

革胡子鲶生长激素全长 cDNA 的克隆与序列分析

张茂群, 陈承勋, 郭永军, 郭 菁, 王晓梅

(天津农学院 水产科学系, 天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 300384)

摘要:通过 RT-PCR 和 RACE-PCR 的方法, 克隆了革胡子鲶生长激素基因全长 cDNA, 其长度为 973 bp, 包含一个 603 bp 的开放阅读框架 (Open reading frame, ORF), 59 bp 的 5' 非编码区和 311 bp 的 3' 非编码区 (含 PolyA 尾 25 bp)。将革胡子鲶 GH cDNA 的 ORF、5' 非编码区和 3' 非编码区的序列分别与同为鲶形目印度囊鳅、巨鲶、南方鲶和鲶的上述序列进行比对分析, 结果表明: 革胡子鲶与上述鱼类生长激素 ORF 的核苷酸与氨基酸序列同源性较高, 平均值分别为 91.2% 和 96.4%, ORF 区核苷酸的碱基替代类型表现出 T/C 转换的偏向性, 平均值为 44.5%, 同时表现出转换/颠换偏差, 平均值为 2.381。5' 和 3' 非编码区序列同源性平均值分别为 75.4% 和 77.0%, 保守性低于编码区。

关键词: 革胡子鲶; 生长激素; RACE; 全长 cDNA; 序列分析

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)06-0027-06

Cloning and Sequence Analysis of Full-length Growth Hormone cDNA from *Clarias gariepinus*

ZHANG Mao-qun, CHEN Cheng-xun, GUO Yong-jun, GUO Jing, WANG Xiao-mei

(Department of Fisheries Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin Key Laboratory of Aqua-Ecology and Aquaculture, Tianjin 300384, China)

Abstract: In this study, the GH full-length cDNA is cloned with the employment of RT-PCR and RACE-PCR techniques, which is 973 bp in length. The total length cDNA includes an open reading frame (ORF) of 603 bp, 5' UTR of 59 bp and 3' UTR of 311 bp (Poly A of 25 bp included). Pairwise and multiple alignments of the sequences of ORF, 5' UTR, 3' UTR of *Clarias gariepinus* GH cDNA with those of *Heteropneustes fossilis*, *Pangasianodon gigas*, *Silurus meridionalis* and *Silurus asotus* are performed using DNAMAN 5.2.2 and MEGA 4.1 software. Sequence alignment analysis indicate that the average homologies are 91.2% and 96.4% separately for ORF nucleotide and amino acid sequence between *Clarias gariepinus* and the 4 species of Siluriforms catfish mentioned above. ORF nucleotide substitution patterns represent the bias of transition between T and C and the average value is 44.5%. Meanwhile, the base substitutions also show transition/transversion bias and the average ratio reaches 2.381. 5' UTR and 3' UTR nucleotide sequence homology are 75.4% and 77.0%, respectively, which are lower conservative than that of ORF nucleotide sequence.

Key words: *Clarias gariepinus*; Growth hormone; RACE; Full-length cDNA; Sequence analysis

革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*), 俗称埃及塘虱, 分类上隶属于鲶形目 (Siluriformes)、胡鲶科 (Clariidae)、胡鲶属 (*Clarias*), 是一种原产于非洲尼罗河流域的淡水鲶类, 具有生长快、食性广、抗病力强、耐低氧、适应性强、营养价值高、味道鲜美等优点, 是一种很有养殖前途的优良高产品种^[1], 于 1981 年从埃及引入我国。

鱼类生长激素 (Growth hormone, GH) 是鱼类脑垂体合成和分泌的一种分子量在 22 kDa 左右的蛋白多肽, 除对鱼类的生长和发育有重要作用^[2], 对鱼类的免疫系统、生殖生理及海水适应性也有着重要的影响^[3]。自 20 世纪 80 年代, 国内外诸多学者对鱼类生长激素基因进行了研究, 斑点叉尾鲶、鲶、鲤等鱼类生长激素基因相继被克隆和表达^[4-14]。同时,

收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点研究项目 (08JCZDJC19000)

作者简介: 张茂群 (1984-), 男, 山东文登人, 在读硕士, 主要从事水产动物分子生物学的研究。

通讯作者: 王晓梅 (1962-), 女, 天津人, 教授, 博士, 主要从事水产动物遗传育种和分子生物学的研究工作。

由于获得全长 cDNA 的技术日渐成熟,多种鱼类生长激素基因全长 cDNA 已被克隆^[15-17],但对革胡子鲶的相关研究未见报道。因此,本研究采用 RACE-PCR 法克隆了革胡子鲶生长激素全长 cDNA,旨在为今后革胡子鲶生长调节的研究积累基础数据,并为进一步利用该基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试革胡子鲶由天津市德仁水产养殖中心提供。

1.2 脑垂体总 RNA 的提取

脑垂体在液氮中研磨成粉末,应用 Trizole 试剂 (Fermentas 公司)提取垂体总 RNA,方法依据产品说明书进行。RNA 真空干燥后溶于 DEPC 处理的水中,再进行完整性和纯度检测。

1.3 生长激素 ORF 的扩增及基因特异性引物设计

1.3.1 cDNA 第一链的合成 应用 RevertAld™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司)合成 cDNA 第一条链,1.5 μg RNA、1 μL Oligo (dT)₁₈,加 DEPC 处理的水至 12 μL,10 000 r/min 离心 5 s,70 ℃ 5 min,冰浴 1 min 后 10 000 r/min 离心 5 s;再加入 4 μL 5 × Buffer、1 μL RNA 酶抑制剂和 2 μL dNTP (10 mmol/L),37 ℃ 5 min 后冰浴 1 min,10 000 r/min 离心 5 s 后加入 1 μL 反转录酶,42 ℃ 60 min,70 ℃ 10 min,4 ℃ 保存备用。

1.3.2 生长激素 ORF 扩增及测序 将上述合成的 cDNA 稀释 10 倍,取 1 μL 作模板,应用引物 N-GHR 序列 CTACAGAGTGCA GTTGAATCCAGGG 和 N-GHF 序列 ATGGCTCAG GTTTTGGTG CTGCT(序列来自文献[18],由上海生工合成),扩增生长激素 ORF 区。25 μL 的反应体系含 1 ×PCR Buffer、Mg²⁺ 2.5 mmol/L、dNTP 200 μmol/L、引物各 0.4 μmol/L、Taq 酶(上海生工)1.5 U。反应过程为 94 ℃ 5 min,然后 94 ℃ 50 s,60 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,进行 26 次循环,72 ℃ 8 min。PCR 产物经凝胶电泳检测后直接测序,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.3.3 基因特异性引物的设计 根据上述测得的革胡子鲶生长激素 ORF 区序列,应用软件 Primer 5.0 设计扩增生长激素 cDNA 3 和 5 端的特异引物,即 3-GSP 和 5-GSP,分别用于扩增生长激素 cDNA 的 3 和 5 端。

1.4 革胡子鲶生长激素全长 cDNA 的克隆

1.4.1 cDNA 第一条链的合成 应用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司)分别合成 3-RACE-Ready cDNA 和 5-RACE-Ready cDNA,其

体系见表 1。

表 1 RACE-Ready cDNA 的扩增体系

Tab.1 Reaction mixtures for amplifying RACE-Ready cDNA

反应组分 Reaction component	3 RACE-Ready cDNA	5 RACE-Ready cDNA
RNA/μg	0.8	0.8
3-CDS primer A(12 μmol/L)/μL	1.0	-
5-CDS primer A(12 μmol/L)/μL	-	1.0
SMART A oligo(12 μmol/L)/μL	-	1.0
加水至总体积 Total volume/μL	5.0	5.0

将上述两个反应管分别进行以下操作:70 ℃ 2 min,冰浴 2 min,加入 2 μL First-Strand Buffer、1 μL DTT (20 mmol/L)、1 μL dNTP (10 mmol/L) 和 1 μL 反转录酶(200 U/μL),混合离心后 42 ℃ 90 min。加入 100 μL Tricine-EDTA,72 ℃ 7 min,-20 ℃ 保存。

1.4.2 生长激素 cDNA 3 和 5 端的扩增 应用 Advantage 2 PCR Kit (Clontech 公司)进行 3 和 5 RACE-PCR,其体系见表 2。

表 2 RACE-PCR 的反应体系

Tab.2 Reaction mixtures of RACE-PCR μL

反应组分 Reaction component	3-RACE- PCR	5-RACE- PCR
3-RACE-Ready cDNA	1.25	-
5-RACE-Ready cDNA	-	1.25
UPM(10 ×)	2.5	2.5
3-GSP(10 μmol/L)	0.5	-
5-GSP(10 μmol/L)	-	0.5
Advantage 2 PCR Buffer (10 ×)	2.5	2.5
dNTP (10 mmol/L)	0.5	0.5
Advantage 2 Polymerase Mix (50 ×)	0.5	0.5
加水至总体积 Total volume	25	25

反应条件为:94 ℃ 30 s、72 ℃ 3 min 5 个循环,然后 94 ℃ 30 s、70 ℃ 30 s、72 ℃ 3 min 5 个循环,最后 94 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s、72 ℃ 3 min 25 个循环。

1.5 3 和 5 RACE-PCR 产物的克隆和筛选以及测序和序列拼接

3 和 5 RACE-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,分别与 pMD19-T 载体(宝生物(大连)有限公司)连接,将连接产物转化至感受态细胞大肠杆菌 DH5,并利用 PCR 法进一步筛选白色菌落(引物序列来自文献[19]),3-RACE-PCR 产物的阳性克隆应用 M13+ 和 M13- 进行双向测序,而 5 RACE-PCR 产物的阳性克隆应用 M13+ 单向测序,测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。应用 DNA-MAN 5.2.2 软件,对所测序列进行拼接与分析。

1.6 同源性分析

应用 DNAMAN 5.2.2 与 MEGA 4.1 软件,将革胡子鲶生长激素 cDNA 的 ORF、5 和 3 非编码序列分别与可在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上检

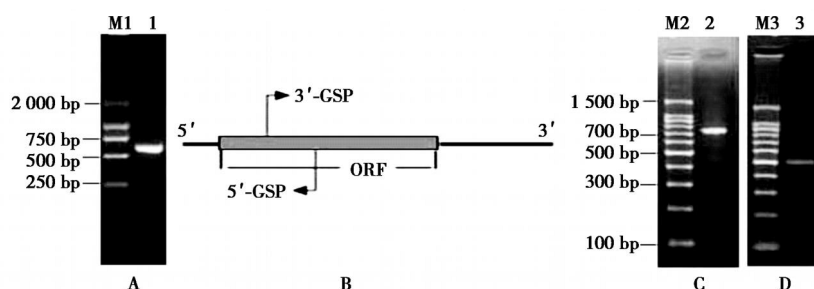
索到的具有生长激素全长 cDNA 序列信息的 4 种鲶形目鱼类,并以鲤形目的鲤为外群,进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 生长激素 ORF 的扩增

本研究扩增革胡子鲇生长激素 ORF 约 600 bp (图 1-A)。经测序分析,该片段长 603 bp。

2.2 生长激素 cDNA 3 和 5 端的扩增



1~3. 分别为生长激素 ORF、3' 和 5' RACE 的扩增结果;M1. DNA Marker-D;M2. 100 bp DNA Ladder I。

1~3. The results of GH ORF, 3' and 5' RACE PCR, respectively;M1. DNA Marker-D;M2. 100 bp DNA Ladder I.

图 1 生长激素 ORF 和 3' 与 5' RACE PCR 的扩增结果(A、C 和 D)以及 3'-GSP 和 5'-GSP 在 ORF 区的位置(B)

Fig. 1 Electrophoresis of the GH ORF, 3' and 5' RACE PCR products(A, C and D) and the positions of 3'-GSP and 5'-GSP designed for amplification of GH 5' UTR and 3' UTR (B)

2.3 3' 和 5' 端扩增片段的克隆测序、全长 cDNA 序列拼接与分析

对 PCR 筛选的阳性克隆进行测序,应用 DNA-MAN 5.2.2 软件对 3' 端片段、5' 端片段以及 ORF 区的序列进行拼接和分析得出:革胡子鲇 GH 全长 cDNA 为 973 bp (包含 PolyA 尾, GenBank 检索号为 FJ823972), ORF 区为 603 bp, 编码 200 个氨基酸 (GenBank 检索号为 ACN97175); 5' 非编码区为 59 bp, 3' 非编码区为 311 bp (含 25 bp 的 PolyA 尾)。图 2 显示了革胡子鲇 GH 全长 cDNA 以及推导的氨基酸序列。

2.4 革胡子鲇与其他鲶形目鱼类生长激素 cDNA 序列的比较

在 GenBank 数据库可以检索到 4 种鲶形目鱼类的生长激素全长 cDNA 序列,分别是囊鳃鲶科囊鳃鲶属的印度囊鳃鲶 (*Heteropneustes fossilis*)、鲇科鲇属的巨鲇 (*Pangasianodon gigas*)、鲇科鲇属的南方鲇 (*Silurus meridionalis*) 和鲇 (*Silurus asotus*)。通过以鲤形目鲤科鲤属的鲤 (*Cyprinus carpio*) 为非鲶形目外科鱼类的代表,将本研究的鲶形目胡鲇科胡鲇属的革胡子鲇 (*Clarias gariepinus*) 同上述鱼类生长激素 cDNA 的 ORF、3' 和 5' 非编码序列进行比对分析。

2.4.1 ORF 区核苷酸序列和氨基酸序列的比较与分析 将本研究获得的革胡子鲇生长激素 ORF 区核苷酸序列和氨基酸序列与已报道革胡子鲇^[18,20]以及上述几种鱼类进行序列比较分析,其生长激素

依据本试验获得的革胡子鲇生长激素 ORF 序列设计基因特异性引物,3'-GSP 序列为:CTCTATC-GAGGCTCCGCGCAGGCA,5'-GSP 序列为:TGCCCATTTTCAGGTCAGCCAGC,其在生长激素 ORF 区的位置见图 1-B。按材料方法所述扩增长生长激素 cDNA 3' 和 5' 端,其长度分别约 740 bp (图 1-C) 和 500 bp (图 1-D)。

ORF 的核苷酸和氨基酸序列间的同源性见表 3,革胡子鲇与其他鲶形目鱼类间的生长激素 ORF 区的碱基替代分析结果见表 4。

表 3 显示,本研究得出的革胡子鲇生长激素 ORF 区与文献[18]和[20]报道的革胡子鲇相比,核苷酸序列的同源性为 99.7%,氨基酸序列则完全相同。鲶形目 5 种鱼类的生长激素 ORF 区核苷酸序列间的同源性为 89.4%~98.8%,鲇与南方鲇的同源性最高为 98.8%;而氨基酸序列的同源性为 95.0%~99.0%,鲇与南方鲇的同源性最高为 99.0%。而鲤生长激素 ORF 区核苷酸序列和氨基酸序列与 5 种鲶形目鱼类相比,同源性分别为 76.9%~78.6%和 76.0%~78.0%。

由表 4 可以看出,本研究得出的革胡子鲇生长激素 ORF 区与文献[18]和[20]报道革胡子鲇、印度囊鳃鲶、巨鲇、南方鲇和鲇相比,碱基替代的个数分别为 2, 41, 46, 62 和 64, 转换/颠换比值分别为 1.000, 2.417, 2.286, 2.263 和 2.556。

2.4.2 5' 和 3' 非编码区序列的比较与分析 革胡子鲇生长激素 cDNA 5' 和 3' 非编码区序列分别为 59 bp 和 311 bp (含 PolyA 尾 25 bp)。不同鱼类生长激素 cDNA 5' 和 3' 非编码区核苷酸序列 (不包含 PolyA) 间的同源性分析见表 5。

表 5 则显示:5 种鲶形目鱼类生长激素 5' 非编码区核苷酸序列间的同源性为 64.0%~100%,印度囊鳃鲶和巨鲇的 5' 非编码区以及鲇和南方鲇的 5' 非

1 GAAAGCCATTGAGACTTCAGTGAGATCTGACAAAGTTTCGTCACAGAGATTGCGCAAAA
60 ATG GCT CGA GTT TTG GTG CTG CTC TCT GTG GTG GTG GCG AGT CTG TTC TTT
1 M A R V L V L L S V V V A S L F F
111 AAT CAA GGC GCG ACA TTT GAG ACC CAG CGG CTC TTC AAC AAC GCG GTC ATC
18 N Q G A T F E T Q R L F N N A V I
162 CGT GTG CAA CAC CTT CAC CAA CTG GCT GCC AAG ATG ATG GAT GAC TTT GAA
35 R V Q H L H Q L A A K M M D D F E
213 GAA GCT TTG TTA CCT GAA GAA CGC AAA CAG CTG AGC AAG ATC TTC CCC CTG
52 E A L L P E E R K Q L S K I F P L
264 TCA TTC TGC AAC TCT GAC TCT ATC GAG GCT CCG GCA GGC AAG GAC GAG ACC
69 S F C N S D S I E A P A G K D E T
315 CAG AAA AGC TCC GTG CTG AAA CTG CTG CAC ACA TCT TAT CGT CTG ATC GAG
86 Q K S S V L K L L H T S Y R L I E
366 TCA TGG GAG TTC CCC AGC AAG AAC CTG GGC AAC CCT AAC CAT ATC TCT GAA
103 S W E F P S K N L G N P N H I S E
417 AAG CTG GCT GAC CTG AAA ATG GGC ATC GGT GTG CTT ATT GAG GGA TGT GTG
120 K L A D L K M G I G V L I E G C V
468 GAT GGA CAA ACC AGC CTG GAC GAG AAT GAC GCA TTT GCT CCG CCC TTC GAG
137 D G Q T S L D E N D A F A P P F E
519 GAT TTC TAC CAG ACC CTG AGC GAG GGG AAC TTG AGG AAG AGC TTC CGT CTG
154 D F Y Q T L S E G N L R K S F R L
570 CTG TCT TGC TTT AAG AAA GAC ATG CAC AAA GTG GAG ACT TAT CTC AGC GTG
171 L S C F K K D M H K V E T Y L S V
621 GCC AAG TGC AGG AGA TCC CTG GAT TCC AAC TGC ACT CTG TAG
188 A K C R R S L D S N C T L *
663 GGGGCGCGTTAGAGTGAGCAGCATTTAGCCACAGCCTGGGATCTGAGACAGGTTTT
719 GGGTTTTAGACTTTTAGGATTTTTATTTTTTTTGTAGTATTCAGGTGTGGTTAAACG
775 TATCAGCCTTTTTCACCTTATACTTTATGTATTTATCCTGCTCCTCAAGGAGAACT
831 CCTCCCATCACACATTTTGCAGATTTCTCTCTCTTTGCAACTTCAGGGTTGTAATA
887 TGGGACCAATTTTACAATGGTGCTACGCAAAAACAAATTCGGCTTTATATCAAACA
943 ATGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

终止密码子用 * 号标记,下划线部分为3和5非翻译区。

The stop coden is marked by * and 3 and 5 untranslated regions are underlined.

图2 革胡子鲶生长激素全长 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of Clarias gariepinus GH full-length cDNA and the predicted amino acid sequence

表3 不同鱼类 GH ORF 核苷酸序列和氨基酸序列的同源性

Tab. 3 The homologies of GH ORF nucleotide and amino acid sequences among different fishes							%
种类 GenBank 检索号	革胡子鲶 FJ823972 *	革胡子鲶 EF411172 **	印度囊鳃鲶 AF147792	巨鲶 L27835	南方鲶 AF530481	鲶 AY157496	鲤 EU147277
革胡子鲶 FJ823972 *		100	98.0	97.0	95.5	95.0	77.0
革胡子鲶 EF411172 **	99.7		98.0	97.0	95.5	95.0	77.0
印度囊鳃鲶 AF147792	93.2	93.2		98.0	95.5	95.0	76.0
巨鲶 L27835	92.4	92.4	96.4		97.5	96.5	78.0
南方鲶 AF530481	89.7	89.6	91.7	94.0		99.0	78.0
鲶 AY157496	89.4	89.2	91.4	93.4	98.8		77.5
鲤 EU147277	76.9	76.6	77.4	78.6	78.4	78.1	

注：*. 为本研究获得的结果；**. 引自文献[18]和[20]。对角线下为核苷酸序列的同源性,对角线上为氨基酸序列的同源性。
Note :Obtained results in this paper are marked by *,results marked by ** are reported in the references [18] and [20]. The data below diagonal are the homologies of ORF nucleotide sequence ,while the data above diagonal are the homologies of the GH amino acid sequence.

编码区完全相同;3 非编码区核苷酸序列间的同源性为 56.8 %~98.3 % ,鲶和南方鲶的同源性最高为 98.3 %。鲤生长激素 5 非编码区和 3 非编码区与 5 种鲶形目鱼类相比 ,同源性分别为 40.6 %~41.7 % 和 38.6 %~44.0 %。

3 讨论

本研究获得的革胡子鲶与鲶形目 4 种鱼类相比较 ,生长激素 ORF 区都为 603 bp ,编码 200 个氨基

酸;与文献已报道的革胡子鲶序列^[18,20]生长激素 ORF 核苷酸相比较 ,除第 219 位发生 G、T 间的颠换 ,第 576 位发生 G、A 间的转换外 ,其余均相同 ,而氨基酸序列完全相同;与印度囊鳃鲶相比 ,有 41 个碱基替代 ,其中 T、C 间的转换占 43.9 % ,转换/颠换比值为 2.417;与巨鲶相比 ,46 个位置出现碱基替代 ,T、C 间的转换占 50.0 % ,转换/颠换比值为 2.286;与南方鲶相比 ,62 个位置出现碱基替代 ,T、C 间的转换占 41.9 % ,转换/颠换比值为 2.263;与鲶相比 ,64

表 4 本研究获得的革胡子鲶与其他鲶形目鱼类 GH ORF 的碱基替代分析

Tab.4 Base substitution analysis of *Clarias gariepinus* GH ORF sequence obtained in this paper with those of some other Siluriformes fishes

			革胡子鲰 EF411172 **	印度囊鳃鲰 AF147792	巨 鲰 L27835	南方鲰 AF530481	鲰 A Y157496
ORF 区长度/ bp			603	603	603	603	603
碱基替代数/ 个			2	41	46	62	64
	T	C	-	18	23	26	27
	G	A	1	11	9	17	20
	C	A	-	4	3	5	4
	C	G	-	3	2	5	4
	A	T	-	2	3	4	3
	G	T	1	3	6	5	6
转换/ 颠换			1. 000	2. 417	2. 286	2. 263	2. 556

注：**文献[18]和[20]报道的革胡子鲶生长激素 ORF 序列。
Note :Result marked by ** is *Clarias gariepinus* GH ORF sequence reported in the references [18] and [20].

表 5 不同鱼类 GH cDNA 5 和 3 非编码区序列间的同源性

Tab.5 5 and 3 untranslated region sequences homologies among different fishes

种类 GenBank 检索号	革胡子鲶 FJ823972 *	印度囊鳃鲶 AF147792	巨鲶 L27835	南方鲶 AF530481	鲶 AY157496	鲤 EU147277
革胡子鲶 FJ823972 *		83. 9	81. 0	71. 3	71. 8	43. 3
印度囊鳃鲶 AF147792	86. 2		72. 9	57. 4	56. 8	40. 9
巨鲶 L27835	86. 2	100. 0		58. 2	58. 4	38. 6
南方鲶 AF530481	65. 3	71. 4	71. 4		98. 3	44. 0
鲶 AY157496	64. 0	70. 0	70. 0	100. 0		43. 2
鲤 EU147277	41. 7	41. 7	41. 7	40. 6	40. 6	

注:对角线下为 5 非编码区序列的同源性,对角线上为 3 非编码区序列的同源性。
Note :The data below diagonal are the homologies of 5 untranslated region sequence ,while the data above diagonal are the homologies of 3 untranslated region sequence.

个位置出现碱基替代,T、C 间的转换占 42. 2 % ,转换/颠换比值为 2. 556。碱基替代可能由多种因素引起,如 DNA 合成酶的严谨性、错配修复酶的保真性和理化因素影响等,而现在大量的研究认为,生物体基因组的碱基构成也会影响碱基的变异^[21]。核苷酸替代是新物种产生的动力之一,在碱基替代中,如果各种类型转换和颠换的发生频率相同,则转换与颠换的比值应等于 0. 5,但往往高于此值,表现出转换偏差^[22]。发生转换/颠换比值为 2 左右,主要是因为 CpG 二核苷酸的胞嘧啶是最易发生突变的位点,胞嘧啶可发生甲基化脱去氨基而形成胸腺嘧啶^[23]。本研究获得的革胡子鲶生长激素 ORF 与鲶形目 4 种鱼类相比,T、C 间的转换占碱基总替代数的 40 % 以上,转换与颠换的平均比值为 2. 381,表现出了明显的核苷酸转换偏差和 T、C 间转换的偏向性。杨学明等^[18,20]对革胡子鲶、本地胡子鲶、越南鲶、大口鲶、鲶、斑点叉尾鲶和黄颡鱼七种鲶形目鱼类生长激素 ORF 区核苷酸序列和氨基酸序列进行了同源性比较,发现鲶形目鱼类生长激素核苷酸序列和氨基酸序列的同源性很高,平均值为 92. 4 % 和 95. 8 % ,与本研究结果相符。说明鲶形目鱼类生长激素的 ORF 序列在不同科属间是相当保守的,但也

存在一定差异。鲤形目的鲤与鲶形目鱼类相比,生长激素 ORF 核苷酸序列和氨基酸序列的同源性都较低,平均值分别为 77. 9 % 和 77. 3 % 。对已经克隆的鱼类生长激素基因序列分析发现,同一目不同科属的鱼类之间,生长激素基因 ORF 序列具有高度的同源性,但不同目鱼类的生长激素基因序列的同源性明显下降^[24],本研究也得到了相同结果。研究还发现,鲶形目鱼类间生长激素氨基酸序列的同源性要高于核苷酸序列,原因可能是遗传密码具有简并性,简并性是遗传密码的基本特性之一,它对降低因 DNA 的突变而引起的翻译误差、保持物种的稳定性具有重要的生物学意义^[25]。但革胡子鲶与鲤间生长激素氨基酸序列的同源性要略低于核苷酸序列,原因将进一步分析。

革胡子鲶、印度囊鳃鲶、巨鲶、南方鲶、鲶和鲤生长激素的 5 非编码区序列分别为 59,58,58,52,53,36 bp ;3 非编码区序列(不包含 PolyA)分别为 286,456,515,415,410,495 bp。革胡子鲶与上述鱼类生长激素 5 非编码区的同源性分别为 86. 2 % ,86. 2 % ,65. 3 % ,64. 0 % ,41. 7 % ,印度囊鳃鲶和巨鲶的同源性及鲶和南方鲶的同源性最高为 100 % ;3 的同源性分别为 83. 9 % ,81. 0 % ,71. 3 % ,71. 8 % ,43. 3 % ,鲶和南方鲶的

同源性仍然最高,为 98.3%。鲤与五种鲶形目鱼类 5 端和 3 端非编码区序列同源性较低,平均值分别为 41.3%和 42.0%。结果说明,上述五种鲶形目鱼类间生长激素非编码区序列的长度和碱基组成差异都比较明显,与 ORF 序列相比则保守性降低,表明鱼类间的亲缘关系越近,非编码区的差异越小。

鱼类的生长与其他脊椎动物相同,是一个复杂的生物代谢过程,受基因型、激素、营养、环境等多方面的影响,对动物生长机理的研究主要从生长轴入手。生长轴是动物体内从下丘脑——垂体——靶器官的一系列激素及其受体所组成的神经内分泌系统^[26],其中生长激素是调控脊椎动物生长的重要内分泌因子,因此,成为研究动物生长最重要的因子,而对生长激素基因的研究也成为分析不同鱼类生长机制差异的基础研究内容之一。故本研究结果不仅为革胡子鲶生长激素基因的研究提供了基础数据,也为探讨革胡子鲶在高密度养殖条件下快速生长的分子机理奠定了基础,为进一步利用该基因提供可能。

参考文献:

- [1] 李恒国,朱兴国,闵宪伟. 高密度集约化革胡子鲶养殖技术[J]. 渔业致富指南, 2006(8): 31 - 32.
- [2] 韦家永,薛良义. 鱼类生长激素的研究概况[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2004(3): 56 - 59.
- [3] 王树启,许友卿,丁兆坤. 生长激素对鱼类的影响及其在水产养殖中的应用[J]. 水产科学, 2005, 24(7): 42 - 46.
- [4] Sekine S, Mizukami T, Nishi T, et al. Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 4306 - 4310.
- [5] Agellon L B, Davies S L, Lin C M, et al. Rainbow trout has two genes for growth hormone [J]. Mol Rep Develop, 1988, 1: 11 - 17.
- [6] 马细兰,张 勇,黄 卫,等. 尼罗罗非鱼生长激素及其受体的 cDNA 克隆与 mRNA 表达的雌雄差异[J]. 动物学报, 2006, 52(5): 924 - 933.
- [7] May D, Alrubaian J, Patel S, et al. Studies on the GH/SL gene family: cloning of African lungfish (*Protopterus annectens*) growth hormone and somatolactin and Toad (*Bufo marinus*) growth hormone [J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 113: 121 - 135.
- [8] Ayson F G, de Jesus E G T, Amemiya Y, et al. Isolation, cDNA cloning, and growth promoting activity of rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone [J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 117: 251 - 259.
- [9] Tang Y, Lin C M, Chen T T, et al. Structure of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene and its evolutionary implications [J]. Mol Marine Biol Biotechnol, 1993, 2(4): 198 - 206.
- [10] Lemaire C, Warit S, Panyim S. Giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone-encoding cDNA: cloning and sequencing by one-side polymerase chain reaction [J]. Gene, 1994, 149(2): 271 - 276.
- [11] 张为民,张 勇,李 欣,等. 斜带石斑鱼生长激素 cDNA 克隆及其在大肠杆菌的融合表达 [J]. 水产学报, 2003, 27(5): 392 - 396.
- [12] 杜启艳,陈丽丽,南 平,等. 鲶生长激素基因 cDNA 的克隆和原核表达 [J]. 水产科学, 2007, 26(4): 195 - 199.
- [13] Johansen B, Johnsen O C, Valla S. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Gene, 1989, 77: 317 - 324.
- [14] Chao S C, Pan F M, Cheng W C. Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA [J]. Biochim Biophys Acta, 1989, 1007(2): 233 - 236.
- [15] Zhang J N, Song P, Hu J R, et al. Molecular cloning and sequence analysis of full-length growth hormone cDNAs from six important economic fishes [J]. Acta Genetica Sinica, January 2005, 32(1): 19 - 29.
- [16] 高春生,范光丽,杨国宇,等. 淇河鲫生长激素 (growth hormone) 全长 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. 分子科学学报, 2008, 24(1): 21 - 26.
- [17] 宋 平,胡隐昌,向 筑,等. 南方鲶生长激素完整 cDNA 的克隆及其 DNA 序列的分析 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(3): 272 - 279.
- [18] 杨学明,张 立,黄光华,等. 革胡子鲶生长激素基因克隆与序列同源分析 [J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 483 - 486.
- [19] Kao F T, Yu J W. Chromosome microdissection and cloning in human genome and genetic disease analysis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 88(3): 1844 - 1848.
- [20] 杨学明,何荆洲,黄雄军,等. 革胡子鲶生长激素 cDNA 克隆与蛋白质结构分析 [J]. 遗传, 2008, 30(7): 913 - 918.
- [21] 唐 萍,王 强,陈建群. 茄科植物叶绿体基因组插入、缺失和核苷酸替代的发生方式及影响 [J]. 遗传, 2008, 30(11): 1506 - 1512.
- [22] Collins D W, Jukes T H. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence [J]. Genomics, 1994, 20(3): 386 - 396.
- [23] 刘福平,白俊杰. 单核苷酸多态性及其在水产动物遗传育种中的应用 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 704 - 712.
- [24] 王 伟,汪亚平,朱作言. 鱼类生长激素基因工程研究 [J]. 自然科学进展, 2002, 12(5): 456 - 460.
- [25] 马 飞,武耀廷,徐晓风. 遗传密码子和氨基酸若干物理化学特性的相关性研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(4): 439 - 445.
- [26] 刘建文,施用晖,乐国伟. 动物生长轴的激素调控 [J]. 中国饲料, 2003(14): 7 - 9.