

暗纹东方鲀生长激素基因 克隆与同源性分析

严美姣¹, 吴旭¹, 李钟杰²

(1. 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002; 2 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:克隆获得暗纹东方鲀 GH 基因, 该基因包含 6 个外显子和 5 个内含子, 在此基础上获得其 cDNA 序列, 共有 591 bp, 编码 196 个氨基酸。将该 cDNA 序列转换成蛋白质序列后, 结合 NCB 数据库中得到的其它 24 种脊椎动物生长激素基因的蛋白质序列, 运用 MEGA 3.1, 以 UPGMA 法构建东方鲀等 25 种脊椎动物的生长激素基因进化树, 14 种鱼类中除了鳗鲡和鲢鱼外聚为一大类, 其它动物中哺乳动物、反刍动物、家禽、爬行动物、人以及鳗鲡等聚为另一大类, 暗纹东方鲀与红鳍东方鲀生长激素基因的氨基酸同源性达到 100%, 与斗鱼、杜父鱼、金鲈生长激素基因的氨基酸同源性达到 70% 以上, 与人的生长激素基因的氨基酸同源性也达到 40%; 斑马鱼、草鱼、鲟鱼以及鲤鱼之间生长激素基因的氨基酸同源性在 85% 以上; 哺乳动物、反刍动物、家禽的生长激素基因的氨基酸同源性在 90% 左右。从进化树的结果来看, 与传统分类学研究结果基本一致, 为进一步研究 GH 基因在胚胎发育及个体生长中的功能奠定基础。

关键词:暗纹东方鲀; 生长激素基因 (GH); 分子克隆; 序列分析

中图分类号: S965.225 文献标识码: A 文章编号: 1000 - 2286(2010)02 - 0236 - 07

Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Takifugu fasciatus* GH gene

YAN Mei-jiao¹, WU Xu¹, LI Zhong-jie²

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China)

Abstract: GH gene in *Takifugu fasciatus* was cloned, and there were 6 exons and 5 introns in the GH gene, 196 amino acids were coded. The sequences of cDNA were brought out based on the structure of GH gene. The acid sequences of GH gene in *Takifugu*, combined with other 24 vertebrate species were obtained from the Gene Bank, and the phylogenetic tree of GH gene was constructed with MEGA 3.1 using UPGMA method. In the UPGMA consensus tree, 25 species were divided into two clusters. The results were found agreeing with those by traditional classification, which establishes a good foundation for further studies on GH gene functions in the embryonic development and the body growth.

Key words: *Takifugu fasciatus*; GH gene; molecular cloning; sequence analysis

生长激素 (growth hormone, GH) 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种约 200 个氨基酸的单一肽链蛋白质激素。GH 不但能增强鱼体食欲, 促进饵料转化率, 提高生长速率^[1], 在鱼类能量代谢、渗透压、性成熟、行为以及免疫力等方面也起着重要调节作用^[2-3]。对生长激素基因的研究越来越受到重视, 迄今已克隆包括人、大鼠、小鼠、牛、鸡、绵羊、罗非鱼、虹鳟、鳗鲡、金枪鱼、牙鲆、鲤鱼等多种脊椎动物

收稿日期: 2009 - 12 - 08 修回日期: 2010 - 03 - 18

基金项目: 福建省教育厅科技项目 (JA09095)、淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题项目 (2008FB014) 和福建农林大学青年教师基金项目 (08B16)

作者简介: 严美姣 (1974 -), 女, 副教授, 博士, 主要从事鱼类生理与分子生态研究, E-mail: yanmeijiao@163.com.

在内的 GH 基因。在鱼类方面, Sekine 等最早从大马哈鱼脑垂体 cDNA 文库中克隆了生长激素 cDNA, 并在大肠杆菌中表达^[4]。

鱼类 GH 基因结构主要有 2 种类型。大多数硬骨鱼, 如一些鲑鳟鱼类, 其 GH 基因有 6 个外显子和 5 个内含子, 与哺乳类相比, 多 1 个外显子和 1 个内含子, 且整个基因组长度约为哺乳类两倍^[5-6]。而鲤鱼和草鱼等鲤科鱼以及大麻哈鱼的 GH 基因与前者不同, 只有 5 个外显子和 4 个内含子, 类似哺乳类 GH 基因结构^[7]。东方鲀 (*Takifugu*) 属于前一种, 其 GH 基因含 6 个外显子和 5 个内含子, 共编码 196 个氨基酸, 其整个基因组长度仅为人类基因组的 1/7。其中红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 已列为人类基因组研究的模式动物^[8]。在国内, 对鱼类 GH 基因的研究多集中在草鱼、鲤和鲂等少数几种鲤科和鲂科鱼类^[9], 而对鲀形目鱼类的研究较为少见。

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 属硬骨鱼亚纲、鲀形目、鲀科、东方鲀属 (*Takifugu*), 系北太平洋西部地区性分布的鱼类。东方鲀属约 22 种, 多为中国特有地方种类, 分布范围较窄、分化较大。河鲀向来以肉味鲜美著称, 我国素有“拼死吃河鲀”之说; 在日本, 人们喜食河鲀的习俗已有数百年, 因其肉味腴美而被称为“鱼中之王”。本文报道了暗纹东方鲀生长激素全长 cDNA 克隆与序列分析, 并就此推导出的氨基酸序列与其他动物生长激素进行同源比较分析。为东方鲀属不同种间的亲缘关系确定提供分子水平的依据, 并为该基因在动物生产中的应用奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 取样于泰州靖江特种水产养殖场。质粒载体 pMD19-T vector 凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司; 琼脂糖、氯化钙、氯仿等购自上海生物工程公司; *E. coli* DH5 菌株为本实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 样品总 DNA 提取 将尾鳍组织 (约 100 mg) 剪碎后加入 500 μ L 组织裂解液, 剪取组织样时用于剪取不同个体的解剖剪严格清洗并分开, 防止交叉污染。采用常规酚仿法抽提 DNA, 具体操作参照 Sambrook^[10]的方法, 稍做改动。

1.2.2 PCR 扩增 参考红鳍东方鲀生长激素基因 DNA 全序列 (GenBank 登录号为: FRU63807) 和其他物种的 GH 基因全序列, 采用 Primer 5.0 引物设计软件, 设计 1 对引物扩增暗纹东方鲀 GH 基因。GH 基因引物对 *fGH*/*rGH* (由上海生物工程公司合成) 序列如下: *fGH*: (5' - AAA GAG ATG AGC CAC CGA AGT - 3'); *rGH*: (5' - CCG TGA TGA GAA GTA AGA TAC CTG T - 3')。反应体系为 25 μ L, 含 1 \times PCR Buffer, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 引物对, 1U Taq 酶, 50 ng 模板 DNA。反应循环为 94 预处理 3 min, 94 30 s, 50 30 s, 72 1 min, 共 35 个循环, 最后于 72 延伸 10 min。PCR 产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色后, 在紫外透射灯下观察。Marker 为 DL-2000 (大连 TaKaRa 公司)。

1.2.3 PCR 产物纯化、克隆及序列测定 PCR 产物纯化采用凝胶回收试剂盒 (Promega 公司), 具体操作过程参照试剂盒说明书。纯化的 PCR 产物与质粒 pMD19-T Simple vector 4 连接过夜。碱裂解法提纯质粒, 以 1 μ L 重组质粒为模板, 进行 2 次 PCR, 以鉴定重组质粒中含有目的片断, 同时取 10 μ L 质粒 DNA, 经 Hind III 消化, 6 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察酶切产物大小。经双重鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司 ABI Prism 377 DNA 自动测序仪完成测序。

1.2.4 序列同源性比较 将暗纹东方鲀 GH 基因全长 cDNA 序列与 GeneBank 中登录的鱼类和部分动物 GH 基因进行同源性比较。采用 DNA star, Align R V2.0, Clustal W 进行排列比对, 找出核苷酸出现变化的位置, 分析这些变异产生的原因, 直接统计转换、颠换突变位点数, 计算转换、颠换突变频率以及基因型频率, 并运用 MEGA 3.1 构建分子进化树。

2 结果与分析

2.1 PCR 检测及重组质粒鉴定结果

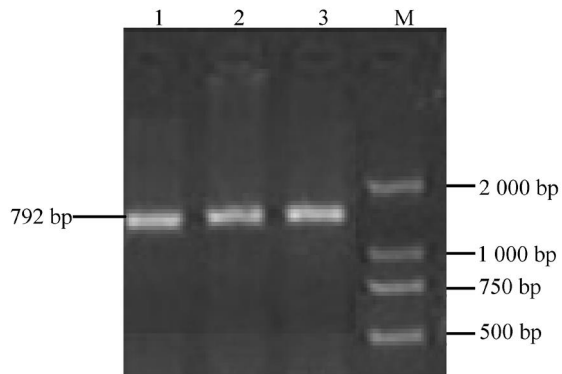
利用引物对 *fGH*/*rGH* 对暗纹东方鲀样本 DNA 进行 PCR 扩增。电泳结果表明, 这对引物 2 次扩增

都获得了 1 条约 1.8 kb 的片段,与引物设计时所预计片段大小 (1 792 bp) 相当。重组质粒 DNA 经 PCR 扩增后均得到与样本总 DNA 扩增片段大小相同产物,大小约为 1 800 bp,说明重组子含有 PCR 产物目标外源片段 (图 1)。

2.2 暗纹东方鲀生长激素基因序列分析

通过得到的暗纹东方鲀 DNA 序列与红鳍东方鲀序列 (GenBank 登录号: FRU63807) 进行比对,得到完整的暗纹东方鲀 cDNA 序列,共有 591 bp,编码 196 个氨基酸。与红鳍东方鲀 GH cDNA 序列相比只有 1 个碱基差异,但编码相同氨基酸。

从 GenBank 数据库中得到有关脊椎动物的生长激素基因的 mRNA 序列以及氨基



M: DNA 分子量标准; 1、2: 样本总 DNA 两次扩增 GH 基因产物; 3: GH 基因重组质粒。

M. DL - 2000 DNA marker; 1, 2 Products of GH; 3. Constructed plasmid of GH gene

图 1 暗纹东方鲀 GH 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig 1 PCR amplification of GH gene from *T. fasciatus*

1	1	MDKVILVLLMSL	GASSQPLTDT	PRLFSMAVSRV	QHLHLAQR	LADFE
2	1	MDKVILVLLMSL	GASSQPLTDT	PRLFSMAVSRV	QHLHLAQR	LADFE
3	1	MARALVILQVYV	SLVYVQGGK	ASENQRLFN	NAVIRVQHL	HQLAAKMI
4	1	MARALVILQVYV	SLVYVQGGK	ASENQRLFN	NAVIRVQHL	HQLAAKMI
5	1	MNRVILVSLV	MVCVGVSSQ	PITENQRLFS	IAGRVQYL	LHLVAKKLT
6	1	MGQVFLMPVLL	VSCFLSQQAA	IENQRLFN	IAVSRVQHL	HLLAQKMI
7	1	MDKVILVLLMSL	GASSQPLTDT	PRLFSMAVSRV	QHLHLAQR	LADFE
8	1	MDRVVLLLVV	CLVSSQPI	ITDGRLFS	IAGRVQHL	HLLAQRL
9	1	MARALVILQVYV	SLVYVQGGK	ASENQRLFN	NAVIRVQHL	HQLAAKMI
10	1	MARVILVSLV	VYVQGGK	ASENQRLFN	NAVIRVQHL	HQLAAKMI
11	1	MASGFLVWP	VLLVSVF	SNVAV	EPISLYN	LFTSAV
12	1	MERAVLLVSL	VSSQPI	ITDGR	LFSIAG	RVQHLHLA
13	1	MARVILVSLV	VYVQGGK	ASENQRLFN	NAVIRVQHL	HQLAAKMI
14	1	MASGLLCPV	LIVLIV	SPKESGAY	PMIPL	SSLFTNAV
15	1	MATGSR	TSLVAFGL	CLPWL	QEGSA	PPTIPL
16	1	MMAAGP	RTSVLLAF	ALLCLP	WQV	GALGAMP
17	1	MAASPR	NSVLLAF	ALLCLP	WPQ	VGAF
18	1	MAAGPR	NSVLLAF	ALLCLP	WPQ	VGTF
19	1	MATDSR	TSLVAFGL	CLPWL	QEGSA	PPTIPL
20	1	MAADSG	TPWLLT	FSLCL	LWPQ	EAGAL
21	1	MMAAGP	RTSVLLAF	ALLCLP	WQV	GALGAMP
22	1	MMAAGP	RTSVLLAF	ALLCLP	WQV	GALGAMP
23	1	MAPGSW	FSPLLIA	VVTE	GLPQ	EAAATF
24	1	MAPGSW	FSPLLIA	VVTE	GLPQ	EAAATF
25	1	MVSGFC	FSPVLLA	VLAISL	QSQQ	EVSA
1	50	SLQTE	EQRQLNKK	FLPFC	FNDS	ITSP
2	50	SLQTE	EQRQLNKK	FLPFC	FNDS	ITSP
3	53	GLMPE	RRQLSKI	FPLS	FCNDS	ITPTG
4	53	NLLPE	RRQLSKI	FPLS	FCNDS	ITPTG
5	51	SQLP	EQHP	LNKI	FLQD	FCHSD
6	53	TLLP	EQRQLN	KI	FLLD	FCNDS
7	51	SLQTE	EQRQLN	KI	FLQD	FCSSDY
8	50	SLQTE	EQRQLN	KI	FLQD	FCNSDY
9	53	SLLP	EQRQLSKI	FPLS	FCNDS	ITPTG
10	53	SLLP	EQRQLSKI	FPLS	FCNDS	ITPTG
11	53	SIPPE	AHRL	QSKT	SPLA	GCYS
12	51	SLQTE	EQRQLN	KI	FLQD	FCNSDY
13	53	ALLP	EQRQLSKI	FPLS	FCNDS	ITPTG
14	58	TYVP	DEQR	HSSKN	SPSA	FCYSET
15	60	AYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
16	61	TYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
17	60	AYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
18	60	AYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
19	60	AYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
20	60	AYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
21	61	TYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
22	61	TYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
23	60	TYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
24	61	SYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET
25	61	TYIPE	EQRY	SIQN	AQAA	FCFSET

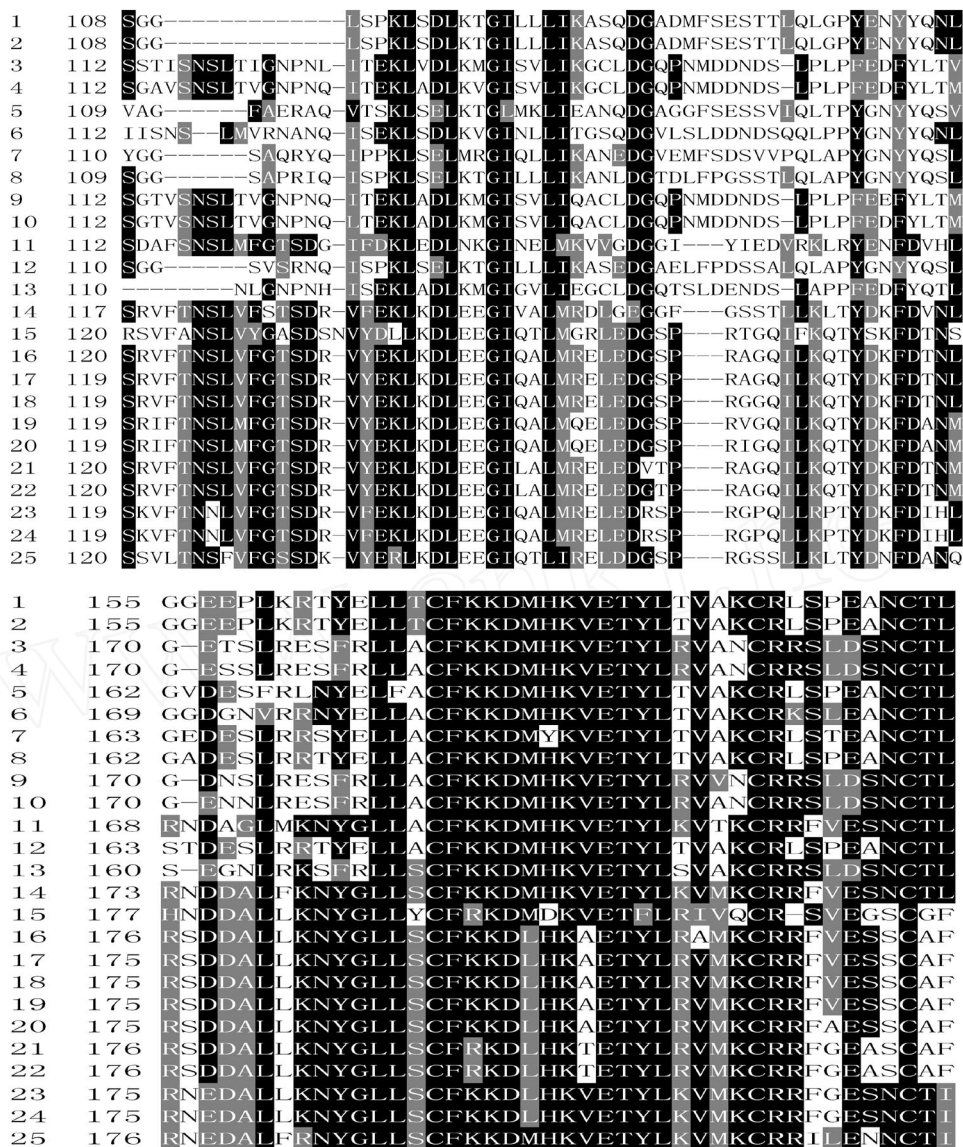


图 2 暗纹东方鲀 GH 与其他动物 GH 氨基酸序列比较

Fig 2 Alignment of the amino acid sequences of Fugu obscurus GH and other animal GHs

酸序列,包括 AJ937858 斑马鱼 (*Danio rerio*), AY616661 草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*), AF086787 大比目鱼 (*Vensper variegatus*), E01334 大马哈鱼 (*Oncorhynchus sp.*), AY873790 斗鱼 (*Betta splendens*), AB079538 杜父鱼 (*Cottus kazika*), AY265352 鲃鱼 (*Carassius auratus gibelio*), AY941176 鳙鱼 (*Acipenser gueldenstaedtii*), AY007303 金鲈 (*Perca flavescens*), CYIGH 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*), AY148493 鳗鲡 (*Anguilla anguilla*), PGSGHA 鲟鱼 (*Pangasianodon gigas*), BC090045 人 (*Homo sapiens*), AF069071 狗 (*Canis familiaris*), NM_001009337 猫 (*Felis catus*), NM_213869 野猪 (*Sus scrofa*), NM_001034848 褐鼠 (*Rattus norvegicus*),

BC061157小鼠 (*Mus musculus*), X15976 绵羊 (*Ovis aries*), DQ184480 牛 (*Bos taurus*), NM_204359 鸡 (*Gallus gallus*), X07079 鸭 (*Anas platyrhynchos*), AY333114 蝾螈 (*Ambystoma barbouri*)。各种动物生长激素氨基酸序列比较见图 2。

图 2 表明整个生长激素家族有 3 个明显的氨基酸序列保守区 (以所有参比的氨基酸序号为标准): 第 36 个氨基酸到第 70 个氨基酸、第 79 个氨基酸到第 156 个氨基酸、第 183 个氨基酸到最后一个氨基酸。这 3 个保守区氨基酸有如下特点:氨基酸数量十分保守;超过半数的氨基酸排列相同,另约 1/3 的氨基酸排列表现出类群特异性,即在鱼类、鸟类和哺乳类各类群中这些氨基酸排列仍然相同;那些具有类群特异性的氨基酸在性质上仍然相同或相近,即类群间这些氨基酸的变异是一种性质相同或相近氨基酸间的互换。如 GH 最后一个保守区内的一段十分保守序列 (以所有参比的氨基酸序号为标准:从第 165 个氨基酸到第 182 个氨基酸),鱼类为 CFKKDMHKVETYL (除斗鱼第 171 个氨基酸为 Y),人为 CFRKMDKVEHL,哺乳动物为 CFKKDLHKAETYL,禽类为 CFKKDLHKVETYL,蝾螈为 CFKKDMHKVETYL。这些改变的氨基酸 (如 K - R 和 H - D) 均为带电荷的氨基酸,而 M - L, V - A 和 Y - F 都为疏水性氨基酸。

通过 ClustalW 排列,结果输入 MEGA 3.1,根据序列差异,用 Kimura 的两参数法计算遗传距离 (表 1),并用 UPGMA 法构建分子系统树 (图 3)。结果表明,各种动物的遗传距离总体上差异较大,但在鱼类或哺乳动物之间差异相对小一些,在 UPGMA 系统进化树中,25 种脊椎动物分为两大类:第 1 大类包括野猪、狗、猫、褐鼠、小鼠、绵羊、牛、鸡、鸭、蝾螈、鳗鲡、鲮鱼和人;第 2 大类包括暗纹东方鲀、红鳍东方鲀、斑马鱼、草鱼、大比目鱼、大马哈鱼、斗鱼、杜父鱼、鲟鱼、金鲈、鲤鱼和鳊鱼。第 1 大类中,哺乳动物 (猪、狗、猫、褐鼠、小鼠) 先聚为一类,逐次与反刍动物 (绵羊、牛)、家禽 (鸡、鸭)、爬行动物 (蝾螈)、鲮鱼、人以及鳗鲡聚为一大类。第 2 大类中,杜父鱼与金鲈首先聚为一类,然后逐次与斗鱼和东方鲀 (暗纹东方鲀和红鳍东方鲀) 聚为第 1 类;斑马鱼与草鱼,鲟鱼与鲤鱼各自先聚为一类,然后与大马哈鱼和鳊鱼聚为第 2 类。

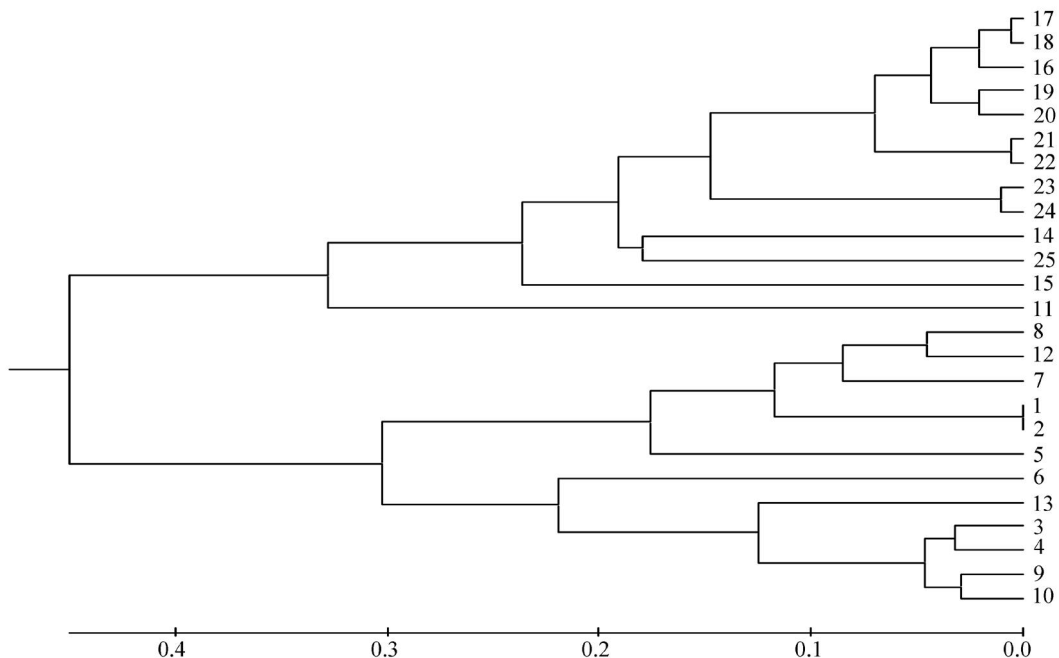


图 3 UPGMA 法构建的脊椎动物生长激素系统进化树

Fig 3 Phylogenetic trees based of GHs using UPGMA method

通过图 2、图 3 和表 1,可以间接说明得到的基因为暗纹东方鲀生长激素基因,它与红鳍东方鲀生长激素基因的氨基酸同源性达到 100%,与斗鱼、杜父鱼、金鲈生长激素基因的氨基酸同源性达到 70% 以上,与人的生长激素基因的氨基酸同源性也达到 40%;斑马鱼、草鱼、鲟鱼以及鲤鱼之间的生长激素基因的氨基酸同源性在 85% 以上;哺乳动物 (猪、狗、猫、褐鼠、小鼠)、反刍动物 (绵羊、牛)、家禽 (鸡、鸭) 内的生长激素基因的氨基酸同源性在 90% 左右。这些结果与传统分类学的结果基本一致。

表 1 依据氨基酸序列采用 ClustalW 排列计算的各种动物生长激素遗传距离

Tab 1 Amino acid sequence identity of GHs using ClustalW method

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
1																									
2	0.00																								
3	0.45	0.45																							
4	0.44	0.44	0.03																						
5	0.57	0.57	0.31	0.38																					
6	0.47	0.47	0.33	0.29	0.38																				
7	0.37	0.37	0.44	0.47	0.28	0.51																			
8	0.18	0.18	0.38	0.37	0.34	0.35	0.17																		
9	0.54	0.54	0.07	0.04	0.43	0.32	0.53	0.45																	
10	0.55	0.55	0.13	0.06	0.48	0.28	0.58	0.48	0.04																
11	0.77	0.77	0.37	0.42	0.40	0.52	0.67	0.63	0.47	0.56															
12	0.28	0.28	0.61	0.60	0.50	0.71	0.13	0.16	0.73	0.73	0.94														
13	0.49	0.49	0.14	0.14	0.26	0.43	0.48	0.44	0.21	0.23	0.35	0.61													
14	0.23	0.23	0.24	0.22	0.29	0.38	0.31	0.23	0.25	0.29	0.35	0.43	0.18												
15	0.40	0.40	0.37	0.37	0.54	0.59	0.44	0.39	0.41	0.46	0.86	0.51	0.49	0.35											
16	0.71	0.71	0.60	0.49	0.78	0.84	0.73	0.65	0.48	0.47	0.87	0.77	0.44	0.36	0.44										
17	0.79	0.79	0.57	0.47	0.71	0.84	0.72	0.69	0.45	0.44	0.83	0.79	0.40	0.36	0.44	0.02									
18	0.67	0.67	0.47	0.39	0.61	0.73	0.64	0.58	0.38	0.39	0.74	0.72	0.34	0.30	0.32	0.03	0.02								
19	0.66	0.66	0.54	0.47	0.64	0.87	0.58	0.64	0.46	0.47	0.83	0.64	0.39	0.34	0.38	0.06	0.05	0.06							
20	0.87	0.87	0.81	0.70	0.97	1.08	0.90	0.90	0.70	0.68	1.08	0.91	0.63	0.56	0.51	0.08	0.10	0.12	0.07						
21	0.63	0.63	0.52	0.48	0.77	0.82	0.80	0.63	0.54	0.56	0.86	0.80	0.54	0.42	0.29	0.16	0.21	0.15	0.21	0.22					
22	0.67	0.67	0.57	0.52	0.83	0.87	0.85	0.67	0.57	0.58	0.91	0.83	0.55	0.46	0.32	0.13	0.18	0.13	0.20	0.18	0.01				
23	0.64	0.64	0.46	0.45	0.67	0.77	0.81	0.69	0.46	0.51	0.47	0.89	0.45	0.32	0.42	0.26	0.26	0.21	0.27	0.30	0.19	0.22			
24	0.62	0.62	0.46	0.44	0.63	0.76	0.77	0.70	0.47	0.51	0.45	0.85	0.41	0.30	0.41	0.27	0.26	0.22	0.25	0.28	0.23	0.25	0.02		
25	0.59	0.59	0.34	0.29	0.57	0.65	0.40	0.44	0.26	0.35	0.51	0.58	0.45	0.28	0.39	0.37	0.36	0.32	0.34	0.55	0.43	0.47	0.39	0.40	

表中各物种的缩写详见图 2 图注。

Abbreviations of the species are shown in Fig 2.

3 讨 论

目前利用 PCR 技术研究系统进化问题,已覆盖到许多动物类群,并取得许多令人信服的结果。这些研究结果为解决动物的系统分类和进化中存在的问题提供有力证据。张竞男等^[11]通过 RT-PCR、5'-RACE、5'-RACE 方法,从 6 种重要经济鱼类——大眼鲷、石斑鱼、黄鳍、鲈鱼、泥鳅和方正银鲫中克隆了生长激素 cDNA 序列;并基于这 6 种鱼类序列的编码区和其它鱼类的 GH 编码序列进行分析,结果(MP 和 NJ 树)与根据形态特征构建的系统发育树基本一致,特别是在硬骨鱼类较大分类阶元(目间、目以上)的系统发育研究方面比较一致,虽然还存在一定差异,但进一步说明生长激素基因编码区应该在硬骨鱼类系统发育研究领域得到更多的重视^[11]。

从分子水平研究进化机制是鱼类研究的一个重要内容,生长激素基因是一个相对保守的基因。本次实验克隆了暗纹东方鲀生长激素基因并得到了 cDNA 序列,结合 NCBI 数据库中其它 24 种脊椎动物的 GH 基因 cDNA 序列以 UPGMA 法构建了分子进化树,在一定程度上反映它们的亲缘关系。14 种鱼类中除了鳗鲡和鳊鱼外聚为一大类,其它的动物中哺乳动物、反刍动物、家禽、爬行动物、人以及鳗鲡等聚为另一大类。暗纹东方鲀与红鳍东方鲀生长激素基因的氨基酸同源性达到 100%,与斗鱼、杜父鱼、金鲈生长激素基因的氨基酸同源性达到 70% 以上,与人的生长激素基因的氨基酸同源性也达到 40%;斑马鱼、草鱼、鲮鱼以及鲤鱼之间的生长激素基因的氨基酸同源性在 85% 以上;哺乳动物、反刍动物、家禽内的生长激素基因的氨基酸同源性在 90% 左右。这些结果与宋平等在研究南方鲇生长激素基因 cDNA 序列的结果基本一致,他们通过氨基酸序列比较发现,南方鲇 GH 与 *Pangasianodon gigas*, *Ictalurus punctatus* 和 *Heteropneustes fossilis* 3 种鲇类的同源性分别为 97.5%, 97.5% 和 95.0%,与鲢鱼、鳊鱼、草鱼、鲫鱼和鲤鱼 GH 同源性达 76.0% 以上,而与人 GH (I, II) 同源性最低,为 31.0% 和 29.5%^[9]。

GH 基因是胚胎生长发育过程中重要的发育调控因子,包括肢体的发育、细胞的定向分化、信号传导等。本研究克隆了暗纹东方鲀 *GH* 基因,并且对其氨基酸序列进行分子系统进化树的量化分析,*GH* 基因分子系统进化树所表现出的物种之间的亲缘关系与传统分类学研究的结果一致。研究表明:*GH* 基因可以作为一种可靠的分子信标基因用于动物分类研究;同时,由于暗纹东方鲀品种间生长表型存在差异,特别是一些土著品种生长比较缓慢,要分析生长激素对暗纹东方鲀生长速度的影响,通过转生长激素基因可解决这一问题。根据 Rahman 等人的观点,转植生长激素基因与受体生长激素基因的同源性越高,转植生长激素基因促生长作用越明显。据报道,转植 *GH* 基因能有效促进罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的生长^[12],并能显著加强食物转化效率、合成能力、代谢强度和平均蛋白合成等^[13]。因此暗纹东方鲀生长激素基因的克隆,为利用生长激素基因改良暗纹东方鲀生长性状奠定基础。

参考文献:

- [1] Peter R E, Marchant T A. The endocrinology of growth in carp and related species[J]. Aquaculture, 1995, 129: 299 - 321.
- [2] Saunders R L, Fletcher G L, Hew C L. Smolt development in growth hormone transgenic Atlantic salmon[J]. Aquaculture, 1998, 168: 177 - 193.
- [3] Johansson V, Winberg S, Jönsson E, et al. Peripherally administered growth hormone increases brain dopaminergic activity and swimming in rainbow trout[J]. Hormones and Behavior, 2004, 46(4): 436 - 443.
- [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(13): 4306 - 4310.
- [5] Agellon L B, Chen T T. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*[J]. DNA, 1986, 5(6): 463 - 471.
- [6] 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(2): 317 - 324.
- [7] ZHU Z, HE L, CHEN T T. Primary - structural and evolutionary analyses of the growth - hormone gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Eur J Biochem, 1992, 207(2): 643 - 648.
- [8] Byrappa Venkatesh, Sydney Brenner. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu nubiipes*) growth hormone - encoding gene: A comparative analysis of teleost growth hormone genes[J]. Gene, 1997, 187(3): 211 - 215.
- [9] 宋平, 胡隐昌, 向筑, 等. 南方鲇生长激素完整 cDNA 的克隆及其 DNA 序列分析 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(3): 272 - 280.
- [10] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- [11] 张竞男, 宋平, 胡珈瑞, 等. 6 种重要经济鱼类生长激素完整 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 遗传学报, 2005, 32(1): 19 - 29.
- [12] Rahman M A, Maclean N. Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene [J]. Aquaculture, 1999, 173(124): 333 - 346.
- [13] Martínez R, Juncal J, Zaldívar C, et al. Growth efficiency in transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*) carrying a single copy of an homologous cDNA growth hormone [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications [J]. 2000, 267(1): 466 - 472.