

文章编号: 1004 - 7271(2006)02 - 0129 - 07

## 异育银鲫促甲状腺激素 $\beta$ 亚基 基因的克隆及序列分析

曲宪成, 杨艳红, 刘颖

(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**利用 RT-PCR、RACE 及克隆等方法获得了异育银鲫促甲状腺激素  $\beta$  亚基(TSH  $\beta$ )基因全长 cDNA 序列。该 cDNA 全长 926 bp, 5' 端非编码区 68 bp; 3' 端非编码区 372 bp; 开放阅读框(ORF)486 bp, 编码 161 个氨基酸。经序列分析显示, 其编码的氨基酸序列与金鱼[*Carassius auratus* (goldfish)]、鲤(*Cyprinus carpio*)、鲢(*Aristichthys nobilis*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Salmo gaidnerii*)、鲑(*Salmo salar*)、鳗鲡(*Anguilla anguilla*)具有较高的相似性, 其相似性分别为 91.3%、87.6%、83.2%、77%、58.6%、56.1%、43.55%, 同源性较高, 这说明 TSH  $\beta$  亚基在长期的进化中具有较高保守性。而且在比较中还发现: 异育银鲫和其它 7 种鱼类相比在 5' 端多 11 个氨基酸序列, 并且都含有定位保守的 12 个半胱氨酸残基和一个 N 糖基化位点。

**关键词:**异育银鲫; 促甲状腺激素  $\beta$  亚基; 5'-RACE; 3'-RACE

中图分类号: S 917 文献标识码: A

## Cloning and characterization of thyrotropin $\beta$ subunit gene from *Carassius auratus*

QU Xian-cheng, YANG Yan-hong, LIU Ying

(College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In this study, rapid amplification of cDNA ends (RACE), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used for the isolation of full length cDNA of thyrotropin  $\beta$  subunit from *Carassius auratus* pituitary. Sequence analysis reveals a 926 bp cDNA containing 68 bp 5'-untranslated region, 372 bp 3'-untranslated region and 486 bp open reading frame(ORF) which encodes 161 amino acids. The deduced amino acid sequence of *C. auratus* had high similarity with *C. auratus* (goldfish), *Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis*, *Danio rerio*, *Salmo gaidnerii* Richardson, *Salmo salar*, *A. anguilla*, and the similarities were 91.3%, 87.6%, 83.2%, 77%, 58.6%, 56.1%, 43.55% respectively. The results indicated that the thyrotropin  $\beta$  subunit gene was very conservative in the progress of evolution. Meanwhile, we also found that there were eleven more amino acids in the 5'-end of *Carassius auratus* compared with other seven species; and they all had twelve cysteine residues and one N-glycosylation site.

**Key words:** *Carassius auratus*; thyrotropin  $\beta$  subunit; 5'-RACE; 3'-RACE

收稿日期: 2005-10-28

基金项目: 上海市重点学科建设项目资助(Y1101); 上海市教委发展基金项目资助(科 04135); 回国留学人员科研启动基金(科 01-113)

作者简介: 曲宪成(1965-), 男, 吉林榆树人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事水生动物生理方面的研究。Tel: 021-65710525, E-mail: xequ@shfu.edu.cn

腺垂体分泌的促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)具有调控甲状腺功能及维持体内甲状腺激素稳定等方面的作用,其活性已在多种硬骨鱼类中被发现。TSH是一种异源二聚体糖蛋白激素,由非特异性的 $\alpha$ 亚基和特异性的 $\beta$ 亚基以非共价键连接而成<sup>[1]</sup>。但 $\beta$ 亚基对TSH的生物学活性起着重要的决定性作用。迄今为止,国内外很多学者已在分子水平上对钝吻鲟(*Acipenser baeri* Brandt)<sup>[2]</sup>、人(*Homo sapiens*)<sup>[3]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[4]</sup>、鸡(*Gallus gallus*)<sup>[5]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[6]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[7]</sup>、鲑(*Salmo salar*)<sup>[8]</sup>、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)<sup>[9]</sup>等的TSH $\beta$ 亚基基因进行了研究,但有关异育银鲫TSH $\beta$ 亚基基因分子水平的研究在国内、外均未见报道。因此,本文运用RACE(rapid amplification of cDNA ends, cDNA末端快速扩增)法分离并克隆了异育银鲫TSH $\beta$ 亚基基因全长序列,并对该基因序列的结构及推导的蛋白质序列进行了比较分析。该基因的克隆,不仅将为TSH的分子进化和同源比较研究提供新的资料;并且也将为今后对异育银鲫TSH $\beta$ 亚基基因表达的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验所用异育银鲫购于上海孙桥水产养殖场。

#### 1.1.2 主要试剂

RNA抽提试剂Trizol<sup>®</sup> Reagent购自Invitrogen<sup>™</sup> life technology公司;100 bp DNA marker (19 325 bp, 300 bp, 100 bp), DH5 $\alpha$ 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;100 bp DNA marker (3 000 bp, 600 bp, 100 bp)购于上海美著生物技术有限公司;TaKaRa Taq<sup>™</sup>, pMD18-T等购于宝生物工程有限公司;BD SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit购于BD Biosciences公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总RNA的抽提

自异育银鲫头部蝶鞍骨背面的小骨腔内取出脑下垂体于1.5 mL灭菌的离心管中,然后按照Trizol<sup>®</sup> Reagent试剂制造商提供的步骤进行总RNA提取。简述如下:首先加入Trizol<sup>®</sup> reagent试剂1 mL,匀浆后,氯仿抽提,异丙醇沉淀,最后用适量的双蒸水溶解总RNA。然后通过琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭(EB)染色显示28s和18s rRNA,检测RNA的完整性。

#### 1.2.2 引物设计

首先根据已报道鱼类TSH $\beta$ 亚基cDNA开放阅读框(ORF)保守区域,运用Primer Premier 5结合Dnastar及BLAST分析软件,设计并合成以下一组扩增异育银鲫部分序列的引物,引物序列如下:

正义链引物 P1:5'-GGTTGGCATGCTGGCTATTTTG-3'

反义链引物 P2:5'-TTCTCTTCAGGGTCAGGGTAC-3'

然后以扩增出的异育银鲫TSH $\beta$ 亚基部分序列为基础,分别设计了RACE用扩增异育银鲫TSH $\beta$ 亚基3'端及5'端的基因特异性引物P3、P4,引物序列如下:

P3:5'-GGCTGTCAACACCACCATCTGCATGGGC-3'

P4:5'-CGGGCAAGATGGCCATCCGGTACTCATC-3'

#### 1.2.3 RT及RACE扩增

RT及3'RACE:RT及RACE反应按照BD SMART<sup>™</sup> RACE cDNA Amplification Kit的说明书进行。简述如下:取1  $\mu$ g总RNA为模板,采用反转录试剂盒内引物3' CDS-primer和反转录酶BD Powerscript Reverse transcriptase在10  $\mu$ L的反应体系中合成3'RACE cDNA。RT反应产物用100  $\mu$ L Tricine-EDTA buffer稀释后,取稀释液2.5  $\mu$ L为模板,采用聚合酶50 $\times$  BD Advantage 2 Polymerase Mix,通用引物UPM和3'端基因特异性引物P3进行3'端扩增。反应条件为:94  $^{\circ}$ C, 30 s, 72  $^{\circ}$ C, 3 min, 5个循环;94  $^{\circ}$ C, 30 s, 70

$^{\circ}\text{C}$ , 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$ , 3 min, 5 个循环;  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 s,  $68^{\circ}\text{C}$ , 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$ , 3 min, 25 个循环; 最后,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

RT 及 5' RACE: 操作流程基本同 3' RACE。不同之处在于 5' RACE-RT 以 5' CDS-Primer 及 BD-SMART II A oligo 为反转录引物, 采用 5' RACE cDNA 为模板, 通用引物 UPM 和 5' 端基因特异性引物 P4 进行扩增。

#### 1.2.4 RACE 产物的纯化、克隆及测定分析

将 RACE 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Nucleo Trap Gel 回收试剂盒对 PCR 产物进行回收、纯化。并将纯化后的 RACE-PCR 产物与 pMD18-T 载体连接构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$ , 经 LB 平板(含 Amp<sup>+</sup>、IPTG 和 x-gal)培养后, 筛选重组子, 并进行插入片段分析。序列测定由上海基康生物科技有限公司完成。所得序列用 DNASTar 分析软件进行分析, 用 Edit Seq 推测 ORF 及蛋白质序列, 用 MegAlign 对核苷酸、蛋白质序列进行分析。

## 2 结果

### 2.1 部分序列及 RACE 扩增结果

#### 2.1.1 异育银鲫部分序列扩增测序结果

用引物 P1、P2 进行部分序列扩增, 产物电泳只有一条明带, 其长度为 367 bp, 与预期长度大小相同。将异育银鲫部分序列与金鱼 [*Carassius auratus* (goldfish)]、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鳊 (*Aristichthys nobilis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 比较, 发现它们的同源性分别为: 99%, 95%, 91%, 87%。同源性很高, 所以我们确定是异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基 cDNA 的部分序列(图 1)。

#### 2.1.2 3' RACE 及 5' RACE 扩增测序结果

以试剂盒内特定引物 UPM 和基因特异性引物 P3 进行 3' 扩增产物只有一条明带, 测序得长度为 662 bp(图 2); 同样以试剂盒内特定引物 UPM 和基因特异性引物 P4 进行 5' 扩增产物也有一条明带, 长度为 326 bp(图 3)。

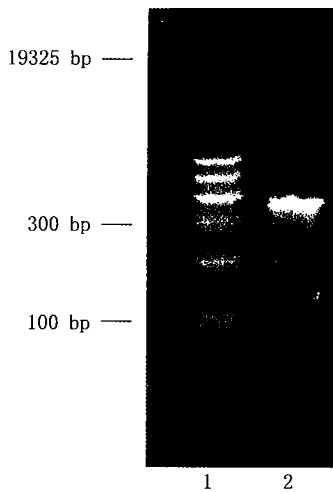


图 1 部分序列扩增结果

Fig.1 Partical sequence of TSH  $\beta$  subunit  
1. 100 bp 分子量 marker. 2. 部分序列扩增产物

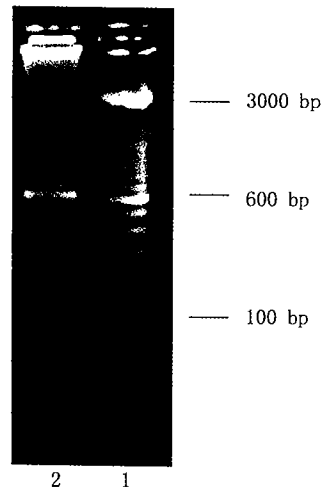


图 2 3' RACE 扩增结果

Fig.2 3' RACE of TSH  $\beta$  subunit  
1. 100 bp 分子量 marker. 2. 3' RACE 扩增产物

### 2.2 序列分析

根据获得的部分序列, 5' RACE 以及 3' RACE 的测序结果, 运用 Dnastar 分析软件分析得到异育银鲫促甲状腺激素  $\beta$  亚基基因全长序列(图 5)。并以 P5、P6 为引物(P5、P6 分别位于序列中 219 ~ 237 bp 和 837 ~ 854 bp), 以异育银鲫 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增该基因长度片段为 636 bp(图 4), 该引物扩增的产物与全长中相对应的片段完全吻合。

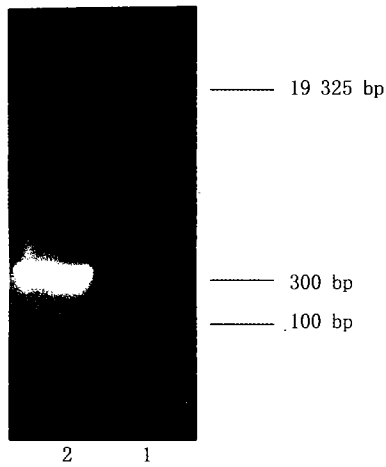


图3 5' RACE 扩增结果

Fig.3 5' RACE of TSH  $\beta$  subunit

1. 100 bp 分子量 marker. 2. 5' RACE 扩增产物

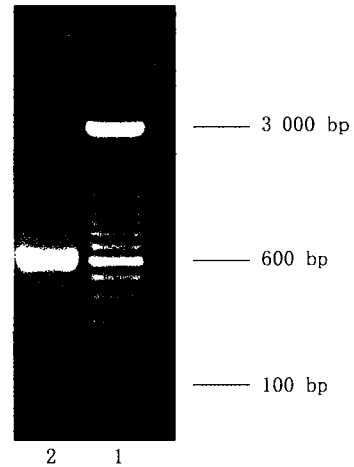


图4 部分序列扩增结果

Fig.4 Partical sequence of TSH  $\beta$  subunit

1. 100 bp 分子量 marker. 2. 部分序列扩增产物

序列分析显示,异育银鲫 TSH $\beta$  亚基包括 68 bp 的 5' 端非翻译区;372 bp 的 3' 端非翻译区;486 bp 的 ORF,其编码 161 个氨基酸;并且在 3' 端非翻译区存在 2 个多聚腺苷酸加尾信号。根据推导出的 TSH  $\beta$  亚基 ORF 蛋白质序列氨基酸的组成特点,并据已知动物如人、鸡、小鼠、虹鳟、鲑等的 TSH  $\beta$  亚基信号肽氨基酸的组成<sup>[8,10]</sup>,以及信号肽识别位点、切割位点氨基酸的构成等信号肽的共同特征<sup>[11]</sup>,推测异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基第 1 至 30 个氨基酸为信号肽。

使用 Dnastar 分析软件,将异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基 ORF 氨基酸序列与其它不同属鱼,如金鱼 [*Carassius auratus* (goldfish)]、鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲮 (*Aristichthys nobilis*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Salmo gaidnerii* Richardson)、鲑 (*Salmo salar*)、鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 等进行比较发现:它们具有较高的同源性,其同源性分别为 91.3%、87.6%、83.2%、77%、58.6%、56.1%、43.55%,基本反应了它们的系统分类地位。而且在所比较的几种鱼 TSH  $\beta$  氨基酸序列中都含有定位保守的 12 个半胱氨酸残基(图 6)和一个 N 糖基化位点。另一方面,从氨基酸序列比较还可以看到,异育银鲫和其它 7 种鱼类相比在 5' 端信号肽序列处多 11 个氨基酸序列(P S R H P A I Q P A M)。

```

-68          ggictaatacgaactcaactatagggcaagcagtggtatcaacgcagaglacggggaggcttaaccag
1. ATGCCCTCCAGACATCCTGCAATACAGCCAGCTATGCTCCTGTGTATGTTGTTGGC
1. M P S R H P A I Q P A M S P V Y V V G
58. ATGCTGGGTATTGTGATGAAGGTAGCCATGCCTATGTTGCAACCCAGGAGTACACT
20. M L G I L M K V A M P M C A P T E Y T
115ATTACATCGAGAGACAGGAGTGCAATTACTGTGTGGCTGTCAACACCCACCATCTG
39. I Y I E R Q E C N Y C V A V N T T I C
171CATGGGCTTCTGTTTCTCCAGGGACAGTAATGTGAAGGAGTTGGTGGGTGCTCGTT
58. M G F C F S R D S N V K E L V G A R
227CTCGTTCAAAGGGGCTGCACGTATCATGAAGTAGAGTACCGGATGGCCATCTTG
76 F L V Q R G C T Y H E V E Y R M A I L
283CCCGGCTGCCCTTCACATGCAGATCCTCACTTCATCTATCCGGTGGCACTTAGCTGT
95 P G C P S H A D P H F I Y P V A L S C
340CACTGCAGCACATGTAATACCAACAGTGATGAATGTGCCACAAAACCAACAACG
114.H C S T C N T N S D E C A H K T N N
395.CTGGCATGAAGTGCTCCAAACCTGTCGGTCAITTTGTACCCCTGACCCCTGAAGAGAA
132 A G M K C S K P V R H L Y P D P E E N
450. CAGCTACAACCAAGCGTATTGGGAACAGTATGAGTAA
151 S Y N Q A Y W E Q Y E ★
487.tgttgattagtccttaactaaactaaATTAAAcagaagtggttagcagctagtgtagcagtggtgtgtttttttatgta
580.atcgttgagttaacctatgacacnaagttacttancacattatgttgcattttatataaagecctatgcttttaaaagccaaaa
673.gttgtaaaaaaaggittgttttaagggtttcaactatgctttatggataatccattcgtaaacttagtgatgitttagtitt
769.tgattggcagtgctctataaaaaatatacagtgacaatcctctATTAAAtacgtttttatcataaaaaaataaaaaa
857.aa

```

图5 异育银鲫 TSH  $\beta$  cDNA 及推导出氨基酸序列

Fig.5 The cDNA and deduced amino acid sequece of the *Carassius auratus* TSH  $\beta$  subunit

小写字母代表 5', 3' 端非翻译区。大写字母部分为编码区,且上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列。粗体字为信号肽。★表示终止密码子。多聚腺苷酸加尾信号(ATTTAAA)用方框标出。

1	MPSRHPAIQPAMSP-VYVVGMLGILMKVAM	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
1	M-----SP-VYVVGMLGILMKVAM	金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
1	M-----SP-VYVVGMLGILMKVAM	鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
1	M-----SP-LYVVGMLGLLMKIAA	鳊 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
1	M-----SL-LYVIGMLGLLMKVAV	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
1	M-----ELSVAMYGLLCLLFSQAV	虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
1	M-----ELSVAMCGLLCLLFSQAV	鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
1	M-----RVVLLASAVLCLLAGQVL	鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )
▼		
30	PMCAPTEYTIYIERQECNYCVAVNTTICMG	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
19	PMCAPTEYTIYIERQECNYCVAVNTTICMG	金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
19	PMCAPTEYTIYIEROECNYCVAVNTTICMG	鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
19	PMCAPTEYTIYIERQECNYCVAVNTTICMG	鳊 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
19	PMCAPTDYTIYIERQECNYCVAVNTTICMG	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
20	PMCVPTDYTLYEERRECDFCVAINTTICMG	虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
20	PMCVPTDYTLYEERRECDFCVAINTTICMG	鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
20	SICSPVDYTLYVEKPECDFCVAINTTICMG	鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )
★		
60	FCFSRDSNVKELVGARFLVQRGCTYHEVEY	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
49	FCFSRDSNVKELVGARFLVQRGCTYHEVEY	金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
49	FCFSRDSNVKELVGPRFLVQRGCTYQEVEY	鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
49	FCFSRDSNVKELVGPRFLVQRGCTYQEVEY	鳊 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
49	FCFSRDSNIKELVGPRFIVQRGCTYQEVEY	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
50	FCYSRDSNMKELAGPRFLIQRGCTYDQVEY	虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
50	FCYSRDSNMKELAGPRFLIQRGCTYDQVEY	鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
50	FCYSLDPNVVGPVAVKRLVVQRGCTYQAVEY	鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )
★		
90	RMAILPGCPSHADPHFIYPVALSCHCSTCN	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
79	RMAILPGCPSHADPHFIYPVALSCHCSTCN	金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
79	RTAILPGCPSHADPHFTYPVALSCHCSTCN	鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
79	RTAILPGCPSYADPHFTYPVALSCHCSTCN	鳊 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
79	RTAVLPGCPSHADPHFTYPVALSCHCSTCK	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
80	RTVILPGCPLHANPLFTYPVALSCHCGTCN	虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
80	RTVILPGCPLHANPLFTYPVALSCHCGTCN	鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
80	RTAELPGCPPHVDPRFSYPVALHCTCRACD	鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )
★ ★ ★		
120	TNSDECAHKTNN-AGMKCSKP-VRHLYPDP	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
109	TNSDECAHKTNN-AGMKCSKP-VRHLYPDP	金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
109	THSDECAHRTSN-AGMKCSKP-VRHLYPDP	鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
109	THSDECAHKTNN-AARKCSKP-VRHLYPDH	鳊 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
109	THSDECALRTRS-AGMRCSKP-VHHLYP--	斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
110	TDSDECAHKASSGDGARCSKP-LRHIYPYP	虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
110	TDSDECAHKASSGDGARCSKP-LRHIYHTL	鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
100	PARDECTHRASA-DGDRCSKPLLLHMHAYP	鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )

148	EENSYNQAYWEQYE	★	★	异育银鲫 ( <i>Carassius auratus</i> )
137	EENSYNQAYWEQYE			金鱼 ( <i>Carassius auratus</i> (goldfish))
137	EENNYIQAYWEQYE			鲤 ( <i>Cyprinus carpio</i> )
137	EENSYIQPYWEQYE			鲮 ( <i>Aristichthys nobilis</i> )
135	EENNYAQAYWDQYE			斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> )
139	GLNSYIHPN			虹鳟 ( <i>Salmo gaidnerii</i> Richardson)
139	A			鲑 ( <i>Salmo salar</i> )
139	GQSNYIQTLL			鳗鲡 ( <i>A. anguilla</i> )

图6 异育银鲫 TSH  $\beta$  氨基酸序列与其它动物 TSH  $\beta$  氨基酸序列比较

Fig.6 Alignment of *Carassius auratus* TSH  $\beta$  amino acid sequence with other species of vertebrate

“-”表示此位置缺失氨基酸;“★”表示半胱氨酸;“▼”表示 N-糖基化位点。

运用 Dnastar 分析软件中的 MegAlign 程序,采用 ClustalV 方法进行比对,并使用最大相似性做了系统树形图,图中直观地表示了异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基基因 ORF 与各种动物 TSH  $\beta$  亚基基因 ORF 的相似程度(图7)。

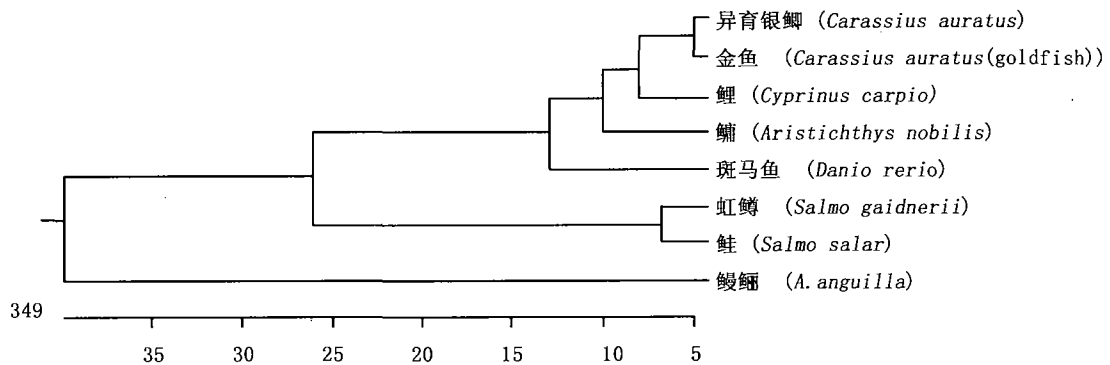


图7 TSH  $\beta$  亚基蛋白质的系统树(使用 Dnastar 选择最大相似方法所构建)

Fig.7 Phylogenetic tree of TSH  $\beta$  proteins

(The tree was constructed by Dnastar using Maximum likelihood of the TSH  $\beta$  proteins)

### 3 讨论

SMART RACE 技术是一种基于 PCR 原理由已知的部分 cDNA 序列来获得完整 cDNA 5' 端和 3' 端序列的方法。该方法利用 M-MLVRT 的突变体能够在逆转录结束时,行使末端转移酶的功能在其 3' 末端加 3~5 个 C 碱基的特点,使用基因特异性引物与试剂盒特定引物 UPM 共同扩增完整的 5' 端和 3' 端部分片段。该方法是一种方便、有效的由已知序列扩增未知序列的方法<sup>[12]</sup>。RACE 法最大的特点是:用 cDNA 文库来分离很难得到的、丰度很低的基因,用 RACE 法就比较容易。RACE 法分离全长 cDNA 的关键环节是模板核酸的制备、引物的质量与特异性等,该环节的优劣决定了该实验能否成功<sup>[13]</sup>。

本实验运用 RACE 法结合克隆方法快速扩增获得了 926 bp 的异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基基因 cDNA 全长序列。并运用 DNastar 中的 EditSeq 序列编辑程序及 MegAlign 比对程序对该序列进行了分析,推导出了其氨基酸列、并进行了同源性比较。氨基酸 ORF 序列同源性比较表明,异育银鲫 TSH  $\beta$  亚基基因与金鱼同源性最高,为 91.3%;鲤、鲮和斑马鱼次之,分别为 87.6%、83.2% 和 77%,这说明在长期的生物进化过程中 TSH  $\beta$  亚基具有较强的保守性,同时也说明了它们的分类地位。此外,在不同种属鱼类氨基酸

序列的比较中还发现:在所比较的 8 种鱼类 TSH  $\beta$  亚基氨基酸序列中,都含有定位相同的一个 N 糖基化位点和 12 个半胱氨酸残基,根据已知鱼类 TSH  $\beta$  亚基的蛋白质结构得知,这 12 个半胱氨酸残基的位置非常保守,它们在成熟肽中形成 6 个二硫键,其对促甲状腺激素的正常折叠、蛋白质构象的确定、维持空间结构以发挥有效的生理功能有着重要的作用<sup>[14]</sup>。但异育银鲫和其它 7 种鱼类相比在 5' 端信号肽序列处多 11 个氨基酸序列,对于它的功能、特性还不明确,有待进一步分析、研究。

#### 参考文献:

- [1] 张镜如,乔健夫.生理学[M].北京:人民卫生出版社,2000.392-393.
- [2] Querat B, Sellouk A, Salmon C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone[J]. Biol Reprod, 2000, 63 (1):222-228.
- [3] Strausberg R L, Feingold E A, Grouse L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (26):16899-16903.
- [4] Kourides I A, Gurr J A, Wolf O. The regulation and organization of thyroid stimulating hormone Genes[J]. Recen Prog Horm Res, 1984, 40:79-120.
- [5] Gregory C, Porter T E. Cloning and sequence analysis of a cDNA for the beta subunit of chicken thyroid-stimulating hormone[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 107 (2):182-190.
- [6] Herzog W, Zeng X, Lele Z, et al. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog[J]. Dev Biol, 2003, 254 (1): 36-49.
- [7] Ito M, Koide Y, Takamatsu N, et al. cDNA cloning of the beta subunit of teleost thyrotropin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90 (13): 6052-6055.
- [8] Martin S A M, Wallner W, Youngson A F, et al. Differential expression of Atlantic salmon (*Salmo salar*) thyrotropin beta subunit mRNA and its cDNA sequence[J]. Fish Biol, 1999, 54 (4):757-766.
- [9] Salmon C, Marchelidon J, Fontaine Y A, et al. Cloning and sequence of thyrotropin (beta)-subunit of a teleost fish the Eel (*Anguilla anguilla* L.) [J]. C R Acad Sci D Sci Nat, 1993, 316:749-753.
- [10] Daniel Perlman, Harlyn O. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides [J]. Mol Biol, 1983, 167:391-409.
- [11] 沈同,王镜岩.生物化学[M].北京:高等教育出版社,2000.411-412.
- [12] 徐美瑜,陈松林,沙珍霞,等.真鲷天然抗性相关巨噬蛋白全长 cDNA 的克隆与序列分析[J].水产学报,2005, 29(1):128-132.
- [13] 俞菊华,夏德全,杨弘,等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定[J].水产学报, 2003, 27(6): 533-539.
- [14] Iao H H, Bai J J. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNAs from two species of gumards[J]. Agricultural Biotechnology, 2001, 9(4): 346-349.