

文章编号: 1674-5566(2009)03-0263-06

斑马鱼促性腺激素释放激素 及相关肽基因的克隆与序列分析

谢保胜, 段瑞君

(青海大学生物科学系, 青海 西宁 810016)

摘要:从斑马鱼脑组织提取总 RNA, 应用 RT-PCR 方法克隆促性腺激素释放激素 (GnRH) cDNA, 其长度为 646 bp 包括一个 258 bp 开放阅读框; 编码的 GnRH 前体为 86 个氨基酸残基, 由一个信号肽、GnRH 十肽和一个由蛋白水解位点 (Gly-Lys-Arg) 连接的促性腺激素释放激素相关肽 (GAP) 组成; 其中信号肽和相关肽的长度分别为 24 和 49 个氨基酸。该 cDNA 编码的 GnRH 的前体氨基酸序列与其他物种的 GnRH 前体基本一致。表明物种间 GnRH cDNA 的蛋白编码区高度保守, 而非编码区的保守性程度很低。进化分析发现, 斑马鱼与鲤、鲫、拟鲤、黑头软口鲮等淡水鲤科鱼类的同源性较高。

关键词:斑马鱼; 促性腺激素释放激素; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Cloning and sequence analysis of gonadotropin-releasing hormone and GnRH associated peptide in *Danio rerio*

XIE Bao-sheng DUAN Rui-jun

(The Department of Biological Science Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: The total RNA was extracted from brain of zebra fish. The GnRH cDNA was amplified by RT-PCR method using isolated total RNA as template. The GnRH cDNA is 646 bp in length that contain an open reading frame (ORF) of 258 bp which encode the 86 amino acids residues that including a signal peptide (SP), a GnRH decapeptide and a GnRH-associated peptide (GAP) which is linked by the processing site Gly-Lys-Arg sequence. The cGnRH cDNA encode SP of 24 amino acids residues and GAP of 49 amino acid residues. The sequence structure of amino acids precursor encoded by GnRH cDNA is basically identical with all others species reported to date. The result showed that the coding region of GnRH cDNA is highly conserved and the untranslated regions are markedly divergent in nucleotide sequence in the listed species. Phylogenetic tree indicated that *Danio rerio* was highly homologous with fresh water fish of Cyprinidae such as *Cyprinus carpio*, *Carassius auratus*, *Rutilus rutilus*, *Pimephales promelas*.

Key words: *Danio rerio*; gonadotropin-releasing hormone (GnRH); cDNA cloning; sequence analysis

促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone GnRH) 是下丘脑-垂体-性腺 (hypothalamic-

收稿日期: 2008-11-05

基金项目: 青海省高校日元贷款人才培养项目 (L/A NO. CO3-P189)

作者简介: 谢保胜 (1965-), 男, 河南孟州人, 硕士, 副教授, 主要从事细胞生物学与分子生物学方面的研究。E-mail: xbsjch@yahoo.com.cn

pituitary-gonadal HPG)轴的关键信息分子,通过刺激垂体前叶释放促性腺激素(gonadotropin, GnRH),调节脊椎动物的性腺发育和维持其繁殖功能^[1]。鱼类脑中至少产生2种类型GnRH。目前,所有鱼类都有GnRH-II,所以它在进化上是非常保守的。GnRH-II前体蛋白由信号肽、GnRH十肽、促性腺激素释放激素相关肽(GAP)构成,经酶切加工后释放出有活性的十肽^[2]。斑马鱼(Danio rerio)是目前生命科学研究中重要的模式脊椎动物之一,具有繁殖能力强、体外受精和发育、胚胎透明、性成熟周期短、个体小易养殖等诸多特点,特别是可以进行大规模的正向基因饱和突变与筛选。本研究根据鱼类GnRH保守的特点,设计基因特异性引物,通过RT-PCR技术克隆斑马鱼GnRH-II基因序列,并对其信息进行分析,为进一步了解GnRH-II对斑马鱼HPG轴的协调及调控的分子机理提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

斑马鱼来自日本高知大学分子发育研究室,挑选大小一致的斑马鱼,平均体长约3.0 cm。T₄DNA连接酶、pGEM-T Vector试剂盒为Promega公司产品。QIAEX II试剂盒为QIAGEN公司产品。大肠杆菌DH5 α 由高知大学分子发育研究室提供。引物由NIPPON EGT株式会社合成。其它试剂购自TaKaRa株式会社。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼总RNA提取

按照谢保胜等^[3]介绍的方法进行斑马鱼总RNA提取和纯化。电泳分析RNA质量,用Eppendorf公司的Biophotometer测定其含量后,分装储存于超低温冰箱中。

1.2.2 引物设计

根据鱼类GnRH-II保守的特点,设计引物为:

GnRH1: 5'-GCAGAAGTATCTCAGAGGC-3';

GnRH2: 5'-CGGCAGTCGATTTACTCACA-3'。

1.2.3 RT-PCR扩增

总RNA溶解于DEPC处理过的水中, RNA的终浓度为1 μ g/ μ L。取5 μ L RNA样加2 μ L RNA-free水, 1 μ L 10 pmol/ μ L(dT)₁₇, 热处理90 $^{\circ}$ C, 5 min立即置于冰内。分别加4 μ L 5 \times MMLV Buffer, 2 μ L 100 mmol/DTE, 4 μ L 5 mmol/dNTP, 1 μ L RNasin, 1 μ L MMLV RTase。指弹混匀,室温放置10 min; 37 $^{\circ}$ C, 1 h; 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 加80 μ L TE制备成cDNA库备用。用上述引物进行PCR扩增,扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30个循环;循环结束后延伸3 min, 取5 μ L PCR产物1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 扩增产物的连接、转化、阳性克隆筛选

取0.5 μ L PCR产物, 0.5 μ L pGEM-T, 2.5 μ L 2 \times Buffer, 0.5 μ L T₄DNA连接酶, 再加去离子水1.5 μ L总反应液为5 μ L。置于15 $^{\circ}$ C的水浴锅中过夜。然后加50 μ L感受态细胞DH5 α , 置于冰上20 min, 42 $^{\circ}$ C热休克1 min 30 s再加1 000 μ L不含抗生素的LB培养基, 37 $^{\circ}$ C振荡1 h倒入含LB培养基的培养皿中, 均匀涂抹。37 $^{\circ}$ C培养12~15 h, 用无菌牙签随机蘸取16个菌落制成细菌悬浮液。分别取上述细菌悬浮液5 μ L加入1 μ L 10 \times Buffer 25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 0.8 μ L, 25 pmol/ μ L(M₁₃Forword) 0.5 μ L, 25 pmol/ μ L(M₁₃Reverse) 0.5 μ L, Taq酶0.1 μ L的16个Eppendorf管中, 扩增反应的总体积为10 μ L。扩增参数为94 $^{\circ}$ C 1 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s 30个循环, 72 $^{\circ}$ C再延伸3 min。扩增后分别取样5 μ L和1 μ L染液, 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。检测后, 选取可行条带的原扩增液, 分别加1 500 μ L 2 \times YT/Amp置于摇床37 $^{\circ}$ C, 培养12~18 h。最后参照Alice Young介绍的方法做测序反应, 该方法由美国国家健康学会网站提供(<http://intramural.nih.gov/center/sngc/Protocol.html>)。

1.2.5 DNA序列测定

在日本高知大学基础实验设施中心的 ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer测序仪进行测序。用 Chromas, DNA Star, Clustalx, Mega, Dnasis等软件对测序结果进行分析。

2 结果

2.1 PCR获得的DNA片段

扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,可见到介于 600~800 bp的条带(图 1)。与预期大小的目的片段(600~700 bp)一致。

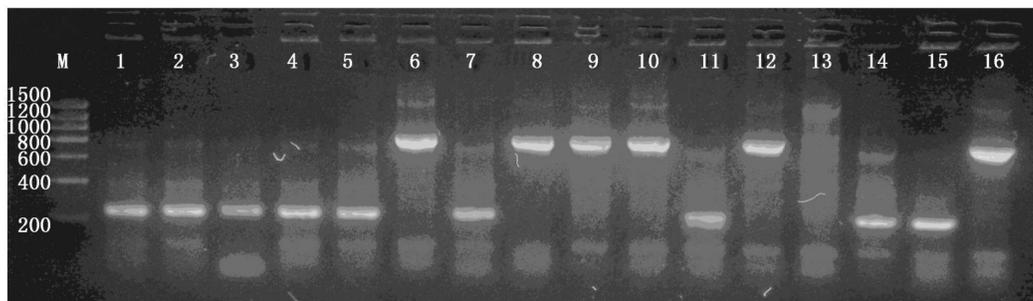


图 1 斑马鱼 GnRH-II 转化后 PCR 结果

Fig 1 The PCR result of *Danio rerio* GnRH-II gene after transformation

M: DNA 标准分子量; 1~16:菌落样品,其中 6、8、9、10、12、16号样品与预期的大小目的片段一致

2.2 序列分析

测序结果显示斑马鱼 GnRH-II cDNA 长度为 646 bp 包括长度 185 bp 的 5'非编码区、一个编码 86 个氨基酸的 ORF、起始密码子 ATG、终止密码子 TGA(图 2)。蛋白质分子量为 9 824.09 u、等电点 pI 为 8.60。BLAST 比对发现与其它鱼类的 GnRH 基因在编码区上具有很高的相似性(图 3)。斑马鱼 GnRH-II

```

TCGCATGCTC CCGGCCGCCA TGGCCGCGGG ATTGCAGAAG TATCACAGAG GCTCTGTGAT 60
TTCACCTAAC CGCTCACTTC ACGAAAAGGA GAACATTTC A GGATTACCAA CACCGGACT 120
GCAGTAGAGG AGCTACAGCA GAAGATACCT CAAGAGAAGA CGTGCCAAA TATTAGACTG 180
AAGTGATGGT GCTGGTCTGC AGGCTGCTGT TGGTCATGGG GCTGATGCTG TGTCTGAGTG 240
  M V L V C R L L L V M G L M L C L S A 19
CTCAGTTGAG CAGCGCTCAG CACTGGTCTC ACGGCTGGTA TCCTGGAGGA AAGAGAGAGA 300
  Q L S S A Q H W S H G W Y P G G K R E I 39
TAGACCTCTA CGACACCTCA GAGGTTTCAG AGGAAGTGAA GCTCTGCGAG GCAGGAAAAT 360
  D L Y D T S E V S E E V K L C E A G K C 59
GCAGTTACCT GAGACCGCAG GGAAGAAACA TCCTCAAGAC AATACTGCTG GATGCCCTCA 420
  S Y L R P Q G R N I L K T I L L D A L I 79
TTCGTGATTT CCAAAGAGA AAGTGACACC AAGCTGATGC TTCAGCCTGT GTCCAAAGAA 480
  R D F Q K R K * 86
ACATCTTTTC CAGCAAGCAC ATTTGGCCTG CCTTTTCATT CCAAAGTGA TATATTGTGT 540
TATTCCTGTG ACTTTATTTT TTTCAATTTG TATGTGTATG TTTAGTTCTG TTCTCATATT 600
CATTGTGAGT AAATCGACTG CCCGAATCAC TAGTGCGGCC GCCTGC 646

```

图 2 斑马鱼 GnRH-II 的核苷酸序列及编码的氨基酸序列

Fig 2 Nucleotide sequence of *Danio rerio* GnRH-II and the deduced amino acid sequence

灰色底纹表示起始密码子和终止密码子;下划线表示相关肽;下划虚线表示信号肽;方框表示十肽区和蛋白水解位点

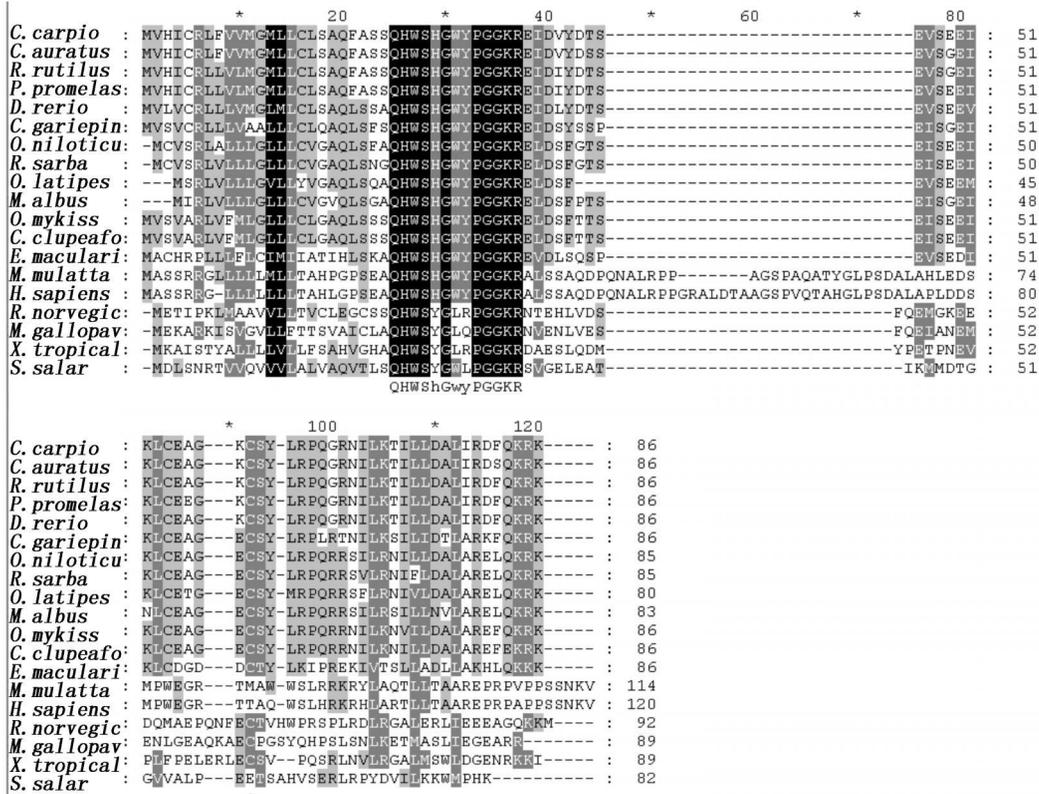


图 3 斑马鱼与其它鱼类和动物的 GnRH-II 氨基酸序列同源性比较

Fig 3 The homologous alignments of the amino acid sequence of Damioerio GnRH-II with other fishes and animals. Grey shaded areas indicate amino acid similarity; black shaded areas indicate ten amino acid complete similarity.

鲤 *C. carpio* AY189961; 鲫 *C. auratus* U30386; 拟鲤 *R. rutilus* U60668; 黑头软口鲮 *P. promelas* EF672264; 斑马鱼 *D. rerio*; 北非鲶鱼 *C. gariepinus* CAA54969; 尼罗罗非鱼 *O. niloticus* AB101666; 平鲷 *R. sarba* EF433771; 青鳉 *O. latipes* NM_001104671; 黄鳝 *M. albus* AY786183; 虹鳟 *O. mykiss* AF125973; 鲱形白鲑 *C. clupearo* is AY245102; 豹纹脸虎 *E. macularius* AB104485; 猕猴 *M. mulatta* NM_001034202; 人 *H. sapiens* NP_001492; 褐家鼠 *R. norvegicus* NM_012767; 火鸡 *M. gallopavo* AY632693; 非洲爪蟾 *X. tropicalis* NM_001113693; 大西洋鲑 *S. salar* X79709.

II 前体氨基酸与鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲫 (*Carassius auratus*)、拟鲤 (*Rutilus rutilus*)、黑头软口鲮 (*Pimephales promelas*) 之间的相似性很高, 分别为 87.2%、82.6%、86.1%、86.1%; 与其他鱼类如鲱形白鲑 (*Coregonus clupearo* is)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、北非鲶 (*Clarias gariepinus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、平鲷 (*Rhabdosargus sarba*)、黄鳝 (*Monopterus albus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 的同源性分别为 75.6%、74.4%、73.3%、70.9%、67.4%、64.0%、61.3%; 而与其他物种如爬行纲豹纹脸虎 (*Eublepharis macularius*)、两栖纲非洲爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、鸟纲火鸡 (*Meleagris gallopavo*)、哺乳纲人 (*Homo sapiens*)、猕猴 (*Macaca mulatta*)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 同源性较低, 分别为 47.7%、35.6%、31.2%、24%、24%、28.7%、28.4%。

2.3 同源性比较和系统分析

利用 Mega 3.0 软件构建邻接 (N-J) 系统进化树, 选择在进化上具有代表性的物种进行比对, 采取默认参数进行构建, 同时应用自举检验估计系统发育树各节点的自引导值 (重复次数为 1000 次)。从中看出斑马鱼与鲤、鲫、拟鲤、黑头软口鲮等淡水鲤科鱼类的同源性较高 (图 4)。

3 讨论

本研究用 RT-PCR 法和基因克隆获得斑马鱼 GnRH-II 的 cDNA, 其长度为 646 bp 编码的前体为 86

个氨基酸,包括 24 个氨基酸的信号肽、GnRH 成熟十肽和由蛋白成熟加工位点 (Gly-Lys-Arg) 连接的 49 个氨基酸残基的 GAP。比较分析得知,所有 GnRH 基因具有相同的基本结构,由 4 个外显子和 3 个内含子组成。4 个外显子的编码特点一致:仅编码 5' 非编码区的外显子;编码信号肽、GnRH 十肽、蛋白成熟加工位点和 GAP 的氨基端的外显子;编码 GAP 的中间部分的外显子;编码 GAP 的羧基端和 3' 非编码区外显子^[4-5]。比较其他物种的 GnRH 前体蛋白的氨基酸序列,同源性从 87.2% 到 28.4%,但 GnRH 十肽是一致的,表明 GnRH 十肽区在进化过程中一直是比较保守的^[6-9]。而 GnRH 前体结构变异最大的部分为 GAP,推测 GAP 可能起着分子伴侣的作用,有利于 GnRH 前体的准确折叠加工^[10]。由此推断,各物种 GnRH 在长期的进化过程中,在不同的进化支上其功能也可能发生相应的改变。

本研究与 GenBank 数据库报道的斑马鱼 GnRH-II (AY657018) 的相似性为 90.56%,主要是扩增后的 PCR 产物的部分 5' 非编码区和部分 3' 非编码区产生的差异,可能在长期的进化过程中,不同种群斑马鱼的非编码区核苷酸序列对 GnRH 的转录以及转录的效率和时期等调控方式的差异不同所致。另外,尽管两者编码的氨基酸相似性为 100%,但其编码氨基酸的基因序列中也有 6 个核苷酸位点不同,可能是不同种群间歧异性的具体表现。对上述问题的深入研究,有可能为斑马鱼的系统发育和进化提供证据。本研究与 GenBank 数据库报道的斑马鱼的 GnRH-III cDNA (NM_182887) 的相似性只有 31.85%,编码的氨基酸相似性也仅为 23.16%,并且前体十肽也有两个氨基酸不同,而与淡水鲤科鱼(鲤^[7]、拟鲤^[8]、鲫^[11]) GnRH-II 前体氨基酸间的相似性也很高,平均为 85%。因此, GnRH 也可作为系统发育的分子标记。

GnRH 在脊椎动物脑组织中以多种形式存在,可能是脊椎动物进化过程中多次基因复制的结果^[12]。根据脊椎动物 GnRH 前体的差异,可将其分为 3 种不同的类型:分布于鱼类、两栖类至哺乳类的下丘脑、间脑,促使脑垂体 GTH 合成与分泌的 GnRH 称为 GnRH-I 型;分布于鱼类和哺乳类的中脑及其他脑区,起神经递质作用,间接参与生殖活动的调节的 αGnRH 称为 GnRH-II 型;分布于各种鱼类的嗅叶、端脑,起神经递质作用,间接参与生殖活动的调节的 βGnRH 称为 GnRH-III 型。斑马鱼 αGnRH 在成熟斑马鱼嗅球终神经区、腹侧端脑视觉区、中脑分布,证明斑马鱼 αGnRH 是以下丘脑促垂体的形式存在的^[13]。而斑马鱼 GnRH-II 在中脑具有高度专一性,表明 GnRH-II 在斑马鱼 HPG 轴的调节作用中并不起特异的功能,其主要功能是起神经递质或神经调质的作用^[14]。

感谢日本国高知大学理学部藤原滋树教授和青海大学祁德林博士在实验过程和序列分析中的支持和帮助。

参考文献:

- [1] Amano M, Urano A, Aida K. Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain [J]. *Zoolog Sci* 1997, 14(1): 1-11.
- [2] Farahmand H, Rahman M A, Sohm F, et al. Isolation and expression of tilapia (*Oreochromis niloticus*) serine 8-type GnRH coding and regulatory sequences [J]. *Gene* 2003, 304: 97-106.
- [3] 谢保胜,藤原滋树. 斑马鱼总 RNA 提取和纯化 [J]. *生物学杂志*, 2007, 24(6): 67-69.
- [4] Han J, Seong J Y, Kim K, et al. Analysis of exonic splicing enhancers in the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001, 173(1-2): 157-166.

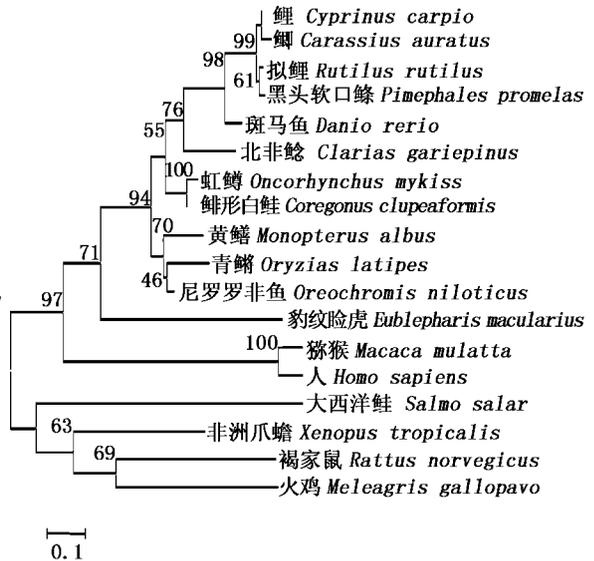


图 4 斑马鱼与其他物种的 GnRH 系统进化树

Fig 4 The phylogenetic tree of *Danio rerio* GnRH and other representation species

- [5] White R B, Femald R D. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species [J]. *Gen Comp Endocrinol* 1998, 112(1): 17-25.
- [6] 方平, 李英文, 胡炜, 等. 黄鳝 α GnRH-III 的 cDNA 克隆与序列分析 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(2): 259-264.
- [7] 黎双飞, 胡炜, 汪亚平, 等. 鲤鱼两个 α GnRH-III 基因的发现及其在成熟个体的表达分析 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2004, 34(1): 88-95.
- [8] Penlington M C, Williams M A, Sumpter J B, et al. Isolation and characterisation of mRNA encoding the salmon- and chicken-type gonadotropin-releasing hormones in teleost fish *Rutilus rutilus* (Cyprinidae) [J]. *Journal of Molecular Endocrinology* 1997, 19: 337-346.
- [9] Dubois E A, Zandbergen M A, Peute J, et al. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates [J]. *Brain Research Bulletin* 2002, 57: 413-418.
- [10] Carolsfeld J, Powell J F, Park M, et al. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones including a novel form from an ancient teleost herring [J]. *Endocrinology* 2000, 141(2): 505-512.
- [11] Lin X W, Peter R E. Cloning and expression pattern of a second [His⁵Tyr⁷Tyr⁸] gonadotropin-releasing hormone (chicken GnRH-III) mRNA in goldfish: Evidence for two distinct genes [J]. *General and Comparative Endocrinology* 1997, 170: 262-272.
- [12] Ohta T. Multigene families and the evolution of complexity [J]. *Journal of Molecular Evolution* 1991, 33(1): 34-41.
- [13] Gothilf Y, Munoz-Cueto J A, Sagrillo C A, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone on a perciform fish (*Sparus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization [J]. *Biol Reprod* 1996, 55: 636-645.
- [14] Lin X W, Otto C J, Peter R E. Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin-releasing hormone and somatostatin [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 1998, 119: 375-388.