

中国大鲵脑 cDNA 文库构建及促甲状腺激素 β 亚基基因 cDNA 的克隆和序列分析

杨丽萍¹, 杨慧荣^{1,2}, 张勇¹, 刘云¹, 黄海^{1,3}, 刘晓春¹,
蒙子宁¹, 黄俊海⁴, 林浩然^{1,3}

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 3. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228;

4. 珠海市斗门金鲵水产科技有限公司, 广东 珠海 519100)

摘要: 以大鲵脑组织为材料, 提取总 RNA, 应用 Cloneminer™ 文库构建技术构建了 cDNA 文库。经检测, 文库初始滴度为 5.0×10^5 cfu·mL⁻¹, 重组率为 91.70%, 插入片段大小在 0.35~3.9 kb, 平均插入片段大小为 0.791 kb, 文库扩增后滴度为 4.0×10^9 cfu·mL⁻¹。随机挑选 200 个阳性克隆测序, 经生物信息学分析, 发现 20 个片段与已报道的基因有较高同源性, 包括促甲状腺激素基因、生长激素基因及催乳素基因等, 其中三个克隆为促甲状腺激素 β 亚基 (TSHβ) 基因。序列分析表明, TSHβ cDNA 全长序列为 705 bp, 包含 417 bp 开放读码框, 编码 138 个氨基酸序列, 其中前 19 个氨基酸为大鲵 TSHβ 亚基信号肽部分, 后接 119 个氨基酸组成的 TSHβ 亚基成熟肽。同源性分析显示, 大鲵 TSHβ 亚基与两栖类牛蛙、蟾蜍及爪蟾同一蛋白的同源性分别为 53.6%、52.2% 和 60.3%。采用邻接法和最大简约法对部分脊椎动物 TSHβ 氨基酸序列构建分子系统树, 结果显示有尾目大鲵为两栖动物中较早分化的一支, 表明其进化地位较原始。RT-PCR 组织分布分析发现, TSHβ 基因除垂体有表达外, 性腺也有少量表达。

关键词: 中国大鲵; cDNA 文库; 促甲状腺激素 β 亚基; 组织分布

中图分类号: Q 785; S 917

文献标识码: A

中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 俗称娃娃鱼, 隶属于两栖纲 (Amphibia)、有尾目 (Caudata)、隐鳃鲵科 (Cryptobranchidae)、大鲵属 (*Andrias*), 为我国特有的珍稀动物。其肉质细嫩、营养丰富, 具有较高的经济价值^[1]。此外, 大鲵是从水生鱼类演化到陆生爬行类的过渡类型, 对探索生物的进化有着重要的学术研究价值^[2]。然而, 由于长期忽视对大鲵资源的保护和合理利用, 滥捕酷杀、栖息地破坏等已经使大鲵野生资源量严重衰减, 甚至濒临灭绝^[3]。目前大鲵已经被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)

附录 I, 同时也被《中国濒危物种红皮书》评为“极危”级, 是我国国家二级保护动物。为快速恢复大鲵资源, 从 20 世纪 70 年代开始, 大鲵养殖广泛开展, 迄今大鲵人工养殖技术日趋成熟, 已有成功繁育出子二代的报道, 大鲵逐渐成为一种极具市场前景的新兴养殖品种^[4]。

目前关于大鲵的研究主要集中在组织细胞水平、胚胎发育、组织结构观察、养殖习性、养殖病虫害防治及生理生化性质等方面^[2]; 涉及分子水平遗传信息的报道较少, 仅有大鲵遗传多样性分析、线粒体基因组研究及肝脏 cDNA 文库构建等三

收稿日期: 2007-10-09

资助项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2006D90204002); 广东省科技计划项目 (2004B26001183); 中山大学青年教师科研启动基金资助

作者简介: 杨丽萍 (1980-), 女, 河南安阳人, 博士研究生, 从事鱼类生理学和分子生物学研究

通讯作者: 林浩然, Tel: 020-84113791, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

方面的报道^[5-8],尚未有大鲵功能基因的报道。自20世纪70年代中期首例cDNA克隆问世以来,构建cDNA文库已成为寻找功能基因,得到完整基因序列的基本手段之一。脑是脊椎动物的中枢神经器官和重要的内分泌器官,对动物生长发育、代谢、繁殖、免疫等多种生理功能的实现起重要调节作用。因此,构建大鲵脑组织cDNA文库,不仅可以保存大鲵这一稀有物种遗传信息,而且为克隆大鲵重要基因及进一步开发制备相关基因工程产品奠定良好的基础。

促甲状腺激素(thyrotropin, thyroid-stimulating hormone, TSH)是腺垂体分泌的促进甲状腺的生长和机能的激素,在促进甲状腺的机能和维持体内甲状腺激素水平稳定等方面具有重要作用。在哺乳类,其合成分泌分别受到促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH)正向调节及甲状腺激素的负反馈调节^[9]。TSH是一种异源二聚体糖蛋白激素,由非特异性的 α 亚基和特异性的 β 亚基以非共价键连接而成。在同一物种中,异源二聚体蛋白激素的 α 亚基相同,其功能可能与腺苷酸环化酶的激活有关,而 β 亚基则与受体识别有关^[10]。两栖类TSH基因 β 亚基的克隆仅见无尾目蛙、爪蟾及蟾蜍^[11-13],有尾目尚未见报道。

本文应用CloneMiner™ cDNA文库构建试剂盒构建了中国大鲵脑cDNA文库,并通过随机测序筛选获得了促甲状腺激素基因 β 亚基基因,利用生物软件对其cDNA序列进行了分析,根据推导的氨基酸序列与脊椎动物其他物种相应序列进行同源性比较,并构建了脊椎动物系统进化树。同时进行了该基因在大鲵不同组织中的mRNA表达分析,为进一步研究其功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

由珠海斗门金鲵水产科技有限公司提供4龄子二代大鲵雌雄各一尾,其中雌性体长为78 cm,体质量为2.60 kg;雄性体长为77 cm,体质量为3.25 kg。经尾静脉取血后立即取脑、垂体、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、性腺、眼、胃、肠、皮肤、脂肪、肌肉、肺、骨和膀胱,置于液氮运回实验室,存于-80℃超低温冰柜备用。

1.2 试剂

RNA提取试剂盒Trizol Reagent、文库构建试剂盒CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit及Thermoscript™ RT-PCR试剂盒均购自Invitrogen公司,E. Z. N. E.质粒提取试剂盒为Omega Bio-Tek公司产品。Taq酶由MBI Fermentas公司提供,其余为国产分析纯试剂。引物合成(引物序列见表1)及DNA序列测定由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)完成。

1.3 方法

总RNA提取 将大鲵脑样品放入盛有1 mL Trizol的1.5 mL离心管中,用1 mL一次性注射器抽打匀浆。匀浆液室温放置5 min后加入200 μ L氯仿,用力振荡15 s,室温放置10 min。于4℃,12 000 \times g离心15 min。转移上清至一新的1.5 mL离心管中,加入500 μ L异丙醇混匀,静置10 min后,于4℃,12 000 \times g离心8 min。弃上清,75%乙醇洗涤两次,空气干燥后,溶于适量DEPC处理的水中。紫外分光光度计上测定纯度,电泳检测。

cDNA文库构建与扩增 依据CloneMiner™文库构建试剂盒操作规程,对大鲵脑cDNA文库进行扩增及质量检测。具体操作如下:取3 μ g总RNA,在biotin-attB2-oligo dT和SuperScript™ II逆转录酶等作用下进行反转录;由大肠杆菌DNA聚合酶I合成第二链。双链cDNA混合物连接attB1接头后经柱层析分离,通过斑点平板印记法确定cDNA浓度,取大小大于500 bp的cDNA片段约150 ng与pDONR™ 222载体进行BP重组反应。将重组产物电转化到ElectroMAX™ DH10B T1 Phage Resistant感受态细胞中,于37℃,225 r \cdot min⁻¹培养2 h,然后加入等体积的灭菌冷冻培养基(60% S. O. C培养基;40%甘油),混匀分装,经液氮速冻后保存于-80℃超低温冰柜。

取100 μ L文库菌液,进行浓度梯度稀释后涂板到LB卡那霉素培养基上,计算文库的滴度与总容量。任意挑取24个克隆,37℃培养过夜后,用限制性内切酶BsrG I酶切检测阳性克隆率和平均插入片段大小。

将初始文库进行扩增,扩增后文库依浓度梯度稀释并涂板,每个稀释度重复2个。37℃培养过夜后,计数菌落数并计算滴度。

序列测定与分析 随机挑取阳性克隆,经 M13 引物扩增后,选取插入片段大于等于 500 bp 的克隆进行序列测定,所用 DNA 测序仪为 ABI 377。将获得的 cDNA 序列通过 BLAST 与国际基因库(GenBank)中的序列进行比较,发现获得大鲵促甲状腺释放激素 β 亚基(TSH β)cDNA 序列,且包含完整开放读码框。

分别应用 DNA STAR 及 CLUSTAL W 软件进行氨基酸序列推导和同源性分析。系统树的构建由 PAUP 4.0 b10 完成,其中最大简约树(maximum parsimony, MP)的构建使用启发式搜索,各种氨基酸替代同等加权,空位视为信息缺失,自展检验(bootstrap analysis)设为 1000 次。邻接树(Neighbor-joining, NJ)的构建由 mean number of pairwise character differences (MEAN)距离矩阵得到,同时采用 Bootstrap 1000 检验系统树各分支的置信度。

表 1 PCR 扩增所用引物及序列
Tab. 1 Primers for PCR analysis

引物 primer	序列(5'→3') sequence(5'→3')
M13-F	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13-R	CAG GAA ACA GCT ATG AC
dnTSH-F	GTA GCA TCC ATA CTC CTC TG
dnTSH-R	TGT TGC ACT TAC AGG TCA C
18S-D	AGC AAC TTT AGT ATA CGC TAT TGG AG
18S-U	CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT CC

TSH β 在各组织中的表达 提取上述各组织 RNA 样品,经 DNase I(Invitrogen, Amplification Grade)处理后,按照 Thermoscript™ RT-PCR 说明,取 1 μ g RNA 进行反转录;再以 0.5 μ L 反转录

产物为模板,用 dnTSH-F 和 dnTSH-R 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ L,反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,后接 35 个循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。以 18S-D,18S-U 为引物,依上述 PCR 程序,扩增 18 S,作为内部参照物。取 5 μ L RT-PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用 BIO-RAD GELDOC2000 对电泳图像进行分析。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

用紫外分光光度计测定大鲵脑组织总 RNA 纯度及浓度,其中 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 为 1.98;浓度为 1.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可观察到 18S 和 28S rRNA 两条明亮的带,因此,所提取的总 RNA 质量符合实验要求。

2.2 cDNA 文库的构建、扩增与质量检测

双链 cDNA 混合物经柱层析分离后,采用斑点平板印迹法选择大片断 cDNA:依据已知对照 pEXP7-tet 浓度,估算各管 cDNA 浓度,通过浓度 \times 体积计算 cDNA 产量,最后收集了约 200 ng 大片断 cDNA 用于文库构建。

大鲵脑 cDNA 文库在稀释浓度为 10^{-2} 时,约有 50~100 个单菌落,依据文库滴度计算公式:滴度($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) = 克隆数 \times 稀释倍数/涂板所用体积,得到大鲵脑 cDNA 文库的滴度为 5.0×10^5 $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。随机挑取 24 个克隆,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,提取质粒,然后用 *Bsr*G I 进行酶切鉴定,1.5% 琼脂糖凝胶电泳检验(图 1)。对酶切图谱进行统计分析,发现大鲵脑 cDNA 文库重组率为 91.70%,插入片断大小在 0.35~3.9 kb,平均大小为 0.791 kb。

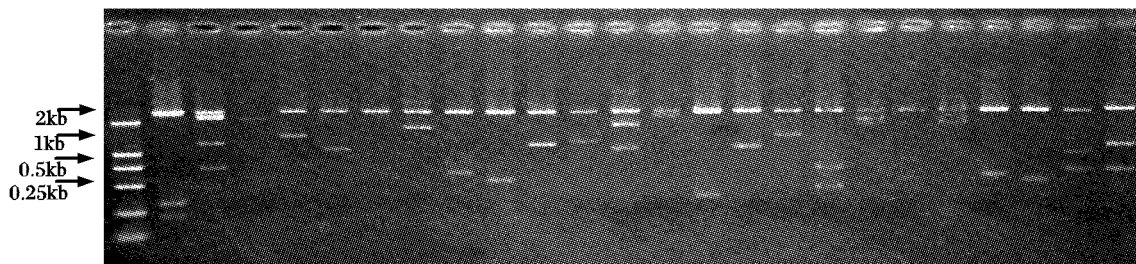


图 1 24 个克隆的 *Bsr*G I 酶切图谱

Fig. 1 Electrophoresis patterns of 24 clones digested by *Bsr*G I

cDNA 文库扩增后,计算扩增文库的滴度为 4×10^9 cfu·mL⁻¹。

2.3 序列测定及促甲状腺激素 β 亚基基因 cDNA 的序列分析

用 M13 引物对阳性克隆进行 PCR 检测(图 2),挑选 200 个插入片段大于等于 500 bp 的克隆进行序列测定。所测序列经 GenBank 检索和生物信息学比较,发现有 51 个 cDNA 片段序列无明显的同源性,20 个片段与已报道的基因有较高同源性。在这 20 个具同源性的片段中有 3 个片段可能是与大鲵生长、发育等相关的重要功能基因,包括促甲状腺激素基因、生长激素基因及催乳素基因等(图 3),其中三个克隆为促甲状腺激素 β 亚基 cDNA,包含全长序列,总长度为 705 bp,包含 417 bp 开放读码框,经翻译得到 138 个氨基

酸。根据其它已知脊椎动物 TSH β 亚基的信号肽氨基酸组成特点,推测大鲵 TSH β 亚基信号肽为 19 个氨基酸,从起始氨基酸(M)始到第 19 位氨基酸(I)为信号肽部分,后接 119 个氨基酸组成的 TSH β 亚基成熟肽(图 4)。序列比较结果表明,在脊椎动物 TSH β 亚基氨基酸序列中,都含有定位相同的 12 个半胱氨酸残基(图 5),分别位于 TSH β 亚基成熟肽的第 3、17、20、28、32、53、68、84、86、89、96、108 位。

2.4 中国大鲵 TSH β 氨基酸进化分析

结合文献报道及 GenBank 收录的脊椎动物 TSH β 氨基酸序列,对 17 种脊椎动物 TSH β 成熟肽的第 1 至第 12 个半胱氨酸残基间氨基酸序列进行了分子进化树聚类分析。这 17 个物种分别为:牛蛙(*Rana catesbeiana*)^[11]、日本蟾蜍(*Bufo*

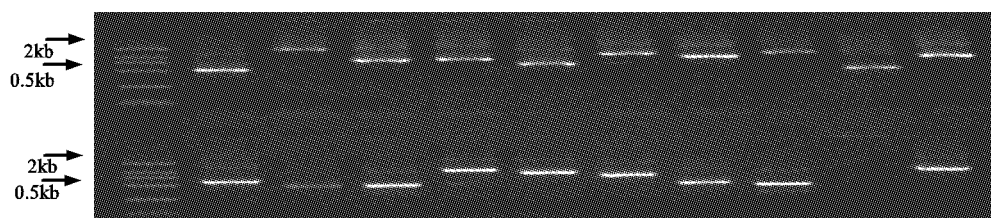


图 2 中国大鲵脑 cDNA 文库随机挑选克隆的 PCR 结果

Fig. 2 PCR electrophoresis patterns of the representative clones from the brain cDNA library of *Andrias davidianus*

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value	
(A) ref XP_001111573.1 PREDICTED: thyroid stimulating hormone, beta	205	2e-51	G
sp P01222 TSHB_HUMAN Thyrotropin subunit beta precursor (Thyr...	203	9e-51	G
ref NP_999533.1 thyrotropin beta subunit [<i>Sus scrofa</i>] >sp P0...	203	9e-51	UG
ref NP_001003290.1 thyrotropin beta chain [<i>Canis lupus famil...</i>	202	1e-50	UG
gb AAE30828.2 thyroid-stimulating hormone beta subunit [<i>Homo sa...</i>	202	2e-50	G
ref NP_000540.2 thyroid stimulating hormone, beta precursor [<i>Ho...</i>	201	3e-50	UG
ref XP_001160337.1 PREDICTED: similar to Thyrotropin beta ch...	201	4e-50	G
gb AAH94206.1 Unknown (protein for IMAGE:7020324) [<i>Xenopus laev...</i>	201	4e-50	U
ref NP_776630.1 thyroid stimulating hormone, beta [<i>Bos tauru...</i>	200	6e-50	UG
ref NP_001075960.1 thyrotropin beta chain [<i>Equus caballus</i>] >...	199	1e-49	UG
ref NP_001041480.1 thyroid stimulating hormone, beta [<i>Felis ...</i>	197	2e-47	G
ref NP_001028196.1 thyroid stimulating hormone beta [<i>Monodel...</i>	191	4e-47	UG
ref XP_001362094.1 PREDICTED: hypothetical protein [<i>Monodelphis</i>	191	5e-47	G
ref NP_027246.1 thyroid stimulating hormone, beta subunit [<i>R...</i>	191	5e-47	UG
ref NP_033458.1 thyroid stimulating hormone, beta subunit [<i>M...</i>	191	5e-47	UG
sp P79357 TSHB_LAMGL Thyrotropin subunit beta precursor (Thyr...	190	6e-47	
gb AB571120.1 thyroid-stimulating hormone beta subunit precu...	189	1e-46	
gb BAC07313.1 thyrotropin beta subunit [<i>Nipponia nippon</i>]	189	1e-46	
ref NP_990394.1 thyroid stimulating hormone, beta [<i>Gallus ga...</i>	189	1e-46	UG
gb AA769236.1 thyroid stimulating hormone beta subunit [<i>Pelodis</i>	188	2e-46	
gb EPL86507.1 thyroid stimulating hormone, beta subunit, iso...	188	3e-46	
sp P04652 TSHB_RAT Thyrotropin subunit beta precursor (Thyro...	188	3e-46	G
gb CA002473.1 thyroid stimulating hormone beta subunit [<i>Ursus</i>	186	1e-45	

(B) Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
gb AAP93863.1	prolactin precursor [Ambystoma barbouri]	361	4e-98
dbj BAD24104.1	prolactin [Eublepharis macularius]	330	1e-88
gb AAV59666.1	prolactin [Anser anser] >gb AAV68019.1 prolactin	329	2e-88
gb ABD38853.1	prolactin [Anser anser] >gb AAK86872.2 prolactin	327	9e-88
emb CAC95835.1	prolactin [Sarkidiornis melanotos]	327	9e-88
gb ABH04235.1	prolactin [Anser anser]	327	1e-87
dbj BAD14943.1	prolactin [Anas platyrhynchos] >dbj BAD14943....	326	2e-87
gb AAV68019.1	prolactin [Anser anser]	326	2e-87
dbj BAD10927.1	prolactin [Coturnix coturnix]	322	2e-86
dbj BAP61527.1	prolactin [Melospiza undulatus]	322	4e-86
dbj BAP66736.1	prolactin [Padda oryzivora]	320	1e-85
sp P17972 PRL_MELGA	Prolactin precursor (PRL) >gb AAB60615.1 pr	320	1e-85
sp P14676 PRL_CHICK	Prolactin precursor (PRL) >dbj BAB18728.1...	320	1e-85
gb AAZ08075.1	prolactin [Anser anser]	318	3e-85
gb AAB60604.1	prolactin	317	7e-85
dbj BAP61528.1	prolactin [Struthio camelus]	312	9e-83
sp O52791 PRL_TRINU	Prolactin precursor (PRL) >gb AAC12736.1 ...	311	4e-83
ref NP_990797.1	prolactin [Gallus gallus] >gb AAC01026.1 AF2...	311	7e-83
sp Q3X4G6 PRL_ISOMA	Prolactin precursor (PRL) >gb AAZ85065.1 ...	309	2e-82
gb AAU06607.1	prolactin [Trichosurus vulpecula]	308	6e-82
ref NP_001028166.1	prolactin precursor [Monodelphis domestic...]	308	6e-82
sp P01238 PRL_PIG	Prolactin precursor (PRL)	303	2e-80
ref NP_001086486.1	prolactin [Xenopus laevis] >gb AAH75216.1 ...	302	2e-80

(C) Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
emb CAB55428.1	growth hormone [Cynops pyrrhogaster]	315	2e-84
gb AAP92705.1	growth hormone [Ambystoma barbouri]	309	5e-81
sp Q9P7G3 SOMA_SIRCA	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	285	3e-75
gb ABV29493.1	growth hormone [Acipenser sinensis]	280	6e-74
gb AAK36064.1	growth hormone [Acipenser gueldenstaedtii]	279	2e-73
gb ABQ09819.1	growth hormone [Mauremys reevesii]	278	4e-73
gb AAN77412.1	growth hormone [Anser anser]	275	1e-72
sp P22077 SOMA_MELGA	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	275	1e-72
ref NP_989690.1	growth hormone 1 [Gallus gallus] >sp P08996 ...	275	1e-72
sp P11226 SOMA_ANAPL	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	275	1e-72
emb CAA31127.1	unnamed protein product [Gallus gallus]	273	8e-72
gb AAB22134.1	growth hormone I, GH I [Acipenser gueldenstadti...]	268	6e-69
sp P26773 SOMA1_ACIGU	Somatotropin-1 (Somatotropin I) (Growth ho	259	8e-69
gb AB670042.1	growth hormone [Ficedula hypoleuca]	261	3e-68
sp P34005 SOMA_CHEMY	Somatotropin (Growth hormone)	261	4e-68
sp P26774 SOMA2_ACIGU	Somatotropin-2 (Somatotropin II) (Growth h	260	7e-68
sp P59765 SOMA_CROMO	Somatotropin (Growth hormone) >gb AAB349...	258	3e-67
ref 112113296x	somatotropin	258	3e-67
sp Q9GHE2 SOMA_NYCPY	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	255	3e-66
ref 11608112x	somatotropin	255	3e-66
sp Q77058 SOMA_HIPAN	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	254	4e-66
sp Q99KA1 SOMA_GALSE	Somatotropin precursor (Growth hormone) ...	254	5e-66
gb ABW36992.1	growth hormone [Alopiex lagopus]	254	6e-66

图 3 中国大鲵促甲状腺激素基因 β 亚基、催乳素基因及生长激素基因 Blast 结果

A. 促甲状腺激素基因 β 亚基; B. 催乳素基因; C. 生长激素基因

Fig. 3 The results of blasting with TSH β , prolactin and growth hormone cDNA sequences of *Andrias davidianus*

A. TSH β , B. prolactin gene, C. growth hormone gene

japonicus) (BAB93563)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (L07618)、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) (AAT69236)、朱鹮 (*Nipponia nippon*) (BAC07313)、家鸭 (*Anas platyrhynchos*) (ABB71120)、鸡 (*Gallus gallus*) (057340)、人 (*Homo sapiens*) (NP_000540)、牛 (*Bos taurus*) (P01223)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (P04652)、欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) (Q08127)、日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) (Q7ZZV4)、草鱼

(*Ctenopharyngodon idella*) (BAA20083)、鲤 (*Cyprinus carpio*) (BAA20082)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (P37240)、鲟 (*Acipenser baerii*) (CAB93505) 和肺鱼 (*Neoceratodus forsteri*) (AJ578039)。

对所有研究物种的 TSH β 氨基酸序列进行简约分析,结果显示在 106 个位点中,共有 79 个变异位点,其中有 71 个为简约信息位点。MP 法得到一棵最简约树,其中支长为 336,一致性指数

```

1 ATG CAT TCC GTC TTC GTA GCA TCC ATA CTC CTC TGC CTG GCG TTC GAG CAT GGG ATC TCA 60
 1 M H S V F V A S I L L C L A F E H G I S 20
61 TTC TGT GTT CCT ACT GAA TAC ACT ATG TAT GTG GAA AAC AAA GAG TGT GCC TAC TGC CTG 120
21 F C V P T E Y T M Y V E N K E C A Y C L 40
121 GCC ATC AAC ACC ACA GTT TGC TCT GGA TTC TGT CAC ACG CGG GAT CCT AAT CTT AAG GAG 180
41 A I N T T V C S G F C H T R D P N L K E 60
181 GGG CTC CCT AAA AGC ACT CTG TCT CAG ACG GCG TGC ACC TAT AAA GCC TAC ATT CAG AAG 240
61 G L P K S T L S Q T A C T Y K A Y I Q K 80
241 ACA GTA TTG GTT CCA GGG TGT CCT CTT CAT GTC AAT CCC TAC TTC TCC TAT CCC ATG GCC 300
81 T V L V P G C P L H V N P Y F S Y P M A 100
301 GTG ACC TGT AAG TGC AAC AAA TGC AAC ACA GAC TAC AGT GAC TGC ATA CAT GAG CCA ATA 360
101 V T C K C N K C N T D Y S D C I H E P I 120
361 AAG ACC AAC TAC TGT ACC AAA CCG CAG AAG ACT TAC AAC ATG AGG TTT GCT ATA TGA 417
121 K T N Y C T K P Q K T Y N M R F A I * 138

```

图 4 中国大鲵 TSH β 亚基 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

划线部分为信号肽，* 为终止密码子

Fig. 4 Nucleotide sequence of *Andrias davidianus* TSH β cDNA and the deduced amino acid sequence

Signal peptide of *Andrias davidianus* TSH β is underlined. The translation stop codon is designated with asterisk (*)

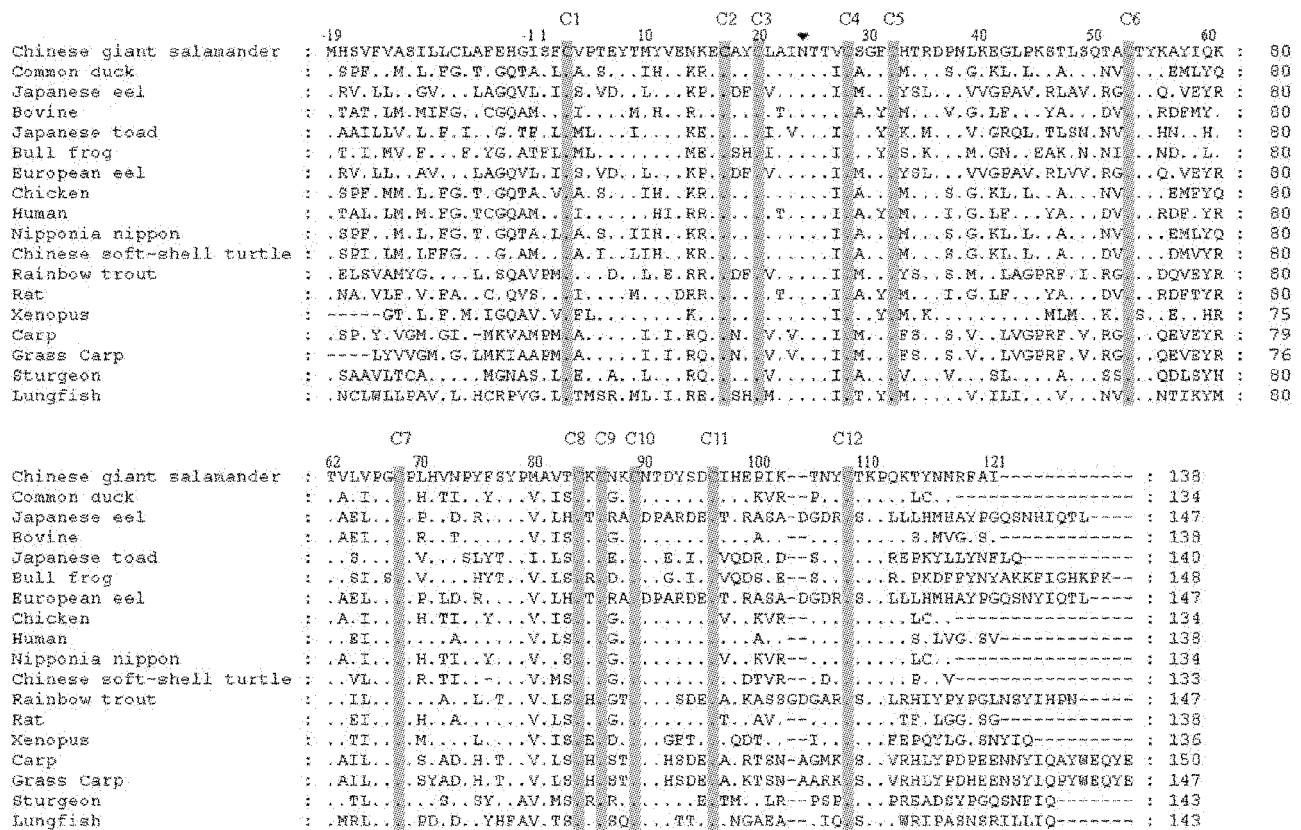


图 5 中国大鲵 TSH β 亚基氨基酸序列与其他脊椎动物 TSH β 亚基氨基酸序列比较

与大鲵 TSH β 亚基氨基酸相同的序列以点(.)代表,以连字符(-)代表插入。12 个保守的半胱氨酸 C1 到 C12 用灰色阴影表示,▼表示保守的天冬氨酸残基连接的糖基化位点

Fig. 5 Multiple protein sequences alignment of vertebrate TSH β mature proteins

Amino acids identical to those of the *Andrias davidianus* are indicated by a dot (.). Hyphens (-) have been inserted to obtain maximum homology. Twelve conserved cysteine residues are designated as C1 through C12 in shaded letters.

▼denotes one putative asparagine (N)-linked glycosylation site is conserved

(consistency indices, CI)、维持性指数 (retention indices, RI) 及重复测量一致性指数 (rescaled consistency indices, RC) 分别为 0.747, 0.744 和

0.556, 该树各分支的自展数据支持率见图 6。NJ 树的构建基于 MEAN 距离, 其中保留自展分析支持率大于 50% 的一致树(图 7)。

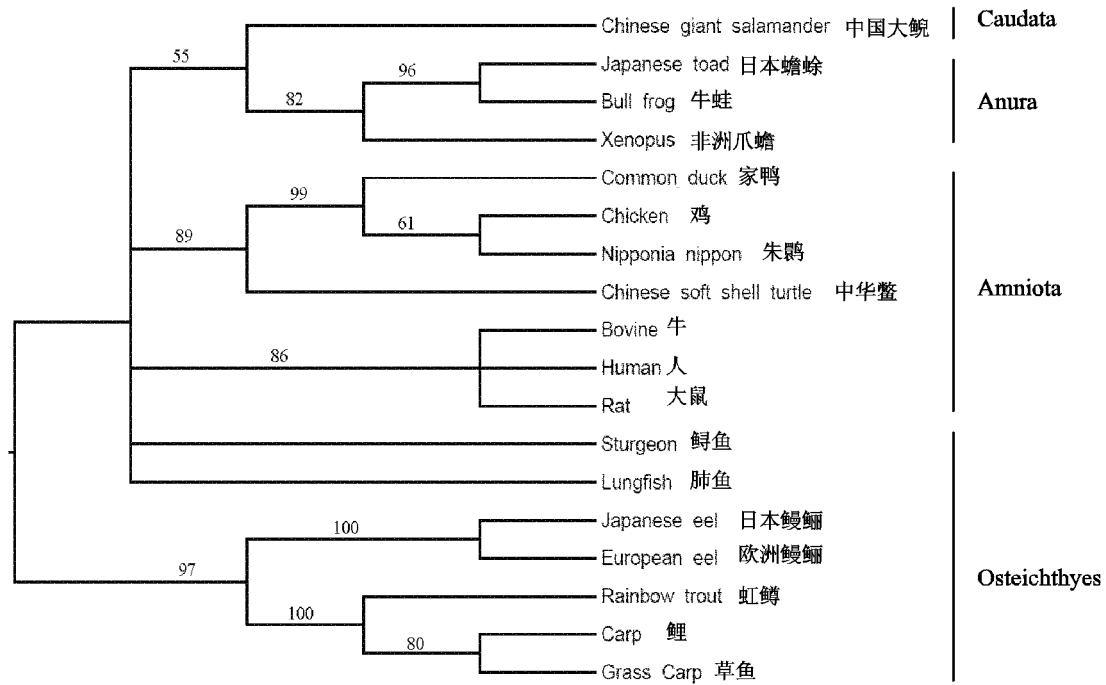


图 6 基于 TSH β 亚基蛋白序列重建的脊椎动物的 Maximum Parsimony (MP) 系统树
Fig. 6 Phylogenetic tree of vertebrate reconstructed by Maximum Parsimony (MP) algorithm based on TSH β amino acid sequence

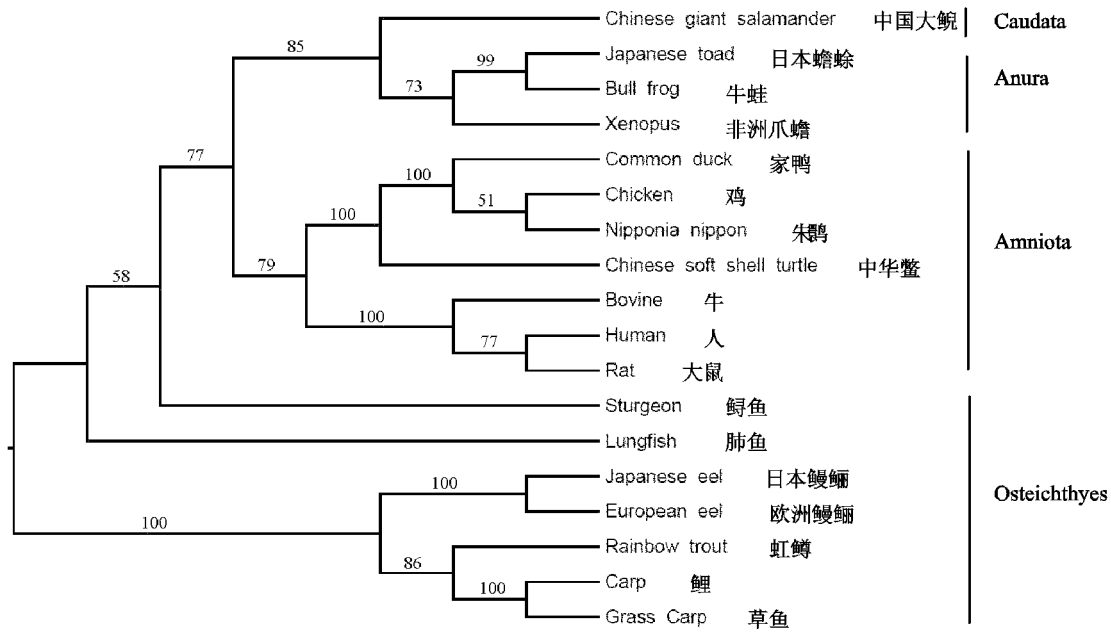


图 7 基于 TSH β 亚基蛋白序列重建的脊椎动物的 Neighbor-joining (NJ) 系统树
Fig. 7 Phylogenetic tree of vertebrate reconstructed by Neighbor-joining (NJ) algorithm based on TSH β amino acid sequence

系统分析得到的 MP 树和 NJ 树的拓扑结构基本一致。较为低等的鱼类较早分化出来,但肺鱼、鲟较为特殊,同高等脊椎动物聚在一起。观察四足动物(包括两栖动物和羊膜动物)聚类情况,由两支组成,其中一支为两栖动物,其中大鲵在两栖动物中较早分化出来,显示其较原始的进化地位;另一支为羊膜动物,由哺乳类、鸟类及爬行类组成,可见 TSH β 系统进化树可以较好的反应脊椎动物发生关系。

2.5 中国大鲵各种组织中 TSH β mRNA 表达分析

用预实验中所建立的半定量 RT-PCR 分析方法对中国大鲵的 16 种组织进行检测,结果如图 8 所示,16 种组织的 18S 基因表达相近,而 TSH β 基因只在垂体、性腺中扩增出来,说明 TSH β 只在垂体、性腺中表达。其中垂体 TSH β 表达量明显高于性腺 TSH β 。

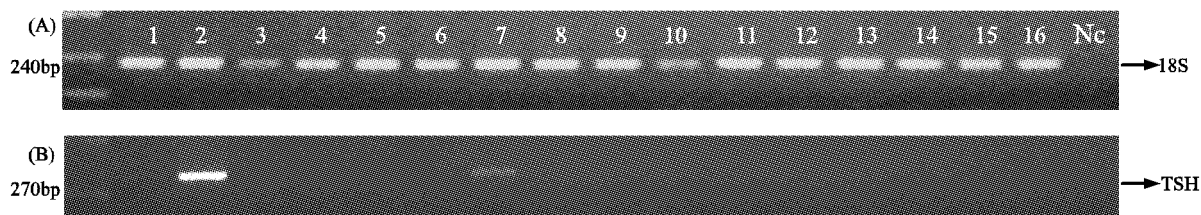


图 8 中国大鲵 TSH β 和 18S mRNA 表达的半定量 RT-PCR 分析

A. 18S; B. TSH β

1: 脑; 2: 垂体; 3: 心脏; 4: 肾脏; 5: 肝脏; 6: 脾脏; 7: 性腺(精巢); 8: 眼; 9: 肺; 10: 胃; 11: 肠; 12: 皮肤; 13: 脂肪; 14: 肌肉; 15: 骨; 16: 膀胱; Nc: 阴性对照

Fig. 8 RT-PCR analysis of the tissue distribution of TSH β and 18S mRNAs in *Andrias davidianus*

A. 18S; B. TSH β

1: Brain; 2: Pituitary; 3: Heart; 4: Kidney; 5: Liver; 6: Spleen; 7: Gonads; 8: Eye; 9: Lung; 10: Stomach; 11: Intestine; 12: Skin; 13: Fat; 14: Muscle; 15: Bone; 16: Bladder; Nc: Negative control

3 讨论

文库质量的评估主要有三个重要参数:库容、重组率及插入片段的大小。美国克隆技术公司对关于一个良好的文库的质量标准是:原始文库重组子在 $5.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^7$ cfu \cdot mL $^{-1}$,重组率大于 90%,插入片断不小于 0.3 kb,平均插入片断大于 1.0 kb^[14]。本文结果表明,所构建的大鲵脑 cDNA 文库质量良好。通过构建大鲵脑 cDNA 文库,一方面可以一次性永久保存大鲵基因资源,另一方面可以利用功能筛选、免疫学筛选、Southern 杂交和大规模测序等现代分子生物学技术来寻找与大鲵生长、发育等相关基因。本研究通过大量随机测序,发现有 51 个 cDNA 片段序列无明显的同源性,20 个片段与已报道的基因有较高同源性,其中包括促甲状腺激素基因、生长激素基因及催乳素基因等。大鲵生长、发育相关基因的获得为进一步探讨其内分泌调节机制提供基础,两栖类在脊椎动物的进化中处于一个特殊的位置,对其进行内分泌学研究,在理论上,可丰富和完善比较内分泌学的内容,在生产实践中,可

为实现两栖类的促生长提供理论依据。

本研究通过文库随机筛选测序,成功获得大鲵促甲状腺激素 β 亚基 cDNA 全长序列。在所比较的脊椎动物 TSH β 蛋白序列中,从鱼类至哺乳类,均存在定位相同的 12 个半胱氨酸残基,它们在成熟肽中可形成 6 个二硫键,对 TSH β 亚基蛋白的正确折叠、维持特定空间结构及生物学活性的实现起关键作用。此外,在第三与第四个半胱氨酸残基中间存在一个保守的天冬氨酸残基连接的糖基化位点(N-X-S/T)。糖基化作用可使糖蛋白类激素生物活性得到全面发挥,同时还可起到保护作用,在合成、分泌过程中避免被酶切^[15]。同源性分析结果表明,所获得的大鲵 TSH β 氨基酸序列与两栖类牛蛙、蟾蜍及爪蟾同一蛋白的同源性分别为 53.6%、52.2% 和 60.3%;低于同爬行类、鸟类及哺乳类相似性(60.9%~61.9%),但仍高于与鱼类的同源性(37%~42%,仅鲟为 53.6%)。该结果提示,相似性情况与物种分类地位存在一定的不相关性,分析原因,可能由于 TSH β 基因进化速率的不恒定所造成,即 TSH β 基因进化并非以一恒定速率进行,而是在某些阶段进化速率突然加快或放慢。

两栖动物是最早由水中登上陆地的脊椎动物,其形态和机能既保留着适应水生生活的特征,又具有开始适应陆地生活的特征,在脊椎动物演化过程中属于由水生到陆生的过渡型动物。该纲在进化树中单独分出,反映了其进化地位的特殊性。在现生滑体两栖类中,有尾目在外形特征上更接近滑体两栖类的祖先类型,而化石证据提示,三叠纪蛙的出现远早于侏罗纪蝶螈^[16-17]。本研究的结果支持大鲵较为原始,但由于有尾目中仅包含大鲵一个物种,加之系统树自展支持率较低,该结论有待加入更多蝶螈 TSH β 序列并利用多种建树方法进一步验证。

本研究应用 RT-PCR 方法检测了 TSH β mRNA 在中国大鲵的各种组织中的表达情况,结果表明:TSH β 不仅在垂体检测到表达,在性腺也有少量表达。在脊椎动物中,仅见石斑鱼性腺有 TSH β 表达^[10, 15, 18]。那么性腺表达 TSH β 是否为非羊膜类动物所特有,TSH β 在性腺有何具体生理作用,还有待更多研究来验证。目前已知垂体分泌的 TSH 主要作用是促进甲状腺激素的释放,其合成分泌分别受到下丘脑释放的促甲状腺激素释放激素的正向调节及甲状腺激素的负反馈调节,即构成下丘脑-垂体-甲状腺调控轴,该调控轴在两栖类变态发育过程中起重要作用^[11]。大鲵促甲状腺激素 β 亚基基因的 cDNA 全长序列的成功克隆,弥补了 Genbank 中缺乏有尾目促甲状腺激素 β 亚基序列这一空白,同时为以后研究大鲵变态发育的调控、探讨该基因结构与功能在脊椎动物中的进化及进一步开发制备相关基因工程产品提供了很好的契机。

4 结论

(1) 本研究成功构建了大鲵脑 cDNA 文库,并通过随机测序分析,获得 20 个片段与已报道的基因有较高同源性,其中包括促甲状腺激素基因、生长激素基因及催乳素基因等。

(2) 第一次在有尾目大鲵中获得 TSH β cDNA 序列,且包含完整开放读码框。

(3) 邻接法和最大简约法构建了脊椎动物 TSH β 系统发育树,显示有尾目大鲵为两栖动物中较早分化的一支,表明其进化地位较原始。

(4) RT-PCR 组织分布分析发现,TSH β 基因除垂体有表达外,性腺也有少量表达。性腺表

达 TSH β 的具体生理作用,还有待更多研究来验证。

参考文献:

- [1] 金立成,汪建国. 大鲵生物学与养殖实用技术 [M]. 台湾:水产出版社,1997:1-2.
- [2] 侯进慧,朱必才,童玉玮,等. 中国大鲵研究进展 [J]. 四川动物,2004,23(3):262-276.
- [3] Wang X M, Zhang K J, Wang Z H, et al. The decline of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* and implication for its conservation [J]. Oryx, 2004, 38(2): 197-202.
- [4] 刘鉴毅,谭永安,卢兴孙,等. 中国大鲵子二代规模化人工孵化技术的研究 [J]. 经济动物学报,2005,9(3):152-155,159.
- [5] Murphy R W, Fu J Z, Upton D E, et al. Genetic variability among endangered Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. Mol Ecol, 2000, 9: 1539-1547.
- [6] 陶峰勇,王小明,郑合勋,等. 中国大鲵四群体的遗传结构和地理分化 [J]. 动物学研究,2005,26(2):162-167.
- [7] 杨芳,贺智敏,詹显全,等. 大鲵肝脏组织定向 cDNA 文库的构建及鉴定 [J]. 动物学报,2004,50(3):475-478.
- [8] Zhang P, Chen Y Q, Liu Y F, et al. The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata) [J]. Gene, 2003, 311:93-98.
- [9] Ito M, Koide Y, Takamatsu N, et al. cDNA cloning of the β subunit of teleost thyrotropin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 6052-6055.
- [10] Chien J T, Chowdhury I, Lin Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding pituitary thyroid stimulating hormone β -subunit of the Chinese soft-shell turtle *Pelodiscus sinensis* and regulation of its gene expression [J]. Gen Comp Endocr, 2006, 146: 74-82.
- [11] Okada R, Iwata T, Kato T, et al. Cloning of bullfrog thyroid stimulating hormone (TSH) β subunit cDNA; expression of TSH β mRNA during metamorphosis [J]. Gen Comp Endocr, 2000, 119: 224-231.
- [12] Komoike Y, Ishii S. Cloning of cDNA s encoding the three pituitary glycoprotein hormone β subunit precursor molecules in the Japanese toad, *Bufo japonicus* [J]. Gen Comp Endocr, 2003, 132: 333-347.
- [13] Buckbinder L, Brown D D. Expression of the

-
- Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes during metamorphosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3820–3824.
- [14] 钟肖芬, 卫剑文, 赵贵军, 等. 平鲐海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(3): 66–69.
- [15] Hsieh Y L, Chowdhury I, Chien J T, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding thyroid-stimulating hormone β -subunit of common duck and mule duck pituitaries; *In vitro* regulation of steady-state TSH β mRNA level[J]. Comp Biochem Physiol B (Biochem Mol Biol), 2007, 146: 307–317.
- [16] Yung J Z. The life of vertebrates [M]. Oxford: Clarendon press, 1981: 267–275.
- [17] Gao K Q, Shubin N H. Earliest known crown-group salamander[J]. Nature, 2003, 422: 424–428.
- [18] Wang Y, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential expression of thyroid-stimulating hormone β -subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers [J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 220: 77–88.

Construction of cDNA library from the brain of Chinese giant salamander *Andrias davidianus* with cloning and sequence analysis of the cDNA encoding thyroid-stimulating hormone β -subunit

YANG Li-ping¹, YANG Hui-rong^{1,2}, ZHANG Yong¹, LIU Yun¹, HUANG Hai^{1,3},
LIU Xiao-chun¹, MENG Zi-ning¹, HUANG Jun-hai⁴, LIN Hao-ran^{1,3}

(1. Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Animal Science College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

3. Ocean College of Hainan University, Haikou 570228, China;

4. Doumen Golden Salamander Aquatic Technology Limited Company, Zhuhai 519100, China)

Abstract: Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) is endemic to China mainland, which is the transitional style for evolution from aquatic fish to reptiles. In order to save the cDNA genetic information of this rarity and clone some hormone genes, a cDNA library from the brain was constructed using the CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit. The titer of the primary library was 5.0×10^5 cfu·mL⁻¹, and the recombinant efficiency of cDNA library was 91.70%. The average insert size was 0.791 kb, while the titer of the amplified library was 4.0×10^9 cfu·mL⁻¹. Random sequencing of 200 cDNA clones generated 20 sequences of high identify with the known genes, including thyroid-stimulating hormone β -subunit(TSH β), prolactin and growth hormone, suggesting some full length cDNAs were contained in the library. There were three clones of TSH β , which was 705 bp in length, including an open reading frame of 417 bp. The deduced TSH β subunit contained 138 amino acids consisting of a putative signal peptide of 19 amino acids and a putative mature protein of 119 amino acids. The deduced amino acids of the Chinese giant salamander TSH β mature protein shared identities of 53.6%, 52.2% and 60.3% with bullfrog, Japanese toad and xenopus respectively. The vertebrate TSH β protein sequences were used to construct Neighbor-joining (NJ) and Maximum parsimony (MP) phylogenetic tree. As analyzed, *A. davidianus* derived from amphibia first, which could reflect its original evolutionary status. RT-PCR analysis indicated that the TSH β mRNA was expressed abundantly not only in pituitary but also in gonads.

Key words: *Andrias davidianus*; cDNA library; thyroid-stimulating hormone β -subunit; tissue distribution