

文章编号: 1000-0615(2003)04-0381-05

• 研究简报 •

# 石斑鱼一氧化氮合酶 cDNA 的分子克隆及序列分析

江 1, 谢 骏<sup>1,2</sup>, 李文笙<sup>1</sup>, 林浩然<sup>1</sup>, 吴淑勤<sup>2</sup>

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

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

关键词: 斜带石斑鱼; 一氧化氮合酶; 分子克隆; 钙调蛋白结合区

中图分类号: Q785 文献标识码: A

## Molecular cloning and sequence analysis of nitric oxide synthase gene from *Epinephelus coioides*

JIANG Yong<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>1,2</sup>, LI Wen-sheng<sup>1</sup>, LIN Hao-ran<sup>1</sup>, WU Su-qin<sup>2</sup>

(1. Institute of Aquatic Economic Animal & Guangdong Provincial Key Economic Animal, Zhongshan University,

Guangzhou 510275, China; 2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** Nitric oxide (NO) is a highly reactive, labile gas produced by the enzymatic conversion of L-arginine by nitric oxide synthases NOS. In mammals, NO mediates multiple physiological processes from cardiovascular control to neural transmission. Three NOS isoforms neuronal, inducible and endothelial have been cloned, sequenced and characterized from several mammalian species. nNOS isoforms were characterized from adult grouper (*Epinephelus coioides*) by using RT-PCR with degenerate oligonucleotide primers designed against a portion of the mammalian NOS gene that codes for the calmodulin-binding region, this region was chosen because it is highly conserved among NOS sequences to date and is a functionally important region of NOS proteins. A partial gene sequence of 377 bp corresponding to mammalian nNOS is obtained. This sequence showed 82%–83%, 85%–93% homogeneity with that of mammalian and the other fish respectively. The deduced amino acid of *E. coioides* shows high identity with that of mammalian (92%–93%), and the other fish (93%–99%). Phylogenetic analysis of these sequences confirms the conserved nature of NOS, particularly of the calmodulin-binding domains.

**Key words:** *Epinephelus coioides*; nitric oxide synthase; molecular cloning; calmodulin CaM binding region

一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 专一性催化 L-精氨酸转化为 L-瓜氨酸和一氧化氮 (nitric oxide, NO), 产物 NO 是一种重要的生物信使分子, 对其功能和代谢的研究越来越受人们的重视<sup>[1]</sup>。国际上, 鱼类 NOS 的研究还刚起步, 已有研究者在鱼类中检测到 NOS 的存在<sup>[2-5]</sup>。虹鳟<sup>[6]</sup>、金鱼<sup>[4]</sup>、大西洋鲑<sup>[7]</sup>和沟鲈<sup>[8]</sup>的诱导型 NOS (iNOS) 和神经型 NOS (nNOS) 的部分序列已鉴定。国内对哺乳动物的 NOS 也进行了研究<sup>[9-11]</sup>, 尚未见关于鱼类 NOS 方面的研究报道。

收稿日期: 2002-11-27

资助项目: 国家海洋 863 项目资助(2001AA621010, 2001AA622050)

作者简介: 江 (1968-), 女, 山西太原人, 博士研究生, 主要从事鱼类生理和分子生物学研究。Tel: 020-84110188, E-mail:

jiangyong001@163.net

斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 俗称青斑, 其肉鲜味美, 价格稳定, 倍受东南亚及我国广大消费者的青睐, 为海水名贵鱼类。本文选用斜带石斑鱼进行一氧化氮合酶 (NOS) 基因研究, 为重组 NOS 产品的研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验鱼

斜带石斑鱼采自广东省大亚湾水产试验中心。

#### 1.1.2 菌种

大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  为中山大学水生经济动物研究所鱼类分子生物学实验室保存。

#### 1.1.3 工具酶和试剂

Trizol Reagent total RNA isolation Reagent、Superscript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit 为 GIBCOBRL 公司产品; EX TaqE、限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品、pGEM-T easy vector systems 为 Promega 公司产品。E. Z. N. A. Gel Extraction Kit、E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit 为 Omega 公司产品。相关试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 石斑鱼下丘脑组织总 RNA 提取

将活的斜带石斑鱼断头处死, 分离 100  $\mu$ g 下丘脑组织, 用 DEPC 水洗掉血液后, 按照进口 Trizol 试剂说明书所提供的方法提取总 RNA。定量, 电泳鉴定其质量后, 置 -80  $^{\circ}$ C 备用。

#### 1.2.2 RT-PCR 扩增石斑鱼 NOS 编码区 377bp cDNA 片段

引物委托上海申友生物技术有限责任公司合成, 引物设计参考哺乳动物和其它鱼类 NOS 编码区的保守区, 设计简并引物。

P1: 5' GGYTGGTACATGRGCACYGAGATYGG 3'; P2: 5' CCNGTBTTCAYCAGGAGATG 3'

P3: 5' GGRTNCCRTTSCAAAKGT 3'; P4: 5' AAGGCRCARAASTGDGGRTA 3'

其中 P1、P4 为合成 NOS 的第一轮引物; P2、P3 为套式 PCR 引物。

按照逆转录试剂盒 Superscript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit 提供的方法进行 cDNA 合成, 产物置于冰上待 PCR 反应。PCR 反应条件根据 EX TaqE 试剂盒提供的试剂比例设置。退火温度为 55  $^{\circ}$ C, 由 Biometra 的 PCR 仪设定 PCR 操作程序自动完成, 置于 4  $^{\circ}$ C 备用。

#### 1.2.3 石斑鱼 NOS 编码区 377bp 片段克隆

将 PCR 产物用 E. Z. N. A. Gel Extraction Kit 纯化后, 与 pGEM-T Easy Vector 载体连接, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 按照 E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit 要求进行质粒的分离纯化。将纯化后的质粒 DNA 用限制性内切酶 *EcoRI* 酶切鉴定。

#### 1.2.4 DNA 序列分析

委托上海申友生物技术工程公司进行双向测序。

#### 1.2.5 NOS 序列系统树分析

NOS 序列系统树分析的材料来源于 GenBank, 应用 Clustal 1.5 软件对钙调蛋白区氨基酸进行系统树分析。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增石斑鱼 NOS 编码区 377bp cDNA 片段及其克隆

利用总 RNA 反转录得到的 cDNA 为底物, 以引物 P1、P4 和 P2、P3 进行套式 PCR, 成功合成了 377bp 的 NOS 编码区 cDNA 片段。RT-PCR 产物与 T-easy 载体连接后, 转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 回收纯化后的质粒经酶切鉴定, 其中全部为插入的 NOS 编码区 cDNA 片段, 结果见图 1。

### 2.2 序列分析

双向测序后得到的片段, 序列如图 2 所示。

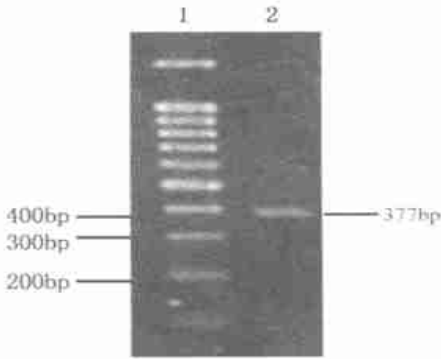


图1 石斑鱼套式 PCR 产物  
Fig. 1 Nested amplification product  
1. 分子量标准; 2. 套式 PCR 产物  
1. 100bp marker; 2. nested PCR product

```

CCTGTTTTTCATCAGGAGATGCTCAACTACCGCCCTCACTCTTCCTTTGAGTAC
P V F H Q E M L N Y R L T P S F E Y
CAGCCTGATCCTTGGAAATACCCACGTGTGGAAAGGAGTCAATGGGACGCCACA
Q P D P W N T H V W K G V N G T P T
AAGAAAAGAGCTATTGGATCAAGAAGCTTGCCAAGGCTGTGAAGTCTCGGCC
K K R A I G F K K L A K A V K F S A
AAGCTCATGGCCAGGCCATGGCCAAGAGGGGTGAAAGCCACCATACTGTTTGGC
K L M G Q A M A K R V K A T I L F A
ACAGAGACAGGCAAAATCGCAAGATATGCCAAAATCTGTGTGAAATCTCAAG
T E T G K S Q D Y A K T L C E I F K
CACGCTTTTGACCAAAGTCAATGGATGAATATGATGTGGTGGACCTG
H A F D A K V M S M D E Y D V V D L
GAGCATGAGACACTGGTCTTGGTGGTACCAGCACATTGGGAACGGC GATCC
E H E T L V L V V T S T F G N G D
    
```

图2 nNOS部分核苷酸及推测的氨基酸序列  
Fig. 2 The nucleotide sequence of nNOS cDNA synthesized by RT-PCR from grouper hypothalamic tissue and deduced amino acid sequence  
下划线为钙调蛋白结合区 the calmodulin-binding domains are underlined

2.3 同源性比较

将得到的石斑鱼碱基序列和推断的氨基酸序列与其它鱼类和哺乳类的相应序列进行比较,结果见表1和图3。

表1 石斑鱼 NOS 与其它已知类型 NOS 比较

Tab. 1 Identities of grouper NOS to others

拉丁学名 species	常用名 common name	蛋白质 protein	氨基酸同源性(%) amino acid identities	碱基同源性(%) nucleotide identities
<i>Epinaphelus coioides</i>	石斑鱼 grouper	nNOS	100	100
<i>Danio rerio</i>	斑马鱼 zebrafish	nNOS	98	85
<i>Takifugu poilonotus</i>	河豚 fugu	nNOS	95	88
<i>Homo sapiens</i>	人 human	nNOS	93	83
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	兔 rabbit	nNOS	92	82
<i>Rattus norvegicus</i>	鼠 rat	nNOS	92	
<i>Cavia porcellus</i>	豚鼠 guinea pig	nNOS	92	83
<i>Salmo salar</i>	大西洋鲑 Atlantic salmon	nNOS	93	85
<i>Stenotomus chrysops</i>	刺棘鲷 scup	nNOS	99	93
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	虹鳟 rainbow trout	nNOS	53	
<i>Homo sapiens</i>	人 human	eNOS	63	

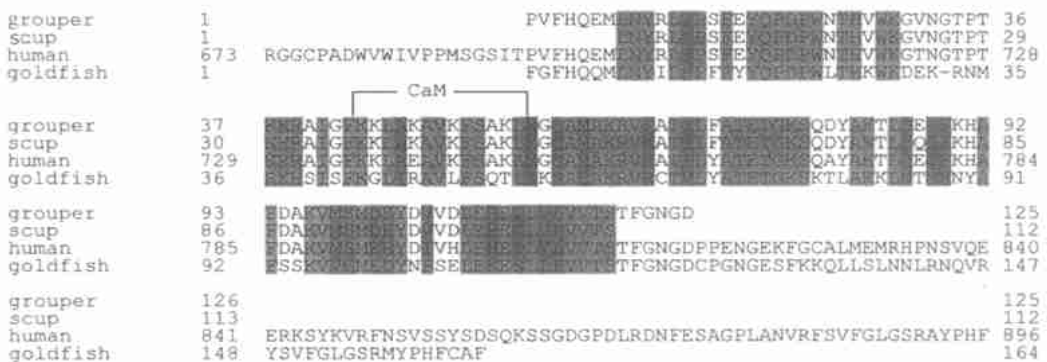


图3 由石斑鱼 NOS 基因推断的氨基酸序列与其它鱼类及人的比较结果

Fig. 3 Multiple alignment of protein sequences predicted from the different nitric oxide synthases genes

CaM indicated conserved elements characteristic (the calmodulin-binding domains) for the different fish and human

CaM 为钙调蛋白, grouper 代表石斑鱼, scup 代表刺棘鲷, human 代表人, goldfish 代表金鱼

### 2.4 系统树分析

系统树分析结果表明, 本实验克隆的基因为 nNOS, 而不是 iNOS 和 eNOS, 结果见图 4。

### 3 讨论

将测得编码石斑鱼 nNOS 的 377 个碱基及推测的氨基酸序列输入 GenBank 进行同源性比较, 结果表明石斑鱼与哺乳类动物的碱基序列同源性为 82% ~ 83%; 与鱼类的碱基序列同源性为 85% ~ 93%。推测的氨基酸序列与哺乳类动物、其它鱼类相应序列的同源性分别为 92% ~ 93%、93% ~ 99%。证明一氧化氮合酶的钙调蛋白结合区具有高度的保守性, 提示该区域在鱼类生理功能中具有重要意义。

NOS 的基因结构均由一连串相对独立的分子结构域折叠组成, 包括 L-Arg 结合区、CaM 结合区、FMN 结合区、FAD 结合区和 NADPH 结合区, nNOS 合成 NO 的催化功能依赖于 CaM 的调节, 其识别位点在 CaM 结合区, 通过 CaM 与该位点的特异结合, 启动合成过程的电子传递, 从而调控 NO 的合成<sup>[12]</sup>。

近来关于 nNOS 在生殖中的作用愈来愈引起人们的重视。目前越来越多的证据表明, nNOS 与性成熟有关<sup>[13]</sup>, 并能刺激促性腺激素的分泌<sup>[14]</sup>, 今后可以在此基础上, 进行石斑鱼 NOS 重组的表达研究, 探讨重组 NOS 产品对石斑鱼繁殖的影响。

### 参考文献:

[ 1 ] Wang T Y. Nitric oxide, a new discovered messenger molecule [J]. Biol Bull, 1991, 34(12):40. [王天云. 一氧化氮, 新发现的一种信使分子 [J]. 生物学通报, 1999, 34(12):40.]

[ 2 ] Barroso J B, Carreras A, Esteban F J, et al. Molecular and kinetic characterization and cell type location of inducible nitric oxide synthase in fish [J]. Am Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279: 650- 656.

[ 3 ] Conte A, Ottaviani E. Characterization of *Cyprinus carpio* brain nitric oxide synthase[J]. Neurosci Lett, 1998, 242: 155- 158.

[ 4 ] Cox R L, Stegeman J J. Characterization of nitric oxide synthase NOS in fish liver: enzyme of combined activity and immunoblot analysis [A]. In: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs E A, (eds). The biology of nitric oxide [C]. Portland Press, London, 1996, 5: 47.

[ 5 ] Huque T, Brand J G. Nitric oxide synthase activity of the taste organ of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 108: 481- 486.

[ 6 ] Laing K J, Hardie W, Grabowski P S, et al. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dev Comp Immunol 1999, 23 (1): 71- 85.

[ 7 ] Oyan A M, Nilsen F, Goksøyr A, et al. Partial cloning of constitutive and inducible nitric oxide synthase and detailed neuronal expression of NOS mRNA in the cerebellum and optictectum of adult Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. Mol Brain Res, 2000, 78: 38- 49.

[ 8 ] Schoort W P, Plumb J A. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri* [J]. Dis Aquat Org, 1994, 19: 153- 155.

[ 9 ] Luo G X, Tu Q P. Nitric oxide immunity regulate use [J]. Shanghai Immunol, 1996, 16(4):245- 247. [罗高兴, 涂秋萍. 一氧化氮的免

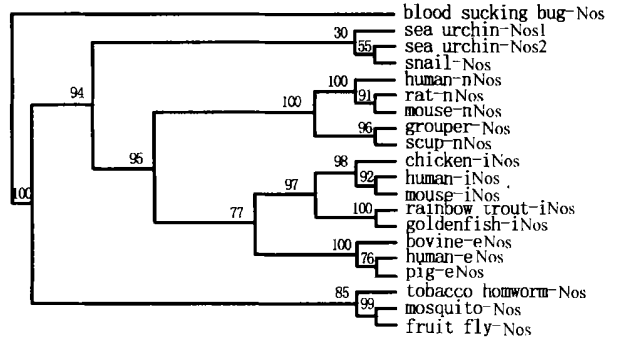


图 4 NOS 系统树分析结果

Fig.4 Unrooted NOS phylogenetic trees

human nNOS, 人的 nNOS, *Homo sapiens*, L02881; rat nNOS, 大鼠的 nNOS, *Rattus rattus*, X59949; mouse nNOS, 家鼠的 nNOS, *Mus musculus*, D14552; scup nNOS, 刺棘鲷的 nNOS, *Stenotomus chrysops*, AF191749; human iNOS, 人的 iNOS, *Homo sapiens*, X73029; rat iNOS, 大鼠的 iNOS, *Rattus norvegicus*, L12562; mouse iNOS, 家鼠的 iNOS, *Mus musculus*, M87039; chicken iNOS, 鸡的 iNOS, *Gallus gallus*, U46504; rainbow trout, 虹鳟的 iNOS, *Oncorhynchus mykiss*, X97013; goldfish iNOS, 金鱼的 iNOS, *Carassius auratus*, X97603; human eNOS, 人的 eNOS, *Homo sapiens*, M95296; bovine eNOS, 牛的 eNOS, *Bos taurus*, M89952; pig eNOS, 猪的 eNOS, *Sus scrofa*, U59924; fruit fly NOS, 果蝇的 NOS, *Drosophila melanogaster*, U25117; tobacco hornworm NOS, 蛾的 NOS, *Manduca sexta*, AF062749; mosquito NOS, 蚊的 NOS, *Anopheles stephensi*, AF053344; snail NOS, 蜗牛的 NOS, *Lymnaea stagnalis* AF012531; sea urchin NOS 1, *Arbacia punctulata*, 海胆的 NOS1, AF191750; sea urchin NOS2, *Arbacia punctulata*, 海胆的 NOS2, AF191751

疫调节作用 [J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(4): 245- 247. ]

- [ 10] Zhao H W. Nitric oxide and immunity regulation[ J]. Shanghai Immunol, 1996, 16( 6):373- 375. [ 赵红卫. 一氧化氮与免疫调节 [J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 373- 375. ]
- [ 11] Fu X P. Effect of nitric oxide on the course of *Fasciola hepatica* infecting goats[ J]. Chinese J Veteri Parasitol, 2000, 6- 33. [ 傅小平. 一氧化氮在肝片吸虫、鸡球虫感染过程中的作用研究[J]. 中国兽医寄生虫病杂志, 2000, 6- 33. ]
- [ 12] Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls[J]. Cell, 1994, 78: 915- 918.
- [ 13] Conrad K P, Davis A K. Nitric oxide synthase activity in placenta from women with pre-eclampsia[ J]. Placenta, 1995, 16:691- 699.
- [ 14] Shaamash A H. Placental nitric oxide synthase activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre eclampsia and eclampsia[ J]. Inter J Gynecol Obst, 2001, 72(2): 127- 133.

## 欢迎订阅 2004 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊, 主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业, 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 88 页, 双月出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 84 元(含邮费)。邮发代号: 18- 250, 国内统一刊号: CN11- 3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005- 8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本, 欢迎购买。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号, 邮政编码: 100039

联系电话: 010- 68673921, 传真: 010- 68673931

E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net