

文章编号:1000-0615(2003)06-0533-07

RACE 法分离团头鲂 生长抑素全长 cDNA 及其序列测定

俞菊华^{1,2}, 夏德全¹, 杨 弘¹, 贺艳辉¹, 陈勇军¹, 吴婷婷¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 生长抑素具有抑制脑垂体 GH 释放的作用, 是调控鱼类生长的主要激素之一。本研究采用 RT 和 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法, 分离和测定了团头鲂脑中生长抑素 PSSI cDNA 的全长核苷酸序列, 并对该基因进行了结构和系统进化分析。3' RACE 扩增得到 700bp 左右的片段, 5' RACE 分离得到 500bp 左右的片段, 把 3' 片段与 5' 片段拼接得到全长 cDNA。cDNA 全长 735bp [不含 poly(A)], 5' 端非翻译区有 100nt, 3' 端 290bp [不包含 poly(A)], 阅读框 (open reading frame, ORF) 345bp。该序列与金鱼 PSSI cDNA 序列同源性为 90%, 主要差异在 5' 端非翻译区。团头鲂生长抑素 mRNA 阅读框编码 114 个氨基酸, 包括一些酶切位点, 产生 26 个氨基酸的大分子态生长抑素, 进一步加工成与人等结构相似的 14 个氨基酸的生长抑素; 团头鲂生长抑素前体氨基酸序列与金鱼、虹鳟、鲢鱼、鳊鱼、蛙、牛、鼠、鸡、猴、人等的比较发现, 它与金鱼的同源性最高达 95%, 与鳊鱼最低 50%, 与人 68%。这说明生长抑素基因在长期的进化中相当保守, 同时, 也因为鱼类生活环境多样导致基因变异较大。

关键词: 团头鲂; 快速扩增 cDNA 末端; 生长抑素; 分离

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Isolation and sequence somatostatin cDNA of *Megalobrama pellegrini*

YU Ju-hua^{1,2}, XIA De-quan¹, YANG Hong¹, HE Yan-hui¹, CHEN Yong-jun¹, WU Ting-ting¹

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. College of Fisheries, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: Somatostatin is one of important hormones in fish growth regulation, which was characterized as a physiological inhibitor of GH secretion in pituitary. In this study, a two-phase rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR was used for the isolation of the full length cDNA of proprosomatostatin I from brain of blunt bream *Megalobrama pellegrini*. The structure and phylogenesis of this gene were also analyzed. A fragment about 700bp was amplified in 3' RACE-PCR, and sequenced. Based upon this sequence a second gene-specific primer for 5' RACE-PCR was designed which yielded an about 500bp fragment. Sequence analysis revealed a 735bp cDNA containing the 100nt 5'-untranslated region, 290bp 3'-untranslated regions and 345bp open reading frame which encode a preprosomatostatin of 114 amino acid. The deduced 114-amino acid PPSS contains a number of

收稿日期: 2003-04-15

资助项目: 中国水产科学研究院科研基金资助(2001-3-7)

作者简介: 俞菊华(1966-), 女, 江苏苏州人, 高级工程师, 南京农业大学在读博士生。主要从事鱼类遗传育种研究

通讯作者: 吴婷婷(1944-), 女, 上海市人, 教授, 博士生导师。主要从事生化生理与生物技术研究。Tel: 0510-5554552, E-mail: wutt

@ffrc.ac.cn

putative processing sites, potentially yielding a 26-amino acid peptide that could be processed further to a 14-amino acid peptide identical in structure to mammalian SS-14. Sequence analysis revealed the identity rate of cDNA of propresomatostatin I of blunt bream and goldfish is 90%. Alignment score between deduced amino acid sequences of propresomatostatin I from *M. pellegrini* and goldfish, rainbow trout, catfish, anglerfish, frog, cow, rat, chicken, monkey, human being is 95%, 78%, 74%, 50%, 70%, 67%, 65%, 75%, 68%, and 68% respectively. These results indicate the somatostatin gene is conservative in the progress of evolution, meanwhile, it is also the cause of the variation of dwelling environment of fish that induces the great gene differences.

Key words: *Megalobrama pellegrini*; rapid amplification of cDNA ends (RACE); somatostatin; isolation

生长抑素最早是从哺乳动物下丘脑分离得到的抑制生长激素分泌的多肽。现有研究表明,鱼类生长抑素 cDNA 有 3 种^[1],分别为 SRIF-14, [Pro²] SRIF-14, SRIF-28, 其中 SRIF-14 和 [Pro²] SRIF-14 具有抑制脑垂体 GH 本底释放的作用^[2]。因此通过生物技术减少体内 SRIF-14 基因的表达,能导致生长激素表达量增加,从而促进动物的生长。团头鲂为我国主要淡水养殖鱼类之一,其肉质细嫩,鲜美,改良团头鲂品种,提高它的生长速度,是遗传育种学家的研究目标之一。反义核酸免疫技术为改良品种提供了新的途径,本研究使用 RACE 法分离和克隆了团头鲂生长抑素 PSS1 全长 cDNA,为进一步构建其反义基因及今后研究团头鲂生长过程中该基因的表达规律奠定了基础,丰富了团头鲂的基础数据资料。

1 材料和方法

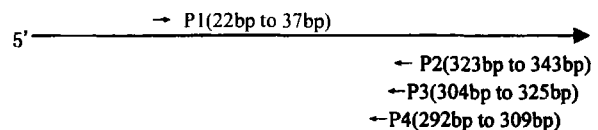
1.1 材料

实验动物:团头鲂取自本单位实验场。组织为下丘脑。

试剂:抽提 RNA 用 Promega 的 Trizol Reagent, 3' RACE 用 Takara 试剂盒,反转录酶、RnaseH、TdT 酶购自 Takara, Taq 酶购自 Promega。

引物设计与合成:根据已知鱼生长抑素 PSS1 cDNA 保守序列合成了如下引物:P1 5' - CTG ATC TAG ATG CGC ACT GGC GCT C - 3'; P2 5' - ACA CGA CGT GAA AGT TTT CC - 3'; P3 5' - CTG ATC TAG ACC AGA AGA AGT TCT TGC ATC C - 3'; P4 5' - CAT CCG GCT TTG CGC TC - 3'。这些引物与模板的匹配方式见图 1, 引物由 Takara 公司合成。

测序:直接将 PCR DNA 送上海开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。



1.2 方法

下丘脑总 RNA 抽提:取团头鲂下丘脑称重,用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙啶染色显示 28s 和 18s 检测 RNA 完整性。

图 1 实验所用引物在 PSS1 上的相对位置

Fig.1 Relative positions of different RACE primers in the sequence of PSS1

3' RACE: 根据试剂盒的操作流程进行:用 5 μ g 总 RNA 以 dT - Ap[dT - AP, 5' - CTGATCTAGAGG TACCGGATCC(T)₁₆ - 3'] 为引物,用 AMV 根据使用说明进行 RT 反应,然后用 RT 液的 2%, AP[AP, 5' - CTGATCTAGAGGTACCGGATCC - 3'] 和 P1 为引物进行 PCR, PCR 总体积 50 μ L, 其中含 5 μ L 10 \times 反应缓冲液, 2 μ mol \cdot L⁻¹ 氯化镁, 200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP, 引物各 0.4 μ mol \cdot L⁻¹, 2.5U Taq 酶。反应条件 94 $^{\circ}$ C 3min, 然后 28 循环 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 扩增液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 测序。

5' RACE: 方法原理参考文献 [3, 4] 的方法, 用 5 μ g 总 RNA, 以 P2 为引物, 进行 RT 反应, 然后加 RnaseH, 分解 mRNA, 用试剂盒回收 cDNA, 去除多余的 dNTP, 引物等; 再用 TdT 酶在 cDNA3' 端加 poly (A), 用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA, 以此为模板, 用 P3 及 dT - AP (同 3' RACE) 为引物, 进行 PCR, 反应体系组成同 3' RACE, PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 再以此回收液为模板, 用

P4 及 AP 进行 PCR,反应体系组成同上,PCR 液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,测序。

序列分析:用 Dnastar 5.02 版, Dnaman 5.2 分析团头鲂 ss mRNA 序列,以及翻译的氨基酸序列与其它鱼类的系统发生。

2 结果

2.1 3' RACE

根据金鱼及其它鱼类生长抑素 mRNA 3' 端保守序列,设计引物 P1,根据 3' RACE 操作流程,结果得到 700bp 左右的特异条带见图 2,PCR 液送上海开瑞用 P1 测序,结果获得 599bp 核苷酸序列,与现有的金鱼生长抑素 mRNA 比较,确定为团头鲂 + 52bp 始到 3' 末端的片段。

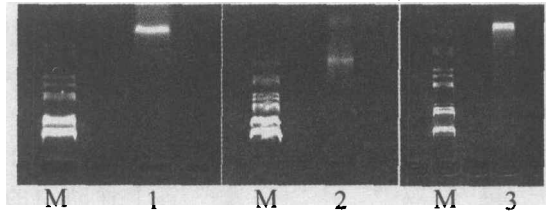


图 2 RT-PCR 结果

Fig. 2 Results of RT-PCR

M. Lambda DNA/HindIII + Eco. RI 分子标准; 1. 3' 端 RT-PCR; 2. 5' 端 RT-PCR (P3 和 polyT-AP 为引物); 3. 5' 端 PCR (P4 和 AP 为引物)

Lane M. Lambda DNA/HindIII + Eco. RI markers; Lane 1. RT-PCR product of 3' RACE; Lane 2. RT-PCR product of 5' RACE with primers P3 and polyT-AP; Lane 3. RT-PCR product of 5' RACE with primers P4 and AP

2.2 5' RACE

根据 5' RACE 操作流程,最后获得 500bp 左右的特异条带见图 2,PCR DNA 送上海开瑞以 P4 为引物测序,结果获得 375 bp 核苷酸序列,经过序列分析,发现为团头鲂 - 100bp 到 278bp。

2.3 序列拼接与分析

根据 5' RACE、3' RACE 的结果,考虑用 PCR 液测序在引物后 20 ~ 30bp 不一定准确,使用 Dnastar (5.2) 把 5', 3' 拼接得团头鲂生长抑素 PSSI cDNA 序列 (GenBank accession number: AY247267, 图 3)。

```

- 100                                acagaaggagcaaagtgaagaggcaactacagttagagc
- 40 agtgctgccccgacgcacatctctctctctctcttttacttttccaccaaatcaatactttc aaag
1ATGCTCTCCACGCGTATCCAGTGCGCACTGGCGCTCTTGTCCCTCGCGCTCGCCGTCAGC
1M L S T R I Q C A L A L L S L A L A V S
61AGCGTCTCAGCAGCACCGTCAGACGCCAACTCCGCCAACTTCTGCAGAGATCTCTCTC
21S V S A A P S D A K L R Q L L Q R S L L
121AACCCGGCTGGAAAACAGGAACTCGAAGATACACACTTACAGATTTGCTCTCAGACCTC
41N P A G K Q E L A R Y T L T D L L S D L
181GTGCAAGCAGAAAACGAAGTGCTGGAGCCCGAGGATCTGTCTCGCGCTGTGGAGAAAGAT
61 V Q A E N E V L E P E D L S R A V E K D

241GAAGTTCGTTTGGAGCTCGAGCGCGCCGCGTCCCATGCTGGCACCTCGCGAGCGCAAA
81 E V R L E L E R A A G P M L A P R E R K
301GCCGGATGCAAGA ACTTCTTCTGGAAA ACTTTCACATCGTGTAAAttctcatcgcaaag
101 A G C K N F F W K T F T S C *
36 lcgtttcccttttgacttattcttttttactctcttcatattttcttttcccgctctttca
42 laatatgcttcatcctatcaaaactgtatatagaaaataaaagcggttatattgtcgttt
48 laaaaacgatgatagctctcactgactatgtttttcaaggctattgatgtgtcatcgaaa
54 lgaatgttttacgaatgtgtgcaaatctgcttttaattgtacttttagcagatttactatt
60 ltttaattgtttgtttg AATAAA atctatgtttcag

```

图 3 团头鲂 PSSI cDNA 和推出的氨基酸序列

Fig. 3 The cDNA and deduced amino acid sequences of the *M. pellegrini* preprosomatostatin I

其中小写字母代表 5' - , 3' - 非翻译区,上面为核苷酸序列,下面为氨基酸序列,粗体字为信号肽,下划线部分为生长抑素 C - 14,方框为酶切位点,* 表示终止子,3' 端 Poly(A) 信号 (AATAAA) 用大写表示

The DNA sequences of the 5' - and 3' - untranslated region are shown as lowercase letters, while coding regions are shown as upper case letters. The putative signal peptide sequences are shown as bold upper case letters. Potential monobasic and dibasic enzymatic cleavage recognition sites are indicated in boxes. The amino acid sequences for somatostatin - 14 (SRIF - 14) are underlined at the C - terminus of precursor. The polyadenylation signals(AATAAA) in the 3' - untranslated regions are shown as upper case letters

3 讨论

3.1 生长抑素的保守性

根据现有鱼生长抑素 PSSI cDNA 保守序列设计合成引物,使用 RT 和 RACE 法分离和测定了团头鲂的 PSSI cDNA 全序列,与金鱼的 PSSI cDNA 序列比较发现,具有高达 90% 的同源性,并且大部分差异主要在 5' 非翻译区;两者氨基酸序列的同源性高达 95%,也说明了两者分类地位较近,同时氨基酸序列与其它 10 种脊椎动物比较同源性都在 50% 以上,与人、牛等在 65% 以上,这再一次证明了生长抑素是一个比较古老的基因,具有较好的保守性,但与鲑鳟的同源性只有 50%,这可能是鱼类生活环境多样化的结果。

3.2 RACE 法分离全长 cDNA 的优势和关键

从 cDNA 文库分离和克隆目的基因的经典方法繁琐且工作量大,并经常出现 PCR 扩增效率低和特异性差的问题,不易得到完整的全长基因(包括 5' 和 3' 非翻译区),特别是在基因的 5' 端。cDNA 末端快速扩增(RACE)技术的出现解决了这些难题,它可以从低丰度的转录本中快速扩增 cDNA 的 5' 和 3' 末端,是一种简单而有效的方法。通过本实验体会到要获得 5' RACE 实验成功,主要应考虑所需分离的 mRNA 在组织中的丰度以及合适的引物的设计。

3.3 PCR 片段直接测序的正确性

通常测序是先把 DNA 片段克隆到载体上,但由于 PCR 扩增过程中会出现很多错配现象,而 PCR 片段经克隆后测序是测定了某一分子的 DNA 序列,在几十个循环的 PCR 扩增过程中,很难保证某一个分子的任何点都不发生错配。因此克隆后测序不一定能完全反应模板的序列,除非在扩增中使用高保真 Taq 酶。但 PCR 片段直接测序时,其结果是 PCR 片段众多分子的混合物的结果,在扩增过程中不可能所有的错配都发生在同一位置。因此大多数分子在某一点上还是应该正确的,在测序时,错配现象也就反映不出来了。因此,PCR 片段直接测序的结果反映的是 PCR 用模板最原始的结果。本实验 3', 5' RACE 扩增用 Taq 酶并非高保真,因此在扩增中会有错配,但用 PCR 片段直接测序避免了这一缺陷,从 3', 5' 片段测序结果比较发现在它们交互区完全相同,这证明了用 PCR 产物直接测序,其正确性很高,反映了模板的实际情况。

参考文献:

- [1] Lin X, Otto C J, Peter R E. Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in goldfish brain: characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation[J]. *Endocrinology*, 1999, 140, 2089 - 2099.
- [2] Peng C, Peter R E. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish[J]. *Zool Stud*, 1997, 36:79 - 89.
- [3] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene - specific oligo-nucleotide primer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85:8998 - 9002.
- [4] Chen S Y, Zhu L H. The polymerase chain reaction[M]. Beijing: Science Press, 1994. 25 - 35. [陈受宜,朱立煌. PCR 聚合酶链式反应[M].北京:科学出版社,1994. 25 - 35.]
- [5] Perlman D, Halvorson H O. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides[J]. *J Mol Biol*, 1983, 167:391 - 409.
- [6] Douglass J, Civelli O, Herbert E. Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides[J]. *Annu Rev Biochem*, 1984, 53: 665 - 715.
- [7] Dnaman (version 5.2) <http://www.bio-soft.net/>

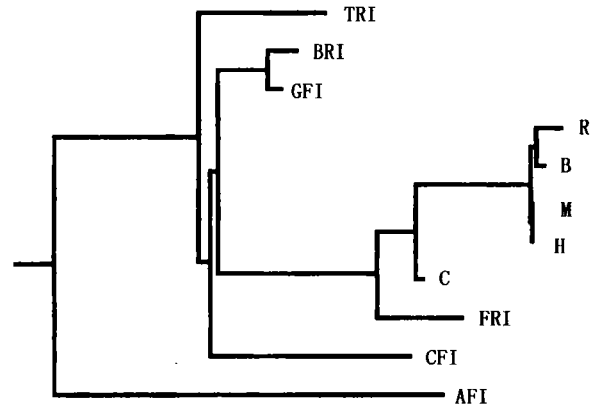


图 5 PSSI 蛋白质的系统树

Fig.5 Phylogenetic tree of PSSI proteins

使用 Danman 5.2 演示版选择最大相似方法所构建

The tree was constructed by Danman version 5.2 (DEMO) using Maximum likelihood of the PSSI protein

- [8] Kittilson J D, Moore C A, Sheridan M A. Polygenic expression of somatostatin in trout pancreas: evidence of a preprosomatostatin encoding somatostatin - 14[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 114: 88 - 96.
- [9] Minth C D, Taylor W L, Magazin M, *et al.* The structure of cloned DNA complementary to catfish pancreatic somatostatin - 14 messenger RNA [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257(17), 10372 - 10377.
- [10] Hobart P, Crawford R, Shen L, *et al.* Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding two distinct somatostatin precursors found in the endocrine pancreas of anglerfish[J]. *Nature*, 1980,288: 137 - 141.
- [11] Tostivint H, Lihmann I, Bucharles C, *et al.* Occurrence of two somatostatin variants in the frog brain: characterization of the cDNAs, distribution of the mRNAs and receptor-binding affinities of the peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93: 12605 - 12610.
- [12] Su C J, White J W, Li W H, *et al.* Structure and evolution of somatostatin genes[J]. *Mol Endocrinol*, 1988,2: 209 - 216.
- [13] Goodman R H, Aaron P C, Roose G A. Rat preprosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 570 - 573.
- [14] Goodman R H, Jacobs J W, Chin W W, *et al.* Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of a pancreatic somatostatin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982,77:1682.
- [15] Travis G H, Sutcliffe J G. Phenol emulsin-enhanced DNA-driven subtractive cDNAcloning: isolation of low abundance monkey cortex-specific mRNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1696 - 1700.
- [16] Shen L P, Pictet R L, Rutter W J. Human somatostatin 1: sequence of the cDNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79:4575 - 4579.

```

GF I  金鱼      -----GGCAGGATTACAACCTGCGCAGCGCTACCCGACACATCTC 41
BR I  团头鲂    ACAGAAGGAGCAAAGTGAAGAGGCAACTTACAGTTAGAGCAGTGCTGCCCGACGCATCTC 60
          * * * ***** * * ***** *** ***** *****
GF I      TCTT—CTTTAATTTCTACCAAATCAATACTTCCAAGGATGCTCTCCACGGTATCCA 99
BR I      TCTCTCCTTTTACTTTTCCACCAAATCAATACTTTCAAAGATGCTCTCCACGGTATCCA 120
          *** ***** *** * ***** ***** ***** *****
GF I      GTGCGCACTGGCGCTCCTGTCTTGGCGCTTGGCGTCTGCAGCGTCTCAGCAGCACCAG 159
BR I      GTGCGCACTGGCGCTCTTGTCCCTCGCGCTCGCGTCTCAGCAGCGTCTCAGCAGCACCAG 180
          ***** ***** * ***** ***** ***** ***** ***** *
GF I      AGACGCCAAACTTCGCAACTTCTGCAGAGATCTCTCCTTAACCCGGCTGGAAAACAGGA 219
BR I      AGACGCCAAACTTCGCAACTTCTGCAGAGATCTCTCCTCAACCCGGCTGGAAAACAGGA 240
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
GF I      ACTCGCCAGATACACACTTGCAGACTTGTCTCAGAGCTCGTGAAGCAGAAAACGAGGC 279
BR I      ACTCGCAAGATACACACTTACAGATTTGCTCTCAGACCTCGTGAAGCAGAAAACGAAGT 300
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *
GF I      GCTGGAGCCCGAGGATCTGTCTCGCGCTGTGGAGAAAGATGAAGTTCGTTTGGAGCTCGA 339
BR I      GCTGGAGCCCGAGGATCTGTCTCGCGCTGTGGAGAAAGATGAAGTTCGTTTGGAGCTCGA 360
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***
GF I      GCGCGCCGCGGTCTATGCTGGCACCTCGCGAGCGCAAAGCCGGATGCAAGAACTTCTT 399
BR I      GCGCGCCGCGGTCCCATGCTGGCACCTCGCGAGCGCAAAGCCGGATGCAAGAACTTCTT 420
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
GF I      CTGGAAAACCTTTCACGTCGTGTTAATTTCTCACCGCGCACCGTTTCTTTGACTTATTC 459
BR I      CTGGAAAACCTTTCACATCGTGTGTTAATTTCTCATCGCAAAGCGTTTCTTTGACTTATTC 480
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
GF I      TTTTTTTTACTCTTCCATGTTTCCCTTTT—CCCGTCTTTCAGGTATTCTTACCCTATCT 517
BR I      TTTTTTT—ACTCCTTCATATTTCTTTTTTCCCGTCTTTCAAATATGCTTCATCCTATCA 539
          ***** ***** * * * * * ***** ***** ***** *****
GF I      AAAATGTATAAAAGAAAATAAAGCAATTATATTTGTCGTTTAAACAACGATGATAGCTCT 577
BR I      AAAATGTATATA—GAAAATAAAGCGGTTATATTTGTCGTTTAAACAACGATGATAGCTCT 598
          *** ***** * ***** ***** ***** ***** *****
GF I      CATTGACTATGTTTTTCGAGGCTATTGATGTGTGTCATCGGAAAGAATGTTTTGCGGATGTG 637
BR I      CACTGACTATGTTTTTCAAGGCTATTGATGTGTGTCATCGGAAAGAATGTTTTACGAATGTG 658
          ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
GF I      TGCGAATCTGCTTTAATTGTAAGTACTTTAGCAGATGTCACTATTTTAAATTGCTTGTGAA 697
BR I      TGCAAATCTGCTTTAATTGTAAGTACTTTAGCAGATTTCACTATTTTAAATTGCTTGTGAA 718
          *** ***** ***** ***** ***** ***** *****
GF I      TAAAATCTATGTTTCAG 714
BR I      TAAAATCTATGTTTCAG 735
          *****

```

图版 团头鲂生长抑素 PSSI cDNA 与金鱼 PSSI cDNA 的比较
 Plate Alignment of *M. pellegrini* PSSI cDNA with goldfish PSSI cDNA

相同的碱基用 * 表示, 缺失用 - 表示

Identical base residues are marked asterisks (*). Dash (-) represents absence of that residues or region at that position. GFI, goldfish PSSI; BR1, *M. pellegrini* PSSI