

大海马垂体糖蛋白激素 亚基的 cDNA 克隆和序列分析

张利红 张为民 成 佳 张 扬 吴金英

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要:大海马 (*Hippocampus kuda* Bleeker) 隶属鱼纲海龙目, 是一种名贵的海产中药材, 也是重要的海洋保护鱼类。我们通过快速扩增 cDNA 末端 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 的方法, 首次从大海马的垂体总 RNA 中扩增出其垂体糖蛋白激素 亚基 (pituitary glycoprotein hormone subunit, PGH) 全长 cDNA, 其 cDNA 全长 741bp (不包括 polyA 尾), 5' 和 3' 非编码区分别含有 76 和 314bp, 开放读码框为 351bp, 编码 117aa 的 PGH 亚基前体 (包括 23aa 的信号肽和 94aa 的成熟肽)。和其他脊椎动物一样, 大海马 PGH 亚基含有 10 个半胱氨酸残基, 2 个脯氨酸残基和 2 个 N- 糖基化位点。序列分析发现, 大海马 PGH 亚基的成熟肽与其他物种的同源性为 50%—61.7%, 其中与鲈形目和合鳃目的同源性最高 (61.7%), 而其信号肽与其他物种的同源性仅为 8.7%—39.1% 左右。这些结果表明大海马与已知的脊椎动物 PGH 亚基同源性都比较低, 是一种比较独特的鱼类。大海马 PGH 亚基的全长 cDNA 克隆对海马垂体糖蛋白激素的结构和功能研究以及海马的养殖和保护有着重要的意义。

关键词:大海马; 糖蛋白激素 亚基; cDNA 克隆

中图分类号:Q343 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)01-0053-06

动物前腺垂体合成和分泌一类糖蛋白激素, 包括促性腺激素和促甲状腺激素, 它们在动物生殖活动和生长发育过程中起重要的调节作用。这些糖蛋白激素都是由 和 两个亚基组成的异源二聚体。现有的研究表明: 同一种动物垂体的各种糖蛋白激素的 亚基 (pituitary glycoprotein hormone subunits, PGH) 是共同的; 而 亚基则是激素特异的, 它决定了激素的活性和种属特异性。 和 两个亚基是由两个不同的基因编码, 在细胞质中通过非共价键结合, 成为有生物活性的二聚体^[1]。

在脊椎动物中, 鱼纲是动物种类最多的一个纲, 包括了 57 个目, 约有 24600 多个种类^[2]。到目前为止, 鱼纲中已经有 11 个目的 40 多种鱼的 PGH 被克隆, 或者进行了化学测序。序列分析表明, PGH 的 10 个半胱氨酸残基构成的 5 个二硫键和 2 个 N- 糖基化位点在所有已研究的鱼类中都是保守的, 而且, 其氨基酸序列的同源性在同一目的鱼中很高, 在不同目的鱼中, 其氨基酸序列的变化和它们的进化关系的远近有关^[3]。因此, 研究不同目中代表种类的 PGH, 对于更好地了解鱼类的系统进化很有

帮助。

大海马 (*Hippocampus kuda* Bleeker) 隶属海龙目、海龙亚目、海龙科、海马属 (*Hippocamps*)。海马具有独特的繁殖行为。在繁殖季节, 性成熟的雌海马将卵排到雄海马的育儿囊内, 卵在育儿囊内受精, 发育成小海马后排出。而且, 海马是一种经济价值很高的贵重中药材, 素有“北方人参, 南方海马”之说。由于过度的捕捞和环境的不断恶化, 现在海马已经濒临灭绝。对海马的生物学研究和保护受到了广泛的关注, 海马的人工养殖也受到许多国家的重视。

到目前为止, 有关海龙目鱼类的 PGH 的 cDNA 序列或氨基酸序列均未见报道。本文克隆了大海马 PGH 的 cDNA 序列, 旨在为进一步了解大海马的生殖活动和生长发育的调节打下基础。

1 材料和方法

1.1 组织样品 成年性成熟大海马购自广东省陆丰市亿达洲海马养殖场。解剖海马, 迅速取出垂体, 立刻置于液氮中, 带回实验室在 -80° 保存。

1.2 试剂和酶 GeneRacer™ kit、总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 和 Platinum Taq DNA polymerase 均购自

收稿日期: 2005-05-20; 修订日期: 2006-06-29

基金项目: 国家 863 计划课题(2002AA624010) 和国家自然科学基金项目(No. 30170130) 资助

作者简介: 张利红, 女, 陕西城固人; 理学博士; 主要从事比较生理学和分子内分泌学研究

通讯作者: 张利红, Tel: 020-84110828, E-mail: ls65@zsu.edu.cn

美国 Invitrogen 公司。pGEM-T Easy Vector System 购自美国 Promega 公司。质粒提取和胶回收试剂盒为美国 Omega Biotek 产品。限制性内切酶购自 TaKaRa 宝生物(大连)有限公司。其余均为国产分析纯试剂。

1.3 大海马垂体总 RNA 的提取 将 4 个海马垂体置于 0.5mL TRIzolTM Reagent 中,用注射器匀浆后,根据厂家提供的方法提取总 RNA,并电泳检测 RNA 质量。

1.4 大海马 PGH 的 cDNA 克隆 应用 GeneRacerTM试剂盒,根据厂家提供的方法,用 0.5μg 大海马垂体总 RNA 合成 cDNA,然后分别进行 3' RACE 和 5' RACE,克隆大海马 PGH 的全长 cDNA 序列。对于 3' RACE,共进行了两轮 PCR 扩增。第 1 轮 PCR,以合成的大海马垂体 cDNA 为模版,引物是以 PGH 的保守区域设计合成的简并引物 PGH (5'-CY-ATCTGYAGYGGNYACTGC-3'; S = G + C; R = A + G; V = A + G + C; Y = C + T; N = A + G + C + T; M = A + C) 和对应于 cDNA 3' 末端接头 DNA 序列的引物 GR3P (5'-GCTGTCAACGATAACGCTACGTAACG-3')。PCR 反应体系为: 50μL 反应体积, 5.0μL 10 × reaction buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 每种引物, 1.0U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)。PCR 反应参数为 94 1min、55 30s、72 1min, 共 35 个循环, 最后 72 延伸 7min。第 2 轮 PCR, 取 1μL 第 1 轮 PCR 产物为模版, 引物是 PGH 和对应于 cDNA 3' 末端接头 DNA 序列的引物

GR3NP (5'-CGCTACGTAACGCCATGACA GTG-3')。其他反应条件同上。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 分析结果, 回收目的片段并将其克隆入 pGEM-T Easy vector, 提取质粒后测序分析。

确定了 PGH 的 3' 末端序列后, 通过 5' RACE 获得 PGH 的 5' 末端序列。对于 5' RACE, 也进行了两轮 PCR 扩增。第 1 轮 PCR, 以合成的大海马垂体 cDNA 为模版, 引物是 PGH 5P1 (5'-TGTGATTGATACGA CGAG-3') 和对应于 cDNA 5' 末端接头 DNA 序列的引物 GR5P (5'-CGACTGGAG CACGAGGACACTGA-3'), 反应条件同上。第 2 轮 PCR, 取 1μL 第 1 轮 PCR 产物为模版, 引物是 PGH 5P2 (5'-CTTTGTAGGICCA GTTCC-3') 和 GR5P。其他反应条件同上。PCR 产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段并将其克隆入 pGEM-T Easy vector, 提取质粒后测序分析。

1.5 序列分析 用 Clustal W 进行多重序列比较, DNASTAR 软件中 Megalign 方法进行序列同源性分析, 用 Phylogenetic 软件中最大简约法构建进化树, 进化树显示采用软件 TreeView (1.6.6)。

2 结 果

2.1 大海马 PGH 亚基的全长 cDNA 克隆

采用 3' RACE 和 5' RACE 的方法扩增出大海马 PGH 亚基全长 cDNA 序列(图 1)。大海马 PGH 亚

ACCAGAAAGTCACCTCAGCAGACCTATTCAAAGAGAAA	ACTTCAACACTGAGAAAGGCAGCCACTGCAACCATA	76
ATG GGA GCT GTG AAA TTT GTT GGA CCA CTT CTT	TTC TTA GTG ACG TCT CTT TTC TGC ATG	136
M G A V K F V G P L L F L V T S L F C M		20
GTC AAT TCG TAT CCC GAC TTG GAC TTG TCA CAC	ATA GGA TGT AAT GAG TGC GCG CTG AAA	196
V N S <u>Y</u> P D L D L S H I G C N E C A L K		40
AAA AAC GAC TTT TTC TCA CGG GAC AAG CCG GTC	TAT CAG TGT AAG GGC TGC TGC TTC TCG	256
K N D F F S R D K P V Y Q C K G C C F S		60
ATG GCT TAC CCG ACA CCT CAC TGG ATC AAG AAG	CTC ATG ATG AAT CCA AAG AAT ATC ACT	316
M A Y P T P H W I K K L M M N P K N I T		80
TCA GAG GCA GCG TGC TGT ACT GCG AGA AGC AGC	GAA TTG GTA AAA GTG CAA AAC TTA ATG	376
S E A A C C T A R S S E L V K V Q N L M		100
GTG AGA AAC CAC ACA GAG TGC TAC TGC GAC ACC	TGC ATC TAT CAC AAG ATC TGA CTGATGG	437
V R N H T E C Y C D T C I Y H K I *		117
GAGATGGCGATGAGTGAGGCCAGTGTGTTCTGCAACAGTATG	TCTCGGTGTGCACACGCTTATCTATTAGG	516
AAGGCATGCTGTAGTATTGCCAAGTCATATTTGTGCAACG	CCTCTCGTCTATGACGTGGCATGTACCGAAACATGT	595
GAACCTCATATACTCGTTTCAGGGTCTGTACGTAACATGG	TTTATGTAACATTGTTGAATATTGTTGGTGAG	674
TAGTGTGTTATTGTAGTGATTCTGTTGGCAGATAA	<u>AATAAA</u> AATAAATAAATGAAACACATT(A)n	741

图 1 大海马 PGH 亚基的全长 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。其成熟肽的第一个氨基酸用下划线标出。* 表示终止密码子位置, 方框表示加 poly(A) 的信号。GenBank 登录号为 DQ057483

Fig. 1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of cDNAs encoding the pituitary glycoprotein hormone subunit of the *Hippocampus kuda*. The first amino acid (Y) of the putative mature peptide is underlined. The termination codon is indicated as “*”. The putative signal for the addition of poly(A) is boxed. The GenBank accession number is DQ057483

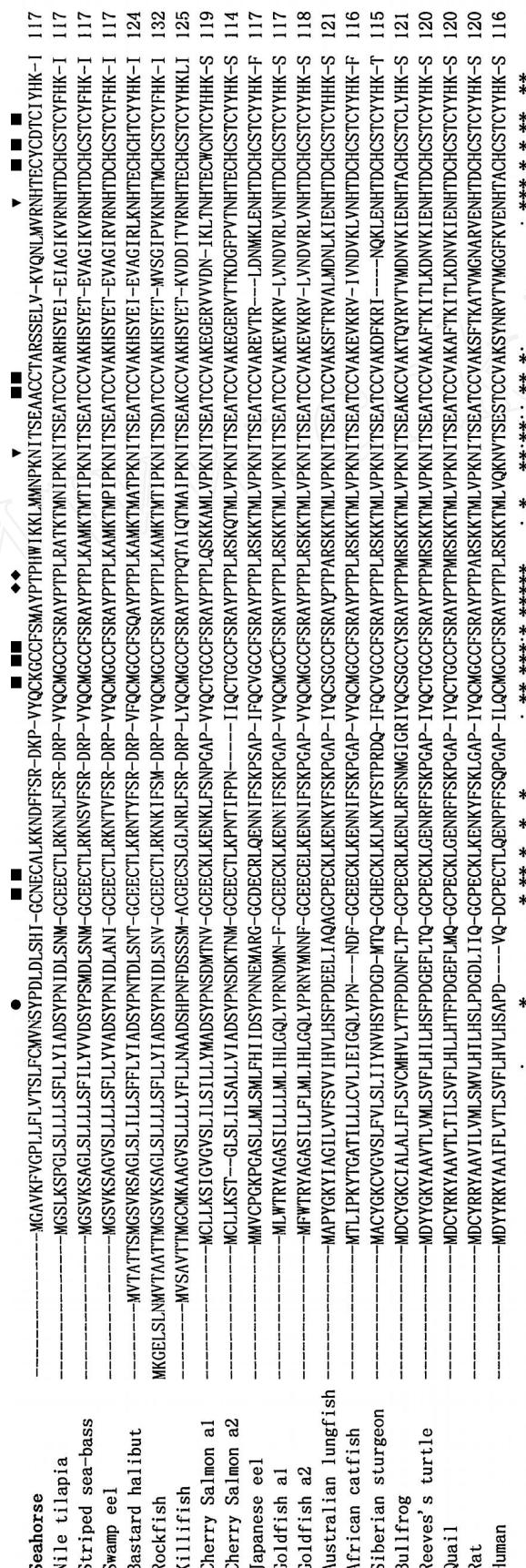


图 2 大海马和其他脊椎动物代表种类的垂体糖蛋白激素 α 亚基氨基酸的序列比较。成熟肽第一个氨基酸的位置由一黑点(●)所示。10个保守的半胱氨酸位置两个N糖基化位点和两个保守的脯氨酸位置分别如正方形(■)、箭头(▼)和菱形(◆)所示。符号“*”、“：“和“.”分别表示相同、高保守性和低保守性的氨基酸。序列中的破折号表示序列比对时产生的间隔。序列登录号见表 1

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences for the PGH α of vertebrates. The first amino acid of the mature peptide is indicated with dot (●). The 10 conserved cysteine residues are indicated with diamond (◆), two conserved prolines are indicated with arrowheads (▼), two putative N-linked glycosylation sites are indicated with dashes (—). The identical, highly conserved and less conserved amino acid residues were indicated with “*”, “：“ and “.”, respectively. The sources of these sequences are given in Tab. 1

基全长 cDNA 为 741bp(不包括 polyA), 5' 和 3' 非编码区分别是 76 和 314bp, 开放读码框为 351bp, 它编码的 PGH 亚基的前体是 117aa, 包括 23aa 的信号肽和 94aa 的 PGH 亚基成熟肽。在 poly(A) 尾上游 16 碱基附近有两个 poly(A) 加尾信号 AATAAA。

2.2 大海马 PGH 亚基的氨基酸序列分析

PGH 亚基的氨基酸序列与其他脊椎动物 PGH 亚基氨基酸序列的同源性比较(图 2)发现, 大海马 PGH 亚基的成熟肽同样具有 4 个保守区(成熟肽第 11 位 C—第 23 位 S, 第 30 位 Q—第 43 位 P, 第 54

位 K—第 66 位 R, 第 78 位 V—第 93 位 K), 另外还含有高度保守的 10 个半胱氨酸残基、2 个 N-糖基化位点、和 2 个脯氨酸残基(第 41 位和第 43 位)。序列分析表明:大海马 PGH 亚基的信号肽与哺乳动物、鸟类、两栖类、爬行类和其他鱼类的同源性在 8.7%—39.1% 之间。大海马 PGH 亚基的成熟肽与其他物种 PGH 的同源性为 50%—61.7%, 其中与鲈形目和合鳃目的同源性最高为 61.7%(表 1)。进化分析(图 3)表明大海马 PGH 亚基与鲈形目鱼类的亲缘关系相对较近。

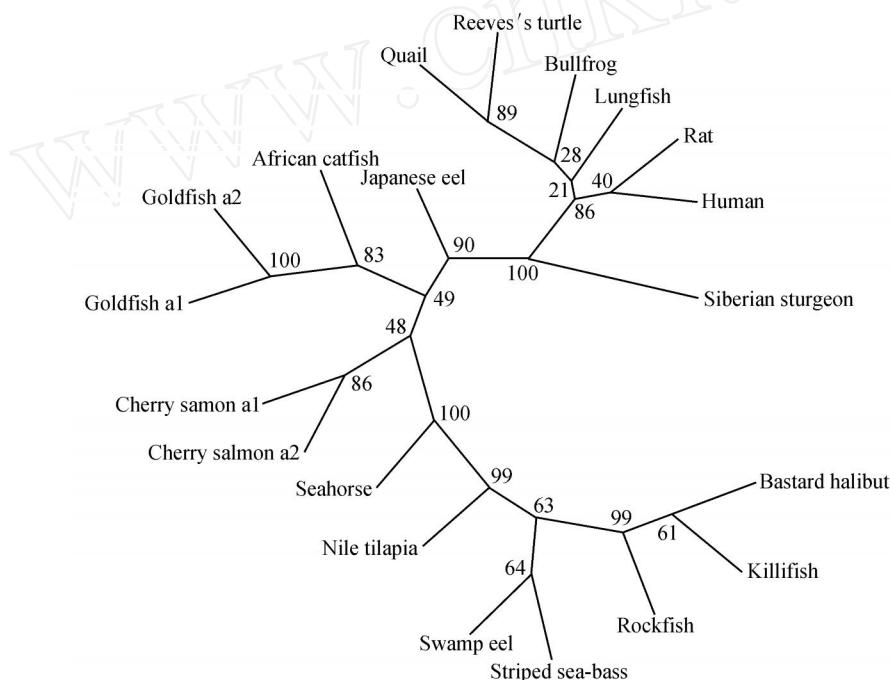


图 3 脊椎动物 PGH 亚基进化分析。图中的数值表示置信度。各序列从 Entrez 下载, GenBank 登录号参见表 1

Fig. 3 Phylogenetic analysis of various vertebrate PGH subunits. The numbers inside the figure represent the bootstrap values. The sequences are downloaded from Entrez, and for accession numbers are shown in Tab. 1

表 1 大海马和其他脊椎动物的垂体糖蛋白激素 亚基氨基酸序列的同源性比较

Tab. 1 Amino acid identity (%) between PGH subunit of the *H. kuda* and those of other vertebrates

Taxa name	Common name	Percentage identity		Accession No.
		Signal peptide	Mature protein	
鱼纲 (Pisces)				
<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia	34.8	61.7	AAP49577
<i>Morone saxatilis</i>	Striped sea-bass	39.1	61.7	Q91119
合鳃目 (Synbranchiformes)				
<i>Monopterus albus</i>	Swamp eel	39.1	61.7	AAN77069
鲽形目 (Pleuronectiformes)				
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Bastard halibut	30.4	60.6	AF268692
鲉形目 (Scorpaeniformes)				
<i>Sebastes schlegeli</i>	Rockfish	39.1	58.5	AAU14140

续表

Taxa name	Common name	Percentage identity		Accession No.
		Signal peptide	Mature protein	
鲈形目(Cyprinodontiformes)				
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Killifish	34.8	57.4	AAB60605
鲑形目(Salmoniformes)				
<i>Oncorhynchus masou</i> 1	Cherry salmon	17.4	58.5	AAB30421
<i>Oncorhynchus masou</i> 2	Cherry salmon	13.6	52.2	AAB30422
鳗鲡目(Anguilliformes)				
<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel	21.7	53.8	BAD14301
鲤形目(Cypriniformes)				
<i>Carassius auratus</i> 1	Goldfish	13.0	53.2	AAV65763
<i>Carassius auratus</i> 2	Goldfish	13.0	55.2	AAV65764
肺鱼目(Ceratodontiformes)				
<i>Neoceratodus forsteri</i>	Australian lungfish	13.0	51.1	BAB16881
鲶形目(Siluriformes)				
<i>Clarias gariepinus</i>	African catfish	17.4	54.3	CAA66358
鲟鱼目(Acipenseriformes)				
<i>Acipenser baerii</i>	Siberian sturgeon	30.4	56.0	CAC43060
两栖纲(Amphibia)				
<i>Rana catesbeiana</i>	Bullfrog	13.0	51.1	P80051
爬行纲(Reptilia)				
<i>Chinemys reevesii</i>	Reeves's turtle	13.0	53.2	BAB92946
鸟纲(Aves)				
<i>Coturnix coturnix</i>	Quail	8.7	53.2	I51241
哺乳纲(Mammalia)				
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	8.7	56.4	BAA00453
<i>Homo sapiens</i>	Human	13.0	50.0	CAH70647

3 讨论

本文通过3 RACE结合5 RACE的方法,克隆了大海马PGH亚基的全长cDNA,这是海龙目鱼类PGH亚基序列的首次报道。大海马PGH亚基全长cDNA为741bp(不包括polyA),它编码的PGH亚基的前体是117aa,与鲈形目、合鳃目和鳗鲡目的PGH前体大小一致;而成熟肽为94aa,与鲈形目、合鳃目、蝶形目的PGH亚基成熟肽大小一致。已知的各纲目中代表物种PGH前体的大小是114—132aa,鲑形目(*Oncorhynchus masou*)PGH2最小(114aa);**鱗形目**(*Sebastes schlegeli*)132aa;各代表物种PGH亚基成熟肽的大小是91—97aa,鲟鱼目(*Acipenser baerii*)成熟肽最小(91aa),牛蛙(*Rana catesbeiana*)的成熟肽最大(97aa)。序列分析表明,大海马PGH亚基成熟肽与哺乳动物、鸟类、两栖类、爬行类和其他鱼类的同源性为50%—61.7%,而鲈形目、合鳃目、蝶形目和**鱗形目**PGH亚基成熟肽之间的同源性高达80%—90%。这提示海龙目大海

马与本文中所比较的各个物种的亲缘关系都比较远,是一种比较独特的鱼类。PGH亚基前体信号肽的大小在不同物种间差异也较大,大小为21—38aa,其中鲑形目PGH2信号肽最小(21aa),**鱗形目**最大(38aa)。大海马PGH前体信号肽是23aa,与鲈形目、合鳃目和鲤形目的PGH前体信号肽大小一致。与成熟肽相比,大海马PGH亚基前体的信号肽与其他物种的同源性更低,为8.7%—39.1%左右,而鲈形目、合鳃目、蝶形目和**鱗形目**PGH亚基信号肽之间的同源性为78.3%—91.3%(结果未列出),这进一步表明了大海马的特殊性。

大海马PGH亚基的推导氨基酸序列和已知的其他物种的PGH亚基的氨基酸序列比较表明,与其他脊椎动物一样,大海马PGH亚基的成熟肽同样具有4个保守区(成熟肽第11位C—第23位S,第30位Q—第43位P,第54位K—第66位R,第78位V—第93位K),这些保守区含有10个半胱氨酸残基,2个N-糖基化位点和2个脯氨酸残基。大海马PGH亚基成熟肽中第40位为酪氨酸,第93位

为赖氨酸,这在所有研究的脊椎动物中是完全一样的。这些保守结构在二聚体的形成、激素和受体的结合以及激素的活性和生理作用等方面有重要的功能^[4—10]。由此推测大海马 PGH 亚基的功能很可能具有保守性。但是,由于大海马 PGH 亚基的氨基酸序列与其他已知的脊椎动物 PGH 亚基同源性较低,大海马 PGH 亚基的生物学特性可能存在一些特殊性,加之大海马具有独特的繁殖行为,因此,有关其垂体糖蛋白激素的结构和功能值得进一步研究。目前,我们也正在克隆大海马垂体糖蛋白激素亚基的基因。

参考文献:

- [1] Xie Q W. Contemporary neuroendocrinology [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press. 1999,127—129 [谢启文. 现代神经内分泌学. 上海:上海医科大学出版社. 1999,127—129]
- [2] Nelson J S. Fishes of the World [M]. 3rd edition. New York: John Wiley and Sons. 1994,305
- [3] Han Y S, Yu J Y. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNAs for pituitary glycoprotein hormone subunits from two species of synbranchiformes, *Monopterus albus* and *Ophisternon bengalense* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, **26**: 111—120
- [4] Arai Y, Kubokawa K, Ishii S. Cloning of cDNAs for the Pituitary Glycoprotein Hormone Alpha Subunit Precursor Molecules in Three Amphibian Species, *Bufo japonicus*, *Rana catesbeiana*, and *Cynops*
- [5] Boime I, Ben-Menahem D. Glycoprotein hormone structure-function and analog design [J]. *Recent Progress in Hormone Research*, 1999, **54**: 271—289
- [6] Bielinska M, Boime I. Site-directed mutagenesis defines a domain in the gonadotropin α -subunit required for assembly with the chorionic gonadotropin β -subunit [J]. *Molecular Endocrinology*, 1992, **6**: 267—271
- [7] Xia H, Chen F, Puett D. A region in the human glycoprotein hormone α -subunit important in holoprotein formation and receptor binding [J]. *Endocrinology*, 1994, **134**: 1768—1770
- [8] Grossmann M, Szkudlinski M W, Dias J A, et al. Site-directed mutagenesis of amino acid 33—44 of the common α -subunit reveals different structural requirements for heterodimer expression among the glycoprotein hormones and suggests that cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production and growth promotion are potentially dissociable functions of human thyrotropin [J]. *Molecular Endocrinology*, 1996, **10**: 769—779
- [9] Zeng H, Ji I, Ji T H. Lys91 and His90 of α -subunit are crucial for receptor binding and hormone action of folliclestimulating hormone (FSH) and play hormone-specific roles in FSH and human chorionic gonadotropin [J]. *Endocrinology*, 1995, **136**: 2948—2953
- [10] Grossmann M, Szkudlinski M W, Zeng H, et al. Role of the carboxy-terminal residues of the α -subunit in the expression and bioactivity of human thyroid-stimulating hormone [J]. *Molecular Endocrinology*, 1995, **9**: 948—958

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE cDNA ENCODING PITUITARY GLYCOPROTEIN HORMONE SUBUNIT OF SEAHORSE HIPPOCAMPUS KUDA BLEEKER

ZHANG Li-Hong, ZHANG Wei-Min, CHENG Jia, ZHANG Yang and WU Jin-Ying

(School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract :In this study, we report, for the first time, the cloning of the cDNA for pituitary glycoprotein hormone subunit (PGH) from seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker, a species of Syngnathiformes. The full length PGH cDNA was obtained using 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length cDNA for the PGH of *H. kuda* was 741bp in size excluding the poly (A) tail, with a 5' UTR of 76bp, a 3' UTR of 314bp, and an open reading frame of 351bp, which encodes a protein of 117 amino acids with a putative signal peptide of 23 amino acid residues and a mature peptide of 94 amino acids. All 10 cysteine residues, 2 putative N-linked glycosylation sites, and two proline residues (P⁴¹ and P⁴³) are conserved. Sequence analysis revealed that the PGH mature peptide of *H. kuda* shares 50%—61.7% amino acid identity with other vertebrates, and the highest identity(61.7%) with tilapia, a member of Perciformes, and with rice-field eel, a member of Synbranchiformes, respectively. The PGH signal peptide of *H. kuda* shares 8.7%—39.1% amino acid identity with mammalian, avian, amphibian, and other fish. These results indicate that the PGH of seahorse *H. kuda* shares relatively low homology with those of other vertebrates, and even other fish examined, suggesting seahorse *H. kuda* is a special fish and worth further study.

Key words :*Hippocampus kuda*; Pituitary glycoprotein hormone subunit; cDNA cloning