

文章编号: 1000- 0615(2003)05- 0391- 07

斜带石斑鱼生长激素 cDNA 克隆及其 在大肠杆菌中的融合表达

张为民, 张 勇, 李 欣, 张利红, 田 静

(中山大学生命科学院水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要:通过构建斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库, 克隆了其生长激素(GH)全长 cDNA。斜带石斑鱼 GH 全长 cDNA 为 955bp, 编码的多肽为 204 aa。应用 PCR 方法把编码 GH 成熟肽的 cDNA 片段克隆到表达载体 pET- 15b, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 表达 N 端含 6 个组氨酸的融合多肽。SDS- PAGE 结果表明, 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导表达的蛋白约为 24 kDa, 主要为不溶性的包含体。细菌裂解液沉淀溶于 6 mol·L⁻¹ 盐酸胍后, 用 Ni²⁺- NTA 树脂进行亲和分离纯化, 纯化产物在 SDS- PAGE 上表现为一条 24 kDa 的蛋白带。在黑鲷 GH 放射免疫分析系统中, 纯化产物能与黑鲷 GH 竞争结合 GH 抗体, 表明大肠杆菌表达的斜带石斑鱼 GH 融合多肽具有 GH 免疫活性。

关键词:斜带石斑鱼; 生长激素; 克隆; 表达

中图分类号: Q785; S917 文献标识码: A

Epinephelus coioides growth hormone cDNA cloning and fusion expression in *Escherichia coli*

ZHANG Wei-min, ZHANG Yong, LI Xin, ZHANG Li-hong, TIAN Jing

(*Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China*)

Abstract: *Epinephelus coioides* GH cDNA was cloned from pituitary cDNA library by random sequencing. The sequence obtained spanned 955bp, with an open reading frame encoding a protein of 204 amino acids, which is composed of a putative signal peptide of 17 residues and a mature polypeptide of 187 amino acids. The cDNA fragment encoding the mature polypeptide of GH was PCR amplified and subcloned to expression vector pET-15b (Novagen), and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) as fusion polypeptide containing a His6 at the N-terminus. The addition of 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG induced expression of a protein band with molecular weight of about 24 kDa. The expressed protein accumulated as inclusion bodies, which were solubilized in 6 mol·L⁻¹ guanidine HCl, and further purified and renatured on Ni²⁺-NTA resin. The purified *Epinephelus coioides* GH fusion polypeptide migrated as a single band of 24 kDa on SDS-PAGE and exhibited GH immunoreactivity in sea bream GH RIA system.

收稿日期: 2002-10-18

资助项目: 国家高新技术计划(863)海洋生物功能基因组开放实验室项目, 国家自然科学基金项目(No. 30070598), 广东省自然科学基金项目(001261)

作者简介: 张为民(1966-), 男, 江西万载人, 副教授, 从事鱼类繁殖生长调节研究。Tel: 020-84113327, E-mail: ls68@zsu.edu.cn

Key words: *Epinephelus coioides*; growth hormone; cloning; fusion expression

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)俗称青斑,肉味鲜美,经济价值很高,是我国南方沿海地区特别是广东和福建等地重要的海水养殖对象,但由于苗种培育过程中存在着幼苗成活率低等问题,限制了养殖规模进一步扩大。鱼类生长激素(growth hormone, GH)是由垂体分泌的单链多肽,由173至188个氨基酸组成,分子量为20 000至22 000 Da左右,在鱼类生长、发育和代谢过程中起着重要调节作用。鱼类胚胎发育早期,其GH基因就已大量表达,表明GH在鱼类胚胎时期起着重要的生理调节作用^[1]。应用投喂和注射的方法,基因重组金头鲷GH能明显提高金头鲷仔、稚鱼生长速率和成活率^[2]。本文克隆了斜带石斑鱼GH基因,并在大肠杆菌中进行了融合表达试验,为进一步探讨GH对斜带石斑鱼胚胎及幼苗生长发育的调节作用,以及为寻求提高其幼苗成活率的有效方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样品

4龄斜带石斑鱼购自广东省水产厅大亚湾鱼种增殖中心的海水养殖基地。垂体取出后立即置于液氮中,带回实验室保存在-80℃。

1.1.2 试剂和酶

SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司。总RNA提取试剂 TRIzolTM Reagent, 反转录酶 SuperScriptTM II 购自 GIBCO-BRL 公司。包装文库所用的包装蛋白 MaxPlaxTM Lambda Packaging Extract 购自 Epicentre Technologies 公司。质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega Biotek 产品,其余均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 斜带石斑鱼垂体总RNA的提取

将垂体置于0.5 mL 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。

1.2.2 斜带石斑鱼垂体cDNA文库的构建

取1 μg 垂体总RNA,根据 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 介绍的方法构建cDNA文库。

1.2.3 斜带石斑鱼GH cDNA的克隆

根据 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 所介绍的方法,将噬菌体 λTriplEx2 重组片段转入到质粒 pTriplEx2 中,用牙签随机挑取平板上50个阳性单克隆,提取质粒DNA,进行序列测定。所获得的序列与 GenBank 中的序列进行相似性比较,发现50个克隆中有3个是GH cDNA,其中2个为全长cDNA克隆,且序列完全一致。

1.2.4 重组斜带石斑鱼GH融合表达质粒的构建

应用 Vent DNA 聚合酶,以斜带石斑鱼GH全长cDNA克隆为模板,PCR扩增斜带石斑鱼GH成熟肽(去除信号肽部分)cDNA片段。PCR引物是根据斜带石斑鱼GH成熟肽N端前6个氨基酸和C端后5个氨基酸而设计,序列分别如下:

5' GAG AGA CAT ATG CAG CCG ATC ACA GAC GGC 3' (上游引物)

5' GAG AGA GGA TCC TTA CAG GGT ACA GTT GGC 3' (下游引物)

PCR产物经末端加A后连接到T载体pUCm-T(上海Sangon公司),然后用NdeI和XhoI切出插入片段,连接到pET-15b(Novagen公司)载体上,所获得表达质粒被命名为pET-ECGH。

1.2.5 重组斜带石斑鱼生长激素在大肠杆菌中的表达

表达质粒 pET- ECGH 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。挑取单菌落, 接种于 5 mL 含氨苄青霉素(100 μg·mL⁻¹)的 LB 培养基, 37℃培养至 OD₆₀₀为 0.6 左右, 然后将培养液保存在 4℃过夜。次日将细菌培养液按 1:50 的比例接种于 50 mL 含氨苄青霉素(100 μg·mL⁻¹)的 LB 培养基, 37℃培养至 OD₆₀₀为 0.9 左右, 加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol·L⁻¹, 诱导重组斜带石斑鱼 GH 表达。

1.2.6 重组斜带石斑鱼 GH 的分离纯化

诱导表达斜带石斑鱼 GH 的 100 mL 细菌离心沉淀后, 重悬于 10 mL 的 Sonication Buffer(50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, pH 7.8) 中, 在冰上用超声波细胞破碎仪将细胞打碎, 12 000×g 冷冻离心 30 min 去除上清液, 沉淀重悬于 10 mL 溶液 A (6 mol·L⁻¹ guanidine HCl, 0.1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0), 搅拌 1h 后冷冻离心(12 000×g) 30 min, 取上清液, 用 Ni²⁺-NTA 亲和树脂分离纯化重组斜带石斑鱼 GH。分离纯化过程简述如下: 取 4 mL 50% Ni²⁺-NTA, 800×g 离心 1 min 后去除上清液, 加入 4 mL 双蒸水混匀后 800×g 离心, 重复 3 次; 加入 10 mL 1× Charge buffer (50 mmol·L⁻¹ NiSO₄), 混合 10 min 后离心, 去除上清液, 用 4 mL 溶液 A 洗涤 3 次。将处理细菌所获得的上清液与预处理好的 Ni²⁺-NTA 亲和树脂缓慢混匀 1 h, 800×g 离心后去除上清液, 然后分别用溶液 A、B (8 mol·L⁻¹ Urea, 0.1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH8.0) 和溶液 C (8 mol·L⁻¹ Urea, 0.1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH6.3) 洗涤 3 次, 再将溶液 C 中的尿素浓度依次调整为 4 mol·L⁻¹、2 mol·L⁻¹、1 mol·L⁻¹、0.5 mol·L⁻¹、0.25 mol·L⁻¹, 与树脂缓慢混合各 30 min, 使重组 GH 复性。经溶液 D (0.1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH6.3) 洗涤 3 次后, 用 Elute buffer(1 mol·L⁻¹ imidazole, 0.5 mol·L⁻¹ NaCl, 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH7.9) 将重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽从树脂上洗脱下来, 在 PBS 中进行透析。

1.2.7 重组斜带石斑鱼 GH 免疫活性测定

在黑鲷 GH 放射免疫测定系统中^[3], 以不同浓度的重组斜带石斑鱼 GH 为样品, 构建竞争性取代曲线, 以此确定重组斜带石斑鱼 GH 与鲷鱼 GH 抗血清的免疫交叉反应。

2 结果

2.1 GH 全长 cDNA 克隆及序列分析

从垂体文库中随机获得的 3 个斜带石斑鱼 GH 克隆的核苷酸序列均一致。斜带石斑鱼 GH 全长 cDNA 序列(图版 I) 为 955bp, 开放读码框编码的多肽为 204aa, 其中信号肽为 17aa, 成熟肽为 187aa。3' 和 5' 非编码区分别含有 84 和 259 个核苷酸。在 Poly(A) 前 21 核苷酸处有一加 Poly(A) 尾的信号 AATAAA。从斜带石斑鱼 GH 核苷酸序列推导的氨基酸序列与其他一些动物 GH 氨基酸序列比较结果如图版 II 所示。斜带石斑鱼 GH 含有 4 个 Cys, 位置非常保守。GH(前体) 家族具有 4 个明显的氨基酸序列保守区(以斜带石斑鱼 GH 氨基酸序号为准): 第 26 个到 49 个、第 70 个到 109 个、第 123 个到 139 个、第 168 个到 202 个氨基酸。在分类地位上越靠近的动物, 它们的 GH 在氨基酸序列上的相似性越高(图 1)。Blast 分析结果表明, 斜带石斑鱼 GH 与

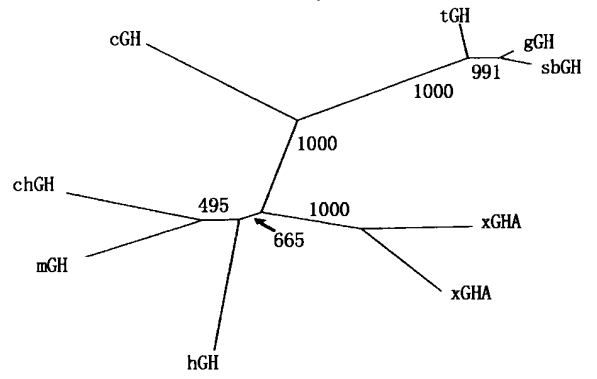


图 1 不同脊椎动物 GH 进化树分析
Fig. 1 Phylogenetic tree of various vertebrate GH forms

进化树由软件 ClustaX 生成, 图形显示采用软件 TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), 图中的数值表示置信度。具体说明见图版 II
The tree was generated by software ClustalX, and visually depicted by software TreeView. The numbers inside the figure represent the bootstrap values. For details, refer to Plate II

人、小鼠和鸡 GH 的同源性分别为 33%、37% 和 40%；与爪蟾、鲤、罗非鱼和金鲷 GH 的同源性分别为 40%、54%、89% 和 97%。

2.2 重组斜带石斑鱼 GH 在大肠杆菌中表达

带有质粒 pETT- ECGH 的 BL21(DE3) 细菌, 在加入 IPTG 之前, 无 GH 融合多肽表达, 而加入 IPTG 2 小时后, 可见一明显的诱导蛋白带, 分子量约为 24 kDa, 主要存在于沉淀部分(图 2 第 8、9、10 道), 表明诱导表达的重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽主要以包涵体的形式存在于 BL21(DE3) 细胞内。

2.3 重组斜带石斑鱼 GH 分离纯化

重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽通过其 N- 端的 6 个组氨酸与 Ni^{2+} - NTA 的亲合作用而被分离纯化, 结果如图 3 所示。重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽与 Ni^{2+} - NTA 树脂混合后大部分吸附在树脂上(图 3 第 4 道), 在洗涤过程中, 其它杂蛋白被洗脱出来, 最后, 重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽被 1M Imidazole 溶液洗脱下来(图 3 第 8 道)。分离纯化后重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽在 SDS- PAGE 上表现为单一条带, 分子量约为 24 kDa。每升细菌培养液 GH 产量可达 25 mg 左右。

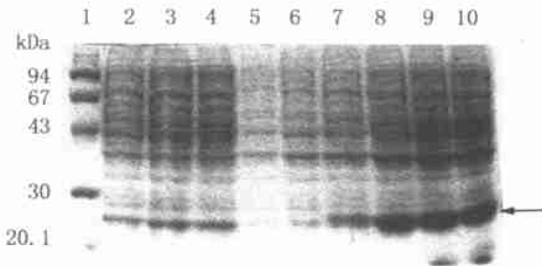


图 2 斜带石斑鱼 GH 融合多肽在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达

Fig. 2 The expression of *Epinephelus coioides* GH fusion polypeptide in BL21(DE3)

1 道: 蛋白质分子量标准; 2~ 4 道: 诱导表达 2、3、4 h 后细菌裂解液的上清液; 5 道: 诱导前样品; 6~ 10 道: 诱导表达 0.5、1、2、3、4 h 后细菌裂解液的沉淀

Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2- 4: supernatants of bacterial lysates after addition of IPTG for 2, 3, 4 h respectively; Lane 5: pre-induction sample; Lane 6- 10: pellets of bacterial lysates after addition of IPTG for 0.5, 1, 2, 3, 4 h respectively

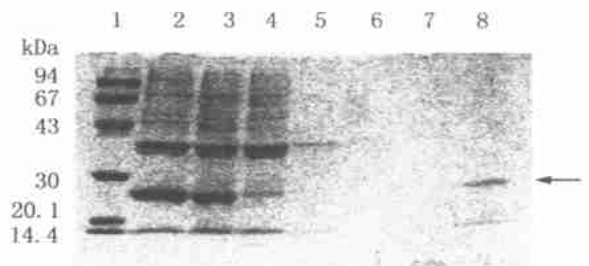


图 3 斜带石斑鱼 GH 融合多肽的纯化

Fig. 3 Purification of *Epinephelus coioides* GH fusion polypeptide

1 道: 蛋白质分子量标准; 2 道: 表达 4 小时后细菌裂解液沉淀; 3 道: 经盐酸胍处理后细菌裂解液沉淀; 4 道: 经 Ni^{2+} - NTA 处理以后所得的上清液; 5 道: 经溶液 A 洗涤以后所得的上清液; 6 道: 经溶液 B 洗涤以后所得的上清液; 7 道: 经溶液 C 洗涤以后所得的上清液; 8 道: 经 Elute buffer 洗脱出的蛋白

Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: pellet of bacterial lysate after induction for 4 hrs; Lane 3: The pellet resuspended in 6 M Guanidine HCl; Lane 4: pellet suspension in 6 M Guanidine HCl treated by Ni^{2+} - NTA resin; Lane 5: wash-out by solution A; Lane 6: wash-out by solution B; Lane 7: wash-out by solution C; Lane 8: eluted *Epinephelus coioides* GH fusion polypeptide

2.4 重组斜带石斑鱼 GH 的免疫活性

重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽在黑鲷 GH 放射免疫测定系统中的竞争取代曲线如图 4 所示。重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽能有效地与 ^{125}I 标记的黑鲷 GH 竞争结合 GH 抗体, 表明重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽具有 GH 免疫活性。

3 讨论

鱼类 GH 与其他动物 GH 一样,是由垂体分泌的一种多功能的肽类激素,除在动物生长过程中起重要的调控作用外,还可能参与动物胚胎发育^[1]、性腺活动^[4]、免疫功能^[5,6]和渗透压调节^[7]等。生长激素是垂体中一种高丰度的激素,合成和分泌活动都比较旺盛。本文通过斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库随机测序,从 50 个克隆中筛选出 3 个 GH cDNA 克隆,其中两个为全长克隆,核苷酸序列完全一致。斜带石斑鱼 GH cDNA 全长 955bp,编码多肽长度为 204aa,其中含 4 个 Cys,而且位置非常保守。系统树分析结果表明:在分类地位上越接近的动物,它们的 GH 在氨基酸序列上同源性越高。

有关重组鱼类 GH 表达的报道较多,有些采用原核表达系统^[8,9],有些采用真核表达系统^[10]。由于 GH 为单链多肽,无糖基化修饰^[11],因此,原核表达系统更通常用来表达重组 GH^[12,13]。本文采用表达载体 pET-15b 在大肠杆菌 BL21(DE3) 表达重组

斜带石斑鱼 GH,表达产物为融合多肽,在斜带石斑鱼 GH 的 N-端加上了 21 aa 的短肽(包括 6 个组氨酸和一个凝血酶切割位点),因此,表达的融合多肽为 208 aa,理论估计分子量为 24 kDa,这与 SDS-PAGE 电泳结果一致。表达的斜带石斑鱼 GH 融合多肽为不溶性的包含体,经 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ guanidine HCl 溶解后与 Ni^{2+} -NTA 树脂混合,用梯度尿素溶液进行洗脱和复性。由于重组斜带石斑鱼 GH 融合多肽的复性与分离纯化是在 Ni^{2+} -NTA 树脂上同步进行的,而在树脂上复性可以降低 GH 分子间的相互作用,减少二聚体的产生,因此该方法操作简便,效率较高。应用类似的方法已成功制备出具有生物活性的重组人 GH^[12]。本文制备的斜带石斑鱼 GH 融合多肽具有与鲷鱼 GH 类似的免疫活性,但其生物活性有待进一步验证。

参考文献:

- [1] Yang B Y, Greene M, Chen T T. Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Mol Reprod Dev, 1999, 53: 127-134.
- [2] Ben-Atia I, Fine M, Tandler A, et al. Preparation of recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone and its use for stimulation of larvae growth by oral administration [J]. Gen Comp Endocrinol, 1999, 113: 155-164.
- [3] Deng L, Zhang W M, Lin H R, et al. Seasonal variations of serum growth hormone levels and growth hormone receptors in *Sparus macrocephalus* [J]. J Fish China, 2001, 25(3): 203-208. [邓利,张为民,林浩然,等.黑鲷生长激素及其受体的季节变化[J].水产学报,2001,25(3):203-208.]
- [4] Singh M S, Joy K P. Effects of ovine LH, GH and prolactin, and testosterone on serum testosterone and estradiol-17 beta levels, and seminal vesicle and testicular activity in the catfish *Clarias batracus* (L.) [J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39: 52-56.
- [5] Harris J, Bird D J. Modulation of the fish immune system by hormones [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 77: 163-176.
- [6] Yada T, Azuma T, Takagi Y. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol, 2001, 129: 695-701.
- [7] Leera S, Oommen O V. Hormonal control on enzymes of osmoregulation in a teleost, *Anabas testudineus* (BLOCH): an *in vivo* and *in vitro* study [J]. Endocr Res, 2000, 26: 169-87.
- [8] Jeh H S, Kim C H, Lee H K, et al. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration [J]. J Biotechnol, 1998, 60: 183-193.

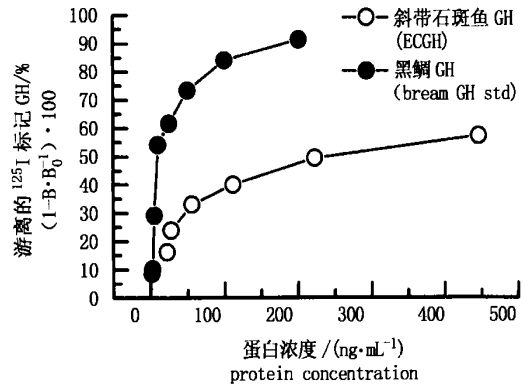


图 4 重组斜带石斑鱼 GH 与¹²⁵I 标记的黑鲷 GH 竞争结合 GH 抗体曲线

Fig. 4 The competitive displacement curve of recombinant *Epinephelus coioides* GH in bream GH radioimmunoassay system

ECGH: 重组斜带石斑鱼 GH 样品; bream GH std: 重组黑鲷 GH 标准品

ECGH: recombinant *Epinephelus coioides* GH; bream GH std: recombinant bream GH standard

- [9] Paduel A, Chapnik-Cohen N, Gertler A, et al. Preparation and characterization of recombinant dolphin fish (*Corypaena hippurus*) growth hormone[J]. *Protein Expr Purif*, 1999, 16: 417- 423.
- [10] Ma J, Bai J J, Li X H, et al. Expression of rainbow trout growth hormone in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Chin J Biotechnol*, 1999, 15(4): 219- 224. [马进, 白俊杰, 李新辉, 等. 虹鳟生长激素 cDNA 在酵母中的表达[J]. *生物工程学报*, 1999, 15: 219- 224.]
- [11] Chang Y S, Liu C S, Huang F L, et al. The primary structures of growth hormones of three cyprinid species: bighead carp, silver carp, and grass carp[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1992, 87: 385- 393.
- [12] Mukhija R, Rupa P, Pillai D, et al. High level production and one-step purification of biologically active growth hormone in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1995, 165: 303- 306.
- [13] Bai J J, Ma J, Jian Q, et al. Cloning of cDNA for common carp (*Cyprinus carpio*) GH and its expression in prokaryocyte[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15: 409- 412. [白俊杰, 马进, 简清, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*) 生长激素基因的克隆及原核表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15: 409- 412.]

1	GAATGCTCTGAGCAGCTGAACTCAGACCTGATCCACCACAGCCAGACCTGATCCACAGCCAGACCTGATCCCAGACC	80
81	AGCC ATG GAC CGA GTC GTC CTC CTG CTG TCA GTA GTG TCT CTG GGT GTT TCC TCT CAG CCA	140
1	M D R V V L L L S V V S L G V S S Q P	19
141	ATC ACA GAC GGC CAG CGT CTG TTC TCC ATC GCC GTC AGC AGA GTT CAA CAT CTC CAC CTG	200
20	I T D G Q R L F S I A V S R V Q H L H L	39
201	CTT GCT CAG AGA CTC TTC TCC GAC TTT GAG AGC ACT CTG CAG ACG GAG GAG CAG CGA CAG	260
40	L A Q R L F S D F E S T L Q T E E Q R Q	59
261	CTC AAC AAG ATC TTC CTG CAG GAC TTC TGT AAC TCT GAT TAC ATC ATC AGC CCC ATC GAC	320
60	L N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D	79
321	AAG CAC GAG ACG CAG CGC AGC TCC GTG TTG AAG CTG TTG TCG ATC TCC TAT CGG TTG GTG	380
80	K H E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V	99
381	GAG TCC TGG GAG TTC CCC AGT CGG TCC CTG TCC GGA GGT TCT GCT CCC AGA AAC CAG ATT	440
100	E S W E F P S R S L S G G S A P R N Q I	119
441	TCT CCC AAA CTG TCT GAA TTG AAG ACC GGG ATC CTG CTG CTG ATC AGG GCC AAT CAG GAC	500
120	S P K L S E L K T G I L L L I R A N Q D	139
501	GGA GCG GAG CTC TTC OCT GAC AGC TCC GCC CTC CAG CTG GCT CCT TAT GGG AAC TAT TAT	560
140	G A E L F P D S S A L Q L A P Y G N Y Y	159
561	CAG AGT CTG GGC GCC GAC GAG TCA CTG CGA CGA ACG TAC GAA CTG CTG GCT TGT TTC AAG	620
160	Q S L G A D E S L R R T Y E L L A C F K	179
621	AAA GAC ATG CAC AAG GTG GAG ACC TAC CTG ACG CTG GCT AAA TGT CGA CTC TCT CCT GAG	680
180	K D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E	199
681	GCC AAC TGT ACC CTG TAG TCCCGCCTCTCCAGTATGAAGACACGCTCCCATGTGGATGATGTAATGCTGTGTG	753
200	A N C T L *	204
754	TTCTGTAGTCCCGCCACATGTTTCTGACTCTGCTAATTAAGCATTAGCATTGTGTGTTAGCCACAGTGTAGCCTGTGT	833
834	TCAGTTGTTGTTGGAGCAGGTGTTATTATGATGACGCCATCAACAGGAGGTGATGTGTCATACTGTCACCATGTGTAAT	912
913	<u>AAAGTGTGTGCTGTGTTGCATTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u> 955	

图版I 斜带石斑鱼 GH 全长 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列
Plate I Nucleotide and predicted amino acid sequences of *Epinephelus coioides* GH

* 表示终止密码子位置, 下划线表示加 poly(A) 的信号; Genebank 登录号为: AF376771

* means the termination codon. The putative signal for the addition of poly(A) is underlined. The Genebank accession number is AF376771

```

hGH      MAAGSRTSLLLAFGLLCLSWLQEGSA-FPTIPLSRLFDNAMLRARRLYLQAYDYTYQEFEE
mGH      MATDSRTSWLLTVSLLCLLWPQEASA-FPAMPLSSLFNSNAVLRAQHLHLQAAADTYKEFER
chGH     MAPGSWFSPLL-IAVVTLGLPQEAAPFPAMPLSNLFANAVLRAQHLHLAAETTYKEFER
xGHA     MATGFCSSPGL-LVIVLLKNVADVGA-FPSVPLFSLFTNAVSRAGYIHMLAADTYRDIYER
xGHB     MVPGSCSSPGL-LVILSPQNVDPVGG-FPNVPLFSLFTNAVNRAGYIHMLAADTYKDYER
gGH      -----MDRVVLLL SVVSLGVSSQPI TDGQRLFSIAVSRVQHLHLAQLRFSDFES
sbGH     -----MDRVVLM SVMSLGVSSQPI TDGQRLFSIAVSRVQHLHLAQLRFSDFES
tGH      -----MNSVYLLL SVVCLGVSSQPI TDSQRLFSIAVNRVTHLHLAQLRFSDFES
cGH      -----MASENQRLFNNAVIRVQHLHLAQAAMINDFED
                ** * : * : ** : **

hGH      AYILKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTPSNRVKTQKSNLELLRISLILLIQSWLEPVQLL
mGH      AYIPEGQRYS-IQNAQA AFCFSETIPAPTGKEEAQRDMELLRPSLLL IQSWLGPVQFL
chGH     TYIPEQRYS-NKNSQA AFCYSETIPAPTGKDDAQKSDMELLRPSLVL IQSWLTPVQYL
xGHA     TYITDEQRHS-NKNSHVVSCYSETIPYPTDKDNTHQKSDLELLRPSLNL IQSWLNPVQAL
xGHB     TYITDDVRRS-SKNSQVVCYSENI PAPTDKDNTHLKSMDMLRPSLTI IQSWLNPVQAL
gGH      TLQTEEQRQL-NKIFLQDFCNSDYI ISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFPPSRSL
sbGH     SLQTEEQPQL-NKIFLQDFCNSDYI ISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFPPSRSL
tGH      SLQTEEQRQL-NKIFLQDFCNSDYI ISPIDKHETQRSSVLKLLSISYGLVESWEFPPSRSL
cGH      NLLPEERRQL-SKIFPLSFCNSDS IEAPTGLDETQKSSMLKLLRISFRLIESWEFPSQTL
                . : * : * * . . : : : . ** * * * : ** * * : *

hGH      RSVFANSLVYGASDSNVYRHLKDLLEEGIQTLMWRELDGS---PRTGQIFNQSYSKFDTKS
mGH      SRIFTNSLMFGTSDR-VYEKLDLEEGIQALMQELEDGS---PRVGQILKQTYDKFDANM
chGH     SKVFTNNLVFGTSDR-VFEKLDLEEGIQALMRELEDRS---PRGPQLLRPTYDKFDIHL
xGHA     NKVFSNNLVFGSSD-VYERLKYLEEGIQALMQELEDGS---FRSFPFLRPPYERFDINL
xGHB     HRLFRN-----SD-VYERLKYLEEGIQSLIRELEDGN---LRSYSFMRTPYERLDINM
gGH      SGGSA-----PRNQISPKLSSELKTGILLIRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSL
sbGH     SGGSA-----PRNQISPKLSSELKTGIHLLIRANEDGAEIFPDRSALQLAPYGNYYQSL
tGH      SGGSS-----LRNQISPRLSSELKTGILLIRANQDEAENYPTDITLQHPYGNYYQSL
cGH      SGQVSNSLTVG-NPNQITEKLADLKVGISVLIKGLDQGNMDDNDSLPLPFEDFYLTM
                : * * : ** * : * : : :

hGH      HND DALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR-SVEGSCGF
mGH      RSD DALLKNYGLLSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFVSSCAF
chGH     RNE DALLKNYGLLSCFKKDLHKVETYL KVMKCRRFVGSNCTI
xGHA     RSD DALVKVYGLLSCFKKDMHKVETYL KVMKCRRFVSNCTI
xGHB     RTD DGLLVYGLLSCFKKDMHKVETYL KVIKCRHFAESKCVI
gGH      GADES LRRTYELLACFKKDMHKVETYL TVAKRLSPEANCTL
sbGH     GTDES LRRTYELLACFKKDMHKVETYL TVAKRLSPEANCTL
tGH      GGNES LRQTYELLACFKKDMHKVETYL TVAKRLSPEANCTL
cGH      G-ESSLRESFRLACFKKDMHKVETYL RVANCRRLDSNCTL
                : . * . : ** ** : ** . * . ** : : : ** : . * :

```

图版 II 斜带石斑鱼 GH 推导氨基酸序列与其他动物 GH 氨基酸序列的比较

Plate II Multiple amino acid level alignment of GHs from *Epinephelus coioides* and other vertebrate species

注:分析软件为 ClustaX (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustaX/Top.html>)。在比较时引入空格(以-表示)以获得最大的同源性。*表示完全相同的氨基酸残基。cGH: 鲤 GH (JE0144); mGH: 小鼠 GH (CAA86658); hGH: 人 GH (AAH20760); xGHA: 爪蟾 GHA (AAF95773); xGHB: 爪蟾 GHB (AAF05774); sbGH: 金鲷 GH (AAK71496); tGH: 尼罗罗非鱼 GH (AAM50321); chGH: 鸡 GH (BAA01365); gGH: 斜带石斑鱼 GH (AAK57697)

Notes: The analysis software is ClustaX. Dash (-) indicates a deletion, which was added to obtain maximum homology among various GH sequences. An asterisk indicates identical residues. Abbreviations: cGH: common carp GH (JE0144); mGH: mouse GH (CAA86658); hGH: human GH (AAH20760); xGHA: clawed frog GHA (AAF95773); xGHB: clawed frog GHB (AAF05774); sbGH: gilthead seabream GH (AAK71496); tGH: tilapia GH (AAM50321); chGH: chicken GH (BAA01365); gGH: orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) GH (AAK57697)