

大口黑鲈生长激素促分泌素 cDNA 结构和 早期发育阶段表达谱分析

樊佳佳¹, 白俊杰^{1*}, 李小慧¹, 杜芳芳^{1,2}, 于凌云¹, 叶星¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 中国水产科学院热带亚热带鱼类选育与
养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 研究采用 RT-PCR、RACE 和 PCR 技术从大口黑鲈胃组织中克隆得到 *ghrelin* 基因的 cDNA。该基因全长 434 bp, 其中开放阅读框 (open reading frame, ORF) 321 bp, 编码 107 个氨基酸的前肽, 20 个氨基酸的成熟肽位于第 27 位到第 46 位氨基酸处。前肽和成熟肽的氨基酸与已报导的舌齿鲈进行同源性分析, 相似性分别为 85% 和 90%。为进一步了解 *ghrelin* 基因在鱼体早期发育阶段的表达, 本实验采用实时定量 PCR (real-time PCR) 方法检测了 *ghrelin* 基因在大口黑鲈胚胎和仔鱼发育过程的表达谱。结果显示, *ghrelin* 基因在受精卵时期就有少量表达, 但直到体节出现之前表达量均较低。出膜第 4 天 *ghrelin* 基因出现大量表达, 第 12 天 *ghrelin* 基因表达量更显著增加, 出膜第 4 天和第 12 天的表达量分别是受精卵时期表达量的 206.77 倍和 531.20 倍。出膜第 4 天正是大口黑鲈仔鱼“开口觅食期”, 仔鱼消化系统初步发育成型, 由完全利用卵黄囊营养转为从外界觅食阶段, 到出膜第 12 天, 仔鱼消化系统已发育完善, 完全依靠外界营养提供能量, 由 *ghrelin* 基因的表达量变化可推测其可能参与了鱼类早期发育阶段的摄食调节。

关键词: 大口黑鲈; 生长激素促分泌素; 实时定量 PCR; 早期发育; 表达谱

中图分类号: S 917

文献标识码: A

生长激素促分泌素 (*ghrelin*) 是生长激素促分泌素受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHS-R) 的内源性配体^[1], 自 1999 年 Kojima^[1] 从小鼠胃中克隆该基因以来, 陆续又有学者克隆到人^[2]、牛蛙^[3]、鸡^[4]、金鱼^[5]、鳗鲡^[6] 和罗非鱼^[7] 等动物的 *ghrelin* 基因。*ghrelin* 具有促进生长激素 (growth hormone, GH) 分泌^[8]、增进食欲和参与能量平衡等生物学作用^[9]。连续给大鼠注射 *ghrelin* 可引起进食和体重增加, 而若注射 *ghrelin* 受体拮抗剂则可引起进食减少、体重减轻^[10], 在鱼类上也有类似的实验结果^[5, 11-12], 说明 *ghrelin* 参与动物的摄食和能量调节等。动物早期发育阶段是其生命过程中食物转换、对外界环境适应最

关键时期, 也是高死亡率时期, 特别对鱼类这种低等的脊椎动物, 早期发育阶段更为重要, 因此, 对鱼类早期发育阶段摄食调控基因的研究非常必要^[13]。关于 *ghrelin* 基因参与成年动物生长和发育方面的工作已有较多报道^[14-16], 但在动物早期发育各阶段的基因表达谱分析还较少见到。Lee^[14] 和 Sun^[15] 等应用 Northern-blotting 方法的分析结果表明, 小鼠 *ghrelin* 基因在出生后 5 天开始微量表达, 7 天该基因表达量显著升高; 而在鱼类胚胎时期的表达仅见斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的初步研究, 陈廷^[16] 用半定量 PCR 和 Southern-blotting 方法检测了 *ghrelin* 基因在斜带石斑鱼的胚胎发育期的表达, 但有关鱼类仔鱼期

收稿日期: 2010-02-05 修回日期: 2010-08-16

资助项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A1209); 广东省科技计划项目 (2007B020708008); 农业部公益性行业科研专项 (200903045); 国家自然科学基金项目 (30600152)

通讯作者: 白俊杰, E-mail: jbjbai@163.net

ghrelin 基因的表达谱分析还未见报导。本实验以大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 为研究对象,在获得完整的编码区序列的基础上,应用实时定量 PCR (real-time PCR) 方法检测大口黑鲈 *ghrelin* 基因在胚胎和仔鱼期的表达谱,为进一步了解鱼类早期摄食调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用的大口黑鲈材料取自珠江水产研究所水产良种基地,选择体重约 400 g 的成鱼用于 *ghrelin* 基因 cDNA 克隆。于 2009 年 4 月选择一对健康亲鱼 (♀ 650 g, ♂ 600 g) 催产后人工授精,收集受精卵于室温 (23 ~ 25 °C) 下培育,选择受精卵、囊胚、原肠早期、原肠中晚期、体节出现、出膜 4 d 和出膜 12 d 的胚胎或仔鱼用于 *ghrelin* 基因的表达谱分析,每个发育阶段随机取 3 组样本,每组样本 30 粒 (尾)。样品置于冻存管,液氮速冻,置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 主要试剂和试剂盒

SV Total RNA Isolation kit 和 DNase I 购自 Promega 公司; PrimeScript™ RT-PCR Kit、3'-Full Race Core Set Ver. 3.0 Kit 和 pMD18-T vectors system 购自 TaKaRa 公司; ReverTra Ace-α-® RT-PCR Kit 购自 TOYOBO 公司; Power SYBR Green PCR Master Mix Kit 购自 ABI 公司; 大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。

1.3 大口黑鲈 *ghrelin* 基因 cDNA 克隆

用 SV Total RNA Isolation kit (Promega) 提取大口黑鲈胃组织总 RNA,提取的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计分析其完整性和纯度,然后置于 -20 °C 备用。

ORF 框扩增 参照 NCBI 中已登录的舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*, DQ665912)、黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*, AY643808)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, AB104859)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*, AB196449)、鳗鲡 (*Anguilla japonica*, AB062427)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, AB096919 & AB100839)、鲫 (*Carassius auratus*, AF454389) 和斑马鱼 (*Danio rerio*, AM055940) 等鱼的 *ghrelin* 基因的 cDNA 序列,在同源保守区内设计引物,上游引物 P₁ 位于起始密码子处,下游引物 P₂ 位于 280 bp 处,用于扩增该基因的核心序列,引物信息见表 1,反转录过程按照 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 的操作步骤进行,反应结束后采用 P₁ 和 P₂ 进行 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 3 min, 1 个循环, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环, 72 °C 7 min。

3'RACE 扩增 根据已获得的序列设计上游引物 P₃ (引物信息见表 1); 下游引物为 3'-Full Race Core Set Ver. 3.0 试剂盒 (TaKaRa) 提供的 3'Race outer primer 和 3'Race inner primer。操作步骤按照试剂盒操作说明进行。

表 1 引物信息

Tab. 1 The information of the primer

引物 primer	引物序列(5'-3') sequences of primers	退火温度 T _m (°C) annealing temperature	产物长度(bp) length of products	用途 purpose
P ₁	ATGYTTYTGAAAARAAAYACCTGTYTGCTGG	52	282	ORF 框扩增
P ₂	CAGAYGCTGAATGATCTCCTG			
P ₃	TGAGTGGAGAGGACTTTGAGG			
3'race outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	55	211	3'RACE 扩增
3'race inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG			
P ₄	TGTTTTGTTCTCTGACCTTGTTGG	58	259	real-time PCR 分析
P ₅	TTCTGCTGCTCTGTGTTTCCC			
18s-F	GGACACGGAAGGATTGACAG	58	182	18 s 内参引物
18s-R	CGGAGTCTCGTTCGTTATCGG			

1.4 大口黑鲈 *ghrelin* 基因在早期发育阶段的相对表达量

采用 SV Total RNA Isolation kit (Promega) 提取保存的胚胎样本总 RNA, 分别测量样品在 260 nm 和 280 nm 波长的吸光度值, 计算 RNA 样品的浓度和纯度, 再分别取相应发育阶段的 RNA 各 1 μg 作为模板, 经 DNase I (Promega) 处理后, 按照 ReverTra Ace- α - $\text{\textcircled{R}}$ (TOYOBO) RT-PCR Kit (TOYOBO) 说明反转录得到 cDNA。应用大口黑鲈 *ghrelin* 基因特异引物 P₄ 与 P₅ (序列见表 1) 和 18 s 内参通用引物 18s-F 与 18s-R (序列见表 1) 进行 real-time PCR。用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (ABI) 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系: 20 μL PCR 反应液包括 1 μL cDNA 模板, 10 μL Power SYBR Green Master Mix, 0.4 μL ROX Reference Dye, 0.4 μL 的上、下游引物 (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 7.8 μL 的 ddH₂O。扩增条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 42 个循环的条件是 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。荧光读板温度为 72 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 结束后对扩增产物进行熔解曲线分析, 以确保特异性扩增。每个样品重复 3 次, 并设置阴性对照 (不加模板)。

1.5 生物信息学分析

序列同源性分析采用 NCBI 数据库 BLAST 程序。ORF 框预测采用 NCBI 数据库的 ORF finder 软件。氨基酸序列结构分析采用 Vector VII 10.3、Clustalx 1.81 和 MEGA 4 软件。

1.6 数据分析

根据公式 $\Delta C_t = C_{t, \text{target}} - C_{t, 18s}$, 取每份样品 3 个重复样的平均 C_t 值计算目标基因 *ghrelin* 相对于内参基因 18s 的 ΔC_t 值, 采用 $2^{-\Delta C_t}$ 方法^[17-18] 计算目的基因在不同发育阶段相对于受精卵时期的相对表达量。

本研究中关于基因相对表达量的所有数据处理均采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析, 差异显著用 One-way ANOVA 方差分析, 并用 Duncan 氏检验进行多重比较, 根据平均值 \pm 标准误绘制统计图。

2 结果与分析

2.1 *ghrelin* cDNA 序列与分析

大口黑鲈胃组织总 RNA 提取结果见图 1, 其中 28s、18s 和 5.8s rRNA 条带完整。*ghrelin*

基因 ORF 和 3'RACE 扩增结果见图 2, 其中 ORF 和 3'RACE 分别扩增出大小约 280 bp 和 250 bp 的特异条带, 与预期片段大小相符。

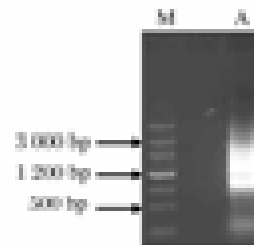


图 1 RNA 提取结果检测

M: 核酸分子量标准; A: RNA 抽提结果。

Fig. 1 Extraction result of RNA

M: marker; A: extraction result of RNA.

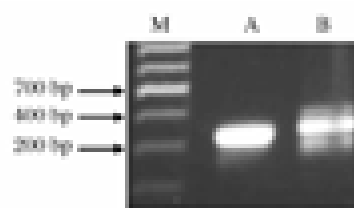


图 2 *ghrelin* 3'RACE 和 ORF 扩增结果

M: 核酸分子量标准; A: 3'RACE 的 PCR 扩增结果; B: ORF 扩增结果。

Fig. 2 PCR amplified results of *ghrelin* 3'RACE and ORF

A: PCR product of *ghrelin* 3'RACE; B: PCR product of ORF.

把获得的片段用 Vector VII 10.3 进行拼接, 拼接后的序列采用 NCBI 数据库的 BLAST 和 ORF finder 软件预测 *ghrelin* 前肽和成熟肽氨基酸序列 (图 3)。结果得到 *ghrelin* cDNA 全长 434 bp, 其中 ORF (开放阅读框) 长 321 bp, 共编码 107 个前肽, 成熟肽位于第 27 位到第 46 位氨基酸处, 共编码 20 个氨基酸, 3' 非翻译区长 113 bp, 有一 Poly (A) 加尾信号 ATTAAA。本研究得到的 *ghrelin* cDNA 序列在 NCBI 上的登陆号为 EU932862。

Blast 分析显示尽管不同物种的 *ghrelin* 基因在氨基酸数量和组成上存在差异, 但成熟肽的前 7 个氨基酸极为保守 (图 4), 特别是第三个丝氨酸, Tena-Sempere^[19] 认为该氨基酸的辛酰基化对 *ghrelin* 成熟蛋白的功能发挥有重要作用。将已报导的 22 种脊椎动物的 *ghrelin* 基因和大口黑鲈 *ghrelin* 基因编码的前肽进行聚类分析发现 (图 5), 23 个物种首先聚为 2 大类, 即鱼类和陆生动物; 鱼

类又明显分为鲤形总目和鲈形总目;陆生动物又明显分为鸡等家禽类和人等哺乳类;该聚类结果与传统的动物分类及进化关系基本吻合。

```

1 ATG TTT CTG AAA AGA AAC ACC TGT CTG CTG GTC TTT CTG TTT TGT
1 M F L K R N T C L L V F L F C
46 TCT CTG ACC TTG TGG TGC AAG TCA ACC AAT GCC GGT TCA AGC TTT
16 S L T L W C K S T N A G S S F
91 CTC AGC CCT TCT CAA AAA CCT CAG AGC AGG GGG AAG CCG TCC AGA
18 L S F S Q K F Q S R G K P S R
136 GCC GGC CCG CAA GTC ATG GAG GAG OCT AAT CAA CCG ACT GAG GAC
46 A G R Q Y M E E P N Q P T E D
181 AAT CAC ATC ACA ATA AGT GCC CCG TTT GAA ATT GGC ATC ACT ATG
61 N H I T I S A P F E I G I T M
226 AGT GGA GAG GAC TTT GAG GAG TAC GGT GTC CTG CTG CAG GAG ATC
76 S G E D F E E Y G V L L Q E I
271 ATT CAG CCG CTG CTG GGA AAC ACA GAG ACA GCA GAA AGA CCA GCA
91 I Q R L L G N T E T A E R P A
316 CAA OCT TGA 321
186 Q P *
325 AGATCARGGA CAGATTTTTC AAATTTTCTG TCCCAATGTC TTCTAATTTC AACTTCATTA
385 GATAGTGAAT ATGATGTC TGAAGCAAT TAGCCGCAAA AAAAAA

```

图3 大口黑鲈 *ghrelin* cDNA 序列及推测的氨基酸序列

双下划线代表:*ghrelin* 成熟肽;圆圈代表:可被辛酰基化的丝氨酸;方框代表:信号识别位点;阴影代表:终止信号。

Fig. 3 *ghrelin* cDNA sequence and deduced amino acids of largemouth bass

Double-underlined: mature *ghrelin*; circled: the third serine residue with potential acyl modification; boxed: the putative amidation signal; shadowed: the stop signal.

将大口黑鲈 *ghrelin* 基因前肽、成熟肽的核苷酸和氨基酸序列与部分脊椎动物进行同源性比较(表2)分析显示,大口黑鲈与不同鱼类前肽和成熟肽的氨基酸同源性分别为 52.7%~87.9% 和 72.7%~90%,其中同源性最高的是舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)和黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*),其同源性均在 85% 以上,但与其他脊椎动物前肽和成熟肽的氨基酸同源性分别为 30.6%~40.0% 和 32.1%~46.2%,表明动物的 *ghrelin* 在氨基酸组成上表现出鱼类内部各物种间的同源性较高,而与其它脊椎动物之间的同源性较低。从表2中还可看出从鱼类到哺乳类其前肽和成熟肽长度分别是 104 到 117 个氨基酸和 19 到 28 个氨基酸,而且多肽长度随动物由低等到高等有逐渐加长的趋势。

2.2 大口黑鲈 *ghrelin* 基因在不同发育阶段的相对表达量

大口黑鲈 7 个不同发育阶段 *ghrelin* 基因的相对表达量(相对于受精卵)的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析结果见表3。结果表明大口黑鲈 *ghrelin* 基因在受精卵时期就开始表达,但表达量很低,囊胚期、原肠早期、原肠中晚期和体节出现期相对受精卵时期

的表达量有少量增加,体节出现期的表达量是受精卵时期的 6.34 倍。仔鱼出膜之后,*ghrelin* 的表达量有很大提高,其中出膜 4 d 和出膜 12 d 的相对表达量是受精卵时期的 206.77 倍和 531.2 倍,方差分析差异均极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

将大口黑鲈 *ghrelin* 基因前肽与其它脊椎动物进行序列比较和同源性分析,可以看出 *ghrelin* 基因属于高度不保守的基因,23 种动物的 *ghrelin* 基因在氨基酸序列中除了 *ghrelin* 成熟肽 N 端 7 个氨基酸(GSSFLSP)保守外,其余氨基酸序列保守性均不高,但从氨基酸组成上表现出哺乳类、家禽类及鱼类内部各物种间的同源性较高,而各类动物之间的同源性较低,如哺乳动物成熟肽 N 端前 10 个氨基酸完全相同,而鱼类内部成熟肽 N 端前 11 个氨基酸完全相同(虹鳟-1 型除外);另外大口黑鲈与各种鱼类前肽和成熟肽的氨基酸同源性分别为 52.7%~87.9% 和 72.7%~90.0%,但与其他脊椎动物前肽和成熟肽的氨基酸同源性分别为 30.6%~40.0% 和 32.1%~46.2%。有研究表明,*ghrelin* 基因发挥生理功能的主要区域

是成熟肽的前7个氨基酸,其中第三位丝氨酸存在N端辛酰基化和去N端辛酰基化两种结构,第三位丝氨酸残基N端辛酰基化,对其生物活性具有重要作用,去N端辛酰基化后,则失去生物活性^[19]。从大口黑鲈 *ghrelin* 基因的功能区域与其它动物功能区域相同,可以推测大口黑鲈 *ghrelin* 基因在鱼体内所起的作用和其他动物相似。

关于 *ghrelin* 基因在动物成年阶段的表达谱分析已有不少报道^[5,11,20],但对 *ghrelin* 基因在动

物早期发育各阶段的表达谱分析仅见小鼠^[14-15]和斜带石斑鱼^[16]的相关报导,从小鼠在出生后7天(摄食量增加)和斜带石斑鱼在出膜3天(开口觅食期)之后 *ghrelin* 基因大量表达,表明 *ghrelin* 基因可能参与了动物早期发育阶段的摄食调节。刘文生等^[21]和吴庆龙^[22]研究表明大口黑鲈受精卵在水温 22 ~ 25 °C 下,出膜第4天卵黄逐渐消失,开始从外界摄取食物为食,出膜第12天以后,大口黑鲈仔鱼的卵黄已经被完全吸收,仔鱼完全

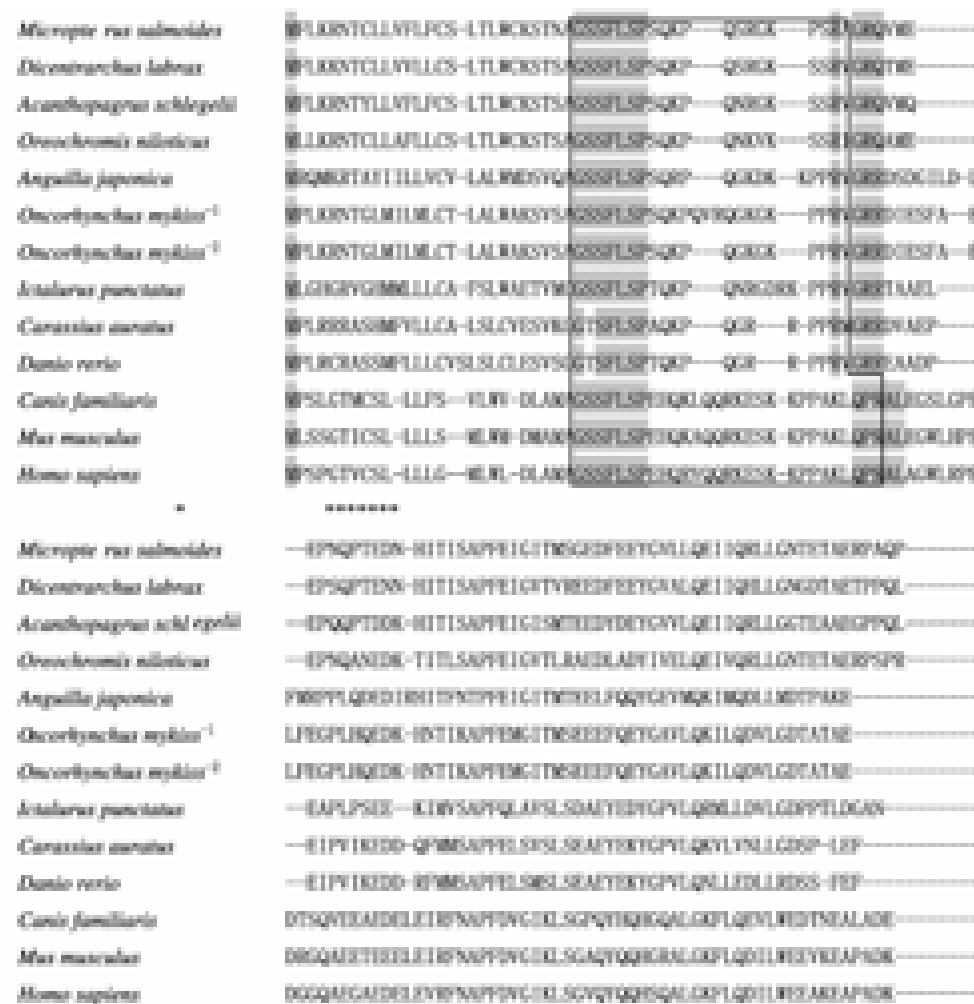


图4 推测的大口黑鲈和其它物种 *ghrelin* 基因的氨基酸序列比较

—:使序列对齐; *:示同一性;方框:代表成熟肽;氨基酸序列:大口黑鲈 EU932862、舌齿鲈 DQ665912、黑棘鲷 AY643808、尼罗罗非鱼 AB104859、鳊 AB062427、虹鳟-1 AB096919、虹鳟-2 AB100839、斑点叉尾鲷 AB196449、鲫 AF454389、斑马鱼 AM055940、狗 AJ298295、小鼠 NM021488、人 NM016362。

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequences of *ghrelin* among largemouth bass and other species

— introduce into sequence to optimize alignment; * represent identical symbols; boxed represent mature peptide; amino acid sequences: *Micropterus salmoides* EU932862, *Dicentrarchus labrax* DQ665912, *Acanthopagrus schlegelii* AY643808, *Oreochromis niloticus* AB104859, *Anguilla japonica* AB062427, *Oncorhynchus mykiss* - 1 AB096919, *Oncorhynchus mykiss* - 2 AB100839, *Ictalurus punctatus* AB196449, *Carassius auratus* AF454389, *Danio rerio* AM055940, *Canis familiaris* AJ298295, *Mus musculus* NM021488, *Homo sapiens* NM016362.

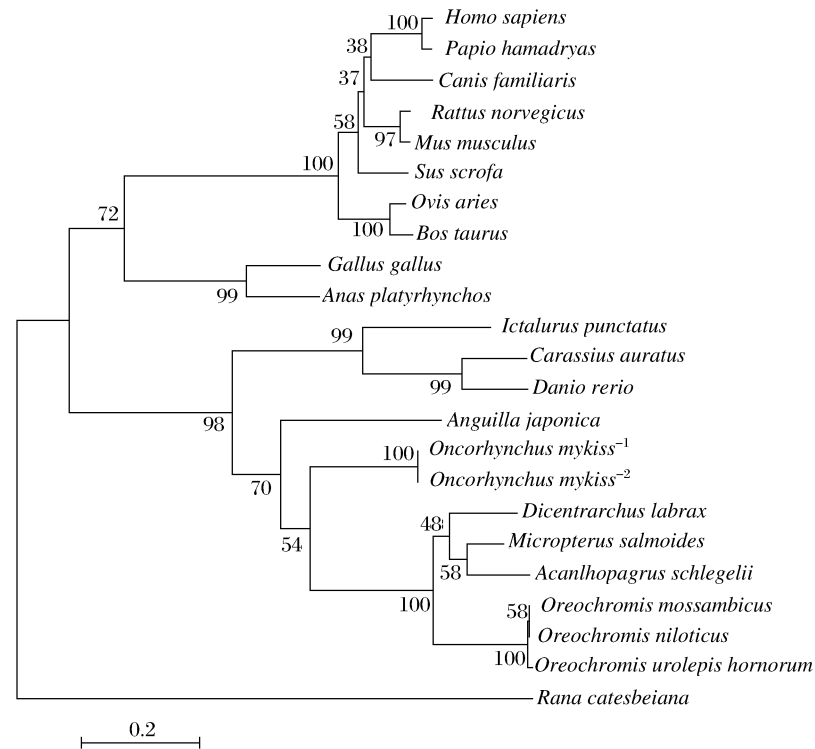


图 5 依据不同动物 ghrelin 前肽序列构建的系统树

Fig. 5 Phylogenetic tree derived from nucleotide sequences of ghrelin prepropeptide

表 2 大口黑鲈与其它脊椎动物 ghrelin 基因的氨基酸序列的同源性比较

Tab. 2 Homology analysis of largemouth bass ghrelin amino acids to those of other vertebrates

物种 species	前肽长度 prepropeptide length	同源性 identity		成熟肽长度 mature peptide length	同源性 identity	
		核苷酸(%) nucleotide	氨基酸(%) amino Acid		核苷酸(%) nucleotide	氨基酸(%) amino Acid
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	107	100	100	20	100	100
舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	107	82.2	85.0	20	90.0	90.0
黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	107	80.4	87.9	20	85.0	85.0
尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	107	72.9	81.3	20	75.0	80.0
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	104	33.6	52.7	19	65.0	80.0
牛蛙 <i>Rana catesbeiana</i>	114	21.6	31.9	28	21.4	32.1
鸭子 <i>Anas platyrhynchos</i>	116	26.7	39.2	26	34.6	42.3
鸡 <i>Gallus gallus</i>	116	25.8	40.0	26	38.5	46.2
狗 <i>Canis familiaris</i>	117	21.5	30.6	28	32.1	35.7
家鼠 <i>Mus musculus</i>	117	25.6	36.4	28	32.1	35.7
人 <i>Homo sapiens</i>	117	24.8	35.5	28	32.1	35.7

表 3 大口黑鲈早期发育阶段中 ghrelin 基因的相对表达量

Tab. 3 Relative expression of ghrelin in early developmental stage of largemouth bass

数值 numerical value	受精卵 fertilized egg	囊胚 blastula	原肠早期 early gastrulae	原肠中晚期 medium/terminal gastrulae	体节出现 metamere stage	出膜 4 d 4-days larva	出膜 12 d 12-days larva
ΔC_T	7.55	7.59	9.73	7.57	10.22	15.24	16.60
ΔC_T	0	-0.04	-2.18	-0.02	-2.67	-7.70	-9.05
$2^{-\Delta\Delta C_T}$	1	1.03	4.52	1.01	6.34	206.77	531.20

注: $\Delta C_T = (C_{t,ghrelin}) - (C_{t,18S})$; $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_{t,受精卵}) - (\Delta C_{t,发育阶段})$ 。

Notes: $\Delta C_T = (C_{t,ghrelin}) - (C_{t,18S, gene})$; $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_{t, fertilized egg}) - (\Delta C_{t, developmental stage})$ 。

靠摄取外界营养维持生存。本实验得出大口黑鲈 *ghrelin* 基因 *mRNA* 在受精卵到体节出现期间,其表达量均较低,而在出膜第 4 天开始大量表达,第 12 天表达量又大幅增加。这一变化规律与大口黑鲈仔鱼的摄食规律基本一致,出膜之前是以卵黄囊为营养,胚胎营养供应稳定,*ghrelin* 基因也没有大量表达,而在出膜第 4 天时,仔鱼完全依靠卵黄囊的营养供应已达不到生理的要求,必须从外界摄取营养来满足,此时 *ghrelin* 基因的表达也大幅提高,而到了完全依靠外源营养满足自己需求的时候,仔鱼的摄食欲表现更强,从而调节食欲的基因会高量表达,表明 *ghrelin* 基因参与大口黑鲈早期发育阶段的摄食调节。

参考文献:

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [2] Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, 2(6): 665-668.
- [3] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, *et al.* Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 40441-40448.
- [4] Kaiya H, Van Der Geyten S, Kojima M, *et al.* Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(9): 3454-3463.
- [5] Unniappan S, Lin X, Cervini L, *et al.* Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(10): 4143-4146.
- [6] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, *et al.* Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity [J]. *J Endocrinol*, 2003, 176(3): 415-423.
- [7] Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, *et al.* Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, 135(3): 421-429.
- [8] Arvat E, Di Vito L, Broglio F, *et al.* Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans [J]. *J Endocrinol Invest*, 2000, 23(8): 493-495.
- [9] 马细兰, 刘晓春, 周立斌, 等. 鱼类 ghrelin 研究进展 [J]. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 546-551.
- [10] Asakawa A, Inui A, Ueno N, *et al.* Ob/ob mice as a model of delayed gastric emptying [J]. *J Diabetes Complications*, 2003, 17(1): 27-28.
- [11] Unniappan S, Canosa L F, Peter R E. Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections [J]. *Neuroendocrinology*, 2004, 79(2): 100-108.
- [12] Riley L G, Fox B K, Kaiya H, *et al.* Long-term treatment of ghrelin stimulates feeding, fat deposition, and alters the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1-2): 234-240.
- [13] 殷名称. 鱼类早期生活史阶段的自然死亡 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20(4): 363-372.
- [14] Lee H M, Wang G, Englander E W, *et al.* Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion; enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(1): 185-190.
- [15] Sun Y, Wang P, Zheng H, *et al.* Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(13): 4679-4684.
- [16] 陈廷. 斜带石斑鱼脑肠肽及其受体的克隆与 mRNA 表达研究 [D]. 广州: 中山大学, 2007: 47-60.
- [17] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): 2002-2007.
- [18] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(9): 1-10.
- [19] Tena-Sempere M. Ghrelin: novel regulator of gonadal function [J]. *J Endocrinol Invest*, 2005, 28(5 Suppl): 26-29.
- [20] 马细兰, 张勇, 刘云, 等. 不同饥饿时段对黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*) ghrelin 基因表达的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(3): 313-318.

- [21] 刘文生,林焯坤,彭锐民.加州鲈鱼胚胎及幼鱼发育的研究[J].华南农业大学学报,1995,16(2): 5-11.
- [22] 吴庆龙.加州鲈鱼的繁殖习性、早期胚胎发育以及孵化与水温的关系[J].海洋湖沼通报,1993(1): 64-70.

***Ghrelin* cDNA structure and expression profile in early development of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)**

FAN Jia-jia¹, BAI Jun-jie^{1*}, LI Xiao-hui¹, DU Fang-fang^{1,2}, YU Ling-yun¹, YE Xing¹

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Ghrelin*, the endogenous ligand of growth hormone secretagogue receptor (GHS-R), has been shown to play an important role in eliciting growth hormone release and energy homeostasis. In the present study, we cloned *ghrelin* from stomach tissue of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) by using RT-PCR, RACE and PCR method. The amplified cDNA was totally 434bp in length including 321bp open reading frame (ORF). It encoded a propeptide of 107aa, with the predicted mature peptide consisting of 20aa. Alignment analyses showed that the similarities of propeptide and mature peptide between *Dicentrarchus labrax* were 85% and 90% respectively. To better understand the expression during fish early development of *ghrelin*, we also detected the expression profile of *ghrelin* at embryo and early fry of largemouth bass by real-time PCR. The result showed that *ghrelin* mRNA was observed at fertilized egg stage, and increased at metamere stage. The expression level at 4-days and 12-days larvae was about 206.77 and 531.20 times higher than that at fertilized egg stage. The 4-days larva was “first-feeding” in largemouth bass, when the larva was from endogenous nutrition to exogenous nutrition phase. The 12-day larvae had greatly increased intake appetite and at this stage larvae took full advantage of the exogenous nutrition, and the expression of *ghrelin* also reached the highest value. These results combined suggest that *ghrelin* is involved in the regulation of food intake in largemouth bass.

Key words: largemouth bass (*Micropterus salmoides*); ghrelin; real-time PCR; early development; expression profile

Corresponding author: BAI Jun-jie. E-mail: jjbai@163.net