

大熊猫生长激素受体 (GHR) cDNA 的克隆与序列分析

廖鸣娟^{1,2} 张志和^{2,3} 张安居³ 朱睦元^{2*}

(1 杭州师范学院生命科学学院, 杭州, 310012) (2 浙江大学生命科学学院, 杭州, 310012)

(3 濒危动物繁殖与保护遗传四川省重点实验室, 成都大熊猫繁育研究基地, 成都, 610081)

摘要: 根据已报道的若干物种 GHR 基因 cDNA 序列设计引物, 利用 RT-PCR 技术首次从大熊猫肝脏组织总 RNA 中扩增出 GHR 基因编码区全长 cDNA 序列, 克隆于 pGEM^R-T 载体后进行测序和序列分析。结果表明, 大熊猫 GHR 的 ORF 为 1 917 bp, 编码 638 个氨基酸的前体蛋白, 由 18 个氨基酸的信号肽和 620 个氨基酸的成熟肽组成, 与人、狗、猪 GHR 结构相似, 大熊猫 GHR 成熟肽由 246 个氨基酸的胞外区、24 个氨基酸的跨膜区和 350 个氨基酸的胞内区组成, 并具 GHR 的特征性结构。序列相似性比较显示, 大熊猫 GHR 与哺乳类 GHR 具有 69%~93% 的高序列相似性, 与爬行类和鸟类的序列相似性也达到 60%, 而与鱼类的序列相似性较低, 仅为 30% 左右。与其它哺乳动物 GHR 相比, 大熊猫 GHR 在氨基酸序列上也存在明显的特异性。

关键词: 大熊猫; 生长激素受体; RT-PCR; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: Q341

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2005)01-0024-08

cDNA Cloning and Sequence Analysis of Growth Hormone Receptor (GHR) from Giant Panda

LIAO Mingjuan^{1,2} ZHANG Zhihe^{2,3} ZHANG Anju³ ZHU Muyuan^{2*}

(1 College of Life Sciences, Hangzhou Teachers College, Hangzhou, 310012)

(2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310012)

(3 Key Laboratory for Reproduction and Conservation Genetics of Endangered Wildlife of Sichuan Province, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu, 610081)

Abstract: The gene encoding giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) growth hormone receptor (GHR) was amplified by RT-PCR from the liver total RNA. Cloned into pGEM^R-T vector, the PCR product was sequenced and analyzed subsequently. The results indicated that the open reading frame (ORF) of giant panda GHR is 1 917 bp, which encodes a 638 amino acid precursor containing a signal peptide of 18 amino acids and a mature peptide of 620 amino acid. Mature GHR of giant panda possesses similar GHR architectural structure from human, dog, and pig, all including a 246 amino acids extracellular domain, a hydrophobic transmembrane region of 24 amino acid followed by a 350 amino acid cytoplasmic region, and all conserved landmarks of GHR were also found in giant panda GHR from sequence alignment. Sequence analysis revealed a fairly high similarity between giant panda GHR and GHR from mammals ranging from 69% to 93%, and a medium level similarity of 60% with the birds and reptiles. But the amino acid similarity decreases to only 30% for fish species. Despite the great similarity, giant panda GHR has its own specificity in the amino acid compared to GHR from other mammals, suggesting possible difference on biological function.

Key words: Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*); Growth hormone receptor (GHR); RT-PCR; cDNA cloning; Sequence analysis

基金项目: 大熊猫繁育研究基金会资助项目 (2000-19); 杭州师范学院科研启动基金

作者简介: 廖鸣娟 (1976-), 女, 博士, 讲师, 主要从事分子遗传学研究. lmjshelly@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-02-16; 修回日期: 2004-06-07

* 通讯作者, correspondence author, E-mail: myzhu@zju.edu.cn

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国特有的珍稀濒危动物, 举世公认的“活化石”, 具有特殊的科学研究价值和观赏价值。分子遗传学技术的发展使大熊猫保护和研究的内容不断丰富, 从分子水平开展大熊猫基因的研究逐渐成为国内外研究的重点。目前, 对大熊猫基因的研究多集中于线粒体基因 (Zhang and Ryder, 1994)、SOX 家族基因的克隆和分析 (周荣家等, 1998), 而对核内其它重要的功能基因及其它们的生物学功能的探索相对较少, 目前仅见对 BDNF (林峰等, 1998)、活化素基因 A 亚基 (汪晓晶等, 2001)、FSH/LH (Liao *et al.*, 2003a)、GH (Liao *et al.*, 2003b) 和 NT-4 (Rao *et al.*, 2004) 等基因的报道。

脊椎动物脑垂体分泌的生长激素 (Growth hormone, GH) 广泛作用于各种细胞和组织, 一方面对机体生长发育和新陈代谢发挥作用 (Kelly *et al.*, 1993), 直接调节动物生长; 另一方面, 它参与机体的性别分化、性腺类固醇激素发生、生殖细胞发生、排卵、妊娠反应、泌乳等过程, 间接调节机体生殖 (Hull and Harvey, 2001)。GH 通过与靶细胞上的特异受体 GHR (Growth hormone receptor) 相互作用发挥其生理效应 (Herrington and Christin, 2001), 保证靶细胞膜上 GHR 的数量和功能是 GH 有效行使其功能的关键。有关 GHR 的研究一直是国内外的研究热点。1987 年, Leung 等 (1987) 首次从兔肝脏 cDNA 文库中克隆出 GHR, 之后, 人等其它许多哺乳动物类 (Godowski *et al.*, 1989)、鸟类 (Burnside *et al.*, 1991) 和鱼类 (Tse *et al.*, 2003) 的 GHR cDNA 序列都得到测序和分析, 为开展 GHR 结构、功能和调控等方面的深入研究奠定基础。GHR 为单链糖蛋白, 属于细胞因子/生长激素/催乳素 (Cytokine/GH/PRL) 受体超家族, 不同物种尤其是哺乳动物的 GHR 高度保守 (孙逊和朱尚权, 1999)。人 GHR cDNA 共编码 638 个氨基酸, 其中包括 18 个氨基酸的信号肽。成熟的人 GHR 由 620 个氨基酸组成, 其中 N 端 246 个氨基酸为胞外区, 构成激素结合结构域, 第 247~270 位为强疏水性氨基酸构成的跨膜区, C 端 350 个氨基酸位于胞内构成信号转导结构域 (Liao *et al.*, 2003b)。但至今对大熊猫 GHR (AmGHR) 的相关研究未见报道。为更好地保护大熊猫, 国内外对其各方面都进行了较多的探索, 但在饲养繁殖过程中, 人们对

大熊猫生长和繁殖特性仍知之甚少。本研究试图通过对大熊猫 GHR 基因结构及其功能的研究, 进一步了解它在生长发育和生殖过程中的作用, 为更有效地开展大熊猫圈养繁殖提供参考资料, 并为更深入开展大熊猫分子生物学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和试剂

大肠杆菌 JM109、限制性内切酶 *Pst*、*Sca* 购自上海华美生物公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成, 总 RNA 抽提试剂盒为 GIBCOBRL 公司 TRIzol Reagent, 逆转录试剂盒为 Promega 公司 Reverse Transcription System。T 载体试剂盒 (pGEM^R-T Vector Systems) 购自 Promega 公司, PCR 产物纯化试剂盒购自 Minipore 公司, Taq plus 聚合酶购自上海生物工程公司, 其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 大熊猫肝脏组织

取成都大熊猫繁育研究基地死亡大熊猫的肝脏组织, 立即冻存于液氮中, 防止 RNA 降解。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

取约 400 mg 的肝脏组织, 在液氮中充分研磨, 按 TRIzol^R Reagent 说明书推荐的方法提取总 RNA。将所得总 RNA 溶解于经 DEPC 处理的水中。用紫外分光光度计测定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的 OD 值, 计算 OD_{260/280} 值以测其纯度。同时进行 1% 的琼脂糖凝胶甲醛变性电泳分析。将总 RNA 保存于 -70 备用。

1.2.2 RT-PCR

利用 DNASIS 2.5 Demo 软件分析人 (*Homo sapiens*) (GenBank 序列号: NM 000163)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (NM 017094)、小鼠 (*Mus musculus*) (NM 010284)、原牛 (*Bos taurus*) (X 700041)、野猪 (*Sus scrofa*) (X 54429)、盘羊 (*Ovis aries*) (M 82912) 等哺乳动物 GHR 的 cDNA 编码区全序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计上下游引物, 引物编号及序列如下:

上游引物 pGR1: 5'-GGT CCT ACA GGT ATG GAT CTG GC-3',

下游引物 pGR2: 5'-CAA AGA AAG GCT AAG GCA TGA TTT T-3',

以肝脏总 RNA 为模板, Oligo dT 为反转录引物, 按照 Promega 公司逆转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第一链的合成。反应体积为 20 μ l, 其中含 1 μ g 左右的总 RNA, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, 0.5 μ g Oiligo (dT)₁₅, 10 U/ μ l RNA 酶抑制剂, 15 U AMV 反转录酶。反转录条件为 42 60 min; 取适量第一链产物为模板, 分别以 pGR1 和 pGR2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体积为 25 μ l, 包括 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 上下游引物各 0.3 μ M, 5U Taq plus 聚合酶; 反应参数设置为: 94 , 3 min; 94 , 1 min, 60 , 1 min, 72 , 1.5 min, 30 个循环; 72 , 10 min; RT-PCR 反应产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。所用 PCR 仪为 Gene Amp PCR System 9700。

1.2.3 重组子克隆和 DNA 序列分析

RT-PCR 反应产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分析和 Millipore 回收试剂盒纯化回收, 直接 T-A 克隆至 pGEM^R-T 载体。连接反应, 细菌转化等均参照分子克隆手册 (曼尼阿蒂斯等, 1992), 稍加修改。筛选阳性克隆, 在 LB 平板上挑取数个单菌落, 快速抽提质粒, 双酶切 (*Pst* 和 *Sca*) 鉴定大小符合的重组子, 再用 PCR 进一步鉴定, 获得阳性克隆。利用 pGEM^R-T 载体上两端的通用引物为测序引物, 挑选两个阳性克隆进行双向测序, 一次双向测序未测通的序列所需的额外测序引物由生物公司测序部设计合成, 以测通整个序列。

1.2.4 序列分析

cDNA 序列的 ORF 查找和氨基酸翻译采用 DNASIS 2.5 Demo 软件; 氨基酸序列的相似性比较和比对分析采用 GenDoc 软件; 利用 MEGA 2.1 软件构建序列的 NJ 进化树。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

利用分光光度计分析抽提的总 RNA, OD_{260/280} 比值为 1.93。经琼脂糖凝胶电泳后可清晰见到 18 S 和 28 S 两条核糖体 RNA 条带 (图 1), 表明本试验所抽提的肝脏总 RNA 是完整的, 材料保存和提取过程未发生降解。

2.2 RT-PCR 和 PCR 产物的克隆

RT-PCR 扩增产物经电泳鉴定, 得到 2 000 bp 左右的特异条带 (图 2), 大小与预期结果一致。PCR 产物经纯化后直接与 pGEM^R-T 载体进行连接, 连接液转化于大肠杆菌 JM109 高效感受态细胞中, 涂平板筛选, 挑取数个白色菌落, 快速提取质粒, 双酶切 (*Pst* 和 *Sca*) 和 PCR 鉴定获得具有大小相符的插入片段的重组子 (图 3)。

2.3 序列分析

测序结果显示扩增的序列为 1 938 bp, 与预期大小相符。在 NCBI 数据库中利用 Blast 搜索软件进行同源性基因检索, 结果发现该序列与其它哺乳动物 GHR 的 cDNA 序列最为相似, 证明所克隆的序

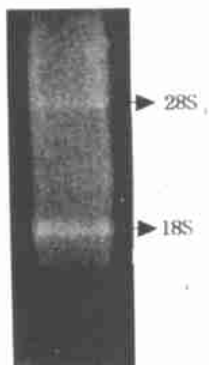


图1 肝脏总 RNA

Fig. 1 Total RNA from the liver

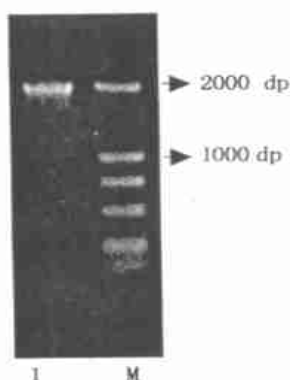


图2 大熊猫 GHR 的 RT-PCR

1: 扩增产物 (1 938 bp)

Fig. 2 RT-PCR of giant panda GHR

1: Amplified product (1 938 bp)

M: DL 2000 marker



图3 GHR 重组子的酶切鉴定

1: GHR PCR 产物; 2: 双酶切 *Pst* 和 *Sca* ;

Fig. 3 Identification of GHR recombinant by enzymatic digestion

1: GHR PCR product; 2: Digested with *Pst* and *Sca* ;

M: *EcoR* / *Hind* marker

列为大熊猫 GHR cDNA 序列。将该序列登录于 GenBank, 得到的登录号为 AF395535。大熊猫 GHR 核苷酸和推导的氨基酸序列如图 4 所示, ORF 为

1 917 bp, 编码 638 个氨基酸的前体蛋白, 包括 18 个氨基酸的信号肽和 620 个氨基酸的成熟肽。与人、野猪和狗等动物的 GHR 相似, 成熟受体由 246

1	GGTCCTACAGGTATGGATCTCTGGCAGCTGCTGTTGACCTTGGCAGTGGCAGGCTCAGGCAATGCTGTTTCTGGGAGTGAAGCCACACCA	90
-18	M D L W Q L L L T L A V A G S G N A V S G S E A T P	8
91	GCTATCCTTGGCAGAGCATCCAGAGTCTGCAAGAGTTAATCCAGGCCAGGACAAATCCTTCTGGGAAGCCTCAGTTCACCAAGTGC	180
9	A I L G R A S Q S L Q R V N P G P G T N P S G K P Q F T K	38
181	CGTTCACCTGAAGTACAGACTTTTTCATGCCACTGGACAGAGGGGTTTCATCAGGTGTGAAGAAGCCAGGATCCATACAGCTGTTCTAT	270
39	R S P E L E T F S H W T E G V H H G V K N P G S I Q L F Y	68
271	ATTAGAAGGAGCACTCAAGATGGACTCCAGAATGGAAGAATGTCCGATTATGTCTCTGCTGGAGAAACAGCTGTACTTTAATTCA	360
69	I R R S T Q E W T P E W K E P D Y V S A G E N S Y F N S	98
361	TCTTATACCTCCATTTGGATACCTACTGTATCAAGCTAACCAGCAATGGTGATACAGTGGATCAAAAATGTTTCTCTGTTGAGGAAATA	450
99	S Y T S I W I P Y I K L T S N G D T V D Q K F S V E E I	128
451	GTGCAACCCAGACCCCATCGGCTCAACTGGACTTACTGAACATCAGTTTAAACGGGATTTCATCGGATATCCAAGTGAGATGGAA	540
129	V Q P D P P I G L N W T L L N I S L T G I H A D I Q V R W E	158
541	CCACCGCCCAACGCAGATGTTGAGAAGGTTGGATAGTCTGGAGTATGAAGTCAATACAAAGAAGTAAACAGTCCAGTGGAAATG	630
159	P P P N A D V Q K G W I V L E Y E L Q Y K E V N E S Q W K M	188
631	ATGGACCTGTATTGTCAACATCAGTTCAGTTTACTCATTGAGACTGGATAAGGAATATGAAGTGCCTGTGAGATCCAGACAACGAAAT	720
189	M D P V L S T S V P V Y S L R L D K E Y E V R V R S R Q R N	218
721	TCTGAAAAATATGGCAGTTCAGTGAAGTCTCTATGTAGCACTTCTCAGATGAGTCCATTGTCATGTGAAGAAGATTCCAGTTTCCA	810
219	S E K Y G E F S E V L Y V A L P Q M S P F A E E D F Q F P	248
811	TGGTCTTAATTATTATCTTTGGAATATTTGGGCTAACGATGATACTATTTTATTCATATTTCTAAACAGCAAAGGATTAAGATGCTG	900
249	W F L I I I F G I F G L T M I L F L F I F S K Q G R I K M L	278
901	ATCTTCCCGGTTCCAGTTCCTCAAGATTAAAGGAATTGATTCAGATCTCTAAAGGAAGGAAATTAAGAAGGTGAGCACAATCTTA	990
279	I L P P V P V P K I K G I D S D L L K E G K L E E V S T I L	308
991	GCCATTGATGACAACTATAAACCTGAATTCTACAAGTACTGCTTGGGTTGAATTGAGTGGATATTGATGACCCAGATGAAAAG	1080
309	A I H D N Y K P E F Y N D D S W V E F I E L D I D D P D E K	338
1081	ACTGAAGGATCAGACACAGACAGACTTCTCAGTAACGACCATGAGAAGTCACTCAACATCCTTGGAGCAAAGGATGATGACTCTGGACGT	1170
339	T E G S D T D R L L S N D H E K S L N I L G A K D D D S G R	368
1171	ACCAGCTGTTATGAACCTGACATTCTGGAGACTGATTTCAATGCCAGTGACGTGTGCGATGGTACATCAGAGGTTGCTCAACCCAGAGG	1260
369	T S C Y E P D I L E T D F N A S D V C D G T S E V A Q P Q R	398
1261	TTAAAGGGGAAATAGATCTTTTGTGCCCTTGACCAAGAATCAAAGTAACTCACCTTCTACTGATACTGCCCTAATACTCAGCAGCCC	1350
399	L K G E I D L L C L D Q K N Q S N S P S T D T A P N T Q Q P	428
1351	GGCGTTATCCTGGCAAGGAAACAAACCAAGACCACTTCTGATTAGTGAAGTCACTCACTCATCAAGCTGCCCTCCTCAGCTAAGC	1440
429	G V I L A K E N K P R P L L I S G T E S T H Q A A H P Q L S	458
1441	AATCCGAGTTCAGTGGCAACATCGACTTTTATGCCAGGTAAGCGACATTAAGTCCAGCAGGAGTGTGGTCTTCCCGAGGCCAAAG	1530
459	N P S S L A N I D F Y A Q V S D I T P A G S V V L S P G Q K	488
1531	AATAAGGCAGGGATAGCCCCGTGTGACATGCCTCCGAAGTGGTCTCGCTCTGCCAGGCAAACCTCATCATGGACAACGCCTACTTCTGC	1620
489	N K A G I A P C D M P P E V V S L C Q A N F I M D N A Y F C	518
1621	GAGGCAGATGCCAAAAGTGCATCACTGTGGCGCTCACGTGAGGCTGAATCACGCGAGAGCAAGCTTAAACGAGGAAGACATTTAC	1710
519	E A D A K K C I T V A P H V E A E S R G E P S F N Q E D I Y	548
1711	ATCACCACAGAAAGCCTTACCAGTGTGCTGGCCAGCCGGGACAGCAGAGCGGGCTCCAAGCTCCGAGATTCCTGTCCCGGAGTATACC	1800
549	I T T E S L T T V A G Q P G T A E R A P S S E I P V P D Y T	578
1801	TCCATCCACATCGTACAGTCTCCACGGGGCTCGTGTCTCAATGCCAGGCCTTGCCTTGCCTGACAAAGATTCTCTCATCGTGGCGG	1890
579	S I H I V Q S P R G L V L N A T A L P L P D K E F L S S C G	608
1891	TACGTGAGCACAGCAACTGAACAAATCATGCCTTAGCCTTCTTTG	1938
609	Y V S T D Q L N K I M P *	620

图 4 大熊猫生长激素受体 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

——: 引物序列; ==: 信号肽序列; □: N-糖基化位点; ○: 保守的半胱氨酸残基; *: 终止密码子;FGZFS 模块结构; □: Box 1 和 Box 2 结构; —: 跨膜区

Fig. 4 cDNA sequence and putative amino acid sequence of GHR from giant panda

——: The primer sequences are underlined; ==: The signal peptides are double underlined; □: The N- glycosylation sites are boxed by open rectangles; ○: Conserved cysteine residues are cycled; *: The asterisks represent stop coden;FGZFS motif is underlined with a dotted line; □: Box 1 and Box 2; regions are boxed in shaded rectangle; —: Transmembrane region is underlined with thick line

个氨基酸的胞外域，24 个氨基酸的疏水跨膜区和 350 个氨基酸的胞内域组成。根据推导出的氨基酸序列，预测大熊猫 GHR 成熟蛋白的分子量约为 69 kDa。

2.4 相似性比较与进化树分析

将大熊猫 GHR 成熟肽序列与 GenBank 中若干已知物种 GHR 进行相似性比较（表 1）。结果表明，大熊猫 GHR 与哺乳类、爬行类、鸟类 GHR 具

有较高的相似性，相似性为 60 % ~ 90 % 左右，其中与同目动物狗的 GHR 序列高度相似，达到 93 % 的相似性。而与鱼类的相似性较低，仅为 30 % 左右。根据 GHR 成熟肽氨基酸序列，利用 Mega 2.1 软件的 NJ 方法构建各种哺乳类、鸟类、爬行类和鱼类 GHR 的分子进化树（图 5），GHR 进化树与传统的物种系统进化关系基本一致，大熊猫与同为食肉目的狗归为一支。

表 1 大熊猫与若干物种 GHR 氨基酸序列相似性比较

Table 1 Amino acid homology between giant panda GHR and GHRs of other species

物种 Species	成熟大熊猫 GHR 相似性 (%) Similarity of mature GHR of giant panda (%)	成熟肽氨基酸数 Amino acid number of mature receptor	GenBank 序列号 GenBank accession No.
狗 <i>Canis familiaris</i>	93	620	AF13835
野猪 <i>Sus scrofa</i>	90	620	X54429
家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	87	620	AF015252
原牛 <i>Bos taurus</i>	82	616	X700041
盘羊 <i>Ovis aries</i>	82	616	M82912
人 <i>Homo sapiens</i>	82	620	NM000163
猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	80	620	MMU84589
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	74	620	NM017094
小鼠 <i>Mus musculus</i>	72	632	NM010284
豚鼠 <i>Cavia porcellus</i>	72	610	AF238492
龟 <i>Pelodiscus sinensis japonicus</i>	60	597	AF211173
鸡 <i>Gallus gallus</i>	59	590	M74057
家鸽 <i>Columba livia</i>	60	593	U20353
鲑鱼 <i>Oncorhynchus masou</i>	31	574	AB071216

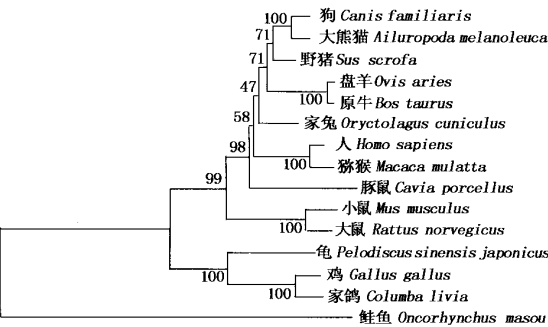


图 5 各物种的 GHR 成熟肽氨基酸序列 NJ 系统进化树
图上置信数业自 1 000 个复制序列的统计

Fig. 5 NJ phylogenetic tree analysis based on amino acid
sequence of mature GHR from different species. Bootstrap
branches were derived from 1000 replications

2.5 多序列比对分析

作为 cytokine/ GH/ PRL 受体超家族成员之一，GHR 在结构上具有一些共同的结构特征。为确定大熊猫 GHR 可能的功能保守区，本研究对大熊猫、狗、野猪、家兔、盘羊、原牛、大小鼠和人的 GHR 进行了多序列比对分析（图 6）。结果表明，在大熊猫 GHR 胞外域的 38、48、83、94、108、122 和 241 位上有 7 个半胱氨酸残基，其中前 6 个在所有目前已知的物种中都保守，用于形成二硫键，起稳定 GHR 胞外区段特定空间结构的作用（Fuh *et al.*，1990）。根据人 GHR 结构可以推知，大熊猫 GHR 可能在 C38 与 C48，C83 与 C94，C108 与 C122 间形成 3 对二硫键（Fuh *et al.*，1990）；胞外 N 端大熊猫 GHR 含有 5 个保守的 N - 糖基化位点，分别位于 28、97、138、143、182，除啮齿类没有 28 位点以外，其它 4 个位点在所有哺乳动物中也完全保守。在胞内区大熊猫 GHR 还具有高度

保守的 BOX1 和 BOX2 区域，分别位于 281 - 290 和 322 - 334。GHR 胞外区接近膜的位置具有保守 YGZFS (Z 为任意氨基酸) 基序 (motif)，大熊猫相

应序列位于 223 - 227，为 YGEFS。另外，在大熊猫 GHR 胞内部分还含有 8 个酪氨酸残基，其中有 6 个在所有哺乳类物种中都保守。

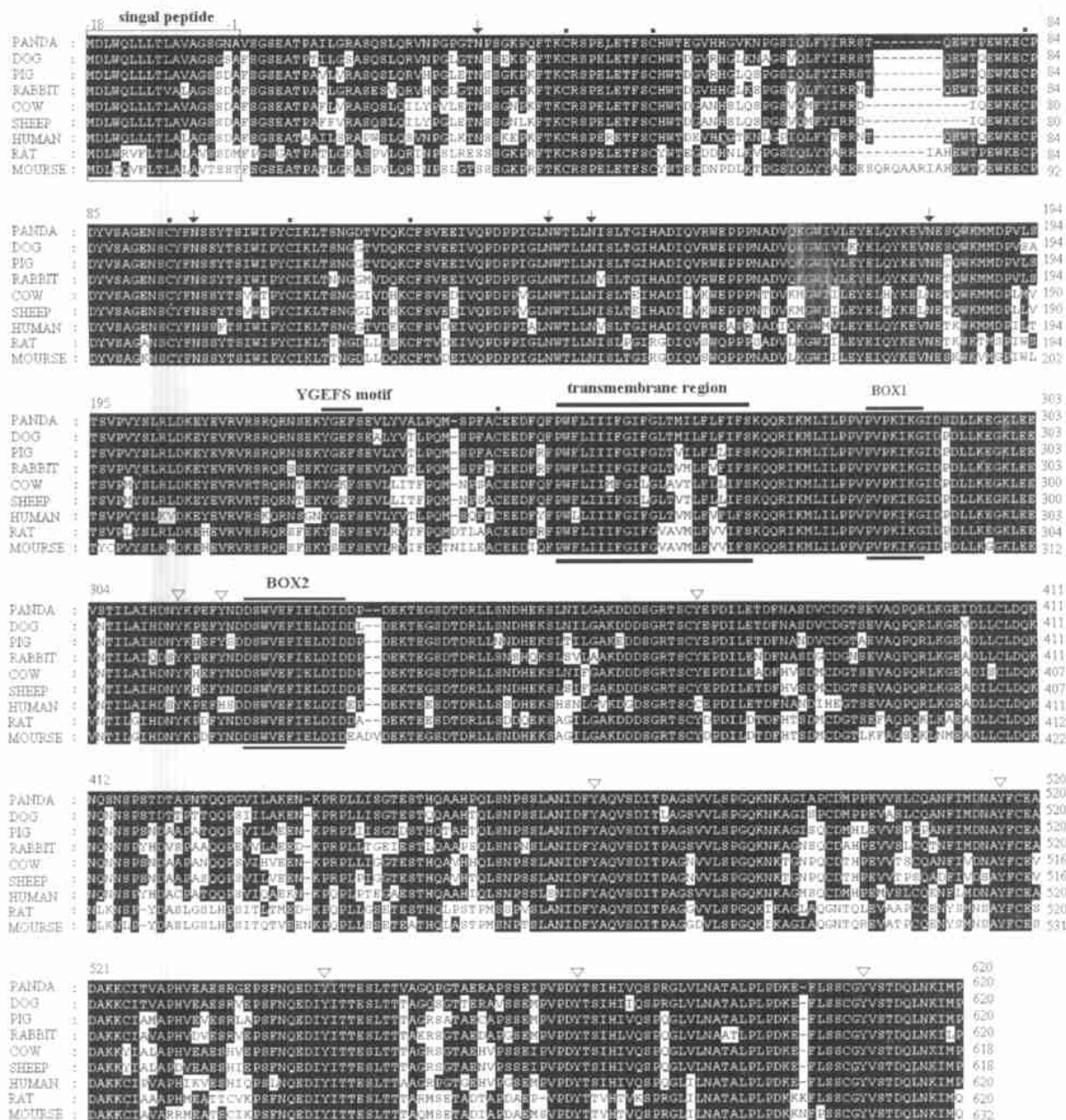


图6 大熊猫与其它哺乳动物的生长激素受体氨基酸序列对比分析

“.”: 保守的半胱氨酸位点; “→”: N-糖基化位点; “▽”: 酪氨酸残基位点

Fig. 6 Alignment of GHR amino acid from giant panda and other mammals

“.”: Dots indicate cysteine residues; “→”: The arrows indicate potential N-linked glycosylation sites;

“▽”: The triangles indicate tyrosine residues

3 讨论

根据已有的哺乳动物序列信息,设计保守引物进行 RT-PCR,成功扩增出大熊猫 GHR 编码区序列。大熊猫 GHR 与人、狗、猪等 GHR 结构相似,胞外区、跨膜区及胞内区分别由 246、24 及 350 个氨基酸组成。序列相似性及比对分析结果都表明大熊猫 GHR 与其它哺乳动物、鸟类和爬行类 GHR 具有较高的相似性,尤其是胞外区半胱氨酸残基、糖基化位点、胞内 BOX1、BOX2 以及 YGEFS 基序等 GHR 的特征结构高度保守,这些结构对 GHR 行使正常功能具有重要作用,如 BOX1 和 BOX2 在 GH 介导的信号转导过程中起着关键作用,前者富含脯氨酸,是 JAK2 结合和激活所必需 (VanderKuur *et al.*, 1994); 后者被认为与 GHR 的增殖反应活性相关 (Herrington and Christin, 2001; Zhu *et al.*, 2001), Box1、Box2 的突变或缺失将导致错误的配体调节细胞生长 (高雪等, 2003)。YGEFS 基序在 GH 和 GHR 结合过程中起稳定空间构象的作用,能保证正常的配体结合和受体信号转导,并参与 GHR 的二聚化 (Leo *et al.*, 2001)。对鱼类 GHR 的研究已表明,鱼类 GHR 在进化过程中变异较大,因而与哺乳动物 GHR 序列相似程度较低 (Tse *et al.*, 2003), 本研究也得到相似的结果,大熊猫 GHR 与鱼类 GHR 的序列相似性仅为 30 % 左右。尽管如此,研究也发现在 GHR 的特征结构域部分,鱼类与其它物种 GHR 序列仍高度保守 (Tse *et al.*, 2003)。以上结果进一步证实不同物种来源的 GHR 在结构进化上的保守性,从而暗示了它们在生命活动中的重要生物学作用。

GHR 缺乏内在的酪氨酸激酶活性,借助于细胞质酪氨酸激酶发挥生理功能,当一分子 GH 与两分子 GHR 作用,引发 GHR 二聚化,继而激活 GHR 并促发 JAK2 酪氨酸激酶的一系列后受体反应 (Moutoussamy *et al.*, 1998), 从而发挥 GH 的各项生理功能。由于结构上的保守性,目前发现不同物种 GH 与 GHR 相互间都具有亲合性。然而灵长类 GH 和 GHR 例外,大多数种属包括鱼类 GHR 都能结合人 GH,但人 GHR 却不能结合哺乳动物及鱼类 GH,人 GHR 仅能与灵长类 GH 结合,突变研究表明人等灵长类 GHR 的第 43 位 Arg 可能与这种特异性有关 (曼尼阿蒂斯等, 1992), 在非灵长类 GHR

的第 43 位均为 Leu。大熊猫 GHR 的第 43 位与其它非灵长类 GHR 一致为 Leu,理论上表明大熊猫 GHR 可与人等其它动物 GH 结合,这一结果为今后将人等物种 GH 应用于大熊猫圈养繁殖以调节大熊猫生长发育、提高幼仔存活率的研究提供理论依据。另一方面,对位比较结果表明,成熟大熊猫 GHR 序列在部分氨基酸位点上也存在特异性,如大熊猫 GHR 的 1, 25, 2, 293, 420 位分别为 V, P, P, S, I, 而其它物种均分别为 F, L, S, P, A。这些结构的特异性是否影响 GHR 的功能而使它具有明显的功能特异性,还有待于对大熊猫 GHR 的功能做进一步的研究。

参考文献:

- Burnside J, Liou S S, Cogburn L A. 1991. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chickens. *Endocrinology*, **128**: 3183 - 3192.
- Fuh G, Mulkerrin M G, Bass S, McFarland N, Brochier M, Bourell J H, Light D R, Wells J A. 1990. The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. *J Biol Chem*, **265**: 3111 - 3115.
- Godowski P J, Leung D W, Meacham L R, Galgani J P, Hellniss R, Keret R, Rotwein P S, Parks J S, Laron Z, Wood W I. 1989. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *PNAS*, **86**: 8083 - 8087.
- Herrington J, Christin C S. 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trend Endocrin Met*, **6**: 252 - 257.
- Hull K L, Harvey S. 2001. Growth hormone: roles in female reproduction. *J Endocrinol*, **168**: 1 - 23.
- Kelly P A, Ali S, Rozakis M, Goujon L, Nagano M, Pellegrini I, Gould D, Djiane J, Edery M, Finidori J. 1993. The growth hormone / prolactin receptor family. *Recent Prog Horm Res*, **48**: 123 - 165.
- Leo T O, Lee G, Nong Y H, Chan Y H, Tse D L, Cheng C H. 2001. Molecular cloning of teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene*, **270**: 121 - 129.
- Leung D W, Spencer S A, Cachianes G, Hammonds R G, Collins C, Henzel W J, Barnard R, Waters M J, Wood W I. 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*, **330**: 537 - 543.
- Liao M J, Zhu M Y, Zhang Z H, Zhang A J, Li G H, Sheng F J. 2003a. Cloning and sequence analysis of FSH and LH in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Anim Reprod Sci*, **77**: 107 - 116.
- Liao M J, Zhu M Y, Zhang Z H, Zhang A J. 2003b. cDNA cloning of growth hormone from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and its expression in *Escherichia coli*. *Comp Biochem Phys B*, **135**: 109 - 116.

- Moutoussamy S, Kelly P A, Finidori J. 1998. Growth hormone receptor and cytokine receptor family signaling. *Eur J Biochem*, **255**: 1 - 11.
- Rao G, Fang S G, Tsutomu F, Wei F W. 2004. Expression of biologically active neurotrophin-4 of giant panda in *Escherichia coli*. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (1): 13 - 18.
- Tse D L, Tse M C, Chan C B, Deng L, Zhang W M, Lin H R, Cheng C H. 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim Biophys Acta*, **1625**: 64 - 76.
- Vander Kuur J A, Wang X, Zhang L, Campbell G S, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, Carter-Su C. 1994. Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **269**: 21709 - 21717.
- Zhang Y P, Ryder O A. 1994. Phylogenetic relationships of bears (the Ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, **3** (4): 351 - 359.
- Zhu T, Goh E L, Graichen R, Ling L, Lobie P E. 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal*, **13**: 599 - 616.
- 孙逊, 朱尚权. 1999. 生长激素受体的结构、功能及其信号途径. 国外医学——生理、病理科学与临床分册, **19** (1): 9 - 14.
- 汪晓晶, 王小行, 谭言飞, 王亚军, 王喜忠, 陈红卫, 何光听, 费立松. 2001. 大熊猫繁育障碍与染色体脆性位点的相关性研究. 遗传学报, **28** (7): 621 - 627.
- 林峰, 杨玉华, 张义正, 陈红卫, 费立松, 宋云芳, 何光听, 张安居. 1998. 大熊猫脑源性神经营养因子基因的克隆与表达. 兽类学报, **18** (2): 95 - 99.
- 周荣家, 程汉华, 余其兴, 张亚平. 1998. 大熊猫 Sox 和 Zfx 基因. 中国科学 (C 辑), **28** (6): 516 - 520.
- 高雪、许尚忠, 张英汉. 2003. 生长激素作用机理的研究进展. 黄牛杂志, **29** (1): 50 - 53.
- 曼尼阿蒂斯 T, 弗里奇 E, 萨姆布鲁克 J (金冬雁等译). 1992. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社.