

荷那龙罗非鱼 ghrelin cDNA 的克隆及表达特征*

高风英¹ 王欢^{1,2} 卢迈新^{1**} 叶星¹ 黄樟翰¹ 朱华平¹ 杨丽萍¹

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025

摘要 以荷那龙罗非鱼胃组织中提取的总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法克隆出荷那龙罗非鱼 ghrelin 前体基因的 cDNA 全序列。所获得的 ghrelin cDNA 总长为 833 bp, 包括 97 bp 的 5' 非编码区, 412 bp 的 3' 非编码区和 324 bp 的开放阅读框, 编码 107 个氨基酸残基。核苷酸序列同源性分析显示, 荷那龙罗非鱼 ghrelin 与莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼 ghrelin 序列的相似性达 99.0% 以上。采用半定量 RT-PCR 方法检测雌、雄荷那龙罗非鱼胃、肌肉和垂体等多个组织中 ghrelin 基因的表达, 结果显示, 荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因有广泛的组织分布, ghrelin 基因在雌、雄鱼胃中的表达量均最高, 在其他组织的表达量存在雌雄个体差异。雌鱼肌肉中 ghrelin 基因的表达量明显高于雄鱼, 是雄鱼的 132 倍。试验鱼饥饿 4 周后, 采用荧光定量 RT-PCR 方法检测胃中 ghrelin 基因表达量变化, 结果表明: 饥饿组较对照组 ghrelin mRNA 表达量有增加, 饥饿组个体中 ghrelin 基因表达量最高的个体的表达量比对照组中表达量最低的个体增加了 47.3 倍。

关键词 荷那龙罗非鱼; ghrelin; cDNA 克隆; 组织表达; 饥饿调控

中图分类号 S 917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0752-06

生长激素促分泌素即 ghrelin, 是生长激素促分泌素受体的内源性配体, 1999 年, 由 Kojima 等^[1]首次从大鼠胃中提取出来。ghrelin 在体内存在无活性的 N 端去辛酰基化和有活性的 N 端辛酰基化 2 种形式。ghrelin 与受体 GHSR-1a 结合后具有调节脑垂体生长激素释放的活性。在哺乳动物中已经证明, ghrelin 基因除了具有促进生长激素分泌的作用外, 还可通过外周和中枢途径参与胃肠生理活动的调节等 (<http://music.qq.com/miniportal/static/taoge/index.html>)。近几年有关蛙类、鸟类等生物的 ghrelin 基因的研究已有报道^[2-3]。在水产动物方面, 金鱼 (*Carassius auratus*)^[4]、鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[5]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[6]、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*)^[7]、鲈 (*Ictalurus punctatus*)^[8]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 和莫桑比克罗非鱼 (*O. mossabicus*)^[9-10] 等也有关于 ghrelin 的研究报道, 但对荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因的研究还未见报道。

荷那龙罗非鱼 (*O. hornorum*) 原产于非洲, 2001 年由中国水产科学研究院珠江水产研究所引入中

国, 主要作为父本与橙色莫桑比克罗非鱼杂交生产高雄性苗种。笔者克隆了荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因 cDNA 全序列, 并分析了 ghrelin 基因在正常饲养的雌雄鱼各组织中表达的差异, 以及饥饿对罗非鱼胃中 ghrelin 基因表达量的影响, 以期了解 ghrelin 基因对罗非鱼能量平衡的调节作用。

1 材料与方法

1.1 试验鱼

荷那龙罗非鱼取自珠江水产研究所高要水产种质工程中心的性成熟个体, 体质量为 (82 ± 0.5) g。活体取样, 取胃、肌肉、垂体、鳃、心脏、肝、脾、性腺、肠和肾等组织, 立即置于液氮中, 运回实验室后存于 -80 °C 超低温冰箱备用。ghrelin 基因的饥饿调控试验分 2 组 (正常喂养组和饥饿组), 室内暂养 4 周后, 每组随机选 3 尾鱼取其胃组织并立即置于液氮中备用。

1.2 ghrelin 基因前体蛋白 cDNA 克隆与序列分析

取荷那龙罗非鱼胃组织, 用高纯总 RNA 提取试剂盒 (百泰克) 提取总 RNA, 依据 AMV 反转录试

收稿日期: 2010-03-20; 修回日期: 2010-09-01

* 国家科技支撑计划 (2006BAD01A1201)、广东省农业攻关项目 (2009B020201003)、现代农业产业技术体系建设专项资金 (nycytx-48-4)、公益性行业 (农业) 科研专项 (3-49)、广东省海洋渔业科技推广专项 (A200901C01) 资助

** 通讯作者. E-mail: mx-lu@163.com

高风英, 女, 1976 年生, 助理研究员. 研究方向: 水产动物生物技术. E-mail: fengyinggao2002@yahoo.com.cn

剂(TaKaRa)盒操作规程合成 cDNA 第一链。根据莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambicus*) 和尼罗罗非鱼 (*O. niloticus*) ghrelin 基因 cDNA 序列的保守区域设计特异引物,以 cDNA 第一链为模板,用特异引物对(ghrelin-F 与 ghrelin-R)扩增 ghrelin 基因前体 cDNA 序列。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。扩增所得目的条带在 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行分离,切下目的条带。用胶回收试剂盒(Omega)纯化目的产物后,克隆到 pMD19-T(TaKaRa)载体上,挑选阳性克隆测序。测序结果用 Vector NTI suit 8.0 软件推导氨基酸序列,并与 GenBank 中其他物种的 ghrelin 基因序列进行相似性比较。用 Meg 软件的 NJ 程序做进化树分析。

1.3 雌鱼和雄鱼 ghrelin mRNA 的半定量 RT-PCR 分析

依据上述方法分别提取 3 尾雌鱼和 3 尾雄鱼各种组织的总 RNA。分别将雌鱼和雄鱼相应组织的 RNA 混匀后各取 1 μg 作为模板,按照 Prime-Script™ 反转录试剂盒(TaKaRa)说明反转录获得 cDNA。取 2 μL cDNA 进行 PCR 扩增。扩增引物根据克隆到的荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因的 cDNA 序列设计(RT-F,RT-R)。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 35 次;最后 1 个循环结束时 72 °C

延伸 7 min。根据莫桑比克罗非鱼和尼罗罗非鱼 β-actin cDNA 序列保守区设计 1 对内源参照基因(β-actin 基因)的 PCR 扩增引物:β-actin-F 和 β-actin-R。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 28 次;72 °C 延伸 7 min。取 5 μL ghrelin 基因和 5 μL β-actin 基因的 PCR 产物在同一块琼脂糖凝胶(1.2%)上电泳,然后用凝胶成像系统拍照。用凝胶图像分析软件对 RT-PCR 条带进行光密度扫描。以 ghrelin 与 β-actin 光密度值的比值表示 ghrelin 基因 mRNA 的相对表达量。

1.4 荧光实时定量检测饥饿状态下 ghrelin 基因的表达调控

1) 标准质粒制备及标准曲线的绘制。设计并验证实时定量引物 ghrelin-R1,ghrelin-F1 和 β-actin-R1,β-actin-F1 分别扩增 ghrelin 基因和 β-actin 基因的片段,反应程序为 94 °C 预变性 3 min;40 个循环:94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s;最后 72 °C 延伸 4 min。上述 PCR 产物分别经胶回收,连接到 pMD19-T 载体上,转化、增殖。按照 Plasmid Miniprep Kit (AXYGEN) 试剂盒操作说明提取质粒 DNA,应用生物分光光度计定量质粒的浓度,分别取 0.01 mol 的质粒作为标准品质粒,用灭菌双蒸水将标准品质粒按 10 倍的梯度稀释至 10⁻⁹ mol 后 -20 °C 保存备用,作为 mRNA 定量的标准品,以此绘制标准曲线。

表 1 荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因克隆和定量检测使用的引物序列

Table 1 Primers used for cloning and assay of ghrelin gene

引物 Primer	用途 Usage	引物序列 Primer sequence
ghrelin-F	cDNA 扩增 To amplify the cDNA sequence	5'-TCAGAATCAGATGAAAAGCA-3'
ghrelin-R	cDNA 扩增 To amplify the cDNA sequence	5'-GTTGATTGATGCTTATTGT-3'
RT-F	半定量 RT-PCR Semi-quality RT-PCR	5'-CATAATCTGAAGCGGCTG-3'
RT-R	半定量 RT-PCR Semi-quality RT-PCR	5'-CAAAGTGAAGTCTCCAGAATC-3'
β-actin-F	半定量 RT-PCR Semi-quality RT-PCR	5'-ATGGTGTGACCCACACAGTGCC-3'
β-actin-R	半定量 RT-PCR Semi-quality RT-PCR	5'-TACAGGTCCTTACGGATGTCGA-3'
ghrelin-R1	实时定量 PCR Real-time PCR	5'-GTGAAGTCTCCAGAATCGGTC-3'
ghrelin-F1	实时定量 PCR Real-time PCR	5'-GTAGTCCGCCAAGTCTTCTGCTC-3'
β-actin-R1	实时定量 PCR Real-time PCR	5'-TGTGGTGTGTGGTTGTTTTG-3'
β-actin-F1	实时定量 PCR Real-time PCR	5'-CAGCAAGCAGGAGTACGATGAG-3'

2) 饥饿状态下 ghrelin 基因表达的定量分析。用高纯总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,每尾鱼分别取 1 μg 总 RNA 用 DNase(Promega)处理后反转录成 cDNA,取 1 μL cDNA 作为荧光定量 PCR 的模板。PCR 反应条件参考 SYBR Green PCR (TOYOBO) 试剂盒推荐的方法:反应体系为 20 μL,SYBR Green PCR Master Mix 10 μL,上下游引

物各 0.4 μL (10 μmol/L),1 μL cDNA,8.2 μL 灭菌双蒸水。反应参数为:95 °C 1 min,然后进入循环(95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s),共 40 个循环,72 °C 延伸处采集荧光信号。反应结束后根据熔解曲线分析产物特异性。ghrelin mRNA 相对表达量用 ghrelin 基因的吸光值/β-actin 基因的吸光值表示。每个 cDNA 样品做 3 个平行扩增,取

其平均值作为最终相对表达量。定量 PCR 所用的 PCR 仪为 ABI7300 型定量 PCR 仪。

2 结果与分析

2.1 荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因 cDNA 的克隆及序列分析

PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳检测,将目的片段回收,克隆到 T-载体,进行测序分析,得到总长度为 833 bp 的 ghrelin cDNA 序列,开放阅读框(ORF)为 324 bp, polyA 加尾信号 AATAAA 位于 816~821 bp 处。荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因编码 107 个氨基酸的前体蛋白,其中包括 22 个氨基酸的成熟肽(GSSFLSPSQKPQNKVKSSRIGR,如图 1)。该鱼成熟肽 N-末端第 3 位氨基酸为丝氨酸,和其他已知脊椎动物该基因位点上的氨基酸类别相同。已登录的 ghrelin 基因成熟肽 N-末端 4 个氨基

酸残基序列除蛙和金鱼外,其他脊椎动物的氨基酸均为 GSSF(图 1)。荷那龙罗非鱼 ghrelin 编码区推测氨基酸序列的成熟肽序列与已知鱼类相应序列具有很高的同源性。如与莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼 ghrelin 基因的同源性均达到 100%,与欧洲黑鲈(*Dicentrarchus labrax*)的同源性为 81.8%,与黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*)的同源性为 86.4%;与虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) ghrelin-1、ghrelin-2 的同源性分别为 69.2%、73.9%;与鲢(*Ictalurus punctatus*)、金鱼(*Carassius auratus*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)的同源性分别为 64%、55%、72%。与蛙类(*Rana esculenta*)、鸡(*Gallus gallus*)以及哺乳类的鼠(*Rattus norvegicus*)、人(*Homo sapiens*)的同源性较低,分别为 41%、52%、47%、47%。ghrelin 基因氨基酸序列构建的系统进化树与传统的分类地位相吻合(图 2)。

荷那龙罗非鱼(<i>O. hornorum</i> , EF371464)	(27)	GSSFLSPSQKP—QNKV—KSSRIGR
莫桑比克罗非鱼(<i>O. mossambicus</i> , AB077764)	(27)	GSSFLSPSQKP—QNKV—KSSRIGR
尼罗罗非鱼(<i>O. niloticus</i> , AB104859)	(27)	GSSFLSPSQKP—QNKV—KSSRIGR
黑鲈(<i>D. labrax</i> , DQ665912)	(27)	GSSFLSPSQKP—QSRG—KSSRVGR
黑鲷(<i>A. schlegelii</i> , AY643808)	(27)	GSSFLSPSQKP—QNRG—KSSRVGR
鳗鲡(<i>A. japonica</i> , AB062427)	(27)	GSSFLSPSQR—QGKDK—KPPRVGR
鲢鱼(<i>I. punctatus</i> , AB196449)	(27)	GSSFLSPTQKP—QNRGDRKPPRVGR
金鱼(<i>C. auratus</i> , AF454389)	(27)	GTSFLSPAQKP—QGR—RPPRMGR
虹鳟(<i>O. mykiss</i> , AB096919)	(27)	GSSFLSPSQKPQVRQKG—KPPRVGR
蛙(<i>R. esculenta</i> , AM055941)	(28)	GTSFLSPTQKP—QGR—RPPRVGR
鸡(<i>G. gallus</i> , AB158617)	(24)	GSSFLSPTYKNIQQKDRKPTARLHRR
小鼠(<i>M. musculus</i> , AB060078)	(24)	GSSFLSPEHQKAQQRKESKPPAKLQPR
大鼠(<i>R. norvegicus</i> , AB029433)	(24)	GSSFLSPEHQKAQQRKESKPPAKLQPR
人(<i>H. sapiens</i> , AB029434)	(24)	GSSFLSPEHQVRVQQRKESKPPAKLQPR

图 1 荷那龙罗非鱼与其他脊椎动物的 ghrelin 基因成熟肽氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparisons of amino acid sequence of mature ghrelin among Zanzibar tilapia and other vertebrates

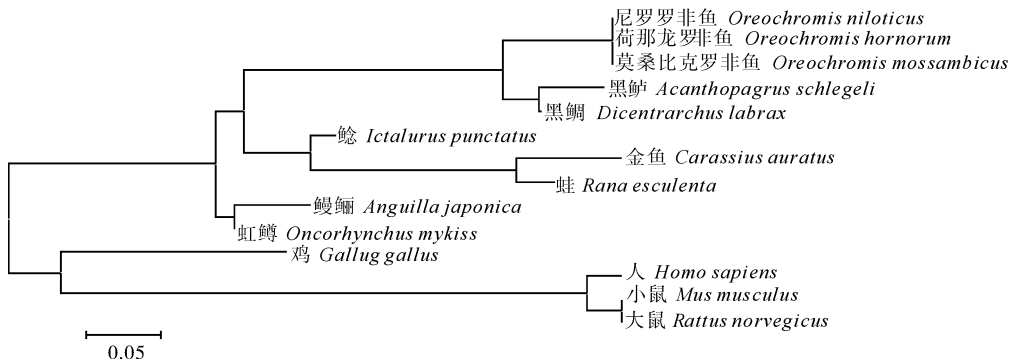


图 2 荷那龙罗非鱼和其他物种 ghrelin 前体蛋白序列的系统进化树

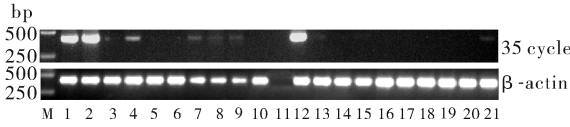
Fig. 2 The phylogenetic tree based on the amino acid sequences of ghrelin precursor of Zanzibar tilapia and other species

2.2 荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因的组织表达

采用 RT-PCR 方法,分别检测了 ghrelin 基因

在雌雄个体不同组织中的表达情况,包括胃、肌肉、垂体、鳃、心脏、肝、脾、肾、肠、性腺等,同时以 β -ac-

tin 的表达量作为内参照(图 3)。结果表明:雌鱼的胃和肌肉组织中 ghrelin 基因表达量高,鳃、垂体、脾、卵巢、肠组织中有较弱的表达;雄鱼只有胃中检测到 ghrelin 基因的高表达,肌肉和肾中检测到微弱的表达信号,而其他被检测组织未检测出 ghrelin 基因的表达。



M: DNA marker; 1~10 为雌鱼组织,依次为:胃、肌肉、垂体、鳃、心脏、肝、脾、卵巢、肠、肾;11 为空白;12~21 为雄鱼组织,组织顺序同雌鱼。Lane 1-10: stomach, muscle, pituitary, gill, heart, liver, spleen, ovary, intestines, kidney for female; Lane 11 was blank; Lane 12-21 were tissues for male in the same order.

图 3 RT-PCR 分析荷那龙罗非鱼 ghrelin mRNA 的组织表达

Fig. 3 Analysis of ghrelin mRNA expression in tissues of Zanzibar tilapia by RT-PCR

2.3 定量 PCR 分析饥饿对荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因表达的影响

根据 β -actin 和 ghrelin 质粒 DNA 定量结果,梯度稀释后 PCR 所得扩增曲线为典型的倒 S 形曲线,且模板浓度越高,其循环阈值(Ct)越小,且 5 个样本基本处于一条直线,标准曲线的直线回归相关系数 R_g 为 0.997, R_β 为 0.997,斜率分别为 -3.11 和 -3.29,说明荧光定量 PCR 的质量控制较好,检测结果可信^[11]。

饥饿实验的分析结果显示饥饿组鱼胃中 ghrelin 基因的相对表达量均高于对照组(ghrelin mRNA 相对表达量 = ghrelin 的表达量(X_g)/ β -actin 的表达量(X_β)),同时饥饿组个体中 ghrelin 基因表达量最高的个体的表达量比对照组中表达量最低的个体增加了 47.3 倍(图 4)。

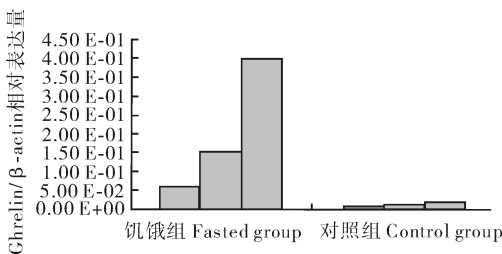


图 4 饥饿对荷那龙罗非鱼胃中 ghrelin mRNA 表达量的影响

Fig. 4 Effect of fasting on expression of ghrelin mRNA in Zanzibar tilapia stomach

3 讨论

本试验克隆的荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因的 cDNA 全序列具有和其他物种 ghrelin 基因相似的结构特征,如具有 ghrelin 保守的活性中心序列 GSSF、成熟肽的 C-末端变异较大而 N-末端则比较保守等。对哺乳动物的研究显示,ghrelin 的 N-末端的前 7 位氨基酸非常保守,最前端的 4 个氨基酸 GSSF 是 ghrelin 的活性中心,其中位于第 3 位的丝氨酸残基具有对 ghrelin 与其受体结合起重要作用的酰化基团^[12-13]。迄今发现金鱼、虹鳟和鲟都具有 2 种 ghrelin 前体^[4,6,8],但尼罗罗非鱼中只发现了 1 种,因为在尼罗罗非鱼的 ghrelin 前体中只发现了 1 个分裂位点^[10]。荷那龙罗非鱼 ghrelin 前体的第 26 位氨基酸处存在 1 个潜在的酶切位点,推测也只具有 1 种前体。

本研究在荷那龙罗非鱼雌雄个体的胃中均检测到 ghrelin 高表达,这和其他鱼类如鳊^[5]、虹鳟^[6]、黑鲷^[7]、鲟^[8]、莫桑比克罗非鱼^[9]、尼罗罗非鱼^[10]、花鲈(山川棘花鲈)^[14]中观察到的结果一致。胃以外的组织中,本研究检测到雌性个体肌肉组织中 ghrelin mRNA 高表达,鳃、垂体、脾、卵巢、肠中微弱表达,而雄性个体肌肉、肾中有微弱表达,其他组织未检测到表达信号。胃以外的组织中可检测到 ghrelin 的表达,说明其他组织也可以分泌 ghrelin^[15-16]。ghrelin、生长激素释放激素(GHRH)和生长抑素(SS)共同参与调节 GH 的分泌。ghrelin 在垂体中的表达与其促进垂体 GH 的分泌作用有关,ghrelin 可促进体外培养垂体细胞释放 GH。ghrelin 在荷那龙罗非鱼鳃中有微弱表达,这与在莫桑比克罗非鱼观察到的结果一致,ghrelin 有可能参与渗透压调节^[9]。荷那龙罗非鱼 ghrelin 基因的表达存在明显的性别差异,差异最显著的为肌肉组织,雌鱼肌肉中 ghrelin 的表达量是雄鱼的 132 倍。雌雄个体中这种肌肉表达的差异在其他物种中未见报道。ghrelin 在肌肉组织中的生理功能尚未清楚,荷那龙罗非鱼雌雄鱼肌肉组织中表达量差异是否是导致雌雄个体生长差异需进一步的研究。

ghrelin 基因主要由胃分泌,其他组织的表达量比胃中的表达量低,调控表达研究表明:ghrelin 可以调节鱼类的摄食^[15,17]。本研究中饥饿调控后荷那龙罗非鱼胃中 ghrelin 基因表达量增加,这一结果

与在花鲈中的研究结果相一致^[14]。饥饿引起胃中 ghrelin 的类似变化在鼠、鸟类、两栖类均有发现^[18-20]。Richards 等^[21]发现饥饿后火鸡胃中 ghrelin mRNA 表达量增加,但血浆中 ghrelin 并无变化。Kim 等^[18]发现饥饿的大鼠胃中 ghrelin 上升,饥饿后再进食,ghrelin 表达量则下降;营养状态对胃中 ghrelin 的表达起负调控作用。这些研究结果表明,禁食可刺激 ghrelin 合成,促进胃内分泌细胞分泌 ghrelin^[22]。在啮齿类动物中,机体主要通过 ghrelin 和 leptin 分别传递外周饥饿和饱食信号,在下丘脑能量平衡中枢进行整合,通过各种途径对食欲进行调节,从而维持机体的能量稳态^[23]。鱼类胃中 ghrelin 是直接促进摄食行为还是通过促使垂体 GH 及下丘脑其他因子的释放间接促进摄食行为的机制还需进一步的研究。

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: 656-660.
- [2] KAIYA H, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue [J]. *Biol Chem*, 2001, 276: 40441-40448.
- [3] KAIYA H, KOJIMA M. Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity [J]. *Endocrinol*, 2002, 143: 3454-3463.
- [4] 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]. *Endocrinol*, 2002, 143: 4143-4146.
- [5] KAIYA H, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Amidated fish ghrelin purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity [J]. *Endocrinol*, 2003, 176: 415-423.
- [6] KAIYA H, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout [J]. *Endocrinol*, 2003, 144: 5215-5226.
- [7] YEUNG C M, CHAN C B. Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies [J]. *Endocrinol*, 2006, 189: 365-379.
- [8] KAIYA H, SMALL B C, BILODEAU A L, et al. Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *General and Comp Endocrinol*, 2005, 143: 201-210.
- [9] 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*, 2003, 135: 421-429.
- [10] PARHAR I S, SATO H, SAKUMA Y. Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development [J]. *Biochem Biophys Research Communications*, 2003, 305: 169-175.
- [11] 李惠芳, 吕建强, 岳志芹, 等. 虹彩病毒蛙病毒属病毒实时荧光 PCR 检测方法的建立 [J]. *华中农业大学学报*, 2008, 27(2): 172-176.
- [12] MUCCIOLI G, PAPOTTI M, LOCATELLI V, et al. Binding of 125 I- labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland [J]. *J Endocrinol Invest*, 2001, 24: 7-9.
- [13] BEDNAREK M A, FEIGHNER S D, PONG S S, et al. Structure-function studies on the new growth hormone releasing peptide, ghrelin; minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 4370-4376.
- [14] TEROVA G, RIMODI S, BERNARDINI G, et al. Sea bass ghrelin: molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(2): 341-351.
- [15] HOSODA H, KOJIMA M, MATSUO H, et al. Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 909-913.
- [16] KORBONITS M, BUSTIN S A, KOJIMA M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 881-887.
- [17] 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, 19: 100-108.
- [18] KIM S M, YOON C Y, PARK K H, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status [J]. *Neuroendocrinology*, 2003, 14: 1317-1320.
- [19] SHOUSA S, NAKAHARA K, KOJIMA M, et al. Different effects of peripheral and central ghrelin on regulation of food intake in the Japanese quail [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 141: 178-183.
- [20] KAIYA H, SAKATA I, YAMAMOTO K, et al. Identification of immunoreactive plasma and stomach ghrelin, and expression of stomach ghrelin mRNA in the bull frog *Rana catesbeiana* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 148: 236-244.
- [21] RICHARDS M P, POCH S M, MCMURTRY J P. Characterization of turkey and chicken ghrelin gene and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145: 298-310.
- [22] TOSHINAI K, MONDAL M S, NAKAZATO M, et al. Upreg-

ulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 281:1220-1225.

[23] KOJIMA M, KANGAWA K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract[J]. Curr Opin Pharmacol, 2002, 2:665-668.

cDNA Cloning and Expression Characterization of Ghrelin of Zanzibar tilapia, *Oreochromis hornorum*

GAO Feng-ying¹ WANG Huan^{1,2} LU Mai-xin¹

YE Xing¹ HUANG Zhang-han¹ ZHU Hua-ping¹ YANG Li-ping¹

1. Pearl River Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380, China;

2. Fishery College of Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China

Abstract Ghrelin precursor cDNA was identified from the stomach of Zanzibar tilapia, *Oreochromis hornorum* by RT-PCR. The total sequence of ghrelin was 833 bp in length, consisting of 97 bp of 5'-untranslated region (UTR), 412 bp of 3'-UTR and 324 bp open reading frame (ORF) encoding 107- amino-acids prepro-ghrelin. The nucleotide sequence identities among Zanzibar tilapia and other tilapia are above 99.0%. The expression of ghrelin genes in stomach, muscle and pituitary and some other tissues in male and female Zanzibar tilapia were detected by RT-PCR. The results showed that ghrelin was widely distributed in Zanzibar tilapia tissues. High expression levels were detected in stomachs of both female and male individuals, but there were different expression levels in other tissues detected between females and males. The expression level of ghrelin in female muscle was 132 times higher than in male's. The effect of fast on ghrelin expression in Zanzibar tilapia was also investigated using relative RT-PCR. The results indicated that the expression level of ghrelin in stomach increased in the fasting individual much more than in the normal feeding individual. The highest ghrelin expression level in fasting individual was 47.3 times than the lowest in normal ones.

Key words *Oreochromis hornorum*; ghrelin; cDNA cloning; tissue expression; fasting regulation

(责任编辑:边书京)