

南方鲇 CART 基因 cDNA 克隆分析及组织分布^{*}

彭焕文, 杨 雁, 尹传龙, 李艳利, 张昊星

(西南大学 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要:采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆得到南方鲇(*Silurus meridionalis*)的 CART 基因的全长 cDNA 序列,全长 688 bp,其中 5'非翻译区长 109 bp,ORF 长 357 bp,3'非翻译区 222 bp,编码 118 个氨基酸。与其他脊椎动物的 CART 蛋白氨基酸序列比对发现,南方鲇 CART 与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)CART、金鱼(*Carassius auratus*)CART1、金鱼 CART2、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)CART1、鲤鱼 CART2 和人(*Homo sapiens*) CART 同源性分别达到 95.8%、72.0%、75.0%、72.9%、75.0%和 52.5%,表现出较高的保守性。进化树结果显示,南方鲇的 CART 与斑点叉尾鲷聚为一支,与基于形态学的鱼类系统发育结论相吻合。组织分布分析表明南方鲇 CART 基因 mRNA 主要在脑中表达,与之功能相吻合。研究结果为该种鱼摄食调控机制的研究提供了新的基础资料。

关键词:南方鲇;CART 基因;克隆;分析;mRNA;组织分布

中图分类号:Q959.4;Q785

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2013)03-0021-07

可卡因-苯丙胺调节转录肽(Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, CART)于 1981 年发现自羊(*Ovis aries*)的下丘脑,并测得了部分序列^[1],但当时该肽的功能未知。Douglass 等人^[2]发现大鼠(*Rattus norvegicus*)经过注射可卡因和苯丙胺后,下丘脑纹状体的 CART 基因 mRNA 水平增高,且其部分序列可编码前述羊下丘脑中的未知肽^[1]。此后,对啮齿目动物(Glires)和人类(*Homo sapiens*)的研究发现,至少存在 6 种 CART 蛋白或多肽^[3-4]。近年来研究者成功克隆了多种动物的 CART 基因序列,如青鳉(*Oryzias latipes*)^[5]、金鱼(*Carassius auratus*)^[6]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[7]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[8]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[9]、比目鱼(*Pleuronectes americanus*)^[10]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[11]等。研究表明,CART 蛋白参与动物的多种生理过程,如摄食、奖赏和强化、感觉处理、内分泌调节和精神焦虑行为^[12-15]以及刺激能量消耗和调节下丘脑垂体轴^[16]等。在鱼类中,金鱼在摄食后脑中 CART 基因 mRNA 水平升高,食物缺乏时脑中 CART 基因 mRNA 的水平降低^[6,17];斑点叉尾鲷脑中的 CART 基因 mRNA 水平也随摄食状况而改变,禁食可以降低斑点叉尾鲷 CART 基因 mRNA 水平^[11],对青鳉、大西洋鳕、鲤鱼等研究也有类似发现,提示鱼类的 CART 蛋白可

能起调节摄食作用,这还需要在更多物种中研究确定^[5-8,11,17]。

南方鲇属于鲇形目(Siluriformes)鲇科(Siluridae)鲇属(*Silurus*),广泛分布于长江流域及其以南地区^[18],属于肉食性鱼类,是重要水产养殖对象。该鱼生活习性特殊、摄食量大、生长速度快、耐饥饿^[19-21],摄食行为生理特征有典型代表意义。南方鲇特殊动力作用(SDA)总耗能大和摄食代谢峰值高,饥饿后摄食代谢相关系数和消化系统组织结构有明显变化^[22-25],但它的摄食调控相关分子机制尚不清楚。本研究克隆了南方鲇 CART 基因 cDNA 序列,并对该序列进行生物信息学分析,以便为今后研究该种鱼的摄食调控分子机制提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

材料:实验鱼为本实验室人工繁殖的雌性南方鲇幼鱼,体质量(100±5)g,经过 14 d 驯化后进行组织表达样品(脑、肝脏、肾脏、心脏、胃、肠和鳃)的采集,样本量 $n=3$ 。驯化期间采用曝气 24 h 以上的自来水,水温(27±1)℃,水体溶氧量大于每升 6 mg,光周期为 12 h 光照:12 h 黑暗,每天于 18:00 时进行饱足投喂。

试剂:RNAiso Plus, TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)

^{*} 收稿日期:2012-12-04 修回日期:2012-12-26 网络出版时间:2013-05-20 18:04

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB1098);国家重点基础研究发展计划资助(No. 2010CB134405);重庆市科委重点实验室专项经费资助(2012)

作者简介:彭焕文,男,硕士研究生,研究方向为遗传工程,E-mail: huanwenpeng@163.com;通讯作者:张昊星,E-mail: haoxingzhang@gmail.com

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130520.1804.201303.21_028.html

Ver. 3.0, TaKaRa LA Taq[®], DNA Marker DL-2000, 氨苄青霉素, pMD[®] 19-T Vector, PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) (宝生生物大连有限公司); 胶回收试剂盒, 小量质粒抽提试剂盒 (北京天根生物公司); BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH Laboratories Inc); 大肠杆菌为本实验室保存, 引物合成和测序由华大基因完成。

1.2 RNA 提取及逆转录

RNA 的提取按照 TaKaRa RNAiso Plus 操作指南进行, 测定 OD_{260/280} 及浓度, 以确保 RNA 质量。反转录参照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 和 BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 操作说明进行。

1.3 南方鲇 CART 基因 cDNA 核心片段克隆

利用斑马鱼 (*Danio rerio*, Genbank 登录号 NP_001017570)、斑点叉尾鲷^[12]、金鱼 (Genbank 登录号 AF288810、AF288811)、鲤鱼 (Genbank 登录号 FR726951、FR726952) 和比目鱼 (Genbank 登录号 FJ379291) 的 CART mRNA 序列进行比对; 选取保守区域设计核心引物 F1 和 R1, 以南方鲇脑组织 cDNA 为模板进行梯度 PCR, 退火温度为 46~60 ℃, PCR 产物经回收、连接、转化和检测后测序。

1.4 南方鲇 CART 基因 cDNA 5 端和 3 端克隆

根据核心片段序列设计 5'RACE 引物 R2、R3 和 3'RACE 引物 F2、F3 (表 1), 外侧扩增模板分别是采用 BD SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 和 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 试剂盒反转的 cDNA, 内侧扩增模板为外侧扩增的 PCR 产物。5'RACE 配对引物为 R2 与 UPM 和 R3 与 NUP, 3'RACE 配对引物为 F2 与 M13M4 和 F3 与 M13M4 (表 1)。5'RACE 和 3'RACE 退火温度分别为 68 ℃ 和 56 ℃。PCR 产物经回收、连接、转化和检测后测序。

1.5 全长序列扩增

拼接得到 CART 基因 cDNA 电子全长序列, 并设计全长序列引物 F4 和 R4 (表 1), 以脑组织 cDNA 为模板进行 PCR, 退火温度为 52 ℃, PCR 产物经回收、连接、转化和检测后测序。

1.6 生物信息学分析

通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行核酸和蛋白序列相似性检索; 采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=/NPSA/npsasopma.html) 和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分别分析 CART 一级结构、二级结构和高级结构; 采用 Vector NTI 进行同源性分析; 采用 Clustal W 和 MEGA5.1 进行多重比对和构建进化树;

表 1 CART 基因引物
Tab. 1 Primer of CART gene

名称	序列(5'-3')
F1	CCTTGGGARAAGAARTTTGG
R1	CCNCGNGGACAGTCGCACAT
F2	CCTCGGGGACAGTCGCACATTTTTC
F3	GCCTTTACGGATTGCGCACTGCTCTCC
R2	TGGGAGAAGAAGTTTGGGCAGGTT
R3	CCTATGTGCGACGTGGGAGAGC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGT
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
M13M4	GTTTTCCTCCAGTCACGAC
F4	GATCCTGAGCGCGGTGTTTG
R4	CATCTCTTCAGCGTGTCTCTGC
F5	GCCCGTTTCGATCAGCACCATG
R5	TCCACTTCGGTGTCCTCGTTGTC
F6	GATACGCTCATTCCGATTACAG
R6	GAGAAACGGCTACCACATCC

采用 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽。

1.7 南方鲇 CART 基因 mRNA 的组织表达分布

mRNA 表达的研究采用 QPCR, RNA 提取和质量及浓度的测定同 1.1, 反转录按照 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 的操作说明完成。RNA 含量定为 800 ng, QPCR 过程按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 的操作说明进行, 目的基因引物为 F5 和 R5, 内参引物为 F6 和 R6 (表 1), 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行相对定量分析, 采用 SPSS17.0 进行统计分析, 显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果

2.1 南方鲇 CART 基因 cDNA 全长序列

克隆得到南方鲇目的 CART 基因 cDNA 核心片段 (图 1A), 长为 104 bp, 于 NCBI BLAST 分析后发现它与金鱼、斑马鱼和鲤鱼的 CART2 基因 cDNA 的同源性达 83% 以上, 由此初步估计它为南方鲇的 CART 基因 cDNA 序列。

采用 5'RACE 和 3'RACE 引物分别扩增得到 5' 端序列长为 394 bp (图 1B) 和 3' 端序列长为 336 bp (图 1C), 拼接后得到南方鲇 CART 基因电子全长序列, 利用全长引物扩增得到 CART 基因 cDNA 全长序列 (图 1D)。NCBI BLAST 比对的结果显示, 它与斑马鱼、鲤鱼和金鱼 CART2 基因 cDNA 同源性分别为 82%、82% 和 77%。表明此序列是南方鲇 CART 基因 cD-

NA 序列。
该序列全长 688 bp(GenBank 登录号 JX478225), 包含 357 bp 的开放阅读框(ORF)、109 bp 的 5'端非

翻译区(5-UTR)和 222 bp 的 3'端非翻译区(3-UTR),ORF 编码 118 个氨基酸,其中信号肽为 25 个氨基酸(图 2)。

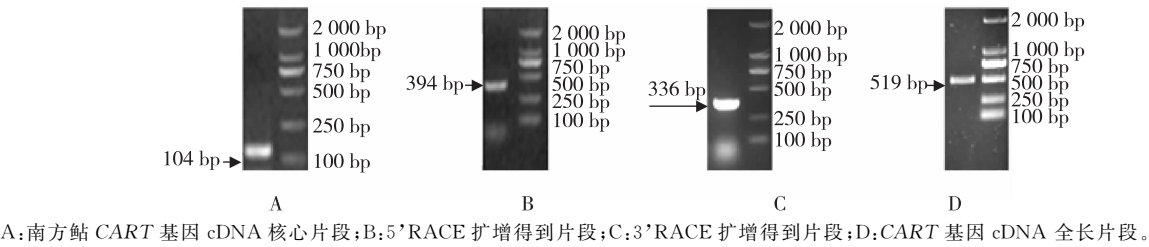


图 1 CART 基因 cDNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of the fragment of CART gene cDNA

```
acgcgggggaatccgaggcgcgcaataaaaagcccgctgcgacacctgagcgcggtgtttggagagtcgcgcgcgccttc 79
gtgcacaaaaagcccgctttcgatcagcacc ATG GAG AGC TCG AGT ATC GCC GCG CGC GCT CTG CTG 145
                                     M E S S S I A A R A L L 12
CTC CTG CTC GTA TTA ATG CTG CGG AGT TGT GCG CGA GGA GAC AAC GAG GAC ACC GAA GTG 205
L L L V L M L R S C A R G D N E D T E V 32
GAC TTG GAT ACA AGA GCC ATC CGA GAC TTC TAT CCG AAA GAC CCC AAT CTG ACC AGC GAA 265
D L D T R A I R D F Y P K D P N L T S E 52
AAA CAG CTG CTT GGC GCT TTG CAT GAT GTT CTG GAA AAG CTT CAG ATG AAA AGA ATT CCT 325
K Q L L G A L H D V L E K L Q M K R I P 72
CCT TGG GAG AAG AAA TTT GGG CAG GTT CCT ATG TGC GAC GTG GGA GAG CAG TGC GCA ATC 385
P W E K K F G Q V P M C D V G E Q C A I 92
CGT AAA GGC TCC AGA ATT GGA AAA ATG TGC GAC TGC CCA CGA GGA GCC TTC TGC AAC TTT 445
R K G S R I G K M C D C P R G A F C N F 112
TTC CTT CTG AAA TGT CTG TGA ggaggaaggcaacttctttagcgggtcaaattgatgtattcaatttattt 517
F L L K C L * 118
gtatagatatattttttaagtgcagaacacgctgaagagatgtgtgtgtgagtctacagtctgttcatctgttcatgc 596
atgcacgcctataataatgtcatgaatatgtaacatgtctgttattgtgtattaaagtgcacgtacattttttgttaa 675
aaaaaaaaaaaaa 688
```

注: * 表示终止密码子,小写字母表示非翻译区(UTR),每行后面的数字表示核苷酸或氨基酸数目。

图 2 CART 基因 cDNA 全长序列及编码氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide acid sequence of CART gene cDNA and its deduced amino acid sequence

2.2 南方鲇 CART 蛋白结构分析

利用 ProtParam 预测南方鲇 CART 蛋白的一级结构,结果显示 CART 蛋白的总原子数为 1 881 个,分子式为 C₅₈₃H₉₅₄N₁₆₄O₁₆₈S₁₂,分子量为 13.33 kD,等电点为 8.18,平均亲水性为-0.147(表 2);该蛋白由 20 种氨基酸组成,其中亮氨酸含量最高,占 14.41%,组氨酸、色氨酸和酪氨酸含量最低,各占 0.85%(表 3)。

表 2 CART 基因 cDNA 编码氨基酸一级结构分析

Tab. 2 Primary structure analysis of CART gene cDNA

一级结构特征	结果
氨基酸数目/个	118
分子量/kD	13.33
等电点 PI	8.18
负电荷数(Asp+Glu)	16
正电荷数(Arg+Lys)	18
不稳定系数(II)	39.1
脂肪系数(AI)	91.78
平均亲水性	-0.147

表 3 CART 基因 cDNA 所编码蛋白质的氨基酸组成

Tab. 3 Amino acid composition of CART gene cDNA encoding protein

氨基酸组成	数目	占比/%	氨基酸组成	数目	占比/%
Leu(L)	17	14.41	Phe(F)	5	4.24
Asp(D)	9	7.63	Ile(I)	5	4.24
Lys(K)	9	7.63	Met(M)	5	4.24
Arg(R)	9	7.63	Val(V)	5	4.24
Aln(A)	8	6.78	Gln(Q)	4	3.39
Cys(C)	7	5.93	Asn(N)	3	2.54
Glu(E)	7	5.93	Thr(T)	3	2.54
Gly(G)	7	5.93	His(H)	1	0.85
Pro(P)	6	5.08	Trp(W)	1	0.85
Ser(S)	6	5.08	Tyr(Y)	1	0.85

利用 SOPMA 分析了 CART 蛋白的二级结构,结果显示其由 44.07%的 α-螺旋、44.07%的无规卷曲、3.39%的 β-折叠和 8.47%的延伸链组成(表 4)。采用 SWISS-MODEL 在线同源建模方法预测三级结构(封三彩图 3),发现其与斑点叉尾鲷和人类的 CART 蛋白结构相似。

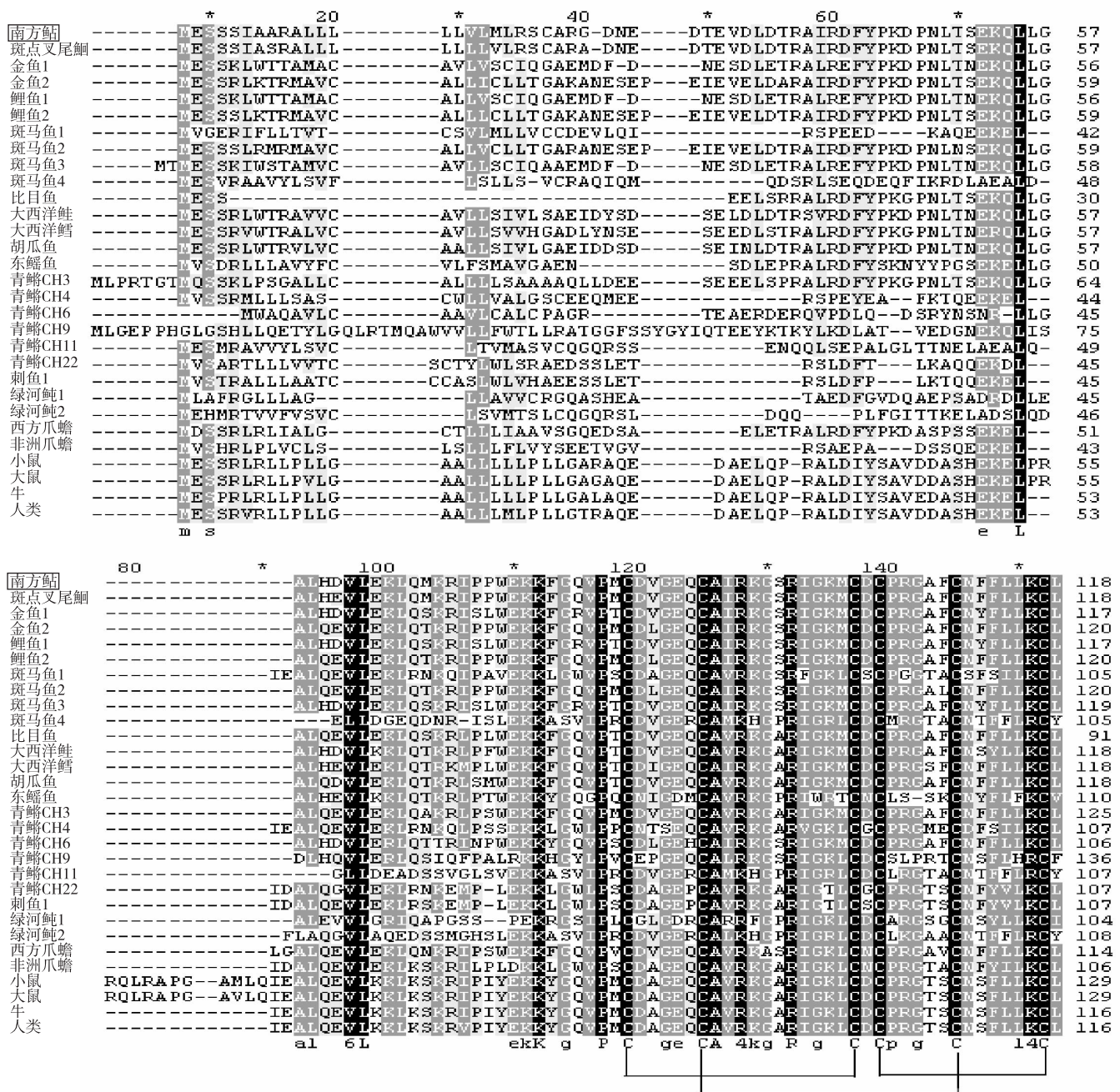
表 4 CART 蛋白二级结构的预测

Tab. 4 Predicted secondary structure of CART protein

结构	占比/%
α -螺旋	44.07
β -折叠	3.39
无规卷曲	44.07
延伸链	8.47

采用 Clustal W 对各物种的 CART 蛋白序列进行比对(图 4), 并采用 Vector NTI 进行同源性分析, 结果显示南方鲇 CART 蛋白与斑点叉尾鲷、金鱼

CART1、金鱼 CART2、鲤鱼 CART1、鲤鱼 CART2、大西洋鲑、比目鱼、大西洋鲑、东鲱鱼 (*Leucoraja ocellata*) 和人类的 CART 蛋白同源性依次为 95.8%、72.0%、75.0%、72.9%、75.0%、72.0%、61.9%、69.5%、48.3% 和 52.5%, 表明其保守性较高。另外, 图 4 显示南方鲇及其他所有脊椎动物 CART 的 C 端都存在 6 个半胱氨酸残基, 并形成 3 个二硫键。利用 Clustal W 和 MEGA5.1 构建出 CART 蛋白系统进化树(图 5)。南方鲇的 CART 蛋白与斑点叉尾鲷处于聚为一支, 表明它们之间的亲缘关系较近。



注: 方框显示是本研究的目标, 大写字母表示此位点氨基酸同源性达到 100%, 小写字母表示此位点氨基酸同源性达 80% 以上, 连线表示二硫键形成位置。

图 4 CART 蛋白氨基酸序列同源比对

Fig. 4 Comparison of the amino acid sequence of CART protein

2.3 南方鲇 CART 基因 mRNA 的组织分布分析

QPCR 分析显示 CART 基因 mRNA 在脑中大量表达并显著高于鳃、肾脏、肝脏、心脏、胃及肠等其他组织($p < 0.05$),而其他组织之间差异不显著(图 6)。

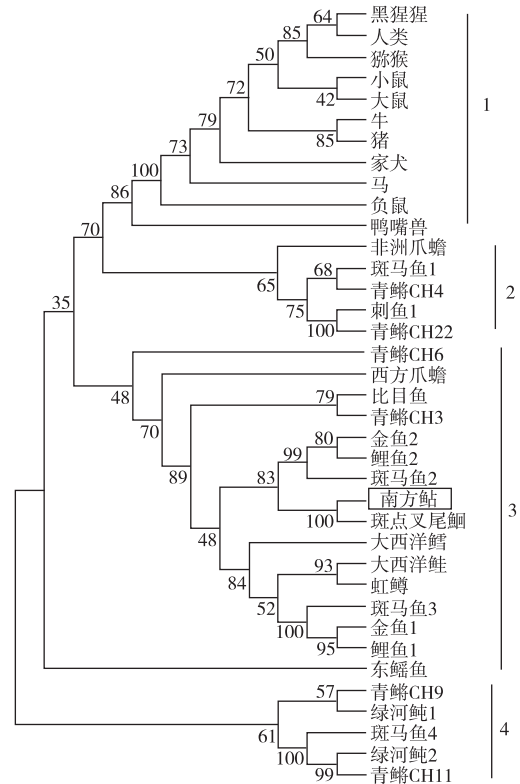
3 讨论

根据 ProtParam 算法,南方鲇 CART 的不稳定系数为 39.1,而当不稳定系数小于 40 时,预测的蛋白较稳定,反之则较差^[27];因此表明南方鲇 CART 蛋白比较稳定。南方鲇 CART 蛋白总平均亲水性为一 0.147,说明其为亲水性蛋白。

与已有研究资料比较发现,CART 蛋白 N 端序列种间差异较大,而 C 端序列的变异性较低(图 4)。本研究发现,南方鲇的 CART 蛋白与哺乳动物^[28]和其他一些鱼类^[9]相似,存在多个潜在的蛋白水解位点,如精氨酸、赖氨酸-精氨酸和赖氨酸-赖氨酸等位点。但已有研究发现潜在的蛋白水解位点可能并非真正的蛋白水解位点^[9]。因此南方鲇脑组织中 CART 蛋白水解位点还需研究确定。

采用 Vector NTI 进行同源性分析,南方鲇 CART 蛋白与人类 CART 蛋白的同源性为 52.5%,与同目的斑点叉尾鲷的同源性为 95.8%,且在高级结构上非常相似(封三彩图 3),说明 CART 蛋白在进化过程中比较保守。通过构建进化树发现,南方鲇与斑点叉尾鲷处于一个分支,表明它们之间的亲缘关系较近,这支持了基于形态学的鱼类系统发育结论,即南方鲇与斑点叉尾鲷同属鲇形目^[29]。已有研究发现,金鱼和鲤鱼中存在 2 个 CART 基因 cDNA^[6-7],青鳉中存在 6 个 CART 基因 cDNA^[5],哺乳动物中仅存在 1 个 CART 基因 cDNA。本研究中仅克隆得到南方鲇一个 CART 基因 cDNA,是否存在其他 CART 基因的 cDNA 需进一步研究确定。

CART 基因 mRNA 在南方鲇的 6 种外周组织中均表达,与比目鱼^[10]、东鲱鱼^[30]和鲤鱼^[7]研究结果一致;而大西洋鲑仅在鳃、肠、肾脏和心脏中表达^[9],大西洋鲑仅在肾脏和肠中表达^[8]。推测 CART 基因 mRNA 的组织表达分布也存在种间差异。CART 基因 mRNA 在南方鲇的脑组织中表达量最高,这与哺乳动物^[2]和其他鱼类^[6,8-10]研究结果一致。脑中 CART 基因 mRNA 高度表达与其功能相吻合:CART 蛋白为神经肽,分布于中枢神经系统和分泌器官^[16],主要在下丘脑起作用,在哺乳动物下丘脑中的主要作用是抑制摄食^[31]。但在鱼类中它的作用尚不甚清楚,仅有的研究资料表明,金鱼、青鳉 CH3、大西洋鲑、鲤鱼和斑点叉尾鲷的 CART 蛋白具有调节摄食的作用^[5-8,11,17],而比目鱼的 CART 蛋白的主要作用并非调节摄食。CART 蛋白是否参与南方鲇的摄食调控,还需更多的研究资料予以验证。



注:图中方框表示本研究的对象,竖线右边数字表示簇的编号,进化树分支上数字表示 1 000 次抽样的支持百分率。各物种 Genbank 登录号分别为:南方鲇 (AFS88931)、人类 (NP_004282)、猕猴 (*Macaca mulatta*, XP_001096906)、黑猩猩 (*Pan troglodytes*, XP_001155069)、家犬 (*Canis lupus familiaris*, XP_852772)、牛 (*Bos taurus*, NP_001007821)、马 (*Equus caballus*, XP_001504083)、猪 (*Sus scrofa*, NP_001090095)、负鼠 (*Monodelphis domestica*, XP_001362868)、鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*, XP_001512604)、小鼠 (*Mus musculus*, NP_038760)、大鼠 (NP_058806)、青鳉 CH3 (NP_001191708)、青鳉 CH4 (NP_001191709)、青鳉 CH6 (NP_001191710)、青鳉 CH9 (NP_001191724)、青鳉 CH11 (NP_001191711)、青鳉 CH22 (NP_001191712)、金鱼 1 (AAL40907)、金鱼 2 (AAL40908)、大西洋鲑 (AAZ94720)、大西洋鲑 (BAH2 4100)、鲤鱼 1 (CBX89932)、鲤鱼 2 (CBX89933)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, CA380644)、比目鱼 (ACO34688)、斑马鱼 1 (XP_691343)、斑马鱼 2 (NP_001017570)、斑马鱼 3 (XP_685429)、斑马鱼 4 (NP_001076401)、东鲱鱼 (ACO06235)、刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*, ENSGACG00000009780)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, NP_001087565)、西方爪蟾 (*Xenopus (Silurana) tropicalis*, AAI22916)、绿河鲷 1 (*Tetraodon nigroviridis*, CAG00270)、绿河鲷 2 (CR688746)、斑点叉尾鲷(暂无登录号,有关 CART 蛋白信息见文献^[11])。

图 5 CART 蛋白系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of CART protein

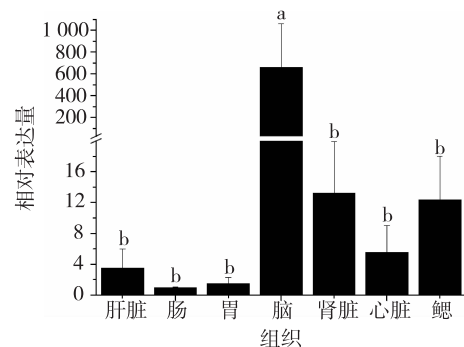


图 6 南方鲇 CART 基因 mRNA 的组织分布

Fig. 6 Tissue distribution of CART gene mRNA in southern catfish

致谢:非常感谢罗毅平老师在文章的撰写、修改和定稿过程中给予耐心的指导和帮助,同时也感谢实验室其他老师和同学在实验过程中给予的帮助。

参考文献:

- [1] Spiess J, Villarreal J, Vale W. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(7): 1982-1988.
- [2] Douglass J, Mckinzie A A, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(3 Pt 2): 2471-2481.
- [3] Kuhar M J, Yoho L L. CART peptide analysis by western blotting[J]. *Synapse*, 1999, 33(3): 163-171.
- [4] Thim L, Kristensen P, Nielsen P F, et al. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine- regulated transcript peptides in the rat[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 2722-2777.
- [5] Murashita K, Kurokawa T. Multiple cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) genes in medaka, *Oryzias latipes*; cloning, tissue distribution and effect of starvation[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 170(3): 494-500.
- [6] Volkoff H, Peter R E. Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish; molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(12): 5076-5088.
- [7] Wan Y, Zhang Y, Ji P, et al. Molecular characterization of CART, AgRP, and MC4R genes and their expression with fasting and re-feeding in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 2215-2223.
- [8] Kehoe A S, Volkoff H. Cloning and characterization of neuropeptide Y (NPY) and cocaine- and amphetamine- regulated transcript (CART) in atlantic cod (*Gadus morhua*) [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2007, 146(3): 451-461.
- [9] Murashita K, Kurokawa T, Ebbesson L O, et al. Characterization, tissue distribution, and regulation of agouti-related protein (AgRP), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) in atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2009, 162(2): 160-171.
- [10] Macdonald E, Volkoff H. Cloning, distribution and effects of season and nutritional status on the expression of neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) [J]. *Horm Behav*, 2009, 56(1): 58-65.
- [11] Kobayashi Y, Peterson B C, Waldbieser G C. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) messenger RNA level, food intake, and growth in channel catfish[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2008, 151(2): 219-225.
- [12] Elefteriou F, Ahn J D, Takeda S, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART[J]. *Nature*, 2005, 434(7032): 514-520.
- [13] Kuhar M J, Adams L D, Hunter R G, et al. CART peptides[J]. *Regul Pept*, 2000, 89(1/2/3): 1-6.
- [14] Adams L D, Gong W, Vechia S D, et al. CART: from gene to function[J]. *Brain Res*, 1999, 848(1/2): 137-140.
- [15] Kuhar M J, Adams S, Dominguez G, et al. CART peptides [J]. *Neuropeptides*, 2002, 36(1): 1-8.
- [16] Rogge G, Jones D, Hubert G W, et al. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(10): 747-758.
- [17] Volkoff H, Peter R E. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*; actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding [J]. *Brain Res*, 2000, 887(1): 125-133.
- [18] 陈湘舜. 我国鲇科鱼类总述[J]. *水生生物学集刊*, 1977, 6(2): 197-218.
Chen X L. A review of the Chinesesiluridae [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1977, 6(2): 197-218.
- [19] 张波, 谢小军. 南方鲇的饥饿代谢研究[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 31(5): 480-484.
Zhang B, Xie X J. Starvation metabolism in the southern catfish (*Silurus meridionalis*) [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1999, 31(5): 480-484.
- [20] 谢小军, 孙儒泳. 南方鲇的最大摄食率及其与体重和温度的关系[J]. *生态学报*, 1992, 12(3): 225-231.
Xie X J, Sun R Y. Maximum ration level in the southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) in relation to body weight and temperature[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1992, 12(3): 225-231.
- [21] 谢小军. 嘉陵江南方大口鲈的年龄和生长的初步研究[J]. *生态学报*, 1987, 7(4): 359-367.
Xie X J. A study on the age and growth of *Silurus soldatovi meridionalis* in the jialing river [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1987, 7(4): 359-367.
- [22] 曾令清, 张耀光. 南方鲇幼鱼消化系统生理功能与组织结构的表型适应性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
Zeng L Q, Zhang Y G. The phenotypic plasticity of function and structure of the digestive system in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen) [D].

- Chongqing: Southwest University, 2011.
- [23] 付世建, 邓利, 张文兵, 等. 南方鲇幼鱼胃和肝脏的组织结构及其在饥饿过程中的变化[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1999, 24(3): 336-342.
- Fu S J, Deng L, Zhang W B, et al. Histology of stomach and liver in *Silurus meridionalis* and their change during starvation [J]. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science, 1999, 24(3): 336-342.
- [24] Fu S J, Xie X J, Cao Z D. Effect of fasting on resting metabolic rate and postprandial metabolic response in *Silurus meridionalis* [J]. Journal of Fish Biology, 2005, 67(1): 279-285.
- [25] 付世建, 谢小军. 营养水平对南方鲇摄食代谢及能量分配的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2004.
- Fu S J, Xie X J. Effect of nutritional status on postprandial metabolic response and energy budget in the southern catfish, *Silurus meridionalis* [D]. Chongqing: Southwest University, 2004.
- [26] Douglass J, Daoud S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript [J]. Gene, 1996, 169(2): 241-245.
- [27] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the exPASy server [M]// The Proteomics Protocols Handbook. [s. l.]: Humana Press, 2005: 571-607.
- [28] Stein J, Steiner D F, Dey A. Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications [J]. Peptides, 2006, 27(8): 1919-1925.
- [29] 丁瑞华. 四川鱼类志 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994: 444-489.
- Ding R H. The fishes of sichuan, China [M]. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science and Technology, 1994: 444-489.
- [30] Macdonald E, Volkoff H. Neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and cholecystokinin (CCK) in winter skate (*Leucoraja ocellata*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression responses to fasting [J]. Gen Comp Endocrinol, 2009, 161(2): 252-261.
- [31] Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2008, 18(2): 158-168.

Animal Sciences

Cloning, Sequence Analysis and Tissue Distribution of *CART* Gene cDNA from *Silurus meridionalis*

PENG Huan-wen, YANG Yan, YIN Chuan-long, LI Yan-li, ZHANG Hao-xing

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education),
Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The full length cDNA of southern catfish CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) was cloned RNA by RT-PCR and RACE. It contains 688 nucleotides, including 5' UTR of 109 nucleotides, 3' UTR of 222 nucleotides and an open reading frame (ORF) with 357 nucleotides encoding a 118-amino acid peptide. The results showed that CART of southern catfish has 95.8%, 72.0%, 75.0%, 72.9%, 75.0% and 52.5% similarity with CART protein from channel catfish, goldfish, goldfish 2, common carp 1, common carp 2 and human, respectively. CART protein of southern catfish was clustered closely with channel catfish, in accordance with the phylogeny of fishes. The result of tissue distribution showed that CART gene mRNA was mainly expressed in the brain, in accordance with CART's function. Our results provide new basic data for feeding-control mechanism in this fish.

Key words: *Silurus meridionalis*; CART gene; cloning; analysis; mRNA; tissue distribution

(责任编辑 方 兴)