

异育银鲫 $GABA_B$ 受体 1 亚基 cDNA 部分序列的克隆及表达分析

王 祎^① 阮记明^{①②} 周爱玲^① 赵依妮^① 曹海鹏^① 胡 鲲^① 杨先乐^{①*}

① 上海海洋大学国家水生动物病原库 上海 201306; ② 江西农业大学动物科学技术学院 南昌 330045

摘要: 为了确定 γ -氨基丁酸 B 受体 (γ -aminobutyric acid B receptor, $GABA_B$ R) 基因在异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 不同组织中的表达, 本实验分别对异育银鲫不同组织中 $GABA_B R1$ 基因进行 RT-PCR 扩增, 并进行了克隆和测序, 在与 GenBank 基因库中已知 $GABA_B R1$ 序列进行同源性比对的基础上采用邻接法构建系统发育树, 并进一步分析其在异育银鲫不同组织内的表达水平。经克隆获得异育银鲫 $GABA_B R1$ 基因 CDS 区序列 383 bp, 编码 127 个氨基酸。荧光定量 PCR 结果显示, $GABA_B R1$ 基因在异育银鲫脑、肝、肾、心、肠、鳔、鳃、肌、尾鳍、脾、卵巢、精巢组织中均有表达, 且在不同组织中的表达水平由高到低依次是: 脑 > 尾鳍 > 精巢 > 心、肠、鳔 > 卵巢、脾、鳃、肌 > 肝、肾。本研究证实了 $GABA_B R1$ 基因在异育银鲫各组织中表达的广泛性, 且有明显的组织特异性。

关键词: 异育银鲫; $GABA_B R1$ 基因; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)06-905-07

Cloning and Expression of Partial cDNA Encoding $GABA_B$ Receptor Subunit 1 in *Carassius auratus gibelio*

WANG Yi^① RUAN Ji-Ming^{①②} ZHOU Ai-Ling^① ZHAO Yi-Ni^① CAO Hai-Peng^①
HU Kun^① YANG Xian-Le^{①*}

① Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② College of Animal Sciences and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

Abstract: To determine the expression of γ -aminobutyric acid B receptor ($GABA_B$ R) gene in different tissues of *Carassius auratus gibelio*, $GABA_B R1$ gene in different tissues was amplified by RT-PCR, cloned and sequenced, its phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method on the basis of homology comparison with $GABA_B R1$ amino acid sequences in the Gen Bank database, and additionally, the level of its expression in different tissues was further analyzed. The cDNA was 383 bp in length which encoded 127 amino acid residues. The real time PCR results showed that the $GABA_B R1$ gene was distributed in brain, liver, kidney, heart, intestine, muscle, bladder, gill, muscle, fin, spleen, ovary, and testis. The $GABA_B R1$ gene was expressed in different tissues, from high level to low level as follows: brain > caudal fin > testis > heart, intestine, bladder ovary, spleen, gill, muscle > liver, kidneys. The study confirmed the wide expression of

基金项目 上海海洋大学研究生科研基金项目, 国家自然科学基金项目 (No. 31172430), 科技部 863 计划项目 (No. 2011AA10A216);

* 通讯作者, E-mail: xlyang@shou.edu.cn;

第一作者介绍 王祎, 女, 硕士研究生; 研究方向: 水产动物药理学; E-mail: smallant-5@163.com.

收稿日期: 2013-01-30, 修回日期: 2013-06-13

GABA_BR1 gene in the tissues of *C. auratus gibelio*, with the highest expression in the brain tissue.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *GABA_BR1* gene; Clone; Tissue expression

γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 是一种广泛存在于动物神经系统中的抑制性神经递质, 在动物体内参与多种神经生理活动 (郭晓娜等 2003)。研究表明, GABA 传递作用由离子型通道 $GABA_A$ 受体 ($GABA_A$ receptor, $GABA_A R$) 和 $GABA_C$ 受体 ($GABA_C$ receptor, $GABA_C R$) 以及代谢型 $GABA_B$ 受体 ($GABA_B$ receptor, $GABA_B R$) 所介导 (李莹等 2009)。这些受体除了参与多种重要的生理功能如学习、记忆、疼痛等外 (Bettler et al. 2004), 还是各种有机氯类、阿维菌素类杀虫剂的作用靶标。据报道, $GABA_B R$ 介导慢速的突触抑制效应, 包括两个异源亚基 $GABA_{B1}$ 和 $GABA_{B2}$, 其中 $GABA_{B1}$ 亚基是 $GABA_B R$ 的主要部分 (Chebib et al. 1999, Marshall et al. 1999)。异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 是我国常见的一种重要的经济鱼类。然而, 作为最具有药理学意义的药物靶点之一 (Hopkins et al. 2002, 蒋明等 2011), $GABA_B R$ 在异育银鲫各组织中的分布与表达情况却是空白。鉴此, 本实验根据鲤科鱼类 *GABA_BR1* 基因设计特异性引物, 分别对异育银鲫不同组织中 *GABA_BR1* 基因进行 RT-PCR 扩增, 对 *GABA_BR1* 基因进行了克隆和测序, 在与 GenBank 基因库中已知 *GABA_BR1* 基因序列进行同源性的基础上采用邻接法构建系统发育树, 并进一步分析了其在异育银鲫不同组织内的表达水平, 以期 $GABA_B R$ 在异育银鲫各组织中的分布与表达情

况提供科学依据, 为渔药在异育银鲫体内的药物靶向及相关渔药理论研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料 异育银鲫, 健康无伤病, 平均体重 60 g ($n = 100$ 尾), 由南通某国营农场提供, 在实验室暂养 1 个月; RNA 提取试剂 (RNAiso Plus)、反转录试剂盒 (PrimeScript RT Master Mix)、荧光定量试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq)、Marker (DL 500 DNA Marker) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 其他相关试剂购自北京索来宝科技有限公司。

1.2 主要仪器 紫外分光光度计 BECKMAN DU800; PCR 仪 Eppendorf Mastercycler gradient; Real time PCR 仪为伯乐 CFX-96。

1.3 *GABA_BR1* 基因在异育银鲫不同组织中的表达分析

1.3.1 引物的设计与合成 通过对 GenBank 中登录的鱼类及哺乳动物的 *GABA_BR1* 基因序列进行同源性比较, 选择保守性高的编码区, 应用 Primer Premier 5.0 软件, 设计特异性引物 (*GABA_BR1*; F1\R1); 并根据所获得的异育银鲫 *GABA_BR1* 基因序列设计荧光定量 PCR 引物 (*GABA_BR1*; F2\R2)。管家基因 β -actin 以鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 基因序列 (GenBank 登录号: M24113.1) 为模板进行设计。引物均由上海生物工程股份有限公司合成。引物序列及目的基因长度见表 1。

表 1 *GABA_BR1* 和管家基因 β -actin 的引物序列

Table 1 Primer sequences for *GABA_BR1* and β -actin house keeping gene used in PCR

基因 Gene	序列 Primer sequence (5' - 3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	PCR 产物 PCR product (bp)
<i>GABA_BR1</i>	F1	GATCAAAGATCCAGCCATCAA	383
	R1	CATCAAACACGCATGACCAG	
<i>GABA_BR1</i>	F2	TCTCCGCAGTGATTTCTT	219
	R2	GTGCCTCCAACCTGACCT	
β -actin	F	TACGTTGCCATCCAGGCTGTG	124
	R	CATGGGGCAGGGCGTAACC	

1.3.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成 随机取异育银鲫 10 尾,分别采集其脑、肝、肾、心、肠、鳃、肌、尾鳍、脾、卵巢、精巢组织样品,液氮速冻后放入 -80°C 冰箱保存备用。按照 RNAiso Plus 试剂的使用说明书操作,分别提取鲫鱼各组织总 RNA,溶于 DEPC 水中,应用紫外可见分光光度计分别在 260 nm 和 280 nm 波长下测定吸光度(A_{260} 和 A_{280})来计算 RNA 的浓度,通过 A_{260}/A_{280} 的比值来判定 RNA 的纯度。然后将提取的各组织总 RNA,以 Oligo(dT)为反转录引物,参照 TaKaRa 公司反转录试剂盒方法进行 cDNA 的合成。反转录条件为: 37°C 15 min、 85°C 5 s;获得的 cDNA 置 -20°C 备用。

1.3.3 GABA_BR1 基因的克隆及测序分析 以 cDNA 为模板,采用 1.3.1 中的引物(GABA_BR1 F1\R1)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μl :cDNA (25 ng/ μl) 2 μl 、dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μl 、 $10\times$ buffer 5 μl 、特异上下游引物各(20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl 、Ex Taq HS (5 U/ μl) 0.25 μl 、 dH_2O 36.75 μl 。PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55.3°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72°C 延伸 5 min。扩增产物用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测后用胶回收试剂盒进行回收,然后与 pMD-18T 载体连接后转化到 DH5 α 感受态细胞,经 LB 平板(含 X-Gal、IPTG、Amp)培养后,挑取阳性克隆送上海桑尼生物科技有限公司双引物测序。将测得序列用 DNASTAR 软件编辑并推导相应氨基酸序列,在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中利用 BLASTn 软件与 GenBank 中的已知序列进行同源性比较,并利用软件 BioEdit 7.0 和 Mega 4.0 进行多重比较后通过邻接法构建系统发育树。

1.4 GABA_BR1 基因在异育银鲫不同组织中的表达分析 采用实时荧光定量 PCR 测定 GABA_BR1 基因在异育银鲫不同组织中的表达水平。其中,实时定量 PCR 反应体系为 25 μl : cDNA 2 μl (约 50 ng)、SYBR Premix Ex Taq 12.5 μl 、上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μl ,加水至总体积为 25 μl 。每个样品设 3 个重复,设

ddH_2O 作为模板的空白对照。实时定量 PCR 反应条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 56.2°C 30 s,共 40 个循环。扩增反应结束后继续从 65°C 缓慢升温至 95°C (0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$),建立 PCR 产物的熔解曲线,以鉴定产物是否单一。对每一样品的分析都重复三次。同时使用 β -actin 作为内参对照,用以校正所有样品中 RNA 的量。根据扩增曲线得到的 CT 值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),计算出目标基因 GABA_BR1 和对照基因 β -actin CT 值的差异 ΔCT ,进而以差异最大的样本作为参照样本,计算出不同样品相对于参照样本基因表达倍数 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$,从而制作出相对定量的图表。

2 实验结果

2.1 GABA_BR1 基因的克隆及序列分析 总 RNA 经提取纯化后用紫外分光光度计检测其浓度及纯度,吸光度值 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.1 之间,可以进行后续实验。取异育银鲫脑的总 RNA 经反转录后,用引物 GABA_BR1 F1\R1 扩增得到 400 bp 左右的条带(图 1),经克隆后测

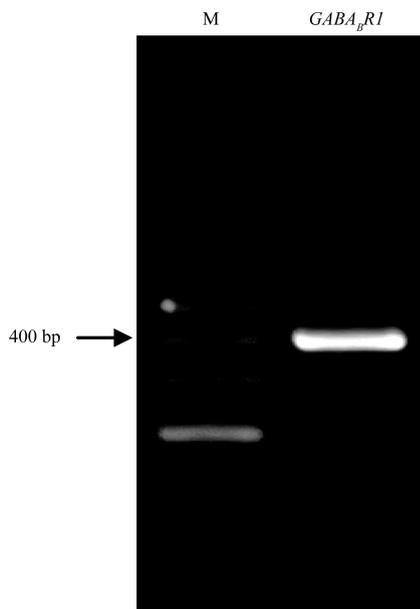


图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 The results of PCR amplification

M. DL500 DNA 分子标准量。M. DL500 DNA marker.

序得到 383 bp 的片段。将测序所得的异育银鲫 $GABA_B R1$ 基因 cDNA 序列用 DNASTAR 软件分析,推测其 cDNA 编码 127 个氨基酸,含疏水氨基酸 47 个,极性氨基酸 34 个,酸性氨基酸 17 个,碱性氨基酸 9 个(图 2)。

选取 GenBank 中已登录的一些动物的 $GABA_B R1$ 氨基酸序列:人 (*Homo sapiens*, CAQ06690.1)、牛 (*Bos taurus*, DAA16292.1)、家兔 (*Oryctolagus cuniculus*, XP_002714384.1) 小家鼠 (*Mus musculus*, AAH54735.1)、野鸽 (*Columba livia*, EMC85999.1)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, ADQ43745.1)、热带爪蟾 (*X. tropicalis*, NP_001107291.1)、金鱼 (*Carassius auratus*, AAV34286.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, CAP09588.1)、日本青鳉 (*Oryzias latipes*, XP_004078538.1)、吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, XP_003459356.1)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, XP_003965753.1)。选择与异育银鲫 $GABA_B R1$ 氨基酸序列相似的区域,使用 Dnastar 软件包中的 MegAlign 软件对 $GABA_B R1$ 氨基酸序列进行比对,结果表明异育银鲫 $GABA_B R1$ 氨基酸序列与其他鱼类的相似度较高,其中,与金鱼、斑马鱼相似度最高,分别为 96.9%、92.2%;而与鸟类、两栖类、哺乳类动物的相似度相对较低

(图 3)。

通过邻接法构建的基于异育银鲫 $GABA_B R1$ 氨基酸序列的系统发育树(图 4)进一步可以看出,异育银鲫 $GABA_B R1$ 氨基酸序列与金鱼的亲缘关系最近,在系统发育树中依次与鲤形目的斑马鱼、鲈形目的吉富罗非鱼以及颌针鱼目的日本青鳉、鲀形目的红鳍东方鲀聚为一支;哺乳类、鸟类、鱼类分别聚支,物种间亲缘关系与其传统分类地位一致。

2.2 $GABA_B R1$ 基因在异育银鲫不同组织中的表达 10 倍梯度稀释(共 5 个梯度)的脑、肝、肾、心等 12 种组织的混合 cDNA 为模板, β -actin、 $GABA_B R1$ 基因特异性引物进行实时荧光定量 PCR 反应,构建各基因的标准曲线。 β -actin 和 $GABA_B R1$ 的扩增效率 E 值分别为 101.5% 和 99.8%,相关系数 R^2 分别为 0.998 和 0.992。 $GABA_B R1$ 与内参基因标准曲线的线性关系良好,能够在所设置的实验浓度范围内进行准确的定量分析。

异育银鲫各组织中 $GABA_B R1$ mRNA 的相对表达量见图 5。 $GABA_B R1$ 在所检组织中均有较广泛的表达,但其在各组织中的表达水平存在明显差异:在脑中表达量最高($P < 0.05$),约为肝的 120 倍;其次是尾鳍、精巢;心、肠、鳃次之;肝、肾表达量较低。

```

1  I  I  K  D  P  A  I  N  C  T  V  E  N  M  T  E  A  V  E  G  H
1  GATCAAAGATCCAGCCATCAATTGCACAGTGGAGAACATGACGGAAGCCGTGGAAGGGCA
21  V  T  T  E  I  V  M  L  N  P  E  T  V  R  G  A  S  N  L  T
61  CGTCACTACTGAAATCGTCATGCTAAACCCGGAGACTGTCCGCGGTGCCCTCAACCTGAC
41  S  Q  E  F  L  A  Q  L  M  S  R  L  G  G  K  N  P  E  E  T
121 CTCCAAGAGTTCTGGCCAGCTGATGTCACGTCTCGGGGGGAAGAATCCAGAAGAAAC
61  G  G  F  Q  E  A  P  L  A  Y  D  A  M  W  A  L  A  L  A  L
181 GGGTGGATTTCAGGAAGCTCCGCTGGCGTATGATGCTATGTGGGCTCTTGCCTGGCCCT
81  N  K  T  V  A  P  L  R  A  K  G  W  T  L  E  D  F  N  Y  N
241 CAATAAAACAGTGGCTCCCCTGAGGGCCAAAGGTTGGACACTGGAGGACTTCAACTACAA
101  N  K  E  I  T  A  E  I  Y  R  A  L  N  T  S  S  F  E  G  V
301 CAACAAGGAAATCACTGCTGAGATTTACCGAGCCCTCAACACCAGCTCGTTTGAAGGAGT
121  S  G  H  V  V  F  D
361 GTCTGGTCATGTCGTGTTTGATG

```

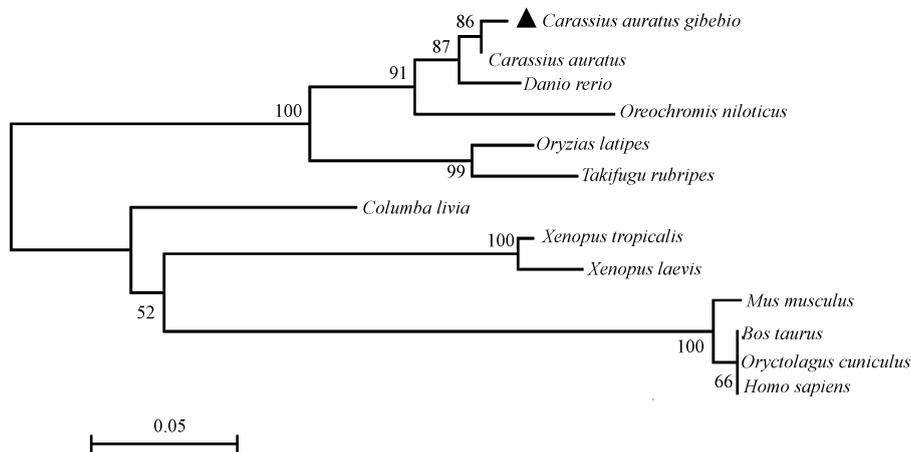
图 2 异育银鲫 $GABA_B R1$ 基因及推导的氨基酸序列

Fig. 2 The deduced amino acid sequences of $GABA_B R1$ gene in *Carassius auratus gibelio*

		相似性百分比 Percentage of identify (%)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
差异性 Divergence (%)	1	■	71.7	71.7	81.1	72.4	100.0	98.4	73.2	100.0	70.9	71.7	78.0	77.2	1	牛 <i>Bos taurus</i>
	2	35.6	■	99.2	79.5	96.9	71.7	71.7	92.1	71.7	89.0	87.4	76.4	75.6	2	金鱼 <i>Carassius auratus</i>
	3	35.6	0.8	■	79.5	97.6	71.7	71.7	92.9	71.7	89.8	88.2	76.4	75.6	3	异育银鲫 <i>Carassius auratus gibelio</i>
	4	21.8	24.0	24.0	■	79.5	81.1	80.3	75.6	81.1	79.5	78.0	83.5	82.7	4	野鸽 <i>Columba livia</i>
	5	34.4	3.2	2.4	24.0	■	72.4	72.4	91.3	72.4	88.2	88.2	75.6	74.8	5	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>
	6	0.0	35.6	35.6	21.8	34.4	■	98.4	73.2	100.0	70.9	71.7	78.0	77.2	6	人 <i>Homo sapiens</i>
	7	1.6	35.6	35.6	22.9	34.4	1.6	■	73.2	98.4	70.9	71.7	78.0	77.2	7	小鼠 <i>Mus musculus</i>
	8	33.1	8.3	7.5	29.6	9.2	33.1	33.1	■	73.2	86.6	85.0	74.8	74.0	8	吉富罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>
	9	0.0	35.6	35.6	21.8	34.4	0.0	1.6	33.1	■	70.9	71.7	78.0	77.2	9	家兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>
	10	36.9	12.0	11.0	24.0	12.9	36.9	36.9	14.8	36.9	■	95.3	74.8	73.2	10	日本青鳉 <i>Oryzias latipes</i>
	11	35.6	13.8	12.9	26.2	12.9	35.6	35.6	16.7	35.6	4.9	■	75.6	74.0	11	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>
	12	26.2	28.4	28.4	18.7	29.6	26.2	26.2	30.7	26.2	30.7	29.6	■	97.6	12	热带爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>
	13	27.3	29.6	29.6	19.8	30.7	27.3	27.3	31.9	27.3	33.1	31.9	2.4	■	13	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		

图 3 序列相似性分析

Fig. 3 The comparison analysis of sequence similarity

图 4 异育银鲫与其他动物 GABA_BR1 氨基酸序列的分子进化树Fig. 4 Phylogenetic tree of GABA_BR1 amino acid sequences of *Carassius auratus gibelio* and other animals

节点处的数字为 1 000 次 bootstrap 检验的支持率;标尺表示采用邻接法计算的进化距离。

The numbers indicate the percentages of bootstrap values supporting each node from 1 000 replicas and the below scale stands for evolutionary distance.

Carassius auratus gibelio: 异育银鲫; *Carassius auratus*: 金鱼 (AAV34286.1); *Danio rerio*: 斑马鱼 (CAP09588.1); *Oreochromis niloticus*: 吉富罗非鱼 (XP_003459356.1); *Oryzias latipes*: 日本青鳉 (XP_004078538.1); *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀 (XP_003965753.1); *Columba livia*: 野鸽 (EMC85999.1); *Xenopus tropicalis*: 热带爪蟾 (NP_001107291.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (ADQ43745.1); *Mus musculus*: 小鼠 (AAH54735.1); *Bos taurus*: 牛 (DAA16292.1); *Oryctolagus cuniculus*: 家兔 (XP_002714384.1); *Homo sapiens*: 人 (CAQ06690.1)

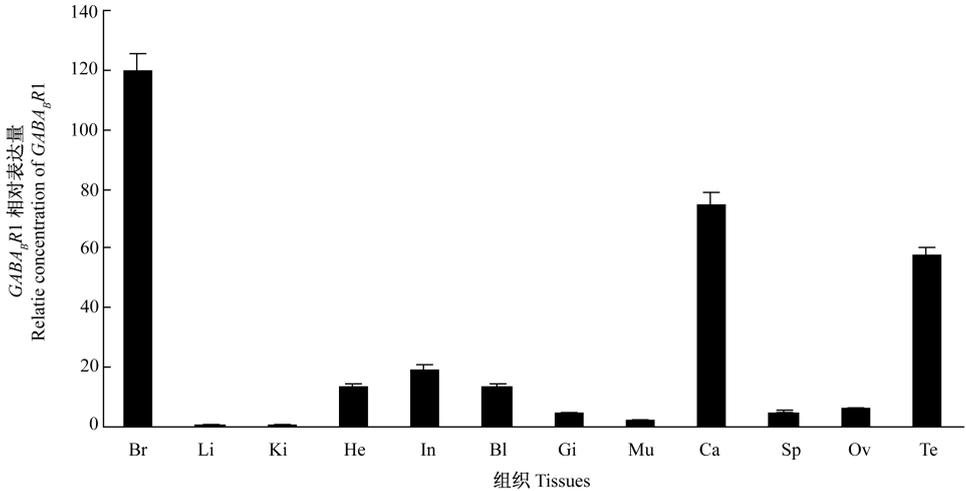


图5 *GABA_BR1* 基因在异育银鲫不同组织的相对表达量

Fig. 5 The relative expression ratios of *GABA_BR1* in tissues of *Carassius auratus gibelio*

Br. 脑; Li. 肝; Ki. 肾; He. 心; In. 肠; Bl. 鳔; Gi. 鳃; Mu. 肌; Ca. 尾鳍; Sp. 脾; Ov. 卵巢; Te. 精巢。表达值以 β -actin 内参基因加以校正,数值表示为相对于对照因子(肝)的倍数变化(平均值 \pm 标准差)。

Br. Brain; Li. Liver; Ki. Kidney; He. Heart; In. Intestine; Bl. Bladder; Gi. Gill; Mu. Muscle; Ca. Caudal fin; Sp. Spleen; Ov. Ovary; Te. Testis. Expression values were normalized to those of internal reference beta-actin. Data were expressed as the mean fold change (Mean \pm SD, $n=3$) from the calibrator group (liver).

3 讨论

$GABA_B R$ 介导慢的、持续较长的抑制性效应,与众多神经系统疾病有关,包括疼痛(陈志峰等 2006)、癫痫(和姬苓 2011)、药物成瘾(金义超等 2011)、痉挛以及抑郁和焦虑(朱珊珊等 2006),同时在动物的心血管系统(彭友清等 1999)、呼吸系统(郭莲军 1993,陆月明 1996)以及应激反应(王博等 2011)的调节中发挥着重要的作用(李华 2000)。本实验克隆了异育银鲫 *GABA_BR1* 基因的 CDS 区部分序列,片段长度 383 bp,编码 127 个氨基酸。与 GenBank 中已登录的其他动物相应序列进行比较,并用 NJ 法构建了分子进化树。由分子进化树可以看出,异育银鲫与金鱼、斑马鱼、吉富罗非鱼、日本青鳉、野鸽、非洲爪蟾、小家鼠、家兔、牛、人等的亲缘关系依次变远,与人、家兔、小家鼠、牛的同源性最低为 71.1%,符合遗传进化规律。提示 *GABA_BR1* 基因在进化过程中具有一定的保守性,但在不同种属间又形成了各自不同的区别特征,因此有必要深入研究异育银鲫 $GABA_B R$ 分

子的结构和功能,这对揭示其药理学作用以及开发针对性的靶点药物具有重要意义(蒋明等 2011)。

$GABA_B R$ 在哺乳动物体内主要分布于中枢神经系统,而其在在外周组织也有部分表达。王智明等(2000)的研究表明大鼠(*Rattus norvegicus*)脑内主要的胆碱能和单胺能神经元几乎均呈 $GABA_B R1$ 样阳性。Nakajima 等(1996)通过免疫组织化学法在大鼠的胃肠道发现 $GABA_B R$ 的分布。龚玲等(2006)的研究表明, $GABA_B R$ 在颌下腺中有表达,并在腺泡和导管系统中有不同的表达强度和细胞分布特征。此外,研究还发现, $GABA_B R$ 在肺(郭莲军 1993)、肝总管、肾小管、生殖腺等外周组织都有分布(谢佳等 2011)。本研究发现 $GABA_B R$ 不仅分布在异育银鲫的脑中,且在肝、肾、心、肠、鳔、鳃、肌、尾鳍、脾、卵巢、精巢中均有表达。提示,与哺乳动物一样, $GABA_B R$ 不仅参与异育银鲫的中枢系统的传递作用,也与呼吸、循环、消化、运动、生殖等多系统的活动密切相关。

GABA_BR 在异育银鲫各组织中有广泛表

达,但也表现出明显的组织特异性。本研究实时荧光定量 PCR 结果显示, GABA_BR1 在异育银鲫脑组织中表达量最高;其次是尾鳍、精巢;心、肠、鳔次之;肝、肾表达量较低。这与 Calver 等(2000)对于 GABA_BR1 在人和大鼠中枢系统及外周组织的表达特征基本相似。

GABA_BR1 在异育银鲫脑组织中表达水平最高;而在尾鳍中也有较高水平的表达,约为肝组织表达量的 75 倍。李人等(1985)以大鼠作为研究对象,证明 GABA 与运动有着密切的关系。有研究表明 GABA_BR 也参与了对大鼠运动的调节,提示我们 GABA_BR1 在异育银鲫的运动调节也有着重要作用。此外,在异育银鲫体内精巢 GABA_BR1 的表达量明显高于卵巢,这与陈忠等(2004)报道的 GABA_BR 主要分布于精子膜上也一致。

近年来, GABA_BR 一直是药理学研究的热点(Hopkins et al. 2002),而国内外对于异育银鲫 GABA_BR 的研究鲜有报道。本实验克隆了异育银鲫 GABA_BR1 基因的 cDNA 部分序列,然后对其进行 DNA 测序及进化树分析,并通过实时荧光定量 PCR 方法研究了 GABA_BR1 在不同组织中的表达及定量,为进一步研究该受体与药物的关系,丰富渔药基础理论研究(胡鲲等 2011)及后期的药物开发、鱼病防治具有重要的意义。

参 考 文 献

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, et al. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiological Reviews*, 84(3): 835-867.

Calver A R, Medhurst A D, Robbins M J, et al. 2000. The expression of GABA_{B1} and GABA_{B2} receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience*, 100(1): 155-170.

Chebib M, Johnston G A R. 1999. The 'ABC' of GABA receptors: A brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(11): 937-940.

Hopkins A L, Groom C R. 2002. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(9): 727-730.

Marshall F H, Jones K A, Kaupmann K, et al. 1999. GABAB receptors-the first 7TM heterodimers. *Trends in*

Pharmacological Sciences, 20(10): 396-399.

Nakajima K, Tooyama I, Kuriyama K, et al. 1996. Immunohistochemical demonstration of GABA_B receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochemical Research*, 21(2): 211-215.

陈志峰, 朱也森. 2006. 三叉神经痛大鼠延髓内 GABA_B受体的变化. *上海交通大学学报: 医学版*, 26(9): 1036-1038.

陈忠, 杨应华, 李玉春. 2004. GABA 受体在哺乳动物生殖系统的分布与作用//中国生理学会. 中南地区第六届生理学学术会议论文摘要汇编. 广西:《生理通讯》编辑部, 61-62.

龚玲, 汪芳裕, 张新华. 2006. γ -氨基丁酸及其受体在大鼠颌下腺表达和分布特征. *医学研究生学报*, 19(6): 521-523.

郭莲军. 1993. 肺的 GABA_B受体. *国外医学: 分子生物学分册*, 15(5): 242-243.

郭晓娜, 朱永义, 朱科学. 2003. 生物体内 γ -氨基丁酸的研究. *氨基酸和生物资源*, 25(2): 70-72.

和姬琴. 2011. γ -氨基丁酸 B 型受体基因与癫痫关系研究进展. *包头医学院学报*, 27(5): 112-113.

胡鲲, 杨先乐. 2011. 渔药基础理论及安全使用技术研究现状分析. *中国水产*, (5): 28-29.

蒋明, 黄思罗, 林听, 等. 2011. GABA_B受体变构剂药理学研究进展. *现代生物医学进展*, 11(14): 2775-2778.

金义超, 王桂松. 2011. γ -氨基丁酸能系统在阿片类药物及可卡因成瘾中的作用机制研究进展. *立体定向和功能性神经外科杂志*, 24(6): 378-381.

李华. 2000. GABAB 受体及其临床意义. *国外医学: 生理病理科学与临床分册*, 20(6): 458-460.

李人, 陶心铭. 1985. 运动性疲劳与脑中 γ -氨基丁酸. *中国运动医学杂志*, 4(2): 81-86.

李莹, 刘剑峰. 2009. GABAB 受体研究现状. *现代生物医学进展*, 9(16): 3144-3146.

陆月明. 1996. γ -氨基丁酸对呼吸系统的作用. *国外医学: 呼吸系统分册*, 16(2): 78-80.

彭友清, 杨军, 殷明, 等. 1999. 大鼠孤束核 GABA_A和 GABA_B受体对心血管活动调节的区别. *第二军医大学学报*, 20(2): 31-33.

王博, 谢佳, 陈忠, 等. 2011. 产前热应激对仔鼠脑垂体 GABA_B受体发育的影响. *动物医学进展*, 32(6): 60-63.

王智明, 李云庆. 2000. 大鼠神经系统中 γ -氨基丁酸 B 受体 1 亚型的定位分布. *解剖学报*, 31(增刊 1): 64.

谢佳, 唐嘉, 李中文, 等. 2011. 哺乳动物外周组织 GABA 能神经元及其受体的研究进展. *中国兽医科学*, 41(10): 1096-1100.

朱珊珊, 聂鑫, 严蓉, 等. 2006. 神经病理性痛对大鼠脊髓水平 GABA_B受体亚型蛋白表达的影响. *国际麻醉学与复苏杂志*, 27(6): 325-328.