

斜带石斑鱼阿片黑素促皮质素原全长 cDNA 克隆及序列分析

张为民¹ 张利红¹ 马广智² 张勇¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要:通过构建斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库和随机测序, 克隆了其阿片黑素促皮质素原(Proopiomelanocortin, POMC) 全长 cDNA。斜带石斑鱼 POMC 全长 cDNA 为 863bp(含 Poly(A)), 编码的 POMC 多肽前体为 219aa。氨基酸序列比较分析表明: 斜带石斑鱼 POMC 前体包含有促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotropin, ACTH), α -促黑素(α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH), β -促黑素(β -MSH), γ -促脂素(γ -lipotrophic hormone, γ -LPH), β -内啡肽(β -endorphin) 等, 但缺失了 γ -促黑素(γ -MSH) 和大部分连接区。斜带石斑鱼 POMC 与哺乳动物 POMC 的同源性为 39%—42% 左右, 与鸟类的同源性为 42% 左右, 与两栖类的同源性为 36%—41%, 与其他鱼类 POMC 的同源性为 38%—77%。斜带石斑鱼和罗非鱼 POMC 的 ACTH 功能区都为 40 个氨基酸残基, 而其他脊椎动物为 39 个氨基酸残基。

关键词:斜带石斑鱼; 阿片黑素促皮质素原; cDNA 克隆

中图分类号: Q45 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)06-0625-06

阿片黑素促皮质素原(POMC)是动物脑和垂体中多种活性肽类的共同前体, 如 ACTH, MSH, β -内啡肽等。在动物体内, 这些活性肽类是通过 POMC 基因的组织细胞特异性表达和加工而产生, 如在垂体前叶 ACTH 细胞中, POMC 被加工为 ACTH 和 β -促脂素(β -LPH), 而在垂体中叶的促黑素细胞中 POMC 被加工为 α -MSH, 类促肾上腺皮质激素中叶肽(Corticotropin-Like Intermediate lobe Peptide, CLIP), β -LPH 和 β -内啡肽^[1]。这些活性肽类在动物的应急、摄食和能量代谢等的调节中起着重要作用^[2, 3]。目前 POMC 的基因已从多种不同动物中克隆, 它是一种存在于所有脊椎动物的前腺垂体激素前体。在脊椎动物中, 鱼类 POMC 基因最具有多样性。在辐鳍鱼类的进化过程中, POMC 中的 γ -MSH 区域不断退化, 以至在真骨鱼类中 γ -MSH 区域完全消失^[4]。在一些软骨鱼类中, 除存在 α 、 β 、 γ -MSH 外, 还发现有 δ -MSH^[5, 6], 因此, 深入研究鱼类 POMC 基因, 对于阐明脊椎动物 POMC 的进化, 以及 ACTH, MSH 和 β -内啡肽等的结构与功能有着重要的意义。斜带石斑鱼是我国南方重要的海水养殖鱼类, 具有很高的经济价值。本文对斜带石斑鱼 POMC 全长 cDNA 进行了克隆和序列分析, 以期为进一步探讨 POMC 对其应急、摄食和能量代谢等的调节奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织样品 4 龄斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides* Hamilton) 购自广东省水产厅大亚湾鱼种增殖中心的海水养殖基地。垂体取出后立即置于液氮中, 带回实验室保存在 -80℃。

1.2 试剂和酶 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 购自 CLONTECH 公司。总 RNA 提取试剂 TRIzolTM Reagent 和反转录酶 SuperScriptTM II 购自 GIBCO-BRL 公司。包装文库所用的包装蛋白 MaxPlaxTM Lambda Packaging Extract 购自 EPICENTRE TECHNOLOGIES 公司。质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega Biotek 产品。除特别注明外, 其余均为国产分析纯试剂。

1.3 斜带石斑鱼垂体总 RNA 的提取 将垂体置于 0.5mL TRIzolTM Reagent 中, 用注射器匀浆后, 根据厂家提供的方法提取总 RNA, 并电泳检测 RNA 质量。

1.4 斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库的构建 取 1 μ g 垂体总 RNA, 根据 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 介绍的方法构建 cDNA 文库。

1.5 斜带石斑鱼 POMC cDNA 的克隆 根据 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 所介绍的方法, 将噬菌体 λ TriplEx2 重组片段转入到质粒 pTriplEx2

收稿日期: 2002-12-17; 修订日期: 2003-01-03

基金项目: 国家高新技术计划(863) 海洋生物功能基因组开放实验室项目; 国家自然科学基金项目(No. 30070598) 资助

作者简介: 张为民(1966—), 男, 江西万载人; 副教授; 研究方向: 鱼类内分泌学与分子生物学, Email: ls68@zsu.edu.cn

中,用牙签随机挑取平板上 70 个阳性单克隆,提取质粒 DNA,进行序列测定。所获得序列通过 BlastP 与 GenBank 中的序列进行同源性比较分析。脊椎动物 POMC 氨基酸序列多重比较以及进化树构建均采用软件 ClustalX(1.8) 进行。进化树显示采用软件 TreeView(1.6.6)。

1.6 斜带石斑鱼 POMC 中间区域 RT-PCR 分析
为了验证斜带石斑鱼 POMC 中 γ -MSH 的缺失不是由于文库构建时的错误,进行了 RT-PCR 分析。取 1 μ g 垂体总 RNA,进行反转录(Reverse Transcription System, Promega)。反转录产物稀释 5 倍后,取 4 μ L 作为 PCR 模板,PCR 引物为两个基因特异性引物,上游引物(GSP1)为:5' ATGTGTCCTGCGTGGCTTTTG3',下游引物(GSP2)为:5' CTCGGCTGACTCTTCTCTAC3',位置如图 1 所示。PCR 反应体系为:50 μ L 反应体积,MgCl₂ 2.0mmol/L, dNTP 各 200 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶(TaKaRa ExTaqTM) 1.25 单位,每种引物各 500pmol/L。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 1min、60 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 45s,共 35 循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

2 结果

2.1 斜带石斑鱼 POMC 全长 cDNA 克隆及序列分析

通过对斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库随机测序,在 70 个克隆中发现 5 个 POMC 的全长克隆。如图 1 所示,斜带石斑鱼 POMC 全长 cDNA 为 863bp,3' 和 5' 非编码区分别含有 68 和 138 核苷酸,在 Poly(A) 前 30 核苷酸处有一加 Poly(A) 尾的信号 AATAAA,开放读码框编码的 POMC 多肽为 219aa,包括信号肽(M¹-S²¹)、ACTH(S⁹⁰-M¹²⁹)、 α -MSH(S⁹⁰-V¹⁰²)、 γ -LPH(R¹³²-E¹⁶⁴)、 β -MSH(D¹⁶⁷-S¹⁸³)、 β -内啡肽(Y¹⁸⁶-Q²¹⁹) 等

功能区。斜带石斑鱼 POMC 与罗非鱼 POMC 同源性最高(图 2)。多重氨基酸序列比较分析表明:斜带石斑鱼和罗非鱼 POMC 都缺失了 γ -MSH 和大部分连接区,ACTH 功能区都为 40 个氨基酸残基,比其他脊椎动物 ACTH 多一个丝氨酸残基。BlastP 分析表明:斜带石斑鱼 POMC 与哺乳动物 POMC 的同源性为 39%—42% 左右,与鸟类的同源性为 42% 左右,与两栖类的同源性为 36%—41%,与其他鱼类 POMC 的同源性为 38%—77%。斜带石斑鱼 POMC 分子的 ACTH 功能区与罗非鱼(*Oreochromis mosambicus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、雀鳝(*Lepisosteus osseus*)、白鲟(*Acipenser transmontanus*)、白斑角鲨(*Squalus acanthias*)、赤魟(*Dasyatis akajei*)和非洲肺鱼(*Protopterus annectens*)的同源性分别为 90%、82%、87%、85%、82%、65%、55% 和 70%,与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、鸡(*Gallus gallus*)和牛(*Bos taurus*)的同源性分别为 80%、77.5% 和 75%。 α -MSH 功能区与罗非鱼、鲤、虹鳟、雀鳝、白鲟、非洲肺鱼、鸡和牛的同源性均为 100%,与白斑角鲨、赤魟和非洲爪蟾的同源性为 92%。 β -MSH 功能区与罗非鱼、鲤、虹鳟、雀鳝、白鲟、白斑角鲨、赤魟和非洲肺鱼的同源性分别为 88%、76%、82%、64.7%、70.6%、47.1%、41.7% 和 58.8%,与非洲爪蟾、鸡和牛的同源性分别为 58.8%、64.7% 和 64.7%。斜带石斑鱼 POMC 分子中 β -内啡肽与罗非鱼、鲤、虹鳟、雀鳝、白鲟、白斑角鲨、赤魟和非洲肺鱼的同源性分别为 82%、76.5%、88%、82%、76%、73%、70% 和 70%,与非洲爪蟾、鸡和牛的同源性分别为 55.8%、52.9% 和 55.8%。斜带石斑鱼 POMC 分子中 γ -LPH 功能区与其他动物无明显的同源性。

1 AT 2

3 CTGTCCAACAGCCAAACGACGAGAAAACATTAGACAGAGAGAGACAGACAGGACAGCG 62

63 TGGGGAatgtgtcctgcgtggcttttggTGGCTGTGGCGGTGGTGGGCGTGGTCAGAGGA 122

1 M C P A W L L V A V A V V G V V R G 18

←----- SIGNAL SEQUENCE -----→

123 GCTGTCAGTCAGTGCTGGGAACATCCGAGCTGTCAGGACGCTCAAGTCTGAGGGCAGCATG 182

```

19 A V S Q C W E H P S C Q D V K S E G S M      38
    .....> <.....
183 ATGGAATGTATCCAGCTCTGTGCTCCGACCTACCGCAGAGACACCTGTCATCCCAGGC 242
39 M E C I Q L C R S D L T A E T P V I P G      58
    .....
243 GACAACCACCTCCAACCTGTTCTCCATCAGATCTCGATTCTCTGCCTCCCCTCCCTCTT 302
59 D N H L Q P V P P S D L D S L P P L P L      78
    ..... N-TERMINAL REGION .....
303 TTATCTTCCCCCTCCTCTCCTCAGGCCAAGCGCTCTACTCCATGGAGCATTTCCGCTGG 362
79 L S S P S S P Q A K R S Y S M E H F R W      98
    .....> <.....
363 GGGAAGCCTGTTGGACGAAAGCGCGCCCGGTCAAAGTCTACACCTCAAACGGCgtagaa 422
99 G K P V G R K R R P V K V Y T S N G V E     118
    ..... ACTH (α-MSH) .....
423 gaagagtcagccgagCTTTTCCCCGAAAGATGAGGAGGCGGGAGCTCACCAGCAAGCTG 482
119 E E S A E L F P G K M R R R E L T S K L     138
    .....> <.....
483 CTTGCAGCAAAGGAAAAGGAGAAGGCGCAGGAGGTGGCTGAAGACGAGCAGGAGCAGCTC 542
139 L A A K E K E K A Q E V A E D E Q E Q L     158
    ..... N-TERMINAL γ-LPH .....
543 CCAGGTGACATCCACGAAAAGAAAGACGGCGGGTACAAGATGAAGCACTTCCGCTGGGGT 602
159 P G D I H E K K D G G Y K M K H F R W G     178
    .....> <..... β-MSH .....
603 GGCCCGCCGGCCAGCAAACGCTACGGTGGGTTCATGAAAAGCTGGGATGAACGCAGCCAA 662
179 G P P A S K R Y G G F M K S W D E R S Q     198
    .....> <.....
663 AGGCCGCTGCTCACGCTTTTCAAAAACGTCATCAACAAAGACGGACAGCAGGAGGGAGAG 722
199 R P L L T L F K N V I N K D G Q Q E G E     218
    ..... β-ENDORPHIN .....
723 CAGTGAGGGAGTAAAAGGGAGAGGGAGGAAAAAGCTCGAAAAGGAGCAAAGACATCGGCC 782
219 Q *                                           260
    .....>
783 AACAAATCCTCCAAATAAAACAAAAATATGATGTTTGTCCCTGATTTTAAAAAAAAAA 842
843 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                      902
```

图1 斜带石斑鱼 POMC 全长 cDNA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列(位于核苷酸序列下方)。核苷酸序列中小写字母表示特翼引物位置,* 表示终止密码子位置,方框表示加 poly(A) 的信号。Genebank 登录号为 AY169408

Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *Epinephelus coioides* POMC. The nucleotide sequence indicated by lowercase letters show position of primers. The termination codon is indicated as “*”. The putative signal for the addition of poly (A) is boxed. The Genebank accession number is AY169408

2.2 斜带石斑鱼 POMC 中间片段的 RT-PCR 分析

以斜带石斑鱼垂体 RNA 反转录产物为模板, GSP1 和 GSP2 为引物的 PCR 产物仅出现单一条带(图 3), 其大小为 368bp, 与图 1 中所示引物区段大

小一致, 而应用单引物 GSP1 或 GSP2 进行 PCR 扩增未得到产物。以 H₂O 为模板, GSP1 和 GSP2 为引物进行 PCR 扩增, 也未得到产物。

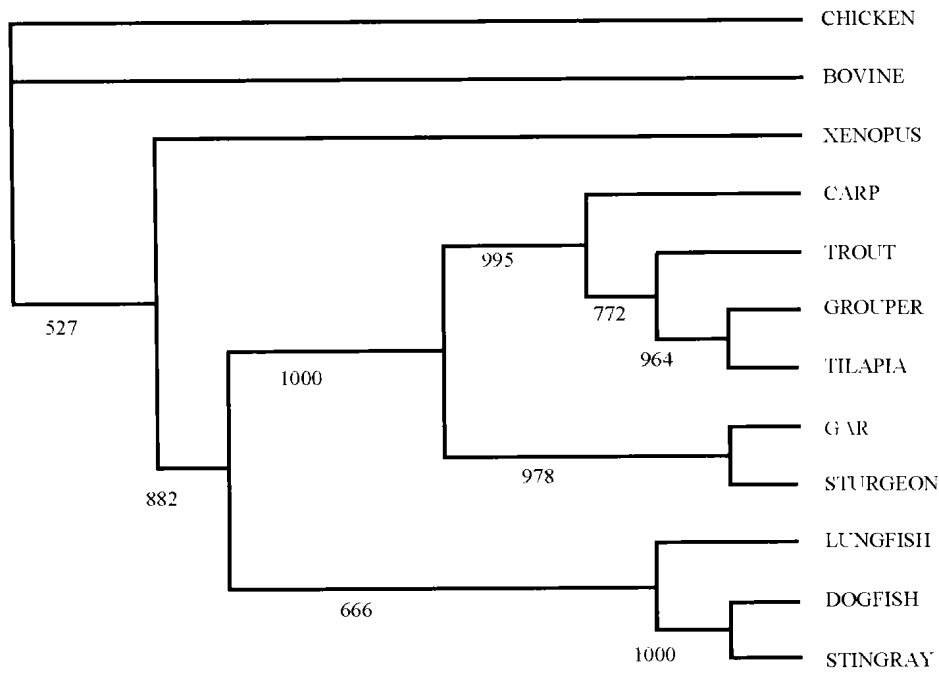


图2 脊椎动物 POMC 系统树分析。进化树由软件 ClustalX 生成, 图形显示采用软件 TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>), 图中的数值表示置信度。Grouper 等动物名称及其 POMC 基因的 Genebank 登录号见英文说明

Fig. 2 Phylogenetic tree of various vertebrate POMC forms. The tree was generated by software ClustalX, and visually depicted by software TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). The numbers inside the figure represent the bootstrap values. Abbreviations: Grouper *Epinephelus coioides* (AY 169408), Tilapia *Oreochromis mosambicus* (AAB03227), Trout *Oncorhynchus mykiss* (CAA49466), Carp *Cyprinus carpio* (CAA 74968), Gar *Lepisosteus osseus* (AAB03227), Sturgeon *Acipenser transmontanus* (JC5283), Chicken *Gallus gallus* (BAA34366), Bovine *Bos taurus* (AAB59262), Xenopus *Xenopus laevis* (CAA29374), Lungfish *Protopterus annectens* (BAA32607), Dogfish *Squalus acanthias* (BAA 32606), Stingray *Dasyatis akajei* (BAA35126)

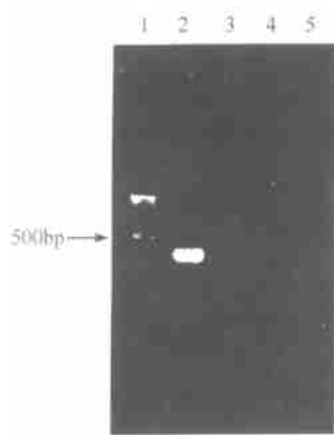


图3 斜带石斑鱼 POMC 中间区域 RT-PCR 分析。泳道 1: 100 bp DNA marker; 2: 模板为垂体 RNA 反转录产物, 引物为 GSP1 和 GSP2; 3: 模板为垂体 RNA 反转录产物, 引物为 GSP1; 4: 模板为垂体 RNA 反转录产物, 引物为 GSP2; 5: 对照组 PCR 产物, 模板为 H₂O, 引物为 GSP1 和 GSP2

Fig. 3 RT-PCR analysis of the central region of POMC of *Epinephelus coioides*. Lane 1: 100bp DNA marker; Lane 2: PCR product of RT mix from pituitary total RNA with primers GSP1 and GSP2; Lane 3: PCR product of RT mix from pituitary total RNA with primers GSP1; Lane 4: PCR product of RT mix from pituitary total RNA with primers GSP2; Lane 5: Control PCR with H₂O as template, and GSP1 and GSP2 as primers

3 讨论

自从 1979 年首次报道了牛的 POMC cDNA 以来, 到目前为止, 大多数脊椎动物代表种类的 POMC 一级结构都已阐明, 如哺乳类^[7], 两栖类^[8-10], 辐鳍鱼类^[11-15] 和无颌类^[16, 17]。对这些不同来源的 POMC cDNA 的分析表明: 在脊椎进化过程中, 由于基因的重复增加了 POMC 基因的拷贝数, 或因基因内部 MSH 区域的重复或缺失, 而造成 POMC 基因的多样

性^[18]。本文通过随机筛选斜带石斑鱼垂体 cDNA 文库, 克隆了其 POMC 全长 cDNA。与四足类动物的 POMC 比较, 斜带石斑鱼 POMC 缺失了 γ -MSH 功能区及大部分连接区。应用基因特异性引物 GSP1 和 GSP2, 以垂体 RNA 反转录产物为模板进行 PCR, 结果进一步表明: 斜带石斑鱼 POMC 分子中 γ -MSH 功能区及大部分连接区的缺失, 不是由于文库构建时的错误所致。其他一些硬骨鱼类如罗非鱼、虹鳟和鲤鱼等的 POMC 一级结构也缺失了 γ -MSH 功能区,

但连接区缺失程度因鱼种不同而有差异, 如斜带石斑鱼和罗非鱼 POMC 连接区缺失程度比虹鳟和鲤鱼大。而在一些软骨鱼类, 如白斑角鲨^[5]和赤^[6], 其 POMC 分子中含有四个 MSH 区域, 其中 δ -MSH 是其特有的。

尽管斜带石斑鱼 POMC 与其他动物的同源性较低, 有些甚至低至 36%, 但其分子仍保留了脊椎动物 POMC 的一些保守特征, 如功能区域一般都由一对碱性氨基酸分隔开, 这对碱性氨基酸是作为酶切位点, 把 POMC 前体分子加工为不同的活性肽; 斜带石斑鱼 POMC 分子中也含有一个 ACTH 区域, 一个 β -MSH 区域和一个 β -内啡肽区域, 在 ACTH 区域中包含有一个 α -MSH 功能区。斜带石斑鱼 POMC 分子的功能区与其他动物的同源性分别为 ACTH: 55%—90%, α -MSH: 92%—100%, β -MSH: 41.7%—88%, β -内啡肽: 52.9%—82%。这些区域与其他动物的同源性较高, 表明这些活性肽类对鱼类及其他脊椎动物的生命活动起着非常重要的调节作用。

斜带石斑鱼 POMC 分子中 ACTH 功能区有 40 个氨基酸残基, 这与罗非鱼 ACTH 功能区相同, 而其他一些鱼类和脊椎动物的 ACTH 功能区却为 39 个氨基酸残基, 缺少一个丝氨酸。斜带石斑鱼 ACTH 中这个丝氨酸残基对其结构与功能的意义有待进一步研究。

参考文献:

[1] Wei P. The research progresses on the regulation of pituitary and extrapituitary POMC gene expression [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Endocrinology*, 2001, **21**(1): 39—41 [魏平. 垂体内 POMC 基因表达调控研究进展 [J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, **21**(1): 39—41]

[2] Arends R J, Vemeer H, Martens G J, *et al.* Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, **143**: 23—31

[3] Pritchard L E, Turnbull A V, White A. Proopiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signaling and obesity [J]. *J Endocrinol*, 2002, **172**: 411—421

[4] Alnubaian J, Danielson P, Fitzpatrick M, *et al.* Cloning of a second proopiomelanocortin cDNA from the pituitary of the sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. *Peptides*, 1999, **20**: 431—436

[5] Amemiya Y, Takahashi A, Suzuki N, *et al.* A newly characterized

melanotropin in proopiomelanocortin in pituitaries of an elasmobranch, *squalus acanthias* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, **114**: 387—395

[6] Amemiya Y, Takahashi A, Suzuki N, *et al.* Molecular cloning of proopiomelanocortin cDNA from an elasmobranch, the stingray, *Dasyatis akajei* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, **118**: 105—112

[7] Douglass J, Civelli O, Herbert E. Polypeptide gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides [J]. *Ann Rev Biochem*, 1984, **53**: 665—715

[8] Hilario E, Lihmann I, Vaudry H. Characterization of cDNA encoding proopiomelanocortin in the frog *Rana ridibunda* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1990, **173**: 653—659

[9] Martens G J M. Expression of two proopiomelanocortin genes in the pituitary of *Xenopus laevis*: complete structure of the two preprohormone [J]. *Nucl Acids Res*, 1986, **14**: 3791—3798

[10] Pan F, Cheng W C. Nucleotide sequence of bullfrog proopiomelanocortin cDNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1989, **17**: 5843

[11] Amemiya Y, Takahashi A, Does R M, *et al.* Sturgeon proopiomelanocortin has a remnant of γ -melanotropin [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1997, **230**: 452—456

[12] Does R M, Smith T R, Mara L E, *et al.* Deciphering posttranslational processing events in the pituitary of a neopterygian fish: cloning of a gar proopiomelanocortin cDNA [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, **107**: 401—413

[13] Kitahara N, Nishizawa T, Iida K, *et al.* Absence of a γ -melanocyte stimulating hormone sequence in proopiomelanocortin mRNA of chum salmon, *Oncorhynchus keta* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1988, **91B**: 365—370

[14] Okuta A, Ando H, Ueda H, *et al.* Two types of cDNA encoding proopiomelanocortin of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* [J]. *Zool Sci*, 1996, **13**: 421—427

[15] Salbert G, Chauveau I, Bonnet G, *et al.* One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, **6**: 1605—1612

[16] Heining J A, Keeley F W, Robson P, *et al.* The appearance of proopiomelanocortin early in vertebrate evolution: cloning and sequencing of POMC from a lamprey pituitary cDNA library [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1995, **99**: 137—144

[17] Takahashi A, Amemiya Y, Sarashi M, *et al.* Melanotropin and corticotropin are encoded on two distinct genes in the lamprey, the earliest evolved extant vertebrate [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1995, **231**: 490—496

[18] Takahashi A, Amemiya Y, Nozaki M, *et al.* Evolutionary significance of proopiomelanocortin in agnatha and chondrichthyes [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, **129B**: 283—289

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF PROOPIOMELANOCORTIN (POMC) IN ORANGE SPOTTED GROUPER, *EPINEPHELUS COIODES*

ZHANG Wei-Min¹ ZHANG Li-Hong¹ MA Guang-Zhi² and ZHANG Yong¹

(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275

2. School of Life Science, Huanan Normal University, Guangzhou 510631)

Abstract: Proopiomelanocortin(POMC) is the precursor for a number of biologically active peptides such as adrenocorticotropin (ACTH), melanocyte stimulating hormone (MSH), and β -endorphin, and they are produced by cell-specific processing of POMC in pituitary. These peptides are known to be involved in stress responses and energy metabolism in vertebrates. It has been shown that POMC molecule is present in all vertebrates examined, and of highest diversities in fish. This paper was aimed to characterize the cDNA sequence of POMC in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, a protogynous hermaphroditic marine fish of high economic values. The pituitary cDNA library of *Epinephelus coioides* was constructed from total RNA using SMARTTM cDNA Library Construction Kit (Clontech, USA). The full-length cDNA encoding *Epinephelus coioides* POMC was obtained by random sequencing the pituitary cDNA library. Seventy clones were randomly picked and sequenced, and five of them were found to be *Epinephelus coioides* POMC cDNA by BlastN analysis. There was no sequence heterogeneity found among the five POMC cDNA clones. The full-length cDNA sequence of *Epinephelus coioides* POMC obtained spanned 863bp (including poly (A) tail), with a 5' UTR of 138 bp, a 3' UTR of 68 bp, and an open reading frame encoding a protein of 219 amino acids with a putative signal peptide of 21 amino acid residues. The signal for the addition of Poly (A) tail is located 30 nucleotides upstream of the Poly (A) sequence. Sequence homology analysis at amino acid level indicates that *Epinephelus coioides* POMC contains ACTH (S⁹⁰-M¹²⁹), α -MSH (S⁹⁰-V¹⁰²), β -MSH (D¹⁶⁷-S¹⁸³), γ -lipotropic hormone (γ -LPH) (R¹³²-E¹⁶⁴), β -endorphin regions (Y¹⁸⁶-Q²¹⁹), but lacks the γ -MSH and most of the joining peptide regions which was further confirmed by RT-PCR analysis of pituitary total RNA. *Epinephelus coioides* POMC shares 39%-42% identities with mammalian POMC, about 42% with avian POMC, 36%-41% with amphibian POMC, 38%—77% with other fish POMC. The high homology was found in ACTH, α -MSH, β -MSH, and β -endorphin regions of vertebrate POMCs, but not in γ -LPH region. The ACTH region of *Epinephelus coioides* POMC shares 90% homology with that of *Oreochromis mossambicus*, 82% with *Cyprinus carpio*, 87% with *Oncorhynchus mykiss*, 85% with *Lepisosteus osseus*, 82% with *Acipenser transmontanus*, 65% with *Squalus acanthias*, 55% with *Dasyatis akajei*, 70% with *Protopterus annectens*, 80% with *Xenopus laevis*, 77.5% with *Gallus gallus*, and 75% with *Bos taurus* respectively. The α -MSH region of *Epinephelus coioides* POMC shares 100% homology with those of *Oreochromis mossambicus*, *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss*, *Lepisosteus osseus*, *Acipenser transmontanus*, *Protopterus annectens*, *Gallus gallus* and *Bos taurus* and 92% homology with those of *Squalus acanthias*, *Dasyatis akajei* and *Xenopus laevis* respectively. The β -MSH region of *Epinephelus coioides* POMC shares 88% homology with that of *Oreochromis mossambicus*, 76% with *Cyprinus carpio*, 82% with *Oncorhynchus mykiss*, 64.7% with *Lepisosteus osseus*, 70.6% with *Acipenser transmontanus*, 47.1% with *Squalus acanthias*, 41.7% with *Dasyatis akajei*, 58.8% with *Protopterus annectens*, 58.8% with *Xenopus laevis*, and 64.7% with *Gallus gallus* and *Bos taurus* respectively. The β -endorphin region of *Epinephelus coioides* POMC shares 82% homology with that of *Oreochromis mossambicus*, 76.5% with *Cyprinus carpio*, 88% with *Oncorhynchus mykiss*, 82% with *Lepisosteus osseus*, 76% with *Acipenser transmontanus*, 73% with *Squalus acanthias*, 70% with *Dasyatis akajei* and *Protopterus annectens*, 52.9% with *Gallus gallus*, and 55.8% with *Xenopus laevis* and *Bos taurus* respectively. The γ -LPH region of the *Epinephelus coioides* POMC did not show significant similarities with those of other vertebrates. The POMC of *Epinephelus coioides* shares highest homology with that of *Oreochromis mossambicus*, and both ACTH regions of *Epinephelus coioides* and *Oreochromis mossambicus* are composed of 40 amino acids, which are one amino acid longer than those of other vertebrates.

Key words: *Epinephelus coioides* Hamilton; Proopiomelanocortin; cDNA cloning