

条石鲷促性腺激素 α 亚基的克隆 与表达特性分析^{*}

陈圣毅^{1,2,3}, 史宝^{1,2}, 柳学周^{1,2*}, 徐永江^{1,2},
李晓晓^{1,2,3}, 王珊珊^{1,2}, 王妍妍^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用同源性克隆和 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法, 从条石鲷(*Oplegnathidae fasciatus*)垂体中获得了全长为 897 bp 的 GtH α cDNA 序列, 其中包含 249 bp 的 5' 非编码区、399 bp 的开放阅读框和 249 bp 的 3' 非编码区。该基因编码由 132 个氨基酸组成的前体蛋白, 其中前 38 个氨基酸为信号肽, 在第 122 和 124 Cys 中间间隔了一个组氨酸(His), 形成 CXC 型趋化因子的特征结构, 肽链中包括 10 个保守 Cys 残基和 2 个 N-糖基化位点。氨基酸同源性和进化分析表明, 条石鲷 GtH α 与鲈形目鱼类的进化关系较近, 与鲈形目鱼类 GtH α 的同源性为 87%~98%, 与其他脊椎动物 GtH α 的同源性为 53%~87%。实时荧光定量 PCR 检测发现, GtH α mRNA 在垂体、脑、性腺中的表达量较高, 在心、肝脏、胃、肠、肌肉、幽门盲囊中微量表达, 在脾脏、头肾、鳃、肾脏中不表达, 其中在垂体中的表达量最高; 周期表达发现: 垂体中 GtH α mRNA 在卵巢发育的 V 期达到最大值, 卵巢中 GtH α mRNA 在卵巢发育的 IV 期达到最大值, 而脑组织中 GtH α mRNA 在卵巢发育的 V 期达到最低值, 表明 GtH α 对卵母细胞发育的调控可能同时通过自分泌和旁分泌两种途径进行。本研究为条石鲷生殖调控机制及人工繁育技术研究提供了基础资料。

关键词: 条石鲷; 促性腺激素 α 亚基; cDNA 克隆; 表达; 卵巢发育周期

中图分类号: Q418

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2015)02-0207-12

鱼类的生殖活动主要受到下丘脑-脑垂体-性腺轴的调控, 其中促性腺激素(Gonadotropin Hormone, GtH)起着重要的调控作用。GtH 是由脑垂体中促性腺激素细胞分泌的一种糖蛋白激素, 对性类固醇激素的分泌、生殖周期的启动以及生殖细胞的产生、成熟、排放等过程起着重要的调节作用^[1-3]。在哺乳动物中, 存在两种类型的 GtH, 分别是促滤泡激素(Follicle-stimulating Hormone, FSH)和促黄体激素(Luteinizing Hormone, LH)。FSH、LH、促甲状腺激素(Thyroid-stimulating Hormone, TSH)和绒毛膜促性腺激素(Chorionic Gonadotropin, CG)都是 GPHs 家族的成员^[4], 所有的 GPHs 都由 2 个不同的 α 亚基和 β 亚基组成, 其中 α 亚基在 4 种激素中都是相同的, 而 β 亚基具有种的特异性, 只有 2 个亚基结合在一起才能发挥特定的生物学活性^[5]。GtH α 在整个脊椎动物中是高度保守的, 它在卵子的产生、成熟、排放以及类固醇激素信号传导方面发挥着重要作用^[6]。目前, 已从青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)^[7]、鲫鱼(*Carassius auratus*)^[8]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[9]、大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[10]、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)^[11]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[12]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[13]、鳙鱼(*Hypophthalmichthys nobilis*)^[14]、

^{*} 收稿日期: 2014-03-05

资助项目: 国家高技术研究发展计划——新养殖海水种类苗种繁育技术(2012AA10A413); 国家自然科学基金——半滑舌鳎膜孕激素受体(mPR-like)及其对卵母细胞成熟过程的作用(31201982); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金——孕酮受体膜组分 1 在半滑舌鳎卵巢发育成熟过程中的作用(BS2013SW042)

作者简介: 陈圣毅(1988-), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事鱼类繁殖生理学方面研究。E-mail: shengyichen88@163.com

^{*} 通讯作者: 柳学周(1959-), 男, 山东青岛人, 研究员, 主要从事鱼类繁育理论与增养殖技术方面研究。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

(王佳实 编辑)

西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)^[15]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[16]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[17]等多种硬骨鱼脑垂体中分离出 2 种 GtH。

条石鲷(*Oplegnathidae fasciatus*)隶属于鲈形目(Perciformes),石鲷科(Oplegnathidae),石鲷属(*Oplegnathus*)^[18],在我国黄海、东海和台湾沿海等海域均有分布。条石鲷肉质细嫩、口感独特、体色艳丽,具有很高的营养价值和观赏价值,条石鲷还适合网箱、池塘、工厂化等多种养殖模式,是一种理想的增养殖鱼种。我国自 21 世纪初开始条石鲷人工繁育技术研究,并先后对条石鲷的形态学、成鱼消化道结构特征、胚胎和仔稚鱼形态特征以及人工养殖条件等进行了研究,促进了条石鲷养殖业的发展^[19-20]。近年来,对条石鲷的繁殖生物学和人工繁育技术进行了深入的研究,促进了条石鲷养殖业的发展,但是关于条石鲷繁殖内分泌学方面的研究报道并不多见。本研究克隆了条石鲷 GtH α 全长,对其 cDNA 序列进行了同源性比较和系统进化分析,同时分析了 GtH α 的表达特性,为条石鲷生殖内分泌机制研究提供了基础资料,也为下丘脑多肽激素如促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)调控 GtH α mRNA 表达和信号传导通路的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条石鲷取自青岛忠海水产有限公司(2012-04—12),共取人工培育的 3 龄以上性成熟的条石鲷雌鱼(全长 27.23~31.11 cm,体重 478.2~671.7 kg)16 尾。条石鲷培育水温 15~26 °C,盐度 28~32, pH 8.0~8.2,溶解氧 6 mg/L 以上,日换水率 300%~500%。

1.2 样品采集

分别于 2012-04, 2012-05, 2012-06, 2012-08 完成条石鲷亲鱼取样,每次取样 4 尾。实验鱼活体打包充氧运回实验室,用 MS222(200 mg/L)麻醉后解剖,取其脑、垂体、卵巢、心脏、胃、幽门盲囊、肠、脾脏、肾脏、鳃、肌肉、肝脏组织快速投入液氮(-196 °C)中,后转入-80 °C 冰箱保存,用于总 RNA 的提取。同时,用 Davidson 固定液固定部分卵巢组织,24 h 后转入 70% 的酒精保存,用于组织学观察,确定卵巢发育时期。

1.3 卵巢的组织学分析

卵巢组织通过梯度酒精(70%~100%)脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后利用 LEICA RM 2235 型切片机切成 6 μ m 切片,烘干后 H. E 染色,中性树脂封片,在显微镜(NIKON 90i)下观察、拍照。卵巢各发育期的确定参考刘筠等^[21]的分类方法。

1.4 RNA 提取

利用 RNAiso Plus (TaKaRa)从垂体、心脏、卵巢等 13 个组织中提取总 RNA。利用超微量紫外检测仪(Nanodrop 2000D)检测总 RNA 的纯度和浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。

1.5 条石鲷 GtH α cDNA 核心序列的克隆

根据 NCBI 上已报道的其他鲈形目鱼类的 GtH α 全长序列设计了特异性引物(表 1)。以条石鲷垂体总 RNA 为模板,根据 PrimeScript[®] RT-PCR Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明反转录合成 cDNA。然后用 GtH α 特异性引物扩增 GtH α 核心序列,PCR 条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s, 59.8 °C 30 s, 72 °C 50 s 共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳检测、切胶回收、纯化后连接到 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司)上并转移至 Transl-T1 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)中,

37 ℃ 条件下振荡培养 12~14 h,筛选阳性克隆菌株送至华大基因公司测序。将测序结果在 NCBI 上进行分析比对。

1.6 条石鲷 GtH α cDNA 的 5'-RACE 和 3'-RACE

根据克隆得到的条石鲷 GtH α cDNA 核心序列设计了 GtH α 的 RACE 引物(表 1),以垂体总 RNA 为模板,根据 Clontech SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明分别合成 5'-cDNA 和 3'-cDNA。然后分别以 5'-cDNA 和 3'-cDNA 为模板,以 GtH α -outGSP5 和 GtH α -outGSP3 为引物,根据 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)中的操作说明进行 PCR 扩增,PCR 条件:94 ℃ 30 s; 68 ℃ 30 s, 15 个循环, T_m 每个循环降低 0.5 ℃, 72 ℃ 延伸 2 min; 然后 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 28 个循环。

将第一次 PCR 产物稀释 40 倍后作为模板,分别以 GtH α -NGSP5 和 GtH α -NGSP3 为引物进行巢式 PCR,PCR 条件同第一次 PCR。用 1% 的琼脂糖电泳检测 PCR 产物,然后切胶回收、连接转化、筛选阳性克隆并测序。

表 1 实验中所用的主要引物
Table 1 Primers used in this study

引 物	引物序列	用 途
GtH α -F	5'-GGGTACTTTCTCTTAACATGGTA-3'	中间片段扩增
GtH α -R	5'-CCTATGAAAATAGCAGGTGCTGC-3'	中间片段扩增
GtH α -outGSP5	5'-GTGGTTTCTCACCTTATGCCGGCC-3'	5'端扩增
GtH α -NGSP5	5'-TTTGCGACACAGCACGTTGCCTCCG-3'	5'端扩增
GtH α -outGSP3	5'-CAGTGTTTTCTCGAGGGACCGTCCGG-3'	3'端扩增
GtH α -NGSP3	5'-CAGTGTTTTCTCGAGGGACCGTCCGG-3'	3'端扩增
Q-GtH α -F1	5'-CGGCATAAGGGTGAGAAA-3'	荧光定量引物
Q-GtH α -R1	5'-GCCACACAAGAACATCAGTTTT-3'	荧光定量引物
Q- β -actin-F	5'-TCATCACCATCGGCAATGAGAGGT-3'	内参引物
Q- β -actin-R	5'-TGATGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT-3'	内参引物

1.7 序列分析

测序结果在 NCBI 数据库中利用 BLAST 进行同源性比对。利用 DNASTAR 软件进行序列拼接、预测蛋白质分子量和等电点;利用 ExPASy 中的 Translate Tool 进行氨基酸序列翻译;利用 SignalP 4.0 Server 进行信号肽预测;利用 Clustal X 进行氨基酸同源性比较;利用 MEGA 5.0 中的 Neighbor-joining 法(自展值为 1 000)进行分子进化分析;利用 SOPMA 进行蛋白质二级结构预测;利用 I-TASSER 进行蛋白质三级结构预测。

1.8 条石鲷 GtH α 基因的组织表达与周期表达

采用实时荧光定量 PCR 法(Mastecycler® eprealplex 实时荧光定量 PCR 仪)检测 GtH α mRNA 在条石鲷不同组织中的相对表达量和在卵巢发育不同时期中脑、垂体、性腺组织中的表达水平变化。根据 1.6 得到条石鲷 GtH α cDNA 全序列,设计特异性引物 Q-GtH α F1 和 Q-GtH α R1,以 Q- β -actin F 和 Q- β -actin R 作为内参引物(表 1),用 SYBR Green II 荧光染料(TaKaRa)进行荧光定量检测,用比较阈值法测定不同组织的相对表达量。每种组织取 3 尾鱼,每尾鱼设定 3 个平行。

以各组织 RNA 为模板,根据 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明合成 cDNA。Real-time PCR 程序:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s;57.5 ℃ 28 s,共 40 个循环,反应结束

后进行溶解曲线分析。

根据 C_t 值计算引物的扩增效率并进行溶解曲线的分析,以确定引物和扩增参数是否达到进行荧光定量检测组织相对表达量的要求($0.8 < E < 1.2, R^2 > 0.98$)。根据各组织的 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出不同组织中 GtH α mRNA 与内参基因 β -actin 的相对表达丰度。结果表示为 Mean $\pm$ SD(平均值 $\pm$ 标准偏差),利用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),设定差异显著水平 P 为 0.05,当 $P < 0.05$ 时即差异显著,当 $P < 0.01$ 时即差异极显著。

2 结果与分析

2.1 条石鲷卵巢各发育时期的特征

对各实验组的雌性条石鲷卵巢进行组织切片观察,确定其性腺发育时期:1)在 4 月份,卵母细胞体积增大,卵细胞多为圆形,细胞核嗜碱性,核仁多靠近核膜分布。初期近细胞膜细胞质内出现数量不等的液泡,其数目和大小随着卵母细胞的生长而增加,并逐渐向核中央靠近。以 III 时相卵母细胞为主的卵巢称为 III 期卵巢(图 1a)。2)5 月份,卵母细胞随着营养物质的不断积累,细胞体积继续增大,胞质中储存着大量卵黄颗粒和油球。卵母细胞外有两层滤泡细胞,随着发育的进行,放射带越来越模糊,并且逐渐缩小,以 IV 时相卵母细胞为主的卵巢称为 IV 期卵巢(图 1b)。3)6 月份,卵母细胞呈圆球形,直径可以达到 $326.1 \sim 370.2 \mu\text{m}$ 。由于卵黄颗粒的大量积累和融合,此时的核仁已经消失,卵母细胞已经脱离滤泡膜进入卵巢腔,以 V 时相卵母细胞为主的卵巢称为 V 期卵巢(图 1c)。4)8 月份,由于亲鱼刚刚产完卵,卵巢萎缩,呈皱缩厚后囊状,卵巢壁上的平滑肌纤维松弛,厚度明显增加。此时相的卵母细胞呈圆球形,卵黄颗粒已经相互融合,核膜消失,此时为 VI 期卵巢(图 1d)。

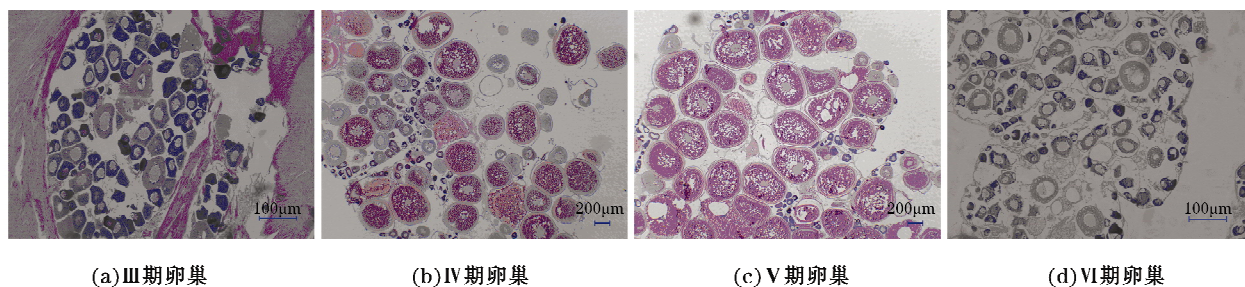


图 1 条石鲷卵巢发育不同时期的形态图

Fig. 1 The morphological characteristics in ovarian development stages of female *Oplegnathus fasciatus*

2.2 条石鲷 GtH α 的序列分析和蛋白质结构预测

条石鲷 GtH α cDNA 全长为 897 bp,编码 132 个氨基酸,包括 1 个 399 bp 开放阅读框、1 个 249 bp 的 5' 非编码区和一个 249 bp 的 3' 非编码区,在 Genbank 注册号为 KM507036。第 1~38 个氨基酸为信号肽,第 39~132 个氨基酸为成熟肽。成熟肽序列包含了 10 个保守的 Cys 残基,分别位于第 49,52,69,72,73,100,101,122,124,127 氨基酸残基处,在第 122 和 124 Cys 残基中间间隔了 1 个 His,形成 CXC 型趋化因子的特征结构(图 2)。此外,在 GtH α 氨基酸序列中发现了 2 个 N-糖基化位点(NIT)和(NHT)(图 3),在 3' 端非编码区内含有 1 个加尾信号 ATTTAA(图 2)。

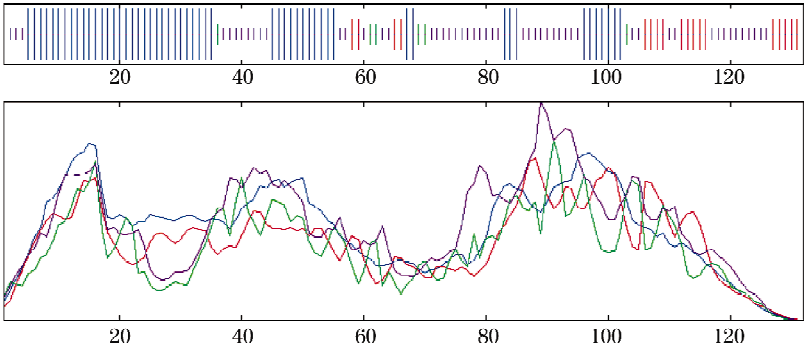
通过 SOPMA 软件进行蛋白质结构分析显示,在 GtH α 蛋白质的二级结构中, α -螺旋占 41.67%, β -转角占 4.55%,无规则卷曲占 40.15%,延伸链占 13.64%(图 3)。通过 I-TASSER 软件预测了条石鲷 GtH α 蛋

白质的三级结构(图 4)。结果表明存在典型的 CXC 趋化因子的空间结构,它包含 1 个 N 末端环状结构(loop),3 个反向平行的 β 链以及 1 个 C 末端的 α 螺旋。该蛋白的分子量为 14.59 kDa,等电点为 8.41。

```
-250                                ACA TGG GGA
-241 GTC AGG ATG GAA GGA TAA TGG AAG TAT GTT TTG GCT TTC CAC TGT TTG TTC TTA TCA TTT
-181 TGT GCT TTA ATG GGA TTA TGA GAA AGG TTG CAA AGT GGC CAG TGA GTC AGT GAG ATC ATT
-121 GAT AAG GTT GGT AGG TTT CAC TTA ATC CAG GAA GTC GTC ACA GAC TGA GGG ACG CGG GTA
-61 TAA ATC GAC CTG GAC TGG GAC AGA AGT CCT CAA TAA AAA GCC ATC CTG CAC AGA GTC ACA
1  ATG AAG GGG GGA CTG TCT CTC AAC ATG GTA ACT GCT GCA ACC ACA ATG GGC TCA GTG AAG
M K G G L S L N M V T A A T T M G S V K
61 TCA GCT GGA CTG TCT CTT CTT CTC TTG TCT TTT TTT CTT TAT GTA GCT GAT TCT TAC OCC
S A G L S L L L L S F F L Y V A D S Y P
121 AAC ATT GAC TTA TCA AAC ATG GGC TGT GAG GAG TGC ACA CTG AGA AAG AAC AGT GTT TTC
N I D L S N M G C E E C T L R K N S V F
181 TCG AGG GAC CGT CCG GTC TAC CAG TGC ATG GGC TGC TGC TTC TCC AGA GCG TAC CCG ACG
S R D R P V Y Q C M G C C F S R A Y P T
241 CCT CTC AAG GCC ATG AAG ACA ATG ACG ATC CCA AAG AAC ATC ACC TCG GAG GCA ACG TGC
P L K A M K T M T I P K N I T S E A T C
301 TGT GTC GCA AAG CAT AGC TAC GAG ACA GAG GTG GCC GGC ATA AGG GTG AGA AAC CAC ACA
C V A K H S Y E T E V A G I R V R N H T
361 GAC TGC CAC TGC AGC ACC TGC TAT TTT CAC AAG ATA TGA CAG ATG GGA ACT GGA GAC CAC
D C H C S T C Y F H K I *
421 TCA GCT TGG CGA CAA ATT GTG TTT CTT TTA ATA TGC AAA AGC TCT TCT CTG TTT TAA AAC
481 TGA TGT TCT TGT GTG GCC AGA TAA TAT TTT TGT AGC GAC TCT GTG TCT GTG ATG TGT AAT
541 TAG CCT CCA GTT TTG CAT TTG ATA GAT GTA TAT GAT TAA TTG TAG ATT GAA AAG CAA TTA
601 AAA TGT GCA CCC AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
```

注:黑色阴影部分表示起始密码子;方框部分表示终止密码子;下划线部分表示加尾信号;椭圆部分表示 10 个半胱氨酸
图 2 条石鲷 GtH α cDNA 全长以及推断的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of gonadotropin hormone common- α subunit from *Oplegnathus fasciatus*



注:蓝色表示 α -螺旋;绿色表示 β -转角;紫色表示无规则卷曲;红色表示延伸链
图 3 SOPMA 软件对条石鲷 GtH α 蛋白二级结构的分析结果

Fig. 3 Secondary structure of *Oplegnathus fasciatus* GtH α protein analyzed by SOPWA

图4 I-TASSER 软件对条石鲷 GtH α 蛋白三级结构的分析结果Fig. 4 Tertiary structure of *Oplegnathus fasciatus* GtH α protein analyzed by I-TASSER

2.3 条石鲷 GtH α 氨基酸的同源性比较及系统进化分析

将条石鲷的 GtH α 氨基酸序列与其他物种的 GtH α 氨基酸序列进行同源性比较,结果表明:条石鲷的 GtH α 与鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)的同源性最高,为 98%;与鲈形目真鲷(*Pagrus major*)、棘池蝶蚌(*Ac-anthopagrus schlegelii*)、条纹鲈(*Morone saxatilis*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、小丑鱼(*Amphiprion melanopus*)的同源性分别为 96%,94%,94%,97%,97%,87%,87%;与其他脊椎动物 GtH α 氨基酸序列的同源性在 53%~87%(图 5)。

通过 MEGA5.0 软件构建了条石鲷 GtH α 氨基酸序列的 NJ 系统进化树。结果表明:条石鲷与鲈形目鱼类的亲缘关系较近,与硬骨鱼类构成一个大分支,与鲈鱼和条纹鲈聚为 1 个小分支,这与上述 Blast 的分析结果一致(图 6)。

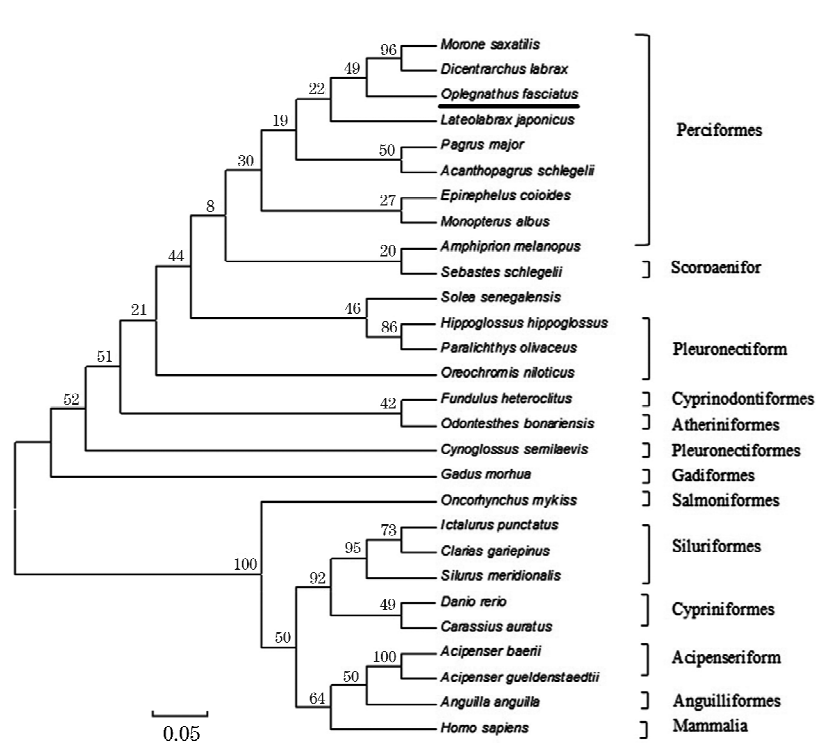
	Signal peptide	1	2	3	45
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	MKGGLSLNMTATNGSVKSGLSLLLSFFLYVADS	YPMIDLSNNGCEETLRKNSVFSR-DKPYQNGCTFSRAYPTPL			
<i>Morone saxatilis</i>					
<i>Dicentrarchus labrax</i>					
<i>Lateolabrax japonicus</i>					
<i>Pagrus major</i>					
<i>Monopterus albus</i>					
<i>Epinephelus coioides</i>					
<i>Solea senegalensis</i>					
<i>Oreochromis niloticus</i>					
<i>Amphiprion melanopus</i>					
<i>Cynoglossus semilaevis</i>					
<i>Odonotosthes bonariensis</i>					
<i>Fundulus heteroclitus</i>					
<i>Carassius auratus</i>					
<i>Clarias gariepinus</i>					
<i>Danio rerio</i>					
<i>Anguilla anguilla</i>					
Human					

	67	8	9	10
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	KAMKMTIPNITSEATGVAKHSYET-EVAGIRVMHTDCHSTGYFHKI			
<i>Morone saxatilis</i>				
<i>Dicentrarchus labrax</i>				
<i>Lateolabrax japonicus</i>				
<i>Pagrus major</i>				
<i>Monopterus albus</i>				
<i>Epinephelus coioides</i>				
<i>Solea senegalensis</i>				
<i>Oreochromis niloticus</i>				
<i>Amphiprion melanopus</i>				
<i>Cynoglossus semilaevis</i>				
<i>Odonotosthes bonariensis</i>				
<i>Fundulus heteroclitus</i>				
<i>Carassius auratus</i>				
<i>Clarias gariepinus</i>				
<i>Danio rerio</i>				
<i>Anguilla anguilla</i>				
Human				

注:细框部分代表半胱氨酸残基位点;粗框部分代表 N-糖基化位点

图5 条石鲷 GtH α 氨基酸序列与其他物种 GtH α 氨基酸序列的比较

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of gonadotropin hormone common- α subunit from *Oplegnathus fasciatus* with other species



注:条石鲷用直线标出

图 6 条石鲷 GtH α 氨基酸序列与其他脊椎动物 GtH α 的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of GtH α , showing the relationship between *Oplegnathus fasciatus* and other known vertebrates

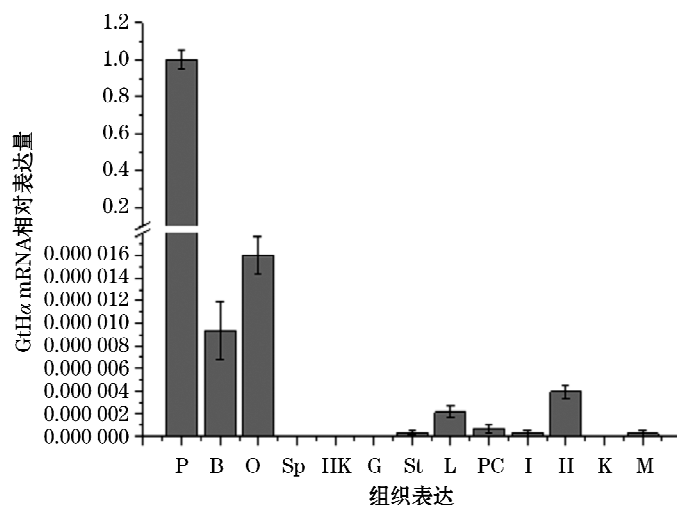
2.4 条石鲷 GtH α 在不同组织中的表达分布

采用 Real time PCR 法,以 β -actin 基因为内参,检测 GtH α mRNA 在条石鲷不同组织中的表达分布情况。结果表明:GtH α mRNA 在除脾脏、头肾、鳃、肾脏的所有组织都有表达,但在表达量上有明显差异,GtH α mRNA 在垂体中的表达量与其他组织差异极显著($P < 0.01$)。而 GtH α mRNA 在脑和性腺的表达量相对于心、肝脏、胃、肠、肌肉、幽门盲囊差异显著($P < 0.05$),而在胃、幽门盲囊、肠、和肌肉之间的表达差异不显著($P > 0.05$)。

2.5 GtH α 在条石鲷卵巢发育不同时期的表达水平

利用荧光定量 PCR 法检测了 GtH α 在雌性条石鲷卵巢发育不同时期垂体、卵巢、脑中的相对表达水平。与脑和性腺相比,垂体中的 GtH α mRNA 在卵巢发育各个时期都有较高的表达水平。利用 SPSS 16.0 软件显著性检验分析得出,GtH α mRNA 在各繁殖周期垂体、脑、卵巢组织的表达水平差异显著($P < 0.05$)。

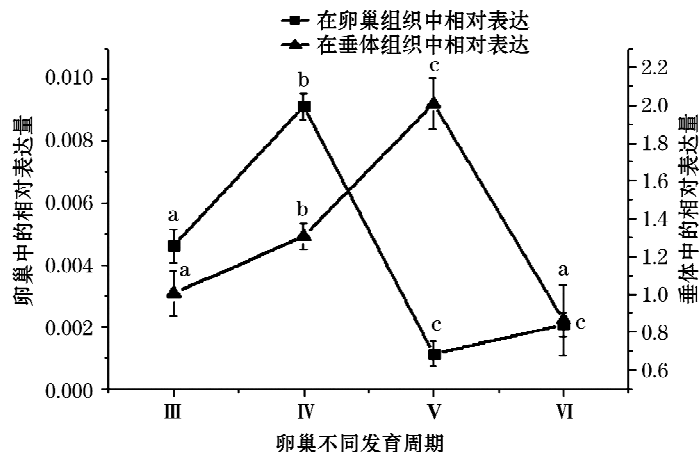
在垂体组织中,GtH α mRNA 在 III ~ V 期的相对表达量逐渐上升,到 V 期时达到最高水平,到 VI 期时显著下降(图 8);在卵巢组织中,GtH α mRNA 在 III ~ IV 期的相对表达量急剧上升,到 IV 期时达最高水平,在 V 期又急剧下降,达到最低值,在 VI 期又开始慢慢回升(图 8);在脑组织中,GtH α mRNA 在 III ~ V 期的相对表达量逐渐下降,到 V 期时达最低水平,并明显低于其他发育期水平,之后在 VI 期时又开始上升(图 9)。



注: P: 垂体; B: 脑; O: 卵巢; Sp: 脾; IIK: 头肾; G: 鳃; St: 胃; L: 肝脏; PC: 幽门盲囊; I: 肠; II: 心脏; K: 肾; M: 肌肉

图 7 条石鲷 GtHα mRNA 在不同组织中的相对表达水平

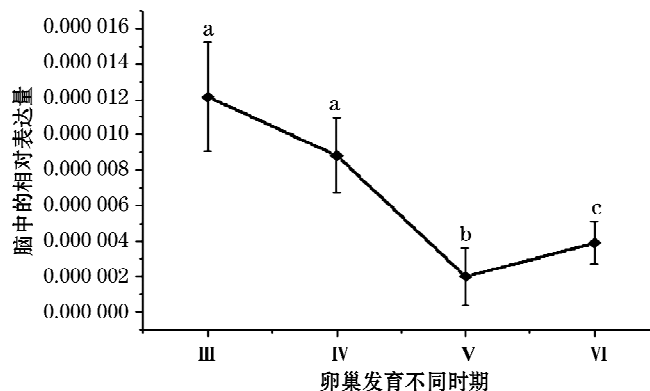
Fig. 7 The relative expression level of GtHα mRNA in various tissues of *Oplegnathus fasciatus*



注: III: III期卵巢; IV: IV期卵巢; V: V期卵巢; VI: VI期卵巢; 凡无相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 8 卵巢和垂体中 GtHα mRNA 在条石鲷卵巢不同发育时期的相对表达量

Fig. 8 The relative expression of GtHα mRNA of ovarian and pituitary in different ovarian development stage of *Oplegnathus fasciatus*



注: III: III期卵巢; IV: IV期卵巢; V: V期卵巢; VI: VI期卵巢; 凡无相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 9 脑中 GtHα mRNA 在条石鲷卵巢不同发育时期的相对表达量

Fig. 9 The relative expression of GtHα mRNA of brain in different ovarian development stage of *Oplegnathus fasciatus*

3 讨 论

利用 RT-PCR 和 RACE 法从条石鲷垂体中扩增出了全长 897 bp 的 GtH α cDNA 序列。序列分析发现,在其成熟肽序列中存在 10 个保守的 Cys 和 2 个 N-糖基化位点,这些保守部分可能参与了促性腺激素亚型和受体结合^[22]。系统进化树分析发现,条石鲷与多数鲈形目鱼类在 1 个分支节点上,这与形态学上得出的分类进化地位相一致。此外,还发现 GtH α 在硬骨鱼类和哺育动物中高度保守,这可能是因为所有脑垂体中的糖蛋白类激素都可以与其结合,GtH α 在较高的进化选择压力下形成了保守的结构。本研究从条石鲷脑垂体中克隆到 1 种 GtH α ,这与莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[23]和中华鲟(*Acipenser sinensis*)^[24]均只有 1 种 GtH α 亚基的报道一致。

采用实时定量荧光 PCR 方法检测了 GtH α 在各组织中的相对表达水平。结果发现 GtH α mRNA 主要在垂体中表达,该特征与其他硬骨鱼类的相同^[25],表明垂体是其分泌的主要部位;研究还发现 GtH α mRNA 在脑、性腺中的表达量较低,在心脏、肝脏、胃、肠、肌肉、幽门盲囊中微量表达,这种多组织表达特性暗示 GtH α 除通过垂体分泌参与卵母细胞的发育成熟调控之外,还可能有更为广泛的生理功能。Mittelholzer 等^[26]采用实时荧光定量 PCR 方法检测到大西洋鲑鱼(*Gadus morhua*)的 GtH α mRNA 在垂体、脑、性腺、肝脏和鳃中表达;但是在检测的心、头肾、肌肉、肠、脾脏中没有发现 GtH α mRNA 的表达。一些学者运用 RT-PCR 和免疫细胞化学染色法证明了 GtH α 在一些鱼类^[27-28]、哺乳动物(包括人类)^[29]垂体之外的组织存在着表达。GtH α lpha 在不同组织的表达特征,说明了促性腺激素存在多种调控机制。

采用 Real Time PCR 法检测了 GtH α 在条石鲷卵巢发育不同时期表达水平变化。结果发现:条石鲷垂体中的 GtH α mRNA 在 V 期达到最大值,表明 GtH α 在卵黄生成和卵母细胞成熟阶段发挥作用,这与雌性鲑科鱼周期表达的结果相一致^[30]。Santos 等^[31]在研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)时也发现 GtH I mRNA 的表达量在卵黄形成阶段逐步上升,在即将排卵时,垂体中 GtH II 的浓度急剧增大,达到最大值,表明 GtH I 和 GtH II 在虹鳟生殖的不同时期有不同程度的合成与分泌,因而对性腺的发育和配子的产生起着不同的生理功能。Shimizu 等^[32]在研究底鳉(*Fundulus heteroclitus*)时发现产卵期垂体中 2 种 GtH 细胞都很丰富,表明卵母细胞的最终成熟需要 2 种 GtH 的参与。对于 GtH α 在条石鲷生殖周期垂体中的这种表达特性是否是由垂体中 GtH II 的大量分泌而引起的,以及调控 GtH α 在条石鲷生殖周期垂体中表达量不同的具体机理还有待进一步研究。

本研究还发现,卵巢中 GtH α mRNA 表达水平在 IV 期达到最大值,而在 V 期达到最低值,这可能暗示着 GtH α mRNA 直接参与了卵黄的早期发育。GtH 是性腺产生性激素的主要调控者:一方面,垂体分泌的 GtH 通过血液迁移到性腺中,与其受体 GtHR 结合以促进性腺成熟;另一方面,GtH 可能是通过调节芳香化酶基因的表达和芳香化酶的活性来刺激卵巢自身分泌雌二醇进一步来调节性腺的发育、配子的生成以及卵母细胞的最后成熟^[33]。Liu 等^[34]在研究罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)时也发现卵巢中 GtH α mRNA 在 IV 期达到最大值,表明卵巢中 GtH α mRNA 可能在鱼类生殖、细胞增殖以及早期卵巢分化和成熟中发挥重要作用。这些结果表明条石鲷的内分泌调节系统可能具有更为复杂的作用模式。此外,关于 GtH 对鱼类生殖调控的内部机制以及 GtH 自身分泌调控的内部机制问题,仍需要进一步研究和探讨。

参考文献(References):

- [1] LIN H R. Fish physiology[M]. Guangzhou:Guangdong Higher Education Press, 1999: 146-261. 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州:广东高等教育出版社, 1999: 146-261.
- [2] YARON Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp[J]. Aquaculture, 1995, 129(124):49-73.
- [3] PIANSA J V, ATHIOS J, SWANSON P. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish[J]. Biological Reproductive, 2000, 62(5):1262-1269.

- [4] YARON Z, GUR G, MELAMED P, et al. Regulation of fish gonadotropins[J]. International Review of Cytology, 2003, 225(1): 131-185.
- [5] JAMESON J L, HOLLENBERG A N. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression[J]. Endocrine Reviews, 1993, 14(1): 203-221.
- [6] ARAI Y, KUBOKAWA K, ISHII S, et al. Cloning of cDNA encoding the common alpha subunit precursor molecule of pituitary glycoprotein hormones in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 110(1): 109-117.
- [7] NORBERG B, KJESBU O S, TARANGER G L, et al. Proceedings of the sixth international symposium on the reproductive physiology of fish[C]. Bergen; University of Bergen, 1999: 462-465.
- [8] YOSHIURA Y, KOBAYASHI M, AIDA K. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH- I β and GTH- II β) from the goldfish, *Carassius auratus*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1997, 105(1): 379-389.
- [9] SO W K, KWOK I F, GE W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity[J]. Biology of Reproduction, 2005, 72(1): 1382-1396.
- [10] SUZUKI K, KAWAUCHI H, NAGAHAMA Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands[J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 71(1): 292-301.
- [11] SWANSON P, SUZUKI K, KAWAUCHI H, et al. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GtII- I and GtII- II [J]. Biology of Reproduction, 1991, 44(1): 29-38.
- [12] LI X X, LIU X Z, SHI B, et al. Cloning and mRNA expression pattern of common glycoprotein α subunit of GtH in *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Fishery Sciences, 2013, 34(5): 23-34. 李晓晓, 柳学周, 史宝, 等. 半滑舌鳎促性腺激素 α 亚基 cDNA 的克隆及组织表达特征[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 23-34.
- [13] VAN DER KRAAK G, SUZUKI K, PETER R E, et al. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II[J]. General and Comparative Endocrinology, 1992, 85(2): 217-219.
- [14] NIU Y D, ZHOU Y, TAO M, et al. Cloning, expression and sequence analysis of two gonadotropin beta subunits cDNA in the bighead fish (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2008, 31(2): 120-124. 牛艳东, 周毅, 陶敏, 等. 鳊鱼 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 促性腺激素 β 亚基的克隆、表达与序列分析[J]. 湖南师范大学: 自然科学学报, 2008, 31(2): 120-124.
- [15] QUÉRAT B, SELLOUK A, SALMON C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63: 222-228.
- [16] QUN X C, LIU Y, YANG Y H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the two gonadotropins β -subunit cDNAs of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, (3): 377-385. 曲宪成, 刘颖, 杨艳红, 等. 团头鲂促性腺激素 β 亚基 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 水生生物学报, 2007, (3): 377-385.
- [17] ZHOU Y. Molecular cloning and expression analysis of gonadotropins and its receptors of *Ctenopharyngodon idellus* [D]. Hunan: Hunan Normal University, 2009: 23-34. 周毅. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 促性腺激素及其受体基因的克隆及表达分析[D]. 湖南: 湖南师范大学, 2009: 23-34.
- [18] ZHU Y D. Fujian Fishes (scroll down) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1985: 254-255. 朱元鼎. 福建鱼类志 (下卷) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 254-255.
- [19] NIU H X, CHANG J, MA S. Advances on the studies of biology and cultural ecology in Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus* [J]. Fisheries Science, 2008, 35(1): 50-52. 牛化欣, 常杰, 马胜. 条石鲷的生物学及养殖生态学研究进展[J]. 水产科技情报, 2008, 35(1): 50-52.
- [20] LIU X Z, XU Y J, WANG Y Y, et al. Characters of development and growth of early life stages of the rock bream *Oplegnathus fasciatus* [J]. Zoological Sinica, 2008, 54(2): 332-341. 柳学周, 徐永江, 王妍妍, 等. 条石鲷的早期生长发育特征[J]. 动物学报, 2008, 54(2): 332-341.
- [21] LIU J, CHEN S Q, WANG Y X, et al. The study of spawning type of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1978, 3(6): 247-257. 刘筠, 陈淑群, 王义铤, 等. 草鱼产卵类型的研究[J]. 水生生物学集刊, 1978, 3(6): 247-257.
- [22] GEN K, OKUZAWA K, SENTHILKUMARAN B, et al. Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63(1): 301-319.
- [23] GUR G, ROSENFELD H, MELAMED P, et al. Tilapia glycoprotein hormone α subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2001, 182(1): 49-60.
- [24] CAO H, ZHOU L, ZHANG Y Z, et al. Molecular characterization of Chinese sturgeon gonadotropins and cellular distribution in pitui-

- taries of mature and immature individuals[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 303(1):34-42.
- [25] KOICHIRO G, KOICHI O, BALASUBRAMA S, et al. Unique expression of gonadotro-pin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation[J]. Biology of Reproduction, 2000, 63(1):308-319.
- [26] MITTELHOLZER C, ANDERSSON E, TARANGER G L, et al. Quantification of gonadotro-pin subunits $GP\alpha$, $FSH\beta$, and $LH\beta$ mRNA expression from Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2009, 153(1):288-295.
- [27] PARIHAR I S, SOGA T, OGAWA S, et al. FSH and LH - β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost[J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 132(1):369-378.
- [28] WONG T T, ZOHAR Y. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Endocrinology, 2004, 145(1):5210-5220.
- [29] WÄHLSTRÖM M T, HUUHTANIEMI I, HIOVATTA O, et al. Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immuno-histochemistry and radio-receptor assay[J]. Clinical Endocrinology and Metabolism, 1983, 57(1):825-83.
- [30] SUZUKI K, KAWAUCHI H, NAGAHAMA Y. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins[J]. General and Comparative Endocrinology, 1988, 71(1):302-306.
- [31] SANTOSE M, RAND W M, TYLER C R. Follicle-stimulating hormone and its alpha and beta subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassays, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females[J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(1):288-294.
- [32] SHIMIZU A, TANAKA H, KAGAWA H. Immunocytochemical application of specific antisera raised against synthetic fragment peptides of mummichog GtH subunits: examining seasonal variations of gonadotrophs (FSH cells and LH cells) in the mummichog and application to other acanthopterygian fishes[J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 132(1):35-45.
- [33] KIM D J, CHOY C, SOHN Y C. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegelii*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis[J]. General and Comparative Endocrinology, 2005, 141(3):282-290.
- [34] LIU Z, ZHANG Y, WANG D. Studies on feminization, sex determination, and differentiation of the southern catfish, *Silurus meridionalis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008, 194(3):223-241.

Cloning and Expression Pattern of Gonadotropin Hormone Common- α Subunit in *Oplegnathus fasciatus*

CHEN Sheng-yi^{1,2,3}, SHI Bao^{1,2}, LIU Xue-zhou^{1,2*}, XU Yong-jiang^{1,2},
LI Xiao-xiao^{1,2,3}, WANG Shan-shan^{1,2}, WANG Yan-yan^{1,2}

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A full length cDNA sequence of gonadotropin hormone common α subunit was cloned from the pituitary of *Oplegnathus fasciatus* using by homology cloning and RACE techniques. The GtH α cDNA sequence consisted of 897 base pairs nucleotides, including 249 base pairs at 5' untranslated region, 249 base pairs at 3' untranslated region and an open reading frame with 399 base pairs nucleotides. The cDNA sequence encoded a precursor protein of 132 amino acids preceded by a signal peptide of 38 amino acids residues. The putative peptide contained ten cysteine residues and two N-glycosylation sites residues. A histidine residue in the middle of 122 and 124 cysteine formed a CXC chemokine characteristic structure. Sequences comparison and phylogenetic analysis showed that the GtH α of *Oplegnathus fasciatus* had higher identity to their orthologs of Perciformes (87%~98%) than to other vertebrates (53%~87%). The qRT-PCR results suggested that the level of GtH α mRNA was higher in pituitary, ovary, brain and trace expression in heart, liver, stomach, intestine, muscle and pyloric caecum. However, it was not found in kidney, Head kidney, spleen and gill by Real-time Quantitative PCR technique. The level of GtH α mRNA was highest in pituitary. The reproductive cycle expression showed that the level of GtH α mRNA in pituitary was maximum in the stage V of ovarian development and that in ovary was maximum in the stage IV. However, the level in brain was lowest in the stage V suggesting the regulation of GtH α in the ovarian development may through both autocrine and paracrine pathways. This research provides a reference to the reproductive regulation mechanism and artificial breeding techniques of *Oplegnathus fasciatus*.

Key words: *Oplegnathus fasciatus*; gonadotropin hormone common- α subunit; molecular cloning; expression; ovarian development cycle

Received: March 5, 2014