

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140383

半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用

柳学周¹, 史宝¹, 李晓晓^{1,2}, 徐永江¹, 王珊珊¹, 李晓妮¹

1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室; 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 中国水产科学研究院
黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为进一步提高半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)人工育苗技术水平, 对半滑舌鳎新型膜孕激素受体(mPR-like)基因进行研究。采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)方法, 获得全长为 2 002 bp 的半滑舌鳎新型膜孕激素受体的cDNA序列; 二级结构分析表明, 该蛋白存在 7 个跨膜区域; 三级结构分析表明该蛋白有多个结合位点。使用MEGA4.0 临位相联法和Clustal X方法对mPR-like的氨基酸序列进行聚类分析和序列相似度分析, 发现半滑舌鳎mPR-like与青鳉(*Oryzias latipes*)和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)的mPR-like聚为一支, 相似度分别为 68% 和 72%。应用实时定量PCR方法分析了mPR-like mRNA表达情况, 发现mPR-like mRNA在性成熟雌性半滑舌鳎不同组织表达具有广泛性, 但表达量存在差异, 在脑、卵巢、心脏、鳃、脾和胃等组织表达丰富; 在不同发育阶段卵母细胞中, mPR-like mRNA表达水平从II时相卵母细胞到V时相卵母细胞持续升高, 而在VI时相卵母细胞的表达水平显著下降($P<0.05$); 在半滑舌鳎繁殖周期的脑和卵巢组织中, mPR-like mRNA的表达水平从性腺发育II期到V期持续升高, 并且在V期达到最高峰($P<0.05$), VI期表达量开始下降; 在半滑舌鳎繁殖周期的垂体组织中, 不同繁殖期mPR-like mRNA表达水平变化幅度不大, 但在性腺发育V期时垂体中的表达量显著高于其他繁殖期($P<0.05$)。放射免疫测定的结果表明, 半滑舌鳎雌鱼血清中孕酮激素的含量变化在整个繁殖周期中差异显著($P<0.05$), 在性腺发育IV期含量迅速升高并在V期达到峰值。该基因在半滑舌鳎多种组织中的表达特征, 预示其具有多种生理学作用; 在卵母细胞和繁殖周期脑-垂体-卵巢的表达特征表明其参与卵母细胞成熟过程和生殖调控。

关键词: 半滑舌鳎; 新型膜孕激素受体; 基因克隆; 表达; 孕酮激素

中图分类号: Q959; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0608-12

鱼类卵母细胞在卵黄生成阶段完成后体积增至最大, 此时卵母细胞不能够受精, 第一次减数分裂没有完成; 卵母细胞停滞在有丝分裂前期。大量分泌的促性腺激素刺激卵巢滤泡细胞释放成熟诱导类固醇激素即孕激素, 成熟诱导类固醇激素促使鱼类卵母减数分裂重新开始^[1], 进而成熟诱导类固醇激素与卵母细胞膜表面的受体结合, 促进了卵母细胞成熟^[2]。卵母细胞成熟是其成功

受精的先决条件。Masui 等^[3]发现孕激素可以诱导两栖动物卵母细胞成熟, 并且孕激素能够把去除细胞核的卵母细胞诱导成熟, 依此推测孕激素受体位于卵母细胞核外。Sadler 等^[4]发现在分离得到的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞膜, 孕激素能够抑制腺苷酸环化酶活性, 这进一步说明孕激素能够在卵母细胞膜引起细胞内的反应。但是关于膜孕激素受体的研究进展较缓慢, 直到近年通

收稿日期: 2014-09-14; 修订日期: 2014-11-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201982); 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042); 留学人员科技活动项目择优资助经费项目。

作者简介: 柳学周, 研究员, 主要从事鱼类繁育理论与增养殖技术. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

过分子生物学实验方法确定了膜孕激素受体和相关功能特征分析,孕激素通过其膜受体发挥生理作用的重要性和复杂性才逐步被揭示。在硬骨鱼类发现增加膜孕激素受体的浓度后,孕激素诱导卵母细胞成熟的作用也增强^[5]。膜孕激素受体主要包括膜孕激素受体 α (mPR α)、膜孕激素受体 β (mPR β)和膜孕激素受体 γ (mPR γ),该受体家族在诱导鱼类和二栖类卵母细胞成熟、哺乳动物分娩等过程发挥重要作用^[6-8]。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*),研究报道了孕激素脂联素受体家族新成员(mPRL),并分析其系统发生;mPRL mRNA在牙鲆卵巢、精巢等繁殖相关组织表达丰富;在牙鲆精巢发育IV期mPRL mRNA表达水平逐步升高并在V期达到整个繁殖期最大值($P<0.05$),从V期到VI期mPRL转录水平下降^[9]。但在鲆鲽类雌鱼,mPRL基因生理作用未见报道。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Günther)为中国海水鱼类工厂化养殖的主要鱼类之一。近年来在生产实践中发现,大量使用的人工培育的半滑舌鲷亲鱼时常出现产卵效果不佳,卵子质量差等现象,影响了苗种生产^[10-11]。因此需要加强其性腺发育和卵母细胞成熟机理及调控方面的研究。在半滑舌鲷中克隆得到新型膜孕激素受体mPR-like基因的cDNA全长,并分析其系统发生,研究mPR-like基因在半滑舌鲷性成熟的雌鱼各组织、不同发育阶段卵母细胞以及繁殖周期内的脑-垂体-卵巢中的mRNA的表达特征,并结合繁殖周期血清中孕酮激素含量的变化情况,初步探讨半滑舌鲷mPR-like的生理功能。为今后人工亲鱼的培育和强化调控技术研究提供科学依据,以提高全人工苗种繁育效率。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验用性成熟的半滑舌鲷雌鱼取自青岛忠海水产有限公司,为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种,经室内人工养成达到性成熟的F₁亲鱼,半滑舌鲷雌鱼全长53~66 cm,体重1 266.3~2 271.0 g。其培育条件为:全年开放流

水培育,水温8~25℃,盐度27~31, pH 7.8~8.4,溶解氧5 mg/L以上。不同繁殖期时,在相同亲鱼培育池中随机选取4条半滑舌鲷雌鱼,连续采集1年。解剖前先用MS-222麻醉,测量实验鱼体质量和体长,尾静脉取血。迅速将半滑舌鲷各组织样品取出,卵巢和肝等称重,样品迅速放入液氮中冻存,然后转入-80℃冰箱保存备用。部分卵巢组织放于Davidesons AFA中固定,用于卵巢发育组织学观察。血液样品于4℃冰箱中静置4~6 h后,12 000 r/min离心10 min,取血清于-40℃中保存备用。

1.2 卵巢组织学分析

将固定在Davidesons AFA氏液中的卵巢组织取出,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。LEICA RM 2235型切片机(德国)切片,厚度为5 μ m,HE染色,中性树胶封片,LEICA DW4000B型显微镜(德国)下观察,选择典型切片进行显微摄影。根据HE染色结果,确定半滑舌鲷卵巢发育情况^[12-13]。

1.3 总RNA提取和cDNA第一链的合成

取于-80℃保存的半滑舌鲷卵巢组织,用RNAiso Plus (TaKaRa公司)抽提总RNA,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。采用Thermo公司Nanodrop 2000测定总RNA的浓度和纯度。取1 μ g总RNA,参照TaKaRa公司的PrimerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒说明,反转录成cDNA模板,-20℃保存备用。

1.4 mPR-like 基因克隆

1.4.1 mPR-like 基因保守片段克隆 使用简并引物mPRL/F(表1),以上述cDNA为模板,扩增mPR-like基因片段。PCR产物回收纯化后与pEASY-T1载体连接,转化到Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞中,在含有Amp抗性的LB平板培养基上培养12 h。随即挑取单克隆菌落,接种于含Amp抗性的液体培养基中,37℃培养8 h后进行菌液PCR。将阳性克隆送至北京华大公司测序。

1.4.2 mPR-like 基因全长克隆 提取半滑舌鲷新鲜性腺组织总RNA,用SMARTer™ RACE

cDNA Amplification Kit(Clontech 公司)试剂盒合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链, 各操作步骤、反应体系以及反应程序均按照试剂盒使用说明进行。合成的 cDNA 第一链分别用 Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech 公司)进行 PCR 扩增。引物 mPRLGSP1/mPRLNGSP1(表 1)用于 5'末端的扩增, 引物 mPRLGSP2/mPRLNGSP2(表 1)用于 3'末端的扩增。扩增产物经克隆、测序, 拼接获得全长序列。

表 1 半滑舌鳎 *mPR-like* 基因克隆与表达所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences for *Cynoglossus semilaevis* mRNA cloning and expression analysis

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') sequence (5'-3')
mPRLF	TTCCAGCGCCACAAYGAGAC
mPRLR	CACCTGGCACACCTTRCGCA
mPRLGSP1	CGTAACAGCAGCCGAGGCAGGACAGACA
mPRLNGSP1	CTGGCATGAAGATCCACGAACGTGTCTG
mPRLGSP2	ACCGAGACCGTAGACTTTGTGGGTGA
mPRLNGSP2	ACCATCGACACGTTCTGTGGGATCTTCA
RT-mPRLF	CAGGGAGTGTAATGTGAAAACAGG
RT-mPRLR	AAAGAGGACAGAAGGAGAATCAACA
RT-mPRLF2	TGTCTCTGTCACGCTCACT
RT-mPRLR2	CCCTGTCCCAAGAAATCACACT
18S F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC
18S R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC

1.5 序列分析

所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, Dnastar 软件分析蛋白分子量和等电点; 使用 SOSUI 软件分析跨膜区域^[14]; 应用 I-TASSE(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)进行蛋白质三级结构预测; 使用 Clustal X 2 进行多重序列比对, 分析半滑舌鳎 *mPR-like* 与其他物种的 *mPR-Like* 同源性高低; 系统进化树构建使用 MEGA6.0 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1 000)。

1.6 *mPR-like* mRNA 在雌鱼各组织及生殖周期中的表达

半滑舌鳎 *mPR-like* mRNA 在雌鱼各组织中的表达分析从挑取的 4 条性成熟的半滑舌鳎雌鱼, 提取脑、垂体、卵巢、鳃、心脏和头肾等 12 种组织的总 RNA 并参照 TaKaRa 公司的 PrimerScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成

cDNA 第一链并用于基因表达分析。半滑舌鳎 *mPR-like* mRNA 在不同发育阶段卵母细胞的表达分析^[15]: 分别从 II 时相、III 时相、IV 时相、V 时相和 VI 时相卵母细胞提取总 RNA 进行反转录用于基因表达分析; 每个卵母细胞发育时相设置 4 个重复。半滑舌鳎 *mPR-like* mRNA 在雌鱼生殖周期的表达分析: 分别从 II 期、III 期、IV 期、V 期和 VI 期的 4 条性成熟的半滑舌鳎, 各自提取脑、垂体和卵巢总 RNA 进行反转录用于基因繁殖周期表达分析。

荧光实时定量(qRT-PCR)反应体系为 20 μ L: 1 μ L cDNA 模板, 1.5 μ L 引物 RT-mPRLF/R 和 RT-mPRLF2/R2 (10 μ mol/L), 10 μ L SYBR Premix ExTaqTM II 和 6 μ L dH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 18 s 共 40 个循环。使用 18S rRNA 基因作为内参对照, 用以校正所有样品中 RNA 的量。荧光实时定量 PCR 反应及信息的收集都在 Mastercycler ep realplex 实时定量 PCR 仪(Eppendorf 公司)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线(melting curve)分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行复孔, 重复 3 次实验, 同时实验设阴性对照, 以确认实验结果的可靠性。

1.7 血清孕酮含量测定

采用放射免疫测定方法, 测定半滑舌鳎血清中孕酮激素在繁殖周期的含量变化, 每个繁殖阶段测定 4 个样品。孕酮放射免疫测定试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, 测定方法参照其说明书, 采用双管平行进行测定。测定的精密度在批次内为 7.2%, 批次间为 8.9%。测定的灵敏度为 0.03 ng/mL。

1.8 数据处理与分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法^[16]计算处理后, 再用 SPSS16.0 进行数据处理和显著性检验分析($P<0.05$)。相对表达量数据均表示为平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$), 并制成柱状图。孕酮激素测定数据均表示为平均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$), 采用单因素方差分析并进行显著性检验分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 卵巢发育组织学分析

对半滑舌鲷卵巢组织切片的 HE 染色结果进行分析, 采用性腺切面中平均面积超过50%或居

最高比例的卵细胞的对应时相来确定性腺的发育时期。对实验样品进行分析, 将采集的卵巢组织样本分为5个期: II期卵巢, III期卵巢, IV期卵巢, V期卵巢和VI期卵巢(图1)。

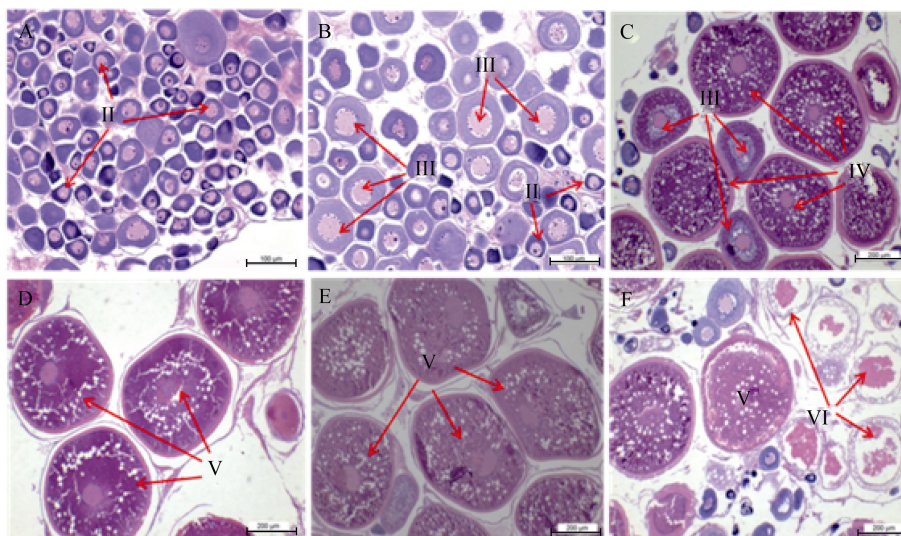


图1 半滑舌鲷各期卵巢组织切片

A: II期卵巢, 比例尺=100 μm ; B: III期卵巢, 比例尺=100 μm ; C: IV期卵巢, 比例尺=200 μm ; D和E: V期卵巢, 比例尺=200 μm ; F: VI期卵巢, 比例尺=200 μm 。

图中标注的II、III、IV、V和VI分别指对应时相的卵母细胞。

Fig. 1 The stained sections for each of ovarian stage of *Cynoglossus semilaevis*

A: ovary of stage II, bar=100 μm ; B: ovary of stage III, bar=100 μm ; C: ovary of stage IV, bar=200 μm ; D&E: ovary of stage V, bar=200 μm ; F: ovary of stage VI, bar=200 μm .

The symbols of II, III, IV, V, and VI were corresponding to the phases of oocytes.

2.2 mPR-like 的序列分析和蛋白质结构分析

从半滑舌鲷卵巢内分离得到了 *mPR-like* 基因全长 cDNA, 该 cDNA 全长为 2 002 bp, 5'非编码区为 163 bp, 3'非编码区 783 bp, 同时在 3'非编码区发现有典型的加尾信号 AATAAA; 该基因的开放阅读框为 1 059 bp, 编码 352 个氨基酸, 分子量为 40 kD (GenBank 登录号为 KF277065) (图2)。采用 SOSUI 软件预测蛋白质二级结构, 发现半滑舌鲷 *mPR-like* 是具有 7 个跨膜区域的膜蛋白 (图3)。通过 I-TASSER 软件预测了半滑舌鲷 *mPR-like* 蛋白质的三级结构, 发现在其蛋白质三级结构中存在多个蛋白结合位点(图4)。

2.3 mPR-like 氨基酸同源性比较及系统进化分析

对半滑舌鲷 *mPR-like* 氨基酸序列与青鳉和

三刺鱼的 *mPR-like* 氨基酸序列进行比对, 发现半滑舌鲷 *mPR-like* 氨基酸序列与其他鱼类的 *mPR-like* 氨基酸序列较为保守(图5)。对半滑舌鲷 *mPR-like* 氨基酸序列与上述的硬骨鱼类的 *mPR-like* 氨基酸序列同源性进行分析, 结果表明半滑舌鲷 *mPR-like* 与青鳉(*Oryzias latipes*)的同源性为68%, 与三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)同源性为72%。

为分析半滑舌鲷 *mPR-like* 的进化地位, 构建了14个物种的 *mPR* 家族成员氨基酸序列系统进化树, 包括硬骨鱼类和哺乳类(图6)。结果发现此进化树共分为3大分支, 分别为 *mPR α* 分支、*mPR-like* (缩写为 *mPRL*)分支、*mPR β* 分支; 半滑舌鲷 *mPR-like* 基因属于硬骨鱼类 *mPR* 家族新基因分支。

```

-163          ACATGGGGGTCTCCGGGGCGCAGAGTCAGGAGGTGTTCAACCC
-121  AGGCCAACACCGTTTGGATTGCACACACAAGCGGAGAGGCCCCAGCAAGGTGCTGGTCAGC
-60  GGGGAAGTGAACGCATCTGACCGCTGCCGAGCTGAGTGATCAACTTCTCTGGCAGTC
1    ATGTCGACCATTTGGTGGAGAGAATTGGGCGATTGTTTCATCAGCCTGCAGCAGATCAGG
1    M A T I V V E R I G R L F I S L Q Q I R
61   CAGATTCCCCAAATGCTCACTGAAGCTGCACCATCTATGCCTGACACGGTCAGAGACGCA
21   Q I P Q M L T E A A P S M P D T V R D A
121  GACGTCCTCATTATTTACGGGAGTGTAATGTGAAAACAGGCTACAGGCCACTTCACCAG
41   D V P H Y F R E C N V K T G Y R P L H Q
181  AATTGGCGCTATTACTTCTGTCGTTGTTCCAGCGTCACAAAGAGACCATCAATATCTGG
61   N W R Y Y F L S L F Q R H N E T I N I W
241  ACGCACTTGTGGCCTTTTAAATTTACTGATCAAACTTCGACATCTTACCGAGACCGTA
81   T H L L A F L I L L I K L R H L T E T V
301  GACTTTGGGGTGACCTCATTCGTGGCCCTGTTGATTCTCTTCTGCTCTTTAAAC
101  D F V G D P H S W P L L I L L L S S L T
361  TACACGGCCTTTAGTGAACAGCTCACTTGCTGGGCGAGAAATCTAAGCTGTGCCATTTT
121  Y T A F S V T A H L L G S K S K L C H F
421  GCCTTCTATTTCTGGATTATATCGGTGTGGCAGTATCAGTATGGCAGTGTGTAGTT
141  A F Y F L D Y I G V A Q Y Q Y G S A V V
481  CACTTTTACTGTGCATGGATGAAAGCTACCATCGACACGTTGTTGGGATCTTCATGCCA
161  H F Y C V M D E S Y H R H V R G I F M P
541  GCTGCCACCTCTCAGCTGTCTGCTCGCTCGGCTGCTGTTACGGCAAATACTGCAAC
181  A A T L L S C L S C L G C C Y G K Y C N
601  TATGGCCGGCAGCGTGGGTGCGCAAGGTCGGTCAGGTGGTGCCTCCGCGATTGCCTAC
201  Y G R P A W V R K V G Q V V P S A I A Y
661  ATATGGGACAGCAGTCTATCATTGGGAGACTCTTGTCTCGTCCAGCGTCACTGAGGAC
221  I W D S S P I I G R L L S S S S V T E D
721  CCTGCACTCATTATCACTTTGGCCAGGTGGGGTCTTTCTCGGTGCGCCTTTTTTTTC
241  P A L I Y H F G Q V G F F L G C A F F F
781  ACCTGTCCAGTTTTTGAACGCTGCTTCCAGGACAGTGTGATTCTTGGGACAGGGTCAC
261  T C P V F E R C F P G Q C D F L G Q G H
841  CCGGTTTTCCATGTCTTGCTATCTTGTGTACACTGTGTCAAATCCAGCCTCTTACCTG
281  P V F H V L L S C C T L C Q I H A S Y L
901  GACTACATCGGTGGAAGGAGCTGTACTCACACCTGCATGGAACGGTGAGGCCTTAGTC
301  D Y I G R R E L Y S H L H G N G E A L V
961  TTTGTGGACTCTATGCTGCTACTTTAGTTGCATGTGGGTCATTTATGTAGTCATGCTA
321  F V G L Y A V T L V A C G F I Y V V M L
1021 CGAAAAGCAAAACGAGAGCTTGACCTGAGGTCCGAGTAAACACCACTGTTTCAGTTTTTC
341  R K A K R E L D L R S E *
1081 TTTCTAACTAGATGACTAACAACTAATCTGAGGCCATGCTTTATTTTGTGCTTTCA
1141 TTTAATTGTAGTCAAAACACTGTTAGCACTGTTGCGCACTCTGCCAAAATAGTCATTGGA
1201 AAGCATTCACTGCCAGTGTCTTCACTTAGGCTAAATATTATCTAGAAGATTATTAAA
1261 ATATCACCAGTGTAGTCGTTAGAAGATATTGTGTTAAGTCTTACTTGATTTTTTTT
1321 TAGAAGCACCAGCAAGTAGTTCATGCAGTACATGCAGGTTTTTACTTGTGATGTTATCGC
1381 CATATTTAAACAGGGCTAAGTGAATGTACAGAAAAATCTCCCGGAAAGAAAAATGTTCT
1441 TCTGTAATCTATGGAGTTTTAAAATTACACATAAACAAGTATATTTTAACATGTTCAAAG
1501 ACATTGTTACTAATTTAGCGGAAATAATCATGTTTGGTTTGTGTGCTGTAATGACAAT
1561 TTAAGGACCTTTTGAACCTTCAGCAGCTAATTGGATTTTAGCCATACTTGATTTAATA
1621 TCGAAACCTGGGCACATACTACTGAATATGGCCTTTTGAAGCCAAGTTTTTAATTGAA
1681 TATAGAACTTTTATATGTTACATAAATGTACTACTTATGGATAAAGGACCATACTAT
1741 GTAAGATTTAATTCGGAGACTTGTATGCCTACTACTGACCAGGATACTATATGTTAAT
1801 AAATATATTCTCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1839

```

图 2 半滑舌鳎 *mPR-like* cDNA 全长及其推断的氨基酸序列Fig. 2 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of *mPR-like* from *Cynoglossus semilaevis*

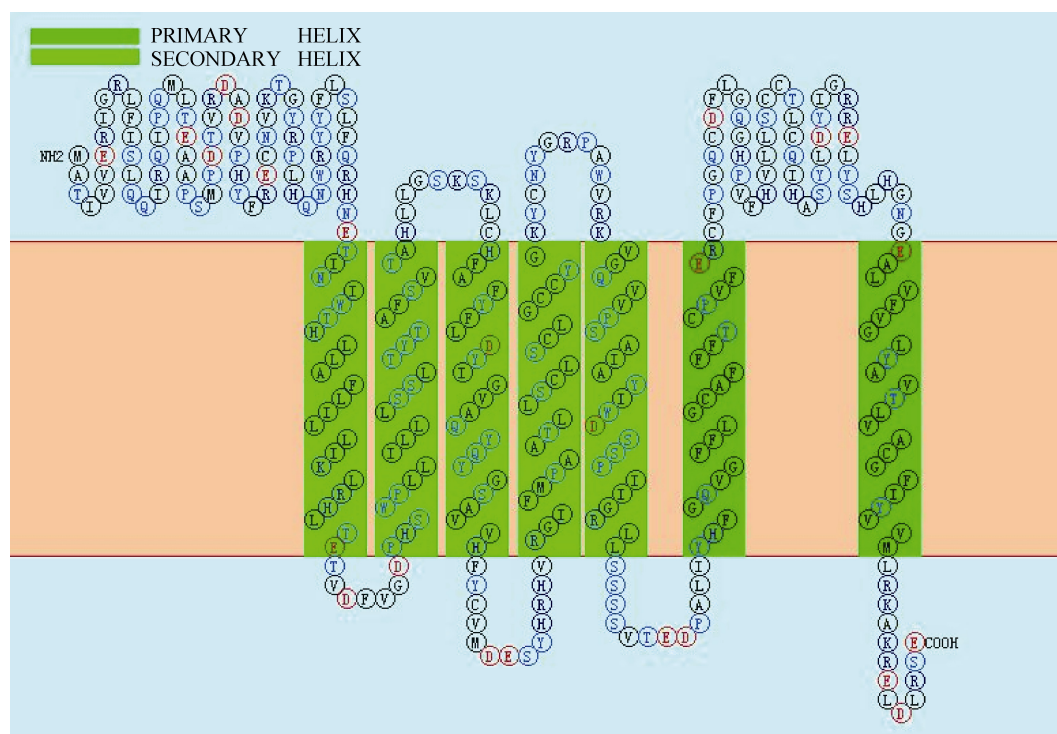


Fig. 3 Proposed model for mPR-like transmembrane domains of *Cynoglossus semilaevis*

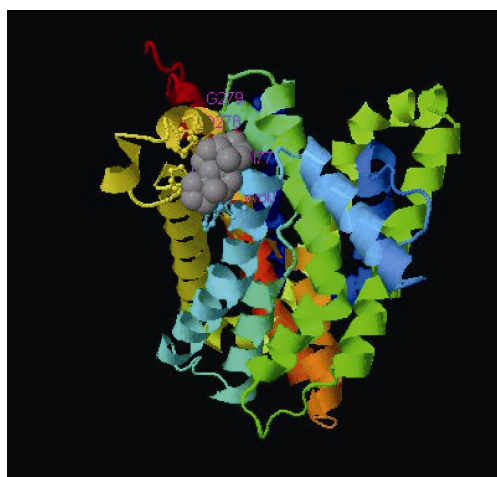


Fig. 4 Tertiary structure of mPR-like protein of *Cynoglossus semilaevis*

qRT-PCR 的分析结果表明 *mPR-like* 基因在半滑舌鳎卵母细胞不同发育阶段均有表达, 但其表达量有明显差异。 *mPR-like* 基因的表达水平从 II 时相卵母细胞到 V 时相卵母细胞持续升高, 而

C. S	MATIVVERIGRLFISLQQIRQIPQMLTEAAPSMPDTRDADVPHYFREC�VKTYRPLHQ	60
G. A	MATIVMESIGRVFISLQQIRGLPRMLTEAAPSMPGTVRDADVPYYFRERYVCGGYRPLHQ	60
O. L	MATIVMESIGRVFISLQQIRQLPRMLTQAAPSMPGTLRDTEVPFYFRERYVHYGYRPLDQ	60
	*****: * ****:***** :*:****:*****, *:***:*, **** * *****, *	
C. S	NWRYYFLSLFQRHNETINIWTHLLAFLILLIKLRHLETETVDFVGDPHSWPLLLSSLT	120
G. A	NWRYYFLSLFQRHNETVNVWTHLLAFLVILVKLRQLAESVDFAGDPHSWPLLLVSSLT	120
O. L	NWRYYFLSMFQRHNETINVWTHLLAFLVFLVKFHLSETVDFVNDSHSWPLLLVSSLT	120
	*****:*****:*:*****:*:***:*, ****, *, *****:*:*****	
C. S	YTAFSVTAHLLGSKSKLCHFAYFYFLDYIGVAQYQYGSVAVHFYCVMDSEYHRHVRGIFMP	180
G. A	YSAFSAAAHLLGGKSELCHYVFYFLDYVGVAQYQYGSVAVHFYAVDEGLGHGVRGVFMP	180
O. L	YSALSAAAHLLGGKSELCHYCFFFLDYVGVAQYQYGSVAVHYFFAVEEGLHQRVSGIFLP	180
	*:***:*, ****:***: *:*****:*****:*****:*, :*:*, * :*:*	
C. S	AATLLSCLSLGCCYGYCNYGRPAWVRKVGVVPSAIAYIWDSSPIIGRLLSSSVTETD	240
G. A	AAAALSCLSLGCCYGYCNHSLPPWVRKVCQVPSAMAYAWDSSPVAKRLASWG-AADD	239
O. L	VAALLSCLSLGCCYGYCNHSLPPWVRKVCQVPLTLAYVWDSSPVAWRLWAW-SSND	238
	. *: *****:*****:*, ***** **** :*: *****: ** : **	
C. S	PALIVHFGQVGFLLGCAFFFTCPVFERCFPGQCDLGGHPVFHVLSCCTLCQIHASYL	300
G. A	PAIAFHFGQFAFFLGCNVFFTPLLERCFPGRCNFVGQSHQMFHVLSCCTLCQIHASHL	299
O. L	PAVVYHFGQVAFLLSCAFFFTFPVLERLLPGRCDFLGHSQHLFHVLLSCCTWCQIHGSYL	298
	*: :****, .***, *: ,*** *:*** :***:***:*, * :***:***** ****, *:*	
C. S	DYIGRRELYSHLHGNGEALVFVGLYAVTLVACGFIYVVMRLKAKRELDLRSE--	352
G. A	DYAARRELYSRLHGSGEAGAFAGLYAATLAACALIAAVMLGRVKRVLADAKSK	353
O. L	DYVGRRELYQRLHRGWAAFAVGLYVVTFGGCAAIAAVMLQKVHVLQPSKSK	352
	** ,*****:*** , ** ,***, *: ,* ,* ,*** :*, *: :*	

图 5 半滑舌鲷 mPR-like 氨基酸与其他鱼类 mPR-like 氨基酸序列的比较
C.S: 半滑舌鲷, O.L: 青鳉, G.A: 三刺鱼.

Fig. 5 Alignment amino acid of *Cynoglossus semilaevis* mPR-like with other teleosts
C.S: *Cynoglossus semilaevis*; O.L: *Oryzias latipes*, G.A: *Gasterosteus aculeatus*.

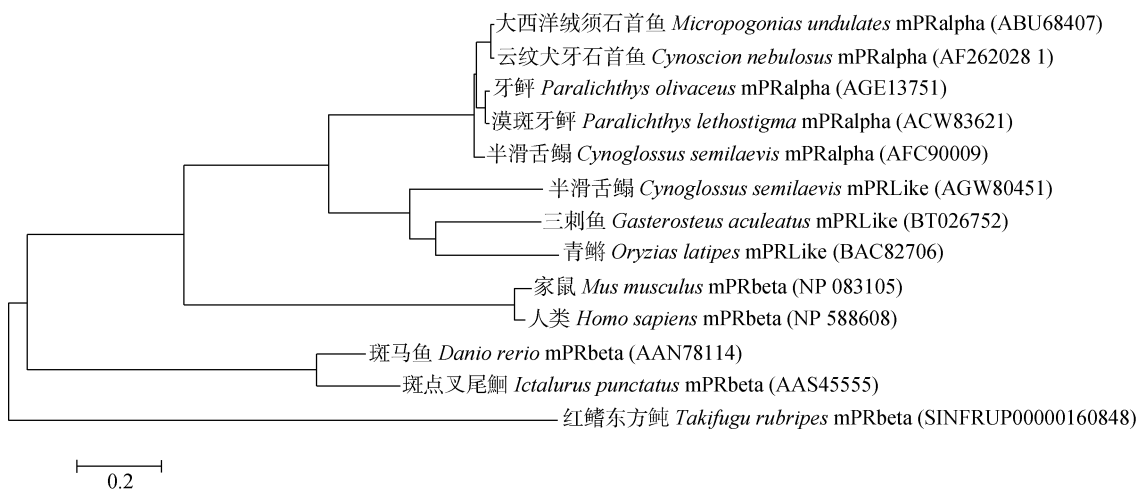


图 6 基于 MEGA 6.0 中的 NJ 方法的半滑舌鲷 mPR-like 与其他脊椎动物 mPR 家族成员进化树聚类分析
Fig. 6 Phylogenetic tree of the mPR-like from *Cynoglossus semilaevis* and other vertebrates mPR family in MEGA 6.0

在 VI 时相卵母细胞表达水平显著下降($P<0.05$)。对卵母细胞的不同发育阶段表达的分析,发现在卵母细胞成熟阶段表达水平达到峰值,预示

mPR-like 基因参与到卵母细胞的成熟过程(图 8)。
2.6 *mPR-like* mRNA 在繁殖周期的表达
qRT-PCR 的结果表明在半滑舌鲷繁殖周期的

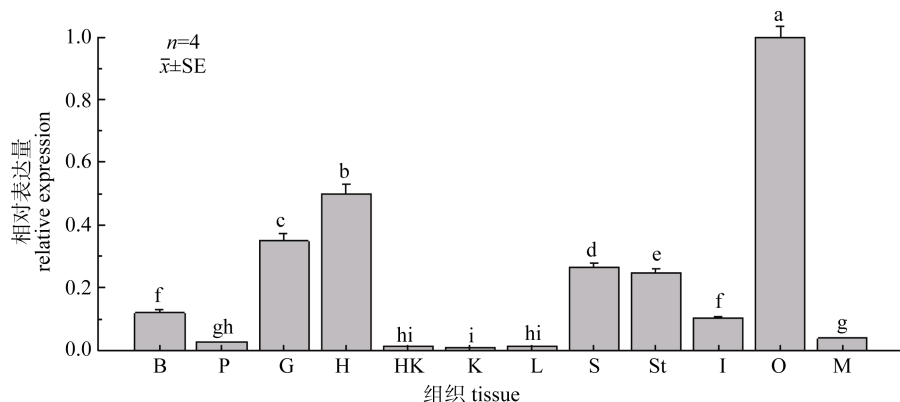


图 7 半滑舌鳎 *mPR-like* mRNA 在不同组织中的表达水平

B: 脑, P: 垂体, G: 鳃, H: 心脏, HK: 头肾, K: 肾, L: 肝, S: 脾, St: 胃, I: 肠, O: 卵巢, M: 肌肉。

无相同字母的两项间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 Expression level of *mPR-like* mRNA in different tissues of *Cynoglossus semilaevis*

B: Brain, P: Pituitary, G: Gill, H: Heart, HK: Head kidney, K: Kidney, L: Liver, S: Spleen, St: Stomach, I: Intestine, O: Ovary, M: Muscle.

Columns marked with different letter do differ significantly from each other ($P<0.05$).

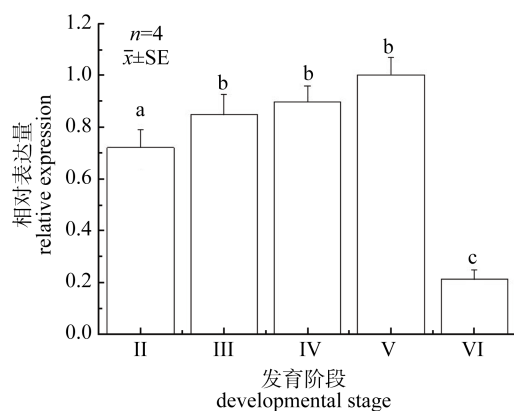


图 8 *mPR-like* mRNA 在半滑舌鳎

不同发育阶段卵母细胞中的表达

不同字母的两项间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 8 Expression level of *mPR-like* mRNA at various stages of oogenesis

Columns marked with different letters do differ significantly from each other ($P<0.05$).

脑组织中, *mPR-like* mRNA 的表达水平从卵巢发育 II 期到 V 期一直显著升高($P<0.05$), 并且在卵巢发育 V 期时达到最高峰, VI 期时该基因表达量下降。在半滑舌鳎繁殖周期的垂体组织中, *mPR-like* mRNA 的表达水平在繁殖周期变化幅度不大, 但是从卵巢发育 II 期到 V 期也是一直缓慢升高的, 而在 IV 期时有所下降, 并且卵巢发育 V 期时该基因在垂体表达量显著高于其他繁殖期($P<0.05$)。在半滑舌鳎繁殖周期的卵巢组织中,

mPR-like mRNA 的表达水平在繁殖周期不同阶段的变化是从 II 期到 III 期表达量稍微下降, 从 IV 期时表达量开始显著升高($P<0.05$), 并在 V 期时表达量迅速升高至整个繁殖期的最高峰, 到 VI 期时该基因的表达量迅速下降至整个繁殖周期的最低值(图 9)。

2.7 孕酮激素在半滑舌鳎繁殖周期中的变化

半滑舌鳎雌鱼血清中孕酮激素(progesterone, P)的含量变化在整个繁殖周期中差异显著($P<0.05$), 从卵巢发育 II 期到 III 期时含量开始升高, IV 期时含量迅速升高并在 V 期时达到繁殖周期的最高值, VI 期时孕酮激素含量开始下降(图 10)。血清中孕酮激素的含量变化与半滑舌鳎卵巢发育、成熟的过程相吻合, 说明孕酮激素在卵母细胞成熟和排卵过程中发挥重要的生理功能。

3 讨论

本研究首次克隆获得半滑舌鳎 *mPR-like* 基因的 cDNA 全长序列, 编码含有 352 个氨基酸的蛋白, 分子量为 40 kD。半滑舌鳎 *mPR-like* 具有典型的孕激素脂联素受体家族(PAQRs)的 7 次跨膜区域。同时, 在预测的该蛋白的三维空间结构中发现有多个蛋白结合位点, 这为 *mPR-like* 未来在生产实践中应用提供了依据。氨基酸序列多重

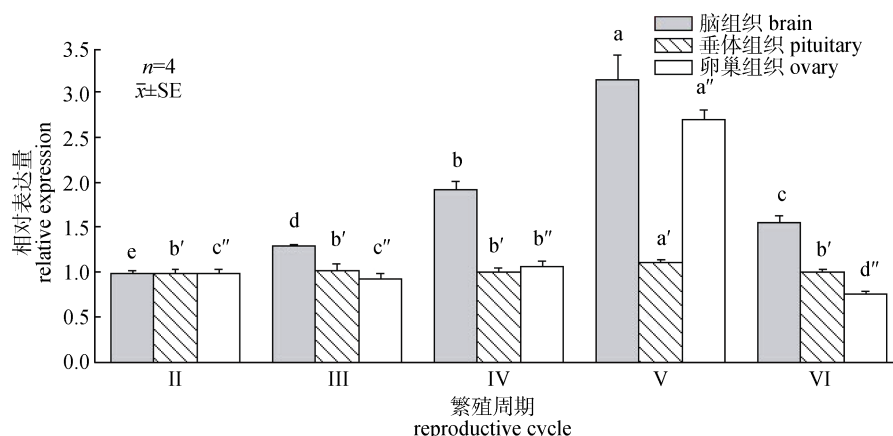


图 9 半滑舌鲷 *mPR-like* mRNA 在不同繁殖期的脑、垂体和性腺中表达水平
不同字母的两项间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 9 Expression level of *mPR-like* mRNA in brain, pituitary and ovary of reproductive cycle of *Cynoglossus semilaevis*
Columns marked with different letters do differ significantly from each other ($P < 0.05$).

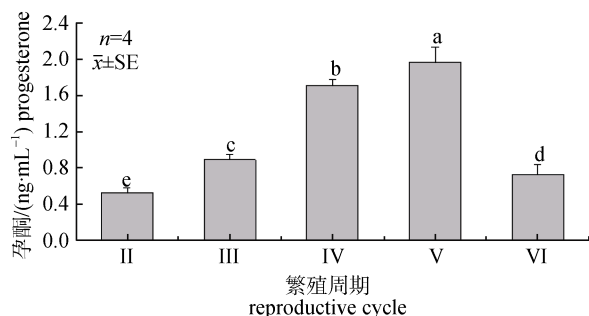


图 10 半滑舌鲷血清中孕酮在繁殖周期的变化规律
无相同字母的两项间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 10 Progesterone levels of *Cynoglossus semilaevis* in the reproductive cycle
Columnars marked by the different letter do differ significantly from each other ($P < 0.05$).

比较分析表明, *mPR-like* 在进化过程中较为保守, 半滑舌鲷 *mPR-like* 与其他硬骨鱼类 *mPR-like* 的氨基酸序列相似度达到 68%~72%, 同源性较高。对半滑舌鲷 *mPR-like* 的氨基酸序列与其他物种膜孕激素受体家族成员的氨基酸序列构建系统进化树, 显示出脊椎动物 *mPR-like* 系统分类关系, 即半滑舌鲷 *mPR-like* 与其他鱼类的 *mPR-like* 聚为一簇, 说明在长期进化过程中, 它们具有较近的亲缘关系。由上述分析也可以发现, 半滑舌鲷 *mPR-like* 属于硬骨鱼类膜孕激素受体家族新基因分支。

采用qRT-PCR的方法研究了性成熟雌性半滑舌鲷各组织中*mPR-like*基因的表达情况, 发现半

滑舌鲷*mPR-like* mRNA较丰富地表达在脑、垂体、卵巢、心脏、鳃、脾和胃等组织, 这表明*mPR-like* 可能在半滑舌鲷多种组织中参与调节孕激素的生理功能。Kazeto等^[17]采用qRT-PCR方法检测斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)膜孕激素受体家族成员基因的组织特异性表达, 发现*mPRα*和*mPRβ* mRNA主要分布在脑、垂体、心脏、卵巢和精巢等组织; *mPRγ* mRNA主要分布在脑、鳃、腹大动脉、肠、肾和精巢等组织。在本研究中发现半滑舌鲷*mPR-like* mRNA表达具有广泛性, 这与膜孕激素受体家族成员的基因表达模式相似。对膜孕激素受体家族基因在脑和垂体组织的生理功能报道很少。使用外源孕激素刺激离体培养的大西洋绒须石首鱼(*Micropogonias undulatus*)脑组织, 发现孕激素可抑制促性腺激素释放激素的分泌; 这种抑制作用进一步导致促性腺激素分泌减少, 同时刺激脑组织分泌孕激素, 并通过神经内分泌的途径协同促进卵母细胞成熟^[18]。采用qRT-PCR的方法研究了*mPR-like*基因在半滑舌鲷不同时相卵母细胞中的表达, 发现*mPR-like* mRNA在卵母细胞成熟过程中表达量逐步升高, 预示着该基因参与半滑舌鲷卵母细胞成熟过程。研究表明*mPRα*和*mPRβ*能够在卵母细胞通过介导孕激素信号通路从而诱导鱼类和两栖类卵母细胞成熟^[7, 19], 在本研究发现半滑舌鲷*mPR-like*可能发挥相似的生

理功能; 这也初步从功能方面说明新发现的半滑舌鳎 *mPR-like* 基因为膜孕激素受体基因家族的一员。

对 *mPR-Like* mRNA 在半滑舌鳎繁殖周期的脑-垂体-卵巢中的表达情况研究发现, 3 种组织中该基因在卵巢发育的不同阶段均有表达, 但是表达规律不同。半滑舌鳎繁殖周期 *mPR-like* 基因在脑和垂体的表达变化的总体趋势是先升高后降低, 据此推测 *mPR-like* 可以在脑-垂体的神经内分泌系统调节孕激素在繁殖过程中的生理作用。*mPR-like* mRNA 在半滑舌鳎卵巢中的周期表达变化趋势是从 II 期到 V 期显著升高并且在 V 期时达到整个繁殖期的最大值 ($P < 0.05$)。由此可见, *mPR-like* mRNA 在半滑舌鳎卵巢中的周期表达变化趋势与卵巢的发育成熟过程相吻合, 进一步说明 *mPR-like* 参与半滑舌鳎卵母细胞的发育、成熟过程。Kazeto 等^[20]采用 qRT-PCR 方法检测斑点叉尾鲷繁殖周期的膜孕激素受体家族成员在卵巢组织的表达变化, 发现 *mPR α* mRNA 在卵母细胞发育阶段表达量开始升高, 在卵母细胞成熟阶段表达量达到峰值; *mPR β* 和 *mPR γ* mRNA 在卵母细胞发育阶段相对表达量最大。本研究结果与斑点叉尾鲷的 *mPR α* 基因周期表达模式相似。半滑舌鳎血清中孕酮激素的在繁殖周期的含量变化情况与 *mPR-like* mRNA 在脑-垂体-卵巢中的周期表达变化趋势相似, 初步说明 *mPR-like* 参与调节孕酮的生理活动, 参与孕激素促进卵巢发育成熟过程。从 *mPR-Like* 表达模式及其与孕激素关系, 可以看出其在硬骨鱼类卵母细胞发育成熟过程中发挥着重要的作用, 但其作用方式和作用机制尚不完全清楚。本研究为进一步探讨 *mPR-Like* 的繁殖内分泌功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Yamashita M. Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 1998, 9(5): 569–579.
- [2] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish[J]. *Dev Growth Differ*, 2008, 50(s1): S195–S219.
- [3] Masui Y, Markert C L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes[J]. *J Exp Zool*, 1971, 177 (2): 129–145.
- [4] Sadler S E, Maller J L. Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein[J]. *J Biol Chem*, 1981, 256(2): 6368–6373.
- [5] Rahman M A, Ohta K, Yoshikuni M, et al. Characterization of ovarian membrane receptor for 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2001, 127(1): 71–79.
- [6] Zhu Y, Rice C D, Pang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocyte[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2231–2236.
- [7] Josefsberg Ben-Yehoshua L, Lewellyn A, Thomas P, et al. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor β in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(3): 664–673.
- [8] Karteris E, Zervou S, Pang Y, et al. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20 (7): 1519–1534.
- [9] Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 1–176. [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1–176.]
- [10] Liu X Z, Sun Z Z, Ma A J, et al. Study on the technology of spawner culture and eggs collection of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(2): 25–32. [柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鳎亲鱼培育及采卵技术研究 [J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 25–32.]
- [11] Liu X Z, Xu Y J, Liu N Z, et al. Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35. [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态数量特征研究[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 25–35.]
- [12] Liu Yun. The reproductive physiology of cultured fish in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 42–46. [刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 42–46.]
- [13] Chen C F, Wen H S, Chen X Y, et al. Studies on ovarian development and spawn type of cultured half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Marine Sciences*, 2010,

- 34(8): 29–34. [陈彩芳, 温海深, 陈晓燕, 等. 人工养殖半滑舌鳎卵巢发育及其产卵类型研究[J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 29–34.]
- [14] Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins[J]. Bioinformatics, 1998, 14: 378–379.
- [15] Li X X. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 1–73. [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 1–73.]
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [17] Kazeto Y, Goto-kazeto R, Thomas P, et al. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterin receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. Mol Endocrinol, 2005, 34: 781–791.
- [18] Thomas P, Pang Y, Zhu Y, et al. Multiple rapid progesterin actions and progesterin membrane receptor subtypes in fish[J]. Steroids, 2004, 69: 567–573.
- [19] Tokumoto T, Tokumoto M, Oshima T, et al. Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 177: 168–176.
- [20] Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant J M. Membrane-bound progesterin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents[J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142: 204–211.

Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther

LIU Xuezhou¹, SHI Bao¹, LI Xiaoxiao^{1,2}, XU Yongjiang¹, WANG Shanshan¹, LI Xiaoni¹

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To improve techniques of artificial breeding, this research focused on the novel membrane progesterin receptor (mPRL) of half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. The full-length cDNA encoding mPRL was cloned from the half smooth tongue sole by means of homology cloning and RACE PCR analyses. The complete cDNA sequence of mPRL (GenBank accession number: KF277065) was 2 002 bp in length, consisting of a 5' untranslated region (UTR) of 163 bp, a coding sequence of 1 056 bp, and a 3'UTR of 783 bp. The molecular weight of mPRL was 17.62 kD. Structural analysis of the translated cDNA suggested that it encoded membrane protein with seven trans-membrane domains. Tertiary structure of the mPRL protein showed that it had several binding sites. The rooted phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method on MEGA4.0 for comparative analysis of half smooth tongue sole mPRL and selected vertebrate sequences. The similarity (% identity) of half smooth tongue sole mPRL in comparison with other representative sequences was analyzed using Clustal X. The results indicated that the half smooth tongue sole mPRL was clustered with mPRL of other fish. Half smooth tongue sole had 68% identity with Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and 72% with three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). The mPRL mRNA expression in half smooth tongue sole was detected by quantitative real-time PCR. And found to be widely, although not homogeneously expressed. mPRL transcripts were highly abundant in the brain, ovary, heart, gill, spleen, and stomach. In addition, positive signals were obtained for mPRL mRNA in the pituitary gland, muscle, and intestine, although the resulting transcript levels were lower than in the ovary. Representative sections of ovaries showed the morphological characteristics during development, which was divided into five stages. The expression level of mPRL mRNA at various stages of oogenesis in the sole showed that the level of mPRL mRNA in the brain and ovary significantly increased from stage II to stage V ($P<0.05$), climaxing at stage V, then sharply decreasing in stage IV. The transcript level of mPRL mRNA in the pituitary peaked at stage V, although it was not significant ($P>0.05$). Serum progesterone levels were measured using radioimmunoassay to evaluate the relationship between levels of mPRL transcript and serum progesterone. Changes in the serum progesterone were dramatic at stage II ($P<0.05$), from which progesterone values increased rapidly, reached a maximum at stage V. Expression in multiple tissue implies that mPRL plays various biological roles in half smooth tongue sole. We can infer from the mPRL mRNA expression pattern at various stages of oogenesis and the reproductive cycle that mPRL also contributes to the process of oocyte maturation of the half smooth tongue sole.

Key words: *Cynoglossus semilaevis* Günther; mPR; gene cloning; expression; progesterone

Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn