

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16008

半滑舌鳎孕酮受体膜组分 1 基因的克隆及组织和时空表达规律

张金勇^{1,2}, 柳学周^{2,3}, 史宝^{2,3}, 徐永江^{2,3}, 李晓妮^{1,2}, 常亚青¹, 王滨^{2,3}

1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266237

摘要: 运用同源克隆和 RACE 方法获得了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)孕酮受体膜组分 1(PGRMC1)的 cDNA 全长序列, 生物信息学分析显示, 半滑舌鳎 PGRMC1 cDNA 序列全长 1335 bp, 开放阅读框长 546 bp; 其编码的蛋白是单次跨膜蛋白, 在 N 端 13~35 位氨基酸残基处有一个跨膜区域。半滑舌鳎 PGRMC1 氨基酸序列与青鳉(*Oryzias latipes*)相似性最高, 达到了 82.9%; 与青斑河鲀(*Tetraodon nigroviridis*)相似度为 81.2%。系统进化分析表明, 半滑舌鳎 PGRMC1 与鲱形目和鲹形目鱼类 PGRMC1 聚为一个分支。采用实时荧光定量 RT-PCR 技术研究发现, 性成熟雌性半滑舌鳎 PGRMC1 mRNA 在各组织广泛表达, 其中在卵巢组织中相对表达量最高($P<0.05$)。在不同卵巢发育时期, 半滑舌鳎 PGRMC1 mRNA 在脑、垂体和卵巢中的周期表达变化特征显示: 脑中 PGRMC1 mRNA 在卵巢 III 期表达量升高明显, V 期表达水平最高($P<0.05$); 垂体中 PGRMC1 mRNA 表达量在卵巢发育 V 期达峰值($P<0.05$); 在卵巢中, PGRMC1 mRNA 表达水平从卵巢发育 II 到 V 期稳步上升, V 期时达到最高值($P<0.05$)。综上, 半滑舌鳎 PGRMC1 基因主要参与卵巢的发育和成熟过程, 并在繁殖期介导孕酮调控卵母细胞的最终成熟, 研究结果为半滑舌鳎繁殖内分泌调控研究提供了基础资料。

关键词: 半滑舌鳎; PGRMC1 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1080-11

孕酮受体膜组分(progesterone membrane receptor components, PGRMCs)属于小分子蛋白。目前在脊椎动物中已鉴定出了两种 PGRMCs 亚型(PGRMC1 和 PGRMC2), 二者均属于膜相关孕激素受体家族成员, 其中研究较多的是 PGRMC1。在所有哺乳动物、无脊椎动物直系同源蛋白和酵母中, PGRMC1 蛋白均有表达, 表明其在进化上是保守的, 并且参与许多重要的细胞过程^[1]。Peluso 等^[2]发现, PGRMC1 依赖 TCF/LEF (T 细胞特异性转录因子/淋巴增强因子)机制, 参与调节基因转录。已有研究表明 PGRMC1 参与哺乳动物精子的顶体反应, 同时可以介导卵巢细胞中孕酮的抗凋亡活

动^[3]; Petersen 等^[4]研究显示, PGRMC1 在哺乳类前腹侧的室旁核(anteroventral periventricular nucleus, AVPV)区域表达量很高, 而且雌激素受体和雌二醇应答元件大量存在于该区域, 暗示着 PGRMC1 在 AVPV 区域参与调节哺乳动物的发情调控。对人(*Homo sapiens*)^[5]、牛(*Bovine*)^[6]、猴(*Macaca Mulatta*)^[7]、小鼠(*Mus musculus*)^[8]等哺乳动物的研究显示, PGRMC1 在调控和维持卵母细胞成熟以及发情行为等方面有重要功能^[9]。

Luciano 等^[10]研究发现 PGRMC1 mRNA 在牛卵母细胞具有非常高的表达水平, PGRMC1 存在于生发泡(germinal vesicle, GV)和 M II(metaphase II)

收稿日期: 2016-01-09; 修订日期: 2016-03-02.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201982); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042); 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50).

作者简介: 张金勇(1987-), 男, 硕士, 研究方向为鱼类繁殖内分泌调控机制研究. E-mail: jinyongzhang2013@126.com

通信作者: 柳学周, 研究员. E-mail: Liuxz@ysfri.ac.cn

期卵母细胞,与牛受精卵原核的形成有关,并且在囊胚高度表达;他们通过进一步开展 PGRMC1 在牛卵巢卵母细胞的蛋白表达和共定位研究等,证明 PGRMC1 可以直接参与调节卵母细胞的生存和功能,并在染色体分离机制中起重要作用。另外该研究发现对牛的卵母细胞注射 PGRMC1 抗体,卵母细胞正常成熟受到损害,并导致染色体异常分离,也证实了 PGRMC1 在卵母细胞成熟中的重要调节作用^[10]。在鱼类中, Mourrot 等^[11]首次从虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)中克隆出 PGRMC1 基因序列,证实其参与了由孕酮诱导卵母细胞的成熟调控过程,但该过程可能发生在转录后水平。孕酮受体膜组分1(PGRMC1)属于膜孕激素受体家族的一员,该基因家族在鱼类的相关研究不多,国内报道的有斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) PGMRC1 基因^[12]、半滑舌鳎膜孕激素受体 mPR α ^[13]、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)膜孕激素受体 mPR α ^[14]、新型膜孕激素受体 mPRL^[15]。PGMRC1 基因在鲆鲽类的繁殖调控作用机制尚不清楚,相关的研究亟待开展。本研究运用 RACE 技术,获得了半滑舌鳎 PGRMC1 完整的 cDNA 序列,并运用实时荧光定量技术分析 PGRMC1 的组织表达和时空表达特性,为进一步探究半滑舌鳎卵母细胞成熟过程的生理功能及繁殖内分泌调控机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料和卵巢发育时期的确定

实验用半滑舌鳎取自山东烟台黄海水产公司,在养殖池随机挑取人工培育达到性成熟的3龄雌性性成熟亲鱼21条。所用亲鱼全长52~59 cm,体重1183.9~1349.2 g。实验用鱼的培育条件:在室内水泥池中(5 m×5 m×1 m)全年开放流水培育,饲喂人工配合饲料,水质条件为:水温10~25℃,盐度27~31, pH 7.8~8.4,溶解氧5 mg/L以上。取脑、垂体、性腺、肾等12种组织。液氮速冻后,转至-80℃冰箱保存留用。Davidson 固定液固定卵巢前、中、后部,24 h后转入70%酒精中保存,经苏木精-曙红(HE)染色,制片,在显微镜(NIKON 90i)下观察及拍照,判别卵巢发育时期^[16]。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取-80℃存放的新鲜半滑舌鳎12个组织,各50~100 mg,用RNAiso Plus(TaKaRa)抽提各个组织总RNA。使用微量核酸测定仪(Nanodrop2000)测量RNA浓度,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测质量。5'-RACE及3'-RACE cDNA第一链合成体系:2.75 μ L总RNA(≤ 1 μ g, 5'-RACE)、1.0 μ L 5'-CDS Primer A或者3.75 mL总RNA(≤ 1 μ g, 3'-RACE),混匀,14000 g离心10秒,72℃孵育3 min,42℃冷却2 min。向RACE cDNA合成体系管加入1 μ L BD SMART II A oligo。然后向上述体系反应管中分别加入下列试剂:2 μ L 5×First-strand Buffer、1.0 μ L DTT(20 mmol/L)、1.0 μ L dNTP Mix(10 mmol/L)、0.25 μ L RNase Inhibitor、1.0 μ L SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 总体积为10 μ L。轻轻混匀,小型离心机短暂离心,42℃孵育90 min,70℃加热10 min,合成的cDNA于-20℃保存备用。

1.3 半滑舌鳎 PGRMC1 基因的克隆

根据NCBI提交的相近物种PGRMC1基因序列设计简并引物PGRMC1-F(5'-TCAGCCTCTGTTTGTACCTAATC-3')和PGRMC1-R(5'-CATCTCTCATGTTCTCCCTCC-3'),以卵巢cDNA为模板,扩增PGRMC1基因的保守区域。1%琼脂糖凝胶电泳跑胶,并回收目的带。快速与pEASY-T1克隆载体连接,转入Transl-T1感受态细胞,LB固体培养基37℃培养过夜,挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。

根据得到的核心序列设计RACE引物PGRMC1 GSP1(5'-GGGGAAGAAGTTTATGGACCAGAGGGACC-3')、PGRMC1 GSP2(5'-CATCCTTTTGTCTCTTGCTTCCTCATCG-3')、PGRMC1 NGSP1(5'-AAAGAAGCCTTGAAGGAGGAGCACGACGAC-3')、PGRMC1 NGSP2(5'-TCCTTTTGTCC-TTTGCTTCCTCATCGTC-3')。3'-RACE:第一次梯度PCR反应体系,先配制一个Master Mix:PCR-Grade Water 17.25 μ L、50×dNTP Mix 0.5 μ L、50×Advantage 2 Polymerase Mix 0.5 μ L、10×Advantage 2 PCR Buffer 2.5 μ L,混匀,离心;然后向Master Mix 中加3'-RACE-Ready cDNA 1.25 μ L、

UPM 2.5 μL 和 PGRMC1GSP2 0.5 μL , 总体积 25 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、67 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 每个循环 T_{m} 降 0.5 $^{\circ}\text{C}$, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 14 个循环; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 28 个循环。

以 50 倍稀释后的第一次 PCR 产物为模板, 分别以 PGRMC1NGSP2、PGRMC1NGSP1 为引物, 采取巢式 PCR 扩增 *PGRMC1* 基因的 5'和 3'末端 (5'-RACE 操作步骤与 3'-RACE 相似)。1%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段后, 切胶回收, 连接载体, 转至 Transl-T1 感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序。使用 BLAST 分析测序结果, Seqman 软件拼接扩增片段, 获取半滑舌鲷 *PGRMC1* 基因全序列。

1.4 实时荧光定量 PCR

根据半滑舌鲷 *PGRMC1* 的 cDNA 序列设计扩增产物为 200~300 bp 的实时定量引物 RT-PGRMC1 F1(5'-GCTGAGTGGGAGGCTCAGTT-3')和 RT-PGRMC1 R1(5'-TGTCCTTTGCTTCCTCATCGT-3'), 以 18S rRNA 为内参基因, 引物分别为 18S F(5'-GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC-3')和 18S R(5'-AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC-3'), 取已采集的半滑舌鲷 12 种组织样品各 50~100 mg, 提取总 RNA 完毕后, 按照 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)合成各组织 cDNA 第一链。然后以卵巢组织 cDNA 为模板进行 10 倍梯度稀释, 选取其中 5 个梯度标准品制备标准曲线。*PGRMC1* 基因和 18S 的扩增效率 E 值分别为 1.06 和 1.02, 相关系数 r^2 分别为 0.992 和 0.995; 熔解曲线单峰, 说明产物特异性较好。

自 2014 年 9 月到 2015 年 1 月挑取 15 尾雌性性成熟半滑舌鲷的卵巢, 运用组织学方法确定卵巢发育时期^[16], 然后采集卵巢发育时相分别在 II-VI 期时对应的脑、垂体、性腺 3 种组织, 每种组织分别对应 3 条雌性半滑舌鲷, 提取总 RNA, 合成各组织 cDNA 第一链。以卵巢发育 V 期的性腺组织 cDNA 为模板, 5 倍梯度稀释, 选取 5 个梯度浓度绘制标准曲线。*PGRMC1* 基因和 18S 的扩增效率 E 值分别为 0.96 和 1.03, 相关系数 r^2 分别为 0.995 和 0.998; 分别以卵巢发育期在 II-VI 期时相应的脑、垂体、性腺组织为模板, 以 18S 作为内参基因, 对 *PGRMC1* 基因 mRNA 在繁殖周期

的表达情况进行实时荧光定量 PCR 检测。

组织和周期表达均在 Mastercycler ep realplex real-time PCR 仪(Eppendorf)进行, 使用 SYBR Premix Ex TaqTM II (Takara)荧光试剂; PCR 反应体系为 20 μL , 包括上下游引物各 0.8 μL , cDNA 模版 1 μL , SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μL , 补充 ddH₂O 至 20 μL 。周期表达实验样品设 3 个平行, 组织表达实验样品设 5 个平行, 实验重复 3 次, 并设阴性对照(模板以 ddH₂O 代替)。采用两步法, PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 54.4 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[17]处理 *PGRMC1* 基因的相对表达量数据。

1.5 序列分析

利用生物学软件 DNASTAR5.0.1 完成对 *PGRMC1* 基因的序列拼接、开放阅读框搜索及氨基酸序列推测, 并预测分子量、等电点等。用 ClustalX 2.0.12(<http://www.clustal.org/download/current/>)进行多重序列比对; 用 TMHMM Server v 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对蛋白质进行跨膜分析; 利用 MEGA 5.1(<http://www.megasoftware.net/mega51.html>)以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树, bootstraps 设置 1000 次进行系统进化评估。

1.6 数据统计分析

利用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差(ANOVA)分析和 Duncan 多重比较分析, 所得数据以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷繁殖周期的卵巢组织学分析

对半滑舌鲷卵巢组织切片的 HE 染色结果进行分析, 发现半滑舌鲷 I-III 期卵巢组织, 中存在不同发育时期的卵母细胞, 如 III、IV、V 时相的卵母细胞。卵巢 IV 期卵黄颗粒相互融合成较大的卵黄球, 核开始偏位, 并逐渐溶解, 卵母细胞进入成熟期。V 时相的卵巢, 卵母细胞的核消失, 细胞质中含有粗大的卵黄颗粒, 卵巢发育至 V 期(图 1)。

2.2 *PGRMC1* 基因序列分析

将所得序列拼接得到半滑舌鲷 *PGRMC1* 基因

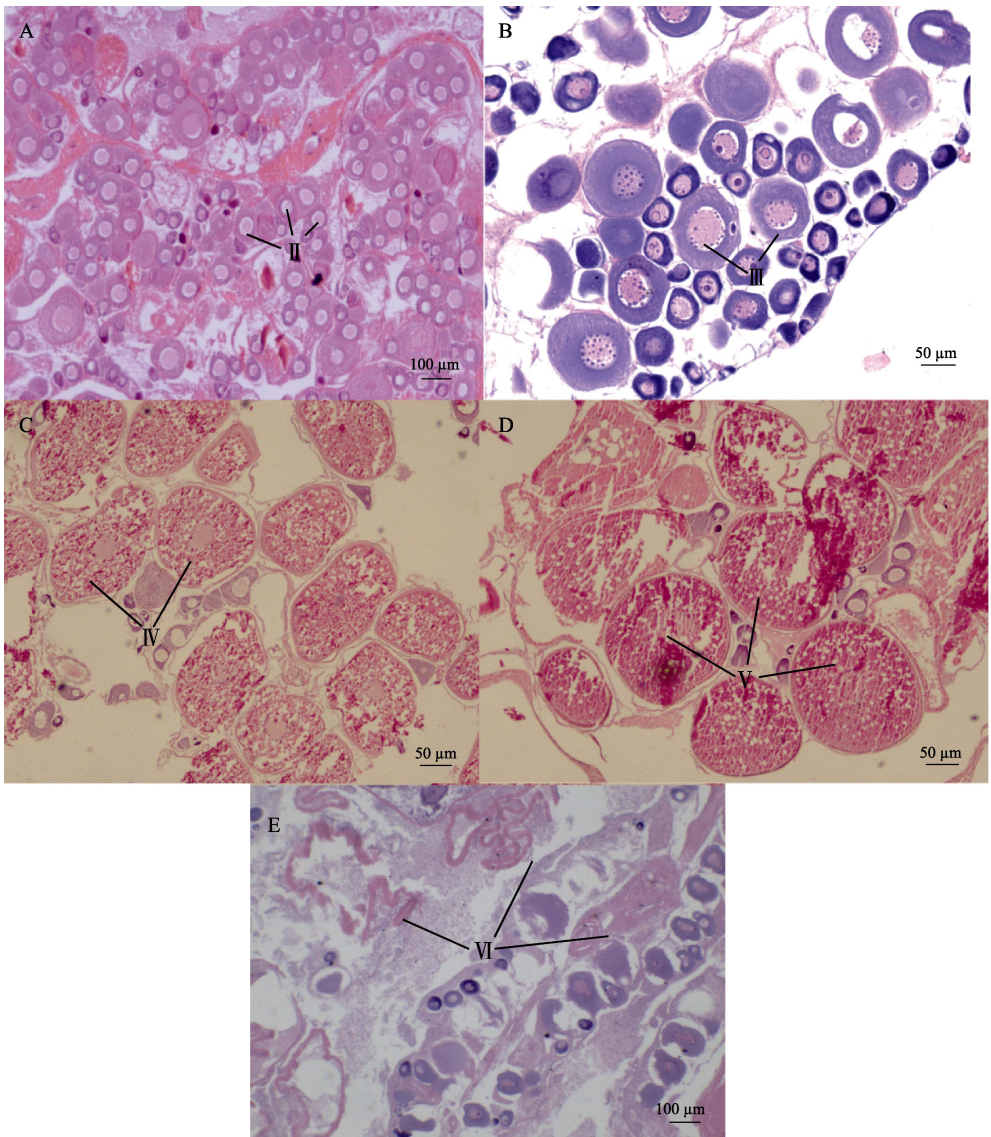


图 1 半滑舌鳎各期卵巢组织切片
A. II 期卵巢(×40); B. III 期卵巢(×200); C. IV 期卵巢(×200); D. V 期卵巢(×200); E. VI 期卵巢(×40).
图中标注的 II、III、IV、V 和 VI 是指对应时相的卵母细胞。
Fig. 1 Different stages of ovary tissue slice of *Cynoglossus semilaevis*
A. ovary of stage II (×40); B. ovary of stage III (×200); C. ovary of stage IV (×200); D. ovary of stage V (×200); E. ovary of stage VI (×40). The symbols of II, III, IV, V and VI correspond with the phases of oocytes.

cDNA 全长, 全长为 1335 bp, 其中 5'非编码区(UTR)大小为 137 bp, 开放阅读框(ORF)546 bp, 3'非编码区(UTR)552 bp, 编码 181 个氨基酸, 预测 PGRMC1 成熟肽分子量大小为 20.64 kD, 等电点为 4.67, 不稳定指数(II)为 29.28, 属稳定蛋白, 脂溶指数为 70.11, 总平均亲水性为-0.697。有 2 个保守的半胱氨酸残基分别位于 31 和 118 位氨基酸, 3'非编码区(UTR)含有 1 个加尾信号 ATTAAG(图 2)。

TMHMM Server2.0 软件预测, 半滑舌鳎 PGRMC1 是单次跨膜蛋白, 在 N 端的跨膜区域位置为 13~35 位氨基酸残基。通过 BlastP 比对, 检测 PGRMC1 蛋白存在一个细胞色素 b5 样血红素/类固醇结合域。利用 HNN 软件预测分析 PGRMC1 二级结构中 α 螺旋占 40.33%。糖基化位点预测结果表明, PGRMC1 蛋白既无 O 糖基化位点, 也无 N 糖基化位点。

```

- 137                                     AC AGG AAA CAG CTA TGA
- 120 CCA TGA TTA CGC CAA GCT TGG TAC CGA GCT CGG ATC CAC TAG TAA CGG CCG CCA GTG TGC
- 60 TGG AAT TGC CCT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCA AGC AGT GGT ATC AAC GCA GAG TAC
1    ATG GGG ATG GCC GAG GAA AGC GAA GTA ACT TCT GCT GGT ATT TTT CAG GAG ATC TTT ACT
1    M  G  M  A  E  E  S  E  V  T  S  A  G  I  F  Q  E  I  F  T
61   TCT CCT CTC AAT CTG ACT CTA CTC AGC CTC TGT TTG TAC CTA ATC TAC AAA ATC TTC CGC
21   S  P  L  N  L  T  L  L  S  L  C  L  Y  L  I  Y  K  I  F  R
121  GGG GAC AAA CAA CCG GAG CTG GAC GAA GCG GAC AAG CCG CTC CCT CGA ATG AAA AAG AGA
41   G  D  K  Q  P  E  L  D  E  A  D  K  P  L  P  R  M  K  K  R
181  GAC TTC ACC AAG GCA GAA CTA AAG CCT TAC GAT GGA CTG GAG AAT CCC AGG ATA CTC ATG
61   D  F  T  K  A  E  L  K  P  Y  D  G  L  E  N  P  R  I  L  M
241  GCA GTG AAC GGT AAA GTG TTC GAC GTG ACG CGG GGG AAG AAG TTT TAT GGA CCA GAG GGA
81   A  V  N  G  K  V  F  D  V  T  R  G  K  K  F  Y  G  P  E  G
301  CCA TAT GGA GTG TTT GCT GGC AGA GAT GCA TCC AGA GGT CTG GCC ACC TTT TGT CTG GAG
101  P  Y  G  V  F  A  G  R  D  A  S  R  G  L  A  T  F  C  L  E
361  AAA GAA GCC TTG AAG GAG GAG CAC GAC GAC CTT TCT GAT CTG AAT TCC ATG CAG CAG GAG
121  K  E  A  L  K  E  E  H  D  D  L  S  D  L  N  S  M  Q  Q  E
421  AGT CTG GCT GAG TGG GAG GCT AAC TTC AAG TAC GAT TAT GTT GGC AAG CTT CTG
141  S  L  A  E  W  E  A  Q  F  N  F  K  Y  D  Y  V  G  K  L  L
481  AAA CCA GGA GAG GAA CCC ACT GAG TAC ACA GAC GAT GAG GAA GCA AAG GAC AAA AAG GAT
161  K  P  G  E  E  P  T  E  Y  T  D  D  E  E  A  K  D  K  K  D
541  GAC TAG AGA TTA CCT ACA GGA CCA GGA GGG AGA ACA TGA GAG ATG CTT TAC AGT TTA TAT
181  D  *
601  GTA ATT TGA TGC AGA TAC CTG CTG TTA GGA TCA ATG AGA AGA ACT GTT ATT ATC CAA GTT
661  GTA TTC CTG TAC TTT TCT AAC ACC AAA AAC TTT TGT TTT GTG GCC CTT ATA TTC TTT TTA
721  TCT TTA TTG AGT ATT TGT GTT TCA CAT ATA TAT CCA CAT GCA GGT GTA TAG AAT GTA CAG
781  CAT ACT CTA ATC ATT GTC TCC ACA GCT GTG GTG TAG GCT TTC TTA CAG TTG CTG CTG ATA
841  TTA TAT TCT TTG ATA TTT TTT TTT TGC CTA TTT AAT GCC TAT ATT GGT CAT GTG TAT ATA
901  GGT TTA AAT GGT CAA TTA TGC ACC ATT CTC TGG TCA ATA ATA ATA ATA ATA ATC ATT CCA
961  ATG TGT TAA TTT ACT CAT TCG AAC AGC CAT GCG CAC TTA TAT GTT GTC TGA TCA TTT TCT
1021 GAC AGT TTA AAT AGA CAT CTT ATT ATT CAC TGG TTT GGA GTT CTC AAT TGC AGT ATA TGC
1081 AAC TTG CCA TCT TTT AAC ATA ACT GTG TCA AAC TGT AAA TAA TGT GCA ATG ATT TAG ACC
1141 CAA TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA GTA CTC TGC GTT GAT ACC ACT GCT T1198

```

图 2 半滑舌鲷 *PGRMC1* cDNA 序列及推导的氨基酸序列

起始密码子 ATG 用阴影标出, 终止密码子 TAG 加星号标注; 2 个保守的半胱氨酸残基加粗表示;
3'-UTR 端加尾信号(ATTTAA)以框标注。

Fig. 2 *PGRMC1* cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of *Cynoglossus semilaevis*
The start codon ATG and the stop codon TAG are shown in grey and by an asterisk, respectively; two conservative Cys residues and the poly(A) adenylation signal ATTTAA are indicated by bold and box, respectively.

2.3 *PGRMC1* 氨基酸序列比对及同源性分析

半滑舌鲷 *PGRMC1* 的氨基酸序列与其他脊椎动物的氨基酸序列比对如图 3 所示。同源性分析结果显示, 半滑舌鲷 *PGRMC1* 与鲱形目鱼类中的青鳉(*Oryzias latipes*)同源性最高, 达到 82.9%, 与鲈形目中的青斑河鲈(*Tetraodon nigroviridis*)同源性达到 81.2%, 与虹鳟同源性为 77.4%, 与非洲蟾蜍(*Xenopus laevis*)同源性为 70.8%, 与原鸡(*Gallus gallus*)同源性为 61.5%, 与人类(*Homo sapiens*)同源性为 62.6%。

2.4 *PGRMC1* 系统进化分析

利用 MEGA 5.1 软件对半滑舌鲷 *PGRMC1* 氨基酸序列(XP-008330630)与半滑舌鲷 *PGRMC2* 预测氨基酸序列(XP-008314298.1)、虹鳟 *PGRMC1*

(AAL49963.1)、*PGRMC2*(NP-001118045.1)、斑马鱼(*Danio rerio*)*PGRMC1*(AAH85558.1)、*PGRMC2* (NP-998269.1), 青鳉 *PGRMC1*(BAE47967.1)、*PGRMC2* (NP-001098199.1), 原鸡 *PGRMC1* (NP-001258868.1)、*PGRMC2*(NP-001006441.1), 青斑河鲈(CAF97306.1), 褐家鼠(*Rattus norvegicus*) *PGRMC1*(NP-068534.1)、*PGRMC2*(NP-001008375.1), 野猪(*Sus scrofa*) *PGRMC1* (NP-999076.1)、*PGRMC2* (ABX45132.1), 非洲蟾蜍 *PGRMC1* (NP-001006842.1)、非洲爪蟾(*X. laevis*) *PGRMC1* (AAH72727.1)、小家鼠(*M. musculus*) *PGRMC1* (NP-058063.2)、*PGRMC2* (AAH44759.1), 人类 *PGRMC1*(NP-006658.1)、*PGRMC2*(NP-006311.2)的氨基酸序列进行聚类分析, 结果如图 4 所示。

虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	-----MADTEGAEEIYPGILQEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKIFRGDK
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	-----MGMAEESEVTSAGIFQEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKIFRGDK
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	-----AGEVTSAGIFQEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKIFRGDR
青斑河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	-----MAEAEAGDTTSGGILQEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKIVRGDK
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	-----MAEEGILQEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKILRGDK
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	MAAEPPAMAGEEAVATEGGGLLEIVGSPNLNLSLLGLCIFLLYQILRGER
人类 <i>Homo sapiens</i>	MAAEDVVATGADPSDLESGGLLHEIFTSPNLNLSLLGLCIFLLYKIVRGDQ
	*: : *. ****: ** *: : *: : *. *: :
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	PADM---GEVEEPLPKLKKRDFLTTELQPYDGLQNPRIILMAVNFVKVFDV
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	QPEL---DEADKPLPRMKKRDFTKAELKPYDGLQNPRIILMAVNGKVFVDV
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	QPDF---GEVETPLPKLKKRDFLTAEELKPYDGLQNPRIILMAVNGKVFVDV
青斑河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	QPDF---AEEKPLPKMKKRDFLTAEELKPYDGLQNPRIILMAVNGKVFVDV
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	PQTT---ENNEEQLPKMKKRDFTPAELKEYDGVQNPRIILMAISGKVFVDV
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	PAAQ---PGEAGPPPLPKMKKRDFLTQLRPYDGVQNPRIILMAVNGKVFVDV
人类 <i>Homo sapiens</i>	PAASGSDDDDEPPPLPRLKKRDFTPAELRRFDGVQNPRIILMAINGKVFVDV
	: *: ** *: : *: : *****. *****
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	TRGKKFYGPEGYPYGVFAGRDASRGLATFCLKEALKDTHTDSDLNAMQQ
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	TRGKKFYGPEGYPYGVFAGRDASRGLATFCLKEALKEEHDSDLNSMQQ
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	TRGKKFYGPEGYPYGVFAGRDASRGLATFCLDKESLKDEYDDLSDLNAMQQ
青斑河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	TRGKKFYGPDGPYGVFAGRDASRGLATFCLDKDALKDEHDDLSDLNASQW
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	TRGKKFYGPEGYPYGVFAGRDASRGLATFCLDKDALKDEYDDLSDLTATQR
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	TRASKFYGPDGPYGVFAGRDASRGLATFCLDKDALKDEYDDLSDLNATQQ
人类 <i>Homo sapiens</i>	TKGRKFYGPEGYPYGVFAGRDASRGLATFCLDKDALKDEYDDLSDLTAAQQ
	*: . *****: *****: *****: *****: *****: *****: *
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	ESLNEWETQFTQKYDYV---GKLLKAGEEPTETDDEEVKD---KKKD---
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	ESLAEWEAQFNFKYDYV---GKLLKAGEEPTETDDEEAKD---KKDD---
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	DSLAEWETQFTFKYDYV---GKLLKAGEEPTETDDEEGKD---KKAD---
青斑河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	ESLSDWEAQFTFKYDYI---GKLLKAGEEPTETDDEEGKD---K-----
非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	ETLSDWEAQFTFKYHHV---GKLLKAGEEPTETDDEDAKDTSDLKKKN---
原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ETLRDWEAQFTFKYHHV---GKLLKAGEEPTVYSDEEEKDAQAKE---
人类 <i>Homo sapiens</i>	ETLSDWEAQFTFKYHHV---GKLLKAGEEPTVYSDEEEKPD---ESARKND---
	: *: *****. *: : ***** *****: *: : ***** :

图 3 半滑舌鳎 PGRMC1 的氨基酸序列与其他脊椎动物的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *Cynoglossus semilaevis* PGRMC1 with the corresponding sequences of PGRMC1 in other vertebrates

2.5 PGRMC1 mRNA 在性成熟雌鱼的组织表达特征

实时荧光定量 RT-PCR 结果表明, *PGRMC1* 基因在雌性半滑舌鳎的脑、垂体、心脏、头肾、肾脏、肝脏、卵巢等 12 种组织中均有表达, 只是在表达量上有着明显差异。经 Duncan 多重比较分析 *PGRMC1* 基因在卵巢组织中相对表达量最高, 显著高于其他组织($P<0.05$); 在肌肉、胃和心脏组织中相对表达量较低, 且 3 种组织间表达量差异均不显著($P>0.05$)(图 5)。另外, *PGRMC1* 基因在脑、垂体和肝脏组织中表达量也较高。

2.6 PGRMC1 mRNA 在卵巢不同发育时期脑、垂体、卵巢中的表达

PGRMC1 基因在半滑舌鳎不同卵巢发育时期, 脑、垂体和卵巢中相对表达量的变化特征表明,

在卵巢发育 II 期, 脑中的表达量相对最低, III 期表达量升高明显, V 期表达量最高, VI 期略有下降($P<0.05$, 图 6A); 从卵巢发育 II 期开始, 垂体中 *PGRMC1* mRNA 表达水平缓慢升高, V 期时达到最高水平, VI 期下降明显($P<0.05$, 图 6B); 在卵巢中, 可以发现 *PGRMC1* mRNA 表达量从卵巢 II 期到 V 期稳步上升, 至 V 期时达到最高, VI 期时下降显著且表达水平最低($P<0.05$, 图 6C)。

在垂体和脑中, *PGRMC1* mRNA 表达水平显示从卵巢发育 II 到 V 期缓慢升高, 且在 V 期达峰值; 但在脑和垂体中 *PGRMC1* mRNA 表达水平显著低于卵巢中 *PGRMC1* mRNA 在各期(VI 期除外)的表达水平(图 6)。

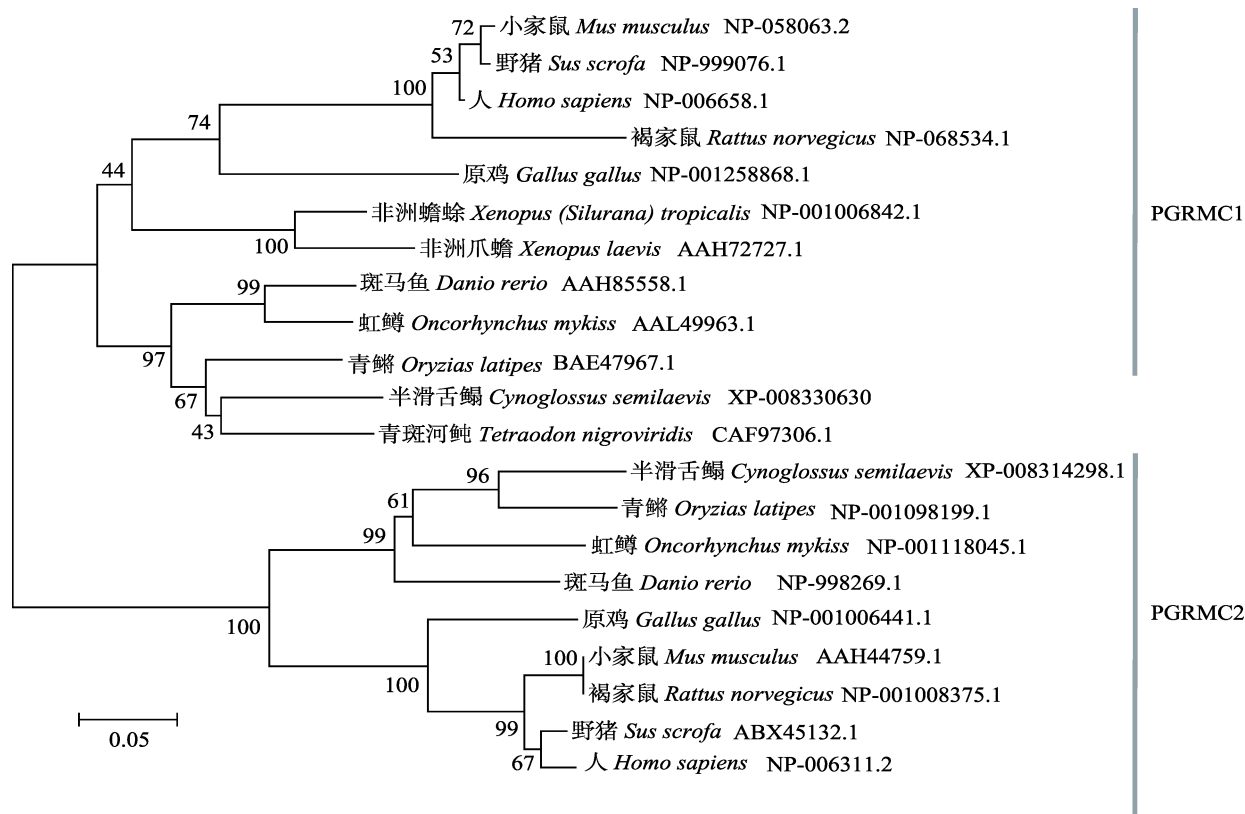


图 4 半滑舌鳎 PGRMCs 氨基酸序列与其他物种的 NJ 系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic analysis based on *Cynoglossus semilaevis* PGRMCs' amino acid sequences and the corresponding sequences of PGRMCs in other vertebrates

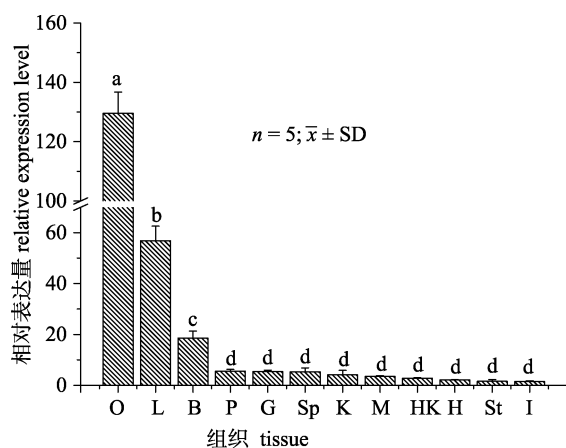


图 5 *PGRMC1* mRNA 在雌性半滑舌鳎各个组织中的表达水平

O: 卵巢; L: 肝脏; B: 脑; P: 垂体; G: 鳃; Sp: 脾脏;
K: 肾脏; M: 肌肉; HK: 头肾; H: 心脏; St: 胃; I: 肠。
不同字母表示各组织间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 The relative expression level of *PGRMC1* mRNA in various tissues of *Cynoglossus semilaevis*

O: ovary; L: liver; B: brain; P: pituitary; G: gill; Sp: spleen; K: kidney; M: muscle; HK: head kidney; H: heart; St: stomach; I: intestine. Different letters denotes significant difference between tissues ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 半滑舌鳎 *PGRMC1* 基因的生物信息学分析

运用 RACE 克隆技术获取了半滑舌鳎 *PGRMC1* 的 cDNA 全长序列, 生物信息学分析显示, *PGRMC1* 基因编码 181 个氨基酸, 分子量约为 20.64 kD, 不稳定指数 (II) 29.28, 属稳定蛋白, 脂溶指数 70.11, 总平均亲水性为 -0.697, 推测该蛋白具疏水性。TMHMM Server2.0 预测半滑舌鳎 *PGRMC1* 是单次跨膜蛋白, 这与预测的虹鳟 *PGRMC1* 蛋白空间结构相似^[11]。通过 BlastP 比对, 检测 *PGRMC1* 蛋白存在一个细胞色素 b5 样血红素/类固醇结合域。通过 ProtComp 9.0 软件预测, 半滑舌鳎 *PGRMC1* 亚细胞定位主要在质膜或细胞质内。另外, 有多项研究也表明 *PGRMC1* 分布在细胞内的膜结构上, 但具体存在于细胞内质网、原生质膜的外膜、顶体膜或细胞核内尚不清楚^[18]。因此考虑到 *PGRMC1* 亚细胞定位的复杂性, 本研究认为

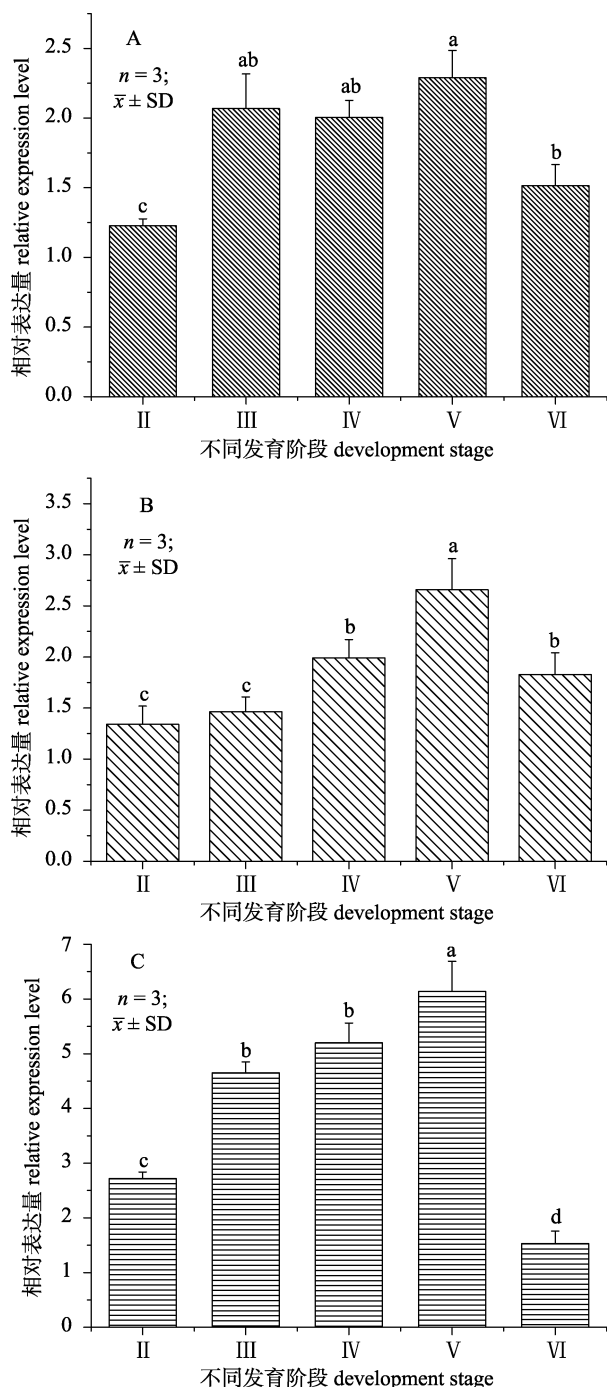


图 6 *PGRMC1* mRNA 在雌性半滑舌鳎不同卵巢发育阶段脑、垂体、卵巢中的相对表达分析

A、B、C 分别代表 *PGRMC1* mRNA 在雌性半滑舌鳎繁殖周期脑、垂体、卵巢组织中的相对表达。不同字母表示各发育阶段间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 The relative expression levels of *PGRMC1* in brain, pituitary and ovary during ovary maturation of *Cynoglossus semilaevis*

A, B, C represent the relative expression levels of *PGRMC1* in brain, pituitary and ovary during ovary maturation in *Cynoglossus semilaevis*. Different letters denotes significant difference between development stages ($P < 0.05$)

PGRMC1 可能在膜/细胞质和细胞核内参与重要的细胞过程。

氨基酸同源序列比对表明, 半滑舌鳎 *PGRMC1* 与鲈形目鱼类中的青鳉相似性最高, 达到了 82.9%, 与鲇形目中的青斑河鲈相似度为 81.2%, 与虹鳟的同源性也达到 75%以上, 说明其与硬骨鱼类同源性较高。这与根据虹鳟 *PGRMC1* 的 cDNA 序列推断出来的研究结果一致^[11]。在已知硬骨鱼类虹鳟、青鳉中, *PGRMC1* 和 *PGRMC2* 的序列已见诸报道^[11]。从系统进化分析看出, 半滑舌鳎 *PGRMC1* 和其他鱼类的 *PGRMC1* 聚为一支, 而与哺乳类的不聚合, 说明半滑舌鳎 *PGRMC1* 和鱼类的亲缘关系更近。此外, 本研究还将基因组数据库中预测的半滑舌鳎 *PGRMC2* 进化地位进行分析, 结果显示半滑舌鳎 *PGRMC2* 与其他鱼类的 *PGRMC2* 聚为一簇。这也进一步说明, 本研究获取的全长序列是半滑舌鳎 *PGRMC1* 的 cDNA 序列。

3.2 半滑舌鳎 *PGRMC1* 时空表达与生理功能分析

本研究结果显示半滑舌鳎 *PGRMC1* mRNA 主要在卵巢中表达, 在 12 个不同组织中, 卵巢中的相对表达水平比其他组织高很多(图 6), 推断半滑舌鳎 *PGRMC1* 基因主要在卵巢中发挥作用。相似研究发现, 虹鳟 *PGRMC1* mRNA 仅在卵巢中发现, 且表达量相对较大^[11]; 检测分析了 *PGRMC1* 基因在不同性别石斑鱼组织的分布情况, 表明在雌鱼中 *PGRMC1* mRNA 在卵巢中的表达量最高^[12]; 在雌性斑节对虾(*Penaeus monodon*)组织分布分析发现, *PGRMC1* mRNA 在卵巢中大量表达^[19]。同样研究发现, 在牛^[20]、大鼠^[21]、人^[22]卵母细胞中, *PGRMC1* mRNA 表达丰度也较高。为进一步研究 *PGRMC1* 在卵母细胞中的作用, Nousiainen 等^[23]研究发现 *PGRMC1* 存在于人卵母细胞有丝分裂纺锤体, 这说明 *PGRMC1* 直接参与调节卵母细胞成熟(减数分裂)。另外, Luciano 等^[6]在牛的卵母细胞注射 *PGRMC1* 抗体, 发现卵母细胞正常成熟受到损害, 导致了染色体异常分离, 该研究也证实了 *PGRMC1* 在卵母细胞成熟中的重要调节作用。

本研究通过检测半滑舌鳎 *PGRMC1* 基因在脑-垂体-性腺轴的表达变化规律发现, 在卵巢发育 III 期, 脑中 *PGRMC1* mRNA 相对表达量明显升

高,在 V 期中表达量最高($P<0.05$,图 6A)。有文献报道在人的下丘脑等组织也发现 *PGRMC1* 基因表达量较高^[5]; Intlekofer 等^[24]运用实时荧光定量的方法证实 *PGRMC1* mRNA 在大鼠的前腹侧的室旁核、视前区、腹内侧核等组织中高丰度表达。本研究在所采集的卵巢发育 II~VI 期半滑舌鳎脑组织中都检测到 *PGRMC1* mRNA 的表达,可能参与了繁殖的神经内分泌调控。本研究结果印证了 Petersen 等^[4]认为的 *PGRMC1* 参与动物繁殖功能有关的神经调节的结论。在卵巢中, *PGRMC1* mRNA 表达水平在卵巢发育各个阶段(VI 期除外)都较高,从卵巢发育 II 到 V 期稳步上升, V 期时达到最高值($P<0.05$,图 6C)。由此推断, *PGRMC1* 对半滑舌鳎性腺发育成熟起重要的调控作用,其可能的原因为卵母细胞的最终成熟以及排卵等过程的完成需要大量 *PGRMC1* 的参与。在牛卵母细胞中, *PGRMC1* mRNA 在生发泡(germinal vesicle, GV)和 M II(metaphase II)期卵母细胞具有非常高的表达水平,这与牛受精卵原核的形成有关,并且在囊胚 *PGRMC1* mRNA 相对表达量进一步升高; *PGRMC1* 在牛卵母细胞的蛋白表达和共定位研究等表明 *PGRMC1* 可以直接参与调节卵母细胞的存活和功能,并在染色体分离机制中起重要作用^[6]。柳学周等^[15]在半滑舌鳎繁殖周期中发现,孕酮激素在整个繁殖周期的变化趋势与性腺指数变化趋势相似。本研究得到的半滑舌鳎 *PGRMC1* mRNA 在整个繁殖周期卵巢组织 mRNA 的相对变化规律也与卵巢发育、卵巢成熟过程相吻合;这有力地证明了在半滑舌鳎卵母细胞成熟及排卵过程中, *PGRMC1* 可能参与介导孕酮激素发挥着重要的生理功能。斑节对虾 *PGRMC1* mRNA 的过表达实验结果也表明适当形式的孕激素有可能通过 *PGRMC1* 诱发卵母细胞/卵巢发育和成熟^[19]。尽管鱼类和甲壳类处于不同进化地位,但其 *PGRMC1* mRNA 在性腺组织表达规律和生理作用上表现出相似性,这与该基因在生物进化上具有很高的保守性并具有重要功能有关。结合 *PGRMC1* mRNA 在半滑舌鳎中的时空表达结果和孕酮激素变化结果的数据,推测 *PGRMC1* 主要参与半滑舌鳎卵巢的发育、成熟过程,并在繁殖期主要介导孕酮促使

卵母细胞成熟。

本实验初步分析了半滑舌鳎 *PGRMC1* 基因结构及表达特征,关于 *PGRMC1* 的具体生理功能作用途径及机制,以及它与该基因家族各成员间的相互作用关系、协同调控作用过程和途径等方面的研究尚不明了,如何解析这些问题需今后进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Friel M, Zhang L, Pru J K, et al. Progesterone receptor membrane component 1 deficiency attenuates growth while promoting chemosensitivity of human endometrial xenograft tumors[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 434–442.
- [2] Peluso J J, Pru J K, et al. Non-canonical progesterone signaling in granulosa cell function[J]. Reproduction, 2014, 147(5): R169–R178.
- [3] Peluso J J, Romak J, Liu X. Progesterone receptor membrane component-1(PGRMC1) is the mediator of progesterone's antiapoptotic action in spontaneously immortalized granulosa cells as revealed by PGRMC1 small interfering ribonucleic acid treatment and functional analysis of PGRMC1 mutations[J]. Endocrinology, 2008, 149: 534–543.
- [4] Petersen S L, Ottem E N, Carpenter C D. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol[J]. Biol Reprod, 2003, 69(6): 1771–1778.
- [5] Krebs C J, Jarvis E D, Chan J, et al. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors[J]. Proc Natl Acad Sci, 2000, 97(23): 12816–12821.
- [6] Luciano A M, Corbani D, Lodde V, et al. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle[J]. Eur J Histochem, 2011, 55(3): 145–150.
- [7] Bishop C V, Satterwhite S, Xu L, et al. Microarray analysis of the primate luteal transcriptome during chorionic gonadotrophin administration simulating early pregnancy[J]. Mol Hum Reprod, 2012, 18: 216–227.
- [8] Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progesterin membrane receptors in the rat corpus luteum[J]. Endocrinology, 2005, 146(12): 5522–5532.
- [9] Gao L, Shen M, Gan S Q, et al. cDNA cloning, sequencing and expression of PGRMC1 protein in sheep (*Ovis aries*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(1): 52–60.[高磊, 沈敏, 甘尚权, 等. 绵羊 PGRMC1 蛋白的 cDNA 克隆、序列分析及组织表达[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(1): 52–60.]

- [10] Luciano A M, Lodde V, Franciosi F, et al. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development[J]. *Reproduction*, 2010, 140 (5): 663–672.
- [11] Mourot B, Nguyen T, Fostier A, et al. Two unrelated putative membrane bound progestin receptors, progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and membrane progestin receptor(mPR) beta, are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4(1): 1–14.
- [12] Xu C. *mPRa* and *PGRMC1* gene cDNA cloning and expression pattern analysis of *Epinephelus coioides*[D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2011.[徐驰. 斜带石斑鱼 *mPRa* 和 *PGRMC1* 基因 cDNA 的克隆及表达模式分析[D]. 广州: 中山大学, 2011.]
- [13] Shi B, Li X X, Liu X Z, et al. Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progestin receptor alpha gene (*mPRa*) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67. [史宝, 李晓晓, 柳学周 等. 半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67.]
- [14] Shi B, Liu X Z, Xu Y J, et al. Molecular and transcriptional characterization of GTHs and mPRa during ovarian maturation in rock bream *Oplegnathus fasciatus*[J]. *J Exp Zool A: Ecol Genet Physiol*, 2015, 323(4): 430–444.
- [15] Liu X Z, Shi B, Li X X, et al. Molecular characterization of the novel membrane progestin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 22(4): 608–619. [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 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[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619.]
- [16] 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.]
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [18] Zhang C L. Silkworm progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) function, expression, purification and preliminary points analyze[D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-tech University, 2009.[张春丽. 家蚕中孕酮受体膜元件 2 的(PGRMC2)的表达纯化及功能初步分析[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2009.]
- [19] Rachanimuk P, Sirawut K, Keisuke Y, et al. Molecular cloning and expression of progestin membrane receptor component 1(Pgmrc1) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 168: 440–449.
- [20] Dode M A, Dufort I, Massicotte L, et al. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos[J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73: 288–297.
- [21] Peluso J J, Pappalardo A, Losel R, et al. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action[J]. *Endocrinology*, 2006, 147: 3133–3140.
- [22] Wood J R, Dumesic D A, Abbott D H, et al. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92: 705–713.
- [23] Nousiainen M, Sillje H H W, Sauer G, et al. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle[J]. *PNAS*, 2006, 10: 5391–5396.
- [24] Intlekofer K A, Petersen S L. 17β -estradiol and progesterone regulate multiple progestin signaling molecules in the anteroventral periventricular nucleus, ventromedial nucleus and sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats[J]. *Neuroscience*, 2011, 176: 86–92.

Molecular cloning of *PGRMC1* from half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and its tissue and spatio-temporal expression patterns

ZHANG Jinyong^{1,2}, LIU Xuezhou^{2,3}, SHI Bao^{2,3}, XU Yongjiang^{2,3}, LI Xiaoni^{1,2}, CHANG Yaqing¹, WANG Bin^{2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Laboratory for Marine Fisheries and Aquaculture, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China

Abstract: To investigate the role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in oocyte maturation in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), we cloned the full-length cDNA sequence of *PGRMC1* from the ovary using homology cloning and rapid amplification of cDNA ends methods. The full-length cDNA of *PGRMC1* was 1335 bp long with an open reading frame of 546 bp encoding a 181 amino acid preprohormone with a deduced molecular mass of 20.64 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.67. The precursor was a single transmembrane protein with an N-terminal transmembrane domain. The predicted transmembrane domain was located at positions 13–35 of the deduced PGRMC1 protein. Sequence alignment of the *C. semilaevis* PGRMC1 precursor protein with corresponding sequences from other species revealed that the highest identity (82.87%) was with the PGRMC1 from *Oryzias latipes*, followed by that from *Tetraodon nigroviridis* (81.22%). In a phylogenetic analysis, the *C. semilaevis* PGRMC1 clustered with its counterparts in the Cyprinodontiformes and Tetraodontiformes. The transcript levels of *PGRMC1* were high in the ovary, moderate in the liver and brain, and low in other tissues. We also monitored changes in *PGRMC1* transcript levels in the pituitary, brain, and ovary at different ovarian developmental stages. The *PGRMC1* mRNA levels increased sharply in the brain at stage III, remained at high levels until stage V, and then decreased at stage VI. In the pituitary, the transcript levels of *PGRMC1* increased to peak at stage V and decreased significantly after ovulation (stage VI). Similarly, in the ovary, the *PGRMC1* levels increased gradually to peak at stage V and then decreased markedly after spawning (stage VI). Taken together, our results shed light on the role of PGRMC1 in oocyte maturation and in regulating reproductive endocrine function in *C. semilaevis*.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *PGRMC1*; cDNA cloning; expression analysis

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