

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19141

施氏鲟下丘脑神经肽基因的克隆、序列分析及表达特征

高雪^{1, 2, 3}, 吕伟华², 王红伟⁴, 张颖²

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
4. 中国水产科学研究院鲟鱼繁育工程中心, 北京 102400

摘要: 为了解下丘脑神经肽(kisspeptin)在施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)生殖调控中的作用, 采用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和 RACE 技术首次克隆得到施氏鲟 2 个 kisspeptin 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *kiss1* 和 *kiss2*, 并对它们编码氨基酸序列的特征及时空表达模式进行分析。结果表明, 施氏鲟 *kiss1* 基因的 cDNA 全长为 522 bp, 编码 130 个氨基酸; *kiss2* 基因的 cDNA 全长为 518 bp, 编码 149 个氨基酸; Kiss1 和 Kiss2 均以 α -螺旋和无规则蜷曲为二级结构中的主要元件, 且为含有信号肽、无跨膜结构、分泌到细胞外的不稳定亲水性蛋白质。氨基酸序列比对及进化分析表明, 施氏鲟 Kiss1 和 Kiss2 具有高度保守区域, 与达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)Kiss1 和 Kiss2 蛋白序列一致性最高, 亲缘关系最近。荧光定量 PCR 结果显示, 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 的表达具有组织特异性, 其中 *kiss1* 在性腺中的表达量最高, 而 *kiss2* 在脑中的表达量最高。*kiss2* 在早期性腺发育过程中的表达量检测显示, 在孵化后 0~49 d, *kiss2* 的表达量较低, 而 *kiss1* 的表达量则较高, 在孵化后 21 d 达峰值; 随着性腺的发育(孵化后 64~199 d), *kiss2* 的表达水平逐渐升高并在 139 d 达到最高, 随后下降; 与 *kiss2* 表达模式不同, *kiss1* 的表达量在孵化后 184 d 达到峰值。以上结果表明, kisspeptin 基因在施氏鲟早期性腺发育过程中具有重要的作用, 且其调控功能存在差异。本实验为进一步阐明 *kiss1* 和 *kiss2* 的生理功能和分子调控机制奠定了理论基础。

关键词: 施氏鲟; kisspeptin; 基因克隆; 序列分析; 基因表达

中图分类号: S917 文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)05-0504-12

Kisspeptin 是由人与哺乳动物 *kiss-1* 基因编码的神经多肽, 可被剪切为 Kisspeptin-10、Kisspeptin-13、Kisspeptin-14 与 Kisspeptin-54 等多种短肽, 具有抑制肿瘤转移, 影响神经内分泌、生殖和心血管功能等生物学作用^[1-2]。研究证实, 一些鱼类具有 2 种 *kiss* 基因(*kiss1* 和 *kiss2*), 其编码的 Kp-10 具有高度的保守性, 通过调控“下丘脑-垂体-性腺轴”, 参与鱼类的青春期启动、GtH 和性类固醇激素分泌, 调控鱼类性腺发育和代谢功能^[3-6]。鱼类 *kiss1* 及 *kiss2* 的组织分布因物种而异, 金鱼(*Carassius auratus*)的 *kiss1* 除了在脑区中表达外,

在肠、肾脏、脂肪、鳃中都有表达, 且在肠中的表达量最高^[7]。此外, 抚仙金线鲃(*Sinocyclocheilus tingi*)也具有 2 个 *kiss* 基因, 其中, *kiss1* 在肠道中大量表达, 而 *kiss2* 在雄性肠道中表达量最高, 在雌性的下丘脑中表达量最高^[8]。硬骨鱼类 *kiss* 系统的一个重要作用是集成环境和代谢信号, 并将这些信号传递到 HPG 轴。而欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)等鱼类入海前垂体促性腺素的分泌不足是导致青春期发育滞后的原因^[9]。

施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)隶属鲟形目(Acipenseriformes)、鲟科(Acipenseridae)、鲟属, 主

收稿日期: 2019-05-14; 修订日期: 2019-07-06.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(HSY201609).

作者简介: 高雪(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为繁殖生理学. E-mail: gxueshuichan@163.com

通信作者: 张颖, 博士, 研究员, 从事鱼类生理与繁育的研究. E-mail: zhangying@hrfri.ac.cn

要分布在黑龙江、乌苏里江和松花江等地,是中国北方重要的经济淡水鱼类^[10]。施氏鲟作为中国第一个自主研发的鲟养殖鱼种,具有生长快、抗逆性强等优点,深受养殖户的欢迎。此外,施氏鲟个体大,寿命长,性成熟晚,且不具有副性征,外表难以区分雌雄。因此,有关鲟生殖发育调控机制的研究对促进鲟产业的健康发展具有重要的实践意义。本研究旨在克隆得到在施氏鲟生殖发育调控中发挥重要功能的*kisspeptin*基因,分析其序列特征和系统进化关系,研究其时空表达特征,为实现这一养殖鱼类的生殖调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用施氏鲟取自中国水产科学研究院鲟鱼工程繁育中心。选取同一时期出膜的仔鱼。养殖条件为水温(18±1)℃,溶解氧大于6.5 mg/L。水蚯蚓作为开口饵料,27 d后投喂混合饲料。仔鱼破膜当天为0 d,孵化后仔鱼期(0~49 d),每7 d取1次样;幼鱼期(64~199 d),每15 d取1次样。其中,仔鱼期每3条鱼合并,作为一个重复;幼鱼期,每3尾鱼的脑合并,作为一个重复,设3个平行,装入冻存管后用液氮迅速冷冻样品,-80 ℃冰箱保存备用。另取体重(185±2.23) g 的施氏鲟,取其心脏、肾、脾、肠、鳃、脑及性腺等组织,置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 合成 采用总 RNA 提取试剂盒(Promega)提取总 RNA,按照说明书操作。用琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白测定仪(Thermo Scientific, 美国)检测 RNA 完整性和浓度,于-80 ℃保存备用。以总 RNA 为模板,取1.5 μg 按照 GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo D T (Promega) 的说明进行反转录实验,合成的 cDNA 均稀释10倍后于-20 ℃保存备用。

1.2.2 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 基因全长克隆 根据施氏鲟转录组数据库序列设计引物,引物由吉林库美生物技术公司合成(表 1)。采用 2×Es Taq MasterMix (CWBIO)进行 PCR 扩增。反应程序为: 94℃ 3 min, 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 35

个循环;终延伸 72 ℃ 2 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行产物检测,使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(CWBIO)对目的片段进行切胶回收,纯化片段连接到 pMD18-T(TaKaRa)载体,转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,在含 Amp 的 LB 平板上 37 ℃ 培养过夜,经菌落 PCR 鉴定,选阳性克隆送吉林库美生物科技有限公司测序。根据已经获得的中间片段分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性引物(表 1)。按照 SMARTer® RACE 5'/3'Kit (TaKaRa, clontech) 试剂盒的说明书进行两轮 PCR 扩增。胶回收、连接、转化及测序。

1.3 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 的序列分析

将 *kiss1* 和 *kiss2* 的中间片段、3'RACE 和 5'RACE 测序结果用 SeqMan 进行拼接,得到全长 cDNA 序列,使用 DNAMAN 8.0 软件分析开放阅读框(ORF)并将其推导为相应的氨基酸序列,应用 NCBI 中 BLAST 程序对获得的序列进行比对。利用 Mega 7.0 和 Clustal X 软件,采用邻位相连法 Neighbor-Joining 构建系统进化树。使用 TMHMM Server v.2.0 预测蛋白的跨膜区,使用专业蛋白在线分析系统(Expert Protein Analysis System, Ex PASy)分析其基本物理化学参数、疏水性、信号肽、亚细胞定位、功能位点及二级结构预测等信息。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 *kiss* 基因的表达

根据已得序列设计定量引物(表 1),以不同组织及不同发育时期脑组织中的总 RNA 逆转录得到的 cDNA 作为荧光定量 PCR (qRT-PCR)模板,以施氏鲟 β -actin 基因为内参,荧光定量 PCR 仪使用 ABI 7500 (Applied Biosystems, USA), 荧光试剂使用 SYBRPremix Ex Taq (Takara, II 中国大连),按照说明书进行实验操作。

1.5 数据处理

结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量,数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。为确保实验的准确性和可重复性,每个样品设 3 次重复。用 SPSS 22 进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较,显著性水平设为 0.05。其中,对于不满足正态分布的离散性数据,采用 SPSS 22 中非参数检验(秩和检验)的方法。

表 1 实验所用引物及序列
Tab. 1 Names and sequences of primers used in this study

| 引物 primer | 序列(5'-3') sequence (5'-3') | 用途 usage |
|--------------|----------------------------|-------------------------|
| kiss1-F | GCTGTTGGTGTGCTGGTCA | 核心区克隆 core region clone |
| kiss1-R | TTCTGTTGCCCTCTGCTGC | 核心区克隆 core region clone |
| kiss2-F | GGCGATTATTACCCGACGA | 核心区克隆 core region clone |
| kiss2-R | GAGACTGGACGCTGCGACAT | 核心区克隆 core region clone |
| 3'kiss1-GSP | GAGCCCTGGGAGCTGGACCACCAA | 3'区克隆 3'region clone |
| 3'kiss1-NGSP | GCGTCAAGCCGGGCTGCTAGCACAG | 3'区克隆 3'region clone |
| 3'kiss2-GSP | CCTCTGAATCCAGGCCAGCGGTCCAT | 3'区克隆 3'region clone |
| 3'kiss2-NGSP | CCGCTATGGAAACGGGACCAGGGT | 3'区克隆 3'region clone |
| 5'kiss1-GSP | GGAGTGGGGCGTTCTTCAGGGTA | 5'区克隆 5'region clone |
| 5'kiss1-NGSP | GGCTCTGACCAGCAACACCAACAGC | 5'区克隆 5'region clone |
| 5'kiss2-GSP | TGGTGAATCGGAGTCTGCAGGAG | 5'区克隆 5'region clone |
| 5'kiss2-NGSP | AGGGTGTGCTTTCAGGTCCCAG | 5'区克隆 5'region clone |
| qkiss1-F | ATTGGCCAGCCTGCTGTT | 荧光定量 PCR RT-qPCR |
| qkiss1-R | TTCTGCCGCTTCTCTGCT | 荧光定量 PCR RT-qPCR |
| qkiss2-F | ACCCATTGGACTCCGCT | 荧光定量 PCR RT-qPCR |
| qkiss2-R | TATGGCAGGAGTGTGCTGC | 荧光定量 PCR RT-qPCR |
| β-actin-F | ATCGCCGCACTGGTTGTTGA | 内参基因 reference gene |
| β-actin-R | ATGCCGTGCTCGATGGGATA | 内参基因 reference gene |

2 结果与分析

2.1 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 基因的 cDNA 序列分析

本研究克隆得到施氏鲟 *Kiss1* 基因 cDNA 的全长为 522 bp (GenBank 登录号为 KT257658.1), 包括部分 5'端非编码区(5' UTR, 56 bp)、3'端非编码区(3' UTR, 73 bp)和开放阅读框 (ORF, 393 bp), 编码 130 个氨基酸; *Kiss2* 基因 cDNA 全长 518 bp (GenBank 登录号为 KT257657.1), 其中, 5'端非编码区(5'-UTR)长为 16 bp, 开放阅读框 (ORF)长 450 bp, 3'非编码区(3'-UTR)长 52 bp, 编码 149 个氨基酸。利用 ExPASy 在线工具, 对 *kiss1* 和 *kiss2* 编码区推导的蛋白质预测得知, 施氏鲟 *Kiss1* 蛋白质分子式为 C₆₃₉H₁₀₅₁N₁₈₅O₁₇₅S₅, 相对分子量为 14.29 kD, 理论 PI 值为 10.73, 蛋白质的不稳定系数为 44.16。*Kiss2* 蛋白质的分子式为 C₇₁₆H₁₁₄₆N₂₁₄O₂₂₃S₅, 相对分子量 16.48 kD, 理论 PI 值为 7.75, 蛋白质的不稳定系数的理论值为 55.66; 对 *Kiss1*、*Kiss2* 蛋白质的疏水性进行预测, 序列中大多数氨基酸属于亲水性氨基酸, 所以认为 *Kiss1* 和 *Kiss2* 为亲水性蛋白质; 跨膜结构和亚细胞定位预测显示,

Kiss1、*Kiss2* 蛋白均无跨膜区, 且最有可能分泌到细胞外(图 1); 二级结构预测显示, *Kiss1*、*Kiss2* 蛋白质二级结构主要为 α-螺旋和无规则蜷曲, β 转角只在局部出现。利用网络在线工具 SignalP-4.1 预测施氏鲟 *Kiss1*、*Kiss2* 均存在信号肽(图 2), 其中, *Kiss1* 蛋白预测剪切位点位于 15~16 位氨基酸, *Kiss2* 预测剪切位点位于 20~21 位氨基酸; 通过 NetPhos 3.1 程序对施氏鲟 *Kiss1*、*Kiss2* 蛋白质磷酸化位点进行预测, 分数阈值大于 0.5 表示此位点发生了磷酸化, 且得分越高, 预测的置信度越高。结果显示, 施氏鲟 *Kiss1* 与 *Kiss2* 均以丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)为潜在的磷酸化位点。

2.2 *Kiss1* 和 *Kiss2* 氨基酸同源性分析

在 NCBI 数据库中, 对 *Kiss1*、*Kiss2* 氨基酸序列进行比对, 同时利用 DNAMAN 8.0 软件分析施氏鲟与其他物种的蛋白质氨基酸序列, 结果表明, 施氏鲟 *Kiss1* 与达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)同源性最高, 为 96.1%; 与豚鼠(*Cavia porcellus*)和抹香鲸(*Physeter catodon*)同源性较高, 分别为 86.9% 和 83.3%; 和海龟(*Chelonia mydas*)同源性最

低, 为 35.7% (表 2)。Kiss2 同样与达氏鲟同源性最高, 为 96.3%, 与铅点东方鲀(*Takifugu alboplumbeus*)同源性为 63%, 和真鲷(*Pagrus major*)、日本鲭(*Scomber japonicus*)同源性均较低, 分别为 39% 和

34.8% (表 3)。不同物种氨基酸序列对比发现, Kiss1 和 Kiss2 中存在高度保守区域(图 3 与图 4), 分别在 101~116 bp 和 91~106 bp 相似度最高, 均含有 C 末端核心肽。而在其他区域的序列则是高度多样的。

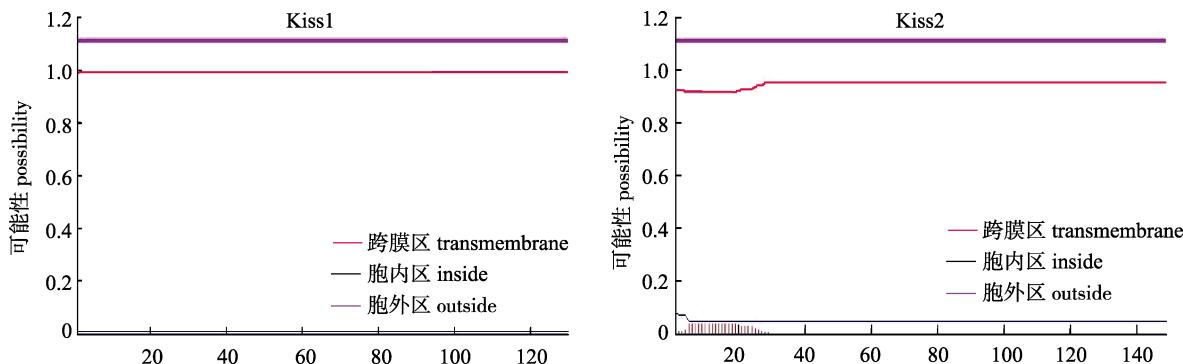


图 1 Kiss1 和 Kiss2 蛋白跨膜区分析
Fig. 1 The transmembrane domain analysis of Kiss1 and Kiss2 protein

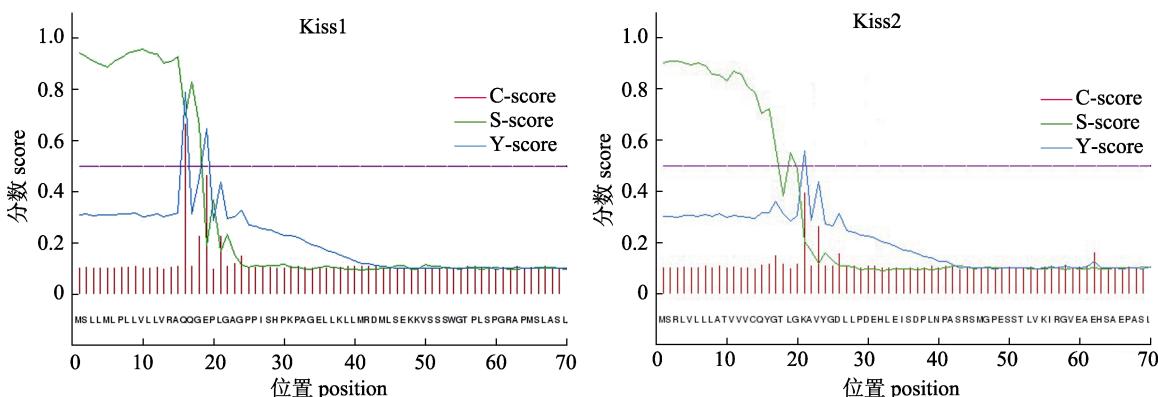


图 2 Kiss1 和 Kiss2 蛋白信号肽预测
Fig. 2 Prediction of Kiss1 and Kiss2 signal peptides

表 2 Kiss1 氨基酸序列的同源性比对
Tab. 2 Comparative identity of amino acid sequence of Kiss1

| 物种 species | GenBank 登录号 accession number | 同源性/% identity |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------|
| 达氏鲟 <i>Acipenser dabryanus</i> | QAX24814.1 | 96.1 |
| 豚鼠 <i>Cavia porcellus</i> | XP_003474726.1 | 86.9 |
| 北海狮 <i>Eumetopias jubatus</i> | XP_027975901.1 | 85.7 |
| 抹香鲸 <i>Physeter catodon</i> | XP_007110606.1 | 83.3 |
| 扬子鳄 <i>Alligator sinensis</i> | XP_025061208.1 | 83.3 |
| 家猫 <i>Felis catus</i> | XP_023103226.1 | 82.3 |
| 非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i> | NP_001156331.1 | 79.2 |
| 水牛 <i>Bubalus bubalis</i> | XP_006062384.1 | 67.7 |
| 山羊 <i>Capra hircus</i> | NP_001272639.1 | 67.7 |
| 白鲸 <i>Delphinapterus leucas</i> | XP_022448995.1 | 63.8 |
| 江豚 <i>Neophocaena asiaeorientalis</i> | XP_024606897.1 | 63.8 |
| 海龟 <i>Chelonia mydas</i> | XP_027683240.1 | 35.7 |

表 3 Kiss2 氨基酸序列的同源性比对
Tab. 3 Comparative identity of amino acid sequence of Kiss2

| 物种 species | GenBank 登录号 accession number | 同源性/% identity |
|------------------------------------|------------------------------|----------------|
| 达氏鲟 <i>Acipenser dabryanus</i> | QAX24815.1 | 96.3 |
| 铅点东方鲀 <i>Takifugu alboplumbeus</i> | BAJ15497.1 | 63.0 |
| 矛尾鱼 <i>Latimeria chalumnae</i> | ALD51308.1 | 58.0 |
| 蓝珊瑚鱼 <i>Chrysiptera cyanea</i> | BAO23489.1 | 57.9 |
| 大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i> | AWO97852.1 | 54.7 |
| 鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i> | SMN23033.1 | 46.7 |
| 黄尾鲷 <i>Seriola lalandi</i> | AEF32394.1 | 45.3 |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i> | NP_001153913.1 | 43.8 |
| 欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i> | ACM07423.1 | 42.7 |
| 点带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i> | ACT65993.1 | 40.0 |
| 真鲷 <i>Pagrus major</i> | BAL44206.1 | 39.0 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> | NP_001136057.1 | 37.3 |
| 日本鲭 <i>Scomber japonicus</i> | ADE21655.1 | 34.9 |

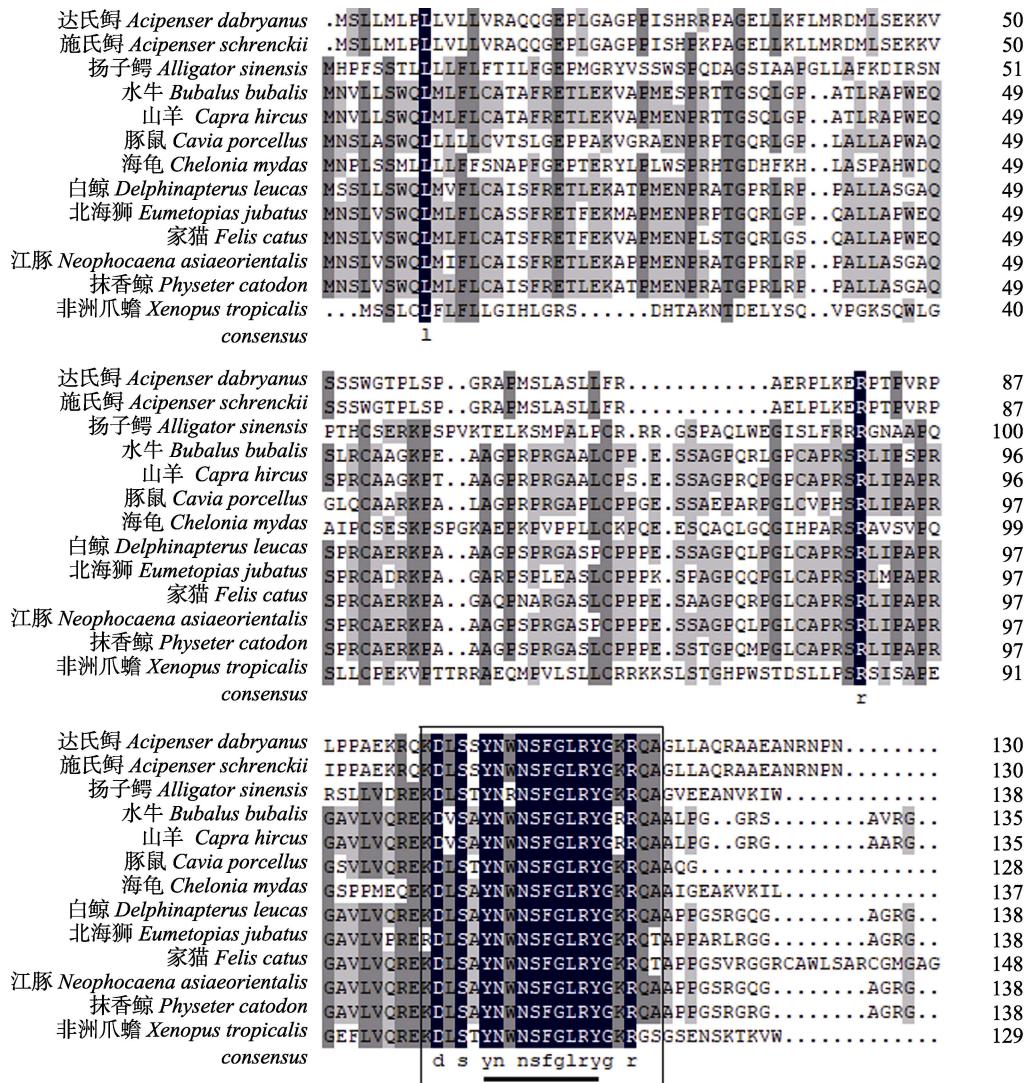


图 3 施氏鲟 Kiss1 氨基酸序列与其他物种氨基酸对比

相同的氨基酸、高度保守的氨基酸和比较保守的氨基酸分别以“黑色”、“深灰色”和“浅灰色”底色表示；C 末端核心十肽(即 Kiss1-10)用黑色粗下划线表示。

Fig. 3 Kiss1 amino acid alignment among *Acipenser schrenckii* and several species

The identical amino acid, highly conserved amino acid, and less conserved amino acid residues are indicated by “black”, “dark gray” and “light gray” background; C-terminal core decapeptide (Kiss1-10) is represented by a thick black underline.

2.3 Kiss1、Kiss2 蛋白质的系统进化树分析

利用 MEGA 7.0 结合 Clustal X 软件对各个物种 Kiss 蛋白的氨基酸序列进行比对，构建 N-J 系统进化树，Bootstrap 重复次数设为 1000 次。Kiss1 和 Kiss2 系统进化树分析发现，进化树可分为两大支，其中施氏鲟 Kiss1 与达氏鲟聚为一支且支持率为 100%，其次与爬行类聚为一支，然后与哺乳类(如猕猴、鼠、牛、熊)等聚为一支(图 5)。从图 6 可以看出，施氏鲟与达氏鲟 Kiss2 的氨基酸序列相似度最高，但与已报道的其他鱼类在进化过

程中则可能发生了一定程度的分化，以上表明施氏鲟 Kiss1 和 Kiss2 均与达氏鲟亲缘关系最近。

2.4 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 基因的时空表达分析

2.4.1 *kiss1* 和 *kiss2* 基因组织表达特征分析 利用荧光定量 PCR 方法检测 *kiss1* 和 *kiss2* 基因在施氏鲟心、脾、肾、肌肉等 8 种组织中的表达情况，结果显示，*kiss1* 和 *kiss2* 在检测的 8 种组织中均有表达，但在表达量上有明显差异(图 7)。*kiss1* mRNA 在性腺中的表达量最高，在脑、肾、肠、心和肌肉中微量表达，与其他组织相比，*kiss1*

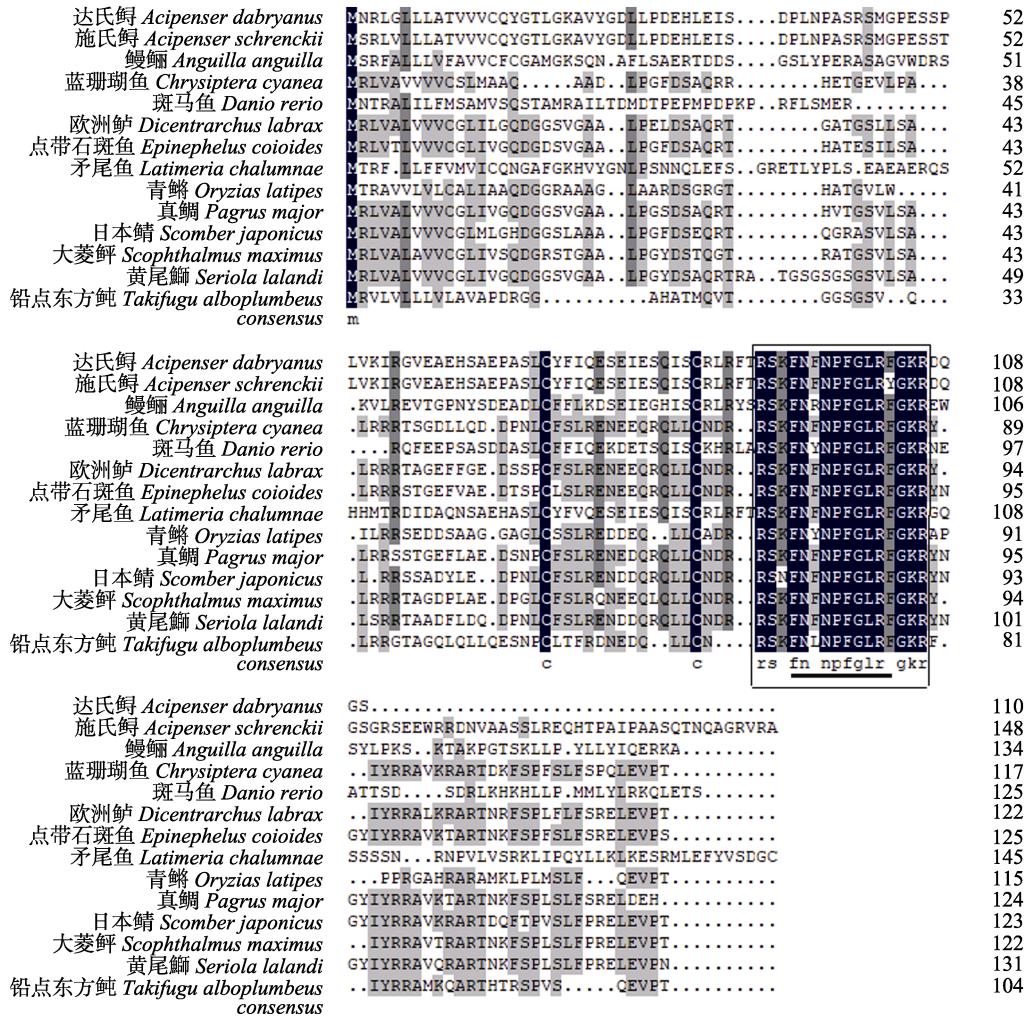


图 4 施氏鲟 Kiss2 氨基酸序列与其他物种氨基酸对比
相同的氨基酸、高度保守的氨基酸和比较保守的氨基酸分别以“黑色”、“深灰色”和
“浅灰色”底色表示; C 末端核心十肽(即 Kiss2-10)用黑色粗下划线表示。

Fig. 4 Alignment Kiss2 amino acid of *Acipenser schrenckii* and several species

The identical amino acid, highly conserved amino acid, and less conserved amino acid residues are indicated by “black”, “dark gray” and “light gray” background, respectively; C-terminal core decapeptide (Kiss2-10) is represented by a thick black underline.

在性腺中的表达差异最显著($P<0.05$); *kiss2* mRNA 在脑和性腺中的表达量与心脏、脾、肠、肌肉等组织相比存在显著性差异($P<0.05$), 而在心脏、鳃、和肌肉之间的表达差异不显著($P>0.05$)。

2.4.2 *kiss1* 和 *kiss2* 基因在不同发育时期的表达特征分析 以 β -actin 为内参基因, 通过实时荧光定量 PCR 技术分析施氏鲟孵化后不同发育时期 *kiss1* 和 *kiss2* 基因相对表达情况, 发现 *kiss1* 与 *kiss2* 的表达变化规律不同。非参数检验结果显示: $Z=20.315$, $P<0.05$, 表明施氏鲟受精卵孵化后 0~49 d 内, 其体内的 *kiss1* 的表达量整体存在差异。进一步两两比较发现, *kiss1* 在第 21 天表达量最

高, 且与对照组存在显著差异($P<0.05$) (图 8)。随着施氏鲟性腺的发育(64~199 d), 施氏鲟脑内的 *kiss1* 基因在 79~124 d 稳定表达, 第 154 天和 184 天显著升高($P<0.05$)。*kiss2* 相对表达量则呈现升高-降低-升高的变化趋势, 在 139 d 达最大峰值(图 9)。

3 讨论

迄今为止, kisspeptin 基因在除鸟类以外的其他脊椎动物中均已被鉴定出来。研究证实, 在哺乳类动物中只存在 *kiss1* 基因; 爬行类动物中只存在 *kiss2* 基因; 在两栖动物如非洲爪蟾(*Xenopus*

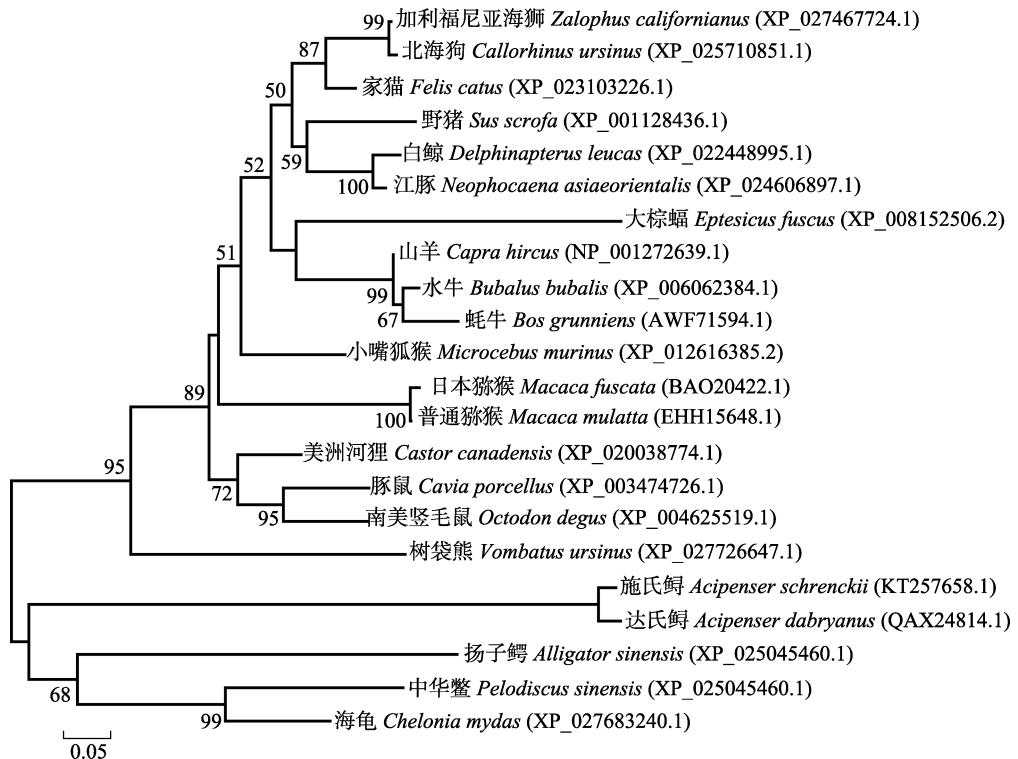


图 5 基于施氏鲟 Kiss1 与其他脊椎动物 Kiss1 序列构建的系统进化树

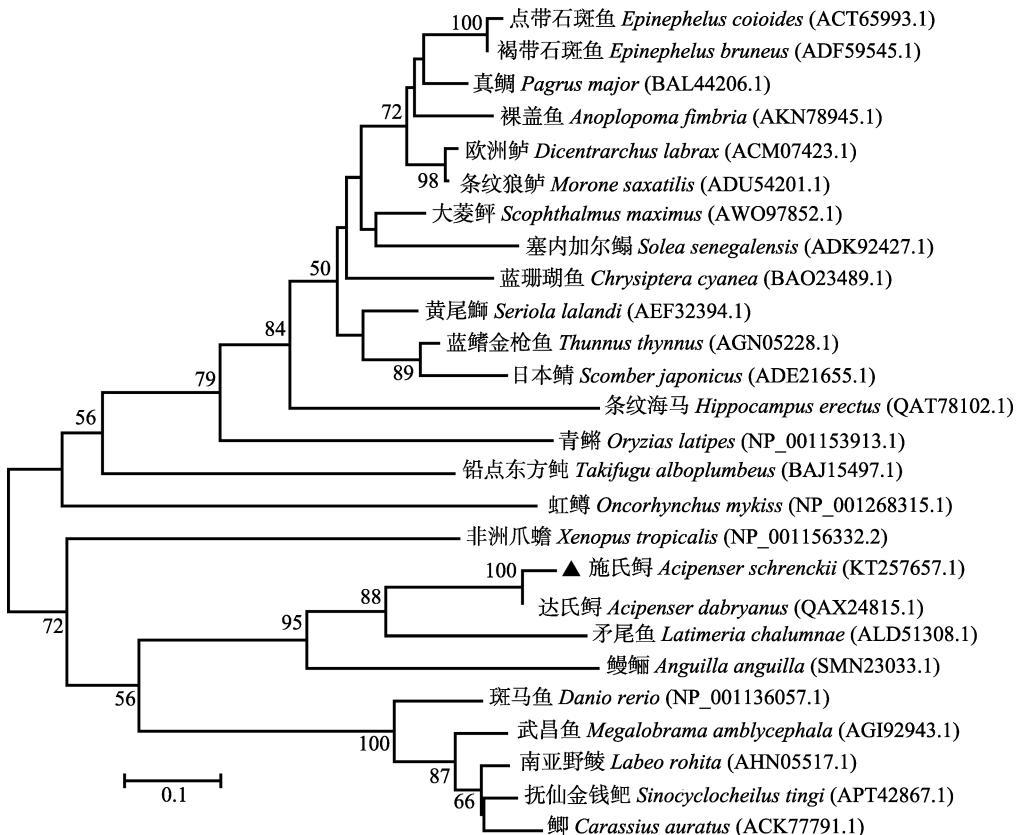
Fig. 5 Phylogenetic tree based on *Acipenser schrenckii* Kiss1 and other species' Kiss1 sequences

图 6 基于施氏鲟 Kiss2 与其他脊椎动物 Kiss2 序列构建的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree based on *Acipenser schrenckii* Kiss2 and other species' Kiss2 sequences

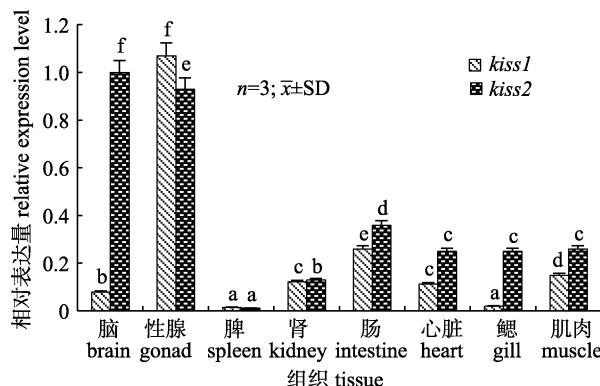


图7 施氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 基因在不同组织中的相对表达
不同字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$)

Fig. 7 The relative expression level of *kiss1* and *kiss2* in different tissues of *Acipenser schrenckii*. Different letters indicate significant differences between different tissues ($P<0.05$).

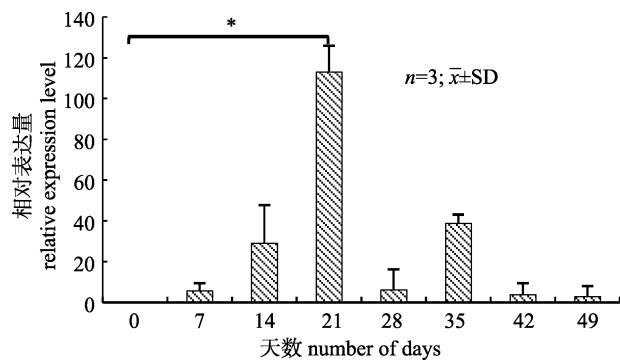


图8 孵化后0~49 d 施氏鲟体内 *kiss1* 基因的相对表达
*表示组间存在显著性差异($P<0.05$)

Fig. 8 Relative expression of *kiss1* gene in *Acipenser schrenckii* at 0~49 days after hatching. The asterisk indicates significant difference between different groups ($P<0.05$).

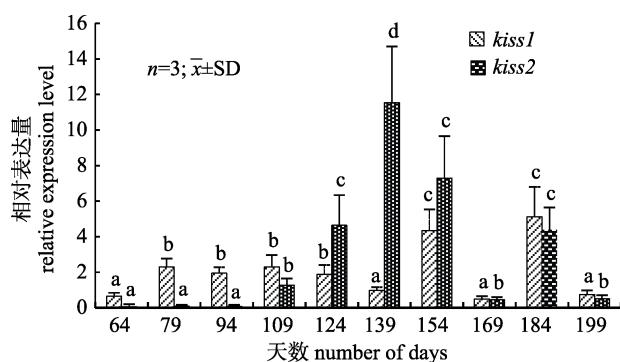


图9 孵化后64~199 d 施氏鲟体内 *kiss1* 和 *kiss2* 基因的相对表达
标准差上方不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 9 Relative expression of *kiss1* and *kiss2* gene in *Acipenser Schrenckii* at 64~199 days after hatching. Different letters above the error bars indicate significant differences ($P<0.05$).

tropicalis)中却发现了 *kiss1a*、*kiss1b* 及 *kiss2* 三种基因；在硬骨鱼类中，首次在斑马鱼和青鳉中鉴定出 Kisspeptin 基因后，已经在多种硬骨鱼类中鉴定出两种该基因的类型^[11-12]。相反，在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、日本比目鱼(*Japanese flounder*)、塞内加尔鳎(*Solea senegalensis*)以及红鲷(*red seabream*)等鱼类中只鉴定出了 *kiss2* 基因^[13]。本研究利用 RACE 技术首次克隆得到施氏鲟的两种 *kiss* 基因，*kiss1* 和 *kiss2* 具有高度保守区域，且与达氏鲟 *kiss1* 和 *kiss2* 基因序列一致性最高，亲缘关系最近。研究证实，*kiss1* 和 *kiss2* 基因的核心序列在不同物种中均非常保守^[14]，如斑马鱼、青鳉和日本鲭 *kiss1* 基因编码蛋白的 C 末端核心十肽为 YNLNSFGLRY，*kiss2* 基因编码蛋白的核心十肽为 FNYNPFGGLRF^[15]。本研究中，施氏鲟的 Kiss1 与 Kiss 蛋白预测的 C 末端核心十肽分别为 YNWNSFGLRY (Kiss1-10) 和 FNPNPFGGLRY (Kiss2-10)，同时，序列比对的结果表明，两种基因的核心序列均与其他脊椎动物高度相似。*kiss1* 编码的 kisspeptin-10 中的第 3 位氨基酸在哺乳动物和两栖动物中为 W，在鱼类中为 L，然而，施氏鲟 *kiss1*-10 的第三位为 W，同时，系统进化树显示施氏鲟与扬子鳄、中华鳖等归为一大支。以上说明，*kiss1* 和 *kiss2* 基因均比较保守，推测施氏鲟和两栖动物如中华鳖等拥有共同的祖先。

此外，Beck 等^[16]首次报道了由 Kisspeptin 介导的鱼类青春期启动，发现外源性 Kisspeptin 可以不同程度地加快鲈的青春期启动及发育。此后，在斑马鱼中，其体内实验显示 Kiss2 (Kiss2-10 或 Kiss2-12) 比 Kiss1 (Kiss1-10 或 Kiss1-15) 更能表现出对促性腺激素合成和释放的促进作用^[17-18]；在鲤中的 Kiss2 十二肽(Kiss2-12)对 *GnRH1*、*LHβ* 和 *FSHβ* 基因表达的影响远高于 Kiss1 十五肽 (Kiss1-15)^[19]；同样，kisspeptin 脑室注射后施氏鲟脑内 *mGnRH* mRNA 的表达量随着注射次数的增加显著升高；在鲭中，Kiss1 比 Kiss2 在促性腺激素刺激方面更有效，且当长期作用时，Kiss1-15 比 Kiss2-12 更能有效刺激其性腺成熟^[20-21]。以上说明，Kiss 十肽是发挥其功能所需的最短序列，且 Kisspeptin 无论类型如何，都可以不同程度地刺

激鱼类生殖功能。然而, 这可能会因生殖阶段、鱼类性别和作用时间而有所不同。

通过对施氏鲟 Kiss1、Kiss2 蛋白进行生物学信息预测分析, Kiss1、Kiss2 蛋白的不稳定系数分别为 44.16 和 55.66, 研究表明, 不稳定系数的值小于 40 才被认为是稳定蛋白^[22], 推测 Kiss1 和 Kiss2 均属于不稳定蛋白。对两者二级结构分析, 发现其基因编码蛋白质二级结构均以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 而酶活性和特异功能部位的构成常常与无规则卷曲有关^[23]。作为一种普遍的生命活动调节方式, 蛋白质的磷酸化修饰在许多细胞信号传导通路中起着枢纽作用^[24]。其蛋白的磷酸化反应可以控制细胞的内源酶“活性”, 对外界信号起到级联放大作用, 从而保证细胞对外界信号的持续反应。本研究中, 施氏鲟的 Kiss1 蛋白中含有 10 个丝氨酸、2 个苏氨酸、1 个酪氨酸磷酸化位点, Kiss2 蛋白中含有 12 个丝氨酸、5 个苏氨酸、1 个酪氨酸磷酸化位点, 推测两个基因在信号传导及代谢过程中可能具有重要作用。

kisspeptin 基因被认为是和生殖相关的基因, 斑马鱼 kiss1 基因主要在脑中表达, 性腺中表达相对较少^[25]。与之相反, 施氏鲟的 kiss1 基因在性腺中高水平表达, 而脑中的 kiss1 基因表达量相对较低; 施氏鲟 kiss2 基因在脑和性腺中均高表达, 这与塞内加尔鳎(Solea senegalensis)^[26]、南亚黑鲮(Labeo rohita)^[27]及欧洲鲈(Dicentrarchus labrax)^[28]的表达结果一致。然而, 在鮈的性腺中并没有检测到 kiss2 基因的表达^[29]。外周组织中, kiss1 和 kiss2 基因在施氏鲟的心脏、肾和肌肉等组织中均有表达, 在其他硬骨鱼类的不同组织中也检测到了 kiss 基因的表达^[30]。以上推测, kiss 基因在施氏鲟发育和生殖方面确实有重要作用, 且鱼类的 kiss 基因可能参与除生殖以外的其他功能, 但在其他组织中的生理学作用目前尚未见报道。

近几年, kisspeptin 在鱼类生殖调控中的作用也有较多研究。如 Kiss1 直接促进金鱼垂体细胞促黄体激素(LH)的分泌, 增加了促卵泡激素 β 亚基(lh β)的表达水平^[31], Kiss2 也促进了欧洲鲈和条纹鲈(Morone saxatilis)垂体细胞中 LH 及卵泡刺

激素(FSH)的分泌^[32-33]。此外, 已有研究证实鱼类 kiss 基因的时空表达模式与其发育阶段有关, 且具有种属特异性。如在鮈中, 雄鱼脑中 kiss1 和 kiss2 表达量随精巢发育逐渐降低, 且 kiss2 在排精后达最小值; 雌鱼脑 kiss1 表达量在卵巢发育过程中保持不变, kiss2 除在卵黄生成早期略增加外, 其表达随卵巢发育逐渐降低^[29]。在黄鳍结鱼(Tor putitora)中, 雌鱼脑 kiss1 的表达水平在卵巢发育初期明显高于排卵期, 且从卵黄期到排卵期脑组织中 kiss1 的表达水平显著下降, 与精子发生前相比, 在排精后雄鱼脑中 kiss1 mRNA 的表达显著下降^[34]。可见, 随着鱼类性腺的成熟, 其体内 kiss 基因的表达水平发生不同程度的降低。然而, 对星点东方鲀的研究发现, 从配子发生早期至产卵前后, kiss 基因表达均显著升高, 且雌鱼 kisspeptin 基因的表达量要高于雄鱼^[35], 此外, Zmora 等^[36]发现在条纹鲈性成熟期, kiss1 和 kiss2 基因表达均显著升高。研究表明, 仔鱼孵化后 24~180 d, 原始生殖细胞(PGC)迁入性腺原基发育为原始性腺, 这个时期为施氏鲟性腺分化的关键期^[10], 本研究以施氏鲟性腺分化的关键期为切入点, 探讨 kiss 基因的表达量。施氏鲟在孵化后 0~49 d 早期性腺发育过程中即性腺原基形成之前, 其体内 kiss1 mRNA 表达量逐渐升高, 在第 21 天达到峰值($P<0.05$); 与 kiss1 的表达模式不同, kiss2 mRNA 表达量较低, 与检测临界值无显著性差异, 表明在施氏鲟性别分化早期 kiss2 基因不表达。随着性腺的发育(孵化后 64~199 d), 施氏鲟脑内的 kiss2 基因开始表达, 在 139 d 达到最高水平($P<0.05$)。该结果与某些硬骨鱼类 kiss 基因在性腺发育早期的表达趋势大体一致。例如, 在雄性斑马鱼脑中, kiss1 mRNA 表达在孵化后 6 周达到峰值, 之后下降, 雌性斑马鱼脑中 kiss1 在孵化后的 2~8 周, mRNA 表达逐渐增加, 84 d 时达到峰值^[37]。Kitahashi 等^[15]研究发现, 斑马鱼 kiss1 和 kiss2 mRNA 表达水平从孵化后 1~7 d 开始升高, 且在 30 日龄时显著升高。在尼罗罗非鱼脑中, kiss2 基因的表达在未成熟阶段显著高于成熟阶段或产卵后阶段^[37]。综合以上结果推测, kiss1 和 kiss2 基因主要参与施氏鲟性腺发

育, 暗示 kisspeptin 基因在鱼类早期性腺发育和性别分化过程中具有重要作用, 但具体的作用机制仍需进一步探究。

参考文献:

- [1] Lee J H, Miele M E, Hicks D J, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1996, 88(23): 1731-1737.
- [2] Tena-Sempere M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: Focus on sexual differentiation and puberty onset[M]//Pediatric Neuroendocrinology. Basel: Karger, 2010, 17: 52-62.
- [3] Ogawa S, Parhar I S. Anatomy of the kisspeptin systems in teleosts[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 181: 169-174.
- [4] Tena-Sempere M, Felip A, Gómez A, et al. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: Lessons from non-mammalian vertebrates[J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 175(2): 234-243.
- [5] van Aerle R, Kille P, Lange A, et al. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish[J]. Peptides, 2008, 29(1): 57-64.
- [6] Shi Y, Zhang Y, Li S S, et al. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17 alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*[J]. Biology of Reproduction, 2010, 83(1): 63-74.
- [7] Yang B, Jiang Q, Chan T, et al. Goldfish kisspeptin: Molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(1): 60-71.
- [8] Liao Z Z, Sun C Y, Wang X A, et al. Molecular cloning and tissue distribution of kisspeptin from *Sinocyclocheilus tingi*[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2016, 35(4): 496-502. [廖宗甄, 孙彩云, 王晓爱, 等. 抚仙金线鲃 kisspeptin 基因的克隆及组织表达特性[J]. 四川动物, 2016, 35(4): 496-502.]
- [9] Zohar Y, Muñoz-Cueto J A, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 438-455.
- [10] Zhang Y, Sun H W, Liu X Y, et al. Histological observation of gonadal differentiation and effect of rearing temperature on sex differentiation in Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1008-1017. [张颖, 孙慧武, 刘晓勇, 等. 施氏鲟的性腺分化及养殖水温对其性腺分化的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1008-1017.]
- [11] Elizur A. The KiSS1/GPR54 system in fish[J]. Peptides, 2009, 30(1): 164-170.
- [12] Akazome Y, Kanda S, Okubo K, et al. Functional and evolutionary insights into vertebrate kisspeptin systems from studies of fish brain[J]. Journal of Fish Biology, 2010, 76(1): 161-182.
- [13] Wang B, Liu Q, Liu X Z, et al. Molecular characterization of kiss2 and differential regulation of reproduction-related genes by sex steroids in the hypothalamus of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2017, 213: 46-55.
- [14] Murphy K G. Kisspeptins: Regulators of metastasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis[J]. Journal of Neuroendocrinology, 2005, 17(8): 519-525.
- [15] Kitahashi T, Ogawa S, Parhar I S. Cloning and expression of kiss2 in the zebrafish and medaka[J]. Endocrinology, 2009, 150(2): 821-831.
- [16] Beck B H, Fuller S A, Peatman E, et al. Chronic exogenous kisspeptin administration accelerates gonadal development in basses of the genus *Morone*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2012, 162(3): 265-273.
- [17] Espigares F, Carrillo M, Gómez A, et al. The forebrain-midbrain Axts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/Gnrh1 system controlling the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Biology of Reproduction, 2015, 92(3): Article No. 70.
- [18] Felip A, Zanuy S, Pineda R, et al. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 312(1-2): 61-71.
- [19] Ohga H, Selvaraj S, Adachi H, et al. Functional analysis of kisspeptin peptides in adult immature chub mackerel (*Scomber japonicus*) using an intracerebroventricular administration method[J]. Neuroscience Letters, 2014, 561: 203-207.
- [20] Selvaraj S, Ohga H, Kitano H, et al. Peripheral administration of Kiss1 pentadecapeptide induces gonadal development in sexually immature adult scombrid fish[J]. Zoological Science, 2013, 30(6): 446-454.

- [21] Selvaraj S, Ohga H, Nyuji M, et al. Subcutaneous administration of Kiss1 pentadecapeptide accelerates spermatogenesis in prepubertal male chub mackerel (*Scomber japonicus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 166(2): 228-236.
- [22] Yu M, Dai J, Huang W, et al. hMTTERF4 knockdown in HeLa cells results in sub-G1 cell accumulation and cell death[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2011, 43(5): 372-379.
- [23] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry: Volume Two[M]. Beijing: Higher Education Press, 1980: 258-260. [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学: 下册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1980: 258-260.]
- [24] Eipper B A, Stoffers D A, Mains R E. The biosynthesis of neuropeptides: Peptide alpha-amidation[J]. Annual Review of Neuroscience, 1992, 15(1): 57-85.
- [25] Biran J, Ben-Dor S, Levavi-Sivan B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates[J]. Biology of Reproduction, 2008, 79(4): 776-786.
- [26] Mechaly A S, Viñas J, Piferrer F. Gene structure analysis of kisspeptin-2 (Kiss2) in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Characterization of two splice variants of Kiss2, and novel evidence for metabolic regulation of kisspeptin signaling in non-mammalian species[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011, 339(1-2): 14-24.
- [27] Felip A, Zanuy S, Pineda R, et al. Evidence for two distinct KiSS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2009, 312(1-2): 61-71.
- [28] Saha A, Pradhan A, Sengupta S, et al. Molecular characterization of two kiss genes and their expression in rohu (*Labeo rohita*) during annual reproductive cycle[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 191: 135-145.
- [29] Selvaraj S, Kitano H, Fujinaga Y, et al. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two Kiss genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 169(1): 28-38.
- [30] Roa J, Aguilar E, Dieguez C, et al. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function[J]. Frontiers in Neuroendocrinology, 2008, 29(1): 48-69.
- [31] Chang J P, Mar A, Wlasichuk M, et al. Kisspeptin-1 directly stimulates LH and GH secretion from goldfish pituitary cells in a Ca^{2+} -dependent manner[J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 179(1): 38-46.
- [32] Espigares F, Zanuy S, Gómez A. Kiss2 as a regulator of lh and fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Biology of Reproduction, 2015, 93(5): Article No. 114.
- [33] Zmora N, Stubblefield J D, Wong T T, et al. Kisspeptin antagonists reveal kisspeptin 1 and kisspeptin 2 differential regulation of reproduction in the teleost, *Morone saxatilis*[J]. Biology of Reproduction, 2015, 93(3): Article No. 76.
- [34] Shahi N, Singh A K, Sahoo M, et al. Molecular cloning, characterization and expression profile of kisspeptin1 and kisspeptin1 receptor at brain-pituitary-gonad (BPG) axis of golden mahseer, *Tor putitora* (Hamilton, 1822) during gonadal development[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 205: 13-29.
- [35] Ando H, Shahjahan M, Hattori A. Molecular neuroendocrine basis of lunar-related spawning in grass puffer[J]. General and Comparative Endocrinology, 2013, 181: 211-214.
- [36] Zmora N, Stubblefield J, Zulperi Z, et al. Differential and gonad stage-dependent roles of kisspeptin1 and kisspeptin2 in reproduction in the modern teleosts, *Morone* species[J]. Biology of Reproduction, 2012, 86(6): Article No. 177.
- [37] Park J W, Jin Y H, Oh S Y, et al. Kisspeptin2 stimulates the HPG axis in immature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2016, 202: 31-38.

Cloning, sequence analysis, and expression characterization of the kisspeptin gene from *Acipenser schrenckii*

GAO Xue^{1,2,3}, LYU Weihua², WANG Hongwei⁴, ZHANG Ying²

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resource, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. Sturgeon Breeding Engineering Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 102400, China

Abstract: The aims of this study were to examine the structural features of the amino acid sequence encoded by *kiss1* and *kiss2* genes and to analyze the expression patterns of these genes during gonadal development, to understand the role of hypothalamic neuropeptide kisspeptin in reproductive regulation of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). We used reverse transcription PCR and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technology to obtain the full-length cDNA of *kiss1* and *kiss2* genes. The results indicated that cDNA of the *kiss1* gene of *A. schrenckii* was 522 bp, encoding 130 amino acids; cDNA of the *kiss2* gene was 518 bp, encoding 149 amino acids. Among them, the α -helix and irregular distortion in Kiss1 and Kiss2 are regarded as the main components in the secondary structure, both containing signal peptide, transmembrane structure, and unstable hydrophilic protein secreted outside the cell. Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *kiss1* and *kiss2* of *A. schrenckii* had highly conserved regions, which had the highest consistency (and the closest relationship) with the *kiss1* and *kiss2* sequences of Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*). The results of real-time PCR showed that the expression of *kiss1* and *kiss2* in *A. schrenckii* was tissue-specific, and *kiss1* had the highest expression in the gonads, while *kiss2* expression was the highest in the brain. In the early gonadal development of *A. schrenckii* the expression of *kiss2* was lower at 0–49 d after hatching, while the expression of *kiss1* was higher, reaching the maximum at 21 d after hatching. With the development of gonads in *A. schrenckii* (64–199 d), the expression level of *kiss2* gradually increased and reached the highest at 139 d, followed by a decline. In contrast, the expression level of *kiss1* reached the maximum at 184 days after hatching. In summary, the kisspeptin gene plays an important role in the early gonadal development of *A. schrenckii*, with differing regulatory functions. This study lays a theoretical foundation for further elucidating the physiological functions and molecular regulation mechanisms of *kiss1* and *kiss2* genes.

Key words: *Acipenser schrenckii*; kisspeptin; gene clone; sequence analysis; gene expression

Corresponding author: ZHANG Ying. E-mail: zhangying@hrfri.ac.cn