

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00012

圆斑星鲈促性腺激素释放激素基因克隆及表达特性

柳学周^{1,2}, 徐永江^{1,2}, 廖梅杰^{1,2}, 潘传燕³, 王妍妍^{1,2}

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071;
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. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003

摘要: 采用 RACE 技术, 在圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)脑中克隆到 3 种 *GnRH* 基因的 cDNA 序列: *cGnRH-II*、*sGnRH* 和 *sbGnRH*。每种 *GnRH* 都包括 1 个信号肽、1 个 Gly-Lys-Arg 连接序列和 1 个 *GnRH* 相关肽。其中, *cGnRH-II* 的 cDNA 全长为 568 bp, 编码 85 个氨基酸, ORF 为 255 bp, 5'UTR 为 141 bp, 3'UTR 为 169 bp。 *sGnRH* 的 cDNA 全长为 457 bp, 编码 90 个氨基酸, ORF 为 270 bp, 5'UTR 为 41 bp, 3'UTR 为 143 bp。 *sbGnRH* 的 cDNA 全长为 381 bp, 编码 98 个氨基酸, ORF 为 294 bp, 5'UTR 为 48 bp, 3'UTR 为 36 bp。分析了 3 种 *GnRH* 基因的编码氨基酸序列与其他脊椎动物的同源性, 圆斑星鲈 *GnRH* 与鲈形目鱼类氨基酸同源性最高, 其次为鲈形目鱼类。对 3 种 *GnRH* 基因的系统进化分析表明, 圆斑星鲈 *GnRH* 基因与其他鲈形目鱼类亲缘关系最近, 其次为鲈形目、鲑形目和鳗鲡目鱼类。荧光定量 PCR 分析表明, 3 种 *GnRH* 基因都在脑中表现出最高表达水平且具有性别特异性表达模式: 雌性中不同组织的 *GnRH* mRNA 表达水平都相应高于雄性。组织表达分析表明, *cGnRH-II* 的 mRNA 仅在脑中表达, 而 *sbGnRH* 在各个组织都有表达, *sGnRH* 仅在脑、垂体和性腺中表达。脑中 *sbGnRH* mRNA 的表达水平在卵巢成熟过程中变化显著($P < 0.05$), 而其他两种 *GnRH* 的 mRNA 表达水平变化不显著($P > 0.05$)。本研究首次在圆斑星鲈脑中克隆到 3 种 *GnRH* 基因, 其组织和季节表达水平变化表明 *sbGnRH* 可能是圆斑星鲈生殖调控的关键 *GnRH* 类型, 本结果可为圆斑星鲈生殖调控机制和人工繁育技术研究提供理论支撑。

关键词: 圆斑星鲈; *GnRH*; 分子克隆; 表达特性

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0012-13

在自然资源下降的情况下, 开发新的海洋鱼类资源是人类获取优质食物蛋白的重要途径。开发新的海洋鱼种并成功实现其人工养殖, 首要前提是认识该鱼种的生殖特性, 以控制其生殖周期和产卵。鱼类的生殖受到脑-垂体-性腺轴(BPG轴)调控。其中, 促性腺激素释放激素(GnRH)是BPG轴的关键内分泌调控激素, 在脊椎动物的性腺发育成熟中起着至关重要的调控作用。*GnRH*由位于脑中的分泌神经元合成, 作用于垂体前部, 刺激垂体合成促性腺激素(GtH)。促性腺激素包括

促滤泡素(FSH)和促黄体素(LH), 通过血液循环系统到达性腺, 刺激性腺合成类固醇激素, 调控性腺配子发生、性腺生长和发育成熟^[1]。目前, 学者们在脊椎动物中共鉴定出 14 种不同分子形式的 *GnRH*, 通常人们以初次分离到该 *GnRH* 的物种名字命名该 *GnRH*。在硬骨鱼类中发现存在 8 种形式的 *GnRH*, 这些不同分子形式的 *GnRH* 具有共同的核心 10 肽结构, 并在长期的进化过程中具有保守的分子结构, 从而组成了 *GnRH* 多肽家族^[2]。现有研究表明, 硬骨鱼类一般在脑中表达

收稿日期: 2012-04-22; 修订日期: 2012-06-19.

基金项目: 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-50); 国家 863 计划项目(2012AA10A413); 中央级公益性事业单位基本科研业务费项目(20603022012022); 国家留学人员科技活动项目择优资助经费资助项目.

作者简介: 柳学周(1959-), 男, 研究员, 主要从事鱼类繁殖理论和增养殖技术研究. Tel: 0532-85830506; E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

2~3 种由不同基因编码的 GnRH 分子^[3]。在 3 种 GnRH 分子中, 其中一种是种特异性的 GnRH, 其分泌神经元主要分布在视前区, 并在生殖过程中起主要的调节作用; 另一种高度保守的 GnRH 形式(如 cGnRH-II), 其分泌神经元一般分布在中脑, 起着神经调质或者神经递质的作用^[4]; 第 3 种 GnRH 分子为 sGnRH, 一般分布在末端神经节和嗅球部位^[2], 但其生理功能不详。

圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)是一种冷水性大型底栖鱼种, 主要分布在中国、日本和韩国沿海, 其因肉质鲜嫩、经济价值较高、营养丰富而成为理想的水产增殖开发新品种, 而如何控制其性腺发育成熟并获得产卵成为实现人工养殖的首要问题。目前, 圆斑星鲈亲鱼在人工养殖条件下存在雌雄发育不同步的现象, 导致优质受精卵获取存在困难。因研究者和养殖业者对其生殖机理的认识有限, 使得其人工繁育技术开发进展缓慢。GnRH 是控制硬骨鱼类生殖的关键调控因子, 人工养殖条件下亲鱼的生殖障碍可能是由于养殖环境抑制了亲鱼 GnRH 的表达, 从而抑制了 FSH 和 LH 的合成和释放, 导致性腺类固醇激素的合成和配子发育发生障碍^[1]。因此, 开展圆斑星鲈 GnRH 的研究, 认识其生殖内分泌调控机制是突破其人工繁育技术并进行养殖开发的关键步骤, 同时可为这一稀有鱼种的资源增殖研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验鱼来源和样品处理

本实验用鱼全部来自青岛忠海水产有限公司培育的圆斑星鲈亲鱼。亲鱼培育池为容积 25 m³ 的圆形水泥池, 亲鱼年龄为 3~4 龄, 体质量 1 500~2 300 g, 培育密度 2~3 尾/m³。亲鱼饵料为活沙蚕、贝肉。日投喂 2 次, 投喂量为鱼体质量的 2%~3%。

2009 年 5 月, 取样圆斑星鲈亲鱼 4 尾(2♀: 2♂), 所有实验鱼以致死剂量的 MS222(400 mg/L)麻醉致死后置冰上, 迅速取出脑、垂体、性腺、肝、脾、肾、肠道、心脏和胃组织, 迅速投入液氮保存。取脑组织用于 GnRH 分子克隆, 其他组织用

于组织表达分析。

2009 年 8 月开始, 对圆斑星鲈亲鱼进行温度和光照调控, 促进亲鱼性腺发育成熟。分别于 2009 年 8 月(卵黄生成期), 12 月(产卵前期)和 2010 年 4 月(产卵结束后)取样雌性圆斑星鲈亲鱼各 3 尾, 取脑组织用于 3 种 GnRH 基因在产卵期的表达变化研究。性腺发育期的划分根据徐永江等^[5]的研究结果确定。

1.2 GnRH 分子克隆

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 合成 利用 Trizol (Invitrogen, 美国)法提取脑组织总 RNA。总 RNA 以 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测质量, 以微量核酸测定仪(Nanodrop ND2000)测定浓度。以 DNase I(NEB, USA)处理总 RNA 以去除基因组 DNA 污染。利用 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech, USA)合成第 1 链 cDNA, 所有操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 GnRH 基因中间片段的克隆 根据其他已知鲈类 GnRH 序列的保守区, 设计 PCR 引物(表 1)扩增圆斑星鲈 GnRH 基因中间区段。引物 cF1、cR1 和 cR2 用来扩增 cGnRH-II 中间片段, 引物 sbF 和 sbR 用来扩增 sbGnRH 基因的中间片段, 引物 sF 和 sR 用来扩增 sGnRH 基因的中间片段。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

1.3 GnRH 3'和 5'端 RACE 扩增

根据测序所得的中间序列设计特异性引物进行 3'和 5'端 RACE 扩增。设计 cGnRH-II 特异性引物 cS1 和 cA1, sbGnRH 特异性引物 sbS1 和 sbA1, sGnRH 特异性引物 sS1、sS2 和 sA1(表 1)。使用 SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, USA), 利用巢式 PCR 进行 3'和 5'端 RACE 扩增。3'端扩增: 以 3'-Race ready-cDNA 为模板, 分别使用引物 cF1 和接头引物 UPM 组合、引物 cS1 和接头引物 NUP 组合进行巢式 PCR 扩增 cGnRH-II 的 3'端序列; 以引物 sbF1 和 UPM 组合、引物 sbS1 和 NUP 组合扩增 sbGnRH 的 3'端序列; 以引物 sS1 和 UPM 引物组合、引物 sS2 和 NUP 引物组合扩增 sGnRH 的 3'端序列。5'端扩增: 以扩增得

表 1 圆斑星鲈 *GnRH* 基因 cDNA 扩增表达所用引物
Tab. 1 Primers used for PCR amplification of *GnRH* cDNAs in *Verasper variegatus*

引物名称 primer name	核酸序列(5'-3') nucleotide acid(5'-3')
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
cF1	CACCTGTGAACCTGTGAGAC
cR1	GGTCACCAGGTAGAAAAGCA
cR2	AGCTCTCTGGCCAAAGCATC
sbF	AAGACCACCGAATCGGAGAC
sbR	CTGTAAATTCGGCAAAAAGG
sF	TACCTTCCTCTGCAGCTCTG
sR	GCTCAGGAAGAGACACCACT
cS1	GTTCTGCTGCTGGGGCTGCTTCT
cA1	CTGAAATCTCTGACGTGCCAAAA
sbS1	CTTGTCAGTGTGGCTGCTCCTCG
sbA1	GAGCAGCCACACTGACAAGGTTT
sS1	CTGATGGAAGCGAGCAGCAGACT
sS2	GGATGATGGGCACAGGCGGAGTGGT
SA1	AGACACCACTCCGCCTGTGCCATC

到的 3 种 *GnRH* 的 3'末端序列为依据设计扩增 5'末端的特异性引物(表 1)。以 5'-RACE-Ready cDNA 为模板, 利用特异性引物 cR1 和接头引物 UPM 组合、引物 cA1 和接头引物 NUP 组合进行巢式 PCR, 扩增 *cGnRH-II* 的 5'端序列。以 sbR1 和 UPM 组合和 sbA1 和 NUP 引物组合扩增 *sbGnRH* 的 5'端序列。以引物 sA1 和 UPM、NUP 引物组合扩增 *sGnRH* 的 5'端序列。

上述 3 种 *GnRH* 基因的扩增采用相同的 PCR 条件, 第一次梯度 PCR 扩增条件: 94℃ 30 s; 68℃ 30 s, 10 个循环, T_m 每个循环降低 1℃, 在 72℃ 延伸 1 min; 然后 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 60s, 20 个循环, 最后在 72℃ 延伸 7 min。巢式 PCR 扩增条件: 94℃ 1 min; 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 最后在 72℃ 延伸 10 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增的 PCR 产物进行检测, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒(Montage, 美国)对目的条带进行回收, 将回收的 PCR 产物克隆到 pEASY-T1 vector (Transgene Biotechnology, China), 后转移至 JM109 感受态细胞中过夜培养。挑选阳性克隆, M13 通用引物测序。

1.4 *GnRH* 的组织 and 性别特异性表达检测

采用荧光定量 PCR 方法检测了 3 种 *GnRH* 基

因的组织表达和性别差异表达模式。RNA 提取、cDNA 反转录按照 1.2.1 的方法进行。定量 PCR 实验使用 realplex 实时定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L \times SYBR® Premix Ex Taq™ II, 1 μ L 定量引物 (1 μ mol/l), 1 μ L 的 1:100 稀释的 cDNA 模板和 9.5 μ L 去离子水(ddH₂O)。利用圆斑星鲈 β -actin 做为内参。定量引物(表 2)设计以获得的 *GnRH* 的 cDNA 序列为依据, 使用 Beacon designer 7.0 软件 (Premier BioSoft)。引物 cF2 和 cR2 用于 *cGnRH-II* 的定量扩增, sF2 和 sR2 用于 *sGnRH* 的定量扩增, sbF2 和 sbR2 用于 *sbGnRH* 的定量扩增, β -actin F 和 β -actin R 用于 β -actin 基因的定量扩增。荧光定量 PCR 条件: 94℃ 30 s, 然后 94℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。对 PCR 产物进行测序以验证定量引物的特异性, 以 β -actin 基因的扩增量作为参照计算 3 种 *GnRH* 基因的定量扩增结果。

1.5 雌性圆斑星鲈脑中 *GnRH* mRNA 在产卵前后的表达水平检测

为了认识 3 种 *GnRH* 与圆斑星鲈卵巢发育成熟的关系, 利用荧光定量 PCR 技术, 对雌性圆斑星鲈脑中 *GnRH* 基因的 mRNA 表达水平在产卵前、产卵中和产卵后的变化进行了检测。实验鱼

表 2 圆斑星鲽 *GnRH* 基因定量表达引物列表
 Tab. 2 Primers used for quantitative expression of *GnRH* genes in *Verasper variegatus*

引物名称 primer name	核酸序列(5'-3') nucleotide sequence (5'-3')
cF2	TGACTGTAGGACGAGCAGAG
cR2	GCAGAACCAGCCGAGATG
SbF2	AAGGACTGAAGACCACCGAATC
sbR2	CACGAGGAGCAGCCACAC
sF2	CAGGTGTTGGTGTGATG
sR2	AGGTCTCTTTGGGTTTG
β -actin F	TTCTGGTGATGGTGTGAC
β -actin R	GTGGTGGTGAAGGAGTAG

的取样见 1.1。定量 PCR 扩增使用的引物(表 2)、PCR 体系及 PCR 反应条件和结果的计算等同 1.4。

1.6 数据分析

利用 DAMBE (<http://aix1.uottawa.ca/>)对已知物种 *GnRH* 序列进行比对分析。测序结果利用 Chromas(<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)进行序列拼接, BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行基因序列的同源性分析; 用 DNASTar 软件 (<http://dnastar.com>) 确定 *GnRH* 编码基因开放阅读框并翻译成氨基酸序列,

预测分子量、等电点等参数。用 SignalP V3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测每种 *GnRH* 分子的信号肽区域。用 Clustalx 2. 0. 12(<http://www.clustal.org/download/current/>)和 MEGA 4.1(<http://www.megasoftware.net/mega41.html>) 进行氨基酸序列对位排列、系统树构建和序列相似性分析。

定量 PCR 扩增的结果计算参照 Schmittgen 等^[6]的方法, 对计算得出的数据进行统计分析(SPSS 16.0), 差异显著性水平设为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

本研究首次在圆斑星鲽脑中克隆到 3 种 *GnRH* 基因的 cDNA 序列, 分别为 *cGnRH-II*、*sbGnRH* 和 *sGnRH*。3 种 *GnRH* 基因结构模式图及其所用引物的位置见图 1。所有的 cDNA 序列都编码 1 个 5'非编码区、信号肽、GnRH 十肽、GnRH 相关肽和 3'非编码区。

2.1 *GnRH* 前体的 cDNA 序列

cGnRH-II 的 cDNA 序列全长为 568 bp, 编码 85 个氨基酸, 包括 1 个长 255 bp 的开放阅读框

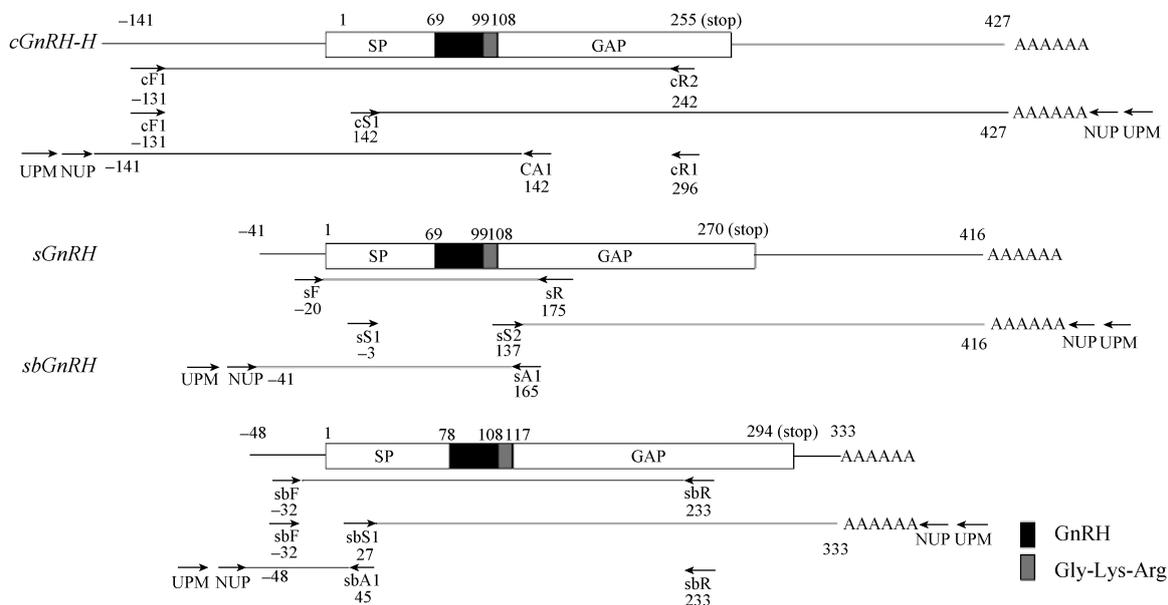


图 1 *cGnRH-II*、*sGnRH* 和 *sbGnRH* cDNA 序列结构模式图和对应的引物位置

SP: 信号肽; GnRH: 促性腺激素释放激素; GAP: *GnRH* 相关肽。

Fig. 1 Schematic structure of *cGnRH-II*, *sGnRH*, and *sbGnRH* precursor cDNAs of *Verasper variegates* and positions of primers used for RT-PCR

SP: signal peptide; GnRH: gonadotropin-releasing hormone; GAP: *GnRH*-associated peptide.

(ORF), 1 个 141 bp 的 5'非编码区, 1 个 169 bp 的 3'非编码区, 1 个终止密码子(TGA), 信号肽长为 23 个氨基酸, 预测的蛋白分子量为 9.59 kD, 等电点为 8.53。GenBank 数据库获取号 HM131601(图 2-A)。sGnRH 的 cDNA 序列全长为 457 bp, 编码 90 个氨基酸, 包括 1 个长 270 bp 的开放阅读框

(ORF), 1 个 41 bp 的 5'非编码区, 1 个 143 bp 的 3'非编码区, 1 个终止密码子(TGA)。预测的蛋白分子量为 10 kD, 等电点为 10.18。GenBank 数据库获取号 HM131602(图 2-B)。sbGnRH 的 cDNA 序列全长为 381 bp, 编码 98 个氨基酸, 包括 1 个长 294 bp 的开放阅读框(ORF), 1 个 48 bp 的 5'非编码

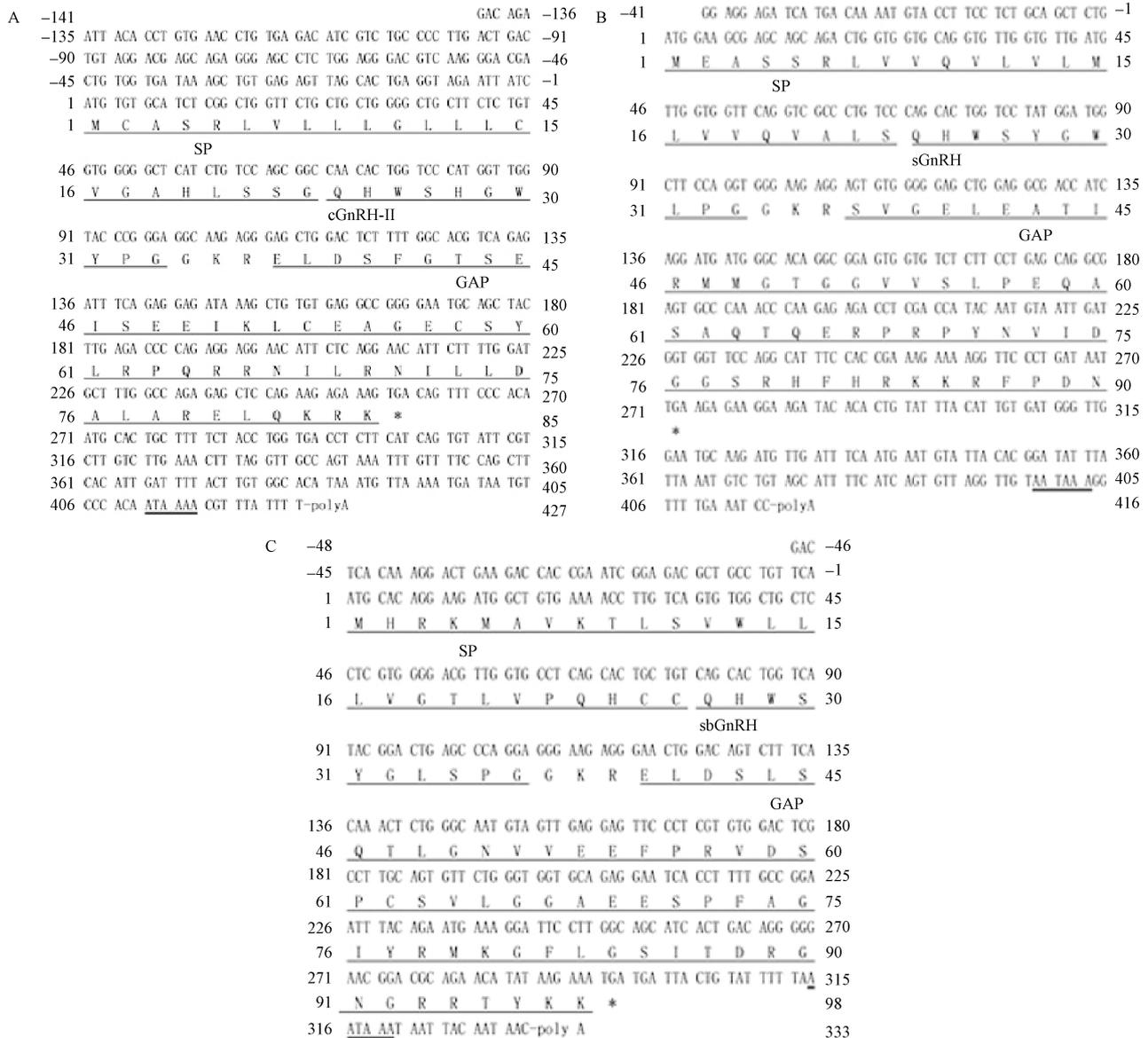


图 2 圆斑星鲈 *GnRH* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

A. *cGnRH-II*; B. *sGnRH*; C. *sbGnRH*.

信号肽序列(SP)、GnRH 核心肽(cGnRH-II、sGnRH、sbGnRH)和 GnRH 相关肽(GAP)分别在图中标示, 终止密码子 TGA 下方以星号(*)标注, 加尾信号 AATAAA 以双划线标注。

Fig. 2 Nucleotide sequence of the cDNA encoding the GnRH precursors of *Varasiper variegatus* and the deduced amino acid sequence. Nucleotides are numbered from 5' to 3' end, beginning with the initiation codon (ATG) in the coding region for the opening reading frame. Amino acid residues are numbered with the first residue (Met) in the open reading frame. Signal peptide (SP), GnRH core peptide (cGnRH-II, sGnRH, sbGnRH) and GnRH-associated peptide (GAP) are underlined. The asterisk indicates the stop codon. The nucleotides corresponding to the polyadenylation signal in the 3'-untranslated region (AATAAA) are double underlined.

区, 1 个 36 bp 的 3'非编码区, 1 个终止密码子(TGA)。预测的蛋白分子量为 10.84 kD, 等电点为 9.31。GenBank 数据库获取号 HM131603(图 2-C)。

2.2 序列同源性比对和系统进化分析

将推导的 cGnRH- II 前体的氨基酸序列与哺乳动物、鸟类、两栖动物、爬行动物和其他鱼类进行了比对分析。结果发现 cGnRH- II 的 GnRH 十肽区域和裂解位点 Gly-Lys-Arg 在所有脊椎动物中高度保守(表 3)。cGnRH- II 前体的氨基酸序列与鱼类的同源性为 56.5%~100%, 其中与鲆鲽

类的同源性达 97.6%以上。当与哺乳动物、鸟类、爬行类和两栖类比较时, 氨基酸同源性下降为 25.9%~61. 2%。圆斑星鲈 sGnRH 的氨基酸序列与其他鱼类的同源性为 42.2%~97.8%, 其中与条斑星鲈同源性最高, 达 97.8%。与其他鲈形目鱼类相比, 同源性仍保持较高的水平(78.9%~85.2%), 与鲤形目鱼类的同源性为 42.4%~44.4%, 与鲑形目鱼类的同源性为 61%~70% (表 3)。圆斑星鲈 sbGnRH 前体的氨基酸序列与其他鲆鲽类的同源性最高, 达 90.8%~93.8%, 与鲈形目鱼类的同源

表 3 圆斑星鲈 GnRH 氨基酸序列与其他硬骨鱼类的同源性比对分析
Tab. 3 Amino acid identity between prepro-GnRHs of *Verasper variegatus* and those of other teleosts

促性腺激素释放 激素类型 GnRH form	物种 species	圆斑星鲈 <i>Verasper variegatus</i>		
		cGnRH- II	sbGnRH	sGnRH
cGnRH- II	条斑星鲈 <i>Verasper moseri</i>	100	16. 5	24. 7
	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	97. 6	16. 5	27. 1
	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	92. 9	16. 5	21. 2
	欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	90. 6	21. 2	24. 7
	金鱼 <i>Carassius auratus</i> 1/2	60/64. 7	20. 9/14	20. 9/20. 9
	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	61. 2	14	18. 6
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	83. 5	18. 6	24. 4
	大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus keta</i>	90. 8	24. 6	32. 3
	鲈 <i>Ictalurus punctatus</i>	68. 2	20. 9	20. 9
	鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	70. 6	19. 5	26. 4
	丽鱼 <i>Pseudotropheus crabro</i>	60. 9	18. 8	22. 4
	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	83. 8	17. 5	22. 5
sbGnRH	条斑星鲈 <i>Verasper moseri</i>	15. 3	93. 8	20
	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	22. 4	92. 9	18. 9
	巴西鲷 <i>Paralichthys orbignyanus</i>	22. 4	90. 8	18. 9
	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	21. 2	55. 2	18. 4
	真鲷 <i>Pagrus major</i>	24. 7	67. 2	26. 6
	欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	21. 2	68. 4	22. 2
	丽鱼 <i>Pseudotropheus crabro</i>	20	70. 2	18. 9
	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	21. 2	51. 6	14. 4
sGnRH	条斑星鲈 <i>Verasper moseri</i>	24. 7	20	97. 8
	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	9. 8	19. 7	88. 5
	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	21. 2	20. 5	85. 2
	欧洲海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	25. 9	20	80
	金鱼 <i>Carassius auratus</i>	23. 5	23. 4	44. 4
	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> 1/2	15. 9/23. 2	17. 1/17. 1	67. 1/61
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> 1/2	27. 1/25. 7	18. 6/20	74. 3/70
	丽鱼 <i>Pseudotropheus crabro</i>	20	17. 8	78. 9
	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	20	20	75. 6

性为 55.2%~77.9%。

利用 Clustalx 2.0.12 和 Mega 4.1 软件构建圆斑星鲈 cGnRH-II 和其他脊椎动物的系统进化树, 结果表明, 圆斑星鲈 cGnRH-II 与其他鲈形目鱼类和鲑形目鱼类聚为一个分支, 和鲈形目及鳗鲡目

鱼类聚为一个大的分支, 哺乳类的 cGnRH-II 聚为一个独立的分支(图 3)。圆斑星鲈的 sGnRH 与其他鲈形目鱼类、鲈形目和鳗鲡目鱼类聚为一个小的分支, 并与鲑形目鱼类聚为一个大的分支, 鲤形目鱼类聚为一个独立分支(图 4)。sbGnRH 属于

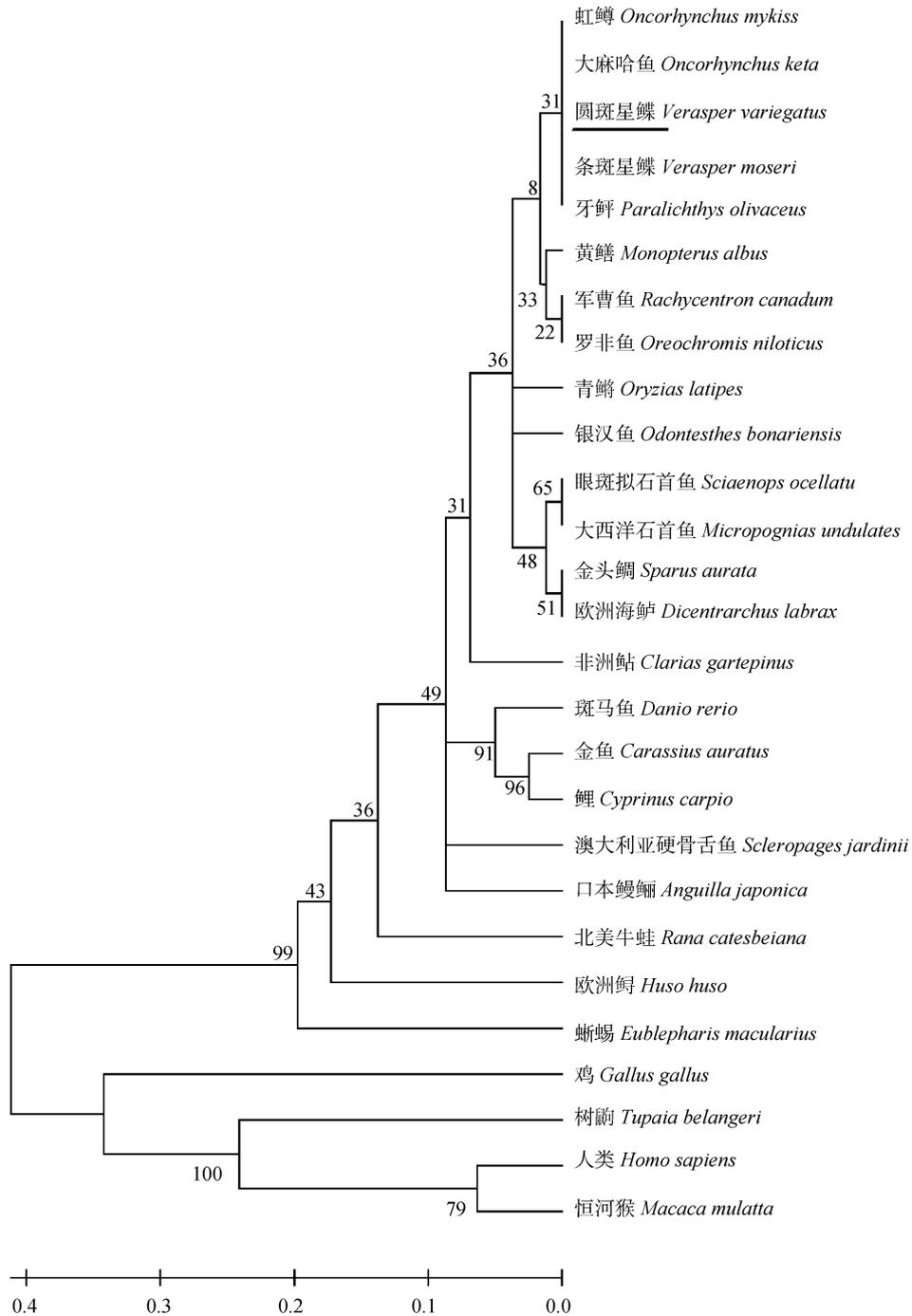


图 3 圆斑星鲈与其他脊椎动物基于 cGnRH-II 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of prepro-cGnRH-II between *Verasper variegatus* and other vertebrates

鱼类特异性 GnRH(如 sbGnRH、cfGnRH、mGnRH、pjGnRH 等)分支。圆斑星鲈 sbGnRH 和其他鲈鲈类聚为一个小的分支, 与鲈形目和鳗鲡目鱼类聚为一个大的分支, 鲤形目鱼类 sbGnRH 聚为一个独立分支(图 5)。

2.3 GnRH mRNA 的组织 and 性别特异性表达

本研究表明, 无论雌性和雄性圆斑星鲈, 脑中 3 种 GnRH 基因 mRNA 的表达水平最高。cGnRH-II mRNA 只在雌鱼和雄鱼的脑中检测到表达(图 6-A), 而 sbGnRH mRNA 在检测的每个组织中都有表达(图 6-B), sGnRH mRNA 在雌鱼的脑、垂体和性腺中表达, 而未在雄性性腺中检测到表达(图 6-C、D)。这 3 种 GnRH 基因都呈现性别特异性表达模式, 即雌性组织中的表达水平高于雄性。脑中表达量最高的为 sbGnRH, 其

mRNA 表达水平分别是 cGnRH-II mRNA 和 sGnRH mRNA 表达水平的 30~2 500 倍。

2.4 卵巢发育过程中雌鱼脑中 GnRH mRNA 表达水平的变化

在圆斑星鲈卵巢发育成熟过程中, sbGnRH mRNA 表达水平呈现出与性腺发育协同一致的表达水平变化, 自 8 月份(卵母细胞卵黄发生期)开始显著增加($P < 0.05$), 并在 12 月份达到(产卵前期)达峰值, 在产卵结束后的 4 月, 表达水平下降(图 7)。然而, sGnRH 和 cGnRH-II mRNA 表达水平在性腺发育过程中未呈现显著变化($P > 0.05$)(图 8)。

3 讨论

本研究首次在圆斑星鲈脑中克隆到 3 种 GnRH

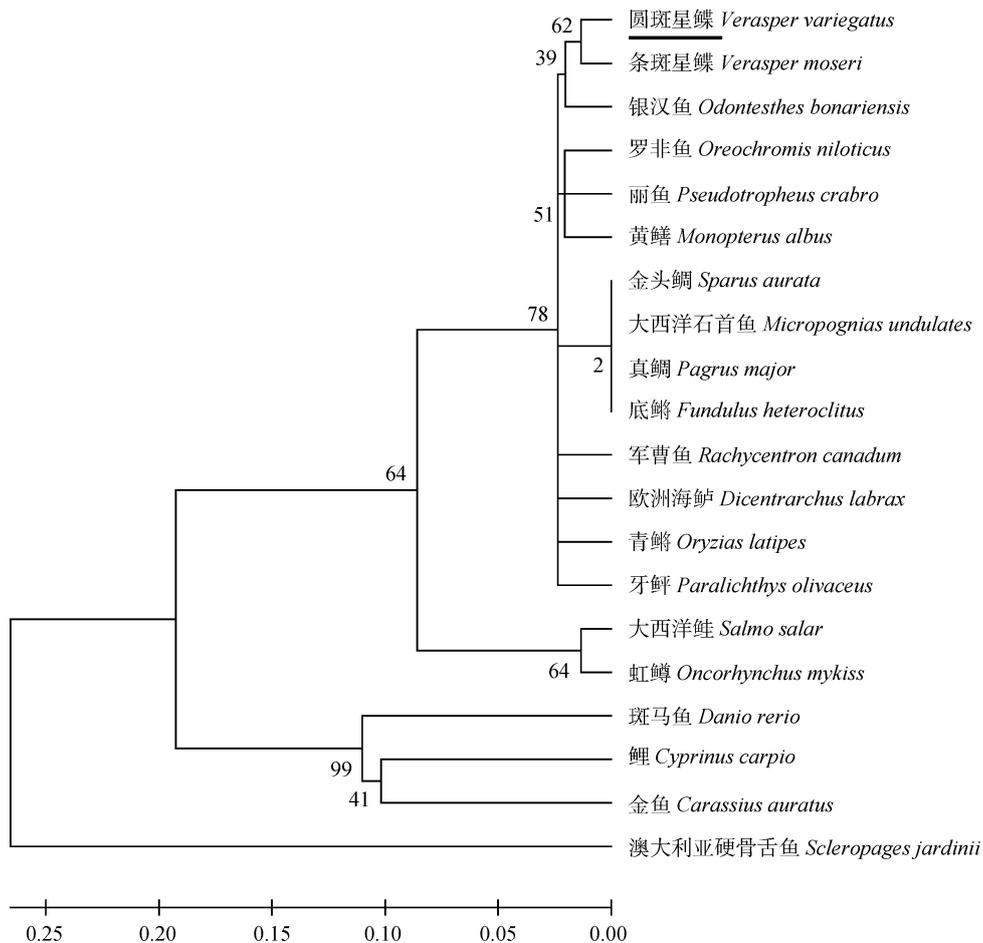


图 4 圆斑星鲈与其他脊椎动物基于 sGnRH 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of prepro-sGnRH between *Verasper variegatus* and other vertebrates

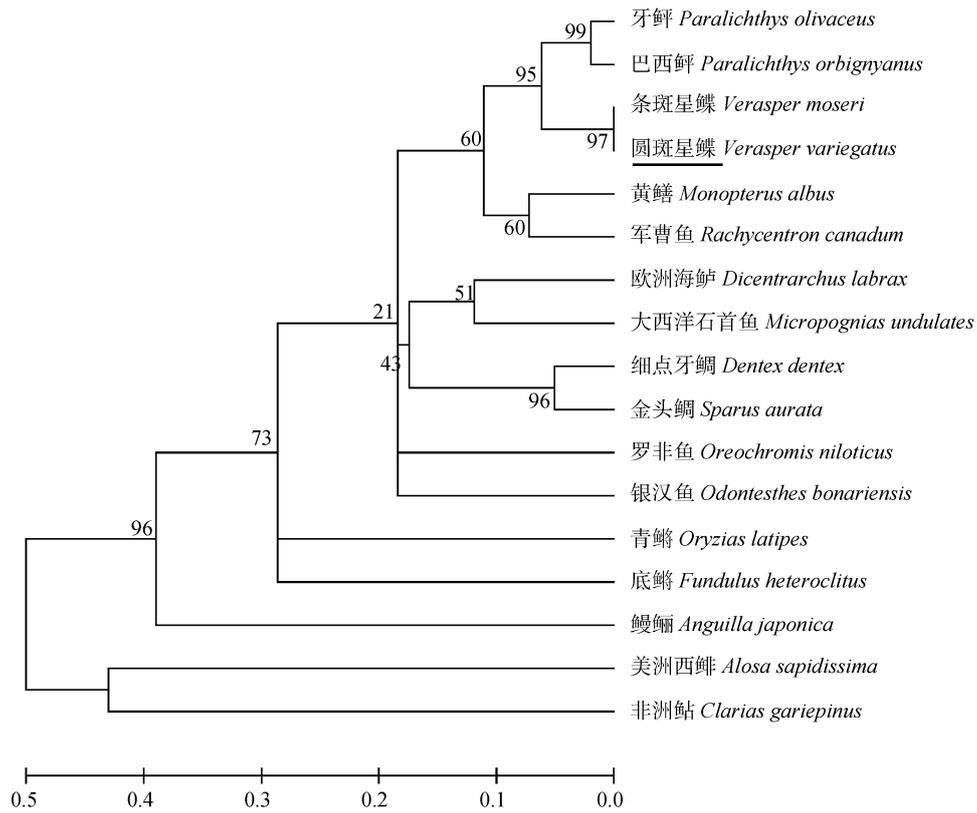


图 5 圆斑星鲈与其他脊椎动物基于 sbGnRH 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of prepro-sbGnRH between *Verasper variegatus* and other vertebrates

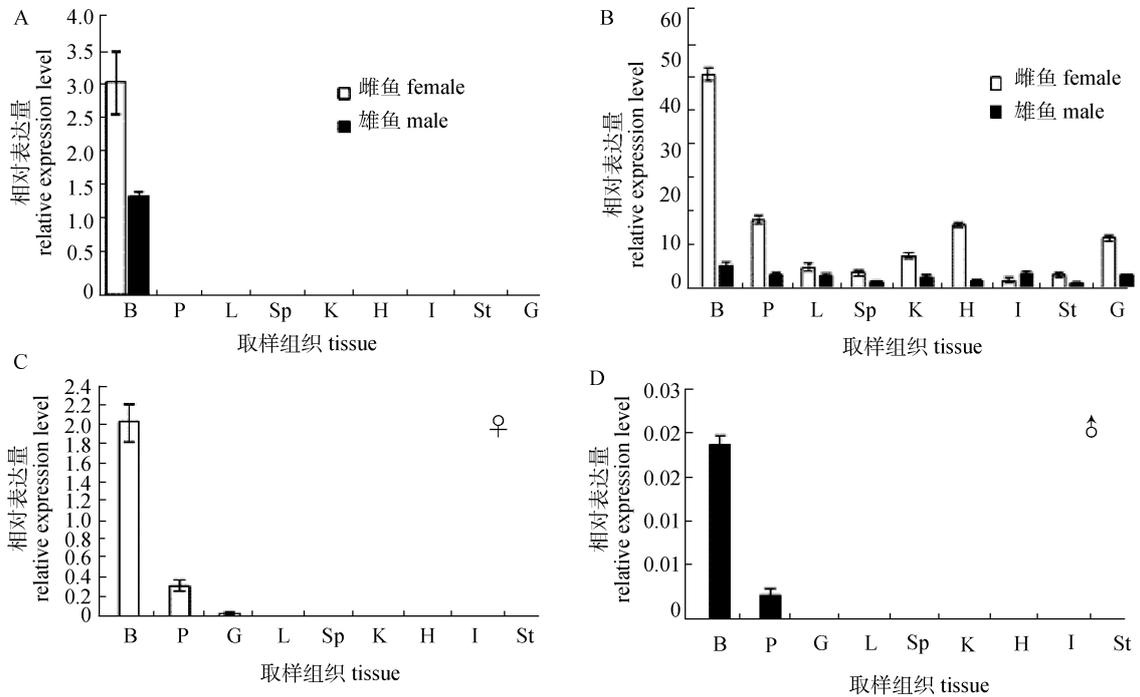


图 6 3 种 GnRH 基因的 mRNA 在半滑舌鲷不同组织的定量表达

A. *cGnRH-II*; B. *sbGnRH*; C. *sbGnRH* ♀; D. *sbGnRH* ♂. B: 脑; P: 垂体; G: 性腺; L: 肝脏; Sp: 脾; K: 肾; H: 心脏; I: 肠道; St: 胃.

Fig. 6 The mRNA expression levels of three *GnRH* genes in various tissues determined by quantitative RT-PCR

A. *cGnRH-II*; B. *sbGnRH*; C. *sbGnRH* ♀; D. *sbGnRH* ♂. B: brain; G: gonad; L: liver; Sp: spleen; K: kidney; H: heart; I: intestine; St: stomach.

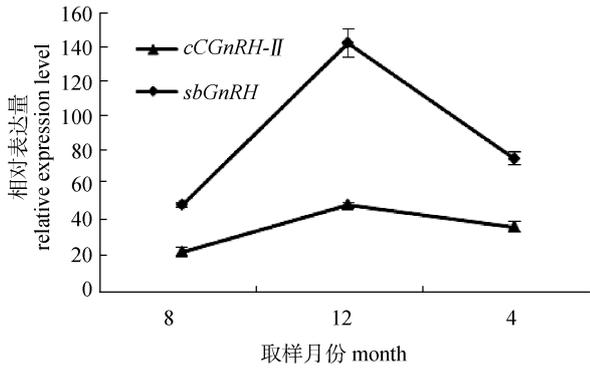


图 7 *cGnRH-II* 和 *sbGnRH* mRNA 表达水平在圆斑星鲈卵巢发育过程中的表达变化

Fig. 7 Fluctuation of brain *cGnRH-II* mRNA and *sbGnRH* mRNA levels during ovary maturation cycle

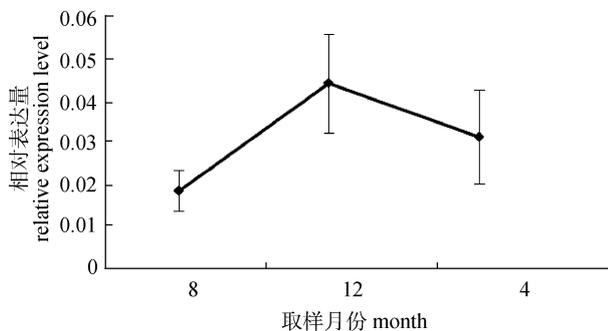


图 8 *sGnRH* mRNA 表达水平在圆斑星鲈卵巢发育过程中的表达变化

Fig. 8 Fluctuation of brain *sGnRH* mRNA level during ovary maturation cycle

基因: *sGnRH*、*sbGnRH*、*cGnRH-II*，为鲈鲷类脑中表达 3 种 *GnRH* 提供了新证据。圆斑星鲈 *GnRH* 包括信号肽(SP)、*GnRH* 十肽和 *GnRH* 相关肽区域，与其他脊椎动物具有类似的结构，表明 *GnRH* 基因可能具有共同的起源。研究表明，脊椎动物脑中至少表达 2 种不同的 *GnRH* 基因，目前所有已研究的鲈鲷类脑中都表达 3 种 *GnRH*^[7-9]。

圆斑星鲈 *GnRH* 的表达模式呈现性别特异性(雌性表达水平高于雄性)，这在其他一些硬骨鱼类中也有类似报道，如在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中，*sbGnRH* 分泌神经元和细胞在雄性中较早出现，且数量较多于雌性^[10]，这种 *GnRH* 发生和发育的雌雄差异表达表明 *GnRH* 可能与性别生长差异相关。本研究 *GnRH* 的表达呈现性别特异性表达，而 *GnRH* 是否参与了圆斑星鲈的性别

差异生长尚有待进一步实验证实。

研究表明，*cGnRH-II* 一般只在鱼类中脑表达，起着神经调质或者神经递质的生理作用^[4,10]。例如，在大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)和条斑星鲈(*Verasper moseri*)中，*cGnRH-II* 分泌神经纤维的胞体只在中脑检测到，起神经调质的作用^[7,11-12]。然而，房保海等^[8]报道在牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)中，除了在脑中表达外，*cGnRH-II* 还在垂体中表达，表明在牙鲈中 *cGnRH-II* 除了作为神经调质外可能还有其他一些生理功能。在本研究中，*cGnRH-II* 仅在脑中表达且在卵巢成熟周期中未有显著的变化，表明圆斑星鲈 *cGnRH-II* 可能仅起神经调质或者神经递质的作用，而与生殖功能的调控没有直接的关系。

sGnRH 除了在鱼类中被发现外，研究者利用高效液相色谱技术和放射免疫技术，在哺乳动物脑中也发现了 *sGnRH* 类似物，表明 *sGnRH* 可能也是一种在脊椎动物普遍存在的分子形式^[13-15]。前人报道 *sGnRH* 除在脑中表达外，还在其他组织表达，如在大麻哈鱼，*sGnRH* 神经纤维在脑和垂体中都有分布，提示 *sGnRH* 除了具有刺激促性腺激素释放的功能外，还起着神经调质的作用^[11,16]。另外，*sGnRH* mRNA 可在虹鳟性腺发育和成熟过程中检测到表达，表明 *sGnRH* 除了具备促性腺激素刺激释放功能外，可能在性腺发育成熟过程中起直接调节性类固醇激素表达的生理作用^[17]。本研究中，圆斑星鲈 *sGnRH* 在脑、垂体和性腺中都有表达，表明其可能除起着神经调质的作用外，还具有其他更为复杂的生理功能。但在雌性亲鱼中，其表达水平的变化在卵巢成熟过程中不显著，表明其可能不是促进促性腺激素分泌的必要因子。

sbGnRH 的表达模式和可能的生理功能研究已在许多种类中开展，如大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)、牙鲈、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大麻哈鱼等^[7,17-21]。现有证据表明，在硬骨鱼类中，*sbGnRH* 在繁殖过程中起主要调控作用。*sbGnRH* 是脑和垂体中表达最为丰富的分子形式，它主要调控脑垂体合成和释放促性腺激素^[21-23]。牙鲈 *sbGnRH* 表现出普遍的组织表达模式^[7]。在一些鱼

种中,虽然脑中 cGnRH- II 和 sGnRH 分泌神经元与 sbGnRH 分泌神经元分布区域重合^[24-26],但是他们在脑垂体中不表达或者是表达量很低,说明它们不参与或者很小程度上参与刺激脑垂体合成和释放促性腺激素的生理调节^[27-28]。Collins 等^[21]报道 sbGnRH 在纵痕平鲷(*Sebastes rastrelliger*)繁殖过程中表达水平发生显著变化,并在脑和垂体中检测到高水平的 sbGnRH。在另一研究中,真鲷(*Pagrus major*)脑和垂体中 sbGnRH 表达水平从 10 月份(未成熟期)开始升高,在 4 月(产卵期)达到峰值^[28]。大菱鲆脑和垂体中 sbGnRH 激素表达水平与性腺发育周期呈一致性的紧密变化^[18]。在本研究中,圆斑星鲈 sbGnRH 同样表现组织表达的普遍性,在脑、垂体、性腺、肝、脾、肾、肠道和胃中都能检测到表达,但是以在脑中的表达水平最高。与 cGnRH- II 和 sGnRH 相比较, sbGnRH 是脑中表达量最高的 GnRH 分子形式,同时其表达水平在卵巢发育过程中变化显著,与卵巢发育期为密切相关,显示 sbGnRH 可能是圆斑星鲈生殖调控的关键 GnRH 形式,同时它的组织的广泛表达还表明其具有神经递质和神经调质的作用。另外,其可能在圆斑星鲈的消化系统、免疫系统等着重要的生理作用^[1,4,29]。

综上,本研究从分子水平研究了圆斑星鲈 GnRH 的分子结构、表达特性及其与性腺发育的关系,为认识其生殖的分子内分泌调控机制提供了直接证据,同时也为这一养殖新资源人工繁育技术开发提供了理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] Zohar Y, Muñoz-Cueto J A, Elizur A, et al. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish [J]. Gen Comp Endocrinol, 2010, 165:438-455.
- [2] Somoza G M, Lescheid D, Miranda L A, et al. Expression of pejerrey gonadotropin-releasing hormone (pjGnRH) in three orders of fish [J]. Biol Reprod, 2002b, 67: 1864-1871.
- [3] Adams B A, Vickers E D, Warby C, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis* [J]. Biol Reprod, 2002, 67: 232-239.
- [4] Servili A, Lethimonier C, Lareyre J J, et al. The Highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. Endocrinology, 2010, 151(5):2265-2275.
- [5] 徐永江, 柳学周, 王清印, 等. 养殖圆斑星鲈血浆性类固醇激素表达与卵巢发育及温光调控的关系[J]. 中国水产科学, 2011, 18(4): 836-846.
- [6] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [7] Amano M, Takahashi A, Yamanome T, et al. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRHs in the brain of barfin flounder [J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 126: 325-333.
- [8] 房保海, 孙修勤, 曲凌云, 等. 牙鲆促性腺激素释放激素基因 cGnRH2II 和 sbGnRH 的克隆与表达特征分析 [J]. 高技术通讯, 2006, 16(5): 529-534.
- [9] Pham K X, Amano M, Amiya N, et al. Immunohistochemical localization of three GnRH systems in brain and pituitary of Japanese flounder [J]. Fish Sci, 2007, 73: 1113-1122.
- [10] Swapna I, Sudhakumari C C, Sakai F, et al. Seabream GnRH immunoreactivity in brain and pituitary of XX and XY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* during early development [J]. J Exp Zool Part A, 2008, 309: 419-426.
- [11] Holland M C, Gothilf Y, Meiri I, et al. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 112:394-405.
- [12] Okuzawa K, Kobayashi M. Gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in the teleostean brain and functional significance[M]//Prasada R, Peter R E. Neural regulation in the vertebrate endocrine system [M]. New York: Kluwer Academic Publisher/Plenum Press, 1999:145-189.
- [13] Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, et al. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform [J]. FEBS Lett, 1999, 463: 289-294.
- [14] Montaner A D, Affanni J M, King J A, et al. Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone variants in the brain of *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia) [J]. Cell Mol Neurobiol, 1999, 19: 635-651.
- [15] Okubo K, Amano M, Yoshiura Y, et al. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias*

- latipes* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276: 298–303.
- [16] Kobayashi M, Amano M, Kim M H, et al. Gonadotropin releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masou salmon [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1997, 17: 1–8.
- [17] Uzbekova S, Lareyre J J, Madigou T, et al. Expression of prepro-GnRH and GnRH receptor messengers in rainbow trout ovary depends on the stage of ovarian follicular development [J]. *Mol Reprod Devel*, 2002, 62: 47–56.
- [18] Anderson E, Fjellidal P G, Klenke U, et al. Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: Immunological characterization and seasonal variation [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2001, 129: 551–558.
- [19] White R B, Fernald R D. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 112: 17–25.
- [20] Goos H, Bosma P, Zandbergen T, et al. Function and molecular aspects of the gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Neth J Zool*, 1995, 45: 147–151.
- [21] Collins P M, Neill D F O, Barron B R, et al. Gonadotropin-releasing hormone content in the brain and pituitary of male and female grass rockfish (*Sebastes rastrelliger*) in Relation to seasonal changes in reproductive status [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 173–179.
- [22] Gothilf Y, Muñoz-Cueto J A, Sagrillo C A, et al. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55: 636–645.
- [23] Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto J A, et al. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 135: 1–16.
- [24] Kah O, Lethimonier C, Somoza G, et al. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 153: 346–364.
- [25] Soga T, Ogawa S, Millar R P, et al. Localization of the three GnRH types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 487: 28–41.
- [26] Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Mananos E, et al. Immunohistochemical localization of three different prepro- GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides [J]. *J Comp Neurol*, 2002, 446: 95–113.
- [27] Okuzawa K, Granneman J, Bogerd J, et al. Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain [J]. *Fish Physiol Biochem*, 1997, 17: 71–79.
- [28] Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, et al. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish [J]. *J Neuroendocrinol*, 1999, 11: 181–186.
- [29] Kim M H, Oka Y, Amano M, et al. Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus* [J]. *J Comp Neurol*, 1995, 356: 72–82.

Cloning and expression characteristics of gonadotropin releasing hormone genes in spotted halibut *Verasper variegatus*

LIU Xuezhou^{1,2}, XU Yongjiang^{1,2}, LIAO Meijie^{1,2}, PAN Chuanyan³, WANG Yanyan^{1,2}

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China;
3. College of fishery Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: We cloned and sequenced the gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) genes from spotted halibut (*Verasper variegatus*) by isolating their cDNAs. This species expressed three molecular forms of GnRH in the brain: chicken type GnRH-II (cGnRH-II), seabream type GnRH (sbGnRH), and salmon type GnRH (sGnRH). Each *GnRH* cDNA encoded a signal peptide (SP), GnRH, and a GnRH-associated peptide (GAP), which was connected to GnRH by a Gly-Lys-Arg sequence. The cGnRH-II consisted of 85 amino acid residues, and the *cGnRH-II* cDNA was 568 bp in length, consisting of a 141 bp 5'UTR, a 255 bp open reading frame (ORF), and a 169 bp 3'UTR. The sGnRH consisted of 90 amino acid residues and was 457 bp in length. It consisted of a 41 bp 5'UTR, a 270 bp ORF, and a 143 bp 3'UTR. The sbGnRH precursor consisted of 98 amino acid residues, and the cDNA was 381 bp in length and consisted of a 48 bp 5'UTR, a 294 bp ORF, and a 36 bp 3'UTR.

Homology analysis of the deduced acid residues of the GnRH precursors revealed that the three spotted halibut *GnRH* genes had the highest identity with homologs from pleuronectiformes, followed by perciformes, salmoniformes, and anguilliformes. Phylogenetic analysis indicated that the multiple molecular forms of spotted halibut GnRHs shared the closest evolutionary relationship with counterparts from pleuronectiformes. The tissue and sex specific expression of these three genes was determined using real time PCR. Expression was highest in the brain for both sexes. cGnRH-II was detected exclusively in the brain whereas sbGnRH was expressed globally in both sexes. sGnRH was detected in the pituitary and gonad (in addition to the brain tissue) in females, but not in the gonad of males. The expression pattern of all three *GnRH* genes was sex-specific with females having higher mRNA levels than males. We evaluated the changes in *GnRH* mRNA expression in the female brain during ovary maturation. *sbGnRH* mRNA levels increased significantly ($P < 0.05$) after August (vitellogenic stage), peaked in December (prespawning stage) 2009, and then decreased by April 2010 (postspawning stage). Conversely, there was no change in either *sGnRH* nor *cGnRH-II* mRNA levels ($P > 0.05$) during the maturation cycle. Our results confirmed that spotted halibut expressed three GnRH isoforms and sbGnRH may be the most important form. Our observations provide insight into the endocrine control of reproduction in the spotted halibut.

Key words: *Verasper variegates*; *GnRH*; cloning; expression characteristics

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