

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00035

半滑舌鳎抗缪勒氏管激素(AMH)基因的克隆及组织表达分析

刘姗姗^{1,2}, 孙冰^{1,3}, 梁卓^{1,2}, 张静^{1,2}, 陈松林¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 大连海洋大学 辽宁省水生生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 本研究克隆了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)AMH 基因并对其进行了表达分析。该基因 cDNA 序列开放阅读框长为 1 563 bp, 编码蛋白含 520 个氨基酸。该蛋白含有 TGF- β 超家族的特征序列, 包含 1 个 AMH-N 区域和 TGF- β 结构域, 并在 C 端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨酸残基。系统进化分析表明, 半滑舌鳎 AMH 和所有鱼类 AMH 聚为一簇, 与鲽形目相似性最高。实时定量结果表明, AMH 基因在半滑舌鳎不同组织中有差异表达, 在正常雄鱼和伪雄鱼性腺中表达量最高。胚后不同时期性腺的实时定量结果表明, 性腺分化之前 AMH 在精巢中相对表达量较低, 70 dph (days post hatching) 达到最高峰, 而在卵巢中呈现先升高后下降的趋势, 预示 AMH 基因可能在半滑舌鳎性腺发育中起重要作用。较正常雄鱼后代而言, AMH 基因在伪雄鱼后代的雄鱼和伪雄鱼性腺中的表达都有升高的趋势, 而在雌鱼中无明显差异, 也预示其可能参与半滑舌鳎的性反转过程。

关键词: 半滑舌鳎; 抗缪勒氏管激素(AMH); 克隆; 表达; 实时定量

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)01-0035-09

抗缪勒氏管激素 (Anti-Müllerian Hormone, AMH) 也叫缪勒氏管抑制物 (Müllerian inhibiting substance, MIS), 是一种以多肽形式存在的细胞因子, 属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族中的一员^[1-2]。1947 年 Jost 首次发现其在睾丸中表达, 由睾丸的 Sertoli 细胞分泌, 与缪勒氏管退化有关。直到 1986 年 Cate 克隆并分离出人类和牛的 AMH 基因^[1], AMH 的生物学效应、相关调控机制等方面研究才得以迅速发展。AMH 在哺乳动物、鸟类、爬行类和硬骨鱼类的性腺发育过程中都起到了重要作用。哺乳动物精巢中支持细胞产生的 AMH 能够指示缪勒氏管的退化, 同时, 精巢中的睾丸间质细胞产生睾酮, 刺激中肾管分化成附睾、输精管和精囊^[2]; 在雌性中, 由于 AMH 的缺失, 缪勒氏管分化成输卵管、子宫和阴道上缘^[3]。硬骨

鱼中不存在缪勒氏管, 但仍存在 AMH, 其在鱼类中起到调节精原细胞增殖和分化的作用。日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 中^[4], AMH 基因主要在未成熟的精巢中表达, 而在精子发生前便停止表达, AMH 的持续表达则抑制精子发生。自 2002 年 Miura 首次从硬骨鱼类日本鳗鲡^[4]克隆出该基因以来, 陆续又有学者克隆到牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[5]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[6]、罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[7]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[8] 等鱼类的 AMH 基因。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 为中国特有经济海水鱼类, 市场价值极高^[9]。半滑舌鳎为雌雄异体, 相同年龄的雌性个体比雄性个体大 2~4 倍^[10], 且存在天然性逆转现象^[11], 性别决定类型为 ZW 型^[12]。以半滑舌鳎为实验材料, 开展鱼类性别相

收稿日期: 2012-05-20; 修订日期: 2012-09-03.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA092203); 国家自然科学基金项目(31072202, 41006107); 山东省泰山学者专项.

作者简介: 刘姗姗(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产遗传育种. E-mail: tuyou-633@163.com

通信作者: 陈松林, 研究员. 研究方向为水产生物技术. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

关基因的研究, 不仅对揭示半滑舌鲷性别调控机制具有重大科学意义, 对提高半滑舌鲷的养殖产量和经济效益也具有重要的现实意义。本研究运用分子生物学方法克隆了半滑舌鲷 *AMH* 基因的 cDNA 序列, 并运用实时定量 PCR 分析了该基因在不同组织、不同发育时期以及伪雄后代性腺组织中的表达规律, 以期半滑舌鲷性别调控机制的研究提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人工养殖半滑舌鲷均采自山东海阳黄海水产公司。分别取 2 龄鱼的性腺、脑、头肾等组织, 液氮迅速冷冻后置于-80℃冰箱中待用。取半滑舌鲷不同发育时期、正常及伪雄后代的性腺样品, 置于-80℃冰箱保存。取一部分性腺固定用于组织切片, 同时取鳍条用于基因组 DNA 提取。

1.2 DNA、RNA 的提取和 cDNA 的合成

用传统酚氯仿法提取鳍条组织的基因组 DNA, 用于性别鉴定。用 Trizol(Invitrogen)法提取各个组织总 RNA, 用 NanoDrop 分光光度计测量 RNA 样品的纯度和浓度, 再分别取相应的 RNA 各 500 ng 为模板, 按照 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 的操作步骤进行反转录, 反应结束后采用内参引物 β -actin(序列见表 1)对 cDNA 进行检测。

1.3 伪雄鱼的鉴定及 *AMH* 基因的克隆

采用半滑舌鲷雌性特异引物 CseF783(序列见

表 1)鉴定半滑舌鲷遗传性别, 具体参照董晓丽等^[13]的方法, 同时取性腺组织切片鉴定其生理性别。

参照深圳华大基因研究院转录组测序所得序列预测其开放阅读框, 在 *AMH* 开放阅读框前后设计 1 对引物 *AMH*-L(序列见表 1), 以半滑舌鲷精巢总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增 *AMH* 片段, 所用引物均由南京金斯瑞生物有限公司合成。40 μ L PCR 反应体系包括 RNase Free dH₂O 29.3 μ L、10 $\times$ Buffer 4 μ L、dNTPs 3.2 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L、模板 cDNA 1 μ L、Ex Taq (TaKaRa) 0.5 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 30 个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳分离后用 Zymoclean Gel DNA Recovery Kit(ZYMO Research)回收目的片段, 纯化后的产物与 pMD18-T (TaKaRa)载体连接, 转化到感受态细胞 TOP 10 (天根生化), 经含氨苄青霉素的 LB 平板培养后, 筛选阳性克隆由华大基因有限公司进行序列测定。

1.4 序列比较分析

对所获得的 *AMH* 开放阅读框 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列, 采用 Blast n/p 程序进行同源搜索。用 CLUSTAL W^[14]程序对搜索得到的 *AMH* 核苷酸和氨基酸序列进行多序列比对。利用分析软件 MEGA 4.0^[15]以 Neighbor-Joining 法构建系统树, Bootstrap 设置为 1 000。所用到的其他物种的 GenBank 序列号详见表 2。

表 1 相关引物及其碱基序列
Tab. 1 Primers and sequences used in the study

引物名称 primer	引物序列 sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C T_m annealing temperature	用途 purpose
CseF783-F	5'-TGATGACACAGGATACGTCTGC-3'	57	性别鉴定 sex certification
CseF783-R	5'-CTGTGGCACTTAGTGCGATGT-3'		
<i>AMH</i> -L-F1	5'-AGTATGCTGCTGGTGGACG-3'	56	ORF 框扩增 ORF frame amplification
<i>AMH</i> -L-R1	5'-TCAGCGACATCCACACTCTT-3'		
<i>AMH</i> -RT-F1	5'-ATGTGGCTGTAGAAGAAGAC-3'	60	Real-time PCR
<i>AMH</i> -RT-R1	5'-CTGTTAGCAGGATGTATCG-3'		
β -actin-F	5'-GCTGTGCTGTCCCTGTA-3'	60	β -actin 内参引物 β -actin primer
β -actin-R	5'-GAGTAGCC-ACGCTCTGTC-3'		

表 2 用于构建系统树的氨基酸序列 GenBank 序列号
Tab. 2 GenBank accession numbers of amino acid used for the phylogenetic tree construction

分类 classification	物种名称 species	GenBank 序列号 GenBank no.
鱼纲 Pisces		
鲈形目 Pleuronectiformes	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	BAD37138.1
鲈形目 Perciformes	花鲈 <i>Lateolabrax japonicas</i>	AEZ68609.1
	舌齿鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	CAJ78431.1
	黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	ADB22521.1
	奥尼罗非鱼 <i>Oreochromis aureus</i>	ABW98500.1
	奥里亚罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	ABS58513.1
	牙汉鱼 <i>Odontesthes bonariensis</i>	AAV31752.2
银汉鱼目 Atheriniformes	青鱈 <i>Oryzias latipes</i>	BAF34132.1
鲷形目 Cyprinodontiformes	花溪鱗 <i>Kryptolebias marmoratus</i>	ACL00867.1
鲑形目 Salmoniformes	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	AAU85130.1
鲱形目 Clupeiformes	银大马哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	ADV40928.1
鳗鲡目 Anguilliformes	日本鳗 <i>Anguilla japonica</i>	BAB93107.1
鲤形目 Cypriniformes	核梭罗鱼 <i>Squalius pyrenaicus</i>	ABX55992.1
	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AAT77729.2
	拟白鱼 <i>Squalius alburnoides</i>	ABX55993.1
鸟纲 Aves		
雁形目 Anseriformes	绿头鸭 <i>Anas platyrhynchos</i>	AAY16522.1
鸡形目 Galliformes	鸡 <i>Gallus gallus</i>	CAA61536.1
哺乳纲 Mammalia		
双门齿目 Diprotodontia	尤金袋鼠 <i>Macropus eugenii</i>	AAR06911.1
啮齿目 Rodentia	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	EDL89230.1
	鼠 <i>Mus musculus</i>	AAI50478.1
	牛 <i>Bos Taurus</i>	AAA98765.1
偶蹄目 Artiodactyla	猪 <i>Sus scrofa</i>	AAC25968.1
	野马 <i>Equus caballus</i>	AEA11205.1
奇蹄目 Perissodactyla	人 <i>Homo sapiens</i>	AAC25614.1

1.5 实时定量 PCR(Real-time Quantitative PCR)

根据得到的半滑舌鳎 *AMH* 基因的 cDNA 片段, 设计 1 对定量引物 *AMH-RT*(表 1), 采用 ABI 7500 Real-time PCR 仪(Applied Biosystems, USA), 按照 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)使用说明, 进行实时定量 PCR 反应。以半滑舌鳎 β -actin 为内参, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[16]确定各样品中 *AMH* mRNA 的相对含量。20 μ L 反应体系包括 SYBR[®] Premix Ex Taq[™](2 $\times$)10 μ L、ROX Reference Dye II 0.4 μ L、正反向引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L、模板 cDNA 50 ng, 其余体积用 RNase Free dH₂O 补齐。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 40 个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s; 熔解曲线反应条件为 95 $^{\circ}$ C

15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。PCR 结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线及融解曲线, 以确保其特异性。每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鳎 *AMH* 基因的克隆及序列分析

根据华大基因提供的序列设计 1 对引物, 通过 PCR 对反转录产物进行扩增反应, 经胶回收、克隆及测序得到了半滑舌鳎 *AMH* 开放阅读框的 cDNA 序列, 其开放阅读框大小为 1 563 bp, 可编码 520 个氨基酸(图 1)。推导的半滑舌鳎 *AMH* 氨基酸序列中包含 1 个 *AMH-N* 区域和 TGF- β 结构域, 并在 C 端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨

酸残基(图 1)。

通过 CLUSTAL W 比对半滑舌鳎 AMH 氨基酸序列和其他鱼类的同源性, 结果表明半滑舌鳎 AMH 与牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)相似性最高, 为 61.7%; 其次为鲈形目的花鲈(*Lateolabrax japonicus*)(58.7%)、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)(57.1%)、奥尼罗非鱼(*Oreochromis aureus*)(52.7%); 与鸟类的相似性最低, 与绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)的相似性仅为 19.2%, 反映了不同物种间亲缘关系的远近。比对结果显示 AMH 在 C 端保守性较高而在 N 端保守性较低。将所有氨基酸序列进行序列比对后用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树(图 2)。结果显示半滑舌鳎 AMH 与鱼类 AMH

紧密聚为一支, 且与鲈形目和鲈形目的亲缘关系最近。

2.2 半滑舌鳎不同组织、不同发育时期及伪雄后代性腺 AMH 基因的表达分析

通过实时定量 PCR 对半滑舌鳎肌肉、脾、脑、肠、肾、血、皮肤、鳃、心脏、垂体、肝、雌鱼性腺、雄鱼性腺和伪雄鱼性腺共 14 个样品进行分析, 结果显示 AMH 在这些组织中的表达量存在很大差异。其中正常雄鱼性腺和伪雄鱼性腺的表达量最高, 与其他组织差异极显著($P < 0.01$), 血液、皮肤和脑的表达量次之, 肌肉的表达量最低(图 3)。AMH 在伪雄鱼性腺的表达显著高于正常雌鱼性腺的表达量, 预示 AMH 对半滑舌鳎性逆转的



图 1 半滑舌鳎 AMH 氨基酸序列和其他鱼类 AMH 氨基酸序列的比较

黑色边框为 AMH-N 区域, 红色边框为 TGF- β 结构域, 9 个保守的半胱氨酸残基用黑色箭头表示。

Fig. 1 Alignment of amino acid *Cynoglossus semilaevis* AMH with other vertebrate fishes. The AMH-N domain (in the black border) and the TGF- β domain (in the red border) that characterized this family were labeled. The nine positions with conserved cysteines were marked by arrows.

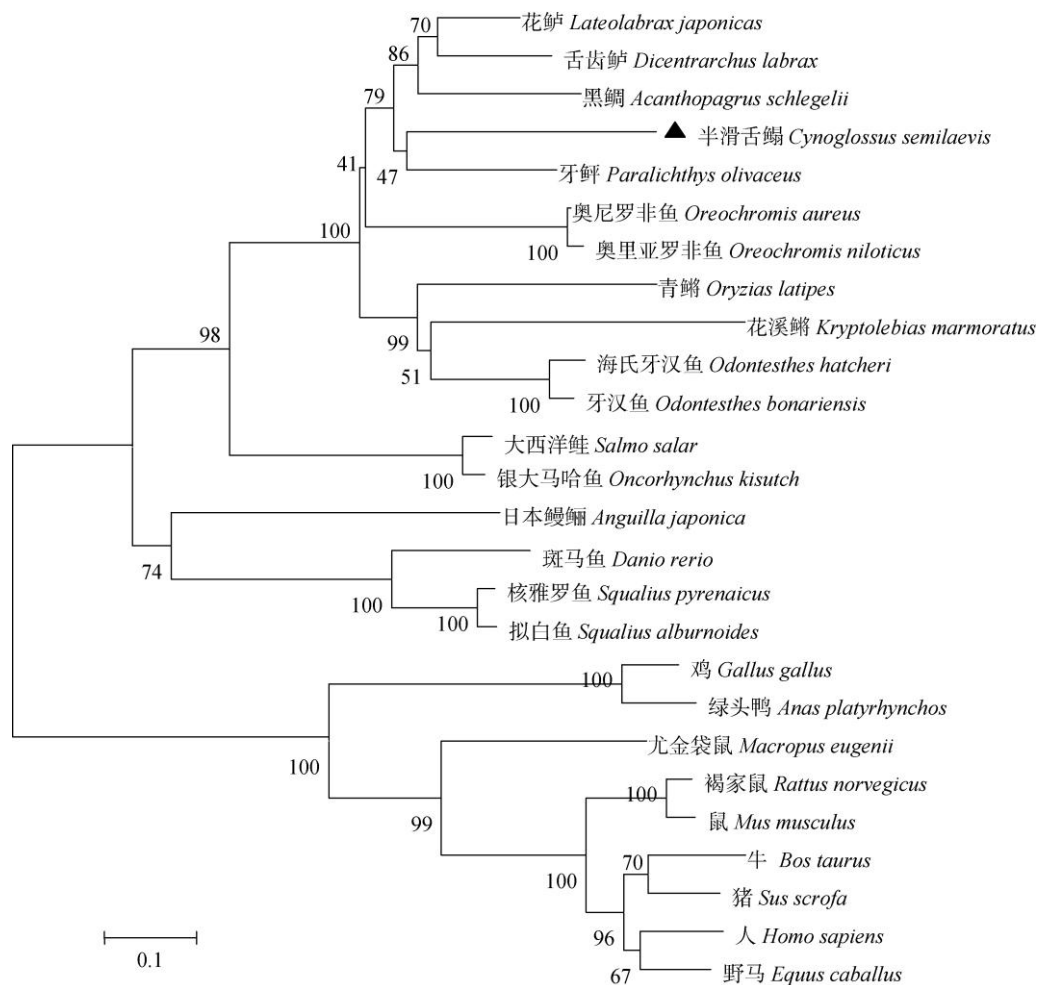


图 2 基于 NJ 法构建的半滑舌鳎 AMH 与其他脊椎动物 AMH 系统树
节点处数字表示 Bootstraps 1 000 次检验的各分支置信度。

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Cynoglossus semilaevis* AMH and other species AMH based on the Neighbor-joining method
Bootstrap values were based on 1 000 re-sampling replicates.

发生可能起到了重要作用。

AMH 在半滑舌鳎胚后不同时期性腺的表达分析结果表明, 半滑舌鳎 AMH 在孵化 70 d 之前的精巢中表达量较低, 从 70 d 开始表达显著升高且达到最高峰; 在卵巢中, AMH 基因呈现先上升后下降的趋势, 在孵化后 133 d 达到最高峰(图 4)。

对半滑舌鳎正常雄鱼后代和伪雄鱼后代的雌、雄、伪雄个体性腺进行表达分析。结果显示, 正常雄鱼后代的雌鱼与伪雄鱼后代的雌鱼性腺中, AMH 的表达无显著差异($P>0.05$); 与正常雄鱼后代相比, AMH 基因在伪雄鱼后代的雄鱼和伪雄鱼性腺中的表达都有明显升高的趋势($P<0.01$), 但 AMH 在伪雄鱼性腺的表达要低于在雄鱼性腺的表达(图 5)。

3 讨论

本研究通过 PCR 获得了半滑舌鳎 AMH 基因的开放阅读框 cDNA 序列。生物信息学分析表明, 该基因编码的蛋白属于 TGF- β 超家族, 并在 C 端生物活性区含有 9 个保守的半胱氨酸残基, 而且 AMH-N 端有增强羧基活性的功能。通过 CLUSTAL W 对其 AMH 氨基酸序列和其他鱼类 AMH 的同源性比对发现, 半滑舌鳎 AMH 与鲽形目和鲆形目的相似性较高, 与鸟类相似性最低。结果显示 AMH 在 C 端保守性较高而在 N 端保守性较低。系统发育树结果表明, 半滑舌鳎 AMH 与鱼类 AMH 紧密聚为一支, 且与牙鲆 AMH 的亲缘关系最相近, 其次与鲆形目的较近, 说明在进化过程

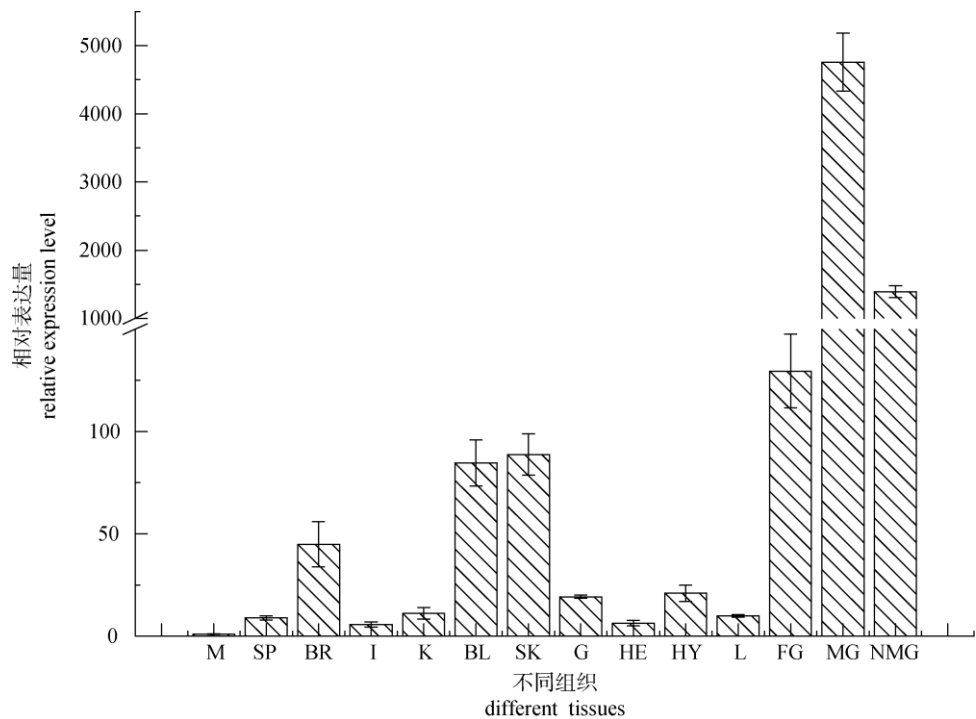


图 3 *AMH* 基因在半滑舌鳎不同组织中的表达

M: 肌肉; SP: 脾; BR: 脑; I: 肠; K: 肾; BL: 血; SK: 皮肤; G: 鳃; HE: 心脏; HY: 垂体; L: 肝; FG: 雌性性腺; MG: 雄性性腺; NMG: 伪雄性腺.

Fig. 3 Expressions of *AMH* gene in different *Cynoglossus semilaevis* tissues

M: muscle; SP: spleen; BR: brain; I: intestine; K: kidney; BL: blood; SK: skin; G: gill; HE: heart; HY: hypophysis; L: liver; FG: female gonad; MG: male gonad; NMG: neo-male gonad.

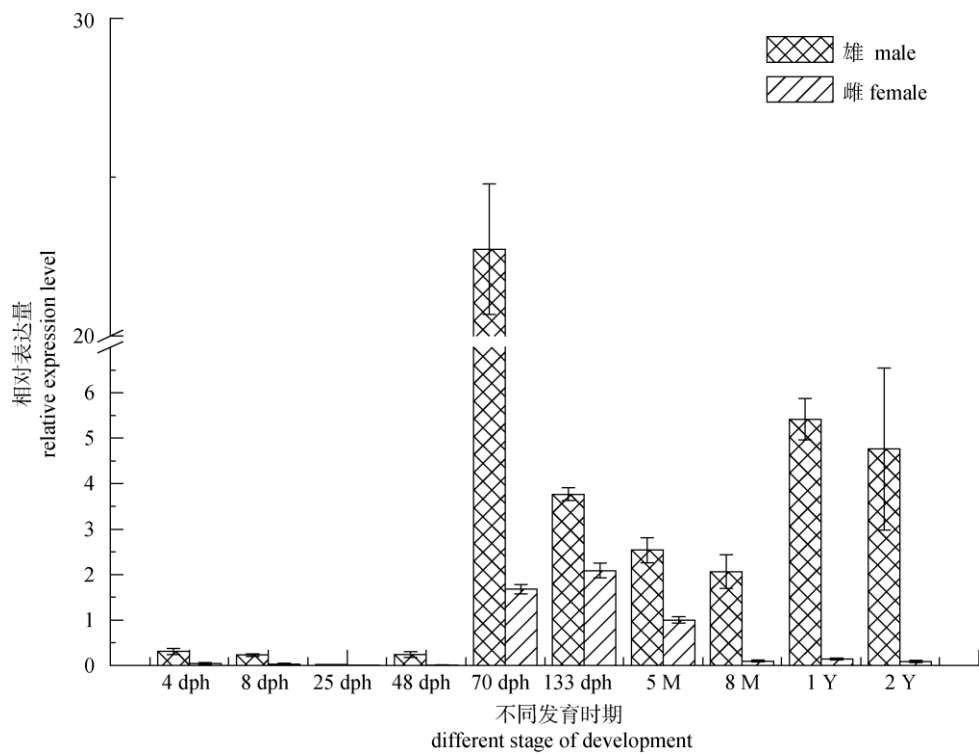


图 4 *AMH* 基因在半滑舌鳎不同发育时期性腺中的相对表达

Fig. 4 Expressions of *AMH* gene in *Cynoglossus semilaevis* gonads during different post-embryonic stages

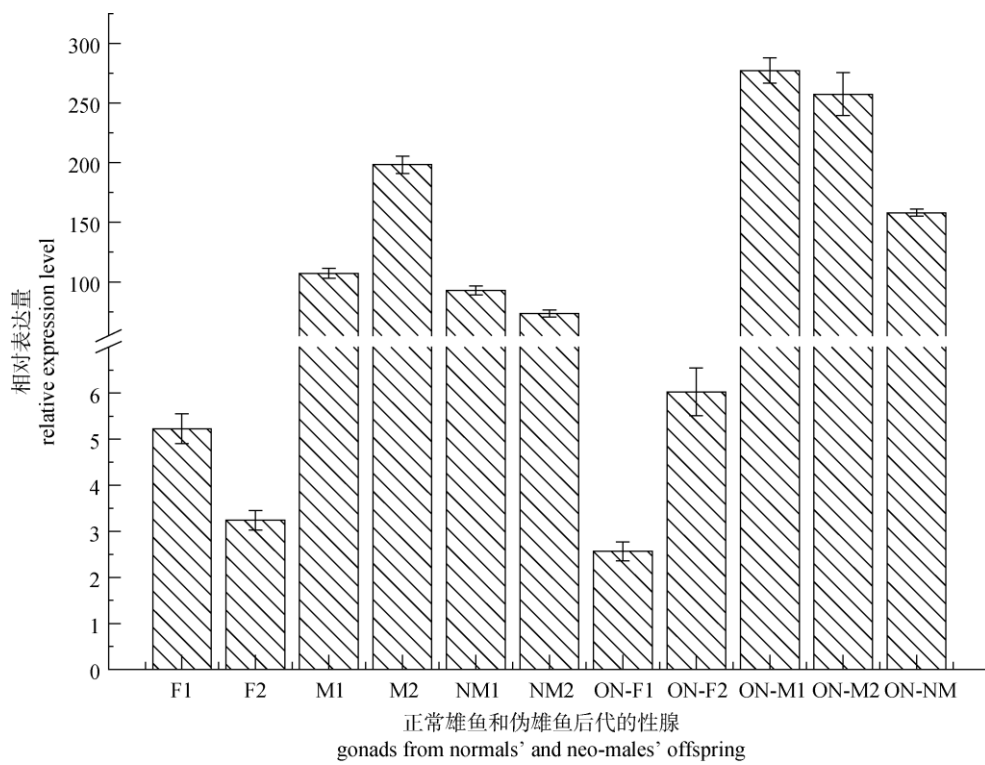


图 5 *AMH* 基因在半滑舌鳎正常雄鱼和伪雄鱼后代性腺中的相对表达

F1、F2: 正常雄鱼后代雌鱼; M1、M2: 正常雄鱼后代雄鱼; NM1、NM2: 正常雄鱼后代伪雄鱼; ON-F1、ON-F2: 伪雄鱼后代雌鱼; ON-M1、ON-M2: 伪雄鱼后代雄鱼; ON-NM: 伪雄鱼后代伪雄鱼。

Fig. 5 Expressions of *AMH* gene in different *Cynoglossus semilaevis* gonads from normals' and neo-males' offspring

F1, F2: female of normals' offspring; M1, M2: male of normals' offspring; NM1, NM2: neo-male of normals' offspring; ON-F1, ON-F2: female of neo-males' offspring; ON-M1, ON-M2: male of neo-males' offspring; ON-NM: neo-male of neo-males' offspring.

中该基因具有一定的保守性。

自 2002 年从日本鳎^[4]中发现第 1 个鱼类 *AMH* 基因开始, 到 2007 年的同类型研究, 在牙鲆、斑马鱼、青鳉等鱼类中, 不管是成鱼还是幼鱼, *AMH* 的表达都被认为只局限于性腺, 这可能是因为之前的研究方法是 RT-PCR, 而荧光实时定量相较于这种方法要灵敏得多, 以至于后来又在很多鱼类中发现 *AMH* 并非性腺特异基因。采用实时定量方法发现, *AMH* 在斑马鱼成体的脑、精巢、肌肉、眼、卵巢、皮肤、肾、肝和心脏中都有表达^[17]。用 Southern Blot 检测舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 成鱼和幼鱼的 RT-PCR 产物结果表明, *AMH* 在脑、垂体、精巢、卵巢和心脏中有表达^[18]。

本研究通过实时定量方法对半滑舌鳎脑、垂体、性腺等不同组织进行分析, 结果显示 *AMH* 基因在所检测的组织中存在差异表达。其中以在雄

鱼和伪雄鱼性腺中的表达量最高, 且与其他组织相比差异极显著, 在雌鱼性腺、血液、皮肤和脑中的表达次之, 而在其他组织中表达非常低。这与在斑马鱼中的表达结果相似^[19], 即在雌雄成鱼性腺中都有表达, 且在精巢中的表达远高于在卵巢中的表达。由此推测, *AMH* 基因也可能参与了半滑舌鳎性逆转过程, 在精巢发育中起重要作用。

对日本牙鲆^[5]、尼罗罗非鱼^[20]、虹鳉^[21]的性别分化研究发现, *AMH* 具有两性表达模式。而青鳉^[8]性别分化过程却不存在两性差异表达, 但在成鱼中 *AMH* 精巢表达要高于卵巢。对半滑舌鳎胚后不同时期性腺中的 *AMH* 表达进行实时定量分析, 发现 *AMH* 在孵化后 70 d 之前(即性腺分化前)的精巢中表达较低, 从 70 d 开始表达显著升高且达到最高峰, 与斑马鱼的研究结果一致^[6]; 在卵巢中, *AMH* 基因呈现先上升后下降的趋势, 且在孵化后 133 d 的卵巢中达到最高峰。在小鼠中,

减数分裂期的生精细胞和雄激素共同抑制了 *AMH* 基因的表达^[22]。在大西洋鲑^[23]中, *AMH* 在未成熟的精巢中持续高表达, 但在精子发生迅速增殖时开始下降, 并在精子生成最多时会降到最低值。8 月龄半滑舌鳎雄鱼已经处于性成熟阶段, 进入减数分裂期并开始大量产生精子。*AMH* 在 8 月龄半滑舌鳎精巢中出现了一个低谷, 其原因可能是精子发生对 *AMH* 表达的抑制。

对半滑舌鳎正常雄鱼后代和伪雄鱼后代的不同个体性腺分析表明, 正常雄鱼后代的雌鱼与伪雄鱼后代的雌鱼性腺中 *AMH* 的表达基本无差异; 较正常雄鱼后代而言, *AMH* 基因在伪雄鱼后代的雄鱼和伪雄鱼性腺中的表达都有升高的趋势。海龟和短吻鳄等动物的性别易受温度影响, 在利于雄性发育的温度条件下, 孵化出的雄性个体 *AMH* 的表达量比正常雄性高^[24-25]。对斑马鱼研究发现, 性逆转时卵巢向精巢的转变过程中, *AMH* 的表达会显著升高^[17]。通过温控可使半滑舌鳎雌鱼性逆转为伪雄鱼, 而半滑舌鳎伪雄鱼中 *AMH* 的表达量低于正常雄鱼的表达, 却高于正常雌鱼的表达。这与海龟(*Trachemys scripta*)、短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)的研究结果相反, 与斑马鱼的结果一致, 有可能是性逆转过程影响了 *AMH* 基因的表达。在半滑舌鳎中, 伪雄鱼后代雄鱼精子质量要远低于正常雄鱼后代精子质量, 这也可能跟 *AMH* 基因的高表达有关, 从而影响性腺正常发育。*AMH* 的表达与性逆转的作用机制还有待进一步研究。

总之, *AMH* 基因的克隆和表达分析为探讨半滑舌鳎性别控制及单性育种的机制奠定了基础。此外, 利用转基因技术(如基因敲除、RNA 干扰技术等)抑制半滑舌鳎 *AMH* 基因的活性, 可望用来分析 *AMH* 基因的潜在功能, 以期进一步了解其 在半滑舌鳎性别调控中的作用机制。

参考文献:

- [1] Cate R L, Mattaliano R J, Hession C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells[J]. Cell, 1986, 45: 685-698.
- [2] Visser J A, Themmen A P N. Anti-Müllerian hormone and folliculo genesis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 234: 81-86.
- [3] Lee M M, Donahoe P K. Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions[J]. Endocr Rev, 1993, 14: 152-164.
- [4] Takeshi M, Chiemi M, Yasuko K. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel, [J]. Development, 2002, 129: 2689-2697.
- [5] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, et al. Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322: 508-513.
- [6] Hofsten J, Larsson A, Olsson P E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (ff1d) is coexpressed with anti-müllerian hormone (AMH) in zebrafish [J]. Dev Dyn, 2005, 233: 595-604.
- [7] Shirak A, Seroussi E, Cnaani A, et al. Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis* spp.) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination[J]. Genetics, 2006, 174: 1573-1581.
- [8] Klüver N, Pfennig F, Pala I, et al. Differential expression of anti-müllerian hormone (amh) and anti-müllerian hormone receptor type II (amhrII) in the teleost medaka [J]. Dev Dyn, 2007, 236: 271-281.
- [9] 陈松林, 杜民, 杨景峰, 等. 半滑舌鳎家系建立及其生长和抗病性能测定[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1789-1794.
- [10] Ji X S, Chen S L, Jiang Y L, et al. Growth differences and differential expression analysis of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing normone(GHRH) between the sexes in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2011, 170: 99-109.
- [11] 季相山, 陈松林, 马洪雨, 等. 半滑舌鳎养殖群体中自然性逆转伪雄鱼的发现[J]. 水产学报, 2010, 34(2): 322-327.
- [12] 周丽青, 杨爱国, 柳学周, 等. 半滑舌鳎染色体核型分析[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 417-419.
- [13] 董晓丽, 陈松林, 季相山. 半滑舌鳎 Dmrt3 基因 cDNA 片段的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 839-835.
- [14] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [15] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. Brief Bioinform, 2008, 9: 299-306.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expres-

- sion data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [17] Wang D S, Kobayashi T, Zhou L Y, et al. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1[J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 712–725.
- [18] Halm S, Rocha A, Miura T, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms[J]. *Gene*, 2007, 388: 148–158.
- [19] Adriana R M, Yan Y L, Ruth A B, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (AMH) relative to Sox9a, Sox9b, and cyp19a1a, during gonad development [J]. *Gene Expr Patt*, 2005, 5: 655–667.
- [20] Ijiri S, Kaneko H, Kobayashi T, et al. Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Biol Reprod*, 2008, 78: 333–341.
- [21] Vizziano D, Baron D, Randuineau G, et al. Rainbow trout gonadal masculinization induced by inhibition of estrogen synthesis is more physiological than masculinization induced by androgen supplementation. [J] *Biol Reprod*, 2008, 78: 939–946.
- [22] Al-Attar L, Noel K, Dutertre M, et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse[J]. *Clin Invest*, 1997, 100(6): 1335–1343.
- [23] Gersende M, Monika S. Changes in expression profiles of genes related to sexual maturation during spermatogenesis in testes of early-maturing male Atlantic salmon parr[J]. *Cy-bium*, 2008, 32(2): 167–168.
- [24] Western P S, Harry J L, Graves J A, et al. Temperature dependent sex determination: upregulation of SOX9 expression after commitment to male development [J]. *Dev Dyn*, 1999, 214: 171–177.
- [25] Shoemaker C, Ramsey M, Queen J, et al. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236: 1055–1063.

Cloning and expression of anti-Müllerian hormone gene in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*

LIU Shanshan^{1,2}, SUN Bing^{1,3}, LIANG Zhuo^{1,2}, ZHANG Jing^{1,2}, CHEN Songlin¹

1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources Certificated by the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Anti-Müllerian hormone (AMH), also known as Müllerian inhibiting substance (MIS), is a glycoprotein belonging to the transforming growth factor β superfamily, which plays a major role during reproductive development in vertebrates. We isolated and characterized *AMH* cDNA in the half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*. The open reading frame (ORF) of this gene spans a region of 1 563 bp and codes 520 amino acids. Sequence alignment analysis revealed that the AMH of half-smooth tongue-sole and pleuronectiformes shared 61.7% homology. We evaluated the pattern of *AMH* mRNA expression in 14 tissues of the half-smooth tongue-sole. Expression level was highest in male and neo-male gonads, followed by the blood, skin, and brain. *AMH* expression was low prior to 70 dph (days post hatching) but was highest in the testis 70 dph. In the ovary, *AMH* expression increased then decreased, suggesting it plays a role during reproductive development. Furthermore, in contrast with normal offspring, the gonad of male and neo-male non-normal offspring exhibited an increased expression, but there was no change in females. This suggests that the *AMH* gene is required for sex reversal.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; anti-Müllerian hormone (AMH); clone; expression; real time quantitative PCR

Corresponding author: CHEN Songlin. Tel: 86-532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn