

半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析

史宝 李晓晓 柳学周* 徐永江 王珊珊 刘芝亮 王妍妍

(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室

中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

摘要 采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)方法,首次获得全长为1 319bp的半滑舌鳎膜孕激素受体(mPR α)的cDNA序列;将推断的氨基酸序列与其他物种mPR α 氨基酸序列进行多重比较分析,发现存在7个跨膜区域。使用MEGA 4.0临位相联法和ClustalX方法对mPR α 的氨基酸序列进行聚类分析和序列相似度分析。结果表明,半滑舌鳎mPR α 与漠斑牙鲆、大西洋绒须石首鱼以及青鳉等鱼类的mPR α 聚为一支,亲缘关系较近,相似度较高,分别为94%、93%和90%;而与高等哺乳动物人和牛相似性均为53%,亲缘关系较远。应用半定量RT-PCR技术分析了mPR α mRNA在性成熟雌性半滑舌鳎不同组织的表达,结果表明,mPR α mRNA组织表达具有广泛性,但表达量存在差异,在脑、肾、脾和卵巢等组织表达丰富,在肝、胃和肌肉组织表达较弱。

关键词 半滑舌鳎 膜孕激素受体基因 基因克隆 组织表达

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)03-0061-07

Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progesterin receptor alpha gene (mPR α) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther

SHI Bao LI Xiao-xiao LIU Xue-zhou* XU Yong-jiang

WANG Shan-shan LIU Zhi-liang WANG Yan-yan

(Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,

Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

ABSTRACT Full-length cDNA encoding membrane progesterin receptor alpha gene (mPR α) was firstly cloned from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther by homology cloning and RACE-PCR analysis. The length of complete cDNA sequence of mPR α gene was 1 319 bp. Sequence alignment of deduced amino acid of tongue sole mPR α and amino acid of other species showed that there were seven transmembrane domains. The rooted phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method of MEGA 4.0, and the identity of tongue

国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、国家自然科学基金(31201982)、公益性农业行业专项项目(200903005)和留学人员科技活动项目择优资助经费共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

收稿日期:2012-05-25;接受日期:2012-06-29

作者简介:史宝(1979-),男,博士,助理研究员,主要从事鱼类生殖生理研究。E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

sole mPR α with other representative sequences was analyzed by ClustalX. The results indicated that the tongue sole mPR α was clustered together with mPR α of other fish. The identity was 94%, 93% and 90% when compared with Southern flounder *Paralichthys lethostigma*, Atlantic croaker *Micropogonias undulates* and Japanese medaka *Oryzias latipes*, respectively. In contrast, identity among the mPR α of tongue sole and that of human *Homo sapiens* and cattle *Bos taurus* was low, only 53%. A semi-quantitative RT-PCR was developed to measure mRNA expression levels of mPR α gene of female tongue sole. Tissue expression analysis showed that mPR α mRNA was expressed widely in tongue sole, although the expression level was not homogeneous. mPR α transcripts were highly abundant in brain, kidney, spleen and ovary, less abundant in liver, stomach and muscle.

KEY WORDS *Cynoglossus semilaevis* Günther mPR α gene Gene cloning
Tissue expression

膜孕激素受体(Membrane progestin receptors, mPRs)是孕激素脂联素受体(Progestin and adipoQ receptors, PAQRs)基因家族的成员。PAQRs在不同物种具有高度保守性表明此基因家族在进化过程中具有重要作用(Tang *et al.* 2005)。孕激素参与调控生物体内的多种生理过程包括繁殖和发育(Tsai *et al.* 1994)。研究者发现,在孕激素诱导鱼类卵母细胞成熟过程中,不是通过激活卵母细胞内的核类固醇受体发挥生理学作用,而是通过结合在细胞表面的膜受体快速地发挥生理学功能(Nagahama *et al.* 1995)。目前,在金鱼 *Carassius auratus*(Tokumoto *et al.* 2006)和斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*(Kazeto *et al.* 2005)等少数几种硬骨鱼类获得了 mPR α 全长 cDNA 序列。但在鱼类和其他脊椎动物,有关 mPR α 的表达及生理功能研究仍相对较少,尤其在重要海水经济鱼类中的相关工作亟待开展。

半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther 主要分布于我国的渤海、黄海海域,是暖水性底栖大型鱼类,肉质鲜美,营养丰富,经济价值很高,是理想的增殖放流和人工养殖种类(邓景耀等 1988;李思忠等 1995)。有关半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术等方面的研究已取得了较大进展(柳学周等 2005、2006、2009),为半滑舌鲷养殖产业的发展提供了理论支撑,半滑舌鲷已成为我国海水鱼类工厂化养殖的主要品种之一。近年来,在生产实践中发现大量使用的半滑舌鲷人工亲鱼时常出现产卵效果不佳,卵子质量差等现象,影响了苗种生产。为了解决这一问题,有必要加强性腺发育和卵子成熟机理及生殖内分泌调控等方面的深入研究。本研究应用分子生物学方法,克隆了半滑舌鲷 mPR α 完整的 cDNA 序列,并对 cDNA 序列和由此推测的氨基酸序列进行了分析,构建系统进化树同时比较了半滑舌鲷 mPR α 与其他鱼类及高等脊椎动物的 mPR α 的氨基酸序列相似性,并分析了 mPR α 的组织特异性表达;旨在为进一步研究 mPR α 在半滑舌鲷卵母细胞成熟过程中的生理功能提供重要参考资料,并为鱼类繁殖内分泌调控研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料于 2011 年 9~10 月取自山东青岛忠海水产有限公司。实验所用的半滑舌鲷亲鱼,为人工培育养殖达到性成熟的 3 龄全人工亲鱼。所用亲鱼全长 53~66 cm,体重 1 266.3~2 271.0 g。亲鱼的培育条件:在室内水泥池中(5 m×5 m×1 m)全年开放流水培育,使用人工配合饲料喂养,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。解剖取出各组织样品,迅速放入液氮中冻存,然后转入-80℃冰箱保存备用。Bouin 氏液固定卵巢组织用于组织学观察。

1.2 卵巢组织学分析

将固定在 Bouin 氏液中的卵巢组织取出,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。LEICA RM 2235 型

切片机(德国)切片,厚度为 $5\mu\text{m}$,H. E 染色,中性树胶封片,LEICA DW4000B 型显微镜(德国)下观察及显微摄影。根据 H. E 染色结果,确定半滑舌鳎卵巢发育情况(刘 筠 1993)。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

取 -80°C 保存的半滑舌鳎各组织:脑、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、卵巢、肌肉各 $50\sim 100\text{ mg}$,用 RNAiso Plus(大连宝生物工程有限公司)抽提总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以 DNase I 酶去除基因组 DNA,Nanodrop2000(美国 Thermo 公司)测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用宝生物(大连)有限公司的反转录试剂合成 cDNA 第一链,反应体系及程序为 $5\mu\text{g}$ RNA 加 Oligo dT 引物 $1\mu\text{l}$,加 dNTP $1\mu\text{l}$ 补水至 $10\mu\text{l}$,混匀后 65°C 反应 5 min,冰浴 5 min;再向上述体系中加入缓冲液 $4\mu\text{l}$ 、RNA 酶抑制剂 $0.5\mu\text{l}$ 、反转录酶 $1\mu\text{l}$,补水至总体积 $20\mu\text{l}$; 30°C 反应 10 min、 42°C 反应 60 min、最后 95°C 反应 5 min 灭活反转录酶。合成的 cDNA 于 -20°C 保存备用。

1.4 半滑舌鳎 mPR α 基因克隆

通过 RT-PCR 反应获得半滑舌鳎 mPR α 基因的保守片段,所用引物为 mPR α F 和 mPR α R;PCR 扩增体系为 cDNA $2\mu\text{l}$ 、PCR 缓冲液 $5\mu\text{l}$ 、dNTP $0.5\mu\text{l}$ 、引物各 $0.5\mu\text{l}$ 、Taq 酶 $0.2\mu\text{l}$,补无菌水至 $25\mu\text{l}$ 。反应条件为 94°C 3 min、 94°C 30 s、 60°C 30 s、 72°C 1 min 共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。

提取新鲜性腺组织总 RNA,用于 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链合成。合成的 cDNA 第一链分别用 Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech 公司)进行 PCR 扩增,各操作步骤、反应体系以及反应程序均按照 SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 公司)使用手册进行。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切下目的条带,使用 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 回收纯化 PCR 产物(操作步骤严格按照 OMEGA 公司胶回收试剂盒说明书)。回收的 DNA 连接到 pEASY-T1 克隆载体,重组子转化至 *Trans1-T1* Phage Resistant 感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 平板上 37°C 培养过夜,挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。实验中所用的引物见表 1。

1.5 序列分析

DNASTAR 软件分析蛋白分子量和等电点;所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,分析半滑舌鳎 mPR α 与其他物种 mPR α 的同源性高低;使用 Clustal X 2 进行多重序列比对;系统进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1 000)。

1.6 表达研究

利用半定量 RT-PCR 方法,检测半滑舌鳎 mPR α 基因在脑、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、卵巢、肌肉等组织中的表达情况。以各组织 cDNA 为模板,用引物

18S F 和 18S R 扩增的 18S rRNA 基因片段作为内参,调整各样品模板浓度。然后用 mPR α F1 和 mPR α R1 一对特异性引物对 mPR α 在各组织中的表达情况进行检测。mPR α 特异表达引物的 PCR 反应条件: 94°C 5 min、 94°C 30 s、 56°C 30 s、 72°C 1 min 共 30 个循环, 72°C 10 min。18S rRNA 的 PCR 反应条件为 94°C 5 min、 94°C 30 s、 56°C 30 s、 72°C 1 min 共 24 个循环, 72°C 10 min。取 $8\mu\text{l}$ PCR 产物,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers used for the PCR analysis

引物 Primer	序列 Nucleotide sequence (5'-3')
mPR α F	5'- CATGGCGACGGTGGTGATG -3'
mPR α R	5'- GGCAGCAGAAGAAATAGGCG -3'
mPR α GSP1	5'- GCACCACCTGGAACAGCTTCAGGACAAA -3'
mPR α GSP2	5'- GAGTCGGCCTTCCTACGCTGCCTTGCA -3'
mPR α NGSP2	5'- CCCTCATGCTCAACCTCTATTCATCGTC -3'
mPR α F1	5'-GTGGTGATGGAGCAGATTGGT-3'
mPR α R1	5'-TGCCAGGAGGACGATGAATAG-3'
18S F	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATC-3'
18S R	5'-CCAATTACAGGGCCTCGAAAG-3'

2 结果

2.1 半滑舌鲷卵巢组织学分析

通过卵巢 H. E 染色分析, 确认实验用亲鱼的性腺发育期, 发现半滑舌鲷卵巢中存在不同发育时期的卵母细胞如包含Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ时相的卵母细胞。卵巢以Ⅴ时相卵母细胞为主, 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 mPR α 序列分析

通过 RT-PCR 方法, 使用引物 mPR α F 和 mPR α R 获得长度为 791bp 的保守片段。经 RACE 反应后克隆测序, 将 5'-RACE 和 3'-RACE 所得片段与所获得保守序列拼接得到 mPR α 基因 cDNA 全长, 其长度为 1 319bp, 其开放阅读框为 1 059bp, 编码了含 352 个氨基酸的蛋白, 其分子量为 41kD, 等电点为 7.0; 且此序列 3'端非编码区含有一个加尾信号 ATTAAA(图 2)。该序列已提交至 GenBank(序列号 JQ322819)。

2.3 mPR α 系统进化分析

利用 MEGA 4.0 软件(Neighbor-Joining 法)对半滑舌鲷 mPR α 氨基酸序列(序列号: AFC90009)与漠斑牙鲆 mPR α (序列号: ACW83621)、大西洋绒须石首鱼 mPR α (序列号: ABU68407.1)、云纹犬牙石首鱼 mPR α (序列号: AAO39265.1)、青鲈 mPR α (序列号: NP_001170947.1)、金鱼 mPR α (序列号: BAD06917.1)、斑马鱼 mPR α (序列号: AAN78115.1)、家鼠 mPR α (序列号: AAH22922)、猪 mPR α (序列号: NP_998904)、牛 mPR α (序列号: NP_001033642)、人类 mPR α (序列号: NP_848509) 10 个物种的氨基酸序列进行聚类分析。结果表明, 所有硬骨鱼类 mPR α 形成一个分支, 其中与半滑舌鲷 mPR α 亲缘关系最近的是漠斑牙鲆 mPR α ; 猪和牛形成一个分支; 鼠和人形成一分支(图 3)。

2.4 mPR α 氨基酸序列比对及同源性分析

对半滑舌鲷 mPR α 氨基酸序列与青鲈、斑马鱼和人类的 mPR α 氨基酸序列进行比对, 发现半滑舌鲷 mPR α 氨基酸序列与其他物种的 mPR α 氨基酸序列相比较为保守, 特别是不同鱼类的 mPR α 氨基酸序列保守性很强; 半滑舌鲷 mPR α 存在 7 个跨膜区域(图 4)。

对半滑舌鲷 mPR α 氨基酸序列与上述 10 个物种的 mPR α 氨基酸序列同源性进行分析, 结果表明, 与漠斑牙鲆同源性为 94%、与大西洋绒须石首鱼同源性为 93%、与云纹犬牙石首鱼同源性为 93%、与青鲈同源性为 90%、与金鱼同源性为 80%、与斑马鱼同源性为 80%、与家鼠同源性为 53%、与猪同源性为 53%、与牛同源性为 53%、与人类同源性为 53%。

2.5 mPR α 基因组织表达分析

应用 RT-PCR 半定量检测方法, 以反转录合成的第一链 cDNA 为模板, 分析 mPR α 基因在半滑舌鲷性成熟雌鱼各组织中的表达情况(图 5)。用 18S rRNA 作为阳性对照, 平衡不同模板的 cDNA 浓度。结果表明, 在性成熟半滑舌鲷各组织 mPR α 基因表达差异较大, 其中在脑、鳃、心、头肾、肾、脾、肠和卵巢组织表达丰富, 在肝、胃和肌肉组织表达较弱。

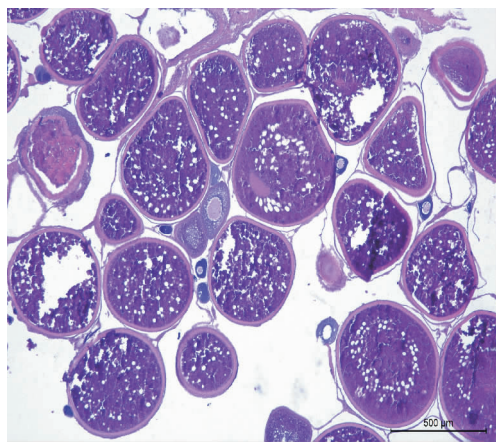


图 1 半滑舌鲷 V 期卵巢组织结构

Fig. 1 Histological structure of ovary in *C. semilaevis*

```

-156                ACATGGGGGAGCTGCGCGGTGAGAGCCGCCAGGCG
-121    CTACCGTCATCTCCATCTATCGGCTTCAAACAATGTTATCTCCACACGGCTGTGTCCA
-60      AACCATCCACTGACCGCTGCATCCGAGCCTCTGGACTGATCTCAACATCTGCAGTTTACC
1        ATGGCGACGGTGGTGATGGAGCAGATTGGTCGACTGTTTCATCAATCGCAGCAGCTTCGG
1        M A T V V M E Q I G R L F I N A Q Q L R
61      CAGATCCCTCAGCTGCTGGAGTCGGCCTTCCCTACGCTGCCTGCACTGTGAAGGTGTCC
21      Q I P Q L L E S A F P T L P C T V K V S
121     GATGTTCCGTGGGTGTTTCAAGAACGCCACATCCTCTCCGGCTACAGACAGCCGACCAG
41      D V P W V F Q E R H I L S G Y R Q P D Q
181     AGTGCGGCTACTATTTCCCTCACCTCTTCCAGAGGCACAATGAGACCTGAACGTGTGG
61      S W R Y Y F L T L F Q R H N E T L N V W
241     ACCCACCTGCTGGCTGCTCATAATCCTGGTGAAGTGGCAGGAGATCTCAGANAAVCGTGG
81      T H L L A A L I I L V K W Q E I S E T V
301     GACTTCTTGCAGACCCCTCAGCTCAACCTCTATTTCATCGTCTCTCCGAGCCTTACC
101     D F L R D P H A Q P L F I V L L A A F T
361     TACCTCTCTCAGCGCCCTCGCTCACCTCCTCAGCCAAGTCGGAGCTTTCCTGTTAC
121     Y L S F S A L A H L L S A K S E L S C Y
421     ACCTTCTACTCCTCGACTACATTGGAGTTGCGGTCTACCAGTATGCCAGCGCCCTGGCG
141     T F Y F L D Y I G V A V Y Q Y G S A L A
481     CACTATTATTATGCCATAGAGAAGGAGTGGCACACTCGAGTCCAGGGGCTCTTTCTCCCT
161     H Y Y Y A I E K E W H T R V Q G L F L P
541     GCGGCAGCCTTCTTAGCTGGCTCACATGCTTCGGCTGTGCTACGGTAAATACGCCAGC
181     A A A F L A W L T C F G C C Y G K Y A S
601     CGTGACATCCCCAAGTTTGTCTGAAGCTGTCCAGGTGGTGCCTCAGCCTTGGCCTAC
201     R D I P K F V L K L F Q V V P S A L A Y
661     TGTTTAGACATAAGCCCGTGGTTCACCGCATCTACAGCTGCTACAGGAAGCTGTTC
221     C L D I S P V V H R I Y S C Y Q E G C S
721     GACCCGGTGGTGGCTACCATTTCTATCAGTGGTCTTTTCTGATAAGCGCCTATTTT
241     D P V V A Y H F Y H V V F F L I S A Y F
781     TTCTGTGCCCTACCCCGAGAGATTCTTCCCGGCAAGTGTGACTTCATCGGACAGGGC
261     F C C P H P E R F F P G K C D F I G Q G
841     CATCAGATCTTTCAGTGTTCGTGGTGTGCACGCTGACGAGATCGAAGCCCTGCGG
281     H Q I F H V F V V V C T L T Q I E A L R
901     ACTGACTTCACAGAGCCCGTCCGCTGTACGAGCGCCTCCAGGGCATCTCCGACACGAT
301     T D F T E R R P L Y E R L H G D L A H D
961     GCGCTCGCGTGTTCATCTTCACTGCCTGCTGCAGTGCCTGACCGCTTTTACGTACGC
321     A V A L F I F T A C C S A L T A F Y V R
1021    AAGCGTGTACGGTGCCTCCACGAAAAGGAGGAGTAAAGACCCTAACATTAAGTTTAA
341     K R V R V A L H E K E E *
1081    AAAAAAGTAATTTATTCACATTGTAGTGACCACTCATAAAATATTTGAAATCAAAAAA
1141    AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

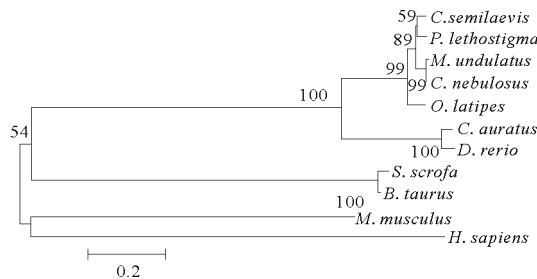
```

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 以黑框表示; * 表示终止密码子;加尾信号以下划线标出

The start and stop codons are shown by box; Asterisk indicates stop codon; the putative polyadenylation signal (ATTA AAA) is underlined

图 2 半滑舌鲷 mPR α 的 cDNA 序列及其推断所得的氨基酸序列分析

Fig. 2 cDNA sequence and putative amino acid sequence of the mPR α of *C. semilaevis*



C. semilaevis 半滑舌鲷; *P. lethostigma* 漠斑牙鲆; *M. undulatus* 大西洋绒须石首鱼; *C. nebulosus* 云纹犬牙石首鱼; *O. latipes* 青鲈; *C. auratus* 金鱼; *D. rerio* 斑马鱼; *S. scrofa* 猪; *B. Taurus* 牛; *M. musculus* 家鼠; *H. sapiens* 人类

图 3 基于 MEGA 4.0 中的 NJ 方法的半滑舌鲷 mPR α 与其他物种分子进化树聚类分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of the mPR α from *C. semilaevis* and other vertebrates in MEGA 4.0

半滑舌鲷 *mPR α* 的 cDNA 序列。

在硬骨鱼类,促性腺激素并不直接作用于卵母细胞。鱼类的卵母细胞发育可分为两个激素依赖的阶段即卵母细胞生长和卵母细胞成熟(Patiño *et al.* 2001)。在卵母细胞生长完成后,促黄体激素刺激成熟的卵巢滤泡产生成熟诱导类固醇激素,然后成熟诱导类固醇激素通过 *mPR α* 诱导卵母细胞成熟(Nagahama *et al.* 2008)。采用 RT-PCR 的方法研究了雌性半滑舌鲷各组织中 *mPR α* 基因的表达情况,结果发现该基因表达模式与其他硬骨鱼类 *mPR α* 的表达模式相似,具有广泛性。半滑舌鲷 *mPR α* 基因较丰富地表达于脑、鳃、心、头肾、肾、脾、肠和卵巢组织,而在肝、胃和肌肉组织表达较弱;这预示着 *mPR α* 在半滑舌鲷多种组织参与调节孕激素的生理功能。Tokumoto 等(2006)采用 RT-PCR 方法检测到金鱼 *mPR α* 基因在脑、眼、鳃、脾和精巢表达量较高,心、肠、肾、肌肉和卵巢表达量较低。这两种硬骨鱼类,*mPR α* 基因 mRNA 表达存在差异可能是因为物种不同和实验鱼的性腺发育存在差异。

在本研究中,*mPR α* 基因在卵巢组织表达丰富,进一步印证了 *mPR α* 参与卵母细胞成熟过程。当前 *mPR α* 基因在半滑舌鲷脑组织表达的生理学意义并不清楚,推测该基因可能参与硬骨鱼类的发育和性别决定。徐驰等(2010)采用 Real-time PCR 检测斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 胚胎发育过程中 *mPR α* 基因 mRNA 表达情况,发现该基因在胚胎发育早期表达量较高;此项研究结果为本研究的推理提供了证据。本研究从半滑舌鲷克隆了 *mPR α* 的 cDNA 序列,初步分析了其结构和 mRNA 水平上的组织特异性表达,为深入了解 *mPR α* 在半滑舌鲷繁殖过程生理功能奠定了基础。

参 考 文 献

- 邓景耀,孟田湘,任胜民,邱显寅,朱建元. 1988. 渤海鱼类种类组成及数量分布. 海洋水产研究, 9:10-98
- 刘 筠. 1993. 养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 29-30
- 李思忠,王惠民. 1995. 中国动物志硬骨鱼纲鲷形目. 北京:科学出版社,68-334
- 柳学周,孙中之,马爱军,梁 友,庄志猛,兰功刚. 2006. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术研究. 海洋水产研究,27(2):25-32
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁 友,刘寿堂,翟介明,曲建忠. 2006. 半滑舌鲷苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究,27(2):17-24
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁 友,徐永江. 2005. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究. 海洋水产研究,26(5):7-14
- 柳学周,徐永江,刘乃真,曲建忠,倪 娜,赵 明. 2009. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. 渔业科学进展,30(6):25-35
- 徐 迟,刘晓春,张 勇,石 禹,陈华谱,林勉生,林浩然. 2010. 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)膜孕激素受体 α *mPR α* 和孕酮受体膜组分 1 PGRMC1 的克隆及其表达模式分析. 见:第一届全国石斑鱼类繁育与养殖产业化论坛论文摘要汇编. 广州:海洋与渔业,34-34
- Kazeto Y, Goto-kazeto R, Thomas P, Trant JM. 2005. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progestin receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J Mol Endocrinol 34(3): 781-791
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M and 2 others. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. Curr Top Dev Biol 30: 103-145
- Nagahama Y, Yamashita M. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. Develop Growth Differ 50(1): S195-S219
- Patiño R, Yoshizaki G, Thomas P, Kagawa H. 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. Comp Biochem Physiol Part B 129(2-3):427-439
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, Tokumoto T. 2006. Cloning and identification of a membrane progestin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. Gen Comp Endocrinol 145(1):101-108
- Tang T, Hu TH, Arterburn M and 4 others. 2005. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. J Mol Evol 61(3):372-380
- Tsai MJ, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu Rev Biochem 63:451-486