

半滑舌鳎促性腺激素 α 亚基 cDNA 的克隆及组织表达特征

李晓晓^{1,2} 柳学周^{1*} 史宝¹ 徐永江¹ 王珊珊¹ 刘芝亮^{1,2} 王妍妍¹

(¹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, 青岛 266071)

(²上海海洋大学水产与生命学院, 201306)

摘 要 采用同源克隆和末端快速扩增(RACE)方法,从半滑舌鳎脑垂体中克隆了促性腺激素 α 亚基(CG α)全长 cDNA(GenBank 序列登录号:JQ364953)。半滑舌鳎 CG α 基因全长 685bp,其开放阅读框 384bp,编码含 127 个氨基酸的蛋白,N 端 33 个氨基酸为信号肽。半滑舌鳎 CG α 成熟肽与其他脊椎动物 CG α 成熟肽结构特征相似,具有 10 个半胱氨酸残基和两个 N-糖基化位点。CG α 成熟肽序列分析表明,半滑舌鳎 CG α 与鲽形目和鲈形目鱼类 CG α 同源率为 60%~70%,与鲤形目鱼类 CG α 同源率为 55%~60%。实时荧光定量 RT-PCR 结果表明,半滑舌鳎 CG α mRNA 在被检测的 12 个组织中均有表达,除头肾和脾脏、脾脏和肝脏间表达量差异不显著外,其他组织间表达量差异显著($P < 0.05$);CG α mRNA 在垂体组织中大量表达,其次是鳃、肾脏、肌肉、卵巢和脑组织,而在心脏、头肾、肝和脾等组织中表达量很低。本研究为进一步探讨促性腺激素在半滑舌鳎繁殖生理中的作用机制奠定基础。

关键词 半滑舌鳎 促性腺激素 α 亚基基因 cDNA 克隆 qRT-PCR

中图分类号 S965.335 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)05-0023-08

Cloning and mRNA expression pattern of common glycoprotein α subunit of GTH in tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther

LI Xiao-xiao^{1,2} LIU Xue-zhou^{1*} SHI Bao¹ XU Yong-jiang¹

WANG Shan-shan¹ LIU Zhi-liang^{1,2} WANG Yan-yan¹

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,

Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,

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

(²College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT Full-length cDNA encoding common glycoprotein α subunit (CG α) was firstly cloned from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther by means of homology cloning and RACE PCR analyses. This sequence was submitted to GenBank with accession No.

国家鲜鲽类产业技术体系(CARS-50)、国家自然科学基金(31201982)、公益性农业行业专项项目(200903005)和 2012 年度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:2012-08-13;接受日期:2012-12-08

作者简介:李晓晓(1988-),女,硕士研究生,主要从事鱼类繁殖生理学研究。E-mail:lixiaoxiao02468@126.com

JQ364953. The whole cDNA length of tongue sole $CG\alpha$ gene was 685bp, including a 384bp open reading frame (ORF). The predicted mature tongue sole $CG\alpha$ consisted of 127 amino acids preceded by a signal peptide of 33 residues. The structure of mature $CG\alpha$ in tongue sole $CG\alpha$ was similar with those in the vertebrate $CG\alpha$, including 10 conserved Cysteine residues and 2 N-linked glycosylation sites. Sequence comparison showed that tongue sole $CG\alpha$ mature peptide had higher identity to their orthologs of percomorphs (perciforms and pleuronectiforms; 60%~70% identity) than to cypriniformes (55%~60% identity). The CG (mRNA expression of tongue sole was detected in all the examined tissues by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) method. The significant test analysis ($P < 0.05$) for expression levels of tissues revealed that head kidney and spleen as well as spleen and liver did not differ significantly from each other. But other tissues showed significant differences from each other. The highest expression level was in pituitary, followed by gill, kidney, muscle, ovary and brain; and lower level expression was found in other tissues including heart, head kidney, liver and spleen.

KEY WORDS *Cynoglossus semilaevis* Günther
Common glycoprotein α subunit gene of GTH
cDNA cloning Quantitative Real-Time RT-PCR

哺乳动物垂体前叶合成和分泌的促黄体激素(Luteinizing hormone, LH)、促滤泡激素(Follicle-stimulating hormone, FSH)和促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone, TSH)(Pierce *et al.* 1981)都是糖蛋白激素,它们和绒毛膜促性腺激素(Chorionic gonadotropin, CG)具有相似的结构。这几种糖蛋白激素由一个共同的 α 亚基(Common glycoprotein α subunit, $CG\alpha$)和一个具有激素生物学特异性的 β 亚基以非共价键结合在一起。只有这两个亚基相互结合,才能发挥激素的生物学活性(Jameson *et al.* 1993)。 $CG\alpha$ 的结构在硬骨鱼类等脊椎动物中高度保守(Ando *et al.* 1994)。在硬骨鱼类中,相对于FSH和LH而言,对 $CG\alpha$ 研究相对较少。但是 $CG\alpha$ 亚基是有生物学活性的糖蛋白激素的一个组成部分,研究表明, $CG\alpha$ 在类固醇激素信号传导方面发挥重要作用(Arai *et al.* 1998)。因此研究 $CG\alpha$ 亚基和它的调控机制有助于更好地理解促性腺激素的生理功能。

半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther 具有个体大、生长快、市场价值高等优点,是近年来新开发的一种理想的增殖对象。近年来,对半滑舌鲷亲鱼培育和采卵技术及苗种生产技术(柳学周等 2006a、b)等方面进行了研究并促进了半滑舌鲷养殖业的发展。关于半滑舌鲷繁殖内分泌学方面的研究也逐渐开展起来,如卵巢发育组织学(柳学周等 2009)、储精囊的形态结构(温海深等 2010)和促性腺激素受体基因在雄性半滑舌鲷繁殖周期的表达(陈晓燕等 2011)等。本研究克隆了半滑舌鲷 $CG\alpha$ 亚基基因,并对其序列特征和组织表达特点进行了分析。所获得结果为今后采用下丘脑多肽激素如促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)调控 $CG\alpha$ 亚基的 mRNA 表达和信号传导通路的研究奠定了基础;在生产实践中也可为半滑舌鲷繁殖调控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

在2011年9~10月,从山东青岛忠海水产有限公司采集研究所用的半滑舌鲷。实验鱼为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种,经室内人工养成达到性成熟年龄的F1代亲鱼。研究所用的4尾雌性半滑舌鲷亲鱼全长53~66 cm,体重1 266.3~2 271.0 g。亲鱼的培育条件:全年开放流水培育,水温10~25 °C,盐度27~31, pH 7.8~8.4,溶解氧5 mg/L以上。将半滑舌鲷雌鱼各组织样品取出,迅速放入液氮中冻存,然后转

入 -80°C 冰箱保存备用。同时取部分卵巢组织放于 Davidsons AFA 中固定,用于组织学观察。

1.2 卵巢组织学分析

将在 Davidsons AFA 固定液中的卵巢组织固定 24h 后取出,放入 70% 的酒精中保存,之后常规梯度酒精脱水,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 DM4000B 型显微镜(德国)下观察及显微摄影。根据柳学周等(2009)半滑舌鳎卵巢发育组织学研究中的分类方法,对半滑舌鳎卵巢组织切片的 H. E 染色结果进行分析,确定半滑舌鳎卵巢发育情况。

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、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、卵巢、肌肉各 50~100 mg,用 RNAiso Plus(TaKaRa 公司)抽提总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,采用 Nanodrop 2000(美国 Thermo 公司)测定抽提的总 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 TaKaRa 公司的 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒反转录试剂合成 cDNA 第一链。反应体系及程序为 $1\mu\text{g}$ 总 RNA 加 gDNA Eraser $1\mu\text{l}$ 、加 $5\times$ gDNA Eraser Buffer $2\mu\text{l}$,补水至 $10\mu\text{l}$,混匀后 42°C 反应 2min,去除基因组 DNA 污染;再向上述体系中加入缓冲液 $4\mu\text{l}$ 、PrimeScript RT Enzyme Mix I $1\mu\text{l}$ 、RT Primer Mix $1\mu\text{l}$,补水至总体积 $20\mu\text{l}$; 37°C 反应 15min、 85°C 反应 5s,合成的 cDNA 于 -20°C 保存备用。

1.4 半滑舌鳎 CG α 基因克隆

通过 RT-PCR 反应获得半滑舌鳎 CG α 基因的保守片段,所用引物为 CG α F 和 CG α R;PCR 扩增体系为 cDNA $1\mu\text{l}$ 、 $10\times$ PCR Buffer (Mg $^{2+}$ Plus) $2.5\mu\text{l}$ 、dNTP $2\mu\text{l}$ 、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 5min、 94°C 30s、 55.1°C 30s、 72°C 50s 共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10min。

提取半滑舌鳎新鲜垂体组织总 RNA,用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit(Clontech 公司)合成 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链。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 Amplification Kit 使用手册进行。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,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 PCR 产物连接到 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。

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers used for the PCR analysis

引物名称 Primer	引物序列 Nucleotide sequence
CG α F	5'-TAGYTGATTCTTACCCARCAT-3'
CG α R	5'-TGCAGTGRCACTGTGTGGTT-3'
CG α GSP1	5'-CACCACAATACCAGCCACCACTACCTCA-3'
CG α NGSP1	5'-GCACGTCGCCTCTGAAGTGATGTTCTTT-3'
CG α GSP2	5'-GTCTACCAGTGCCAGGGCTGTGCTTCT-3'
CG α F1	5'-TTCCCCACTCCTCTAACGACA-3'
CG α R1	5'-ACCACAATACCAGCCACCACTAC-3'
18S F	5'-GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC-3'
18S R	5'-AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC-3'

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 CG α 与其他物种的 CG α 同源性高低;从 GenBank 中选择脊椎动物哺乳纲和鱼纲的物种,鱼纲分类到目,具体的代表性物种见表 2。使用 ClustalX 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)。

表 2 同源性比较及进化树中引用的基因序列号

Table 2 GenBank accession number of genes used for homologue and phylogenesis analysis

分类 Category	物种英文名 Species	学名 Scientific name	登录号 Accession number
硬骨鱼纲 Osteichthyes			
鳎形目 Pleuronectiformes	Tongue sole	<i>C. semilaevis</i>	AFD04550
	Senegalese sole	<i>Solea senegalensis</i>	ABW81405
	Atlantic halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAD10503
	Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AAK58600
鲈形目 Perciformes	European seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAK49431
	Orange-spotted grouper	<i>Epinephelus coioides</i>	AAN18038
	Black porgy	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	ABQ96863
	Red seabream	<i>Pagrus major</i>	BAB18562
	Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	AAP49577
	Striped sea-bass	<i>Morone saxatilis</i>	AAB66489
合鳃鱼目 Synbranchiformes	Swamp eel	<i>Monopterus albus</i>	AAN77069
银汉鱼目 Atheriniformes	Pejerrey	<i>Odontesthes bonariensis</i>	ABD36561
鲤形目 Cypriniformes	Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	AAR84285
	Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	AAV65764
鲇形目 Siluriformes	Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	AAD18004
	North African catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	P53542
	Silurus soldatovi meridionalis	<i>Silurus meridionalis</i>	AAAY42268
鲑形目 Salmoniformes	Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAB17685
鲟形目 Acipenseriformes	Siberian sturgeon	<i>Acipenser baerii</i>	CAC43060
	Russian sturgeon	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	AAS92716
鳗鲡目 Anguilliformes	European eel	<i>Anguilla anguilla</i>	P27794
鳕形目 Gadiformes	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	ABD62882
鲉形目 Scorpaeniformes	Korean rockfish	<i>Sebastes schlegelii</i>	AAU14140
鲿形目 Cyprinodontiformes	Mummichog	<i>Fundulus heteroclitus</i>	P47744
哺乳纲 Mammalia	Human	<i>Homo sapiens</i>	NP_000726

1.6 Real-time RT-PCR 及数据处理

为了检测半滑舌鳎体内 $CG\alpha$ 基因的表达情况,取 4 条性成熟的半滑舌鳎雌鱼的脑、垂体、鳃、心和头肾等组织,按照 1.3 的方法合成 cDNA 第一链。根据克隆得到的半滑舌鳎 $CG\alpha$ cDNA 的序列,设计并合成实时定量 PCR 引物 $CG\alpha F1$ 和 $CG\alpha R1$,同时合成作为内参的 18S 基因的引物 18S F 和 18S R,研究所用引物序列参见表 1。挑选部分组织的 cDNA 为模板(如性腺、肝脏),先用 *Taq* 酶(TaKaRa 公司)作普通 PCR 实验,通过琼脂糖凝胶电泳,检测引物的特异性,优化 PCR 条件,使 PCR 扩增效率达到最高并且产物准确、单一。当引物符合要求时,用试剂 SYBR Premix Ex *Taq*TM II (Perfect Real Time) (TaKaRa 公司)进行荧光实时定量 PCR 实验。PCR 反应 20 μ l 体系中含有 1 μ l 的 cDNA 模版、0.8 μ l 的 10 μ mol/L 的上下游引物、10 μ l 的 SYBR Premix Ex *Taq*TM II 和 7.4 μ l 的 dH₂O。采用两步法 PCR 扩增程序,反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30s,95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 20s 共 40 个循环。使用 18S 基因作为内参对照,用以校正所有样品中 RNA 的量。荧光实时定量 PCR 反应及信息的收集都在 Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 上进行。程序运行完成后进行熔解曲线分析以确定引物

及反应是否正常。实验需设阴性对照, 每个样品设置 3 个平行。重复 3 次实验, 以确认实验结果的可靠性。实验所得数据用相对定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算处理后 (Livak *et al.* 2001), 再用 SPSS 16.0 软件进行数据处理和显著性检验分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。相对表达量数据均表示为平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SE), 并制成柱状图。

2 结果

2.1 半滑舌鲷卵巢组织学分析

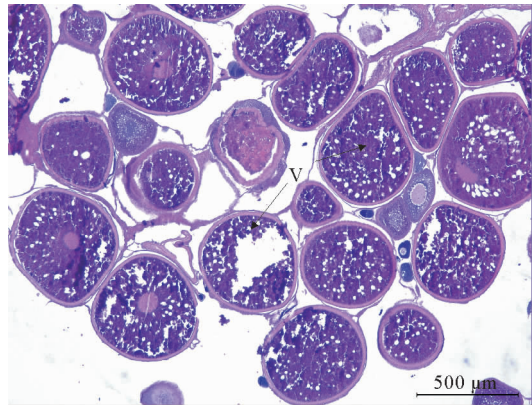
当用手轻压半滑舌鲷实验鱼的腹部, 发现有成熟卵粒流出。通过卵巢 H. E 染色分析, 观察到半滑舌鲷卵巢切片中存在不同发育时期的卵母细胞, 包括 II 时相卵母细胞、III 时相卵母细胞、IV 时相卵母细胞和 V 时相卵母细胞; 此时期卵巢以 V 时相卵母细胞为主, 卵母细胞的核消失, 细胞质中含有粗大的卵黄颗粒; 确定卵巢已经发育至 V 期 (图 1)。

2.2 CG α 序列分析

通过 RT-PCR 方法, 使用引物 CG α F 和 CG α R 获得长度为 270bp 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 CG α 基因 cDNA 全长, 其长度为 685bp, 开放阅读框为 384bp, 编码了含 127 个氨基酸的蛋白, 分子量为 14 kD, 等电点为 7.7; 第 1~33 个氨基酸为信号肽, 成熟肽序列包含 10 个保守的半胱氨酸残基 (Cys)。且此序列 3' 端非编码区含有一个加尾信号 ATTTAAA (图 2)。该序列已提交至 GenBank (序列号 JQ364953)。

2.3 CG α 氨基酸序列比对及同源性分析

半滑舌鲷 CG α 成熟肽与鲽形目鱼类 CG α 成熟肽的相似性分别为塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* 67%、庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus* 60% 和牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 62%。半滑舌鲷 CG α 成熟肽与鲟形目鱼类 CG α 成熟肽的相似性分别为狼鲈 *Dicentrarchus labrax* 70%、斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 69%、真鲷 *Pagrus major* 69% 和尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 70%。半滑舌鲷 CG α 成熟肽与鲤形目鱼类 CG α 成熟



图示为 V 期卵巢, 黑色箭头所指为 V 时相卵母细胞

The ovary at stage V, the black arrow shows the phase V oocyte

图 1 半滑舌鲷卵巢组织学

Fig. 1 Ovarian development phase of *C. semilaevis*

```

-36          ACATGGGGAGTGCCAGGAGTTCTCTACAGACGCACC
1  ATGGAAGGGAAGGCAACCGCTGCCATGGGTCGGTGAATCAGCAACTGTGTCT
1  M E G K A T A A S T M G S V K S A T L S
61  CTCTCTCTGTGACCTTTTCTTTATGTAGCTGACTCTTACCACAGCAAAGACCTACAG
21  L L L L T F S L Y V A D S Y H S K D L Q
121 AAATTGGGCTGCGAGAGTTGCACCTCTGGAAAGAATGATTATTCTACTATATGGTCCA
41  K L G C E S C T L G K N D L F S L Y G P
181 GTCTACCAGTGCCAGGGCTGCTGCTTCTCACGAGCGTTCCCACTCTCTAACGACATTG
61  V Y Q C Q G C C F S R A F P T P L T T L
241 GAAACGATGGAAGTCGAAAGAATCATCTTCAGAGGCGACGTGCTGCGTGCCAGGTCC
81  E T M E S R K N I T S E A T C C V A R S
301 AGCTATGAGGTAGTGGTGGCTGGTATTGTGGTGAGAAACCACACAGACTGCCACTGTAGT
101 S Y E V V V A G I V V R N H T D C H C S
361 ACCTGTAATACCACAAGATATTCACGAGAACAGGGACCACGCTGCAGAGCTCAGCTTCAC
121 T C K Y H K I *
421 GGCACATCATTTATTCATTTAGTGAACCTGTGCCAAAGATAGTTTTTCTTTTCAAAAATGT
481 GTTTTAAAACCGATCACACTTTTGCAGTGATCCTTAGTCTGTGACGTGTAATTAGTCCAC
541 ACACTGTCTTTGTAGATGTACTCTGTGTAATCGATGATGTAATGGAAAGCAATTAATG
601 AAAACATGCATCTTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

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

The initiation and termination codons are shown by box; Asterisk indicates termination codon; the putative polyadenylation signal (ATTTAAA) is underlined; Cys is in boldface

图 2 半滑舌鲷 CG α 全长以及推断的氨基酸序列分析

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

肽的相似性分别为金鱼 *Carassius auratus* 58% 和斑马鱼 *Danio rerio* 60%。半滑舌鲷 CG α 成熟肽与哺乳纲人类 *Homo sapiens* CG α 成熟肽的相似性为 55%。

半滑舌鲷的 CG α 成熟肽与其他硬骨鱼类和人类的 CG α 进行多序列比对时,发现半滑舌鲷 CG α 氨基酸具有糖蛋白激素保守的 10 个半胱氨酸残基。在半滑舌鲷的 CG α 成熟肽的氨基酸序列中,发现了两个 N-糖基化位点: 55 ~ 57 NTT, 79 ~ 81NHT(图 3)。

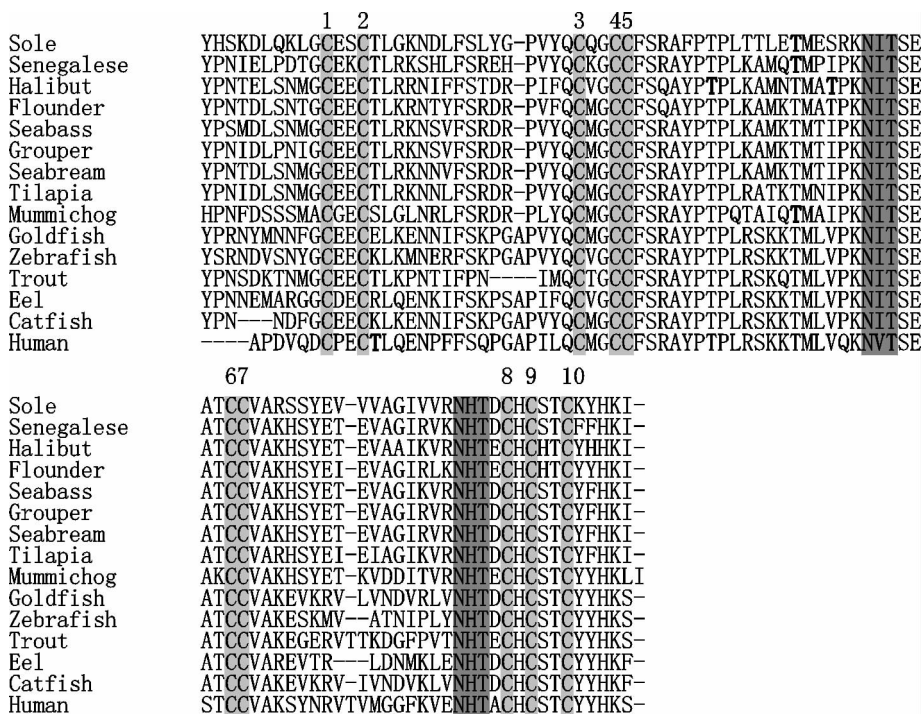
2.4 CG α 系统进化分析

系统进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中 Neighbor-joining 法,发现硬骨鱼类 CG α 构成一个大的分支;半滑舌鲷与其他硬骨鱼类关系较近,如与庸鲽聚为一个小分支,与人类关系则渐远(图 4)。不同物种 CG α 氨基酸序列比较发现:半滑舌鲷 CG α 与鲽形目、鲈形目、合鳃鱼目、银汉鱼目的 CG α

相似性为 59%~72%,比鲟形目(46%~47%)、鲑形目(50%)和鲤形目(50%~53%)的 CG α 同源性高。但半滑舌鲷 CG α 与鲽形目中的其他鱼类 CG α 同源性相对低(59%~65%),与鲈形目 CG α 同源性较接近(70%~72%);这可能是导致鲽形目 CG α 不能聚为一簇的原因。

2.5 CG α 基因在不同组织的表达分析

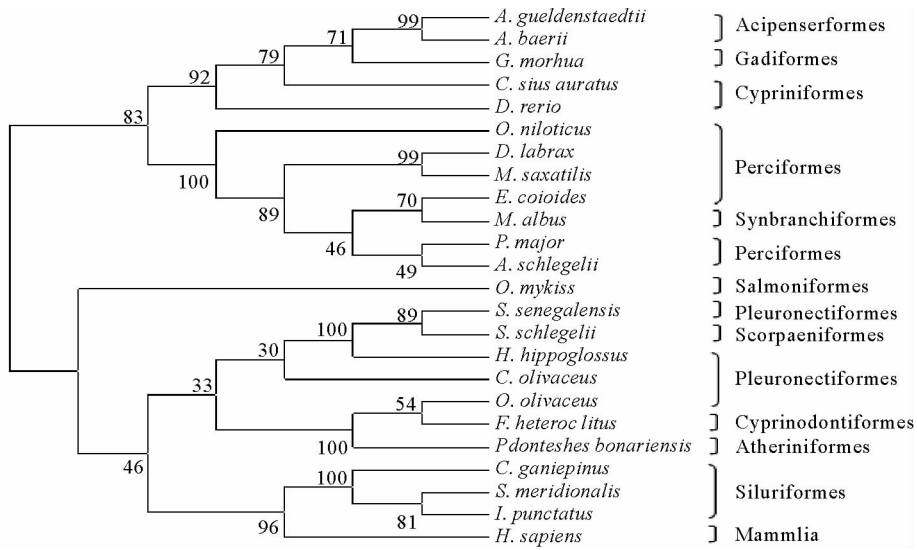
通过实时荧光定量 RT-PCR 检测半滑舌鲷 CG α 基因在不同组织中的表达水平,结果表明,CG α 基因在繁殖期半滑舌鲷雌鱼的脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝脏、脾脏、胃、肠、卵巢、肌肉 12 种组织中均有表达,只是在表达量上有着明显差异。由 SPSS 16.0 软件显著性检验分析得出,12 种组织除头肾和脾脏间、脾脏和肝脏间表达量差异不显著外,其他各组织间表达量差异显著($P < 0.05$)。就表达量而言,CG α 基因在垂体中相对表达量最高;其次在鳃中的表达量较高,肾脏、卵巢、肌肉、肠、脑中的表达量均稍低于鳃;而在心、头肾、肝、脾中的表达量很小(图 5)。



灰色阴影代表半胱氨酸残基位点;黑色阴影代表 N-糖基化位点;黑体(T)代表 O-糖基化位点
Gray shadow indicates the cysteine residues; Black shadow indicates N-linked glycosylation sites; O-glycosylation sites are in boldface

Sole 为半滑舌鲷 *C. semilaevis*, Senegalese 为塞内加尔鲷 *S. senegalensis*, Halibut 为庸鲽 *H. hippoglossus*, Flounder 为牙鲆 *P. olivaceus*, Seabass 为狼鲈 *D. labrax*, Grouper 为斜带石斑鱼 *E. coioides*, Seabream 为真鲷 *P. major*, Tilapia 为尼罗罗非鱼 *O. niloticus*, Mummichog 为底鳉 *F. heteroclitus*, Goldfish 为金鱼 *C. auratus*, Zebrafish 为斑马鱼 *D. rerio*, Trout 为虹鳟 *O. mykiss*, Eel 为欧洲鳗鲡 *A. anguilla*, Catfish 为革胡子鲶 *C. gariepinus*, Human 为人类 *H. sapiens*

图 3 半滑舌鲷 CG α 氨基酸与其他物种 CG α 氨基酸序列的比较
Fig. 3 Alignment of CG α amino acid of *C. semilaevis* with other species



所用物种的 GenBank 的序列号见表 2

GenBank accession number of the amino acid sequences are shown in Table 2

图 4 基于 MEGA 4.0 中的 NJ 方法的半滑舌鲷 CG α 与其他物种分子进化树聚类分析

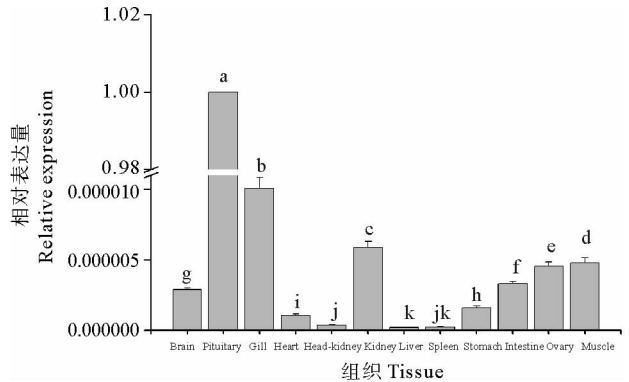
Fig. 4 Phylogenetic tree of the CG α from *C. semilaevis* and other vertebrates based on MEGA 4.0

3 讨论

3.1 半滑舌鲷 CG α 亚基克隆及序列分析

本研究通过同源克隆技术和生物信息学分析,从半滑舌鲷脑垂体中克隆了促性腺激素 α 亚基基因。比较不同物种的 CG α 成熟肽序列,表明半滑舌鲷 CG α 与鲈形目鱼类 CG α 的相似性为 60%~67%,与鲑形目鱼类 CG α 的相似性 69%~70%;这预示着半滑舌鲷 CG α 一级结构和鲈形目鱼类 CG α 一级结构相差较大。分析发现,在半滑舌鲷和其他硬骨鱼类 CG α 的成熟肽序列中包含两对相邻的半胱氨酸(Cys)和两对 N-糖基化基序;这些保守区域可能参与和其他促性腺激素亚型或者促性腺激素受体的结合 (Xia *et al.* 1994; Zenkevics *et al.* 2000)。在本研究氨基酸序列比较中发现,硬骨鱼类和哺乳类动物中 CG α 的一级结构高度保守,这可能是因为促黄体激素 (LH)、促滤泡激素 (FSH) 和促甲状腺激素 (TSH) 都可以和其结合,因此 CG α 在较高的进化选择压力下形成了保守的结构。

在本研究中,通过末端快速扩增方法从半滑舌鲷脑垂体中只克隆得到了一种 CG α 亚基。这与莫桑比克罗非鱼 *Oreochromis mossambicus* (Gur *et al.* 2001) 和中华鲟 *Acipenser sinensis* (Cao *et al.* 2009) 只有一种 CG α 亚基的报道一致。但是有一些硬骨鱼类如马苏大马哈鱼 *Oncorhynchus masou* (Gen *et al.* 1993)、金鱼 *Carassius auratus* (Kobayashi *et al.* 1997) 和红鲫 *Carassius auratus* red var. (李建中等 2005) 有两种 CG α



注: 凡有相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 凡无相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

Brain: 脑; Pituitary: 垂体; Gill: 鳃; Heart: 心脏; Head kidney: 头肾; Kidney: 肾脏; Liver: 肝脏; Spleen: 脾脏; Stomach: 胃; Intestine: 肠; Ovary: 卵巢; Muscle: 肌肉

图 5 半滑舌鲷 CG α mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig. 5 Expression level of CG α mRNA in different tissues of *C. semilaevis*

亚基并对应两种类型的 mRNA。在后续实验中,将进一步采取 Northern 杂交等实验方法直观展示出半滑舌鳎 CG α 只存在一种转录本。

3.2 CG α 亚基在繁殖季节半滑舌鳎组织表达特征

采用实时荧光定量 PCR 技术研究发现,CG α mRNA 在繁殖季节半滑舌鳎的垂体组织表达水平最高,在鳃、肾、肠、脑和卵巢组织表达水平较低,而在其他组织微量表达。Mittelholzer 等(2009)采用实时荧光定量 PCR 方法检测到大西洋鳕鱼 *Gadus morhua* 的 CG α mRNA 在垂体、脑、性腺和鳃组织表达;但是在检测的其他组织如肠、肌肉、脾脏、心、头肾和肝等没有发现 CG α mRNA 的表达。除实验鱼种类不同外,这两个实验的基因表达水平和表达部位差异的可能原因是实验鱼的性腺发育处于不同阶段,大西洋鳕鱼性腺发育水平处于繁殖期前的状态。在本研究中首次报道了 CG α mRNA 在繁殖季节的半滑舌鳎不同组织的表达。Wu 等(2009)采用半定量 RT-PCR 方法研究了 CG α 基因在南方鲇 *Silurus meridionalis* Chen 不同组织的表达,只发现 CG α mRNA 在成年南方鲇垂体和卵巢表达,在其他组织没有检测到该基因表达。而在繁殖季节半滑舌鳎的各个组织都检测到 CG α mRNA 的表达,可能是因为实时定量 PCR 技术比半定量 RT-PCR 技术更加灵敏,能更好地反映出基因在生物体表达的情况。在后续的研究中,将分析 CG α 基因在半滑舌鳎繁殖周期表达情况、血清中 CG α 变化和促性腺激素释放激素调控 CG α 亚基的 mRNA 表达等,进一步认识促性腺激素在鲆鲽类繁殖生理中的作用。

参 考 文 献

- 李建中,陶敏,张轩杰,刘少军,刘筠. 2005. 红鲫促性腺激素 α 亚基的 cDNA 克隆. 湖南师范大学(自然科学学报),28(1):62-66
- 陈晓燕,温海深,何峰,李吉方,陈彩芳,张葭人,金国雄,史宝,史丹,杨艳萍. 2011. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)促性腺激素受体在雄性生殖周期中的表达. 海洋与湖沼,42(2):201-206
- 柳学周,孙中之,马爱军,梁友,庄志猛,兰功刚. 2006a. 半滑舌鳎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. 2006b. 半滑舌鳎苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究,27(2):17-24
- 柳学周,徐永江,刘乃真,曲建忠,倪娜,赵明. 2009. 半滑舌鳎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
- 温海深,牟幸江,张葭人,陈彩芳,陈晓燕,金国雄,史宝,何峰,李吉方. 2010. 雄性半滑舌鳎储精囊形态结构与内分泌功能初步研究. 中国海洋大学学报(自然科学版),40(9):33-38
- Ando H, Ishii S. 1994. Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acids for the pituitary glycoprotein hormone α -subunit and luteinizing hormone β -subunit precursor molecules of Japanese quail (*Coturnix japonica*). Gen Comp Endocrinol 93(3): 357-368
- Arai Y, Kubokawa K, Ishii S, Joss JMP. 1998. Cloning of cDNA encoding the common alpha subunit precursor molecule of pituitary glycoprotein hormones in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. Gen Comp Endocrinol 110(2): 109-117
- Cao H, Zhou L, Zhang YZ and 3 others. 2009. Molecular characterization of Chinese sturgeon gonadotropins and cellular distribution in pituitaries of mature and immature individuals. Mol Cell Endocrinol 303(1-2): 34-42
- Gen K, Maruyama O, Kato T and 3 others. 1993. Molecular cloning of cDNAs encoding two types of gonadotrophin α subunit from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: construction of specific oligonucleotides for the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits. J Mol Endocrinol 11(3):265-273
- Gur G, Rosenfeld H, Melamed P and 3 others. 2001. Tilapia glycoprotein hormone α subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation 182(1):49-60
- Jameson JL, Hollenberg AN. 1993. Regulation of chorionic gonadotropin gene expression. Endocr Rev 14(2): 203-221
- Kobayashi M, Kato Y, Yoshiura Y, Aida K. 1997. Molecular cloning of cDNA encoding two types of pituitary gonadotropin α subunit from the goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol 105(3): 372-378
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25(4): 402-408
- Mittelholzer C, Andersson E, Taranger GL and 2 others. 2009. Quantification of gonadotropin subunits GP α , FSH β , and LH β mRNA expression from Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle. Comp Biochem Physiol, Part B 153: 288-295
- Pierce JG, Parsons TF. 1981. Glycoprotein hormones: Structure and function. Ann Rev Biochem 50: 465-495
- Wu FR, Zhang XY, Zhang WL and 4 others. 2009. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development. Comp Biochem Physiol 153(1):44-48
- Xia H, Chen F, Puett D. 1994. A region in the human glycoprotein hormone alpha-subunit important in holoprotein formation and receptor binding. Endocrinology 134(4):1768-1770
- Zenkevics H, Vose V, Vosekalne I, Bucena A. 2000. Partial deglycosylation of alpha subunit modifies sturgeon gonadotropin function. Acta Biochim Pol 47(3): 815-819