

# 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *gnrh2* 基因克隆、 组织分布及卵巢成熟过程中表达分析\*

王 滨<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>1,2①</sup> 刘 权<sup>1,3</sup> 赵 明<sup>1</sup>  
徐永江<sup>1,2</sup> 史 宝<sup>1,2</sup>

(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. 青岛海洋科学与技术国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

**摘要** 为了研究下丘脑神经肽促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone 2, GnRH2)在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢成熟过程中的生理作用,本研究通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得了半滑舌鳎 GnRH2 全长 cDNA 序列;通过实时荧光定量 PCR(qPCR)对 *gnrh2* mRNA 的组织分布以及卵巢成熟过程中的时空表达特性进行了分析。结果显示,半滑舌鳎 GnRH2 全长 cDNA 序列为 538 bp (不包括 polyA 尾),其中,5'非编码区(Untranslated region, UTR)为 154 bp,3'UTR 为 126 bp,开放阅读框(Open reading frame, ORF)为 258 bp,编码 85 个氨基酸的前体多肽,其分子量及等电点分别为 9.69 kDa 和 8.55。GnRH2 前体多肽由信号肽、GnRH2 十肽、酶切位点(GKR)以及 GnRH 相关肽共 4 部分组成。序列比对分析发现,GnRH2 在鱼类中源性极高,尤其是十肽(QHWSHGWYPG)在所有硬骨鱼类中完全相同。半滑舌鳎 GnRH2 与鲈形目源性最高(89.41%–90.59%),其次为鲹形目、鲑形目和鲑形目(78.82%–85.88%),与鲤形目源性最低(61.18%–71.76%)。*gnrh2* mRNA 主要在脑中表达,在垂体及其他外周组织中表达量极低。此外,组织学分析显示,半滑舌鳎卵巢发育共分为 5 个时期(II、III、IV、V 和 VI 期)。在卵巢成熟过程中,脑 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成期(III 期)显著性增加,达到峰值;随后表达量急剧下降,在成熟期(V 期)达到最小值;在排卵后期(VI 期)又显著性增加。然而,在卵巢成熟过程中,垂体 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成后期(IV 期)显著性降低,随后在成熟期(V 期)有所增加,但在排卵后期(VI 期)又急剧下降。上述研究结果表明,脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鳎卵巢发育过程。

**关键词** 半滑舌鳎; 促性腺激素释放激素 2; 基因克隆和表达; 卵巢成熟

**中图分类号** S917; Q575; Q492 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0063-10

硬骨鱼类的性腺成熟主要受到脑-垂体-性腺轴 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)促进垂体促性腺激素(Gonadotropins, GTHs)即促卵泡激素(Follicle-

\* 国家自然科学基金项目(31602133; 31502145)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、山东省自然科学基金项目(ZR2016CB02)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022016018)共同资助 [This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31602133 and 31502145), China Agriculture Research System (CARS-50), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2016CB02), and Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (20603022016018)]  
王 滨, E-mail: wangbin@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-08-16, 收修改稿日期: 2016-09-21

stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(Luteinizing hormone, LH)的合成与分泌, GTHs 进而作用于性腺促进类固醇激素的分泌。到目前为止,在脊椎动物中已经鉴定出 15 种 GnRH 亚型,其中,8 种存在于硬骨鱼类中;每种硬骨鱼类中存在至少 2 种形式的 GnRH 多肽(Ohkubo *et al.*, 2010)。进化和功能分析表明, GnRH 分为 3 大支: GnRH1 (之前被称作 seabream GnRH)、GnRH2 (之前被称作 chicken GnRH-II)及 GnRH3 (之前被称作 salmon GnRH)。GnRH1 是一种物种特异性的 GnRH 多肽,主要在嗅球、端脑腹侧及视前区表达,通过促进垂体 GTHs 合成与分泌进而调控性腺成熟; GnRH2 从鱼类到哺乳类动物高度保守, GnRH2 神经元位于中脑盖,并且其神经元轴突广泛分布于整个中枢神经系统,可能参与了性行为 and 摄食行为; GnRH3 是鱼类所特有的一种亚型,位于前脑腹侧,在嗅球、端脑腹侧及视前区与 GnRH1 有部分重叠分布,可能参与神经调节功能(Hildahl *et al.*, 2011; Shahjahan *et al.*, 2010)。

目前,已在多种鱼类中鉴定出了 GnRH2 同源基因,从鱼类到哺乳类 GnRH2 前体氨基酸序列高度保守,均由信号肽、GnRH2 十肽、酶切位点及 GnRH 相关肽组成(Guilgur *et al.*, 2006)。尽管 GnRH2 高度保守,然而其生理学功能研究较少,尤其是 GnRH2 在鱼类生殖调控中的生理作用仍不清楚。与其他性腺时期相比,黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和小丑鱼(*Amphiprion melanopus*)性腺 *gnrh2* mRNA 在成熟精巢和成熟卵巢中表达量较高,说明 GnRH2 可能参与了二者性腺发育和性逆转(An *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012)。然而,美洲黑石斑(*Centropristis striata*)脑 *gnrh2* mRNA 水平在性逆转过程中保持稳定(Breton *et al.*, 2015)。此外,在银汉鱼(*Odontesthes bonariensis*)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)、大西洋鳕(*Gadus morhua*)以及圆斑星鲽(*Verasper variegatus*)卵巢成熟过程中脑 *gnrh2* mRNA 水平基本保持不变(Guilgur *et al.*, 2009; Hildahl *et al.*, 2011; Shahjahan *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012)。鲑鱼(*Scomber japonicus*)脑和垂体 *gnrh2* mRNA 表达量以及脑中 GnRH2 多肽含量在卵巢成熟过程中也没有发生显著性变化(Selvaraj *et al.*, 2012)。上述结果说明, GnRH2 可能没有直接参与上述鱼类性腺发育成熟过程。然而,鲑鱼脑 *gnrh2* mRNA 表达量在性腺分化过程中显著性减少(Selvaraj *et al.*, 2015)。鲮鱼(*Mugil cephalus*)脑 *gnrh2* mRNA 表达量在卵巢成熟过程中也显著性降低(Nocillado *et al.*, 2007)。相反,大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)脑中 GnRH2 含量随着卵母细胞直径增加而升高,并且一直持续到排卵后期

仍保持较高水平(Andersson *et al.*, 2001)。综上所述, GnRH2 在鱼类性腺成熟过程中的生理作用尚未完全阐明,需要进一步深入研究。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是一种重要的海水养殖经济鱼类。近年来,对于半滑舌鳎生殖相关功能基因研究已有过一些报道,例如 *FSH $\beta$* 、*LH $\beta$* 、*GTH $\alpha$* 、*mPR-like* 等(Shi *et al.*, 2015; 柳学周等, 2015)。为了进一步研究 GnRH2 在半滑舌鳎卵巢成熟过程中的生理作用,本研究通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得 GnRH2 全长 cDNA 序列,并通过实时荧光定量 PCR(qPCR)方法研究了 *gnrh2* mRNA 的组织分布和在卵巢成熟过程中的时空表达特性,旨在为半滑舌鳎生殖内分泌研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼及试剂耗材

实验所用半滑舌鳎购自山东海阳市黄海水产有限公司,其中,克隆及组织分布所用半滑舌鳎为 2 龄雌鱼,体重为 553.0–844.1 g,体长为 48.0–53.0 cm; 卵巢发育不同时期所用半滑舌鳎为性成熟 3 龄雌鱼,体重为 1183.9–1349.2 g,体长为 52.0–59.0 cm。

RNA 提取试剂 RNAiso Plus、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)及荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)购自 TaKaRa 公司; RACE 试剂盒 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购自 Clontech 公司; 胶回收试剂盒 Zymoclean Gel DNA Recovery Kit 购自 ZYMO 公司; pEASY-T1 载体以及 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞购自全式金公司; 其余为国产分析纯。引物和测序均由生工生物工程(上海)有限公司完成。无 RNA 酶 EP 管及 PCR 管购自 Axygen 公司; NanoDrop2000C 分光光度计购自 Thermo 公司; Veriti™ 96-孔热循环仪购自 Applied Biosystems 公司; 荧光定量 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪购自 Eppendorf 公司。

### 1.2 GnRH2 全长 cDNA 克隆及序列分析

半滑舌鳎用 0.05% MS-222 麻醉后,用剪刀沿侧线剪开头部处死,迅速取出全脑,置于液氮中。按照 RNAiso-Plus 操作说明提取总 RNA,通过 NanoDrop2000C 分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度,通过 1%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 RACE cDNA Amplification Kit 进行反转录,得到 3'-RACE-Ready cDNA 和 5'-RACE-Ready cDNA。根据已知其他鱼类 GnRH2 的保守序列设计引物

(表 1), 以上述 cDNA 为模板, 分别进行 3'/5'RACE。第 1 轮 PCR 反应体系: 10×PCR Buffer 2.5 μl, dNTP Mixture (10 mmol/L) 2 μl, GnRH2-F1/GnRH2-R1 (10 μmol/L) 0.5 μl, UPM (long) 2.5 μl, *Taq* 聚合酶 0.2 μl, cDNA 1 μl, ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μl。第 1 轮 PCR 程序: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 10 个循环, 每个循环退火温度下降 1℃; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 20 个循环, 72℃ 10 min。第 2 轮(巢式)PCR 扩增体系中以第 1 轮 PCR 产物为模板, UPM(short)替代 UPM(long), GnRH2-F2/GnRH2-R2(10 μmol/L)替代 GnRH2-F1/GnRH2-R1(10 μmol/L), 其余组分均不变。巢式 PCR 程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。以 1.5%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 将符合目的基因大小的条带

按照 Gel DNA Recovery Kit 说明书进行胶回收。将胶回收产物与 pEASY-T1 载体 25℃连接 10 min 后转化 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选。挑取阳性单克隆, 经菌液 PCR 验证后条带大小合适的菌液样品送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

将测序所得的片段进行拼接, 获得半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 序列。通过 DNAMAN 软件推导其氨基酸序列; 利用在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽; 利用在线软件 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行同源性序列比对; 利用软件 Mega 6.06 通过邻接法(NJ)构建进化树, 1000 次自举(bootstrap)重复检验进化树的置信度; 利用在线软件 ExPASy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))推断前体多肽的分子量及等电点。

表 1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	目的 Purpose
GnRH2-F1	GTTCTGTGCTGGGGCTGCTTCT	3'RACE, 1st PCR
GnRH2-F2	CAYTGGTCNCAYGGNTGGTAYCC	3'RACE, 2nd PCR
GnRH2-R1	CTGGGAAGGATCACCATAGAAA	5'RACE, 1st PCR
GnRH2-R2	ATAATGTCTTTTCAGAATGCTCC	5'RACE, 2nd PCR
UPM (long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	Universal primers
UPM (short)	CTAATACGAC TCACTATAGGGC	
GnRH2-F3	GGAATCTGAACTGGAGAACTGCT	q-PCR
GnRH2-R3	TGGCTGCTCACAACCTTTATCAC	
18S-F	GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	
18S-R	AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC	

### 1.3 *gnrh2* mRNA 组织分布及卵巢成熟过程中表达分析

为了检测 *gnrh2* mRNA 在半滑舌鲷中的组织分布, 取 3 条雌性半滑舌鲷用 0.05% MS-222 麻醉后, 用剪刀沿侧线剪开头部处死, 迅速取出脑、垂体、鳃、心、肝、脾、肾、胃、肠、肌肉及卵巢置于液氮中保存至 RNA 提取。

将处于卵巢不同发育阶段的半滑舌鲷用 0.05% MS-222 麻醉后, 用剪刀沿侧线剪开头部处死, 迅速取出性腺置于 Davis 固定液中固定 24 h 后, 转入 70% 酒精保存, 用于组织切片分析; 同时, 将脑和垂体置于液氮中保存至 RNA 提取。参考柳学周等(2009)半滑舌鲷卵巢发育组织学研究中的分类标准, 对卵巢组织切片的 HE 染色结果进行分析并确定卵巢发育时期。将各个时期对应的脑和垂体样品经 RNA 提取、反转录后, 通过荧光定量 PCR 检测 *gnrh2* mRNA 在

卵巢成熟过程中的表达特性。

### 1.4 总 RNA 提取、反转录与荧光定量检测

按照 RNAiso Plus 操作说明提取组织总 RNA, 通过 NanoDrop2000C 分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 通过 1%琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性。纯度高且完整的 RNA 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real-time)反转录试剂盒说明书进行反转录实验。反转录实验体系为 20 μl, 先取 1 μg 总 RNA 与 2 μl 5×g DNA Eraser Buffer、1 μl gDNA Eraser, 用无 RNase 水补充至 10 μl, 缓慢混匀、短暂离心, 按以下反应程序进行: 42℃ 2 min; 将这一步的反应液与 1 μl RT Primer Mix、1 μl PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、4 μl 5×PrimeScript Buffer、4 μl 无 RNase 水, 缓慢混匀、短暂离心, 按以下反应程序进行: 37℃ 15 min, 85℃ 5 s; 将反转录产物 10 倍稀释后-20℃保存备用。

按照 Wang 等(2016)所述方法通过荧光定量 PCR 检测相关基因的表达。荧光定量扩增体系为 20  $\mu$ l, 包括 10  $\mu$ l 2 $\times$ SYBR<sup>®</sup>Premix Ex Taq<sup>™</sup>II、0.8  $\mu$ l 上下游引物(每种引物浓度均为 10  $\mu$ mol/L)、2  $\mu$ l 稀释的 cDNA 模板以及 7.2  $\mu$ l 无菌水, 缓慢混匀、短暂离心后, 通过 Mastercycler ep realplex Real-time PCR 仪(Eppendorf)进行荧光定量检测, 每个样品 3 个平行, PCR 程序采用两步法: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以验证产物特异性。18S 作为内参基因, 本研究所用引物信息见表 1。基因相对表达量参照 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法计算, 结果以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示。采用 SPSS 17 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)与 Duncan 多重比较,  $P < 0.05$  认为有显著性统计差异。

## 2 结果

### 2.1 GnRH2 全长 cDNA 克隆及序列分析

如图 1 所示, 半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 为 538 bp (不包括 poly A 尾), 其中, 5'非编码区(Untranslated region, UTR)为 154 bp, 3'UTR 为 126 bp, 开放阅读框(Open reading frame, ORF)为 258 bp, 编码 85 个氨基酸(GenBank 登录号: KX090947)。GnRH2 前体多肽由 4 部分组成: 信号肽(23 个氨基酸)、GnRH2 十肽(QHWSHGWYPG)、酶切位点(GKR)以及 GnRH 相关肽(49 个氨基酸)。

### 2.2 GnRH2 同源性比对与进化树分析

如图 2 所示, 将半滑舌鲷 GnRH2 前体与其他硬骨鱼类进行同源性比对分析, 发现 GnRH2 在鱼类中同源性极高, 尤其是十肽(QHWSHGWYPG)在所有硬骨鱼类中完全相同。半滑舌鲷 GnRH2 与鲈形目同源性最高(89.41%–90.59%), 其次为鲷形目、鲑形目和鲉形目(78.82%–85.88%), 与鲤形目同源性最低(61.18%–71.76%)。

采用 Mega 6.06 软件, 基于 GnRH 前体氨基酸序列比对分析结果, 以邻近法构建鱼类 GnRH 进化树。如图 3 所示, 进化树共分为 3 大支: GnRH1 分支、GnRH2 分支以及 GnRH3 分支。本研究克隆所得半滑舌鲷 GnRH2 与其他鱼类 GnRH2 聚为一支。

### 2.3 *gnrh2* mRNA 组织分布及在卵巢成熟过程中表达分析

如图 4 所示, *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达, 在

```

-154          tgggggagcgtgaggagaaatctgaactggagaa
-120 ctgctaagaaccataaagacaataaagagtgtctgagagcttctgcgagagcgtgagga
-60 aaacat1taagaagcccctgtgg1gataaaagtgtgagcagccaactaggtacagacata1c
1 ATGAGTGTGTTCGGCTGGTCTGTLTGC1TGGGCTGCTTCTCGCTGGGCTCAATTT
1  M S V F R L V L L L G L L L C L G A Q F
          Signal peptide
61 TCTAATGCACAGCACTGGTCTCATGGTGGTACCCAGGAGGGAAAAGGGAGCTGGACTCC
21  S N A Q H W S H G W Y P G G K R E L D S
          GnRH2
121 TTTGGTACATCAGAGATTCAGAGGAGATTAACCTCTGTGAGGCCGAGAAATGCAATTAC
41  F G T S E I S E E I K L C E A G E C S Y
          GnRH-associated peptide
181 CTGAGACCCAGAGGAGGACATTCGAAAGACATTATACTCGATCGGTGGCCCGGGAG
61  L R P Q R R S I L K D I I L D A L A R E
241 CTACAGAAGGAAGTGAaacgttctgttttctatgtgtatccttccagtgactgtt
81  L Q K R K *
301 ttgatggtgtgaa1ttggtgtatctgtatgtgaaatgtattaactcgttgtttaaatt
361 tcccataataaacaattttgat1t-polyA

```

图 1 半滑舌鲷 GnRH2 前体 cDNA 核苷酸序列与推测的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of cDNA encoding the GnRH2 precursor of *C. semilaevis*

开放阅读框用大写字母表示, 5'和 3'非编码区用小写字母表示。起始密码子和终止密码子分别用黑框和星号表示; 下划实线为信号肽序列; 下划实线且粗体字母为 GnRH2 十肽; 下划虚线为 GnRH 相关肽

The ORF was denoted by capital letters, and the 5'-and 3'-UTRs were denoted by lower-case letters. The initiation codon was boxed, and the stop codon was denoted by an asterisk. The signal peptide was underlined with a solid line.

GnRH2 decapeptide was highlighted in bold letters and underlined with a solid line. The GnRH-associated peptide was underlined with a dotted line

垂体及其他外周组织中表达量很低, 只有脑中表达量的 2.5%–8.3%。

如图 5 所示, 根据卵母细胞不同发育时相, 以各期切片视野中数量或者面积占优势的卵母细胞类型作为卵巢划分依据, 卵巢发育周期共分为 5 个时期: 时期 II, 卵黄生成前期; 时期 III, 卵黄生成期; 时期 IV, 卵黄生成后期; 时期 V, 成熟期; 时期 VI, 排卵后期。

如图 6-A 所示, 以 II 期作为参照, 在卵巢成熟过程中, 脑 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成期(III期)显著性增加, 达到峰值; 随后, 脑 *gnrh2* mRNA 表达量急剧下降, 在成熟期(V期)达到最小值; 然而, 在排卵后期(VI期)又显著性增加。如图 6-B 所示, 以 II 期作为参照, 在卵巢成熟过程中垂体 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成期(III期)略微降低, 与 II 期相比无显著性差异; 然而, 垂体 *gnrh2* mRNA 表达量在卵黄生成后期(IV期)显著性降低; 随后, 垂体 *gnrh2* mRNA 表达量在成熟期(V期)较 IV 期显著性增加, 在排卵后期(VI期)又急剧下降。

	Signal peptide	GnRH2	GnRH-associated peptide
Tongue sole	M-SVFRLLVLLGLLLCLGAQFSNA	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
Grass puffer	M-RVPGLLLLLGLLLCAGAHLSNG	QHWSHGWPYGGKRELD	FPNPEISEEIKLCEAGECSYL
Winter flounder	M-CASRLVLLGLLLCVGAQLSSG	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
Grouper	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSSA	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
Nile tilapia	M-CVSRLALLLGLLLCVGAQLSFA	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
Chub mackerel	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSNA	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTPEISEEIKLCEAGECSYL
Black porgy	M-CVSRLVLLGLLLCVGAQLSNG	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
European sea bass	M-CVSRLVLLFGLLLCVGAQLSNA	QHWSHGWPYGGKRELD	SFGTSEISEEIKLCEAGECSYL
Goldfish	MVHICRLFVVMGMLMFLSVQFAS	QHWSHGWPYGGKREI	DVYDPSEVSEEEKLCNAGKCS
Zebrafish	MVLVCRLLLVVGLMLCLSAQLSSA	QHWSHGWPYGGKREI	DLYDTSEVSEEVKLCNAGKCS
Rainbow trout	MVSVARLVFMGLLLCLGAQLSSS	QHWSHGWPYGGKRELD	SFTTSEISEEIKLCEAGECSYL

\*: \* ..:.\*::: ..::: .\*\*\*\*\*:\* : \*:::\*:\*:\*:\*:\*:\* \* \* \*..\* : .:\*:\* \*:::\*\*\*\*

图 2 不同硬骨鱼类 GnRH2 前体氨基酸序列比对

Fig.2 Multiple amino acid sequence alignments of GnRH2 precursors from different fish species

相同的氨基酸用(\*)标识; 高度保守的氨基酸用(:)标识; 低度保守的氨基酸用(.)标识。GenBank 登录号分别为: 半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*; BAJ07189)、美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*; AER93392)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*; ACZ51152)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*; BAC65155)、鲈鱼(*Scomber japonicus*; ADP89592)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92552)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*; AAF62900)、金鱼 (*Carassius auratus*; AAB86989)、斑马鱼(*Danio rerio*; AAM43951)以及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687)

The identical amino acids were labeled with “\*”, the highly conserved amino acids were labeled with “:”, and the less conserved amino acids were labeled with “.”. The GenBank accession numbers of the GnRH2 precursor sequences of teleosts were as follows: half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256), grass puffer (*Takifugu niphobles*; BAJ07189), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*; AER93392), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*; ACZ51152), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; BAC65155), chub mackerel (*Scomber japonicus*; ADP89592), black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92552), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*; AAF62900), goldfish (*Carassius auratus*; AAB86989), zebrafish (*Danio rerio*; AAM43951), and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687)

### 3 讨论

本研究首先通过 RT-PCR 及 RACE 方法获得了半滑舌鲷 GnRH2 全长 cDNA 序列。进化分析表明, 半滑舌鲷 GnRH2 与其他硬骨鱼类 GnRH2 聚为一支, 不同于 GnRH1 和 GnRH3 分支。多重序列比对发现, 鱼类 GnRH2 前体序列高度保守, 由信号肽、成熟十肽、酶切位点以及 GnRH 相关肽组成, 尤其是成熟十肽在所有硬骨鱼类中完全相同。此外, 半滑舌鲷 *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达, 以及在卵巢成熟过程中脑中 *gnrh2* mRNA 表达量的动态变化, 表明脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鲷性腺发育。该结果增加了对 GnRH2 参与鱼类生殖调控作用的认识。

半滑舌鲷 GnRH2 ORF 为 258 bp, 编码 85 个氨基酸的前体多肽(图 1), 这与黑鲷(An *et al*, 2008)、小丑鱼(Kim *et al*, 2012)、星点东方鲀(Shahjahan *et al*, 2010)、鲈鱼(Selvaraj *et al*, 2012)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*) (Shao *et al*, 2015)、美洲拟鲈(Tuziak *et al*, 2013a)、美洲黑石斑(Morin *et al*, 2015)等结果是一致的。不同鱼类 GnRH2 前体多肽氨基酸长度略有差异, 例如底鳉(*Fundulus heteroclitus*)、中华鲟(*Acipenser*

*sinensis*)、大西洋鲑 GnRH2 前体分别为 83 个氨基酸、86 个氨基酸、86 个氨基酸(Hildahl *et al*, 2011; Ohkubo *et al*, 2010; Yue *et al*, 2013)。不同硬骨鱼类 GnRH2 前体同源性比对分析显示, GnRH2 在进化中高度保守, 半滑舌鲷 GnRH2 与鲈形目同源性最高, 其次为鲈形目、鲑形目和鲀形目, 与鲤形目同源性最低(图 2)。进化树分析进一步证实, 本研究克隆所得序列确实为半滑舌鲷 GnRH2 序列。此外, GnRH 进化树分为 3 大支也表明 3 种 GnRH 序列在硬骨鱼类进化中高度保守(图 3), 暗示 3 种 GnRH 多肽可能发挥了重要的生理功能。

为了研究 GnRH2 潜在的生理功能, 本研究对其组织表达模式进行了分析。荧光定量 PCR 结果显示, 半滑舌鲷 *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达, 在垂体及其他外周组织中表达量极低, 只有脑中表达量的 2.5%~8.3%(图 4)。与之类似, 圆斑星鲈 *gnrh2* mRNA 只在脑中表达(Xu *et al*, 2012)。除了主要在脑中表达外, *gnrh2* mRNA 在不同鱼类外周组织中表达有所差异, 在底鳉肾(Ohkubo *et al*, 2010)、中华鲟垂体(Yue *et al*, 2013)、美洲拟鲈精巢(Tuziak *et al*, 2013a)、大西洋鲑卵巢(Hildahl *et al*, 2011)、精巢和脾(Tuziak *et al*, 2013b)等组织中也有少量表达。综上所述, GnRH2

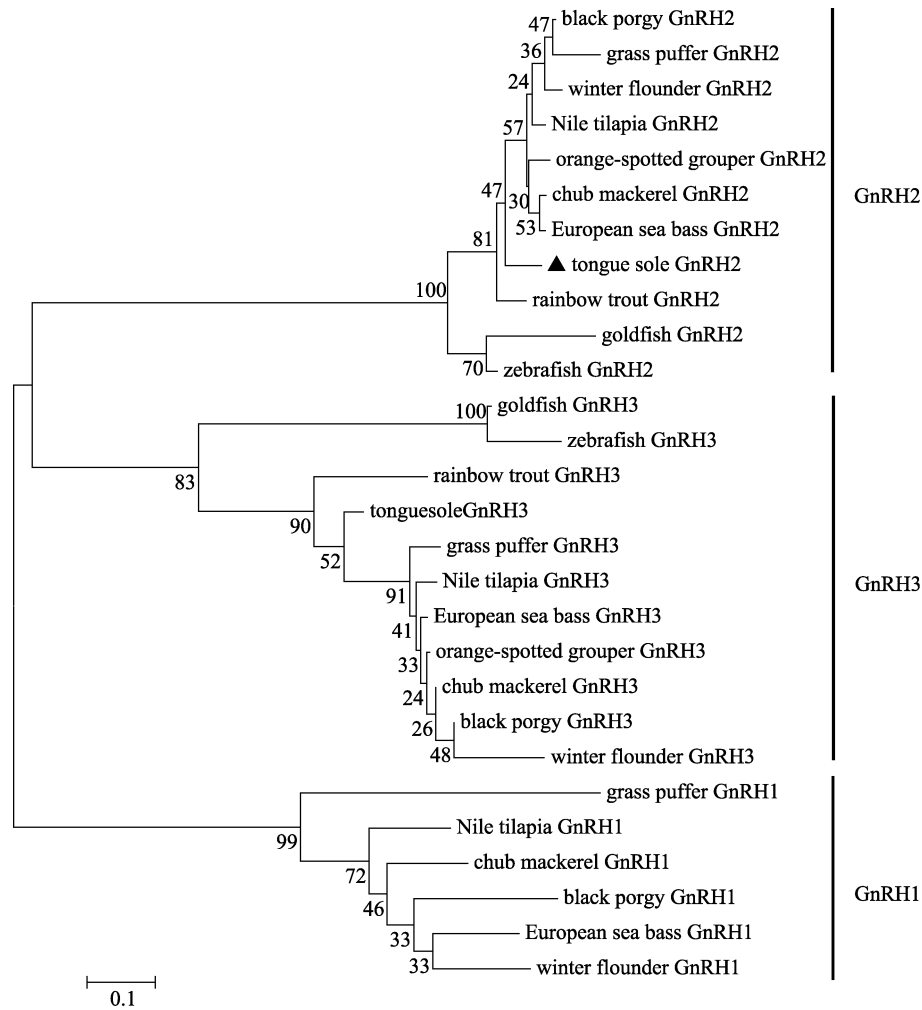


图 3 不同硬骨鱼类 GnRH 前体进化树分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of GnRH precursors from different teleosts

鱼类 GnRH1、GnRH2 以及 GnRH3 的 GenBank 登录号分别为：半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256/AFP23141)、星点东方鲀(*Takifugu niphobles*; BAJ07188/BAJ07189/BAJ07190)、美洲拟鲈(*Pseudopleuronectes americanus*; AER93394/AER93392/AER93395)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*; ACZ51152/ACZ51151)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*; BAC65154/BAC65155/BAC65156)、鲈鱼(*Scomber japonicus*; ADP89591/ADP89592/ADP89593)、黑鲷(*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92553/ABU92552/ABV03808)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*; AAF62898/AAF62900/AAF62899)、金鱼(*Carassius auratus*; AAB86989/BAB18904)、斑马鱼(*Danio rerio*; AAM43951/AAL99294)以及虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687/AAF91280)

The GenBank accession numbers of GnRH1, GnRH2 and GnRH3 precursor sequences of teleosts were as follows: half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*; ANW83256/AFP23141), grass puffer (*Takifugu niphobles*; BAJ07188/BAJ07189/BAJ07190), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*; AER93394/AER93392/AER93395), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*; ACZ51152/ACZ51151), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; BAC65154/BAC65155/BAC65156), chub mackerel (*Scomber japonicus*; ADP89591/ADP89592/ADP89593), black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*; ABU92553/ABU92552/ABV03808), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*; AAF62898/AAF62900/AAF62899), goldfish (*Carassius auratus*; AAB86989/BAB18904), zebrafish (*Danio rerio*; AAM43951/AAL99294) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; AAF08687/AAF91280)

主要由脑分泌进而作用于垂体发挥其生理功能。此外，通过免疫细胞化学方法在金鱼及尼罗尖吻鲈(*Lates niloticus*)脑和垂体中均检测到了 GnRH2 的阳性信号(Kim *et al*, 1995; Mousa *et al*, 2003)。

尽管 GnRH2 在进化过程中高度保守，但其生理

学功能研究较少。在金鱼中，侧脑室注射 GnRH2 直接影响了雌鱼生殖行为(Volkoff *et al*, 1999)，抑制了金鱼的摄食行为(Matsuda *et al*, 2008)。此外，GnRH2 促进了金鱼垂体 LH 及 GH 分泌(Chang *et al*, 2012、2009)。然而，GnRH2 在鱼类生殖调控中的作用仍不

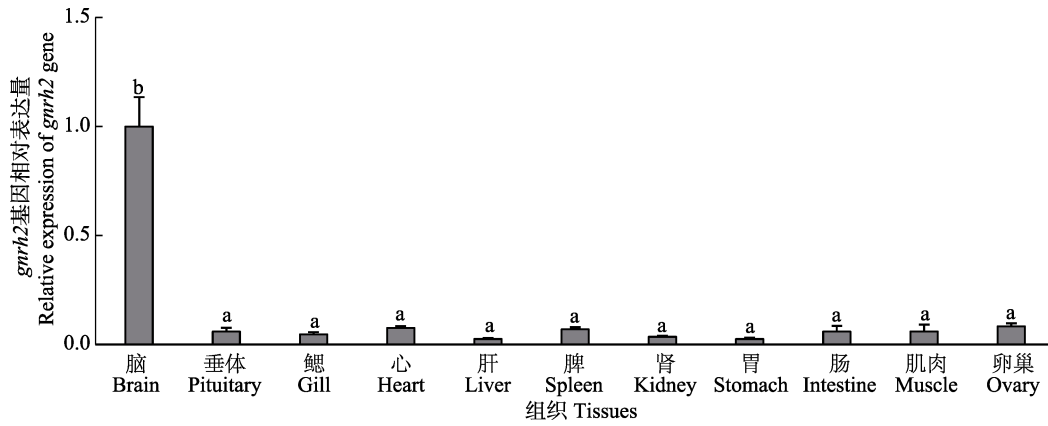


图 4 半滑舌鳎 *gnrh2* mRNA 组织分布

Fig.4 Relative mRNA levels of *gnrh2* in various tissues of *C. semilaevis*

图中不同字母表示不同组之间有显著性差异, 下同

Groups with different letters are significantly different from each other, the same as below

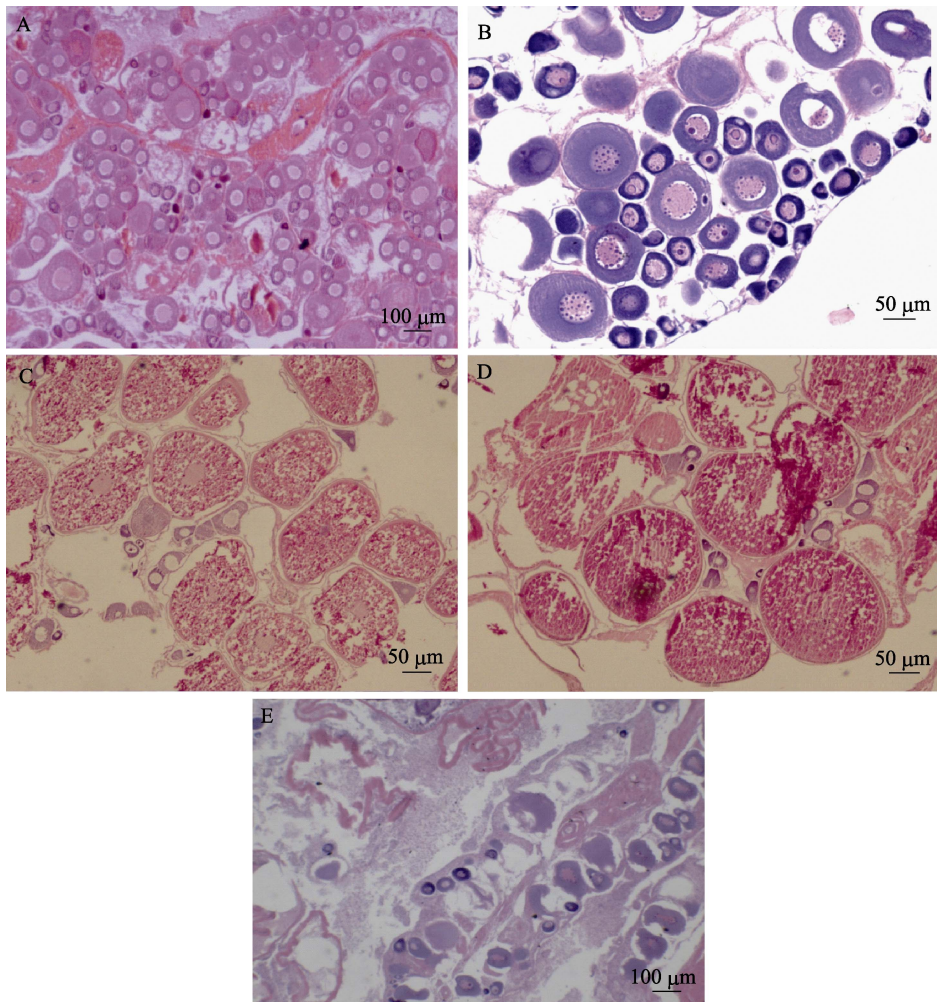


图 5 半滑舌鳎卵巢发育时期组织切片

Fig.5 Histological sections of *C. semilaevis* ovaries at different stages of development

A. II期卵巢; B. III期卵巢; C. IV期卵巢; D. V期卵巢; E. VI期卵巢. 比例尺: 100 μm (A 和 E); 50 μm (B、C 和 D)

A. Ovaries at stage II; B. Ovaries at stage III; C. Ovaries at stage IV; D. Ovaries at stage V; E. Ovaries at stage VI.

Scale bar: 100 μm (A, E); 50 μm (B, C, and D)

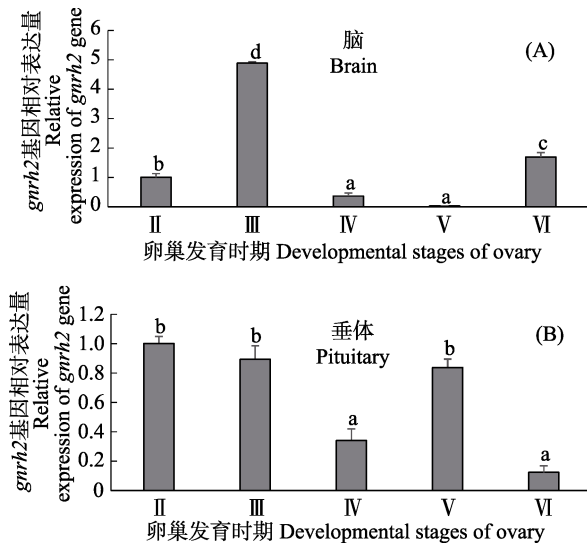


图6 半滑舌鲷卵巢不同发育时期脑(A)和垂体(B)中 *gnrh2* mRNA 表达分析

Fig.6 Expression profiles of *gnrh2* mRNA in the brain (A) and pituitary (B) during ovarian maturation of *C. semilaevis*

清楚,需要进一步深入研究。本研究中,半滑舌鲷脑 *gnrh2* mRNA 在卵黄生成期(III期)显著性增加,达到峰值;随后表达量急剧下降,在成熟期(V期)达到最小值;在排卵后期(VI期)又显著性增加。与此同时,垂体 FSH $\beta$  和 LH $\beta$  也在III期显著性增加,分别在IV期和V期达到峰值(Shi *et al.*, 2015)。因为 FSH 在早期性腺复苏和配子发育过程中起了主要作用,而 LH 在最后性成熟过程中发挥了重要作用(Shahjahan *et al.*, 2010),因此, GnRH2 可能通过促进垂体 FSH 和 LH 合成与分泌的方式在半滑舌鲷卵巢发育中发挥了重要作用。此外,半滑舌鲷为非同步分批多次产卵型鱼类,脑 *gnrh2* mRNA 水平在排卵后期(VI期)显著性增加,有可能是为下一次卵巢发育做准备。与之类似,星点东方鲀脑 *gnrh2* mRNA 表达量也在排卵后期有所增加(Shahjahan *et al.*, 2010)。

为了进一步研究垂体 GnRH2 是否参与半滑舌鲷卵巢发育,对半滑舌鲷卵巢成熟过程中垂体 *gnrh2* mRNA 表达差异也进行了分析。在半滑舌鲷卵巢成熟过程中,垂体 *gnrh2* mRNA 表达量除在成熟期(V期)相对有所增加外,随着卵巢发育垂体 *gnrh2* mRNA 表达量显著降低,这说明垂体 GnRH2 多肽可能没有参与卵巢发育。与之类似,鲑鱼垂体 GnRH2 多肽水平在卵巢成熟过程中没有发生显著性变化(Selvaraj *et al.*, 2012)。在条纹鲈(*Morone saxatilis*)、金头鲷(*Sparus aurata*)及真鲷(*Pagrus major*)垂体中不表达 *gnrh2* 或者 GnRH2 含量不随着生殖状况的变化而变化,进一

步证实了上述结论(Xu *et al.*, 2012)。此外,半滑舌鲷垂体 *gnrh2* mRNA 表达量随卵巢发育降低,可能是由于受到垂体 FSH/LH 负反馈作用导致的,然而这一推断需要进一步深入研究。

## 4 小结

本研究获得了半滑舌鲷 GnRH2 的全长 cDNA 序列,并对其系统进化、基因组织分布及卵巢成熟过程中的时空表达特性进行了分析。进化分析表明,半滑舌鲷 GnRH2 与其他硬骨鱼类 GnRH2 聚为一支,不同于 GnRH1 和 GnRH3 分支。多重序列比对发现,鱼类 GnRH2 前体序列高度保守,荧光定量 PCR 结果表明, *gnrh2* mRNA 主要在脑中表达。此外,卵巢成熟过程中脑 *gnrh2* mRNA 表达量的动态变化,暗示脑 GnRH2 可能参与了半滑舌鲷性腺发育。该结果增加了对 GnRH2 参与鱼类生殖调控作用的认识。

## 参 考 文 献

- An KW, Nelson ER, Habibi HR, *et al.* Molecular characterization and expression of three GnRH forms mRNA during gonad sex-change process, and effect of GnRH $\alpha$  on GTH subunits mRNA in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). *General and Comparative Endocrinology*, 2008, 159(1): 38–45
- Andersson E, Fjellidal PG, Klenke U, *et al.* Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: Immunological characterization and seasonal variation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2–3): 551–558
- Breton TS, DiMaggio MA, Sower SA, *et al.* Brain aromatase (*cyp19a1b*) and gonadotropin releasing hormone (*gnrh2* and *gnrh3*) expression during reproductive development and sex change in black sea bass (*Centropristis striata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 181: 45–53
- Chang JP, Habibi HR, Yu Y, *et al.* Calcium and other signalling pathways in neuroendocrine regulation of somatotroph functions. *Cell Calcium*, 2012, 51(3–4): 240–252
- Chang JP, Johnson JD, Sawisky GR, *et al.* Signal transduction in multifactorial neuroendocrine control of gonadotropin secretion and synthesis in teleosts-studies on the goldfish model. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 42–52
- Guilgur L, Strüssmann C, Somoza G. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to



- the reproductive status. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, 35(1): 157–166
- Guilgur LG, Moncaut NP, Canario AV, *et al.* Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2006, 144(3): 272–283
- Hildahl J, Sandvik GK, Edvardsen RB, *et al.* Identification and gene expression analysis of three GnRH genes in female Atlantic cod during puberty provides insight into GnRH variant gene loss in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(3): 458–467
- Kim MH, Oka Y, Amano M, *et al.* Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology*, 1995, 356(1): 72–82
- Kim NN, Shin HS, Habibi HR, *et al.* Expression profiles of three types of GnRH during sex-change in the protandrous cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus*: Effects of exogenous GnRHs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 161(2): 124–133
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progesterin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鲷新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Liu XZ, Xu YJ, Liu NZ, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 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*, 2009, 30(6): 25–35]
- Mousa MA, Mousa SA. Immunohistochemical localization of gonadotropin releasing hormones in the brain and pituitary gland of the Nile perch, *Lates niloticus* (Teleostei, Centropomidae). *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 130(3): 245–255
- Matsuda K, Nakamura K, Shimakura S, *et al.* Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. *Hormones and Behavior*, 2008, 54(1): 83–89
- Morin SJ, Decatur WA, Breton TS, *et al.* Identification and expression of GnRH2 and GnRH3 in the black sea bass (*Centropristis striata*), a hermaphroditic teleost. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(2): 383–395
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, *et al.* Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (*drd2*) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(2): 278–287
- Ohkubo M, Aranishi F, Shimizu A. Molecular cloning and brain distribution of three types of gonadotropin-releasing hormone from mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Fish Biology*, 2010, 76(2): 379–394
- Selvaraj S, Kitano H, Amano M, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of three GnRH forms in the brain and pituitary of adult chub mackerel (*Scomber japonicus*) maintained in captivity. *Aquaculture*, 2012, 356–357(4): 200–210
- Selvaraj S, Kitano H, Ohga H, *et al.* Expression changes of mRNAs encoding kisspeptins and their receptors and gonadotropin-releasing hormones during early development and gonadal sex differentiation periods in the brain of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 222: 20–32
- Shahjahan M, Hamabata T, Motohashi E, *et al.* Differential expression of three types of gonadotropin-releasing hormone genes during the spawning season in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 167(1): 153–163
- Shao YT, Tseng YC, Chang CH, *et al.* GnRH mRNA levels in male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, under different reproductive conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 180: 6–17
- Shi B, Liu X, Xu Y, *et al.* Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- Tuziak SM, Volkoff H. Gonadotrophin-releasing hormone in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*): Molecular characterization, distribution and effects of fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 2013a, 184(3): 9–21
- Tuziak SM, Volkoff H. Melanin-concentrating hormone (MCH) and gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in Atlantic cod, *Gadus morhua*: Tissue distributions, early ontogeny and effects of fasting. *Peptides*, 2013b, 50(3): 109–118
- Volkoff H, Peter RE. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 116(3): 347–355
- Wang B, Jia J, Yang G, *et al.* *In vitro* effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 1–9
- Xu YJ, Liu XZ, Liao MJ, *et al.* Molecular cloning and differential expression of three GnRH genes during ovarian maturation of spotted halibut, *Verasper variegatus*. *Journal of Experimental Zoology, Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 2012, 317(7): 434–446

Yue H, Ye H, Chen X, *et al.* Molecular cloning of cDNA of gonadotropin-releasing hormones in the Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and the effect of 17 beta-estradiol on

gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2013, 166(4): 529–537

(编辑 冯小花)

## Molecular Cloning, Localization, and Expression Analysis of *gnrh2* in Different Tissues of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) During Ovarian Maturation

WANG Bin<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2①</sup>, LIU Quan<sup>1,3</sup>, ZHAO Ming<sup>1</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, SHI Bao<sup>1,2</sup>

(1. Key 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; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** In order to clarify the physiological roles of gonadotropin-releasing hormone 2 (GnRH2) during ovarian maturation in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), we first cloned the full-length cDNA of GnRH2 by RT-PCR coupled with RACE. Then, the tissue distribution and changes in *gnrh2* mRNA levels during ovarian maturation were evaluated by real-time quantitative PCR. Our data showed that the full-length cDNA of GnRH2 was 538 bp in size, excluding the poly-A tail. It consisted of a 5' untranslated region (UTR) of 154 bp, a 3' UTR of 126 bp and an open reading frame (ORF) of 258 bp which encoded an 85-amino acids preprohormone with a deduced molecular mass and isoelectric point of 9.69 kDa and 8.55, respectively. GnRH2 precursor contained a signal peptide, a mature decapeptide, a processing site, and a GnRH-associated peptide. Multiple sequence alignments indicated that GnRH2 preprohormones were highly conserved among teleosts, especially the decapeptide (QHWSHGWYYPG) motif. Tongue sole GnRH2 precursor displayed the highest sequence identities with the order Perciformes (89.41%–90.59%), followed by Pleuronectiformes, Salmoniformes, and Tetraodontiformes (78.82%–85.88%), and the lowest sequence identities with Cypriniformes (61.18%–71.76%). The tissue distribution showed that *gnrh2* transcripts could be detected at the highest levels in the brain and at lower levels in the pituitary and other peripheral tissues. The developmental stages of ovaries were divided into five stages (II, III, IV, V, and VI) by histological analysis and the expression patterns of *gnrh2* mRNA during ovarian maturation were also investigated. In the brain, the mRNA expression of *gnrh2* peaked at stage III, declined sharply at stage IV and reached a minimum at stage V. However, the brain *gnrh2* mRNA levels ascended again at stage VI. The pituitary *gnrh2* mRNA levels declined gradually, except for a temporary increase at stage V. These data indicate that brain GnRH2 appears to be involved in ovarian maturation in the half-smooth tongue sole, and this study extends our knowledge of the roles of GnRH2 on the regulation of reproduction in fish.

**Key words** *Cynoglossus semilaevis*; GnRH2; Gene cloning and expression; Ovarian maturation

① Corresponding author: LIU Xuezhou, Email: liuxz@ysfri.ac.cn