

黄颡鱼促卵泡激素受体基因的克隆 及其在雌鱼生殖周期中的表达

刘 森¹, 温海深^{1,2,3*}, 何 峰¹, 李吉方¹

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心,

农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 内蒙古民族大学动物科学技术学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 为研究黄颡鱼促卵泡激素受体(FSHR)基因的克隆以及该基因在卵巢发育周期中的表达情况,实验首先采用 SmartTM Race 技术,获得了黄颡鱼促卵泡激素受体基因 cDNA 全长序列,该基因全长 2 340 bp,编码 661 aa,具有 G 蛋白偶联受体超家族(G protein-coupled receptor, GPCR)的 7 个跨膜螺旋区(transmembrane domain)。经分析发现,得到的 FSHR 基因序列具有 9 个富含亮氨酸的重复性序列(LRRs);5 个潜在的 N-端糖基化位点;蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)磷酸化位点(⁴⁰³Y)位于第一个包外环,C-末端(C-terminal domain)G 蛋白偶联区域,存在 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(⁶³⁴S, ⁶⁴³S, ⁶³²T)。这些区域可能与 FSHR 的功能有密切关系。RT-PCR 发现,FSHR 基因在卵巢和脑中大量表达,在其他组织中均存在少量或微量的表达;在繁殖周期中,卵巢 FSHR 基因表达从 III 期~IV 期处于较高水平,在 VI 期时下降。研究推测,卵巢中 FSHR 基因参与黄颡鱼卵母细胞成熟及卵黄蛋白的积累过程。

关键词: 黄颡鱼;促卵泡激素受体;基因克隆;半定量 mRNA 表达

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

促性腺激素释放激素(GnRH)、促性腺激素(GtH)和性腺类固醇激素是分别存在于下丘脑、垂体、性腺轴中的关键激素,参与脊椎动物的生殖调控。与所有的脊椎动物相同,鱼类(不同产卵类型)配子的形成主要依赖于下丘脑-垂体-性腺轴的调控^[1]。在调控过程中,垂体合成和分泌的 2 种促性腺激素:促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体激素(luteinizing hormone, LH),均属于糖蛋白激素,它们包含一个共同的 α -亚单位和激素特异性的 β -亚单位(FSH β 和 LH β),促进卵巢的发育和分化,调节配子的形成和性腺内分泌功能^[2]。促性腺激素对性腺组织的作用是通过促性腺激素受体(GtHRs)参与调控的^[3],其中,促卵泡激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)属于

G 蛋白偶联受体超家族(G protein-coupled receptor, GPCR)介导促卵泡激素(FSH)参与体内重要生理的功能^[4]。迄今为止,已经在斑马鱼(*Danio rerio*),斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*),大马哈鱼(*Oncorhynchus rhodurus*),庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*),半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)等多种硬骨鱼中克隆了 FSHR 基因^[5-9],并进行了组织表达的研究,发现 FSHR 基因在谢尔托利氏细胞和卵巢的颗粒细胞中表达^[10],直接参与生殖细胞的生长和发育,这与 FSH 在卵子形成中的描述相一致^[7]。

已有研究表明,在激素调控中 FSH 和 LH 的表达和分泌对配子发育和卵巢成熟具有重要作用^[5]。已知在雌鱼卵巢发育周期中,FSHR 基因表达与卵泡的不同发育阶段相关^[11]。最早关于

收稿日期:2011-12-21 修回日期:2012-06-13

资助项目:农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室重点课题(BZ200709)

通讯作者:温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

FSHR 基因表达的研究出现在斑点叉尾鲴性腺繁殖周期表达模式的相关报告中,*FSHR* 基因参与了斑点叉尾鲴繁殖周期的调控^[6];然而,近几年关于 *FSHR* 基因研究多关注于精子发生过程的调控和性腺分化期的作用^[12-13],对于 *FSHR* 基因在雌雄个体差异较大种类鱼的研究甚少。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 是我国重要的淡水养殖品种,雌雄个体差距大,是我国单性育种研究的理想对象。本实验以人工养殖的雌性黄颡鱼为研究对象,应用同源克隆和 RACE 技术,得到 *FSHR* 基因的全长 cDNA 序列,并用 RT-PCR 研究 *FSHR* 基因在不同组织和整个繁殖周期的表达模式。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

黄颡鱼采集于山东某养殖场,每月定期采集雌性黄颡鱼 20 尾,连续一年。实验用鱼在水族箱内暂养 2~3 d,流水充氧 (≥ 4 mg/L),人工调节光照 (12L:12D),自然水温。解剖时迅速取出卵巢、肝脏、胃、肠、鳃、心、脾、肾、头肾和脑等组织,一部分 Bouin 氏液固定,用于组织切片,其余放在液氮中速冻用于克隆及 mRNA 表达实验的样品,然后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

1.2 卵巢组织学分期

将固定在 Bouin 氏液中的卵巢组织经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。使用 LEICA-RM 2 016 型切片机切片,厚度为 5 μ m, H. E 染色,中性树脂封片,Nikon E 200 型显微镜下观察及显微摄影。根据 H. E 染色结果,将所得卵巢组织样本分为 5 期(图 1)。

1.3 试剂及引物

SmartTM Race cDNA Amplification kit 试剂盒购自 Clontech 公司,普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体购自北京天根生化科技有限公司,大肠杆菌 DH5 α 和基因克隆用 HiFi *Taq* 酶购自北京全式金生物技术有限公司,RNA 提取试剂 RNAiso Reagent 和基因表达所用 *Taq* 酶试剂盒购自 TaKaRa 公司,反转录 M-MLV 购自 Promega 公司。其他试剂均为国产分析纯。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1),其中 *FSHR* 简并引物(FSHRF/R1,FSHRF/R2)应用 CodeHop 法设计^[14]。5'-RACE (FSHR-5) 和 3'-RACE (FSHR-3-1/3-2) 引物及表达引物 (FSHRF/R) 利用 Primer premier 5.0 软件设计。

1.4 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 -80 °C 保存的肠、鳃、心、脾、肾、头肾、卵巢、肝、胃、脑组织各 100 mg,用 RNAiso Reagent

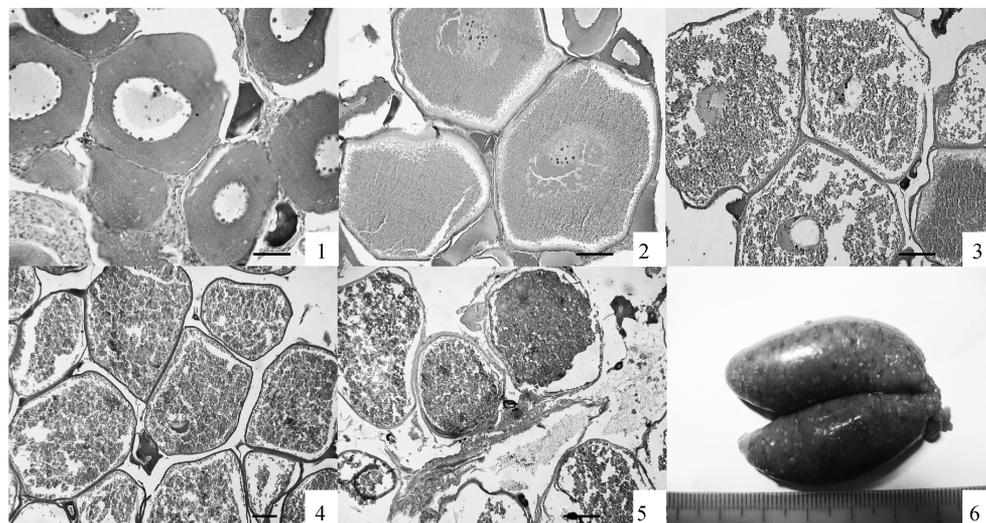


图 1 黄颡鱼卵巢组织学切片

1. II期(含有初期卵母细胞)比例尺 = 70 μ m; 2. III期(含有初级卵黄的卵母细胞)比例尺 = 70 μ m; 3. IV期(含有次级卵黄的卵母细胞)比例尺 = 70 μ m; 4. V期(含有成熟卵黄的卵母细胞)比例尺 = 100 μ m; 5. VI期(退化的 I 卵巢)比例尺 = 70 μ m; 6. 卵巢外观图。

Fig. 1 Histological photomicrographs of the ovary of yellow catfish

1. stage II (consisting of perinucleolus stage oocyte) bar = 24 μ m; 2. stage III (consisting of primary yolk stage oocyte) bar = 70 μ m; 3. stage IV (consisting of secondary yolk stage oocyte) bar = 70 μ m; 4. stage V (consisting of tertiary yolk stage oocyte) bar = 100 μ m; 5. stage VI (degraded ovary) bar = 70 μ m; 6. morphological structure of ovary.

抽提总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。用 DNaseI 酶去除基因组 DNA,核酸蛋白测定仪 (Biodropsis, BO-1000) 测定 RNA 浓度。各组织 RNA 分别用 M-MLV 逆转录酶以 Oligo(dT)₁₈ 为引物合成 cDNA 第一链。合成的 cDNA 于 -20 ℃ 保存备用。

表 1 黄颡鱼 FSHR 基因全长克隆及半定量 RT-PCR 表达所用引物

Tab.1 Primers used for yellow catfish FSHR gene cloning and mRNA expression analysis

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
FSHRF1	CCTGACCTACCCTCCCAITGYGC
FSHRR1	GGCGAAGAAGGAGATGGNGCCATRCA
FSHRF2	ATCCCCACAAACACCACCTWYGTNGARAT
FSHRR2	AGGAAGGTGAAGCCCATGATRTCYTCRCA
FSHR-5	CATAGGCTTCAATACTCTGGAGG
FSHR-3-1	CTGCTCTAATGCCAGTGATAGGTGT
FSHR-3-2	TGACAGTGCCGATGCCCGTGT
FSHRF	CTCTAATGCCAGTGATAGGTGT
FSHRR	AAGCGACTGGTGAGAAGAAAGA
18SF	CCTGAGAAAACGGCTACCACATCC
18SR	AGCAACTTTAATATACGCTATTGGAG

1.5 FSHR 基因全长克隆

用 RNAiso 提取总 RNA,核酸蛋白测定仪测定总 RNA 浓度,取 1 μg 按照 SmartTM Race cDNA Amplification kit 试剂盒说明书合成第一链 cDNA。合成的 5'-RACE 和 3'-RACE cDNA 第一链使用 HiFi Taq 酶试剂盒并按照使用说明进行 PCR 扩增。扩增后的 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的条带。使用 T₄ 连接酶将回收的 DNA 连接到 pGM-T 载体中,重组子转化至 DH5α 感受态细胞,LB 平板 37 ℃ 过夜培养,蓝白斑挑菌培养,菌体 PCR 检测,阳性克隆送至北京华大公司测序。

1.6 FSHR 基因全长序列分析与进化树构建

应用 DNAMAN 推断氨基酸序列,通过 NCBI 在线数据库进行 BLAST 同源性分析,利用 Clustal X 和 MEGA 4.0 邻接法 (Neighbour-Joining, NJ) 构建系统进化树。预测氨基酸结构的跨膜螺旋结构区域和信号肽使用 <http://www.lrrfinder.com/>。预测蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 位点、N-端糖基化位点 (N-linked glycosylation sites)、Ser, Thr 和 Thy 磷酸化位点分别使用 NetPhosK 1.0、NetNGlyc 1.0 Server、NetPhos 2.0

Server 进行预测。

1.7 FSHR 基因的组织特异性和卵巢在繁殖周期中表达分析

采用半定量 RT-PCR 法,检测 FSHR 基因 mRNA 在雌性黄颡鱼组织中 (Ⅲ期) 及卵巢不同发育时期中的表达情况 (卵巢的发育分期是根据石蜡切片的结果,每一发育阶段挑选 4 个卵巢组织样品)。cDNA 稀释后取 1 μL 作为模板进行 PCR 扩增,以黄颡鱼 18S rRNA 作为反应的内参照物,18S rRNA 所进行的 PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 18 个循环,72 ℃ 10 min 延伸。特异性引物 FSHR-R 和 FSHR-F PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 35 个循环,72 ℃ 10 min。取 5 μL 的 PCR 产物进行电泳,对电泳结果采用 Lane 1D 凝胶图像处理系统进行分析。

1.8 数据分析

所得数据均表示为平均数 ± 标准误 (mean ± SE),采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析并进行 Duncan 多重比较 (当 P < 0.05 时认为差异显著)。

2 结果

2.1 黄颡鱼 FSHR 基因 cDNA 全序列克隆和分析

提取黄颡鱼新鲜卵巢组织 RNA,通过 Touch down PCR 方法,分别用两对简并引物扩增得到特异性条带,长度分别约为 830 和 880 bp (图 2),

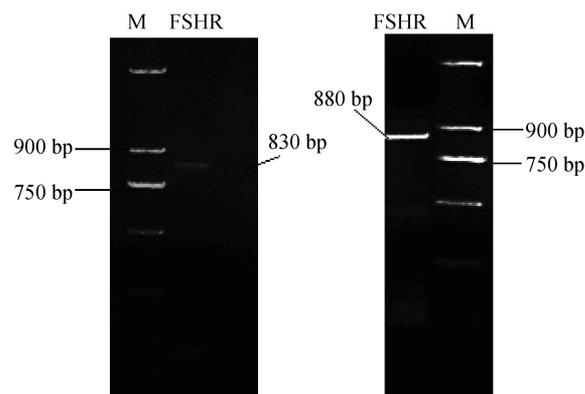


图 2 简并引物 PCR 扩增结果

FSHR: 简并性引物 PCR 扩增结果; M: Marker II。

Fig. 2 Result of PCR amplification used degenerate primers

FSHR: The result of PCR amplification used degenerate primers, M: Marker II.

经测序并拼接获得 1 565 bp *FSHR* 基因片段。根据所得片段序列分别设计 5'-RACE 及 3'-RACE 特异引物,最终得到 *FSHR* 基因全长序列 2 340 bp(序列号为 JF919484)。共编码 661aa,包含 5'

非编码区 177 bp,3'非编码区 177 bp,开放阅读框 1 986 bp(图 3)。由 DNAMAN 推测该全长的氨基酸序列(图 4)得出,此受体具有典型的 G-蛋白偶联受体结构,包括 1 个 N-末端胞外区域

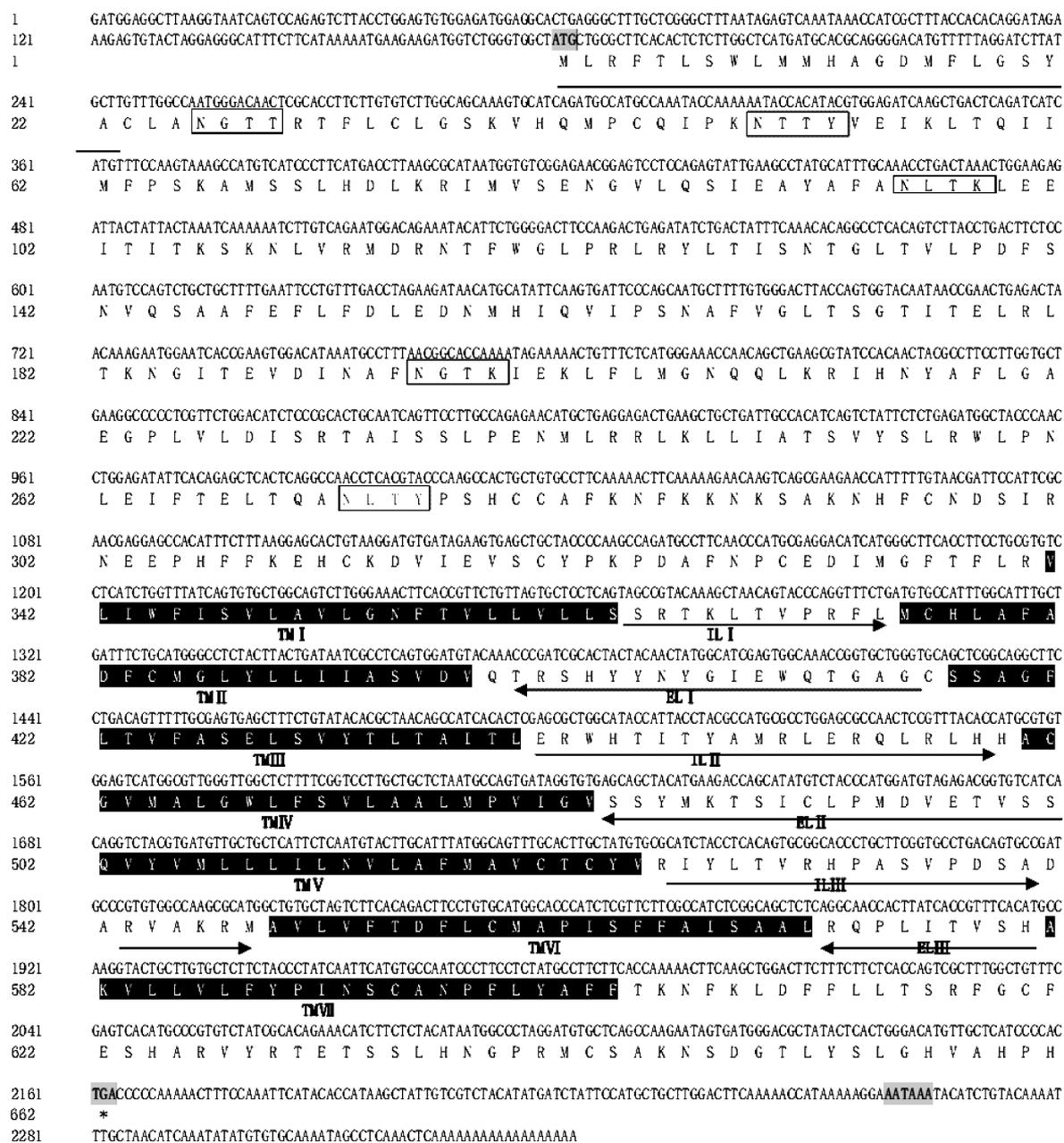


图 3 黄颡鱼 *FSHR* 基因 cDNA 全长序列

起始密码子: ATG, 信号肽: M L R F T, 跨膜螺旋区(TM I -TM VII): 为黑底白字, 胞内环(IL I -IL III): →, 胞外环(EL I -EL III): ←, 潜在的 N-端糖基化位点: N G T T, 终止密码子: TAG, 数字中核苷酸序列从 5' 第一个开始(上行), 氨基酸序列从起始密码子 M 开始(下行)。

Fig. 3 Full sequence of *FSHR* gene cDNA of yellow catfish

initiation codon: ATG, signal protein: M L R F T, transmembrane helices (TM I -TM VII): black backgrounds and white words, intracellular loops (IL I -IL III): →, extracellular loops (EL I -EL III): ←, potential N-linked glycosylation sites: N G T T, termination codon: TAG, Numbers indicate the nucleotide position starting at the 5' of the sequence (top line) and the amino acid positions starting at the initial methionine (M, bottom line).

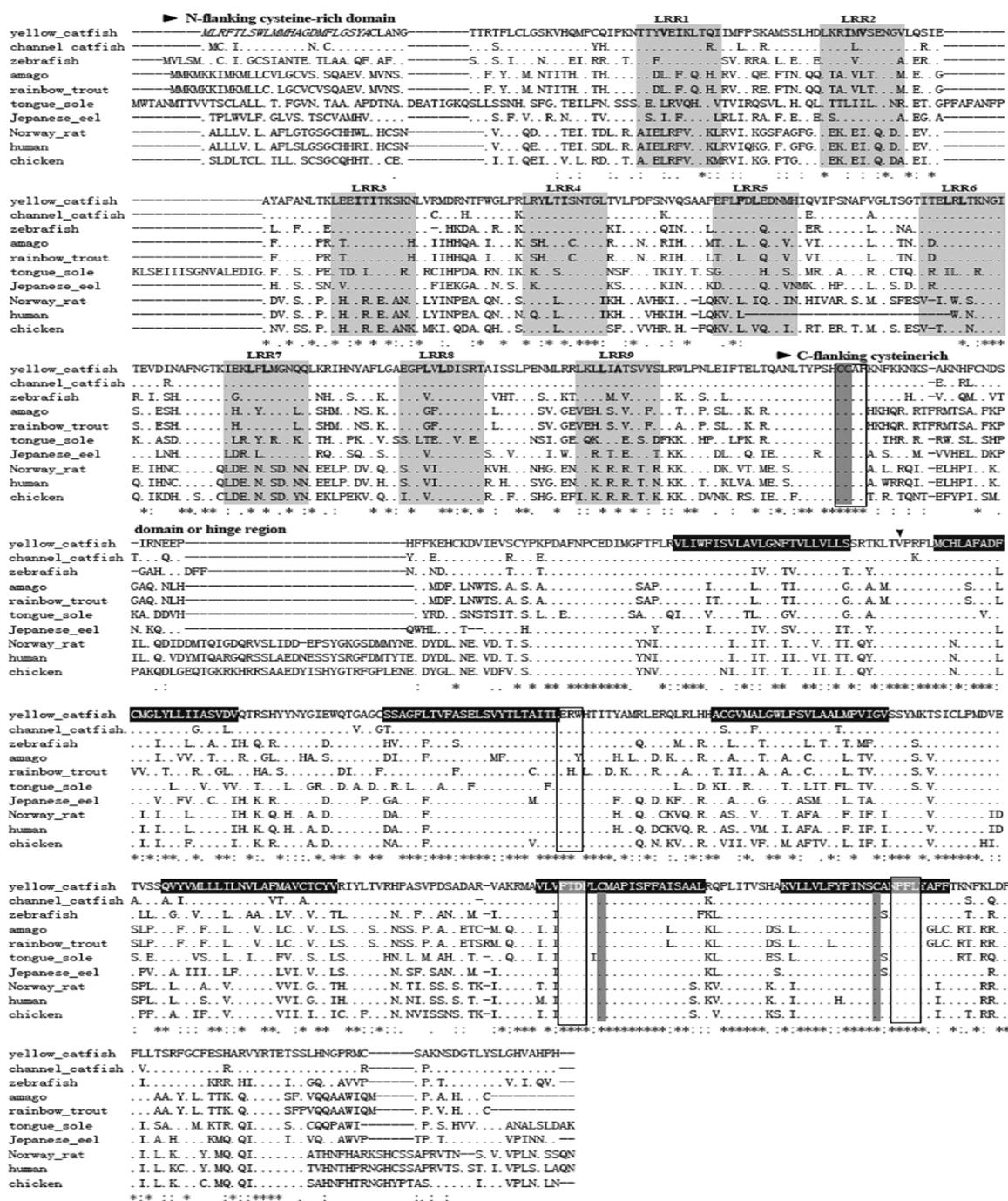


图4 黄颡鱼FSHR与其他物种FSHR氨基酸序列比对

信号肽序列:*MLRFT*;富含亮氨酸的重复性区域:LRR1-9,其中加粗的为脂肪族剩余物;跨膜螺旋区:为黑底白字,富含半胱氨酸残基的高度保守区:灰底黑字, GpHR 家族的特殊保守信号序列: *CCAF*, *ERW*, *FTD*, *NPLY*,潜在的 PKC 磷酸化位点: *TVP*。

Fig. 4 Alignment of yellow catfish FSHR with FSHRs from several other species

signal protein: *MLRFT*; typical motifs of the LRR1-9 are shaded and their aliphatic residues are marked in bold; transmembrane helices (TM I-TM VII); black backgrounds and white words, high conserved domains rich in Cys residues; gray backgrounds and black words, special conserved signal sequence of GpHR family: *CCAF*, *ERW*, *FTD*, *NPLY*; protein kinase C sites: *TVP*.

(extracellular domain, ECD) 340aa 是激素识别和高度结合区,其中包含由在 N-末端由 22aa 组成的信号肽序列;根据软件分析推测,该基因在 N-末端胞外区域含有 5 个 N-端糖基化位点,多个半胱氨酸保守性区域;9 个富含亮氨酸的重复性序列(leucine-rich repeats, LRRs), LRRs 是由 1 个较短的 β 链为基础组成的包括 LxxLxLxxN/CxL 的连续序列(x 可以是任何一个氨基酸, L 是亮氨酸,缬氨酸或其他疏水性氨基酸)^[15],随后是 α -螺旋区。这是一段与其他 G-蛋白偶联受体相似的 7 次跨膜螺旋区(transmembrane helix, TM helix)构成的锚定单元(anchoring unit)共 260 aa,是通过 3 个胞内环(intracellular loop, IL)(IL I-IL III)和 3 个胞外环(EL I-EL III)(extracellular loop, EL)连接具有与激素结合和信号传导作用^[16]。其中,在胞外环 I 和 II 各存在 1 个半胱氨酸残基,推测为二硫键的一部分;蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)磷酸化位点(⁴⁰³Y)位于第 1 个胞外环。最后是一段 58 aa 的胞内 C-末端(C-terminal domain)区域,在这个区域我们利用软件发现了 3 个蛋白激酶 C 位点磷酸化位点(⁶³⁴S, ⁶⁴³S, ⁶³²T)。根据氨基酸对比,发现了 GpHR 家族的特殊信号序列,如²⁸⁰CCAF, ⁴⁴⁰ERW, ⁵⁵³FTD

和⁵⁹⁶NPFL。

2.2 系统进化树分析

利用 Mega 4.0 软件,应用 NJ 法对下列序列进行聚类分析(图 5)。结果显示,所用的硬骨鱼类形成一个分支,而蝶螈、牛、鼠、鸡和人形成一个分支。在硬骨鱼分支中,与黄颡鱼 FSHR 亲缘关系最近的为斑点叉尾鲷 FSHR,其次为斑马鱼 FSHR 和日本鳗鲡 FSHR,都具有很高的自展值。

2.3 FSHR 基因在不同组织中的表达分析

采用半定量 RT-PCR 检测 FSHR 基因在 III 期雌性黄颡鱼不同组织中的表达(图 6)。从图中看出 18S 基因片段在各组织中扩增良好,可以排除 RNA 提取失败的假阴性结果。FSHR 基因在黄颡鱼的心脏、肝脏、脾脏、胃、肾、卵巢、鳃、脑、头肾和肠中均有表达,且在卵巢和脑中的表达量最高。

2.4 FSHR 基因在卵巢生殖周期的表达分析

FSHR 基因在卵巢生殖周期中的 IV 期表达最为丰富($P < 0.05$),然后随着卵巢的发育,FSHR 基因的表达量逐渐降低,在 VI 期达到最低值($P < 0.05$),在退化吸收期后 FSHR 基因表达量出现回升(图 7)。

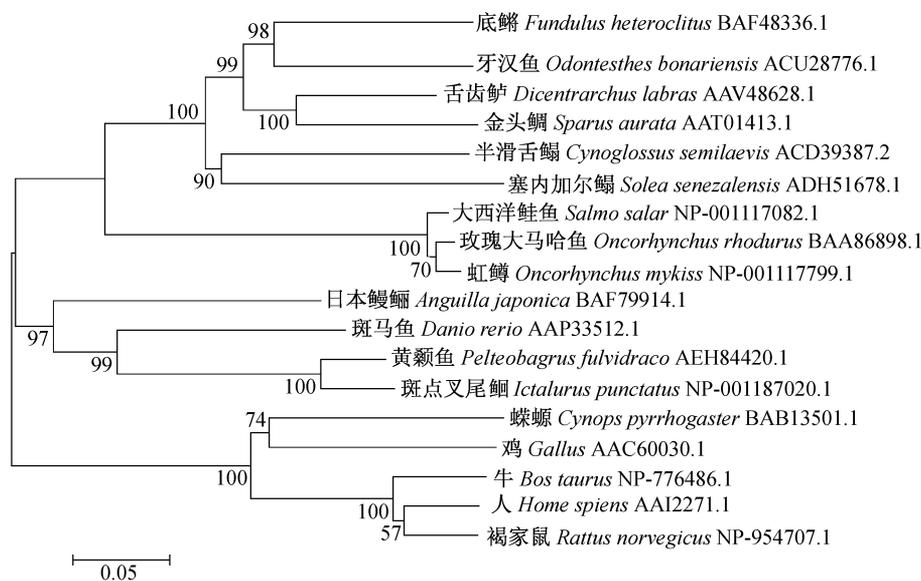


图 5 18 个物种 FSHR 氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree for 18 species' FSHR amino acid sequences

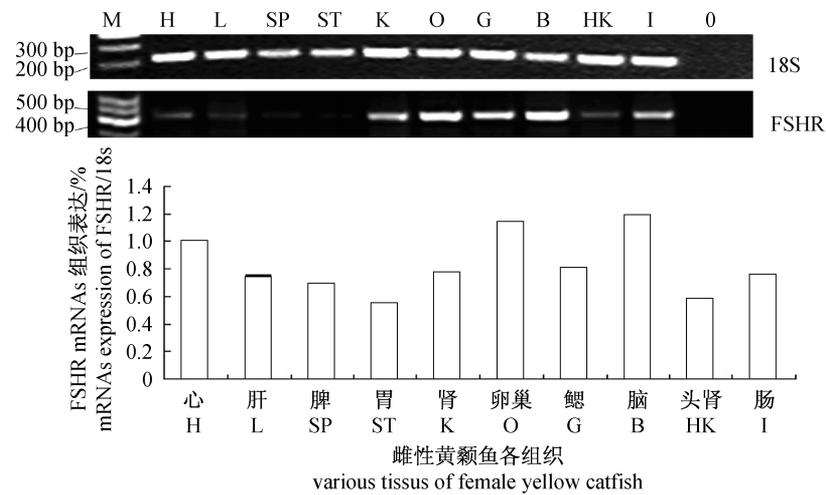


图6 *FSHR* 基因在雌性黄颡鱼各组织中的表达和相对表达量 (*FSHR/18S*)

M. DNA 分子量标准; H. 心脏; L. 肝脏; SP. 脾; ST. 胃; K. 肾; O. 卵巢; G. 鳃; B. 脑; HK. 头肾; I. 肠; 0. 阴性对照(以水为模板)。

Fig. 6 The expression of *FSHR* gene in female yellow catfish (*FSHR/18S*)

M. DNA molecular weight marker; H. heart; L. liver; SP. spleen; ST. stomach; K. kidney; O. ovary; G. gill; B. brain; HK. head kidney; I. intestine; 0. control (using water as template).

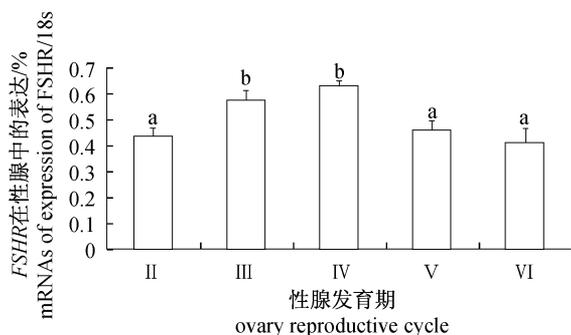


图7 *FSHR* 基因在性腺发育周期雌性黄颡鱼性腺的变化不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 7 mRNA expression of *FSHR* gene in ovary of female yellow catfish during the reproductive cycle in a year

Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

实验克隆得到黄颡鱼 *FSHR* 基因全长序列, 并且研究了 *FSHR* 基因在黄颡鱼各组织的表达分布和卵巢年周期的表达水平。经 Blastn 分析, 得到相似性高的序列均为鱼类 *FSHR* 基因, 其中同源性最高的为斑点叉尾鲷 *FSHR* 基因。

通过对黄颡鱼 *FSHR* 氨基酸序列的分析得出, 该基因具有典型的糖蛋白受体特征: 一个相对较长的 ECD 区域, 其中包括一个将 LRRs 连接到 G 蛋白偶联受体的信号识别蛋白^[13]。将所得到的 *FSHR* 氨基酸序列同其他鱼类序列相对比, 发

现在 N-ECD 区域均含有一个高度保守的功能性结构区域。在黄颡鱼 *FSHR* 氨基酸序列的 ECD 区, 发现了 5 个 N-糖基化位点。Oba 等^[17] 在大马哈鱼 (*Oncorhynchus rhodurus*) *FSHR* 氨基酸序列中首次发现这种 N-糖基化位点, 暗示其确保了脊椎动物糖蛋白激素受体血统的保守性。在跨膜区观察到大量的半胱氨酸残基, 已有报道推测这种现象存在于具有高突变性的跨膜区^[18], 这个区域将对结合高感应信号发挥重要的作用^[19]。在 EL I 和 EL II 各存在一个半胱氨酸残基 C⁴¹⁶ 和 C⁴⁹², 这在促性腺激素受体上是十分保守的, 且在受体的表达中起到重要的作用^[19]。在 *FSHR* 氨基酸序列 ICD 区域存在 3 个蛋白激酶 K 磷酸化位点 (S⁶³⁴, S⁶⁴³, T⁶³²), 推测该基因磷酸化作用参与构成调控受体功能的信号^[13]。

采用半定量 RT-PCR 法研究 *FSHR* 基因 mRNA 在雌性黄颡鱼各组织的空间表达, 结果发现 *FSHR* 基因在卵巢和脑中有较高的表达, 这与半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 和玫瑰大马哈鱼 (*Oncorhynchus rhodurus*) 的结果相似^[7,9], *FSHR* 基因在其他组织中也存在不同程度的表达。这一相似的发现均在斑马鱼^[5], 大西洋鲑^[13], 庸鲽^[8] 等硬骨鱼类的非性腺组织中存在, 而在脑中的高表达可能与 FSH 在下丘脑的分泌有关。但 *FSHR* 基因在非性腺组织中表达的相关生理机制尚未明确, 从以上实验结果推断, 黄颡鱼

FSH 和 *FSHR* 基因可能具有更广泛的性腺外生理功能。

黄颡鱼 *FSHR* 基因的表达水平,在卵黄发生前(Ⅱ期)较低,卵黄发生早期(Ⅲ期)表达量开始上升,在卵黄发生后期(Ⅳ期)达到峰值,随着卵巢进入排卵期(Ⅴ期)和卵巢的退化吸收期(Ⅵ期)表达量显著性下降。在舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)的研究中,*FSHR* 基因在卵母细胞初级生长期处于较低的表达水平,在进入卵黄生成阶段其表达水平显著性上升^[20]。最近关于斑点叉尾鲷和斑马鱼的研究表明,卵巢中 *FSHR* 基因的高表达发生于卵黄生成早期,并且这种上调作用持续整个卵黄发育期^[6-7]。Campbell^[21]发现,银大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*) *FSHR* 基因大量表达发生于卵巢中油滴的出现。在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的研究中发现,*FSHR* 基因表达量的增加与卵巢的发育水平、卵母细胞的成熟和排卵有关^[22]。在对该批鱼雌二醇(E_2)的周年变化的前期研究^[23]中发现, E_2 变化趋势与本研究中 *FSHR* 基因表达趋势相一致, E_2 可诱导肝脏合成卵黄蛋白原,促进卵母细胞中卵黄的积累^[24],且对鱼类 GtHs 的调控和释放有正反馈作用^[25],而 GtHs 则是通过与受体结合来促进卵巢发育^[2]。综上所述,本实验推测黄颡鱼 *FSHR* 基因的表达水平伴随着卵巢中卵黄蛋白的产生而上升,说明 *FSHR* 基因表达与卵黄蛋白积累密切相关。

本研究克隆得到黄颡鱼 *FSHR* 基因 cDNA 全长序列,通过 RT-PCR 研究 *FSHR* 基因组织特异性表达和性腺周期中的变化趋势,发现 *FSHR* 基因存在的一系列特异性区域,推测这些区域参与受体功能信号的传导,同时,实验发现 *FSHR* 基因在各组织中均存在表达,其中性腺和脑中的表达量最高;卵巢繁殖周期中,*FSHR* 基因参与卵黄蛋白的积累和卵母细胞的成熟,这为揭示 *FSHR* 基因生理功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Weltzien F A, Andersson E, Andersen Ø, et al. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes) [J]. Comparative Biochemistry Physiology-Part A: Molecular Integrative Physiology, 2004, 137 (3): 447 - 477.

- [2] Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamasgita M, et al. Regulation of oocyte growth and maturation in fish [J]. Current Topical in Development Biology, 1995, 30:103 - 145.
- [3] Alam M A, Kobayashi Y, Hirai T, et al. Isolation, characterization and expression analyses of FSH receptor in protogynous grouper [J]. Comparative Biochemistry Physiology-Part A: Molecular Integrative Physiology, 2010, 156(3):364 - 371.
- [4] Motle W R, Campbell R K, Myers R V, et al. Co-evolution of ligand-receptor pairs [J]. Nature, 1994, 368(6468):251 - 255.
- [5] Kwork H F, So W K, Wang Y J, et al. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors-evidence for their distinct functions in follicle development [J]. Biology of Reproduction, 2011, 72 (6): 1370 - 1381.
- [6] Kumar R S, Iijiri S, Trant J M. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor [J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(3):710 - 717.
- [7] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, et al. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communicatious, 1999, 263(2):584 - 590.
- [8] Kobayashi T, Andersen Ø. The gonadotropin receptors FSH-R and LH-R of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), 1. Isolation of multiple transcripts encoding full-length and truncated variants of FSH-R [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 156(3):584 - 594.
- [9] 陈晓燕,温海深,何峰,等.半滑舌鲷促滤泡激素受体基因克隆及其在雌鱼生殖周期中的表达 [J]. 水产学报, 2010, 34(9):1309 - 1318.
- [10] Rocha A, Gómez A, Zanuy S, et al. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity [J]. Molecular Cellular Endocrinology, 2007, 272(1-2):63 - 76.
- [11] Bobe J, Maugars G, Nguyen T, et al. Rainbow trout follicular maturational competence acquisition is associated with an increased expression of follicle

- stimulating hormone receptor and insulin-like growth factor 2 messenger RNAs [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2003, 66 (1): 46 - 53.
- [12] Ohta T, Miyake H, Miura C, *et al.* Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel *Anguilla japonica* [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(6) : 970 - 977.
- [13] Mauqars G, Schmitz M. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 149 (1): 108 - 117.
- [14] 陈彩芳,温海深,何峰,等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 CYP17 基因 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39(6) : 1213 - 1218.
- [15] Kajava A V, Kobe B. Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information [J]. *Protein Science*, 2002, 11(5) : 1082 - 1090.
- [16] Vassart G, Pardo L, Costagliola S. A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29 (3): 119 - 126.
- [17] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, *et al.* Cloning, functional characterization, and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) [J]. *Biochemical Biophysical Research Communicatious*, 2000, 276 (1): 258 - 263.
- [18] Moyle W R, Xing Y, Lin W, *et al.* Model of glycoprotein hormone receptor ligand binding and signaling [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43) : 44442 - 44459.
- [19] Zhang R, Buczko E, Dufau M L. Requirement of cysteine residues in exons 1 - 6 of the extracellular domain of the luteinizing hormone receptor for gonadotropin binding [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(10) : 5755 - 5760.
- [20] Rocha A, Zanuy S, Carrillo M, *et al.* Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 162 (3): 265 - 275.
- [21] Campbell B, Dickey J, Beckman B, *et al.* Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 75(1) : 34 - 44.
- [22] Bobe J, Nguyen T, Jalabert B. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(1) : 73 - 82.
- [23] Liu M, Wen H S, He F, *et al.* Expression patterns of cytochrome P450 aromatase genes during ovary development and their responses to temperature stress in female yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Jounary of Ocean Universty of China*, 2011, 10 (4): 409 - 417.
- [24] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 146 - 240, 188 - 191.
- [25] Trudeau V L, Peter R E, Sloley B D. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish [J]. *Biology of Reproduction*, 1991, 44(6) : 951 - 960.

Molecular cloning of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and expression analysis during the reproductive cycle in female yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

LIU Miao¹, WEN Hai-shen^{1,2,3*}, HE Feng¹, LI Ji-fang¹

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Nationality University, Tongliao 028000, China)

Abstract: Follicle-stimulating hormone (FSH) controls gonadal function in mammalian and many non-mammalian vertebrates through the interaction with their receptors (FSHR). Molecular cloning of the yellow catfish FSH receptor is reported together with changes in the gene expression throughout a reproductive cycle. This work describes the molecular cloning of the cDNA encoding the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by means of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), degenerate primers PCR amplification and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) analyses. We cloned the complete cDNA sequence of *FSHR* gene and the length is 2 340 bp, encoding a protein of 661 amino acids. This gene belongs to G protein-coupled receptor (GPCR) family, which contains the seven conserved transmembrane helix (TM helix) domains. We found that the amino acids sequence contains nine Leucine-rich repeats (LRRs), five potential N-linked glycosylation sites and that only one protein kinase C phosphorylation site is ⁴⁰³Y in EL I (extracellular loop, EL I) and three protein kinase C phosphorylation sites are ⁶³⁴S, ⁶⁴³S, ⁶³²T in C-terminal domain. The areas played the important role in the function of *FSHR* gene. The tissue distribution pattern showed high expression of *FSHR* gene in ovary and brain, and trace amount was detected weakly in other tissues. We also analyzed the mRNA expression level of *FSHR* gene in ovary at different stages of reproductive cycle. Result showed that the transcript level of *FSHR* gene was high from III to IV phases then followed by a substantial decline. These changes in expression profiles may imply differences in the functionality of the enzyme gene between different stages, suggesting an important role of *FSHR* gene in yellow catfish development. We inferred that the gene of *FSHR* in ovary might also be involved in the processes which regulate ovulation maturation and ovulation, and preferentially promote vitellogenin accumulation. The result has provided an important theoretical basis for the function of *FSHR* gene and the breeding of yellow catfish.

Key words: *Pelteobagrus fulvidraco*; follicle-stimulating hormone receptor (FSHR); gene clone; RT-PCR mRNA expression

Corresponding author: WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn