

条石鲷促性腺激素 β (FSH, LH) 亚基 cDNA 克隆及表达特性分析

陈圣毅^{1,2}, 柳学周^{1*}, 史宝¹, 徐永江¹,
李晓晓^{1,2}, 王珊珊¹, 臧坤^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 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, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用同源性克隆和 cDNA 末端快速扩增(RACE)方法克隆了条石鲷 *GtH β* cDNA 序列, 并分析了 *GtH β* mRNA 在条石鲷组织中的表达差异和在卵巢发育不同时期的垂体、卵巢、脑中表达水平变化。结果发现, 条石鲷 *FSH* cDNA 全长 554 bp, ORF 长 363 bp, 编码了 120 个氨基酸, 前 18 个氨基酸为信号肽。条石鲷 *LH* cDNA 全长 857 bp, ORF 长 450 bp, 编码了 149 个氨基酸, 前 24 个氨基酸为信号肽。*FSH* 和 *LH* 包含了 12 个保守的半胱氨酸残基(Cys)和一个 N-糖基化位点, 在 *LH* 的第 4 和第 5 个 Cys 之间存在着硬骨鱼类特异性的 Cys-Ser-Gly-His (CSGH) 区域。同源性比较和进化分析显示, 条石鲷 *FSH* 和 *LH* 与鲈形目鱼类的进化关系较近。采用实时荧光定量 PCR 法检测发现, *FSH* mRNA 和 *LH* mRNA 在垂体中的表达量最高, 其次是性腺; *FSH* mRNA 在头肾和肾脏中不表达, *LH* mRNA 在头肾中不表达。周期表达分析显示, 垂体中的 *FSH* mRNA 在卵巢发育的 IV 期达到最大值, *LH* mRNA 在 V 期达到最大值; 卵巢中的 *FSH* mRNA 在 V 期达到最低值, 而 *LH* mRNA 在 V 期达到最大值; 脑中的 *FSH* 和 *LH* mRNA 在 V 期达到最低值。激素分析显示, 血清中 *FSH* 在卵巢发育的 IV 期达到最大值, 而 *LH* 在 V 期达到最大值, 血清中 *FSH* 和 *LH* 水平与垂体中 *FSH* mRNA 和 *LH* mRNA 表达趋势一致。

关键词: 条石鲷; 促性腺激素 β 亚基; cDNA 克隆; 表达; 卵巢发育周期

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱼类的生殖活动主要受到下丘脑-脑垂体-性腺轴(BPG轴)的调控, 其中促性腺激素(gonadotropin hormone, GtH)起着重要的调控作用。卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和黄体生成素(luteinizing hormone, LH)是由脑垂体前叶合成和分泌的糖蛋白激素, 对鱼类性腺的发育、性类固醇激素和多肽类激素的分泌、生殖活动的进行起着非常重要的作用; 其 α 亚基与促甲状腺激素(thyroid-stimulating

hormone, TSH)和绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin, CG)的 α 亚基相同, 但是 β 亚基具有表达和调控的特异性^[1]。已有研究表明, FSH 在鱼类性腺发育的早期(主要是配子发生和卵黄产生阶段)起主要作用, 它通过刺激性腺产生雌二醇和睾酮等性类固醇激素来调节早期卵子、精子的发生和卵黄生成^[2-3], 而 LH 主要在性腺成熟期发挥主导作用, LH 主要刺激性腺分泌促成熟激素(MIH)来促使精子和卵细胞的最

收稿日期:2014-05-11 修回日期:2014-07-10

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A413); 国家鲆鲽类产业技术体系专项(CARS-50); 国家自然科学基金(31201982); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2013SW042)

通信作者:柳学周, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

后成熟并刺激排卵和排精^[2-3]。目前已经对鲤 (*Cyprinus carpio*)^[4]、大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*)^[5]、鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*)^[6]、真鲷 (*Chrysophrys major*)^[7]、条纹狼鲈 (*Morone saxatilis*)^[8]、西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*)^[9]、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[10]、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)^[11]、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*)^[12]等30多种鱼类的GtH β 亚基进行了研究,为认识其生殖调控机制和突破调控产卵技术提供了理论和技术支撑。

条石鲷 (*Oplegnathidae fasciatus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、石鲷科 (Oplegnathidae)、石鲷属 (*Oplegnathus*)^[13], 主要分布在太平洋沿岸, 包括中国的黄海、东海、台湾沿海, 朝鲜半岛的南部, 日本北海道以南和夏威夷的西北部太平洋沿岸^[14]。条石鲷不仅肉质细嫩、口感独特、体色艳丽, 具有很高的营养价值和观赏价值, 还适合网箱、池塘、陆基工厂化养殖等养殖模式, 有望发展为中国人工鱼礁增殖放流和大型深水网箱养殖的新品种。近年来, 中国开展了条石鲷繁殖生物学和人工繁育技术研究, 突破了自然产卵调控和苗种培育关键技术, 促进了条石鲷养殖业的发展^[15-16], 但关于条石鲷生殖调控的机制研究鲜有报道。本实验克隆了 *FSH* 和 *LH* 的全长, 并分析了该基因在不同组织和卵巢发育不同时期的表达情况, 同时测定了血清中 GtH 在卵巢发育不同时期的含量变化, 旨在为其生殖内分泌机制研究提供基础资料, 为建立条石鲷稳定的生殖调控技术提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

条石鲷于2012年4月至2012年12月取自青岛忠海水产有限公司, 共取人工培育的3龄以上性成熟的条石鲷雌鱼 (全长27.23~31.11 cm, 体质量478.2~671.7 kg) 16尾。条石鲷培育水温15~26℃, 盐度28~32, pH 8.0~8.2, 溶解氧6 mg/L以上, 日换水率300%~500%。实验鱼活体打包充氧运回实验室后, 以MS222 (200 mg/L) 麻醉后解剖, 先抽血, 然后取其脑、垂体、卵巢、心脏、胃、幽门盲囊、肠、脾脏、肾脏等组织并快速投入液氮中, 后转入-80℃冰箱保存, 用于总RNA的提取。用Davidson固定液固定部分卵巢组织, 24 h后转入70%的酒精保存, 用于组织学观察,

确定卵巢发育时期。血液于4℃以10 000 r/min离心5 min, 取上清, 于-20℃保存, 用于血清中促性腺激素的测定。

1.2 RNA提取

利用RNAiso Plus (TaKaRa) 从垂体、脑、卵巢等13个组织中提取总RNA。利用超微量紫外检测仪 (Nanodrop 2000D) 检测总RNA的纯度和浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量。

1.3 条石鲷 *GtH β* cDNA 保守片段的克隆

根据GenBank数据库中已有的其他鲈形目鱼类的 *FSH* 和 *LH* 全长序列设计了特异性引物 (表1)。以垂体中总的RNA为模板, 根据PrimeScript[®] RT-PCR Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa) 中的操作说明合成cDNA。然后分别用 *FSH* 和 *LH* 特异性引物扩增其保守序列, PCR条件: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, T_m℃ 30 s, 72℃ 50 s 共30个循环 (T_m^{FSH} = 59.8℃, T_m^{LH} = 58.5℃), 最后72℃延伸10 min。PCR产物经1%的琼脂糖电泳检测、切胶回收、纯化后连接到pEASY-T1载体 (北京全式金生物技术有限公司) 上并转移至Trans1-T1感受态细胞 (北京全式金生物技术有限公司) 中, 37℃条件下振荡培养12~14 h, 筛选阳性克隆菌株送至华大基因公司测序。将测序结果在NCBI上分析比对。

1.4 条石鲷 *GtH β* 基因 5'-RACE 和 3'-RACE

根据得到的保守序列分别设计了 *FSH* 和 *LH* 的RACE引物 (表1), 以垂体中总的RNA为模板, 根据Clontech SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa) 中的操作说明分别合成5'-cDNA和3'-cDNA。然后分别以5'-cDNA和3'-cDNA为模板, 以FSH-outGSP5、FSH-outGSP3、LH-GSP5和LH-GSP3为引物, 根据Smart RACE Advantage 2 PCR试剂盒 (Clontech) 中的操作说明进行PCR扩增, PCR条件: 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 15个循环, T_m每个循环降低0.5℃, 72℃延伸2 min; 然后94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 60 s, 28个循环。

将第一次PCR产物稀释40倍后作为模板, 分别以FSH-NGSP5、LH-NGSP5和LH-NGSP3为引物进行巢式PCR, PCR条件同第一次PCR。用1%的琼脂糖电泳检测PCR产物, 然后切胶回收、连接转化、筛选阳性克隆并测序。

表 1 实验中所用的主要引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') primer nucleotide sequence	用途 usage
FSH-F	5'-AGCAGAGGATGMAGCTGG T-3'	中间片段扩增引物
FSH-R	5'-TGGCCACAGGGTAGGTSAC-3'	中间片段扩增引物
LH-F	5'-CAGGCCAGCAGAGTGATGTTCC-3'	中间片段扩增引物
LH-R	5'-GGCTGCAGGCTCTCGAAGGTAC-3'	中间片段扩增引物
FSH-outGSP5	5'-GGGTAGGTGACGCCACTGGACATCCTT-3'	5'-RACE 引物
FSH-NGSP5	5'-TTT CACCTCATAGGATCAGTCCCCGTTA-3'	5'-RACE 引物
FSH-outGSP3	5'-GCCGCACCGAGTTCATCTACACCACCAT-3'	3'-RACE 引物
LH-GSP5	5'-AAGGAGGGCTGTTCCAAGTGTC-3'	5'-RACE 引物
LH-NGSP5	5'-TTCCTGACTGTCTCTGGCGT-3'	5'-RACE 引物
LH-GSP3	5'-GATGACAGGGTCTTGGTGATGC-3'	3'-RACE 引物
LH-NGSP3	5'-TAGAGACACCGTTTGGTTGATGAGC-3'	3'-RACE 引物
Q-FSH-F1	5'-CGCACCGAGTTCATCTACAC-3'	荧光定量引物
Q-FSH-R1	5'-GACCAGTCCCCGTTACAGA-3'	荧光定量引物
Q-LH-F1	5'-AGACACCGTTTGGTTGATGAG-3'	荧光定量引物
Q-LH-R1	5'-GCTCCCTCTTGATGTTGAGTTT-3'	荧光定量引物
Q- β -actin-F	5'-TCATCACCATCGGCAATGAGAGGT-3'	内参引物
Q- β -actin-R	5'-TGATGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT-3'	内参引物

1.5 序列分析

测序结果在 NCBI 数据库中利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源性比对。利用 DNASTar 软件进行序列拼接、预测蛋白质分子量和等电点;利用 ExPASy 中的 Translate Tool 进行氨基酸序列翻译;利用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>) 进行信号肽预测;利用 Clustal X 进行氨基酸同源性比较;利用 MEGA 5.0 中的 Neighbor-Joining 法(自展值为 1 000)进行分子进化分析;利用 SOPMA (<http://npsa-devel.ibcp.fr/NPSA/npsa-sopma.html>) 进行蛋白质二级结构预测;利用 I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) 进行蛋白质三级结构预测。

1.6 条石鲷 *GtH β* 基因的组织表达与周期表达

采用实时荧光定量 PCR 法(Mastercycler[®] ep realplex 实时荧光定量 PCR 仪)检测 *FSH* 和

LH mRNA 在条石鲷不同组织中的相对表达量和在卵巢发育不同时期脑、垂体、卵巢组织中的表达水平变化。根据序列分析得到的全长设计了特异性引物 Q-FSH F1/R1 和 Q-LH F1/R1,以各组织 RNA 为模板,根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明合成 cDNA。然后以各组织 cDNA 为模板,分别以 Q-FSH F1/R1 和 Q-LH F1/R1 作为定量引物,以 Q- β -actin F 和 Q- β -actin R 作为内参引物(表 1),用 SYBR Green II 荧光染料(TaKaRa)进行荧光定量检测,用比较阈值法测定不同组织的相对表达量和卵巢发育不同时期脑、垂体、卵巢组织中的表达水平变化。每种组织取 3 尾鱼,每尾鱼设定 3 个平行。

以各组织 RNA 为模板,根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明合成 cDNA。Real-time

PCR 程序:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,58.5 ℃ 28 s,共40个循环(二者退火温度一样),反应结束后进行熔解曲线分析。根据 C_t 值计算引物的扩增效率和分析熔解曲线,以确定引物和扩增参数达到进行荧光定量检测组织相对表达量的要求($0.8 < E < 1.2, R^2 > 0.98$)。根据各组织的 C_t 值,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出不同组织中 *FSH* mRNA 和 *LH* mRNA 与内参基因 β -actin 的相对表达丰度。结果表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$,利用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),设定差异显著水平为 0.05,当 $P < 0.05$ 时即差异显著,当 $P < 0.01$ 时即差异极显著。

1.7 血清中促性腺激素在条石鲷卵巢发育不同时期含量的测定

采用 ^{125}I 放射免疫测定方法(RIA)对条石鲷卵巢发育不同时期血清中 *FSH*、*LH* 的含量进行测定。根据放射免疫测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)中的操作说明先制作标准曲线,待标准曲线制作好后(相关系数 $R > 0.9999$)再上样,每次上样时都选择双管平行上样,每个样品重复3次。结果表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$,采用 SPSS 16.0 统计进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 多重比较分析,当 $P < 0.05$ 时即差异显著。

2 结果与分析

2.1 条石鲷卵巢各发育时期的特征

对各样本组的条石鲷卵巢进行组织切片观察,确定其性腺发育时期。在4月份,卵母细胞体积增大,卵细胞多为圆形,细胞核嗜碱性,核仁多靠近核膜分布。初期近细胞膜细胞质内出现数量不等的液泡,其数目和大小随着卵母细胞的生长而增加,并逐渐向核中央靠近。以Ⅲ时相卵母细胞为主的卵巢称为Ⅲ期卵巢(图1-a);5月份,卵母细胞随着营养物质的不断积累,细胞体积继续增大,胞质中储存着大量卵黄颗粒和油球。卵母细胞外有两层滤泡细胞,随着发育的进行,以Ⅳ时相卵母细胞为主的卵巢称为Ⅳ期卵巢(图1-b);6月份,卵母细胞呈圆球形,卵黄颗粒大量积累和融合,此时的核仁已经消失,卵母细胞已经脱离滤泡膜进入卵巢腔,以Ⅴ时相卵母细胞为主的卵巢称为Ⅴ期卵巢(图1-c);8月份,由于亲鱼刚刚产完卵,卵巢萎缩,呈皱缩厚囊状。卵母细胞呈圆球

形,卵黄颗粒已经相互融合,核膜消失,此时为Ⅵ期卵巢(图1-d)。

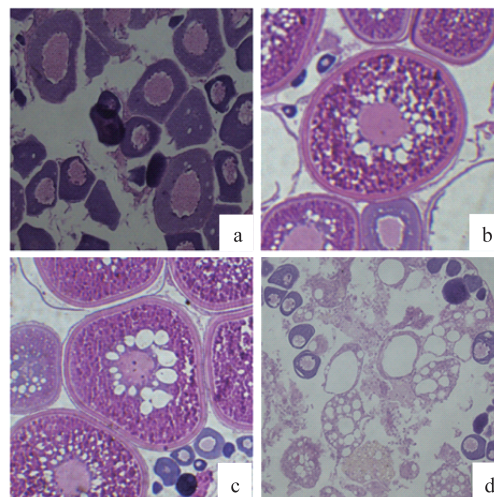


图1 条石鲷卵巢发育不同时期的组织切片

(a) Ⅲ期卵巢; (b) Ⅳ期卵巢; (c) Ⅴ期卵巢; (d) Ⅵ期卵巢

Fig. 1 The stained sections for each of ovarian development stage of *O. fasciatus*

(a) ovary of phase III $\times 40$; (b) ovary of phase IV $\times 200$; (c) ovary of phase V $\times 200$; (d) ovary of phase VI $\times 200$

2.2 条石鲷 *FSH* 和 *LH* 的序列分析和蛋白质结构预测

条石鲷 *FSH* cDNA 全长为 554 bp,其中开放阅读框为 363 bp,编码了 120 个氨基酸。第 1~18 个氨基酸为信号肽。成熟肽部分包含了 12 个保守的 Cys 残基(图 2-a)。此外,在 *FSH* 氨基酸序列中发现了一个 N-糖基化位点(NIS),在 3'端非编码区内含有一个加尾信号 AAATAA(图 2-a)。*LH* cDNA 全长 857 bp,其中开放阅读框为 450 bp,编码 149 个氨基酸,第 1~24 个氨基酸为信号肽,成熟肽序列包含了 12 个保守的 Cys(图 2-b),在第 65 个 Cys 残基位点和第 69 个 Cys 残基位点之间存在着硬骨鱼类特异性的 Cys-Ser-Gly-His(CSGH)区域(图 2-b)。此外,在 *LH* 氨基酸序列中发现了一个 N-糖基化位点(NQT),在 3'端非编码区内含有一个加尾信号 AAATAA(图 2-b)。

通过 SOPMA 软件对条石鲷 *FSH* 和 *LH* 氨基酸序列进行了二级结构预测,在 *FSH* 蛋白质的二级结构中, α -螺旋占 13.33%, β -转角

占 8.33%, 无规则卷曲占 60%, 延伸链占 18.33% (图 3-a)。在 LH 蛋白质二级结构中, α -螺旋占 14.09%, β -转角占 4.03%, 无规则卷曲占 32.21%, 延伸链占 49.66% (图 3-b)。通过 I-TASSER 软件预测 FSH 和 LH 蛋白质的三级结构

(图 4), 在其蛋白质结构中存在着多个蛋白结合位点。FSH 预测的蛋白分子量为 12.96 ku, 等电点为 6.05, LH 预测的蛋白分子量为 16.56 ku, 等电点为 5.52。

```

-122                C ATG GGG ACA GAA GCT GTT ACA GAA GAC TTG
-61 CAA CTG ACG TTC AAA GCA ACA ACA GAG CAA TAC AGG CGT CTG TGC TGC ACC CAG CAG AGG
1  ATG CAG CTG GTT GTC ATG GCA GCA GTG CTG GCG CTG GCG GGG GCG GGG CAG GGC TGC AGC
  M Q L V V M A A V L A L A G A G Q G C S
61 TTC GGC TGT CAT CCA ACC AAC ATC AGC ATC CCC GTG GAG AGC TGT GGC CGC ACC GAG TTC
  F G C H P T N I S I P V E S C G R T E F
121 ATC TAC ACC ACC ATA TGC GCA GGG CAG TGT TAC CAC GAG GAT CCG GTC TAC ATC GGC CAT
  I Y T T I C A G Q C Y H E D P V Y I G H
181 GAT GAC TGG GCC AAA CAG AAG ATC TGT AAC GGG GAC TGG TCC TAT GAG GTG AAA CAC ATT
  D D W A K Q K I C N G D W S Y E V K H I
241 AAA GGA TGT CCA GTG GGC GTC ACC TAC CCT GTG GCC AGA AAC TGC GAG TGC ACC GCA TGT
  K G C P V G V T Y P V A R N C E C T A C
301 AAC GAA GGA AAC ACG TAC TGC GGG CGC TTT CCT GGA AAC ATA CCC AGC TGT CTG TCC TTT
  N E G N T Y C G R F P G N I P S C L S F
361 TAA AGA AAC CTG TCG TCT ATC CTA CAT TTA CTT ATT ATC TTT GTG TCA CTT GAC TTG GTA
  *
481 CTG AAA TAA ACA GGT ATC ACA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

(a)

```

-271                CCA CAA CTT ACT TTA TTA GCT TCT TAA ATC
-241 AGC AGT GCA TGA CAC TTC CTT TAT TTA CAC ATG AAA GCA TAA ACA AGT ATG TTT GCA TTC
-181 TGT GTG ACA TAT TCA GAT TAA GAT TAA GAT TCG TTT AIT TAT ACC AAA CAC ATG CAC AGA
-121 CAT GCA CAT CAC AGT CAT GCA ATG GTA GGC AAA TTT ATC CTC TGC ATT TAA CCC ATC TGG
-61 TGC AGA CGC CAC AGA GCT GCT GAG CCC GAT CAT CGA CAC AAA CAC TTG ATC TCC TGC AGG
1  ATG TTG GCC GAG CAG AGC AGC GTG AGA GTG AAG CTC CCT CTG ACC TTG AGT TTG TTT CTG
  M L A E Q S S V R V K L P L T L S L F L
61 GGA GCC TCA TCT ICC ATT TGG CCC CTG GCT CCT GCA GCG GCC TTC CAG CTG CCG CCC TGC
  G A S S S I W P L A P A A A F Q L P P C
121 CAG CTC ATC AAC CAA ACG GTG TCT CTA GAA AAG GAG GGC TGT TCC AAG TGT CAC CCA GTG
  Q L I N Q T V S L E K E G C S K C H P V
181 GAA ACA ACC ATC TGC AGT GGT CAC TGC ATC ACC AAG GAC CCT GTC ATC AAG ATA CCA TTC
  E T T I C S G H C I T K D P V I K I P F
241 AGC AAT GTT TAT CAG CAT GTG TGC ACG TAC CGG GAC TTT TAC TAC AAG ACG TTT GAG CTT
  S N V Y Q H V C T Y R D F Y Y K T F E L
301 CCT GAC TGT CCT CCT GGC GTG GAC CCG ACC GTC ACC TAC CCC GTG GCT TTG AGC TGC CAC
  P D C P P G V D P T V T Y P V A L S C H
361 TGC GGC CGC TGT GCC ATG GAC ACG TCT GAC TGC ACC TTC GAG AGC CTG CAG CCC AAC TTC
  C G R C A M D T S D C T F E S L Q P N F
421 TGC ATG AAT GAC ATA CCT TTC TAC TAC TAG TCT CAA GTA ATA GCA GAA TAA AGC ACA TTA
  C M N D I P F Y Y *
481 AAA CAC ACT ATA CAT ATA GAA ACT GTG CTA ACT TTT AGC ATC AAC TGT TGT AAA TAA AGA
541 TTG TTA CAT TTG CAG CGC AAA AGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA

```

(b)

图 2 条石鲷 *GtH β* cDNA 全长以及推断的氨基酸

(a) FSH 全长以及推断的氨基酸; (b) LH 全长以及推断的氨基酸

阴影部分表示起始密码子; 方框部分表示终止密码子; 下划线部分表示加尾信号; 椭圆部分表示 12 个半胱氨酸

Fig. 2 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of *GtH β* subunit from *O. fasciatus*

(a) The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of FSH; (b) The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of LH

The initiation codon (ATG) is shadow part; the stop codon is box section part; polyadenylation signal is underlined part. The twelve conservative cysteines are shown in ellipse part

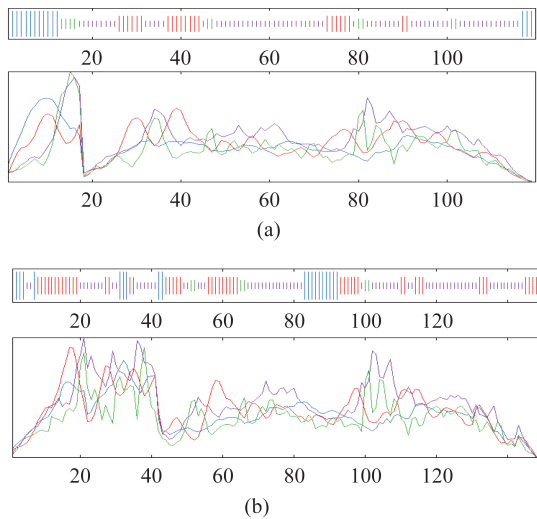


图3 SOPMA 软件对 GtH β 蛋白质二级结构的分析结果

(a) FSH 蛋白质二级结构; (b) LH 蛋白质二级结构
蓝色表示 α -螺旋; 绿色表示 β -转角; 紫色表示无规则卷曲; 红色表示延伸链

Fig.3 Secondary structure of *O. fasciatus* GtH β protein analyzed by SOPMA

(a) secondary structure of FSH; (b) secondary structure of LH
Blue: α -helix; Green: β -turn; Purple: random coil; Red: extended strand

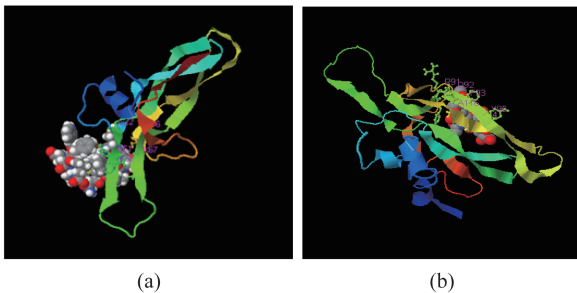


图4 I-TASSER 软件对 GtH β 蛋白质三级结构的分析结果

(a) FSH 蛋白质三级结构; (b) LH 蛋白质三级结构

Fig.4 Tertiary structure of *O. fasciatus* GtH β protein analyzed by I-TASSER

(a) tertiary structure of FSH; (b) tertiary structure of LH

2.3 条石鲷 FSH 和 LH 氨基酸的同源性比较和进化分析

通过 Blast 和 Clustal X 对条石鲷的 GtH β 氨基酸序列与其他物种的 GtH β 氨基酸序列进行同源性比较,发现条石鲷的 FSH 氨基酸序列与鲈形目的真鲷 (*Pagrus major*)、条纹鲈 (*Morone saxatilis*)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、蓝曼龙 (*Trichogaster trichopterus*)、斑鳢 (*Channa maculata*)、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、蓝鳍金枪鱼

(*Thunnus thynnus*) 同源性分别为 78%、83%、83%、88%、80%、85%、77%、84%;与其他脊椎动物 FSH 氨基酸序列的同源性为 38%~79% (图 5-a)。LH 氨基酸序列与鲈形目中斜带石斑鱼、斑鳢、莫桑比克罗非鱼、蓝鳍金枪鱼、狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、真鲷的同源性分别为 98%、90%、92%、94%、97%、90%;与其他脊椎动物的 LH 氨基酸序列同源性为 48%~84% (图 5-b)。

通过 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建了条石鲷与其他脊椎动物 FSH 和 LH 氨基酸的系统进化树,置信度检验 1 000 次。结果发现,条石鲷 FSH 和 LH 都与硬骨鱼类构成一个大分支,与鲈形目鱼类的亲缘关系较近,FSH 与斑鳢聚为一个小分支(图 6-a),而 LH 与斜带石斑鱼和鲈聚为一个小分支(图 6-b)。

2.4 条石鲷 FSH mRNA 和 LH mRNA 的组织表达分布

采用 Real time PCR 法检测了雌性条石鲷 FSH mRNA 和 LH mRNA 的组织表达分布,FSH mRNA 和 LH mRNA 在垂体和卵巢中的表达量较高,FSH mRNA 在脑、脾脏、鳃、心、幽门盲囊、胃、肠、肌肉、肝脏微量表达,在头肾和肾脏中不表达,而 LH mRNA 在鳃、心脏、脾脏、肾脏、肝脏、脑、胃、肠、肌肉、幽门盲囊微量表达,在头肾中不表达;二者在垂体中的表达量最高。统计分析表明,FSH mRNA 和 LH mRNA 在垂体中的表达量与其他组织差异极显著 ($P < 0.01$)。FSH mRNA 在卵巢的表达量相对于脑、脾脏、鳃、心脏、肝脏、胃、肠、肌肉、幽门盲囊差异极显著 ($P < 0.01$),在脑和胃中的表达量相对于脾脏、鳃、心脏、肝脏、肠、肌肉、幽门盲囊差异显著 ($P < 0.05$),而在鳃、幽门盲囊、心、肠、肝脏、和肌肉之间的表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 7-a)。而 LH mRNA 在性腺和脑中的表达量相对于脾脏、鳃、心、胃、肠、肌肉、肾脏、幽门盲囊差异显著 ($P < 0.05$),而在鳃、肾脏和肌肉之间的表达差异不显著 ($P > 0.05$) (图 7-b)。

2.5 条石鲷 FSH mRNA 和 LH mRNA 在卵巢发育不同时期的表达分布

采用 Real time PCR 法检测了 FSH mRNA 和 LH mRNA 在卵巢发育不同时期垂体、卵巢、脑的表达分布,与脑和性腺相比,垂体中的 FSH mRNA 和 LH mRNA 在卵巢发育各个时期都有较高的表达水平。由 SPSS 16.0 软件显著性检验分析得出,FSH mRNA 和 LH mRNA 在各繁殖周期垂体、脑、

卵巢组织的表达水平差异显著($P < 0.05$)。

在垂体中,FSH mRNA 在 III-IV 期的相对表达量逐渐上升,到 IV 期时达到最高,在 V-VI 期时显著下降(图 8-a-1);在卵巢中,FSH mRNA 在 III-V 期的相对表达量急剧下降,到 V 期时达到最小值,在 VI 期又开始慢慢回升(图 8-a-1);在垂体和卵巢

组织中,LH mRNA 在 III-V 期的相对表达量逐渐上升,到 V 期时达到最高水平,到 VI 期时显著下降(图 8-b-1)。而在脑中,FSH mRNA 和 LH mRNA 在 III-V 期的相对表达量逐渐下降,到 V 期时达最低水平,并明显低于其他发育期,之后在 VI 期时又开始上升(图 8-a-2 和图 8-b-2)。

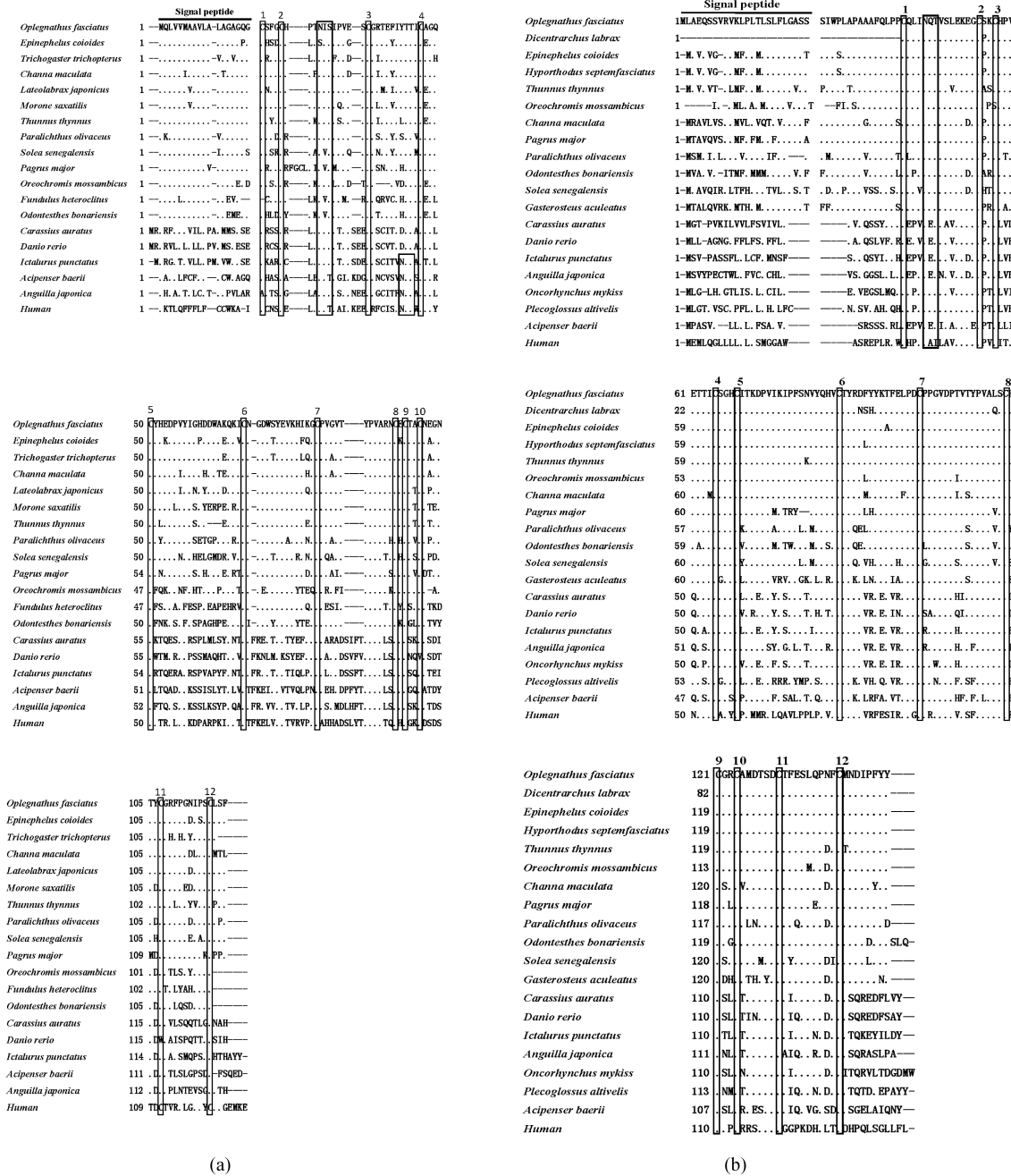


图 5 条石鲷 GtH β 氨基酸序列与其他物种 GtH β 氨基酸序列的比较

(a) FSH 氨基酸序列与其他物种 FSH 氨基酸序列的比较; (b) LH 氨基酸序列与其他物种 LH 氨基酸序列的比较
细框部分代表半胱氨酸残基位点;粗框部分代表 N-糖基化位点

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of GtH β from *O. fasciatus* within crucian carp with other species

(a) amino acid sequence alignment of FSH within *O. fasciatus* with other fishes; (b) amino acid sequence alignment of LH within *O. fasciatus* with other fishes

The conserved cysteine residues with thin frame section. The N-glycosylation sites residues with bold frame

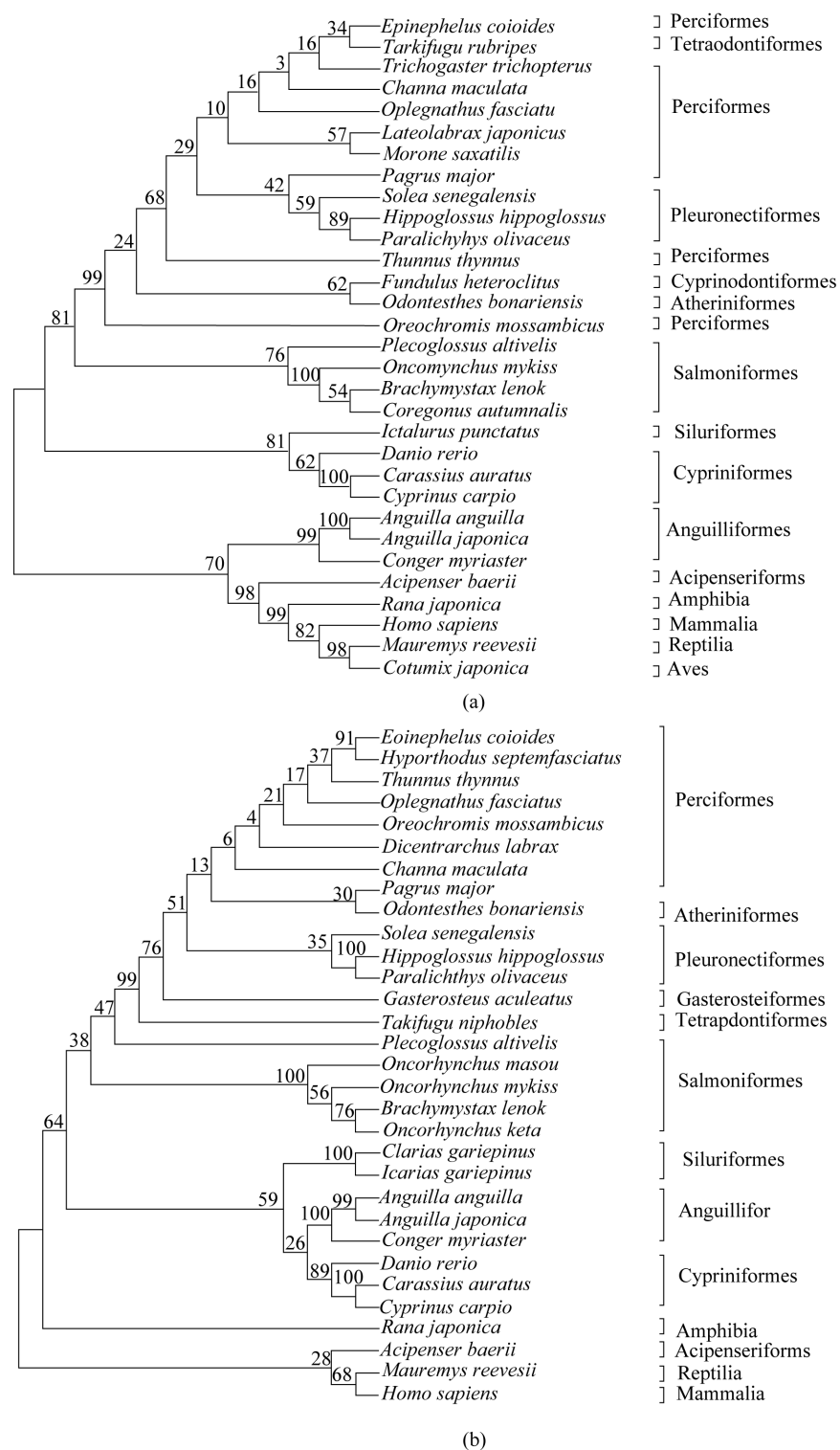


图6 条石鲷 GtH β 氨基酸序列与其他脊椎动物 GtH β 的系统进化树

(a) FSH 氨基酸序列的系统进化分析; (b) LH 氨基酸序列的系统进化分析
 线长表示遗传距离; 条石鲷 GtH β 用直线标出

Fig. 6 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of GtH β showing the relationship between the *O. fasciatus* and other known vertebrates

(a) Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of FSH; (b) Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of LH
 The length on the phylogenetic tree indicates the genetic distance. The straight line marks the *O. fasciatus* GtH β

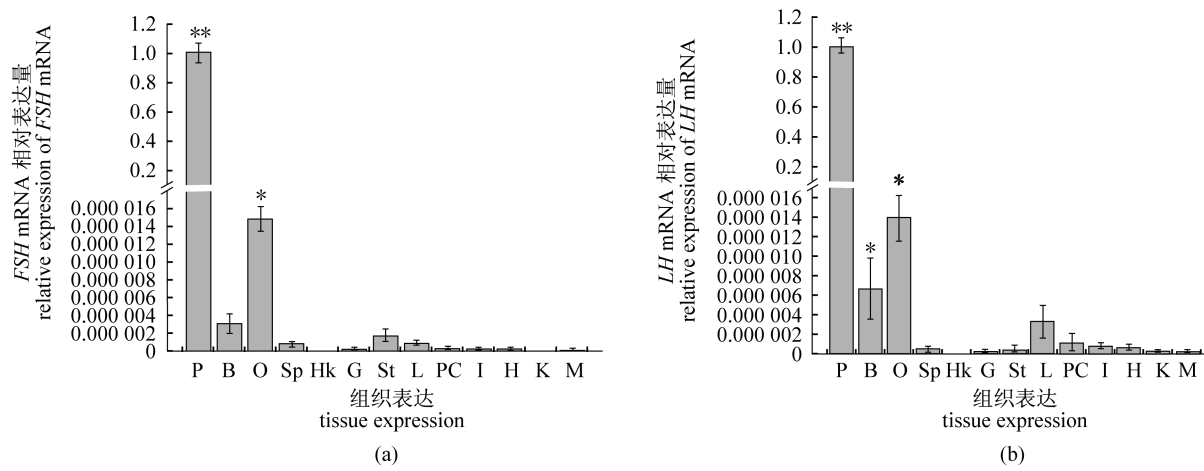


图 7 条石鲷 *GtH β* mRNA 在不同组织中的相对表达水平

(a) *FSH* mRNA 的组织表达; (b) *LH* mRNA 的组织表达

P. 垂体; B. 脑; O. 卵巢; L. 肝脏; H. 心脏; K. 肾; Sp. 脾; Hk. 头肾; St. 胃; I. 肠; M. 肌肉; G. 鳃; PC. 幽门盲囊

Fig. 7 The relative expression level of *GtH β* mRNA in various tissues of *O. fasciatus*

(a) the tissue expression of *FSH* mRNA; (b) the tissue expression of *LH* mRNA

P. pituitary; B. brain; O. ovary; L. liver; H. heart; K. kidney; Sp. spleen; Hk. head kidney; St. stomach; I. intestine; M. muscle; G. gill; PC. pyloric caecum

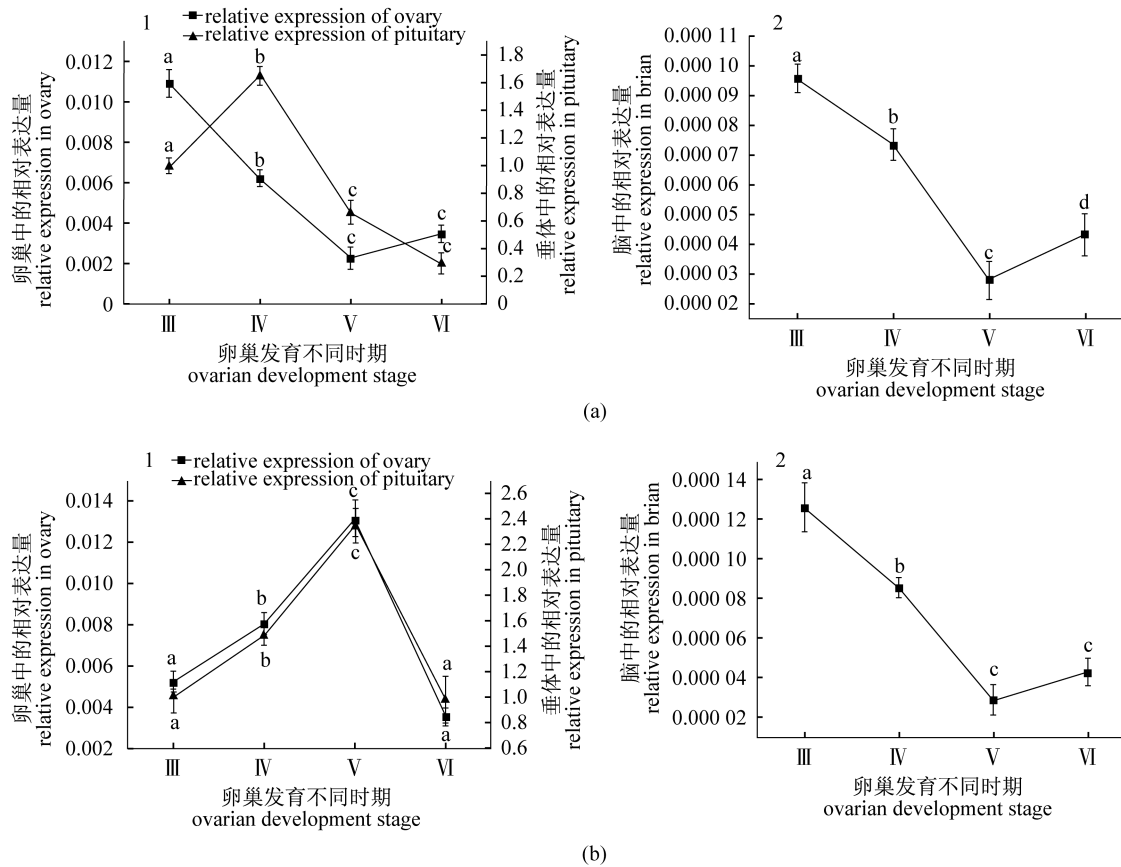


图 8 *GtH β* mRNA 在条石鲷卵巢不同发育时期的相对表达量

(a) *FSH* mRNA 的周期表达; (b) *LH* mRNA 的周期表达

III. III 期卵巢; IV. IV 期卵巢; V. V 期卵巢; VI. VI 期卵巢

Fig. 8 The relative expression of *GtH β* mRNA in ovarian development stage of *O. fasciatus*

(a) the relative expression of *FSH* mRNA in ovary development stage; (b) the relative expression of *LH* mRNA in ovary development stage

III. ovary of phase III; IV. ovary of phase IV; V. ovary of phase; VI. ovarian of phase VI

2.6 血清中 FSH 和 LH 在条石鲷卵巢发育不同时期的含量变化

在制作标准曲线过程中,选择曲线拟合方式为四参数方程。当相关系数 R 接近于 1 时,曲线理想。FSH 和 LH 激素测定标准曲线分别如图 9-a 和图 9-b,相关系数分别为 0.994 和 0.998 9,标准曲线较好。

血清中 FSH 在 III ~ IV 期之间显著上升,在 IV 期时达到最大值,为 5.78 mIU/mL,之后在 V ~ VI 期开始急剧下降,在 VI 期达到最小值,为 2.25 mIU/mL。血清中 LH 在 III ~ V 期之间显著上升,在 V 期

时达到最大值,为 6.44 mIU/mL,然后在 VI 期开始急剧下降,达到最小值,为 2.75 mIU/mL。由 SPSS 16.0 软件分析表明,FSH 在 III、IV、VI 期之间差异显著 ($P < 0.05$);而在 III 期和 V 期之间差异不显著 ($P > 0.05$),LH 在卵巢发育的各个时期差异显著 ($P < 0.05$) (图 10)。当血清中 FSH 和 LH 分别在 IV 期、V 期达到最大值时,垂体中 FSH mRNA 和 LH mRNA 也分别在 IV 期、V 期达到最大值,这在一定程度上说明血清中 FSH 和 LH 激素与垂体中分泌的 FSH mRNA 和 LH mRNA 密切相关。

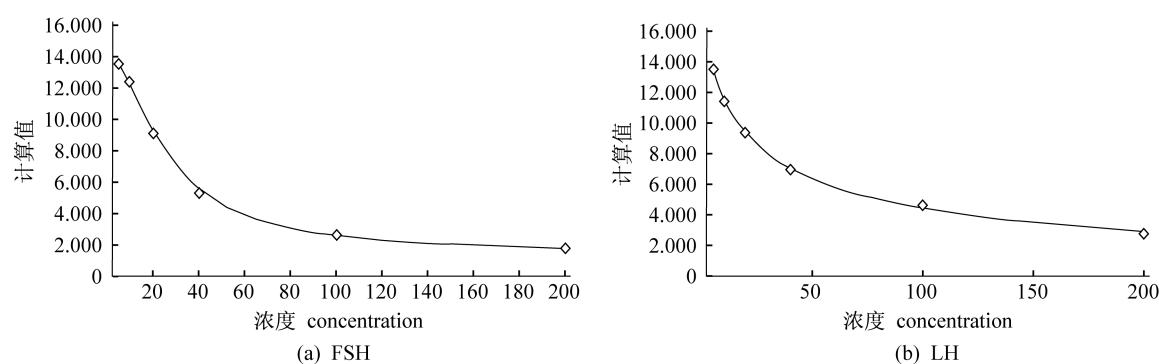


图 9 血清中 FSH 和 LH 的标准曲线

Fig. 9 The determination standard curve of plasma FSH and LH

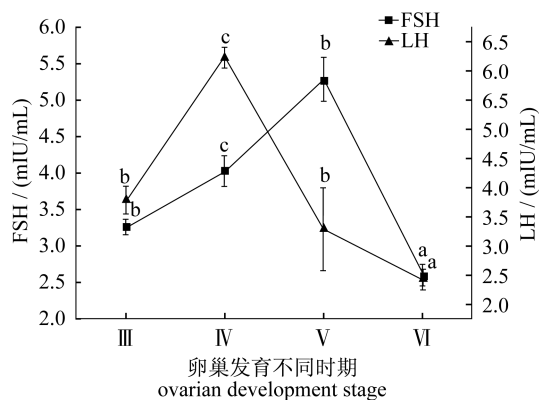


图 10 促性腺激素在条石鲷卵巢不同发育时期的含量变化

III. III 期卵巢; IV. IV 期卵巢; V. V 期卵巢; VI. VI 期卵巢
字母不同代表存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 10 The content levels of gonadotropins in ovarian development stages of *O. fasciatus*

III. ovary of phase III; IV. ovary of phase IV; V. ovary of phase V; VI. ovary of phase VI

The different letters mean the significant difference ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 FSH 和 LH 序列分析

本研究利用 RT-PCR 和 RACE 法从条石鲷垂

体中扩增出了全长 554 bp 的 FSH cDNA 序列和全长 857 bp 的 LH cDNA 序列。序列分析发现,在 FSH 和 LH 的成熟肽序列中都含有一个 N-糖基化位点和 12 个保守的 Cys,在 3' 端非编码区内都含有一个加尾信号 AAATAA,此外,在 LH 中还存在着硬骨鱼类特异性的 Cys-Ser-Gly-His (CSGH) 区域,这些结构表明 FSH 和 LH 在进化中具有高度保守性。同源性比较表明,条石鲷 FSH 和 LH 与斜带石斑鱼同源性最高,与其他脊椎动物的同源性较低。系统进化分析表明,条石鲷 FSH 与蓝曼龙和斑鳢聚为一个小分支,而 LH 与斜带石斑鱼和鲈聚为一个小分支,二者都与硬骨鱼类构成一个大分支,说明了在长期进化中它们具有较近的亲缘关系。已有的突变研究表明,N-糖基化位点和 Cys 残基是 FSH 和 LH 异二聚体形成、蛋白折叠、特异性受体结合等功能所必需的^[17]。硬骨鱼类 FSH 和 LH 结构中 N-糖基化位点和 Cys 残基的变化会影响到其与受体结合的能力以及异源二聚体的稳定性^[18]。在条石鲷的 FSH 和 LH 结构中只有一个 N-糖基化位点,而有些鱼类的 FSH 和 LH 存在着两个 N-糖基化位点,这可能是由种的特异性所决定的。

3.2 FSH mRNA 和 LH mRNA 组织表达分析

采用 qRT-PCR 方法检测了各组织中 FSH mRNA 和 LH mRNA 的相对表达量。结果表明: FSH mRNA 和 LH mRNA 主要表达的部位是垂体,其次是卵巢,表明垂体是 FSH 和 LH 的主要分泌和发挥作用的靶器官。此外还发现, FSH mRNA 和 LH mRNA 在脑、脾、鳃、心、肠、肌肉、幽门盲囊、肝、胃组织中微量表达。So 等^[19]发现斑马鱼(*Danio rerio*)的 FSH mRNA 在除垂体以外的多种组织中都有表达,如性腺,脑,肾脏和肝脏,尽管其表达量都显著低于垂体,陈德林^[20]在研究斜带石斑鱼时利用 Southern blot 法检测杂交信号时发现, FSH mRNA 在垂体中表达最丰富,在性腺中有较高的表达量,在脑中微量表达,而 LH mRNA 在垂体中表达量最高,在脑和性腺中也有较高的表达量,在肝脏、心、肾、脾中也检测出了微弱的信号,表明 LH mRNA 在这些组织中表达量较低。研究还发现, FSH 和 LH mRNA 在金头鲷(*Sparus aurata*)的卵巢中也有表达^[21]。这些结果表明,鱼类的内分泌调节系统可能具有更为复杂的作用模式。

3.3 FSH mRNA 和 LH mRNA 周期表达分析

垂体中的 FSH mRNA 在 IV 期达到最大值,之后逐渐降低,在 VI 期达到最低水平,表明 FSH 的主要作用是促进卵黄的形成和积累以及调控配子的产生和发育。LH mRNA 在 V 期达到最大值,在 VI 期急剧降低,其可能原因是卵母细胞的最后成熟以及产卵等过程的顺利进行需要大量 LH 参与。Mittelholzer 等^[22]对大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)的研究发现, FSH mRNA 在卵巢生长及卵黄生成阶段表达量非常高,揭示了 FSH 对卵母细胞的生长发育和卵黄的生成起到重要作用。Kim 等^[23]在研究许氏平鲷(*Sebastes schlegeli*)时发现,卵巢中 LH mRNA 在卵黄形成阶段迅速增加,在排卵时期达到最高水平,产卵后其表达水平急剧下降,表明 LH 的分泌主要是为了卵黄的成熟和卵母细胞的最终成熟。对于 FSH 和 LH 在条石鲷生殖周期垂体中的这种表达特性的具体作用机制需要进一步研究。

本实验还发现,卵巢中的 FSH mRNA 在 III-V 期的相对表达量急剧下降,到 V 期时达到最小值,其可能原因是卵黄的生成和配子发生需要大量的 FSH 参与;在产卵期其含量达到最低值,

产卵后卵巢开始退化,卵巢中除含有很多退化的卵母细胞外,还含有部分处于 II 时相和 IV 时相的卵母细胞,此时 FSH 又开始发挥作用,因此 FSH mRNA 在 VI 期略有回升。而卵巢中的 LH mRNA 表达量的变化趋势与垂体中的相似,这进一步证明了 LH 对卵母细胞的最终成熟以及排卵是不可避免的。Larsen 等^[24]曾对银大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)进行性腺切除实验,发现性腺切除后的银大麻哈鱼垂体中 FSH 和 LH 的表达量明显降低。性腺可能通过自身来合成和分泌 FSH 和 LH,然后作用于其他靶器官和性腺,同时对垂体分泌 FSH 和 LH 产生反馈作用。本研究中 FSH 和 LH 的两种分泌方式可能共同调控条石鲷的生殖活动,以保证卵巢中卵母细胞能够成熟以及排卵、产卵等过程能够顺利进行。

3.4 血清中 FSH 和 LH 的表达分析及与基因表达之间的关系分析

通过对血清中 FSH 和 LH 含量的测定发现,血清中 FSH 在卵巢发育的 VI 期达到最大值,而在 V 期明显下降,说明 FSH 对卵黄生成和积累的作用明显大于对卵母细胞成熟及排卵的作用,表明 FSH 在卵黄生成阶段发挥主导作用。LH 在卵巢发育的 III-VI 期浓度急剧上升,在 V 期达到最大值,表明 LH 主要在卵母细胞的成熟阶段发挥主导作用,这也揭示了 FSH 和 LH 在卵巢发育的不同时期有着不同的生理作用。Santos 等^[25]在研究虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)时也发现在卵黄形成阶段,血清和垂体中的 GtH I 的表达量逐步上升,在即将排卵时,血清和垂体中 GtH II 的浓度急剧增大,达到最大值,表明 GtH I 和 GtH II 在虹鳟卵巢发育的不同时期起着不同的生理功能。

本实验还发现,血清中 FSH、LH 的含量变化趋势与周期表达中 FSH mRNA、LH mRNA 的表达量变化趋势呈正相关,这在一定程度上说明血清中 FSH 和 LH 激素主要在垂体 FSH mRNA 和 LH mRNA 的调控下参与鱼类的生殖调控过程。王珊珊^[12]在研究半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)时也得到了与本实验相似的结果。已有研究表明,在鱼类脑垂体中存在着性激素受体,并且雌、雄性激素都会促进垂体中 FSH mRNA 和 LH mRNA 的表达^[26]。在硬骨鱼类中,BPG 轴分泌的 GtH 和性类固醇激素之间的调节是相当复杂的,也可能涉及到鱼类自身一些其他调控因子

的作用,这需要今后更全面更深入地去研究。

参考文献:

- [1] Pierce J G, Parsons T F. Glycoprotein hormones: structure and function [J]. Annual Review of Biochemistry, 1981, 50(1): 465 - 495.
- [2] Santos E M, Rand-Weaver M, Tyler C R. Follicle-stimulating hormone and its alpha and beta subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassay, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females [J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(1): 288 - 294.
- [3] Weltzien F A, Norberg B, Swanson P. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2003, 131(2): 97 - 105.
- [4] Van Der Kraak G, Suzuki K, Peter R E, et al. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II [J]. General and Comparative Endocrinology, 1992, 85(2): 217 - 219.
- [5] Sekine S, Saito A, Kawauchi H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs [J]. Proceedings of the National Academy of Science USA, 1989, 86(22): 8645 - 8649.
- [6] Liu Y D, Zhou Y, Tao M, et al. Cloning, expression and sequence analysis of two gonadotropin beta subunits cDNA in the bighead fish (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2008, 31(2): 120 - 124. [牛艳东, 周毅, 陶敏, 等. 鳙鱼 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 促性腺激素 β 亚基的克隆、表达与序列分析. 湖南师范大学自然科学学报, 2008, 31(2): 120 - 124.]
- [7] Gen K, Okuzawa K, Senthilkunaran B, et al. Unique expression of gonadotropin-I and-II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation [J]. Biology of Reproduction, 2000, 63(1): 308 - 319.
- [8] Hassin S, Elizur A, Zohar Y, et al. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropin-I and -II subunits [J]. Molecular Endocrinology, 1995, 15(1): 23 - 35.
- [9] Quera B, Sellouk A, Salmin C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone [J]. Biology of Reproduction, 2000, 63: 222 - 228.
- [10] Qun X C, Liu Y, Yang Y H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the two Gonadotropins β -subunit cDNAs of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(3): 377 - 385. [曲宪成, 刘颖, 杨艳红, 等. 团头鲂促性腺激素 β 亚基 cDNA 的克隆和序列分析. 水生生物学报, 2007, 31(3): 377 - 385.]
- [11] Zhou Y. Molecular cloning and expression analysis of gonadotropins and its receptors of *Ctenopharyngodon idellus* [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2009: 23 - 34. [周毅. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 促性腺激素及其受体基因的克隆及表达分析. 长沙: 湖南师范大学, 2009: 23 - 34.]
- [12] Wang S S. Study on physiological function of gonadotropins in reproductive cycle of the female *Cynoglossus semilaevis* Günther [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 48 - 52. [王珊珊. 促性腺激素在雌性半滑舌鳎繁殖周期的生理功能研究. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 48 - 52.]
- [13] Zhu Y D. Fujian Fishes (scroll down) [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 1985: 254 - 255. 朱元鼎. 福建鱼类志 (下卷). 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 254 - 255.
- [14] Wu Y F, Men Q, Kang B. Two additional studies of rare fish morphology and ecology [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(5): 581 - 585. [武云飞, 门强, 康斌. 两种珍稀鱼类的形态学和生态学的补充研究. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(5): 581 - 585.]
- [15] Niu H X, Chang J, Ma S. Advances on the Studies of Biology and Cultural Ecology in Japanese Parrotfish *Oplegnathus fasciatus* [J]. Fisheries Science of Technology Information, 2008, 35(1): 50 - 52. [牛化欣, 常杰, 马胜. 条石鲷的生物学及养殖生态学研究进展. 水产科技情报, 2008, 35(1): 50 - 52.]
- [16] Liu X Z, Xu Y J, Wang Y Y, et al. Characters of development and growth of early life stages of the rock bream *Oplegnathus fasciatus* [J]. Zoological Sinica, 2008, 54(2): 332 - 341. [柳学周, 徐永江, 王妍妍, 等. 条石鲷的早期生长发育特征. 动物学报, 2008, 54(2): 332 - 341.]
- [17] Gharib S D, Wierman M E, Shupnik M A, et al. Molecular biology of the pituitary gonadotropins [J]. Endocrine Reviews, 1990, 11(1): 177 - 99.

- [18] Kim D J, Cho Y C, Sohn Y C. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 141 (1): 282 – 290.
- [19] So W K, Kwok H F, Ge W. Zebrafish gonadotropins and their receptors II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 72(6): 1382 – 1396.
- [20] Chen D L. mRNA expression analysis and protein expression of Gonadotropin I and II from orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2005: 30 – 32. [陈德林. 斜带石斑鱼促性腺激素 I 和 II 的组织表达分布和蛋白表达研究. 广州: 中山大学, 2005: 30 – 32.]
- [21] Wong T, Zohar Y. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the githead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(1): 5210 – 5220.
- [22] Mittelholzer C, Anderson E, Taranger G, et al. Quantification of gonadotropin subunits $GP\alpha$, $FSH\beta$, and $LH\beta$ mRNA expression from Atlantic cod (*Gadus morhua*) throughout a reproductive cycle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2009, 153(1): 288 – 295.
- [23] Kim D J, Cho Y C, Sohn Y C. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 141 (1): 282 – 290.
- [24] Larsen D A, Swanson P. Effects of gonadotropin on plasma gonadotropins I and II in coho-salmon, *Oncorhynchus kisutch* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1997.
- [25] Santos E M, Rand-Weaver M, Tyler C R. Follicle-stimulating hormone and its alpha and beta subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassay, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65(1): 288 – 294.
- [26] Sze-wah L, Wei G. Differential regulation of gonadotropins (FSH and LH) and growth hormone (GH) by neuroendocrine, endocrine, and paracrine factors in the zebrafish-An *in vitro* approach [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 160(2): 183 – 193.

Cloning and expression pattern of gonadotropin hormone β (FSH, LH) subunit in *Oplegnathus fasciatus*

CHEN Shengyi^{1,2}, LIU Xuezhou^{1*}, SHI Bao¹, XU Yongjiang¹,
LI Xiaoxiao^{1,2}, WANG Shanshan¹, ZANG Kun^{1,2}

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

Abstract: Full length cDNA sequences of gonadotropin hormone β subunits were cloned from the pituitary of *Oplegnathus fasciatus* by homology cloning and RACE techniques. The expression of *GtH β* mRNA was analysed in different tissues and different ovarian development stages of pituitary, ovary, and brain. The *FSH* cDNA sequence is 554 bp and its open reading frame is 363 bp, which encoded a precursor protein of 120 amino acids preceded by a signal peptide of 18 amino acids residues. The *LH* cDNA sequence is 857 bp and its open reading frame is 450 bp, which encoded a precursor protein of 149 amino acids preceded by a signal peptide of 24 amino acids residues. Both of the putative peptide of FSH and LH contained 12 cysteine residues and 1 N-glycosylation sites residues. Moreover, there was a special area of Cys-Ser-Gly-His (CSGH) in the middle of 4 and 5 cysteine of LH. Sequences comparison and phylogenetic analysis showed that the *O. fasciatus* FSH and LH had the close relationship with Perciformes. The Real-time Quantitative PCR results suggested that the expression levels of *FSH* and *LH* mRNA were the highest in pituitary, followed by ovary. The *FSH* mRNA was not found in kidney and head kidney and the *LH* mRNA was not found in Head kidney. The *GtH β* expression level in the reproductive cycle showed that the level of pituitary *FSH* mRNA was maximum in the IV ovarian development stage and the *LH* mRNA was maximum in the V ovarian development stage. In ovary, the level of *FSH* mRNA was the lowest in the V ovarian development stage, however, the *LH* mRNA was maximum in the V ovarian development stage. Both of the brain *FSH* and *LH* mRNA were the lowest in the V ovarian development stage. The hormone analysis indicated that the concentration of FSH was maximum in the IV ovarian development stage in serum, but the concentration of LH was maximum in the V ovarian development stage in serum. The content of FSH and LH in serum showed a consistent trend of regular changes with the level of *FSH* mRNA and *LH* mRNA in pituitary. The research is beneficial to the technique of artificial breeding in *O. fasciatus*. and provides a certain reference value to the reproductive regulation of *O. fasciatus*.

Key words: *Oplegnathus fasciatus*; gonadotropin hormone β subunit; molecular cloning; expression; ovarian development cycle

Corresponding author: LIU Xuezhou. E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn