第41卷 第7期　　水　产　学　报　　Vol. 41, No. 7
2017 年 7 月　　JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA　　July，2017

文章编号: 1000-0615(2017)07-0993-13　　DOI: 10.11964/jfc.20160310332

金钱鱼促性腺激素受体基因克隆及其在性腺发育不同时期mRNA表达水平的分析

张　逛，　王　武，　段征宇，　桂　朗，
苏冒亮，　牟幸江，　张俊彬*
(上海海洋大学水产与生命学院，上海　201306)

摘要：为了解金钱鱼促性腺激素受体基因(*GtHRs*)在金钱鱼性腺发育中的作用，采用反转录PCR (Rt-PCR)与cDNA末端快速克隆(RACE)首次克隆了金钱鱼卵泡刺激素受体(FSHR)和促黄体生成素受体(LHR)的cDNA序列全长。FSHR的cDNA全长2538 bp，编码702个氨基酸，LHR的cDNA全长3315 bp，编码722个氨基酸，它们都含有属于糖蛋白激素受体(GHR)家族的典型跨膜螺旋结构区域(TM helix)。同源性分析显示金钱鱼GtHRs与欧洲鲈的相似性最高，且GtHRs在进化中具有一定的保守性。性腺不同时期表达分析表明，在卵巢Ⅰ期时，FSHR高水平表达，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期时在较低水平表达。在精巢中，FSHR的表达水平在Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期逐渐升高并在Ⅲ期达到最高，Ⅳ期开始下降。LHR在金钱鱼卵巢和精巢的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期低水平表达，在Ⅳ期表达水平达到最高。研究表明，FSHR在金钱鱼性腺发育早期扮演重要作用，LHR与卵子和精子的成熟有关。

关键词: 金钱鱼；卵泡刺激素受体；促黄体生成素受体；序列分析；基因表达

中图分类号: Q 785；S 965　　**文献标志码:** A

在脊椎动物中，配子的形成主要由脑—垂体—性腺轴(brain-pituitary-gonad, BPG)调控。垂体分泌的促性腺激素(gonadotropic hormone, GtHs)包括卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)，它们作用于性腺，诱导调控配子形成[1]。FSH和LH功能的实现依赖于和它们的受体结合，启动下游信号传导通路，致使性类固醇生成相关蛋白，诱导性激素合成[2]。这种调控机制也存在于硬骨鱼类中[3]。促性腺激素受体(gonadotropic hormone receptor, GtHRs)包括卵泡刺激素受体(follicle-stimulating hormone receptor, FSHR)和促黄体生成素受体(luteinizing hormone receptor, LHR)，属于G蛋白偶联受体超家族糖蛋白，由胞外区、胞内区及跨膜区3部分构成[4]。二者在鱼类生殖发育周期的配子发生过程中的特定时期发挥着功能。在雌鱼体内，FSHR与卵黄生成有关，而LHR则促进卵母细胞的成熟和排卵[5-6]。真鲷(*Pagrus major*)的FSH mRNA在卵巢发育过程中则始终维持在较低状态，LH mRNA在两性配子发生到排出始终保持较高水平[7]。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内两受体GtHs的转录水平均随卵巢发育逐渐升高，并在卵子成熟阶段达到最高。在雄鱼体内，GtHRs与促进精巢成熟有关，影响精子发生和排出[8]。在繁殖初期的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和大西洋鲑(*Salmo salar*)体内，*FSHR*基因mRNA的表达量变化不显著，随着精子发生而显著升高，在排精时达到最大表达量[9-10]。在斑马鱼(*Danio rerio*)体内，*LHR*基因mRNA也是在排精时达到最大表达量[11]。这些结果表明GtHs在硬骨鱼生殖调控中的功能存在种属特异性。GtHs的作用是通过结合GtHRs实现的，因此研究

收稿日期：2016-03-29　　**修回日期**：2016-10-17
资助项目：国家自然科学基金(31272662)；上海市教委科研创新项目(14YZ117)

通信作者：张俊彬，E-mail：jb-zhang@shou.edu.cn

GtHRs在配子形成过程中的表达和调控, 可更深入理解GtHs的作用机制。

金钱鱼(*Scatophagus argus*)属鲈形目(Perciformes)，为广盐性亚热带鱼类，是我国东海和南海较常见的优质经济鱼类。过度捕捞导致野生鱼苗资源量减少，远远不能满足需求，迫切需要人工繁殖。在人工繁殖过程中极易出现金钱鱼雌雄个体性腺发育不同步的现象，导致繁殖不成功，给人工繁育金钱鱼带来极大的困难[12]。目前国内外对金钱鱼生长繁育方面的研究比较少，有关金钱鱼性腺发育尤其是配子形成的分子机制还未阐明，因此开展其分子机理的研究具有重要意义。

本研究以人工养殖金钱鱼为实验材料，通过组织学切片对金钱鱼的性腺发育时期进行了鉴定。采用RACE技术克隆得到金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因cDNA序列，应用Rt-PCR技术对FSHR和LHR mRNA在不同组织的表达及在性腺不同发育时期的表达进行研究。为进一步阐明FSHR和LHR的生理功能和分子机制奠定基础，同时也为金钱鱼生殖调控及育种提供基础数据。

1　材料与方法

1.1　实验对象

实验用金钱鱼取自广东龙胜鱼苗繁殖有限公司养殖基地。生长发育4个时期，分别取每个时期雌鱼和雄鱼各5条的性腺混合作为一个样，共40条鱼。利用液氮迅速冷冻样品，然后置于–80 °C冰箱保存待用。

1.2　总RNA的提取和cDNA合成

将样品放入液氮中研磨。总RNA的提取使用Trizol Reagent试剂盒，按说明书提取RNA。用琼脂糖电泳检测RNA的完整性，核酸蛋白定量(nanodrop 2000)测定RNA浓度，然后–80 °C保存备用。以总RNA为模板，cDNA第一链利用Oligo (T) d 16来合成，获得cDNA用于克隆实验。按照PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)操作说明进行反转录用于荧光定量，反转录cDNA均稀释10倍。合成的cDNA于–20 °C保存备用。

1.3　*FSHR*和*LHR*序列克隆

根据金钱鱼转录组数据库序列设计引物(表1)并验证此中间片段，PCR反应体系为25 μL，含2.5 μL 10×Buffer、2.5 μL $MgCl_2$、1 μL dNTP (2.5 mmol/L)、上游和下游引物各0.5 mL (10 μmol/L)、0.3 μLTaq酶(5 U/μL)和1 mL模板，以ddH_2O补充至25 μL。扩增条件：94 °C 3 min；94 °C 45 s，58 °C 30 s，72 °C 1 min 30 s，30个循环；72 °C延伸10 min。PCR产物切胶纯化回收后，连接到pMD18-T (TaKaRa)载体，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，经鉴定后将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。

根据已得到中间片段序列设计3′RACE引物(表1)，3′FSHR-1、3′FSHR-2、3′RACE的操作参照TaKaRa Prime Script Reverse Transcriptase试剂盒推荐方法进行。首先以试剂盒提供的3′RACE Adaptor为引物进行反转录，然后以试剂盒提供的AP和按要求设计的3′FSHR-1进行第1轮PCR扩增。反应条件：94 °C 3 min；94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 2 min，30个循环；72 °C延伸10 min。以第1轮PCR产物为模板，3′RACE-R和3′FSHR-2为引物进行第2轮PCR扩增。反应条件：94 °C 3 min；94 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 2 min，35个循环；72 °C 10 min。将获得的扩增产物连接到pMD18-T载体，转化大肠杆菌DH5α感受态细胞，挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。5′RACE参照Hu等[13]方法，设计5′RACE引物(表1)，首先以AOLP为引物进行反转录得到cDNA第1链，用RNaseH消化cDNA，然后用末端脱氧核

表 1　实验用引物序列

Tab. 1　Primer sequences for PCR study

引物　primer	序列　sequence (5′–3′)
AP (Adaptor Primer)	CTGATCTAGAGGTACCGG ATCC
Oligo (dT)16AP	CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT
AOLP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTV
3′RACE-R	CTAGAGGTACCGGATCCTT
5′FSHR-1	GGAGCAGTGGTCCCTGTAGAA
5′FSHR-2	CGTTGGGATTGATGTGAGTAAG
3′FSHR-1	GGTCCTCTTCTACCCGATCAAC
3′FSHR-2	ACAGATTTACCGGACAGAGAGTTC
5′LHR-1	GTACAAGTTGTCACAGATATCCAAGAT
5′LHR-2	ATTGTGTTGGAGAAGCAGCGGC
3′LHR-1	TGAAGCAGATGCTTTCAATCCCT
3′LHR-2	CAGACTTCTGCATCGGGATCTAC

苷转移酶(TaKaRa)进行5′端加polyA尾得到5′RACE模板。以Oligo (dT)16AP和5′FSHR-1为引物进行第1轮PCR，反应条件为94 °C 3 min；94 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 1 min 30 s，30个循环；72 °C 10 min。然后以第1轮PCR产物为模板，5′FSHR-2和AP为引物进行第2轮PCR，反应条件：94 °C 3 min；94 °C 30 s，60 °C 30 s，72 °C 1 min 30 s，35个循环；72 °C 10 min。PCR产物切胶纯化回收、连接、测序、拼接。*LHR*基因克隆同FSHR。

1.4　序列分析

用DNAStar软件包中的SeqMan将*FSHR*和*LHR*的中间片段、3′RACE和5′RACE测序所得序列进行拼接得到*FSHR*和*LHR*的全长cDNA序列。在NCBI中BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行同源性分析，并使用ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi)确定开放阅读框(open reading frame，ORF)。利用在线工具TMHMMServer 2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)对蛋白的跨膜区域进行预测；利用在线工具SignalP 4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)预测信号肽；利用ProtParam (http://web.expasy.org/protparam)对所推测的蛋白质基本物理化学参数进行分析；利用NetPhos 2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)预测Ser、Thr和Tyr磷酸化位点。利用NetNGlyc1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc)预测N端糖基化位点。利用Mega 6.0 软件采用邻位相连法Neighbor-Joining结合Clustal X软件构建分子系统进化树。

1.5　金钱鱼卵巢、精巢不同发育时期组织学染色

样品固定后经梯度酒精脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，石蜡切片厚度5~6 μm，H.E染色，Nikon显微镜拍照并观察。卵巢和精巢发育分期参照崔丹等[14]的方法。

1.6　金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因在雌雄不同时期的表达分析

采用ABI 7500荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, USA)。PCR反应体系(共10 μL)：SYBR Premix Ex Taq Ⅱ(2×) 5.0 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL，ROX II(50×) 0.2 μL，cDNA模板1.0 mL，用水补至10 μL。反应条件：95 °C预变性30 s；95 °C变性5 s，55 °C退火34 s，40个循环；95 °C变性15 s，60 °C退火1 min，95 °C延伸15 s。实时荧光定量数据以$2^{-\Delta\Delta C_T}$法处理, 表达量变化以mean±SD表示。为确保实时荧光定量PCR反应的准确性和可重复性，每个样品均重复测定3次。使用SPSS软件进行方差分析和多重比较，显著性水平设为$P<0.05$。

2　结果与分析

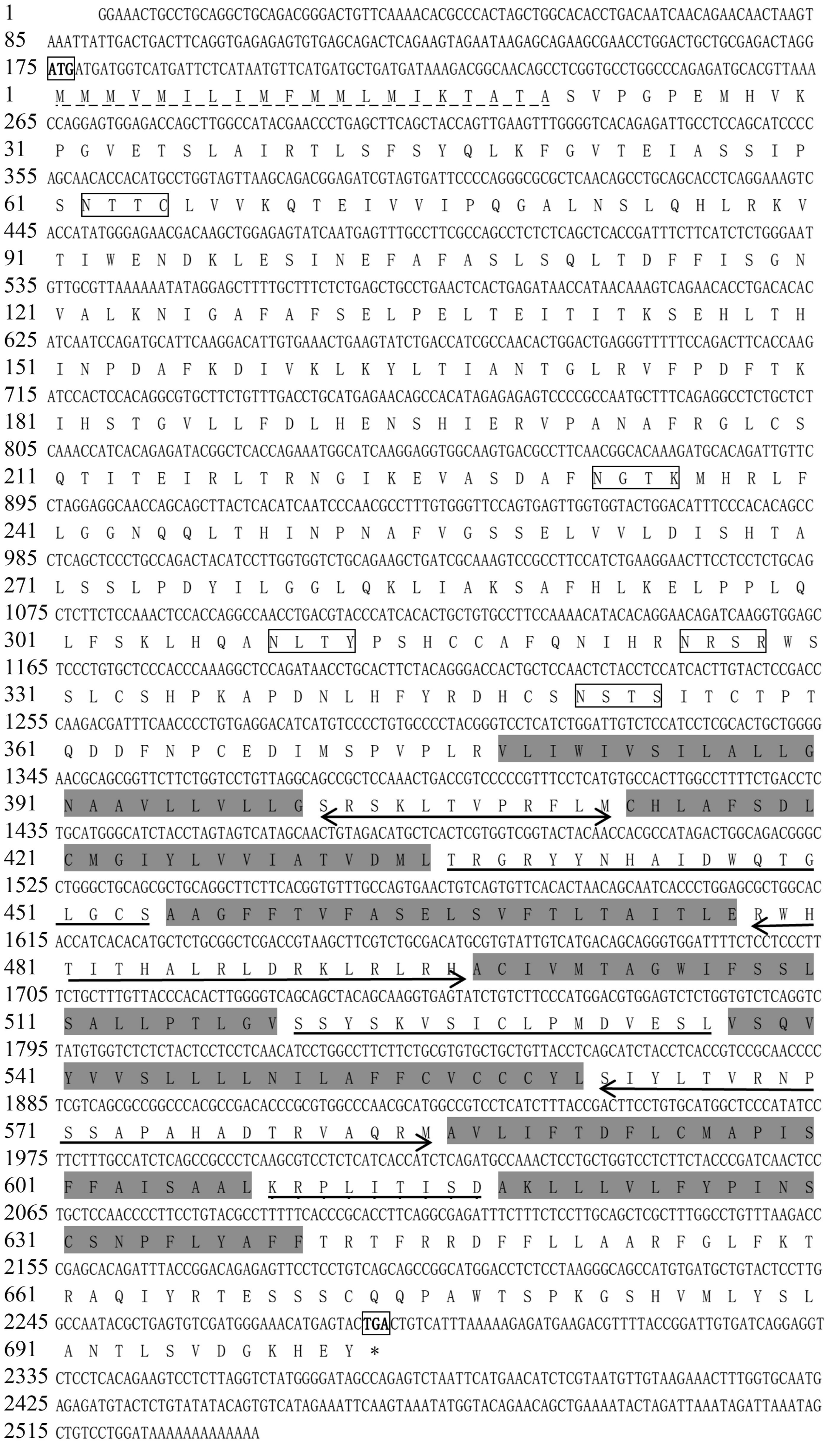
2.1　金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因序列分析

金钱鱼*FSHR*的GenBank登录号为KU646840，cDNA全长2538 bp，开放阅读框(ORF)2109 bp，共编码702个氨基酸。预测金钱鱼FSHR蛋白分子量为78.255 ku，理论等电点为8.84。该氨基酸序列分为377 aa的胞外区域(ECD)，其中20 aa为信号肽；长度为263 aa的7次跨膜螺旋区(7 TM helices)，其中3个胞内环(IL)和3个胞外环(EL)连接这7个跨膜螺旋区；有62 aa胞内区。预测整个编码区有17个Ser磷酸化位点、5个Thr磷酸化位点和3个Tyr磷酸化位点。推测该氨基酸含有5个潜在的N基端糖基化位点，分别为^{62}NTTC、^{232}NGTK、^{309}NLTY、^{325}NRSR、^{351}NSTS(图1)。*LHR*的GenBank登录号为KU886226，cDNA全长3315 bp，开放阅读框(ORF)2169 bp，共编码722个氨基酸。预测LHR蛋白分子量80.185 ku，等电点8.64。该氨基酸序列分为389 aa的胞外区域(ECD)，其中包含21个信号肽；长度为263 aa的7次跨膜螺旋区(7 TM helices)，其中3个IL和3个EL连接这7个跨膜螺旋区；长度为70 aa胞内区。预测整个编码区有14个Ser磷酸化位点、4个Thr和6个Tyr磷酸化位点。推测该氨基酸含有4个N基端糖基化位点，分别为^{42}NLTQ、^{199}NGTK、^{303}NGST和^{403}NLTV(图2)。

2.2　FSHR和LHR氨基酸同源性分析

利用CLUSTAL X在线软件对金钱鱼的氨基酸序列进行对比，金钱鱼FSHR与欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)和点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)FSHR同源性较高，分别为91%和80%，与斑马鱼同源性为60%，与人类等哺乳动物同源性为51%(表2)。金钱鱼LHR同样与欧洲鲈和点带石斑鱼LHR同源性较高，分别为89%和87%。与斑马鱼同源性为69%，与人类等哺乳动物同源性为52%~53%(表3)，FSHR与LHR在进化中比较保守。

不同物种氨基酸序列对比发现了GpHR家族



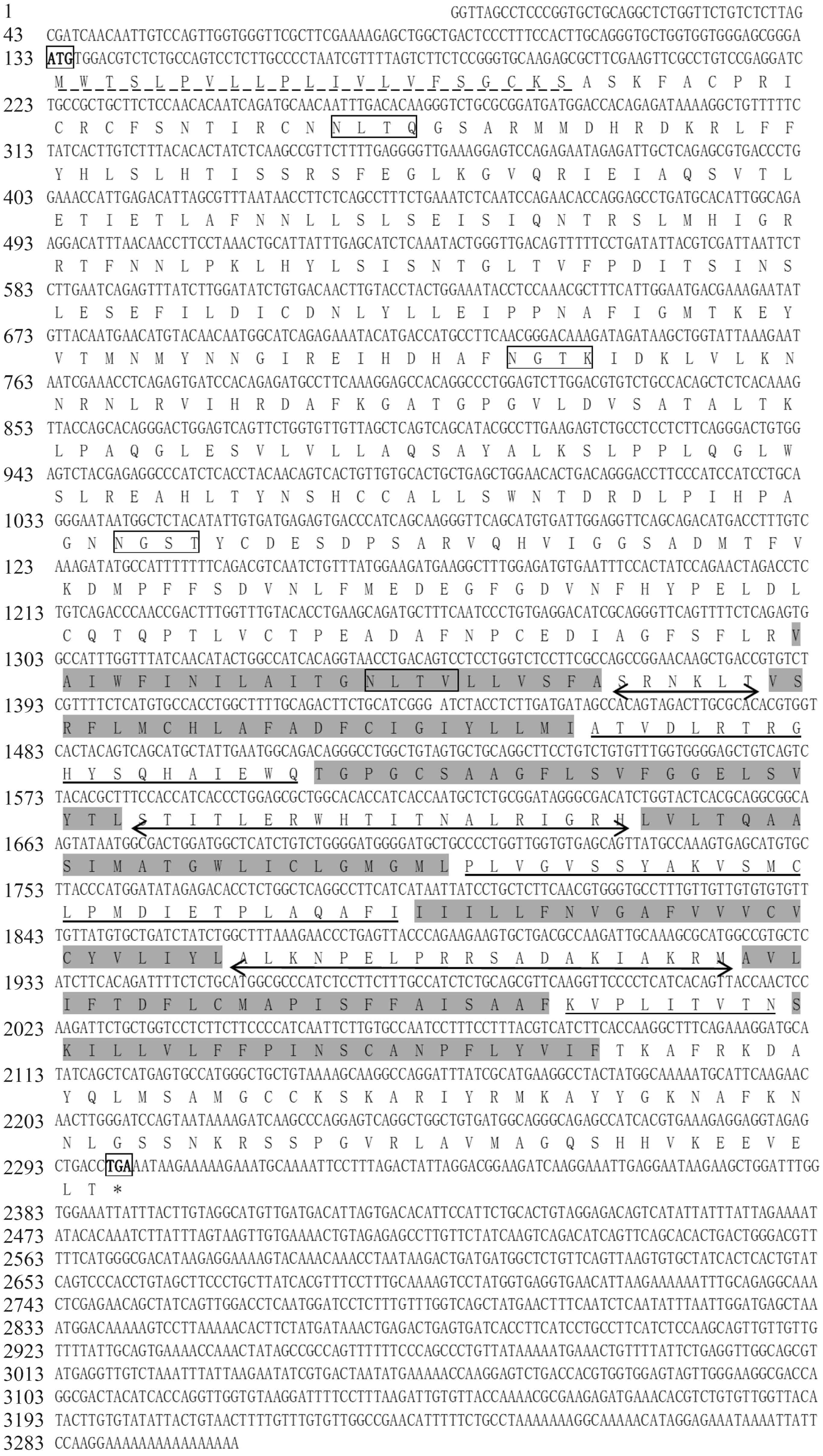
```
1      GGAAACTGCCTGCAGGCTGCAGACGGGACTGTTCAAAACACGCCCACTAGCTGGCACACCTGACAATCAACAGAACAACTAAGT
85    AAATTATTGACTGACTTCAGGTGAGAGAGTGTGAGCAGACTCAGAAGTAGAATAAGAGCAGAAGCGAACCTGGACTGCTGCGAGACTAGG
175   ATGATGATGGTCATGATTCTCATAATGTTCATGATGCTGATGATAAAGACGGCAACAGCCTCGGTGCCTGGCCCAGAGATGCACGTTAAA
1      M  M  M  V  M  I  L  I  M  F  M  M  L  M  I  K  T  A  T  A  S  V  P  G  P  E  M  H  V  K
265   CCAGGAGTGGAGACCAGCTTGGCCATACGAACCCTGAGCTTCAGCTACCAGTTGAAGTTTGGGGTCACAGAGATTGCCTCCAGCATCCCC
31     P  G  V  E  T  S  L  A  I  R  T  L  S  F  S  Y  Q  L  K  F  G  V  T  E  I  A  S  S  I  P
355   AGCAACACCACATGCCTGGTAGTTAAGCAGACGGAGATCGTAGTGATTCCCCAGGGCGCGCTCAACAGCCTGCAGCACCTCAGGAAAGTC
61     S  N  T  T  C  L  V  V  K  Q  T  E  I  V  V  I  P  Q  G  A  L  N  S  L  Q  H  L  R  K  V
445   ACCATATGGGAGAACGACAAGCTGGAGAGTATCAATGAGTTTGCCTTCGCCAGCCTCTCTCAGCTCACCGATTTCTTCATCTCTGGGAAT
91     T  I  W  E  N  D  K  L  E  S  I  N  E  F  A  F  A  S  L  S  Q  L  T  D  F  F  I  S  G  N
535   GTTGCGTTAAAAAATATAGGAGCTTTTGCTTTCTCTGAGCTGCCTGAACTCACTGAGATAACCATAACAAAGTCAGAACACCTGACACAC
121    V  A  L  K  N  I  G  A  F  A  F  S  E  L  P  E  L  T  E  I  T  I  T  K  S  E  H  L  T  H
625   ATCAATCCAGATGCATTCAAGGACATTGTGAAACTGAAGTATCTGACCATCGCCAACACTGGACTGAGGGTTTTCCAGACTTCACCAAG
151    I  N  P  D  A  F  K  D  I  V  K  L  K  Y  L  T  I  A  N  T  G  L  R  V  F  P  D  F  T  K
715   ATCCACTCCACAGGCGTGCTTCTGTTTGACCTGCATGAGAACAGCCACATAGAGAGAGTCCCCGCCAATGCTTTCAGAGGCCTCTGCTCT
181    I  H  S  T  G  V  L  L  F  D  L  H  E  N  S  H  I  E  R  V  P  A  N  A  F  R  G  L  C  S
805   CAAACCATCACAGAGATACGGCTCACCAGAAATGGCATCAAGGAGGTGGCAAGTGACGCCTTCAACGGCACAAAGATGCACAGATTGTTC
211    Q  T  I  T  E  I  R  L  T  R  N  G  I  K  E  V  A  S  D  A  F  N  G  T  K  M  H  R  L  F
895   CTAGGAGGCAACCAGCAGCTTACTCACATCAATCCCAACGCCTTTGTGGGTTCCAGTGAGTTGGTGGTACTGGACATTTCCCACACAGCC
241    L  G  G  N  Q  Q  L  T  H  I  N  P  N  A  F  V  G  S  S  E  L  V  V  L  D  I  S  H  T  A
985   CTCAGCTCCCTGCCAGACTACATCCTTGGTGGTCTGCAGAAGCTGATCGCAAAGTCCGCCTTCCATCTGAAGGAACTTCCTCCTCTGCAG
271    L  S  S  L  P  D  Y  I  L  G  G  L  Q  K  L  I  A  K  S  A  F  H  L  K  E  L  P  P  L  Q
1075  CTCTTCTCCAAACTCCACCAGGCCAACCTGACGTACCCATCACACTGCTGTGCCTTCCAAAACATACACAGGAACAGATCAAGGTGGAGC
301    L  F  S  K  L  H  Q  A  N  L  T  Y  P  S  H  C  C  A  F  Q  N  I  H  R  N  R  S  R  W  S
1165  TCCCTGTGCTCCCACCCAAAGGCTCCAGATAACCTGCACTTCTACAGGGACCACTGCTCCAACTCTACCTCCATCACTTGTACTCCGACC
331    S  L  C  S  H  P  K  A  P  D  N  L  H  F  Y  R  D  H  C  S  N  S  T  S  I  T  C  T  P  T
1255  CAAGACGATTTCAACCCCTGTGAGGACATCATGTCCCCTGTGCCCCTACGGGTCCTCATCTGGATTGTCTCCATCCTCGCACTGCTGGGG
361    Q  D  D  F  N  P  C  E  D  I  M  S  P  V  P  L  R  V  L  I  W  I  V  S  I  L  A  L  L  G
1345  AACGCAGCGGTTCTTCTGGTCCTGTTAGGCAGCCGCTCCAAACTGACCGTCCCCCGTTTCCTCATGTGCCACTTGGCCTTTTCTGACCTC
391    N  A  A  V  L  L  V  L  L  G  S  R  S  K  L  T  V  P  R  F  L  M  C  H  L  A  F  S  D  L
1435  TGCATGGGCATCTACCTAGTAGTCATAGCAACTGTAGACATGCTCACTCGTGGTCGGTACTACAACCACGCCATAGACTGGCAGACGGGC
421    C  M  G  I  Y  L  V  V  I  A  T  V  D  M  L  T  R  G  R  Y  Y  N  H  A  I  D  W  Q  T  G
1525  CTGGGCTGCAGCGCTGCAGGCTTCTTCACGGTGTTTGCCAGTGAACTGTCAGTGTTCACACTAACAGCAATCACCCTGGAGCGCTGGCAC
451    L  G  C  S  A  A  G  F  F  T  V  F  A  S  E  L  S  V  F  T  L  T  A  I  T  L  E  R  W  H
1615  ACCATCACACATGCTCTGCGGCTCGACCGTAAGCTTCGTCTGCGACATGCGTGTATTGTCATGACAGCAGGGTGGATTTTCTCCTCCCTT
481    T  I  T  H  A  L  R  L  D  R  K  L  R  L  R  H  A  C  I  V  M  T  A  G  W  I  F  S  S  L
1705  TCTGCTTTGTTACCCACACTTGGGGTCAGCAGCTACAGCAAGGTGAGTATCTGTCTTCCCATGGACGTGGAGTCTCTGGTGTCTCAGGTC
511    S  A  L  L  P  T  L  G  V  S  S  Y  S  K  V  S  I  C  L  P  M  D  V  E  S  L  V  S  Q  V
1795  TATGTGGTCTCTCTACTCCTCCTCAACATCCTGGCCTTCTTCTGCGTGTGCTGCTGTTACCTCAGCATCTACCTCACCGTCCGCAACCCC
541    Y  V  V  S  L  L  L  L  N  I  L  A  F  F  C  V  C  C  C  Y  L  S  I  Y  L  T  V  R  N  P
1885  TCGTCAGCGCCGGCCCACGCCGACACCCGCGTGGCCCAACGCATGGCCGTCCTCATCTTTACCGACTTCCTGTGCATGGCTCCCATATCC
571    S  S  A  P  A  H  A  D  T  R  V  A  Q  R  M  A  V  L  I  F  T  D  F  L  C  M  A  P  I  S
1975  TTCTTTGCCATCTCAGCCGCCCTCAAGCGTCCTCTCATCACCATCTCAGATGCCAAACTCCTGCTGGTCCTCTTCTACCCGATCAACTCC
601    F  F  A  I  S  A  A  L  K  R  P  L  I  T  I  S  D  A  K  L  L  L  V  L  F  Y  P  I  N  S
2065  TGCTCCAACCCCTTCCTGTACGCCTTTTTCACCCGCACCTTCAGGCGAGATTTCTTTCTCCTTGCAGCTCGCTTTGGCCTGTTTAAGACC
631    C  S  N  P  F  L  Y  A  F  F  T  R  T  F  R  R  D  F  F  L  L  A  A  R  F  G  L  F  K  T
2155  CGAGCACAGATTTACCGGACAGAGAGTTCCTCCTGTCAGCAGCCGGCATGGACCTCTCCTAAGGGCAGCCATGTGATGCTGTACTCCTTG
661    R  A  Q  I  Y  R  T  E  S  S  S  C  Q  Q  P  A  W  T  S  P  K  G  S  H  V  M  L  Y  S  L
2245  GCCAATACGCTGAGTGTCGATGGGAAACATGAGTACTGACTGTCATTTAAAAAGAGATGAAGACGTTTTACCGGATTGTGATCAGGAGGT
691    A  N  T  L  S  V  D  G  K  H  E  Y  *
2335  CTCCTCACAGAAGTCCTCTTAGGTCTATGGGGATAGCCAGAGTCTAATTCATGAACATCTCGTAATGTTGTAAGAAACTTTGGTGCAATG
2425  AGAGATGTACTCTGTATATACAGTGTCATAGAAATTCAAGTAAATATGGTACAGAACAGCTGAAAATACTAGATTAAATAGATTAAATAG
2515  CTGTCCTGGATAAAAAAAAAAAAA
```

图 1　金钱鱼*FSHR* cDNA全长序列

MMMVM：信号肽；VLIWIV：阴影部分跨膜螺旋区；黑色线条：胞内环；黑色箭头：胞外环；方框：潜在的N端糖基化位点；ATG：起始密码子；TGA：终止密码子；下同

Fig. 1　Full sequence of *FSHR* of *S. argus*

MMMVM: signal protein; VLIWIV: shadows are transmembrane helices; black lines: intracellusar loops; black arrows: extracelluar loops; squares: potential N-linked glycosylation sites; ATG: initiation codon; TGA: termination codon; the same below



```
1                                             GGTTAGCCTCCCGGTGCTGCAGGCTCTGGTTCTGTCTCTTAG
43    CGATCAACAATTGTCCAGTTGGTGGGTTCGCTTCGAAAAGAGCTGGCTGACTCCCTTTCCACTTGCAGGGTGCTGGTGGTGGGAGCGGGA
133   ATGTGGACGTCTCTGCCAGTCCTCTTGCCCCTAATCGTTTTAGTCTTCTCCGGGTGCAAGAGCGCTTCGAAGTTCGCCTGTCCGAGGATC
       M  W  T  S  L  P  V  L  L  P  L  I  V  L  V  F  S  G  C  K  S  A  S  K  F  A  C  P  R  I
223   TGCCGCTGCTTCTCCAACACAATCAGATGCAACAATTTGACACAAGGGTCTGCGCGGATGATGGACCACAGAGATAAAAGGCTGTTTTTC
       C  R  C  F  S  N  T  I  R  C  N  N  L  T  Q  G  S  A  R  M  M  D  H  R  D  K  R  L  F  F
313   TATCACTTGTCTTTACACACTATCTCAAGCCGTTCTTTTGAGGGGTTGAAAGGAGTCCAGAGAATAGAGATTGCTCAGAGCGTGACCCTG
       Y  H  L  S  L  H  T  I  S  S  R  S  F  E  G  L  K  G  V  Q  R  I  E  I  A  Q  S  V  T  L
403   GAAACCATTGAGACATTAGCGTTTAATAACCTTCTCAGCCTTTCTGAAATCTCAATCCAGAACACCAGGAGCCTGATGCACATTGGCAGA
       E  T  I  E  T  L  A  F  N  N  L  L  S  L  S  E  I  S  I  Q  N  T  R  S  L  M  H  I  G  R
493   AGGACATTTAACAACCTTCCTAAACTGCATTATTTGAGCATCTCAAATACTGGGTTGACAGTTTTTCCTGATATTACGTCGATTAATTCT
       R  T  F  N  N  L  P  K  L  H  Y  L  S  I  S  N  T  G  L  T  V  F  P  D  I  T  S  I  N  S
583   CTTGAATCAGAGTTTATCTTGGATATCTGTGACAACTTGTACCTACTGGAAATACCTCCAAACGCTTTCATTGGAATGACGAAAGAATAT
       L  E  S  E  F  I  L  D  I  C  D  N  L  Y  L  L  E  I  P  P  N  A  F  I  G  M  T  K  E  Y
673   GTTACAATGAACATGTACAACAATGGCATCAGAGAAATACATGACCATGCCTTCAACGGGACAAAGATAGATAAGCTGGTATTAAAGAAT
       V  T  M  N  M  Y  N  N  G  I  R  E  I  H  D  H  A  F  N  G  T  K  I  D  K  L  V  L  K  N
763   AATCGAAACCTCAGAGTGATCCACAGAGATGCCTTCAAAGGAGCCACAGGCCCTGGAGTCTTGGACGTGTCTGCCACAGCTCTCACAAAG
       N  R  N  L  R  V  I  H  R  D  A  F  K  G  A  T  G  P  G  V  L  D  V  S  A  T  A  L  T  K
853   TTACCAGCACAGGGACTGGAGTCAGTTCTGGTGTTGTTAGCTCAGTCAGCATACGCCTTGAAGAGTCTGCCTCCTCTTCAGGGACTGTGG
       L  P  A  Q  G  L  E  S  V  L  V  L  L  A  Q  S  A  Y  A  L  K  S  L  P  P  L  Q  G  L  W
943   AGTCTACGAGAGGCCCATCTCACCTACAACAGTCACTGTTGTGCACTGCTGAGCTGGAACACTGACAGGGACCTTCCCATCCATCCTGCA
       S  L  R  E  A  H  L  T  Y  N  S  H  C  C  A  L  L  S  W  N  T  D  R  D  L  P  I  H  P  A
1033  GGGAATAATGGCTCTACATATTGTGATGAGAGTGACCCATCAGCAAGGGTTCAGCATGTGATTGGAGGTTCAGCAGACATGACCTTTGTC
       G  N  N  G  S  T  Y  C  D  E  S  D  P  S  A  R  V  Q  H  V  I  G  G  S  A  D  M  T  F  V
123   AAAGATATGCCATTTTTTTCAGACGTCAATCTGTTTATGGAAGATGAAGGCTTTGGAGATGTGAATTTCCACTATCCAGAACTAGACCTC
       K  D  M  P  F  F  S  D  V  N  L  F  M  E  D  E  G  F  G  D  V  N  F  H  Y  P  E  L  D  L
1213  TGTCAGACCCAACCGACTTTGGTTTGTACACCTGAAGCAGATGCTTTCAATCCCTGTGAGGACATCGCAGGGTTCAGTTTTCTCAGAGTG
       C  Q  T  Q  P  T  L  V  C  T  P  E  A  D  A  F  N  P  C  E  D  I  A  G  F  S  F  L  R  V
1303  GCCATTTGGTTTATCAACATACTGGCCATCACAGGTAACCTGACAGTCCTCCTGGTCTCCTTCGCCAGCCGGAACAAGCTGACCGTGTCT
       A  I  W  F  I  N  I  L  A  I  T  G  N  L  T  V  L  L  V  S  F  A  S  R  N  K  L  T  V  S
1393  CGTTTTCTCATGTGCCACCTGGCTTTTGCAGACTTCTGCATCGGG ATCTACCTCTTGATGATAGCCACAGTAGACTTGCGCACACGTGGT
       R  F  L  M  C  H  L  A  F  A  D  F  C  I  G  I  Y  L  L  M  I  A  T  V  D  L  R  T  R  G
1483  CACTACAGTCAGCATGCTATTGAATGGCAGACAGGGCCTGGCTGTAGTGCTGCAGGCTTCCTGTCTGTGTTTGGTGGGGAGCTGTCAGTC
       H  Y  S  Q  H  A  I  E  W  Q  T  G  P  G  C  S  A  A  G  F  L  S  V  F  G  G  E  L  S  V
1573  TACACGCTTTCCACCATCACCCTGGAGCGCTGGCACACCATCACCAATGCTCTGCGGATAGGGCGACATCTGGTACTCACGCAGGCGGCA
       Y  T  L  S  T  I  T  L  E  R  W  H  T  I  T  N  A  L  R  I  G  R  H  L  V  L  T  Q  A  A
1663  AGTATAATGGCGACTGGATGGCTCATCTGTCTGGGGATGGGGATGCTGCCCCTGGTTGGTGTGAGCAGTTATGCCAAAGTGAGCATGTGC
       S  I  M  A  T  G  W  L  I  C  L  G  M  G  M  L  P  L  V  G  V  S  S  Y  A  K  V  S  M  C
1753  TTACCCATGGATATAGAGACACCTCTGGCTCAGGCCTTCATCATAATTATCCTGCTCTTCAACGTGGGTGCCTTTGTTGTTGTGTGTGTT
       L  P  M  D  I  E  T  P  L  A  Q  A  F  I  I  I  I  L  L  F  N  V  G  A  F  V  V  V  C  V
1843  TGTTATGTGCTGATCTATCTGGCTTTAAAGAACCCTGAGTTACCCAGAAGAAGTGCTGACGCCAAGATTGCAAAGCGCATGGCCGTGCTC
       C  Y  V  L  I  Y  L  A  L  K  N  P  E  L  P  R  R  S  A  D  A  K  I  A  K  R  M  A  V  L
1933  ATCTTCACAGATTTTCTCTGCATGGCGCCCATCTCCTTCTTTGCCATCTCTGCAGCGTTCAAGGTTCCCCTCATCACAGTTACCAACTCC
       I  F  T  D  F  L  C  M  A  P  I  S  F  F  A  I  S  A  A  F  K  V  P  L  I  T  V  T  N  S
2023  AAGATTCTGCTGGTCCTCTTCTTCCCCATCAATTCTTGTGCCAATCCTTTCCTTTACGTCATCTTCACCAAGGCTTTCAGAAAGGATGCA
       K  I  L  L  V  L  F  F  P  I  N  S  C  A  N  P  F  L  Y  V  I  F  T  K  A  F  R  K  D  A
2113  TATCAGCTCATGAGTGCCATGGGCTGCTGTAAAAGCAAGGCCAGGATTTATCGCATGAAGGCCTACTATGGCAAAAATGCATTCAAGAAC
       Y  Q  L  M  S  A  M  G  C  C  K  S  K  A  R  I  Y  R  M  K  A  Y  Y  G  K  N  A  F  K  N
2203  AACTTGGGATCCAGTAATAAAAGATCAAGCCCAGGAGTCAGGCTGGCTGTGATGGCAGGGCAGAGCCATCACGTGAAAGAGGAGGTAGAG
       N  L  G  S  S  N  K  R  S  S  P  G  V  R  L  A  V  M  A  G  Q  S  H  H  V  K  E  E  V  E
2293  CTGACCTGAAATAAGAAAAAGAAATGCAAAATTCCTTTAGACTATTAGGACGGAAGATCAAGGAAATTGAGGAATAAGAAGCTGGATTTGG
       L  T  *
2383  TGGAAATTATTTACTTGTAGGCATGTTGATGACATTAGTGACACATTCCATTCTGCACTGTAGGAGACAGTCATATTATTTATTAGAAAAT
2473  ATACACAAATCTTATTTAGTAAGTTGTGAAAACTGTAGAGAGCCTTGTTCTATCAAGTCAGACATCAGTTCAGCACACTGACTGGGACGTT
2563  TTTCATGGGCGACATAAGAGGAAAAGTACAAACAAACCTAATAAGACTGATGATGGCTCTGTTCAGTTAAGTGTGCTATCACTCACTGTAT
2653  CAGTCCCACCTGTAGCTTCCCTGCTTATCACGTTTCCTTTGCAAAAGTCCTATGGTGAGGTGAACATTAAGAAAAAATTTGCAGAGGCAAA
2743  CTCGAGAACAGCTATCAGTTGGACCTCAATGGATCCTCTTTGTTTGGTCAGCTATGAACTTTCAATCTCAATATTTAATTGGATGAGCTAA
2833  ATGGACAAAAAGTCCTTAAAAACACTTCTATGATAAACTGAGACTGAGTGATCACCTTCATCCTGCCTTCATCTCCAAGCAGTTGTTGTTG
2923  TTTTATTGCAGTGAAAACCAAACTATAGCCGCCAGTTTTTTCCCAGCCCTGTTATAAAAATGAAACTGTTTTATTCTGAGGTTGGCAGCGT
3013  ATGAGGTTGTCTAAATTTATTAAGAATATCGTGACTAATATGAAAAACCAAGGAGTCTGACCACGTGGTGGAGTAGTTGGGAAGGCGACCA
3103  GGCGACTACATCACCAGGTTGGTGTAAGGATTTTCCTTTAAGATTGTGTTACCAAAACGCGAAGAGATGAAACACGTCTGTGTTGGTTACA
3193  TACTTGTGTATATTACTGTAACTTTTGTTTGTGTTGGCCGAACATTTTTCTGCCTAAAAAAAGGCAAAAACATAGGAGAAATAAAATTATT
3283  CCAAGGAAAAAAAAAAAAAAA
```

图 2　金钱鱼*LHR* cDNA全长序列

Fig. 2　Full sequence of *LHR* of *S. argus*

表 2 FSHR氨基酸序列的同源性比对

Tab. 2 Comparative identity of amino acid sequence of FSHR

物种(GenBank登录号) species (GenBank accession no.)	同源性/% identity
人 *Homo sapiens* (AAB26480.1)	51
小鼠 *Mus musculus* (NP_038551.3)	51
大鼠 *Rattus norvegicus* (NP_954707.1)	51
矮黑猩猩 *Pan paniscus* (XP_003822740.1)	51
绵羊 *Ovis aries* (AAA31525.1)	51
马 *Equus caballus* (NP_001157485.1)	51
原鸡 *Gallus gallus* (NP_990410.1)	51
美洲洞蛇 *Bothrops jararaca* (AAO72730.1)	51
黄颡鱼 *Tachysurus fulvidraco* (AEH84420.1)	58
大西洋鳕 *Gadus morhua* (ABD62885.1)	67
大西洋鲑 *Salmo salar* (ABH10576.1)	67
青鳉 *Oryzias latipes* (BAJ05402.1)	77
斑马鱼 *Danio rerio* (AAR84280.1)	60
虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* (AAQ04551.1)	66
点带石斑鱼 *Epinephelus coioides* (AIW52567.1)	80
欧洲鳗鲡 *Anguilla anguilla* (CPR30242.1)	59
欧洲鲈 *Dicentrarchus labrax* (AAV48628.1)	91

表 3 LHR氨基酸序列的同源性比对

Tab. 3 Comparative identity of amino acid sequence of LHR

物种(GenBank登录号) species (GenBank accession no.)	同源性/% identity
小鼠 *Mus musculus* (AAA39432.1)	53
大鼠 *Rattus norvegicus* (AAA41529.1)	52
人 *Homo sapiens* (AAB19917.2)	52
原鸡 *Gallus gallus* (BAA23736.1)	54
家牛 *Bos taurus* (AAM09535.1)	52
黄颡鱼 *Tachysurus fulvidraco* (AEH16748.2)	50
大西洋鳕 *Gadus morhua* (ABD62886.1)	49
大西洋鲑 *Salmo salar* (ABH10577.1)	71
青鳉 *Oryzias latipes* (BAJ05403.1)	49
斑马鱼 *Danio rerio* (AAR84281.1)	69
草鱼 *Ctenopharyngodon idella* (ABM73668.1)	68
虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* (NP_001117798.1)	70
底鳉 *Fundulus heteroclitus* (BAF48337.1)	76
点带石斑鱼 *Epinephelus coioides* (AEG65827.1)	87
欧洲鳗鲡 *Anguilla anguilla* (CPR30244.1)	61
欧洲鲈 *Dicentrarchus labrax* (ABX79919.1)	89

保守信号序列为CCAF、ERW、FTD、NPFLY (图3，4)。

利用MEGA6.0构建系统进化树，FSHR和LHR进化树分析发现，进化树可分为两支，其中各种鱼类聚为一支，哺乳类、两栖类和鸟类聚为一支。金钱鱼FSHR和LHR均处于鱼类这一支且均与欧洲鲈亲缘关系最近(图5，6)。

2.3 金钱鱼卵巢、精巢不同发育时期组织学观察

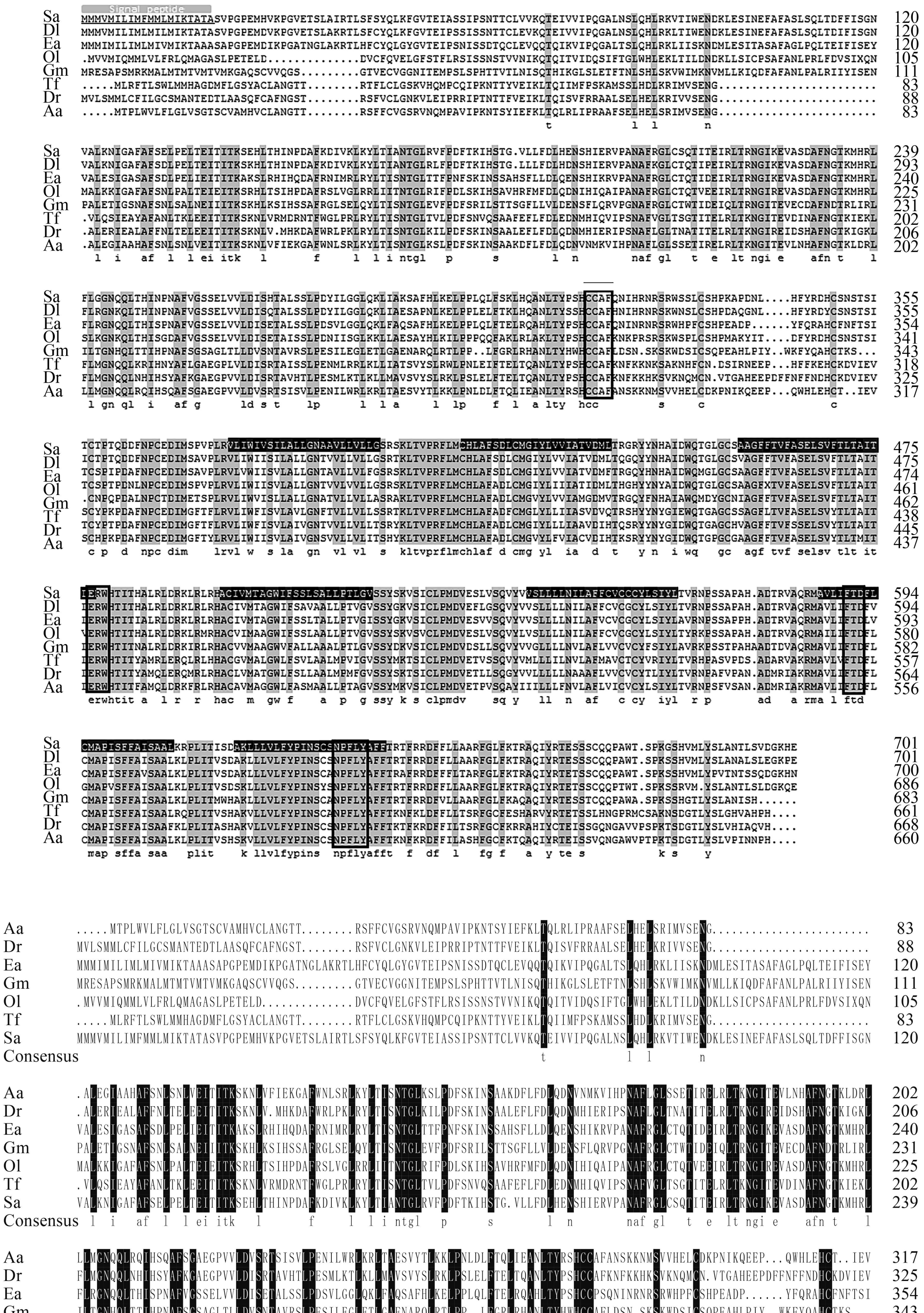
金钱鱼卵巢和精巢发育可分为4个时期。卵巢Ⅰ期卵母细胞分化，Ⅱ期卵母细胞发育出现卵黄核，Ⅲ期卵母细胞出现脂肪油滴，Ⅳ期卵母细胞发育成熟，含大量卵黄颗粒。精巢Ⅰ期精原细胞增殖，Ⅱ期精母细胞生长发育，Ⅲ期精母细胞分化成精子细胞，Ⅳ期精子发育成熟。

2.4 金钱鱼不同发育时期性腺中*FSHR*和*LHR*基因mRNA的表达水平

根据H.E染色结果可将卵巢和精巢分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期 (图7)。Real-time PCR结果(图8)显示*FSHR*基因mRNA在卵巢中Ⅰ期高水平表达，Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期显著下降($P<0.05$)，但Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期表达水平逐渐升高，Ⅳ期相对于Ⅱ期有显著性升高($P<0.05$)。随着精巢发育，*FSHR*基因mRNA表达水平逐渐升高并在Ⅲ期达到最高，在Ⅳ期显著性降低($P<0.05$)。*LHR*基因mRNA在卵巢和精巢的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期表达水平较低，且Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期之间无显著性变化($P>0.05$)；在Ⅳ期，*LHR*基因mRNA的表达相比Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期均有显著提升($P<0.05$)。

3 讨论

本研究通过Rt-PCR和RACE技术克隆了金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因的cDNA序列全长，分别编码702和722个氨基酸。金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因编码的氨基酸均与欧洲鲈同源性最高，分别为92%和89%；*FSHR*和*LHR*与斑马鱼同源性分别为60%和69%。金钱鱼GtHRs氨基酸序列具有GHRs家族典型的7次跨膜螺旋结构(7 TM helices)[15]。系统发育分析也显示金钱鱼GtHRs与鲈形目聚为一支，



(图 3　Fig . 3)

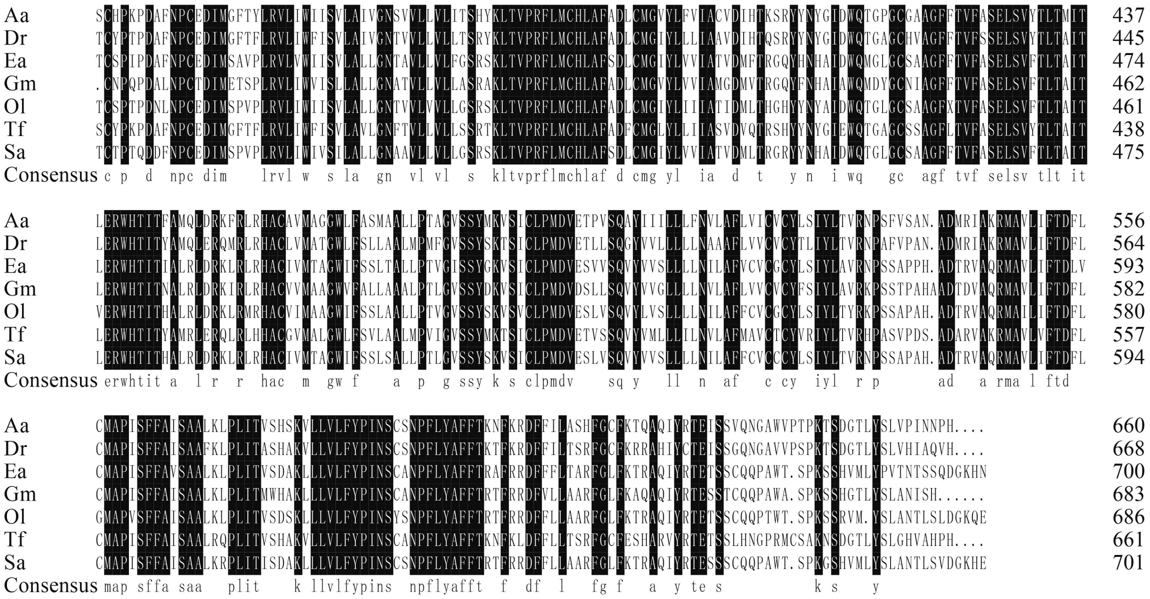
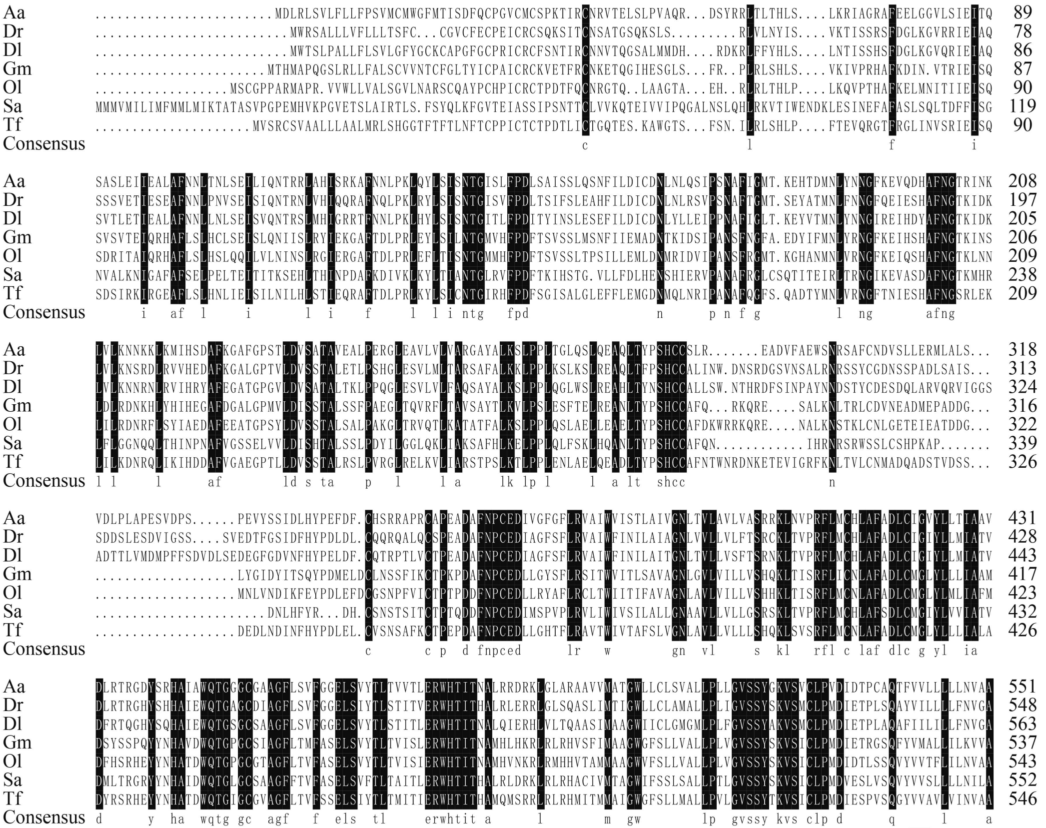


图 3　金钱鱼FSHR氨基酸序列与其他物种FSHR氨基酸对比

7次跨膜螺旋区，CCAF、ERW、FTD、NPFLY：GpHR家族的特殊保守信号序列。GenBank登录号：KU646840(金钱鱼.Sa)，AAV48628.1(欧洲鲈.Dl)，AIW52567.1(点带石斑鱼.Ea)，BAJ05402.1(青鳉.Ol)，ABD62885.1(大西洋鳕.Gm)，AEH84420.1(黄颡鱼.Tf)，AAR84280.1(斑马鱼.Dr)，CPR30242.1(欧洲鳗鲡.Aa)

Fig. 3　Alignment of FSHR from several species

Seven transmembrane helix domains, CCAF, ERW, FTD, NPFLY: special conversed signal sequence of GpHR family. GenBank accession number: KU646840(*Scatophagus argus*. Sa), AAV48628.1(*Dicentrarchus labrax*. Dl), AIW52567.1(*Epinephelus akaara*.Ea), BAJ05402.1(*Oryzias latipes*. Ol), ABD62885.1(*Gadus morhua*. Gm), AEH84420.1(*Tachysurus fulvidraco*. Tf), AAR84280.1(*Danio rerio*. Dr), CPR30242.1(*Anguilla anguilla*. Aa)



(图 4　Fig . 4)

图 4　金钱鱼LHR氨基酸序列与其他物种LHR氨基酸对比

7次跨膜螺旋区，ERW、FTD、NPFLY：GpHR家族的特殊保守信号序列。GenBank登录号：KU646840(金钱鱼.Sa)，ABX79919.1(欧洲鲈.Dl)，NP_001117798.1(虹鳟.Om)，AAR84281.1(斑马鱼.Dr)，CPR30244.1(欧洲鳗鲡.Aa)，ABD62886.1(大西洋鳕.Gm)，BAJ05403.1(青鳉.Ol)，AEH16748.2(黄颡鱼.Tf)

Fig. 4　Alignment of LHR from several species

seven transmembrane helix domains, ERW, FTD, NPFLY:special conversed signal sequence of GpHR family. GenBank accession number: KU886226(*Scatophagus argus.* Sa)，ABX79919.1(*Dicentrarchus labrax.* Dl)，NP_001117798.1(*Oncorhynchus mykiss.* Om)，AAR84281.1(*Danio rerio.* Dr)，CPR30244.1(*Anguilla anguilla.* Aa)，ABD62886.1(*Gadus morhua.* Gm)，BAJ05403.1(*Oryzias latipes.* Ol)，AEH16748.2(*Tachysurus fulvidraco.* Tf)

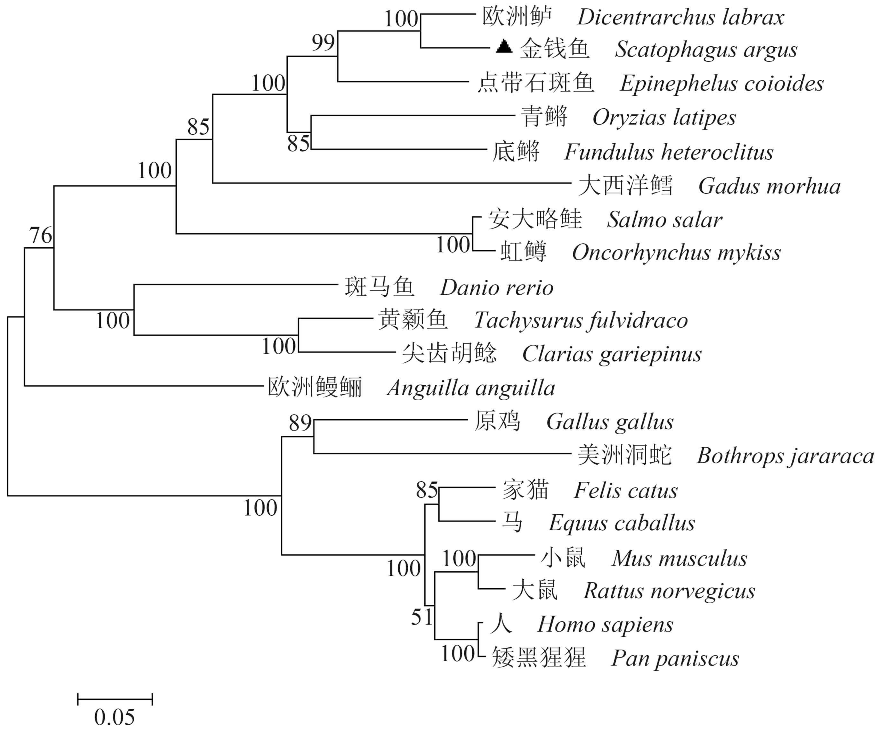


图 5　金钱鱼FSHR与其他脊椎动物FSHR构建的系统进化树

GenBank登录号：欧洲鲈(AAV48628.1)，点带石斑鱼(AEG65826.1)，青鳉(BAJ05402.1)，底鳉(BAF48336.1)，大西洋鳕(ABD62885.1)，安大略鲑(ABH10576.1)，虹鳟(AF439405.1)，斑马鱼(AAR84280.1)，黄颡鱼(AEH84420.1)，尖齿胡鲶(CAB51907.2)，欧洲鳗鲡(CPR30242.1)，原鸡(NP_990410.1)，美洲洞蛇(AAO72730.1)，家猫(NP_001041479.1)，马(NP_001157485.1)，小鼠(NP_038551.3)，大鼠(NP_954707.1)，人(AAB26480.1)，矮黑猩猩(XP_003822740.1)

Fig. 5　Phylogenetic tree of *Scatophagus argus* FSHR and other species FSHR

GenBank accession number: *Dicentrarchus labrax* (AAV48628.1), *Epinephelus coioides* (AEG65826.1), *Oryzias latipes* (BAJ05402.1)，*Fundulus heteroclitus* (BAF48336.1), *Gadus morhua* (ABD62885.1), *Salmo salar* (ABH10576.1), *Oncorhynchus mykiss* (AF439405.1), *Danio rerio* (AAR84280.1), *Tachysurus fulvidraco* (AEH84420.1), *Clarias gariepinus* (CAB51907.2), *Anguilla anguilla* (CPR30242.1), *Gallus gallus* (NP_990410.1), *Bothrops jararaca* (AAO72730.1), *Felis catus* (NP_001041479.1), *Equus caballus* (NP_001157485.1), *Mus musculus* (NP_038551.3), *Rattus norvegicus* (NP_954707.1), *Homo sapiens* (AAB26480.1), *Pan paniscus* (XP_003822740.1)

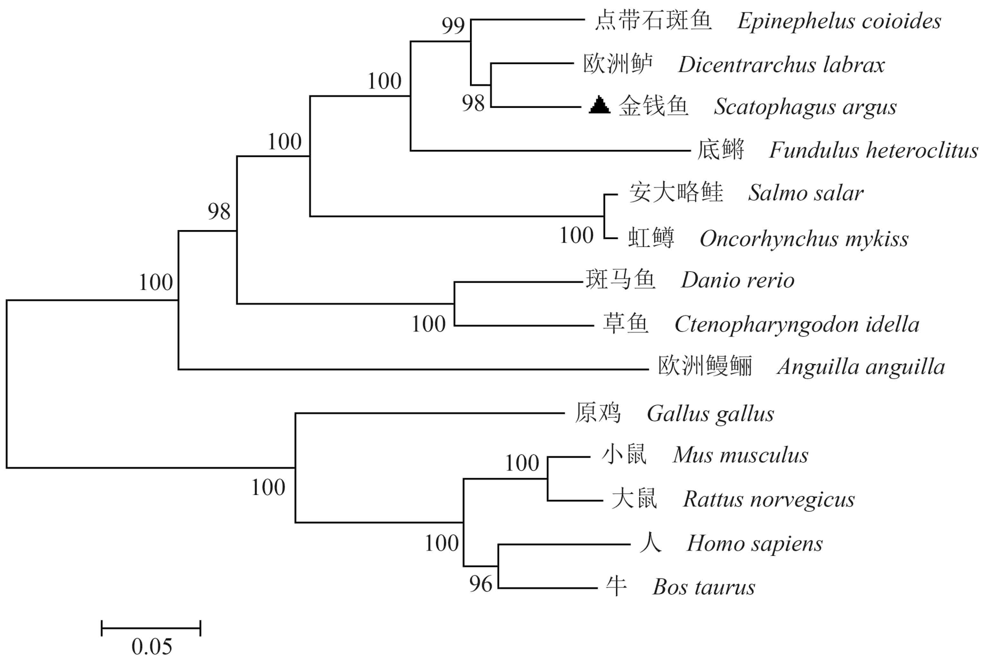


图 6 金钱鱼LHR与其他脊椎动物LHR构建的系统进化树

GenBank登录号：点带石斑鱼(AEG65827.1)，欧洲鲈(ABX79919.1)，底鳉(BAF48337.1)，安大略鲑(ABH10577.1)，虹鳟(NP_001117798.1)，斑马鱼(AAR84281.1)，草鱼(ABM73668.1)，欧洲鳗鲡(CPR30244.1)，原鸡(BAA23736.1)，小鼠(AAA39432.1)，大鼠(AAA41529.1)，人(AAB19917.2)，牛(AAM09535.1)

Fig. 6 Phylogenetic tree of *Scatophagus argus* LHR and other species LHR

GenBank accession number: *Epinephelus coioides* (AEG65827.1), *Dicentrarchus labrax* (ABX79919.1), *Fundulus heteroclitus* (BAF48337.1), *Salmo salar* (ABH10577.1), *Oncorhynchus mykiss* (NP_001117798.1), *Danio rerio* (AAR84281.1), *Ctenopharyngodon idella* (ABM73668.1), *Anguilla anguilla* (CPR30244.1), *Gallus gallus* (BAA23736.1), *Mus musculus* (AAA39432.1), *Rattus norvegicus* (AAA41529.1), *Homo sapiens* (AAB19917.2), *Bos taurus* (AAM09535.1)

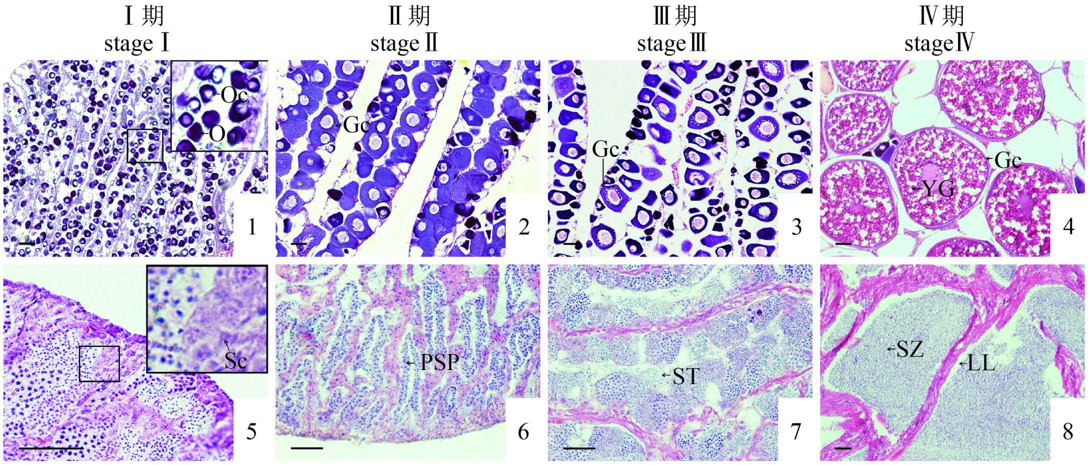


图 7 金钱鱼卵巢、精巢不同发育时期形态结构

1、2、3、4分别为卵巢Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期的形态结构。5、6、7、8分别为精巢Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期的形态结构。Oc. 卵母细胞，Oo. 卵原细胞，Gc. 颗粒细胞，YG. 卵黄颗粒，Sc. 支持细胞，LL. 小叶内腔，PSP. 初级精母细胞，ST. 精子细胞，SZ. 精子。比例尺50 μm

Fig. 7 Morphological structure of ovary and testis of *S. argus* at different development stages

1, 2, 3, 4 are the morphological structure of ovary at the development stages of Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ, respectively.5, 6, 7, 8 are the morphological structure of testis at the development stages of Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ， respectively. Oo. oogonia， Oc. oocyte, Gc. granulose cells, YG. yolk granules， Sc. sertoli cell, LL. primary spermatocyte, ST. spermatid, SZ. spermatozoa. Scale bar=50 μm

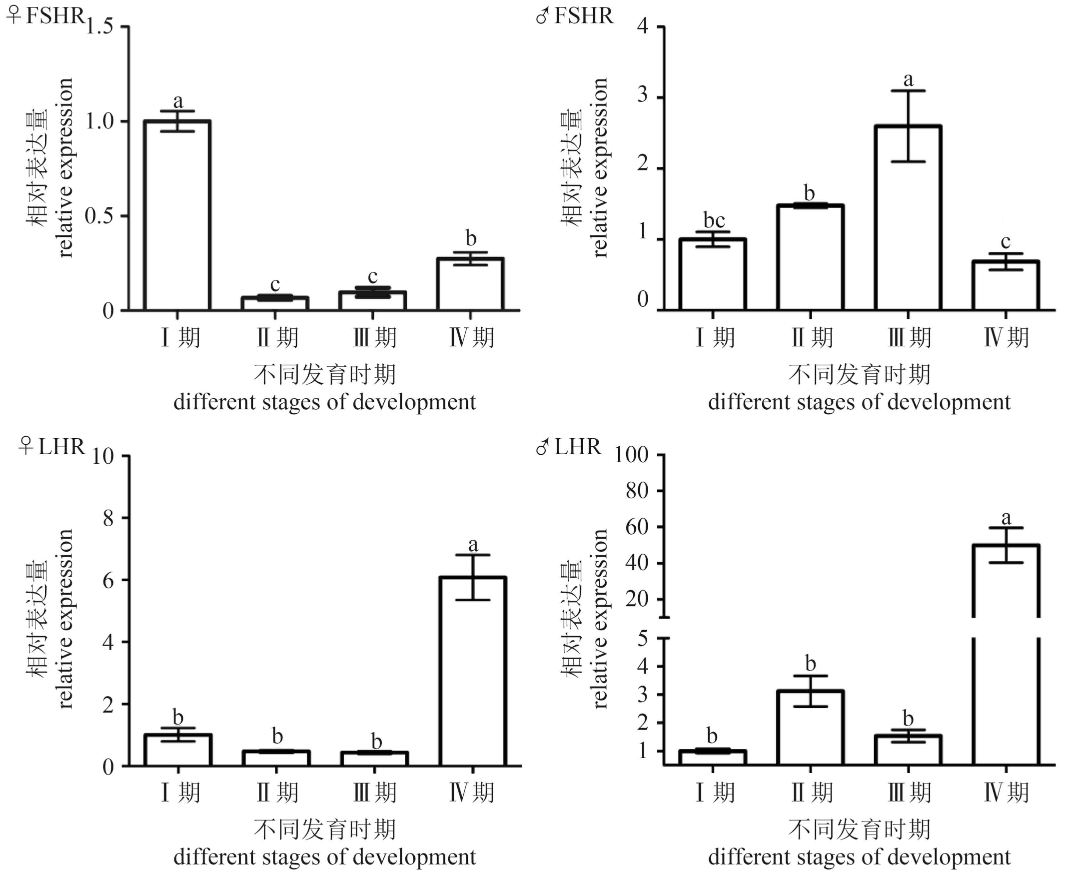


图 8　金钱鱼卵巢、精巢不同发育时期*FSHR*和*LHR*基因mRNA 的相对表达分析

不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Fig. 8　Analysis of FSHR and LHR mRNA expression in different development stages in ovary and testis of *S. argus* by Real-time PCR

Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$)

这些都充分证明克隆所得到的序列是金钱鱼GtRHs目的基因。金钱鱼性腺发育可分为4个时期，不同发育阶段雌、雄的GtHRs的mRNA表达水平不同。金钱鱼卵巢中*FSHR*在Ⅰ期表达水平较高，随着卵巢发育，表达水平显著下降。在许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)卵巢中，*FSHR*具有相似的表达方式，在卵巢的发育早期显著高于后期[16]。在卵黄生成的早期，尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)*FSHR*基因也有比较高水平的表达[17]。推测金钱鱼*FSHR*在卵巢的早期发育中起着重要的作用。不同的鱼类，在卵巢发育早期*FSHR*的表达水平也不相同。在斑马鱼中，*FSHR*表达水平随着卵黄的生成而逐渐升高，在卵黄生成的中期达到最高水平，随后开始下降[6]。在罗非鱼中，*FSHR*在整个生殖周期的表达水平都较低，但在排卵后开始逐渐升高[17]。同样在红点鲑(*O. rhodurus*)[18]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)[15]中，*FSHR*表达量都是在卵黄生成早期开始上调，并在整个卵黄生成过程中持续上升，最后在卵黄生成后期达到最高。以上结果表明*FSHR*在鱼类卵巢的表达方式主要有两种，金钱鱼的*FSHR*属于在卵巢发育前期有较高表达水平，出现两种表达方式的原因可能是由于鱼类的生长易受外界因素影响，不同鱼类进化出不同的表达方式。在雄性大西洋鲑中，*FSHR*的表达水平在早期发育阶段明显高于后期[9]。且金钱鱼*FSHR*在Ⅲ期精巢中的表达量明显高于在Ⅳ期精巢中的表达量，这表明*FSHR*在精巢发育和精子发生阶段起重要作用。金钱鱼*LHR*基因mRNA在卵巢中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期表达水平较低，且在Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期之间没有明显变化($P>0.05$)，而在Ⅳ期时，*LHR*基因mRNA表达水平均有显著的升高($P<0.05$)。在雌性斑马鱼排卵期，颗粒细胞中充满卵黄颗粒，同时*LHR*的表达水平达到最高[6]。

金钱鱼*LHR*在卵巢中的表达方式印证了上述研究结果。在雄性金钱鱼中，LHR的表达随着精巢的发育逐渐升高，在Ⅳ期达到最高。在真鲷中，LHR主要调控排卵和排精[19]，雄性金钱鱼*LHR*的表达方式与之相符。Rt-PCR结果显示了不同时期GtHRs的表达水平，揭示了金钱鱼*FSHR*主要与早期内源性卵黄的生成和精子的发生有关，*LHR*的主要作用是促进配子成熟和排出。本研究首次克隆得到金钱鱼*FSHR*和*LHR*基因cDNA序列全长，并对其在精巢和卵巢不同发育时期中的表达进行了分析，初步揭示了*FSHR*和*LHR*在金钱鱼生殖周期中的作用，为进一步研究硬骨鱼类的繁殖及生理作用奠定基础。GtHRs或GtHs (FSH和LH)在金钱鱼性腺生长发育过程中的具体机制还需进一步探究。

参考文献：

[1] Sambroni E, Rolland A D, Lareyre J J, *et al*. FSH and LH have common and distinct effectson gene expression in rainbow trout testis[J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2012, 50(1): 1-18.

[2] Gharib S, Wierman M, Shupnik M, *et al*. Molecular biology of the pituitary gonadotropins[J]. Endocrine Reviews, 1990, 11(1): 177-199.

[3] 林浩然. 鱼类生理学. 广州: 广东高等教育出版社, 1999: 146-202.
Lin H R. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 1999: 146-202.

[4] Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mañanós E L, *et al*. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors[J]. General & Comparative Endocrinology, 2010, 165(3): 412-437.

[5] Hirai T, Oba Y, Nagahama Y. Fish gonadotropin receptors: molecular characterization and expression during gametogenesis[J]. Fisheries Science, 2002, 68(2): 675-678.

[6] So W K, Kwok H F, Ge W. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormonesubunits-their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity[J]. Biology of Reproduction Official Journal of the Society for the Study of Reproduction, 2005, 72(6): 1382-96.

[7] Gen K, Yamaguchi S, Okuzawa K, *et al*. Physiological roles of FSH and LH in red seabream (*Pagrus major*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2003, 28(1): 77-80.

[8] 陈晓燕, 温海深, 何峰, 等. 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)促性腺激素受体在雄性生殖周期中的表达[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(2): 201-206.
Chen X X, Wen H S, He F, *et al*. Expression analysis of fshr and lhr mrnas during the reproductive cycle of males *cynoglossus semilaevis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(2): 201-206.

[9] Kusakabe M, Nakamura I, Evans J, *et al*. Changes in mRNAs encoding steroid genicacute regulatory protein, steroid genic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes[J]. Journal of Endocrinology, 2006, 189(3): 541-554.

[10] Gersende M, Monika S. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. General & Comparative Endocrinology, 2006, 149(1): 108-117.

[11] Kwok H F, So W K, Wang Y, *et al*. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I Cloning andcharacterization of zebrafish folliclestimulating hormone and luteinizing hormone receptors evidence for their distinct functions in follicle development[J]. Biology of Reproduction, 2005, 72(6): 1370-1381.

[12] 兰国宝, 阎冰, 廖思明, 等. 金钱鱼生物学研究及回顾[J]. 水产科学, 2005, 24(7): 39-40.
Lan B G, Yan B, Liao S M, *et al*. Biology of spotted scat *Scatophagus argus*: a review[J]. Fisheries Science, 2005, 24(7): 39-40.

[13] Hu P, Li S Q, Zhong Y, *et al*. Identification of fxyd genes from the spotted scat (*Scatophagus argus*): molecular cloning, tissue-specific expression, and response to acute hyposaline stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 174: 15-22.

[14] 崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. 水产学报, 2013, 37(5): 696-704.
Cui D, Liu Z W, Liu N X, *et al*. Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(5): 696-704.

[15] 陈晓燕, 温海深, 何峰, 等. 半滑舌鳎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.
Chen X Y, Wen H S, He F, *et al*. Cloning of FSHR and expression analysis during the reproductive cycle in female *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(9): 1309-1318.

[16] Mu W J, Wen H S, Feng H, *et al*. Cloning and expression analysis of folliclestimulating hormone and luteinizing hormone receptor during the reproductive cycle in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*)[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2013, 39(6): 1419-1430.

[17] Hirai T, Oba Y, Yao Z X, *et al*. Putative gonadotropin receptors in tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonads: cDNA cloning and expression during oogenesis[J]. International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, 2000: 201.

[18] Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, *et al*. Cloning, functional characterization, and expression of agonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1999, 263(2): 584-590.

[19] Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran 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.

Gene cloning of gonadotropic hormone receptors and their mRNA expressions at different development stages of the gonad in *Scatophagus argus*

ZHANG Guang ,　WANG Wu ,　DUAN Zhengyu ,　GUI Lang ,
SU Maoliang ,　MU Xingjiang ,　ZHANG Junbin *
(*College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai*　201306, *China*)

Abstract: In the present study, follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) and luteinizing hormone receptor (LHR) genes were cloned by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA 5′ and 3′ ends (RACE) in *Scatophagus argus*. The full-length of FSHR cDNA was 2538 bp, encoding a 702 amino acid protein and the full-length of LHR cDNA was 3315 bp, encoding a 722 amino acid protein. Both of them contain seven TM helix domains, a feature of glycoprotein hormone receptor (GHRs) family. Multiple sequence alignment shows that *S. argus* GtHRs have the highest homology with that of *Dicentrarchus labrax*. mRNA expression patterns showed that a high expression level of FSHR was detected at stage I in ovary, followed by an obvious decrease at stage II, III and IV. In the testis, the expression of FSHR gene increased gradually during early stages (stage I, II and III), and apparently reduced at stage IV. Our results indicates that according to H.E staining, sperm maturation started at stage III, implying FSHR played an important role in early stages of the gonadal development, and LHR is vital for sperms/oocytes maturation and release as well as sperms.

Key words: *Scatophagus argus*; FSHR; LHR; sequence analysis; gene expression

Corresponding author: ZHANG Junbin. E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272662); Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (14YZ117)