

# 半滑舌鲷促滤泡激素基因全长 cDNA 的克隆与组织表达分析

王珊珊<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>2\*</sup> 史 宝<sup>2</sup> 温海深<sup>1</sup> 徐永江<sup>2</sup> 李晓晓<sup>2</sup> 刘芝亮<sup>2</sup> 王妍妍<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>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, 266071)

**摘 要** 从半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther 脑垂体中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术首次克隆得到半滑舌鲷促滤泡激素 (FSH) 基因全长 cDNA 序列。半滑舌鲷 FSH cDNA 全长为 541bp, 开放阅读框为 393bp, 编码 130 个氨基酸 (GenBank 序列登录号: JQ277933)。发现一个 N-糖基化位点: 24~27 NTT。与其他脊椎动物的 FSH 成熟肽氨基酸序列同源性比较表明, 半滑舌鲷 FSH 与鲽形目和鲈形目鱼类 FSH 同源性为 42%~49%, 与鲤形目和高等脊椎动物 FSH 同源性为 27%~31%。用 MEGA 4.0 软件构建了 NJ 树, 获得的进化树表明, 半滑舌鲷 FSH 与其他鱼类 FSH 聚类, 亲缘关系较近。实时荧光定量组织表达分析表明, FSH mRNA 除在垂体中大量表达外, 其他组织也有表达, 尤以脑、性腺表达量较高。半滑舌鲷 FSH mRNA 在垂体以外组织中的广泛表达, 暗示 FSH 可能具有广泛的生理功能。

**关键词** 半滑舌鲷 促滤泡激素基因 cDNA 克隆 组织表达 实时荧光定量 PCR

**中图分类号** S96 **文献识别码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0015-09

## Full length cDNA cloning and tissue expression analysis of follicle-stimulating hormone (FSH) from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther

WANG Shan-shan<sup>1,2</sup> LIU Xue-zhou<sup>2\*</sup> SHI Bao<sup>2</sup> WEN Hai-shen<sup>1</sup>  
XU Yong-jiang<sup>2</sup> LI Xiao-xiao<sup>2</sup> LIU Zhi-liang<sup>2</sup> WANG Yan-yan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup>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, 266071)

**ABSTRACT** Total RNA was extracted from the pituitary gland of half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther, and the follicle-stimulating hormone (FSH) was cloned using

国家鲜鲽类产业技术体系(CARS-50)、国家自然科学基金(31201982)、公益性农业行业专项项目(200903005)和 2012 年度留学人员科技活动项目择优资助经费共同资助

\* 通讯作者。E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830506

收稿日期: 2012-08-14; 接受日期: 2012-12-07

作者简介: 王珊珊(1986-), 女, 硕士, 主要从事鱼类繁殖生理学研究。E-mail: 0610wangshan@163.com

RT-PCR and RACE technology for the first time. The obtained FSH cDNA is 541bp, and the open reading frame is 393bp encoding a peptide of 130 amino acids. This cDNA sequence was submitted to GenBank with accession No. JQ277933. One N-glycosylation site was found in the deduced amino acid sequence(NTT,24-27). Multiple amino acid sequence alignment was performed with other vertebrates. It showed that FSH peptide of half-smooth tongue sole was more similar to their orthologs of Pleuronectiformes and Perciformes with 42%-49% identity, as to Cypriniformes and Mammalia with 27%-31% identity. The pairwise distances were computed and phylogenetic tree was constructed using NJ method based on the codon sequences of the chosen species by MEGA 4.0 software. The result indicated that the FSH of half-smooth tongue sole was clustered with other fish FSH, and the half-smooth tongue sole gene shared the high homology with teleost. Real-time PCR analysis showed that FSH mRNA was expressed at the highest level in pituitary, and also strong amplification signals were detected in all other tissues, especially in brain and gonad. Wide expression of FSH mRNA of half-smooth tongue sole in non-pituitary tissues may suggest that it has more physiological functions.

**KEY WORDS** *Cynoglossus semilaevis* Günther FSH gene cDNA cloning  
Tissue expression Quantitative real-time PCR

促性腺激素(Gonadotropin Hormone,GTH)是由脊椎动物脑垂体合成和分泌的促进生殖细胞生长、发育、成熟、排精及排卵的一类糖蛋白激素。哺乳动物的促性腺激素有两种,即促滤泡激素(Follicle Stimulating Hormone,FSH)和促黄体生成素(Luteinizing Hormone,LH)。早期研究认为,鱼类只有一种类似LH的促性腺激素;直到1975年,加拿大学者用伴刀豆球蛋白-琼脂糖凝胶(Concanavalin-A-Sepharose)进行亲和层析,从大麻哈鱼 *Oncorhynchus keta* 脑垂体中分离出两种GtH,即GTH-I和GTH-II(Idler *et al.* 1975)。通过功能研究表明,鱼类的GTH-I对应于哺乳动物的FSH(Van der Kraak *et al.* 1992)。

性腺发育与配子成熟主要受下丘脑-垂体-性腺轴(Hypothalamus-Pituitary-Gonad axis,HPG)3个不同层次的内分泌系统调控。FSH由脑垂体前叶细胞分泌,主要通过血液循环到达卵巢,刺激卵巢分泌性类固醇激素,促进卵巢生长发育(林浩然 1999)。在大麻哈鱼中,用放射性同位素标记检测到FSH受体(FSHR)存在于初级卵泡的颗粒细胞,揭示FSH对卵泡的发育作用可能在初级卵泡就开始了(Miwa *et al.* 1994; Yan *et al.* 1992)。用放射免疫法测定大麻哈鱼(Prat *et al.* 1996)和虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* (van den Hurk 1982)的促性腺激素,发现FSH在性腺发育早期,即精子发生和卵黄生成阶段起主导作用,此时脑垂体和血液中的GTH以FSH为主,尤其脑垂体中的FSH含量大约是LH的10倍,刺激卵黄的生成。Natio等(1991)、Weltzien等(2003)分别采用原位杂交技术和Western blot杂交技术研究虹鳟和大西洋庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus* GTH水平的变化规律,发现FSH的产生和释放只用来刺激早期阶段的性腺发育。

半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* Günther 是重要的海水养殖经济鱼类,属鲽形目Pleuronectiformes、舌鲷科Cynoglossidae、舌鲷属 *Cynoglossus*,生长速度快,经济价值高,洄游距离短,是理想的增殖放流和人工养殖种类(李思忠等 1995)。半滑舌鲷生殖调控及规模化人工繁育技术已获得重大突破(柳学周等 2005、2006),推动了半滑舌鲷产业的快速发展。近些年,随着分子生物学技术的发展,对半滑舌鲷群体遗传变异、性别和繁殖相关基因的克隆表达分析等方面进行了研究。目前多种鱼类的FSH的cDNA序列已成功克隆(Querant *et al.* 2004; Kajimura *et al.* 2001; Hellqvist *et al.* 2004),但是半滑舌鲷FSH的研究尚未见报道。本研究应用分子生物学方法,克隆了半滑舌鲷FSH的全长cDNA序列,对FSH mRNA在繁殖期不同组织的表达进行研究,为进一步阐明FSH的生理功能奠定基础,同时也为鱼类生殖调控与人工繁育提供重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用半滑舌鳎于 2011 年 9~10 月采自山东青岛忠海水产有限公司。实验鱼为野生亲鱼自然产卵后,人工育苗得到的健康苗种经室内人工养成达到性成熟年龄的 F1 代亲鱼。所用 4 尾雌性亲鱼全长 53~66 cm,体重 1 266.3~2 271.0 g。将半滑舌鳎各组织样品取出,取组织样品时,各样品间不存在交叉污染,组织样品迅速放入液氮中冻存,然后转入-80℃冰箱保存备用。Davidson's 液固定卵巢组织,用于组织学观察。

### 1.2 卵巢组织学分析

将固定在 Davidson's 液中的卵巢组织取出,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。LEICA RM 2235 型切片机(德国)切片,厚度为 5~7 μm, H. E 染色,中性树胶封片,LEICA DW4000B 型显微镜(德国)下观察及显微摄影。参考柳学周等(2009)半滑舌鳎卵巢发育组织学研究中的分类标准,对半滑舌鳎卵巢组织切片的 H. E 染色结果进行分析,确定卵巢发育情况。

### 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

取-80℃保存的半滑舌鳎各组织:脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、卵巢、肌肉,用宝生物工程(大连)有限公司的 RNAiso Plus 抽提总 RNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,采用 Nanodrop 2000 (美国 Thermo 公司)测定抽提的总 RNA 浓度。各组织及部分垂体 RNA 分别用宝生物(大连)有限公司的反转录试剂合成 cDNA 第一链。20 μl 反转录体系中最大使用 1 μg 总 RNA,合成的 cDNA 于-20℃保存,用于荧光实时定量 PCR。

### 1.4 半滑舌鳎 FSH 基因克隆

通过 RT-PCR 反应获得半滑舌鳎 FSH 基因的保守片段,所用引物为 FSHF 和 FSHR(表 1)。PCR 扩增体系为 cDNA 2 μl, PCR 缓冲液 5 μl, dNTP 0.5 μl, 引物各 0.5 μl, *Taq* 酶 0.2 μl, 补无菌水至 25 μl。反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60.8℃ 30 s, 72℃ 50 s 共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

提取新鲜垂体组织总 RNA,用于 5'-RACE 及 3'-RACE cDNA 第一链合成。合成的 cDNA 第一链分别用 Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech 公司)进行 PCR 扩增,各操作步骤、反应体系以及反应程序均按照 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 公司)使用手册进行。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切下目的条带,使用 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 回收纯化 PCR 产物(操作步骤严格按照 OMEGA 公司胶回收试剂盒说明书)。回收的 DNA 连接到 pEASY-T1 克隆载体,重组子转化至 Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞,在含氨苄青霉素的 LB 平板上 37℃ 培养过夜,挑取阳性克隆送至北京华大公司测序。实验中所用的引物见表 1。

表 1 实验所用引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers used for PCR analysis

| 引物名称 Primer | 引物序列 Nucleotide sequence(5'-3') |
|-------------|---------------------------------|
| FSHF        | AGCAGAGGATGMAGCTGGT             |
| FSHR        | TGGCCACAGGGTAGGTSAC             |
| FSHGSP1     | GCCACAGGGTAGGTCACCTTCTCTGGAC    |
| FSHNGSP1    | GGTCCAGTCTCCGTTGCACGTCTTCTGC    |
| FSHGSP2     | GTGCTGGCGATGGTTTGTCTCTGGGAAGG   |
| FSHF1       | TGATGGGTGTCCAGAGGAAG            |
| FSHR1       | CAACAAACCGTCCACAGTCC            |
| 18S F       | GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC         |
| 18S R       | AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC            |

## 1.5 序列分析

DNASTAR 软件分析蛋白分子量和等电点。所得序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,分析半滑舌鳎 FSH 与其他物种的 FSH 同源性高低。使用 SignalP 3.0 Server 找出序列的成熟肽。使用 CBS 在线软件分析 N 糖基化位点。从 GenBank 中选择脊椎动物哺乳纲、鸟纲、爬行纲、两栖纲和鱼纲不同分类地位的物种的 FSH 序列,鱼纲分类到目,具体见表 2,这些序列用于同源性比较及进化树构建。运用 ClustalX 2 进行多重序列比对。系统进化树构建使用 MEGA 4.0 软件中 Neighbor-joining 法(自展值为 1000)。

表 2 同源性比较及进化树中引用的基因序列号

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

| 分类 Category            | 种名 Species             | 学名 Scientific name               | 登录号 Accession number |
|------------------------|------------------------|----------------------------------|----------------------|
| 硬骨鱼纲 Osteichthyes      |                        |                                  |                      |
| 鳎形目 Pleuronectiformes  | Tongue sole            | <i>C. semilaevis</i>             | AFC90009             |
|                        | Senegalese sole        | <i>Solea senegalensis</i>        | ABW81403             |
|                        | Atlantic halibut       | <i>H. hippoglossus</i>           | CAD10501             |
|                        | Japanese flounder      | <i>Paralichthys olivaceus</i>    | AAK58601             |
| 鲈形目 Perciformes        | European seabass       | <i>Dicentrarchus labrax</i>      | AAN40506             |
|                        | Orange-spotted grouper | <i>Epinephelus coioides</i>      | AAO31971             |
|                        | Blotched snakehead     | <i>Channa maculate</i>           | AAS01610             |
|                        | Three-spot gourami     | <i>Trichogaster trichopterus</i> | Q9PW99               |
|                        | Striped seabass        | <i>Morone saxatilis</i>          | Q91120               |
|                        | Red seabream           | <i>Pagrus major</i>              | BAB18563             |
|                        | Mozambique tilapia     | <i>Oreochromis mossambicus</i>   | AAK83079             |
| 鲱形目 Tetraodontiformes  | Grass puffer           | <i>Taki fugu ni phobles</i>      | BAJ12081             |
| 银汉鱼目 Atheriniformes    | Pejerrey               | <i>Odontesthes bonariensis</i>   | AAP85606             |
| 鲢形目 Cyprinodontiformes | Mummichog              | <i>Fundulus heteroclitus</i>     | P30971               |
| 鲤形目 Cypriniformes      | Zebrafish              | <i>Danio rerio</i>               | NP_991187            |
|                        | Goldfish               | <i>Carassius auratus</i>         | Q98848               |
|                        | Common carp            | <i>Cyprinus carpio</i>           | O13050               |
| 鲑形目 Siluriformes       | Channel catfish        | <i>Ictalurus punctatus</i>       | Q9DG81               |
| 鲑形目 Salmoniformes      | Rainbow trout          | <i>O. mykiss</i>                 | BAB17686             |
|                        | Cherry salmon          | <i>Oncorhynchus masou</i>        | P48252               |
|                        | Lenok                  | <i>Brachymystax lenok</i>        | AAR99810             |
|                        | Arctic cisco           | <i>Coregonus autumnalis</i>      | P48250               |
|                        | Sweetfish              | <i>Plecoglossus altivelis</i>    | AAM92269             |
| 鳗鲡目 Anguilliformes     | European eel           | <i>Anguilla anguilla</i>         | AAN73407             |
|                        | Japanese eel           | <i>Anguilla japonica</i>         | Q9YGK3               |
|                        | White-spotted conger   | <i>Conger myriaster</i>          | BAB97390             |
| 鲟形目 Acipenseriformes   | Siberian sturgeon      | <i>Acipenser baerii</i>          | CAB93504             |
| 两栖纲 Amphibia           | Japanese frog          | <i>Rana japonica</i>             | BAD16757             |
| 爬行纲 Reptilia           | Reeves's turtle        | <i>Mauremys reevesii</i>         | BAB92948             |
| 鸟纲 Aves                | Japanese quail         | <i>Coturnix japonica</i>         | BAC01164             |
| 哺乳纲 Mammalia           | Human                  | <i>Homo sapiens</i>              | NP_001018090         |

## 1.6 荧光实时定量 PCR

为了检测半滑舌鳎体内 FSH 基因的表达情况,取 4 条性成熟的半滑舌鳎雌鱼的脑、垂体、鳃、心和头肾等组织,按照 1.3 的方法合成 cDNA 第一链。根据克隆得到的半滑舌鳎 FSH cDNA 的序列,设计并合成实

时定量 PCR 引物 FSHF1 和 FSHR1,同时合成作为内参的 18S 基因的引物 18S F 和 18S R。实时定量 PCR 反应体系参考 SYBR Premix Ex Taq™ II (宝生物工程(大连)有限公司,大连)试剂盒,使用 2-step 法,反应条件为 95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 22 s 共 40 个循环。实时定量 RT-PCR 反应及信息的收集都在 Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 上进行。程序运行完成后进行熔解曲线分析以确定引物及反应是否正常。为保证结果的可靠性,对每一样品的分析均重复 3 次。使用 18S 基因作为内参对照,用以校正所有样品中 RNA 的量。

根据扩增曲线得到的 CT 值(荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数),计算出目标基因 FSH 和对照基因 18S CT 值的差异  $\Delta CT$ ;进而以垂体作为参照样本,计算出其他不同样品  $\Delta CT$  值相对于垂体的  $\Delta CT$  值的差值  $\Delta \Delta CT$ 。所得实验数据采用 SPSS(13.0 版本)统计进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan's 多重比较分析, $P < 0.05$  表示差异显著。最终依据  $2^{-\Delta \Delta CT}$  方法(Livak *et al.* 2001),制作出各组织 mRNA 相对表达量的关系图表。

## 2 结果

### 2.1 半滑舌鳎卵巢组织学分析

通过半滑舌鳎卵巢 H.E 染色分析,观察到卵巢中存在不同发育时期的卵母细胞。卵巢中含有 II 时相卵母细胞、III 时相卵母细胞、IV 时相卵母细胞和 V 时相卵母细胞。此时期卵巢以 V 时相卵母细胞为主,卵母细胞的核消失,细胞质中含有粗大的卵黄颗粒;确定卵巢已经发育至 V 期(图 1)。

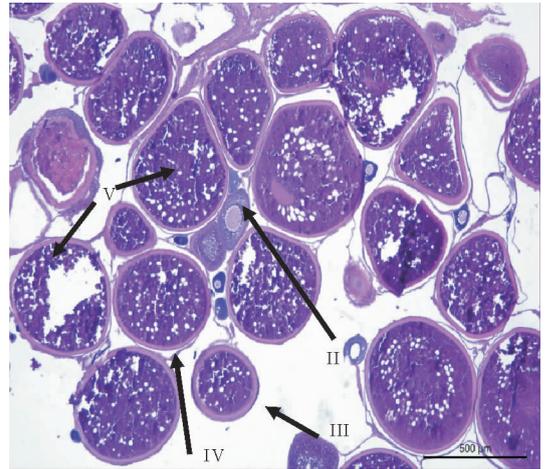
### 2.2 FSH 序列分析

通过 RT-PCR 方法,使用引物 FSHF 和 FSHR 获得长度为 279bp 的保守片段。经 RACE 反应后克隆测序,将 5'-RACE 和 3'-RACE 所得片段与所获得保守序列拼接得到 FSH 基因 cDNA 全长,其长度为 541bp,其开放阅读框为 393bp,编码了含 130 个氨基酸的蛋白,其分子量为 14kD,等电点为 7.3;第 1~27 个氨基酸为信号肽,成熟肽序列包含 12 个保守的半胱氨酸残基(Cys),且此序列 3 端非编码区含有一个加尾信号 AATAAA(图 2)。该序列已提交至 GenBank(序列号 JQ277933)。

### 2.3 FSH 氨基酸序列比对及同源性分析

半滑舌鳎 FSH 成熟肽与鲽形目鱼类 FSH 成熟肽的相似性分别为塞内加尔鳎 *Solea senegalensis* 46%、庸鲽 *Hippoglossus hippoglossus* 45%和牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 49%。半滑舌鳎 FSH 成熟肽与鲆形目鱼类 FSH 成熟肽的相似性分别为狼鲆 *Dicentrarchus labrax* 46%、斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 44%和真鲷 *Pagrus major* 48%。半滑舌鳎 FSH 成熟肽与鲤形目鱼类 FSH 成熟肽的相似性分别为金鱼 *Carassius auratus* 31%和斑马鱼 *Danio rerio* 27%。半滑舌鳎 FSH 成熟肽与哺乳纲人类 *Homo sapiens* FSH 成熟肽的相似性为 27%(图 3)。

半滑舌鳎的 FSH 成熟肽与其他硬骨鱼类和人类的 FSH 进行多序列比对时发现,半滑舌鳎 FSH 氨基酸具有糖蛋白激素保守的 12 个半胱氨酸残基。在半滑舌鳎的 FSH 成熟肽的氨基酸序列中,发现了 1 个 N-糖基化位点:24~27 NTT。



V 期卵巢,黑色箭头所指为不同时相卵母细胞  
Ovary in Stage V, the black arrow shows oocytes  
in the different development phase

图 1 半滑舌鳎卵巢组织学

Fig. 1 Ovarian histology of *C. semilaevis*

```

-53          ACAGGGGGTCTGTATTATGCTGTAGAGAGTCAAAGGAGGAGGAAGACTACA
1          ATGTGGTTCAGCAGAGCTCCAAAGAGGTGCAGCTGGTTGTCATGGCAGCAGTGTGGCG
1          M W F S R A P K R V Q L V V M A A V L A
61          ATGGTTTGTCTGGGAAGGGTGCAGCATTGACTGTCGTCGGATCCTTACCACCATCTCA
21          M V C P G K G C S I D C R P I L T T I S
121         GTGAAGGGTGTGGAATAACAGAACTGGTCAACACCACCGAGTGTACTGGACACTGCTTC
41          V K G C G I T E L V N T T E C T G H C F
181         ATGACGGATCACAGCTATCAAGGAAATCGGCAGCAGAGAAGACGTGCAACGGAGACTGG
61          M T D H S Y Q G N R Q Q Q K T C N G D W
241         ACCTATATGTTAAACGTATTGATGGGTGCCAGAGGAAGTACCTACCCTGTGGCCATG
81          T Y M F K R I D G C P E E V T Y P V A M
301         AAATGCAATTGTGCTGTATGTGATCTAAAGACCATGGACTGTGGACGGTTTGTGAAACT
101         K C N C A V C D L K T M D C G R F V E T
361         ATACCAACATGTGATCCATTGTTAAAAGAGTAAATGTACATAGTTACATTATTGGCTTC
121         I P T C D P L L K E *
421         AATTGGCTGGAAGTAAATAAACAGACATTACTCAAGTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
481         AAAAAAA

```

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 以黑框表示; \* 表示终止密码子; 加尾信号以下划线标出; 黑体为 Cys  
The start and stop codons are shown by box; asterisk indicates stop codon; the putative polyadenylation  
signal (AATAAA) is underlined; Cys is in bold face

图 2 半滑舌鲷 FSH 全长以及推断的氨基酸序列

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

|            |  |
|------------|--|
| Tilapia    | -EQDCSSGCRPKNISLPV-DTCG--FVDTTICEGQCFQKDPNFHTDDWPKQKTCN-GEWSY    |
| Mummichog  | -----CHLKNVSIPI-ERCGQRVCIHTTICEGLCFSEDAVFPSPDEAPEHRVON-GDWSY     |
| Goldfish   | -GSECRSSCRLTNLSITVSEECGSCITIDTTACAGLCKTQESVYRSPLMLSYQNTCNFREWTY  |
| Zebrafish  | AESECRSCRLTNIISITVSEECGSCVTIDTTACAGLCTMDRVYPSMAQHTQKVCNFKNLMY    |
| Trout      | -GTDCRYGCRLLNMTITVEREDCHGSITVTT--CAGLCETDLDLNYQSTWLPSPQVGNPKWESY |
| Eel        | -----STSCGLANISISVENECCGGCVTFNTTACAGLCFTQDSVYKSSLPYPQQACNFRDVVY  |
| Sturgeon   | -----SCALENITIGLEKDGCGNCVSVNTTSCAGRCLTQADVYKSSISLYTLQVCTFKEISY   |
| Human      | -----NSCELTNTIIATEKECECRFCISINTTWCAGCYTRDLVYKDPARPKIQKTCFTELKY   |
|            | 7 8 9 10 11 12   |
| Sole       | MFKRIDGCPPEE--VTYPVAMKONCAVCDLKT-DCGRFVETIPTCDPLLKE-----         |
| Senegalese | EVKRINGCPQA--VTYPVATNCHCTSCNPNT--HCGRFPGEIASCLSF-----            |
| Halibut    | EVKHINGCPVA--VTYPVARHCHCSICNLDDT--DCSPFPDIPGCLTTLHLSLSTLD        |
| Flounder   | EAKHINGCPVA--VTYPVARHCHCTVCPNGT--DCGRFPDIPSCLPF-----             |
| Seabass    | EVKHIKGCPVG--VTYPVARNCECTCNTENT--DCGRFPDIPSCLSF-----             |
| Grouper    | EVKHFQGGCPVG--VTYPVARNCKCTACNAGNT--YCGRFPDIPSCLSF-----           |
| Seabream   | EVKHIDGCPVA--ITYPVARSECTVCDTGNM--DCGRFPDIPKCPFF-----             |
| Tilapia    | EVKYTEQCPRG--FIYPVARKCECTACNANTD--CGTLSGYIPSC-----               |
| Mummichog  | EVKHIQGPCES--ITYPVATNCYCSACNTKDT--YCTRLYAHIPSC-----              |
| Goldfish   | ETYEFKGPAPADSIPTYPVALSCECSKNSDIT--DCGVLSQQTLCNAH-----            |
| Zebrafish  | KSYEFKGPAGVDSVFVYPVALSCECNQVNSDIT--DWGATSPQITSCSIH-----          |
| Trout      | EKVYLEGCPSGVNLPLF--IPVAKSCDCIKCKTDNT--DCDRISMATPSCIVNPLEM-----   |
| Eel        | ETVHLPGCPGMDLHFTYPVALSCECSKNTDST--DCGPLNTEVSGGLTH-----           |
| Sturgeon   | VYQLPNCEPHVDPFYTPVALSCECGCATDYT--DCGTLSLGPSCDFSQ--ED----         |
| Human      | ETVRVPGCAHHDADSLYTPVATQCHCGKCDSDST--DCTVRGLGPSYCSFG--EMKE----    |

灰色阴影代表半胱氨酸残基位点; 黑色阴影代表 N-糖基化位点

Gray shadow indicates the cysteine residues; black shadow indicates N-linked glycosylation sites

Sole 为半滑舌鲷 (Tongue sole), Senegalese 为塞内加尔鲷 (Senegales sole), Halibut 为庸鲽 (Atlantic halibut),

Flounder 为牙鲆 (Japanese flounder), Seabass 为狼鲈 (European seabass), Grouper 为斜带石斑鱼 (Orange-spotted grouper),

Seabream 为真鲷 (Red seabream), Tilapia 为莫桑比克罗非鱼 (Mozambique tilapia), Mummichog 为底鲱 (Mummichog),

Goldfish 为金鱼 (Goldfish), Zebrafish 为斑马鱼 (Zebrafish), Trout 为虹鳟 (Rainbow trout), Eel 为欧洲鳗鲡 (European eel),

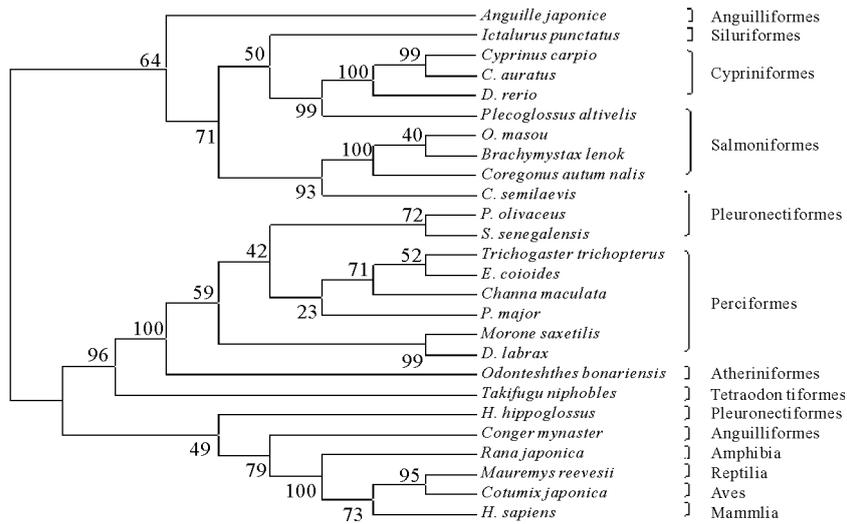
Sturgeon 为西伯利亚鲟 (Siberian sturgeon), Human 为人类 (Human)

图 3 半滑舌鲷 FSH 氨基酸与其他物种 FSH 氨基酸序列的比较

Fig. 3 Alignment of *C. semilaevis* FSH amino acid with other species

### 2.4 FSH 系统进化分析

通过 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 法构建 NJ 系统进化树(图 4),置信度检验 1 000 次。获得的进化树表明,硬骨鱼类 FSH 聚类亲缘关系较近,而与哺乳类和鸟类等亲缘关系较远。不同物种 FSH 氨基酸序列比较发现,半滑舌鳎 FSH 与鲽形目、鲈形目、鲑形目、银汉鱼目的 FSH 相似性(45%~50%)比鳗鲡目(26%~27%)、鲑形目(26%~28%)、鲤形目(23%~26%)和高等脊椎动物(21%~24%)FSH 同源性高。但是半滑舌鳎 FSH 与鲽形目中的其他鱼类 FSH 同源性相对低(45%~50%),与鲈形目 FSH 同源性较接近(47%~50%);这可能是导致鲽形目 FSH 不能聚为一簇的原因。



所用物种的 GenBank 的序列号见表 2

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

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

Fig. 4 Phylogenetic tree of the FSH from *C. semilaevis* and other vertebrates using NJ method in MEGA 4.0

### 2.5 FSH 基因在不同组织的表达分析

以 18S 基因为参照,研究繁殖期半滑舌鳎不同组织 FSH 基因的表达水平。实时荧光定量 PCR 检测结果发现,FSH 基因在脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝脏、脾脏、胃、肠、卵巢、肌肉 12 种组织中都有表达,但表达量有明显差异。如图 5 所示,在垂体中相对表达量最高。单因素方差分析结果显示,FSH mRNA 在垂体的表达与其他组织中的表达差异显著( $P < 0.05$ )。FSH mRNA 在脑和卵巢中表达量亦较丰富,尽管分别比垂体低 3 920 倍和 118 倍。另外,在鳃、心、头肾、肾、肝脏、脾脏、胃、肠、肌肉这 9 个组织中,FSH mRNA 虽然表达量很小,但仍可检测到表达。

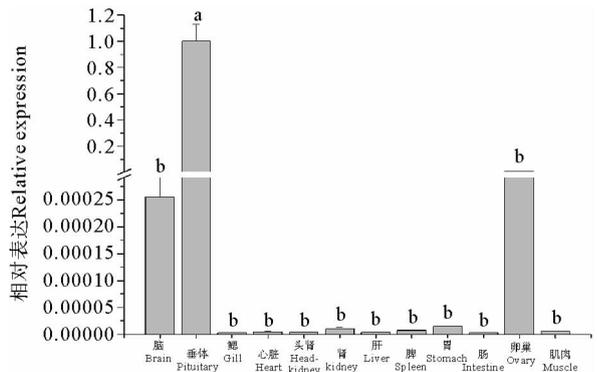


图 5 半滑舌鳎 FSH mRNA 在不同组织中的表达水平

Fig. 5 Expression level of FSH mRNA in tissues of *C. semilaevis*

### 3 讨论

#### 3.1 半滑舌鲷 FSH 基因克隆及序列分析

本研究运用 RT-PCR 和 RACE 技术获得了半滑舌鲷 FSH cDNA 的全长序列,并对半滑舌鲷的 FSH 与其他脊椎动物氨基酸序列的同源性进行比较。分析表明,半滑舌鲷 FSH 同鲷形目、鲈形目的 FSH 相似性较高,而同鲤形目和哺乳动物 FSH 的相似性相对低。半滑舌鲷 FSH 成熟肽序列包含 12 个半胱氨酸残基(Cys)和 1 个 N-糖基化位点(24~27 NTT),这反映出 FSH 在进化中高度的保守性。12 个保守的半胱氨酸残基在 FSH 和促性腺激素  $\alpha$  亚基(Common alpha subunit)结合形成稳定二聚体中起到重要作用。硬骨鱼类 FSH 结构的变化会影响到与受体结合能力及异源二聚体的稳定性(Kim *et al.* 2005)。有研究指出,鱼类中 GTH 和受体之间的反应不是一一对应的(Levavi-Sivan *et al.* 2010),大马哈鱼 FSH 与 FSHR 特异结合(Miwa *et al.* 1994; Yan *et al.* 1992),而玫瑰大麻哈鱼 *O. rhodurus* 的 FSH 既与 FSHR 结合也能与 LHR 结合(Oba *et al.* 1999)。另外有研究报道,FSH 一般包含两个 N-糖基化位点,这两个 N-糖基化位点都会影响激素与细胞受体的结合力,其中第 2 个 N-糖基化位点还会影响信号转导(曲宪成等 2007)。半滑舌鲷 FSH 不含第 1 个 N-糖基化位点,至于是否会影响 FSH 的空间结构以及生物活性,还有待深入研究。依据 Neighbor-joining 方法构建系统进化树,发现半滑舌鲷 FSH 与鲷形目中的其他鱼类 FSH 同源性(45%~50%)比鲈形目(47%~50%)相对较低,推测这可能是导致鲷形目 FSH 不能聚为一簇的原因。这也表明半滑舌鲷 FSH 一级结构和鲷形目鱼类 FSH 一级结构相差较大。鲷形目鱼类 FSH 同源性比较低,预示着 FSH 在鲷形目鱼类生理功能可能存在细微的差异,但这需要进一步的实验验证。

#### 3.2 FSH 基因在繁殖季节半滑舌鲷组织表达特征

本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测 FSH mRNA 在半滑舌鲷各组织的表达,结果发现,在垂体表达量最丰富,其他组织表达量都很小,脑和性腺相对表达量较高。利用半定量 RT-PCR 方法和免疫细胞化学检测方法,在尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 和红大马哈鱼 *O. nerka* (Parhar *et al.* 2003)、金头鲷 *Sparus aurata* (Wong *et al.* 2004)和斑马鱼(So *et al.* 2005)检测到 FSH mRNA 的表达,除垂体外,FSH mRNA 亦分布在其他组织中,本研究结果与之相似。采用实时荧光定量 PCR 方法检测到半滑舌鲷 FSH mRNA 在非垂体组织中也广泛表达,但有关该表达方式的生理机制尚未明确,暗示半滑舌鲷 FSH 可能具有更加广泛的垂体外的生理功能。FSH 在鱼类发育的不同时期的作用和表达量的多少存在差异(胡红霞等 2006),FSH 在鱼类性腺发育早期起主导作用。所以,需要对 FSH 基因在不同性腺、不同发育时期的表达进行更深入的研究,进而更全面地了解 FSH 在半滑舌鲷性腺发育中的生理作用。

### 参 考 文 献

- 李思忠,王惠民. 1995. 中国动物志:硬骨鱼纲. 鲷形目. 北京:科学出版社,68-334
- 曲宪成,刘颖,杨艳红,崔严慧,周正峰. 2007. 团头鲂促性腺激素  $\beta$  亚基 cDNA 的克隆和序列分析. 水生生物学报,31(3):377-385
- 林浩然. 1999. 鱼类生理学. 广州:广东高等教育出版社,158-165
- 胡红霞,张勇,刘晓春,贝锦新,朱华,林浩然. 2006. 史氏鲟两种促性腺激素  $\beta$  亚基 cDNA 克隆及序列进化分析. 动物学报,52(2):362-375
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁友,徐永江. 2005. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究. 海洋水产研究,26(5):7-15
- 柳学周,庄志猛,马爱军,陈四清,孙中之,梁友,刘寿堂,翟介明,曲建忠. 2006. 半滑舌鲷苗种生产技术的开发研究. 海洋水产研究,27(2):17-24
- 柳学周,徐永江,刘乃真,曲建忠,倪娜,赵明. 2009. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究. 渔业科学进展,30(6):25-35
- Hellqvist A, Bornestaf C, Borg B and 1 other. 2004. Cloning and sequencing of the FSH- $\beta$  and LH- $\beta$  subunit in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* and effects of photoperiod and temperature on LH- $\beta$  and FSH- $\beta$  mRNA expression. Gen Comp Endocrinol 135(2):167-174
- Idler DR, Bazar LS, Hwang SJ. 1975. Fish gonadotropin(s). II. Isolation of gonadotropin(s) from chum salmon pituitary glands using affinity chromatography. Endocrinol Res 2(3):215-235

- Kajimura S, Yoshiura Y. 2001. cDNA cloning of two gonadotropin  $\beta$  subunits (GTH- I  $\beta$  and - II  $\beta$ ) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Gen Comp Endocrinol* 122(2):117-129
- Kim DJ, Cho YC, Sohn YC. 2005. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 141(3):282-290
- Levavi-Sivan B, Bogerd J, Mananos EL and 2 others. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen Comp Endocrinol* 165(3):412-437
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25(4):402-408
- Miwa S, Yan L, Swanson P. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol Reprod* 50(3):629-642
- Natio N, Hyodo S, Okumoto N and 2 others. 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Res* 266(3):457-467
- Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y and 3 others. 1999. Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263(2):584-590
- Parhar IS, Soga T, Ogawa S and 1 other. 2003. FSH and LH- $\beta$  subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost. *Gen Comp Endocrinol* 132(3):369-378
- Prat F, Sumpter JP, Tyler CR. 1996. Validation of radioimmunoassay for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54(6):1375-1382
- Querat B, Yuta A, Adeline H and 3 others. 2004. Pituitary glycoprotein hormone  $\beta$  subunits in the Australian lungfish and estimation of the relative evolution rate of these subunits within vertebrates. *Biol Reprod* 70(2):356-363
- So WK, Kwok HF, Ge W. 2005. 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. *Biol Reprod* 72(6):1382-1396
- van den Hurk R. 1982. Effects of steroids on gonadotropic (GTH) cell in the pituitary of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, shortly after hatching. *Cell Tissue Res* 224(2):361-368
- Van der Kraak G, Suzuki K, Peter RE and 2 others. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol* 85(2):217-229
- Weltzien FA, Norberg B, Swanson P. 2003. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Gen Comp Endocrinol* 131(2):97-105
- Wong TT, Zohar Y. 2004. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Endocrinol* 145(11):5210-5220
- Yan L, Swanson P, Dickhoff WW. 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 47(3):418-427