

半滑舌鳎促黄体激素基因克隆和表达分析及其血清浓度测定

柳学周, 史宝, 王珊珊, 徐永江, 李晓晓

(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)

[摘要] 利用RACE技术首次克隆了半滑舌鳎脑垂体中促黄体激素(LH)基因cDNA全长序列。该基因全长670 bp, 开放阅读框为477 bp, 编码158个氨基酸。与其他脊椎动物的LH成熟肽氨基酸序列同源性比较表明: 半滑舌鳎LH与鲈形目和鲑形目同源性高58%~68%。另外, 半滑舌鳎LH含有12个保守的半胱氨酸残基和1个N-糖基化位点(19~21 NQT)。实时荧光定量组织表达分析表明, LH mRNA在脑、垂体、卵巢等组织中表达, 垂体中表达量最丰富, 其他组织尤以脑、性腺表达量较高, 推测半滑舌鳎LH可能具有广泛的垂体外生理功能; 实时荧光定量PCR方法对繁殖周期雌性半滑舌鳎LH表达水平进行测定, 结果表明, LH mRNA在II~VI各繁殖周期的脑、垂体、卵巢3种组织都有表达, 但表达水平有差异, 在IV、V期表达量最丰富, 说明LH主要促进卵母细胞最终成熟及排卵。利用¹²⁵I标记的放射免疫测定(RIA)技术检测繁殖周期半滑舌鳎血清LH浓度, 结果表明LH在V期含量最丰富, 也说明LH主要促进卵母细胞最终成熟及排卵。

[关键词] 半滑舌鳎; 促黄体激素(LH); cDNA克隆; 实时荧光定量PCR; 放射免疫测定

[中图分类号] S96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2014)09-0050-11

1 前言

脊椎动物生殖活动主要受下丘脑—脑垂体—性腺轴(HPG)3个不同层次的内分泌系统调控。促性腺激素(GTH)是由垂体合成和分泌的一类糖蛋白激素, 在鱼类的性腺发育、性类固醇及多肽类激素调控中起着至关重要的作用。脑垂体GTH包括促滤泡激素(FSH)和促黄体激素(LH), 它们是异源二聚体, 都是由 α 和 β 亚基以非共价键相连组成的二聚体结构, 其中 α 亚基氨基酸组成相同, 而 β 亚基明显不同, 具有特异的生物学作用。

通过对大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)GTH生物学功能的研究, 发现两种GTH在表达模式及生殖周

期不同发育阶段的水平有所不同^[1]。生理学研究表明, LH主要调控性腺成熟及排精/排卵^[2-4]。LH由脑垂体前叶细胞分泌, 通过血液循环到达性腺及其他组织, 鱼类LH相应生物学功能及水平的变化规律已有报道。用放射免疫法测定虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)^[5]的GTH, 发现LH在排精及卵母细胞最终成熟和排卵时大量分泌并达到最高峰, 促使卵母细胞和精子最终成熟并刺激排卵排精。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)是重要的海水养殖经济鱼类, 属秋季产卵型鱼类^[6], 自然繁殖季节为9—10月份, 卵巢内卵母细胞发育不同步, 是分批成熟多次产卵类型鱼类^[7]。近年来, 半滑舌鳎生殖调控及规模化人工繁育技术的研究获

[收稿日期] 2014-06-20

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-50); 国家自然科学基金项目(31201982); 国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042); 2012年度留学人员科技活动项目择优资助经费资助

[作者简介] 柳学周, 1959年出生, 男, 山东青岛市人, 研究员, 主要从事海水鱼类繁育理论与增养殖技术研究工作; E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

得重大突破^[8]。目前,国内外多种硬骨鱼类的LH cDNA序列已成功克隆,包括鲤形目^[9]、鲈形目^[10]、鳊鲂目^[11]和鲑形目^[12]等,但关于半滑舌鲷LH的研究尚未见报道。本文应用分子生物学和碘(¹²⁵I)放射免疫分析法(RIA),克隆得到半滑舌鲷LH的全长cDNA序列,对其mRNA组织表达及繁殖周期表达特征进行分析,并检测血浆LH在雌性半滑舌鲷繁殖周期的变化规律,揭示其可能的生理功能,以期为鱼类促性腺激素及生殖内分泌调控的研究提供科学依据,为提高半滑舌鲷全人工育苗和转季节育苗的生殖调控效率提供理论参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验用半滑舌鲷于2011年6月—2012年1月采自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。研究用15尾雌性亲鱼全长53~66 cm,体重1 266.3~2 271.0 g。亲鱼培育条件:全年开放流水培育,人工调控亲鱼发育及产卵过程,产卵前2个月左右进行亲鱼强化培育。水温由20℃逐渐提高到25℃,并使用遮光幕和白炽灯进行光照强度和光照节律的调节,控制光强200~300 lx,光照时间由8 h/d逐渐增加到12 h/d^[13]。将半滑舌鲷各组织样品取出,迅速于液氮中冻存,并转入-80℃冰箱保存备用,取样操作要避免各样品间的交叉污染。Davidedsons液固定卵巢组织用于组织学观察。

2.2 药品和试剂

RNA提取试剂RNAiso Plus、Taq酶、DNase I (RNasefree)、RNasin、SYBR Premix Ex TaqTM II试剂盒购自TaKaRa公司,SMARTTM RACE cDNA扩增试剂盒、Advantage 2 PCR试剂盒购自Clontech公司,E.Z.N.A Gel Extraction Kit普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自OMEGA公司,pEASY-T1载体、Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞购自全式金公司,其余均为国产分析纯。所有PCR引物由TaKaRa公司合成,序列由北京华大基因公司测定。血浆中LH含量的测定,试剂盒Iodine^{[125}I]-LH RIA Kit购自天津九鼎医学生物工程有限公司。

2.3 卵巢组织学分析

卵巢组织经常规梯度乙醇脱水后,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。参考半滑舌鲷卵巢发育组织学研究中的分类标准^[14],确定卵巢发育情况。

2.4 总RNA的提取和cDNA的合成

取-80℃保存的半滑舌鲷各组织:脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝、脾、胃、肠、卵巢、肌肉各50~100 mg,用RNAiso Plus抽提总RNA,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,采用Nanodrop2000(美国Thermo公司)测定总RNA浓度。各组织RNA经反转录合成cDNA第一链,于-20℃保存备用。

2.5 半滑舌鲷LH基因克隆

-20℃保存的cDNA作为PCR模板,通过RT-PCR反应获得半滑舌鲷LH基因的保守片段,所用引物为LHF和LHR。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)。回收产物与pEASY-T1克隆载体连接,重组子转化至Trans1-T1 Phage Resistant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。

根据扩增得到的序列设计特异性引物LHG-SP1、LHNGSP1(5' RACE)和LHGSP2(3' RACE),应用SMARTTM RACE cDNA扩增试剂盒克隆半滑舌鲷LH cDNA全长。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。PCR反应体系25 μL,反应条件为94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 2 min,共25个循环。取5 μL产物于1%琼脂糖凝胶电泳检测后,再次对目的条带进行回收、与载体连接、转化、筛选阳性克隆并测序。实验中所用的引物见表1。

2.6 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,分析半滑舌鲷LH与其他物种的LH同源性高低;从GenBank中选择脊椎动物哺乳纲和鱼纲的物种的LH序列,鱼纲分类到目,具体见表2。这些序列用于同源性比

表1 实验所用引物及其序列

Table 1 Sequences of the primers used for the PCR analysis

引物名称	引物序列(5'-3')
LHF	5'-CCATYTGACAGCGGYCAC-3'
LHR	5'-GCAGCTCAMAGCCACMGG-3'
LHGSP1	5'-GCTCAAAGCCACAGGGTACGTGATGGTG-3'
LHNGSP1	5'-GGGGCAGTCGGGGAGTTCAAATGTCT-3'
LHGSP2	5'-AAGATGCCGTCGTTTCAGTCACCCTTCA-3'
LHF1	5'-AGACGGTGTCTCTGGAGAAAGAAG-3'
LHR1	5'-ACGGCACCTTGATGTTGGT-3'
18S F	5'-GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC-3'
18S R	5'-AGTGGGGTTCAGCGGGTTAC-3'

较及进化树构建。运用Clustal X2进行多重序列比对;系统进化树构建使用MEGA4.0软件中Neighbor-joining法(自展值为1000)。

2.7 实时荧光定量PCR检测mRNA组织及周期表达差异

根据克隆得到的半滑舌鳎LH cDNA的序列,设

计并合成引物LHF1和LHR1,同时合成18S F和18S R作为内参引物。对繁殖周期半滑舌鳎表达分析,每个发育阶段分别取3条半滑舌鳎,并且每个实验鱼设定3个平行。取半滑舌鳎组织,合成cDNA第一链,应用实时定量PCR(qRT-PCR)方法检测LH mRNA在不同组织及繁殖周期的相对表达量。反应体系参考SYBR Premix Ex Taq™ II(宝生物工程(大连)有限公司)试剂盒说明书,使用2-Step法,反应条件为:95℃预变性30s,95℃预变性5s,60℃预变性22s,共40个循环。

实时荧光定量PCR反应在Eppendorf公司的Mastercycler ep realplex上进行,并收集反应信息。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,进行三次平行试验。所得数据采用SPSS(13.0)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。最后依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[15],制作出mRNA相对表达量的关系图表。

表2 同源性比较及进化树中引用的基因序列号

Table2 Genbank accession number of genes used for homologue and phylogenesis analysis

分类	种名	学名	序列号
硬骨鱼纲 鲽形目	半滑舌鳎(Tongue sole)	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	AFF59207
	塞内加尔鳎(Senegalese sole)	<i>Solea senegalensis</i>	ABW81404
	庸鲽(Atlantic halibut)	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	CAD10502
	牙鲆(Japanese flounder)	<i>Paralichthys olivaceus</i>	BAB47388
	狼鲈(European seabass)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	AAN40507
鲈形目	斜带石斑鱼(Orange-spotted grouper)	<i>Epinephelus coioides</i>	AAM28896
	鳢鱼(Blotched snakehead)	<i>Channa maculate</i>	AAS01609
	真鲷(Red seabream)	<i>Pagrus major</i>	BAB18564
	尼罗罗非鱼(Nile tilapia)	<i>Oreochromis niloticus</i>	AAP49576
银汉鱼目	银汉鱼(Pejerrey)	<i>Odontesthes bonariensis</i>	AAP85607
鲤形目	斑马鱼(Zebrafish)	<i>Danio rerio</i>	AAV31153
	金鱼(Goldfish)	<i>Carassius auratus</i>	Q98849
	鲤鱼(Common carp)	<i>Cyprinus carpio</i>	P01235
鲇形目	斑点叉尾鲷(Channel catfish)	<i>Ictalurus punctatus</i>	Q9DG80
	革胡子鲶(North African catfish)	<i>Clarias gariepinu</i>	P53543
鲑形目	虹鳟(Rainbow trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	BAB17687
	马苏大马哈鱼(Cherry salmon)	<i>Oncorhynchus masou</i>	P48253
	细鳞鲑(Lenok)	<i>Brachymystax lenok</i>	AAR99811
	大马哈鱼(Chum salmon)	<i>Oncorhynchus keta</i>	P10256
鳗鲡目	香鱼(Sweetfish)	<i>Plecoglossus altivelis</i>	AAM92270
	欧洲鳗鲡(European eel)	<i>Anguilla anguilla</i>	P27767
	日本鳗鲡(Japanese eel)	<i>Anguilla japonica</i>	BAD14302
	星康吉鳗(Whitespotted conger)	<i>Conger myriaster</i>	BAB97391
鲟形目	西伯利亚鲟(Siberian sturgeon)	<i>Acipenser baerii</i>	CAB93502
刺鱼目	三刺鱼(Three-spined stickleback)	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	CAD59185
哺乳纲	人类(Human)	<i>Homo sapiens</i>	NP_000885

2.8 血浆 LH 繁殖周期浓度测定

实验用鱼同2.1节实验材料。即在每次取样时都对半滑舌鲷进行抽血, 12 000 r/min、4 °C离心10 min, 吸取上清液。血清于-20 °C保存备用。采用碘(¹²⁵I)RIA法测定血浆中LH含量, 先制作标准曲线, 当相关系数R接近于1时, 曲线理想, 如图1所示。然后, 每个样品双管平行上样于FJ-2008PS γ 放射免疫计数器进行检测, 样品间再设两个平行。实验数据表示为平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD), 使用SPSS16.0软件进行显著性检验分析。

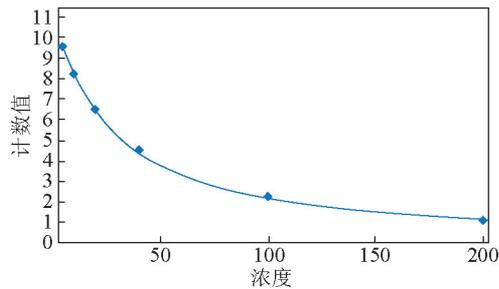


图1 血浆 LH 测定标准曲线 ($R=0.9997$)

Fig. 1 The determination standard curve of plasma LH ($R=0.9997$)

3 结果

3.1 LH 序列分析

通过实时荧光定量PCR方法, 使用引物LHF和LHR获得长度为197 bp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LH基因cDNA全长, 其长度为670 bp, 开放阅读框为477 bp, 编码158个氨基酸, 其分子量为18 kD, 等电点为5.9; 第1到第25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(见图2), 该序列已提交至GenBank(序列号JQ277934)。图3为半滑舌鲷LH氨基酸与其他物种的比较。

3.2 LH 氨基酸序列比对及同源性分析

半滑舌鲷LH成熟肽与鲷形目鱼类LH成熟肽的相似性分别为塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)66%、庸鲷(*Hippoglossus hippoglossus*)69%和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)67%。半滑舌鲷LH成熟肽

```

-46          ACATGGGAAACACAACCTCTACCGGCACCACACAGCCCCCTACAGG
1          ATGTGGTTGCAGTGCAGATGCATAGGTTGATCGTCCACCTGACACTAACCGTGTATTATA
1          M L V A V Q M H R L I V H L T L T L L L
61          CCAGCATCTTCACCTGATTGGTTGCTCACTCCTGCAGCGGCCCTTCATGCTGCCTGGCTGT
21          P A S S P D W L L T P A A A F M L P G C
121         CAGCTGATTAATCAGACGGTGTCTCTGGAGAAAGAAGGATGTCCCATCTGTCACTCAGTG
41          Q L I N Q T V S L E K E G C P I C H S V
181         GAAACCACCATTTCAGTGGCCACTGCAGAACAAGGAACCAACATCAAGGTGCCGTTG
61          E T T I C S G H C R T K E P N I K V P L
241         TACAAGATGCCGTCGTTTCAGTCACCCTTCAACGTGTCCAGCAGGTGTCACATATGAA
81          Y K M P S F Q S P F N V F Q Q V C T Y E
301         CACGTGCACTACAAGACATTTGAACTCCCCGACTGCCCCCGGTGTGGACCCACCATC
101         H V H Y K T F E L P D C P P G V D P T I
361         ACGTACCCGGTGGCTCTGAGCTGCCACTGCGGCCTGTGTGACATGAAAAGCGGACTGC
121         T Y P V A L S C H C G L C D M K K A D C
421         ACAGTGGAGAGTCTGCGACCTGATATCTGCATGAACGACGTCCTCTCAACTACTGATGT
141         T V E S L R P D I C M N D V L F N Y *
481         CACACAACCAGCAGCTGCCGCTGGACAACAATGGCTGGGAATTTAAATTTCAAATTTTCAT
541         GTCTTCAGATTTTGTGCTCACATTTAACCTGGAAAATAAAAAATATTGTATAACAAAAA
601         AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图2 半滑舌鲷LH全长以及推断的氨基酸序列分析

Fig. 2 cDNA sequence and putative amino acid sequence of the LH of *C.semilaewis*

注:起始密码子ATG和终止密码子TGA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

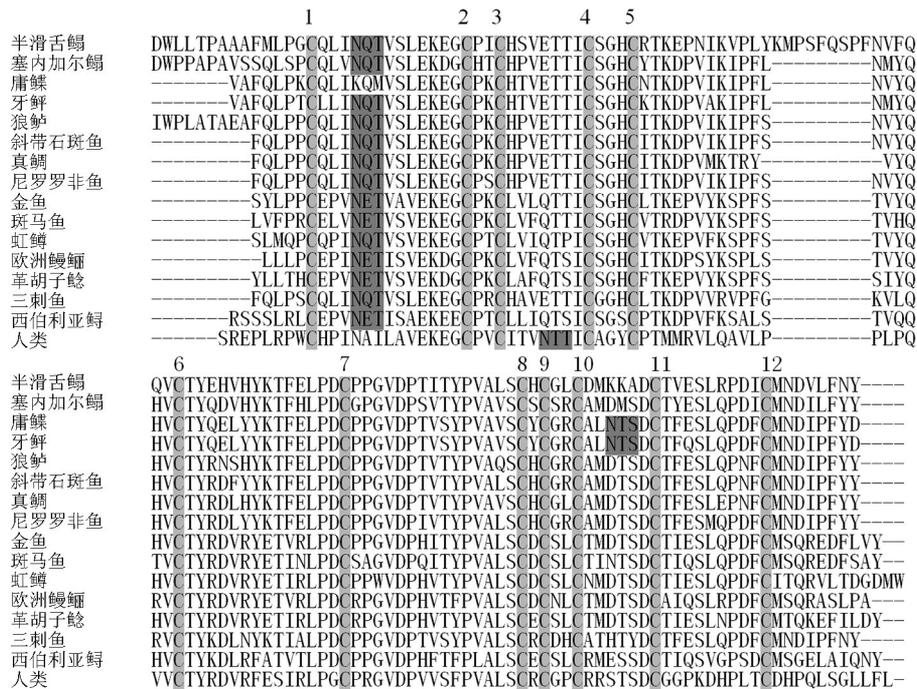


图3 半滑舌鲷LH氨基酸与其他物种LH氨基酸序列的比较

Fig. 3 Alignment amino acid of *C.semilaepis* LH with other species

注: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

与鲈形目鱼类LH成熟肽的相似性分别为斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 74 %、真鲷 (*Pagrus major*) 74 %和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 73 %。半滑舌鲷LH成熟肽与鲤形目鱼类LH成熟肽的相似性分别为金鱼 (*Carassius auratus*) 58 %和斑马鱼 (*Danio rerio*) 54 %。

半滑舌鲷的LH成熟肽与其他硬骨鱼类和人类的LH进行多序列比对时发现,半滑舌鲷LH氨基酸具有糖蛋白激素保守的12个半胱氨酸残基。在半滑舌鲷的LH成熟肽的氨基酸序列中,发现了一个N-糖基化位点:19~21 NQT;该糖基化位点在大多数硬骨鱼类是保守的。在半滑舌鲷成熟肽序列中存在与其他动物高度保守的特征基序如LH的第4个半胱氨酸残基位点和第5个半胱氨酸残基位点之间存在着硬骨鱼类特异性的Cys-Ser-Gly-His(CS-GH)区域。

3.3 LH系统进化分析

通过MEGA4.0软件Neighbor-Joining法构建NJ系统进化树(见图4),置信度检验1000次,获得的进化树表明硬骨鱼类LH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LH氨基酸序列比较发现:半滑舌鲷LH与鲈形目和鲈形目的LH相似性(58%~68%)比鲑形目(48%~50%)、鲤形目(47%~51%)、鳊形目(47%)、鲇形目(48%)和高等脊椎动物人类(34%)LH同源性高。但是半滑舌鲷LH与鲈形目中的其他鱼类LH同源性相对低(58%~64%),与鲈形目LH同源性较接近(64%~68%);这可能是导致鲈形目LH不能聚为一簇的原因。

3.4 LH mRNA在不同组织的表达分析

采用实时荧光定量PCR法,检测LH在半滑舌鲷的脑、垂体、鳃、心、头肾、肾、肝脏、脾脏、胃、肠、卵巢、肌肉12种组织中的表达。结果如图5所示,LH在所有组织中都有表达,在垂体相对表达量最高,在脑和卵巢中表达量相对较丰富,分别比垂体低约78740倍和5180倍。另外,在鳃、心、头肾、肾、肝脏、脾脏、胃、肠、肌肉这9个组织中,LH mRNA虽然表达量非常小,但仍可检测到表达。单因素方差分析结果显示,LH mRNA在垂体的表达与其他组织中的表达量差异显著($P<0.05$)。

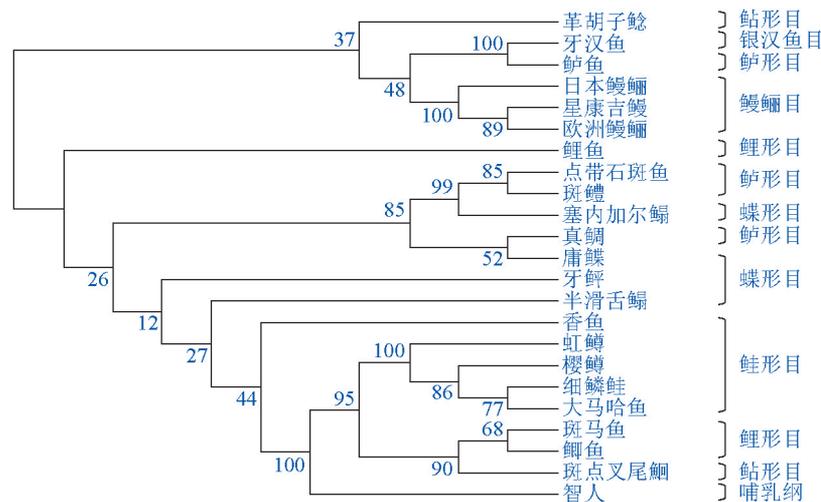


图4 基于MEGA4.0中的NJ方法的半滑舌鳎LH与其他物种分子进化树聚类分析
 Fig. 4 Phylogenetic tree of the LH from *C.semilaevis* and other vertebrates in MEGA4.0

注:所用物种的GenBank的序列号见表2

3.5 半滑舌鳎组织学

对实验用鱼的卵巢进行组织切片和H-E染色, 并进行半滑舌鳎卵巢发育分期(见图6)。II期卵巢:几乎全为II时相卵母细胞;胞质嗜碱性,可见数个核仁(见图6a)。III期卵巢:排列紧密,以III时相卵母细胞为主,也有II时相卵母细胞存在。细胞体积增大,呈规则的椭圆形。胞质嗜碱性,胞核内可见大量核仁(见图6b)。IV期卵巢:以IV时相卵母细

胞为主,可见少量II时相和III时相卵母细胞。体积显著增加,辐射带增厚,胞质内卵黄颗粒充满,偏嗜酸性(见图6c)。V期卵巢:以V时相卵母细胞为主,体积继续增大,胞质中充满粗大的卵黄颗粒,并逐渐融合成块状;细胞核偏位,核膜逐渐模糊(见图6d)。VI期卵巢:可见正在退化的卵母细胞,有少数II和III时相的卵母细胞,放射膜厚,卵黄颗粒、胞核模糊消失,可见闭锁空泡(见图6e)。

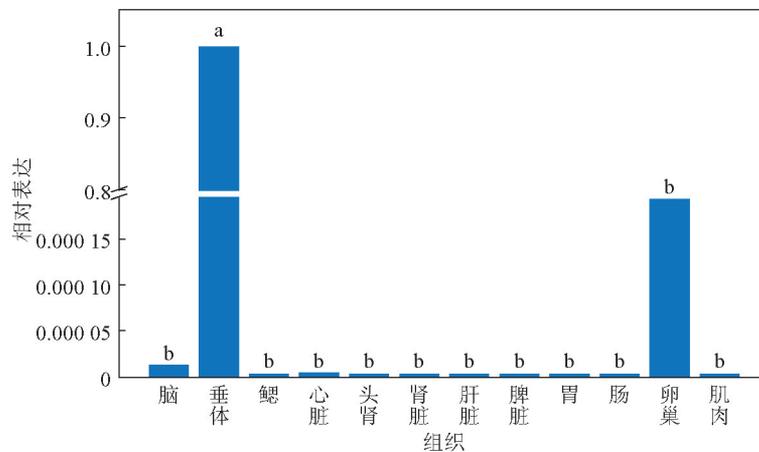


图5 半滑舌鳎LH mRNA在不同组织中的表达水平
 Fig. 5 Expression level of LH mRNA in different tissues of *C.semilaevis* tissues

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

3.6 LH mRNA在雌性半滑舌鲷繁殖周期的表达模式

采用实时荧光定量PCR方法检测雌性半滑舌鲷LH mRNA在繁殖周期II~VI期的脑、垂体、卵巢

3个组织中的表达水平,表明LH mRNA在II~VI各繁殖周期的脑、垂体、卵巢3个组织都有表达,但表达水平有差异,具体结果见图7。

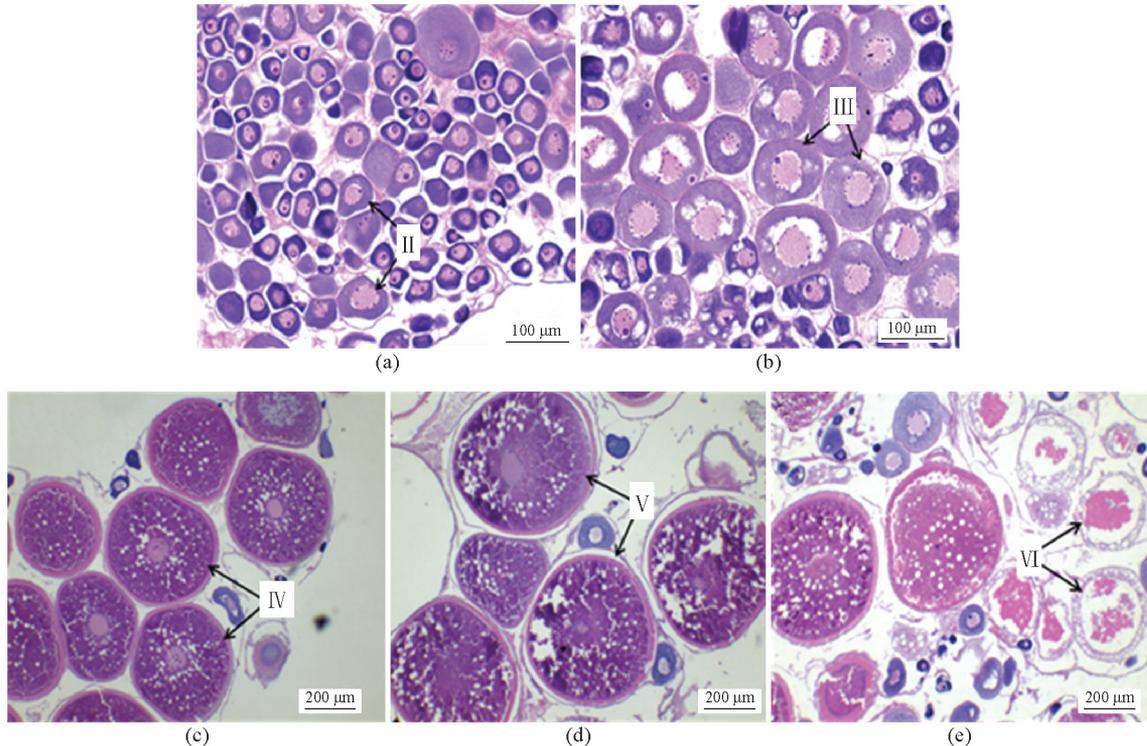


图6 半滑舌鲷卵巢不同发育时期的组织切片

Fig. 6 The stained sections for each of ovarian development stage of *C.semilaevis* Günther

注:a: II期卵巢,箭头示II时相卵母细胞,标尺=100 μm;b: III期卵巢,箭头示III时相卵母细胞,标尺=100 μm;c: IV期卵巢,箭头示IV时相卵母细胞,标尺=200 μm;d: V期卵巢,箭头示V时相卵母细胞,标尺=200 μm;e: VI期卵巢,箭头示VI时相卵母细胞,标尺=200 μm

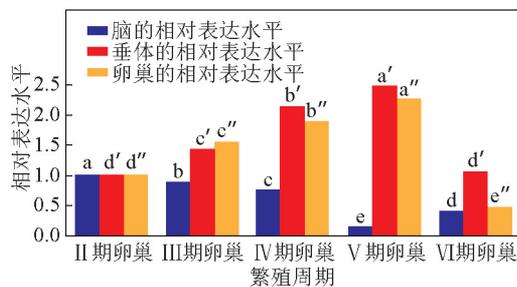


图7 LH mRNA在雌性半滑舌鲷繁殖周期的表达水平
Fig. 7 Expression level of LH mRNA in reproductive cycles of female *C.semilaevis*

注:不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

脑组织中,LH mRNA在II~V期表达水平下降,IV期急剧下降,到V期时达最低水平,并明显低于其他发育期水平,VI期时又有所回升。由SPSS16.0软件显著性检验分析得出,LH mRNA在

各繁殖周期脑组织的表达水平差异显著($P < 0.05$)。垂体组织中,LH mRNA的表达水平在II~V期稳步上升,V期达最高水平,VI期下降基本与II期表达水平相同。显著性检验分析表明,垂体LH mRNA在II、VI发育期的表达处于同一低水平,差异不显著($P > 0.05$),并与III、IV、V发育期的高表达水平差异显著($P < 0.05$)。说明垂体组织的LH在性腺成熟及排卵时期(尤其V期)水平高,而卵巢发育前期和排卵后水平较低。卵巢组织中,LH mRNA的表达水平在II~V期逐渐上升,到V期时达最高水平,VI期急剧下降,达最低值。显著性检验分析表明,卵巢LH mRNA各发育期的表达水平差异显著($P < 0.05$)。推测卵巢LH主要对卵母细胞最终成熟及卵子排出的卵巢起作用,V期卵巢已完全成熟;VI期卵巢退化,此时卵巢除含有很多退化的卵母细胞外,一部分卵母细胞退化至II、IV时相,此时

卵巢LH发挥相对较弱的生理作用。

3.7 血清LH在雌性半滑舌鲷繁殖周期的变化规律

雌性半滑舌鲷繁殖周期血清LH浓度变化呈现明显的周期性变化规律,即呈先上升后下降的趋势。Ⅱ期时浓度最低,均值为3.24 mIU/mL;之后上升,Ⅴ期时达到最大浓度,均值为4.80 mIU/mL,说明LH在卵巢发育至Ⅴ期(即卵母细胞成熟及排卵)时发挥最大作用,LH主要参与卵子的成熟及排放过程;Ⅵ期浓度明显下降($P<0.05$),均值只有3.55 mIU/mL,说明卵母细胞退化时LH作用有所减弱;但浓度高于Ⅱ期,此时卵巢内存在退化的Ⅱ、Ⅲ、Ⅵ时相卵母细胞(见图8)。

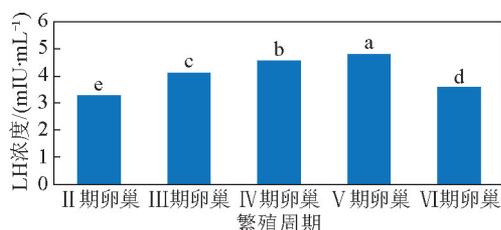


图8 雌性半滑舌鲷繁殖周期血浆LH的浓度

Fig. 8 Concentration of plasma LH in reproductive cycles of female *C. semilaervis*

雌性半滑舌鲷繁殖周期,采用碘(¹²⁵I)RIA法测定血浆LH变化规律与实时荧光定量PCR方法检测到的LH mRNA水平在垂体及卵巢组织的变化规律基本一致。

4 讨论

4.1 半滑舌鲷LH基因克隆及序列分析

本实验克隆了半滑舌鲷LH cDNA的全长序列,并对半滑舌鲷的LH与其他脊椎动物氨基酸序列的同源性进行比较,结果显示半滑舌鲷LH同鲈形目、鲑形目的LH相似性较高,而同哺乳动物LH的相似性相对低。半滑舌鲷LH成熟肽序列包含12个半胱氨酸残基Cys,与所比对的各物种中完全保守(见图4),并与GTH α 亚基交联形成二硫键,参与蛋白折叠及配体受体相互作用^[16],因此,硬骨鱼类LH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。四足类及硬骨鱼类的LH β 存在与GTH α 结合相关的某些重要的氨基酸残基,比如一些硬骨鱼类第4个和第5个Cys位点之间就存在着特异性的Cys-Ser-Gly-His(CSGH)区域^[17],半滑舌鲷的这一结

构(见图4)也能反映LH在进化中高度的保守性。另有研究发现,鲷目鱼LH多肽一级结构有一个N-糖基化位点,与其他硬骨鱼类和高等脊椎动物保持高度保守性,这一结构可能与有机体的生物合成及激素调控有关^[18]。本研究发现半滑舌鲷LH也有1个N-糖基化位点Asn(19~21 NQT)(见图4),具体生理机能有待进一步探究。依据Neighbor-Joining方法构建系统进化树,发现半滑舌鲷LH与鲈形目中的其他鱼类LH同源性(58%~64%)比鲈形目(64%~68%)相对较低,这可能是导致鲈形目LH不能聚为一簇的原因。

4.2 LH基因在繁殖季节半滑舌鲷的组织表达

利用实时荧光定量PCR方法检测LH基因在半滑舌鲷各组织的表达,结果发现:所有组织中均有表达,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。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、红大马哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)^[19]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[20]和斑马鱼(*Danio rerio*)^[21]的研究中,利用半定量实时PCR方法和免疫细胞化学检测方法,检测到LH mRNA在非垂体组织中亦有表达,与本研究结果相似。但有关LH mRNA在非垂体组织中广泛表达的生理机制尚未明确,推测半滑舌鲷LH可能具有更加广泛的垂体外的生理功能,对此进行深入研究具有重要意义。

4.3 雌性半滑舌鲷LH mRNA周期表达模式分析

本研究表明半滑舌鲷卵巢发育至Ⅱ期,LH mRNA表达量相对低,之后mRNA水平逐渐稳步上升;直到Ⅳ~Ⅴ期mRNA表达量急剧增大。说明LH主要促进卵母细胞最终成熟及排卵。有研究利用原位杂交、放射免疫、Northern blot、实时荧光定量PCR等方法,检测虹鳟鱼^[22~24]、许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)^[25]、斑点叉尾鲷^[26]的LH,发现卵巢最终成熟及排卵时LH mRNA水平急剧上升,并起主导作用。与本实验结果一致。

各时期LH不同的表达水平可能与其受体时空表达的差异性相关。斑点叉尾鲷的研究表明,垂体LH水平同卵巢LHR水平的变化规律基本一致,推测LH与其受体结合具有高度的特异性。但陈晓燕^[27]对半滑舌鲷LHR mRNA进行相关研究,显示LHR在Ⅲ期卵巢和脑中表达量最丰富,与本研究结果有所不同。因此,半滑舌鲷LH与其受体结合的高度特异性有待进一步研究。

4.4 雌性半滑舌鲷血清LH周期变化及其与LH基因表达关系

实验采用RIA方法,检测半滑舌鲷血清LH在卵母细胞生长、卵黄生成、卵子成熟及排卵等各时期的表达水平。结果显示:性腺发育早期(即卵黄生成作用),血清LH浓度逐渐稳步上升,直到排卵时(V期卵巢)浓度最大。揭示卵黄生成阶段垂体内LH大量合成并积累,从而排卵时血清LH浓度达到最高。由此可见,半滑舌鲷血清LH激素分泌的变化规律与卵巢发育、卵母细胞生长、成熟及退化基本一致,在卵子成熟及排卵时期起主导作用。这与早期虹鳟的研究结果相一致。虹鳟LH垂体合成及其血清浓度不同步,LH mRNA先在垂体合成,之后LH激素进入血液循环^[28],发挥相应生理学作用。本研究同时发现,雌性半滑舌鲷繁殖周期,血浆LH浓度的变化规律同LH mRNA水平在垂体及卵巢组织的变化规律基本一致。但对于半滑舌鲷LH垂体合成及血浆浓度是否同步,应进一步进行科学实验研究。

GtH的合成及释放受各种因素制约,其中性类固醇激素作用最大。许多研究表明,虹鳟^[29]、欧洲鳗鲡^[30]及银大马哈鱼^[31]血清LH的含量及mRNA水平与性类固醇激素有关。在血清FSH及E₂^[32]水平已达最高值的卵黄生成后期,LH浓度才急剧上升,说明雌激素能刺激LH垂体内合成,从而血浆LH浓度增大。半滑舌鲷GtH的合成释放与性类固醇激素的相互作用关系有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, et al. cDNA cloning of two gonadotropin- β subunits (GTH- I β and II- β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 122(2): 117-129.
- [2] Schulz R W, Viseher H F, Cavaco J E B, et al. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 129(2-3): 407-417.
- [3] Schulz R W, Miura T. Spermatogenesis and its endocrine regulation [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26(1): 43-56.
- [4] Swanson P, Dickey J T, Campbell B. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 53-59.
- [5] Prat F, Sumpter J P, Tyler C R. 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*) [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 54(6): 1375-1382.
- [6] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷繁殖生物学及繁育技术研究[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(3): 15-24.
- [7] 柳学周. 半滑舌鲷繁殖及养殖技术(中)[J]. *科学养鱼*, 2006(11): 14-15.
- [8] 柳学周, 庄志猛, 马爱军, 等. 半滑舌鲷苗种生产技术的开发研究[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 17-24.
- [9] 周毅. 草鱼促性腺激素及其受体基因的克隆及表达分析[D]. 湖南: 湖南师范大学, 2009.
- [10] Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Melamed P, et al. The GTH β subunit of tilapia: Gene cloning and expression [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1997, 1(1-6): 85-92.
- [11] 张勇, 黄海, 李水生, 等. 花鳉促性腺激素cDNA克隆与其在激素诱导性腺发育过程中的作用[R]. 2008.
- [12] Kato Y, Gen K, Maruyama O, et al. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH- I β and GTH- II β) from the masu salmon (*Oncorhynchus masou*): Rapid divergence of the GTH- I β gene [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1993, 11: 275-282.
- [13] 柳学周, 孙中之, 马爱军, 等. 半滑舌鲷亲鱼培育及采卵技术的研究[J]. *海洋水产研究*, 2006, 27(2): 25-32.
- [14] 柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25-35.
- [15] Livak K J, Thomas D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Hearn M T, Gomme P T. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: Part I. The glycoprotein hormones [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2000, 13(5): 223-278.
- [17] Power M E, Carolsfeld J, Wallis G P, et al. Isolation and characterization of a cDNA for gonadotropin II- β of Pacific herring, an ancient teleost [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50: 315-323.
- [18] Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, et al. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone [J]. *Endocrine*, 1999, 11(3): 205-215.
- [19] Parhar I S, Soga T, Ogawa S, et al. FSH and LH- β subunits in the preoptic nucleus: ontogenic expression in teleost [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(3): 369-378.
- [20] Wong T T, Zohar Y. Novel expression of gonadotropin subunit genes in oocytes of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5210-5220.
- [21] 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.
- [22] Natio N, Hyodo S, Okumoto N, et al. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development [J]. *Cell and Tissue Research*, 1991, 266(3): 457-467.
- [23] Prat F, Sumpter J P, Tyler C R. 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*) [J]. *Biology of Reproduction*, 1996, 54(6): 1375-1382.
- [24] Gomez J M, Well C, Ollitrault M, et al. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 113(3): 413-428.

- [25] 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, 141:282–290.
- [26] Kumar R S, Trant J M. Hypophyseal gene expression profiles of FSH- β , LH- β , and glycoprotein hormone- α subunits in *Ictalurus punctatus* throughout a reproductive cycle [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 136:82–89.
- [27] 陈晓燕. 促性腺激素受体在半滑舌鲷繁殖周期中的作用研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.
- [28] Gomez J M, Well C, Ollitrault M, et al. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1999, 113(3):413–428.
- [29] Trinh K Y, Wang N C, Hew C L, et al. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1986, 159(3):619–624.
- [30] Querat B, Hardy A, Fontaine Y A. Regulation of the type- II gonadotropin α and β subunit mRNAs by estradiol and testosterone in the European eel [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1991, 7:81–86.
- [31] Dickey J T, Swanson P. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1998, 21(3):291–306.
- [32] Scott A P, Sumpter J P, Hardiman P A. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri Richardson*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, 49:128–134.

Full length cDNA cloning and expression of luteinizing hormone (LH) and which serum concentration was measured in half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther

Liu Xuezhou, Shi Bao, Wang Shanshan, Xu Yongjiang, Li Xiaoxiao

(Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

[Abstract] The full length cDNA of LH has been cloned from pituitary of half smooth tongue sole *C. Günther* by using RACE technology for the first time. The cDNA of LH is 670 bp, and the open reading frame is 477 bp encoding peptides of 158 amino acid. Multiple amino acid sequences alignments were performed among vertebrates, and the results showed that tongue sole LH mature peptide was the most similar to their orthologs of Pleuronectiformes and Perciformes which was 58% ~ 68% identity. And 12 conserved cysteine residues and 1 N-linked glycosylation site were found in the deduced amino acid sequence. Real-time PCR analysis showed that LH mRNA was expressed in all twelve tissues including brain, pituitary, ovary and so on. The highest expression level was in pituitary. And the stronger amplification signals were detected in the brain and gonad than all other non-pituitary tissues. It suggested that LH may had the more physiological functions because LH mRNA of tongue sole expressed widely in non-pituitary tissues. Quantitative real-time PCR was used for analyzing the expression of female *C. semilaevis* LH mRNA in the reproductive cycle. The results showed that LH mRNA was expressed in all three tissues including brain, pituitary and ovary from the stage II to stage VI, and the highest expression level appeared on the stage IV and stage V which suggested that the

main function of LH is to promote eggs finally mature and discharge. Radio immunoassay (RIA) marked by ^{125}I was used to detect the concentration of plasma LH in *C.semilaevis*. The results showed that the biggest plasma LH concentration appeared on the stage of V which also suggested that the main function of LH was to promote eggs finally mature and discharge.

[Key words] *Cynoglossus semilaevis* Günther; LH; cDNA cloning; quantitative real-time PCR; RIA