

## 抚仙金线鲃促性腺激素亚基基因克隆及组织表达分析

杨国坤<sup>1</sup>, 关佳佳<sup>1</sup>, 孙彩云<sup>1</sup>, 王晓爱<sup>2</sup>, 潘晓赋<sup>2</sup>, 杨君兴<sup>2\*</sup>, 李文笙<sup>1\*</sup>

(1. 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 中山大学深圳研究院, 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

**摘要:** 抚仙金线鲃 *Sinocyclocheilus tingi* 是云南抚仙湖特有种, 虽然实现了人工繁殖, 但在塘养环境下仍无法自然繁衍。鱼类的生殖活动受下丘脑-垂体-性腺轴的调控, 其中促性腺激素在该过程中起重要作用。本实验利用实时荧光定量 PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术从抚仙金线鲃垂体中克隆了 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  3 种基因的 cDNA 序列, 其中 GTH $\alpha$  的开放阅读框(ORF)长度为 357 bp, 编码 118 个氨基酸, 有 10 个半胱氨酸残基和 2 个 N-糖基化位点; FSH $\beta$  cDNA 全长为 856 bp, ORF 长度为 393 bp, 编码 130 个氨基酸, 有 11 个半胱氨酸残基和 1 个 N-糖基化位点; LH $\beta$  cDNA 全长为 930 bp, ORF 长度为 441 bp, 编码 146 个氨基酸, 有 12 个半胱氨酸残基和 1 个 N-糖基化位点。实时荧光定量 PCR 结果显示, GTH $\alpha$  和 LH $\beta$  都只在雄鱼和雌鱼的垂体中表达。FSH $\beta$  在垂体中表达量最高, 在雌鱼和雄鱼的脂肪、肌肉和雄鱼的精巢和肝脏中有少量表达。本研究为抚仙金线鲃的人工繁育提供了重要的基础数据。

**关键词:** 抚仙金线鲃; 促性腺激素; 克隆; 组织表达

中图分类号: Q959.4; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1000-7083(2016)05-0686-05

## Gonadotropin Subunits cDNA Cloning and Tissue Expression in *Sinocyclocheilus tingi*

YANG Guokun<sup>1</sup>, GUAN Jiajia<sup>1</sup>, SUN Caiyun<sup>1</sup>, WANG Xiaoi<sup>2</sup>,  
PAN Xiaofu<sup>2</sup>, YANG Junxing<sup>2\*</sup>, LI Wensheng<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Province Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Research Institute of Sun Yat-Sen University in Shenzhen, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Resources and Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China)

**Abstract:** *Sinocyclocheilus tingi* is an endemic species of the Fuxian Lake in Yunnan province. Although the artificial breeding has been successfully developed, the natural reproduction of *S. tingi* is still failed in pond culture. It is well known that fish reproduction is regulated by the hypothalamus-pituitary-gonadal axis, and the gonadotropins (GTHs) play important role in this process. In this study, the sequences of GTH $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  were obtained from the pituitary of *S. tingi* using real-time quantitative PCR (qPCR) and rapid amplification of cDNA ends technology. The results showed that the open reading frame of GTH $\alpha$  was 357 bp, encoding 118 amino acids, containing 10 cysteine knot motifs and 2 N-linked glycosylation sites. The full length of FSH $\beta$  cDNA was 856 bp, with 393 bp open reading frame in length encoding the proteins of 130 amino acids, containing 11 cysteine knot motifs and a N-linked glycosylation site. The full length of LH $\beta$  cDNA was 930 bp, with 441 bp open reading frame in length encoding proteins of 146 amino acids, containing 12 cysteine knot motifs and a N-linked glycosylation site. The result of qPCR indicated that GTH $\alpha$  and LH $\beta$  were only expressed in the pituitary of both male and female fish. The highest expression level of FSH $\beta$  was observed in the pituitary, and the even lower levels were detected in the fat tissue, muscle of male and female fish, and testis and liver of male fish. These findings provided basic data for further research in the reproduction of *S. tingi*.

**Key words:** *Sinocyclocheilus tingi*; gonadotropin; clone; tissue distribution

收稿日期: 2015-09-08 接受日期: 2016-05-11

基金项目: 中山大学高校基本科研业务费项目; 深圳市战略性新兴产业发展专项资金项目(NYSW20140401010064); 云南省应用基础研究面上项目(2012FB183); 中国科学院昆明动物研究所“一三五”重大专项(Y206B51181); 云南省生物多样性保护专项资金项目

作者简介: 杨国坤(1988—), 男, 博士研究生, 研究方向: 鱼类内分泌功能基因, E-mail: ygk5210207@126.com

\* 通信作者 Corresponding author, E-mail: yangjx@mail.kiz.ac.cn; lsslws@mail.sysu.edu.cn

脊椎动物的生殖活动受脑-垂体-性腺轴调控,在此过程中,2种重要的促性腺激素(GTH)发挥着关键作用,分别为卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)。这2种促性腺激素均为异源二聚体结构形式的糖蛋白,拥有同一种 $\alpha$ 亚基,并且通过非共价键分别与各自的FSH $\beta$ 和LH $\beta$ 结合,发挥着不同的生理功能(Gharib *et al.*, 1990)。大多数动物的促性腺激素都包含1个GTH $\alpha$ 亚基、1个FSH $\beta$ 或LH $\beta$ 亚基,但在中华鲟*Acipenser sinensis*中却有2种GTH $\alpha$ 亚基,分别为GTH $\alpha$  I和GTH $\alpha$  II(Cao *et al.*, 2009)。促性腺激素各个亚基基因序列已经在多种鱼类中被确认,在鱼类的各个生长阶段和生殖循环过程中都有表达,并发挥着重要的生理功能(An *et al.*, 2010)。在卵巢中,FSH和LH在早期卵巢的分化中起关键作用(An *et al.*, 2010),LH可以促进卵泡成熟、排卵以及类固醇激素的合成,而在精子的发生及早期生殖系统的发育中,FSH可能起主要作用(Ando & Urano, 2005; Guzman *et al.*, 2009)。

抚仙金线鲃*Sinocyclocheilus tingi*属鲤形目Cypriniformes 鲤科Cyprinidae 金线鲃属*Sinocyclocheilus*, 俗名波罗鱼,仅分布于云南省抚仙湖(杨君兴,陈银瑞,1995)。由于外来物种入侵和过度捕捞,抚仙金线鲃的种群数量急剧减少,现湖体种群数量稀少,仅有少量个体存活在沿湖的龙潭中(杨君兴,陈银瑞,1995;潘晓赋等,2009;王伟营等,2011)。目前对抚仙金线鲃的研究仅局限于人工繁殖和苗种培育技术(潘晓赋等,2009)、肌肉营养成分分析(赵亚鹏等,2013),其生殖系统方面的研究鲜有涉及,抚仙金线鲃人工繁殖中存在生殖系统紊乱的现象(Mylonas & Zohar, 2007; Cabrita *et al.*, 2009),不能实现塘养环境下的自然繁殖。本研究克隆抚仙金线鲃生殖关键基因GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 以及LH $\beta$ 的cDNA并分析它们在不同组织中的表达特性,为抚仙金线鲃繁殖生理的进一步研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用鱼由中国科学院昆明动物研究所珍稀鱼类保育研究基地提供,为人工繁殖的抚仙金线鲃,雌、雄鱼各3尾,体长12~15 cm,健康且性成熟。实验用鱼在光照、黑暗各12 h,循环水中驯养1周。本研究取样时间为7月,且雌鱼未排卵。实验时丁香酚麻醉后断头处死,迅速取出相应组织放入RNase free EP管中,并立即放于液氮,然后转至-80 °C保存备用。

表1 抚仙金线鲃GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 和LH $\beta$ 克隆和表达分析引物  
Table 1 Primers used for cloning and expression analyses of GTH $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  in *Sinocyclocheilus tingi*

引物 Primers	序列 Sequence (5'3')
The first fragment cloning of LH	
LH-ff-F1	TRGWRAARGAVGGCTGTCC
LH-ff-R1	AWSGTRCAGCTCDGABGTGT
The first fragment cloning of FSH	
FSH-ff-F1	GCTGTGGCCRGYGYTAATGAG
FSH-ff-R1	GCTGAKARCWCCMCARTCTG
The first fragment cloning of GTH	
GTH-ff-F1	ATGTTTTGGACAAGATAYGCTGRAG
GTH-ff-R1	TTAAGAYTTRTGATAGTARCAGGTCC
3' RACE of LH	
LH-3'-F1	GAAGGAGGGCTGTCCAAAATGTCTG
LH-3'-F2	TATCACTTACCCTGTGGCTCTC
5' RACE of LH	
LH-5'-R1	CATTTTGGACAGCCCTCCTTCTC
LH-5'-R2	CCTGGAGGACAGTCTGGCAAG
LH-5'-R3	TGCTAGACACTAGAAAATGGG
3' RACE of FSH	
FSH-3'-F1	GTCGGCTCACCAATATCTCCAT
FSH-3'-F2	AGTGTTTACCCTAGCCCAATG
5' RACE of FSH	
FSH-5'-R1	TGAGAGCACCCCACTCTGTGATGTC
FSH-5'-R2	CCATTCTTTGAAGTTACAGGTG
The ORF cloning of LH	
LH-ORF-F	ATGGGGACACCTGTCAAGATC
LH-ORF-R	CTAGTAAACAAGGAAATCCTCTC
The ORF cloning of FSH	
FSH-ORF-F	ATGAGGATGCGCTTCGTTGTTATGG
FSH-ORF-R	CTAATGTGCATTGCAGCTGAGTATC
The ORF cloning of GTH	
GTH-ORF-F	ATGTTTTGGACAAGATATGCTGGAG
GTH-ORF-R	TTAAGATTTATGATAGTAGCAGGTG
The quantitative of LH	
LH-qPCR-F	GAAGGAGGGCTGTCCAAAATGTCTG
LH-qPCR-R	AGGTGTCCATGCTGCACAGGCTG
The quantitative of FSH	
FSH-qPCR-F	CTTCGTTGTTATGGTGATGCTGTTG
FSH-qPCR-R	GCATCATTGGGCTACGCTAAACAC
The quantitative of GTH	
GTH-qPCR-F	GAATAACTTTGGATGTGAGGAG
GTH-qPCR-R	GTTTGACATCATTGACAAGCACC
Universal primers	
AUAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC
AAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTACGGGGGGGGGG
AP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC(T) <sub>16</sub>
$\beta$ -actin	
actin-F	GCTATCGTGATGGACTCTGGTGA
actin-R	CAAAGTCAAGAGCCACATAGCAGAG

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成** 利用 Trizol 法 (Life Technologies) 提取抚仙金线鲃垂体总 RNA, 利用超微量紫外检测仪 (Nanodrop 2000C, Thermo Scientific) 检测总 RNA 的浓度后, 用 M-MLV 逆转录酶 (Life Technologies) 进行第一条链的合成, 用内参基因  $\beta$ -actin, 并用 PCR Kit (东盛生物) 做 PCR 验证第一条链合成质量, 反应程序为 94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 25 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。

**1.2.2 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  基因中间保守片段的克隆** 根据 GenBank 中鲤科鱼类斑马鱼 *Danio rerio*、草鱼 *Ctenopharyngodon idella* 和青鱼 *Mylopharyngodon piceus* 相关基因的保守区域设计兼并引物 (表 1), 以验证过的垂体 cDNA 第一条链为模板, 与各个基因设计好的兼并引物用 Blend Taq-Plus (TOYOBO) 扩增各个基因的中间保守片段, PCR 反应程序为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物用 E. Z. N. A 胶回收试剂盒 (OMEGA, Bio-Tek) 回收后连接到 PCR2.1 载体 (Invitrogen, Life Technologies) 后克隆测序。

**1.2.3 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  基因 3' RACE 和 5' RACE** 用 M-MLV 逆转录酶进行第一条链合成, 用于 3' RACE 的第一条链合成时用 Oligo (dT)<sub>20</sub> 做引物, 而用于 5' RACE 第一条链合成时用 AP 做引物, 并且用于 5' RACE 的模板第一条链合成后, 产物用 E. Z. N. A 胶回收试剂盒回收, 然后用加尾试剂盒 (TaKaRa) 加尾。根据测序得到的中间保守片段设计用于扩增 3' 和 5' 端的特异性引物并结合所需的接头引物 AUAP 和 AAP (表 1), 用 Blend Taq-Plus 进行 3' RACE 和 5' RACE 的扩增。5' RACE 时第一轮以 AAP 和 5'-R1 为引物, 第二轮以 AUAP 和 5'-R2 为引物; 3' RACE 时第一轮以 AUAP 和 3'-F1 为引物, 第二轮以 AUAP 和 3'-F2 为引物, PCR 反应程序为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经回收、连接, 克隆测序。

**1.2.4 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  基因的表达特性** 每尾鱼取 14 个组织, 分别为垂体、下丘脑、脑 (不含垂体和下丘脑)、脊髓、鳃、心脏、肝脏、胃、脂肪、肌肉、肾、头肾、脾脏和性腺 (雄性为精巢, 雌性为卵巢)。使用 Trizol 法提取各组织的 RNA, 每个样品取 1  $\mu$ g 的总 RNA 用 M-MLV 逆转录酶进行 cDNA 的第一条

链合成, 用 SYBR Green qPCR Mix (TOYOBO, Japan) 以不同组织合成的第一条链 cDNA 稀释 10 倍后为模板, 并以相应基因的定量引物为引物 (表 1),  $\beta$ -actin 为内参基因, 进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应程序为 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。根据目的基因和内参基因的 Ct 值, 使用比较 Ct 法计算目的基因的表达水平。

**1.2.5 序列数据分析** 把测序得到的序列进行拼接, 先用 NCBI 上 ORF finder 找到获得序列的开放阅读框; 然后用 SignalP 4.1 Server 分析 3 种不同蛋白的信号肽 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 使用 SMART 预测出 3 种蛋白的结构域 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>); 使用 Clustal Omega 对不同物种的 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  的氨基酸序列作同源性分析 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>); 使用 NetNGlyc 1.0 Server 找出 3 种蛋白的 N-糖基化位点 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)。

## 2 结果

### 2.1 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 和 LH $\beta$ 基因的克隆及序列比对

根据测序结果拼接后得到抚仙金线鲃 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  3 种基因的 cDNA 序列, GTH $\alpha$  (KU382238) 基因开放阅读框长度为 357 bp, 编码 118 个氨基酸, 其中第 1~23 位氨基酸为信号肽序列, 第 33~118 位氨基酸为糖蛋白激素  $\alpha$  结构域 (GHA); FSH $\beta$  (KU382237) 基因全长为 856 bp, 开放阅读框长度为 393 bp, 编码 130 个氨基酸, 第 1~19 位氨基酸为信号肽序列, 第 21~128 位氨基酸为糖蛋白激素  $\beta$  结构域 (GHB), 基因序列的 815~820 位点 (AATAAA) 为 PolyA 加尾信号; LH $\beta$  (KU382239) 基因全长为 930 bp, 开放阅读框长度为 441 bp, 编码 146 个氨基酸, 第 1~27 位氨基酸为信号肽序列, 第 31~137 位氨基酸为糖蛋白激素  $\beta$  结构域 (GHB), 基因序列的 815~820 位点 (AATAAA) 为 PolyA 加尾信号。GTH $\alpha$  蛋白中有 10 个半胱氨酸残基和 2 个 N-糖基化位点 (-NIT-, -NHT-), FSH $\beta$  有 11 个半胱氨酸残基和 1 个 N-糖基化位点 (-NIS-), 而 LH $\beta$  有 12 个半胱氨酸残基和 1 个 N-糖基化位点 (-NET-)。氨基酸序列同源性比对发现, 抚仙金线鲃的 GTH $\alpha$  与其他鱼类的保守性较高, 都在 80% 以上。除了与斑马鱼的同源性在 75% 左右以外, 抚仙金线鲃的 FSH $\beta$  和 LH $\beta$  与其他鱼类的保守性同样较高 (表 2)。

表2 抚仙金线鲃与不同物种 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  氨基酸序列同源性比对

Table 2 Amino acid sequence alignment of *Sinocyclocheilus tingi* GTH $\alpha$ , FSH $\beta$  and LH $\beta$  with other species

物种	GTH $\alpha$	FSH $\beta$	LH $\beta$
抚仙金线鲃 <i>Sinocyclocheilus tingi</i>	KU382238 100%	KU382237 100%	KU382239 100%
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	X56497.1 98.31%	AB003583.1 92.31%	X59889.1 93.06%
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	EU095936.1 98.31%	EF194762.1 86.82%	EF565171.1 93.79%
岩原鲤 <i>Procypris rabaudi</i>	JX105891.1 97.46%	JX105892.1 91.54%	JX105893.1 97.26%
鳊鱼 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	EU095937.1 97.46%	EF552360.1 84.62%	EF565164.1 93.15%
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	AY800267.1 97.46%	D88023.1 92.31%	D88024.1 92.14%
稀有鮡鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	JF340460.1 95.76%	KC464360.1 90.77%	KC464361.1 90.00%
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AY522553.1 81.20%	NM_205624.1 70.00%	NM_205622.2 74.10%
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	—	AF319961.1 85.27%	AF319960.1 93.53%
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	—	HM217217.1 90.77%	HM217218.1 96.58%

### 2.2 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$ 和 LH $\beta$ 基因的组织表达

实时荧光定量 PCR 结果显示, GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  主要在垂体中表达, 而 GTH $\alpha$  和 LH $\beta$  在雄鱼和雌鱼中的其他组织中表达量都非常低(图1, 图3)。FSH $\beta$  在雄鱼和雌鱼的垂体中表达量最高。FSH $\beta$  在雌鱼脂肪和肌肉中也有少量的表达; FSH $\beta$  不仅在雄鱼脂肪和肌肉中有表达, 而且在精巢、肝脏等组织中也少量的表达(图2)。

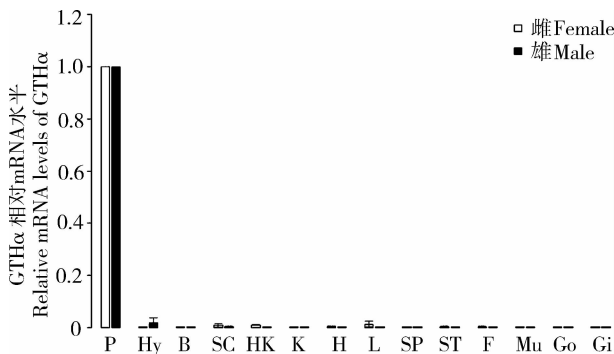


图1 GTH $\alpha$  在抚仙金线鲃组织中的表达特性(平均值  $\pm$  标准误,  $n=3$ )  
Fig. 1 Tissue expression analysis of *Sinocyclocheilus tingi* GTH $\alpha$  by real-time PCR (Mean  $\pm$  SE,  $n=3$ )

P. 垂体, Hy. 下丘脑, B. 脑, SC. 脊髓, HK. 头肾, K. 肾, H. 心脏, L. 肝脏, SP. 脾脏, ST. 胃, F. 脂肪, Mu. 肌肉, Go. 性腺, Gi. 鳃; 下图同。  
P. pituitary, Hy. hypothalamus, B. brain, SC. spinal cord, HK. head kidney, K. kidney, H. heart, L. liver, SP. spleen, ST. stomach, F. fat, Mu. muscle, Go. gonad, Gi. gill; the same below.

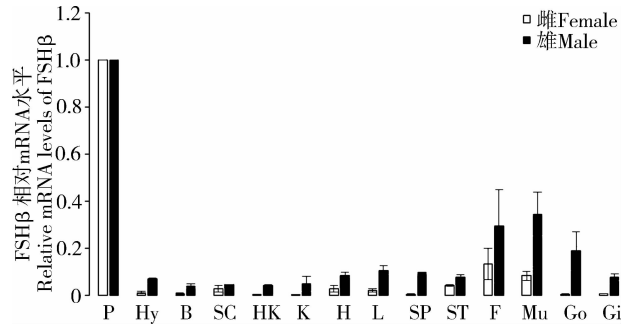


图2 FSH $\beta$  在抚仙金线鲃组织中的表达特性(平均值  $\pm$  标准误,  $n=3$ )  
Fig. 2 Tissue expression analysis of *Sinocyclocheilus tingi* FSH $\beta$  by real-time PCR (Mean  $\pm$  SE,  $n=3$ )

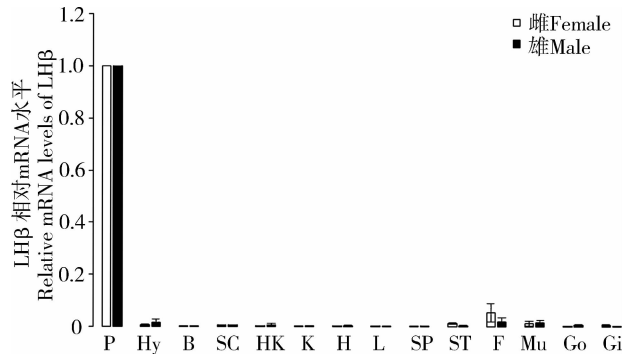


图3 LH $\beta$  在抚仙金线鲃组织中的表达特性(平均值  $\pm$  标准误,  $n=3$ )  
Fig. 3 Tissue expression analysis of *Sinocyclocheilus tingi* LH $\beta$  by real-time PCR (Mean  $\pm$  SE,  $n=3$ )

### 3 分析与讨论

鱼类通过促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)调节 GTHs 的合成与分泌, 从而调节下游的性类固醇激素的合成与分泌, 参与到下丘脑-垂体-性腺轴的生殖活动, FSH 和 LH 在性成熟、精子发生和卵子发生以及排卵过程中发挥重要的作用。本文克隆得到抚仙金线鲃的 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  基因, 经过序列比对发现, 抚仙金线鲃 GTH $\alpha$  与其他物种的同源性较高, 而 FSH $\beta$  和 LH $\beta$  与其他物种的同源性较低, 但相对而言, LH $\beta$  比 FSH $\beta$  与其他物种的同源性高一些, 这与草鱼的研究结果相似(Zhou *et al.*, 2010)。抚仙金线鲃 GTH $\alpha$  蛋白中有 10 个半胱氨酸残基和 2 个 N-糖基化位点, 并且在第 58 ~ 87 位氨基酸中有 2 对相邻的半胱氨酸和 1 个 N-糖基化位点, 这与真鲷 *Pagrosomus major* 的研究结果相似, 推测可能跟受体的结合有关(Gen *et al.*, 2000), 在半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis* 的研究中也发现类似的结构(Shi *et al.*, 2015)。在抚仙金线鲃的 FSH $\beta$  和 LH $\beta$  的蛋白中分别有 11 个和 12 个半胱氨酸残基, 这与南方鲇 *Silurus meridionalis* (Wu *et al.*, 2009) 和中华鲟(Cao *et al.*, 2009) 相似。

抚仙金线鲃 GTH $\alpha$  在雌鱼和雄鱼的垂体中表达,而在其他组织中的表达量非常低。这个结果与其他鱼类 GTH $\alpha$  主要在垂体中表达的结果相似,然而有些鱼类 GTH $\alpha$  除了在垂体中表达外,在其他组织中也有表达,例如斑马鱼 (So *et al.*, 2005) 和半滑舌鲷 (Shi *et al.*, 2015) 的脑、肾和肝脏中也有表达;南方鲇 (Wu *et al.*, 2009) 和大西洋鳕 *Gadus morhua* (Mittelholzer *et al.*, 2009) 卵巢中检测到有 GTH $\alpha$  的表达。LH $\beta$  也主要在垂体中表达,而 FSH $\beta$  除了在垂体中表达量最高外,在雌鱼和雄鱼的脂肪和肌肉中也有少量的表达,另外在雄鱼的精巢和肝脏中也有表达。对其他鱼类研究表明,FSH $\beta$  和 LH $\beta$  虽然在垂体中表达量最高,在其他组织也有一定的表达,罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 的脑 (Parhar *et al.*, 2003),斑马鱼的脑、肾、肝脏等 (So *et al.*, 2005),半滑舌鲷 (Shi *et al.*, 2015)、南方鲇 (Wu *et al.*, 2009) 和大西洋鳕 (Mittelholzer *et al.*, 2009) 的卵巢,慈鲷科 Cichlidae 鱼类的视前叶和下丘脑中检测到 FSH $\beta$  和 LH $\beta$  的表达。由此可见,垂体以外的组织表达 GTHs 在鱼类中是一个普遍的现象。FSH $\beta$  在抚仙金线鲃垂体以外的组织中表达所起的作用需要进一步的实验进行探究。

本文克隆了抚仙金线鲃生殖调控中关键的 3 种基因 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  的序列,并对其进行了氨基酸序列分析,同时探索了 3 种基因在抚仙金线鲃不同组织中的表达特性,这为进一步研究 GTH $\alpha$ 、FSH $\beta$  和 LH $\beta$  在抚仙金线鲃生殖调控的作用提供了基础数据。

## 参考文献:

- 潘晓斌,刘淑伟,李再云,等. 2009. 抚仙金线鲃人工繁殖与鱼苗培育技术[J]. 动物学研究, 30(4): 463-467.
- 王伟营,杨君兴,陈小勇. 2011. 云南境内南盘江水系鱼类种质资源现状及保护对策[J]. 水生态学杂志, 32(5): 19-29.
- 杨君兴,陈银瑞. 1995. 抚仙湖鱼类生物学和资源利用[M]. 昆明: 云南科技出版社.
- 赵亚鹏,潘晓斌,杨君兴,等. 2013. 滇池金线鲃(*Sinocyclocheilus grahami*)与抚仙金线鲃(*S. tingi*)肌肉营养成分初步分析[J]. 动物学研究, 34(6): 636-639.
- An KW, Lee J, Choi CY. 2010. Expression of three gonadotropin subunits and gonadotropin receptor mRNA during male-to-female sex change in the cinnamon clownfish, *Amphiprion melanopus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 156(4): 407-415.
- Ando H, Urano A. 2005. Molecular regulation of gonadotropin secretion by gonadotropin-releasing hormone in salmonid fishes[J]. Zoological Science, 22(4): 379-389.
- Cabrita E, Robles V, Herraiz P. 2009. Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species[M]. Boca Raton: CRC Press.
- Cao H, Zhou L, Zhang YZ, *et al.* 2009. Molecular characterization of Chinese sturgeon gonadotropins and cellular distribution in pituitaries of mature and immature individuals[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 303(1-2): 34-42.
- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, *et al.* 2000. Unique expression of gonadotropin- I and - II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation[J]. Biology of Reproduction, 63(1): 308-319.
- Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, *et al.* 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins [J]. Endocrine Reviews, 11(1): 177-199.
- Guzman JM, Bayarri MJ, Ramos J, *et al.* 2009. Follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression during larval development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 154(1): 37-43.
- Mittelholzer C, Andersson E, Taranger GL, *et al.* 2009. Quantification of gonadotropin subunits G $\alpha$ , 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, 153(3): 288-295.
- Mylonas CC, Zohar Y. 2007. Promoting oocyte maturation, ovulation and spawning in farmed fish [M]// Babin PJ. The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications. Dordrecht: Springer Publishing Company, Inc: 437-474.
- Shi B, Liu X, Xu Y, *et al.* 2015. Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 16(2): 2767-2793.
- 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 [J]. Biology of Reproduction, 72(6): 1382-1396.
- Wu F, Zhang X, Zhang W, *et al.* 2009. Expression of three gonadotropin subunits in Southern catfish gonad and their possible roles during early gonadal development [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 153(1): 44-48.
- Zhou Y, Niu Y, Tao M, *et al.* 2010. Molecular cloning, characterization and expression of FSH and LH beta subunits from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 36(2): 213-221.