第31卷 第3期
2007年5月

水 生 生 物 学 报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 31, No. 3
May, 2007

团头鲂促性腺激素β亚基cDNA的克隆和序列分析

曲宪成　刘　颖　杨艳红　崔严慧　周正峰
(上海水产大学生命科学与技术学院, 上海　200090)

摘要: 本研究利用RT-PCR和RACE克隆了团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)脑下垂体中两种促性腺激素β亚基(GtH Iβ和GtH IIβ) cDNA序列, 并对其进行了结构和系统进化分析。团头鲂GtH Iβ亚基cDNA全长567碱基对(bp), 5′端非翻译区26bp; 3′端非翻译区148bp; 开放阅读框(ORF) 393bp, 其编码含有130个氨基酸的蛋白质, 包括由108个氨基酸组成的成熟肽以及22个氨基酸组成的信号肽。GtH II亚基cDNA全长564bp, 5′端非翻译区43bp; 3′端非翻译区95bp; ORF 426bp, 其编码含有141个氨基酸的蛋白质, 包括由117个氨基酸组成的成熟肽以及24个氨基酸组成的信号肽。团头鲂GtH Iβ亚基氨基酸序列与青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)等15种鱼类相比较, 相似性为90%—31%, 与湖蛙(*Rana Ridibunda*)等5种四足类的相似性为38%—21%; GtH II亚基与青鱼等15种鱼类相比较, 其相似性为95%—41%, 与湖蛙等5种四足类的相似性为49%—36%, 团头鲂GtH Iβ和GtH II亚基与鲤科鱼类的相似性最高, 显示出较为亲近的进化关系。另外, 团头鲂GtH Iβ和GtH IIβ亚基含有12个保守的半胱氨酸残基和1个N糖基化位点。

关键词: RT-PCR; RACE; 克隆; 团头鲂; 促性腺激素β亚基cDNA
中图分类号: Q343　　文章标识码: A　　文章编号: 1000-3207(2007)03-0377-09

鱼类的性腺发育以及生殖活动主要受到下丘脑-脑垂体-性腺轴的调控, 而腺垂体分泌的促性腺激素(Gonadotropin hormone, 简称GtH)在性腺发育以及生殖活动中起着重要的作用。GtH[1]是脊椎动物腺垂体合成和分泌的促进性腺发育、成熟的重要糖蛋白激素。在哺乳类中, 有两种类型的促性腺激素, 它们分别是促滤泡激素(Follicle-stimulating hormone, 简称FSH)和促黄体激素(Luteinizing-hormone, 简称LH)。FSH和LH, 还有促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone, 简称TSH)和绒毛膜促性腺激素(Chorionic-gonadotropin, 简称CG)都是糖蛋白激素家族的成员。这四种糖蛋白激素都是由α和β两个亚基组成, 其中在每种动物中α亚基是相同的, 而β亚基都是不同的, 激素的特异性是由β亚基所决定的。不同的基因分别指导α和β亚基的合成, 二者在质膜上以非共价键结合, 形成具有生物活性的二聚体分子蛋白。

在鱼类, 存在两种类型的促性腺激素, 被称为GtH I和GtH II, 这是依据色谱的洗脱顺序而命名的[2]。根据分析两种GtH的氨基酸序列、生物活性以及分泌方式, 一般认为GtH I和GtH II分别对应于哺乳动物中的FSH和LH[3]。GtH在鱼类中的作用同其他脊椎动物相同, 主要是促进性腺发育、成熟, 性激素合成和分泌。具体来讲, 在雌性中, GtH的靶器官为卵巢的滤泡细胞。处在生长期的卵母细胞在GtH的作用下, 滤泡细胞能够合成和释放雌二醇, 并促进卵母细胞的生长; 而处在最终成熟期的卵母细胞在GtH的作用下, 滤泡细胞能够合成和释放最终成熟激素, 如17α, 20β-二羟黄体酮而使鱼类排卵。而在雄性中, GtH的靶器官为精巢的间质细胞和支持细胞。处在生长期的精母细胞在GtH的作用下, 间质细胞合成和释放睾酮或11-酮基睾酮, 同时在GtH的作用下支持细胞合成雄激素结合蛋白。在间质细胞和支持细胞的共同作用下, 促进精母细胞的生长; 而处在最终成熟期的精母细胞在GtH的作用下, 间质细胞能够合成和释放最终成熟激素, 如17α, 20β-二羟黄体酮而使鱼类排精[4,5]。进一步地, GtH I和GtH II在鱼类生殖活动的不同时期占主导

收稿日期: 2006-04-05; 修订日期: 2007-02-17
基金项目: 回国留学人员科研启动基金(科01—113); 上海市重点学科建设项目资助(Y1101); 上海水产大学博士启动基金(科00—119)资助
作者简介: 曲宪成(1965—), 男, 副教授, 硕士生导师; 主要从事水生动物生理方面的研究
通讯作者: 曲宪成, Tel: 021-65710525, E-mail: xcqu@shfu.edu.cn

作用, 其含量随生殖周期而呈现明显变化[4,5]。到目前为止, 关于 GtH β 的研究国内外已有很多报道, 包括大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)[6]、条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)[7]、真鲷(*Chrysophrys major*)[8]、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)[9,10]、金鱼[11]等, 近30种鱼 GtH Iβ 和 GtH IIβ mRNA 全序列已被克隆。但只有报道的金鱼(*Carassius auratus*) GtH Iβ 是由两个不同的基因编码, 即 GtH Iβ-1 和 GtH Iβ-2, 并且研究者认为这可能是由金鱼的四倍体特性造成的[11]。因此目前, 一般普遍认为鱼类存在 GtH Iβ 和 GtH IIβ 两种类型。

GtH 的释放主要受到下丘脑分泌的促性腺激素释放激素(GnRH)和血液中性激素水平的调控。此外, 多巴胺、γ-氨基丁酸等也对 GtH 的分泌与合成具有一定的调节作用。一般地, GnRH 可以促进脑垂体合成和释放 GtH, 而血清中的类固醇激素水平又对 GtH 的分泌具有正和负反馈作用[12,13]。

综上所述, 为更好地发展水产养殖业、增加水产品总量, 满足消费者对水产品的需要, 对鱼类繁殖生理的研究、认识是必要的一个环节。因此, 对鱼类 GtH 的研究无论是理论上还是生产实践上都具有重要的意义。而 GtH 的作用主要是由特异性的 GtH β 亚基来起作用的。因此, 认识鱼类 GtH β 亚基的基因表达、调控是非常重要的。

团头鲂为鲤科鱼类, 又名武昌鱼, 其肉质鲜美、生长快, 为我国目前主要养殖对象之一。迄今为止, 国内研究者先后对团头鲂的生长情况、种质以及多倍体育种、人工繁殖、甲状腺激素和雄性激素浓度的周年变化、GtH 细胞的电镜观察以及生长激素基因的克隆等方面进行了研究[14—19]。在人工繁殖过程中, 目前所采用的人工催产方法是几种促滤泡激素释放激素类似物(LHRH-A)和鱼脑下垂体(PG)搭配使用。PG 被公认为是理想的催产剂, 但手续麻烦, 成本也较高。如果能成功地克隆团头鲂的 GtH β 亚基 cDNA 序列, 然后通过生物技术手段合成团头鲂的 GtH, 可以为团头鲂的人工繁殖提供一条新的催产途径。目前国内、外有关团头鲂 GtH 的研究还没有报道。因此, 我们首先克隆了团头鲂脑垂体中 GtH Iβ 和 GtH IIβ 亚基 cDNA 序列, 并对其序列进行了分析, 以便为通过生物技术手段生产团头鲂的 GtH 提供理论基础, 也为进一步认识 GtH 在团头鲂繁殖过程中的作用, 内分泌干扰物质对鱼类生殖机能的危害, 以及从分子水平认识团头鲂的进化提供条件。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼 实验用团头鲂购自上海松江水产良种场。团头鲂在自然条件下, 饲养于研究室内160L 的塑料箱内。饲养 3 周后, 从团头鲂头部蝶骨鞍背面的小骨腔内取出脑下垂体, 进行 RNA 提取。

1.2 提取总 RNA 和单链 cDNA (ssDNA)的合成 利用 Trizol®Reagant 试剂提取总 RNA: 取团头鲂脑垂体于 1.5mL 离心管中, 加入 Trizol®Reagant 试剂(Invitrogen™ life technology 公司) 1mL, 匀浆器匀浆后, 经氯仿抽提、异丙醇沉淀, 最终加入适量 0.1% DEPC 水溶解总 RNA。

ssDNA 合成: 用通常的方法, 将总 RNA 经反转录成 ssDNA, 保存于 -20℃ 备用。反转录用 M-MLV reverse transcriptase, 购于 Promega 公司。RNase inhibitor, dNTP, Oligo d(T) 购于 TaKaRa 公司。

1.3 设计简并引物, 进行 PCR 扩增获得部分序列 分别根据 GenBank 中已报道的几种鱼类 GtH I 和 GtH IIβ 亚基 mRNA 序列开放阅读(ORF)的保守区设计简并引物, 然后以团头鲂的 ssDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得团头鲂 GtH β 亚基 cDNA 部分序列。用于扩增 GtH Iβ 和 GtH IIβ 亚基 cDNA 的引物如下:

GtH Iβ:

P1 正义引物: 5' GAAT(G/T) CAGGT(C/G) CAGCTGTC 3';

P2 反义引物: 5' TCACAGCT(G/C) AG-(G/A) GCCAC 3'

GtH IIβ:

P3 正义引物: 5' GCTGTCCAAAATG(T/C) CTGGTG 3';

P4 反义引物: 5' ATCCTCTCTCTG(A/G) GACATGC 3'.

PCR 扩增: PCR 反应使用的酶 *Taq*™、dNTP 购于 TaKaRa 公司。反应体系为 50μL, 反应组成同产品使用说明。GtH Iβ 亚基 cDNA 反应的参数为: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 55℃ 30s (GtH IIβ 亚基 cDNA 为 57.8℃), 72℃ 45s, 40 个循环; 72℃ 2min 延伸。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 然后采用 DNA 回收试剂盒 Nucleo Trap gel (BD Biosciences) 进行产物回收, 并将回收 PCR 产物送往上海生物工程有限公司测序。

1.4 设计基因特异性引物, RACE-cDNA 的合成以及 RACE-PCR 根据已经获得的团头鲂 GtH β 亚基

cDNA 部分序列设计基因特异性引物, 合成 RACE-cDNA, 然后分别进行 3' RACE 和 5' RACE。用于扩增 GtH Iβ 和 GtH IIβ 亚基 cDNA 的引物如下:

GtH Iβ:

P5 正义引物(3' RACE): 5' GACACCACAGCCTGTGCCGGGTTTTGC 3';

P6 反义引物(5' RACE): 5' CTGGTAGTTCTGCATCATGGGGCTACGG 3'.

GtH IIβ:

P7 正义引物(3' RACE): 5' CCGCTACGAGACAGTCCGCTTGCCAGAC 3';

P8 反义引物(5' RACE): 5' GGGACATGCAGTAATCGGGCTGCAGGC 3'.

3' RACE-cDNA 的合成以及 3' RACE-PCR: 根据试剂盒的操作流程进行。取 1μg 总 RNA 为模板, 采用引物 3' CDS-primer 和反转录酶 BD Powerscript reverse transcriptase 在 10μL 的反应体系中合成 3' RACE-cDNA。反转录产物用 100μL Tricine-EDTA buffer 稀释后, 取稀释液 2.5μL 为模板, 采用聚合酶 50× BD Advantage 2 Polymerase Mix, 通用引物(UPM) 和基因特异性引物 P5 (P7) 进行 3' 扩增。反应体系为 50μL, 反应条件为: 94 ℃ 30s, 68 ℃ 30s, 72 ℃ 3min, 45 个循环。

5' RACE-cDNA 的合成以及 5' RACE-PCR: 操作流程基本同 3' RACE。不同之处在于 5' RACE-cDNA 的合成是以 5' CDS-Primer 及 BD-SMART II A Oligo 为反转录引物。采用 5' RACE-cDNA 为模板, UPM 和基因特异性引物 P6 (P8) 进行 5' 端扩增, 其他步骤与 3' RACE 基本相同。

1.5　RACE 产物的纯化、克隆及测定分析　将 RACE 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Nucleo Trap gel (BD Biosciences) 回收试剂盒对目的片段进行回收纯化。并将纯化后的 RACE 产物与 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司) 连接、构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌(*E. coli*) DH5α (TaKaRa 公司), 经平板培养后, 筛选重组子进行插入片段检测, 并进行测序分析, 序列测定由上海生物工程有限公司完成。

1.6　设计引物扩增全长序列　由部分序列, 3' 和 5' RACE 产物拼接出全序列后, 由序列 ORF 的两端设计引物, 进行全序列 GtH Iβ 和 GtH IIβ PCR, 并将产物送至上海生物工程有限公司测序。扩增全序列 GtH I 和 GtH IIβ 的引物如下:

GtH Iβ:

P9　正义引物: 5' GTTGCCAGCGCTGATGAGG 3';

P10　反义引物: 5' GTGCAGCTGGATGTCTGCTG 3'.

GtH IIβ:

P11　正义引物: 5' CTTCCACCATGTGAGCCAG 3';

P12　反义引物: 5' CTGAGACATGCAGTAATCGGG 3'.

1.7　序列分析　运用 ClustalX、Dnastar、Mega3 等软件, 将团头鲂 GtH β 亚基氨基酸序列与其他脊椎动物进行序列比对、分析, 比较团头鲂与其他鱼类和生物的亲缘和进化关系。用于序列比对的各种脊椎动物的 GtH Iβ 和 GtH IIβ 的序列来源(NCBI 注册号) 见表 1。

表 1　序列比对中脊椎动物 **GtH Iβ** 和 **GtH IIβ** 的序列来源(NCBI 注册号)

Tab. 1　The sources (NCBI accession numbers) of vertebrate GtH Iβ and GtH IIβ used for sequence alignment

全名 Species	拉丁文名 Latin name	NCBI 注册号 NCBI accession numbers	
		GtH Iβ	GtH IIβ
团头鲂	*Megalobrama amblycephala*	本研究	
青鱼	*Mylopharyngodon piceus*	AF319961	AF319960
黑头软口鲦	*Pimephales promelas*	ABB51644	ABB51645
鲤鱼	*Cyprinus carpio*	AB003583	X59889
金鱼	*Carassius auratus*	D88023	D88024
斑马鱼	*Danio rerio*	AY714131	AY714132
斑点叉尾鮰	*Ictalurus punctatus*	AF112191	AF112192
日本鳗鲡	*Anguilla japonica*	AB016169	AB175835
大麻哈鱼	*Oncorhynchus keta*	M27153	M27154
虹鳟	*Oncorhynchus mykiss*	BAB17686	BAB17687
施氏鲟	*Acipenser schrenckii*	AY575920	AY575921
牙鲆	*Paralichthys olivaceus*	AF268693	AF268694
条纹狼鲈	*Morone saxatilis*	L35070	L35096
斑鳢	*Channa maculata*	AY447038	AY447037
底鳉	*Fundulus heteroclitus*	M87014	M87015
小点猫鲨	*Scyliorhinus caniaula*	SCA310344	CAC43236
草龟	*Chinemys reevesii*	BAB92948	BAB92949
红腹蝾螈	*Cynops pyrrhogaster*	BAB92958	BAB92959
湖蛙	*Rana ridibunda*	CAC39253	CAC39252
褐家鼠	*Rattus norvegicus*	AAB60705	AAA96703
人	*Homo sapiens*	AAB02868	AAL69719

2 结 果

2.1 团头鲂 GtH Iβ 亚基 cDNA 全长

运用简并引物 P1、P2 进行 PCR, 得到的产物只有一条明带, 其大小约为 260bp。经序列分析结果显示: 片段大小为 265bp, 与预期的长度大小相同(图 1A)。

通过 3' RACE (UPM, P5) 和 5' RACE (UPM, P6), 并结合获得的部分序列后, 拼接出全序列。进一步地, 由拼接序列 ORF 的两端设计引物进行 PCR, 得到的序列经测序证明与拼接序列一致。经序列分析得到了 GtH Iβ 亚基 cDNA 全长(图 1A, 1C; 图 2)。GtH Iβ 亚基 cDNA 全长为 567bp, 由 26bp 的 5'-UTR, 393bp 的 ORF 以及 148bp 的 3'-UTR 组成。其 ORF 可能包括由 22 个氨基酸组成的信号肽和由 108 个氨基酸组成的成熟肽(在线 SignalP 程序, (图 2)。

2.2 团头鲂 GtH IIβ 亚基 cDNA 全长

运用简并引物 P3、P4 进行的 PCR, 得到的产物只有一条明带, 其大小约为 290bp。经序列分析结果显示: 片段大小为 288bp, 与预期的长度大小相同(图 1B)。

通过 3' RACE (UPM, P7) 和 5' RACE (UPM, P8), 并结合获得的部分序列后, 拼接出全序列。同样, 由拼接序列 ORF 的两端设计引物进行 PCR 扩增, 得到的序列经测序证明与拼接序列一致。经序列分析得到了 GtH IIβ 亚基 cDNA 全长(图 1 B, 1C; 图 2)。GtH IIβ 亚基 cDNA 全长 564bp, 由 43bp 的 5'-UTR, 426bp 的 ORF 以及 95bp 的 3'-UTR 组成。其 ORF 可能包括由 24 个氨基酸组成的信号肽和由 117 个氨基酸组成的成熟肽(在线 SignalP 程序, (图 2)。

2.3 序列分析

分别将团头鲂 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基氨基酸序列与其他 20 种脊椎动物的 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基或 FSH β、LH β 亚基进行了比较(图 3)。在推测出的氨基酸序列中, 团头鲂 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基都含有 12 个位置保守的半胱氨酸残基和 1 个 N 糖基化位点。

团头鲂 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基与青鱼等 20 种脊椎动物的氨基酸序列相似性见表 2。团头鲂 GtH Iβ, GtH IIβ 亚基与鲤科鱼类相似性最高。GtH Iβ 亚基与青鱼、黑头软口鲦(*Pimephales promelas Rafinesque*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、金鱼的相似性为 90% —80%, 与其他几种鱼类的为 66% —31%, 与四足类的相似性最低, 为 38% —21%; GtH IIβ 亚基与青鱼、黑头软口鲦、鲤鱼、金鱼的相似性为 95% —87%, 与其他几种鱼类的为 75% —41%, 与四足类的相似性则为 49% —36%。另外, 团头鲂 GtH Iβ, GtH IIβ 亚基的

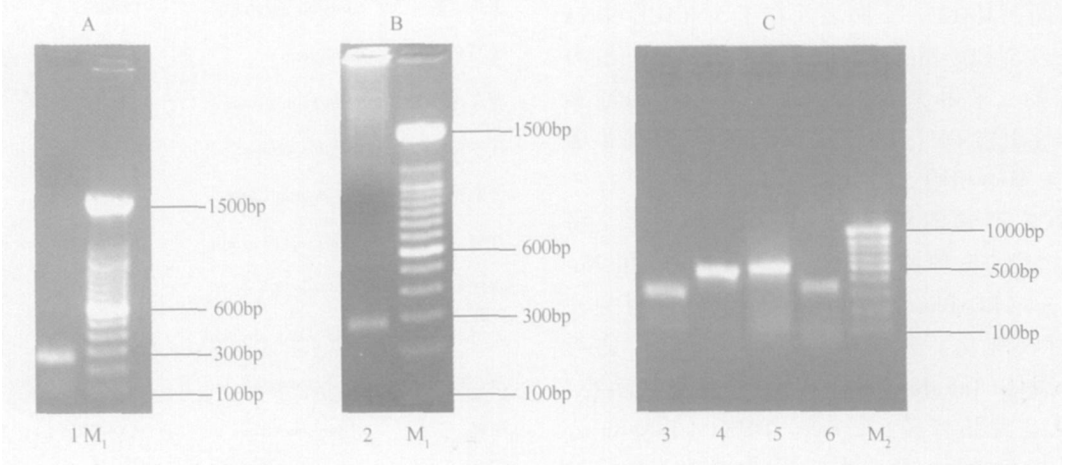

图 1 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoretic analysis of RT-PCR and RACE

M_1, M_2: 100bp DNA 分子量标记; 1. 团头鲂 GtH Iβ 亚基 cDNA 部分序列扩增产物; 2. 团头鲂 GtH IIβ 亚基 cDNA 部分序列扩增产物; 3. GtH Iβ 亚基 cDNA 5'-RACE 扩增产物; 4. GtH Iβ 亚基 cDNA 3'-RACE 扩增产物; 5. GtH IIβ 亚基 cDNA 5'-RACE 扩增产物; 6. GtH IIβ 亚基 cDNA3'-RACE 扩增产物

M_1, M_2: 100bp DNA ladders; 1. PCR product of partial GtH Iβ subunit cDNA; 2. PCR product of partial GtH IIβ subunit cDNA; 3. 5'-RACE product of GtH Iβ subunit cDNA; 4. 3'-RACE product of GtH Iβ subunit cDNA; 5. 5'-RACE product of GtH IIβ subunit cDNA; 6. 3'-RACE product of GtH IIβ subunit cDNA

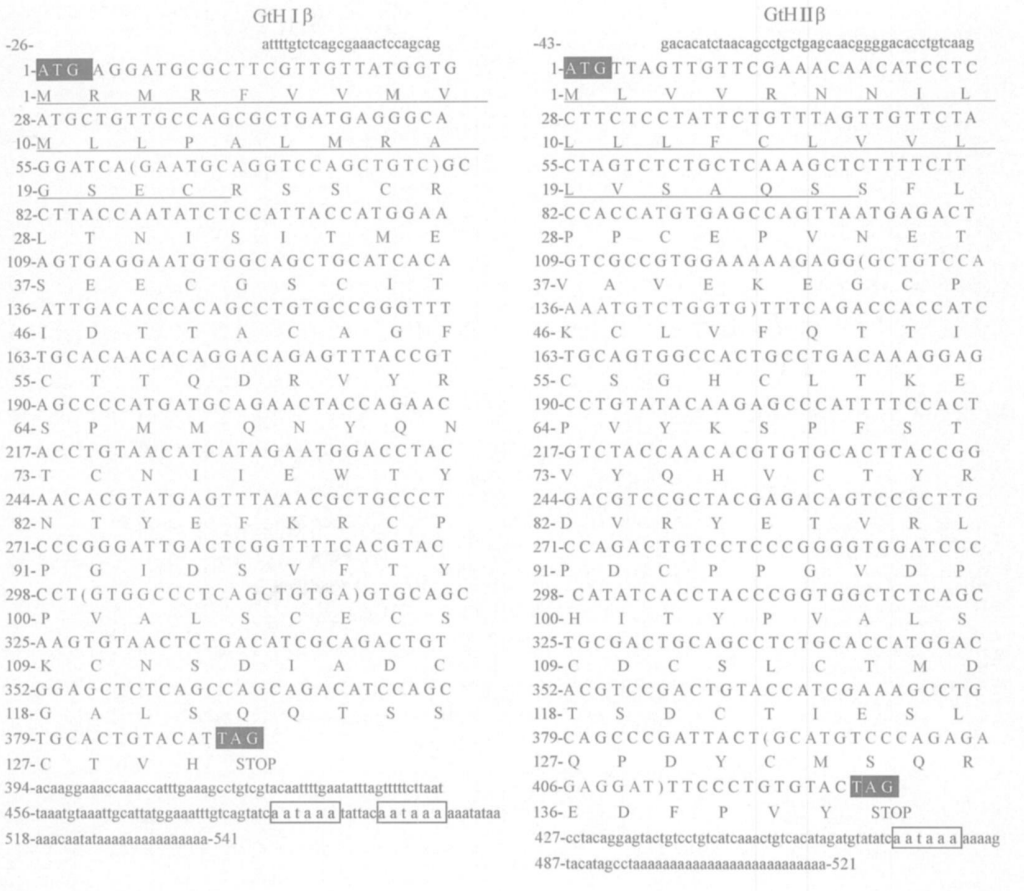

图 2　团头鲂 GtH β 亚基 cDNA 和氨基酸序列

Fig. 2　The *Megalobrama amblycephala* GtH β subunits cDNA and deduced amino acid sequence

小体字母代表 5′, 3′ 非翻译区; 大写字母部分为编码区; 上面为核苷酸序列、下面为氨基酸序列。带下划线的序列为信号肽; 黑框中的为启始密码子和终止密码子; 多聚腺苷酸加尾信号(AATAAA)用方框标出; 括号中为简并引物

The 5′-, 3′-untranslated regions are in lower case, and coding regions are in uppercase, while the upper sequence indicates the nucleotide sequence and the lower shows the amino acid sequence. The putative signal peptide sequences are underlined. Sequences in black boxes are start and stop codons. Putative polyadenylation signals (AATAAA) are boxed; degenerate primers are in brackets

相似性为 38.6%。

3　讨　论

RACE 技术是一种基于 PCR 原理由已知部分的基因序列来获得完整 cDNA 的方法。RACE 的优点是: 用 cDNA 文库来分离很难得到的、丰度很低的表达基因, 用 RACE 法就比较方便。

本实验运用 RACE 法获得了团头鲂 GtH β 亚基 cDNA 全长序列, 并且运用 ClustalX、Dnastar、Mega3 等软件对团头鲂 GtH β 亚基 cDNA 进行了分析, 并对推导出的氨基酸序列进行了相似性比较。通过该实验的完成, 也能够为进一步研究团头鲂的生殖生理, 以及内分泌干扰物质对团头鲂生殖机能的危害提供理论基础。

表 2 中列出了团头鲂 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基与青鱼等 20 种脊椎动物氨基酸序列相似度。可以看到: 团头鲂与青鱼、黑头软口鲦、鲤鱼、金鱼的相似度最高, 而与其他鱼类以及四足类的相似度则较低, 这可以说明团头鲂在分类中的地位、亲缘和进化关系, 也说明在长期的进化过程中 GtH β 亚基拥有较强的保守性, 这点在图 4 的进化树中能够更直观地看出来。值得注意的是, GtH IIβ 亚基的相似度总是高于 GtH Iβ 亚基, 说明 GtH IIβ 亚基在进化中保持了较高的保守性。

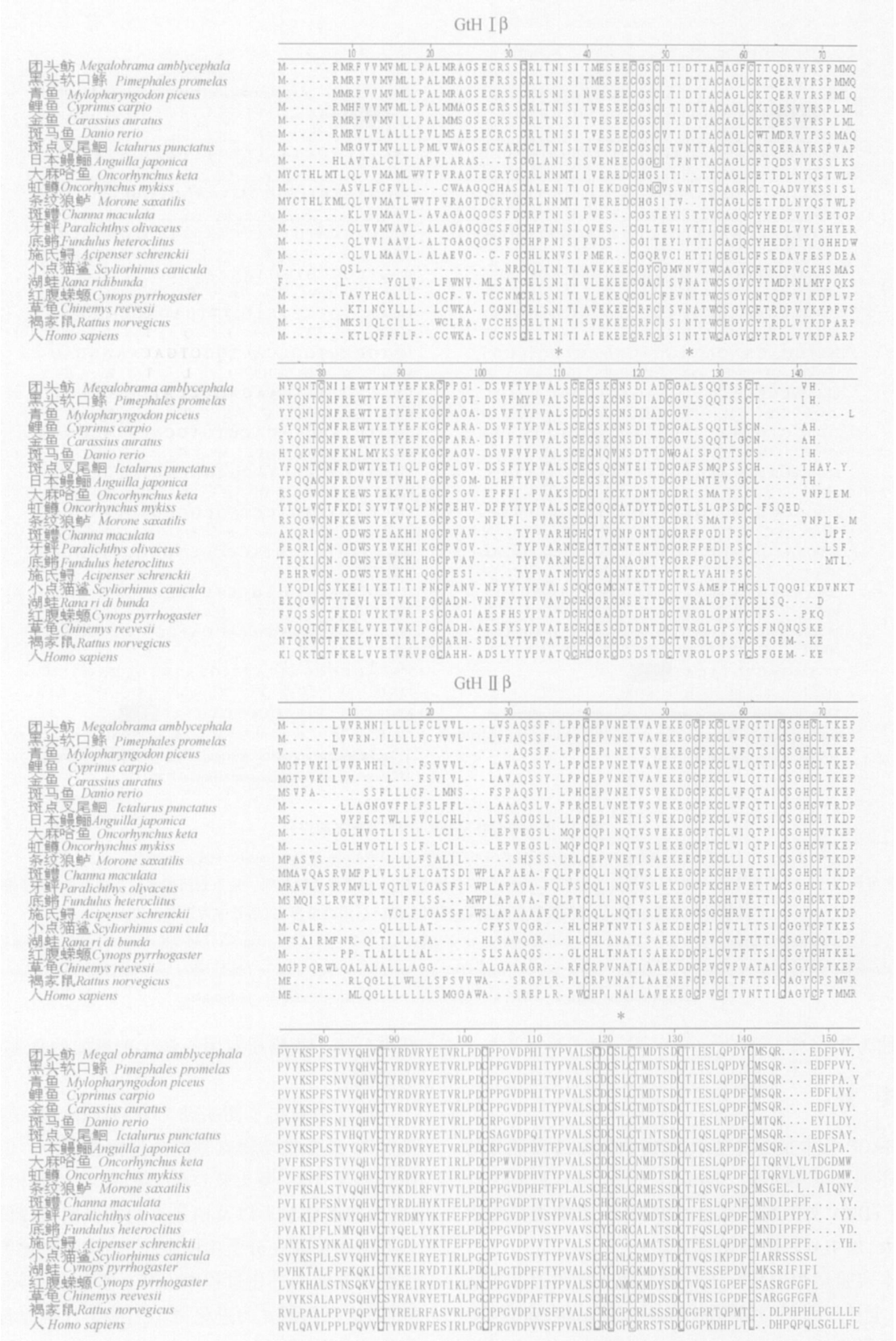

图 3 GtH Iβ、GtH IIβ 亚基多序列比对

Fig 3 Multiple sequence alignment of GtH Iβ and GtH IIβ subunits amino acid sequence

序列中插入了短划线以获得最大的相似性, 方框中为 GtH Iβ 和 GtH IIβ 亚基 12 个保守半胱氨酸残基, N 糖基化位点在序列下方用星号标出

Gaps (–) are inserted to obtain maximum homology. Twelve conserved cysteine residues are boxed and asterisks under the sequences show the N-linked glycosylation sites

表 2　团头鲂与其他几种动物 GtHβ 亚基氨基酸序列相似度比较

Tab. 2　Amino acid identities of GtHβ subunits between *Megalobrama amblycephala* and other vertebrates

相似度(100%) Identities	GtH Iβ	GtH IIβ
	团头鲂 GtH Iβ	团头鲂 GtH IIβ
青鱼	90	95
黑头软口鲦	84	92
鲤鱼	83	85
金鱼	80	87
斑马鱼	66	73
斑点叉尾鮰	63	75
日本鳗鲡	45	72
大麻哈鱼	43	66
虹鳟	38	67
施氏鲟	39	58
牙鲆	36	51
条纹狼鲈	35	56
斑鳢	32	55
底鳉	31	47
鲨鱼	33	41
龟	29	49
蝾螈	25	47
湖蛙	21	43
鼠	35	40
人	38	36

GtH Iβ 和 GtH IIβ 亚基中都含有 12 个保守的半胱氨酸残基和 1 个 N 糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)[20], 这反映出 GtH Iβ 亚基和 GtH IIβ 亚基在进化中高度的保守性。根据 GtH β 亚基的多序列比较(图 3) 可以看出, GtH Iβ 亚基中含有 12 个保守的半胱氨酸残基, 其中 11 个在比较的多个序列中完全保守。在比较的几种脊椎动物中, 大多数淡水鱼类(包括团头鲂) 和四足类含有第 3 个半胱氨酸残基(Cys49), 在多数海水性鱼类中都缺失第 3 个半胱氨酸残基(Cys49), 这是一个比较有趣的现象。同样, 在图 3 中可以看到, GtH IIβ 亚基的 12 个半胱氨酸残基在与比较的各种动物中完全保守。国外学者的研究表明[21], FSH β (GtH Iβ) 和 LH β (GtH IIβ) 亚基中的 12 个半胱氨酸残基可以形成 6 个二硫键, 以其中 3 个二硫键形成的半胱氨酸结为中心, 又向外延伸出 3 个β 发夹[15]。这种结构对于 GtH α 亚基和β 亚基的组装具有关键性的作用, 而只有两个亚基结合之后 GtH 才具有较高的活性以及受体结合能力。这 6 个二硫键的配对如下: Cys32—80, Cys 46—95, Cys 49—133, Cys 57—111, Cys 61—113 以及 Cys 116—123[21]。有的学者在研究中指出[20], 在不含有第 3 个半胱氨酸残基(Cys49) 的 GtH Iβ 亚基中, 第 12 个半胱氨酸残基(Cys133) 倾向于与一个转移到 N 末端的半胱氨酸残基形成 1 个二硫键, 以帮助 α 和β 二聚体的形成。

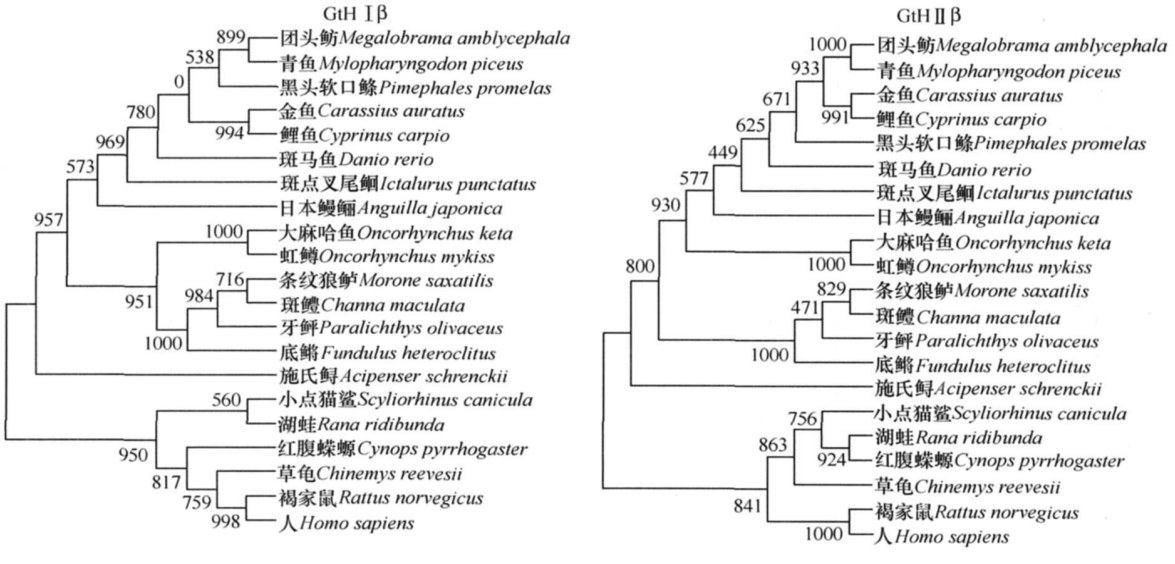

图 4　根据图 2 的多序列比较用邻接法得到的进化树, 图由 Mega3 做出

Fig. 4　Phylogenetic trees of selected GtH β-subunits from vertebrates with particular reference to fish. The trees were constructed by neighbor-joining method from the aligned sequences in Fig. 2 and drawn with Mega3

另一方面,我们知道异二聚体糖蛋白的寡聚糖结构对激素的合成、分泌、代谢率以及激素的调节效率都起着重要的作用[22, 23]。有研究报道,FSH β亚基一般包含2个N糖基化位点(Asn36和Asn53),而LH β只有1个N糖基化位点(Asn44)。这几个糖基化位点都会影响激素与细胞受体的结合力,而其中FSH β亚基的第二个N糖基化位点(Asn53)还会影响信号转导,曾有研究证明人类FSH β亚基的第2个N糖基化位点突变后(Asn-Gln),其生物活性降低[22]。然而,如团头鲂、金鱼、鲤鱼、大麻哈鱼、斑马鱼(*Danio rerio*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、斑鳢(*Channa maculate*)、条纹狼鲈等很多鱼类的GtH Ⅱβ亚基都不含有第2个N糖基化位点,要想阐明这是否会影响GtH Ⅱβ亚基的空间结构以及生物活性,还需要进一步的实验研究来认识。

参考文献:

[1] John G P, Thomas F P. Glycoprotein hormones: structure and function [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1981, **50**: 465—495

[2] Suzuki K, Kawuchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1988, **71**: 292—301

[3] Li M D, Ford J J. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequence of the alpha-and beta-subunits of glycoprotein hormone gene family [J]. *J. Endocrinol.*, 1998, **156**: 529—542

[4] Lin H R. Fish Physiology (1st edition) [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press. 1999, 158 [林浩然. 鱼类生理学(第一版). 广州: 广东高等教育出版社. 1999, 158]

[5] Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads [J]. *Zool. Sci.*, 1987, **4**: 209—222

[6] Sekine S, Saito A, Itoh H, Kawauchi H, Itoh S. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, **86** (22): 8645—8649

[7] Hassin S, Elizur A, Zohar Y. Morone saxatilis Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and-II subunits [J]. *J. Mol. Endocrinol.*, 1995, **15**(1): 23—35

[8] Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, *et al*. Unique expression of gonadotropin-I and-II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation [J]. *Biol. Reprod.*, 2000, **63**(1): 308—319

[9] Yoshiura Y, Suetake H, Aida K. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. *J. Mol. Endocrinol.*, 1996, **16**(2): 171—181

[10] Nagae M, Todo T, Gen K, Kato Y, *et al*. Molecular cloning of the cDNAs encoding pituitary glycoprotein hormone alpha-and gonadotropin Ⅱ beta-subunits of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, and increase in their mRNAs during ovarian development induced by injection of chum salmon pituitary homogenate [J]. *J. Mol. Endocrinol.*, 1996, **16**(2): 171—181

[11] Sohn Y C, Suetake H, Yoshiura Y, *et al*. Structural and expression analyses of gonadotropin I beta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Gene*, 1998, **222**(2): 257—267

[12] Zhou L B, Liu X C, Ye W, Lin H R. In vitro studies of effects of 17β-estratiol and methyl-testosterone on gonadotropin secretion by pituitary of helmet catfish (*Cranoglanis bouderius*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(2): 114—118 [周立斌, 刘晓春, 叶卫, 林浩然. 17β-雌二醇和甲基睾酮对离体长臀鮠脑垂体促性腺激素分泌的影响. 中国水产科学, 2005, **12**(2): 114—118]

[13] Deng S P, Wang D S, Zhang Y G, Wu T L. Effects of Exogenous Hormones on the Level of Serum Gonadotropin in Southern Catfish (*Silurus meridionalis*) [J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)*, 2003, **28**(4): 614—617 [邓思平, 王德寿, 张耀光, 吴天利. 外源激素对南方鲶血清促性腺激素水平的影响. 西南师范大学学报(自然科学版), 2003, **28**(4): 614—617]

[14] Zhao J L, Li S F, Cai W Q, Zou S M. Biochemical genetic marker genogenetic population of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, **9**(2): 166—168 [赵金良, 李思发, 蔡完其, 邹曙明. 团头鲂雌核发育生化遗传标记的初步研究. 上海水产大学学报, 2000, **9**(2): 166—168]

[15] Yang M S. Comparative effects of different inducing methods on artificial induced spawning of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2001, **31**(4): 5—6 [杨明生. 团头鲂催产中不同催产剂和方法的效果比较. 淡水渔业, 2001, **31**(4): 5—6]

[16] Zhao W X. Testosterone and 11-oxotestosterone changes during an annual cycle in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1991, **22**(5): 412—415 [赵维信. 团头鲂两种雄性激素浓度的周年变化. 海洋与湖沼, 1991, **22**(5): 412—415]

[17] Zhao W X, Jiang R L, Zhou Q B, *et al*. Annual variations in serum thyroid hormone levels of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2000, **9**(2): 108—110 [赵维信, 姜仁良, 周秋白, 等. 团头鲂血清甲状腺激素浓度的周年变化. 上海水产大学学报, 2000, **9**(2): 108—110]

[18] Wang W, Du K H. Immune electron microscope localization of calmodulin in gonadotropin cell of *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 1993, **1**: 86 [王文, 杜开和. 团头鲂脑垂体GtH细胞钙调素免疫电镜定位. 电子显微学报, 1993, **1**: 86]

[19] Lao H H, Bai J J, Ye X, *et al*. Molecular Cloning and Sequence Analysis of Growth Hormone cDNAs from Two Species of Gurnards [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, **9**(4): 346—349 [劳海华, 白俊杰, 叶星, 等. 团头鲂和广东鲂生长激素cDNA的分子克隆和序列分析. 农业生物技术学报, 2001, **9**(4): 346—349]

[20] Abhijit C, San-Tai S, John Y Y. Molecular cloning of cDNAs and strutural model analysis of two gonadotropin β-subunits of snakehead

fish (*Channa maculate*) [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 2005, **143**: 278—286

[21] Fox K M, Dias J A, Van Roey P. Three-Dimensional Structure of Human Follicle-Stimulating Hormone [J]. *Mol. Endocrinol.*, 2001, **15**: 378—389

[22] Flack M R, Froehlich J, Bennet A P, *et al*. Site-directed Mutagenesis Defines the Individual Roles of the Glycosylation Sites on Follicle-stimulating Hormone [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**: 14015—14020

[23] Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias J A. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone [J]. *Endocrine.*, 1999, **11**(3): 205—215

MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE TWO GONADOTROPIN β-SUBUNIT cDNAs OF BLUNT SNOUT BREAM(*MEGALOBRAMA AMBLYCEPHALA*)

QU Xian-Cheng, LIU Ying, YANG Yan-Hong, CUI Yan-Hui and ZHOU Zheng-Feng

(Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090)

Abstract: The cDNAs encoding β-subunits of gonadotropin hormone I (GtH Iβ) and gonadotropin hormone Ⅱ(GtH IIβ) have been cloned from pituitary of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) using reverse transcription-polymerase chain reaetion (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA end (RACE) methods. Then, amino acid sequence and phylogenetic relations were analysed. The GtH Iβ subunit cDNA is 567 base pair(bp) that comprises of a 5'-UTR of 26bp, a 3'-UTR of 148bp and an open reading frame (ORF) of 393bp which encodes a 130 amino acid protein with a signal peptide of 22 amino acids and a mature peptide of 108 amino acids. On the other hand, GtH IIβ subunit cDNA is 564bp that comprises of a 5'-UTR of 43bp, a 3'-UTR of 95bp and an ORF of 426bp which encodes a 141 amino acid protein with a signal peptide of 24 amino acids and a mature peptide of 117 amino acids. The amino acid sequence identities of *Megalobrama amblycephala* GtH Iβ and GtH IIβ subunits in comparison with other 15 fishes including *Mylopharyngodon piceus* are 90% —31% and 95% —41%, respectively; while in comparison with 5 tetrapods including *Rana Ridibunda* are 38% —21% and 49% —36%, respectively. Both GtH Iβ and GtH IIβ subunits of *Megalobrama amblycephala* resemble most to those of Cyprinidae, implying their closer phylogenetic relationship. In addition, both *Megalobrama amblycephala* GtH Iβ and GtH IIβ subunits have 12 conserved cysteine residues and 1 N-linked glycosylation site.

Key words: RT-PCR; RACE; Cloning; *Megalobrama amblycephala;* GtH β subunit cDNA