

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)两种催乳素受体基因的 cDNA 克隆和 mRNA 表达分析*

张 勇¹ 马细兰^{2,3} 陈勇智³ 李水生¹ 陈华谱¹ 刘晓春¹ 林浩然¹

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室 广州 510275; 2. 华南师范大学生命科学学院 广州 510631; 3. 惠州学院生命科学系 生物技术研究所 惠州 516007)

摘要 采用 RT-PCR 方法克隆了斜带石斑鱼两种催乳素受体(Prolactin receptor, PRLR)的 cDNA 序列, 序列分析表明: PRLR1 开放阅读框为 1947bp, 共编码 649 个氨基酸, PRLR2 开放阅读框为 1749bp, 共编码 487 个氨基酸, PRLR1 与 PRLR2 的氨基酸同源性为 40.4%。用 Real-time RT-PCR 方法研究了 PRLR1 和 PRLR2 在各组织和早期发育不同阶段的表达情况, 结果表明: PRLR1 和 PRLR2 在所检测的 12 种组织中均有表达, 其中以鳃、肾、肠表达量较高; PRLR1 在受精期表达最高, PRLR2 在视囊形成期表达最高, 而且除受精期外 PRLR2 在各时期的表达量均高于 PRLR1。

关键词 斜带石斑鱼, 催乳素受体, cDNA 克隆, Real-time RT-PCR, mRNA 表达
中图分类号 Q95

催乳素(Prolactin, PRL)是一种多功能的单链多肽激素, 属于 GH/PRL/SL 蛋白家族。它主要通过与其靶组织细胞表面的特异膜受体相互作用, 启动信号传导来发挥作用。在高等的脊椎动物中, PRL 与生物体的盐水平衡、生长发育、内分泌和代谢、脑和行为、繁殖以及免疫调控有关(刘臻等, 2010)。

20世纪70年代, 催乳素受体(Prolactin receptor, PRLR)被证实是一种特异的、高亲和性的、膜锚定蛋白。大鼠、人等哺乳动物中, PRLR 存在多种形式, 是由不同启动子选择性的转录和转录后选择性剪切形成的。PRLR 的不同形式在长度和细胞内区的组成上有所不同, 分别被称为长型、中长型和短型PRL 受体。例如: 在大鼠中就有291 个氨基酸(短型)、393 个氨基酸(中长型)和591 个氨基酸(长型)的PRLR (Bole *et al.*, 1998)。1995年, 在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中第一次得到鱼类PRLR的全长cDNA (Sandra *et al.*, 1995)。迄今, 已经从多种鱼类中克隆到了PRLR的全长cDNA, 并对黑鲷(Huang *et al.*, 2007)、尼罗罗非鱼(Zhang *et al.*, 2010)中克隆得到的两种PRLR 基因的全长cDNA, 通过配体受体结合实验证明这两

种PRLR都能与PRL结合诱导下游信号通路, 从而证明这两种PRLR的确是PRL受体基因。

鱼类 PRLR 在肾、鳃和肠中高丰度表达, 在其它组织, 如脑、垂体、肝脏、肌肉、皮肤、脾、头肾、卵巢、精巢及淋巴细胞中也检测到了 PRLR 的 mRNA, PRLR 在鱼类组织中广泛分布, 提示 PRL 在鱼类中除调节渗透压外, 也参与其它生命活动的调节(Manzon, 2002)。有关鱼类 PRL 和 PRLR 在早期发育中表达模式的研究不多, 目前已在虹鳟、黑鲷和罗非鱼的早期发育阶段检测到 PRLR 的 mRNA(Yang *et al.*, 1999; Shiraiishi *et al.*, 1999), 表明 PRL 对仔鱼胚胎发育可能起重要作用。

本文以斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)这一重要经济鱼类为研究对象, 通过 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法克隆了两种 PRLR 的 cDNA, 应用 Real-time PCR 方法比较分析了两种 PRLR 基因的时间和空间表达模式, 拟为鱼类的内分泌研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)

* 公益性行业(农业)科研专项, 200903046 号。张 勇, 博士, 副教授, E-mail: lsszy@mail.sysu.edu.cn

通讯作者: 林浩然, 教授, 中国工程院院士, E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-09, 收修改稿日期: 2011-11-16

表 1 克隆斜带石斑鱼 PRLRs cDNA 序列及检测 mRNA 表达所用引物
Tab.1 Primers used for cloning and mRNA expression analysis of *E. coioides* PRLRs

引物	序列
克隆引物	
中间片段克隆引物	
PRLR-F	5'-CTAC(AT)AC(AC)T(CG)AC(CG)GTGGTGGC-3'
PRLR-R	5'-GGC(CT)TACAG(TC)GCACCTGAAC-3'
5'RACE 引物	
PRLR1-R1	5'-GTACACCACATCTACATCCACAG-3'
PRLR1-R2	5'-GAGAAGGTGCTGCCCAGTGC-3'
PRLR2-R1	5'-CACGTTCTCAGGAGCGTATG-3'
PRLR2-R2	5'-GGTGTCTGAAGTGGCATTCC-3'
3'RACE 引物	
PRLR1-F1	5'-GGATCACGCTCATCTACGAGCTC-3'
PRLR1-F2	5'-GATGCACCTTG CAGGCCAGCAG-3'
PRLR2-F1	5'-CTATAACACAGACACCAAG-3'
PRLR2-F2	5'-CGTATTT CAGCCTGTATGG-3'
AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
表达引物	
β -actin F	5'-GGTGGGTATGGGTCAGAAAGA-3' nt 213-233
β -actin R	5'-GCTGTGGTGGTGAAGGAGTAG-3' nt 672-692
PRLR1-F	5'-ACCTACTCTGACCCTGTGGA-3' nt 543-562
PRLR1-R	5'-GGAGATACTCGGGAACCTTTG-3' nt 881-900
PRLR2-F	5'-CAATGCCCTTGGAATACA-3' nt 538-556
PRLR2-R	5'-TCCGTGCGAGGAAAGTTAG-3' nt 894-912

表 2 斜带石斑鱼 PRLR 与其它脊椎动物 PRLR 氨基酸的相似性比较
Tab.2 Amino acid identities among PRLR of *E. coioides* and other vertebrates

PRLR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	100												
2	36.6	100											
3	35.6	87.2	100										
4	46.3	34.8	33.6	100									
5	51.2	36.5	35.3	63.3	100								
6	38.2	34.2	33.6	38.4	40.4	100							
7	35.1	46.8	47.4	34.7	36.1	33.2	100						
8	35.1	44.6	45.8	34.5	34.9	33.3	68.9	100					
9	51.7	34.6	33.8	64.0	83.0	39.2	31.3	35.6	100				
10	37.2	32.3	31.4	34.6	36.1	66.7	30.8	31.3	35.6	100			
11	48.4	35.5	35.0	57.0	72.4	36.9	36.6	35.7	68.2	35.0	100		
12	34.1	28.8	29.0	32.2	34.7	53.2	29.1	28.8	34.6	48.9	34.3	100	
13	81.7	35.5	35.2	46.6	50.0	38.7	34.5	35.7	51.9	36.9	48.6	34.5	100

注: 1. common carp, 2. frog-prlrA, 3. frog-prlrB, 4. fugu, 5. grouper1, 6. grouper2, 7. human, 8. rat, 9. seabream1, 10. seabream2, 11. tilapia1, 12. tilapia2, 13. zebrafish. 同源性关系通过 DNASTAR 软件包的 MegAlign 计算。各种动物的 PRLR 氨基酸序列来自 NCBI, 序列号参考图 3—图 6

1 GCAATGATGAAGAAAGTCATCGAAGTCTCTGCTGTGTGCTGCTAGTCTTTATGCCGCATGCGAGGGAACA 75
 1 M M K K V I E V L L L L L L L V F M P H A E G T 24
 76 CGCTATAGCCCTCCGGGCAAGCCACCGTGTACAGATGTCGTCTCTGAAAGAGACCTTCCACCTGCTGGTGG 150
 25 R Y S P P G K P T L I R C R S P E K E T F T C W W 49
 151 AAGCCGGATCTGTAGGGGACTGCCACCACATACGCCTTGACTATCGCAAAGAGCTCCGACACAGTGCAC 225
 50 K P G S D G G L P T T Y A L Y Y R K E S S D T V H 74
 226 GAGTGTCTGACTACCAGACGGCCGGGAGAACTGCTGCTTCTCAACAAGAACGACACATCCATCTGGGTCAGC 300
 75 E C P D Y Q T A G E N S C F F N K N D T S I W V S 99
 301 TACAACATCACCGTGGTGGCCACCAACGCACTGGGAGCACCTTCTCCGACCTGTGGATGTAGATGTGGTGTAC 375
 100 Y N I T V V A T N A L G S T F S D P V D V D V V Y 124
 376 ATTGCAAGCCTAATCTCCAGAGAAGGTAACAGTGAATGGAGGATAAGGGCTGGCCCTTTCTGCGGGTG 450
 125 I V K P N P P E K V T V T V M E D K G W P F L R V 149
 451 TCATGGGAACCCACATAAGGCTGACACCCGCTCTGGTGGATCAGCTACGAGCTCCCGCTCAAGTTG 525
 150 S W E P P H K A D T R S G W I T L I Y E L R V K L 174
 526 GAGGGGAAAATGACTGGGAGATGCACCTTGCAGGCCAGAGAAGATATTTAACATCTTCCAGCTGCGGTGAGT 600
 175 E G E N D W E M H L A G Q Q K I F N I F S L R S G 199
 601 GGTAATACCTTGTTCAGGTGCGCTGAAGCCCGATCATGGCTTTGGAGTGAATGGAGTTCAACCTCTATATC 675
 200 G K Y L V Q V R C K P D H G F W S E W S S T S Y I 224
 676 AAAGTCTGACTATTTTCATCGGGAGAAGTCAAGTGGATCCTCATAACCGTCTTTTGGCTTCATCTGCTCCTC 750
 225 K V P D Y F H R E K S V W I L I T V F C A F I F L 249
 751 ATCCTCACATGGTGTACACATGAACAGCCGAGTCTGAAGCATTTTCATCTGCTCCAGTCCCTGGCCCTAAA 825
 250 I L T W L L H M N S R S L K H F I L P P V P G P K 274
 826 ATCAAAGGATTTGATAAGCAGCTTCTCAAAAATGGAAAATCTGACAATGTCTCAGTGCATGGTGGTGTCTGAT 900
 275 K G F D K Q L L K N G K S D N V F S A L V V S D 299
 901 TTCCTCCGACCACATCTAAGTATGAGGACTGTGCTGGTGGAGTACCTGGAGTCCAGTCCAGAGGAGCAG 975
 300 F P P T T S N Y E D L L V E Y L E V Y V P E E Q 324
 976 GAGTACTACTGGAGGAAAGCAAGGATCTACAGGATAGCTGCCTAAAATCTGAGAGCTCCACATGTGACAGTAC 1050
 325 E L I L E E S K D L Q D S C L K S E S S T C D S D 349
 1051 TCTGGCCGAGGACAGTCCGACAGCCACACTCTGCTGATGGAGAGGTGTGAAGATACAAAAGAAAGAGAGGCAA 1125
 350 S G R G S C D S H T L L M E R C E D T K E E E R Q 374
 1126 CGAGATCGGGAACCGGTCGAATGCAAAACGGAGGACAGTGGCCGAGGAGGACTGGGAGCAGGAAAGCGTGACC 1200
 375 A D R E S G R M Q T E A Q W R Q K D W E Q E A L T 399
 1201 TATGCTCATGAGACATGGTATGCCCTGACATGTCAGTGGCAGGTTGAAGACCTGGCCCTCTGTGTTTCTCCG 1275
 400 Y A H G D M V S P D M S S G R V K T W P S V F S P 424
 1276 CTGCCCCAGTACAGTCAAACCCACTGGACCAACAGAGCTCACTTGAGATGACTAAACAGCATTCCCTCTCGACA 1350
 425 L P Q Y S S N P L D Q Q S S L E M T K Q H S L S T 449
 1351 TCCTCTATCTACCCAGCTGGCCATGGCACAAGGAGACTCTCGGCCGAGCTACTGGGACTTCTGCATGAGC 1425
 450 S S Y L T Q P G H G T K E T L G P S Y W D F C M S 474
 1426 GACAAGCAGCCTCATCTGCTCCATCTCAGCCGAGGCTACCGGCAACTCCAGGCCACAGCGATGTCAACATC 1500
 475 D K Q P H L L H P Q P Q A H R Q L Q A H S D V N I 499
 1501 TCTCAGCCGAGGCTACCCGCAACTCCAGGCCACAGCGATGTCAACATCTCCTGCATCGGCGGCAAGCCTGCA 1575
 500 S Q P Q A H R Q L Q A H S D V N I S C I G G K P A 524
 1576 CCTGCTGGTCTGCCCTCCGCCGCTTACGGTCCGCCGAGTATGTGGAGGTCAAAGGTCATGAGGAGAATATG 1650
 525 P A G L P S P A L R S A E Y V E V Q R V N E E N M 549
 1651 GTGCTTCTCCAGCTATTTSCAGGAGGATGGCCGACGCCAGCGCTATCCCGAGGCCCCACAGAGGACTAT 1725
 550 V L L Q P I S G G C G D A D G Y P Q A P H R E D Y 574
 1726 AGCAAAGGTGAAGGGGTAGACAGGGACAACGTGCTGCTGCTCCAGAGAGAGGTGAGCGAAGAGGAGAGCATGGAG 1800
 575 S K V K G V D R D N V L L L Q R E V S E E E S M E 599
 1801 ATGGCTGGAGCAGCGAGAGCTGTACACATCTTACATCACCCTACCCTAAGCAACAGCCTGCAGTCTG 1875
 600 M A G A A E S C Y T S Y I T T T T P K Q T A C S L 624
 1876 CCGGTCCAGGACGAAAGGTTCTGAGAGTGGCGGTACGTTGACTGCACTGTATTACACATGCATACCTAC 1950
 625 P V Q D E R V L R V S G Y V D T A T V F T L H T Y 649
 1951 TAGATGCGTCACTAGTTAAACAGAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2012
 650 * 674

图 1 斜带石斑鱼 PRLR1 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of *E. coioides* PRLR1 cDNA and deduced amino acid sequence
注: 上排为碱基序列, 下排为氨基酸序列。信号肽序列为斜体; 保守的半胱氨酸及编码它们的碱基序列以黑体标出; WS 结构和 box1 用框框出; 23 个氨基酸的跨膜区用灰色背景显示; 细胞内区 8 个酪氨酸以黑体表示; *表示终止密码子; 碱基序列上 poly(A)的加尾信号以下划线标出

采自广东省大亚湾水产试验中心, 组织取出后放入经 DEPC 处理的 1.5ml 塑料离心管, 并立即置于液氮

向 nested 引物 PRLR1-R2/PRLR2- R2 进行 5'端片段的扩增, 以 PRLR1-R1/PRLR2-R1 为 GSP, 进行反转录,

中, 带回实验室保存在-80℃超低温冰箱。

1.1.2 试剂 总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent、DNase 试剂盒购自 Invitrogen 公司, ReverTra Ace-α-TM SYBR Green I Real-time RT-PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司, Ex Taq™ 由 TaKaRa 公司生产, E.Z.N.A 质粒提取和胶回收试剂盒为 Omega 公司产品, pGEM-T Easy Vector 载体连接试剂盒购自 Promega 公司, 其余均为国产分析纯试剂。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α由本实验室保存。所有引物由上海生工生物工程公司合成, DNA 序列测定由上海博亚生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 克隆与序列分析 以斜带石斑鱼鳃组织为材料, 提取 RNA, 经 DNase 处理后, 按 ReverTra Ace-α-TM RT-PCR 试剂盒说明书合成第一链。根据从 NCBI 上查找到的鱼类 PRLR 的氨基酸和碱基序列, 在较保守的区域设计简并引物 PRLR-F 和 PRLR-R, 以第一链为模板, 扩增 PRLR cDNA 编码区。PCR 反应程序为: 94℃预变性 3min, 然后 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 2min, 35 个循环后 72℃延伸 15min。将所获得的 PCR 产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上 100V 电泳分离 DNA 片段, 切下目的条带。用 E.Z.N.A 胶回收试剂盒(Omega)纯化目的产物, 直接克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 挑选阳性克隆进行序列测定。根据 PRLR 的中间片段测序结果分析, 获得两种 PRLR 中间片段序列, 把这两种序列分别命名为 gPRLR2 和 gPRLR1。根据两种已知的 PRLR 中间片段, 分别设计反向引物 PRLR1-R1/PRLR2-R1 和反

所得的 RT 产物进行纯化, 加尾, 以此为模板, 以 PRLR1- R2/PRLR2- R2 和 5'特异接头引物 AP 为引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增程序同上, nested PCR 产物测序分析。再根据两种已知的 PRLR 中间片段, 分别设计正向引物 PRLR1-F1/PRLR2-F1 和 nested 引物 PRLR1-F2/ PRLR2-F2 进行 3'端片段的扩增, 用 PRLR1-F1/PRLR2-F1 和反转录产物的 3'通用引物 AUAP 对鳃组织反转录产物进行 PCR, 程序同上。取 PCR 产物为模板, 用 PRLR1-F2/PRLR2-F2 和 AUAP 再进行 PCR, 退火温度采用 58℃。nested PCR 产物测序, 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 对序列进行 blast、BioXM 2.0 对序列进行翻译分析、<http://smart.embl-heidelberg.de/> 对蛋白序列的氨基酸性质进行分析、Clustal X1.8 对脊椎动物中 PRLR 的氨基酸序列进行比对、Phylip 软件包对它们进行系统进化分析、DNAstar 对各序列同源性进行计算。

1.2.2 mRNA 表达分析 组织表达分析实验, 取成熟雌、雄斜带石斑鱼, 经尾静脉取血后立即取垂体、下丘脑、鳃、胸腺、头肾、肝脏、脾脏、胃、肠、肾脏、卵巢、精巢 12 种组织。早期表达分析实验, 选取发育同步的一批受精卵进行观测及拍照, 观察期间的水温为 26—28℃, 海水盐度为 31.5, 按斜带石斑鱼胚胎发育的时间顺序取样, 每管样品约为 50 粒受精卵, 其重量约为 20mg。用 Trizol 提取各样品的总 RNA, 通过 DNase I 处理后, 采用 ReverTra Ace-α- TM First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO, Japan) 进行反转录。采用 β-actin 基因作为内参基因, 校正各基因的反转录效率。同时设计各基因的特异性引物, 引物选用见表 1。

Real-time PCR 反应体系采用 20μl 体系: 10μl SYBR Green Real-time PCR Master Mix (TOYOBO,

```

1 GGGGAAAGACGTCTGTCTCTGTCTGTGTGTCAACATCAGTCACATGTAGCGACGGTCTGACAAAAGTCCCTGAACAGG 77
78 TCAAAAACAAGACACGCAGCCAGCCACGGTTTATTTACCACATTAACACACAGCTGGTGATGCATCTTCAGG 152
153 GCGGGCAGCTAACAGTTTGTCCAGGATGAGGAGACATTTTGGTGGCAGCTCTGTCTGTCTGACGAGCT 227
1 M R R H F G L A L L L L L S A A 16
228 GTGGAGTCCAACAGCATGTCTCCACGGGAAACAGTCTCTGCTCAGCTCAGGTCCTCCCTGAGAAGGAGACGTT 302
17 V E S N S M S P P G K P V L L S C R S P E K E T F 41
303 ACCTGCTGGTGGGAGCCAGCTCCGACGGAGGGCTGCCACCACACACCGCCTGTATTATGAGAGAGAAAGATTG 377
42 T C W W E P G S D G G L P T T H R L Y Y E R E R L 66
378 GAGGAAACGTACGAGTGTCCAGACTATTGGTCAGCAGGGAGAACTCTGTTTCTTTGACAAGAACCACACTCC 452
67 E G T Y E C P D Y W S A G R N S C F F D K N H T S 91
453 ATCTGGGTCGACTACTACCTGACGGTGGTGGCTTCCAACATCTCGGGAATGCCACTTCAGACACCTTTAAGATG 527
92 I W V D Y Y L T V V A S N I L G N A T S D T F K M 116
528 GACGTGATGAAATAGTGAACCATACGCTCTGAGAAGCTGACTCTGCAGGTGGAGGAGAGAGAGAGAGAGCCCA 602
117 D V M E I V K P Y A P E N V T L Q V E E R E D S P 141
603 TGCTCCATGTCAGGTGGGACCTCCCTATAACACAGACACCAAGTCCGGTGGGTCACCATTAATATGAATTA 677
142 C L H V R W E P P Y N T D T K S G W V T I K Y E L 166
678 AGAATCAAACAAGGAAACAAGTGAAGAGGATACAGGTCAGGCACACAAAGCTATTTACGCCTGTATGGCGTC 752
167 R I K Q G N N K W K E Y R S G T Q T Y F S L Y G V 191
753 AGTCTGGGGCGGTGTACACAGTTCAGGTGACTGTAGACTGCACCACGGTGCCTGGAGCGAGTGGAGCAACACC 827
192 S P G A V Y T V Q V K E C R L H H G A W S E W S N T 216
828 ACCTATGTGAAAATCCCAACTATCTTCATAATGACAGACTGTTTGGATAATGGTTTCTGTCTGTCTGCGATT 902
217 T Y V K I P N Y L H N D R L F W I M V S V L S A V 241
903 CCAGTTATAACAGCAGTGTGCATCTTGGTCATAAAGAGGAAACATGTGAAGCAGTTTATCTGCCCCCTGTCTCT 977
242 P V I T A V C I L V I K R K H V K Q F I L P P V P 266
978 GGTCCAAGATAAGAGGAGTGTATGTCCAACTTCTCAAGAGTAGGGATCTGAAGATGTGCACGGTGTCTGTATC 1052
267 G P K I R G V D V Q L L K S R G S E D V D G V L I 291
1053 AACAAACCGAGCTTTCCTCTATGGTGGCTGGAAGGACCAGATGGAGGAATACCTTATCGTGCAGGACAATGAT 1127
292 N N P S F P P M V A W K D Q M E E Y L I V T D N D 316
1128 GACGGCTTTCCTCTATTCTCAACAAAGGAAAGAAAGCCTGATTATTCCTGTGGCTTCCTCTTAGACACAGAA 1202
317 D G L S S Y S Q Q R K K S L I I P A G F L L D T E 341
1203 ATCTATTGTAAGGATCAACCGTGGCTGGGAGAGAAAAGAACGAAACAGAAAACACCATCGAACCTTCCACAAAC 1277
342 I Y C K E S T L A G E R K N E T E N T I E P T C N 366
1278 AGCGGTTATGTGGATATTCAGAGACATGTGGAGAATTCAGGGGGTGGATGTGAAACAGGTGGACTACAGCAGA 1352
367 S G Y V D I Q R H V E N L Q G V D V K Q V D Y S R 391
1353 GTCAAAGAGGTGAACAGTGAACAATGCTCATCTCAAGAAAGAAAACACCAAGGCTGCTCAGAGACAAGAGGAA 1427
392 V K E V N S D N A H I L K K E N T K A A Q R Q E E 416
1428 GACATAACAGGACTACTGCTGGTGAAGAGGTGGACCGTGACAATATGATCTCTGCAGACACAAAGTCCA 1502
417 D I P E D Y C W V K E V D R D N M I L L Q T Q S P 441
1503 TCAGTAGACAGTCTGTGGAGAGAAGGAAACCACACTACACAGACTTGGCCCTCAGAGGCAAAGAAAACCTCAA 1577
442 S V D T S C G E K G N H Y T D F A L Q R Q R K P Q 466
1578 GTGTGCACAGAACTCATTCAGAGCGGATATGTAGATACCATCCCTACACAAAATTTAATGTAGAGTGTGTTTA 1652
467 V C T E L I D S G Y V D T I P T P N L M * 491
1653 TATGCAGTGTCTCAGTGATGTTGAGGGTTAAAGCTGCAGATATTTATGTTCCTGTCAATATTACTGGATGAG 1727
1728 TTGCCATGAAGTTTGGCACAGACATTCATGGTCACCAGAGGATGAATTCGATGACTGGTGACCCCTGACCTTT 1802
1803 TCCTACAGCATATAATGTGTGGTTTGTGGTTCAGAGTGACATATCTGAAATCATGGGTAGATTGTTGAGACATC 1877
1878 TGTTAAAGATATTCAGGCTCTTTAAAGTCTAACTTCGGTATTTTTTTAAACCTGAACCTTTTTTCCCATGTTTT 1952
1953 TGTGCCTAATTAATGCAACAACAATTTTGTATTATGTCCAGCATTAAAGAGGGCTGCAGAGGAGCAGTGC 2027
2028 TGCTGTAATGTAATCAGATAGGAAAACGTGATTCATGTCGTCATTTATAAATTTGTTATTTTTGTGTCAGACAAA 2102
2103 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2137

```

图 2 斜带石斑鱼 PRLR2 cDNA 的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide sequence of *E. coioides* PRLR2 cDNA and deduced amino acid sequence
注: 上排为碱基序列, 下排为氨基酸序列。信号肽序列为斜体; 保守的半胱氨酸及编码它们的碱基序列以黑体标出; WS 结构和 box1 用框框出; 23 个氨基酸的跨膜区用灰色背景显示; 细胞内区 8 个酪氨酸以黑体表示; *表示终止密码子; 碱基序列上 poly(A) 的加尾信号以下划线标出

Japan), 1μl RT 产物, 0.4μl 的特异性引物。PCR 反应程序: 95℃ 预变性 60s, 然后 95℃ 变性 15s, 65℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 23s, 40 个循环。

通过 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems)测定各基因的阈值循环数

(threshold cycle, C_T)。通过质粒浓度梯度和所对应的 C_T 值建立 β -actin、PRLR1、PRLR2 基因的标准曲线。然后通过各样品所对应的 C_T 值和标准曲线计算出各待测样品的浓度。结果采用相对浓度表示,即表示为目的基因浓度/内参基因浓度(GHR/ β -actin)。

1.2.3 数据分析 用平均值 \pm 标准差表示斜带石斑鱼 PRLR mRNA 相对表达量,数据分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan's 法进行多重比较,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 斜带石斑鱼 PRLR cDNA 克隆及序列分析

以简并引物 PRLR-F、PRLR-R 在鳃反转录产物中 PCR 扩增,得到一条约 350bp 的片段,与设计引物时预测片段大小一致,将这个 350bp 的片段克隆、测序,序列分析发现,有两种不同的 PRLR 序列,经 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 网站 blastn 和 blastp 比对,结果与其它鱼类 PRLR 的氨基酸序列相似,将这两种序列分别命名为 gPRLR1 和 gPRLR2。

根据已知的中间片段 cDNA 序列设计特异性引

物,进行扩增 5'端和 3'端的扩增,并应用 DNATOOL6.0 拼接和推导氨基酸序列,将所得的中间片段、5'端片段和 3'端片段拼接起来,得到 cDNA 全长。PRLR1 cDNA 全长 2012 个碱基,包括 5'端非翻译区(UTR)3 个碱基和 3'UTR 287 个碱基,在多聚腺苷酸(PolyA)尾上游 20 个碱基处有一加尾信号 taaa,该 cDNA 共编码 649 个氨基酸,经 SMART 分析,该氨基酸序列具有以下特点:前 22 个氨基酸为信号肽;序列内部 23 个亲水氨基酸为跨膜区;细胞外区由 211 个氨基酸组成;细胞内区由 234 个氨基酸组成,13 个可被酪氨酸激酶磷酸化的酪氨酸残基分别位于第 308、315、319、400、428、452、468、538、565、574、608、611 和第 637 位氨基酸上(图 1)。

PRLR2 cDNA 全长 2137 个碱基,包括 5'端非翻译区(UTR)179 个碱基和 3'UTR 497 个碱基,该 cDNA 编码的多肽链序列具有以下特点:前 19 个氨基酸为信号肽;序列内部 23 个亲水氨基酸为跨膜区;细胞外区由 230 个氨基酸组成;细胞内区由 235 个氨基酸组成,8 个可被酪氨酸激酶磷酸化的酪氨酸残基分别位于第 329、322、343、369、389、422、454 和第 476 位氨基酸上(图 2)。

用 Clustal X1.8 软件对斜带石斑鱼、罗非鱼和黑鲷的两种 PRLR 氨基酸序列进行比对,结果发现,斜带石斑鱼 PRLR cDNA 编码的氨基酸序列具有与其它鱼类 PRLR 一样的保守区。这些保守区包括:4 个保守的半胱氨酸,分别位于 32、42、71 和 82 位氨基酸上,这 4 个半胱氨酸的位置在脊椎动物的 PRLR 中都是保守的;位于细胞外区的 WS 结构;细胞内区由富含脯氨酸和疏水氨基酸的 8 个氨基酸残基组成的 box1(图 3)。

用 DNASTAR 软件对多种脊椎动物 PRLR 氨基酸的同源性进行分析,发现斜带石斑鱼 PRLR1 cDNA 编码的蛋白与黑鲷的同源性最高,有 83.0%同源性;而与其它鱼类如鲤鱼、罗非鱼、斑马鱼则分别只有 63.3%、72.4%、50.0%同源性,PRLR2 cDNA 编码的蛋白与黑鲷和罗非鱼的同源性分别为 66.7%和 53.2(表 2)。

用 Clustal X 1.8 对斜带石斑鱼、黑鲷、罗非鱼、河鲀、鲤鱼、斑马鱼、蛙、

```

Grouper-prlr1      --MMKKVIEVLLLLLLLLVFMPHAEGTRYSPGKPTLIRCRSPEKETFTCWWKPGSDGGGLP
seabream1         ---MRKVLEVILLLLLLLVFT--HAKGTRYSPGKPTLIRCRSPEKETFTCWWKPGSDGGGLP
tilapia1          ---MMTKVGEVILLLLLLPAFVPHDTGTHYSLPGKPTIICRSPEKETFTCWWKPGSDGGGLP
Grouper-prlr2     ----MRRHFGLALLLLLSA--AVESNSMSPPGKPVLLSCRSPEKETFTCWWKPGSDGGGLP
seabream2         ---MMWRDLRLAVLVLLCA--AVKSNSSSPPGKPVLLSCRSPEKETFTCWWKPGSDGGGLP
tilapia2          MVCARMVKHLRLPLLLLLALAAECNSMSKPGKPKLGCSPDKETFFCWWTPGSGGGGLP
      *:*:      . . . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Grouper-prlr1     TTYALYRKESDVTVHECPDYQTAGENSCEFKNKNTSIWVSYNITVAVTALNGSTFSDPV
seabream1         TTYALYRKESDVTNECPDYRTAGENSCEFKNKNTSIWVSYNITVAVTALNGSTFSDPV
tilapia1          TTYALYRKESDVTVECPDYHTAGNSCFKNKNTSIWVSYNITVAVTALNGSTFSDPV
Grouper-prlr2     TTHRLYERERLEGTVECPDYSAGNSCFEDKNTSIWVDYLLTVVASNLLGNATSDTF
seabream2         TTYKLYERERLEGVHECPDYSAGNSCFKSHNTSIWVGYLLTVVAVNALGNATSDVF
tilapia2          TVHRLYYKTEGRETVRQCPDYHTA--HSCFPKSTYTSIWVEYTVIVEASNALGNTSSDPL
* : * * * * * : . . : * * * * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
Grouper-prlr1     DVDVVYIVKPNPPEKVTVTVMEDKGWPFIRVSWEPHPKADTRSGWITLYELRVKLE-GE
seabream1         DIDVVYIVKPNPPEQVAVTVMEDKGWPFIRVSWEPHPKADTRSGWITLYELRVKLE-EE
tilapia1          DIDVVYIVKPPPEKLEVTVMKDGWPFIRVSWEPHPKADTRSGWITLYELRVKLEDEE
Grouper-prlr2     KMDVMEIVKPYAPENVTLQVEEREDSPCLHVRWEPYKADTRKSGWITLYELRRIKQ--GN
seabream2         KMDVMQI IKPNVPEVNTLLVETGDSPYLNIRWEHPRNTDTGSGWVTKYELRVKQE--NN
tilapia2          TFDLMDIVKPYAPENVTLVVS--IGDNPHLTIQWHTPSNIDTKSGWVTLKQRLRIKLE-KS
      . : * * * * * * * : . : * * * * * * * : . : * * * * * * * : . : * * * * *
Grouper-prlr1     NDWEMHLAGQQKIFNIFSLRSGGKYLQVRCRCPDHGFWSEWSSSTSYIKVPDYFHREKSVW
seabream1         NDWETHLAGQQKMFNIFSLRSGGTYLVQVRCRCPDHGFWSEWSSSYVKVPDYFHREKSVW
tilapia1          SEWENHAAGQQKMFNIFSLRSGGTYLVQVRCRCPDHGFWSEWSSSYVKVPDYFHREKSVW
Grouper-prlr2     NKWKYRSRGTQTFYSLYGVSPGAVYTVQVCRCLHGGWSEWSSNTTYVKIPNYLHNDRLFW
seabream2         NKWKAYMSGTQTHFSLYSINPGVHTVQVCRCLDHGWSWDTNS THVKVPNYQNEKSEFW
tilapia2          KIWKNYTSDTQTHFTIYNIELGVVYMEVRCADNSAWSEWNTTFVKVPNFPRTDSEFW
      * : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * *
Grouper-prlr1     ILITVFCAFITLILTWLLHMNSRSLKHFILPPVPGPKIKGFDKQLKNGKSDNVFSALVV
seabream1         ILITVFCAFITLIVTWLLHMNSRSLKHFILPPVPGPKIKGFDKQLKNGKSEEVFSALVV
tilapia1          ILVLVFSAFITLLLTWLLTHMNSHSLKHCMLPPVPGPKIKGFDKQLKNGKSEVFSALVV
Grouper-prlr2     IMVSVLSAVPYITAVCLILVIRKRVKQFILPPVPGPKIRGVDVQLKSRGSEDDVGVGLIN
seabream2         ILVATLSAIPFMAAMCILLVVKRENVKQVILPPVPGPKIRGVDVQLKMSGQYEDTNNALII
tilapia2          ILVFSLSLPLLVAMIIILLKRVKQFILPPVPGPKIRGVDVQLKSRGSEDDVGNAMLL
* : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * *
Grouper-prlr1     SDFPPTSSNYEDLLVEYLEVYVPEEQE-LILEESKDLQSDCLKSESSTCDSDSGRGSCD
seabream1         SDFPPK--SSNYEDLLVEYLEVYIPEEQE-LMLEKSMIDLVSCLKSEGSTSDSDSGRGSCD
tilapia1          SDFPPT--TSNYEDLLVEYLEVYVPEEQE-LMVDKGDHDD--CLKSIGSASDSDSGRGSCD
Grouper-prlr2     NPSFPP--MVAWKQMEEYLVITDNDG---LSSYSQRRKSLIIPAGFLDTEIYCK---
seabream2         NQNFPL--MMGWKQIEEYLVITENSIGPPLDASNCQRRKSLIIPAGFSDWEIECKSTH
tilapia2          NQRFPV--VMPWKKQNEDEYLVISDKETS----YLPLEKNKIFILPVAITLDSVQSKETS
      . * * * * * : * * * * * : . : * * * * * : . : * * * * *

```

小鼠及人的 PRLR 氨基酸比对, 据此结果再采用 MEGA 3.1 软件构建系统发生树, 发现斜带石斑鱼、黑鲷、罗非鱼的 PRLR1 与鲤鱼、斑马鱼的 PRLR 在同一分支; 哺乳类与两栖类的 PRLR 并为另一分支; 斜带石斑鱼、黑鲷、罗非鱼的 PRLR2 与河鲀 PRLR 构成另一支。鱼类中, 不论是 PRLR1 还是 PRLR2, 斜带石斑鱼和黑鲷最接近(图 4)。

2.2 斜带石斑鱼 PRLR mRNA 表达分析

2.2.1 组织表达分析 斜带石斑鱼

PRLR1 和 PRLR2 mRNA 在所检测的 12 种组织中均有表达, PRLR1 mRNA 在鳃的表达量最高, 肾和肠其次, 胃表达量也较高, 脑部(垂体, 下丘脑)最低; PRLR2 mRNA 在肠的表达量最高, 鳃其次, 肾表达量也较高, 同样脑部最低(图 5)。

2.2.2 早期发育表达分析 PRLR1

mRNA 只在受精卵期有较高表达, 随后骤降为零, 至肌节形成期才有微量表达(图 6A), 在孵出后 10 天、20 天仔鱼中, PRLR1 表达量显著提高, 并在随后的发育阶段维持此表达水平(图 6B); 而 PRLR2 mRNA 在检测的各个阶段均有表达, 其中受精卵、4 细胞期 PRLR2 表达水平中等偏低, 从桑椹期起 PRLR2 表达水平开始显著升高, 到视囊形成期达到最高峰, 听囊形成期稍有回落(图 6A), 在孵出后第 10 天、20 天仔鱼中, PRLR2 表达量处于较低的水平, 随后降得更低(图 6B)。

3 讨论

从斜带石斑鱼鳃中克隆到的两种催乳素受体(gPRLR1 和 gPRLR2)均具有脊椎动物 PRLR 的一般特性。哺乳动物 PRLR 细胞外区 C 端有 4 个半胱氨酸形成的 2 个二硫键和五肽序列 W-S-X-W-S (X 为任意氨基酸), 亦称为 WS 结构。这两个特性对 PRLR 蛋白在细胞内的正确折叠和转运是必须的, 可能参与了与 PRL 的结合。鱼类 PRLR 中 2 个二硫键的位置很保守, 而 WS 结构的位置有些不同。相对于哺乳动物的序列来说, 鱼类的 WS 结构高度保守, 但是金鱼和黑鲷第五位的 S(Ser)被 T(Thr)替换。细胞外区最大不同在于 N-糖基化位点的数量。已知鱼类的 PRLR 在第二和第

续图 3

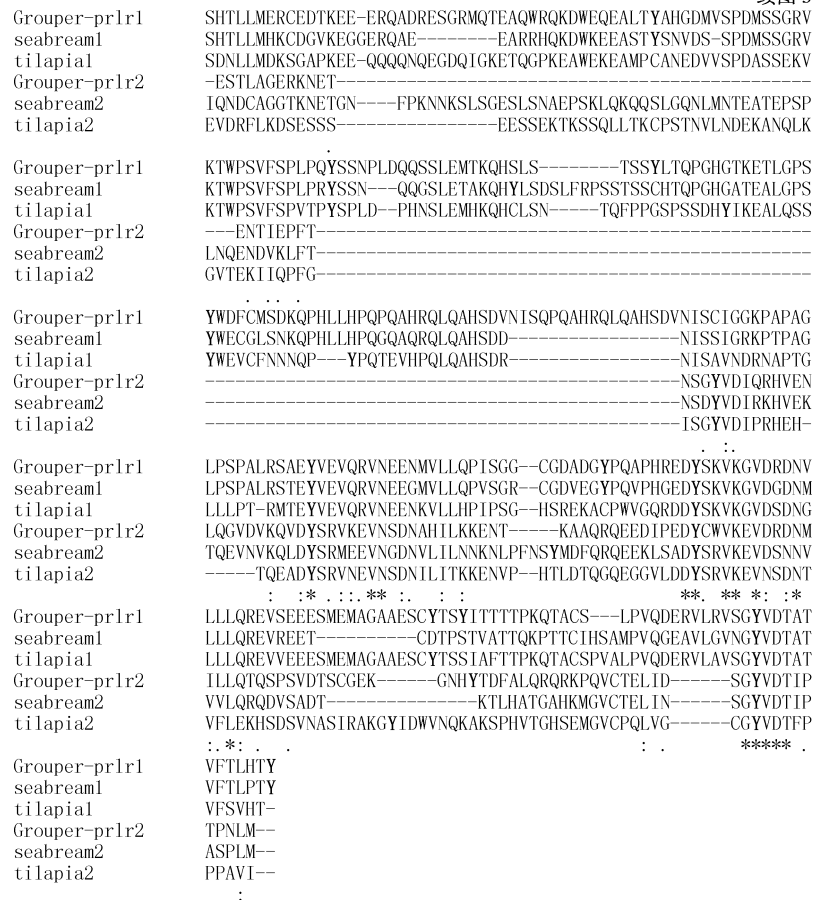


图 3 斜带石斑鱼 PRLR 与几种其它脊椎动物 PRLR 的比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of *E. coioides* PRLR with PRLRs from several other vertebrates

注: 细胞外区保守的半胱氨酸以黑体标出, WS 结构和 box1 用框框出, 23 个氨基酸的跨膜区用灰色背景显示, 细胞内区酪氨酸以黑体表示。各 PRLR 氨基酸在基因库中的序列号: black seabream PRLR1 EF429092 and PRLR2 EF429093; and the Nile tilapia PRLR1 Q91513 and PRLR2 EF429094

三个半胱氨酸之间比哺乳动物少一个 N-糖基化位点。哺乳动物长型 PRL 受体的细胞内区有两个保守域: box1, 近膜的 8 个氨基酸, 由脯氨酸和疏水氨基酸组成, 包含信号转换分子的识别位点; box2, 在短型哺乳动物 PRLR 中没有, 由疏水氨基酸、带负电的氨基酸和带正电的氨基酸组成, 其组成很不保守(Freeman *et al.*, 2000)。box1 序列在鱼类和哺乳动物中非常保守, box2 在序列上的变化很大, 但在鱼类中却保守。细胞内的保守区表明, 鱼类和哺乳动物的信号传导机制在进化上是保守的。斜带石斑鱼的 PRLR 与黑鲷的同源性最高, PRLR1 达到 89.3%, PRLR2 达到 74.3%, 与其它鱼的同源性则相对偏低, 可能是因为斜带石斑鱼和黑鲷都属鲈形目海水鱼, 生活环境相似。

这 2 种 PRLR 在斜带石斑鱼所检测的 12 种组织

中均有表达, 但具有组织特异性。在鳃、肾、肠中 2 种 PRLR 的表达较高, 表明 PRL 在鱼中的主要功能还是参与渗透压调节; 在性腺中 PRLR 也有表达, 表明 PRL 可能也参与生殖调节; 脾和头肾中亦有 PRLR 的

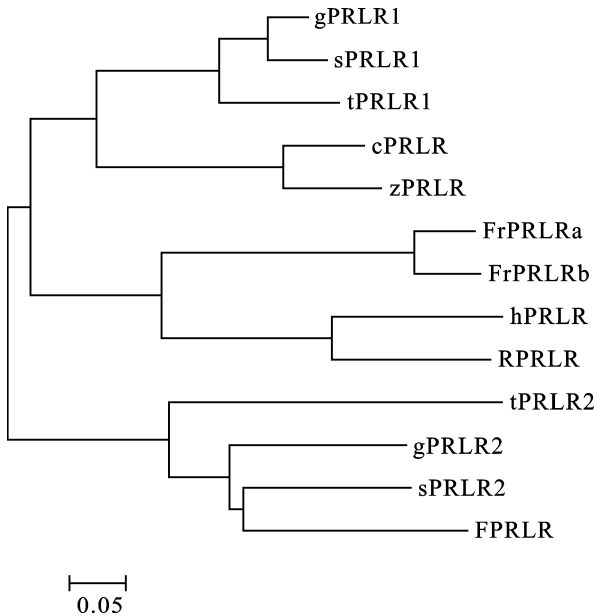


图 4 部分脊椎动物 PRLR 进化系统树

Fig.4 Phylogenetic tree of PRLR in several vertebrates

注: 本进化树采用 MEGA 3.1 软件构建。由软件 Clustal X 1.8 生成, 图形显示采用软件 Tree View 1.6.6。各 PRLR 氨基酸在基因库中的序列号: black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) PRLR1, sPRLR1, EF429092 and PRLR2, sPRLR1, EF429093; Nile tilapia PRLR1 nPRLR1, Q91513 and PRLR2, nPRLR1, EF429094. fugu (*Takifugu rubripes*) PRLR1, FPRLR1, BAE94535; Common carp, cPRLR, AAK95833; zebrafish (*Danio rerio*), zPRLR, AAQ84555; frog (*Xenopus laevis*) A, FrPRLRa, AAF05776.1; frog (*Xenopus laevis*) B, FrPRLRb, AAF05777.1; Rat, RPRLR, A36116; human, hPRLR, A40144. grouper PRLR1 (gPRLR1) and PRLR2 (gPRLR2)即本文克隆序列

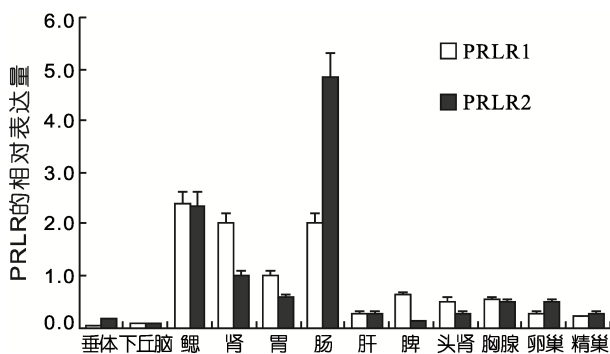


图 5 Real-time PCR 分析斜带石斑鱼 PRLR1 和 PRLR2 mRNA 的组织分布

Fig.5 Analysis of PRLR1 and PRLR2 mRNA distribution in *E. coioides* tissues by Real-time PCR

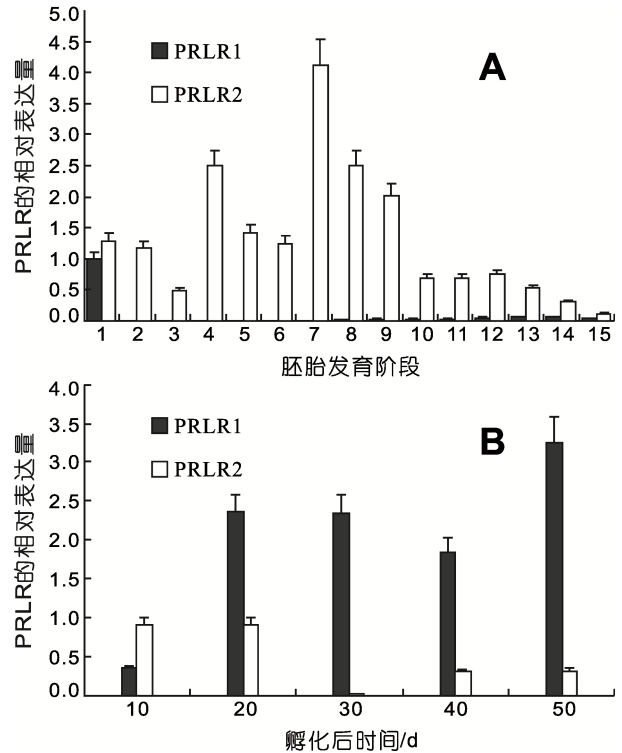


图 6 Real-time PCR 分析斜带石斑鱼不同胚胎发育阶段和孵化后不同时间 PRLR1 和 PRLR2 的 mRNA 表达

Fig.6 Analysis of PRLR1 and PRLR2 mRNA expression in *E. coioides* of different embryo development stages and different days after hatching by Real-time PCR

A: 不同胚胎发育阶段, 1—15 分别表示受精卵期、四细胞期、多细胞期、桑椹期、低囊胚期、胚体形成期、视囊出现期、关节形成期、听囊形成期、脑泡形成期、心脏分化期、尾芽期、晶体形成期、将孵化期、孵出期。B: 孵化后不同时间

表达, 可能与免疫调节相关。

在鱼类中, PRL 主要被认为是一种与渗透压调节相关的激素(Manzon, 2002), 在广盐性鱼类如罗非鱼(Sandra *et al*, 2000)、虹鳟(Le Rouzic *et al*, 2001)、淡水硬骨鱼如金鱼(Tse *et al*, 2000)和海水硬骨鱼如金头鲷(Santos *et al*, 2001)中, 与渗透压调节相关的组织如鳃、肠、肾的 PRLR 表达量都很高。海水硬骨鱼为了适应高渗的体外环境, 吞饮大量海水以补充鳃和体表失去的水分。海水中带入的大量的一价离子(Na^+ , Cl^-)通过鳃氯细胞中的 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ 主动运输排出; 而二价离子则在进入食道后被转运到血液中, 通过血液循环进入肾脏, 由肾脏排出体外; 水则在胃肠道被吸收(林浩然, 1999; 潘鲁青等, 2006)。有研究表明, 在金头鲷和罗非鱼鳃的氯细胞中, 都检测到 PRLR 的表达, 推测 PRL 可能与 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$ 的活性调控有关(Santos *et al*, 2001)。然而 PRL 对于鳃中氯细胞的

Na⁺-K⁺ ATPase 的具体作用, 现在还没有一致意见。在本实验中, 斜带石斑鱼鳃丝的 PRLR 表达量很高, 说明 PRL 及其受体在鳃丝中可能起着很重要的作用。

有研究表明, PRL 能够影响肠道上皮粘膜的通透性从而进行渗透压调节(Manzon, 2002)。肠道上皮粘膜的通透性与其上的 Na⁺-K⁺ATPase 的活性有关。肠道中水分的吸收是随着 Na⁺离子的主动吸收创造的渗透压梯度而发生的, 而 Na⁺离子的吸收则被认为是 Na⁺-K⁺ATPase 驱动的。在褐鲟中, PRL 通过降低 Na⁺-K⁺ ATPase 活性, 减少肠道对 NaCl 的吸收, 同时也减少了对水分的吸收(Seidelin *et al*, 1999)。相反, 在海鲷中, PRL 则可增强肠道 Na⁺-K⁺ATPase 活性, 增强对水分的吸收(Kelly *et al*, 1999)。这说明 PRL 在鱼体内的作用有明显的种属特异性, 它的作用与鱼的生理活动要求相一致。在本实验中, 斜带石斑鱼肠道的 PRLR 表达量也很高, 提示其肠道也是 PRL 的重要靶组织。

PRL 可以刺激雌性和雄性罗非鱼的配子生成(Tan *et al*, 1988), 精原细胞和卵母细胞都是 PRLR 基因的潜在作用靶位点(Cavaco *et al*, 2003)。在黑鲷和罗非鱼中(Huang *et al*, 2007; Zhang *et al*, 2010), PRLR2 在卵巢中的表达都比 PRLR1 高, 在斜带石斑鱼中, 作者同样发现这个现象, 表明鱼类 PRLR2 可能在性腺中具有重要的功能。

金头鲷和莫桑比克罗非鱼在刚受精后就可检测到 PRLR mRNA 的表达, 且在原肠胚时期表达显著增加(Shiraishi *et al*, 1999)。本实验结果亦表明斜带石斑鱼的 PRLR 从刚受精刚开始至此以后各个时期都有表达, 与金头鲷和莫桑比克罗非鱼 PRLR 的早期表达模式相似。有研究表明, 在通透性非常低的卵黄膜上发现了形成多细胞复合物的氯细胞, 而在氯细胞中也检测到了 PRLR 的存在。氯细胞在鱼类中的主要作用是调节盐水平衡(林浩然, 1999), 因此推测 PRL 在胚胎时期可能有渗透压调节的作用。原肠期以前的各个时期检测到 PRLR, 推测可能是来自于母体信息遗传(Power, 2005)。通过对多种硬骨鱼如海鲷、海鲈、银大麻哈鱼、日本鳗鲡的垂体发育进行研究, 发现 PRL 蛋白在幼鱼阶段才能被检测到, 而在斜带石斑鱼胚胎发育的整个过程中都可检测到 PRL mRNA 的表达(Zhang *et al*, 2004), 本实验结果表明在斜带石斑鱼的早期发育过程中始终可检测到 PRLR mRNA 的存在, 这说明在斜带石斑鱼整个胚胎发育过程中, PRL 是一个重要的调控因子。

参 考 文 献

- 刘 臻, 罗小华, 鲁双庆等, 2010. 鳊(*Siniperca chuatsi*)生长激素基因克隆和原核表达. 海洋与湖沼, 41(3): 365—370
- 潘鲁青, 唐贤明, 刘泓宇等, 2006. 盐度对褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼血浆渗透压和鳃丝 Na⁺-K⁺-ATPase 活力的影响. 海洋与湖沼, 37(1): 1—6
- Bole F C, Goffin V, Ederly M *et al*, 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: action, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinology Review*, 19: 225—268
- Cavaco J E, Santos C R, Ingleton P M *et al*, 2003. Quantification of prolactin (PRL) and PRL receptor messenger RNA in gilthead seabream (*Sparus aurata*) after treatment with estradiol-17beta. *Biol Reprod*, 68: 588—594
- Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A *et al*, 2000. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80: 1523—1631
- Higashimoto Y, Nakao N, Ohkubo T *et al*, 2001. Structure and tissue distribution of prolactin receptor mRNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): Conserved and preferential expression in osmoregulatory organs. *Gen Comp Endocrinol*, 123: 170—179
- Huang X G, Jiao B W, Fung C K *et al*, 2007. The presence of two distinct prolactin receptors in sea bream with different tissue distribution patterns, signal transduction pathways and regulation of gene expression by steroid hormones. *Journal of Endocrinology*, 194: 373—392
- Kelly S P, Chow I N, Woo N Y, 1999. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *Gen Comp Endocrinol*, 113(1): 9—22
- Le Rouzic P, Sandra O, Grosclaude J *et al*, 2001. Evidence of rainbow trout prolactin interaction with its receptor through unstable monodimerisation. *Mol Cell Endocrinol*, 172: 105—113
- Manzon L A, 2002. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen Comp Endocrinol*, 125: 291—310
- Power D M, 2005. Developmental ontogeny of prolactin and its receptor in fish. *Gen Comp Endocrinol*, 142(1): 25—33
- Sandra O, Le Rouzic P, Cauty C *et al*, 2000. Expression of the prolactin receptor (tiPRL-R) gene in tilapia *Oreochromis niloticus*: tissue distribution and cellular localization in osmoregulatory organs. *J Mol Endocrinol*, 24: 215—224
- Sandra O, Sohm F, de Luze A *et al*, 1995. Expression cloning of a cDNA encoding a fish prolactin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 292: 6037—6044
- Santos C R, Ingleton P M, Cavaco J E *et al*, 2001. Cloning, characterization and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol*, 121: 32—47

- Seidelin M, Madsen S S, 1999. Endocrine control of Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. *J Endocrinol*, 162(1): 127—135
- Shiraishi K, Matsuda M, Mori T *et al*, 1999. Changes in expression of prolactin- and cortisol-receptor genes during early life stages of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater. *Zool Sci*, 16: 139—146
- Tan C H, Wong L Y, Pang M K *et al*, 1988. Tilapia prolactin stimulates Estradiol-17 beta synthesis *in vitro* in vitellogenic oocytes of the guppy *Poecilia reticulata*. *J Exp Zool*, 248: 361—364
- Tse D L, Chow B K, Chan C B *et al*, 2000. Molecular cloning and expression studies of a prolactin receptor in goldfish (*Carassius auratus*). *Life Sci*, 66: 593—605
- Zhang W M, Tian J, Zhang L H *et al*, 2004. cDNA sequence and spatio-temporal expression of prolactin in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Gen Com Endocrinol*, 136: 134—142
- Zhang Y, Long Z Z, Li Y Y *et al*, 2010. The second prolactin receptor in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and gene expression. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 283—295

cDNAs CLONING AND mRNA EXPRESSION OF TWO PROLACTIN RECEPTORS IN ORANGE-SPOTTED GROUPER *EPINEPHELUS COIOIDES*

ZHANG Yong¹, MA Xi-Lan^{2,3}, CHEN Yong-Zhi³, LI Shui-Sheng¹,
CHEN Hua-Pu¹, LIU Xiao-Chun¹, LIN Hao-Ran¹

(1. *Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 510275*; 2. *School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, 510631*; 3. *Department of Life Science, Institute of Biotechnology, Huizhou University, Huizhou, 516007*)

Abstract Prolactin (PRL) has many important physiological roles in the control of growth, osmoregulation and reproduction, which is mediated by prolactin receptor (PRLR). In this study, two cDNAs encoding PRLR were isolated from the gill of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. The two cDNAs, one consisting of 1947bp and the other of 1749bp, encoding for putative 649- and 487-amino acid PRLR (designated PRLR1 and PRLR2, respectively), shared 40.4% identity in deduced amino acid sequence. PRLR1 and PRLR2 showed the conserved structural characteristics of PRLR family, including the WS motif, the box1 region, extracellular cysteine residues and intracellular tyrosine residues. However, there were differences of structural features between the two receptors as well. PRLR1 has 13 intracellular tyrosine residues while PRLR2 only has 8. The structural discrepancies thus undoubtedly indicated the distinct biological functions of PRLR1 and PRLR2. Real-time RT-PCR analysis showed that both PRLR1 and PRLR2 mRNAs were presented in all tissues tested and expressed extremely highly in gill, kidney and intestine, lowly in pituitary and hypothalamus. The expressions of PRLR1 and PRLR2 in different embryo developmental stages were also detected by real-time PCR. The strongest signal was detected in the fertilized egg stage for PRLR1, while in the stage of optic vesicle and smoitte formation for PRLR2. The expression level of PRLR2 is much higher than PRLR1 in all stages examined except in the fertilized egg stage. The expression distinction of PRLR1 and PRLR2 suggested that they may play different roles during early development of orange-spotted grouper.

Key words Orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, Prolactin receptor, cDNA clone, Real-time RT-PCR, mRNA expression