

条石鲷 mPR α 基因的 cDNA 克隆和表达模式分析*

史宝¹ 柳学周¹ 陈圣毅^{1,2} 徐永江¹ 臧坤^{1,2} 李晓妮¹

(1. 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 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 采用同源性克隆和末端快速扩增(RACE)方法,首次获得全长为 1222bp 的条石鲷膜孕激素受体 α (mPR α)的 cDNA 序列。其开放阅读框为 1060bp,编码了含 353 个氨基酸的蛋白,N 端前 16 个氨基酸为信号肽。氨基酸序列比较分析发现其存在 7 个跨膜区域。其预测的蛋白质三级结构中存在多个蛋白结合位点。同源性比较和进化分析表明,条石鲷 mPR α 与鲈形目鱼类 mPR α 聚为一支,进化关系较近,相似度达到 95%以上。实时荧光定量 PCR 方法检测 mPR α mRNA 表达情况:发现 mPR α mRNA 在性成熟雌性条石鲷各组织均有表达,并在脑、垂体和卵巢组织中的表达较丰富。在条石鲷繁殖周期的脑和垂体组织中,mPR α mRNA 的表达水平在卵巢发育 期达到最大值;在繁殖周期的卵巢组织中,mPR α mRNA 的表达水平从卵巢发育 期到 期持续升高并且在 期达到最大值 ($P < 0.05$)。条石鲷雌鱼血清中雌二醇激素的含量变化在整个繁殖周期中差异显著 ($P < 0.05$),在性腺发育 期含量迅速升高并在 期达到峰值。本研究为条石鲷卵巢成熟调控机制研究提供了基础参考资料。

关键词 条石鲷;膜孕激素受体;基因克隆;表达;雌激素

中图分类号 S96 doi: 10.11693/hyhz20140600160

孕激素参与调控生物体内的多种生理生化过程,包括生殖、发育、细胞增殖和脑部功能等(Tsai *et al.*, 1994)。孕激素、促黄体激素和成熟促进因子共同作用下硬骨鱼类卵母细胞成熟(Nagahama *et al.*, 2008)。孕激素结合膜孕激素受体(Membrane progesterin receptor, mPR),进而激活成熟促进因子促使卵母细胞成熟(Thomas *et al.*, 2004)。近年来,在脊椎动物包括硬骨鱼类发现膜孕激素受体的三种亚型 mPR α 、mPR β 、mPR γ (Zhu *et al.*, 2003; Kazeto *et al.*, 2005a)。在斑马鱼,发现 mPR α 和 mPR β 在卵母细胞发育的早期的转录水平较低,在卵黄生成阶段转录水平逐渐增加(Kazeto *et al.*, 2005b)。而且,显微注射 mPR α 和 mPR β 的反义寡核苷酸探针能够有效地抑止斑马鱼、金鱼和蟾蜍卵母细胞对孕激素的应答(Ben-Yehoshua *et al.*, 2007; Tokumoto *et al.*, 2012)。这些研究说明膜孕激素受体参与调控孕激素诱导卵母细胞成熟。

条石鲷(*Oplegnathidae fasciatus*)在黄海、东海和台湾沿海等海域均有分布,其肉质细嫩,具有较高的营养价值(张春霖等, 1955)。条石鲷适合网箱、工厂化等多种养殖模式,是一种理想的增养殖鱼种。近年来,有关条石鲷的繁殖生物学和人工繁育、养殖技术研究已有一些报道(刘伟成等, 2008; 柳学周等, 2008; 孙中之等, 2009; 张凤萍等, 2010; He *et al.*, 2011; 彭志兰等, 2013),促进了条石鲷养殖业的发展,但是关于条石鲷繁殖内分泌学方面的研究报道并不多见,不利于建立稳定的生殖调控技术。本研究对条石鲷的 mPR α 基因进行了克隆,并对其在雌体各组织及其卵巢发育不同阶段表达谱进行了分析,初步探讨 mPR α 在卵巢发育成熟中的作用以及与性类固醇激素的关系;旨在查明 mPR α 在条石鲷卵母细胞成熟过程的作用机制提供理论依据,并为条石鲷的繁殖调控提供科学参考。

*国家高技术研究发展计划项目, 2012AA10A413 号; 国家自然科学基金项目, 31201982 号; 国家鲆鲽类产业技术体系, CARS-50 号; 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目, BS2013SW042 号。史宝, 助理研究员, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-06-23, 收修改稿日期: 2014-11-26

1 材料与方 法

1.1 实验材料

条石鲷取自青岛忠海水产有限公司(2012 年 4—12 月), 共取 16 尾人工培育的 3 龄以上性成熟的条石鲷雌鱼(全长 27.23—31.11 cm, 体重 478.2—671.7 kg)。条石鲷培育水温 15—26 °C, 盐度 28—32, pH 8.0—8.2, 溶解氧 6 mg/L 以上, 日换水率 300%—500%。在条石鲷亲鱼繁殖周期取样, 每次取样 4 尾。实验鱼用 MS222(200 mg/L)麻醉后解剖, 取其脑、垂体、肝脏、心脏、卵巢、胃、幽门盲囊、肠、脾脏、肾脏、鳃、肌肉组织快速投入液氮中, 然后转入-80 °C 冰箱保存, 用于总 RNA 的提取。同时, 用 Davidson 固定液固定部分卵巢组织, 24h 后转入 70%的酒精保存, 用于组织学观察, 确定性腺发育时期。

1.2 卵巢的组织切片与观察

卵巢组织固定后切取小块组织, 通过梯度酒精(100%—70%)脱水、二甲苯透明、石蜡包埋, 利用 LEICA RM 2235 型切片连续切片, 切成 6 μ m 切片, 采用苏木精-曙红(H.E)染色, 中性树胶封片, 在 NIKON 90i 显微镜下观察及显微摄影。卵巢各发育期的确定参考刘筠对鲤科鱼类性腺分期的标准进行(刘筠, 1993)。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus (TaKaRa)从垂体、心脏、卵巢等 12 个组织中提取总 RNA。利用超微量紫外检测仪(Nanodrop 2000D)检测总 RNA 的纯度和浓度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。以条石鲷卵巢中总 RNA 为模板, 根据 PrimeScript[®]RT-PCR Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明反转录合成 cDNA 并用

于后续克隆。

1.4 条石鲷 mPR α 基因 cDNA 序列克隆

使用 F/R 引物(表 1)扩增 mPR α 保守序列, PCR 扩增体系为 cDNA 2 μ L, PCR Buffer 2.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, Taq 酶 0.2 μ L, 补无菌水至 20 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C 5min, (94 °C 30s, 57.7 °C 30s, 72 °C 50s)共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10min。PCR 产物用 1%的琼脂糖电泳检测、切胶回收、纯化后连接到 pEASY-T1 载体(北京全式金生物技术有限公司)上并转移至 Trans1-T1 感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司)中, 37 °C 条件下振荡培养 12h, 筛选阳性克隆菌株送至华大基因公司测序。将测序结果在 NCBI 上进行分析比对。

以垂体总 RNA 为模板, 根据 Clontech SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明分别合成 5'-cDNA 和 3'-cDNA。然后分别以 5'-cDNA 和 3'-cDNA 为模板, 以 GSP5 和 GSP3 为引物(表 1), 根据 Smart RACE Advantage 2 PCR 试剂盒(Clontech)中的操作说明进行 PCR 扩增, PCR 条件: 94 °C 30s; 68 °C 30s, 15 个循环, T_m 每个循环降低 0.5 °C, 72 °C 延伸 2 min; 然后 94 °C 30s, 60 °C 30 s, 72 °C 60s, 28 个循环。将第一次 PCR 产物稀释 40 倍后作为模板, 分别以 NGSP5 和 NGSP3 为引物进行巢式 PCR, PCR 条件同第一次 PCR。用 1%的琼脂糖电泳检测 PCR 产物。然后切胶回收、连接转化、筛选阳性克隆并测序。

1.5 序列分析

测序结果在 NCBI 数据库中利用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比对。利用 DNASTAR 软件进行序列拼接、预测蛋白分子量和等电

表 1 实验中所用引物及其序列
Tab.1 Sequences of the primers used for PCR analysis

引物	序列(5'—3')	用途
F	5'-CATGGCGACGGTGGTGATG-3'	中间片段扩增引物
R	5'-GGCAGCAGAAGAAATAGGCG-3'	中间片段扩增引物
GSP5	5'-CATGGTAGAAATGGT ACGCCACAACCTGG-3'	5'端 RACE 引物
NGSP5	5'-ATGCGGTGAACCACAGGGCTTATGTCTA-3'	5'端巢式引物
GSP3	5'-AAGGTGTCTGACGTTCCCTGGGTGTTC-3'	3'端 RACE 引物
NGSP3	5'-CTCATCATCTTGGTGAAGTGGCAGGAGA-3'	3'端巢式引物
Q-F1	5'-ACGGTCATCCTTTTCTCTGTTC-3'	荧光定量引物
Q-R1	5'-GATGGTAGAATCAATGCGAAGTC-3'	荧光定量引物
Q- β -actin-F	5'-TCATCACCATCGGCAATGAGAGGT-3'	内参引物
Q- β -actin-R	5'-TGATGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT-3'	内参引物

点; 利用 ExPASy 中的 Translate Tool 进行氨基酸序列翻译; 利用 SignalP 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>)进行信号肽预测; 利用 Clustal X 进行氨基酸同源性比较; 利用 MEGA 5.0 中的 Neighbor-joining 法(自展值为 1000)做进化分析; 利用 SOPMA (<http://npsa-devel.ibcp.fr/NPSA/npsa-sopma.html>)进行蛋白质二级结构预测; 利用 I-TASSE(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)进行蛋白质三级结构预测。参与序列比对和进化分析的 mPR α 序列均来自 GenBank(表 2)。

表 2 mPR α 同源性比较与进化树中所用的鱼种及其基因登录号

Tab.2 GenBank accession number of mPR α used for homologue and phylogenesis analyses

分类	学名	登录号
硬骨鱼纲 Osteichthyes		
鲈形目 Perciformes	<i>Cynoscion nebulosus</i>	AAO39265.1
	<i>Micropogonias undulatus</i>	ABU68407.1
	<i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003452119.1
鲷形目 Pleuronectiformes	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	AFC90009.1
	<i>Paralichthys lethostigma</i>	ACW83621.1
鲱形目 Cyprinodontiformes	<i>Oryzias latipes</i>	NP_001170947.1
鲤形目 Cypriniformes	<i>Carassius auratus</i>	BAD06917.1
	<i>Danio rerio</i>	AAN78115.1
哺乳纲 Mammalia	<i>Mus musculus</i>	AAH22922.1
	<i>Sus scrofa</i>	NP_998904.1
	<i>Bos taurus</i>	NP_001033642.1
	<i>Homo sapiens</i>	NP_848509.1

1.6 条石鲷 mPR α mRNA 的组织表达与繁殖周期表达

采用实时荧光定量 PCR 法(Mastercycler[®] Eprealplex 实时荧光定量 PCR 仪)检测 mPR α mRNA 在条石鲷不同组织中的相对表达量和卵巢发育不同时期中脑-垂体-卵巢组织中的表达水平变化。设计特异性引物 Q-F1/R1, 以 Q- β -actin-F/R 为内参引物(表 1), 用 SYBR Green 荧光染料(TaKaRa)进行荧光定量检测, 用比较阈值法测定不同组织的相对表达量。每种组织取 3 尾鱼, 每尾鱼设定 3 个平行。以各组织 RNA 为模板, 根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa)中的操作说明合成 cDNA。Real-time PCR 程序: 95 °C 30s; 95 °C 5s; 63.5 °C 28s, 共 40 个循环, 反应结束后进行溶解曲线分析。根据

Ct 值计算引物的扩增效率和溶解曲线的分析, 以确定引物和扩增参数是否达到进行荧光定量检测组织相对表达量的要求($0.8 < E < 1.2$, $R^2 > 0.98$)。

1.7 性类固醇激素的测定

采用 ¹²⁵I 放射免疫测定方法(RIA)(FJ-2008PS γ 放射免疫计数)对条石鲷卵巢不同发育阶段血清中雌激素(E₂)的含量进行测定。试剂盒购于天津九鼎医学生物工程有限公司, 根据试剂盒中的操作说明先制作标准曲线, 待标准曲线制作好后(相关系数 $R > 0.9999$)再上样, 每次上样时都选择双管平行上样, 每个样品重复 3 次。测定的精密度在批次内为 7.7%, 批次间为 8.9%。测定的灵敏度为 2.1 pg/mL。

1.8 数据处理

基因表达实验所得数据用相对定量的 2^{-CT} 方法(Livak *et al*, 2001)计算处理后, 再用 SPSS 16.0 进行数据处理和显著性检验分析($P < 0.05$)。相对表达量数据均表示为平均数 \pm 标准误(Mean \pm SE), 并制成柱状图。雌激素测定数据均表示为平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE), 采用单因素方差分析并进行显著性检验分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 条石鲷卵巢组织学

对 16 尾条石鲷卵巢组织切片的 H.E 染色结果进行分析, 采用卵巢切面中平均面积超过 50%或居最高比例的卵母细胞的时相来确定性腺的发育时期。对实验样品进行分析, 将采集的卵巢组织样本分为 4 个期: 期卵巢, 期卵巢, 期卵巢和 期卵巢(图 1); 每个性腺发育期对应 4 尾雌鱼。组织切片观察, 期卵巢以 时相卵母细胞为主, 卵母细胞多为圆形, 细胞核嗜碱性, 核仁多靠核膜分布(图 1a)。进入 期, 条石鲷的卵母细胞随着营养物质的不断积累, 细胞体积继续增大, 胞质中储存着大量卵黄颗粒和油球, 卵母细胞外有两层滤泡细胞(图 1b)。卵巢发育进入 期, 卵母细胞呈圆球形, 卵黄颗粒的大量积累和融合, 核仁消失(图 1c)。进入 期, 卵巢萎缩, 卵巢壁上的平滑肌纤维松弛, 卵黄颗粒颜色暗淡(图 1d)。

2.2 条石鲷 mPR α 的序列分析和蛋白质结构预测

获得的条石鲷 mPR α 的 cDNA 序列全长为 1222bp, ORF 长 1060bp, 编码了 353 个氨基酸, 其中第 1—16 个氨基酸为信号肽, 在其序列含有 13 个保守的半胱氨酸(Cys), 分别位于第 35、189、192、193、221、234、239、262、263、274、291、330、331 氨

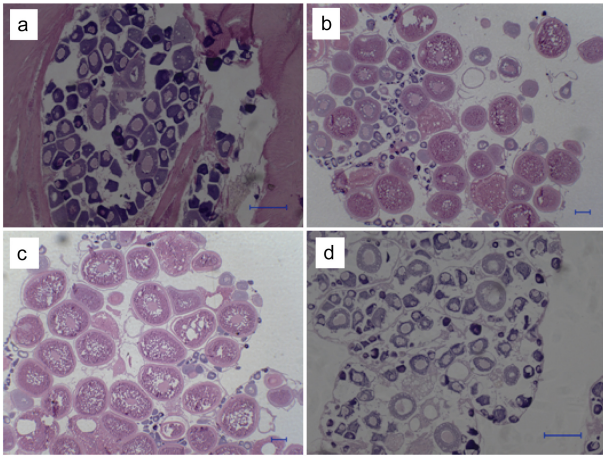


图 1 条石鲷卵巢发育不同时期的形态特征

Fig.1 The morphological characteristics in ovarian development stages of *O. fasciatus*

a: 期卵巢, 标尺为 100µm; b: 期卵巢, 标尺为 200µm; c: 期卵巢, 标尺为 200µm; d: 期卵巢, 标尺为 100µm

氨基酸残基处(图 2)。该蛋白的预测分子量为 40.68 kDa, 预测等电点为 7.08。

通过 SOPMA 软件对 mPR α 的蛋白质二级结构进行预测, 结果表明 mPR α 蛋白质的二级结构中, 图中蓝色代表的 α -螺旋占 55.97%, 绿色代表的 β -转角占 1.99%, 紫色代表的无规则卷曲占 28.98%, 红色代表的延伸链占 13.07%(图 3)。通过 I-TASSER 软件预测了条石鲷 mPR α 蛋白质的三级结构, 结果表明在其蛋白质三级结构结果中存在着多个蛋白结合位点(图 4)。

2.3 条石鲷 mPR α 氨基酸的同源性比较及系统进化分析

将条石鲷 mPR α 的氨基酸序列与其它物种 mPR α 的氨基酸序列进行同源性分析, 结果表明: 其与云纹犬牙石首鱼(*Cynoscion nebulosus*)同源性为 98%; 与大西洋绒须石首鱼(*Micropogonias undulatus*)的同源性为 97%; 与罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的同源性

```

-129                                     ACA TGG GGA
-121 CGG TCA TCC TTT TCT CTG TTC ACC CCC TTC AAA CAA TGT TCT CTA TAT TCC GCA CGG CTA
-61 CAT CAT TCA TCC ACT GCC AAA CTC AAG ACT TCG CAT TGA TTC TAC CAT CTA CAG TTT GCC
  1  ATG GCG ACG GTG GTG ATG GAG CAG ATC GGT CGC CTG TTT ATC AAC GCG CAG CAG CTG CGT
    M A T V V M E Q I G R L F I N A Q Q L R
  61 CAG ATC CCT CAG CTT CTG GAG TCG GCC TTC CCC ACG CTG CCT TGC ACT GTG AAG GTG TCT
    Q I P Q L L E S A F P T L P C T V K V S
 121 GAC GTT CCC TGG GTG TTC CGT GAG CGC CAC ATC CTC ACC GGC TAC AGG CAG CCG GAC CAA
    D V P W V F R E R H I L T G Y R Q P D Q
 181 AGC TGG CGC TAC TAC TTC CTC ACC CTC TTC CAA AGG CAC AAT GAG ACC CTC AAT GTG TGG
    S W R Y Y F L T L F Q R H N E T L N V W
 241 ACC CAC CTG CTG GCT GCC CTC ATC ATC TTG GTG AAG TGG CAG GAG ATC TCG GAG ACC GTA
    T H L L A A L I I L V K W Q E I S E T V
 301 GAT TTT TTG CGA GAC CCT CAC GCT CAG CCC CTC TTC ATT GTC CTC CTG GCA GCC TTC ACC
    D F L R D P H A Q P L F I V L L A A F T
 361 TAC CTC TCC TTC AGC GCC CTC GCT CAT CTC CTC TCT GCC AAG TCC GAG CTC TCC TAC TAC
    Y L S F S A L A H L L S A K S E L S Y Y
 421 ACT TTC TAC TTC CTC GAC TAC GTG GGG GTC GCC GTC TAC CAG TAT GGC AGT GCC CTG GCA
    T F Y F L D Y V G V A V Y Q Y G S A L A
 481 CAC TAC TAC TAC GCC ATA GAG AAA GAG TGG CAC ACT AGA GTG CAA GGG CTC TTT TTA CCC
    H Y Y Y A I E K E W H T R V Q G L F L P
 541 GCT GCA GCA TTC TTG GCC TGG CTT ACT TGC TTC GGC TGC TGC TAT GGC AAA TAT GCG AGT
    A A A F L A W L T C F G C C Y G K Y A S
 601 CCT GAG CTG CCC AAG TTA GCC CAC AAG CTC TTC CAA GTG GTG CCC TCA GCC TTG GCT TAC
    P E L P K L A H K L F Q V V P S A L A Y
 661 TGT TTA GAC ATA AGC CCT GTG GTT CAC CGC ATC TAC AGC TGC TAC CAG GAG GGC TGC TCC
    C L D I S P V V H R I Y S C Y Q E G C S
 721 GAC CCA GTT GTG GCG TAC CAT TTC TAC CAT GTG CTC TTT TTC TTA ATC GGC GCC TAT TTC
    D P V V A Y H F Y H V L F F L I G A Y F
 781 TTC TGC TGC CCT CAC CGA GAG AGT TTG TTC CCT GGG AAG TGT GAC TTC ATC GGG CAG GGC
    F C C P H P E S L F P G K C D F I G Q G
 841 CAC CAG CTC TTT CAT GTG TTT GTG GTG GTG TGC ACC CTG ACG CAG GIT GAA GCA CTG CGA
    H Q L F H V F V V C T L T Q V E A L R
 901 ACA GAC TTC ACA GAG CGC CGC CCC TTC TAC GAG CGC CTT CAC GGC GAT CTC GCA CAT GAT
    T D F T E R R P F Y E R L H G D L A H D
 961 GCC GTT GCA CTC TTC ATC TTC ACT GCC TGC TGC AGT GCT CTT ACC GCT TTT TAT GTG CGC
    A V A L F I F T A C C S A L T A F Y V R
1021 AAT CGT GTA CGT GCC TCT CTC CAC GAC AAG GAG GAG TAA GAG TTG AAA TGA AGA AAA AAA
    N R V R A S L H D K E E *
1081 AAA AAA AAA AAA A
    
```

图 2 条石鲷 mPR α cDNA 全长以及推断的氨基酸序列

Fig.2 The cDNA sequence and its deduced amino acid sequence of mPR α from *O. fasciatus*

黑色阴影部分表示起始密码子; 方框部分表示终止密码子; 椭圆部分表示 13 个半胱氨酸

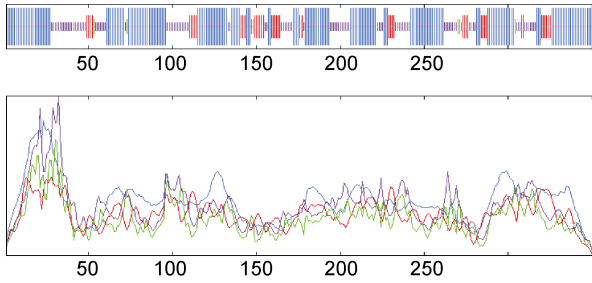


图3 条石鲷 mPR α 蛋白二级结构的分析

Fig.3 Secondary structure of *O. fasciatus* mPR α protein

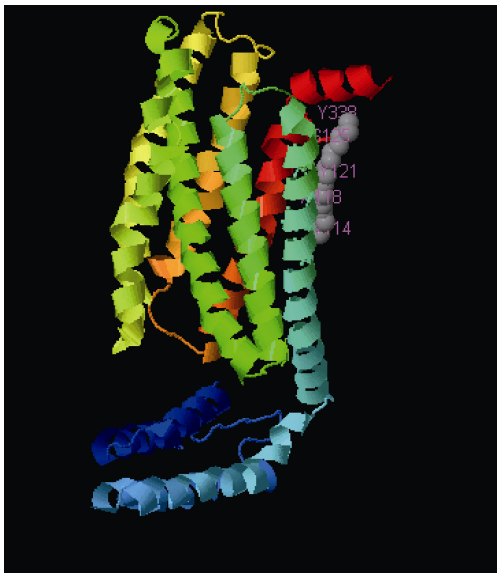


图4 条石鲷 mPR α 蛋白三级结构的分析

Fig.4 Tertiary structure of *O. fasciatus* mPR α protein

为 95%；与半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)的同源性为 94%；与漠斑牙鲆(*Paralichthys lethostigma*)的同源性为 93%；与青鳉(*Oryzias latipes*)的同源性为 91%；与金鱼(*Carassius auratus*)的同源性为 81%；与斑马鱼(*Danio rerio*)的同源性为 80%；与猪(*Sus scrofa*)的同源性为 54%；与牛(*Bos taurus*)的同源性为 54%；与家鼠(*Mus musculus*)的同源性为 53%；与人(*Homo sapiens*)的同源性为 54%。同源性比较还发现，在条石鲷的 mPR α 中存在着 7 个保守的跨膜区域(图 5)。通过 MEGA5.0 软件中的 Neighbor-joining 法(置信度检验 1000 次)构建了条石鲷 mPR α 氨基酸序列的 NJ 系统进化树。结果表明：条石鲷 mPR α 与硬骨鱼类构成一个大分支；与鲈形目鱼类的亲缘关系较近，与云纹犬牙石首鱼和大西洋绒须石首鱼聚为一个小分支(图 6)。

2.4 mPR α mRNA 在不同组织中的表达分布

利用实时荧光定量 PCR 法，以 β -actin 基因为参

照，检测条石鲷 mPR α mRNA 在条石鲷不同组织中的表达分布。结果表明：mPR α 在被检测的 13 个组织中均有表达，其中在脑中的表达量最高，其次是性腺和垂体。统计分析表明：mPR α mRNA 在脑和性腺中的表达量与其它组织差异极显著($P < 0.01$)；而在垂体、脾脏、头肾、鳃、胃、肝脏、幽门盲囊、肠、心、肾和肌肉中的表达量差异不显著($P > 0.05$) (图 7)。

2.5 mPR α mRNA 在卵巢不同发育时期的表达

利用实时荧光定量 PCR 法检测了 mPR α mRNA 在条石鲷卵巢不同发育时期的脑-垂体-卵巢中的相对表达水平。与垂体和卵巢相比，脑中的 mPR α mRNA 在卵巢发育各个时期都有较高的表达水平。由 SPSS16.0 软件显著性检验分析得出，mPR α mRNA 在各繁殖周期脑、垂体、卵巢组织的表达水平差异显著($P < 0.05$)。

在繁殖周期脑组织中，mPR α mRNA 的表达量在卵巢发育的 — 期逐渐上升，到 期时达到最大值($P < 0.05$)，在 期又急剧降低，达到最小值，然后在 期时开始回升(图 8a)。在繁殖周期垂体组织中，mPR α mRNA 的表达量在卵巢发育的 — 期逐渐上升，到 期时达到峰值($P < 0.05$)，在 期又急剧降低，达到最低值，然后在 期时开始回升(图 8b)。在繁殖周期卵巢组织中，mPR α mRNA 的表达量在卵巢发育的 — 期急剧上升，到 期时达到最大值($P < 0.05$)，在 期又急剧下降(图 8c)。

2.6 雌二醇在条石鲷卵巢发育不同时期的含量变化

利用放射免疫测定方法(RIA)检测了血清中雌二醇(E_2)在条石鲷卵巢发育不同时期的含量变化。结果表明：条石鲷血清中 E_2 的含量在卵巢发育的各个时期差异显著($P < 0.05$) (图 9)。 E_2 在卵巢发育的 — 期急剧上升，并在 期达到最大值($P < 0.05$)，之后其含量开始下降，并在 期达到最小值。表明条石鲷血清雌二醇的浓度变化与卵巢的发育相关。

3 讨论

本研究利用 RACE 等方法首次从条石鲷卵巢中获得 mPR α 的 cDNA 全长序列，推导的 mPR α 蛋白序列含 353 个氨基酸。通过氨基酸序列分析，在其成熟肽序列中存在 13 个保守的半胱氨酸，在其二级结构中有 7 个跨膜区域；在结构上与其它脊椎动物 mPR α 具有很高的保守性。同源性比较表明，条石鲷的 mPR α 与硬骨鱼类的 mPR α 同源性比较高(80%—98%)，与哺乳动物 mPR α 的同源性较低(53%—54%)。系统

进化分析表明, 条石鲷与同为鲈形目的云纹犬牙石首鱼和大西洋绒须石首鱼聚为一个小分支, 与其它

硬骨鱼类聚为一个大分支, 说明在长期进化的过程中它们的亲缘关系比较接近。

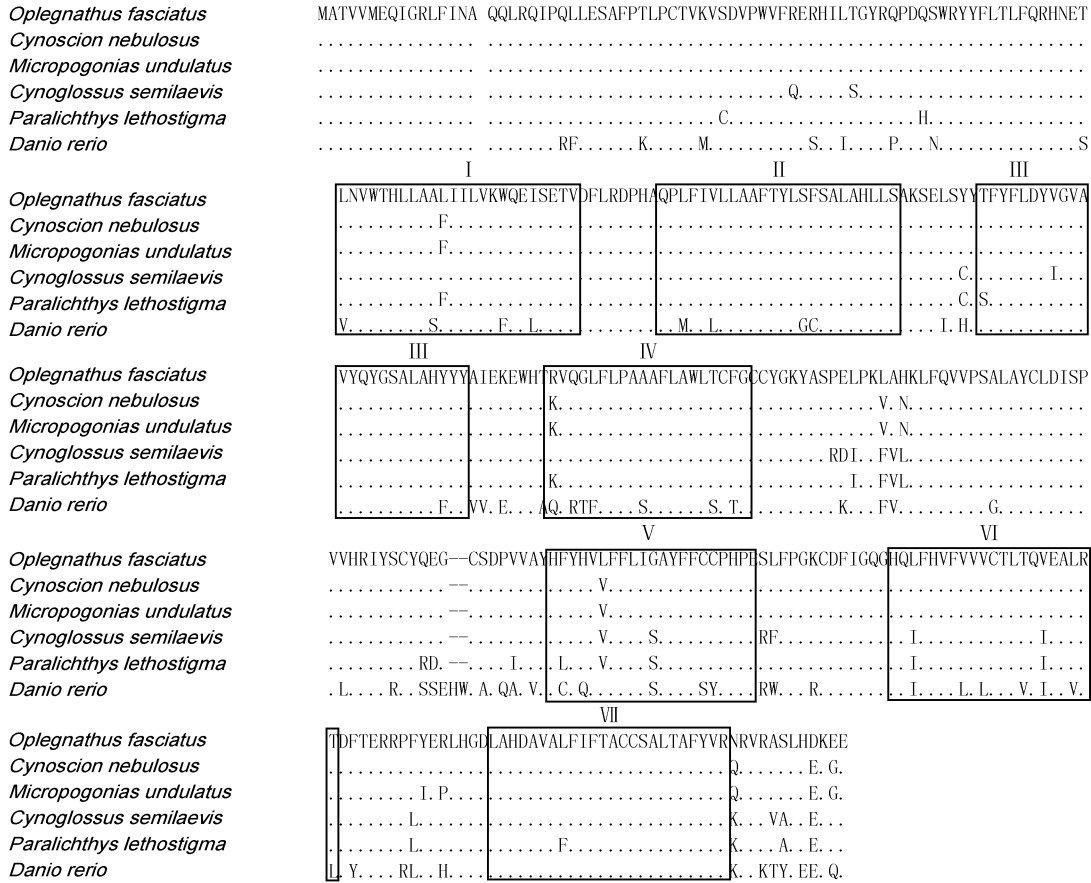


图 5 条石鲷 mPR α 氨基酸序列与其它物种 mPR α 氨基酸序列的比较
Fig.5 Amino acid sequence alignment of mPR α from *O. fasciatus* with other fishes
直线部分代表信号肽; 线框代表保守区域

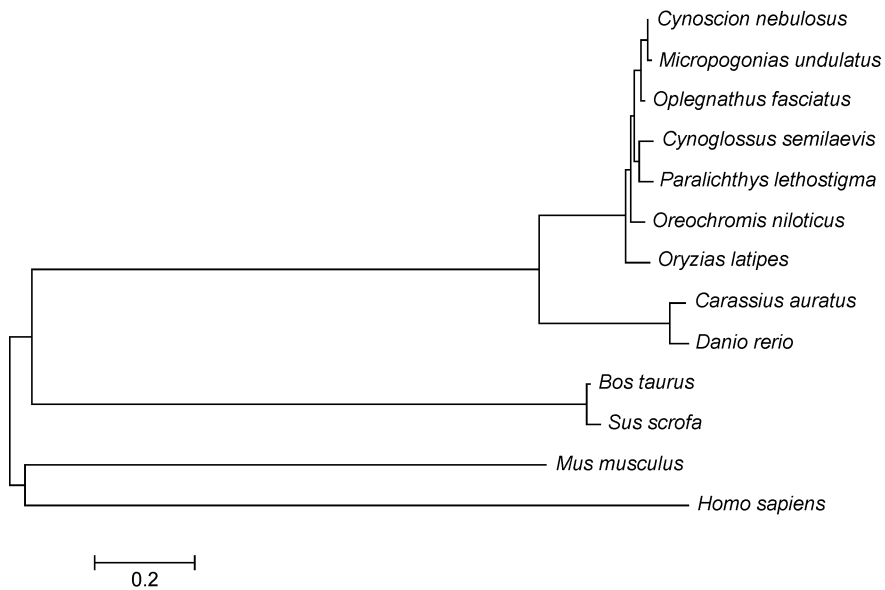


图 6 条石鲷 mPR α 氨基酸序列与其它脊椎动物 mPR α 的系统进化树
Fig.6 Phylogenetic tree of mPR α from *O. fasciatus* and other known vertebrates

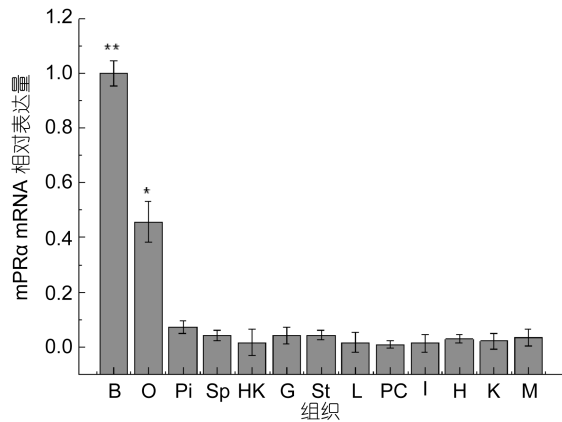


图7 条石鲷 mPR α mRNA 在不同组织中的相对表达水平
Fig.7 The relative expression level of mPR α mRNA in various tissues of *O. fasciatus*

B: 脑; O: 卵巢; Pi: 垂体; Sp: 脾; HK: 头肾; G: 鳃; St: 胃; L: 肝脏; PC: 幽门盲囊; I: 肠; H: 心脏; K: 肾; M: 肌肉

采用实时荧光定量 PCR 法检测了 mPR α mRNA 在条石鲷的组织表达特征, 结果表明 mPR α mRNA 在脑组织的表达量最高, 其次是在卵巢组织, 而垂体组织中 mPR α mRNA 相对表达水平低于前二者; 这与斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) mPR α mRNA 组织表达特征相似之处, 但是斑点叉尾鲷垂体组织的 mPR α mRNA 相对表达水平要高于卵巢组织(Kazeto *et al.*, 2005a)。Hanna 等(2009)通过免疫组化技术对模式生物斑马鱼的垂体和卵巢中 mPR α 的细胞表达定位进行检测, 发现 mPR α 主要分布于卵母细胞的细胞膜和滤泡细胞, 垂体内 mPR α 在多种细胞内分布。本研究首次在石鲷科鱼类发现 mPR α mRNA 表达也具有广泛性, 在被检测的 13 个组织中均有表达。Tubbs 等(2010)在大西洋绒须石首鱼发现 mPR α mRNA 组织表达具有广泛性, 在脑、卵巢、精巢、心脏、肝脏、肠、肌肉、鳃、嗅上皮等组织中都有表达。在本研究中条石鲷 mPR α mRNA 广泛表达模式与之相似。这些研究结果表明 mPR α 在硬骨鱼类多种组织介导孕激素的生理功能。关于 mPR α 在其它组织中具体的作用机制和生理作用需要深入研究, 这将有助于更加全面了解 mPR α 的调控机制。

用实时荧光定量 PCR 法检测了 mPR α mRNA 在条石鲷卵巢发育不同阶段的表达水平变化。结果发现在条石鲷繁殖周期, mPR α mRNA 在脑组织中的表达水平始终高于卵巢和垂体; 而且在卵巢发育 Ⅳ 期时脑组织中 mPR α mRNA 达到最大值。在条石鲷繁殖周期, 垂体中的 mPR α mRNA 在 Ⅳ 期达到最大值, 而在

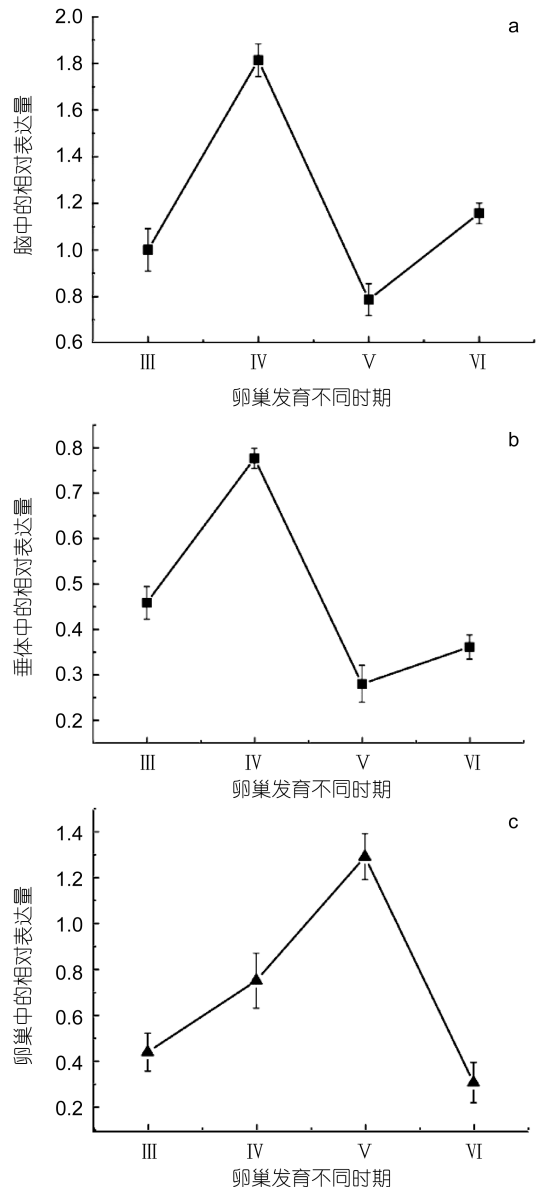


图8 mPR α mRNA 在条石鲷卵巢不同发育时期的相对表达量

Fig.8 The relative expression of mPR α mRNA in ovarian development stage of *O. fasciatus*

Ⅲ: 期卵巢; Ⅳ: 期卵巢; Ⅴ: 期卵巢; Ⅵ: 期卵巢

急剧降低。条石鲷脑和垂体组织 mPR α mRNA 的繁殖周期表达模式相似, 说明孕激素在脑-垂体神经内分泌系统, 可以通过 mPR α 的介导进而调节繁殖活动。在另一种重要海水养殖经济鱼类半滑舌鲷, 研究发现其脑和垂体组织的 mPR α mRNA 的表达水平从卵巢发育的 Ⅲ 期显著升高($P < 0.05$)并且在 Ⅳ 期时达到最高峰(李晓晓等, 2013)。在鱼类神经内分泌系统发现 mPR α mRNA 在繁殖周期各个阶段均有表达, 一方面预示着 mPR α 生理功能重要性; 另一方面其作

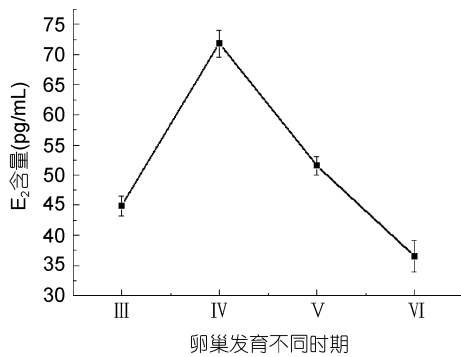


图 9 雌二醇激素在条石鲷卵巢不同发育时期的含量变化

Fig.9 The level of plasma estrogen in ovarian development stage of *O. fasciatus*

: 期卵巢; : 期卵巢; : 期卵巢; : 期卵巢

用机制并不清楚,也体现出复杂性。在条石鲷繁殖周期,卵巢组织中的 mPR α mRNA 在 III 期急剧上升,并在 IV 期达到最大值;表明 mPR α 在卵巢发育、成熟的生理过程均发挥作用,并在介导孕激素诱导卵母细胞的成熟过程起着重要的调控作用。Kazeto 等(2005b)采用实时荧光定量 PCR 方法检测斑点叉尾鲷繁殖周期的 mPR α mRNA 在卵巢组织的表达变化,发现 mPR α mRNA 在卵母细胞发育阶段表达量开始升高,在卵母细胞成熟阶段表达量达到峰值。本研究结果与斑点叉尾鲷 mPR α 基因周期表达模式相似。条石鲷血清中雌二醇含量在卵巢发育的 III 期急剧上升,并在 IV 期达到最大值($P < 0.05$),之后其含量开始下降。Karteris 等(2006)研究发现在人类子宫肌层,雌二醇可以上调 mPR α mRNA 和蛋白水平。在本研究中卵巢从 III 期发育到 VI 期过程中,血清中雌二醇水平升高,繁殖周期脑-垂体-卵巢中 mPR α mRNA 表达量也升高;并且雌激素含量变化与繁殖周期脑-垂体中 mPR α 基因表达变化相似;但是在条石鲷卵巢成熟期,血清中雌二醇水平降低而卵巢中 mPR α mRNA 达到周期中最高值,推测此阶段主要由 mPR α 介导孕酮激素诱导卵母细胞成熟。真鲷(*Pagrus major*)血清中孕激素通过 ELISA 测定发现在卵巢发育成熟期达到峰值(Otha *et al.*, 2002),该研究支持本实验的推测。在今后的研究中,将进一步分析条石鲷繁殖周期血清中孕酮激素与 mPR α mRNA 和蛋白水平变化关系,揭示 mPR α 的作用机制。

参 考 文 献

刘 筠, 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 42—46
刘伟成, 单乐州, 谢起浪等, 2008. 温度对条石鲷摄食率、产卵量

- 和受精率的影响. 宁波大学学报(理工版), 21(3): 314—317
孙中之, 柳学周, 徐永江等, 2009. 条石鲷人工育苗及养殖技术. 齐鲁渔业, 26(1): 28—31
李晓晓, 2013. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
张凤萍, 柳敏海, 彭志兰等, 2010. 条石鲷卵巢发育的组织学研究. 大连水产学院学报, 25(2): 102—106
张春霖, 成庆泰, 郑葆珊等, 1955. 黄渤海鱼类调查报告. 北京: 科学出版社, 153—155
柳学周, 徐永江, 王妍妍等, 2008. 条石鲷的早期生长发育特征. 动物学报, 54(2): 332—341
彭志兰, 柳敏海, 傅荣兵等, 2013. 野生条石鲷精巢的年周期发育. 海洋通报, 32(6): 700—703
Ben-Yehoshua L J, Lewellyn A L, Thomas P *et al.*, 2007. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor β in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 21(3): 664—673
Hanna R N, Zhu Y, 2009. Expression of membrane progesterone receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1): 153—157
He T, Xiao Z Z, Liu Q H *et al.*, 2011. Stages of rock bream *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel 1844): embryonic development. *Aquaculture Research*, 42(12): 1764—1777
Karteris E, Zervou S, Pang Y F *et al.*, 2006. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology*, 20(7): 1519—1534
Kazeto Y, Goro-Kazeto R, Trant J M, 2005b. Membrane-bound progesterone receptors in channel catfish and zebrafish ovary: Changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1—2): 204—211
Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P *et al.*, 2005a. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progesterone receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3): 781—791
Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
Nagahama Y, Yamashita M, 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth & Differentiation*, 50(S1): S195—S219
Otha K, Yamaguchi S, Yamaguchi A *et al.*, 2002. Biosynthesis of steroids in ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major* (Sparidae, Teleostei) during final oocyte maturation and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(1): 45—54
Thomas P, Pang Y F, Zhu Y *et al.*, 2004. Multiple rapid progesterone actions and progesterone membrane receptor subtypes in fish. *Steroids*, 69(8—9): 567—573
Tokumoto T, Tokumoto M, Oshima T *et al.*, 2012. Characterization of multiple membrane progesterone receptor (mPR) subtypes

- from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 177(1): 168—176
- Tsai M J, O'Malley B W, 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry*, 63(1): 451—486
- Tubbs C, Pace M, Thomas P, 2010. Expression and gonadotropin regulation of membrane progesterin receptor alpha in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) gonads: Role in gamete maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 165(1): 144—154
- Zhu Y, Rice C D, Pang Y F *et al*, 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 100(5): 2231—2236

CLONING AND EXPRESSION OF MEMBRANE PROGESTIN RECEPTOR (mPR α) IN ROCK BREAM *OPLEGNATHUS FASCIATUS*

SHI Bao¹, LIU Xue-Zhou¹, CHEN Sheng-Yi^{1,2}, XU Yong-Jiang¹, ZANG Kun^{1,2}, LI Xiao-Ni¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, P. R. China, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract A full-length cDNA sequence of mPR α was cloned first time from the ovary of *Oplegnathus fasciatus* by homology cloning and RACE techniques. The mPR α cDNA sequence is 1222bp and its open reading frame is 1060bp, encoding a precursor protein of 353 amino acids preceded by a signal peptide of 16 amino acids residues. Sequence alignment of the mPR α and amino acid of other species suggested that it had seven transmembrane domains. Tertiary structure of mPR α protein showed that it had several binding sites. Sequences comparison and phylogenetic analysis showed the mPR α clusters with perciformes in more than 95% identity. The *mPR α* mRNA expression of sexually matured rock bream was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) method. Tissue expression analysis showed that *mPR α* mRNA was expressed widely in the fish, and *mPR α* transcripts were highly abundant in brain, pituitary, and ovary. Expression level of *mPR α* mRNA in brain and pituitary of reproductive cycle showed that *mPR α* mRNA were maximum at stage . And the expression level of *mPR α* mRNA in the reproductive cycle showed that it significantly increased from ovarian development stage to stage ($P<0.05$), then peaked in the stage . Changes in serum estrogen values of reproductive cycle indicated that plasma estrogen values changed dramatically ($P<0.05$), and the estrogen values increased rapidly and reached maximum at stage . The research may provide a reference for understanding ovarian maturation regulation of *O. fasciatus*.

Key words *Oplegnathus fasciatus*; membrane progesterin receptor; gene cloning; expression; estrogen