

## 花鳗鲡脑 cDNA 文库的构建及 *GnRH* 基因克隆与表达分析

黄海<sup>1,2</sup> 张勇<sup>1</sup> 刘晓春<sup>1</sup> 尹绍武<sup>2</sup> 杨丽萍<sup>1</sup>  
朱培<sup>1</sup> 齐兴柱<sup>2</sup> 林浩然<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 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. 海南大学海洋学院热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

**摘要:**以花鳗鲡脑组织为材料,提取总 RNA,应用 Cloneminer™文库构建试剂盒构建 cDNA 文库。经检测,文库的滴度为  $4.3 \times 10^6$  cfu/mL,总容量为  $5.16 \times 10^7$  cfu/mL,阳性克隆率为 99.6%,插入片段 0.43—3.2kb 之间,平均插入片段大小为 1532bp。以文库为模板,克隆获得花鳗鲡两种类型的促性腺激素释放激素(*mGnRH* 和 *cGnRH-II*) cDNA 序列。序列分析表明,花鳗鲡 *mGnRH* cDNA 开放阅读框(ORF)包含 276 个碱基,编码 91 个氨基酸,其中包括 22 个氨基酸的蛋白质前体信号肽(1—22 位氨基酸)、*mGnRH* 十肽(23—32 位氨基酸)、一个三肽裂解位点(33—35 位氨基酸)和 56 个氨基酸的 GnRH 相关肽(36—91 位氨基酸);花鳗鲡 *cGnRH-II* cDNA 开放阅读框包含 264 个碱基,编码 87 个氨基酸,其中包括 24 个氨基酸的蛋白质前体信号肽(1—24 位氨基酸)、*cGnRH-II* 十肽(25—34 位氨基酸)、一个三肽裂解位点(34—36 位氨基酸)和 50 个氨基酸的 GnRH 相关肽(37—87 位氨基酸)。序列同源性分析表明,花鳗鲡 *mGnRH*、*cGnRH-II* cDNA 与日本鳗鲡之间的相似性率高达 98%;与鲑形目、鲈形目、鲹形目鱼类的相似率为 73%—78%;而与鲤形目鱼类的相似性相对较低(63%—67%)。采用 RT-PCR 方法分析了两种 *GnRH* 基因在花鳗鲡雌雄个体中的表达,结果表明两基因在雌雄个体的组织表达模式无明显差异;但 *mGnRH* 基因在雌雄个体内表达部位多于 *cGnRH-II* 的。

**关键词:**花鳗鲡;cDNA 文库;促性腺激素释放激素;克隆;基因表达

**中图分类号:**Q781 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2009)02-0214-08

花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)俗名又称鲈鳗、花鳗、雪鳗、鱧王、溪鳗等,在分类学中属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鳗鲡目(Anguilliformes)、鳗鲡科(Anguillidae)、鳗鲡属(*Anguilla*),是鳗鲡属鱼类中分布最广的种类,分布范围东至太平洋的中部诸岛,西达印度洋的马达加斯加岛,南至澳大利亚南部,北达朝鲜、日本南部。我国见于福建、广东、台湾、海南等省的河流及海域中<sup>[1,2]</sup>。近年来,由于过度捕捞、环境污染、拦河建坝等人类活动加剧,花鳗鲡的自然资源明显减少,我国已将其列为二级保护动物。花鳗鲡不但肉脆味美,营养价值高,而且有药用价值,系优质食用鱼类<sup>[2,3]</sup>。目前,海南等地积极发展花鳗鲡人工养殖业,市场前景广阔,产业发展势头良好。然而,至今为止,国内外未见花鳗鲡神经生殖内

分泌和人工繁育技术的研究报道。

鱼类生长、生殖活动的神经内分泌调控机理的研究是当前鱼类生理学研究的热点领域之一。脑不仅是信息处理的神经中枢,而且能合成与分泌多种神经内分泌因子,参与生长与生殖的调控。目前,鱼类生长轴、生殖轴的组织与器官,如脑垂体<sup>[4]</sup>、性腺<sup>[5,6]</sup>、肝脏<sup>[7,8]</sup>等的 cDNA 文库构建在国内已经有了报道,但未见脑 cDNA 文库的报道。本研究采用 Cloneminer™文库构建试剂盒构建了花鳗鲡脑 cDNA 文库,并以文库为模板,克隆获得两种类型的花鳗鲡促性腺激素释放激素(*GnRH*)基因 cDNA,并进行序列分析。花鳗鲡脑 cDNA 文库的构建不仅可保护花鳗鲡的基因资源,而且为今后研究与花鳗鲡生长、生殖相关的功能基因打下了基础。

收稿日期:2008-03-12;修订日期:2008-12-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30770283);“十一五”国家科技支撑计划重点项目(2007BAD29B03);广东省科技兴海(渔)项目(B200701A06);海南大学科研基金项目(kyj0621);海南省教育厅高等学校科学研究资助项目(Hjkj2008-22)资助

作者简介:黄海(1974—),男,海南三亚人;博士研究生;研究方向为鱼类生理学。E-mail: Huanghai74@126.com

通讯作者:林浩然(1934—),男,海南文昌人;工程院院士,教授,博导;研究方向为鱼类生理学。E-mail: lsslhr@mail.sysu.edu.cn

## 1 材料与方 法

**1.1 材 料** 花鳉由海南文昌金山花鳉科技开发有限公司提供,体重在 856.0—1221.4 g,全长 56.0—78.7cm 的 6 尾花鳉(雌雄各 3 尾),解剖后取各组织,置于液氮中保存,用于构建文库和组织表达分析,其中体重为 1221.4g、体长 78.7cm 的一尾雌鱼的全脑用于构建文库,其余鱼的组织用于组织表达分析。Trizol reagent 和 CloneMiner™ cDNA 文库构建试剂盒购自 Invitrogen 公司,质粒提取与胶回收试剂盒为 Omega 产品,其余的均为国产分析纯试剂。

### 1.2 方 法

**1.2.1 cDNA 文库的构建与质量检测** 取花鳉脑组织,提取总 RNA,并用蛋白核糖检测仪和电泳检测 Total RNA 浓度和质量。根据 CloneMiner™ cDNA 文库构建试剂盒的操作说明书构建花鳉脑 cDNA 文库。取大约 5 μg mRNA 在 biotin-attB2-oligo dT 和 SuperScript™ II 逆转录酶(RT)等作用下合成第一链;在合成第二链和末端钝化之后把磷酸化的双链 attB1 接头连接到 cDNA 的 5' 末端;使用柱子分级收集 cDNA 片段;取大小适合的 cDNA 片段 150ng 左右和 pDONR™ 222 载体在 BPClonase™ 酶混合物催化下进行 BP 反应;在进行灭活以及酒精沉淀后,重组的产物电转化到 ElectroMAX™ DH10B 的感受态细胞中;在文库细胞样品加入等体积的灭菌冷冻培养基(60% S. O. C 培养基:40% 甘油)并混匀、分装后,液氮速冻, -70℃ 下保存。

用 100 μL 文库菌液稀释成不同浓度的样品涂板到 LB 卡那霉素培养基上,计算文库的滴度与总容量;任意选取 24 个克隆,根据 CloneMiner™ 说明书提供的步骤,用 *BsrG* I 限制性内切酶消化,电泳检测;并根据载体 pDONR™ 222 设计 M13 上游引物(5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') 和 M13 下游引物(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'),以 24 个重组克隆的质粒为模板扩增插入片段;检测文库阳性克隆率和平均插入片段大小。

### 1.2.2 花鳉两种 *GnRH* 基因的克隆与序列分析

根据日本鳉 *mGnRH* 和 *cGnRH-II* 前体基因序列(Genebank 序列号分别为 AB026989 和 AB026990),采用 Primer Premier 5.0 软件分别设计两对特异性引物(表 1)。以花鳉脑组织 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 反应条件都为:94℃ 预变性 3min;94℃ 15s,54℃ 15s,72℃ 40s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。PCR 反应总体系为:去离子 H<sub>2</sub>O

13.4 μL, *ExTaq* Buffer 2 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.6 μL, dNTP 0.4 μL, 正向引物 1 μL, 反向引物 1 μL, 模板 0.6 μL, *ExTaq* DNA 聚合酶 0.08 μL;总体积为 20 μL。PCR 扩增产物经 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳,并经琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收,与 pMD18-T 载体 16℃ 连接过夜,转化大肠杆菌 DH5α 涂板,37℃ 生长过夜,挑单克隆菌培养,提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切鉴定确定阳性克隆后,用 DNA 自动测序仪(ABI377)进行测序。测序结果用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行扩增片段同源性分析,根据分析结果判定扩增片段是否属于 *GnRH* 基因家族;采用 Clustal W 程序对花鳉 2 种 *GnRH* 以及其他鱼类的 *GnRH* 进行多序列比较,并采用 MEGA3.1 软件以邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统进化树。

表 1 PCR 扩增所用引物及其序列

Tab. 1 PCR primer sequences for cloning gene

引物名称	引物方向	引物核苷酸序列
Name of primer	Forward of primer	Sequences of primer
<i>mGnRH</i> -sen1	Sense	5' GAAGAGAACGCAACTTCTGC 3'
<i>mGnRH</i> -ant1	Antisense	5' GTTTTATTGAAGGAATGCATGC 3'
<i>mGnRH</i> -sen2	Sense	5' AGTGTCATCTGACAAAGAATG 3'
<i>mGnRH</i> -ant2	Antisense	5' CTCTATATATTTTTCCGTCAG 3'
<i>cGnRH</i> -sen1	Sense	5' AAGAGCTCTTCAAGGAACATCC 3'
<i>cGnRH</i> -ant1	Antisense	5' GCTATGTGAAGGAAGAACAGC 3'
<i>cGnRH</i> -sen2	Sense	5' TCCACCTTTAGTGTGATGTTG 3'
<i>cGnRH</i> -ant2	Antisense	5' TGCTACTTCCTCTCTCTCTGG 3'
<i>β-Actin</i> -sen	Sense	5' GGTGGGTATGGGTCAGAAAGA 3'
<i>β-Actin</i> -ant	Antisense	5' GATGAGGAAGTGCTGTCC 3'

**1.2.3 花鳉 *GnRH* 组织表达分布** 采用 RT-PCR 的方法,检测花鳉促性腺激素释放激素在雌鱼、雄鱼中不同组织与器官中的转录表达。分别提取花鳉雌鱼和雄鱼的前脑、中脑、后脑、垂体、下丘脑、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、肌肉、性腺(卵巢、精巢)、脂肪等 14 种不同组织与器官的总 RNA,并反转录合成 cDNA,用特异性引物对样品进行扩增,用 *β-actin* 作内部参照物(引物序列见表 1),检测 *mGnRH* 与 *cGnRH-II* 在不同组织与器官中的转录表达。

## 2 结 果

### 2.1 cDNA 文库的构建与质量检测

取 1 μL 总 RNA 稀释 100 μL 后用紫外分光光度计检测吸光度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> = 1.91,浓度为 0.167g/L,提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),说明总 RNA 的提取质量已达到构建文库的要求。

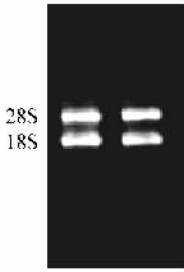


图1 花鳗鲡脑组织总 RNA 电泳图谱

Fig. 1 Total RNA extracted from brain of marbled eel agarose gel analysis

在合成第一链和第二链后用柱子分级收集 20 管片段分级样品,样品用 SYBR GOLD 核酸凝胶染料检测各管浓度,结果表明从第 5 管起的样品浓度均大于  $5\text{ng}/\mu\text{L}$ ,但第 14 管起片段较小,因此只合并第 5 到第 13 管的样品,乙醇沉淀 cDNA,用  $45\mu\text{L}$  TE 缓冲液重悬 cDNA 沉淀,分光光度计检测,  $\text{OD}_{260/280}$  为 1.83,共得到 210ng 样品。所得 cDNA 用于 BP 反应与电转化,最后获得的文库经检测,文库的滴度为  $4.3 \times 10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ ,总容量为  $5.16 \times 10^7 \text{ cfu}$ 。随机提取 24 个克隆的质粒,经 *BsrG* I 消化与 PCR 扩增后电泳结果(图 2、3)表明,文库阳性克隆率为 99.6%,插入片段 0.43—3.2kb 之间,平均插入片段大小大约为 1532bp。按照 CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit 要求,一个高质量的 cDNA 文

库,其滴度应大于  $1 \times 10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ ,文库总容量大于  $5 \times 10^6 \text{ cfu}$ ,阳性克隆率大于 95%,平均插入 cDNA 片段大于或等于 1500bp。因此,所构建的花鳗鲡脑文库质量较高。

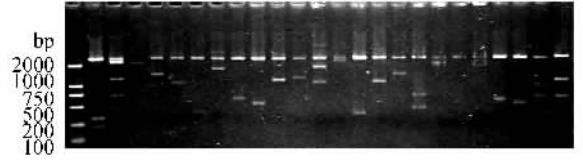
图2 24 个克隆的 *BsrG* I 限制性内切酶切图谱Fig. 2 The restriction patterns by *BsrG* I of 24 clones

图3 部分克隆质粒的 PCR 扩增结果

Fig. 3 The PCR amplified results of partial clones

## 2.2 花鳗鲡 *GnRH* 基因的克隆与序列分析

将从花鳗鲡脑组织 cDNA 文库中 PCR 得到的特异性扩增片段克隆到 PMD18-T 载体,并进行测序,获得了花鳗鲡促性腺激素释放激素 *mGnRH*(图 4)和 *cGnRH-II*(图 5)的 cDNA 序列。序列分析表明,花鳗鲡 *mGnRH* 前体蛋白质 cDNA 开放阅读框

```

1 ATG GCA GAT AAG AGC GCC CTC TTG TGG CTG GGG CTG GCT GTG GCA CTG GTG TGT CAG GGA 60
1 M A D K S A L L W L G L A V A L V C Q G 20
Signal peptide (SP)
61 TGC TGT CAG CAC TGG TCG TAC GGC CTG AGA CCC GGG GGC AAG AGA GGA GCA GAT AGC CTA 120
21 C C Q H W S Y G L R P G G K R G A D S L 40
mGnRH
121 CAG GAC ATG CTG CAA GAT ATC ATA GAG GAG CTG CAG AAG CTG GAC ACC TCC AGT TTG CCC 180
41 Q D M L Q D I I E E L Q K L D T S S L P 60
GnRH - associated Peptide (GAP)
181 AGC TGC AAT GAC CTC TCC CCA CAT ATT ACA CTT TOC AGC CTG AAG GAA ATA CTG GCA AAT 240
61 S C N D L S P H I T L S S L K E I L A N 80
241 CTG GCT GAC AGA GAA ACT GGA CGG AAA AAT ATA TAG 276
81 L A D R E T G R K N I * 92

```

图4 花鳗鲡 *mGnRH* cDNA 序列和对应的氨基酸序列Fig. 4 cDNA Sequence and amino acid sequence of *mGnRH* of marbled eel

```

1  ATG GTG AAC ACC GGC AGG CTG GTG CTG ATT TTG GGG GTG CTG CTG TGT TTG GGG GCG CAG  60
1  M   V   N   T   G   R   L   V   L   I   L   G   V   L   L   C   L   G   A   Q   20
                                     Signal peptide (SP)
61  CTC TCC CTG TGT CAG CAC TGG TCC CAC GGC TGG TAC CCC GGG GGA AAG AGG GAG CTG GAC 120
21  L   S   L   C   Q   H   W   S   H   G   W   Y   P   G   G   K   R   E   L   D   40
                                     cGnRH
121 TCC CTC ACC ACC GCC GAG GTA TTG GAA GAG ATA AAG CTC TGC GAT GGG GGA GAA TGC AGC 180
41  S   L   T   T   A   E   V   L   E   E   I   K   L   C   D   G   G   E   C   S   60
                                     GnRH - associated Peptide (GAP)
181 TAC TTG AGA CCC CAG CGG AAA AGC CTC TTA AAA AAC ATT CTG CTG GAC GCC CTC GCC CGG 240
61  Y   L   R   P   Q   R   K   S   L   L   K   N   I   L   L   D   A   L   A   R   80
241 GAG TTC CAG AGG AAG AGG AAG TGA 264
81  E   F   Q   R   K   R   K   * 88

```

图5 花鳉脑 *cGnRH* cDNA 序列和对应的氨基酸序列  
 Fig. 5 cDNA Sequence and amino acid sequence of *cGnRH* of marbled eel

(ORF) 包含 276 个碱基, 编码 91 个氨基酸, 其中包括 1—22 位的 22 个氨基酸的信号肽、具有生物活性的 mGnRH (23—32 位氨基酸)、一个三肽裂解位点 (33—35 位氨基酸) 和 56 个氨基酸的 GnRH 相关肽 (36—91 位氨基酸)。花鳉脑 *cGnRH*-II 前体蛋白质 cDNA 开放阅读框包含 264 个碱基, 编码 87 个氨基酸, 其中包括 1—24 位的 24 个氨基酸的蛋白质前体信号肽、具有生物活性的 *cGnRH*-II (25—34 位氨基酸)、一个三肽裂解位点 (34—36 位氨基酸) 和 50 个氨基酸的 GnRH 相关肽 (37—87 位氨基酸)。

2.3 花鳉脑 *GnRH* 基因的同源性分析与进化树

Blast 结果表明, 花鳉脑 *cGnRH*-II 基因的 cDNA 序列与其他生物有较高的同源性。如与日本鳉 (*A. japonica*) 的相似性为 98%, 与鲑形目白鲑 *Coregonus clupeaformis* 的相似性为 78%, 与鲈形目尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 和条纹鲈 *Morone saxatilis* 的相似性分别为 77% 和 73%; 与鲱形目牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 和条斑星鲈 *Verasper moseri* 的相似性分别为 77% 和 75%; 与鲤形目斑马鱼 *Danio rerio* 和金鱼 *Carassius auratus* 的相似性为 67% 和 63%。花鳉脑 *mGnRH* cDNA 与日本鳉 *A. japonica* 的 *mGnRH* cDNA 同源性也较高, 两者间的相似性率为 98%。GnRH 前体蛋白氨基酸序列聚类分析结果表明, 不同鱼类的 GnRH 聚成 3 大分支, 其中 mGn-

RH 和 sbGnRH 聚为一大类 (I 类型), *cGnRH*-II 和 *sGnRH* 各自聚为一类 (II, III)。在鱼类中, mGnRH 仅见于鳉目等少数的低等鱼类中, 而 sbGnRH 存在于分类地位较高的鱼类中。它们有明显的种类特异性。这两种类型的 GnRH 聚为一类, 说明它们在分子结构和功能特征上具有相似性。而 *cGnRH*-II 是一类在进化上很保守的 GnRH 类型, 存在于多种脊椎动物中; *sGnRH* 则普遍存在于多种鱼类中。*sGnRH* 与 *cGnRH*-II 先聚在一起, 然后再与第 I 类型聚类, 说明 *sGnRH* 是鱼类进化起源史上出现时间较早、相对保守的原始 GnRH 类型。它在陆地生物中的缺失, 可能是由于基因丢失所造成。以 *cGnRH*-II 为例, 低等硬骨鱼类鳉形目的花鳉脑和日本鳉单独聚为一小分支, 再与高等硬骨鱼的鲑形目、鲈形目、鲱形目、鲤形目聚为一大分支 (图 6)。

2.4 花鳉脑 *GnRH* 基因的组织表达

花鳉脑促性腺激素释放激素的组织分布在雌鱼和雄鱼间没有明显差别。在前脑、中脑、后脑、垂体、下丘脑、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肠、鳃、肌肉、性腺 (卵巢、精巢)、脂肪等 14 种组织中, *mGnRH* 广泛分布于各种组织中, 仅在雌鱼的脾脏、肌肉和脂肪中没有表达以及雄鱼的肌肉和脂肪中没有表达; 而 *cGnRH*-II 仅在雌鱼和雄鱼的前脑、中脑、后脑与性腺中有表达 (图 7)。

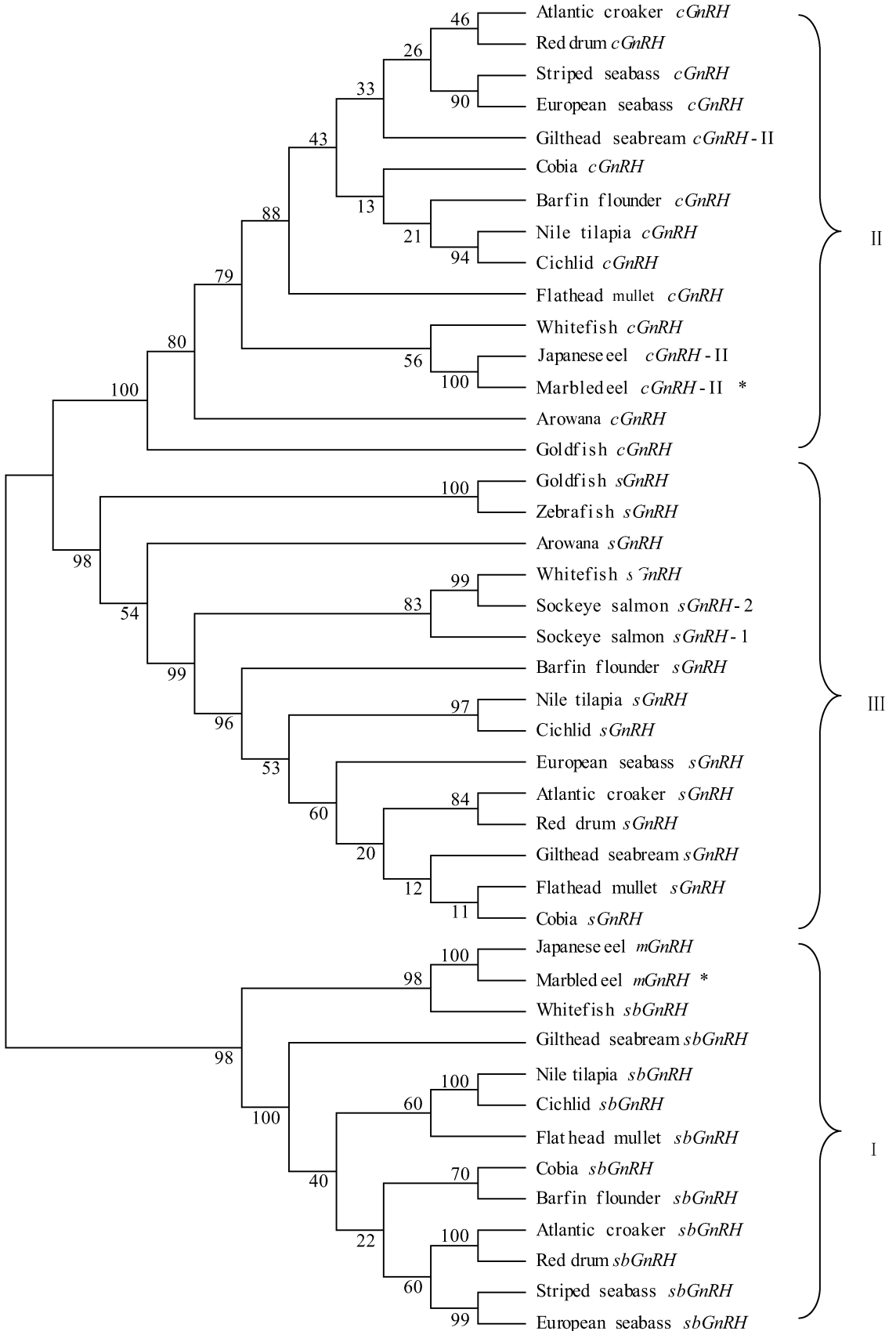


图6 构建的 *GnRH* 氨基酸序列系统进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree based on sequences of *GnRH* amino acid



图 7 促性腺激素释放激素在花鳗鲡雌雄鱼中不同组织的转录表达

Fig. 7 The level of translated expressions of *GnRH* in different tissues in female and male marbled eel

FB 为前脑;MB 为中脑;HB 为后脑;P 为垂体;HY 为下丘脑;L 为肝脏;H 为心脏;S 为脾脏;K 为肾脏;I 为小肠;G 为鳃;M 为肌肉;O 为卵巢;T 为精巢;F 为脂肪;B 为阴性对照

FB, forebrain; MB, midbrain; HB, hindbrain; P, pituitary; H, hypothalamus; L, liver; H, heart; S, spleen; K, kidney; I, intestine; G, gill; M, muscle; O, ovary; T, testis; F, fat; B, blank

### 3 讨 论

采用分子克隆技术构建 cDNA 文库是保护生物基因库资源的重要举措,也是研究功能基因组学的基本手段之一。从 1976 年 Hofstetter 成功地构建了第一个 cDNA 文库以来,构建 cDNA 文库的技术方法逐步发展与完善。目前所报道的 cDNA 全长文库的构建一般按照美国 Clontech 公司的 SMART™ cDNA Library Construction Kit 方法或 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen, USA) 使用说明进行。2003 年,Invitrogen 公司推出的 Cloneminer™ 文库构建试剂盒整合了 Gateway 技术,使构建 cDNA 文库简单、系统、高效,而且与限制性酶切和连接的 cDNA 克隆途径相比有两个主要优点:第一个优点就是该方法通过重组进行克隆,免除了 cDNA 的限制性内切酶消化,使构建的 cDNA 文库质量更高,代表性更佳,平均插入片段更大,全长克隆的数量更多。第二个优点是创建的文库是 Gateway 入门克隆。单一的克隆或者整个的 CloneMiner™ 文库能够快速转化到多种表达和功能分析系统中,为后继研究提供方便。

花鳗鲡属于降海洄游性鱼类,在淡水中生长发育,性成熟后洄游到深海产卵繁殖。由于环境污染严重、过度捕捞、拦河建坝等原因,花鳗鲡自然资源日益匮乏,已经被列为国家二级保护动物<sup>[2]</sup>,目前

对它的生长发育、繁殖规律和生殖内分泌特点还不清楚。因此,开展花鳗鲡神经生殖内分泌研究,不仅有利于花鳗鲡资源保护,而且可为花鳗鲡人工繁殖提供理论依据。本试验采用 Invitrogen 公司的 Cloneminer™ 文库构建试剂盒构建了花鳗鲡脑 cDNA 文库。所得文库经检测,文库的滴度为  $4.3 \times 10^6$  pfu/mL,总容量为  $5.16 \times 10^7$  pfu,重组率 99.6%,插入片段 0.43—3.2kb 之间,平均插入片段大小为 1532bp,说明所到文库的质量很高。本研究还以文库为模板,利用根据日本鳗鲡与欧洲鳗鲡 *GnRH* 基因序列设计的特异性引物,克隆得到两种花鳗鲡 *GnRH* 基因的 cDNA 序列,进一步证实了所构建文库 cDNA 的质量与应用价值。本文库的构建不仅可以保护我国二级保护动物花鳗鲡的宝贵基因资源,而且为今后开展花鳗鲡生长发育、生殖神经内分泌相关基因等研究奠定了基础。

促性腺激素释放激素是由下丘脑分泌的神经内分泌因子,它与脑垂体促性腺分泌细胞的特异性受体结合后刺激促性腺的产生与释放,起着调节生殖活动的作用<sup>[9,10]</sup>。至今为止,在脊椎动物中已经验证的 GnRH 至少有 16 种。不同种类的 GnRH 保守性较高,其中 1—4、6、9、10 位氨基酸残基相对保守,而 5、7、8 位氨基酸残基变异性较高<sup>[9—11]</sup>。White 根据 GnRH 的序列比较,把 GnRH 分为 I 型、II 型和 III

型三大类;其中 I 型 GnRH 是种特异的 GnRH,如 mGnRH (mammalian GnRH)、sbGnRH (seabream GnRH) 等;II 型 GnRH 主要分布在中脑,也称中脑型 GnRH,是一种在长期进化中非常保守的 cGnRH-II (chicken GnRH-II);III 型 GnRH 主要分布在端神经节,如在部分硬骨鱼中已经证实的 sGnRH (salmon GnRH) [11]。我们构建的进化树分析显示,不同鱼类的 GnRH 分为三大类群,完全支持了 White 的观点。进化分析还表明,花鳗鲡与日本鳗鲡独立聚为一类,而高等硬骨鱼的鲈形目、鲷形目、鲑形目、鲤形目聚为一大类群,再与鳗形目聚在一起,说明了鳗形目鱼类与鲈形目、鲷形目、鲑形目、鲤形目等高等硬骨鱼的亲源关系较远,支持了传统的鱼类学分类观点。

一种鱼类的脑至少可以分泌 2 种 GnRH,有些还可以产生 3 种 GnRH [9]。鳗鲡的脑中可产生 2 种类型的 GnRH (mGnRH 和 cGnRH-II) [12-14]。本研究克隆获得了花鳗鲡 2 种类型的 GnRH,再次证实鳗鲡属鱼类存在 mGnRH 和 cGnRH-II 两种类型的 GnRH。组织分布研究表明,mGnRH 在花鳗鲡中的组织分布广泛,而 cGnRH-II 只在大脑各区和性腺等中有表达。这与在日本鳗鲡的研究结果相似 [14],也与 sbGnRH 在伯氏朴丽鱼 *Haplochromis burtoni* 的大脑、心脏、肝脏、脾、肾脏、精巢等组织中有分布,而 cGnRH-II 只在精巢与大脑中有表达 [15];cGnRH-II 在金鱼 *Carassius auratus* 的精巢与卵巢中有分布等研究结果相似 [16]。对于 GnRH 的生理功能研究,以往报道主要对不同大脑区中的 GnRH 研究居多,而对性腺等外周组织中的 GnRH 研究较少。mGnRH 主要由下丘脑合成与分泌,通过 GnRH 受体的介导作用于垂体的促性腺激素细胞合成与分泌 GtH,进而调节性腺的发育与成熟。除此之外,它在大脑各区以及肝脏、心脏、肾脏、脾脏、肠、肌肉、脂肪等外周组织也有分布,说明它可能作为神经递质或神经调节因子参与神经、呼吸、免疫、消化、生长等生理调控。cGnRH-II 除了在中脑表达量较高外,在性腺也有较高的表达,说明 cGnRH-II 可能在性腺中以自分泌或旁分泌的方式参与性腺发育调控,其生理功能和调控机制还有待深入研究。为了能更好地理解两种 GnRH 在花鳗鲡神经内分泌中的作用,促进花鳗鲡资源保护、人工养殖与繁育,我们今后将继续开展两种 GnRH 在花鳗鲡中的细胞定位、基因表达调控、信号传导、遗传进化、体外表达及生理功能等方面的研究。

## 参考文献:

- [1] Miller M J, Mochioka N, Otake T, et al. Evidence of a spawning area of *Anguilla marmorata* in the western North Pacific [J]. *Marine Biology*, 2002, **140**: 809—814
- [2] Chen C. Developments and ecological characters of marbled eel [J]. *Journal of Peking Fisheries*, 2005, **1**: 54 [陈锤. 花鳗鲡的生态学特征与开发利用. 北京水产, 2005, **1**: 54]
- [3] Yuan Y, Min Z Y. The general biology of marbled eel (*Anguilla marmorata*) [J]. *Fisheries Science*, 2005, **24**(9): 29—31 [袁瑛, 闵志勇. 花鳗鲡的基础生物学研究. 水产科学, 2005, **24**(9): 29—31]
- [4] Shao Y Q, Zhang D C, Chu T F, et al. The construction of putuitary gland cDNA library of *Nibea coibor* [J]. *South China Fisheries Science*, 2006, **2**(6): 8—12 [邵艳卿, 张殿昌, 初天凤, 等. 浅色黄姑鱼脑垂体 cDNA 文库的构建. 南方水产, 2006, **2**(6): 8—12]
- [5] Zhang Y, Zhang W M, Li X, et al. Construction of cDNA library from *Epinephelus coioides* and cloning of a fatty acid binding protein (FABP) [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, **42**(2): 66—69 [张勇, 张为民, 李欣, 等. 石斑鱼卵巢 cDNA 文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42**(2): 66—69]
- [6] Fan L C, Xie J, Wang Y, et al. construction of oocyte cDNA libraries of gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp and cloning of their cyclin A<sub>1</sub> cDNAs [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **26**(4): 573—581 [樊迎春, 谢京, 汪洋, 等. 银鲫与彩鲫卵母细胞 cDNA 文库构建及周期蛋白 A<sub>1</sub> 的 cDNA 克隆. 水生生物学报, 2000, **26**(4): 573—581]
- [7] Yang F, He Z M, Zhan X Q, et al. Construction and identification of directional cDNA library from Chinese giant salamander *Andrias davidianus* liver [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, **50**(3): 475—478 [杨芳, 贺智敏, 詹显全, 等. 大鲵肝脏组织定向 cDNA 文库的构建及鉴定. 动物学报, 2004, **50**(3): 475—478]
- [8] He X J, Li S F. Construction of cDNA library from liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2005, **14**(3): 353—358 [何学军, 李思发. 尼罗罗非鱼肝 cDNA 文库的构建. 上海水产大学学报, 2005, **14**(3): 353—358]
- [9] Lin H R. Evolutionary aspects of the structures and functions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptors [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2004, **43**(6): 1—5 [林浩然. 促性腺激素释放激素结构与功能及其受体的进化发展. 中山大学学报(自然科学版), 2004, **43**(6): 1—5]
- [10] Fernald R D, White R B. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1999, **20**: 224—240
- [11] White R B, Fernald R D. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain [J]. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1998, **112**: 322—329

- [12] King J A, Dufour S, Fontaine Y A, *et al.* Chromatographic and immunological evidence for mammalian *GnRH* and chicken *GnRH* II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary [J]. *Peptides*, 1990, **11**:507—514
- [13] Dufour S, Montero M, Le B N, *et al.* Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) in the European eel, *Anguilla anguilla* [J]. *Fish Physiol. Biochem.*, 1993, **11**: 99—106
- [14] Okubo K, Suetake H, Aida K. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of *GnRH* [J]. *Zool. Sci.*, 1999, **16**: 471—478
- [15] White R B, Fernald R D. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, **112**:17—25
- [16] Yu K L, Sherwood N M, Peter R E. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Peptides*, 1988, **9**:625—630

## CONSTRUCTION OF BRAIN cDNA LIBRARIES AND MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *GNRH* GENE IN MARBLED EEL (*ANGUILLA MARMORATA*)

HUANG Hai<sup>1,2</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, LIU Xiao-Chun<sup>1</sup>, YIN Shao-Wu<sup>2</sup>, YANG Li-Ping<sup>1</sup>,  
ZHU Pei<sup>1</sup>, QI Xing-Zhu<sup>2</sup> and LIN Hao-Ran<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Biocontrol, Institute of Aquatic Economic Animals and Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275; 2. Key Laboratory of Tropical Biology Resources, Ministry of Education, College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228)

**Abstract:** Marbled eel (*Anguilla marmorata*) is the secondary protected animal in China. In order to save the genetic information of this rarity and clone the function genes on growth, development and reproduction, a cDNA library was constructed by Cloneminer™ kit from brain of marbled eel. The titer of the amplified cDNA library was  $4.3 \times 10^6$  cfu/mL, the total of recombinants was  $5.16 \times 10^7$  cfu, and the percentage of recombinant efficiency was about 99.6%, the exogenous inserts of the recombinants was from 0.43 kb to 3.2 kb and the average size was 1532 bp. These results showed that cDNA library had excellent quality. Two types of *GnRH* (*mGnRH* and *cGnRH-II*) cDNA sequences were isolated from cDNA library by PCR. Sequence analysis showed that *mGnRH* cDNA contained an open reading frame (ORF) of 276 bp and encoded 91 amino acid residues, which consisting of a 22-amino acid signal peptide precursor (1—22 amino acid residues), *mGnRH* decapeptide (23—32 amino acid residues), 3-amino acid signal processing site (33—35 amino acid residues), and a 56-amino acid *GnRH*-associated peptide (36—91 amino acid residues). *cGnRH-II* cDNA open reading frame (ORF) contained 264 bases encoded 87 amino acid residues, which consisting of a 24-amino acid signal peptide precursor (1—24 amino acid residues), *cGnRH-II* decapeptide (25—34 amino acid residues), 3-amino acid signal processing site (34—36 amino acid residues), and a 50-amino acid *GnRH*-associated peptide (37—87 amino acid residues). The homology analysis showed that the percentage of *mGnRH* and *cGnRH-II* precursor sequence identity with Japanese eel *Anguilla japonica* is 98%, with fishes of *Salmoniformes*, *Perciformes* and *Pleuronectiformes* is 73%—78%. However, it was relative low with fishes of *Cypriniformes* (63%—67%). Phylogenetic tree analysis ranked the fish *GnRH* as three distinct groups, *mGnRH* and *sbGnRH* group, *cGnRH-II* group and *sGnRH* group, respectively. Expression analysis by RT-PCR showed that *cGnRH-II* and *mGnRH* gene expression had no obvious differences between female and male marbled eel individuals, but *mGnRH* gene could be expressed in more tissues than *cGnRH-II*. *mGnRH* were detected in forebrain, midbrain, hindbrain, pituitary, hypothalamus, liver, heart, spleen, kidney, intestine, gill, ovary and testis, while expression of *cGnRH-II* was mainly limited to forebrain, midbrain, hindbrain, ovary and testis. The present work provided evidence of two *GnRH* in Marbled eel reproductive system and suggested an important role of *mGnRH* in reproduction.

**Key words:** Marbled eel (*Anguilla marmorata*); cDNA library; *GnRH*; Cloning; Gene expression