

黄鳝 cGnRH-II 的 cDNA 克隆与序列分析

方平^{1,2} 李英文^{2,3} 胡炜⁴ 诗华²

(1. 中国水产科学研究院, 北京 100038; 2. 西南农业大学水产学院, 重庆 400716; 3. 重庆师范大学重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 400047; 4. 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 是一个保守的十肽神经家族激素, 在脊椎动物的性腺发育和繁殖功能的维持方面起着重要的调控作用。本文通过运用 RACE 和 RT-PCR 方法, 从黄鳝脑组织中克隆得到 cGnRH-II cDNA 全序列, 其核苷酸序列长度为 617bp。该 cDNA 编码的 cGnRH-II 的前体氨基酸序列结构组成与其他物种的 cGnRH-II 前体结构一致, 其推导的蛋白前体长度为 83 个氨基酸, 包括一个信号肽、cGnRH-II 十肽和一个由蛋白水解位点 (Gly-Lys-Arg) 连接的 GnRH 联接肽, 其中信号肽和联接肽的长度分别为 21 和 49 个氨基酸。cGnRH-II 的氨基酸序列和其他相关物种 cGnRH-II 氨基酸序列比较结果显示, cGnRH-II cDNA 的蛋白编码区高度保守, 而非编码区的保守性程度很低。

关键词: 黄鳝; 促性腺激素释放激素; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: Q343.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)02-0259-06

促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 是下丘脑-垂体-性腺 (hypothalamic-pituitary-gonad, HPG) 轴的主要调控因子, 通过刺激垂体前叶合成与释放促性腺激素 (gonadotropin, GtH), 促性腺激素刺激性腺分泌出类固醇激素 (steroid hormone), 类固醇激素对整个性腺轴和繁殖周期调控起到反馈作用^[1]。因此, GnRH 在脊椎动物的性腺发育调控和繁殖功能的维持中起着重要的作用。

20 世纪 70 年代初, Matsuo 等^[2]和 Burgus 等^[3]分别从猪和绵羊下丘脑中发现 mGnRH (mammal GnRH, GnRH 最初被命名为促黄体素释放激素, LHRH), 迄今为止, 从原索动物到脊椎动物的诸多物种神经组织中, 已经发现有 16 种不同形式的 GnRH 存在^[4]。各种不同的 GnRH 的命名原则, 除了 mGnRH 外, 一般是以最先发现生物的名字的缩写加在该 GnRH 的前面^[5,6]。通过氨基酸序列的测定发现, GnRH 是一类保守的神经十肽家族激素, 这些 GnRH 的成熟、有活性的分子都具有非常相似的结构: 一条由 10 个氨基酸组成的多肽链, 其中 1, 4, 9, 10 位氨基酸十分保守; 而第 8 位氨基酸变动最大,

其次是第 5、7 和第 6 位^[7]。同时这些不同形式的 GnRH 也并非只是单一的存在于某一种类中, 而是有可能几种形式的 GnRH 同时存在于同一种类中。一般每种脊椎动物都有两种以上分子形式的 GnRH, 其中最保守的是 chicken GnRH-II (chicken II-type Gonadotropin-releasing hormone, cGnRH-II), 它随同其他分子形式的 GnRH 共同存在于大多数脊椎动物中, 存在于所有的有颌类包括人类中^[8]。

黄鳝 (*Monopterus albus*) 是我国常见的经济鱼类, 因其具有特殊的性逆转现象, 常用于淡水经济鱼类性别决定及其性逆转机制的研究。Zhou 等^[9]从黄鳝中分离出 SRY 相关基因, 并且通过 Southern 杂交, 证明了 SRY 基因是个保守的基因。刘利等^[10]克隆并鉴定分析了黄鳝 Sox9 基因, 进一步说明了 Sox9 基因在进化上是高度保守性。陶亚雄等^[11]给黄鳝注射鲑鱼促性腺激素释放激素类似物 (sGnRH-A) 成功的诱导黄鳝提前性逆转, 推测 GnRH 可能是黄鳝性逆转过程中一个关键的调节因子。在黄鳝性腺发育和性逆转的研究报道中, 关于 GnRH 的分子机理研究还没有文献报道。基于此, 本研究首次从黄鳝

收稿日期: 2005-03-15; 修订日期: 2006-05-04

基金项目: 中国科学院水生所淡水生态与生物技术国家重点实验室 (No. 2003-8) 开放课题项目; 重庆市农业局“鱼类人工繁殖基地建设”项目资助

作者简介: 方平 (1979—), 男, 甘肃兰州人; 硕士; 主要从事水产生物技术研究。E-mail: fanght0619@163.com

通讯作者: 李英文, E-mail: Liyw@swau.edu.cn, Tel/Fax: 023-65363535

体内克隆其 cGnRH-II 基因, 主要根据其他物种 cGnRH-II 序列设计基因特异性引物, 应用 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, cDNA 末端快速扩增) 技术, 成功获得了黄鳝 cGnRH-II cDNA 全序列, 为进一步研究 cGnRH-II 对黄鳝性逆转机制、下丘脑-垂体-性腺轴的协调作用和调控的分子机理奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验鱼和取材 黄鳝从水产市场购买, 体长约 25cm, 体重约 200g, 经活体解剖确定全部为雌性个体。鱼活体运回实验室, 迅速取出脑, 分离出下丘脑区称重 40mg 用于提取总 RNA。

1.2 黄鳝脑总 RNA 提取 脑组织在冰上充分匀浆后, 用上海华舜生物公司的组织小量 RNA 抽提试剂盒分离总 RNA, 操作步骤按照说明书进行。提取的总 RNA 经电泳和分光光度计的定性和定量检测后, 分装贮存于 -80℃ 冰箱。

1.3 黄鳝 cGnRH-II β RACE 扩增 根据 GenBank 发表的与黄鳝亲缘关系很近的鲈形目鱼类 cGnRH-II 基因 mRNA 序列, 进行同源序列比对, 分别设计基因特异性引物 cGn3-1: 5'-CAGCACTGGTCCCATGGTGGTA-3' 和 cGn3-2: 5'-GAATGCAGCTACTTGAGACCCG-AG-3', 以获得黄鳝 cGnRH-II 基因的 cDNA β 末端序列, 引物由上海生物工程有限责任公司合成。用于第一链 cDNA 合成的 Oligo(dT) 接头引物是 5'-CTGATCTAGAGGTACCGATCC(T) $_{20}$ -3', 特异接头引物 (adaptor primer, AP) 是 5'-CTGATCTAGAGGTACCGATCG-3'。3' 端的第一链 cDNA 合成按照 3' RACE 试剂盒 (TaKaRa) 说明书进行。3' 末端序列扩增的 PCR 扩增循环参数为: 94℃ 预变性 3min, 94℃, 1min, 55℃, 1min, 72℃, 1min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。取第一轮 PCR 产物, 用双蒸水稀释 20 倍, 按照上面程序扩增 1 μ L 稀释产物, 退火温度改为 60℃。

1.4 黄鳝 cGnRH-II β RACE 扩增 黄鳝 cGnRH-II 5' 端 cDNA 扩增采用 Invitrogen 公司的 GeneRacer Kit, cDNA 第一链合成和加尾等具体操作见试剂盒说明。根据已知黄鳝 cGnRH-II 3' RACE 产物的测序结果, 分别设计用于扩增 5' 端的基因特异性引物 cGn5-1: 5'-AGTATGCTCCTCTCTGGGGTCT-3' 和 cGn5-2: 5'-AAAGAGTCCAGCTCCCTCTGCG-3', 上游通用扩增引物 GeneRacer 5' 为 5'-CGACTGGAGCAGGACACTGA-3'。用基因特异性引物 cGn5-1 和通用扩增引物 GeneRacer 5' 进行第一轮 PCR 扩增; 再以此 PCR 产物的稀

释物 (稀释 100 倍) 为模板, 用基因特异性引物 cGn5-2 和通用扩增引物 GeneRacer 5' 进行巢式扩增, 以获得黄鳝 cGnRH-II cDNA 的 5' 端。第一次 PCR 退火温度为 55℃, 共 30 个循环, 第二次 PCR 退火温度为 58℃, 共 30 个循环, PCR 反应的其他条件同“1.3”。

1.5 亚克隆和测序 所有 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离, 采用胶回收试剂盒 (上海华舜生物公司) 纯化特异片段, 然后将纯化片段克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa), 具体操作按照说明书进行。DNA 测序由上海博亚生物公司完成。用 Vector NTI 9.0 序列分析软件对测序结果进行整理和比较分析。

2 结果

2.1 RACE 扩增结果

运用引物 cGn3-1 和 AP, cGn3-2 和 AP 扩增 cGnRH-II cDNA 编码区 3' 末端得到约 400bp 和 300bp 的特异片段, 测序结果表明引物 cGn3-1 和 AP 扩增片段长度为 385bp, 巢式引物 cGn3-2 和 AP 扩增片段长度为 286bp。cGn3-2 和 AP 扩增片段序列包含在 cGn3-1 和 AP 扩增片段当中。运用引物 cGn5-1 和 GeneRacer 5', 巢式引物 cGn5-2 和 GeneRacer 5' 扩增 cGnRH-II cDNA 编码区 5' 端, cGn5-1 和 GeneRacer 5' 用于第一次 PCR 扩增, 未得到非常明亮的特异性条带, 将第一次 PCR 扩增产物稀释后作为模板, 用巢式引物 cGn5-2 和 GeneRacer 5' 进行巢式扩增, 结果得到约 300bp 的特异性片段, 测序结果表明 cGn5-2 和 GeneRacer 5' 的巢式扩增产物长度为 328bp。

根据 cGnRH-II 3' RACE 和 5' RACE 结果分析, 3' RACE 扩增的 385bp cDNA 片段与 5' RACE 获得的 328bp cDNA 片段的重叠区序列完全一致, 拼接得到包括完整编码区的 cDNA 长度为 617bp, 根据 3' RACE 和 5' RACE 结果设计两端特异性引物进行全长扩增, 扩增结果与前面得到的结果完全一致。通过 BLAST 分析发现它与很多生物的 cGnRH-II 基因在编码区上具有较高的相似性, 说明本研究克隆的基因确实是 cGnRH-II 家族中的成员。和部分已报道的 cGnRH-II 前体氨基酸进行序列比较发现, 黄鳝 cGnRH-II 前体氨基酸与舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[12]、条纹狼鲈 (*Marone saxatilis*)^[13]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[14]、金头鲷 (*Sparus aurata*)^[15] 等鲈形目鱼类 cGnRH-II 前体氨基酸之间的相似性很高, 分别为 86%、85%、88%、86%, 与其他硬骨鱼类如鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[16]、青 (*Oryzias latipes*)^[17]、虹鳟 (*rainbow trout*)^[18]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[19]、拟鲤

(*Rutilus rutilus*)^[20] 的同源性分别为 68%、77%、75%、70%、71%，而与爬行纲的斑脸虎 (*Eublepharis macularius*)^[21]、两栖纲的牛蛙 (*Rana catesbeiana*)^[22] 和哺乳纲的人 (*Homo sapiens*)^[23] 同源性则比较低，均

低于 65%，分别是 53%、63%、61%。该 cDNA 序列已被 GenBank 数据库接受，注册号为 AY786183，cDNA 全序列及其推导的氨基酸序列见图 1。

1	AGAGAATCTTTACAGTAAAAACCTGTGAAACCGTGAGATAOCTTTAGAACTGGTCTACT	60
61	GAGGGAAAAGCAGACTGCACTTCTGGAGAGACGTTAAGGGACACCAGTGCCAAAAAAGTT	120
121	GAGTTTAGACTAAGATTTCCTAAAGCAGGTCAAACAGCAGGTGGAATATGATTTCGGCTG	180
1		M...I...R...L... 4
181	GTCTTGCTGCTGGGGCTOCTTCTATGTGTGGGGGTTGAGCTGTCCGGGCCAGCACTGG	240
5	V L L L L G L L L C V G V Q L S G A Q H W	24
241	TCCATGGCTGGTATCCTGGTGGCAAGAGGGAGCTGGAATCTTTCACATCAGAGATT	300
25	S H G W Y P G G K R E L D S F P T S E I	44
301	TCAGGGGAGATTAACTGTGTGAGGCAGGGGAATGCAGCTAOCCTGAGACCCAGAGGAGG	360
45	S G E I N L C E A G E C S Y L R P Q R R	64
361	AGCATACTCAGAAGCATTCCTTTGAATGTATTAGCCAGAGAGCTCCAGAAGAGGAAGTGA	420
65	S I L R S I L L N V L A R E L Q K R K *	83
421	CAGCTTTCCACCTACACTGCTTTTCTTCTAGTGACCTCTTTATCATGGCATGAATCA	480
481	ACTTCATGCCGATCCTCTGATCTTGTGCATTTGTTTCAGTAAACTGTTTTTCATGGTTTC	540
541	TCTTTGTGGCGCAGAAATATTGAAGTTACAATATCTCATAATAAAGTATCTATTTTGATA	600
601	CTAAAAAATAAAAAAATA	617

图 1 黄鳍 cGnRH- II 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence encoding the chicken-II-type Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor of rice field eel and the deduced amino acid sequence
氨基酸序列位于核苷酸序列下面。起始密码子，联接肽和终止密码子用下划线表示。信号肽和 AATAAA 序列用下划线虚线表示，十肽区和蛋白水解位点用方框表示

The amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The start codon, associated peptide and stop codon are underlined. Signal peptide and AATAAA sequence in the 3'-untranslated region are underlined by broken line. The decapeptide coding region and proteolytic processing are boxed

2.2 序列分析

根据图 1 的核苷酸序列及预测的氨基酸序列可以看出，黄鳍 cGnRH- II 的 cDNA 全长 617bp，包括一个 5' 非编码区序列（长度为 168bp）、一个包括编码 83 个氨基酸的开放阅读框、TGA 终止密码子和一个包括 poly(A) 信号的 3' 非编码区。编码区核苷酸长度为 249bp，共编码 83 个氨基酸，是由信号肽（21 个氨基酸）、成熟肽（10 个氨基酸）、三肽加工位点和联接肽（49 个氨基酸）组成。

2.3 同源性比较及系统分析

从 NCBI 上查找到其他物种的 cGnRH- II 序列，现已知在哺乳动物、爬行动物、两栖动物和鱼类中都已经克隆出了 cGnRH- II cDNA 序列，利用 Vector NTI 9.0 分析软件，分别选择各个物种比较有代表性种类的 cGnRH- II 序列，与本试验得到的 cGnRH- II 序列进行氨基酸同源性序列比对（见图 2），分析各个物种 cGnRH- II 序列的相似性。

运用 Vector NTI 9.0 序列分析软件，根据所选择的 cGnRH- II 的氨基酸序列进行系统进化树分析，从图中可以看出，黄鳍的 cGnRH- II 氨基酸序列与鲈形目鱼类的相似性比较高。结果见图 3。

3 讨 论

本研究从黄鳍中克隆了 cGnRH- II 的 cDNA 全长序列，该序列编码的前体蛋白有 83 个氨基酸，包括信号肽、cGnRH- II 成熟十肽和一个由蛋白水解位点（Gly-Lys-Arg）连接起来的 GnRH 促性腺激素释放激素联接肽（GnRH-associated peptide, GAP），其基本结构和从其他脊椎动物中提取的 GnRH 神经肽家族成员的基本结构一致^[24]，表明黄鳍 cGnRH- II 基因和其他类型的 GnRH 基因可能有共同的祖先起源。迄今为止发现的 16 种 GnRH 都有相同的分子结构，其特点均由 4 个外显子组成。其中，第 2 个外显子编码信号肽、一个蛋白水解位点和 GnRH 联接肽的

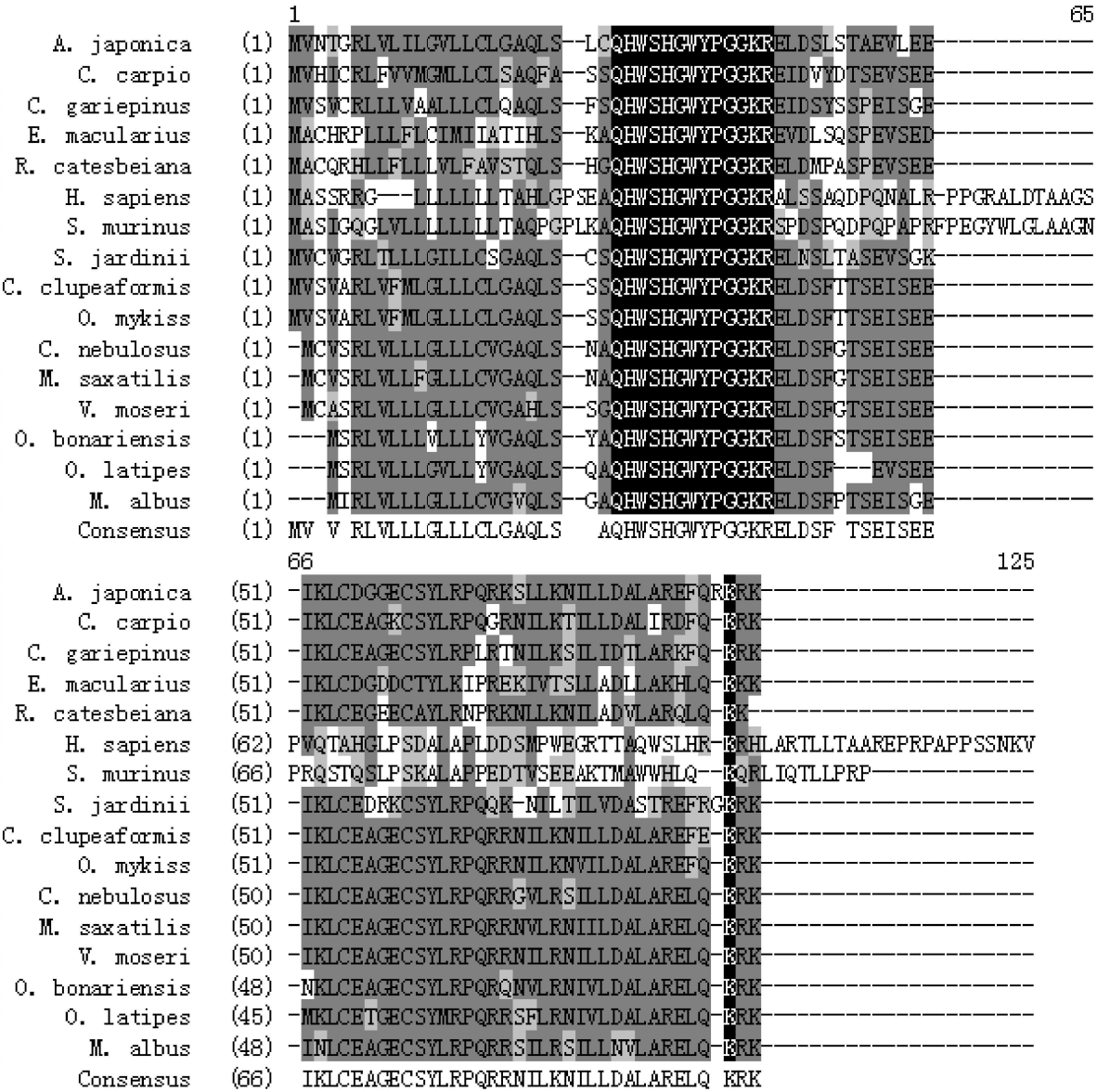


图 2 由黄鲶 cGnRH- II 推断的氨基酸序列与其他物种的比较结果

Fig. 2 Comparison of amino acid sequence deduced from cGnRH- II cDNA of rice field eel with some similar protein sequences
灰色阴影区表示氨基酸相似区, 黑色阴影表示完全相似区

A. japonica, 日本鳗鲡, BAA83598; *C. carpio*, 鲤鱼, AA089186; *C. gariepinus*, 北非鲈, CAA54969; *E. macularius*, 斑鳃虎, BAC99084; *R. catesbeiana*, 牛蛙, AAL05971; *H. sapiens*, 人, NP_001492; *S. murinus*, 鼠, 097686; *S. jardinii*, 澳洲鲷, BAB72183; *C. clupearformis*, 鲱形白鲑, AAP57219; *O. mykiss*, 虹鳟, AAF08687; *C. nebulosus*, 云纹犬牙石首鱼, AAV74402; *M. saxatilis*, 条纹狼鲈, 073811; *V. moseri*, 条斑星鲈, BAB83983; *O. bonariensis*, 牙银汉鱼, AAU94307; *O. latipes*, 青 99DGC9.

Regions of moderate similarity are indicated by the gray shade. The highly conserved GnRH decapeptide sequence is indicated by the black shade

一部分, 该外显子相当保守, 第三个外显子编码 GnRH 联接肽的其余部分。第 1、第 3 和第 4 处外显子不像第 2 外显子那样保守, 而 5' 非翻译区则变化很大。在许多脊椎动物种类中都有两种或多种 GnRH, 而 cGnRH- II 是最普遍具有的类型。这表明最早的脊椎动物有一个基因复制, 而 cGnRH- II 在脊椎动物进化过程中是高度保守的^[25]。

从 cGnRH- II 相似性角度分析表明, cGnRH- II 分子高度保守并且分布在所有的脊椎动物类群, 包括低等哺乳动物, 很可能是一个比较古老的 GnRH 分子。将几种代表不同脊椎动物类群的 cGnRH- II 前体氨基酸序列比较发现: cGnRH- II 前体的成熟十肽和蛋白水解位点是完全一致的, 而信号肽和联接肽有较大的变异。因此脊椎动物在长期的自然选择压

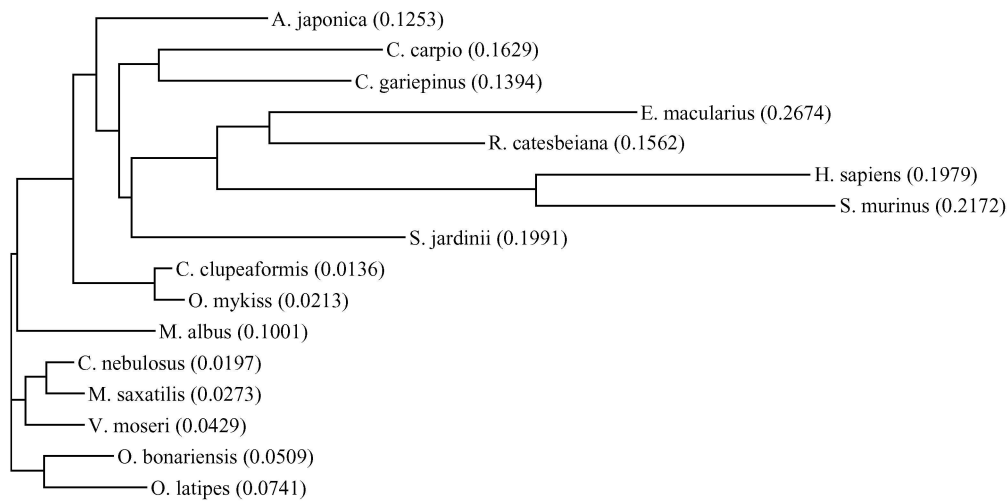


图 3 黄鳝与其他物种 cGnRH- II 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on cGnRH- II deduced amino acids of rice field eel and other species
进化树由 Vector NTI 9.0 序列分析软件生成(括号的数值是表示序列间相对差异程度)

力条件下, cGnRH- II cDNA 的编码特点、cGnRH- II 成熟肽和蛋白水解位点序列十分保守,而在不同的进化分支脊椎动物之间, cGnRH- II 前体信号肽和 GAP 的氨基酸序列相似性大大降低。由此可以推测, cGnRH- II 在长期的进化适应过程中,在不同分类地位的物种中其功能也可能发生相应的变化。迄今为止,对于 cGnRH- II 在生物体中的确切功能仍然不是很清楚,仅仅只推测 cGnRH- II 十肽对刺激垂体前叶释放促性腺激素起一定的作用,在黄鳝的性腺发育和性逆转方面起协调作用,但其主要功能可能还是起神经递质或神经调节剂的作用^[26]。

致谢:

实验完成过程得到西南农业大学农学与生命科学院柴友荣研究员的大力帮助,特此致谢!

参考文献:

[1] Amano M, Urano A, Aida K. Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain [J]. *Zool Sci*, 1997, **14**: 1—14

[2] Matsuo H, Baba Y, Nair R M G, *et al.* Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971, **43**: 1334—1339

[3] Burgus R, Bucher M, Amoss N. Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69**: 278—282

[4] Yamamoto N. Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts [J]. *Anat Sci Internat*, 2003, **78**: 139—155

[5] Fernald R, White R B. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure and functions [J]. *Front. Neuro.*, 1999, **20**:

224—240

[6] Somoza G M, Miranda L A, Stroh-Mazzulla P. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains [J]. *Cell Mol. Neurobiol.*, 2002, **22**(5/ 6): 589—609

[7] Lin H R. The structural variants and functional diversity of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates [J]. *Acta Zoological Sinica*, 1998, **44**(2): 226—234 [林浩然. 脊椎动物促性腺激素释放激素的分子结构变异型和功能多样性. 动物学报, 1998, **44**(2): 226—234]

[8] White R B, Eisen H A, Kasten T L, *et al.* Second gene for Gonadotropin-releasing hormone in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 305—309

[9] Zhou R J, Cheng H H, Zhang Q Y, *et al.* SRY-related genes in the genome of the rice field eel (*Monopterus albus*) [J]. *Genet. Sel. Evol.*, 2002, **34**: 129—137

[10] Liu L, Guo Y Q, Zhou R J. The cloning and verification of the Sox 9 gene of the rice field eel [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, **28**(6): 535—539 [刘利, 郭一清, 周荣家. 黄鳝 Sox9 基因的克隆及其鉴定分析. 遗传学报, 2001, **28**(6): 535—539]

[11] Tao Y X, Lin H R. Effects of exogenous hormones on serum steroid hormone in female ricefield eel (*Monopterus albus*) [J]. *Acta Zoological Sinica*, 1993, **39**(9): 315—321 [陶亚雄, 林浩然. 外源激素对雄性黄鳝血清类固醇激素的影响. 动物学报, 1993, **39**(9): 315—321]

[12] Gonzalez-Martinez D, Madgou T, Zmora N, *et al.* Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *J Comp Neurol*, 2001, **429**(1): 144—155

[13] Chow M M, Kight K E, Gothilf Y, *et al.* Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and cGnRH- II genes from the striped bass, *Morone saxatilis* [J]. *J Mol Endocrinol*, 1998, **21**(3): 277—289

[14] Parhar I S, Ogawa S, Hamada T, *et al.* Single-cell real-time quanti-

- tative polymerase chain reaction of immunofluorescently identified neurons of gonadotropin-releasing hormone subtypes in cichlid fish [J]. *Endocrinology*, 2003, **144**(8): 3297—3300
- [15] Holland M C, Gothilf Y, Meiri I, *et al.* Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, **112**(3): 394—405
- [16] Okubo K, Suetake H, Aida K. A splicing variant for the pre-mammalian gonadotropin-releasing hormone (pre-mGnRH) mRNA is present in the brain and various peripheral tissues of the Japanese eel [J]. *Zool Sci*, 1999, **16**: 645—651
- [17] Okubo K, Aida K. Gonadotropin-releasing hormone gene products downregulate the expression of their neighboring genes that encode protein tyrosine phosphatases alpha and epsilon [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **312**: 531—536
- [18] Von S K R, Harrower W L, Sherwood N M. Regulation and expression of gonadotropin-releasing hormone in salmon embryo and gonad [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, **157**(1—2): 41—54
- [19] Teven C, Lehnen N, Kight K, *et al.* Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2003, **133**(1): 27—37
- [20] Penlington M C, Williams M A, Sumpter J P, *et al.* Isolation and characterisation of mRNA encoding the salmon- and chicken-II type gonadotropin-releasing hormones in the teleost fish *Rutilus rutilus* (Cyprinidae) [J]. *J Mol Endocrinol*, 1997, **19**(3): 337—346
- [21] Ikemoto T, Park M K. Identification and characterization of the reptilian GnRH-II gene in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*, and its evolutionary considerations [J]. *Gene*, 2003, **316**: 157—165
- [22] Wang L, Yoo M S, Kang H M, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs encoding the GnRH1 and GnRH2 precursors from bullfrog (*Rana catesbeiana*) [J]. *J Exp Zool*, 2001, **289**(3): 190—201
- [23] Limonta P, Moretti R M, Marelli M M, *et al.* The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2003, **24**(4): 279—295
- [24] Gothilf Y, Elizur A, Chow M, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1995, **4**(1): 27—35
- [25] Dubois E A, Zandbergen M A, Peute H, *et al.* Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates [J]. *Brain Res Bull*, 2002, **57**: 413—418
- [26] Lin X W, Otto Carla J, Peter R E. Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin hormone-releasing hormone and somatostatin [J]. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 1998, **119**: 375—388

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF cDNA ENCODING cGnRH-II FROM RICE FIELD EEL (*MONOPTERUS ALBUS*)

FANG Ping^{1,2}, LI Ying-Wen^{2,3}, HU Wei⁴ and DING Shi-Hua²

(1. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039; 2. College of Fisheries Science, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716;

3. The Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 400047; 4. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is a conserved neural decapeptide that regulates the development and maintenance of reproductive function in vertebrate. The cDNA encoding the [His⁵Trp⁷Tyr⁸] gonadotropin-releasing hormone (chicken-II-type GnRH, cGnRH-II) precursor from the brain of rice field eel (*Monopterus albus*) has been isolated and sequenced by using reverse transcription and rapid amplification of cDNA ends (RACE). From the subcloning and sequence analysis of 3'-RACE and 5'-RACE product, the complete sequence of the cDNA encoding its cGnRH-II peptide was identified and determined to be 617 bp in length. The structure of the encoded peptide is identical to all other cGnRH-II reported to date. The deduced peptide is composed of a signal peptide (SP), a GnRH decapeptide and a GnRH-associated peptide (GAP) which is connected to GnRH by a Gly-Lys-Arg sequence. The cGnRH-II cDNA encoded SP of 21 amino acids and GAP of 49 amino acids. The amino acid sequence of cGnRH-II in combining with the Gly-Lys-Arg sequence is highly conserved during evolution when compared with the corresponding regions of other GnRH precursors. However, the untranslated region of GnRH are markedly divergent in nucleotide sequences.

Key words: *Monopterus albus*; GnRH (Gonadotropin-releasing hormone); cDNA cloning; Sequence Analysis