

于善坤, 张俊玲, 施志仪, 等. 牙鲆 *kiss2* 基因的分子鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 176-183.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.027

牙鲆 *kiss2* 基因的分子鉴定及表达分析

于善坤, 张俊玲, 施志仪, 付元帅, 张红梅

(上海海洋大学水产与生命学院/农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为克隆与牙鲆生殖相关的神经内分泌因子 *kiss2* 基因, 并检测该基因在牙鲆成体不同组织及早期不同发育阶段的表达变化, 本研究采用 Trizol 法提取牙鲆成鱼各组织及早期不同发育阶段样品总 RNA; 参照其他物种的 *kiss2* cDNA 序列, 设计并合成 *kiss2* 引物进行 PCR 扩增; 运用实时荧光定量 PCR 检测 *kiss2* 基因在牙鲆成鱼各组织及早期不同发育阶段的表达情况。结果成功地获得长度为 449 bp 的牙鲆 *kiss2* cDNA 序列, 其中编码区序列为 366 bp, 编码 121 个氨基酸。在该序列中发现了高度保守的“FNYNPLTLRF”序列, 此序列可以调节促性腺激素释放激素和黄体生成素的合成与释放。定量 PCR 结果显示, 牙鲆 *kiss2* 基因在脑组织中的表达量最高, 在卵巢和精巢中也均有表达; 牙鲆 *kiss2* 基因在胚胎阶段表达量相对较低, 而在孵化后第 7 d 其表达量显著增高, 且在孵化后的第 29 d 达到高峰。说明牙鲆 *kiss2* 基因具有明显的时期和组织差异性表达, 其在牙鲆脑中的丰富表达及在精巢和卵巢中的表达表明该基因可能在牙鲆神经系统与生殖中发挥重要作用。

关键词: 牙鲆; *kiss2*; 组织分布; 发育表达

中图分类号: S 917

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)01-0176-08

Molecular characterization and expression patterns of *kiss2* gene in Japanese flounder

YU Shan-kun, ZHANG Jun-ling, SHI Zhi-yi, FU Yuan-shuai, ZHANG Hong-mei

(Key laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture/College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: A reproduction-related neuroendocrine gene, *kiss2*, was cloned and its expression changes in different adult tissues and developmental stages were examined by real-time quantitative PCR in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). A cDNA sequence of 449 bp was obtained, which included an open reading frame (ORF) of 366 bp encoding a polypeptide of 121 amino acids. A highly conserved Kisspeptin-10 region “FNYNPLTLRF”, a functional peptide stimulating the synthesis and release of GnRH/LH, was found. The most abundant expression of *kiss2* was detected in brain. The *kiss2* was also expressed in gonad including ovary and testis. During embryonic and larval development, *kiss2* showed low levels of expression. After 7-d hatching, the expression of *kiss2* markedly increased and reached a peak at 29 d. These results

demonstrated that the *kiss2* gene exhibits stage- and tissue-specific expression. Its expressions in brain and the gonad suggest that the *kiss2* gene might be involved in nervous system and reproductive development of Japanese flounder.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *kiss2*; tissue distribution; developmental expression

收稿日期: 2015-05-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30271017); 国家自然科学基金基金青年项目(41306128)

作者简介: 于善坤(1989-), 男, 河北人, 硕士研究生, 研究方向为鱼类发育生物学。(E-mail) ysk198901@foxmail.com

通讯作者: 施志仪, (E-mail) zyshi@shou.edu.cn

Kisspeptin 系统的鉴定及其生理学作用的特性描述是神经内分泌学的一项重大突破,是脊椎动物生殖研究领域的一场新革命^[1-3]。Kisspeptin 是 2001 年发现的一种肽类激素,由 *kiss1* 基因编码,最初发现其具有抑制肿瘤转移的作用^[4-5]。然而在 2003 年,大量的研究报道称 Kisspeptin 的受体 *Gpr54* 基因突变的人和小鼠都表现出了生殖功能的损伤^[6-7]。随后发现,*kiss1* 基因敲除的小鼠也表现出了类似的损伤^[8]。这些研究结果表明 Kisspeptin 系统与哺乳动物的生殖调控密切相关。后来陆续发现,该系统可以调节哺乳类动物促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元的活性,影响性成熟的形成^[9]。并通过对下丘脑-垂体-性腺(Hypothalamic - pituitary - gonadal, HGP)轴的调控影响青春期的启动。另外,该系统还可影响包括人类在内的啮齿类、家畜及灵长类动物促性腺激素的分泌^[10-13]。

迄今为止,对非哺乳类动物,尤其是硬骨鱼类 kisspeptin 系统的研究还很少。最近的研究发现一些鱼类^[14-17]存在 2 种 *kiss* 基因,即 *kiss1* 和 *kiss2*,其中包括七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳞(*Oryzias latipes*)、金鱼(*Carassius auratus*)、鲫鱼(*Carassius auratus*)和鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)以及两栖动物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)。*kiss2* 基因在诱导鲈鱼促性腺激素表达方面比 *kiss1* 作用大;斑马鱼脑部原位杂交结果也表明 *kiss2* 与生殖调控有关,而 *kiss1* 基因则可能与环境感知等其他方面的功能有关。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是一种重要的海水养殖经济鱼类,其雌鱼的生长速度明显快于雄鱼。在幼体阶段,牙鲆的性别易受环境因子的影响,如温度、pH 值、密度和光照都可影响牙鲆的性别分化^[18-19]。大量研究结果表明 Kisspeptin 系统与鱼类 HGP 轴的活化有关,但是关于其是否参与鱼类性别分化还未见报道。因此本研究克隆了牙鲆 *kiss2* 基因,并进行序列分析比较,运用定量 PCR 方法检测了 *kiss2* 基因在牙鲆早期发育阶段和成体组织中的表达,期望为进一步研究 Kisspeptin 系统在牙鲆生殖调控中的作用积累材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用牙鲆胚胎和仔鱼采集于中国水产科学研究院北戴河中心实验站,养殖水温控制在 $(16.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$;试验用牙鲆成鱼购自上海市铜川路水产品市场。

1.2 样品采集

根据孙朝徽等^[20]对牙鲆胚胎发育时期的划分,对牙鲆胚胎和仔鱼进行取样,分别采集未受精卵(0 h),受精卵(0.5 h),原肠胚期(26 h),心跳期(71 h),孵化后 3 d、7 d、9 d、14 d、17 d、20 d、23 d、29 d、36 d 和 41 d 仔鱼,各时期样品平行取样 3 组,每组 15~30 个体。同时解剖成鱼 3 尾,取其脑、鳃、肌肉、心脏、肝脏、胃、肾、肠、性腺组织。各样品立即在液氮稍冻存,然后置于 $-80 ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取与鉴定 利用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, USA)对牙鲆胚胎、仔鱼及成鱼组织样品进行总 RNA 的提取,并用 DNA 酶处理 1 h,除去各样品总 RNA 中的基因组 DNA 污染。采用分光光度计(NANODROP 2000C, USA)和琼脂糖凝胶电泳检测所提取的总 RNA 的质量和浓度。

1.3.2 牙鲆 *kiss2* 基因的克隆 根据已知物种的同源基因,设计 *kiss-F* 和 *kiss-R* 引物。取 $2 \mu\text{g}$ 的脑组织 RNA 在 M-MLV 逆转录酶(Promega, USA)的作用下合成 cDNA 的第 1 条链。以此为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为: $1 \mu\text{l}$ 的 cDNA 模板, $2.0 \mu\text{l}$ 的 $10\times \text{Ex Taq}$ buffer, $1.6 \mu\text{l}$ 的 dNTP (2.5 mmol/L), $1 \mu\text{l}$ 的上游和下游引物($10 \mu\text{mol/L}$), 2.5 U 的 *Ex Taq*[®] DNA 聚合酶(TaKaRa, Japan),最后加水至 $20 \mu\text{l}$ 。反应条件为 $94 ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 ^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $59 ^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 ^\circ\text{C}$ 延伸 20 s, 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,并将其连接到 pMD[®] 19-T 载体上, $16 ^\circ\text{C}$ 连接过夜后,转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中,经蓝白斑筛选,挑选阳性克隆抽提质粒后送上海生工生物工程有限公司测序。

为得到牙鲆 *kiss2* 基因的全部编码区序列,根据上述所得序列设计 3'-RACE 引物(表 1),进行 3'-RACE PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,割胶回收纯化目的片段,进行连接、转化、克

隆和测序。

1.3.3 序列分析 所得的 cDNA 序列用 DNAMAN 软件进行拼接,开放阅读框用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行分析。用 BioEdit 软件进行不同物种 *kiss2* 基因编码的氨基酸序列的比对。用 MEGA 5.1 软件中的 NJ (Neighbor-joining) 法进行系统进化树的构建,预测氨基酸的理化性质通过 ExPASy (<http://web.expasy.org/prot->

param/) 来分析。

1.3.4 荧光实时定量 PCR 取上述各 RNA 样品分别合成 cDNA 的第 1 条链,所得产物 10 倍稀释后用于荧光定量 PCR。所用引物采用 Primer 5.0 设计,应用普通 PCR 确认是否有引物二聚体和其他非特异性扩增片段的产生,选择特异性强的引物对用于定量 PCR,选用引物分别为 *qkiss*-F 和 *qkiss*-R (表 1);内参基因为 *18s*,引物分别为 *18s*-F 和 *18s*-R (表 1)。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

引物种类	引物名称	引物序列 (5'→3')
部分片段扩增引物	<i>kiss</i> -F	ATGAGGCTYGTGGCTCTG
	<i>kiss</i> -R	AGGCACCTCCAGTTCYCG
3'-RACE 引物	3'-RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
	3'-RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
	3'- <i>kiss</i>	CGGCACAAAGGACACAAGCAA
	3'- <i>kiss</i> -nest	TCGCTTTGGGAAACGCTACAT
定量引物	<i>qkiss</i> -F	CGGCACAAAGGACACAAGCAA
	<i>qkiss</i> -R	TCGTGGGAACAGAGAAAGGGG
	<i>18s</i> -F	CTTAGTTGCTGGAGCGATTTC
	<i>18s</i> -R	CTTAGTTGCTGGAGCGATTTC

简并碱基: Y=(C/T); F:上游引物; R:下游引物。

首先进行目的基因和内参基因的标准曲线扩增,Real-time PCR 在 CFX96™ PCR 仪 (Bio-Rad) 上进行。PCR 反应体系为 20 μ l,包括 1 μ l 的 10 倍梯度稀释的 cDNA,0.4 μ l 的基因上下游引物,10 μ l 的 2 \times FastStart Essential DNA Green Master (Roche)。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,61 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,并随之采集荧光,40 个循环;随后进行溶解曲线的扩增。内参基因和目的基因的相应扩增效率均为 95%~100%,*R* 值均大于 0.99,且目的基因和内参基因的 *M* 值相差小于 0.1。随后进行所有样品的定量检测,PCR 反应体系和条件同上,试验设 3 次重复。此外,各样品的 Real-time PCR 也同时进行。

1.3.5 统计分析 牙鲆胚胎和仔鱼不同发育时期以及成鱼各组织的 *kiss2* 的相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。其数值用平均值 \pm 标准误差表示,

n=3。统计分析采用 SPSS17.0 软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA),使用 Dunnett's T3 test 进行比较。

2 结果与分析

2.1 牙鲆 *kiss2* cDNA 的克隆及序列分析

以牙鲆脑组织总 RNA 为模板,首先进行 *kiss2* 部分 cDNA 片段的 PCR 扩增,得到 1 段长为 366 bp 的序列;然后通过 3'-RACE PCR 得到长为 261 bp 的序列。经过拼接,得到长度为 449 bp 的牙鲆 *kiss2* 序列 (图 1)。该序列包括 1 段 83 bp 的 3'非翻译区和 1 段编码 121 个氨基酸残基的 366 bp 开放阅读框。经序列分析发现其信号肽有 19 个氨基酸残基,在 PloyA 尾部上游 14 bp 处有多聚腺苷酸化信号 (AATAAA);其包含的 Kisspeptin-10 片段氨基酸序列为 "FNYNPLTLRF",序列附近有一个蛋白水解切

割位点(GKR)。经预测,*kiss2* 蛋白的理论等电点为 10.20,分子量为13 700。通过 BioEdit 软件分析,在

其第 5 和第 15 个氨基酸之间有一个典型的疏水性区域。

```

1  ATGAGGCTCGTGGCTCTGGCTGTGGTGTGTGGCCTGATCGTCGGCCAGGATGCAGGGAGTGAGGGGAAGCTCGGCCAGGATATGGCTCG
   M R L V A L A V V C G L I V Q D A G S E G E A R P G Y G S
91  GCACAAAGGACACAAGCAACAGGATCTGCTCTCTGCGCTCAGGG AGGAGGACTGAGGCCGACCTGGTGGAGGAGCCAGCCTGTGTCTC
   A Q R T Q A T G S V L S A L R R R T E A D L V E E P S L C L
181 TCCCTGAGGGAGAACGAGGAGCAGAAGCAGCTGCTGTGCAACGACCGCAGGAGTAAATTCAACTACAACCCGTTAACCTTCGCTTTGGG
   S L R E N E E Q K Q L L C N D R R S K F N Y N P L T L R F
271  AAACGCTACATGTACAGGAGGGCAGTCAAAAGACCCGGACAAATAATTCTTCCCTCTTCTGTTCCACGAGAACTGGAGGTGCCT
   K R Y M Y R R A V K R A R T N N F F P L S L F P R E L E V P
361  ACCTGAGAGAGATGAGTCTTTCCGTATGTGTGTACAGATCTCATCATGTTCCCTGAATAAACTTTTATACCTAGAAAAA 449
   T *

```

—表示信号肽; * 表示终止密码子; □表示加尾信号和 Kisspeptin-10 序列; ◇表示蛋白水解切割位点。

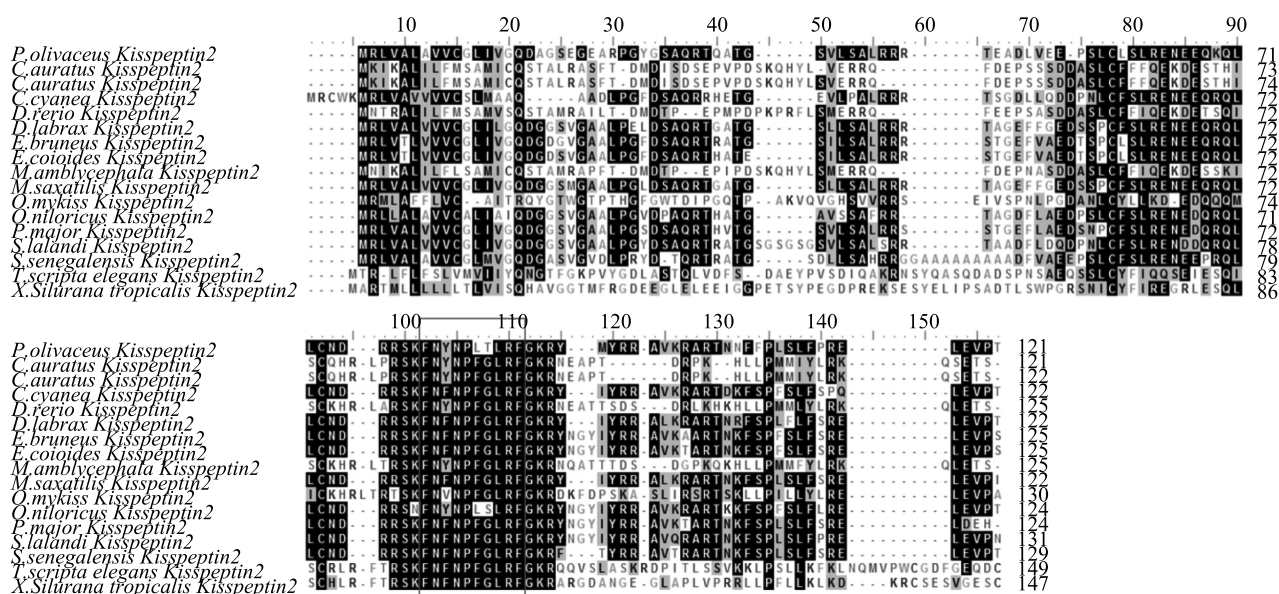
图1 牙鲆 *kiss2* 基因序列及其推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Japanese flounder *kiss2*

2.2 牙鲆 *kiss2* 同源性比对及系统进化树构建

通过氨基酸序列比对发现,牙鲆 *kiss2* 与条纹鲈 (*Morone saxatilis*) 的同源性最高 (76%), 其次是欧洲海鲈 (*Dicentrarchus labrax*) (74%)、带点石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (72%)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (70%) 和塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*)

(69%)。而其与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、鲫鱼 (*Casrassius auratus*) 的同源性仅为 34%、28% 和 25%, 与巴西乌龟 (*Trachemys scripta elegans*) 和非洲爪蟾 (*Xenopus silurana tropicalis*) 的同源性仅为 24%。然而, Kisspeptin-10 片段区域在脊椎动物中高度保守 (图 2)。



颜色不同表示保守性不同。

图2 牙鲆 *kiss2* 氨基酸序列比对分析

Fig.2 Alignment of amino acid sequences of *kiss2* from Japanese flounder and other species

经 NJ 系统进化树分析,脊椎动物 Kisspeptin 分为 2 支,即 Kisspeptin-1 和 Kisspeptin-2。牙鲈 Kisspeptin 与脊椎动物 Kisspeptin-2 聚为 1 支(图 3)。

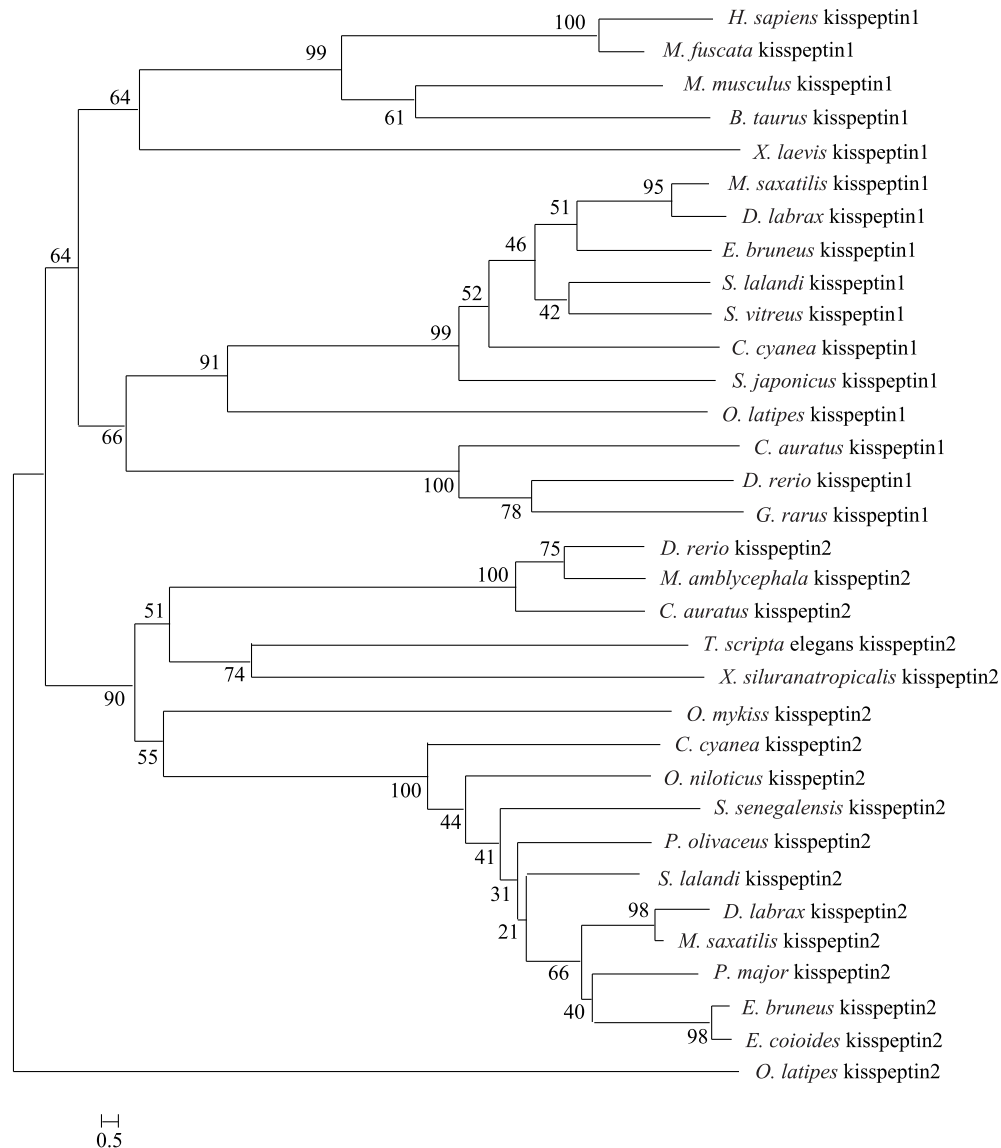


图 3 *kiss1* 和 *kiss2* 编码的氨基酸序列构建的系统进化树

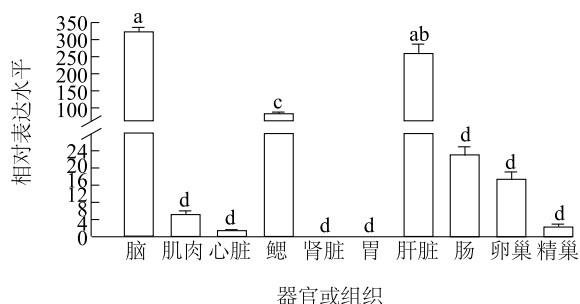
Fig.3 Phylogenetic analysis of vertebrates based on amino acid sequences of *kiss1* and *kiss2* genes

2.3 牙鲈 *kiss2* 基因在成体组织及胚胎、仔鱼不同发育阶段中的表达

如图 4 显示,在牙鲈各个组织中,*kiss2* 基因在脑中的表达量最高,其次是肝和鳃,在肠、肌肉、卵巢、精巢和心脏中的表达量较低,而在胃和肾中没有检测到 *kiss2* 基因的

表达。

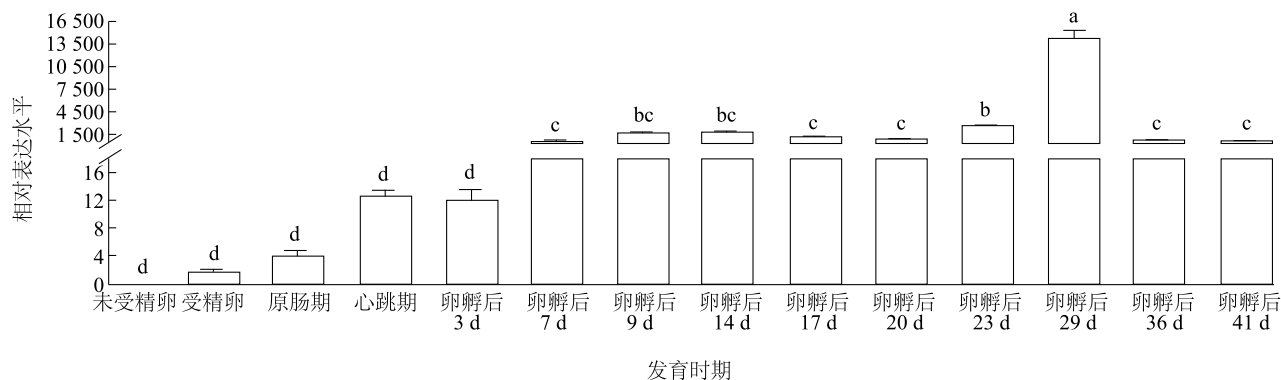
图 5 显示,在牙鲈胚胎发育时期,*kiss2* 基因处于低表达水平,在未受精卵中没有检测到 *kiss2* 的表达。在孵化后第 7 d,*kiss2* 表达量开始显著增加,至孵化后第 29 d 达到高峰。之后,*kiss2* 基因的表达量有所降低。



不同小写字母表示 *kiss2* 基因在不同器官中的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 *kiss2* 基因在牙鲆成体各组织中的表达

Fig. 4 Tissue distribution of *kiss2* gene in the adult Japanese flounder



不同小写字母表示 *kiss2* 基因在不同发育时期的表达量差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 *kiss2* 基因在牙鲆不同发育时期的表达

Fig.5 Expression of *kiss2* gene at different developmental stages of Japanese flounder

编码的 Kisspeptin-10 序列被认为是卵泡刺激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH) 和黄体生成素 (Luteinizing hormone, LH) 合成的主要调控因子^[2,21]。这表明 *kiss2* 基因在脊椎动物生殖调控方面具有保守性的重要作用。而此区域以外的序列则同源性较低,这也是 Kisspeptin 的一个共同特征。由于前肽翻译后的修饰作用,这些区域被切掉以离开高度保守的信号肽^[9]。Kisspeptin-10 之后的 3 个氨基酸 (GKR) 被认为是酰胺化和切割位点,在哺乳动物和鱼类中高度保守^[4,15]。

鱼类中存在 2 种 *kiss* 基因的现象很常见,但目前在红石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、星点东方鲀 (*Takifugu niphobles*)、塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*) 和大西洋比目鱼 (*Hippoglossus hippoglossus*)

3 讨论

本研究成功克隆了牙鲆 *kiss2* 基因,并对其序列特征和表达情况做了初步的分析。其推导的氨基酸序列与其他脊椎动物氨基酸序列的同源性在 24% ~ 76%,此外,系统进化树显示牙鲆 *kiss2* 基因与鱼类 *kiss2* 基因紧密聚为一支。在其氨基酸序列中存在 1 段高度保守的区域,即 Kisspeptin-10,它是 1 段成熟的功能性肽。牙鲆 Kisspeptin-10 的序列为“FNYN-PLTLRF”,其与斑马鱼和青鳞的 Kisspeptin-10 序列“FNYNPFGLRF”有 2 个氨基酸不同。在多数哺乳类动物中,Kisspeptin-10 在体内可以显著地刺激 GnRH/LH 的释放^[20]。在硬骨鱼类中,*kiss2* 基因所

编码的 Kisspeptin-10 序列被认为仅报道了 *kiss2* 基因的存在。另外,Felip 等人指出在黑鲈中,*kiss2* 在诱导促性腺激素的释放方面较 *kiss1* 作用大^[14]。因此,本研究克隆了牙鲆 *kiss2* 基因,旨在进一步探讨其在牙鲆生殖发育和性别分化方面的作用。

本研究结果显示 *kiss2* 基因在牙鲆脑中的表达量最高。在斑马鱼和青鳞中,*kiss2* 基因主要在脑中表达^[16,22]。在鲈鱼脑中 *kiss2* 基因也有较高的表达,但在鲈鱼性腺中并没有检测到 *kiss2* 基因的表达^[27]。本研究发现,*kiss2* 基因在牙鲆的精巢和卵巢都有表达。以往的研究结果表明,kisspeptin 系统通过调节 GnRH 的分泌来调控多种生殖活动^[9]。在青鳞中的研究结果中表明,*kiss2* 基因在下丘脑的 2 个核区高表达,即后室旁核和核腹侧结节^[16]。在斑

马鱼和黑鲈中, *kiss1* 神经元存在于脑部缰核区域, 这一区域与环境感知和代谢有关。而 *kiss2* 神经元主要位于下丘脑的背侧和腹侧, 预示着 *kiss2* 与 GnRH 的合成与分泌有关。综合这些研究结果, 暗示了牙鲈 *kiss2* 基因在精巢和卵巢的表达可能与其生殖调控有关。

除了胃和肾脏以外, *kiss2* 基因在牙鲈其他组织中也有表达, 包括肌肉、心脏、肝脏、鳃和肠。在其他硬骨鱼中, *kiss2* 基因也被检测到在不同组织中表达^[3,14-15]。这表明, *kiss2* 基因可能与鱼类除生殖以外的其他功能有关, 但其在这些组织中的生理学作用目前尚不清楚。

关于 *kiss2* 基因在鱼类早期发育阶段表达情况的研究非常有限。在斑马鱼中^[21], *kiss2* 基因的表达在受精后 1~7 d 升高, 在受精后 30 d 时显著升高。在本研究中, *kiss2* 基因表达水平在牙鲈胚胎发育时期较低, 而孵化后表达量显著升高, 在孵化后第 29 d 时达到顶峰。孙朝徽等人^[19]指出, 在牙鲈中, 原始生殖细胞在孵化后第 10 d 开始出现, 在孵化后第 20 d 时原始性腺原基形成, 之后性腺原基显著增长。在大约孵化后第 30 d 时, 原始上皮细胞开始出现, 标志着原始性腺的形成, 之后性腺开始分化。因此, 相比胚胎时期, *kiss2* 基因在牙鲈仔鱼发育阶段的高表达(尤其是孵化后第 29 d)可能与牙鲈的性腺分化有关。另外, 有研究结果表明在孵化后第 26 d 的军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼体脑部也发现了 *kiss* 基因受体 *gpr54* 基因的表达高峰^[28]。由此看来, Kisspeptin 系统可能在鱼类性腺发育中发挥重要作用, 但关于其在鱼类性腺发育中的表达模式及其生理功能仍需要进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] SEMINARA S B. Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: critical pathway modulating GnRH secretion [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2005, 26: 131-138.
- [2] MATSUI H, TAKATSU Y, KUMANO S, et al. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 320: 383-388.
- [3] ROA J, AGUILAR E, DIEGUEZ C, et al. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2008, 29 (1): 48-69.
- [4] KOTANI M, DETHEUX M, COMMUNI D, et al. The metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54 [J]. *Journal of Biology and Chemistry*, 2001, 276: 34631-34636.
- [5] OHTAKI T, SHINTANI Y, HONDA S, et al. Metastasis suppressor gene *Kiss-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor [J]. *Nature*, 2001, 411: 613-617.
- [6] FUNES S, HEDRICK J A, VASSILEVA G, et al. The *Kiss-1* receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312: 1357-1363.
- [7] DE ROUX N, GENIN E, CAREL J C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the *Kiss1*-derived peptide receptor GPR54 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 10972-10976.
- [8] LAPATTO R, PALLAIS J C, ZHANG D, et al. *Kiss1*^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than *Gpr54*^{-/-} mice [J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 4927-4936.
- [9] OAKLEY A E, CLIFTON D K, STEINER R A. Kisspeptin signaling in the brain [J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30: 713-743.
- [10] NAVARRO V M, CASTELLANO J M, ROA J, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by *Kiss-1* peptide, the endogenous ligand of GPR54 [J]. *The Journal of Physiology*, 2004, 561: 379-386.
- [11] SMITH J T. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe [J]. *Brain Research Reviews*, 2008, 57: 288-298.
- [12] DHILLO W S, CHAUDHRI O B, PATTERSON M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in human males [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005, 90: 6609-6615.
- [13] SEMINARA S B, MESSENGER S, CHATZIDAKI E E, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2003, 349: 1614-1627.
- [14] FELIP A, ZANUY S, PINEDA R, et al. Evidence for two distinct *Kiss* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 312: 61-71.
- [15] BIRAN J, BEN-DOR S, LEVAVI-SIVAN B. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 79: 776-786.
- [16] KANDA S, AKAZOME Y, MATSUNAGA T, et al. Identification of *Kiss-1* product kisspeptin and steroidsensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Endocrinology*, 2008, 149: 2467-2476.
- [17] LI S, ZHANG Y, LIU Y, et al. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Endocrinology*, 2009, 201: 407-418.
- [18] EIICHI Y. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hiram, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*,

- 1999, 173: 235-246.
- [19] 佟雪红, 睢燕, 路瑛, 等. 牙鲆变态期间核酸、总蛋白的变化及其与生长的关系[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 171-173.
- [20] 孙朝徽, 刘海金, 司飞, 等. 养殖牙鲆性腺的组织学观察[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(6): 451-454.
- [21] GOTTSCH M L, CUNNINGHAM M J, SMITH J T, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse [J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 4073-4077.
- [22] KITAHASHI T, OGAWA S, PARHAR I S. Cloning and expression of *kiss2* in the Zebrafish and Medaka [J]. *Endocrinology*, 2009, 150: 821-831.
- [23] SHIMIZU Y, TOMIKAWA J, HIRANO K, et al. Central distribution of *kiss2* neurons and peri-pubertal changes in their expression in the brain of male and female red seabream *Pagrus major* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175: 432-442.
- [24] SHAHJAHAN M, MOTOHASHI E, DO H, et al. Elevation of *Kiss2* and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169: 48-57.
- [25] MECHALY A S, VINAS J, PIFERRER F. Identification of two isoforms of the kisspeptin-1 receptor (*kissir*) generated by alternative splicing in a modern teleost, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) [J]. *Biology Reproduction*, 2009, 80: 60-69.
- [26] MECHALY A S, VINAS J, MURPHY C, et al. Gene structure and regulation of the Kiss-1 receptor-2 (*Kiss1r-2*) in the Atlantic halibut: insights into the evolution and regulation of *Kiss1r* genes [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, 317: 78-89.
- [27] SELVARAJ S, KITANO H, FUJINAGA Y, et al. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two *Kiss* genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169: 28-38.
- [28] MOHAMED J S, BENNINGHOFF A D, HOLT G J, et al. Developmental expression of the G-protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, 38: 235-244.

(责任编辑:陈海霞)