

## 双须骨舌鱼抗缪勒氏管激素基因*amh*的克隆、 组织表达分析和原核表达

王且鲁<sup>1,2</sup>, 刘奕<sup>1</sup>, 宋红梅<sup>1</sup>, 汪学杰<sup>1</sup>, 刘超<sup>1</sup>,  
牟希东<sup>1</sup>, 胡隐昌<sup>1</sup>, 罗建仁<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,  
农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东广州 510380;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为探究双须骨舌鱼抗缪勒氏管激素基因*amh*的作用和表达模式, 本研究通过RACE技术克隆了双须骨舌鱼*amh*基因全长cDNA序列, 发现存在*amh1*、*amh2*两个亚型(GenBank登录号KU378662、KU378663)。序列分析结果显示, 双须骨舌鱼*amh1*基因的cDNA全长2277 bp, 编码623个氨基酸, *amh2*基因cDNA全长2181 bp, 编码355个氨基酸。同源性分析显示, *amh*基因保守性较低, 双须骨舌鱼与同科的美丽硬仆骨舌鱼相似度最高, 为85.64%, 与不同科鱼类的相似度均低于42%。系统进化分析显示, 该基因与骨舌鱼目聚为一支, 与鲱形目、鲤形目等较低等的硬骨鱼类亲缘关系较近, 与双须骨舌鱼进化地位相符。用荧光定量PCR检测的结果显示, *amh*基因在双须骨舌鱼不同组织中均有表达, 其中*amh1*亚型在精巢中表达量最高, 且明显高于卵巢和其他组织; *amh2*亚型也在精巢中表达量最高, 且明显高于其他组织, 但远远低于*amh1*在精巢中的表达。构建了原核表达载体pCold I -*amh1*和pCold I -*amh2*并在大肠杆菌中成功诱导出大小分别为68和48 ku的融合蛋白, 为进一步研究*amh*在双须骨舌鱼体内的生物功能奠定了基础。

**关键词:** 双须骨舌鱼; 抗缪勒氏管激素; 克隆; 表达分析; 原核表达

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

抗缪勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH)又称作缪勒氏管抑制物(Müllerian inhibiting substance, MIS), 为肽类生长因子, 属于转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族成员。1940年Alfred Jost首次发现其在小鼠睾丸中表达, 由睾丸中未成熟的支持细胞分泌, 其功能与缪勒氏管退化有关; 1986年Richard Cate从人类和牛体内分离出AMH基因及其序列<sup>[1]</sup>; 此后, AMH基因的分子生物学机制等相关研究得以迅速开展。AMH基因广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物性腺中, 并对脊椎动物的性腺发育起着重要调控作用。在哺乳动物中, AMH能够指示缪勒氏管的退化并阻止雌性生殖

管的发育, 刺激中肾管分化成附睾、输精管和精囊<sup>[2-3]</sup>。硬骨鱼类没有缪勒氏管, 但也存在AMH的同源基因<sup>[4]</sup>, 其表达产物能够调节精原细胞的增殖和分化, 2002年首次发现于日本鳗鲡(*Anguilla japonicus*)<sup>[5]</sup>, 后陆续有学者从牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)<sup>[6]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[7]</sup>、青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[8]</sup>等鱼类中克隆出来, 但尚未发现有不同亚型。

双须骨舌鱼(*Osteoglossum bicirrostum*)俗称银龙鱼, 为骨舌鱼目(Osteoglossiformes), 骨舌鱼科(Osteoglossidae), 骨舌鱼属(*Osteoglossum*)中型鱼类, 是骨舌鱼科现存的7种鱼类之一<sup>[9]</sup>, 原产于

收稿日期: 2016-04-11 修回日期: 2016-07-07

资助项目: 国家水产种质资源平台(2016DKA30470); 广东省自然科学基金(2014A030310397)

通信作者: 罗建仁, E-mail: olfishlo@163.com

亚马逊河流域的巴西、圭亚那和秘鲁等地，主要栖息在亚马逊河及其支流的缓流区。在原产地是一种重要的食用鱼类，而在亚洲则是最具代表性的大型热带观赏鱼之一<sup>[10-11]</sup>。双须骨舌鱼第二性征极不显著，性成熟晚，繁殖习性特殊，且研究成本较高，目前相关研究论述较少。田媛等<sup>[12]</sup>对双须骨舌鱼的形态特征和核型进行了描述和分析；汪学杰等<sup>[13]</sup>对双须骨舌鱼的性腺发育进行了组织学观察。余者多为繁养殖技术、病害防治层面的论述<sup>[10, 14]</sup>，未能阐明双须骨舌鱼性腺分化和发育的具体过程和分子机制。本研究从鱼类性别相关基因*amh*的克隆和表达分析等入手，探讨双须骨舌鱼*amh*基因结构的组织表达特点，试图阐明双须骨舌鱼性别决定和性腺发育的分子机制，从而为完善双须骨舌鱼的人工繁育技术以及补充鱼类性别相关研究提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用双须骨舌鱼采自珠江水产研究所观赏鱼基地。

LA Taq酶、反转录试剂盒、3'RACE试剂盒、

5'RACE试剂盒、*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells、Transetta(DE3) Chemically Competent Cell、pMD19-T Vector、NdeI DNA内切酶、*EcoR* I DNA内切酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶等购自宝生物工程(大连)公司，TRIzol Reagent、RNAsafer II Reagent、RNA提取试剂盒等购自OMEGA公司，琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司，pCold I质粒和pET30质粒为本实验室保存。所用引物由广州艾基生物技术有限公司合成。

### 1.2 实验方法

**总RNA的提取及cDNA第一链的合成** 取成熟双须骨舌鱼精巢，用Total RNA Kit II (OMEGA) RNA提取试剂盒提取RNA，用PrimeScript<sup>TM</sup> II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)反转录试剂盒进行反转录，获得cDNA第一链。

***amh*基因的克隆** 根据双须骨舌鱼*amh*基因的转录组拼接序列，参考美丽硬骨舌鱼(*Scleropages formosus*)、斑马鱼、尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)、青鳉等鱼类*amh*基因序列设计双须骨舌鱼*amh*基因中间序列引物amh-F、amh-R(表1)，引物由广州艾基生物技术有限公司合成。25  $\mu$ L PCR体系

表1 实验中使用的引物

Tab. 1 Primers used in experiment

引物名称 primer	引物序列 sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C annealing temperature	引物用途 purpose
amh-F	CGGATCGTAACCCCTTG	60.0	<i>amh</i> 中间序列扩增
amh-R	GCCACCATGTCGGGTTTGTAC		
amh3'n	GCCGCCATCAACAACTGC	52.5	<i>amh</i> 3' 端扩增
amh3'w	CTGCGTGCCCGTGGAGTA	54.7	
amh5'n	CTTCCCACTGAAAGGCAAGCGGTCT	65.3	<i>amh</i> 5' 端扩增
amh5'w	ATTGCGGGGAAGGAGAATAAAGTG	62.0	
amh1 RT-F	GGATCTTCTCGCAGACCAGGC	63.0	<i>amh</i> 1 RT-PCR 引物
amh1 RT-R	CCCGGTGCGAGAGAGTACTA		
amh2 RT-F	GCAAGCACGTTTTTCACGGT	62.0	<i>amh</i> 2 RT-PCR 引物
amh2 RT-R	GGGACCATGAGGCAAATGCT		
GAPDHRT-F	TACAGCCACCCAGAAGACAGT	57.0	内参基因引物
GAPDHRT-R	CTCCTTGATCTCTGCGTAGCT		
amh1 e-F	CATATGTCGCTGGGTCTGTGGTTGGA	63.5	<i>amh</i> ORF 扩增引物
amh2 e-F	CATATGGAGACAACTGGGGGATAATGG	62.0	
amhe-R	GAATTCGCGCAGCCGCACTCTTG	63.7	

包括 ddH<sub>2</sub>O 18.7 μL, 10×Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, 模板 cDNA 0.6 μL, Taq 0.2 μL。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶, 用 TIANgel Midi Purification Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 连接至 pMD19-T Vector 载体, 转化 *E. coli* DH5α Competent Cells, 克隆、测序。

根据测序结果设计的 3'RACE 巢式 PCR 引物 *amh*3'w、*amh*3'n 和 5'RACE 巢式 PCR 引物 *amh*5'n、*amh*5'w(表 1), 分别用 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 (TaKaRa) 试剂盒和 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒扩增 *amh* 基因的 3'端和 5'端序列, 并分别进行胶回收、连接、转化、克隆、测序。

将 *amh* 中间序列、3'端序列和 5'端序列用

Vector NTI 软件进行拼接, 得到完整的双须骨舌鱼 *amh* 基因 cDNA 序列。

**序列分析** 用 Vector NTI 软件进行开放阅读框(ORF)分析, 并推导出相应的氨基酸序列。用 ProtParam (physico-chemical parameters of a protein sequence, <http://web.expasy.org/protparam/>) 软件分析蛋白质一级结构; 用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 软件分析信号肽; 用 TMHMM 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) 进行跨膜区结构预测; 用 NCBI 保守结构域数据库 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行结构域分析; 用 NCBI 中的 BLASTP 程序进行氨基酸序列同源性检索; 用 Clustal X 1.83 软件进行多序列比对, 并用 MAGE 4.0 软件构建系统发育树(表 2)。

**组织表达分析** 选取性成熟的双须骨舌鱼雌雄各 3 尾, 分别解剖获取性腺、肝、脾、肠、肾、

表 2 用于构建系统发育树的物种及其 AMH 氨基酸序列的 GenBank 序列号

Tab. 2 Species used for phylogenetic tree construction and the GenBank accession numbers of their AMH amino acid sequences

物种名称 species name	分类地位 taxonomic status	GenBank 序列号 GenBank no.
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	鲟形目 Acipenseriformes	AKE47491
眼斑雀鳢 <i>Lepisosteus oculatus</i>	雀鳢目 Lepidosteiformes	XM_015365340
美丽硬骨舌鱼 <i>Scleropages formosus</i>	骨舌鱼目 Osteoglossiformes	KPP74697
双须骨舌鱼 <i>Osteoglossum bicirrostum</i>	骨舌鱼目 Osteoglossiformes	KU378662 (Amh1) KU378663 (Amh2)
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	鲱形目 Clupeiformes	XM_012839522
银大麻哈鱼 <i>Oncorhynchus kisutch</i>	鲑形目 Salmoniformes	HQ67762
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	鲑形目 Salmoniformes	XP_010870000
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	鲤形目 Cypriniformes	XM_009296234
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	鲤形目 Cypriniformes	XP_007233319
茉莉花鲮 <i>Poecilia latipinna</i>	鲮形目 Cyprinodontiformes	XP_014893228
牙汉鱼 <i>Odontesthes bonariensis</i>	银汉鱼目 Atheriniformes	AAV31752
黄鳢 <i>Monopterus alba</i>	合鳃目 Symbranchiformes	AHF27393
奥利亚罗非鱼 <i>Oreochromis aureus</i>	鲈形目 Perciformes	ABW98500
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	鲽形目 Pleuronectiformes	BAD37138
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	鲀形目 Tetraodontiformes	XP_011613046
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	无尾目 Anura	BAO04196
密西西比鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	鳄目 Crocodylia	KQL88081
猎隼 <i>Falco cherrug</i>	隼形目 Falconiformes	XP_005434314
小家鼠 <i>Mus musculus</i>	啮齿目 Rodentia	XP_006513182
智人 <i>Homo sapiens</i>	灵长目 Primates	NP_000470

头肾、脑、鳃、心9种组织,用RNA提取试剂盒分别提取各组织总RNA,然后用东南bxz-800核酸蛋白分析仪测定RNA浓度和纯度,各取1ng RNA用PrimeScript™ II 1st Strand cDNA synthesis Kit(TaKaRa)反转录成cDNA样品。

选用双须骨舌鱼*gapdh*基因作为荧光定量表达实验的内参基因,并根据斑马鱼、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、黄鳝、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)等物种的*gapdh*基因保守区域设计一对引物GAPDHRT-F/GAPDHRT-R(表1),作为内参基因荧光定量PCR引物。根据测得的双须骨舌鱼*amh*基因两种亚型的cDNA序列,在二者差异区域分别设计一对荧光定量PCR引物amh1RT-F/amh1RT-R、amh2RT-F/amh2RT-R(表1)。分别将以上三对引物的PCR扩增产物连接到pMD19-T载体并转入*E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells,经过克隆测序等挑取阳性克隆进行扩培,然后用TIANprep Mini Plasmid Kit质粒小提试剂盒提取质粒。

用核酸蛋白分析仪测定质粒浓度,然后对其进行10倍梯度稀释,共8个梯度,即分别为原浓度的 $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ 倍,用ABI 7300 SDS仪检测标准曲线,若相关系数 $>0.99$ 则对各样品进行荧光定量PCR,PCR体系共20  $\mu$ L,包括SYBR Select Master Mix (applied biosystems) 10  $\mu$ L,正反向引物(10  $\mu$ mol/L)各0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L,模板cDNA 1  $\mu$ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。每个样品重复3次。根据导出数据的Ct值、质粒浓度比和标准曲线,用7000 System SDS软件计算每个样品的目的基因和内参基因扩增后的拷贝数(Qty),各样品的目的基因和内参基因Qty值之比即为目的基因相对定量值。对各样品的相对定量值进行统计分析,得到*amh*基因在双须骨舌鱼各组织中的相对表达量。

**原核表达载体的构建及诱导表达** 根据双须骨舌鱼*amh*基因序列及其分析结果设计引物amh1e-F/amh1e-R、amh2e-F/amh2e-R(2个亚型共用一个下游引物)扩增*amh1*和*amh2*基因的开放阅读框(ORF),将两种扩增产物分别连接到pMD19-T载体并转入DH5 $\alpha$  *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells,选取测序完全正确的阳性克隆进行扩培,产物分别命名为amh1-DH5 $\alpha$ 、amh2-DH5 $\alpha$ 。

提取amh1-DH5 $\alpha$ 和amh2-DH5 $\alpha$ 的质粒,分别用Nde I、EcoR I进行双酶切,再分别用T<sub>4</sub> DNA

连接酶插入经同样双酶切的载体pCold I中,构建出表达载体amh1-pCold I、amh2-pCold I,分别转入DH5 $\alpha$ ,经PCR、测序等筛选出阳性克隆并大量扩增,分别提取质粒。

将两个质粒分别取1  $\mu$ L转化表达感受态细胞Transetta(DE3) Chemically Competent Cell,轻弹混匀,冰浴30 min,42 $^{\circ}$ C准确热激45 s,冰上静置2 min,加入400  $\mu$ L SOC摇菌1 h,涂于含Amp<sup>+</sup>的LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养。每个平板上各挑取1个单克隆至3 mL含Amp<sup>+</sup>的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C过夜振荡培养。取200  $\mu$ L过夜培养的菌液,加入1.8 mL含Amp<sup>+</sup>的LB液体培养基,37 $^{\circ}$ C摇菌培养至OD<sub>600</sub> $\approx$ 0.5时,加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L诱导,amh1-pCold I在15 $^{\circ}$ C下诱导24 h,amh2-pCold I在15 $^{\circ}$ C下诱导16 h。诱导结束后,10 000 r/min离心1 min收集菌体,用550  $\mu$ L PBS悬浮菌液;取50  $\mu$ L悬菌液加入10  $\mu$ L 6 $\times$ Protein Loading Buffer混匀,沸水浴10 min,12 000 r/min离心5 min,取10  $\mu$ L上清液点样至10%的SDS-PAGE胶,考马斯亮蓝染液染胶、脱色,观察结果。将剩余的菌液超声后分别取上清液和沉淀点样至10%的SDS-PAGE胶,考马斯亮蓝染液染胶、脱色,观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 双须骨舌鱼*amh*基因的克隆及序列分析

用Vector NTI软件拼接得到的双须骨舌鱼*amh*基因第一亚型(*amh1*) cDNA全长为2278 bp,包括191 bp的5'末端非翻译区(untranslated regions, UTR),1839 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF)和248 bp的3'UTR。3'UTR具有典型的加尾信号AATAAA和Poly(A)尾。编码区序列共编码613个氨基酸,预测蛋白分子量为67 987.6 u,理论等电点(pI)为5.96。用CDD分析发现预测氨基酸含有一个AMH-N区域(100~502位氨基酸)和一个TGF- $\beta$ 结构域(520~613位氨基酸),且在C端生物活性区域有9个保守的半胱氨酸残基。用SignalP软件分析发现21、22位氨基酸可能为信号肽剪切位点,1~21位氨基酸为信号肽,推测该蛋白为分泌蛋白。用TMHMM服务器预测跨膜区,结果显示该氨基酸不存在跨膜区(图1)。

双须骨舌鱼*amh*基因第二亚型(*amh2*)cDNA全长为2181 bp,包括868 bp的5'UTR,1065 bp的ORF和248 bp的3'UTR。3'UTR结构与*amh1*相同。

```

acatggggccc 11
gctgaaactggatcttctcgcagaccaggcgaaggatcggaggaagactgcaccgcttttctttatctgatgtatttatttcttctgctta 101
tgccttggcttcaagtgctctgtgcccgcagcaggagaaaagcactgtatgaaaattaatttaattgattgaattgaactgaangac 191
ATGTCGCTGGGTCTGTGGTTGGAGTGTCTGTCTGCTGCTTGCCTAGTAGTCACTCTCTCGCACCCGGATCCGGAGGGAGACCGGATT 281
M S L G S V V G V L L L L P C V V V T L S H R D P E G D R I 30
CGATCAGGAGAAGGAGTGC AAATGCGATCGAGGGCAGAAGGCGAGAGGGGAGTTTGGAGAAGGAGGACATTTGCGCTCATGGTCCCCCA 371
R S G E G G A N G I E G R R R E G E F G E E E H L P H G P P 60
AAGCCCTGGAGGGGAACTGCCCGCTGGAGTCGGTACCGTCCCGTCCCGTCTCCGAGCAACGGCTAGGAAAGCTGTGCTCTGG 461
K P L E G N L P P L E S V T V P V P V S E Q R L G K L L L W 90
GCAGCCGAGGAAAACATGCAGCTGTGTGAAGGAGTTTCAGAGCAAACCTCCGGAAGCCTCTGCTAGTATTGGAAGTGAAGTCTGAG 551
A A E E N H A A V V K E F Q S K L P E A S G S D L E L S S E 120
GACAGGGAACGGTTGGCCCTTTGTTCAATCTAGATGGGAAAACGGTGGCCGGATCGTAACCCCTTGGCGCTGGCTGAAAGTTTGGGA 641
D R E R F G L C S N L D G K T G G R I V T P L A L A E S F G 150
AGAGATCAAGAGAAAGCGCACTGTACATTTTACCCCACTAAAGAGCTGTGGGAGTGGATGGAGGACGCACAGGACTACGCAGCTC 731
R D Q E K A A L Y I L H P T K E L W E V D G A T H R T T Q L 180
CTTCACTTCCACTCGCGCCCCCTGCGCTCGGCACGCCACAACTGACCCCACTGCTTCTTCTGCAAGATCTGCTCAGGACG 821
L H F H L P P P L R S A R H K L T P T L L F F L Q R S V R T 210
GGAGTGTGAGCATCTCCTTTACAGTGTTCCTCCTCCACATCACCAGACCGCTTGCCTTTCAGTGGGAGCCAGTTTATTGCCCTG 911
G V L S I S F T S R S L L P H H Q T A C L S V G S Q F I A L 240
TCTGGAGAAAAGTCCATGCGGAGCCAGCATCACCTGGCTGGCAGATTACCATGGAGACAACTGGGGGATAATGGACCCGAGGTG 1001
S G R K V P C G A Q H H L A W Q I T M E T N W G D N G P E V 270
TCGCTGCTGAAAGTGCAGCGCTGCTGAGAGGGGACAAGCCAGAAAGAGAGGCTCCGAGCCCTCTGCTCTGCTCTGCAAGAGGGTG 1091
S A A E V Q R L L R G D K P E D E A P S P L L L L L A D R V 300
GGCGGAGGATTGGACAGCCCTGAGCCGAGCAGCGAACAACCCATGTGGAAATTTTCTGCAAAAGCGCGCTGGAGCTGAGCCAC 1181
A A D D S D S P E P E H A N N P C G N F S C K A A L E L S H 330
ACCGAGCCACCCCACTTCTGAAACCTTCCCTTTCCTGTGGAGTTGAGAGTTCTGGGCAAGCCCTTTCACAGACACAGCTGGAG 1271
T A A T P P S E T F L F L C E L Q K F L G K A L S Q T Q L E 360
CCTGTCCTGCTCGCGCGCTCTGTGTCTTAGGTGCCCTGACATCACTGCCCTCCATGCGTCTGGGTCTCTCCTCAGTGAAGCCCTC 1361
P V P A P P A S V S L G A L T S L P S M R L G S S S S E A L 390
CTCCTGGGCTGTCAACTCTGGCTCCCACTTATCTCCTTCCCGCAATGCGCGGAGCTCTGAGCCACCGGGTCACTGAGCC 1451
L L G L L N S S A P T L F S F P R N A A E L W T H R G Q L T 420
TTGAGCCCACTTACTGTAGTGTGAGGCTTGGCTGGAGGAGCCATGAGCCAGATGCGCAGAGAGAGGAGGAGGACACCGCATG 1541
L Q P H L L S V L R L R L E E A M S Q M R R E E A G G H G M 450
AAGGACCACTCCTTGGCTGCGGAAATGAGCAGGCTGCGGCGGAGGATGCAAGCTGCCAGGGGCTTGGCAACCTGAAAGAAAGA 1631
K D Q L L R L R E L S R L P A E D A Q L P G G L G N P E E R 480
CAGTACCACTGCTGCTTCTGCTCAAGCCCTGCAGACTGTGCTTTGGACTTGGAGGCAAGAGGGGACAGCGGGCCGCTCGCGGGGT 1721
Q Y H A V L L L K A L Q T V L W T W E A E R G Q R A A R G G 510
CAAGAGCCAGAGAAAGCATGGGCAAGTGGCGGCTGCACCTCTCACTGTGTCATGGATAAGTACTGCTGAGCCCGCTATGGCCGC 1811
Q E A Q R S M G K C R L H P L T V S M D K Y L L S P P M A A 540
ATCAACAACCTGCCAGGGCTTTCAGTACTGCGCTGGAGAGGATCACCAATCAAGCCATGATGCTGAATCCATCGGAACAACGGG 1901
I N N C Q G S C S D L P L E R I T N H A M M L N I H R N N G 570
CTGCGCTCGAGCGTGGACCTTGTGCTGCGCGGTGAGTACGAGGAGCTGTGCTGGCCAGCTGAGCGGCAAGGTACCGAAATACAG 1991
L P L E R G P C C V P V E Y E E L C V A T L S G E G T E I Q 600
TACAAACCCGACATGGTGCCAAAGAGTGGCGTGGCTGacattccacaaagcgtgtc tttatatgctactaagtggttaatecat 2081
Y K P D M V A K E C G C R * 613
gtaaaagactgcttctgectgectgctgtgttttagccctcatgtgcaaaactgtttgtctgctgcaatcatgcatctcttcaaacg 2171
tttactgtaactgtatgtcattcacagatgtccaccttaggggtttttcttcgatggcattttctgtatttatataaattgttttac 2261
gaagggaaaaaaaaaa 2278

```

图 1 双须骨舌鱼 *amh1* 基因 cDNA 序列及其推导蛋白序列

单下划线的 ATG 为起始密码子, 单下划线的 tga 为终止密码子, 双下划线碱基表示加尾信号, 绿色区域为信号肽, 灰色区域为 AMH-N 区域, 红色区域为 TGF-β 结构域, \* 表示终止密码子; 下同

Fig. 1 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *amh1* in *O. bicirrostum*

The ATG with single underline shows the start codon, the tga with single underline shows the terminator codon, the basic group with double underline shows tailing signal, the region marked in gray shows the signal peptide, the region marked in gray shows the AMH-N domain, the region marked in red shows the TGF-β domain, the asterisk shows the stop codon; the same below

编码区序列共编码355个氨基酸, 预测蛋白分子量为38740.2 u, pI为5.39。用CDD分析发现预测蛋白也含有一个AMH-N区(2~244位氨基酸)和一个TGF- $\beta$ 结构域(262~355位氨基酸)。用SignalP软件分析, 未发现信号肽, 推测该蛋白可能为胞内蛋白。用TMHMM服务器预测跨膜区, 结果显示该氨基酸不存在跨膜区(图2)。

## 2.2 双须骨舌鱼 *amh* 基因的系统发育分析

用ClustalX2软件将双须骨舌鱼*amh1*氨基酸序列与GenBank中收录的其他一些动物进行比对, 发现双须骨舌鱼*amh*氨基酸序列保守性较低。除与其同科的美丽硬骨舌鱼相似度较高, 达到85.64%外, 与其他物种相似度均较低。比如与银大麻哈鱼、大西洋鲱、斑马鱼、西伯利亚鲟、眼斑雀鳝的相似度分别为41.69%、34.58%、31.65%、26.92%、26.48%; 与其他脊椎动物的相似度更低, 比如与非洲爪蟾、密西西比鳄、猎隼、小家鼠和智人的相似度分别为19.94%、21.79%、22.42%、22.49%、24.03%。

将各物种的AMH氨基酸序列进行比对后用MEGA6软件构建系统发育树(图3), 结果显示双须骨舌鱼Amh与骨舌鱼目紧密聚为一支, 与鲱形目、鲤形目等进化地位较低的硬骨鱼类亲缘关系较近, 与双须骨舌鱼的进化地位基本相符。

## 2.3 双须骨舌鱼不同性别、不同组织AMH基因的表达分析

荧光定量PCR结果显示, *amh1*在双须骨舌鱼各组织中均有表达, 其中在性腺中的表达量明显高于其他组织( $P < 0.05$ ), 且在精巢中的表达量显著高于卵巢; 另外在肾和头肾中也有明显的性别二态性表达; 在肝、脾、肠、心脏等组织中的表达量极低(图4)。

*amh2*表达量最高的组织也是性腺, 明显高于其他组织( $P < 0.05$ ), 且精巢中的表达量显著高于卵巢; 在雌性脑中也有表达, 在其他组织中表达量极低(图5)。

## 2.4 原核表达产物的检测

两个重组表达质粒pCold I -*amh1*和pCold I -*amh2*经测序确认重组表达载体开放阅读框完全正确, 表明表达载体构建成功。两个表达载体在表达菌株BL21(DE3)中经IPTG诱导后, 得到分子量约为68和48 ku的重组蛋白(图6中箭头)。其

中*amh1*的融合蛋白分子量与预期完全相符, *amh2*的融合蛋白分子量略大于预期, 可能为SDS-PAGE误差所致。二者均主要以包涵体形式表达(图6)。

## 3 讨论

本研究发现双须骨舌鱼*amh*基因具有两个不同的亚型。这两个亚型的5'UTR区完全不同; CDS区为包含关系, 即*amh1*的CDS区序列包括*amh2*的CDS区序列; 3'UTR区完全相同。*amh1*自第286位碱基之后(含286)的序列与*amh2*自第190位碱基之后(含190)的序列完全一致。在其他关于*amh*基因的报道中尚无类似情况。唐永凯等<sup>[15]</sup>在克隆奥利亚罗非鱼*amh*基因时曾发现有两种不同的*amh*基因序列, 但只是在3'UTR区域中长短不一且二者为包含关系, 可能由于PCR过程中的错配、测序的误差或克隆过程中的突变等情况所致, 并非不同亚型。氨基酸序列分析表明Amh1氨基酸序列中1~21位氨基酸为信号肽序列, 推测其为分泌蛋白, 但未发现Amh2蛋白具备信号肽序列, 其是否为胞内蛋白还需根据后续研究其行使功能的具体位置来确定。

与其他物种的序列比对结果显示, *amh*基因保守性比较低, 除与同科的美丽硬骨舌鱼相似度(85.64%)较高外, 与其他鱼类的最高相似度只有41.69%(银大麻哈鱼)。但根据基因比对结果显示, 构建的系统发育树与各物种的进化关系基本吻合。另外双须骨舌鱼*amh*基因的TGF- $\beta$ 结构域保守性较高, 与美丽硬骨舌鱼*amh*的相似度高达92.55%, 与虹鳟的相似度为64.89%, 与斑马鱼、非洲爪蟾、密西西比鳄、猎隼、小家鼠、智人的相似度分别为50%、42.16%、44.44%、44%、37.37%、37.37%。

对多种鱼类的研究表明, *amh*基因通常在成体的多种组织中都有表达, 以性腺中的表达量为最高, 且在部分组织中存在两性表达模式, 尤其是精巢中的表达量高于卵巢。如对于半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)<sup>[16]</sup>、斑马鱼<sup>[17]</sup>、金钱鱼(*Scatophagus argus*)<sup>[18]</sup>等*amh*基因表达的研究中均出现类似表达模式。这表明*amh*基因是鱼类的一种性别相关基因, 对于鱼类性腺分化起到重要作用。这也与本研究*amh1*的表达模式相符。而在不同的发育时期, *amh*基因的表达量通



```

          acttttttttttttttttgcaccccagctctctttatagctgttgatcctccgctgggg  59
caggtgccagctcttttttctgcaggtctgcccAACGCAAGCACCGTtttcaCGTgtgcccacctgttccgcttttctgctcgggcgg  149
taggttctgaagacccccagcttgtc taaggtgacctgcacaggagaaggaggtgcaaatggcatcgagggcagaaggcgagagggggag  239
tttgagaagaggagcatttgoctcatggtccccaaagccccggaggggaacctgcccgcctggagtcggtgacctccccgttccc  329
gtctccgagcaacgcctaggaaagctgttctctgggcagccgaggaaaaccatgcagctgttgtgaaggagtttcagagcaaaacttccg  419
gaagcctctggtagtgatttgaactgagctctgaggacagggaacggttcggcctttgttccaatctagatgggaaaaccggtggccgg  509
atcgtaaccccccttggcgtggtgaaagttttggaagagatcaagagaaggcggcactgtacattttacaccccactaaagagctgtgg  599
gaggtggatggagcagcgcacaggactacgagctccttcacttccacctgcccggccccctgcccctggcagcgcacaaaactgacccc  689
acgctatctgtcaggacgggagtgctgagcatctcctttaccagctgttccctcctcccacatcacagaccgcttgcctttcagtgggg  779
agccccgtttcttctgcagagagttcattgcctgtctggacgaaaagtccatgcggagcccagcaccctggccttggcagattacc  869
ATGGAGACAAACTGGGGGATAATGGACCCGAGGTGTCCGCTGCTGAAGTGCAGCGGCTGCTGAGAGGGGACAAGCCAGAAGACGAGGCT  959
M E T N W G D N G P E V S A A E V Q R L L R G D K P E D E A 30
CCGAGCCCTCTGCTCCTGCTCCTTGCAGACAGGGTGGCGGCGGACGATTGCGACAGCCCTGAGCCCGAGCACGCGAAACAACCCATGTGGG  1049
P S P L L L L L A D R V A A D D S D S P E P E H A N N P C G 60
AATTTTCTGCAAAGCGGCGCTGGAGCTGAGCCACACCGCAGCCACCCACCTTCTGAAACCTTCTTTTCTGTGCGAGTTGCAGAAG  1139
N F S C K A A L E L S H T A A T P P S E T F L F L C E L Q K 90
TTCTGGGCAAAGCCCTTTCACAGACACAGCTGGAGCCTGTCCCTGCTCCGCCGGCCTGTGTCTCTAGGTGCCCTGACATCACTGCC  1229
F L G K A L S Q T Q L E P V P A P P A S V S L G A L T S L P 120
TCCATGCGTCTGGGGTCTCCTCCAGTGAGGCCCTCCTCCTGGGCTGTCTCAACTCCTCGGCTCCCACTTTATTCTCCTTCCCCGCAAT  1319
S M R L G S S S S E A L L L G L L N S S A P T L F S F P R N 150
GCGGCGGAGCTCTGGACCCACCGGGTCACTGACCTTGACGCCCCACTTACTGTGAGTGTGAGGCTTCGGCTGGAGGAGGCCATGAGC  1409
A A E L W T H R G Q L T L Q P H L L S V L R L R L E E A M S 180
CAGATGCGCAGAGAAGAGGCAGGAGGACCGCATGAAGACCAACTCCTTCGGCTGCGGGAATTGAGCAGGCTGCCGCGGAGGATGCA  1499
Q M R R E E A G G H G M K D Q L L R L R E L S R L P A E D A 210
CAGTGCCAGGGGTCTTGGCAACCTGAAGAAAGACAGTACCAAGCTGTGCTTCTGCTCAAGGCCCTGCAGACTGTGCTTTGGACTTGG  1589
Q L P G G L G N P E E R Q Y H A V L L L K A L Q T V L W T W 240
GAGGCAGAGAGGGACAGCGGCCGCTCGCGGGGTCAAGAGGCCAGAGAAGCATGGCAAGTCCCGGCTGCACCCTCTCACTGTGTCC  1679
E A E R G Q R A A R G G Q E A Q R S M G K C R L H P L T V S 270
ATGATAAGTACCTGCTGAGCCCGCTATGGCCGCATCAACAAGTCCAGGGCTCTTGCAGTACTTGGCGTGGAGAGGATCACCAAT  1769
M D K Y L L S P P M A A I N N C Q G S C S D L P L E R I T N 300
CACGCCATGATGCTGAATATCCATCGGAACAACGGGCTGCCGCTCGAGCGTGGACCTTGTGCGTGCCCGTGGAGTACGAGGAGCTGTGC  1859
H A M M L N I H R N N G L P L E R G P C C V P V E Y E E L C 330
GTGGCCACGCTGAGCGGCAAGGTACCGAAATACAGTACAAACCCGACATGGTGCCAAAGAGTCCGGCTGCCGCTgacttccacaagcg  1949
V A T L S G E G T E I Q Y K P D M V A K E C G C R * 355
tgtctttatagctgacactaagtgtgtaatccatgtaaaagactgcttctgcccctgctgctggttttagcctcctatgtgcaaaacgctc  2039
tttctctgctcgtgcaatcatgcatctcttcacaagtttactgtaactgtagatgtcattcacagatgtccaccttttagggctttttctc  2129
gatggcattttctgtatttataataaatgttttacgcaagggaaaaaaaaa  2181

```

图 2 双须骨舌鱼 *amh2* 基因 cDNA 序列及其推导蛋白序列

Fig. 2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *amh2* in *O. bicirrostrum*

常有明显差异。对斑马鱼<sup>[17]</sup>、奥利亚罗非鱼<sup>[15]</sup>、半滑舌鲷<sup>[16]</sup>等多种鱼类的研究显示, *amh* 基因通常在幼鱼期间表达微弱或不表达; 从性腺分化期开始, 表达量升高并出现两性差异, 即雄性高于雌性; 此后至成鱼阶段精巢表达量一直高

于卵巢, 卵巢表达量较低或不表达。所不同的是有的鱼类精巢 *amh* 基因表达的高峰期为鱼种期, 如奥利亚罗非鱼<sup>[15]</sup>、金钱鱼<sup>[18]</sup>、半滑舌鲷<sup>[16]</sup>等, 有的高峰期成鱼期, 如斑马鱼<sup>[17]</sup>等。但有的鱼类也比较特殊, 如青鲮<sup>[8]</sup>, *amh* 基因在其性腺发

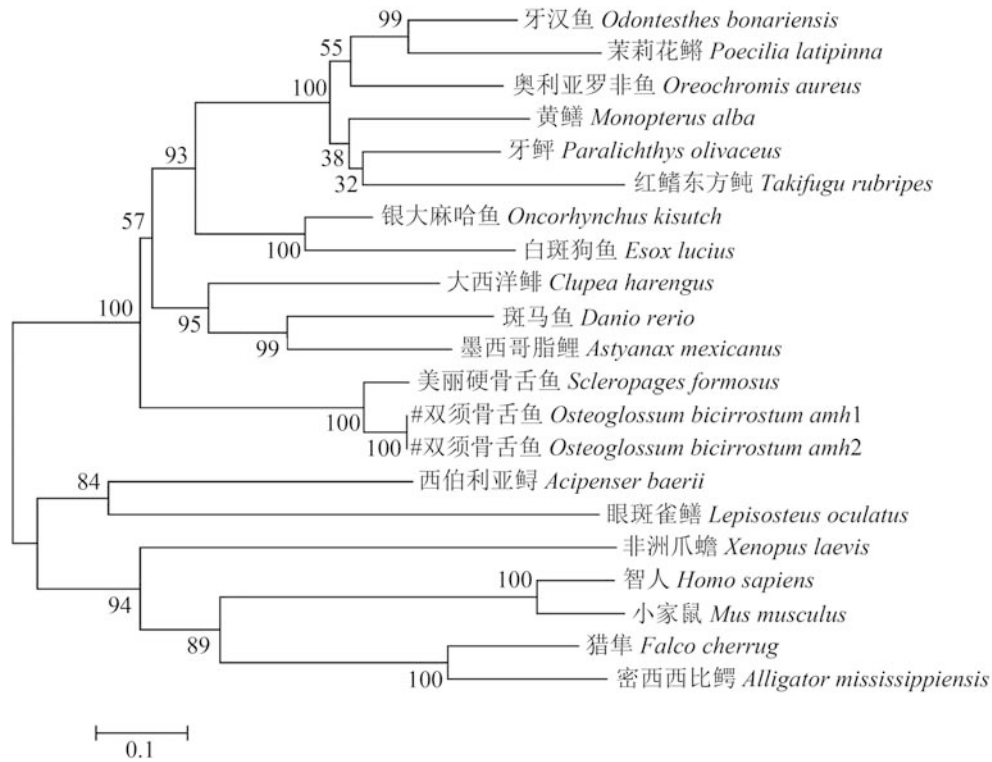


图 3 基于AMH氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on AMH amino acid sequences

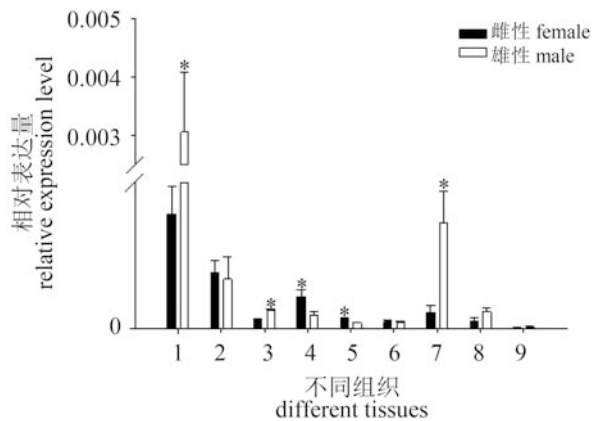


图 4 双须骨舌鱼各组织中 *amh1* 基因的相对表达量

1.性腺; 2.肝; 3.脾; 4.肠; 5.肾; 6.头肾; 7.脑; 8.鳃; 9.心; \*. 两性表达量差异显著( $P < 0.05$ ), 且标在表达量较高的一侧; 下同

Fig. 4 Relative expression of *amh1* gene in various tissues of *O. bicirrostum*

1. gonad; 2. liver; 3. spleen; 4. intestines; 5. kidney; 6. head-kidney; 7. brain; 8. gill; 9. heart; \*. significant difference ( $P < 0.05$ ) between two sexes and appears above the higher expression; the same below

育阶段并无显著的两性差异, 在成鱼阶段精巢明显高于卵巢。另外, *amh1*在双须骨舌鱼头肾中也有相对较高的表达量, 且雄性表达量显著高于雌性。头肾是部分圆口类和硬骨鱼类特有的器

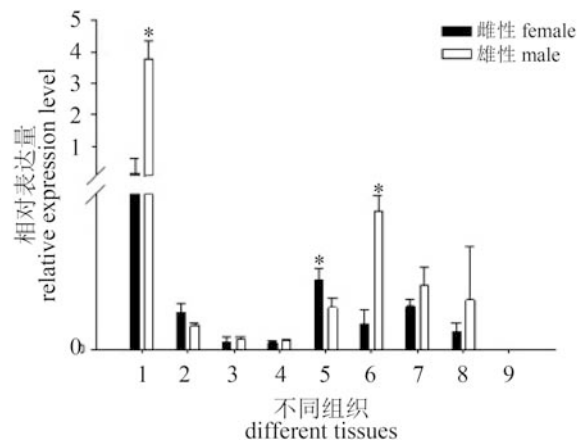


图 5 双须骨舌鱼各组织中 *amh2* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *amh2* gene in various tissues of *O. bicirrostum*

官, 通常认为其在硬骨鱼类中的作用相当于哺乳类的肾上腺皮质<sup>[19]</sup>, 具有免疫、造血重要作用。另有研究表明, 硬骨鱼类头肾能合成微粒体酶P450c17, 该物质在17 $\beta$ -雌二醇的生成过程中起重要催化作用<sup>[20]</sup>, 因此可以肯定头肾对于硬骨鱼类性别分化、性腺发育也具有重要作用。

*amh2*的表达模式则与*amh1*不同, 虽然也是在精巢中表达量最高, 但远远低于*amh1*在精巢



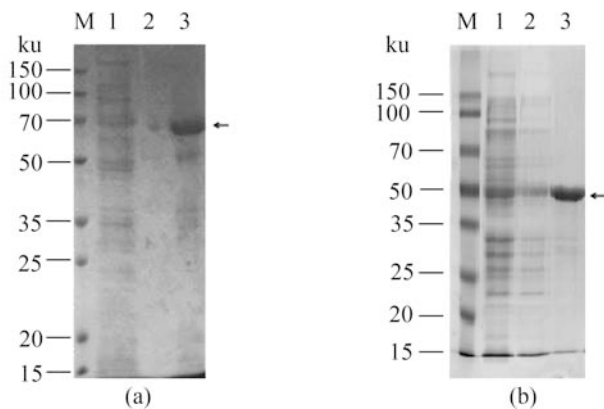


图 6 双须骨舌鱼 *amh* 氨基酸在大肠杆菌中的重组表达

(a) *amh1*; (b) *amh2*; M. blue plus II protein marker; 1. 未诱导的全菌; 2. 上清液; 3. 包涵体

**Fig. 6 Expression of *O. bicirrostum amh* in *E. coli***

(a) *amh1*; (b) *amh2*; M. blue plus II protein marker; 1. lysis supernatant without induction; 2. supernatant liquor; 3. precipitate

和卵巢中的表达量, 且表达量仅次于性腺的是脑而非头肾, 在脑中也具有雄性表达量显著高于雌性的特点, 这表明 *amh2* 也是一种性别相关基因, 但其具体的作用方式和机理以及与 *amh1* 有何差异或联系尚不明确。众所周知, 下丘脑—垂体—性腺轴是脊椎动物体内重要的内分泌调节系统, 下丘脑分泌的促性腺激素释放激素促进垂体分泌促性腺激素, 促性腺激素进而促进性腺分泌性腺激素, 性腺激素可以反过来对促性腺激素释放激素的分泌形成负反馈调节, 因此脑及其分泌的激素对于脊椎动物性别分化和性腺发育至关重要, 比如硬骨鱼类脑型芳香化酶在脑中就有大量表达, 可能对中枢神经系统发育、性行为以及性别分化都具有重要调节作用<sup>[21-23]</sup>。因此双须骨舌鱼 *amh2* 基因可能也在下丘脑—垂体—性腺轴中发挥一定作用, 但仍需进一步的实验证据。

在哺乳动物的胚胎发育早期, *AMH* 诱导缪勒氏管退化, 并抑制 *CYP19* 基因的表达<sup>[24]</sup>, 对斑马鱼的研究也显示其 *amh* 是抑制 *cyp19a* 基因表达的因素之一<sup>[17, 25]</sup>。在硬骨鱼类系统发育过程中经历了一次大规模基因组复制, 所以很多基因具有双拷贝<sup>[17]</sup>, 如硬骨鱼类的芳香化酶基因具有 *cyp19a* 和 *cyp19b* 两种类型, 前者主要在性腺中表达, 通过催化雄激素向雌激素的转化直接参与卵巢的发育, 后者主要在脑中表达, 可能通过

下丘脑—垂体—性腺轴参与性别分化, 而人类单一的 *CYP19* 基因在性腺和脑中都有表达<sup>[17]</sup>。双须骨舌鱼 *amh* 基因存在两种亚型的原因可能与硬骨鱼类 *cyp19* 基因类似。由于信号肽分析结果显示 *Amh1* 为分泌蛋白, 而 *Amh2* 可能为胞内蛋白, 所以猜测双须骨舌鱼 *amh1* 主要负责诱导雄性生殖器官的发育, 而 *amh2* 主要在胞内行使对 *cyp19a* 基因的抑制作用, 从而实现哺乳动物单一 *AMH* 基因多个功能的分离。

关于硬骨鱼类 *amh* 基因的研究多集中于克隆和时空表达分析等方面, 而对蛋白结构和功能的研究很少。研究中使用的原核表达载体 pCold I 是一种冷启动表达载体, 能够在低温下启动蛋白表达, 调控蛋白折叠更严谨, 并提高可溶性蛋白的比例<sup>[26]</sup>, 但本研究获得的融合蛋白是以包涵体形式存在, 后续会通过优化条件或在载体上添加助溶标签尝试诱导可溶性蛋白。本研究通过构建原核表达载体并进行诱导表达获得了纯度较高的双须骨舌鱼 *Amh* 蛋白, 从而为下一步制备多克隆抗体, 探究 *amh* 基因在双须骨舌鱼性腺中的表达模式以及对性腺分化和发育的作用方式打下了基础。

**参考文献:**

- [1] Cate R L, Mattaliano R J, Hession C, *et al.* Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells[J]. *Cell*, 1986, 45(5): 685-698.
- [2] Visser J A, Themmen A P N. Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, 234(1-2): 81-86.
- [3] Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, *et al.* Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor[J]. *Nature Genetics*, 1995, 11(4): 382-388.
- [4] Lasala C, Carré-Eusèbe D, Picard J Y, *et al.* Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Müllerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species[J]. *DNA and Cell Biology*, 2004, 23(9): 572-585.
- [5] Miura T, Miura C, Konda, *et al.* Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel[J]. *Development*, 2002, 129(11): 2689-2697.
- [6] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, *et al.* Sexually

- dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 322(2): 508-513.
- [7] von Hofsten J, Larsson A, Olsson P E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (*ff1d*) is coexpressed with anti-Müllerian hormone (*AMH*) in zebrafish[J]. Developmental Dynamics, 2005, 233(2): 595-604.
- [8] Klüver N, Pfennig F, Pala I, *et al.* Differential expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) and anti-Müllerian hormone receptor type II (*amhr II*) in the teleost medaka[J]. Developmental Dynamics, 2007, 236(1): 271-281.
- [9] Nelson J S. Fishes of the World[M]. 4th ed. New York: Wiley, 2006.
- [10] 庄树文, 吕冬云. 银龙鱼的生态习性及其养成技术[J]. 水利渔业, 2008, 28(1): 49-50.  
Zhuang S W, Lü D Y. Ecological habits and breeding technology of silver arowana[J]. Reservoir Fisheries, 2008, 28(1): 49-50(in Chinese).
- [11] Silva T D J D, Hrbek T, Farias I P. Microsatellite markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes)[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3): 1019-1022.
- [12] 田媛, 牟希东, 汪学杰, 等. 双须骨舌鱼形态特征与核型分析[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(2): 173-177.  
Tian Y, Mu X D, Wang X J, *et al.* Morphological structure and karyotype of *Osteoglossum bicirrhosum*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(2): 173-177(in Chinese).
- [13] 汪学杰, 田媛, 刘奕, 等. 双须骨舌鱼性腺发育的组织学观察[J]. 水产学报, 2014, 38(4): 525-531.  
Wang X J, Tian Y, Liu Y, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Osteoglossum bicirrhosum*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(4): 525-531(in Chinese).
- [14] 庄树文, 吕冬云. 银龙鱼养殖技术与疾病防治[J]. 经济动物学报, 2006, 10(4): 228-230.  
Zhuang S W, Lü D Y. The technique of cultivation and prevention & cure of disease of *Silver arowana*[J]. Journal of Economic Animal, 2006, 10(4): 228-230(in Chinese).
- [15] 唐永凯, 李建林, 俞菊华. 奥利亚罗非鱼*AMH*基因结构及其表达[J]. 水产学报, 2009, 33(3): 379-388.
- Tang Y K, Li J L, Yu J H. Characterization and expression pattern of *Oreochromis aureus* anti-Müllerian hormone (*AMH*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2009, 33(3): 379-388(in Chinese).
- [16] 刘姗姗, 孙冰, 梁卓, 等. 半滑舌鲷抗缪勒氏管激素(*AMH*)基因的克隆及组织表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 35-43.  
Liu S S, Sun B, Liang Z, *et al.* Cloning and expression of anti-Müllerian hormone gene in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 35-43(in Chinese).
- [17] Rodríguez-Marí A, Yan Y L, BreMiller R A, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (*AMH*) relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development[J]. Gene Expression Patterns, 2005, 5(5): 655-667.
- [18] 曾文刚, 刘振浩, 李红, 等. 金钱鱼抗缪勒氏管激素基因克隆及其在性腺发育不同时期mRNA表达水平的分析[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1604-1612.  
Zeng W G, Liu Z H, Li H, *et al.* Gene cloning of anti-Müllerian hormone and analysis of its mRNA level in *Scatophagus argus* at the different development stages of gonad[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1604-1612(in Chinese).
- [19] 陈彩芳, 温海深. P450c17s基因mRNA在雄性半滑舌鲷繁殖周期中的表达[J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1019-1025.  
Chen C F, Wen H S. The characteristic analysis of P450c17s mRNA expression during the reproductive cycle in male *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(7): 1019-1025(in Chinese).
- [20] 田焱, 张丙龙, 常亚青. 仿刺参性别相关基因*P450c17*的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 22-32.  
Tian Y, Zhang B L, Chang Y Q. Cloning and bioinformatics analysis of aromatization gene *P450c17* in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 22-32(in Chinese).
- [21] Kishida M, Callard G V. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen

- regulated during early development[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(2): 740-750.
- [22] Bjerselius R, Lundstedt-Enkel K, Olsén H, *et al.* Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 $\beta$ -estradiol[J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 53(2): 139-152.
- [23] Trant J M, Gavasso S, Ackers J, *et al.* Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 290(5): 475-483.
- [24] Rouiller-Fabre V, Carmona S, Merhi R A, *et al.* Effect of anti-Müllerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(3): 1213-1220.
- [25] Wang X G, Orban L. Anti-Müllerian hormone and 11 $\beta$ -hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males[J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(5): 1329-1338.
- [26] 曾祖聪, 曹建萌, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 *LrrG-Sip* 融合基因原核表达载体的构建及表达[J]. *南方水产科学*, 2014, 10(5): 17-23.
- Zeng Z C, Cao J M, Lu M X, *et al.* Construction and expression of prokaryotic expression vector for *LrrG-Sip* fusion gene of *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(5): 17-23 (in Chinese).

## Molecular cloning, expression pattern and prokaryotic expression of anti-Müllerian hormone (*amh*) gene in *Osteoglossum bicirrostum*

WANG Qielu<sup>1,2</sup>, LIU Yi<sup>1</sup>, SONG Hongmei<sup>1</sup>, WANG Xuejie<sup>1</sup>, LIU Chao<sup>1</sup>,  
MU Xidong<sup>1</sup>, HU Yinchang<sup>1</sup>, LUO Jianren<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation,  
Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to explore the function and expression pattern of anti-Müllerian hormone (*amh*) gene in *Osteoglossum bicirrostum*, this study cloned the whole cDNA of *amh* gene in *O. bicirrostum* using RACE method, and found that *O. bicirrostum* had two different hypotypes—*amh1* and *amh2* (Genbank no.: KU378662, KU378663) of this gene. The result of sequence analysis showed that *Amh1* had the full-length of 2277 bp, and encoded 623 amino acids; *Amh2* had the full-length of 2181 bp, and encoded 355 amino acids. The homology analysis showed that the *Amh* in *O. bicirrostum* shared little conservation, and the similarity compared with its coordinial *Scleropages formosus* was the highest (85.64%), but that with fishes in other families was lower than 42%. Phylogenetic analysis showed that *Amh* came to be a cluster with Osteoglossiformes *Amh* and was closely related with lower teleost species such as Clupeiformes and Cypriniformes, which agreed with the evolutionary position of *O. bicirrostum*. The real-time fluorescent quantitative PCR results showed that *amh* was expressed generally in many tissues. The expression of *amh1* was the highest in the testis, and much higher than that in ovary and other tissues. The expression of *amh2* was also the highest in the testis, and much higher than that in other tissues, but much lower than the expression of *amh1* in the testis. We constructed prokaryotic expression vectors pCold I -*amh1* and pCold I -*amh2*, and successfully induced proteins of 68 and 48 ku in *Escherichia coli*, which laid the foundation for further study of *amh* in *O. bicirrostum*.

**Key words:** *Osteoglossum bicirrostum*; anti-Müllerian hormone; clone; expression analysis; prokaryotic expression

**Corresponding author:** LUO Jianren. E-mail: olfishlo@163.com

**Funding projects:** The Program of the National Science Infrastructure Platform of China (2016DKA30470); Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (2014A030310397)