

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00822

赤点石斑鱼促甲状腺激素 *TSH β* 启动子的克隆及其在斑马鱼胚胎原始性腺和垂体中定位表达

李辰昱 汪洋 周莉 桂建芳

(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: 促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone, TSH)具有调节生长、发育、代谢和生殖的功能,但是在低等脊椎动物中的功能研究较少。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 促甲状腺激素 *TSH β* 除在垂体中表达外还在性腺中表达,进一步发现 *TSH β* 也在赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)性腺中表达。且在人工诱导的赤点石斑鱼中,随着雄性化的转变,*TSH β* 转录水平升高。为研究石斑鱼 *TSH β* 特殊表达方式的调控机制,采用基因组步移技术扩增获得赤点石斑鱼 *TSH β* 5'端序列共 5112 bp。将 1864 bp 核心片段顺向克隆到 pBK-TOL2 载体中,p*TSH β* -TOL2 重组质粒与转座酶 mRNA 共注射斑马鱼一细胞期受精卵。Western blot 结果显示,在受精后 10h 的尾芽胚中可检测到 GFP 的表达,胚体晚期 GFP 表达量最高。荧光显微镜追踪观察发现,受精后 12—30hpf (Hours post fertilization)观察到 GFP 在原始生殖细胞(PGC)区域表达;36hpf—7dpf 观察到 GFP 除在 PGC 区域表达外还在垂体中表达。由此可见,赤点石斑鱼 *TSH β* 5'端 1864 bp 的序列具有特异定位的启动子活性。

关键词: 石斑鱼; *TSH β* ; 启动子; GFP; PGC

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)04-0822-06

早在 1920 年,促甲状腺激素(Thyroid-stimulating hormone, TSH)已被发现具有促进甲状腺生长的功能^[1,2];后经研究显示,TSH 为 28—30 kD 的糖蛋白,由 α 和 β 两个独立亚基构成^[3]。 α 亚基非常保守,而 β 亚基的功能随物种特异^[4]。在哺乳动物中,垂体分泌 TSH,一方面受下丘脑分泌的促甲状腺激素释放激素(Thyrotropin-releasing hormone, TRH)的促进影响,另一方面又受到甲状腺素(Thyroid hormone)反馈性的抑制影响^[5,6],二者互相拮抗,组成下丘脑-垂体-甲状腺轴。TSH 通过调节甲状腺的生长和功能进而调节生长、发育、代谢和生殖^[7—11]。*TSH β* 和其受体在哺乳动物中已被深入研究,但在低等脊椎动物中还鲜有报道。

赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*) 隶属于属鳍科(Serranidae)

石斑鱼属(*Epinephelus*)。由于生长快、食物转化迅速以及市场销售价格高,因而潜力巨大^[12];同时人工繁殖与育苗技术难度也较大^[13]。最近几年,虽然在人工繁育方面已经取得初步成果,但离稳定批量生产种苗的目标尚有相当差距^[14]。低等动物中存在一些性反转现象^[15],石斑鱼个体发育过程中存在先雌后雄的性反转现象。尽管已经进行了一些繁殖生物学研究以及运用激素诱导石斑鱼性反转的实验^[16],但主要集中于性腺组织学的研究^[17],对性反转的分子机制知之甚少。揭示石斑鱼性反转的分子机制,发展生殖调控的高新技术,是解决制约石斑鱼养殖业发展瓶颈的关键之一^[18]。为此,我们实验室已经从斜带石斑鱼和赤点石斑鱼中鉴定了多个重要的与性别分化和性反转相关的基因,如 *TSH β* ^[19], *GTH α* , *FSH β* and *LH β* ^[20], *Sox3*^[21], *Dmrt1*^[22]和 *Cyp19a1a*^[23]

收稿日期: 2009-05-31; 修订日期: 2010-01-08

基金项目: 国家 973 计划项目(NO.2004CB117401); 国家自然科学基金(NO.U0631007)资助

作者简介: 李辰昱(1982—), 男; 硕士; 主要从事鱼类发育遗传学研究。E-mail: lcy253@gmail.com

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

等, 并对这些基因进行了表达特征和内分泌调控机制研究^[24]。

有趣的是, 我们在研究斜带石斑鱼 *TSH β* 时, 首次发现其 *TSH β* 除在垂体中表达外还在性腺中表达, 且随着雄性化的转变, *TSH β* 转录水平升高^[19]。为进一步探讨 *TSH β* 与性腺发育的关系, 本研究试图从赤点石斑鱼中克隆鉴定 *TSH β* 的启动子, 并采用绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因, 利用显微注射的方法, 获得了赤点石斑鱼 *TSH β* 启动子驱动 GFP 在原始性腺和垂体中特异表达的斑马鱼, 验证了石斑鱼 *TSH β* 既在垂体也在性腺中表达。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼

实验用斑马鱼(*Danio Rerio*)为 AB 品系, 由本实验室养鱼房饲养。喂养方案按照 Zebrafish Book 描述进行^[25]。照明 14h、黑暗 10h 交替, 雌雄两组分别饲养, 定时喂以饵料。获取胚胎将一雌三雄混合, 收集的胚胎培养于 28.5℃ 隔水式培养箱中, 按已描述的形态特征区分发育阶段^[26]。

1.2 克隆启动子序列

用 Genome Walker 试剂盒(Clontech), 以基因特异引物 GSP1 和人工接头引物 AP1 对 *TSH β* 基因的启动子进行扩增, 首轮 PCR 扩增的参数为: 94℃ 变性 25s, 72℃ 延伸 4min, 7 个循环后改为 94℃ 变性 25s, 67℃ 延伸 4min, 继续进行 32 个循环终止。将第一轮 PCR 产物稀释 50 倍, 取 1 μ L 作为第二轮 PCR 反应的模板, 用基因特异引物 GSP2 和人工接头引物 AP2 进行 PCR 反应, 同样的方法共经过 5 轮的扩增后, 获得石斑鱼 *TSH β* 启动子片段, 进行鉴定和测序。

1.3 引物设计及载体构建

用于构建载体 F 引物设计 *Kpn* 酶切位点, R 引物设计 *Xho* 酶切位点。启动子片段(-1864—-1 bp) 顺向插入到 pBK-TOL2 载体 *Kpn* 和 *Xho* 位点间,

得到 pTSH β -TOL2 重组质粒。

1.4 显微注射

收集斑马鱼受精卵若干, 用 0.25% 胰酶溶液脱膜, 将质粒与转座酶 mRNA 共注射于一细胞期受精卵动物极区域中, 每个胚胎大约注射 80 pg 质粒, 10 pg 转座酶 mRNA。注射后的鱼卵于 Holtfreter 液中继续培养。显微注射后的胚胎在 Leica 荧光显微镜下定期观察, 照像。

1.5 Western blot

显微注射后 8、10、12、24、36、48h 取样, 每个时期取 30 个胚胎, 使用 deoyolk buffer 去卵黄, 300 r/min 离心收集沉淀, -80℃ 冻存。蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶(溶于 TBST 中)封闭 1h, 以 1:500 比例加入抗 GFP 抗体, 室温反应 1h。TBST (25mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150mmol/L NaCl, 0.1% Tween20) 洗涤 3 次, 1:1000 加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体(Vector), 室温 1h, 洗去二抗后在 BCIP/NBT (Promega) 底物中显色。以抗 β -actin 抗体(Santa Cruze) 检测各样品中 β -actin 的表达为内参。

2 结 果

2.1 赤点石斑鱼 *TSH β* 启动子的克隆和分析

通过 Genome Walker 技术, 经过五轮 PCR 扩增后, 获得 5.1 kb 条带, 凝胶回收后连入 pGEM-T Easy (Promega)。双向测序得到 5112 bp 的 *TSH β* 启动子片段(图 1), 用 TESS 软件(<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/>)分析这段序列中所含的顺式作用元件, 发现 CTCF、PPAR、HNF-3、GATA-1、MBF-1 等转录因子结合位点(图 1)。

2.2 Western blot 检测

共注射 pTSH β -TOL2 质粒和转座酶 mRNA 后 8、10、12、24、36、48h 取样, 每个时期取 30 个胚胎, 以 GFP 抗体检测胚胎内 GFP 蛋白表达情况, 以各样品中 β -actin 的表达为内参。GFP 蛋白分子质量

表 1 实验所用引物序列
Tab. 1 Primers used for all the experiments

| 引物 Primers | 序列 (5'-3') Sequences | 作用 Function |
|------------|-----------------------------|--------------|
| TSHpF | GGT ACC CTATAAAGATCAGCTCACG | Gene cloning |
| TSHpR | CTCGAGGTTGAGCAATGGTATTTTCC | Gene cloning |
| GFP-F | GGTCCTTCTTGAGTTTGTAAC | Gene cloning |
| GFP-R | CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG | Gene cloning |

```

-1891 GAGACAGT TTAACCAGT GCCACTG CAAATCTCAGAGTGTATGAAGCACTCCGATGCTTTCGGCAGACTATAAAGATCAGCTCACGTAGTAAATAATCCATCAAG
-1786 GACACACAGCATTGAGGACAGCCATAAATTCAGTGATAGTAAAAAGTGATGCCAGTGGTTTCTCTGATGACAAACAAGAGACTTCCTGTTGTCAGAGCTCT
-1681 TCATTCCTCAATGAAATGGTGTGACAAAATCAGGAGTGGTCTTTATACAACCCAGGTTACTCTGTAGTGTGATTATCTAAGTAATTAAGGAGCCAGGCGAGT
-1576 TAAACCTTAATGATTGGGTCACCTTTGGGTCATGTGATTTGAAAACTCACAATGTGACGACTTTTGAAAAATATTGCAGATAAGAAGGAGAGTAGGCGTTA
-1471 GCTGTGGACCTGTACGCTAGCAGATACTAAGTGTCTGACTTGTATTAGTAACTAATATAGTTGGATTTAAGGTTCTGATTTGTAAAGTCAGTCTTGATG
-1366 AGAAAAATGAGTTCTGGTCAAAATCTTAAAAAAGTAAATGTAATAATGGCTCATACTGTTAATTATTGTAAGGTGAGTAGGAGCTGGGAGAAGGAATGAGCTGCT
-1261 AAAAGGAACAATAACTGACGGTATCATAGTATTCTTTGAGCGTCATTCTGCTCAGTACAGATTAACTCATCACCAGAGAATGACAGTGTGCATTGTAATAAT
-1156 GGTAACTGTTATAAGATGAGGGGTAATAATTCAGTAAGAAGTACTGTGATTGAAATGAACAAGAAATCCATCTGCCCTTTGATTTGTGAGATAATCCAGTTCATG
-1051 GCACAAAGAGGAATGGCAAGAAACCCACTGAACTATAAATGAAGATGAAGAAAAACAGCCACATGGCTAAACCTATCAGAGACTTTGACTACCCCTCAACAATCAC
-946 ACATGAATATAGACAAGGATACACCTGCAGCTAGCAGGGTTGGCAGGGGGAATGATACTCTTCACTCCTCAAGCCAAAGTACTGCCTTGTGAGAAGTTGAAATG
-841 CTCATCTTCAGAAATTTGATGTTAGAAAATGAATGCTACTGTCCACAACAGTAGTTTTTAATTTACTTACTTTGAGAGCTGATGAGATAAACCTGCTCCGAATGT
-736 TTTCCACCCTTGTTCAGGACATGTTGGACTGTGACAGTTTTTAAACATTTTCATGTTTACATTTGCTGACTGGTGTAGATTTTGTCCACCAAGTGCACAAAATCA
-631 TCATTTTGCACAGCCACATGAAGTCTCTGAACTGACTCAGACAACAAGACTGCTTTTCCCTCTTAATTTTACCCAAATGCAAGACAGATAAGTTAAACTCA
-526 GGTCAAAATTAAGTGGCTCTTTGTAATAATGCAATCTTCCAGCAGAAATTAAGCTTTTAGGCATTTGTGAACAGTGGACACAGTTTGGACCCTTTGAAA
PPAR NP-TC II HOXD8 MBF-1
-421 GAATGACATGCTGAGTTGCACACAGGGTCTGCTGGTGCAGAATCCATTGTGTAGATTTCCCTGGTGTATTAACTTCATGAGGGAATCATAATTCATG
HNF-3 GT-1
-316 TCATCCACTAAATGGACTAAAAGTTCCAGTCTTCTTGTCTGCACAGATAGAAGATAGCTGCTACCTGGATACAGTGGGATTACATAATGTTTGTATAAACTAGT
TF II D
-211 CTCAGGGGATGTTACAGACTCACAGCATATTAGGCCCTGAGGTGCCCTCAGGCTCTAGAGCAGGTATTACACACGAGAGGGGAAGAAATATATTTAAGA
LVc HSTF
-106 TACTAACTTTTACCCTCTCTGTTATCTGGTTGTCAGTTTGTGTCTTATCTTTCCCTCCATGCAGGTCCAAAATGACTGGGAAAAATACCATTGCTCAAC
CTCF GATA-1 GATA-1 CTCF
1 ATGAAAAGTGCAGTGTCTCTGCTGGCTCCTTTTCTGATGTTTCCAGCCAGCTGTTCCCATGTTTACCCTGACTTCACCCTGTATGTTGGAGAGCCAGAG
106 TGCAGTCTGTGTGGCCATCAATACGACCATGTCATGGGCTTCTGCTACTCAAGGGTATGTATGCCAGACTGCTTTTCATT

```

图 1 石斑鱼 *TSHβ* 启动子序列

Fig. 1 Sequence of the promoter regions of *Epinephelus akaara TSHβ* gene
起始密码子 ATG 用黑框标出, 转录因子结合位点用下划线标出

The first ATG codon are boxed. Sequences of the putative binding sites of the transcription factors are underlined

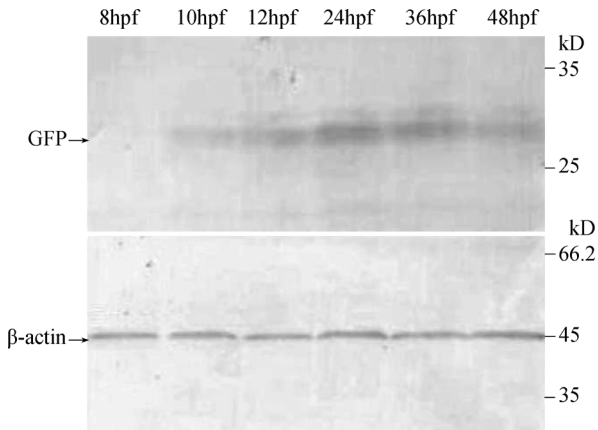


图 2 Western blot 检测胚胎中 GFP 蛋白

Fig. 2 Western blot analysis of GFP protein expression in different stage embryos

为 27 kD, 内参 β -actin 蛋白分子质量为 45 kD。检测结果(图 2)表明: 在受精后 10h 的尾芽胚中可检测到 GFP 的表达, 体节期表达量显著增加, 胚体晚期 GFP 表达量最高。

2.3 赤点石斑鱼 *TSHβ* 启动子驱动 GFP 在斑马鱼胚胎和幼鱼中表达

共注射 pTSH β -TOL2 质粒和转座酶 mRNA,

荧光显微镜观察到 GFP 在斑马鱼胚胎表达。斑马鱼胚胎 12、16、18、24、30、3、48hpf (Hours post fertilization) 分别处于胚胎发育的 6 体节期、14 体节期、18 体节期、prim-6 期、prim-16 期、long pec 期。追踪观察发现, 受精后 1h 即可见 GFP 表达(图 3A), 18hpf 可见 GFP 表达于卵黄与背部之间(图 3C), 12—30hpf GFP 表达于原始生殖细胞(Primordial germ cell, PGC)区域(图 3A-E), 36hpf—7dpf GFP 除在 PGC 区域表达外还在部分胚胎垂体中表达(图 3F-I)。

2.4 GFP 在垂体和 PGC 区域表达的统计分析

共注射 pTSH β -TOL2 质粒和转座酶 mRNA 36h 后, 观察到 GFP 除在 PGC 区域中表达外, 还在部分胚胎垂体中表达(图 4), 统计结果(表 2): 90.9% 以上胚胎观察到 GFP 特异表达, 其中 GFP 在只在 PGC 区域表达的胚胎(图 4A)为 58.6%, 在垂体和 PGC 区域都表达的胚胎(图 4B)为 27.8%, GFP 在只在垂体中表达的胚胎(图 4C)为 4.5%。结果表明石斑鱼 *TSHβ* 启动子主要驱动 GFP 在 PGC 区域特异表达, 同时也在垂体中表达。

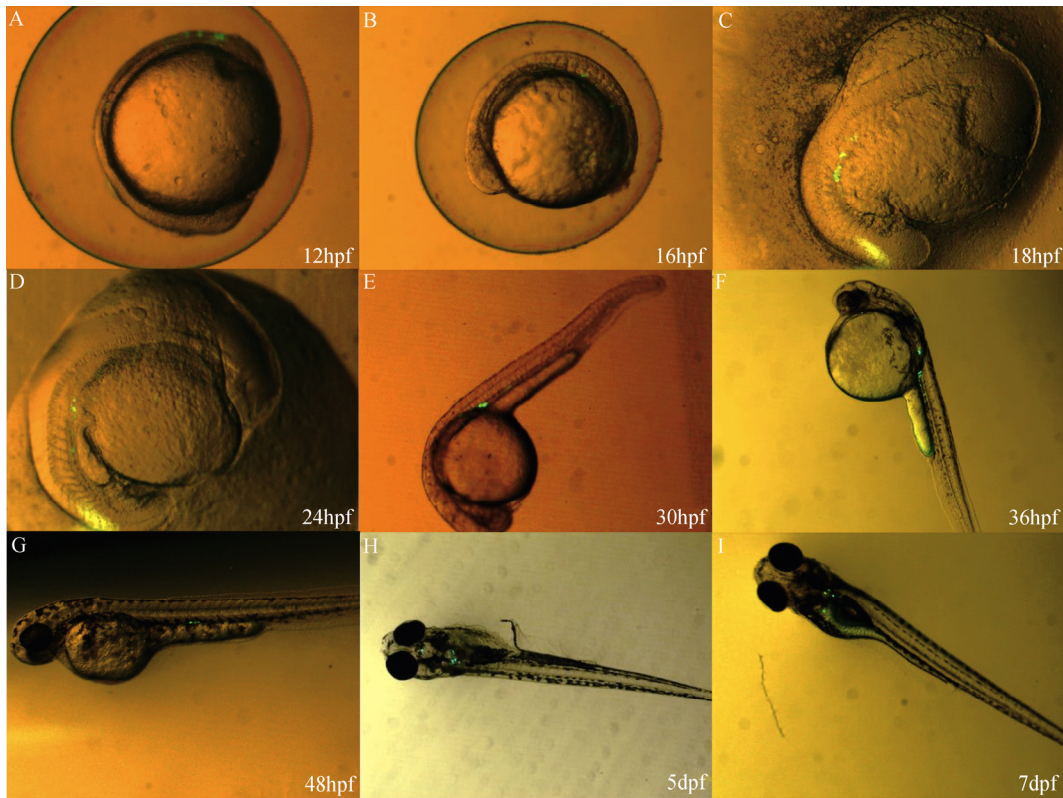


图 3 GFP 在斑马鱼不同发育时期胚胎和幼鱼中表达

Fig. 3 Lateral view of GFP expression in zebrafish at different developmental stages

A. 受精后 12h; B. 受精后 16h; C. 受精后 18h; D. 受精后 24h; E. 受精后 30h; F. 受精后 36h; G. 受精后 48h; H. 受精后 5d; I. 受精后 7d
A. 12 hours postfertilization (hpf); B. 16 hpf; C. 18 hpf; D. 24 hpf; E. 30 hpf; F. 36 hpf; G. 48 hpf; H. 5days postfertilization (dpf); I. 7 dpf

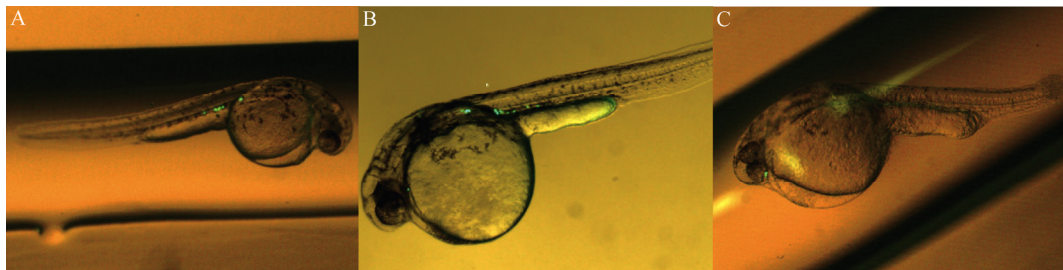


图 4 *TSH β* 启动子驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼胚胎中表达

Fig. 4 Expression of GFP in zebrafish embryos directed by *TSH β* promoter

A. GFP 只在 PGC 区域表达; B. GFP 在垂体和 PGC 区域都表达; C. GFP 只在垂体表达

A. GFP expression in the PGC; B. GFP expression in the pituitary and PGC; C. GFP expression in the pituitary

表 2 显微注射 pTSH β -TOL2 载体 36h 后 GFP 在 PGC 区域和垂体中表达数目和比例

Tab. 2 The percentage and number of expressed GFP in 36 hpf Embryos Injected with Construct pTSH β -TOL2

| 克隆 Clone | 总胚胎(次) Total Embryos (times) | GFP 表达 GFP expression (%) | 只 PGC 区域表达 GFP expression in the PGC (%) | PGC 区域和垂体中都表达 GFP expression in the pituitary and PGC (%) | 只垂体中表达 GFP expression in the pituitary (%) |
|--------------------|---------------------------------|------------------------------|---|--|---|
| pTSH β -TOL2 | 133 (3) | 121 (90.9%) | 78 (58.6%) | 37 (27.8%) | 6 (4.5%) |

3 讨论

自 1920 年首次发现促甲状腺激素能促使甲状腺合成并分泌甲状腺激素以来^[1,2], 人类开展了一系

列的研究工作。在哺乳动物中其调控通路研究已有一定研究^[5,6]。近来, 在一些脊椎动物中, *TSH* 基因已经被克隆和鉴定^[27]。然而, 在低等脊椎动物尤其

是鱼类中, *TSH* 基因的功能和调控机制知之甚少^[28]。本实验室汪洋等在研究斜带石斑鱼 *TSH β* 时, 首次发现其 *TSH β* 除在垂体中表达外还在性腺中表达, 进一步发现 *TSH β* 也在赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 性腺中表达。且在人工诱导的赤点石斑鱼中, 随着雄性化的转变, *TSH β* 转录水平升高^[19]。为进一步探讨 *TSH β* 与性腺发育的关系, 本研究从赤点石斑鱼中克隆鉴定 *TSH β* 的启动子, 并采用绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因, 利用显微注射的方法, 获得了赤点石斑鱼 *TSH β* 启动子驱动 GFP 在原始性腺和垂体中特异表达的斑马鱼, 验证了石斑鱼 *TSH β* 既在垂体也在性腺中表达的发现。石斑鱼 *TSH β* 基因及其启动子在性腺中的独特表达特征, 意味着 *TSH β* 在石斑鱼的早期生殖调控中可能具有特殊的作用。

追踪观察发现, 受精后 12h 即可观察到绿色荧光, 持续到 7d 仍可稳定观察到。12—30hpf 绿色荧光位于 PGC 区域, 36hpf—7dpf 除在 PGC 区域外还在垂体中观察到绿色荧光。采用 Western blot 的方法检测更早期的胚胎中的 GFP 蛋白, 结果表明: 受精 10h 后尾芽期即检测到 GFP 的表达, 体节期表达量显著增加, 胚体晚期表达量最高。而斑马鱼胚胎 PGC 形成和迁移位于十个体节到 24hpf 时期, 斑马鱼垂体形成和迁移位于 26—48hpf 时期。这说明石斑鱼 *TSH β* 启动子驱动 GFP 在斑马鱼胚胎的表达与斑马鱼 PGC 和垂体形成和迁移的过程同步。推测 *TSH β* 启动子与斑马鱼早期性腺发育和垂体发育可能相关。

1.8 kb 的 *TSH β* 启动子核心片段具有特异定位的启动子活性, 软件预测发现在-1844—-1 启动子片段范围内包含一系列转录因子结合位点, 其中包括 CTCF、PPAR、HNF-3、GATA-1、MBF-1 等。*TSH β* 启动子的表达与哪种特异的转录因子相互作用仍有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Magner J A. Thyroid stimulating hormone: biosynthesis, cell biology, and bioactivity [J]. *Endocrine Reviews*, 1990, **11**: 354—385
- [2] Magner J A. Biosynthesis, cell biology, and bioactivity of thyroid-stimulating hormone. In: Braverman L E, Refetoff S (Eds.), *Endocrine Reviews Monographs* [M]. The Endocrine Society, Rockville, MD. 1994, 3
- [3] Hsieh Y L, Chatterjee A, Lee G, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for thyroid-stimulating hormone β -subunit of Muscovy duck [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, **120**: 336—344
- [4] Que'rat B. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In: Davey K G, Peter R E, Tobe S S (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology* [M]. National Research Council of Canada, Ottawa. 1994, 27—35
- [5] Denver R J. Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis [J]. *American Zoologist*, 1997, **37**: 172—184
- [6] Grossmann M, Weintraub B D, Szkudlinski M W. Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family [J]. *Endocrine Reviews*, 1997, **18**(4): 476—501
- [7] Gorbman A, Dickhoff WW, Vigna S R, *et al.* The thyroid gland. In: Gorbman A, Dickhoff W W, Vigna S R, *et al* (Eds.), *Comparative Endocrinology* [M]. Wiley, USA. 1983, 185—275
- [8] Vassart G, Dumont J E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth [J]. *Endocrine Reviews*, 1992, **13**: 596—611
- [9] Nagayama Y, Rapoport B. The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insights after its molecular cloning [J]. *Molecular Endocrinology*, 1992, **6**: 145—156
- [10] Vassart G, Parma J, Van Sande J, *et al.* The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. In: Braverman L E, Refetoff S (Eds.), *Endocrine Reviews Monographs* [M]. The Endocrine Society, Rockville, MD. 1994, **3**: 77—80
- [11] Kohn L D, Shimura M, Shimura Y, *et al.* The thyrotropin receptor [J]. *Vitamins & Hormones*, 1995, **50**: 287—384
- [12] Boonyaratpalin M. Nutritional requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia [J]. *Aquaculture*, 1997, **151**: 283—313
- [13] Yao B, Zhou L, Gui J F. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *sox3* gene in grouper *Epinephelus coioides* [J]. *High Technology Letters*, 2003, **13**(5): 74—81 [姚波, 周莉, 桂建芳. 斜带石斑鱼 *sox3* 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯, 2003, **13**(5): 74—81]
- [14] Zhao H H, Liu X C, Liufu Y Z, *et al.* Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, **42**(6): 56—59, 63 [赵会宏, 刘晓春, 刘付永忠, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42**(6): 56—59, 63]
- [15] Yu F F, Yu X Y, Wang M F, *et al.* Sex reversal phenomena in bivalves and its mechanism [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 576—580 [于非非, 余祥勇, 王梅芳, 等. 双壳类的性转换现象及其机理探讨. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 576—580]

- [16] Fang Y Q, Lin Q M, Qi X, *et al.* Effects of 17 α -methyltestosterone on sex reveal in *Epinephelus akaara* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, **16**(2): 171—174 [方永强, 林秋明, 齐襄, 等. 17 α 甲基睾酮对赤点石斑鱼性逆转的影响. 水产学报, 1992, **16**(2): 171—174]
- [17] Yeh S L, Kuob C M, Tingc Y Y, *et al.* The effects of exogenous androgens on ovarian development and sex change in female orange spotted protogynous grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Aquaculture*, 2003, **218**(4): 729—739
- [18] Lin H R. The sustainable exploitation of marine fish resources and the research directions of science and technology for marine fish [J]. *Engineering Science*, 2003, **5**(3): 27—30 [林浩然. 海洋鱼类资源的可持续利用和海洋鱼类科学技术的研究方向. 中国工程科学, 2003, **5**(3): 27—30]
- [19] Wang Y, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential expression of thyroid stimulating hormone subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, **220**: 77—88
- [20] Li C J, Zhou L, Wang Y, *et al.* Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common α , FSH β and LH β in groupers [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, **233**: 33—46
- [21] Yao B, Zhou L, Wang Y, *et al.* Differential expression and dynamic changes of SOX3 during gametogenesis and sex reversal in protogynous hermaphroditic fish [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2007, **307A**: 207—219
- [22] Xia W, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, **263**: 156—172
- [23] Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (Cyp19a1a) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, **307**(1-2): 224—236
- [24] Zhou L, Gui J F. Molecular mechanisms underlying sex change in hermaphroditic groupers [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, available online
- [25] Westerfield M. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*) [M]. 4th. Eugene: University of Oregon Press. 2000. 1—27
- [26] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, **203**(3): 253—310
- [27] Martin S A M, Wallner W, Youngson A F, *et al.* Differential expression of Atlantic salmon thyrotropin β -subunit mRNA and its cDNA sequence [J]. *Journal of Fish Biology*, 1999, **54**: 757—766
- [28] Cyr D G, Eales J G. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1996, **6**: 165—200

CLONING OF RED-SPOTTED GROUPE *TSH β* PROMOTER AND ITS LOCALIZATION EXPRESSION IN PRIMITIVE GONAD AND PITUITARY OF ZEBRAFISH EMBRYOS

LI Chen-Yu, WANG Yang, ZHOU Li and GUI Jian-Fang

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Thyroid-stimulating hormone (TSH) regulates the growth and function of thyroid for formation of thyroid hormones, which are involved in regulation of growth, development, metabolism and reproduction. *TSH β* and their thyroidal receptors have been investigated extensively in mammals, but comparative studies were considerably less in lower vertebrates. Our lab had cloned and characterized the full-length cDNA encoding thyroid-stimulating hormone β -subunit (*TSH β*) from orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), and first reported *TSH β* expressed in the gonads of any vertebrates in addition to the expected expression in the pituitary. Further analysis found that *TSH β* also expressed in the gonads of the red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). To elucidate the mechanisms regulating *TSH β* expression, we isolated a 5.1kb fragment of the 5'-flanking region of *TSH β* promoter from red-spotted grouper by Genome walking. 1.8 kb of this upstream region was used to produce GFP reporter construct (pBK-TOL2) for analysis of tissue-specific expression in zebrafish embryos. During 12—30hpf stage, GFP expressed in the PGC; 36hpf—7dpf stage, GFP expressed not only in the PGC but also in pituitary. Western blot analysis showed that GFP protein was detected early in the 10hpf stage embryos.

Key words: Grouper; *TSH β* ; Promoter; GFP; PGC