

# 性成熟雌性牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)新型膜孕激素受体(mPRL)的定性定量表达分析\*

史 宝<sup>1,2</sup> 柳学周<sup>1,2①</sup> 徐 涛<sup>3</sup> 李晓妮<sup>1,2</sup> 徐永江<sup>1,2</sup> 张金勇<sup>1,2</sup>

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室  
海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 山东省渔业技术推广站 济南 250013)

**摘要** 在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)繁殖周期, 新型膜孕激素受体基因(mPR-Like, *mPRL*)在脑-垂体-性腺轴的表达变化规律与性腺发育成熟密切相关。为进一步研究牙鲆 *mPRL* 作用机制, 本研究对其 mRNA 和蛋白的表达特征进行了分析。应用实时定量 PCR 方法分析 *mPRL* mRNA 在卵子形成过程中的时序表达, 发现牙鲆 *mPRL* mRNA 相对表达量的最高值出现在性成熟阶段卵巢的 V 时相卵母细胞。原位杂交分析 *mPRL* mRNA 在繁殖相关组织中的细胞学定位, 发现 *mPRL* mRNA 主要分布在牙鲆性成熟阶段卵巢的卵母细胞膜上; 在脑组织的神经元附近区域 *mPRL* mRNA 阳性信号也较强。制备牙鲆 *mPRL* 的多克隆抗体, 采用 Western blotting 方法检测牙鲆 *mPRL* 蛋白在不同组织的表达特性, 发现 *mPRL* 蛋白表达量在卵巢和脑组织中相对较高, 在肝脏、头肾、肾脏中表达量相对较少。免疫组化结果显示, 牙鲆 *mPRL* 蛋白在卵巢和脑组织的细胞学定位与 *mPRL* mRNA 定位一致。牙鲆 *mPRL* 在繁殖相关组织的表达特征说明其参与卵母细胞成熟的过程, 并通过内分泌方式参与牙鲆的繁殖调控。

**关键词** 牙鲆; 新型膜孕激素受体; mRNA 表达; 蛋白表达

**中图分类号** S197.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)01-0018-07

在高等哺乳动物中, 关于膜孕激素受体(mPRs)组织表达和生理学作用研究较多, 而对低等脊椎动物膜孕激素受体表达特征和组织定位研究较少(Hasegawa *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2008; 史宝等, 2013)。孕激素参与繁殖的所有环节, 但在繁殖相关器官卵巢、精巢和脑等的作用机制尚不清楚, 多种受体参与孕激素信号传导, 并且由于高等动物的生殖系统复杂, 使得相关的研究不易于开展(Mulac-Jericovic *et al*, 2004; Fernandes *et al*, 2005)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)人工繁育技术成熟、怀卵量大, 是研究孕激

素调控繁殖机制很好的实验材料。鱼类卵母细胞在卵黄生成阶段完成后体积增大, 停滞在有丝分裂前期。大量分泌的促性腺激素刺激卵巢滤泡细胞释放成熟诱导类固醇激素即孕激素, 孕激素促使鱼类卵母细胞减数分裂重新开始, 与膜孕激素受体结合, 促进卵母细胞成熟(Nagahama *et al*, 2008)。

膜孕激素受体具有和 G 蛋白偶联受体(GPCRs)相似的跨膜结构域, 但是, 膜孕激素受体属于孕激素脂联素受体家族(PAQR)成员(Tang *et al*, 2005)。孕激素相关的膜受体主要包括膜孕激素受体(mPR $\alpha$ 、

\* 国家自然科学基金项目(31201982)、国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW042)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31201982), China Agricultural Research System (CARS-50) and Shandong Youth Scientist Awards Foundation (BS2013SW042)]. 史 宝, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2015-12-13, 收修修改稿日期: 2016-01-12

mPR $\beta$  和 mPR $\gamma$ )和孕酮受体膜组成部分(PGMRCs)等, 该受体家族在诱导鱼类和两栖类卵母细胞成熟、哺乳动物分娩等过程中发挥重要作用(Karteris *et al*, 2006; Josefsberg Ben-Yehoshua *et al*, 2007)。在牙鲆中, 文献曾报道了 PAQR 家族一个新成员(mPR-Like, mPRL); 组织特异性表达分析显示, mPRL mRNA 在牙鲆卵巢、精巢、脑等繁殖相关器官表达丰富; 在牙鲆精巢和卵巢发育 期时, mPRL mRNA 表达水平逐步升高并在 期达到整个繁殖期最大值( $P < 0.05$ ), 从 期到 期, mPRL 转录水平下降, 该基因相对表达量变化与性腺发育状态密切相关; 但 mPRL 的蛋白结构和精确作用机制等仍不清楚(史宝, 2010<sup>1</sup>); 李晓晓, 2013<sup>2</sup>)。本研究采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、免疫印迹和免疫组织化学方法, 在 mRNA 和蛋白质水平揭示牙鲆 mPRL 的表达特性和细胞学定位, 为揭示牙鲆 mPRL 的表达特征、探讨其调控卵母细胞成熟机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验鱼和组织准备

实验用牙鲆雌鱼采自山东青岛忠海水产有限公司, 为野生亲鱼自然产卵后人工育苗得到的健康苗种, 经室内人工养殖达到性成熟的 F<sub>1</sub> 代亲鱼。牙鲆雌鱼全长为 40–60 cm, 体重为 1428.7–2508.3 g。其培育条件: 全年开放流水培育, 水温为 8–25℃, 盐度为 27–31, pH 为 7.8–8.4, 溶解氧 > 5 mg/L。在牙鲆繁殖季节, 挑选腹部膨大、松软的亲鱼, 使用 MS-222 麻醉雌鱼后解剖。按照牙鲆卵巢发育的组织学特征, 在显微镜下将卵母细胞按时相分类取样, 从发育 期卵巢分离到 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞, 用液氮将卵母细胞速冻并在 -80℃ 保存, 用于总 RNA 提取。雌鱼麻醉后解剖, 留取各组织样品, 在 4℃ 条件下, 4%多聚甲醛[溶于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中]固定 20 h, 梯度甲醇(25%、50%、75%和 100% 甲醇溶于 0.01 mol/L PBS)脱水, 在 -20℃ 保存于甲醇中的样品, 一部分用于免疫组化, 一部分用于原位杂交; 部分性腺组织用 Davidsens AFA 固定, 用于检验性腺发育状况; 使用液氮速冻后保存在 -80℃

的组织样品, 用于总蛋白的提取。

### 1.2 实时荧光定量 PCR 检测

对牙鲆 mPRL mRNA 在不同发育阶段卵母细胞的表达进行分析。每个卵母细胞发育时相设置 4 个重复, 分别提取 时相、 时相、 时相、 时相和 时相卵母细胞的总 RNA, 进行反转录, 并使用 PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA 第 1 链, 用于基因表达分析。使用  $\beta$ -actin 基因作为 qRT-PCR 的内参基因。牙鲆 mPRL 引物序列为: 5'-CAATCAACGAGGGTGC-GTAAAG-3'(mPRLF)和 5'-AAAGAGAACGGCTTGG-TCACTG-3'(mPRLR);  $\beta$ -actin 引物序列为: 5'-GAAA-TCGCCGCACTGGTT-3'( $\beta$ -actinF)和 5'-GCCCATAC-CCACCATCACTC-3'( $\beta$ -actinR)。qRT-PCR 反应体系(20  $\mu$ l): 1  $\mu$ l cDNA 模版, 1.5  $\mu$ l 引物(10  $\mu$ mol/L), 10  $\mu$ l SYBR Premix Ex Taq™ 和 6  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O。采用两步法 PCR 扩增程序, 反应条件: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 18 s 共 40 个循环。qRT-PCR 反应及信息的收集都在 Mastercycler ep realplex 实时定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)上进行。程序运行完成后进行熔解曲线(Melting curve)分析以确定引物及反应是否正常。每个样品设置 3 个平行孔, 重复 3 次实验, 同时设阴性对照, 以确认实验结果的可靠性。

### 1.3 原位杂交(ISH)

使用正向引物(5'-AAGCTTAGACACCGAGGT-TCCCGCTTAT-3')和反向引物(5'-GAATTCGAGGAT-GGTGGCAACAGGCA-3'), 扩增牙鲆 mPRL 基因(GenBank Accession No. KM507040), 获得 440 bp 的 cDNA 片段。以此为模板, 使用地高辛试剂盒(Roche, 瑞士)体外转录合成正义和反义 RNA 探针。牙鲆卵巢和脑组织在 4%多聚甲醛中固定, 经脱水、透明、包埋、切片。切片经二甲苯处理 2 次, 每次 5 min, 酒精梯度处理, 每次 5 min。PBST 冲洗 3 次, 每次 10 min。蛋白酶 K(10  $\mu$ g/ml) 37℃ 消化 10 min。PBST 冲洗 2 次, 每次 5 min。用预杂交液 70℃ 处理 3 h, 然后加入含有地高辛标记的 RNA 探针的杂交液, 70℃ 杂交 12 h。2 $\times$ SSC 洗涤, 70℃ 孵育 15 min; 0.2 $\times$ SSC, 70℃

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1–176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1–176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1–73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1–73]

孵育 1 h。1×MAB 室温洗涤 5 min。血清室温封闭 6 h。1:500 封闭液稀释的抗体 4℃ 孵育过夜。PBST 室温冲洗 6 次, 每次 15 min; 碱性磷酸缓冲液室温洗涤 (2 次) 每次 10 min。加 20 μl 显色液 (BCIP/NBT) 室温避光显色。PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 终止反应。4%PFA-PBS 固定 10 min, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 酒精梯度脱水、二甲苯透明, 封片, 使用 Nikon E80i 显微镜观察并拍照。

#### 1.4 Western blotting

分析牙鲈 mPRL 蛋白序列, 选择抗原表位, 合成相应的免疫多肽; 多肽常规免疫新西兰大白兔, 制备抗体。冻存的牙鲈卵巢、脑、头肾、肾和肝组织 (约 100 mg), 各加入 1 ml 动物组织蛋白提取试剂, 匀浆、提取组织蛋白。12% SDS-PAGE 电泳检测所提取的蛋白, 并使用蛋白测定试剂盒测定组织总蛋白浓度。统一蛋白上样量为 40 μg。蛋白提取液经 12% SDS-PAGE 胶分离, 电转移到 PVDF 膜上, PBST 洗涤 (2 次) 每次 5 min, 以 5% 脱脂奶粉封闭。一抗用制备的牙鲈 mPRL 多克隆抗体, 稀释度为 1:2000; 二抗用辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 稀释度为 1:2000。DAB 显色, 凝胶成像系统拍照。使用软件对每个泳道的蛋白条带光密度值进行分析。

#### 1.5 免疫组化

组织切片脱蜡复水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 15 min, PBST 洗涤 2 次, 每次 15 min; 3% BSA 室温孵育 1 h, 封闭非特异性反应。滴加牙鲈 mPRL 抗体, 稀释度为 1:1000, 湿盒中室温孵育过夜, PBST 洗涤 5 次, 每次 5 min。利用羊抗兔 IgG (1:1000) 作为阴性对照, 孵育方法相同, 室温孵育 1 h。DAB 显色 1-2 min。苏木精复染、脱水、透明、封片, 使用 Nikon E80i 显微镜观察并拍照。

#### 1.6 统计分析

基因表达实验所得数据用相对定量的 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法 (Livak *et al.*, 2001) 计算后, 使用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行数据处理。P<0.05 为差异显著。相对表达量数据均表示为平均值±标准误 (Mean±SE), 并制成柱状图。蛋白表达水平检测采用 AIC.AlphaView 成像分析系统 (Cell Biosciences Inc) 分析灰度值, 并制成柱状图。

## 2 结果

### 2.1 卵子形成过程中 mPRL 的时序表达

qRT-PCR 的结果显示, 在牙鲈卵巢发育 V 期,

mPRL 基因在卵母细胞不同发育阶段均有表达, 但其表达量有显著差异。mPRL 基因的表达水平从 II 时相到 V 时相卵母细胞持续显著升高, 而在 VI 时相卵母细胞表达水平迅速下降 (P<0.05)。mPRL 基因在卵母细胞成熟阶段表达水平达到峰值, 这表明 mPRL 基因参与卵母细胞的成熟过程 (图 1)。

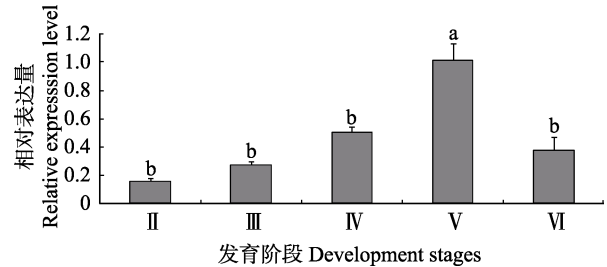


图 1 mPRL mRNA 在牙鲈不同时相卵母细胞的表达  
Fig.1 Relative expression levels of mPRL mRNA at various stages of oogenesis (n=4)

不同字母表示差异显著 (P<0.05), 下同  
Different letters indicated significant different (P<0.05), the same as below

### 2.2 mPRL 基因的细胞学定位

原位杂交分析 mPRL mRNA 在牙鲈繁殖相关组织中的细胞学定位结果显示, 在卵巢和脑组织有明显的杂交信号 (图 2)。在牙鲈发育成熟的卵巢中, mPRL mRNA 在卵母细胞膜上表达丰富 (图 2-A), 将该区域放大, 可观察到较强的阳性信号 (图 2-1), 预示了其作为膜受体行使生理功能。在牙鲈脑组织中, mPRL mRNA 在脑组织神经元表达 (图 2-B), 局部放大后显示阳性信号较强 (图 2-2)。图 2-a 和图 2-b 为相应组织原位杂交分析的阴性对照。

### 2.3 mPRL 蛋白表达量

通过 Western blotting 方法检测牙鲈 mPRL 蛋白在不同组织的表达水平。结果显示, 在卵巢、脑、头肾、肾脏和肝脏检测到蛋白条带, 分子量约为 50 kDa, 比理论值 (40 kDa) 大 (图 3-A)。对照组采用多肽抗原进行 Western blotting, 证实了抗体特异性。牙鲈 mPRL 蛋白表达量在卵巢和脑中相对较高, 在头肾、肾脏和肝脏组织中也有表达, 但表达量相对较少 (图 3-B)。在卵巢、脑和肝脏等多个组织的表达说明, mPRL 在牙鲈多种组织中参与调节孕激素生理功能。

### 2.4 mPRL 蛋白的细胞学定位

免疫组化结果显示, 牙鲈 mPRL 在卵巢和脑的细胞学定位与 mPRL mRNA 一致。在性成熟卵巢组织中, mPRL 主要分布于卵母细胞膜上, 具有较强的免

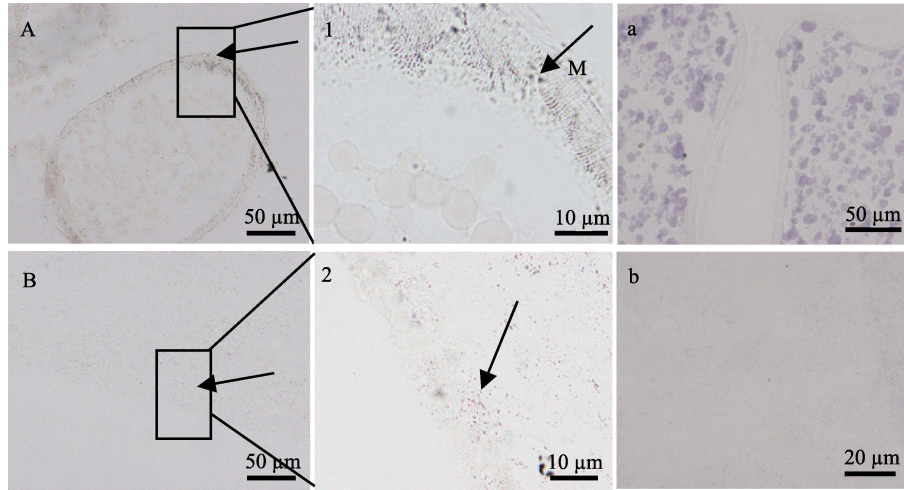


图 2 牙鲆 *mPRL* 基因在卵巢和脑组织中的细胞学定位

Fig.2 Localization of *mPRL* mRNA in ovary and brain tissues of *P. olivaceus* using *in situ* hybridization

A: 卵巢; 1: 卵巢(×1000); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑(×1000); b: 脑对照组;  
M: 卵母细胞膜; 箭头指向为阳性信号位置  
A: Ovary; 1: Ovary (×1000); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain (×1000); b: Negative control of brain;  
M: Oocyte membrane; the arrows indicated the positive reaction

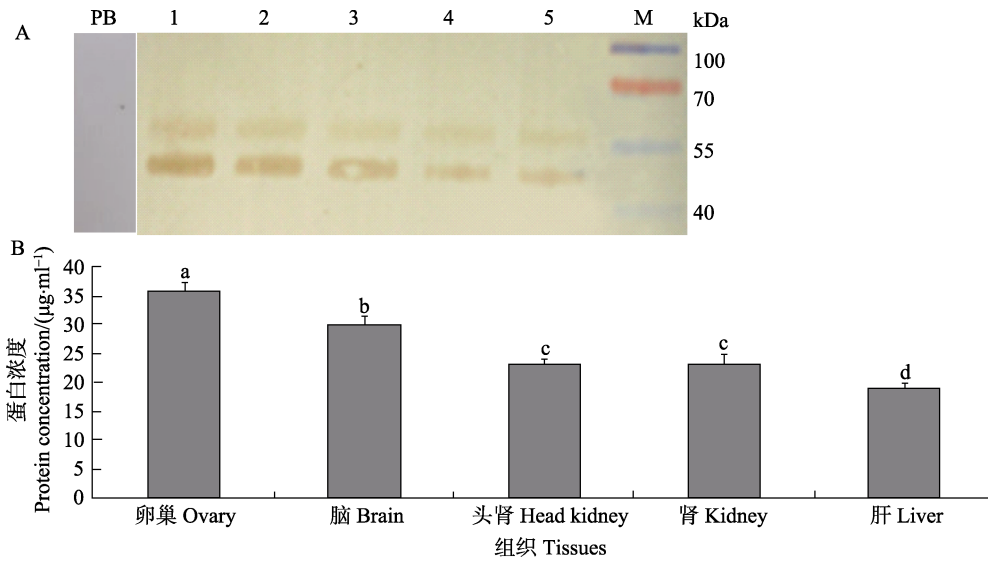


图 3 牙鲆各组织 *mPRL* 蛋白的表达

Fig.3 Expression of *mPRL* protein in different tissues of *P. olivaceus*

A: *mPRL* 蛋白表达电泳图; B: *mPRL* 蛋白表达量化; 1: 卵巢; 2: 脑; 3: 头肾; 4: 肾; 5: 肝;  
M: 蛋白分子量标准; PB: 阴性对照  
A: Electrophoregram of protein expression of *mPRL*; B: Quantitative abundance of *mPRL* protein expression;  
1: Ovary; 2: Brain; 3: Head kidney; 4: Kidney; 5: Liver; M: Protein molecular weight marker; PB: Negative control

疫阳性显色(图 4-A); 放大 1000 倍后可以很明显看出其在膜附近的表达密集(图 4-1)。在脑组织中 *mPRL* 主要定位在脑组织的神经元附近(图 4-B), 放大 1000 倍后可以明显看到该区域免疫阳性反应特征(图 4-2)。图 4-a 和图 4-b 为相应组织免疫组化分析的阴性对照。

### 3 讨论

#### 3.1 *mPRL* 在卵母细胞成熟过程中的表达分析

通过 qRT-PCR 方法分析了 *mPRL* 转录本在牙鲆不同组织中的表达, 发现 *mPRL* 在卵巢、脑、心、鳃

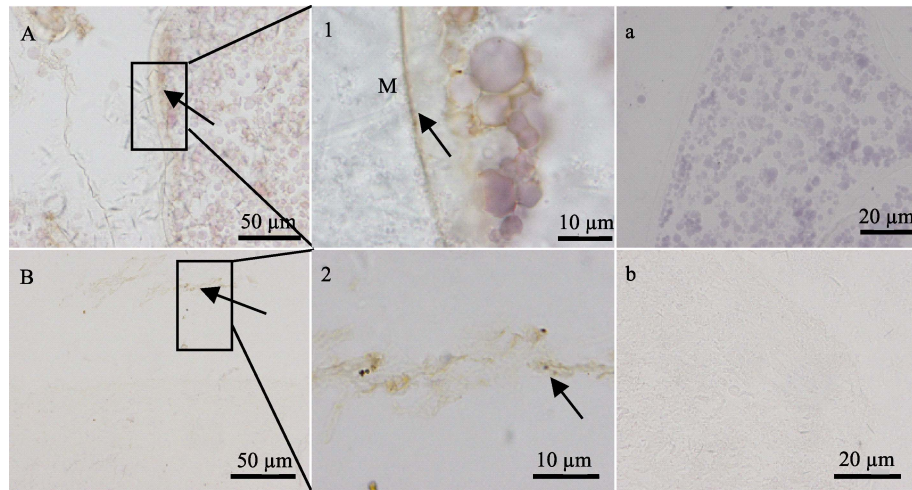


图 4 牙鲆 mPRL 蛋白在卵巢和脑组织的细胞定位

Fig.4 Localization of mPRL protein in the ovary and brain of *P. olivaceus* demonstrated by immunohistochemistry

A: 卵巢; 1: 卵巢( $\times 1000$ ); a: 卵巢对照组; B: 脑; 2: 脑( $\times 1000$ ); b: 脑对照组;

M: 卵母细胞膜; 箭头指向为阳性信号位置

A: Ovary; 1: Ovary ( $\times 1000$ ); a: Negative control of ovary; B: Brain; 2: Brain ( $\times 1000$ ); b: Negative control of brain;

M: Oocyte membrane; the arrows indicated the positive reaction

等组织表达丰富,在垂体、肝、肾脏、肌肉等器官相对表达量较低(李晓晓等,2013)。为进一步分析 *mPRL* 在牙鲆卵巢的作用机制,本研究通过 qRT-PCR 方法检测不同发育阶段卵母细胞母源的 *mPRL* 转录本。发现 *mPRL* mRNA 随着卵母细胞发育,表达水平逐步升高;在牙鲆发育 V 期的卵巢,处于 V 时相卵母细胞的 *mPRL* mRNA 表达量最高。当前,关于 PAQR 基因家族在配子发育早期的生理作用未见研究报道(Tokumoto *et al*, 2006; 柳学周等, 2015)。根据本研究结果,推测 *mPRL* 可能参与卵母细胞的卵黄发生。在卵黄生成后期卵母细胞和成熟阶段卵母细胞 *mPRL* mRNA 转录水平急剧上升,预示牙鲆 *mPRL* 基因参与调控卵母细胞成熟。

### 3.2 表达与定位分析

Western blotting 分析发现, *mPRL* 蛋白表达量在卵巢和脑中相对较高,在肝脏、肾脏、头肾中也有表达,但表达量相对较少。明显的蛋白免疫反应条带出现在约 50 kDa 位置,比理论预测的蛋白分子量(40 kDa)大 10 kDa。这种差异可能来自糖基化作用等蛋白质翻译后的修饰(Jiménez-Castaño *et al*, 2007),这

也是需要进一步研究证实的内容之一。在本研究中,牙鲆 *mPRL* 基因和蛋白在繁殖内分泌相关组织表达较为丰富,并且在 V 时相卵母细胞 *mPRL* mRNA 表达量和 V 期的卵巢组织 *mPRL* 蛋白表达量均最大,说明 *mPRL* 在卵巢具有重要的成熟调控功能。

采用原位杂交和免疫组化方法分析了牙鲆 *mPRL* 转录本和蛋白在繁殖相关器官的细胞学定位,结果显示, *mPRL* 基因和蛋白阳性信号特异性的定位在成熟性腺的卵母细胞膜上,并在脑组织的神经元细胞中分布; *mPRL* 在这些繁殖相关器官的分布表明,孕激素在牙鲆卵巢和脑可以通过 *mPRL* 介导的信号通路发挥作用。孕激素在神经系统具有重要的生理功能,如调节促性腺激素释放激素(GnRH)释放和繁殖行为等(Petersen *et al*, 2013)。 *mPRL* 在牙鲆脑的分布预示 *mPRL* 介导孕激素参与神经内分泌功能调节,进而影响牙鲆繁殖。研究发现,在牙鲆繁殖周期性腺发育的不同阶段, *mPRL* mRNA 在脑-垂体-性腺轴相对表达水平显著升高并在 V 期达到峰值( $P < 0.05$ ),在 VI 期表达量下降;另外,牙鲆血清中孕激素含量变化也随着性腺的发育呈先升高后降低的变化特征(史宝, 2010<sup>1)</sup>; 李晓晓, 2013<sup>2)</sup>)。因此, *mPRL* 在牙鲆卵巢发育的过

1) Shi B. Study on the molecular mechanisms of reproductive endocrinology in *Paralichthys olivaceus* and *Paralichthys lethostigma*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2010, 1-176 [史宝. 牙鲆繁殖内分泌分子机理研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2010, 1-176]

2) Li XX. Study on the physiological function of membrane progesterin receptor in the reproductive cycle of flatfish. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 1-73 [李晓晓. 膜孕激素受体在鲆鲽类繁殖周期中的生理功能研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 1-73]

程表达增强,结合本研究中 mPRL 在成熟卵母细胞膜上的定位,预示 mPRL 是受孕激素调控的介导卵母细胞成熟的膜受体。相关的研究也发现与本研究相似的结果,通过原位杂交和免疫组化的方法发现斑马鱼(*Danio rerio*)的 mPR $\alpha$  定位在卵母细胞膜附近或者卵母细胞膜上,结合云纹犬牙石首鱼(*Cynoscion nebulosus*)过表达 mPR $\alpha$  可以加速卵母细胞成熟,表明 mPR $\alpha$  参与卵母细胞成熟调控(Hanna *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2007)。牙鲈 mPRL 与其他鱼类的 mPR $\alpha$  在卵母细胞膜上类似的表达模式表明,它们可能在卵巢具有相似的生理功能。

mPRL 基因属于膜孕激素受体家族的一员,为本团队近年来在鲆鲽类发现的一种介导卵母细胞成熟的功能基因(柳学周等, 2015),并发现在半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)等鱼类的基因组中存在该基因的同源序列;有关 mPRL 基因与膜孕激素受体成员 mPR( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ )在介导卵母细胞成熟、神经内分泌调控和繁殖行为等方面是如何协调配比调控孕激素发挥生理学作用以及是否激活相同的信号通路发挥生理功能的研究未见报道;鉴于 mPRL 基因在鲆鲽类卵母细胞成熟过程中的重要作用,今后将通过真核表达方式获得重组蛋白,进一步分析其蛋白结构、家族各成员之间的作用并将产生的蛋白应用于亲鱼的促熟实验,以利于获得足够数量的和高质量具有受精能力的鱼卵,这不仅对具有经济价值的鱼类产业发展有极大的促进作用,而且可将该技术应用于濒危鱼类繁衍后代。

## 参 考 文 献

- Fernandes MS, Pierron V, Michalovich D, *et al.* Regulated expression of putative membrane progestin receptor homologues in human endometrium and gestational tissues. *Journal of Endocrinology*, 2005, 187(1): 89–101
- Hanna RN, Zhu Y. Expression of membrane progestin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 161(1): 153–157
- Hasegawa J, Yanaihara A, Iwasaki S, *et al.* Reduction of progesterone receptor expression in human cumulus cells at the time of oocyte collection during IVF is associated with good embryo quality. *Human Reproduction*, 2005, 20(8): 2194–2200
- Jiménez-Castaño L, Villamiel M, López-Fandiño R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(3): 433–443
- Josefsberg Ben-Yehoshua L, Lewellyn AL, Thomas P, *et al.* The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor  $\beta$  in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(3): 664–673
- Karteris E, Zervou S, Pang Y, *et al.* Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein coupled receptors: Potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(7): 1519–1534
- Liu XZ, Shi B, Li XX, *et al.* Molecular characterization of the novel membrane progestin receptor gene and its role during ovarian development in the half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(4): 608–619 [柳学周, 史宝, 李晓晓, 等. 半滑舌鳎新型膜孕激素受体基因分子特征及其在卵巢发育过程的作用. *中国水产科学*, 2015, 22(4): 608–619]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, 2004, 128(2): 139–146
- Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation*, 2008, 50(S1): 195–219
- Petersen SL, Intlekofer KA, Moura-Conlon PJ, *et al.* Novel progesterone receptors: Neural localization and possible functions. *Frontiers in Neuroscience*, 2013, 7: 1–7
- Shi B, Li XX, Liu XZ, *et al.* Molecular cloning and tissue expression analysis of membrane progestin receptor alpha gene (mPR $\alpha$ ) from half smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(3): 61–67 [史宝, 李晓晓, 柳学周, 等. 半滑舌鳎膜孕激素受体基因克隆与组织表达分析. *渔业科学进展*, 2013, 34(3): 61–67]
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, *et al.* PAQR proteins: Novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(3): 372–380
- Thomas P, Pang Y, Dong J, *et al.* Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 705–718
- Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, *et al.* Cloning and identification of a membrane progestin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(1): 101–108
- Zhu Y, Hanna R, Schaaf M, *et al.* Candidates for membrane progestin receptors-past approaches and future challenges. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2008, 148(4): 381–389

## Expression Characterization of the Novel Membrane Progesterin Receptor (mPR-Like) in Sexual Maturation of Female Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

SHI Bao<sup>1,2</sup>, LIU Xuezhou<sup>1,2①</sup>, XU Tao<sup>3</sup>, LI Xiaoni<sup>1,2</sup>, XU Yongjiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Jinyong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. Shandong Province Fisheries Technology Extension Station, Jinan 250013)

**Abstract** This research examined the expression characteristics and mechanism of the novel membrane progesterin receptor-like (mPRL) in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. In the present study, the temporal changes of *mPRL* mRNA expression level in isolated oocytes at various oogenesis stages were measured using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The *mPRL* transcript levels significantly increased with the oocyte development, with the peak level at stage V. However, the transcript level decreased significantly at stage VI. These expression characteristics of *mPRL* showed that *mPRL* is a good marker for studying the oocyte maturation. The spatial expression of *P. olivaceus mPRL* mRNA in the ovary and brain was demonstrated using *in situ* hybridization. Results revealed that *mPRL* transcript was localized at the membrane of oocytes, and the positive signals were also observed in the brain neurons of *P. olivaceus*. Specifically, high-titer rabbit polyclonal antibody was generated against synthetic peptides derived from the C-terminal domain of *P. olivaceus mPRL* amino acid. Immunoblotting analysis identified the immunoactive protein that bands in the ovary, brain, head kidney, kidney and liver of *P. olivaceus*. However, the expression levels of protein in ovary and brain were higher than other tissues. The protein was localized in the major reproductive associated organs including the ovary and brain using immunohistochemistry. Moreover, the cellular localization of mPRL protein was similar with that of mRNA in *P. olivaceus*. The intensive signals were observed at the edge of pituitary and brain, and the intensity of positive signals was found on the membrane of oocytes. This is to date the first study that examined the tissue specific localization of mPRL protein and transcript in the reproductive organs of *P. olivaceus*. The mPRL expression characteristics implied that mPRL regulates the reproduction of *P. olivaceus* through the endocrine system. Furthermore, the evidence supports a functional role of mPRL in the oocyte maturation of *P. olivaceus*, possibly, by acting as a mediator of progesterone.

**Key words** *Paralichthys olivaceus*; mPR-Like; mRNA expression; Protein expression

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn