

东北虎促卵泡激素和促黄体激素基因的克隆及其序列分析*

廖鸣娟 朱睦元** 叶丹 张志和 张安居 沈富军

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012) (成都大熊猫繁育研究基地, 成都 610081)

摘要 本研究首次从东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 脑垂体提取总 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增出东北虎垂体促性腺激素 亚基、促卵泡激素 (FSH) 亚基和促黄体激素 (LH) 亚基的编码区序列, 并进行克隆、测序和比较分析。结果表明, 其 亚基、FSH 亚基、LH 亚基基因的开放阅读框分别为 363 bp、390 bp 和 429 bp, 分别编码 120、129 和 142 氨基酸的前体蛋白。与已发表的人、牛、绵羊、猪、大鼠、小鼠等物种相应序列比较, 无论在核苷酸水平, 还是在氨基酸水平都显示出较高的同源性 (64.7%~96.6%), 其中与猪的同源性最高 (86%~96.6%)。东北虎的基因序列还具有其明显的特异性, 首次发现 LH 亚基 cDNA 编码的前体蛋白在信号肽部分比其它物种相应序列多一个亮氨酸残基 (Leu)。

关键词 东北虎 克隆 人工繁殖 FSH 和 LH

促卵泡激素 (Follicle-Stimulating Hormone, FSH) 和促黄体激素 (Luteinizing Hormone, LH) 是由动物垂体前叶分泌的两种促性腺激素, 属糖蛋白激素, 结构相似, 均由一个共同的 亚基和另一个决定激素特异性的 亚基通过非共价键构成 (Pierce *et al.*, 1981)。在促性腺激素释放激素 (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) 的调控下, FSH 和 LH 共同参与性腺功能调节, 对动物的生殖过程起着非常重要的作用 (Gharib *et al.*, 1990; Margaret *et al.*, 1996)。在雌性动物中, FSH 刺激卵泡发育, LH 则促进卵泡的成熟和雌激素的产生, 并在与 FSH 达到一定比例时, 导致排卵; 在雄性动物中, LH 与 FSH 协同促进精子的发生和成熟 (Gharib *et al.*, 1990)。因此, 垂体中 FSH 和 LH 的含量及其相互比例, 与动物的发情和排卵功能有密切关系。通过人工注射外源性 FSH、LH 及其类似激素, 可以人为地调控雌性动物的发情和排卵, 并能促使因乏情而不能自然交配的雌性动物发情, 从而有效提高动物的繁殖率。鉴于此, FSH 和 LH 一直是国内外生殖领域的研究热点, 人及多种物种的 FSH 和 LH 基因相继被克隆 (Li *et al.*, 1998), 并得到广泛和深入地研究, 重组 FSH 和 LH 已被广泛应用于临床医学和畜牧业生产中

(Fauser, 1998)。

东北虎属食肉目, 猫科, 豹属, 是我国一级保护野生动物。长期以来, 由于人类对东北虎栖息环境的干扰侵占及非法盗猎, 致使其分布区不断缩小, 种群数量急剧下降, 东北虎野生种已濒于灭绝 (马逸清等, 1998)。开展东北虎圈养饲养繁殖, 增加人工种群数量, 为最终东北虎的放归野外作准备, 是当前拯救东北虎的关键。本文报道东北虎促卵泡激素 (FSH) 和促黄体激素 (LH) 基因的克隆和序列分析, 并与人、猪、牛、羊、大鼠和小鼠等同源基因作比较分析。试图从分子水平探索东北虎生殖生物学, 探讨 FSH 和 LH 在东北虎人工繁殖研究中的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 东北虎脑垂体 取成都动物园出生后未存活的雌性东北虎幼仔的脑垂体, 迅速冻于液氮中保存。

1.1.2 菌株、质粒和试剂 大肠杆菌 JM109、限制性内切酶 *EcoR*、*Pst* 购自上海华美生物公司, PCR 引物由北京赛百盛公司合成, 总 RNA 抽提试剂盒为 GIBcoBRL 公司 TRIzol Reagent, 逆

2001-12-10 收稿, 2002-04-30 修回

* 成都大熊猫繁育研究基金会项目资助 (2000-19)

** 通讯作者 E-mail, lsczhumy@mail.hz.zj.cn

第一作者简介 廖鸣娟, 女, 25 岁, 博士研究生。研究方向: 分子遗传学。

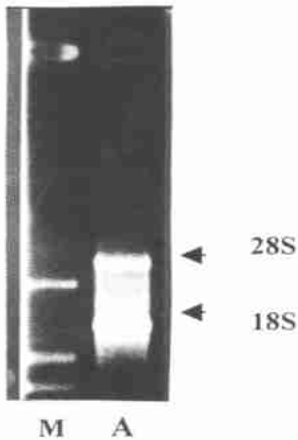


图 1 总 RNA 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 1% formaldehyde agarose gel electrophoresis analysis of total RNA

M: DL 2000 标准分子量 (DL 2000 Marker)

A: 总 RNA (Total RNA)

转录试剂盒为 Promega 公司 Reverse Transcription System。PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物公司, Pfu DNA 聚合酶购自上海生工, 其它试剂均为分析纯。质粒 pUC18 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取约 200 mg 的垂体组织, 在液氮中研磨后, 并用匀浆器彻底匀浆, 按 TRIzol Reagent 说明书推荐的方法提取总 RNA。将所得总 RNA 溶解于经 DEPC 处理的水中, 用紫外分光光度计和 1% 甲醛琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。-70 保存。

1.2.2 PCR 引物的设计 通过对人 (Fiddes *et al.*, 1979; Talmadge *et al.*, 1984; Watkins *et al.*, 1987)、牛 (Erwin *et al.*, 1983; Maurer *et al.*, 1985; Esch *et al.*, 1986)、绵羊 (Bello *et al.*, 1989; Mountford *et al.*, 1989; d'Angel-Bernard *et al.*, 1990)、猪 (Hirai *et al.*, 1989; Ezashi *et al.*, 1990; Li *et al.*, 2000)、大鼠 (Chin *et al.*, 1983; Burnside *et al.*, 1988; Maurer *et al.*, 1987)、小鼠 (Chin *et al.*, 1981; Kumar *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1995) 等动物垂体促性腺激素 亚基、FSH 亚基、LH 亚基 cDNA 序列进行同源比较, 根据保守区设计相应引物, 三对引物编号和序列如下:

TGA 1: 5 AGG ACG AAG AGC CAT GGA TTA
CTA 3

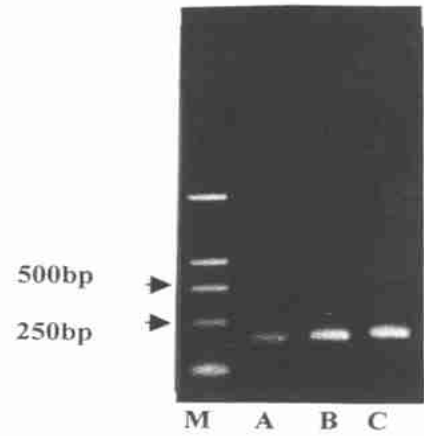


图 2 RT-PCR 扩增产物电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of RT-PCR amplified products

M: DL 2000 标准分子量 (DL 2000 Marker)

A: 亚基扩增产物 (subunit product)

B: FSH 亚基扩增产物 (FSH subunit product)

C: LH 亚基扩增产物 (LH subunit product)

TGA 2: 5 CAC GGC AAA CTA TTA GGA TTT
GTG 3

TFB 1: 5 CAA GTG CCC AGG ATG AAG 3

TFB 2: 5 CTC CAC TGC TCT TTA TTC 3

TLB 1: 5 GGA TGG AGA TGC TCC AGG GAC
TG 3

TLB 2: 5 GGG GCA TCC TTA GAG GAA CGG G
3

1.2.3 RT-PCR 扩增 以抽提的总 RNA 为模板, 以 Oligo dT 为反转录引物, 按照 Promega 公司反转录试剂盒操作手册进行 cDNA 第一链的合成。反转录条件为 42 60 min, 95 5 min, 5 5 min。取适量第一链产物为模板, 分别以 TGA1 和 TGA2, TFB1 和 TFB2, TLB1 和 TLB2 为引物进行 PCR 扩增。反应总体积 50 μ l, 其中包括 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 上下游引物各 0.3 μ mol/L 和 5 U Pfu 聚合酶。PCR 反应参数设置为: 94 预变性 3 min; 94 变性 40 s, 50 退火 40 s, 72 延伸 50 s, 30 个循环; 72 延伸 5 min。RT-PCR 反应产物在 1.6% 琼脂糖凝胶中电泳并观察结果。所用 PCR 仪为 Gene Amp PCR System 9700 (PE 公司)。

1.2.4 PCR 产物的克隆及其序列测定 PCR 产物经华瞬小量柱胶回收试剂盒回收, 以摩尔比 3:1 与经 Sma 限制性内切酶平端化的 pUC18 在 22 下连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 (JM109) 感受

态细胞,涂布含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨基青霉素、200 mg/mL IPTG 及 20 mg/mL X-Gal 的 LB 平板,过夜培养,筛选阳性克隆,并用 PCR 及双酶切对阳性克隆进行初步鉴定。阳性克隆送样于上海博亚生物有限公司进行 DNA 测序,所用测序仪为 ABI 377 自动测序仪。

1.2.5 序列分析 利用 WDNAsis、GENDOC 等软件,将所得到的 DNA 序列与 GenBank 数据库中已知的 FSH 和 LH 相应序列进行序列同源性比较和分析。

2 结 果

2.1 总 RNA 的分离

所分离总 RNA A260/A280 为 2.0,甲醛琼脂糖凝胶电泳后清晰可见 18 S 和 28 S 两条核糖体 RNA 条带(图 1),说明本实验所抽提的垂体组织总 RNA 是完整的,材料保存和提取过程中均无降解发生。

2.2 RT-PCR 扩增、PCR 产物克隆及其鉴定

以合成的三对引物(TGA1、TGA2,TFB1、TFB2 和 TLB1、TLB2)分别进行 RT-PCR 扩增,产物(亚基、FSH 亚基和 LH 亚基 DNA 片段)经 1.6% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,均得到明显特异性条带(图 2),PCR 产物大小与预期结果一致,分别为 390 bp (亚基)、420 bp (FSH 亚基)、440 bp (LH 亚基)左右。PCR 产物经纯化后连接于 pUC18 载体,连接液转化大肠杆菌 JM109 高效感受态细胞,涂平板筛选,挑取数个白色菌落,分别提取质粒。用 PCR 和限制性内切酶进行鉴定,证实扩增克隆的片段大小均正确。

2.3 序列分析

利用 pUC18 质粒的正反向通用引物,测序克

隆的 3 个 DNA 序列(图 3),结果表明扩增的东北虎垂体促性腺激素 亚基、FSH 亚基和 LH 亚基大小分别为 387 bp (图 3 A)、414 bp (图 3 B)和 440 bp (图 3 C),与预期大小一致。利用 WDNAsis 软件分析各基因的开放阅读框,发现 亚基基因编码 120 个氨基酸的前体蛋白,包括 24 个氨基酸的信号肽和 96 个氨基酸的成熟肽,和其它物种 亚基一样,存在 10 个保守的半胱氨酸残基(Cys)及 2 个潜在的糖基化位点。东北虎 FSH 亚基基因则编码 129 个氨基酸的前体蛋白,其中前 19 个氨基酸为信号肽,成熟肽序列包含 12 个保守的半胱氨酸残基(Cys)和 2 个潜在的糖基化位点。而东北虎 LH 亚基基因开放阅读框为 429 bp,编码 21 个氨基酸的信号肽和 121 个氨基酸的成熟肽,含有 12 个半胱氨酸残基(Cys)和 1 个糖基化位点。将三个亚基的 ORF 序列登录于 GenBank (登录号分别为: AF408393, AF540937, AF540935)。

同源比较分析表明(表 1),无论在核苷酸水平还是在氨基酸水平,东北虎与人、牛、绵羊、猪、大鼠和小鼠的 亚基、FSH 和 LH 序列间都存在较高的同源性(64.7%~96.6%),并可以清楚地看出东北虎 FSH 和 LH 基因与猪相应序列的同源性最高(86%~96.6%)。

3 讨 论

动物的生殖主要受下丘脑-垂体-性腺轴分泌的各种生殖激素调控,其中垂体前叶分泌的 FSH 和 LH 作用于性腺,通过调节雌性动物的排卵过程和雄性动物的精子发生、成熟过程参与生殖调控。FSH 和 LH 基因作为生殖功能基因,其核苷酸及编码的氨基酸序列在不同物种间高度保守(Li *et al.*, 1998)。在本研究中,东北虎序列与其它物种

表 1 东北虎与已报道的若干物种 FSH 和 LH 基因及其编码的氨基酸序列的同源性比较 (%)

Table 1 Comparison of homology of *Panthera tigris altaica* subunit , FSH and LH with other reported mammals at the nt level and the aa level (%)

基因 Gene	比较水平 Level for comparison	人 Human	牛 Bovine	绵羊 Sheep	猪 Pig	大鼠 Rat	小鼠 Mouse
FSH	核苷酸 (nt)	72.6	85.1	84.0	91.7	74.3	75.4
	氨基酸 (aa)	68.3	90.9	92.5	96.6	86.7	90.9
	核苷酸 (nt)	86.9	88.2	88.4	90.5	83.3	83.0
	氨基酸 (aa)	86.1	89.2	88.4	91.5	77.6	83.8
LH	核苷酸 (nt)	81.6	85.6	85.2	88.9	81.6	80.7
	氨基酸 (aa)	64.7	78.8	78.8	86.6	80.9	80.9

A	1 <u>AGGACGAAGAGCCATGGATTACTACAGAAAATATGCAGCTGTTCATCTGGCCATACTCTCTGTGTTTCTGCATATTTCCATTCTTTT</u> 87 -24 <u>M D Y Y R K Y A A V I L A I L S V F L H I L H S F</u> 1 88 <u>CTGATGGAGAGTTTACAATGCAGGGTGCCAGAAATGCAAGCTAAAGGAAAACAATACTTCTCCAAGTTGGGTGCCAGTTTATCAA</u> 177 2 <u>P D G E F T M Q G C P E C K L K E N K Y F S K L G A P V Y Q</u> 31 178 <u>TGCATGGGCTGCTGCTTCTCCAGAGCATACCCCACTCCAGCAAGTCCAAGAAGACAATGTTGGTCCCAAGAATCACCTCAGAAGCC</u> 267 32 <u>C M G C C F S R A Y P T P A R S K K T M L V P K</u> N I T <u>S E A</u> 61 268 <u>ACATGCTGTGTGCCAAAGCCTTTACCAAGGCCACGGTAATGGGAAATGCCAAAGTGGAATCACACAGAGTGCCACTGCAGTACTTGT</u> 357 62 <u>T C C V A K A F T K A T V M G N A K V E</u> N H T <u>E C H C S T C</u> 91 358 <u>TATTATCACAATCCTAATAGTTTGCCGTG</u> 387 92 <u>Y Y H K S *</u> 96
B	1 <u>CAAGTGCCAGGATGAAGTCAGTCCAGTCTTGTCTCTTTCTGTGCTGGAGAGTAATCTGCTGCAAGAGCTGTGAGCTGACAACATC</u> 90 -19 <u>M K S V Q F C F L F C C W R V I C C K S C E L T</u> N I 7 91 <u>ACCATCACAGTGGAAAAGAGGAATGTCGCTTTCATGAGCATCAATGCCACTTGGTGTGCAAGTACTGCTATACCCGGGATCTAGTG</u> 180 8 I <u>I T V E K E E C R F C M S I</u> N A T <u>W C A G Y C Y T R D L V</u> 37 181 <u>TACAAGGACCCAGCCAGGCCAACCAACAGAAAACATGTACCTTCAAGAGCTGGTGTACGAGACAGTGAAGTGCCTGCTGCTCAC</u> 270 38 <u>Y K D P A R P N N Q K T C T F K E L V Y E T V K V P G C A H</u> 67 271 <u>CAGGAGATCCCTGTATACATATCCAGTAGCCACTGAATGTCACTGTGGCAAGTGTGATAGTGACAGTACTGACTGCACCGTACAAGGC</u> 360 68 <u>Q A D S L Y T Y P V A T E C H C G K C D S D S T D C T V Q G</u> 97 361 <u>CTGGGCCCAGCTACTGCTCCTTCAAGTAAAGAAATAAAGAGCAGTGGAG</u> 414 98 <u>L G P S Y C S F S E M K E *</u> 110
C	1 <u>GGATGGAGATGCTCCAGGGACTGCTGCTGTGCTGCTGCTGAATGTGGTGGGGTGGACCTCCAGGGGGCCACTGCGGCCGCTG</u> 89 -21 <u>M E M L Q G L L L L W L L L N V G G V W T S R G P L R P L</u> 8 90 <u>TGCCGGCCATCAAGCCACCCTGGCTGTGAGAACGAGGCTGCCCGTCTGTGTACCTTACCACCACCATCTGTGCCGGCTACTGC</u> 179 9 <u>C R P I</u> N A T <u>L A A E N E A C P V C V T F T T T I C A G Y C</u> 38 180 <u>CCCAGCATGATGCGAGTGTGCCAGCGGCCCTGCCCCCTGTGCCCCAGCCCGTGTGCACCTACCGTGAGCTGCGCTTTGCTCCGCTCCGG</u> 269 39 <u>P S M M R V L P A A L P P V P Q P V C T Y R E L R F A S V R</u> 68 270 <u>CTCCCGGATGCCCGCGGGTGTGGACCCCGTGTCTTTCCCGTGGCCCTCAGCTGTGCGGGCCCTGCCGCTCAGCAGCTCT</u> 359 69 <u>L P G C P P G V D P V V S F P V A L S C R C G P C R L S S S</u> 98 360 <u>GACTGTGGGGTCCAGGGCCCAACCTTGGCTGTGACCGCCCCACTCCCGGCCCTCCCGTCTCCTAAGGATGCC</u> 440 99 <u>D C G G P R A Q P L A C D R P P L P G L P F L *</u> 121

图 3 东北虎促性腺激素、FSH、LH cDNA 序列及其推知的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of and subunit of FSH and LH from Panthera Tigris altaica

A. 亚基 (subunit) B. FSH 亚基 (FSH subunit) C. LH 亚基 (LH subunit) 下划线为引物序列 (The primer sequences are underlined) 双下划线为信号肽序列 (The signal peptides are double underlined) 方框为 N-糖基化位点 (The N-glycosylation sites are boxed by open rectangles) 星号代表终止密码子 (The asterisks represent stop codons)

具有较高的同源性 (64.7% ~ 96.6%)，分子中形成二硫键的半胱氨酸残基 (Cys) 以及 N-糖基化位点完全保守 (图 4)，突变研究已表明，Cys 和糖基化位点 Asn 是蛋白折叠、异二聚体形成、特异受体结合等功能所必须的 (Gharib et al., 1990)。FSH 和 LH 基因结构的高保守性，正暗示了它们在生命活动中的重要生物学功能。

在圈养条件下，为了提高东北虎繁殖率，研究者试图通过注射外源性 FSH、LH 及其类似激素，诱导雌虎发情和排卵 [Phillips et al., 1982]。但是诱导效果不佳，东北虎对外源激素经常表现为无反应或引起的排卵较少。造成诱导水平低下的原因可能有两个，第一，试验动物较少，对东北虎基础

激素水平、注射激素类型、最佳剂量和处理时间等繁殖规律还缺乏足够的知识和经验。第二，由于注射的激素为异源性激素，在结构与功能上都可能与东北虎自身激素存在种间差异，从而影响作用效果。在其它猫科动物的相关研究中就曾发现，外源激素诱导卵泡发育和排卵存在明显的种间差异 (Brown et al., 1996; Howard et al., 1997)。本研究通过对位比较分析表明东北虎 FSH 和 LH 在氨基酸序列上存在明显的种间特异性 (图 4)，如亚基中 39 位残基，东北虎为 V，其他物种均为 I (图 4 A)；FSH 亚基的 20，24，68 和 96 位残基，东北虎为 M，A，Q，Q，而其他物种分别为 N，I，H，R (图 4 B)；LH 亚基的 1，27 和 119 位

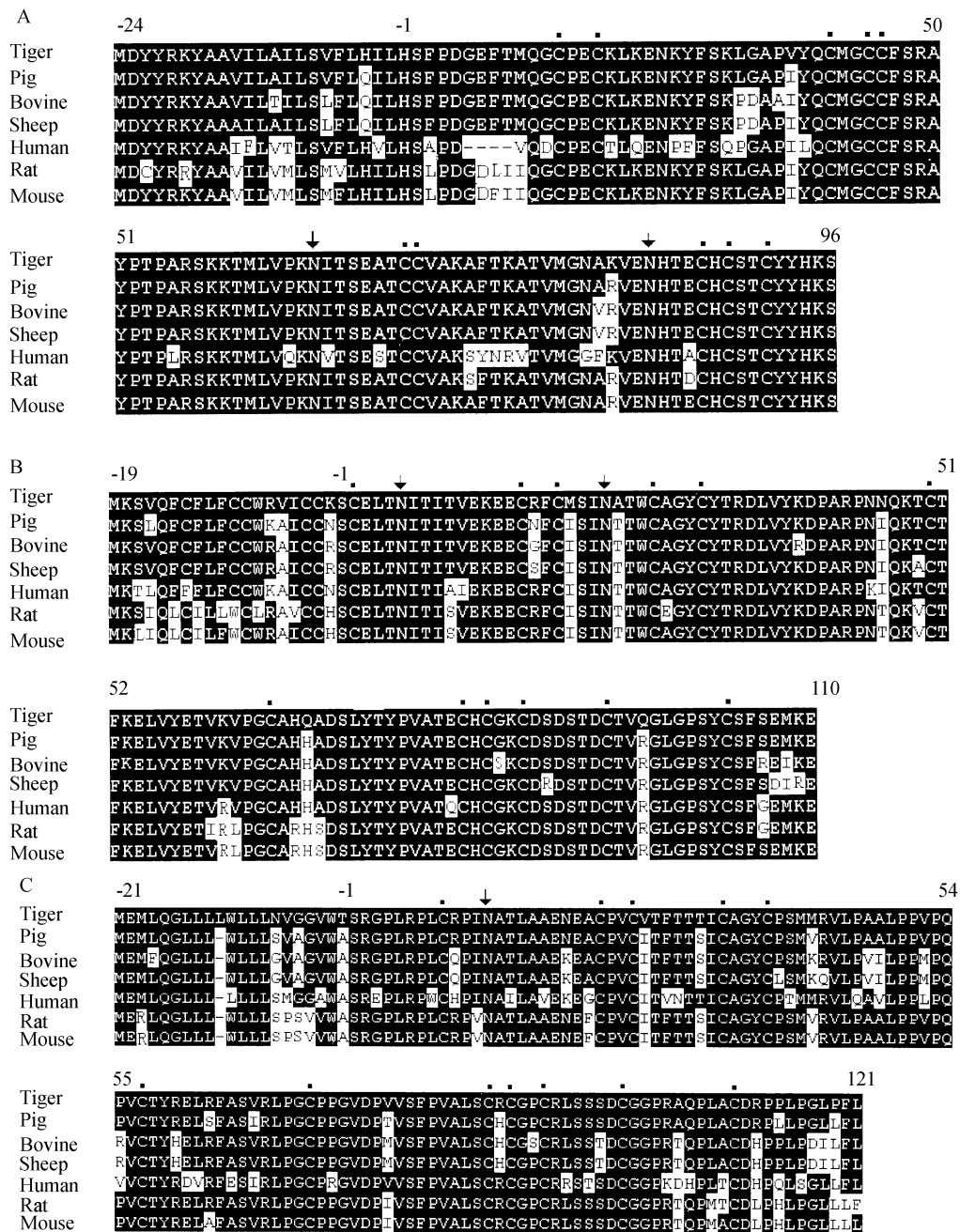


图 4 东北虎与各物种促性腺激素 亚基、FSH 亚基和 LH 亚基氨基酸序列比较分析

Fig. 4 Alignment of and subunit putative aa of FSH and LH of

Panthera tigris altaica with those of other species

A. 亚基 (subunit) B. FSH 亚基 (FSH subunit) C. LH 亚基 (LH subunit) “tiger” 特指东北虎 (“tiger” represents *Panthera tigris altaica*) “■” 表示保守的半胱氨酸位点 (Dots indicate cysteine residues) “ ” 表示 N-糖基化位点 (The arrows indicate potential N-linked glycosylation sites)

残基, 东北虎为 T, V, D, 而其他物种分别为 A, I, L (图 4 C), 特别是在信号肽 - 12 位上, 东北虎比其它物种多出一个 Leu (L) 残基, 这在所有已克隆的 LH 亚基中, 是首次发现。至于以上氨基酸的差异是否直接会造成东北虎激素功能上的特异性, 还有待进一步的研究。鉴于上述分析, 我们

认为选择高同源性的异源激素或自身激素可能是解决目前人工繁殖东北虎中异源激素效果差的有效途径之一。

致谢 感谢成都大熊猫繁育研究基地实验室对本研究的支持和帮助

参 考 文 献 (References)

- Bello, P. A., J. R. McNeilly, M. R. Brandon and T. E. Adams 1989 Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the common alpha-subunit of the ovine pituitary glycoprotein hormones. *Nucleic Acids Res.* **17**: 10 494.
- Brown, J. L., D. E. Wildt, N. Wielebnowski, K. L. Goodrowe, L. H. Graham, S. Wells and J. G. Howard 1996 Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *J. Reprod Fertil.* **106**: 337 ~ 346.
- Burnside, J., P. R. Buchl and W. W. Chin 1988 Isolation and characterization of the gene encoding the subunit of the rat pituitary glycoprotein hormones. *Gene* **70**: 67 ~ 74.
- Chin, W. W., J. E. Godine, D. R. Klein, A. S. Chang, L. K. Tan and J. F. Habener 1983 Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of rat lutropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4 649 ~ 4 653.
- Chin, W. W., H. M. Kronenberg, P. C. Dee, F. Maloof and J. F. Habener 1981 Nucleotide sequence of the mRNA encoding the pre-subunit of mouse thyrotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5 329 ~ 5 333.
- d'Angelo-Bernard, G., M. Moumni, M. Jutisz and R. Counis 1990 Cloning and sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta subunit of ovine luteinizing hormone. *Nucleic Acids Res.* **18**: 2 175.
- Erwin, C. R., M. L. Croyle, J. E. Donelson and R. A. Maurer 1983 Nucleotide sequence of cloned complementary deoxyribonucleic acid for subunit of bovine pituitary glycoprotein hormone. *Biochemistry* **22**: 4 856 ~ 4 860.
- Esch, F. S., A. J. Mason, K. Cooksey, M. Mecado and S. Shimasaki 1986 Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of the beta chain of bovine follicle stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6 618 ~ 6 621.
- Ezashi, T., T. Hirai, T. Kato, K. Wakabayashi and Y. Kato 1990 The gene for the beta subunit of porcine LH: clusters of GC boxes and CACCC elements. *J. Mol. Endocrinol.* **5**: 137 ~ 146.
- Fiddes, J. C and H. M. Goodman 1979 Isolation, cloning and sequence analysis of cDNA for the subunit of human chorionic gonadotropin. *Nature* **281**: 351 ~ 355.
- Gharib, S. D., M. E. Wierman, M. A. Shupnik and W. W. Chin 1990 Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocrine Reviews* **11**: 177 ~ 194.
- Howard, J. G., T. L. Roth, A. P. Byers, W. F. Swanson and D. E. Wildt 1997 Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard. *Bio. Reprod.* **56**: 1 059 ~ 1 068.
- Hirai, T., H. T. Akikawa and Y. Kato 1989 Molecular cloning of cDNAs for precursors of porcine pituitary glycoprotein hormone common alpha-subunit and of thyroid stimulating hormone beta subunit. *Mol. Cell. Endocrinol.* **63**: 209 ~ 217.
- Kumar, T. R., M. Kelly, M. Mortrud, M. J. Low and M. M. Matzuk 1994 Cloning of the mouse gonadotropin subunit-encoding genes, structure of the follicle-stimulating hormone subunit-encoding gene. *Gene* **166**: 333 ~ 334.
- Kumar, T. R and M. M. Matzuk 1995 Cloning of the mouse gonadotropin beta-subunit-encoding genes, structure of the luteinizing hormone beta-subunit-encoding genes. *Gene* **166**: 355 ~ 336.
- Li, M. D., G. A. Rohrer, T. H. Wise and J. J. Ford 2000 Identification and characterization of a new allele for the beta subunit of follicle-stimulating hormone in Chinese pig breeds. *Anim Genet.* **31** (1): 28 ~ 30.
- Li, M. D and J. J. Ford 1998 A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the and subunits of glycoprotein hormone gene family. *Journal of Endocrinology* **156**: 529 ~ 542.
- Ma, Y. Q and W. Yan 1998 Advances in the tiger protection. *Chinese Wildlife* **19** (1): 3 ~ 7. [马逸清, 闫文 1998 老虎保护进展. *野生动物* **19** (1): 3 ~ 7.]
- Margaret, A. S. 1996 Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biology of Reproduction* **54**: 279 ~ 286.
- Maurer, R. A. 1985 Analysis of several bovine lutropin beta subunit cDNAs reveals heterogeneity in nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **260** (8): 4 684 ~ 4 687.
- Maurer, R. A. 1987 Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of complementary deoxyribonucleic acid for the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone. *Mol. Endocrinol.* **1**: 717 ~ 723.
- Mountford, P. S., P. A. Bello, M. R. Brandon and T. E. Adams 1989 Cloning and DNA sequence analysis of the cDNA for the precursor of ovine follicle stimulating hormone subunit. *Nucleic Acids Research* **17**: 6 391.
- Phillips, L. G., L. G. Simmons, M. Bush, J. G. Howard and D. E. Wildt 1982 Gonadotropin regimen for inducing ovarian activity in captive wild felids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **181** (11): 1 246 ~ 1250.
- Pierce, J. G and T. F. Parsons 1981 Glycoprotein hormone: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 465 ~ 495.
- Talmadge, K., N. C. Vamvakopoulos and J. C. Fiddes 1984 Evolution of the genes for the subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* **307**: 37 ~ 40.
- Watkins, P. C., R. Eddy, A. K. Beck, V. Vellucci, B. Leverone, R. E. Tanzi, J. F. Gusella and T. B. Shows 1987 DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA* **6** (3): 205 ~ 212.

外 文 摘 要 (Abstract)

CLONING AND ANALYSIS OF THE HOMOLOGY OF THE FOLLICLE-STIMULATING HORMONE AND LUTEINIZING HORMONE GENES IN SIBERIAN TIGER (PANTHERA TIGRIS ALTAICA) *

LIAO Ming-Juan ZHU Mu-Yuan * * YE Dan
ZHANG Zhi-He ZHANG An-Ju SHEN Fu-Jun
(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)
(Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, China)

The pituitary gonadotropin follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) play important roles in regulating gonad function and are essential for normal reproductive function in mammals. In this paper, by comparing the FSH/LH common, FSH and LH cDNA sequences reported from humans, cattle, sheep, pigs, rats and mice, three pairs of primers were designed and synthesized according to the conserved region. Using these primers, the genes encoding, FSH and LH in *Panthera tigris altaica* were amplified by reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) from pituitary total RNA and were cloned, sequenced and submitted to GenBank, with accessions Nos. AF408393, AF540937 and AF540935 respectively. It was revealed that the open reading region (ORF) of subunit from *Panthera tigris altaica* was 369 bp encoding a precursor containing a 24 amino acid signal peptide and a 96 amino acid mature peptide. Similarly, the ORF of FSH was 390 bp encoding a 19 amino acid signal peptide and 110 amino acid mature protein. The ORF of the LH subunit was 429 bp encoding a 141 amino acid protein which had an additional Leu residue in the 21 amino acid signal peptide sequence compared to other species. The mature protein of the LH subunit contained 121 amino acids just like those of other species. The predicted primary structure of the three subunits were similar to those of other mammals with conserved cysteines (10 for the subunit and 12 for the subunit) and putative N-glycosylation sites (2 for the and FSH subunits, 1 for the LH subunit). When nucleotide sequences and deduced amino acids were compared with homologous sequences from available mammals including humans, cattle, sheep, pigs, rats and mice, they displayed a fairly high (64.7% ~ 96.6%) degree of conservation. Among all species compared, pigs exhibited the highest degree of amino acid similarity of 96.6%, 91.5% and 86.6% with *Panthera tigris altaica*. Sequence alignment indicative of some distinct amino acid diversity, which could be related to the species-specific characteristics of gonadotropins, was also found in the *Panthera tigris altaica* sequence, such as position 39 of the subunit, 20, 24, 68 and 96 of the FSH subunit and 27 and 119 of the LH subunit. Our results not only provide an insight into the characteristics of FSH and LH in *Panthera tigris altaica* that can make a practical contribution to its conservation, but also lay the foundation for further research towards producing recombinant FSH and LH which could increase the efficiency of artificial breeding technology.

Key words *Panthera tigris altaica*, Cloning, Assisted reproduction, FSH and LH

* This work was supported by the Chengdu Research Fund of Giant Panda Breeding (2000-19)

** Corresponding author. lsczhumy@mail.hz.zj.cn