

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00896

# 斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)*GnRH II* 基因的克隆及启动子分析

陈戟, 罗余山, 朱作言, 胡炜

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:** 促性腺激素释放激素(Gonadotrophin-releasing hormone, GnRH)是调控脊椎动物生殖的关键因子之一。文章克隆了经济鱼类斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)*GnRH II* 基因的 cDNA、基因组序列及其启动子, 发现 *GnRH II* 基因启动子中与组织特异性表达相关的区域位于距转录起始点上游-2005 bp~-956 bp 之间。以 *GnRH II* 启动子驱动绿色荧光蛋白在斑马鱼胚胎中表达的结果显示, GnRH II 神经元主要分布在中脑附近和眼部。文章为深入了解 *GnRH II* 基因表达的调控机制及 *GnRH II* 基因的功能提供了基础信息。

**关键词:** 斜带石斑鱼; 促性腺激素释放激素(GnRH); 启动子

## Cloning and promoter analysis of gonadotrophin-releasing hormone II in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)

CHEN Ji, LUO Yu-Shan, ZHU Zuo-Yan, HU Wei

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

**Abstract:** Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) is a key regulator of reproduction in all vertebrates. We first cloned the cDNA and genomic DNA sequences coding for *GnRH* gene in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), an economically important marine fish, and then cloned its promoter sequence. The region responsible for the cell-specific expression of *GnRH* was located between -2005 bp to -956 bp from the translation start site. *GnRH* promoter driven EGFP expression in transgenic zebrafish showed that GnRH -positive neurons were primarily located in the midbrain and in the eyes. Our results provide an improved understanding of the regulatory mechanism and function of *GnRH* of *E. coioides*.

**Keywords:** orange-spotted grouper(*Epinephelus coioides*); gonadotrophin-releasing hormone (GnRH); promoter

收稿日期: 2012-12-28; 修回日期: 2013-03-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30930069), 中国科学院知识创新重要方向性项目(编号: KSCX2-EW-N-004)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2010CB126302)资助

作者简介: 陈戟, 博士, 研究方向: 鱼类遗传学。Tel: 027-68780677; E-mail: chenji7890@gmail.com

通讯作者: 胡炜, 研究员, 研究方向: 鱼类基因工程。E-mail: huwei@ihb.ac.cn

致谢: 感谢中山大学生命科学学院刘晓春教授在提供石斑鱼实验材料方面给予的帮助。

网络出版时间: 2013-4-1 13:27:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130401.1327.001.html>

促性腺激素释放激素(Gonadotrophin-releasing hormone, GnRH)是位于下丘脑-垂体-性腺轴中的上游信号分子,在脊椎动物的生殖发育中发挥着至关重要的功能。GnRH 由下丘脑产生,通过下丘脑-垂体门静脉到达垂体前叶,进而刺激促性腺激素的释放,促进性激素的合成和配子发生<sup>[1]</sup>。

在鸟类和哺乳类等高等脊椎动物中,存在着两种 GnRH(型和型)。由于进化过程中的第 2 次基因组复制,硬骨鱼有 3 种 GnRH(型、型和型)<sup>[2-5]</sup>。3 种 GnRH 在功能和分布上各不相同。GnRH 主要通过卵泡刺激素及黄体生成素调控生殖;GnRH 对性行为和摄食有影响;GnRH 与性行为有关,并且在某些物种中调控促性腺激素的释放<sup>[4,6,7]</sup>。在非洲鲶(*Clarias gariepinus*)<sup>[8]</sup>、乌颊鱼(*Sparus aurata*)<sup>[9]</sup>、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[10]</sup>、斑马鱼(*Danio rerio*)<sup>[11]</sup>、青鳉(*Oryzias latipes*)<sup>[12]</sup>、黄锡鲷(*Sparus sarba*)<sup>[13]</sup>中的研究表明,鱼类 GnRH 神经元细胞发生于嗅板,向嗅觉神经迁移,最终分布于嗅球、端脑腹侧和视前区;GnRH 神经元发生于中脑侧面,随后迁移至中脑被盖中线;GnRH 与 GnRH 起源相同<sup>[10,14]</sup>,所以神经元也有类似的起源和分布。

GnRH 表达调控极为复杂。目前已有有人(*Homo sapiens*)<sup>[11]</sup>、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[15]</sup>、斑马鱼<sup>[11,13]</sup>和黄锡鲷<sup>[13]</sup>等物种的 *GnRH* 基因启动子的研究报道。对 *GnRH* 基因启动子的序列分析表明其上有许多转录因子的结合位点,暗示 *GnRH* 可被多种因子调控。

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)是一种重要的海洋经济鱼类。由于其具有天然性反转的特性,石斑鱼也是研究生殖发育和性别分化的独特材料<sup>[16,17]</sup>。有研究表明,正向调控 *GnRH* 的 Kisspeptin 和负向调控 *GnRH* 的 GnIH 能调节石斑鱼性激素释放<sup>[18,19]</sup>,因此推测 GnRH 也可能参与调控斜带石斑鱼的生殖发

育和性激素释放<sup>[20]</sup>。为了初步了解斜带石斑鱼 *GnRH* 基因的基本信息和表达特征,本研究克隆了斜带石斑鱼 *GnRH* 的 cDNA、基因组序列和启动子,确定了启动子的核心区域,并确认了 GnRH 神经元的分布区域。该结果为进一步研究 *GnRH* 在斜带石斑鱼器官发育和生殖行为中的调控作用提供了信息。

1 材料和方法

1.1 材料

斜带石斑鱼取自广东省大亚湾,体重在 2.2~2.9 kg 之间。

1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取,反转录 cDNA

以酚-氯仿法从斜带石斑鱼肝组织中提取基因组 DNA。脑组织取出后保存在-80 ,随后用 TRIzol(Invitrogen, USA)提取总 RNA,并用 DNase I(Promega, USA)处理 RNA 样品以去除残留基因组 DNA。20 μL 反转录体系中包含 2 μg RNA 模板、5 pmol Oligo-d(T)、4 μL 5×RT buffer、1 mmol/L dNTP、100 U ReverTra Ace(TaKaRa, Japan)和 20 U RNase Inhibitor (TaKaRa, Japan)。反转程序为 30 10 min, 42 30 min, 95 5 min。

1.2.2 RACE, *GnRH II* 基因组序列克隆和染色体步移

3'和 5'RACE 使用 GenaRacer Kit(Invitrogen, USA)。根据各物种的 *GnRH* 前体 cDNA 保守区序列设计 3'RACE 引物,再根据 3'RACE 结果设计 5'RACE 引物。根据 RACE 获得的 cDNA 全长设计引物克隆基因组序列。使用 Genome Walker Kit (TaKaRa, Japan)进行染色体步移以获得启动子序列,总共进行了 3 轮步移。所有引物序列信息见表 1。将所有 PCR 产物片段连入 pMD18-T 载体(TaKaRa,

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	用途
<i>GnRH</i> DP1	CARCA YTG GWSNCA YGGNTGGTA	第一轮 3'RACE
<i>GnRH</i> DP2	CAYGGITGGTAYCCIGGIGG	第二轮 3'RACE
<i>GnRH</i> GSP1	GGGCACTGAAGAGGAGG	第一轮 5'RACE
<i>GnRH</i> GSP2	AGCAGTGTAGGGTGGAA	第二轮 5'RACE

Japan), 挑取阳性克隆质粒测序。

### 1.2.3 *GnRH II* 启动子活性分析

克隆两个启动子片段(分别距转录起始点-2005 bp~-7 bp 和-956 bp~-7 bp), 分别连入去除 *CMV* 启动子的 pEGFP 载体(Invitrogen, USA), 构建体分别被命名为 pGnRH Pro-EGFP 1 及 pGnRH Pro-EGFP 2。采用显微注射将两个构建体分别导入斑马鱼受精卵(构建体浓度 100 ng/ $\mu$ L, 每个胚胎注射 2 nL)。用 Olympus SZX12 型体视镜观察绿色荧光, Nikon DS-5MC 型 CCD 拍照。

### 1.2.4 启动子 5'端连续缺失分析

参照 Alcaraz-Perez 等<sup>[21]</sup>报道的方法, 以斑马鱼胚胎为材料进行启动子 5'端连续缺失分析。将不同长度的 7 个启动子片段[219 bp (-225 bp~-7 bp)、470 bp (-476 bp~-7 bp)、707 bp (-713 bp~-7 bp)、807 bp (-813 bp~-7 bp)、950 bp (-956 bp~-7 bp)、1 999 bp (-2005 bp~-7 bp) 和 2 504 bp (-2510 bp~-7 bp)]分别连入 pGL3 载体, 构成阳性质粒。以去除启动子的 pGL3 质粒作为阴性对照。

### 1.2.5 序列分析和数据处理

使用 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)进行 *GnRH* 前体氨基酸序列的比对分析。使用 MEGA 4.0 进行聚类分析<sup>[22]</sup>。使用 Alibaba 2.0

(<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html/>)和 MatInspector V2.2 (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/.eldorado/main.pl>)进行启动子转录因子结合位点预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GnRH* cDNA 和基因的分子特征

斜带石斑鱼 *GnRH* 前体 cDNA 长 616 bp (GenBank 登录号 :FJ550191), 包含 135 bp 的 5'UTR、226 bp 的 3'UTR 和 255 bp 的开放阅读框, 编码 85aa 的多肽。与其他物种的 *GnRH* 基因类似, 斜带石斑鱼 *GnRHII* 基因(GenBank 登录号 :FJ794694)含 4 个外显子和 3 个内含子(图 1A)。内含子序列末端符合“GT-AG”规律。

斜带石斑鱼 *GnRH* 前体蛋白包含 4 个部分: 信号肽(1~23aa)、*GnRH* 核心十肽(24~33aa)、GKR 水解位点(34~36aa)和 *GnRH* 相关肽 GAP(37~85aa)。核心十肽序列为“QHWSHG WYPG”(图 1B)。

### 2.2 序列分析

斜带石斑鱼 *GnRH* 的核心十肽与鸡的完全相同。为了更明确斜带石斑鱼 *GnRH* 的进化地位, 我们进行了 *GnRH* 前体蛋白氨基酸序列的比对。序列比对结果表明, 斜带石斑鱼 *GnRH* 前体蛋白与其他硬骨鱼类有较高的序列相似性(图 2), 如与罗非

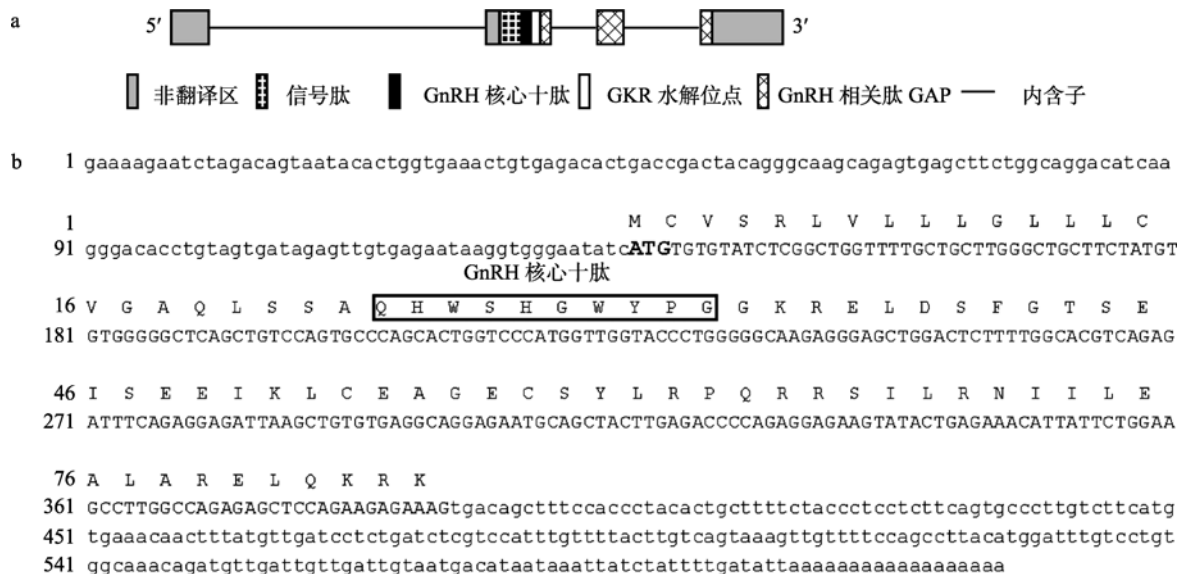


图 1 斜带石斑鱼 *GnRH II* 基因结构

A: 斜带石斑鱼 *GnRH* 基因对应多肽的结构; B: 斜带石斑鱼 *GnRH* 基因的全长 cDNA 和推导的氨基酸序列。

鱼(GenBank 登录号 : BAC65155)、北方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*, GenBank 登录号 : ABX10869)、红鼓鱼(*Sciaenops ocellatus*, GenBank 登录号 : AAT80330)和细须石首鱼(*Micropogonias undulates*, GenBank 登录号 : AY324669)的序列相似性分别为 95%、94%、93%和 92%。而与高等脊椎动物有较低的同源性, 如与鸡(*Gallus gallus*, GenBank 登录号 : AB194408)、猕猴(*Macaca mulatta*, GenBank 登录号 : NP\_001029374)、臭鼬(*Suncus murinus*, GenBank 登

录号 : AAD09114)和人(GenBank 登录号 : CAC29101)的序列相似性分别为 28%、33%、32%、36%。

### 2.3 *GnRH* 启动子克隆

通过 3 轮染色体步移, 获得了 *GnRH* 基因 2 598 bp 的启动子序列。分析软件预测启动子上可能存在的转录因子结合位点包括 : Oct-1, AP-1, C/EBP, ER, GATA-1, GCN4, HNF-3, ICSBP, JunD, Pit-1, SP1, TBP, Ubx 和 USF(图 3)。

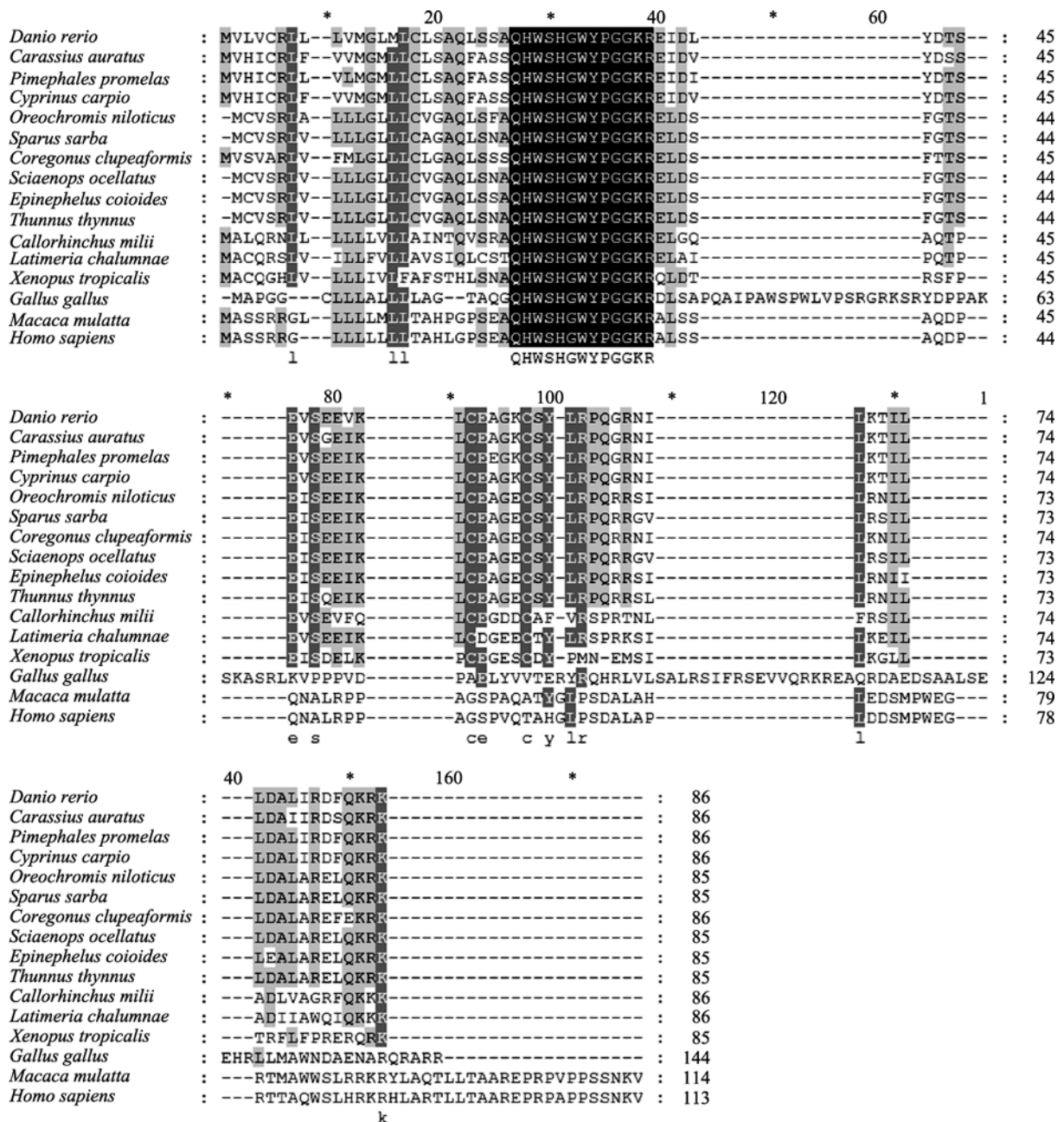


图 2 斜带石斑鱼和其他物种的 *GnRH* II 前体蛋白氨基酸序列比对

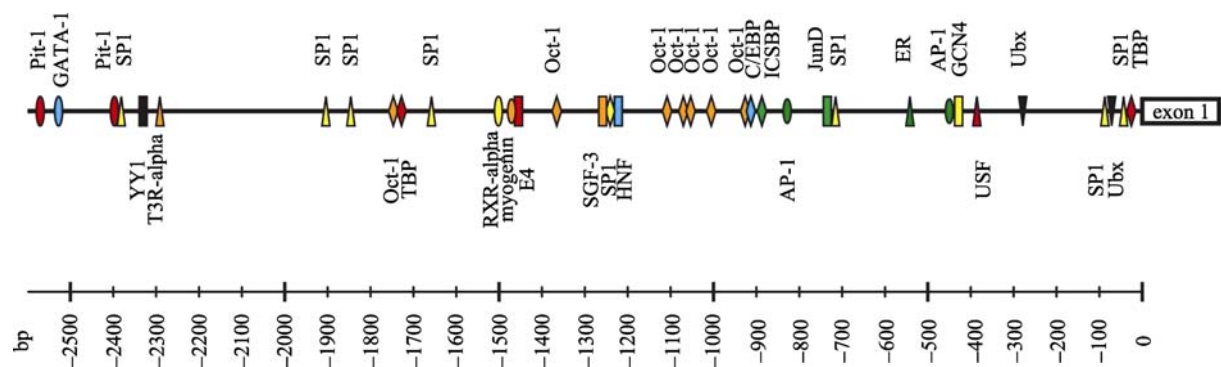


图 3 斜带石斑鱼 *GnRH II* 启动子的调控模型

表 2 斜带石斑鱼和其他物种 *GnRH II* 启动子调控模型的比对

	Oct-1	AP-1	C/EBP	C/EBPalpha	COUP	CPI	ER	GATA-1	GCN4	HNF-3	ICSBP
<i>Epinephelus coioides</i>	7	2	1	0	0	0	1	1	1	1	1
<i>Sparus sarba</i>	4	0	0	2	1	0	2	1	1	2	0
<i>Oreochromis niloticus</i>	4	1	0	4	1	1	1	0	1	0	0
<i>Danio rerio</i>	4	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0

	ISGF-3	JunD	NF-1	NF-kappaB	Pit-1	PR	RXR-beta	SP1	TBP	Ubx	USF	zeste
<i>Epinephelus coioides</i>	0	1	0	0	1	0	0	7	2	2	1	0
<i>Sparus sarba</i>	1	0	0	0	1	0	0	7	1	1	0	0
<i>Oreochromis niloticus</i>	2	0	1	1	0	1	1	7	0	0	0	1
<i>Danio rerio</i>	0	0	1	1	0	0	0	2	11	0	1	0

2.4 斑马鱼中 *GnRH* 启动子驱动的 EGFP 组织表达

将 pGnRH pro-EGFP 1 显微注射到斑马鱼受精卵, 在发育 2 d 后的胚胎中, 后脑处可见微弱的绿色荧光。而在注射 pGnRH pro-EGFP 2 的胚胎中, 包括脑、肌肉和皮肤的多个组织都表达绿色荧光(图 4A)。在注射 pGnRH pro-EGFP 1 3 d 后的胚胎中, EGFP 主要表达于脑中部和眼部(图 4B)。而在注射 pGnRH pro-EGFP 2 3 d 后的胚胎中, EGFP 仍然呈现泛组织表达。

2.5 *GnRH* 启动子转录活性分析

启动子 5'缺失分析显示, -2510 bp~-7 bp 具有最强的转录活性, 高于对照 122 倍。-2510 bp 下游连续缺失的一系列启动子片段转录活性逐渐减弱, -2281 bp~-7 bp、-2005 bp~-7 bp、-813 bp~-7 bp 区间启动子的相对转录活性分别为对照的 85、47 及 10 倍。而-713 bp~-7 bp、-476 bp~-7 bp 及-225 bp~-7 bp 已基本无转录活性(图 4C)。该结果表明, 斜带石斑鱼 *GnRH* 启动子的转录活性区位于-2520 bp~

-713 bp 之间。

3 讨论

本研究克隆了斜带石斑鱼 *GnRH* 的 cDNA 和基因组 DNA。同其他物种 *GnRH* 一样, 斜带石斑鱼 *GnRH* 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成。第一外显子不参与 *GnRH* 前体蛋白的编码, 第二外显子编码信号肽、核心十肽、GKR 水解位点和部分相关肽 GAP, 第三、四外显子编码相关肽 GAP 的其余部分。许多物种的 *GnRH* 已被克隆, 尽管 *GnRH* 前体蛋白的序列相似性不高, 但是核心十肽却非常保守。目前, 总共发现了 24 种核心十肽序列<sup>[14]</sup>, 斜带石斑鱼的 *GnRH* 核心十肽与鸡的核心十肽(cGnRH)完全相同, 都为 QHWSHGWYPG。

虽然已有一些针对 *GnRH* 活性调控机制的研究<sup>[11,23]</sup>, 但其机制仍不清楚。本研究对比了斜带石斑鱼、鲷、罗非鱼、斑马鱼和刺棘鱼的 *GnRH* 启动子特征, 发现启动子区域没有明显的相似性, 但其上分布的转录因子结合位点类似(表 2)。这可能暗示



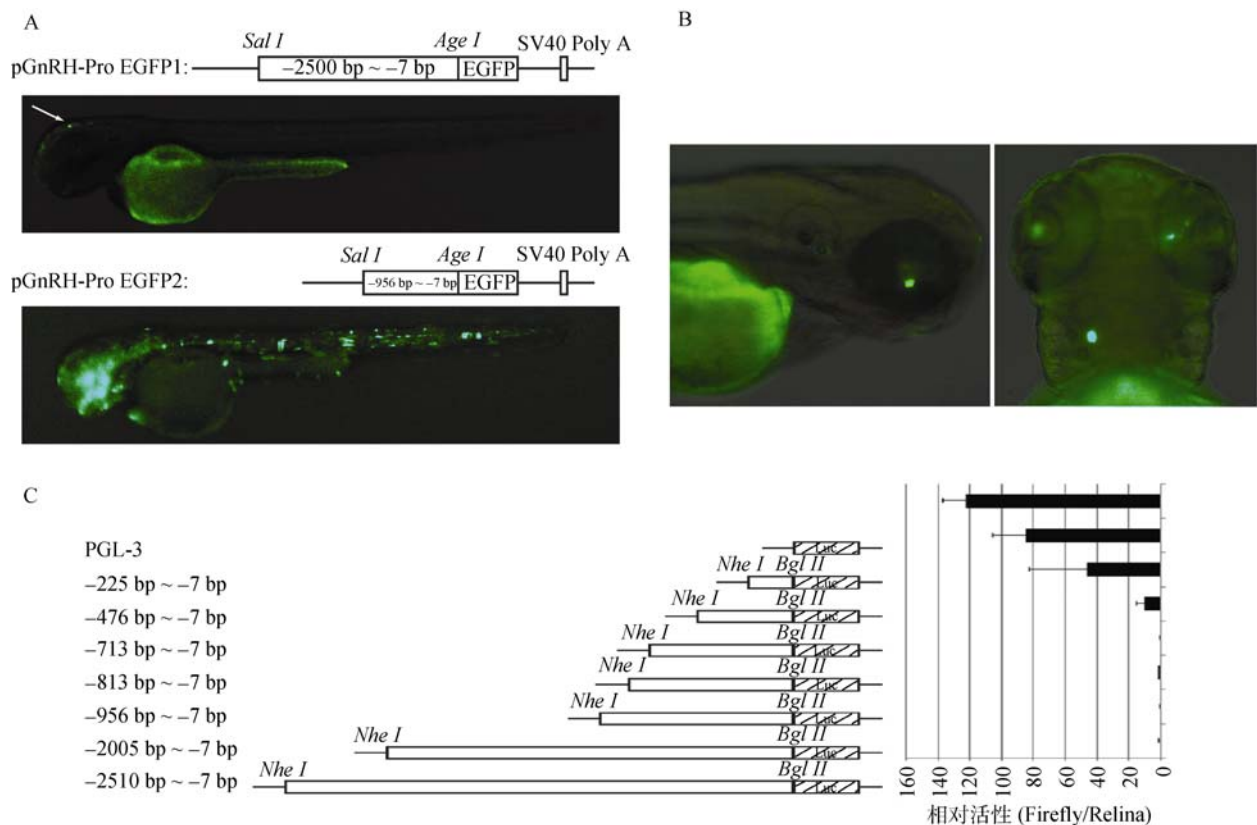


图 4 *GnRH II* 启动子活性分析

A: 使用 *GnRH* 启动子部分片段驱动的 EGFP 在受精后 2 d 的斑马鱼胚胎中的表达情况; B: 注射 pGnRH pro-EGFP 1 质粒的受精后 3d 胚胎中的 EGFP 表达情况; C: 启动子 5' 端连续缺失活性分析。

了鱼类 *GnRH* 表达调控机制的保守性。本研究确定了斜带石斑鱼 *GnRH* 活性调控的启动子区域。启动子-956 bp~-7 bp 区域驱动 EGFP 泛组织表达, 而-2005 bp~-7 bp 区域能使 EGFP 组织特异性表达。由此我们认为, -2005 bp~-956 bp 区域与 *GnRH* 组织特异性表达相关。Oct-1 和 Olf-1 被认为与人和小鼠 *GnRH* 组织特异性表达有关<sup>[23,24]</sup>, 而本研究在斜带石斑鱼 *GnRH* 启动子-2005 bp~-956 bp 区域发现了多达 6 个 Oct-1 结合位点, 猜测 Oct-1 可能在调控斜带石斑鱼 *GnRH* 的表达活性上具有重要作用。

Palevitch 等<sup>[11]</sup>通过 RNA 原位杂交和特异启动子驱动 EGFP 表达的方法, 确定斑马鱼的 *GnRH* 神经元分布于前脑、中脑和后脑。而黑鲷的 *GnRH* 神经元只分布于中脑<sup>[13]</sup>。本研究中, 石斑鱼 *GnRH* 神经元也分布于在脑中中部附近分布, 推测其分布特点与 *GnRH* 行使生殖调控功能相一致。有趣的是, 本研究还发现 *GnRH* 神经元细胞也分布于石斑鱼眼部。

*GnRH* 敲降的斑马鱼, 其眼部发育畸

形, 并且一些视觉发育的标记基因如 *pax 2.1*、*pax 6.1*、*mab 21l2* 和 *meis1.1* 也表达异常<sup>[25]</sup>。此外, 也有研究发现 *GnRH* 还与视觉信号处理有关<sup>[26,27]</sup>。因此, 我们推测石斑鱼 *GnRH* 可能参与视觉系统的发育和行使相关功能。

#### 参考文献(References):

- [1] Lee VHY, Lee LTO, Chow BKC. Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the *GnRH* gene. *FEBS J*, 2008, 275(22): 5458-5478. DOI
- [2] Lethimonier C, Madigou T, Muñoz-Cueto JA, Lareyre JJ, Kah O. Evolutionary aspects of *GnRH*s, *GnRH* neuronal systems and *GnRH* receptors in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*, 2004, 135(1): 1-16. DOI
- [3] Li SF, Hu W, Wang YP, Zhu ZY. Cloning and expression analysis in mature individuals of two chicken type-II *GnRH* (c*GnRH*-II) genes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci China C Life Sci*, 2004, 47(4): 349-358. DOI
- [4] 黎双飞, 胡炜, 汪亚平, 孙永华, 陈尚萍, 朱作言. 鲤鱼 *sGnRH* 基因克隆及其在成熟个体的表达分析. 遗传学

- 报, 2004, 31(10): 1072–1081. [DOI](#)
- [5] Meyer A, Van de Peer Y. From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 2005, 27(9): 937–945. [DOI](#)
- [6] Hu W, Li SF, Tang B, Wang YP, Lin HR, Liu XC, Zou J, Zhu ZY. Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal development in transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 2007, 271(1-4): 498–506. [DOI](#)
- [7] Xu J, Huang W, Zhong CR, Luo DJ, Li SF, Zhu ZY, Hu W. Defining global gene expression changes of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in female sGnRH-antisense transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Plos One*, 2011, 6(6): e21057. [DOI](#)
- [8] Zandbergen MA, Kah O, Bogerd J, Peute J, Goos HJ. Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormones in the catfish brain. *Neuroendocrinol*, 1995, 62(6): 571–578. [DOI](#)
- [9] Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod*, 1996, 55(3): 636–645. [DOI](#)
- [10] González-Martínez D, Zmora N, Mananos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *J Comp Neurol*, 2002, 446(2): 95–113. [DOI](#)
- [11] Palevitch O, Kight K, Abraham E, Wray S, Zohar Y, Gothilf Y. Ontogeny of the GnRH systems in zebrafish brain: *in situ* hybridization and promoter-reporter expression analyses in intact animals. *Cell Tissue Res*, 2007, 327(2): 313–322. [DOI](#)
- [12] Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocrinol*, 2008, 20(3): 394–405. [DOI](#)
- [13] Hu SY, Chen MH, Lin YC, Lin GH, Gong HY, Yang TH, Wu JL. Cloning and functional analysis of the proximal promoter region of the three GnRH genes from the silver sea bream (*Sparus sarba*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2008, 151(4): 373–380. [DOI](#)
- [14] Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol*, 2007, 153(1-3): 346–364. [DOI](#)
- [15] Kitahashi T, Sato H, Sakuma Y, Parhar IS. Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(2): 536–543. [DOI](#)
- [16] Wang Y, Zhou L, Yao B, Li CJ, Gui JF. Differential expression of thyroid-stimulating hormone  $\beta$  subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 220(1-2): 77–88. [DOI](#)
- [17] Chen J, Hu W, Zhu ZY. Progress in studies of fish reproductive development regulation. *Chin Sci Bull*, 2013, 58(1): 7–16. [DOI](#)
- [18] Shi Y, Zhang Y, Li SS, Liu Q, Lu DQ, Liu M, Meng ZN, Cheng CHK, Liu XC, Lin HR. Molecular identification of the kiss2/kiss1ra system and its potential function during 17 $\alpha$ -methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Biol Reprod*, 2010, 83(1): 63–74. [DOI](#)
- [19] Zhang Y, Li SS, Liu Y, Lu DQ, Chen HP, Huang XG, Liu XC, Meng ZN, Lin HR, Cheng CHK. Structural diversity of the gnih/gnih receptor system in teleost: Its involvement in early development and the negative control of LH release. *Peptides*, 2010, 31(6): 1034–1043. [DOI](#)
- [20] Gui JF, Zhu ZY. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals. *Chin Sci Bull*, 2012, 57(15): 1751–1760. [DOI](#)
- [21] Alcaraz-Pérez F, Mulero V, Cayuela ML. Application of the dual-luciferase reporter assay to the analysis of promoter activity in Zebrafish embryos. *BMC Biotechnol*, 2008, 8: 81. [DOI](#)
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596–1599. [DOI](#)
- [23] Clark ME, Mellon PL. The POU homeodomain transcription factor Oct-1 is essential for activity of the gonadotropin-releasing hormone neuron-specific enhancer. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(11): 6169–6177. [DOI](#)
- [24] Kudrycki K, Stein-Izsak C, Behn C, Grillo M, Akeson R, Margolis FL. Olf-1-binding site: characterization of an olfactory neuron-specific promoter motif. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(5): 3002–3014. [DOI](#)
- [25] Wu S, Page L, Sherwood NM. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 257-258: 47–64. [DOI](#)
- [26] Grens KE, Greenwood AK, Fernald RD. Two visual processing pathways are targeted by gonadotropin-releasing hormone in the retina. *Brain Behav Evol*, 2005, 66(1): 1–9. [DOI](#)
- [27] Maruska KP, Tricas TC. Gonadotropin-releasing hormone and receptor distributions in the visual processing regions of four coral reef fishes. *Brain Behav Evol*, 2007, 70(1): 40–56. [DOI](#)