

文章编号: 1004-7271(2006)03-0270-06

奥利亚罗非鱼促性腺激素释放激素 cDNA 的克隆及原核表达

曹丽萍, 丁炜东

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种
和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要 促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)是下丘脑分泌产生的神经激素,对脊椎动物生殖的调控起重要作用。本研究通过 RT-PCR 方法从奥利亚罗非鱼丘脑中扩增出长约 400 bp 的目的序列 GnRH,并将其克隆到 T 载体中,经酶切鉴定、序列测定分析后表明其与尼罗罗非鱼和乌鲷海鲷具有较高的同源性,处于同一个进化分支上,而与日本青鲈、金鱼、拟鲤、壁虎等的同源性较低。将此 cDNA 片段定向克隆到表达载体 pMAL-c2x 中构建重组表达质粒 pMAL-GnRH,转化到大肠杆菌 TB1 中,0.3M IPTG 诱导 4 h 后成功表达出与预期大小相符的约 56 kD 的融合蛋白。表明大肠杆菌表达系统可以成功地体外表达奥利亚罗非鱼 GnRH,为进一步制备抗体了解其免疫调节作用奠定基础。

关键词 奥利亚罗非鱼;促性腺激素释放激素;相关肽;基因克隆;原核表达

中图分类号 S 917 文献标识码: A

Cloning and prokaryotic expression of the cDNA of gonadotropin-releasing hormone in *Oreochromis aurea*

CAO Li-ping, Ding Wei-dong

(Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture,
Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract The cDNA encoding gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH associated peptide (GAP) was amplified from total RNA from *Oreochromis aurea* pituitary glands by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method, and then blasted against other GnRH cDNA sequences in the GenBank. The analysis of the sequence data indicated that the coding region of the cDNA fragment, which encoded 89 amino acid residues, is about 400 bp in size. A high homology was found with the GnRH coding region within *O. niloticus*, *O. aurea* and *S. aurata*. The amplified cDNA fragment was cloned into the prokaryotic expression vector, pMAL-c2x, to produce the expression vector pMAL-GnRH. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* TB1. GnRH-MBP fusion protein was obtained after the addition of IPTG into the growth media. SDS-PAGE analysis revealed that the GnRH-MBP was expressed after induction with IPTG for 4h. A protein band of 56 kD appeared on SDS-PAGE gel. It is anticipated that the fusion protein will be proved useful for further research.

收稿日期 2005-07-18

基金项目: 国家 973 项目(2004CB117401)* 863 项目(2004AA243060); 国家“十五”攻关(2004BA526B0110); 农业部海洋与河口重点开放实验室开放课题(开-2-04-01)

作者简介: 曹丽萍(1977-),女,江苏泰兴人,硕士,主要从事鱼类生物技术研究。E-mail: caolp@ffrc.cn, Tel: 0510-88296778

Key words : *Oreochromis aurea* ; gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ; GnRH associated peptide (GAP) ; gene cloning ; prokaryotic expression

促性腺激素释放激素是下丘脑 - 垂体 - 性腺 (hypothalamic-pituitary-gonadal , HPG) 轴的关键信息分子 , 通过刺激垂体前叶释放促性腺激素 (Gonadotropin , GtH) , 在脊椎动物的性腺发育、繁殖功能的维持中起着重要的作用。GnRH 前体蛋白由信号肽、GnRH 十肽 (decapeptide) 促性腺激素释放激素相关肽 (GnRH associated peptide , GAP) 构成 , 经酶切加工后释放出有活性的 GnRH 十肽。临床上用免疫接种技术控制 GnRH 的释放量来控制哺乳动物的性腺发育已经取得了成功^[1]并表现出诱人的前景。Øivind Andersen^[2]等研究了抗虹鳟 GnRH 的免疫接种 , 提出了一种有望控制鱼类性成熟的方法 , 认为免疫抑制技术在控制虹鳟生殖方面有一定的应用潜势。奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*) 属鲈形目、鲷鱼科 , 具有繁殖周期短 , 生长速度快 , 抗逆性能强等特点 , 是热带和亚热带地区重要的淡水经济鱼种 , 在淡水养殖业中占有重要的地位。但是它也存在性成熟提早 , 过度繁殖^[3]等问题 , 因此对性腺发育具有调节作用的 GnRH 为研究的一个方向。本试验采用 RT-PCR 方法克隆出奥利亚罗非鱼 GnRH 基因 cDNA , 将其克隆入原核表达系统中 , 得到重组表达质粒 , 在大肠杆菌中以 IPTG 诱导表达得到 GnRH/GAP 融合蛋白 , 利用其较好的免疫原性 , 为进一步制备抗体的研究工作打下基础。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

奥利亚罗非鱼取自淡水中心渔场 , 组织为丘脑。

1.2 仪器与试剂

PCR 仪购自 BioRod 公司 , 反转录试剂盒、T4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、*EcoRI*、*Hind III* 等购自大连宝生物公司 , 聚丙烯酰胺、RNase 抑制剂等购自上海生物工程公司。

1.3 质粒与菌株

pMD18-T 载体购自大连宝生物公司 , 表达质粒 pMAL-c2x 为本室保存 , 受体细菌 JM109 和 TB1 由本室保存。

1.4 引物设计与 RT-PCR 反应

根据已发表尼罗罗非鱼 GnRH 基因序列 (GenBank 检索号 : AB101666) 设计了位于非编码区的一对特异性引物 :

引物 1 5' -ACTGAGGGAACTTGGACTGAT -3'

引物 2 5' -CAAGGCAGAAATAGAAAGGAAG -3'

反转录引物 AP 购自上海生物工程公司。

以提取自罗非鱼的丘脑总 RNA 为模板进行反转录合成第一链 cDNA , 以反转录产物为模板及合成的上下游引物进行 PCR 扩增 , 反应条件为 : 94 °C 预变性 3 min , 94 °C 预变性 30 sec , 55 °C 退火 45 sec , 72 °C 延伸 1 min , 30 个循环 , 72 °C 延伸 7 min。

1.5 PCR 产物的克隆与鉴定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后用凝胶回收试剂盒回收 , 将回收产物与 pMD18-T 载体 16 °C 连接过夜 , 连接产物转化大肠杆菌 JM109 , 随机挑取细菌 , 提取质粒后以 *EcoRI*、*Hind III* 双酶切初步鉴定后 , 将阳性克隆送交上海生工进行 DNA 测序。测序结果用 DNASTAR、CLUSTAL X 等软件进行分析。

1.6 原核表达载体的构建

在筛选出正向连接的 pMD-18T-GnRH/GAP 克隆后 , 将其和原核表达质粒 pMAL 分别用 *EcoRI*、*Hind III* 37 °C 双酶切 , 用凝胶回收试剂盒回收 GnRH/GAP 片段和线性化 pMAL 质粒 , 按照 T4 DNA 连接酶

的说明书设计连接反应体系,构建表达质粒 pMAL-GnRH/GAP,并转化大肠杆菌 JM109,筛选阳性克隆,随机挑取 2 个克隆进行酶切鉴定。

1.7 目的基因在大肠杆菌中的表达

将 pMAL-GnRH/GAP 转化大肠杆菌 TB1,挑取阳性克隆接种到含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养过夜,取培养菌液以 1:10 的比例接种于新鲜的含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,分别以 0.3、1M 浓度的 IPTG 诱导,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇瓶培养 4 h 后,收集菌体,重悬于 100 μL SDS-PAGE 上样缓冲液中,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸,通过对菌体和上清的 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白的表达。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳表明,扩增到了预期大小即约 400 bp 的目的片段(图 1)。

2.2 重组质粒 pMD18-T-GnRH/GAP 和 pMAL-GnRH/GAP 的构建及酶切鉴定。

2.2.1 重组质粒 pMD18-T-GnRH/GAP 构建及酶切鉴定

将候选的重组质粒 pMD18-T-GnRH 转化大肠杆菌 JM109 菌株后,随机挑取 10 个克隆提取质粒,提取的质粒经 *EcoRI* 和 *Hind* III 双酶切(图 2 泳道 1),酶切结果表明 pMD18-T-GnRH/GAP 酶切后有一条约 400 bp 的条带,说明 GnRH/GAP 成功克隆入 T 载体中,将重组质粒 pMD18-T-GnRH/GAP 送测序公司测序。

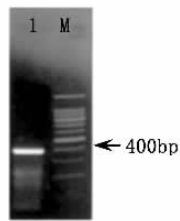


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

M: DNA 分子量标记; 1: RT-PCR 产物

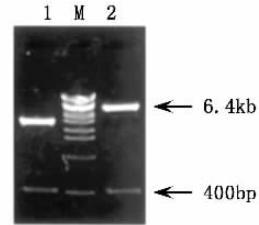


图 2 重组质粒 pMD18-T-GnRH 的限制性酶切分析

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of pMD18-T-GnRH plasmid

M: DNA 分子量标记; 1: pMD18-T-GnRH 经 *EcoRI* 和 *Hind* III 双酶切; 2: pMAL-GnRH 经 *EcoRI* 和 *Hind* III 双酶切

2.2.2 序列分析

测序结果(图 3)表明奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼 GnRH cDNA 只有少数的碱基不同,并从绘制的基因发生树(图 4)也可以看出奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼、乌颊海鲷的亲缘关系较近。将其翻译成氨基酸后与尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、乌颊海鲷(*Sparus aurata*)、日本青鳉(*Oryzias latipes*)、拟鲤(*Rutilus rutilus*)、金鱼(*Carassius auratus*)、壁虎(*Eublepharis macularius*)、人(*Homo sapiens*)、家鼠(*Mus musculus*)的 GnRH 前体蛋白的氨基酸序列进行比较(图 5),相似性分别为:98.8%、92.9%、81.2%、67.1%、63.5%、49.4%、35.3%、22.4%,其中奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼、乌颊海鲷等具有较高的相似性,分别为 98.8%、92.9%。从蛋白质序列(图 5)比较可以看出,GnRH 十肽具有很高的保守性,不同种类的 GnRH 十肽的氨基酸序列变异较小,几乎一致,主要的变化集中在 GAP 中,这可能与 GAP 在不同类别鱼中具有不同的作用有关。这也与基因发生树得到的结果相一致。

2.2.3 重组质粒 pMAL-GnRH/GAP 的构建及酶切鉴定

提取重组质粒 pMD18-T-GnRH 经 *EcoRI* 和 *Hind* III 37 $^{\circ}\text{C}$ 双酶切后,凝胶纯化试剂盒纯化后将纯化产物与经相同酶切的载体 pMAL 相连接,连接产物转化 JM109,提取质粒后再用上述酶进行双酶切,酶切结果(图 2 泳道 2)可见有大小约为 400 bp 的目的片段,表明成功的构建了表达载体 pMAL-GnRH/GAP。

```

1 ATGTGTGTGTCTCGACTGGCTTTGCTCTTGGGGCTGCTTCTCTGTGTGGG 奥利亚罗非鱼.seq
1 ATGTGTGTGTCTCGACTGGCTTTGCTCTTGGGGCTGCTTCTCTGTGTGGG 尼罗非鱼.seq
51 GGCTCAGCTGTCTTTGCCAGCACTGGTCCCATGGTTGGTATCCTGGAG 奥利亚罗非鱼.seq
51 GGCTCAGCTGTCTTTGCCAGCACTGGTCCCATGGTTGGTATCCTGGAG 尼罗非鱼.seq
101 GAAAAAGGGAGCTGGACTCCTTTGGACATCAGAGATTTTCAGAGGAGATT 奥利亚罗非鱼.seq
101 GAAAAAGGGAGCTGGACTCCTTTGGACATCAGAGATTTTCAGAGGAGATT 尼罗非鱼.seq
151 AAGCTGTGTGAAGCAGGGGAATGCAGCTACCTGAGACCCCCAGAGGAGGG 奥利亚罗非鱼.seq
151 AAGCTGTGTGAAGCAGGGGAATGCAGCTACCTGAGACCCCCAGAGGAGGG 尼罗非鱼.seq
201 TATCCTGAGAAACATTTCTTCTGATGCCTTAGCCAGAGAGCTTTCAGAGA 奥利亚罗非鱼.seq
201 TATCCTGAGAAACATTTCTTCTGATGCCTTAGCCAGAGAGCTTTCAGAGA 尼罗非鱼.seq
251 GAAAGTGA 奥利亚罗非鱼.seq
251 GAAAGTGA 尼罗非鱼.seq

```

图 3 尼罗罗非鱼与奥利亚罗非鱼 GnRH cDNA 序列比较

Fig.3 Genomic sequence alignment of *O. niloticus* (accession no. AF467291) and *O. aurea* GnRH cDNA

2.3 融合蛋白的表达

将重组质粒 pMAL-GnRH/GAP 转化大肠杆菌 TB1 菌株后,以 IPTG 0.3、1M 分别诱导 4 h,收集菌体,离心后加上样缓冲液煮沸破碎细胞,进行 12% 浓度的 SDS-PAGE 电泳(图 6)。由图 6 可知,加入 IPTG 诱导后,转入载体 pMAL 的细菌总蛋白提取物中出现了分子量约为 42.5 kD 的蛋白条带(图 6 泳道 3 中箭头所示),而转入重组质粒的细菌总蛋白提取物中出现了新的蛋白质,分子量约为 56 kD(图 6

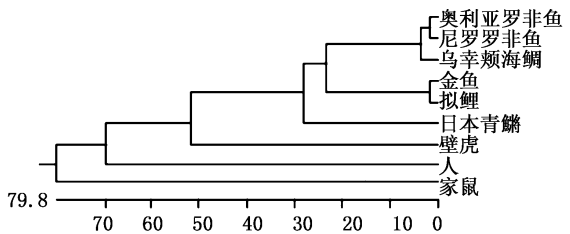


图 4 GnRH 系统进化树

Fig.4 Maximum-parsimony tree for GnRH coding sequences in ten examined fishes

	信号肽	GnRH F 十肽	裂解位点	GAP	
1	MC-VSRLALLLG-LLLCVGAQLSFA	QHWWSHGWYYP	GKRE	ELDSFGTSE	奥利亚罗非鱼
1	MC-VSRLALLLG-LLLCVGAQLSFA	QHWWSHGWYYP	GKRE	ELDSFGTSE	尼罗罗非鱼
1	MC-VSRLVLLLG-LLLCVGAQLSNG	QHWWSHGWYYP	GKRE	ELDSFGTSE	乌颊海鲷
1	M---SRLVLLLG-VLLVYVGAQLSQA	QHWWSHGWYYP	GKRE	ELDSF---E---	日本青鲮
1	MVHICRLFVVMG-WLMFLSVQFASS	QHWWSHGWYYP	GKRE	IDVYDPSE---	金鱼
1	MVHICRLLVLMG-WLLCLSAQFASS	QHWWSHGWYYP	GKRE	IDVYDPSE---	拟鲤
1	MACHRPLLLFLC-IMI IAT IHL SKA	QHWWSHGWYYP	GKRE	VDLSQSPE---	壁虎
1	WASSRRGLLLL-LLLT AHL GPSEA	QHWWSHGWYYP	GKRAL	SSAQDPQNAL	人
1	MI-----LKLWAG ILLLTVCLEGCSS	QHWWSYGLRPG	GKRN	NTEHLVESFQEM	家鼠
46	-----ISEEIKLCEAGECSYLRP	-----	-----	-----QRRGI	奥利亚罗非鱼
46	-----ISEEIKLCEAGECSYLRP	-----	-----	-----QRRSI	尼罗罗非鱼
46	-----ISEEIKLCEAGECSYLRP	-----	-----	-----QRRSV	乌颊海鲷
46	-----VSEEMKLCETGEC SYMRP	-----	-----	-----QRRSF	日本青鲮
47	-----VSEEIKLCNAGKCSFLIP	-----	-----	-----QGRNI	金鱼
47	-----VSGEIKLCEAGKCSYLRP	-----	-----	-----QGRNI	拟鲤
47	-----VSEDIKLCDDGDDCTYLKI	-----	-----	-----PREKI	壁虎
49	RPPGRALD TAAGSPVQTAHGLPSDALAPLDDSMPEWGR TTAQWSLHRKRH	-----	-----	-----	人
47	---GKEVD-QMAEPQHF---	---EC---	---	---TVHWPRSPRLRD	家鼠
69	LRNILLDALARELQ-----KRK	-----	-----	-----	奥利亚罗非鱼
69	LRNILLDALARELQ-----KRK	-----	-----	-----	尼罗罗非鱼
69	LRNILLDALARELQ-----KRK	-----	-----	-----	乌颊海鲷
64	LRNIVLDALARELQ-----KRK	-----	-----	-----	日本青鲮
70	LKTILLDALTRDFQ-----KRK	-----	-----	-----	金鱼
70	LKTILLDALIRDFQ-----KRK	-----	-----	-----	拟鲤
70	VTSLLADLLAKHLQ-----KKK	-----	-----	-----	壁虎
99	LARTLLTA-AREPRPAPPSSNKV	-----	-----	-----	人
73	LRGALESLIEEEARQ-----KKM	-----	-----	-----	家鼠

图 5 罗非鱼 GnRH-GAP 的氨基酸序列与其它鱼类的氨基酸序列的同源性比较

Fig.5 Alignment of the amino acid sequences of GnRH/GAP protein of *O. ourea* and other fishes (图中 GenBank 检索号为尼罗罗非鱼(*O. niloticus*, AB101666) 乌颊海鲷(*S. aurata*, U30325) 金鱼(*C. auratus*, U40567) 拟鲤(*R. rutilus*, U60668) 日本青鲮(*O. Latipes*, ab041330) 壁虎(*E. macularius*, AB104485) 人(*H. sapiens*, NM_001501) 家鼠(*M. musculus*, NM_008145))

泳道 5 中箭头所示)。由于 pMAL 表达质粒本身可编码 42.5 kD 的 MBP(麦芽糖结合蛋白),而 GnRH 及相关肽分子量约为 13.5 kD,理论上融合蛋白的分子量约为 56 kD。这与预期结果相一致,重组表达载体经 IPTG 诱导后,融合蛋白得到表达。而大肠杆菌 TB1 没有相应的蛋白表达。

3 讨论

3.1 GnRH cDNA 基因的克隆

GnRH 基因的保守性已得到公认,其主要由 4 个外显子和 3 个内含子构成。第 1 个外显子包含一个 5'UTR;第 2 个外显子编码信号肽、GnRH 十肽、酶裂解位点、编码部分 GAP;外显子 3 编码大部分的 GAP;GAP 的其余部分和 3'UTR 均为外显子 4 所编码^[4,5]。在本研究中发现奥利亚罗非鱼的 GnRH cDNA 与尼罗罗非鱼 GnRH 几乎是一致的(图 3)。比较各类鱼的 GnRH 前体蛋白的氨基酸序列,同源性

从 98% 到 22.4%,但 GnRH 十肽却是一致的(图 5),进一步验证了 GnRH 十肽区在进化过程中一直是保守的^[6,7]。变异较大的区域主要集中在 GAP 区,这个区域的可变性是很正常的,已有多篇文献^[8]报道了不同鱼类中编码 GAP 氨基酸的差异性,也意味着 GAP 在不同的种群中起着不同的作用。它可能对促性腺激素细胞本身的 FSH 和黄体生成素分泌具有直接的作用,也可能对垂体前叶细胞具有旁分泌作用。但奥利亚罗非鱼与尼罗罗非鱼 GnRH 前体蛋白的氨基酸序列具有较高的一致性,这是由于这两种鱼分类上属于同一属,进化差异较小。采用 Maximum-parsimony 方法绘制了系统发育进化树(图 4),结果显示奥利亚罗非鱼、尼罗罗非鱼与乌颊海鲷 GnRH 前体蛋白同在 1 个分支上,具有较高的同源性;金鱼与拟鲤 GnRH 前体蛋白则同属另 1 分支。因此 GnRH 也可作为系统发育的分子标记。

3.2 GnRH cDNA 的原核表达

GnRH 是一个控制动物性腺发育和繁殖的一个理想激素,除了避孕作用外,它的中和作用可以阻断一些性激素如雌激素、睾丸激素的产生^[8]。目前通常采用提纯或者人工合成的方法得到 GnRH 或其类似物,人工合成的 GnRH 在化学结构和生理作用与天然 GnRH 完全相同,但是半衰期只有 2~4 min,合成的类似物作用时间持久、生物作用更强,可以满足实际工作的需求,但是其穿透各种生物膜的能力却不够,且由天然的 10 肽变成 9 肽影响了 GnRH 的活性^[9]。基于此,探索一种新型的 GnRH 合成方法势在必行,而利用基因工程的方法克隆表达 GnRH 在理论和实践上都是可行的。人源 GnRH 已经在大肠杆菌中获得了表达^[10,11],而鱼类的 GnRH 的体外表达尚未见报道。大肠杆菌表达系统由于其遗传学、生物化学和分子生物学等方面已充分被人们了解而成为表达许多异源蛋白质的首选表达系统,具有生长周期短、培养方便、操作简便、成本低廉等优点。本试验首次将奥利亚罗非鱼 GnRH cDNA 基因在大肠杆菌中进行了融合表达,为进一步制备 GnRH 抗体,了解其免疫调节作用,控制罗非鱼的性成熟提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Matsuo H, Baba Y, Nair R M G, et al. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. 1. The proposed amino acid sequence [J]. Biochem Biophys Res comm. un, 1971, 43 :1334 - 1339.
- [2] Øivind A, Hans J.S. Larsen and Peter Alestrøm. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against gonadotropin releasing hormone : a

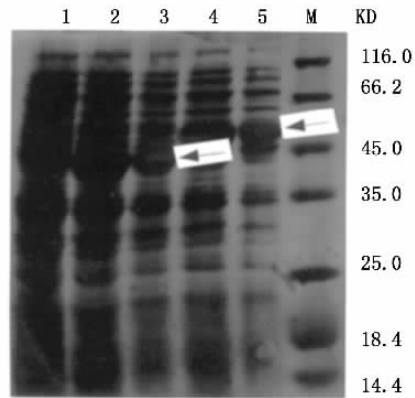


图 6 鉴定大肠杆菌中 GnRH/GAP 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expressed GnRH/GAP fusion protein in *E. coli* TB1

M 蛋白质分子量标记;1: *E. coli* TB1; 2-3: TB1/pMAL 分别经 0.3M、1M IPTG 诱导 4h; 4-5: TB1/pMAL-GnRH/GAP 分别经 0.3M、1M IPTG 诱导 4h。图中箭头表示诱导产生的蛋白,泳道 3 为 MBP,泳道 5 为 MBP-GnRH/GAP 蛋白

- possible approach to the control of sexual maturation in fish [J]. *Aquaculture* , 1992 , 106(2) : 195 - 200 .
- [3] 李家乐, 李晨虹, 李思发. 不同组合尼罗罗非鱼(♀)×奥利亚罗非鱼(♂)养殖性能差异研究 [J]. 上海水产大学学报, 1997, 16(2) : 96 - 101 .
- [4] Chow M M , Kight K E , Gothilf Y , *et al* . Multiple GnRHs present in a teleost species re encoded by separate genes : analysis of the sbGnRH and CcGnRH- II genes from the striped bass , *Morone saxatilis* [J]. *J Mol Endocrinol* , 1998 , 21 : 277 - 289 .
- [5] White R B , Fernald R D . Genomic structure and expression sites of three Gonadotropin-releasing hormone genes in one species [J]. *Gen Comp Endocr* , 1998 , 112 : 17 - 25 .
- [6] Carolsfeld J , Powell J F , Park M , *et al* . Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones , including a novel form , from an ancient teleost , herring [J]. *Endocrinology* , 2000 , 141(2) : 505 - 512 .
- [7] 黎双飞, 胡 炜, 汪亚平, 等. 鲤鱼两个 CcGnRH-II 基因的发现及在成熟个体的表达分析 [J]. 中国科学 C 辑, 2004, 34(1) : 88 - 95 .
- [8] Chow M M , Kight K E , Gothilf Y , *et al* . Multiple GnRHs present in a teleost species re encoded by separate genes : analysis of the sbGnRH and CcGnRH- II genes from the striped bass , *Morone saxatilis* [J]. *J Mol Endocrinol* , 1998 , 21 : 277 - 289 .
- [9] 宋 艳. 促性腺激素释放激素在畜牧业上的应用 [J]. 四川畜牧兽医, 1994, 1 : 59 - 60 .
- [10] 金元昌, 李 璐, 李景鹏. 人促性腺激素释放激素及其转运肽基因的克隆、表达与纯化 [J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(4) : 427 - 431 .
- [11] Xu Jinshu , Liu Jingjing , Peng Duan , *et al* . The immunogenicity of recombinant and dimmeric gonadotrophin-releasing hormone vaccines incorporating a T-helper epitope and GnRH or repeated GnRH units [J]. *Journal of Immunological Methods* , 2004 , 289 : 111 - 122 .