

# 奥利亚罗非鱼促性腺激素释放激素 cDNA 的原核表达及其免疫原性研究 Cloning and Expression of *Oreochromis aurea* Gonadotropin-releasing Hormone cDNA in *Escherichia coli* and Its Immunogenicity for Mice

丁炜东, 曹丽萍, 吴婷婷\*

DING Wei-Dong, CAO Li-Ping and WU Ting-Ting\*

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, 无锡 214081

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

**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。为研究 GnRH 对奥利亚罗非鱼性腺发育的作用,构建了 GnRH cDNA 的原核表达载体并进行融合表达。利用 RT-PCR 方法从丘脑中扩增出长约 400bp 的目的序列 GnRH 基因,克隆至 T 载体中,经酶切鉴定和序列测定分析确认序列的正确性后将此片段克隆到表达载体 pMAL-c2x 中构建重组表达质粒 pMAL-GnRH,并在大肠杆菌 TB1 中获得了高表达,目的蛋白约占菌体总蛋白的 41.6%。菌体经溶菌酶裂解,制备无细胞抽提液, Amylose-sepharose 柱层析后得到分子量为 56kD 单一条带的目的蛋白。目的蛋白经 Factor Xa 酶切裂解, Amylose-sepharose 过柱纯化后得到纯化的 GnRH 前体蛋白。以 80 $\mu$ g/只的剂量 4 次免疫 ICR 小鼠,免疫小鼠可以检测到特异性针对 GnRH 前体蛋白的血清抗体应答,免疫组抗体水平显著高于空白组 ( $P < 0.05$ ),且加强免疫第 5 周后抗体效价为  $0.707 \pm 0.320$ ,达到高峰值,说明表达产物具有免疫原性,可以刺激机体产生免疫应答。

**关键词** 奥利亚罗非鱼,促性腺激素释放激素,促性腺激素释放激素相关肽,原核表达,抗体,免疫原性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0561-06

**Abstract** To study the function of the GnRH protein, the recombinant pMAL-GnRH was constructed and expressed in TB1 *E. coli*. The cDNA encoding gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH associated peptide (GAP) was amplified from total RNA of *O. aurea* pituitary glands by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), 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, was about 400 bp in size. 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 56kD appeared on SDS-PAGE gel and was proved by Western blot. The mass production of the recombinant protein was about 41.6% of total bacteria protein. After purification and cleavage of the fusion protein purified GnRH protein could be obtained. Then the fusion

Received: January 20, 2006; Accepted: March 13, 2006.

This work was supported by a grant from The State Major Basic Research and Development Program of China (No. 2004CB117401), The National High Technology Research and Development Program of China (863 program) (No. 2004AA243060) and opening project from key and open laboratory of marine and estuary fisheries, ministry of agriculture of China (开-2-04-01).

\* Corresponding author. Tel: 86-15-88296778, E-mail: wutt@ffrc.cn

国家 973 项目(No. 2004CB117401);“863”项目(No. 2004AA243060);农业部海洋与河口重点开放实验室开放课题(开-2-04-01);  
© 2006 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心编辑部. All rights reserved. http://www.journals.im.ac.cn

protein was used to immunise some ICR mice to produce anti-GnRH antibody. This fusion protein could significantly elicit specific antibody response in immunized mice compared with the blank groups, and the titers against GnRH reached peak  $0.707 \pm 0.320$  at the 5th week after immunization. These results demonstrated that recombinant protein could induce high GnRH antibody responses in laboratory animals.

**Key words** *O. aurea*, gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH associated peptide (GAP), prokaryotic expression, antibody, immunogenicity

促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)前体蛋白由信号肽、GnRH十肽(decapptide)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。GnRH在调节脊椎动物的生殖发育中起着非常重要的作用,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。关于GnRH的免疫原理,目前还没有确切说法。Meloan<sup>[1]</sup>和Ook等<sup>2,3]</sup>文章中有所论述,认为是血液中的GnRH抗体特异性地中和了动物体内的GnRH,导致体内GnRH生物活性部分或完全丧失,引起内分泌系统平衡的改变,从而改变了HPG轴系,减少或杜绝精子(或卵子)的生成与成熟及激素的合成与释放。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<sup>4]</sup>,并表现出诱人的前景。Andersen<sup>[5]</sup>与Riley<sup>[6]</sup>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力。

奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)属于鲈形目、鲷鱼科,具有繁殖周期短,生长速度快,抗逆性强等特点,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。但是它存在性成熟提早,过度繁殖<sup>7]</sup>等问题,因此对性腺发育具有调节作用的GnRH研究具有一定的生产意义。人源GnRH已经通过基因工程手段获得了体外表达并在动物实验中获得了较好的免疫原性<sup>[8,9]</sup>。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,经分离纯化、酶切后得到GnRH/GAP蛋白,首次表达出鱼类GnRH前体蛋白,纯化蛋白作为抗原免疫ICR小鼠,获得高效价的抗体,为进一步免疫抑制控制鱼类性成熟的研究打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料:

实验鱼:奥利亚罗非鱼取自淡水中心渔场,组织为丘脑。小鼠:购自浙江大学实验动物中心的ICR小鼠。

1.1.2 试剂:AMV反转录试剂盒、T4 DNA连接酶、凝胶回收试剂盒、Taq DNA聚合酶、EcoR I、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工生物工程公司,Factor Xa、Amylose-sepharose柱、抗麦芽糖结合蛋白(MBP)单抗均购自纽英伦生物技术(北京)公司,其他生化试剂均为国产分析纯。弗氏完全、不完全佐剂,ELISA反应板等均购自上海申能博彩生物有限公司。

1.1.3 仪器:PCR仪购自BioRad公司,实验结果记录和蛋白分析使用的是柯达公司的凝胶成像系统,DNA序列分析使用DNASTAR软件,全自动测序工作由上海生工生物工程公司完成。酶标测定仪购自TECAN公司。

1.1.4 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。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与RT-PCR反应:采用Primer5.0设计了一对特异性引物:

引物1 5'-ACTGAGGGAACTTGGACTGAT-3'

引物2 5'-CAAGGCAGAAATAGAAAGGAAG-3'

反转录引物AP购自上海生工生物工程公司。

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℃预变性3min,94℃预变性30s,55℃退火45s,72℃延伸1min,30个循环,72℃延伸7min。

1.2.2 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MD18-T载体16℃连接过夜,连接产物转

化大肠杆菌 JM109, 随机挑取细菌, 提取质粒后用 *EcoR* I、*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。

**1.2.3 原核表达载体的构建**: 在筛选出正向连接的 pMD18T-GnRH/GAP 克隆后, 将其和原核表达质粒 pMAL 分别用 *EcoR* I、*Hind* III 37℃ 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。

**1.2.4 目的基因在大肠杆菌中的表达、鉴定**: 将 pMAL-GnRH/GAP 转化大肠杆菌 TB1, 挑取阳性克隆接种含 50 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 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、1 mol/L 浓度的 IPTG 诱导, 37℃ 振荡培养 4h 后, 收集菌体, 重悬于 100 μL SDS-PAGE 上样缓冲液中, 100℃ 煮沸, 通过对菌体和上清的 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白的表达。参照《分子克隆》<sup>[10]</sup> 及试剂手册进行蛋白质印迹确定蛋白的表达。

**1.2.5 融合蛋白的获得、纯化及裂解**: 取过夜培养的 10 mL 细菌于 1 L LB (含葡萄糖) 中, 37℃ 振荡培养 3h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 再继续培养 2h, 4000g 离心 20min 收集菌体, 重悬于 50 mL 柱缓冲液中。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/mL, 冰浴 30min。最后加入 DNA 酶和 RNA 酶至终浓度为 5 μg/mL, 4℃ 孵育 10min。9000g 离心 30min, 将上清转移备用, 上清即为表达的融合蛋白。

将上清蛋白质上样于平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 平衡好的 Amylose-sepharose 亲和柱中, 用缓冲液平衡至基线后, 开始用洗脱缓冲液 (平衡缓冲液 + 10 mmol/L 麦芽糖) 洗脱, 洗脱液中即为纯化后的融合蛋白, 最后 SDS-PAGE 电泳检测。

在纯化好的蛋白中加入 Factor Xa 至终浓度为 200 μg/mL, 室温作用 4h, 同上过 Amylose-sepharose 亲和柱, 用平衡缓冲液洗脱下的即为 GnRH 前体蛋白。同样作 SDS-PAGE 电泳检测。

**1.2.6 对 ICR 小鼠的免疫原性实验**:

(1) 疫苗准备与免疫程序: 取重组菌 37℃ 培养、纯化后, 与完全弗氏佐剂以 1:1 的比例混合均匀, 免疫 15 只小鼠, 每只小鼠腹腔注射 80 μg 纯化蛋白进

行免疫, 初免后小鼠每间隔 2 周以与初免相同的剂量加强免疫 4 次。每次免疫后 1 周尾静脉采血, 制备血清。同时以生理盐水腹腔注射 10 只小鼠为空白对照。最后大量取血制备抗血清。

(2) 间接 ELISA 检测 GnRH 血清抗体: 通过间接 ELISA 方法测定 GnRH 特异的血清抗体效价。ELISA 按常规方法进行。将纯化的重组蛋白 4℃ 过夜包被, PBST (含 0.02% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次后, 用含 10% FCS 的 PBS 加满各孔 4℃ 封闭 24h, PBST 洗涤 3 次。样品血清作倍比稀释 (100 μL/孔), 同时设立阴性对照 (1:100 稀释的免疫前小鼠血清) 和空白对照 (PBS), 37℃ 水浴孵育 2h, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL 1:25000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37℃ 水浴孵育 2h, PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μL OPD 底物进行测定,  $OD_{490}$  值, 以  $P/N$  (待检样品  $OD_{490}$ /阴性样品  $OD_{490}$ )  $\geq 2.1$  判为阳性。

**1.2.7 数据统计**: 采用生物统计软件 SPSS11.0 进行数据分析, 差异显著性分析采用 T 检验。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

实验结果表明: 扩增到了预期大小即约 400bp 的目的 cDNA 片段 (图 1) (GenBank 号 DQ351818), 将其与尼罗罗非鱼该基因进行同源性比对, 结果表明其同源性为 98.8%。

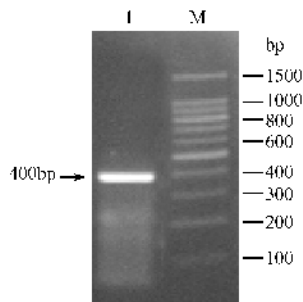


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product  
M: DNA marker; 1: Product of RT-PCR.

### 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 *EcoR* I 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 400bp 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,测序结果表明成功的将 GnRH cDNA 克隆到 T 载体中。

**2.2.2 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 *EcoR* I 和 *Hind* III 37°C 双酶切,凝胶纯化试剂盒纯化后将纯化产物与经相同酶酶切的载体 pMAL 相连接,连接产物转化大肠杆菌 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 400bp 的目的片段,表明成功地构建了表达载体 pMAL-GnRH/GAP。

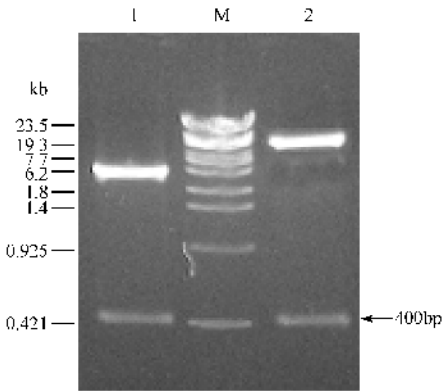


图 2 重组质粒 pMD18-T-GnRH 的限制性酶切分析

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

M : DNA marker ; 1 : pMD18-T-GnRH/*EcoR* I + *Hind* III ( 2.6kb + 400bp ) 2 : pMAL-GnRH/*EcoR* I + *Hind* III ( 6.6kb + 400bp ).

### 2.3 融合蛋白的表达及鉴定

将重组质粒 pMAL-GnRH/GAP 转化大肠杆菌 TB1 菌株后,以 0.3、1mol/L IPTG 分别诱导 4h,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 3)。由图 3 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 42.5kD 的蛋白条带(图 3 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 56kD(图 3 泳道 5 中箭头所示)。由于 pMAL 表达质粒本身可编码 42.5kD 的麦芽糖结合蛋白(Maltose binding protein, MBP),而 GnRH 及相关肽分子量约为 13.5kD,理论上融合蛋白的分子量约为 56kD。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。目的蛋白表达量经软件分析,约达到了细菌表达蛋白总量的 41.6%。以抗 MBP 蛋白的抗血清进行的 Western blot 试验表明在大小为 56kD 和

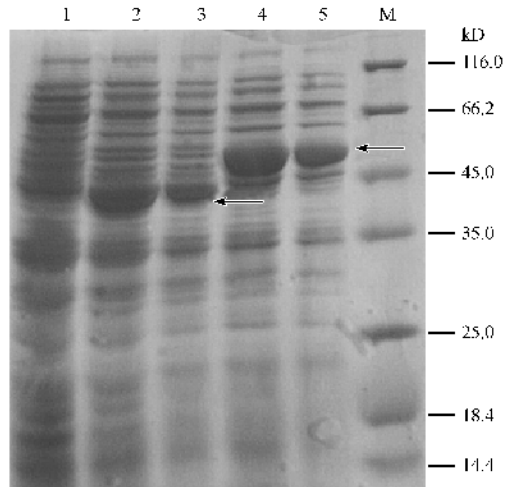


图 3 鉴定大肠杆菌中 GnRH/GAP 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed GnRH/GAP fusion

protein in *E. coli* TB1

M : high molecular weight protein marker ; 1 : supernatant of *E. coli* TB1 ; 2-3 : supernatant of TB1/pMAL induced 4h ; 4-5 : TB1/pMAL-GnRH/GAP induced 4h.

42.5kD 可见两条清楚的蛋白条带(见图 4 中泳道 2、3)。

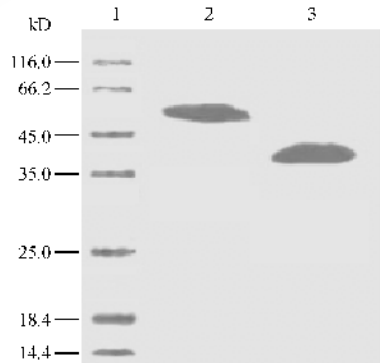


图 4 蛋白免疫印迹

Fig. 4 Western blot analysis of expression of pMAL-c2x and pMAL-GnRH/GAP

1 : protein molecular marker 2 : supernatant of TB1 cells transformed with pMAL-GnRH/GAP induced 4h ; 3 : supernatant of TB1 cells transformed with pMAL-c2x induced 4h.

### 2.4 表达蛋白的酶切与纯化

表达融合蛋白的细菌液经溶菌酶裂解后收集上清,过平衡好的 Amylose-sepharose 亲和柱,用洗脱缓冲液进行洗脱后收集洗脱液,经 SDS-PAGE 电泳检测,纯化蛋白为单一条带(见图 5 泳道 2),分子量为 56kD 左右,相对于未融合蛋白 MBP 的分子量明显偏大。取纯化好的蛋白经 Factor X 酶切 4h 后,经 SDS-PAGE 电泳检测,目的蛋白为两个条带(见图 5

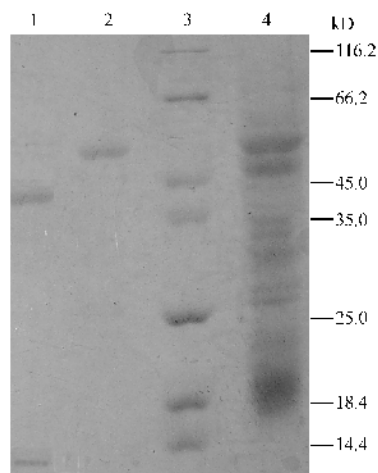


图5 重组原核表达载体 pMAL-GnRH/GAP 经 IPTG 诱导 2h 后表达融合蛋白的分离、纯化

Fig.5 Purification of recombinant GnRH/GAP fusion proteins expressed in *E. coli* induced by IPTG for 2h  
1: purified protein after Factor XA cleavage ; 2: purified protein eluted from amylose column with maltose ; 3: protein molecular marker ; 4: induced cells.

泳道 1) 即分子量为 42kD 的为 MBP, 分子量为 13.5kD 的 GnRH/GAP 蛋白。再经 Amylose-sepharose 过柱后, 得到纯化的 GnRH/GAP 蛋白。

### 2.5 对 ICR 小鼠免疫原性试验结果

初免 1 周后, 免疫组小鼠的血清中就能检测到重组蛋白诱导产生的特异抗体, 在加强免疫后第 5 周抗体滴度为  $0.707 \pm 0.320$ , 达到峰值(见图 6), 而空白对照组不能产生特异抗体, 且免疫组与空白组抗体效价值差异显著 ( $P < 0.05$ )。

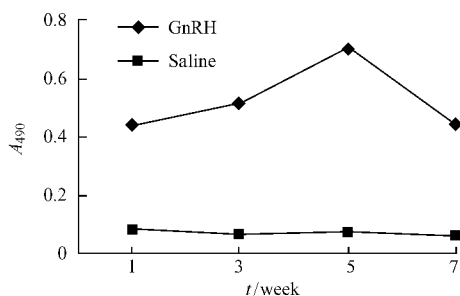


图6 小鼠免疫 GnRH 和生理盐水后的抗体滴度分布

Fig.6 The titers of mice serum immunized with GnRH protein and saline

## 3 讨论

本试验通过对网上数据库 NCBI 中的 GnRH 同源序列进行对比, 设计了一对特异引物, 利用 RT-PCR 方法成功的从奥利亚罗非鱼脑中克隆到长约 400bp GnRH cDNA, 对该片段进行克隆测序, 并用软

件 DNASTAR 对测序结果进行分析, 与 GenBank 中检索比较发现该基因与尼罗罗非鱼 GnRH- II 具有较高的同源性(98.8%), 证实属于 GnRH- II 基因。其基本结构与其他脊椎动物中提取的 GnRH 神经肽家族成员的基本结构一致<sup>[11, 12]</sup>, 这表明奥利亚罗非鱼 GnRH 基因和其他类型的 GnRH 基因可能由一个共同的祖先分子进化而来。

GnRH 是一个控制动物性腺发育和繁殖的理想激素, 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<sup>[13]</sup>。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 ~ 4min; 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不够, 且由天然的 10 肽变成 9 肽影响了 GnRH 的活性<sup>[14]</sup>。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。目前, 国内关于鱼类的 GnRH 克隆产物的表达研究尚未见报道。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 基因克隆到原核表达载体中, 并在大肠杆菌中进行了融合表达, 目的蛋白质通过 Amylose-sepharose 层析柱得到很好的纯化, 通过 SDS-PAGE、免疫印迹等试验证明表达的蛋白即为目的蛋白 GnRH/GAP。

GnRH 是一个小分子量的蛋白, 作免疫原没有很好的免疫原性, 增加其免疫原性的基本思路就是将其与大分子的载体蛋白结合或者改变 GnRH 的分子结构。XU 等<sup>[9]</sup>将 GnRH 与 B 细胞抗原耦联后作为免疫原, 其所得的免疫效果与我们相似。Renjifo 等<sup>[15]</sup>将 GnRH-I 与 BSA 偶联免疫小鼠后第 6 周获得最高免疫效果( $1.83 \pm 0.34$ ), 这可能与其对 GnRH 氨基端进行了改造有关。但是值得注意的是偶联的载体有时会抑制半抗原抗体水平的提高, 有时针对载体的高抗体水平会一直持续在整个实验过程中<sup>[16]</sup>。本研究中为了避免载体及其抗体的干扰, 采用 GnRH 前体蛋白作为免疫原, 配以完全弗氏免疫佐剂, 进行加强免疫, 免疫小鼠后获得了较好的免疫效果, 在免疫后第 5 周即能达到  $0.707 \pm 0.320$  左右的抗体效价。本试验中 GnRH 前体蛋白高效价抗体的成功制备表明, GnRH 前体蛋白能够刺激机体产生

免疫应答,为 GnRH 调控鱼类性生殖的研究提供了一个新的方法。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Melen RH, Turkstra JA, Lankhof H *et al.* Efficient immunocastration of male piglets by immunoneutralization of GnRH using a new GnRH-like peptide. *Vaccine*, 1994, **12**( 8 ):741 - 746
- [ 2 ] Oonk HB, Turkstra JA, Lankhof H *et al.* Testis size after immunocastration as parameter for the absence of boar taint. *J Anim Sci Livest Pro Sci*, 1995 **42**: 63 - 71
- [ 3 ] Oonk H B, Turkstra J A. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH. *Vaccine*, 1998, **16**( 11/12 ): 1074 - 1082
- [ 4 ] Talwar GP, Singh O, Shaha R *et al.* Vaccine for control of fertility. *Immunology, Suppl*, 1989 **2**: 93 - 97
- [ 5 ] Øivind A, Hans JS, Larsen, Peter Aleström. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against gonadotropin releasing hormone: a possible approach to the control of sexual maturation in fish. *Aquaculture*, 1992, **106**( 2 ): 195 - 200
- [ 6 ] Riley EM, Secombes CJ. Immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against gonadotropin-releasing hormone (GnRH): a potential anti-maturation vaccine? *Aquaculture*, 1993, **112**( 2 ): 271 - 282
- [ 7 ] Li JL(李家乐), Li CH(李晨虹), Li SF(李思发). Culture performance of hybrids from different strain combinations of *OREOCHROMIS NILOTICUS* × *O. AUREUS*. *Journal of Shanghai Fisheries University*(上海水产大学学报), 1997 **6**( 2 ): 96 - 101
- [ 8 ] Jing YC(金元昌), Li L(李璐), Li JF(李景鹏). Cloning and prokaryotic expression and purification of GnRH and transporter gene sequence. *Journal of Northeast Agricultural University*(东北农业大学学报) 2004 **35**( 4 ): 427 - 431
- [ 9 ] Xu J, Liu J, Peng D *et al.* The immunogenicity of recombinant and dimeric gonadotrophin-releasing hormone vaccines incorporating a T-helper epitope and GnRH or repeated GnRH units. *Journal of Immunological Methods* 2004 **289**: 111 - 122
- [ 10 ] Joseph S, David WR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press 2001 pp. 1217 - 1265
- [ 11 ] Ling HF(林浩然). The structural variants and functional diversity of gonadotropin releasing hormone in vertebrates. *Acta Zoologica Sinica*(动物学杂志), 1998 **44**( 2 ): 226 - 234
- [ 12 ] Amano M, Oka Y, Aida K *et al.* Immunocytochemical demonstration of salmon (*Oncorhynchus masou*). *J Comp Neurol*, 1991, **314**: 587 - 597
- [ 13 ] Chow MM, Kight KE, Gothilf Y *et al.* Multiple GnRHs present in a teleost species reared encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and CcGnRH-II genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. *J Mol Endocrinol*, 1998 **21**: 277 - 289
- [ 14 ] Padula AM. GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science*, 2005 **88**( 12 ): 115 - 126
- [ 15 ] Renjifo X, Wolf S, Pasoret PP *et al.* Carrier-induced, hapten-specific suppression: a problem of antigen presentation? *J Immunol*, 1998 **161**: 702 - 706
- [ 16 ] Ferro VA, Khan MAH, McAdam D *et al.* Efficacy of an anti-fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) - a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2004 **101**: 73 - 86