

剑尾鱼卵黄蛋白原 C(Vg C) 全长 cDNA 的克隆及表达

刘春¹, 李凯彬¹, 王芳¹, 王庆¹, 聂湘平², 王英英¹, 吴淑勤^{1*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

摘要: 利用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和 cDNA 末端快速扩增(RACE)等方法, 克隆获得剑尾鱼卵黄蛋白原 C(Vg C) 基因的全长 cDNA 序列。剑尾鱼 Vg C 基因 cDNA 序列全长 4 011 bp, 其 5' 非编码区包含 12 bp 和 3' 非编码区包含 246 bp; 含有一个 3 753 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 1 250 个氨基酸, 推测其编码氨基酸分子量大小为 141.7 ku, 编码氨基酸序列与其他鱼类卵黄蛋白原 C 编码氨基酸序列相似性在 44% ~ 85%。荧光定量 PCR 结果显示, Vg C 在剑尾鱼肝脏中表达量最高, 脾、肾、卵巢中有微量表达, 脑、肌肉、鳃中几乎没有检测到表达; 对不同时间暴露在雌激素中剑尾鱼肝脏进行实时荧光定量 PCR 表达分析的结果表明, Vg C 在剑尾鱼肝脏中第 5 天表达量最高, 随后降低, 第 9 天后维持相对较低的表达量。研究首次克隆了剑尾鱼 Vg C 基因全长 cDNA 序列, 并对 Vg C 在剑尾鱼体内表达组织器官分布及雌激素诱导后不同时间表达谱进行了初步研究, 为剑尾鱼生殖生理及环境污染物监测应用等不同领域研究打下重要基础。

关键词: 剑尾鱼; 卵黄蛋白原 C; 克隆; 表达; 荧光定量 PCR; 17 β -雌二醇

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

卵黄蛋白原(vitellogenin, Vg)是卵黄蛋白的前体^[1], 它可被用来检测雌性鱼类是否发育成熟以及成熟鱼类的性别鉴定^[2]; 由于卵黄蛋白原受雌激素类物质的诱导, 鱼类 Vg 也作为一种有效的生物标志物被广泛应用于环境污染物的评价^[3]。硬骨鱼卵黄蛋白原入卵后降解成卵磷脂蛋白(lipovitellin, Lv)、卵黄高磷蛋白(phosvitin, Pv)和 β' 组分(β' -component, β' -c) 3 种卵黄蛋白^[4], 卵黄蛋白原 A 和卵黄蛋白原 B 都属于这种“完整”型卵黄蛋白原^[5], 它们编码的氨基酸序列结构中含有 3 种完整的卵黄蛋白结构域(Lv 结构域、Pv 结构域、 β' -c 结构域)。随着基因克隆和免疫生物化学分析在鱼类卵黄蛋白原研究上的广泛应用, 一些形式的“非完整”型卵黄蛋白原也相继被发现^[2,5-7], 它们编码的氨基酸序列结构中不含有完整 3 种卵黄蛋白结构域, 入卵降解后只含有 Lv 或者缺少 Pv, 卵黄蛋白原 C(Vg C)

就属于这种类型, 其编码的氨基酸序列结构中只含有 Lv 结构域, 不含 Pv 结构域和 β' -c 结构域。由于 Vg C 是一种比较原始的卵黄蛋白原基因^[8], 在大多数鱼类中都有发现^[5,7]。Vg C 的“非完整”特征属于派生特征而非祖传的状态^[9], 因为硬骨鱼 Vg C 与“完整”型的鸡卵黄蛋白原 A 是直系同源的基因^[10]。目前卵黄蛋白原相关报道比较多, 包括卵黄蛋白原的发生、合成、结构、功能等多方面^[11], 而鱼类卵黄蛋白原的研究则主要集中在基因的克隆和作为理想的雌激素类雌激素标志物应用于水环境内分泌干扰物筛选等方面^[12]。

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)属花鳉科(Poeciliidae)剑尾鱼属(*Xiphophorus*), 有体型小、繁殖力强、易辨别雌雄、便于在实验室饲养等特点。剑尾鱼的实验动物化研究历经多年, 是中国首个通过审定的鱼类实验动物, 应用于水环境监

收稿日期:2011-01-21 修回日期:2011-07-04

资助项目:科技部公益项目(2004DIB1J029)

通讯作者:吴淑勤, E-mail: wushuqin001@21cn.com

测、水产药物安全性评价、动物疾病检验模型等不同领域^[13]。本实验以剑尾鱼为实验材料,通过 RT-PCR、RACE 等方法对剑尾鱼 Vg C 全基因进行克隆和序列分析,并对 Vg C 在剑尾鱼体内的组织器官分布进行了研究,以期剑尾鱼生殖生理研究及剑尾鱼在水环境污染检测研究中的应用提供良好的平台,为剑尾鱼进一步实验动物化研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 的提取

实验用鱼(4~5月龄)均来自珠江水产研究所水生实验动物中心,腹腔注射 17 β -雌二醇(Sigma),1周后取其肝脏,按照 SV Total RNA Isolation System 试剂盒(Promega)推荐方法提取总 RNA,用于反转录合成 cDNA 第一链。

1.2 剑尾鱼 Vg C 全长 cDNA 扩增

根据已知鱼类 Vg C cDNA 序列:食蚊鱼

(*Gambusia affinis*) (AB181837)、真鲷(*Pagrus major*) (AB181840)、黄鳍刺鰕虎鱼(*Acanthogobius flavimanus*) (AB088474),设计并合成 3 对引物 PVgC1、PVgC2、PVgC3(表 1)。以 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,经 94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。根据已获得的 Vg C 基因片段设计 5'RACE 下游引物 5race、3'RACE 上游引物 3race(表 1),5'RACE 扩增的上游引物按照 SmartTM RACE cDNA Amplification kit(Takara)试剂盒说明使用其通用引物 UPM,3'RACE 扩增的下游引物为通用引物 Oligo(dT)₁₆,RT-PCR 扩增反应均按照试剂盒操作说明进行。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶纯化试剂盒(Omega)纯化后与 pMD-18T 载体(TaKaRa)连接,转化到大肠杆菌 DH5 α 株,PCR 检测阳性克隆后测序。

表 1 核苷酸引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primer sequence

引物名称 primer name	上游引物 forward primer	下游引物 reverse primer
PVgC1	5'-CTAAGGTTTCCACGACTG-3'	5'-GCCATTCCAACATTCTC-3'
PVgC2	5'-TCTTGGAGGCTCGTTAC-3'	5'-CGCTCTGGATTCTCTC-3'
PVgC3	5'-CCTGCGAGTGACACCCTAT-3'	5'-AACCAGCGTATCCATCCG-3'
5race	UPM	5'-TGCCAGCAGTTTGTACATCCAC-3'
3race	5'-CAGTCTGGATGCTGAGGCAAAGGC-3'	Oligo(dT) ₁₆
QVgC	5'-TTGGTCTTGGAGGCTCGTTAC'-3'	5'-GCTTTCAGTGGGTGAGGGATT'-3'
Qactin	5'-TGCTATGTTGCACTGGACTTTGAG-3'	5'-CCTCTCGTTCCGATGGTGATGAC-3'

1.3 序列分析

用 ABI PRISMTM 3730 全自动荧光测序仪完成 cDNA 序列测定,将获得的 ORF 部分序列、5'序列和 3'序列用 DNASTAR 分析软件进行全长拼接。用软件 SignalP 3.0Server 和 ExPASy^[14]对拼接后的 cDNA 序列进行序列分析,内容包括核苷酸序列中 ORF 的寻找,编码氨基酸序列的推导、信号肽及其保守结构域的预测。

采用 vector VTI 10.0 软件把获得的剑尾鱼卵黄蛋白原 CDNA 序列及编码氨基酸序列与 GenBank 中登录的其他鱼类进行同源性分析。系统发育树由 Clustal X 和 MEGA 4.0 程序中的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建。

1.4 Vg C 在剑尾鱼不同组织器官中的分布

组织总 RNA 的抽提和反转录合成 cDNA

为检测 Vg C 在不同组织器官中的表达水平,取 3 尾雌性剑尾鱼(4~5月龄),分别取其肝、脾、肾、鳃、脑、肌肉、卵巢。按 Trizol(Invitrogen)试剂盒说明书提取总 RNA,经 DNase I RNase-free (Fermentas)处理后,分别测量 RNA 样品在 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度值,计算 RNA 样品的浓度和纯度。利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa)试剂盒进行反转录得到 cDNA。

荧光定量 PCR 根据剑尾鱼 Vg C 基因 cDNA 序列设计荧光定量检测引物 QVgC,内参基因 β -actin 的引物为 Qactin(表 1),荧光定量 PCR 在 ABI 7500 型(Applied Biosystems)实时荧光定量 PCR 仪上进行,扩增体系为 20 μ L:10 μ L SYBR premix Ex Taq(2 \times),0.8 μ L PCR Forward Primer(10 μ mol/L),0.8 μ L PCR Reverse Primer

(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL ROX Reference Dye II(50 \times), 2 μL cDNA, 6 μL ddH₂O。反应采用两步法, 扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s, 94 $^{\circ}\text{C}$, 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 34 s, 40 个循环, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行荧光信号采集, 反应结束后对扩增产物进行溶解曲线分析, 以确保特异性扩增。样本和内参分别设 3 个重复, ROX 作为校正荧光, $\beta\text{-actin}$ 为内参。采用相对 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行 Vg C mRNA 在剑尾鱼在各组织器官中的表达分析。

1.5 Vg C 在剑尾鱼肝脏中的表达

雌激素的诱导 实验用鱼为雄性剑尾鱼(4~5 月龄), 健康无病, 已具备性特征, 饲养于玻璃箱中。实验用水为曝气后的自来水, 水温 23~28 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.6。实验分处理组和对照组, 每组 20 尾, 处理组暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ 的 17 β -雌二醇(溶解于 DMSO) 水体中, 对照组养殖水体中加入同样浓度 DMSO(终浓度 < 0.01%), 暴露时间为 11 d, 每隔 1 天更换全部暴露液。实验期间正常投喂。分别在 1、3、5、7、9、11 d 取 3 尾鱼肝脏冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

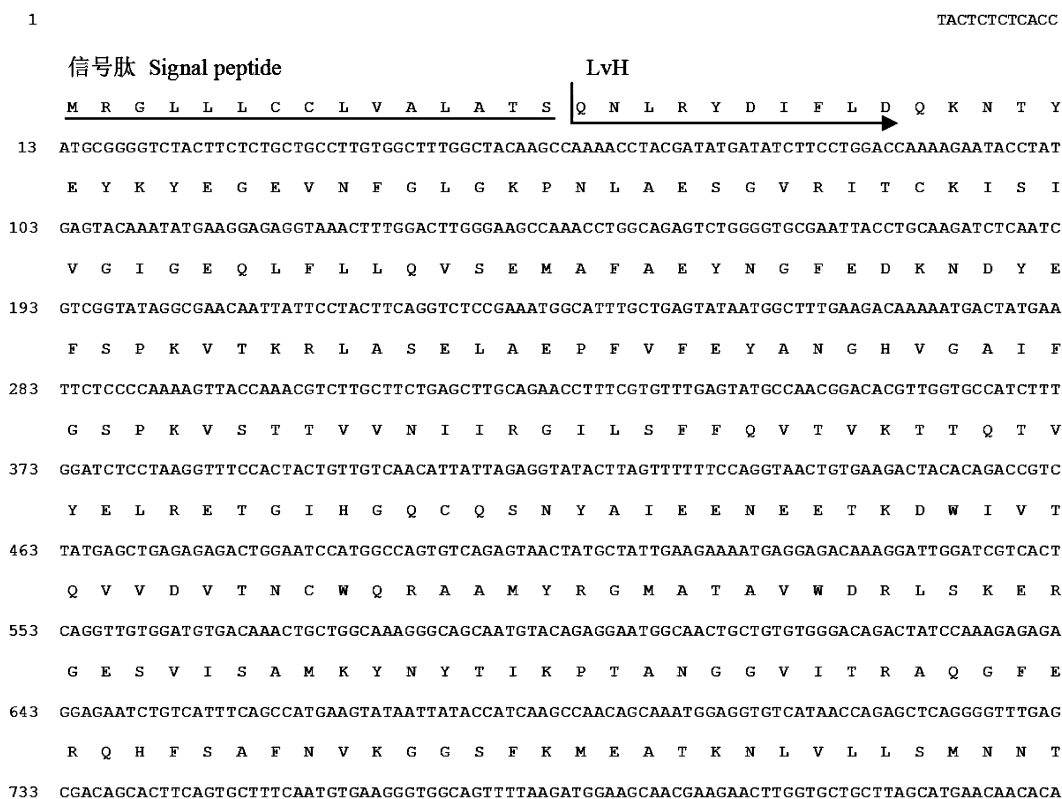
Vg C 在剑尾鱼肝脏中表达的荧光定量 PCR 检测 以不同时间雌激素诱导后的剑尾鱼肝为样品, 进行总 RNA 的抽提和反转录合成 cDNA,

方法同“组织总 RNA 的抽提和反转录合成 cDNA”, 以获得的 cDNA 为模板, 对剑尾鱼肝的 Vg C 变化规律进行荧光定量 PCR 检测, 检测方法同“荧光定量 PCR”。

2 结果

2.1 剑尾鱼 Vg C 基因 cDNA PCR 扩增结果及结构分析

利用 PCR 方法扩增到 3 条剑尾鱼 Vg C 基因核心片段, 通过 RACE PCR 的方法获得 3' 和 5' 端片段, 经过测序后将 3' 和 5' 端序列及核心片段序列用 DNASTar 软件拼接获得了剑尾鱼 Vg C 基因的全长 cDNA 序列。经 ExPASy 软件在线分析, 该序列全长 4 011 bp, 包含起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA 及加尾信号 ATTAAA, 该基因的 5' 非编码区为 12 bp, 3' 非编码区为 246 bp, 开放阅读框(ORF)位于 13~3 765 bp, 长 3 753 bp, 共编码 1 250 个氨基酸, 信号肽为 15 个氨基酸, 根据推算, 其编码蛋白分子量为 141.7 ku, 等电点为 6.01。剑尾鱼 Vg C 基因 cDNA 包含 Lv 结构域的轻链(LvH)和重链(LvL)二个组分。该基因的核苷酸序列以及编码的氨基酸序列如图 1。



A R G R T Y G P I E T K G N I I Y K F E D V D I N I P M M M
 823 GCCAGAGGAACAACATATGGACCAATAGAAACGAAAGGCAACATTATCTACAAATTTGAGGATGTGGACATTAATATCCCAATGATGATG
 Q N L D N P V P K A I E L I K R L S E A N S G T I D S A T T
 913 CAGAACCTAGATAACCCAGTACCAAAGGCTATTGAATTGATCAAGCGCTTGAGTGAGGCTAATAGTGGCACTATTGATAGTGCCACCCT
 E D S M K L Y H L L R V T P Y E E L E N M W K Q L A E N P K
 1003 GAGGACTCTATGAAGCTGTACCATCTCCTGCGAGTGACACCCTATGAAGAACTGGAAAACATGTGGAAGCAATTAGCTGAAAAATCCCAAG
 Y R R W F L D S I V E I A D V K V L N F M E T R F K A N D W
 1093 TATAGGCGTTGGTTTTTGGACTCAATCGTTGAAATGCGGATGTCAAAGTCTGAATTTTCATGGAGACGAGATTTAAAGCAAATGATTGG
 T P S E A L Q T I L I A F H H L D P T P E N V G M A K V F L
 1183 ACGCCTTCTGAAGCTTTGCAAACCATCTTAATTGCTTTTCATCATCTTGATCCACACCTGAGAATGTTGGAATGGCTAAAAGTTTTCTC
 K L P F S K S N T Y L W Q T V A L S Y G S L V N K Y C V H Y
 1273 AAGCTGCCATTCAGTAAATCTAACACCTATCTGTGGCAGACTGTGGCACTTTCTTATGGCTCTTTGGTGAACAAGTACTGTGTACATTAT
 L P C P V N P L Q P L L E M A T E A L R S G N K E E M V I A
 1363 TTGCCATGTCCAGTTAACCTCTTCAGCCCTGCTGGAATGGCCACAGAGGCTCTGAGGAGTGGCAACAAGAAGAAATGGTTATCGCT
 L K A L G N A G H P K S M K T I M R F L P G M A A S P V D L
 1453 CTGAAAGCGCTGGGAAATGCAGGGCATCTAAGAGCATGAAACCATCATGCGTTTCCTTCTGGAATGGCTGCCTCTCCTGTGGATCTG
 P L R V Q S A A V Q A M R L I T T R D P H S V L E V T L T M
 1543 CCTCTTCGGGTGCAGAGTGCAGCTGTCCAGGCGATGAGACTCATACGACCAGAGACCCTCACAGTGTCTAGAGGTACCCCTGACCATG
 F L H K H I P A E V R M L A F K I L I A S K P S M A L V S I
 1633 TTTCTGCATAAGCACATTCAGCTGAGGTTCCGATGCTTGCCTTCAAGATTCTTATTGCGTCTAAGCCTTCAATGGCTCTTGTGTCCATC
 V T A H L Q D E T D L E V A S F A Y S Y L H D L A S S R T P
 1723 GTGACAGCTCATCTGCAGGACGAAACAGACCTTGAGGTTGCAAGTTTTGCGTACTCTTACTTGCATGATCTTGCCAGCTCCAGGACTCCA
 N N H Y L S I V S S L A V K I L A P R F G R L C H Y Y S K A
 1813 AACAACTACTATCTTTCGATTGTCTCCAGTTGGGTGTGAAAATCCTTGACCCAGATTTGGCCGTCTCTGTCAATTACTACAGCAAAGCA
 K H A D W F D D R W L T G I T S E F F M L R N A S N I I P S
 1903 AAGCATGCAGACTGGTTCGATGATAGGTGGCTAACTGGGATAACATCTGAATCTTTCATGCTAAGAAATGCAAGCAACATCATTCCCTCA
 E I V S S G K F H I I G R I I E L L E L G V R A D G I K D L
 1993 GAGATTGTCAAGTGGTAAATTCACATCATTGGTTCGAAATATTGAGTTACTGGAGTTGGGTGTCCGTGCAGATGGAATAAAGGATCTG
 I G A G I P G F K G D F S M S D L M A I F N V L Q K W E S L
 2083 ATTGAGCTGGCATTCTGGATTTAAAGGAGACTTTAGTATGAGTGACCTTATGGCTATTTTCAATGTGCTTCAAAGTGGGAGAGTCTG
 D N D K P V L S V Y S R I T G Q E W F F A D M S K D I L R N
 2173 GACAATGATAAACAGTCTTTCAGTTTATTACAGTATTACAGGGCAAGAGTGGTCTTCGCTGACATGAGCAAAGACATCCTCCGAAAT
 I I T A F S P A A W K S S P L R A M I E S L Q K G T S W D Y
 2263 ATCATCACTGCCTTCAGTCTGCTGCATGGAATCAAGTCTTTGAGAGCTATGATTGAGAGTTTACAGAAAGAACCTCATGGGACTAC
 T R A F L V L E A R Y F Q A T T L G L P V E I S K Y Y N T I
 2353 ACACGGGCATTTTGGTCTGGAGGCTCCTTACTTCCAAGCCACAACCTGGGGCTCCAGTGGAGATCAGCAAATATTATAATACAATC
 T A F N I N A K V A V N P S P T E S I V Q L L N S E I T M E
 2443 ACTGCATTCAACATTAATGCTAAAGTTGAGTTAATCCCTCACCCTGAAAGCATTGTACAGCTCTTGAATTTGAAATTACAATGGAA
 T D G Y A G C T K D F W V F Y G I N T K L F Q S G S E L K I
 2533 ACGGATGGATACGCTGGTTCACCAAGGACTTTTGGGTTTTCTATGGGATCAACCAAAGCTTCCAGAGTGGCTCAGAGTTAAAGATT
 K R P L A V P W K L S A K I N V P E R K F E L D F P P S K K
 2623 AAGAGACCCTTAGCGGTACCATGGAAGTTATCTGCCAAGATAAATGTGCCAGAAAGGAAATTTGAGCTTGATTCCCCCTAGCAAAAAG
 E I E L L S I R S D L Y A V S R N I E E P D S A K M T P I M
 2713 GAAATTGAACCTTCTTCGATTAGATCCGATTTGTATGCAGTGTCCAGGAACATTGAAGAGCCCGATTCCAGCAAATGACTCCAATCATG
 S P S A D P N D D V I E P Y T W H P S S K M C Y E Y N I Y G

```

2803 TCCCCCTCTGCTGACCCCAATGATGACGTAATAGAACCCCTACACCTGGCATCCTTCTTCCAAAATGTGTATGAATACAACATTTATGGA
    V G F C M E Y E L K R Q Y F H E E Y P L Y Y F L G Y S N M A
2893 GTGGGTTTCTGCATGGAGTACGAGTTAAAGCGACAGTATTTCCATGAGGAGTACCCACTGTAATTTTCTTGGATACAGCAACATGGCA
    F K I I P A Q T T K A V E K I H F E L D V L P S K H P M S A
2983 TTCAAAAATAATTCAGCTCAGACAACAAAAGCGGTTGAGAAAATCCACTTTGAGCTTGACGTTCTTCCAGCAAGCATCCAATGAGTGCA
    R Q L L G T M R S L S K E E T Q Q I N L S S D S S E R D R D
3073 CGCCAACTGCTTGGGACTATGAGGAGTCTTTCCAAGGAAGAAACACAGCAAATTAATCTATCTTCAGACTCATCTGAAAGAGACAGAGAC
    F P H R H H T I L L E N S T T E A I F N F K A F A I C E T Q
3163 TTTCTCACAGACACCACACAATCCTTCTGAAAACCTGACAACCTGAAGCCATCTTCAACTTCAAAGCTTTTGCCATTTGTGAGACCCAG
    K P E G Y D A V M Y Y S P E A S I K N A Q L I V S Q V G A S
3253 AAGCCTGAGGGTTATGATGCAGTTATGTAATTTACCTGAGGCAAGCATTAAAAATGCCCAACTAATGTGTCCCAAGTTGGAGCGAGC
    T N W K M C V E T S L D A E A K A H V T W G D E S Q T Y D M
3343 ACCAACTGGAAGATGTGTGTTGAAACCAGTCTGGATGCTGAGGCAAAGGCACACGTCACATGGGGCGATGAAAGTCAGACCTATGACATG
    S M E A T A A Y I N G S K P E L K A K V Q W S R I S E Y M T
3433 TCAAATGGAAGCCACTGCTGCATATATTAATGTTCCAAGCCAGAGCTCAAGGCCAAAGTACAATGGAGCAGGATTTGAGGTACATGACT
    E L G K R I E R Y I P G V A L L Y G F S E R N E R N P E Q E
3523 GAGCTTGGCAAAAAGAAATGAACGGTACATCCCTGGTGTGGCACTTATTTCTGAGAGAAAATGAGAGAAAATCCAGAGCAGGAA
    V S A T V V A A W T D S V D V E I K L P E Y T V Y N K A M S
3613 GTGTCTGCAACAGTTGTTGCTGCCTGGACAGACAGCGTTGATGTGGAGATTAAGTACCTGAGTATACAGTGTACAACAAAGCTATGTCA
    F P V L W S S Q W L Y Q N M T C S T E Y *
3703 TTTCCGTCCTATGGAGCAGCCAATGGCTTTATCAAAAACATGACATGCTCAACAGAATATTAATTCATATAAGCATGAAAACATAAAAA
3793 CTGCAGAGCCCAGATGGCAGCCAGATGCCTGATGTACCATTTGTTGGAAGAACAACCTGCAGCCAAAACAGCATTTTAAGCCTATTATCAGA
3883 TTGTCTCAGTTTCTAATCATCACTTTGTATTAACAGCATGTTACTGAACATATTTTCTGAAGAATGATTAATCAGACCAATTAATTTG
3973 TAGAGCAACAAAAA

```

图 1 剑尾鱼 Vg C 全长 cDNA 序列及推导出的氨基酸序列

水平下划线标记信号肽及各个卵黄蛋白组分的起始位置;加尾信号 ATTTAA 用阴影标出。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *X. helleri*'s Vg C

Horizontal lines under the sequence indicate predicted sites for cleavage of the vitellogenins into yolk proteins. Polyadenylation sites (ATTTAA) are indicated by shade.

2.2 不同鱼类 Vg C 基因序列的同源性比对及系统发生分析

将剑尾鱼 Vg C 基因 ORF 及编码氨基酸序列与其他硬骨鱼 Vg C 基因 ORF 及编码氨基酸序列进行同源性比较,结果见表 2。

剑尾鱼 Vg C 和 GenBank 中已登录的其它鱼类 Vg C 相比,与同属于花鲈科的食蚊鱼同源性最高,核苷酸同源性为 92%,氨基酸同源性为 85%;与艾氏异仔鲮(*Xenotoca eiseni*)、鲮(*Mugil cephalus*)、蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、美洲白鲈(*Morone americana*)、小口棘隆头鱼(*Centrolabrus exoletus*)、红纹隆头鱼(*Labrus mixtus*)、真鲷、黄鳍刺鰕虎鱼、斑马鱼(*Danio rerio*)的核苷酸同源性分别为 85%、73%、73%、72%、70%、70%、70%、70%、61%、57%,氨基酸同源性

分别为 76%、61%、61%、62%、59%、58%、61%、48%、44%。通过 MEGA 4.0 的 NJ 法分析,重复 1 000 次的计算方法构建了系统进化树,分子进化分析,剑尾鱼与食蚊鱼、艾氏异仔鲮聚为一支,具有最近的亲缘关系(图 2)。

2.3 Vg C 基因在剑尾鱼不同组织器官分布的实时荧光定量检测

以 QVgC 为引物,雌性剑尾鱼肝、脾、肾、脑、肌肉、鳃、卵巢 7 个样本 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,利用荧光定量 RT-PCR 方法研究剑尾鱼 Vg C mRNA 的组织器官表达特征(图 3),剑尾鱼 Vg C mRNA 在肝、脾、肾、卵巢均能检测到表达,其中肝中表达量最高,脾、肾、卵巢中有微量表达,脑、肌肉、鳃中几乎没有检测到表达。

表 2 剑尾鱼与其他硬骨鱼类 Vg C 基因 ORF 的同源性比较
Tab. 2 Homology comparison between *X. helleri*'s Vg C ORF and those of other teleosts

物种 species	核苷酸同源性/% nucleotide homology	氨基酸同源性/% amino acid homology	编码多肽的长度/bp length of peptide
剑尾鱼 <i>Xiphophorus helleri</i>	100	100	1 250
食蚊鱼 <i>Gambusia affinis</i>	92	85	1 242
艾氏异仔鲮 <i>Xenotoca eiseni</i>	85	76	1 251
鲮 <i>Mugil cephalus</i>	73	61	1 272
蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	73	61	1 275
美洲白鲈 <i>Morone americana</i>	72	62	1 275
小口棘隆头鱼 <i>Centrolabrus exoletus</i>	70	59	1 266
红纹隆头鱼 <i>Labrus mixtus</i>	70	58	1 273
真鲷 <i>Pagrus major</i>	70	61	1 272
黄鳍刺鰕虎鱼 <i>Acanthogobius flavimanus</i>	61	48	1 238
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	57	44	1265

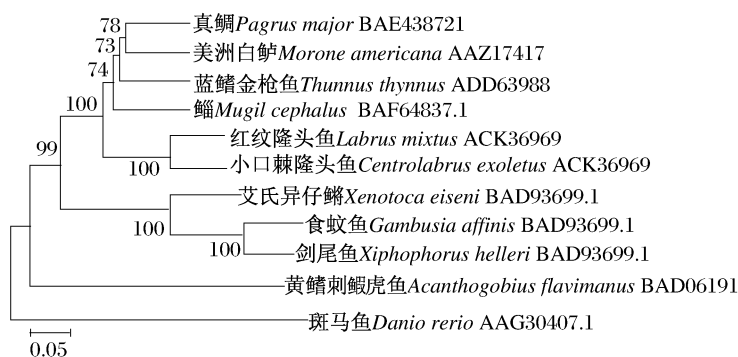


图 2 基于剑尾鱼和其他已知硬骨鱼类 Vg C 蛋白序列的系统进化树

节点处数值为自展置信值,自展重复 1 000 次;星号标出剑尾鱼 Vg C。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Xiphophorus helleri*'s Vg C with related teleosts' Vg C

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis(1 000 repetitions); *X. helleri*'s Vg C is marked with asterisk.

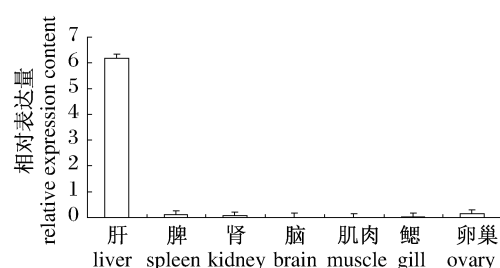


图 3 剑尾鱼 Vg C 在各组织中的表达情况

Fig. 3 The expression of *X. helleri*'s Vg C in different tissues

2.4 雌激素诱导剑尾鱼肝脏中 Vg C 的表达情况

以 QVgC 为引物,雌激素诱导 1、3、5、7、9、11 d 后雄性剑尾鱼肝样本 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,利用荧光定量 RT-PCR 方法研究剑尾

鱼肝中 Vg C 变化规律(图 4),剑尾鱼肝中 Vg C mRNA 相对表达量在雌激素诱导后第 1 天达到一个小高峰,第 5 天达到高峰值,第 9 天后维持相对较低的表达量。

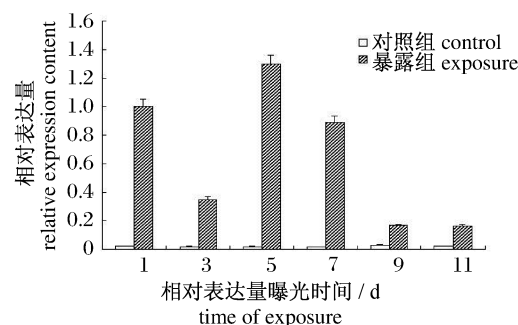


图 4 Vg C 在剑尾鱼肝中的相对表达量

Fig. 4 The relative expression content of *X. helleri*'s Vg C in liver

3 讨论

实验运用 RT-PCR 和 RACE 扩增法从剑尾鱼肝组织中扩增得到 4 011 bp 的全长 cDNA 序列,该序列 ORF 与 GenBank 中登录的 10 种鱼类 Vg C 的 ORF 比对,与食蚊鱼同源性高达 92%,与其它 9 种鱼类同源性为 57% ~ 85%,表明本实验成功克隆了剑尾鱼 Vg C 全长 cDNA 序列。

Vg 基因属于多基因家族,起源于同一个基因。目前证实爪蟾(*Xenopus laevis*)有 4 种 Vg 编码基因^[15],鸡(*Gallus gallus*)有 3 种 Vg 基因^[16]。研究发现鱼类也有不止一种 Vg 的形式存在。早在 1990 年, NAGLER 等^[17]就发现比目鱼(*Pseudopleuronectes americanus*)中有两种不同的类 Vg,它们是高密度的脂蛋白,都被正在发育的卵母细胞吸收并产生卵黄蛋白。随着分子生物学技术在鱼类卵黄蛋白原研究中的广泛应用, GenBank 中已经登陆了几十种鱼类中的卵黄蛋白原全长 cDNA 序列,其中食蚊鱼、真鲷等鱼类分别获得 3 种形式 Vg 全序列,而斑马鱼则有 7 种形式的 Vg 全序列发现,笔者以前也有剑尾鱼 Vg A、Vg B 全长 CDNA 序列克隆的报道^[18],到目前为止,剑尾鱼也发现了 3 种形式的卵黄蛋白原。笔者把所得的剑尾鱼 Vg C 氨基酸序列与剑尾鱼 Vg A、Vg B 氨基酸序列比对后发现,剑尾鱼 Vg C 编码 1 250 个氨基酸序列,明显少于剑尾鱼 Vg A 和 Vg B 编码的 1 685 和 1 688 个氨基酸序列,3 种剑尾鱼 Vg 编码氨基酸序列均含有 Lv 结构域,剑尾鱼 Vg C 编码氨基酸序列缺少 Pv 结构域和 β' -c 结构域,这也与 Vg C 的结构特征一致。

卵黄蛋白原是广泛存在于卵生动物体内的雌性特异性蛋白。比较分析不同物种的 Vg 基因结构显示卵黄蛋白原基因非常古老,是构成卵生动物卵黄的主要成分,研究显示,几乎所有动物的卵黄蛋白原基因都起源于一个共同的祖先基因。在系统进化分析中,卵黄蛋白原的进化速度相当快,因而卵黄蛋白原序列作为一种分子标记,序列数据可以很好用于进化关系较近的物种系统进化研究^[19]。本研究中剑尾鱼 Vg C 氨基酸序列与同为花鲈科的食蚊鱼 Vg C 氨基酸序列的同源性高达 85%,与 9 种其他鱼类同源性为 44% ~ 76%。11 种鱼类 Vg C 蛋白序列进化分析表明,鲈形目和鲷形目的鱼类形成一支,剑尾鱼与同属于花鲈科

的食蚊鱼聚为一支,再与同属于鲷形目的艾氏异仔鲈聚在一起,并有很高的自展值支持,而与黄鳍刺鲷虎鱼、斑马鱼的遗传距离较远,说明其亲缘关系也较远,这与它们传统的分类地位基本一致。

卵黄蛋白原有两种来源:一是可以从卵母细胞本身中合成,称为内源性卵黄蛋白原合成,二是自卵母细胞以外的地方合成,然后进入卵母细胞,称为外源性卵黄蛋白原合成。鱼类卵黄蛋白原由肝细胞合成,通过血液循环系统,运输到卵巢,经过修饰后以卵黄蛋白形式储存于卵母细胞,为胚胎的发育提供能量。鱼类卵黄蛋白原主要在肝中合成,主要进行外源性的卵黄蛋白原合成方式。YAN 等^[20]用 Northern-blotting 检测斑马鱼和青鳉(*Oryzias latipes*)各个器官中 Vg A 表达情况,发现 Vg A 基因的表达只稳定出现在雌鱼肝中,在肌肉、肠、卵巢中均检测不到。也有学者认为鱼类既有内源性的卵黄蛋白原合成,也有外源性的卵黄蛋白原合成^[21], DAVID 等^[22]研究发现在雌激素诱导的胖头鲤(*Pimephales promelas*)鳃组织中能够检测到 Vg 的转录;HAO 等^[23]在 2000 年用 Northern-blotting 检测斑马鱼各个器官中 Vg C 表达情况,认为 Vg C 基因主要在肝中合成,在肠中也有少量合成;在 2005 年用 Northern-blotting 分析的斑马鱼各个器官中 7 种 Vg 表达情况,发现 Vg 在雌鱼的肝、肠、卵巢中表达,在雌激素诱导雄鱼的肝、肠、精巢、肌肉中也有表达,且肝外其他器官的 Vg mRNA 浓度最多只有雌鱼肝中浓度的 5%^[24];韩英等^[25]研究发现二倍体雌性虹鳟在性腺发育 III ~ V 期的,血液和肝细胞能检测到 Vg, IV ~ V 期在卵巢中能检测到 Vg,各发育期肠组织均检测不到 Vg,认为虹鳟外源性的卵黄发生于肝脏合成 Vg,随血液循环进入卵巢,在卵母细胞中积累。各发育阶段在肠道中均未发现 Vg 的存在,说明 Vg 的合成和运输与肠道无关。本研究中用荧光定量 PCR 的方法对剑尾鱼肝、脾、肾、脑、肌肉、鳃、卵巢等 7 个组织器官进行了 Vg C mRNA 检测,发现 Vg C mRNA 在肝中表达量最高,脾、肾、卵巢中有微量表达,其表达量分别为肝中表达量的 2%、1%、3%,脑、肌肉、鳃中几乎没有检测到表达,表明肝是剑尾鱼 Vg C 合成的主要场所,至于脾、肾、卵巢中是否是 Vg C 的合成场所还需要进一步研究。

雌激素或其类似污染物在进入鱼体后,会诱

导肝脏合成 Vg, 在 Vg 合成之前其 mRNA 的表达将被启动。FLOURIOT 等^[26] 研究发现雌二醇诱导后的聚集培养的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝细胞 Vg A mRNA 表达量在第 8 天达到高峰; YAN 等^[20] 研究发现雌激素诱导后的斑马鱼 Vg A mRNA 在第 2 天达到一个小高峰, 在 30 d 达到高峰, 青鳉 Vg A mRNA 在第 3 天和 12 天达到高峰, 本研究对雌激素诱导后剑尾鱼肝进行荧光定量 PCR 分析, 发现 Vg C mRNA 相对表达量在雌激素诱导后第 1 天达到一个小高峰, 第 5 天达到高峰, 这与斑马鱼和青鳉变化规律相似, 均在高峰前有一个小高峰。虹鳟、斑马鱼、青鳉 Vg A mRNA 表达量最高的时间与本研究中剑尾鱼 Vg C mRNA 表达量达到高峰的时间不一致, 这可能是由鱼的种类和卵黄蛋白原类型不同造成的。

参考文献:

- [1] WALLACE R A. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates [J]. *Developmental Biology*, 1985, 1:127-177.
- [2] HIRAMATSU N, CHEEK A O, SULLIVAN C V, et al. Vitellogenesis and endocrine disruption [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2005, 6:431-471.
- [3] KIME D E, NASH J P, SCOTT A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics [J]. *Aquaculture*, 1999, 177:345-352.
- [4] MATSUBARA T, SAWANO K. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*) [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1995, 272:34-45.
- [5] HIRAMATSU N, MATSUBARA T, FUJITA T, et al. Multiple piscine vitellogenins; biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments [J]. *Marine Biology*, 2006, 149:35-47.
- [6] PATINO R, SULLIVAN C V. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002, 26:57-70.
- [7] MATSUBARA T, NAGAE M, OHKUBO N, et al. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28:295-299.
- [8] WANG H, YAN T, TAN J T, et al. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene [J]. *Gene*, 2000, 256:303-310.
- [9] BABIN P J. Conservation of a vitellogenin gene cluster in oviparous vertebrates and identification of its traces in the platypus genome [J]. *Gene*, 2008, 413:76-82.
- [10] AMANO H, MOCHUZUKI M, FUJITA T, et al. Purification and characterization of a novel incomplete-type vitellogenin protein (Vg C) in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(1):41-8.
- [11] 张年国, 张颖, 孙大江, 等. 卵黄蛋白原的发生、结构及功能研究现状 [J]. *水产学杂志*, 2007, 20(1):97-106.
- [12] 周庆祥, 江桂斌. 卵黄蛋白原的分离测定及其在环境内分泌干扰物质筛选中的应用 [J]. *化学进展*, 2003, 15(1):67-73.
- [13] 吴淑勤, 黄志斌, 石存斌, 等. 水生实验动物—剑尾鱼 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [14] JANNICK D B, HENRIK N, GUNNARYON H, et al. Improved prediction of signal peptides; SignalP 3.0 [J]. *Molecular Biology*, 2004, 340:783-795.
- [15] GERMOND J E, WALKER P, HEGGELER B, et al. Evolution of vitellogenin genes; comparative analysis of the nucleotide sequences downstream of the transcription initiation site of four *Xenopus laevis* and one chicken gene [J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12:8595-8609.
- [16] VAN HET SCHIP F D, SAMALLO J, BROOS J. Nucleotide sequence of a chicken vitellogenin gene and derived amino acid sequence of the encoded yolk precursor protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 196:245-260.
- [17] NAGLER J J, IDLER D R. Ovarian uptake of vitellogenin and another very high density lipoprotein in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and their relationship with yolk proteins [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1990, 68:330-335.
- [18] 刘春, 李凯彬, 耿冬雨, 等. 剑尾鱼 2 种卵黄蛋白原全长 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17(1):31-43.
- [19] 叶海燕, 黄原. 卵黄蛋白原在系统进化中的应用 [J]. *陕西农业科学*, 2005, 5:67-70.
- [20] YAN T, TAO S, YEW K P, et al. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17h-

- estradiol[J]. *Gene*,2004,328:25-36.
- [21] 张士瑾,孙旭彤,李红岩. 卵黄蛋白原研究及其进展[J]. *海洋科学*,2002,26(7):32-35.
- [22] DAVID L L, TIRUMURU V R, DENISE A G, *et al.* 17 α -ethynylestradiol-induced vitellogenin gene transcription quantified in livers of adult males, larvae, and gills of fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*,2002,21(11):2385-2393.
- [23] HAI W, TIE Y, JACQUELINE T T T, *et al.* zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene [J]. *Gene*,2000,256:303-310.
- [24] HAI W, JACQUELINE T T T, EMELYANOV A, *et al.* Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Gene*,2005,356:91-100.
- [25] 韩英,王琨,张颖,等. 不同倍性虹鳟卵黄蛋白原的组织定位[J]. *水产学报*,2008,32(4):566-571.
- [26] FLOURIOT G, VAILLANT C, SALBERT G, *et al.* Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates[J]. *Journal of Cell Science*, 1993,105:407-416.

The full length cDNA cloning and expression profile of vitellogenin C (Vg C) gene from swordtail fish *Xiphophorus helleri*

LIU Chun¹, LI Kai-bin¹, WANG Fang¹, WANG Qing¹, NIE Xiang-ping²,
WANG Ying-ying¹, WU Shu-qin^{1*}

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Institute of Hydrobiology, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Endocrine disruption seems to be related to high vitellogenin (Vg) levels in male fish and has emerged as a useful biomarker of exposure to estrogenic substances. In this study, we show full-length cDNA sequence of swordtail fish vitellogenin C (Vg C) to provide a basis for assessing estrogenic effects of endocrine disrupting compounds in aquatic environment. Full-length Vg C gene cDNA of swordtail fish were obtained using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques with total RNA extracted from liver of a swordtail fish after treatment with 17 β -estradiol (E₂). The result of sequence analysis indicated that the full length of swordtail fish's Vg C cDNA is 4 011 bp, containing an open reading frame (ORF) of 3 753 bp which encodes a 1 250 amino acids protein with deduced protein molecular weight of 141.7 ku. The comparison results showed that the nucleotide homology of Vg C was 57%–92% and amino acid homology of Vg C was 44%–85% between swordtail fish and other ten teleosts. Furthermore, expression profile of Vg C mRNA in different tissues and time intervals of swordtail fish was determined by real-time fluorescent quantitative PCR. The result showed the swordtail fish's Vg C mRNA was mainly detected in liver and weakly in spleen, kidney, ovary. After exposure to E₂, Vg C mRNA expression quantified in liver of swordtail fish had reached a peak on the fifth day, and then the expression level declined gradually. The data obtained from present study provided valuable information for research on reproduction and physiology and application of environmental pollution monitoring of swordtail fish.

Key words: swordtail fish (*Xiphophorus helleri*); Vg C; cloning; expression; real-time PCR; 17 β -estradiol

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com