

条纹密鲈卵黄蛋白原基因的克隆与检测

梁岳, 方展强*

(华南师范大学生命科学学院,广东省高等学校生态与环境科学重点实验室,广东 广州 510631)

摘要: 采用 RT-PCR 方法克隆并分析了条纹密鲈卵黄蛋白原 (VTG) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) cDNA 部分序列。获得的 VTG cDNA 序列片段长 3 464 bp, 全部处于编码区, 编码 1 150 个氨基酸; β -actin cDNA 序列片段长 1 253 bp, 编码 375 个氨基酸。使用活体与离体的实验方法, 检测了 VTG mRNA 转录情况, 并以此评价雌二醇 (E_2)、辛基酚 (OP)、镉 (Cd^{2+}) 和全氟辛烷磺酸类化合物 (PFOS) 引起的雌激素效应。结果显示, E_2 和 OP 在活体和离体实验中均能剂量依赖性地诱导 VTG mRNA 表达。 Cd^{2+} 仅在活体实验低剂量组诱导 VTG mRNA 表达, PFOS 在活体和离体实验的各个浓度组均未见显著的 VTG mRNA 表达。结果表明, 所诱导的雌激素效应强弱的排列顺序为 $E_2 > OP > Cd^{2+}$ 。 Cd^{2+} 的雌激素效应活体和离体实验的结果不一致, 推测 Cd^{2+} 引起雌激素效应的机理可能和 E_2 不同。条纹密鲈 VTG cDNA 对环境激素敏感, 适合作为监测环境激素的生物标志物。

关键词: 条纹密鲈; 卵黄蛋白原基因; 克隆与表达; 环境激素

中图分类号: S 917

文献标志码: A

环境激素 (environmental hormone) 或称为环境内分泌干扰物 (environmental endocrine-disrupting chemicals, EDCs) 对生物体的正常内分泌系统造成负面影响, 进而影响其生长、发育、新陈代谢以及繁殖等生理过程。目前, 关于环境激素在生物体内的作用机制、监测控制以及其化合物的鉴定已经成为国际性的研究热点。水环境是大部分污染物的最终聚集场所, 也是鱼类等水生动物的自然生存环境, 因此它们受污染物的危害风险很高。建立灵敏、有效的检测和评价水环境中环境激素污染的方法具有重要意义, 因此, 许多研究环境激素的实验方法应运而生。

利用卵黄蛋白原 (vitellogenin, VTG) 作为生物标志物的研究已较广泛。雌性动物卵黄生成期可合成大量 VTG, 而在其他生活期及雄性动物体内的 VTG 的含量却很低。雄性和幼年动物在人工雌激素或低剂量的类雌激素长期作用下, 都能诱导体内 VTG 的生成^[1-2]。根据这一特性, 雄性卵生脊椎动物肝细胞的 VTG 合成可以用于检测

EDCs^[3-4]。目前, 已有多种鱼类 VTG 被应用作为生物标志物, 包括食蚊鱼 (*Gambusia affinis*)^[5], 剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*)^[6], 稀有鮎鲫 (*Gobiocypris rarus*)^[7] 和莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[8] 等, 尽管 VTG 检测实验具有灵敏、快速、专一等优点, 但由于物种之间的差异、免疫系统的复杂性以及 EDCs 成分的多样性, 借助一种动物实验, 单一检测指标难以对一种化学物质或某水域的雌激素效应作出全面评价。开发和建立更多的实验模型并发展活体和离体实验体系对 EDCs 的筛选和鉴定显然更具现实意义。肌动蛋白 (actin) 是所有真核生物细胞重要结构蛋白, 几乎参加了真核细胞的所有生理过程^[9]。 β -actin 是最主要的非肌肉或胞质肌动蛋白异型体, 它在真核生物的大多数非肌肉细胞以及未分化的成肌细胞中表达, 由于表达水平非常稳定, 常常用来作为研究其它基因表达水平的内参基因^[10]。

条纹密鲈 (*Colisa fasciata*) 隶属于鲈形目

收稿日期: 2011-03-19 修回日期: 2011-04-20

资助项目: 国家科技支撑计划项目 (2009BADB2B0401-02); 广东省科技计划项目 (2009B030600006)

通讯作者: 方展强, E-mail: fangzqh@snu.edu.cn

(Perciformes), 斗鱼科(Belontiidae), 一种热带杂食性小型鱼类, 主要分布在印度、孟加拉国、缅甸、尼泊尔等国的河口或池塘水域, 作为经济观赏鱼引入我国。本研究采用条纹密鲈作为实验材料, 克隆 VTG 和 β -actin cDNA 片段, 建立活体(*in vivo*)和离体(*in vitro*)方法检测雌二醇(17β -estradiol, E_2)、辛基酚(octylphenol, OP)、镉(Cd^{2+})和全氟辛烷磺酸类化合物(perfluorooctane sulfonates, PFOS)的雌激素效应。探索利用条纹密鲈卵黄蛋白原基因作为生物标志物监测环境激素物质的可行性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

限制性内切酶、Premix ExTaq 酶、反转录酶 AMV、pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品; DNase I、RNase、连接酶、William's E Medium、辛基酚、氯化镉及其他主要试剂为 Sigma 公司产品; 胎牛血清为杭州四季青产品, 一次性 6 孔细胞培养为 JET BIOFIL 产品, 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 序列分析由上海博尚生物技术有限公司完成。

1.2 实验鱼的饲养与染毒

于 2010 年 5 月从广州市花地湾鱼花鸟市场购买条纹密鲈, 10 ~ 12 月龄, 性成熟健康个体。雌鱼体长(6.35 ± 0.5) cm; 体质量(2.4 ± 0.3) g; 雄鱼体长(6.05 ± 0.5) cm, 体质量(2.6 ± 0.3) g。将雌雄分开饲养于水族箱(30 cm \times 22 cm \times 25 cm, 加入水体积为 8 L), 静养 1 周后用于 VTG 诱导实验。雌鱼用于相关基因的克隆与分析实验, 雄鱼用于体内外染毒实验。实验过程中 2 d 换水 1 次, 实验用水为连续曝气 24 h 的自来水, 水温(25 ± 2) $^{\circ}C$, pH 为 6.8。以水体浸浴或培养基浸浴的方式分别研究几种污染物对实验鱼肝脏或原代培养肝细胞的 VTG 诱导作用。根据 HAN 等^[6]和 WANG 等^[11]的研究并结合预实验结果, 染毒方法设计如下: 每种污染物设置 4 个质量浓度梯度, 其中 E_2 为 0, 0.005, 0.025 和 0.125 $\mu g/L$; OP 为 0, 5, 25 和 125 $\mu g/L$; $CdCl_2$ 和 PFOS 分别为 0, 50, 250 和 1 000 $\mu g/L$ 。活体实验, 每箱随机放入 8 尾雄性条纹密鲈, 暴露时间为 7 d, 每个处理设置 3 个平行, 每个平行取两条鱼的肝脏混合一管进行 RNA 提取。暴露实验结束后, 以 MS-222(50 mg/L)将鱼麻醉, 然后解剖取出肝脏。

1.3 肝细胞原代培养

参考文献[12]的方法, 进行稍微的改进。取暂养 1 周后的实验鱼, 于 0.01% 的高锰酸钾溶液中浸泡 20 min, 再以 MS-222(50 mg/L)将鱼麻醉, 然后以 75% 酒精进行再次体表消毒, 用刀片在臀鳍处对鱼进行断尾并用无菌棉花蘸血以达到去血的目的。去血后, 无菌手术取出肝组织, 剪至 1 mm³ 大小组织块, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化液室温 [(25 ± 3) $^{\circ}C$] 消化, 待肝组织的细胞分散成单个或大量小细胞团时即停止消化, 所得细胞用 100 目筛过滤, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加含 10% 胎牛血清的 William's E Medium 培养基(含 100 mg/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素)重悬沉淀, 用细胞计数板进行细胞计数, 用台盼蓝(0.4%)排除法评价细胞活性, 只有在活细胞数达到细胞总数的 90% 以上时方可将其用于实验^[13]。以每孔 2 mL $1.0 \times 10^6/mL$ 的浓度接种于一次性 6 孔细胞培养板, 每个处理设置 3 个平行, 置 28 $^{\circ}C$ 、4.5% CO_2 培养箱中培养。48 h 后首次换液, 此后每 24 小时换液, 各污染物按照在体实验的浓度分别加入培养基中, 倒置显微镜下观察细胞生长状态。培养 4 h 后, 进行总 RNA 提取实验。

1.4 肝脏或培养肝细胞总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

取条纹密鲈新鲜肝脏组织, 按 Trizol 说明书提取总 RNA 或收集原代培养肝细胞, 利用 RNAPrep pure Cell/Bacteria Kit 提取总 RNA, 电泳检测完整性, 核酸定量仪检测其浓度和纯度, 保证其 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 。利用 DNase I 处理 RNA, 去除残留的基因组 DNA 污染。以总 RNA(约 2 μg)为模板, 以 OligodT₁₈为引物, 按照反转录酶 M-MLV 说明书合成第一链 cDNA。

1.5 引物设计, PCR 扩增 VTG 和 β -actin cDNA 片段

根据 NCBI 数据库上白鲈(*Morone americana*) (GenBank 登陆号: DQ020120) VTG cDNA 序列和黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*) (GenBank 登陆号: AY491380) β -actin cDNA 序列, 利用 NCBI 在线 Blast 程序分析其保守区域, 在此区域分别设计一对引物(具体序列与产物大小见表 1)。扩增条纹密鲈 VTG 和 β -actin cDNA 中间片段, 以第一链 cDNA 为模板, PCR 反应总体积均为 25 μL , 各含 2.5 μL 10 \times 反应缓冲液,

0.5 μL 上、下游引物(各 10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL dNTPs(10 mmol/L), *Taq* 酶 1.25U, 模板量 1 μL , 以 ddH₂O 补足体积(以下 PCR 反应体系均同此)。PCR 程序均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。分别将两个 PCR 产物切胶纯化回收后, 连接到 pMD-20T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经鉴定后将阳性克隆测序。利用 NCBI 的在线 Blast 程序, BioXM 2.6, MEGA 4.0 等软件对获得的序列进行分析。

表 1 实验所用的引物序列

Tab. 1 Primers used for all the experiments

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	产物大小/bp product size	用途 usage
VTG	F:AGAGGTATCCTGAATGTCCT R:AATGTCCTGATGAAAGCAG	3 500	基因克隆 gene cloning
β -actin	F:AGCGAAAAGCCCCACCAAAG R:CGCCTGAGTGTGTATGAGAAAT	1 200	基因克隆 gene cloning
VTG	F:ATAGTCCTTTGATGCTCGGT R:CTCCAGAACATCAGCGGCAG	126	荧光定量 PCR RT-PCR
β -actin	F:AAGCCAACAGGGAGAAGATG R:TACGACCAGAGGCATACAGG	103	荧光定量 PCR RT-PCR

1.6 引物设计及荧光定量 PCR

根据已获得的条纹密鲈 VTG 或 β -actin 基因序列, 分别设计 VTG 和 β -actin 基因的荧光定量 PCR 引物(具体序列与产物大小见表 1), 采用 SYBR Premix Ex *Taq* 试剂盒(TAKARA, Dalian, China), 在荧光定量仪 ABI PRISM 7500 Sequence Detector System(PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系为 25 μL , 各含 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™](2 \times) 12.5 μL , 0.5 μL 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$), cDNA 模板 2 μL , 以 ddH₂O 补足体积。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s 退火、延伸, PCR 循环 40。扩增结束后进行溶解曲线分析, 确定 RCR 质量。以 β -actin 为管家基因校正实验误差。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法 [$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{实验组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{对照组}}$] 计算目的基因的表达倍数。采用 SPSS 16.0 软件对所得表达丰度数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较(multiple comparisons), $P < 0.05$ 具有显著性差异。所有结果以平均值 \pm 标准差(mean \pm

SD)表示。

2 结果

E₂、OP、Cd²⁺ 和 PFOS 暴露实验期间, 各浓度组均未发现实验鱼死亡现象, 且在全过程中各暴露组实验鱼与对照组相比无行为异常, 细胞离体暴露实验中, 各暴露组细胞与对照组相比亦无显著的形态差异, 说明在实验浓度范围内 4 种污染物对条纹密鲈无可观测的急性毒性作用。

2.1 原代培养肝细胞形态与活力

倒置显微镜下观察, 可见新鲜分离的原代肝细胞呈圆形并呈分散状态。培养 24 h 后大部分细胞贴壁, 贴壁的肝细胞其形态上发生明显改变, 呈纤维细胞状, 胞体变平变薄, 体积略有增大, 致密粘附于培养板底部; 48 h 后, 细胞连接成片状形成单层结构(图 1)。预实验结果表明, 生长状况良好的肝细胞能维持一周左右, 培养到第 6 天, 细胞活力开始下降, 但不显著, 从第 7 天开始, 细胞活力开始显著下降, 直到第 14 天, 全部死亡。

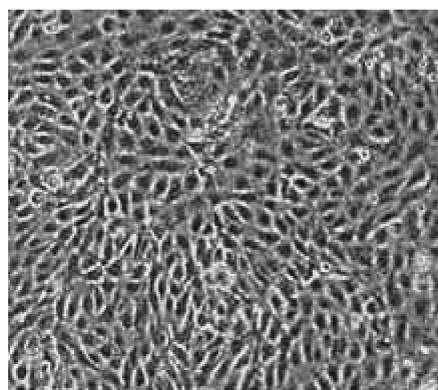


图 1 条纹密鲈原代培养 48 h 肝细胞($\times 200$)

Fig. 1 Primary culture hepatocyte of *C. fasciata* at 48 h ($\times 200$)

2.2 条纹密鲈 VTG 和 β -actin 序列分析

在线 Blast 结果显示, 获得两条序列分别包含有 VTG 或 β -actin 重要功能域, 而且与相近鱼类的同源性较高, 说明克隆至载体上 DNA 片段序列是正确的, 可以用于后续研究。获得的 VTG cDNA 序列片段长 3 464 bp, 全部处于编码区, 编码 1 150 个氨基酸(图 2)(GenBank 登陆号: GU727852.1)。获得的 β -actin cDNA 序列片段长 1 253 bp, 编码 375 个氨基酸(图 3)(GenBank 登陆号: GU363348.1)。

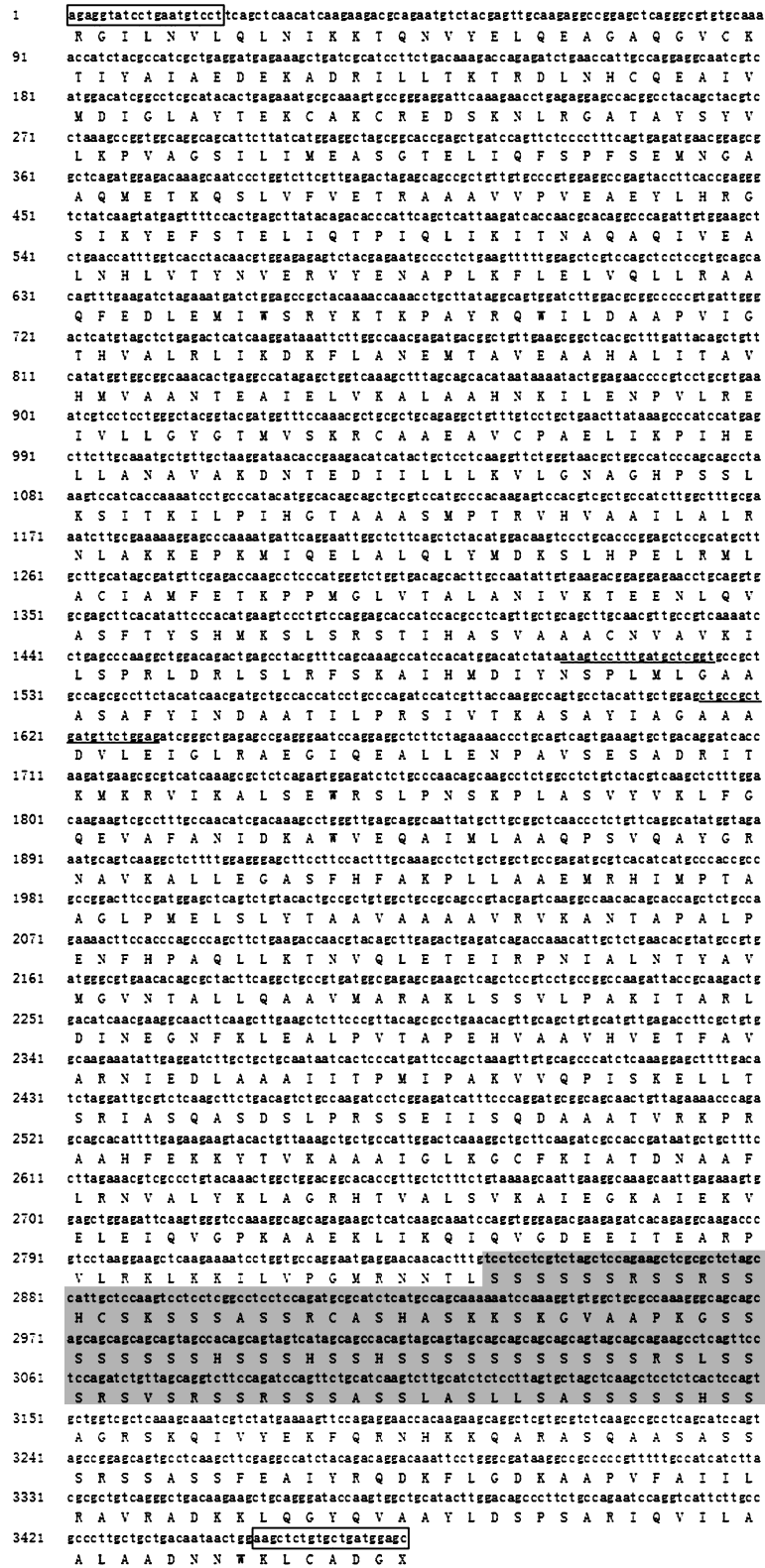


图 2 条纹密鲈 VTG 部分 cDNA 序列及推导出的氨基酸序列

方框标记用于基因克隆的引物序列, 下划线标记用于实时定量 PCR 的引物序列, 用阴影部分为标记多聚丝氨酸区域。

Fig. 2 The partial cDNA and deduced amino acid sequence of *C. fasciata*'s VTG

The boxed sequences indicate the location of the primers is used to gene cloning, the underlined sequences indicate the location of the primers is used to analyze mRNA levels by real-time PCR, the polyserine domain is indicated by shade.

```

1   AGCGAAAAGCCCCCAACAAAGTAAACCatggatgatgaatcgcgcactcgttgttgacaacggatccggtat
      M D D E I A A L V V D N G S G M
76  gtgcaaagccgattcgcggtagcagcgcctcgtgctgtcttccctccatcgttggtgccaaggcatca
      C K A G F A G D D A P R A V F P S I V G R P R H Q
151 gggagtgatgggtatggccagaaggacagctacgttggatgaagctcagagcaagagggtatcctgac
      G V M V G M G Q K D S Y V G D E A Q S K R G I L T
226 cctgaagtacccatcagcagcgtattgtgaccaactgggatgacatggagaagatctggcatcacacctota
      L K Y P I E H G I V T N W D D M E K I W H H T F Y
301 caacgagctgagagttgcccctgaggagcaccctgtcctgctcagagggccccctgaaccccaaggccaacag
      N E L R V A P E E H P V L L T E A P L N P K A N R
376 ggagaagatgaccagatcatgttcgagacctcaacacccccccatgtacgttgccatccaggctgtgctgctc
      E K M T Q I M F E T F N T P A M Y V A I Q A V L S
451 cctgtatgctctggctgctgaccaccggtattgtcactgactccggtgatgggtgaccacacagtgccatcta
      L Y A S G R T T G I V M D S G D G V T H T V P I Y
526 cgagggtatgcccctgcccacgccatcctcgtctggtattggctggcctgacccacagactacctcatgaa
      E G Y A L P H A I L R L D L A G R D L T D Y L M K
601 gatcctgacagagcgtgctactcctcaccaccacagccagagggaaatcgtgctgacatcaaggagaagct
      I L T E R G Y S F T T T A E R E I V R D I K E K L
676 gtgctacgtcgcctggacttcagcagagatgggactgctgctcctctcttccctggagaagagctacga
      C Y V A L D F E Q E M G T A A S S S S L E K S Y E
751 gctgccgacggacaggtcatcaccatcggcaatgagaggttccgttgcctgaggccctctccagcctcctt
      L P D G Q V I T I G N E R F R C P E A L F Q P S F
826 cctcgtatggagtcctcgggaatccacgagaccacctacaacagcatcatgaagtgcgacgtcgcacatccgtaa
      L G M E S C G I H E T T Y N S I M K C D V D I R K
901 ggacctgtacccaacactgtgctgtctgtgtgtaccaccatgtaccccgcatcgcgacaggtgcagaagga
      D L Y A N T V L S G G T T M Y P G I A D R M Q K E
976 gatcacagccctggcccacatcaccatgaagatcaagatcattgcccacctgagcgtaaatactccgtctggat
      I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S V W I
1051 tggagctccatcctgcccctctctgtccacctccagcagatgtggatcagcaagcaggagtacgatgagtcggg
      G G S I L A S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D E S G
1126 cccatccatcgtccaccgtaaatgcttctaaACGGACTGTTCCCTTCCCCCTCTCCCAACCAACACCCAAACA
      P S I V H R K C F *
1201 ACTTTAGCTCTGTGCAAAACAACCACAACACATTTCATACACTCAGCGG

```

图3 条纹密鲈 β -actin 部分 cDNA 序列及推导出的氨基酸序列

方框标记用于基因克隆的引物序列,下划线标记用于实时定量 PCR 的引物序列。

Fig. 3 The partial cDNA and deduced amino acid sequence of *C. fasciata*'s β -actin

The boxed sequences indicate the location of the primers used to gene cloning, the underlined sequences indicate the location of the primers is used to analyze mRNA levels by real-time PCR.

利用 Clustal W 程序将已发表的其它鱼类 VTG 氨基酸序列进行多序列比对(图4)。

从 NCBI 中蛋白质数据库中分别挑选不同种类物种的 VTG 或 β -actin 氨基酸序列;VTG:包括鲮、食蚊鱼、斑马鱼、红火蚁、蜜蜂、青蟹、蟾蜍、锦龟、家鸡等 9 个序列; β -actin:包括鲮、斑马鱼、真鲷、拟黑多刺蚁、青蟹、蟾蜍、家鸡、家牛、人等 9 个序列,利用 MEGA 4.0 软件,分别分析这些序列的同源性(表 2 和表 3),并构建进化树(图 5 和图 6)。从 VTG 同源性分析来看,VTG 在进化上并不十分保守,不同物种之间差异较大,在所比较的 9 个物种中氨基酸序列的同源性为 20% ~ 59%。与条纹密鲈同源性最高的是斑马鱼,为 59%,鲮次之,与家牛同源性最低的是蜜蜂,为 20%。从

进化树可以看出,所收集的物种的 VTG 起源于共同的祖先,主要分为 3 支,一支进化为甲壳动物,蟹 (*Callinectes sapidus*);一支进化为昆虫 (*Solenopsis invicta*, *Apis mellifera*);另一支进化为脊椎动物,又为 3 个不同的方向进化:一为两栖类 (*Xenopus laevis*) 和龟鳖类 (*Chrysemys picta*);一为鸟类 (*Gallus gallus*);还有一个为鱼类 (*Cirrhinus molitorella*, *Gambusia affinis*, *Danio rerio*, *Colisa fasciata*),说明鱼类在长期的进化过程中不仅亲缘关系较近,而且进化途径基本相同。由构建的分子系统树可见,根据 VTG 基因序列获得的分类结果与传统分类结果、系统发育演化基本吻合。从 β -actin 同源性分析来看, β -actin 极度保守,各物种之间的差异极小,从进化树来看, β -

actin 起源于共同的祖先,主要分为两支进化,一支进化为节肢动物 (*Callinectes sapidus*),另一支进化为脊椎动物,尽管如此,在比较的 9 个物种

中,从鱼类到昆虫,从鸟类到人类的氨基酸序列的同源性均高达 99%。 β -actin 的保守特性可能和其为细胞骨架的关键基因有关。

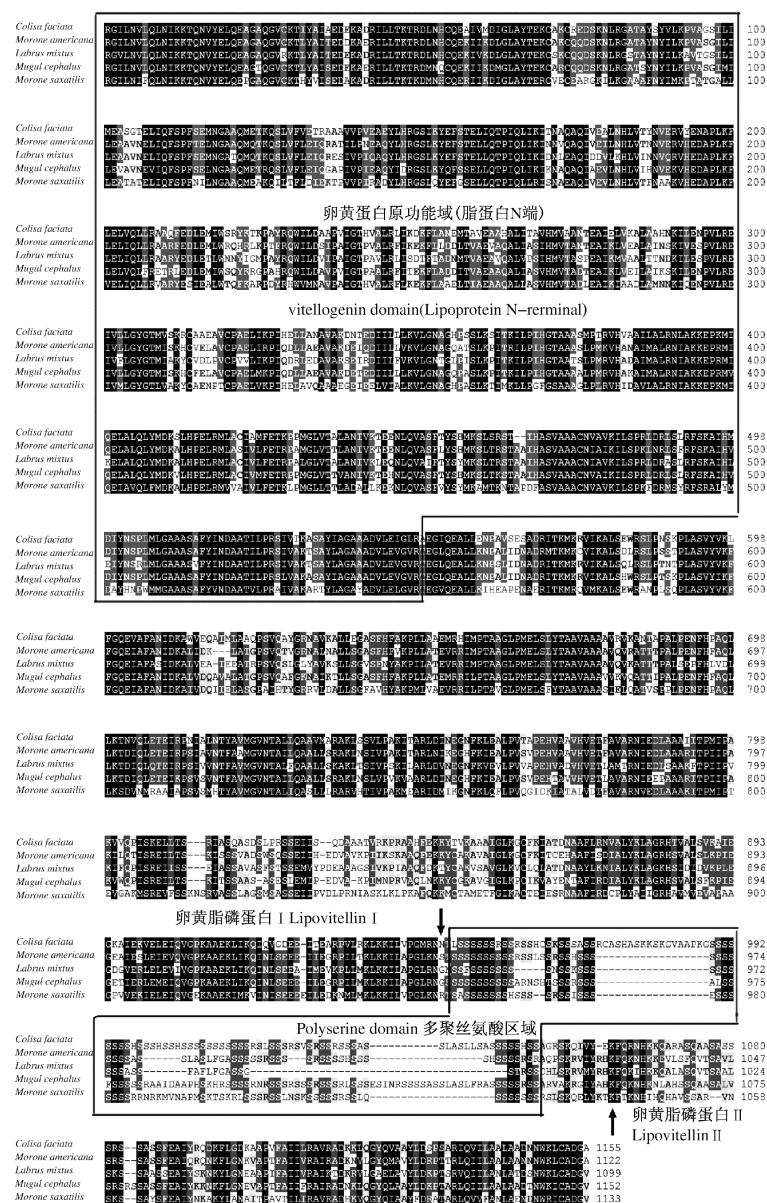


图 4 条纹密鲈 VTG 核苷酸序列和其它鱼类相应序列比较

比对鱼类为白鲈 (*Morone americana*)、隆头鱼 (*Labrus mixtus*)、鲮 (*Mugil cephalus*) 和条纹石鲈 (*Morone saxatilis*), GenBank 登陆号分别为 AAZ17415.1; ACK36967.1; BAF64835.1 和 ADZ57173.1。相同、高度保守或中度保守分别用黑色、灰色和白色指示。黑框表示卵黄蛋白原功能域(脂蛋白 N 端)和多聚丝氨酸区域。卵黄脂蛋白 I, 卵黄高磷蛋白(多聚丝氨酸区域)和卵黄脂蛋白 II 边界用黑色箭头标示, 根据 TONG 等^[14]。

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of VTG of *C. fasciata* and other fishes

Fishes: *Morone americana*, *Labrus mixtus*, *Mugil cephalus* and *Morone saxatilis*. Genbank number, are AAZ17415.1; ACK36967.1; BAF64835.1 and ADZ57173.1, respectively. The identical, highly conserved and less conserved amino acid residues are indicated by black, gray, and white, respectively. Vitellogenin domain (Lipoprotein N-terminal Domain) and Polyserine domain are indicated by black box. The boundaries of putative signal peptide, lipovitellin I, phosphitin (Polyserine domain), and lipovitellin II, are indicated by arrows according to TONG *et al.*^[14].

表 2 条纹密鲈与其它物种的 VTG 氨基酸序列的比较(同源性,相似性)

Tab.2 Comparison(% identity,% similarity) of amino acid sequences for VTG of *C. fasciata* with some known species

物种 species	基因库 登录号 GenBank no.	同源 性/% identity	相似 性/% similarity
鲮 <i>Cirrhinus molitorella</i>	GU324313.1	55	74
食蚊鱼 <i>Gambusia affinis</i>	AB181835.1	59	77
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NM_001044913.1	54	73
红火蚁 <i>Solenopsis invicta</i>	AF512520.1	26	48
蜜蜂 <i>Apis mellifera</i>	NM_001011578.1	20	37
青蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	DQ314748.1	23	42
蟾蜍 <i>Xenopus laevis</i>	NM_001159281.1	40	60
锦龟 <i>Chrysemys picta</i>	FJ827119.2	39	62
家鸡 <i>Gallus gallus</i>	D89547.1	37	59

表 3 条纹密鲈与其它物种的 β -actin 氨基酸序列的比较(同源性,相似性)

Tab.3 Comparison(% identity,% similarity) of amino acid sequences for β -actin of *C. fasciata* with some known species

物种 species	基因库 登录号 GenBank No.	同源 性/% identity	相似 性/% similarity
鲮 <i>Cirrhinus molitorella</i>	DQ007446.1	99	100
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	AF057040.1	99	100
真鲷 <i>Pagrus major</i>	AB199890.1	99	100
拟黑多刺蚁 <i>Polyrhachis vicina</i>	GQ870295.1	99	99
青蟹 <i>Callinectes sapidus</i>	DQ084066.1	99	99
蟾蜍 <i>Xenopus laevis</i>	NM_001088953.1	99	99
家鸡 <i>Gallus gallus</i>	L08165.1	99	99
家牛 <i>Bos taurus</i>	AY141970.1	99	99
人 <i>Homo sapiens</i>	NM_001101.3	99	99

2.3 污染物诱导 VTG mRNA 的表达

熔解曲线显示,熔解温度均一,波峰单一,从而排除了形成引物二聚体和非特异产物对结果带来影响的可能,同时说明设计的引物有很好的特异性,PCR 反应条件合适。

活体实验 如图 7 所示,在 E_2 和 OP 实验组,VTG mRNA 表达呈显著的剂量依赖效应, E_2

和 OP 诱导的最高表达倍数分别为 436 倍和 39 倍。在 $CdCl_2$ 暴露组,仅 50 $\mu g/L$ 组有显著表达。PFOS 暴露组,各浓度均未见 VTG mRNA 表达的显著差异。

离体实验 如图 8 所示,在 E_2 和 OP 实验组,与活体实验的结果相似,VTG mRNA 表达呈显著的剂量依赖效应,但是, E_2 和 OP 诱导的最高表达倍数分别为 114 倍和 30 倍。其变化趋势不及活体实验。 Cd^{2+} 和 PFOS 暴露组,VTG mRNA 表达均未见显著差异($P > 0.05$)。

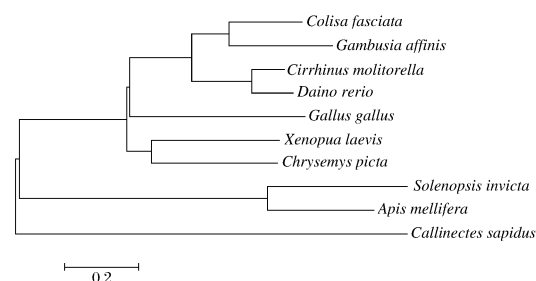


图 5 根据条纹密鲈及其他 9 个物种 VTG 氨基酸序列构建的分子进化树

由 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 方法 1 000 bootstrap 构建。所用序列见表 2。

Fig.5 A phylogenetic tree on VTG amino acid sequences between *C. fasciata* and other nine species

By the Neighbor-Joining method with 1 000 bootstrap trials by the MEGA 4.0 program. The sequences used are shown in Tab.2.

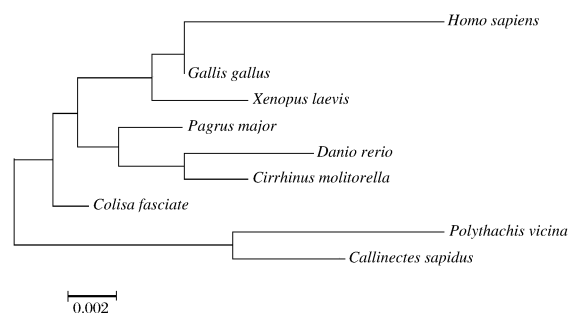


图 6 根据条纹密鲈及其他 9 个物种 β -actin 氨基酸序列构建的分子进化树

由 MEGA 4.0 软件 Neighbor-Joining 方法 1 000 bootstrap 构建。所用序列见表 3。

Fig.6 A phylogenetic tree on β -actin amino acid sequences between *C. fasciata* and other nine species

By the Neighbor-Joining method with 1 000 bootstrap trials by the MEGA 4.0 program. The sequences used are shown in Tab.3.

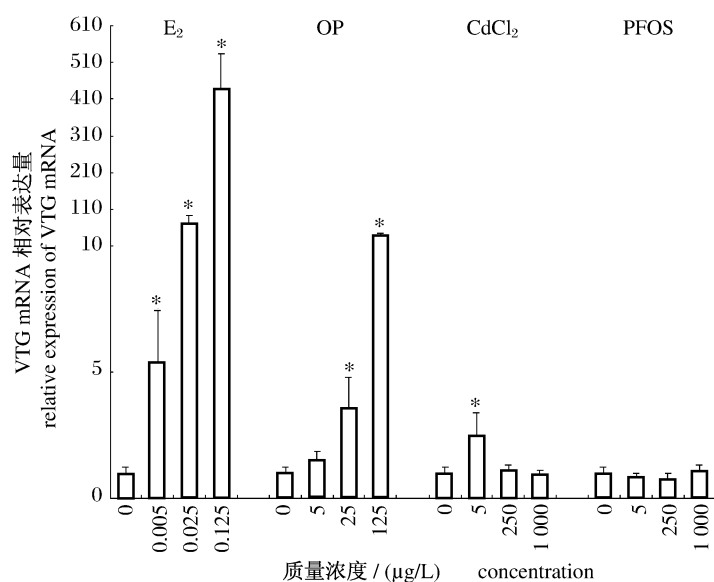


图7 荧光定量PCR分析暴露于E₂、OP、Cd²⁺和PFOS的雄鱼的VTG mRNA表达

基因表达水平为与对照比较的相对mRNA表达。数据结果表示为来自6条鱼的3次重复的平均值,误差线为标准差,“*”表示与对照比较差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 7 Real-time quantitative RT-PCR analyses of mRNA expression of VTG from control and E₂, OP, Cd²⁺ and PFOS-exposed male fish

Gene expression levels represent the relative mRNA expression compared to controls. The results show the means of the three replicates from six individual fish, and the error bars indicate standard deviations; * $P < 0.05$ indicate significant differences between the controls and corresponding exposure groups.

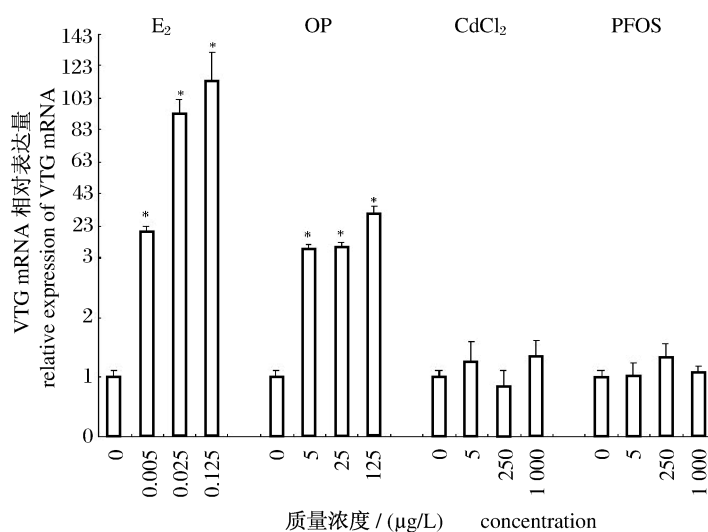


图8 荧光定量PCR分析暴露于E₂、OP、CdCl₂和PFOS的雄鱼原代培养肝细胞的VTG mRNA表达

基因表达水平为与对照比较的相对mRNA表达。数据结果表示为来自6条鱼的3个重复的平均值,误差线为标准差,“*”表示与对照比较差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 8 Real-time quantitative RT-PCR analyses of mRNA expression of VTG from control and E₂, OP, Cd²⁺ and PFOS-exposed primary culture liver cell

Gene expression levels represent the relative mRNA expression compared to controls. The results show the means of the three replicates from six individual fish, and the error bars indicate standard deviations; * $P < 0.05$ indicate significant differences between the controls and corresponding exposure groups.

3 讨论

本实验中,作者建立了一个成功的条纹密鲈原代肝细胞培养方法。该方法操作简单,容易上手,不需要大量摸索条件。生长状况良好的肝细胞能维持一周左右。但是培养到第 9 天,细胞活力显著下降。到第 14 天左右细胞基本全部死亡。可能的原因是专为哺乳类设计的培养基并不能完全适用于鱼类细胞培养,而目前专为鱼类设计的培养基还非常少。另外,肝细胞作为一种高度分化的上皮细胞,在缺乏体内条件下各种激素或生长因子的调控,其增殖能力有限。因而,本方法培养的细胞适用于时间少于 7 d 的急性毒理研究。外源物质对细胞刺激时间对基因表达有重要影响^[15],考虑到细胞活力与效率等因素,体外实验选择 4 d 作为细胞暴露时间较合适。

关于卵黄蛋白原基因序列的研究是随着近年分子生物技术的飞速发展才开始出现了较大的进展。目前卵生动物中,软体动物,节肢动物,鱼类、鸟类、两栖类和爬行类以及圆口纲七鳃鳗的卵黄蛋白原都有报道^[16]。由于卵黄蛋白原的氨基酸序列的不同,功能域进化速率差异较大,既有进化较快的部分,亦有高度保守,进化极慢的序列。因此,序列在种间显示出较大的分歧度,同时在高级分类阶元间也表现出良好的分辨率。在系统进化分析中,卵黄蛋白原的进化速度较快,序列可以很好地用于进化关系较近的物种系统进化研究。而对于进化关系较远的物种,序列中的高度保守区域可以用来进行系统进化的比较分析^[17]。因此,VTG 可以作为用于系统发育分析的分子标记。

E_2 在雌性动物生长、发育,尤其在性发育、性调节和生殖行为等多方面起到了重要的作用。 E_2 的诱导常常被用作 VTG 诱导实验的阳性对照,这是因为 E_2 为天然雌激素亦是雌激素活性最强的雌激素之一。 E_2 能够诱导卵生动物 VTG 的产生,主要是由于 E_2 可以与肝脏中的雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合,形成受体蛋白复合物进入到细胞核中,结合到染色体上使 VTG 基因转录并表达^[18]。OP 是烷基酚类化合物中有代表性的环境污染物,目前已有的雌激素效应评估研究普遍认为,辛基酚是雌激素效应最强的烷基酚类化合物^[19],OP 主要通过雌激素受体途径来影响机体的生殖与发育^[20],推测 OP 的雌激素效应

可能和雌二醇的雌激素效应机理相同。

Cd^{2+} 是环境污染中最危险的重金属毒物之一,其对机体的毒性作用在活体和离体试验中都已充分证实,但其是否具有雌激素效应,仍有争议。ZHENG 等^[21] 的研究发现,1 $\mu\text{g/L}$ 的 Cd^{2+} 就能显著上调多齿围沙蚕 (*Perinereis nuntia*) VTG 基因表达,而且呈剂量依赖效应。HWANG 等^[22] 发现 100 $\mu\text{g/L}$ 的 Cd^{2+} 能诱导矮小拟镖剑水蚤 (*Paracyclops nana*) VTG mRNA 表达,并呈时间依赖效应。然而,另外的研究人员则发现 Cd^{2+} 能抑制 VTG 的合成。HWANG 等^[23] 的研究表明 200 $\mu\text{g/L}$ 的 Cd 能显著抑制虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝细胞在雌激素诱导下的 VTG mRNA 表达,但其抑制机理可能与金属铝不一样。SANDERS 等^[24] 发现 50 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 的硫化镉 (CdS) 均未能诱导无鳞甲三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 的 VTG 的合成。而有些学者发现,在急性刺激情况下, Cd^{2+} 暴露能抑制 VTG 合成^[25];而低剂量长期暴露却能诱导 VTG 合成,认为 VTG 具有抵抗 Cd^{2+} 毒性的功能^[26]。本实验中仅在活体实验中的 50 $\mu\text{g/L}$ 暴露组的 VTG mRNA 表达和对照组比较差异显著,而相同浓度下,离体实验组各个浓度暴露组的 VTG mRNA 表达均无差异 ($P > 0.05$)。这说明 Cd 具有轻微的雌激素效应,但其机理和雌二醇可能不一样,推测 Cd 的雌激素效应需要肝细胞外的因素参与。Cd 和 VTG 可能存在着有趣的博弈关系,Cd 能通过损害细胞生理功能来抑制 VTG 合成过程,而 Cd 的低剂量暴露能激发肝细胞合成 VTG 的免疫应答,VTG 的存在能降低 Cd 对机体的毒性作用。

PFOS 是近年来引起学者密切关注的持久性有机污染物。有研究报道,PFOS 具有雌激素活性^[27-29],但本实验中,活体和离体暴露组均未见 VTG mRNA 的显著表达。因此推测,PFOS 作为一种非常稳定的化合物,本身毒性极低,其对机体的负面影响主要因为其具有难降解性、生物蓄积性和沿食物链在生物体内富集作用。因为 PFOS 的急性毒性极低,短时间的暴露,可能未能在体内积累足够可引起机体发生异常的量。

本实验中,活体和离体实验的结果比较来看,变化趋势基本吻合,但离体实验的变化幅度要显著小于活体实验,可能是因为体外培养的肝细胞

活力不及体内实验的肝细胞,随着培养时间的推移,活力不断降低的情况下,细胞合成 mRNA 和分泌蛋白质的能力都会大大下降。

参考文献:

- [1] KIM H R, PARK Y J, KIM J G, *et al.* Molecular cloning of vitellogenin gene and mRNA expression by 17 alpha-ethinylestradiol from slender bitterling [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3) : 484 - 495.
- [2] MIKAWA N, UTOH T, HORIE N, *et al.* Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger (*Conger myriaster*) and vitellogenin gene expression during ovarian development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 2006, 143(4) : 404 - 414.
- [3] SCHOLZ S, MAYER I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 293(1 - 2) : 57 - 70.
- [4] BARUCCA M, CANAPA A, OLMO E, *et al.* Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species [J]. *Environmental Research*, 2006, 101(1) : 68 - 73.
- [5] LEUSCH F D L, VAN DEN HEUVEL M R, LAURIE A D, *et al.* Quantification of vitellogenin mRNA induction in mosquitofish (*Gambusia affinis*) by reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. *Biomarkers*, 2005, 10(6) : 429 - 438.
- [6] HAN J, FANG Z. Estrogenic effects, reproductive impairment and developmental toxicity in ovoviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(2) : 281 - 290.
- [7] ZHONG X P, XU Y, LIANG Y, *et al.* The Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) as an *in vivo* model for endocrine disruption in freshwater teleosts: a full life-cycle test with diethylstilbestrol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 71(1) : 85 - 95.
- [8] TAKEMURA A, KIM B H. Effects of estradiol-17 beta treatment on *in vitro* and *in vivo* synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2001, 129(2 - 3) : 641 - 651.
- [9] MITTA G, ROCH P, CADORET J P. Isolation and characterization of a cDNA encoding an actin protein from the mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2000, 19(1) : 183 - 186.
- [10] SANTOS C R A, POWER D M, KILLE P, *et al.* Cloning and sequencing of a full-length sea bream (*Sparus aurata*) beta-actin cDNA [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 117(2) : 185 - 189.
- [11] WANG R, GAO Y, ZHANG L, *et al.* Cloning, expression, and induction by 17-beta estradiol (E2) of a vitellogenin gene in the white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(2) : 157 - 164.
- [12] CHRISTIANSON-HEISKA I, ISOMAA B. The use of primary hepatocytes from brown trout (*Salmo trutta lacustris*) and the fish cell lines RTH-149 and ZF-L for *in vitro* screening of (anti) estrogenic activity of wood extractives [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(3) : 589 - 597.
- [13] SMEETS J M, RANKOUHI T R, NICHOLS K M, *et al.* *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti) estrogenic activity of xenobiotics [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 157(1) : 68 - 76.
- [14] TONG Y, SHAN T, POH Y K, *et al.* Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 beta-estradiol [J]. *Gene*, 2004, 328 : 25 - 36.
- [15] LATONNELLE K, LE MENN F, BENNETAU-PELISSERO C. *In vitro* estrogenic effects of phytoestrogens in rainbow trout and *Siberian sturgeon* [J]. *Ecotoxicology*, 2000, 9(1 - 2) : 115 - 125.
- [16] KIM H R, PARK Y J, KIM J G, *et al.* Molecular cloning of vitellogenin gene and mRNA expression by 17 alpha-ethinylestradiol from slender bitterling [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 168(3) : 484 - 495.
- [17] HAYWARD A, TAKAHASHI T, BENDENA W G, *et al.* Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans [J]. *Febs Letters*, 2010, 584(6) : 1273 - 1278.
- [18] HENRY T B, MCPHERSON J T, ROGERS E D, *et al.* Changes in the relative expression pattern of

- multiple vitellogenin genes in adult male and larval zebra fish exposed to exogenous estrogens [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2009, 154(1) : 119 – 126.
- [19] ROUTLEDGE E J, SUMPTER J P. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272 : 3280 – 3288.
- [20] INADERA H, HASHIMOTO S, DONG H Y, *et al.* WISP-2 as a novel estrogen-responsive gene in human breast cancer cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 275 (1) : 108 – 114.
- [21] ZHENG S L, CHEN B, WANG Z, *et al.* Reproductive toxic effects of sublethal cadmium on the marine polychaete *Perinereis nuntia* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73 (6) : 1196 – 1201.
- [22] HWANG D S, LEE K W, HAN J, *et al.* Molecular characterization and expression of vitellogenin (Vg) genes from the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana* exposed to heavy metals [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2010, 151 (3) : 360 – 368.
- [23] HWANG U G, KAGAWA N, MUGIYA Y. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 beta in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 119(1) : 69 – 76.
- [24] SANDERS M B, SEBIRE M, STURVE J, *et al.* Exposure of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) to cadmium sulfide nanoparticles: Biological effects and the importance of experimental design [J]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66(1) : 161 – 163.
- [25] CERVERA A, MAYMO A C, MARTINEZ-PARDO R, *et al.* Vitellogenesis inhibition in *Oncopeltus fasciatus* females (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51 (8) : 895 – 911.
- [26] CERVERA A, MAYMO A C, MARTINEZ-PARDO R, *et al.* Vitellogenin polypeptide levels in one susceptible and one cadmium-resistant strain of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae), and its role in cadmium resistance [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2006, 52(2) : 158 – 168.
- [27] DU Y, SHI X, LIU C, *et al.* Chronic effects of water-borne PFOS exposure on growth, survival and hepatotoxicity in zebrafish: a partial life-cycle test [J]. *Chemosphere*, 2009, 74(5) : 723 – 729.
- [28] LIU C, DU Y, ZHOU B. Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 85(4) : 267 – 277.
- [29] ISHIBASHI H, YAMAUCHI R, MATSUOKA M, *et al.* Fluorotelomer alcohols induced hepatic vitellogenin through activation of the estrogen receptor in male medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Chemosphere*, 2008, 71(10) : 1853 – 1859.

Cloning, sequence analysis and detection of vitellogenin cDNA from *Colisa fasciata*

LIANG Yue, FANG Zhan-qiang*

(Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education,
College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Using RT-PCR, the partial length vitellogenin (VTG) cDNA sequence and β -actin cDNA sequence of *Colisa fasciata* were cloned. VTG cDNA sequence contains 3 464 bp nucleotides and encodes 1 150 amino acids. β -actin cDNA sequence contains 1 253 bp nucleotides and encodes 375 amino acids. *In vivo* and *in vitro* methods were employed to investigate VTG mRNA expression under exposure to estradiol (E_2), octylphenol (OP), cadmium (Cd^{2+}) and perfluorooctane sulfonates (PFOS) and evaluate the estrogenic activity. The results showed that E_2 and OP could induce VTG mRNA expression in dose-dependent way by *in vivo* and *in vitro* test. Cd^{2+} could induce VTG mRNA expression only in the low dose by *in vivo* test, but VTG mRNA expression was not observed in PFOS groups by *in vivo* and *in vitro* test. The results indicated that the strength of estrogenic effects was in the order $E_2 > OP > Cd^{2+}$. Cd^{2+} estrogenic effects *in vivo* and *in vitro* results are inconsistent, suggesting that the mechanism of Cd^{2+} induced effects of estrogen and E_2 may be different. The results also indicated that VTG cDNA of *C. fasciata* is very sensitive to environmental hormone and very suitable to be a biomarker for monitoring the environmental hormones.

Key words: *Colisa fasciata*; vitellogenin cDNA; clone and detect; environmental hormone

Corresponding author: FANG Zhan-qiang. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn