

## 半滑舌鳎 *Vasa* 基因 cDNA 克隆及其在繁殖周期的表达

张远青, 温海深\*, 何峰, 李吉方, 史丹,  
胡健, 刘森, 母伟杰, 马瑞芹  
(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 通过简并引物和 RACE 技术分离得到了半滑舌鳎 *Vasa* 基因的 cDNA 序列, 其全长为 2 602 bp, 编码包含 722 个氨基酸残基的蛋白质。半滑舌鳎 *Vasa* 在 N 末端含有 5 个 RGG 重复和 10 个 RG 重复, 具备 DEAD-box 家族特有的 8 个保守基序, 与东方蓝旗鲷的同源性最高 (91%)。利用 RT-PCR 技术研究了 *csVasa* 在性成熟半滑舌鳎中的表达模式。组织分布研究发现, *Vasa* 在半滑舌鳎的卵巢和精巢中表达丰富, 心脏中有微量表达; 繁殖周期中, 卵巢中 *Vasa* 的表达量在初级卵黄期和囊泡期要明显高于核周期和退化吸收期; 精巢中, *Vasa* 在精子细胞增殖期的表达量要显著高于精子成熟期和精母细胞增殖期。结果表明, *Vasa* 可能半滑舌鳎的配子发生中起重要作用。

**关键词:** 半滑舌鳎; *Vasa*; 基因克隆; mRNA 表达; 繁殖周期

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标志码:** A

*Vasa* 是 DEAD-box 家族中的一种 ATP 依赖的 RNA 解旋酶, 由 *Vasa* 基因编码, 最先在果蝇中被鉴别出来, 被认为是生殖细胞的标记基因<sup>[1-2]</sup>。DEAD-box 家族蛋白共享 8 个特异性基序序列, 并且参与多个重要的细胞进程, 如 RNA 剪切、修饰和处理, mRNA 表达的起始、核外转运和降解<sup>[3]</sup>。目前已在多种无脊椎动物和脊椎动物中克隆得到了 *Vasa* 的同源基因, 并对其功能进行了深入研究。

在鱼类中, *Vasa* 是 PGC(原始生殖细胞)的第一个分子标记, 同时也是生殖细胞的特异性分子标记<sup>[4-8]</sup>。目前国内外学者对 *Vasa* 在胚胎发育、性腺分化、早期性腺发育和(或)配子发生中的作用进行了深入研究, 如斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[8-9]</sup>, 金鱼 (*Carassius auratus*)<sup>[10-11]</sup>, 罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[12]</sup>, 金头鲷 (*Sparus aurata*)<sup>[13]</sup>, 南方鲇 (*Silurus meridionalis*)<sup>[14]</sup>, 银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)<sup>[15]</sup>, 青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[16]</sup>, 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)<sup>[17]</sup>,

革胡子鲶 (*Clarias gariepinus*)<sup>[18]</sup> 和狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)<sup>[19]</sup>。此外, 还有其在黄鳝 (*Monopterus albus*) 性逆转过程中作用的研究<sup>[20]</sup>。到目前为止, 已经从 41 种鱼类中获得 *Vasa* 及其同源物的 cDNA 序列, 但在鲆鲽类中 *Vasa* 的研究还未见报道。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Günther) 是我国重要的海水养殖对象, 属分批产卵类型鱼类。本实验以人工养殖的半滑舌鳎为对象, 应用分子生物学方法, 克隆 *Vasa* 基因的全长 cDNA 序列, 并对 *Vasa* 在不同组织和繁殖周期的表达模式进行了研究。该研究为进一步阐明 *Vasa* 基因在配子发生中的功能奠定基础, 同时也为从分子水平研究半滑舌鳎 PGC 的起源、迁移和分化提供依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

2007 年 2 月至 2008 年 1 月, 从烟台莱州某养殖场池塘内每月采集一次, 采样时间分别为雌鱼

收稿日期:2011-06-21 修回日期:2011-09-27  
资助项目:国家“十二五”科技支撑计划课题(2011BAD13B03)  
通讯作者:温海深, E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn

4月、7月、10月和翌年1月,雄鱼3月、6月、9月、12月。实验鱼均为初次性成熟。其中用于本实验的雌性半滑舌鳎12尾,2~3龄,体长41.9~54.9 cm,体质量528.1~1 194.6 g;雄性半滑舌鳎12尾,2~3龄,体长23.7~37.1 cm,体质量89.2~352.8 g。采集后在水族箱内暂养2~3 d,流水充氧,人工调节光照,自然水温。采集组织样品后立即放入液氮保存。克隆 *csVasa* (*Cynoglossus semilaevis Vasa*) cDNA 全长的材料为达到性成熟的雌性半滑舌鳎。

### 1.2 试剂

引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, Smart™ Race cDNA Amplification kit 试剂盒购自 Clontech 公司, RNA 提取试剂 RNAiso Reagent 和基因表达所用 *Taq* 酶试剂盒为 TakaRa 公司产品, M-MLV 购自 Promega 公司, 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pGM-T 载体购自北京天根生化科技有限公司, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和基因克隆所用 HiFi *Taq* 酶购自北京全式金生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 *csVasa* 的克隆

收集性成熟雌性半滑舌鳎的性腺, 迅速放入液氮进行研磨。用 RNAiso 提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 取 1  $\mu$ g 按照 Smart™ Race cDNA Amplification kit 试剂盒说明书合成第一链 cDNA。根据斑马鱼、罗非鱼、南方鳅、鲤、真鲷等的 *Vasa* cDNA 序列, 使用 CodeHop 法<sup>[21]</sup> 在其保守区设计简并引物。以已合成的第一链 cDNA 为模板, 按照以下程序扩增 *Vasa* 片段: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60.5  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 28 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收目的片段后亚克隆到 pGM-T 载体, 转化进感受态细胞中, 蓝白斑筛选后由华大基因测序。利用 Primer 5.0 在得到的 *Vasa* cDNA 片段上设计引物, 按照以下程序扩增 3' 和 5' cDNA 末端: 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 65  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 10 s, 36 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

### 1.4 *Vasa* 的序列分析与进化树构建

根据已克隆得到的 *Vasa* cDNA 序列, 用 DNAMAN 推导氨基酸序列, 并用 Clustal X 和 MAGA 4.0 构建 NJ (Neighbor-Joining) 系统进化树。所用物种的 *Vasa* 氨基酸序列均从 GenBank

下载, 物种及登录号为黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, NP\_723899), 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, AAR37337), 斑马鱼 (*Danio rerio*, NM\_131057), 南方鳅 (*Silurus meridionalis*, ACD62525), 南方鳅—短亚型 (*Silurus meridionalis-s*, ACD62526), 革胡子鳅 (*Clarias gariepinus*, ACV32355), 五条鲈 (*Seriola quinqueradiata*, ADD91316), 扁舵鲹 (*Auxis thazard*, GU581283), 东方蓝旗鲷 (*Thunnus orientalis*, ABY77970), 花腹鲭 (*Scomber australasicus*, ADD81190), 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, BAB19807), 尼罗罗非鱼—短亚型 (*Oreochromis niloticus-s*, BAB56110), 黄姑鱼 (*Nibea mitsukurii*, ACV32355), 大西洋鳕 (*Gadus morhua*, ADV36250), 金鱼 (*Carassius auratus*, AAX22126), 异育银鲫 (*Cyprinus carpio*, AAL87139), 真鲷 (*Pagrus major*, AB365436), 金鱼 (*Carassius auratus*, AY821684), 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, NP\_001117665), 伊比利亚肋突鳎 (*Pleurodeles waltl*, ABB83368), 刷尾负鼠 (*Trichosurus vulpecula*, ABZ02207), 人 (*Homo sapiens*, AAF72705), 进化树中的数值表示随机进行 1 000 重复计算的步展值 (Bootstrap value), 代表该进化树的可靠性。

### 1.5 *csVasa* 在组织中的表达模式

从性成熟雌性半滑舌鳎收集卵巢, 性成熟雄性半滑舌鳎收集精巢、肝脏、脑、垂体、肠、心、肾脏、脾脏、胃、头肾、鳃、肌肉组织, 提取总 RNA, 经 DNase I 去除基因组 DNA 后, 反转录为 cDNA。根据已得到的 *Vasa* cDNA 全长, 设计基因特异性引物 VF 和 VR (515 bp) 来研究 *Vasa* 在半滑舌鳎各组织中的表达模式, PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60.5  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 24 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。18S rRNA (119 bp) 为内参, 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s, 62  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 23 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应结果, 用凝胶成像系统成像。用 ImageJ 软件计算条带的亮度来测量相对表达量<sup>[22]</sup>。

### 1.6 *csVasa* 在半滑舌鳎繁殖周期中的表达模式

收集 4 月、7 月、10 月和翌年 1 月的性成熟雌性半滑舌鳎的卵巢, 组织学鉴定卵巢发育期,

将卵巢分为核周期、初级卵黄期、囊泡期和退化吸收期 4 个时期<sup>[23]</sup>,研究方法同上。实验设 3 个平行组。数据采用 SPSS 13.0 统计分析软件中的 Duncan 氏法进行数据处理和检验分析,当  $P < 0.05$  时认为差异显著,用 EXCEL 表格生成柱状图,所用数据均用平均数  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示。

### 1.7 *csVasa* 在雄性半滑舌鳎繁殖周期中的表达模式

从性成熟雄性半滑舌鳎收集 3 月、6 月、9 月和 12 月的精巢,组织学方法鉴定精巢发育期。由于 6 月和 9 月采集的样品精巢均处于精子细胞增殖期,故按照采样月份来研究 *Vasa* 在性成熟雄性半滑舌鳎繁殖周期中的表达模式。半滑舌鳎 *Vasa* 基因克隆和表达分析所用引物见表 1。

表 1 半滑舌鳎 *Vasa* 克隆和 mRNA 表达研究所用引物  
Tab.1 Primers used for *C. semilaepis Vasa* cloning and mRNA expression analysis

引物 primer	引物序列 sequence of primer	引物作用 usage
VDF	5'-GCTGGMMGRGAYCTVATGGC-3'	扩增 cDNA 片段
VDR	5'-GGCTCAAAAATRCCARCAT-3'	产物长度: 345 bp
VS3	5'-GCGGCTGATGGACATGATAGAGAGAGG-3'	扩增 3' 末端
VS5	5'-GCTCAACCCAACCTTCTCTCTCTAT-3'	扩增 5' 末端
VF	5'-GACTCCACCGTAAACAACCAC-3'	表达
VR	5-AACAGAGGGATGAAGGCAGT-3	产物长度: 515 bp
18SF	5'-CCTGAGAAAACGGCTACCACATC-3'	扩增内参
18SR	5'-CCAATTACAGGGCTCGAAAG-3'	产物长度: 119 bp
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'	载体引物
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'	

## 2 结果

### 2.1 *csVasa* cDNA 全长序列

克隆得到 *Vasa* (GenBank 登录号: HQ727561) 序列全长 2 602 bp, 其中 5' 非编码区 49 bp, 3' 非编码区 387 bp, 开放阅读框 2 166 bp, 编码 722 个氨基酸。推导的氨基酸序列中包含 DEAD-box 家族特有的 8 个保守基序以及 5 个

RGG 盒和 10 个 RG 重复。未发现该基因的亚型存在。

### 2.2 序列分析和系统进化分析

利用 Blast 分析氨基酸序列发现, *csVasa* 与东方蓝旗鲷的相似性最高 (91%), 丝足鲈 (*Osphronemus goramy*, 90%)、黄鳢 (*Monopterus albus*, 72%) 次之。利用 Clustal X 进行半滑舌鳎 *Vasa* 与其它物种 *Vasa* 的氨基酸序列进行多重对比, 发现半滑舌鳎 *Vasa* 与其它后口动物具有很高的相似性, 共享 *Vasa* 在后口动物中保守的基序, 即: AQTGSGKT、PTREL、GG、TPGR、DEAD、SAT、HRIGRTGR 和 ARGLD 以及 N 端的 5 个 RGG 重复和 10 个 RG 重复。其中 AQTGSGKT 为 ATP 的结合位点; DEAD 为 ATP 发生水解的部位; SAT 为 RNA 解旋基序, HRIGRTGR 为 RNA 结合基序。序列分析见图 1。在半滑舌鳎与其它物种 *Vasa* 的氨基酸序列构建的系统进化树 (图 2) 中, *Vasa* 在昆虫、鱼类、爬行类和哺乳动物各成一个分支, *csVasa* 属于鱼类一支 (方框指示半滑舌鳎 *Vasa*)。

### 2.3 *csVasa* 的组织表达模式

采用 RT-PCR 研究了 *csVasa* 在性成熟半滑舌鳎各组织中的表达模式, 结果表明, 半滑舌鳎 *Vasa* 在精巢和卵巢中表达, 且卵巢中表达量丰富, 在性腺外组织中, 仅观察到在心脏中有微量表达 (图 3)。

### 2.4 *csVasa* 在雌鱼繁殖周期中的表达模式

对 *csVasa* 在雌性半滑舌鳎繁殖周期的表达模式的研究结果表明, *Vasa* 在核周期的表达量最低, *Vasa*/18S 的平均值为 1.004; 随后表达量迅速上升, 在初级卵黄期已明显升高, 到囊泡期达到最高值, 相对比值的平均值为 1.867; 退化吸收期恢复至核周期水平 (图 4)。

### 2.5 *csVasa* 在雄鱼繁殖周期中的表达模式

研究了 *csVasa* 在雄性半滑舌鳎繁殖周期的表达模式, 结果表明在 3 月份 (精母细胞增殖期) 表达量最低, 相对表达量 (*Vasa*/18S) 的平均值为 0.785; 然后在 6、9 月份 (精子细胞增殖期) 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 并在 9 月份达到最高值, 相对表达量的平均值为 1.502; 在 12 月份 (精子成熟期) 表达量下降至最低值, 相对表达量的平均值为 0.542 (图 5)。

```

1  AAATCAAGCTGAAGTTTACCTCAGCTTACACTTCACCAGGCTGTTGAATATGGATGACTGGGAAGAGACGAAAAATGCAGAAGTGGTGTCTGTAATCAGCTGTGCCT
1  M ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ T E N A E V V S V I S C A
108 CAACAGAAGTTCAAGGAACACTTCTGAAAAGATGACAGTCTTGAAAAGAGAGTAGGACAGTGCAGGCGAAATCAAGCTGAAGTTTACCTCAGCTTACACTTCACC
20  S T E G S R E H F W K D D S S G K R A R T V R R N Q A E V Y L S L H F T
215 AGGCTGTGAATATGGATGACTGGGAAGAGACGAAAAATGCAGAAGTGGTGTCTGTAATCAGCTGTGCCTCAACAGAAGTTCAAGGAACACTTCTGAAAAGATGA
56  R L L N M D D W E E T E N A E V V S V I S C A S T E G S R E H F W K D D
322 CAGTTCTGAAAAGAGAGTATGAGAAAAGTAACGGCACTGGAACATTACAGGAACCTCAAGCTTCAACCAAGATTGGGAATCTTCAAGAACAGAGAAGGACAAC
92  S S G K R A D E K S N G T G T I T G T S S F N Q D W E F F K N T E G Q
429 AAGTGGTATTAGAGGAAGAGGACGGCAGAGGATTTGGGAGAGAGACAGAAGTGTTCATGGAGACAGCAATGGATTTGTGAAAGCGAGTTCAGAGGAGTA
127 Q G G I R G R G R G R G F G R E N R S D F N G D S N G F C E S E F R G V
536 AGCCGAGGAGTCAATGGTCCGAGGAGGAAGGAAGAGGCTTACAGCTGGCAGTGAAGGAGGCTCCAGGGGAGGCTCAGAGAAGCGGAGAACAAAGAGGTAG
163 S R G G H G G R G G R G R G F R R G T E G G S R G G F R E D G E Q R G R
643 AGGAGCTTTAGAGGAGTTACCGTGGAAAGGGCGAAAAATACTTTTTCAGAGAAAAGAAAACAAAGAAATTAACAGAGGGATGAAGGAGTGTGACAAAGCCAA
199 G G F R G G Y R G K G E N N F F Q E K E N K E L K Q R D E G S A D K P
750 AAGTCAGTTATCCCTCCAGCCTCGCTGAGGATGAAAACCTCAGTTTGTCTCACTATGAGACTGGAATCAATTTTGACAAGTATGACGACATACTGGTGAACGTC
234 K V S Y I P P A L A E D E N S V F A H Y E T G I N F D K Y D D I L V N V
857 AGTGAACCAACCCGCCACAGGCAATAATGACATTTGAGGAGGCTGCCTGTGGACTCTTTATCCAAAATGTGACAGATCTGGATATGTCAAGCCGACTCCTGT
270 S G T N P P Q A I M T F E E A A L C D S L S K N V S R S G Y V K P T P V
964 ACAGAAGCAGGCATTCATATCTTCTGCTGGCAGAGATCTCATGGCCTGTGCACAGACGGGCTGGAAAAACGGCTGCATTCCTGCTCCCATCCTGCATCAGC
306 Q K H G I P I I S A G R D L M A C A Q T G S G K T A A F L L P I L H Q
1071 TGATGATAGCGGAGCATCATCTTTTTCAGTGAAGTGCAGGAGCCTAAGGCCATTTATGTGGCTCAACAGGGAGCTTATAAACCAGATTTTCTGGAGGCC
341 L M I G G A S S S F F S E L Q E P K A I I V A P T R E L I N Q I F L E A
1178 AGGAAATTTGCCTATGGAACGTGTGTGGTCCAGTGGTGTTCAGGGTGGAGTCAAGTATAGACACCAGTTAGTACCTTAAACAGGGATGTAATGCTCTTGTGG
377 R K F A Y G T V V R P V V V Y G G V S I R H Q V S D L N K G C N V L C G
1285 AACACCAGGGCGGTGATGGACATGATAGAGAGAGAAAGTTGGGTTGAGCAAGGTGCAATACTTTGTTCTGGATGAGGCTGATCGAATTTGGACATGGGCTTCG
413 F P G R L M D M I E R G K V G L S K V Q Y F V L D E A D R M L D M G F
1392 AGCCAGATATGCGCCGCTGGTTCCTCCTCCTGGAATGCCATCAGGGAGGGCGCTCAGACACTGATGTTAGCGCTACCTCCCTGAGGAAATCCAGAAAATTTGCA
448 E P D M R R L V A S P G M P S R E G R Q T L M F S A T F P E E I Q K L A
1499 GCGACTTCTCAAGCCAGACTATCTTCTTGGCTGCGGAATAGTGGTGGAGCTTGCAGTACGCTAGAGCAGCGTTTATCGAAGTTGGCAAGTTCTCAAAGAG
484 A D F L K P D Y L F L A V G I V G G A C S D V E Q T F I E V G K F S K R
1606 GGAACAGCTTCTGATCTTGAAGACATGTGAAATGAGCGCACCATTGTGTTTGGAGAAGAAGACAGCGGATTTATCGCCACATTCCTGTGCAGGAGA
520 E Q L L D L V K T C G N E R T I V F V E K K R Q A D F I A T F L C Q E
1713 ATGTTCAACACCAGCATTATGGGATCGTGGCAGTGGCAGGAGAGCAGGCGCTTAGCAGACTTAAATACGGCAATGTCCAGTCTGGTTGCAACCTCTGTG
555 N V P T T S I H G D R E Q W Q R E Q A L A D F K Y G K C P V L V A T S V
1820 GCAGCCGCGGTCTGGATATTCCTGATGTTGACATGTGGTCAACTTGACCTCCAGGAGCAGTATGATGATGTTACCGCATTGGGAGAACTGGCCGCTGTGG
591 A A R G L D I P D V Q H V V N F D L P G S I D E Y V H R I G R T G R C G
1927 GAACGTGGGTAGAGCGGTGTCTTTCTTGACACAGATGTTGACGGTCACTGTCTCGCCCTGATTTCCATCCTGTCGAAGGCTCAGCAGGAAGTGCCCTCTGGT
627 N V G R A V S F F D T D V D G H L S R P L I S I L S K A Q Q E V P P W
2034 TGGAGCAGTTGGCTTTTAGCAGTGCAGCTCTGGAGGAACTTCAACGCCAACAAAGAACTTTGCTTTTACAGATCCAGGAAGGTCAGCAAGAGGATCATCT
662 L E Q L A F S S A S S G G N F N A N K N N F A F T D S R K G Q Q R G S S
2144 TTTCAAGGCAACTGTGAGAGCCAGGTGACAGCTGTGCTCCAGCTCCAGTGGAGGAGGAAGAAATGGGAGTAGAGAAAATACATGGAGCAGCAGTGCCACAC
698 F Q G N T V Q S Q V T A V L Q P P P ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ *
2248 ATTACCAGTTTAGTGTGTTTTCATTGTTGACGTGTGGAGTTTATCACAGTATTTTGTCTACTGTGAACAAAAAGACAAAAATGTTATAATGTCATGT
2355 AAGATTTGAGATTCATCTGTTGTTTATACCAAAGGTTTTTTTCCCGCAAAAGTAGAAGTGAAGTGAATGACGACAAAAGGGGTAAAAACCACTTCATG
2462 TCAGAGGAGACACCATGGGATTTCTTTATTTTCTGTTTTTGATAAATAATGCATTAATAATGTTAATGCTTGACGATAAGGACCAATAAATGGATGTAAT
2569 CCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

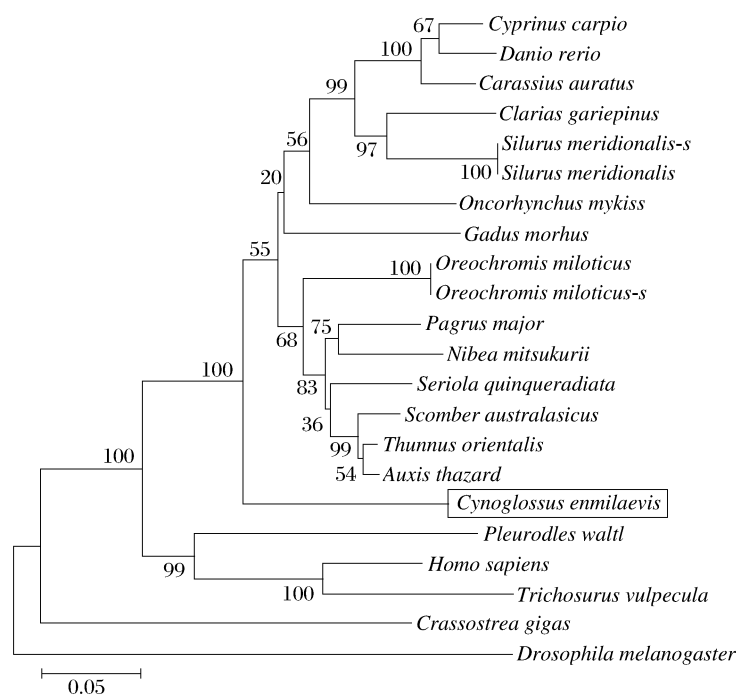
```

图1 半滑舌鲷 *Vasa* cDNA 全长序列和氨基酸序列分析

方框指示 DEAD-box 家族蛋白共有的 8 个保守基序;下划线指示 RG 重复,粗体下划线指示 RGG 重复;圆圈指示 N 末端和 C 末端的酸性氨基酸残基(E 谷氨酸残基,D 天冬氨酸残基)和色氨酸(W)残基。数字中核苷酸序列从 5' 第一个开始(上行),氨基酸序列从起始密码子 M 开始(下行)。

Fig. 1 Complete sequence of *C. semilaevis Vasa* and analysis of deduced amino acid sequence

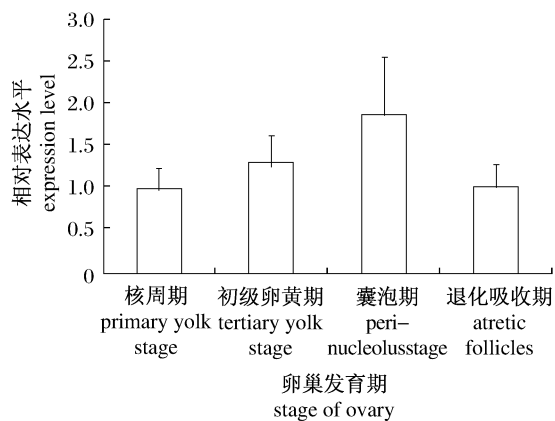
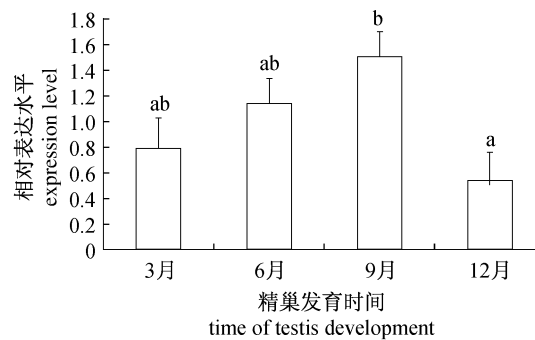
Boxes correspond to the eight conserved motifs of the DEAD-box protein family. ginine-glycine(RG) repeats and arginine-glycine-glycine (RGG) repeats in the N-terminal region are underlined and bold underlined, respectively. Acidic amino acid residues( aspartic acid; D and glutamic acid; E) and tryptophan(W) in the N-terminal and C-terminal regions are shown by inside circles. Numbers indicate the nucleotide position starting at the 5' of the sequence( top line) and the amino acid positions starting at the initial methionine(M, bottom line).

图2 22种物种 *Vasa* 氨基酸序列构建的系统进化树Fig. 2 Phylogenetic tree for 22 kinds of animals *Vasa* amino acid sequences图3 RT-PCR 分析 *csVasa* 在性成熟半滑舌鳎各组织的分布

MK:DNA 分子量标准; T:精巢; O:卵巢; L:肝脏; B:脑; P:垂体; I:肠; K:肾; H:心脏; Sp:脾; St:胃; Hk:头肾; G:鳃; M:肌肉。

Fig. 3 Tissue distribution of *Vasa* expression in adult *C. semilaevis* by RT-PCR

MK:DNA molecular weight marker; T:testis; O:ovary; L:liver; B:brain; P:pituitarium; I:intestine; K:kidney; H:heart; Sp:spleen; St:stomach; Hk:head kidney; G:gill; M:muscle.

图4 繁殖周期中 *Vasa* mRNA 在雌性半滑舌鳎卵巢的表达水平Fig. 4 *Vasa* mRNA expression level in ovary of female *C. semilaevis* reproductive cycle图5 繁殖周期中 *Vasa* mRNA 在雄性半滑舌鳎精巢的表达水平

不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 *Vasa* mRNA expression level in testis of male *C. semilaevis* reproductive cycle

The different letters mean significantly different.

### 3 讨论

*csVasa* 全长为 2 602 bp, 推导的氨基酸序列与东方蓝旗鲷同源性最高(91%), 并含有 DEAD-box 家族蛋白共有的全部 8 个保守基序(motif), 这表明所得序列为目的基因。与其它物种 *Vasa* 相似, 半滑舌鳎 *Vasa* 在非保守区域也具有很多与 RNA 结合有关的结构, 如: N 末端存在 5 个 RGG 盒和 10 个 RG 重复序列、1 个甘氨酸富集区(G-rich); N 末端起始密码子和 C 末端终止密码子附近的色氨酸(W)残基<sup>[24-25]</sup>。C 末端最后 7 个氨基酸残基中有 6 个是酸性氨基酸残基(E)<sup>[11]</sup>。这充分表明, *Vasa* 在进化上非常保守, 这些保守的基序和结构可能对于维持 *Vasa* 蛋白的结构和功能至关重要。

组织表达模式中, *Vasa* 在卵巢和精巢中表达量非常高, 其它组织中仅在心脏中有微量表达。这与该基因在生殖细胞系发育的突出作用相一致<sup>[26]</sup>。然而, *Vasa* 在性腺外的组织也表达, 但表达量很低, 如鼠的肾上腺和中肾组织<sup>[27]</sup>, 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的体细胞<sup>[28-29]</sup>, 性成熟黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)的心脏、肾脏、肌肉和脑<sup>[30]</sup>, 蜜蜂(*Apis mellifera*)的下颚<sup>[31]</sup>和脂肪体<sup>[32]</sup>, 虹鳟的心脏和脑<sup>[33]</sup>, 狼鲈的除性腺外的几乎其它所有组织<sup>[19]</sup>。这表明 *Vasa* 可能通过它的解旋酶活性参与调节与其它组织特异性细胞类型的特化和分化有关的 mRNAs 转录调节<sup>[29]</sup>。

人工养殖半滑舌鳎, 在 4 月卵巢处于核周期, 尚未进入繁殖期; 从 6 月开始, 卵母细胞内开始沉积卵黄颗粒, 处于卵黄生成前期; 10 月, 卵巢大部分处于卵黄发生后期, 少量开始排卵, 此时卵巢处于囊泡期; 翌年 1 月, 卵巢闭锁或退化吸收, 此时繁殖期结束<sup>[34]</sup>。卵巢中 *Vasa* 在核周期的相对表达量最低, 随后相对表达量迅速上升, 在卵黄生成前期已明显升高, 到囊泡期达到最高值, 然后在翌年退化吸收期时恢复到核周期水平。可以看出, *Vasa* 在雌性半滑舌鳎繁殖周期中的表达量与卵巢发育时期密切相关。在革胡子鲈的实时定量表达、罗非鱼和银鲫的原位杂交和人的免疫染色中, *Vasa* 在未成熟的卵细胞中表达量高, 而在成熟卵细胞中表达量相对较低。这可能是因为转录产物广泛扩散增加了成熟卵细胞卵黄蛋白原的积累量<sup>[12, 15, 18, 24]</sup>。这些结果表明, *Vasa* 与卵黄发生密切相关。

人工养殖半滑舌鳎, 在 3 月精巢处于 III 期, 为精

母细胞增殖期; 6 月份, 雄性半滑舌鳎进入繁殖期, 此时精巢处于 IV 期, 为精子细胞增殖期; 8 月份, 启动生精活动; 在 12 月份时精巢发育成熟<sup>[37]</sup>。本研究中, *Vasa* 在精母细胞增殖期的相对表达量较低, 在精子细胞增殖期(6, 9 月)时显著升高, 在精子成熟期下降至很低水平, 这与在革胡子鲈<sup>[18]</sup>中的研究结果一致, 暗示 *Vasa* 在精子发生中有重要作用。罗非鱼的原位杂交中发现, 在精原细胞中信号很强, 初级精母细胞信号强度中等, 而在次级精母细胞、精子细胞和精子中没有检测到信号<sup>[12]</sup>; 然而, 在人和鼠中, *Vasa* 的表达在精子细胞中能观察到<sup>[24, 35]</sup>。在该批半滑舌鳎中, 先前已经对雌雄鱼的雌二醇(E<sub>2</sub>)周年变化进行了研究<sup>[23, 36]</sup>, 雌鱼的 E<sub>2</sub> 周年变化趋势与本研究中 *Vasa* 表达量的变化趋势基本一致, 而雄鱼中二者的变化趋势完全一致。金头鲷中已经证实 E<sub>2</sub> 对 *Vasa* 的表达有刺激作用<sup>[13]</sup>。在狼鲈中的研究结果与本研究相一致<sup>[19, 37]</sup>。

本研究克隆了半滑舌鳎的全长 *Vasa* cDNA, 在鲆鲽类中首次获得该基因, 为从分子水平研究半滑舌鳎 PGC 的起源、迁移和分化提供可靠的分子标记, 也为其它鲆鲽类鱼类 *Vasa* 基因的研究提供参考。另外, 本实验研究了 *Vasa* 在人工养殖的半滑舌鳎的组织表达模式和繁殖周期的表达模式, 推测 *Vasa* 在配子发生中有重要的功能。

#### 参考文献:

- [1] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein-component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases[J]. Cell, 1988, 55(4): 577-587.
- [2] Lasko P F, Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4a[J]. Nature, 1988, 335(6191): 611-617.
- [3] Luking A, Stahl U, Schmidt U. The protein family of RNA helicases[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 33(4): 259-296.
- [4] Extavour C G, Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans[J]. Development, 2003, 130(24): 5869-5884.
- [5] Extavour C G, Pang K, Matus D Q, et al. *Vasa* and *nanos* expression patterns in a sea anemone and the evolution of bilaterian germ cell specification mechanisms[J]. Evolution & Development, 2005, 7(3): 201-215.
- [6] Komiya T, Itoh K, Ikenishi K, et al. Isolation and

- characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis* [J]. *Developmental Biology*, 1994, 162(2):354–363.
- [7] Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T. Universal occurrence of the *vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in Hydra [J]. *Development Genes and Evolution*, 2001, 211(6):299–308.
- [8] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells [J]. *Development*, 1997, 124(16):3157–3165.
- [9] Krøvel A V, Olsen L C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development [J]. *Developmental Biology*, 2004, 271(1):190–197.
- [10] Otani S, Maegawa S, Inoue K, *et al.* The germ cell lineage identified by *vasa*-mRNA during the embryogenesis in goldfish [J]. *Zoological Science*, 2002, 19(5):519–526.
- [11] 陈云贵, 叶鼎, 宋平, 等. 金鱼配子发生中 *vasa* 基因的表达和分布特征 [J]. *动物学研究*, 2005, 26(2):179–183.
- [12] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 99(1–2):139–142.
- [13] Cardinali M, Gioacchini G, Candiani S, *et al.* Hormonal regulation of *vasa*-like messenger RNA expression in the ovary of the marine teleost *Sparus aurata* [J]. *Biology of Reproduction*, 2004, 70(3):737–743.
- [14] 胡重江, 吴凤瑞, 刘智皓, 等. 南方鲇 *Vasa* 基因两种亚型 cDNA 的克隆及其表达 [J]. *动物学报*, 2008, 54(6):1051–1060.
- [15] Xu H, Gui J, Hong Y. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate [J]. *Development Dynamics*, 2005, 233(3):872–882.
- [16] Herpin A, Rohr S, Riedel D, *et al.* Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *BMC Developmental Biology*, 2007(7):3.
- [17] Li C J, Liu L. Identification of a *vasa* homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2010, 157(2):159–166.
- [18] Raghuvveer K, Senthilkumaran B. Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus* [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(1):79–85.
- [19] Blázquez M, González A. Cloning and sequence analysis of a *vasa* homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 170(2):322–333.
- [20] 吕道远, 宋平, 陈云贵, 等. 黄鳝性腺自然逆转过程中 *vasa* 基因的表达分析 [J]. *动物学报*, 2005, 51(3):469–475.
- [21] 陈彩芳, 温海深, 何峰, 等. 程序化设计的简并引物克隆半滑舌鳎 *CYP17* 基因 [J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39(6):1213–1218.
- [22] Ghai S, Monga R. Tissue-specific promoter methylation coincides with *Cyp19* gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta of different stages of gestation [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 169(2):182–189.
- [23] Chen C F, Wen H S, Wang Z P, *et al.* Cloning and expression of P450c17-1 ( $17\alpha$ -hydroxylase 17, 20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2010, 36(4):1001–1012.
- [24] Castrillon D H, Quade B J, Wang T Y, *et al.* The human *VASA* gene is specifically expressed in the germ cell lineage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(17):9585–9590.
- [25] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, *et al.* Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(25):12258–12262.
- [26] Braat A K, Speksnijder J E, Zivkovic D. Germ line development in fishes [J]. *Developmental Biology*, 1999, 43(7):745–760.
- [27] Zamboni L, Upadhyay S. Germ cell differentiation in mouse adrenal glands [J]. *The Journal of*

- Experimental Zoology, 1983, 228(2): 173 – 193.
- [28] Ikenishi K, Tanaka T, Komiya T. Spatio-temporal distribution of the protein of *Xenopus vasa* homologue (*Xenopus vasa*-like gene 1, XVLG1) in embryos [J]. Development, Growth & Differentiation, 1996, 38(5): 527 – 535.
- [29] Ikenishi K, Tanaka T. Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, XVLG1, in oocytes and embryos; the presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells [J]. Development, Growth & Differentiation, 2000, 42(2): 95 – 103.
- [30] Jia R, Nie L W, Wang N, et al. Molecular cloning and expression patterns of the *Vasa* gene from *Rana nigromaculata* (Amphibia: Anura) [J]. Zoologia, 2009, 26(2): 316 – 322.
- [31] Dearden P K. Germ cell development in the honeybee (*Apis mellifera*): *Vasa* and *Nanos* expression [J]. BMC Developmental Biology, 2006, 6: 1 – 14.
- [32] Tanaka E D, Hartfelder K. Sequence and expression pattern of the germ line marker *vasa* in honey bees and stingless bees [J]. Genetics and Molecular Biology, 2009, 32(3): 582 – 593.
- [33] Yoshizaki G, Sakani S, Tominga H, et al. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage [J]. Molecular Reproduction and Development, 2000, 55(4): 364 – 371.
- [34] 陈彩芳, 温海深, 陈晓燕, 等. 人工养殖半滑舌鳎卵巢发育及其产卵类型研究 [J]. 海洋科学, 2010, 34(8): 29 – 34.
- [35] Tanaka S S, Toyooka Y, Akasu R, et al. The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells [J]. Genes & Development, 2000, 14(7): 841 – 953.
- [36] 张霞人. 雌激素受体和雄激素受体在养殖雄性半滑舌鳎繁殖生理中的作用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [37] Papadaki M, Piferrer F, Zanuy S, et al. Growth, sex differentiation and gonad and plasma levels of sex steroids in male and female dominant populations of *Dicentrarchus labrax* obtained through repeated size grading [J]. Fish Biology, 2005, 66(4): 938 – 956.

## Cloning of *Vasa* and expression analysis during the reproductive cycle in *Cynoglossus semilaevis* Günther

ZHANG Yuan-qing, WEN Hai-shen\*, HE Feng, LI Ji-fang, SHI Dan,  
HU Jian, LIU Miao, MU Wei-jie, MA Rui-qin

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The *Vasa* gene encodes a protein of DEAD-box family that is essential for PGCs proliferation. In this study, we characterized the cDNA of *Vasa* and researched its expression in the reproductive cycle of *Cynoglossus semilaevis* through RACE and RT-PCR technology, aiming to clarify its function in gametogenesis of fishes. The length of *Vasa* gene is 2 602 bp and this gene encodes a protein of 722 amino acids. The deduced amino acid sequence contains 8 conserved motifs of DEAD-box family protein, 5 RGG repeats and 10 RG repeats in N-terminal region. Comparisons of the deduced amino acid sequence with those of other vertebrates and invertebrates revealed the highest homology (91%) with *Thunnus orientalis*. *Vasa* was strongly expressed in gonad and little expressed in heart. In the reproductive cycle, the transcript level of *Vasa* gene in the primary yolk stage and tertiary yolk stage is higher than peri-nucleolus stage and atretic follicles in ovary. The transcript level of spermatogenesis stage is obviously higher than that of spermatocyte stage and spermiation stage. These results suggest that *Vasa* gene may play an important role in spermatogenesis and oogenesis during reproductive cycle.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis* Günther; *Vasa*; gene cloning; mRNA expression; reproductive cycle

**Corresponding author:** WEN Hai-shen. E-mail: wenhaishen@ouc.edu.cn