

## 黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因的克隆及表达分析

唐良华<sup>1,2\*</sup>, 苏 敏<sup>1,2</sup>, 吕博彦<sup>1,2</sup>, 詹冰津<sup>1,2</sup>, 池丽影<sup>1,2</sup>, 祝 玲<sup>1,2</sup>, 周 琼<sup>1,2</sup>

(1. 福建师范大学福建省发育与神经生物学重点实验室, 福建 福州 350108;

2. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108)

**摘要:** 为了从分子水平上研究鱼类生殖细胞发育的机制, 首次从重要的经济养殖鱼类——黑脊倒刺鲃中克隆了斑马鱼 *vasa* 的同源基因 *ScVHG*。该 cDNA 长 1 962 bp, 编码 654 个氨基酸, 氨基酸序列中含有 DEAD 蛋白家族特有的 9 个保守结构域。经比对发现, 其编码的蛋白序列与斑马鱼 VASA 蛋白等具有高度的同源性, 与斑马鱼、罗非鱼、虹鳟、银鲫、黄鳝、金鱼、金枪鱼、草鱼的 VASA 蛋白相似度分别为 77%, 77%, 79%, 90%, 74%, 89%, 79% 和 86%。RT-PCR 结果显示: 在成鱼不同的组织中, *ScVHG* 仅在精巢和卵巢中表达。RNA 原位杂交结果进一步表明: 在精子发生中, *ScVHG* 只在精原细胞中表达, 而在后期的精母细胞、精子细胞中均未发现明显的表达; 在卵子发生中, *ScVHG* 在卵原细胞和卵母细胞的各个时相中均有表达, 在卵原细胞中表达最为强烈, 而在随后各时相的卵母细胞中, 阳性信号逐渐减弱。研究认为, 该基因中含有的保守序列、序列的相似性以及该基因在生殖细胞中的特异性表达等结果均表明, 克隆得到的 *ScVHG* 是斑马鱼 *vasa* 的同源基因, 此基因可作为一种有效的分子标记, 用于黑脊倒刺鲃以及其他鱼类生殖细胞发育机制的研究。

**关键词:** 黑脊倒刺鲃; *vasa*; 原位杂交; 生殖细胞

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

黑脊倒刺鲃 (*Spinibarbus caldwelli*), 属鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Barbinae)、倒刺鲃属 (*Spinibarbus*), 分布于福建、广东等地的江河、湖泊、水库中, 在民间具有重要的食用、药用价值以及较高的经济价值<sup>[1-4]</sup>。近年来, 由于江河水质污染、滥捕滥渔等原因, 其自然种质资源日渐衰退; 对其进行批量养殖生产又受到苗种资源的制约。因此, 对其生殖细胞的发育机制进行研究, 对于最终实现大规模人工繁育、促进相关渔业生产的发展, 具有重要的现实意义。

本课题组曾对黑脊倒刺鲃育苗、早期发育、生殖细胞的起源分化等方面作了较为详细的研究<sup>[1-4]</sup>。但是前期的研究多数基于传统组织学的水

平, 难以清晰地阐述其生殖细胞发育的确切机制。为了能从分子水平上更为深入地研究其生殖细胞发育的机制, 首先必须找到一种生殖细胞的分子标记 (molecular marker)。迄今, 在已研究的几种硬骨鱼类中发现 *vasa* 基因只在斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[5-6]</sup>, 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[7]</sup>, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)<sup>[8]</sup>, 青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[9]</sup>, 银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)<sup>[10]</sup>, 金鱼 (*Carassius auratus*)<sup>[10]</sup>, 南方鲇 (*Silurus meridionalis*)<sup>[14]</sup> 等的生殖细胞中表达。*vasa* 基因编码的蛋白是一类 ATP 依赖的 RNA 解旋酶<sup>[11]</sup>, 是 DEAD 蛋白家族中最重要的成员之一; 其基因最早在果蝇中被发现<sup>[12]</sup>, 它在果蝇腹部形成和生殖细胞分化中发挥着重要

收稿日期: 2011-10-28

修回日期: 2012-02-08

资助项目: 国家自然科学基金项目 (81072616); 福建省自然科学基金计划资助项目 (2011J01149); 福建省教育厅科技基金项目 (JA09063)

通讯作者: 唐良华, E-mail: biotlh@fjnu.edu.cn

作用。因此, *vasa* 基因及其编码的蛋白有可能作为黑脊倒刺鲃生殖细胞发育研究的分子标记。

迄今为止, 国内关于鱼类 *vasa* 基因的研究报道<sup>[13-14]</sup>并不太多, 本研究克隆得到黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因 (*Spinibarbus caldwelli vasa* homolog gene, *ScVHG*) 的序列, 并对其在成鱼的不同组织以及精子发生、卵子发生中的表达进行了分析, 为下一步研究黑脊倒刺鲃以及其它鱼类生殖细胞的形成和分化机制等奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

黑脊倒刺鲃成鱼购于福州市洪山桥头水产市场, 体质量约 1 000 g, 解剖取性腺、肝脏、脑、鳃、肌肉、肾和脾等组织。

#### 1.2 主要试剂

Dnase I (RNase Free), RNA 酶抑制剂, DNA Polymerase, Marker 等均购自大连宝生物公司; T7 RNA polymerase, 地高辛标记与检测试剂盒均为罗氏(Roche)公司产品; 胶回收试剂盒购于 QIAGEN 公司; 质粒小量抽提试剂盒, cDNA 第一链合成试剂盒购自 Omega 公司; Trizol 试剂, 引物购自 Invitrogen 公司; DEPC, x-gal, IPTG 购于 BBI 公司; 大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  和载体 pBlueScript KS 由本实验室保存; 其他常规试剂均为分析纯, 购于国药集团公司。

#### 1.3 黑脊倒刺鲃 *ScVHG* 的克隆

取新鲜性腺, 用液氮在研钵中研磨成粉末状, 然后迅速转移至 Trizol 试剂中, 按照说明书步骤提取纯化总 RNA。紫外检测 RNA 产率和纯度, 并电

泳检测 RNA 完整性。接着用 DNase 去除基因组 DNA 后, 按照试剂盒说明书步骤合成 cDNA 第一链。

根据 GenBank 公布的其他鱼类的 *vasa* 基因 cDNA 序列, 设计扩增引物 V<sub>F</sub>、V<sub>R</sub>, 引物序列见表 1。以合成的第一链 cDNA 为模板, 用引物 V<sub>F</sub>、V<sub>R</sub> 扩增 *ScVHG*, 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 然后于凝胶成像系统上分析。

含目的片段的胶段经胶回收试剂盒回收后, 将其克隆到含有 T7 RNA 聚合酶启动子的 pSURE-T 载体中, 常规氯化钙法转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经蓝白斑筛选, 将阳性克隆送至上海英韦创津 (Invitrogen) 公司测序。

#### 1.4 序列及系统进化分析

将测序结果与 GenBank 核酸数据库中的已知序列作 BlastX 同源性分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 确定开放阅读框序列并预测编码氨基酸序列。

将预测的编码氨基酸序列与 GenBank 数据库中的已知序列作 BlastP 同源性比对和相似性搜索。使用 ClustalX 1.83 程序对 GenBank 中已报道的 VASA 蛋白序列和本研究得到的预测氨基酸序列进行多序列比对, GeneDOC 程序输出比对结果。

采用多序列比对软件 ClustalX 1.83 程序和进化树构建软件 MEGA 4.0 以邻位相连 (Neighbor-Joining, NJ) 法构建系统进化树, 并做 Bootstrap 检验, Bootstrap 值取 100, 分析计算各节点支持率。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因 gene	引物 primer	序列(5'→3') sequence	产物长度/bp length of the products	
<i><math>\beta</math>-actin</i>	$\beta_F$	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	226	
	$\beta_R$	TCCACAICTGCTGGAAGGTG		
<i>vasa</i>	V <sub>F</sub>	ATGGCTTGCTCACAC	1926	
	V <sub>R</sub>	GCTGTCTGCTTCATCCA		
	V <sub>F-RT</sub>	CATCCAGAACCAAATACCG		619
	V <sub>R-RT</sub>	GGACCCAAGGTTGTCTATG		
正义探针模板 template of sense probe	V <sub>SF</sub>	<u>CGGGATCC</u> CATCCAGAACCAAATAC	619	
	V <sub>SR</sub>	<u>CCCAAGCTT</u> GGACCCAAGGTTGTCT		
反义探针模板 template of antisense probe	V <sub>AF</sub>	<u>CCCAAGCTT</u> CATCCAGAACCAAATA	619	
	V <sub>AR</sub>	<u>CGGGATCC</u> GGACCCAAGGTTGTCT		

### 1.5 *ScVHG* 在黑脊倒刺鲃不同组织中的表达分析

选取精巢、卵巢、肝脏、脑、鳃、肌肉、肾脏和脾等 8 种组织, 提取各组织中的总 RNA, 经 DNase I 去除基因组 DNA 后, 分别逆转录为第一链 cDNA, 以  $\beta$ -actin 基因作为内参, 来检测 *vasa* 基因在黑脊倒刺鲃不同组织中的表达情况(引物  $\beta_F$ 、 $\beta_R$ 、 $V_{F-RT}$ 、 $V_{R-RT}$  序列如表 1 所示)。扩增条件为 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L 扩增产物, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 原位杂交

**原位杂交探针制备** 以重组质粒 pSURE-*ScVHG* 为模板, 用特异引物  $V_{SF}$ 、 $V_{SR}$  和  $V_{AF}$ 、 $V_{AR}$  分别扩增正义探针模板及反义探针模板(引物序列如表 1 所示), 连接到 pBlueScript II KS 载体上, 获得正义探针模板质粒 pblue-*ScVHG*-s 和反义探针模板质粒 pblue-*ScVHG*-a。

分别提取正义探针模板质粒 pblue-*ScVHG*-s 和反义探针模板质粒 pblue-*ScVHG*-a, 线性化后作为体外转录的模板。采用地高辛标记系统, 利用 T7 RNA 聚合酶转录 cRNA 正义链和反义链探针。

**组织原位杂交** 用焦碳酸二乙酯(DEPC)水处理实验所需的工具及器皿, 并高压消毒; 实验所需试剂均用去 RNase 水配制。简要步骤如下: 取新鲜性腺迅速投入 4% 多聚甲醛(PFA)中, 4 °C 下固定 16 h 后常规方法进行石蜡切片, 厚度为 7  $\mu$ m, 展片贴片后, 60 °C 烤片过夜。次日石蜡切片经脱蜡、复水后, 蛋白酶 K 室温消化 12 min, 用甘氨酸抑制蛋白酶 K 活性后, 0.25% 乙酰酐溶液乙酰化; 之后, 切片在 66% 甲酰胺/2 $\times$ SSC 预杂交液中 60 °C 预杂交 1 h, 加入地高辛标记的浓度为 2~6 ng/ $\mu$ L 的探针, 60 °C 下杂交过夜。第 3 天切片经 5 $\times$ SSC 漂洗、50% 的甲酰胺洗脱后, 用 RNaseA 和 RNaseT 在 37 °C 下消化未杂交结合的探针; 然后用封闭剂 Buffer I (0.1 mol/L 马来酸, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5) 洗涤 5 min, 封闭剂 Buffer II (含 1% BSA 和 2% blocking solution) 室温封阻至少 1 h; 最后加入抗 DIG 抗体, 4 °C 避光过夜。第 4 天在洗脱液(0.1 mol/L Tris-HCl (pH 9.5), 0.05 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 中分 10 次洗去多余抗体, 前 8 次和第 10 次各 1 h, 第 9 次过夜漂洗, 最后两次洗脱液中应含有终浓度为 2 mmol/L 的左旋咪唑。第 5 天漂洗后

加入显色液 NBT/BCIP, 室温避光显色。待显色完全后, 直接将切片放入梯度乙醇中终止显色反应, 最终用中性树胶封片。

## 2 结果

### 2.1 黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因的克隆

使用 Trizol 试剂分离得到黑脊倒刺鲃精巢组织的总 RNA; 以其为模板, 使用 Oligo dT 引物, 反转录出第一条链, 再以反转录出的 cDNA 为模板, 用引物  $V_S$  和  $V_A$ , 经过 PCR 扩增得到黑脊倒刺鲃 *ScVHG* 的开放阅读框(图 1)。得到的片段大小和预期一致, 约为 2 000 bp。该目的片段克隆到 pSURE-T 载体中, 常规氯化钙法转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。

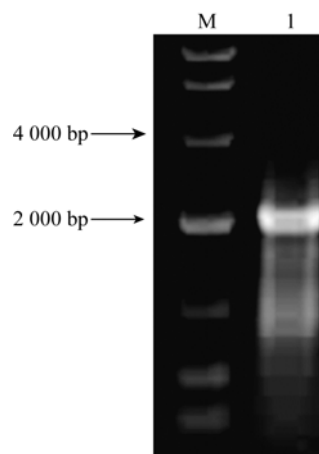


图 1 PCR 扩增黑脊倒刺鲃 *ScVHG*  
M. DL10000™ 分子量标记; L. *ScVHG* 扩增产物。

Fig. 1 PCR amplification of *ScVHG* in *S. caldwelli*  
M. DL10000™ DNA Marker; L. PCR product of *ScVHG*.

### 2.2 *ScVHG* 核苷酸序列和氨基酸序列特征

测序结果表明, 黑脊倒刺鲃中 *vasa* 同源基因的开放阅读框长 1962 bp, 编码 654 个氨基酸。通过该基因推导得到, 氨基酸序列含有 DEAD 蛋白家族所有的 9 个保守结构域(图 2): xYxxPTPVQ, AQTGSGKTA, PTRELINQ, TPGR, DEAD, SAT, xVfVETK, RGLD, HRIGRTGR 以及 GG 重复序列<sup>[15]</sup>。其中 xYxxPTPVQ 又称作 Q 框, 是最近几年发现的又一保守区域<sup>[16]</sup>。ARKF 框仅在 DEAD 蛋白家族中的 VASA 和 PL10 蛋白中发现<sup>[17]</sup>。

### 2.3 序列比对和系统进化分析

与 GenBank 核酸数据库中已知的其他序列一起, 进行 BlastX 分析, 发现黑脊倒刺鲃 *ScVHG* 与其它物种的 *vasa* 基因, 特别是与鱼类的 *vasa* 基因有很高的相似性。*ScVHG* 序列推导出的氨基酸序

```

MDDWEEDQGPVVSCRS GFDVDGSSWKTTA AgdgfrggrggsrggrggfRNTFKSET
DENGNDegwkgeqgrggrggrgfc dgGSEETGRRFGRENDEngtdegwkggegrggrg
frggfrdgggdeetGKrgfgrggrfrgRNEEVFSKASTADKPDQEAGENAGPKVVYV ppppp
eeESSIFSHYATGINFDKYDDILVDVSGSNPPKAIMTFDEAGLCESLRKNVTKS[G
YVKPTPVQ]KYGIPIISAGRDLMAC[AQTGSGKTA]AFLLPILQRLMADGVAASKF
SEVQPEAIIIVAPTRELINQIYLE ARKFAYGTCVVRPVVVY GGINTGYTIREVLK
GCNVLCG[TPGR]LLDIIGRGKVGLSKLRYLVL[DEAD]RMLDMGFEPDMRKLVG
SPGMPSKEDRQTLMF[SAT]YPEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQ
TIVQVDQYSKRDQLLEVLRATGNER[TMVFVETK]RSADFIATFLCQEKISTTSIH
GDREQREREKALSDFRGTGQCPVLVATSVAARGLDIEQVQHVVNFDLPSSIDEY
V[HRIGRTGR]CGNIGRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQQEVPKWLEEIAFG
AHGTTGFNPRGKVFASDTDRKGGSFKTDEpprasapsaaaADDEEWE

```

图 2 *ScVHG* 基因编码的氨基酸序列

DEAD-box 家族蛋白的保守结构域用黑色框标出; 阴影部分为色氨酸; N 末端 RGG 重复、ARKF 和 GG doublet 均用下划线标出; 小写字母显示的是含有 RG 和 RGG 重复序列的甘氨酸富集区。

Fig. 2 Deduced amino acid sequence of *ScVHG*

The well-conserved motifs of the DEAD-box protein family are boxed in black. Tryptophan is shaded. RGG repeats, ARKF motifs and GG doublet in the N-terminal are underlined. Lower-case letters show the glycine-rich region.

列, 经 GenBank 数据库的 BlastP 同源相似性搜索发现: 其与斑马鱼、罗非鱼、虹鳟、银鲫、黄鳝(*Monopterus albus*)、金鱼、太平洋黑鲷(*Thunnus orientalis*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的 VASA 蛋白有很高的相似性(图 3), 相似度分别为 77%, 77%, 79%, 90%, 74%, 89%, 79%, 86%。序列比对的结果还表明, *vasa* 基因序列在硬骨鱼中是相当保守的。

黑脊倒刺鲃 VASA 蛋白和银鲫的进化关系最近(图 4), 首先聚在一起, 然后二者依次同鲤、斑马鱼的 VASA 蛋白汇合构成了 VASA 蛋白的一个大分支。可见, 黑脊倒刺鲃 VASA 蛋白的进化地位与其物种的生物学分类地位一致。

2.4 *ScVHG* 在黑脊倒刺鲃不同组织中的表达

为进一步确认 *vasa* 同源基因在黑脊倒刺鲃不同组织中的表达情况, 本研究应用引物  $V_{F-RT}$  和  $V_{R-RT}$ , 分别以精巢、卵巢、肝脏、脑、鳃、肌肉、肠、脾的 cDNA 为模板进行扩增, 通过 RT-PCR 技术分析 *vasa* 基因在不同组织中的表达分布状况。为保证模板量相同, 使用黑脊倒刺鲃的  $\beta$ -actin 基因作为内参。结果表明, 在卵巢和精巢中, *vasa* 基因的 mRNA 均有特异的表达, 而且其在卵巢中的表达要显著强于在精巢中的表达; 但在黑脊倒刺鲃的其它器官组织, 如肝脏、脑、鳃、肌肉、肠、脾中则检测不到其表达的信号(图 5)。

2.5 原位杂交法检测 *ScVHG* mRNA 在黑脊倒刺鲃组织中的表达

利用 RNA 原位杂交技术, 检测 *vasa* mRNA 在

黑脊倒刺鲃性腺组织及配子发育中的表达情况。结果表明: 在精子发生中, *vasa* mRNA 仅在精原细胞中有较强的表达, 而在精母细胞、精子细胞、精子中均未发现明显的阳性信号(图版 , 图版 )。而在卵子发生中, *vasa* mRNA 在卵原细胞中的杂交信号最强, 而在 、 等时相的卵母细胞中, *vasa* mRNA 的杂交信号明显减弱, 最终定位于细胞的外层区域。

3 讨论

*vasa* 蛋白是 DEAD 蛋白家族的一员<sup>[18]</sup>, 而且具有 RNA 解旋酶活性。本实验成功克隆出黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因(*ScVHG*)的开放阅读框(1 962 bp); 根据此序列推导出的氨基酸序列含有 DEAD 蛋白家族所有的 9 个保守结构域<sup>[19]</sup>。其中, AQTGSGKTA 序列位于蛋白质 N 端第 260~269 位, 该区域是 ATP-A 结构域, 是 ATP 的结合位点, 与 ATP 酶和解旋酶活性密切相关; DEAD 序列位于 374~378 位, 该区域是 ATP-B 结构域<sup>[20]</sup>, 是 ATP 的水解位点, 这一区域是 DEAD 蛋白家族中最为保守区域, 在 VASA、PL10 和 P68 亚蛋白家族均保守存在<sup>[21]</sup>。除此之外, 在其 N 端还含有 16 个 RG(arginine-glycine)重复序列和 9 个 RGG (arginine-glycine-glycine)重复序列, 这些与其他种类中发现的 VASA 同源蛋白的标志性特征一致。上述含有多个重复序列的甘氨酸富集区(G-rich region), 与单链核酸的结合有关, 而这正是 RNA 解



<i>C. gibelio</i>	401	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>C. arassius</i>	401	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>S. caldwelli</i>	354	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>C. idellus</i>	370	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>D. rerio</i>	414	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>O. mykiss</i>	348	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA
<i>O. niloticus</i>	344	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKENRQTLMFSA
<i>T. orientalis</i>	345	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKENRQTLMFSA
<i>M. albus</i>	329	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKENRQTLMFSA
consensus	421	RLLDIIGRGKVGLSKLRYLVLDEADRMLDMGFEPDMRKLVGSPGMPGSKEDRQTLMFSA

		ATP-B
<i>C. gibelio</i>	461	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>C. arassius</i>	461	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>S. caldwelli</i>	414	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>C. idellus</i>	430	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>D. rerio</i>	474	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>O. mykiss</i>	408	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>O. niloticus</i>	404	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>T. orientalis</i>	405	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
<i>M. albus</i>	389	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM
consensus	481	PEDIQRMAADFLKVDYIFLAVGVVGGACSDVEQTIIVQVDQYSKRDQLLDLLRSTGTERTM

<i>C. gibelio</i>	521	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>C. arassius</i>	521	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>S. caldwelli</i>	474	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>C. idellus</i>	490	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>D. rerio</i>	534	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>O. mykiss</i>	468	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>O. niloticus</i>	464	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>T. orientalis</i>	465	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
<i>M. albus</i>	449	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL
consensus	541	VFVETKRSADFIATFLCQEKISTTSIHGDREQREREKALSDFRTGQCPVLVATSVAARGL

<i>C. gibelio</i>	581	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>C. arassius</i>	581	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>S. caldwelli</i>	534	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>C. idellus</i>	550	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>D. rerio</i>	594	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>O. mykiss</i>	528	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>O. niloticus</i>	524	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>T. orientalis</i>	525	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
<i>M. albus</i>	509	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ
consensus	601	DIEVQHVVNFDLPSIDIEYVHRIGRTGRCGNI GRAVSFFNPESDTPLARSLVKVLSGAQ

<i>C. gibelio</i>	641	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>C. arassius</i>	641	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>S. caldwelli</i>	594	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>C. idellus</i>	610	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>D. rerio</i>	654	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>O. mykiss</i>	588	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>O. niloticus</i>	584	QEVPSWLEEFAFSGHSPSGFNPPKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>T. orientalis</i>	585	QEVPSWLEEFAFSGHSPSGFNPPKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
<i>M. albus</i>	569	QEVPSWLEEFAFSGHSPSGFNPPKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA
consensus	661	QEVPKWLEEIFAFSAHGTTGFNPRGKVFASDTTRKG---GSFKTDEPPR--ASAPTPAAAA

图 3 VASA 蛋白氨基酸序列比对分析  
 Fig. 3 Comparison of the deduced amino acid sequences of VASA proteins

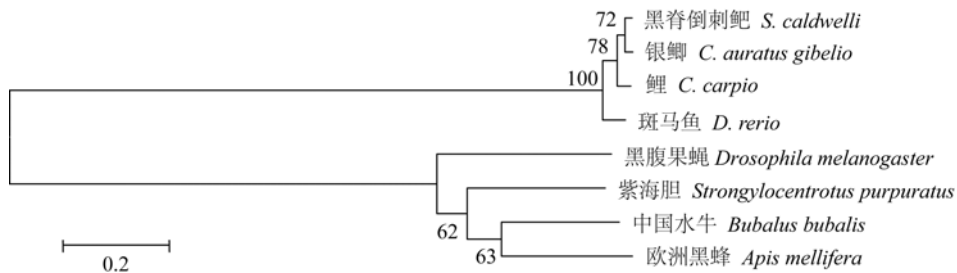


图 4 VASA 蛋白的系统进化树

数字代表各分支的置信度。

Fig. 4 Phylogenetic analysis of the VASA proteins

Numbers indicates the confidence level of each branch.

旋酶的重要特征。本研究得到的基因序列所编码的蛋白质应是属于 DEAD 蛋白家族, 且具有 RNA 解旋酶的活性。系统进化树的分析进一步表明, 此

基因为 *vasa* 同源基因。

本研究结果表明, 黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因只能特异地在成鱼的精巢和卵巢中表达, 而不在其

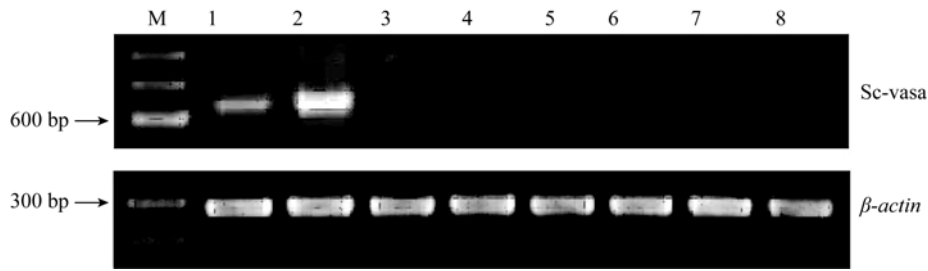


图 5 *ScVHG* 在不同组织中的 RT-PCR 表达分析

M. 150 bp DNA Ladder Marker; 1. 精巢; 2. 卵巢; 3. 肝脏; 4. 脑; 5. 鳃; 6. 肌肉; 7. 肾; 8. 脾。

Fig. 5 RT-PCR analysis of *ScVHG* expression in different tissues

1. testis; 2. ovary; 3. liver; 4. brain; 5. gill; 6. muscle; 7. kidney; 8. spleen.

他的器官、组织中表达。原位杂交的结果进一步表明：在精子发生过程中，*vasa* mRNA 仅在精原细胞中有较强的表达，而在精母细胞、精子细胞、精子中均未发现明显的阳性信号。这说明 *vasa* 基因可能仅在精子发生的初期起着重要作用。在小鼠精子发生的试验中，如果将 *vasa* 基因敲除，精子发生会在第一次减数分裂前期的偶线期被终止<sup>[22]</sup>。可见，*vasa* 基因在小鼠精子发生的早期起着重要作用。在黑脊倒刺鲃卵子发生中，*vasa* mRNA 在卵原细胞中阳性信号最强，而在 、 等时相的卵母细胞中，*vasa* mRNA 的杂交信号明显减弱，并最终定位于细胞的外层区域。造成这一现象的原因可能是随着卵子发生的进程，卵巢中各时相生殖细胞的体积不断增大，可能导致 *vasa* mRNA 在细胞中的相对密度降低；与此同时，*vasa* mRNA 的转录速度也可能下降并逐渐中止。最终，存在于成熟卵子中的 *vasa* mRNA，作为母源性遗传物质，通过受精卵被带入新生的个体中。有研究者发现，*vasa* 基因敲除的小鼠，其自身卵子发生的进程并未受到影响<sup>[22]</sup>。上述结果表明，*vasa* 基因可能与新生个体中原始生殖细胞(PGCs)的形成、迁移和分化等过程密切相关。

近期，Okutsu 等<sup>[23]</sup>利用精原细胞移植技术，成功地在鲈中得到了蓝鳍金枪鱼的配子。这项技术应用的关键在于能够分选和得到高浓度的精原细胞，而精原细胞等生殖细胞的分选则需要一个可靠的分子标记。黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因的克隆为应用上述技术及黑脊倒刺鲃人工育苗技术的发展奠定了基础。

*vasa* 基因最早是在果蝇中被发现，它作为一种母源效应基因在果蝇腹部形成和生殖细胞分化

中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。本研究克隆得到的 *vasa* 基因的序列极为保守；在黑脊倒刺鲃中的表达模式也与其他硬骨鱼乃至其他生物的研究结果十分相近；而且，*vasa* 基因及其蛋白产物还是不同种类生物生殖细胞中生殖质(germ plasm)的重要组成成分。因此，推测 *vasa* 基因在鱼类生殖细胞发育的调控过程中起着关键作用；作为一种母源性基因，*vasa* 基因还可能与子代原始生殖细胞的形成、迁移、分化等发育过程密切相关，其中相关的调控机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 尤永隆, 林丹军, 苏敏. 黑脊倒刺鲃卵子发生中生殖质的产生[J]. 动物学报, 2004, 50(2): 231-239.
- [2] 苏敏, 唐良华, 刘雅真, 等. 黑脊倒刺鲃原生殖细胞起源和迁移的研究[J]. 福建师范大学学报, 2009, 25(5): 81-85.
- [3] 林丹军, 尤永隆, 苏敏. 黑脊倒刺鲃精巢结构和精子发生的研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 563-568.
- [4] 苏敏, 林丹军, 尤永隆, 等. 黑脊倒刺鲃性腺早期分化的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 62-66.
- [5] 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.
- [6] Olsen L C, Aasland R, Fjose A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells[J]. Mechanisms of Development, 1997, 66(1-2): 95-105.
- [7] Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga 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.
- [8] 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.
- [9] Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, *et al.* The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. Development Growth & Differentiation, 2000, 42(4): 317-326.
- [10] 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]. Developmental Dynamics, 2005, 233(3): 872-882.
- [11] Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P. Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities[J]. Development, 1994, 120(5): 1201-1211.
- [12] Schupbach T, Wieschaus E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of Drosophila[J]. Developmental Biology, 1986, 113(2): 443-448.
- [13] 徐红艳, 彭金霞, 桂建芳, 等. 银鲫种系细胞标记分子 Vasa: cDNA 克隆及其抗体制备[J]. 动物学报, 2005, 51(4): 732-742.
- [14] 胡重江, 吴风瑞, 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] Cordin O, Banroques J, Tanner N K, *et al.* The DEAD-box protein family of RNA helicases[J]. Gene, 2006, 367: 17-37.
- [16] Cordin O, Tanner N K, Doère M, *et al.* The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity[J]. EMBO Journal, 2004, 23(13): 2478-2487.
- [17] Chang C, Dearden P, Akam M. Germ line development in the grasshopper *Schistocerca gregaria*: vasa as a marker[J]. Developmental Biology, 2002, 252(1): 100-118.
- [18] Benz J, Trachsel H, Baumann U. Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*-the prototype of the DEAD box protein family[J]. Structure, 1999, 7(6): 671-679.
- [19] 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 helicase[J]. Cell, 1988, 55(4): 577-587.
- [20] Linder P, Lasko P F, Ashburner M, *et al.* Birth of the D-E-A-D box[J]. Nature, 1989, 337(6203): 121-122.
- [21] Pause A, Sonenberg N. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: The mammalian translation initiation factor eIF-4A[J]. EMBO Journal, 1992, 11(7): 2643-2654.
- [22] 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): 841-853.
- [23] Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, *et al.* Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation[J]. Journal of Reproduction and Development, 2006, 52(6): 685-693.



## cDNA cloning and expression analysis of a vasa-like gene in *Spinibarbus caldwelli*

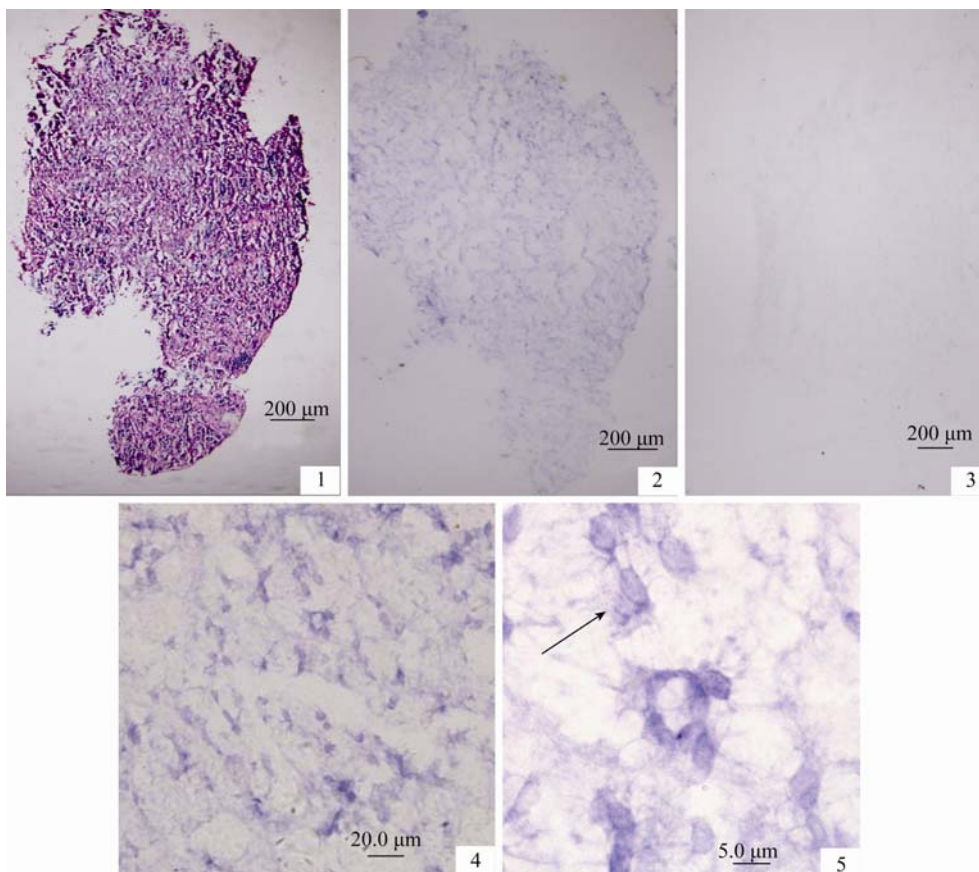
TANG Liang-hua<sup>1,2\*</sup>, SU Min<sup>1,2</sup>, LÜ Bo-yan<sup>1,2</sup>, ZHAN Bing-jin<sup>1,2</sup>,  
CHI Li-ying<sup>1,2</sup>, ZHU Ling<sup>1,2</sup>, ZHOU Qiong<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Developmental and Neuro Biology of Fujian Province, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China;  
2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** In order to interpret the development mechanism of fish germ cells at a molecular level, a *Spinibarbus caldwelli* homolog of the zebrafish *vasa* gene, *ScVHG* (*S. caldwelli vasa* homolog gene), was cloned and characterized for use as a molecular marker for germ cells in this species. Analysis of the nucleotide sequence revealed that *ScVHG* comprises an open reading frame of 1 932 bps encoding 644 amino acids. The deduced amino acid sequence contained nine conserved motifs belonging to the DEAD-box protein family. The *S. caldwelli* VASA protein sequence showed high similarity to that of zebrafish (77%), *Oreochromis niloticus* (77%), *Oncorhynchus mykiss* (79%), *Carassius auratus gibelio* (90%), *Monopterus albus* (74%), *Carassius auratus* (89%), *Thunnus orientalis* (79%) and *Ctenopharyngodon idellus* (86%). In adult tissues, the *ScVHG* transcripts were specifically detected in ovary and testis. *In situ* hybridization analysis showed that *ScVHG* messenger RNA (mRNA) was detected in spermatogonia, but not in spermatocytes, spermatoblasts and sperms; During oogenesis, *ScVHG* mRNA was detected in all time phases from oogonia to oocytes. The earlier phase of oogenesis, the more *ScVHG* mRNA molecules were detected. The positive signals of *ScVHG* mRNA gradually weakened in the late phase of oocytes and finally these signals gathered round the cell edge. Consequently, consensus sequences, sequence similarity, and specific localization of *ScVHG* mRNA in the germ cells all suggest that *ScVHG* is the *S. caldwelli* homolog of the zebrafish *vasa*. Further, *ScVHG* can be used as a molecular marker for *S. caldwelli* germ cells.

**Key words:** *Spinibarbus caldwelli*; *vasa*; *in situ* hybridization analysis; germ cell

**Corresponding author:** TANG Liang-hua. E-mail: biotlh@fjnu.edu.cn

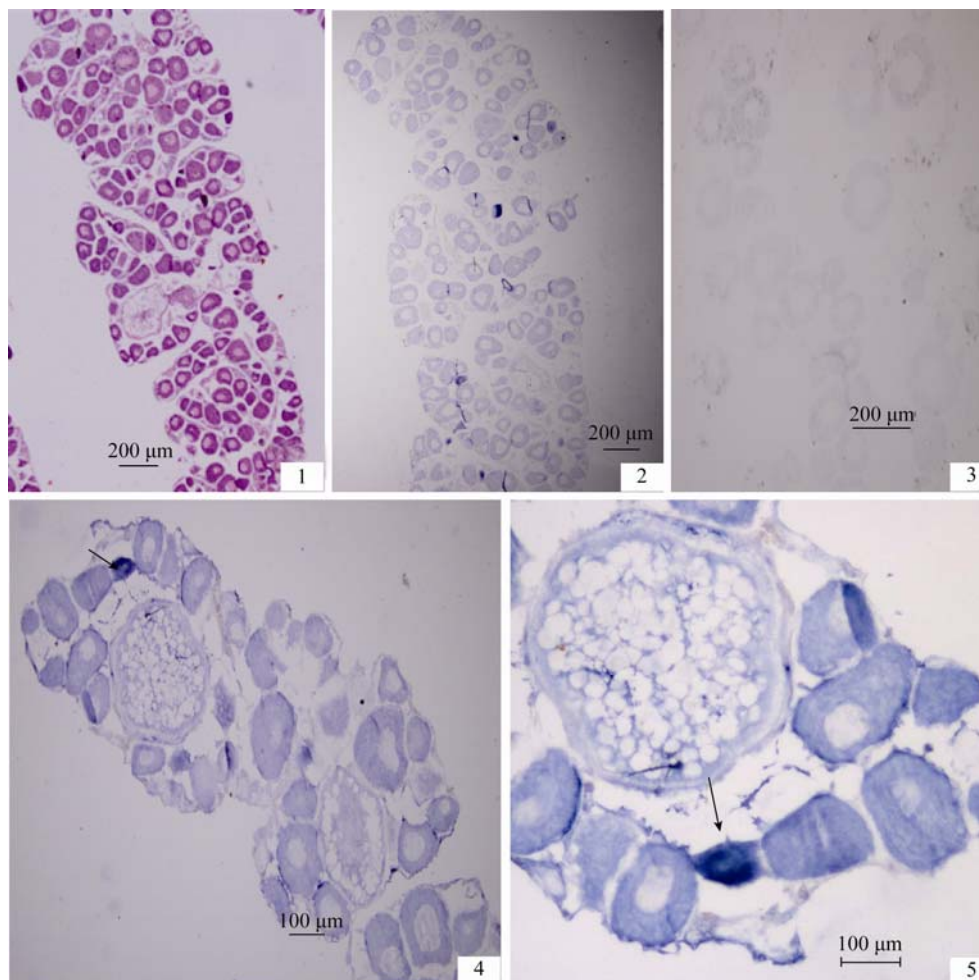


图版 黑脊倒刺鲃 *vasa* (*ScVHG*)在精巢中的表达

1. H.E 染色的组织切片; 2, 4, 5. 与反义探针杂交的组织切片, 其中可见 *vasa* mRNA 在精原细胞中特异地表达; 3. 为与正义探针杂交的组织切片, 正义探针杂交的切片中没有发现特异性的染色。4. 图(2)下半部的放大; 5.图(4)上半部的放大, 黑箭头所指的是精原细胞。

**Plate *vasa* homolog expression in testis**

1. Sequential sections stained with H. E; 2, 4, 5. hybridized with an antisense; sense (3) *vasa* probe. No unspecific staining is observed with the sense probe. The signal of *vasa* mRNA is specifically expressed in spermatogonia. 4 is high magnification of the inset in the lower region of (2), and (5) is high magnification of the inset in the upper region of (4). Black arrow shows spermatogonium(5).



图版 黑脊倒刺鲃 *vasa* (*ScVHG*)在卵巢中的表达

1. H. E 染色的组织切片; 2, 4, 5. 与反义探针杂交的组织切片, 其中发现 *vasa* mRNA 能在卵原细胞及卵母细胞中特异性地表达; 3. 与正义探针杂交的组织切片, 正义探针杂交的切片中没有发现特异性地染色。4. 图 2 局部的放大; 5. 图 4 局部的放大。图中黑箭头所指是卵原细胞。

**Plate *vasa* homolog expression in ovary**

1. Sequential sections stained with H. E. (1) and hybridized with an antisense (2, 4, 5) and sense (3) *vasa* probe. No unspecific staining is observed with the sense probe. The signal *vasa* mRNA is specifically expressed in the oogonia and oocytes. (4) is high magnification of the inset in (2), and (5) is high magnification of the inset in (4). Black arrow shows oogonium(4, 5).