

斑节对虾性腺差异表达基因的筛选

陈亮^{1,2}, 黄建华¹, 张殿昌¹, 苏天凤¹, 江世贵^{1*}

(1 中国水产科学研究院南海水产研究所,农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室,广东 广州 510300;
2. 广东海洋大学水产学院,广东 湛江 524088)

摘要:以池塘养殖 250 日龄的斑节对虾性腺组织为材料,利用 mRNA 差异显示(differential display, DD)筛选性腺差异表达基因,获得 173 条雌、雄性腺差异表达片段。随机选取 44 条差异片段进行回收、克隆、测序及 Real-time RT-PCR 验证,最终获得 10 条阳性差异表达片段,其中 OA7-1、OA7-2、OG8-1、OG8-2、OC1-3、OC4-2、OC8 在卵巢中表达量极显著($P < 0.01$)高于精巢, TG6-3、TG8 在精巢中表达量极显著($P < 0.01$)高于卵巢, TC1 为精巢特异表达片段。序列分析表明 OA7-2 为脱氧尿嘧啶三磷酸核苷酸水解酶(dUTPase) (E 值 6e-54); OG8-1 为真核细胞翻译起始因子 3 亚单位 4 (eIF-3 delta) (E 值 9e-58); OC1-3 为未命名蛋白产物(unnamed protein product) (E 值 2e-17); OC4-2 为 60 S 核糖体蛋白 L7(RPL7) (E 值 6e-40); OC8 为 60 S 核糖体蛋白 L3(RPL3) (E 值 5e-36); OA7-1、OG8-2 和 TC1 与 BLASTx 比对同源性较低($10^{-4} < E \text{ 值} < 10$); TG6-3 和 TG8 未检索到同源序列(E 值 > 10),为新的 EST 序列。对 TC1 转录水平分析表明其在精巢中表达,在卵巢及雌、雄性个体的眼柄神经节、大脑组织、肝胰腺、肌肉中均不表达,雌、雄个体基因组 DNA 均能扩增出 TC1 片段,推测 TC1 可能为一条由转录水平调控参与精子发生及繁殖相关的重要基因。对精巢表达量远高于卵巢的差异片段 TG6-3 进行雌、雄个体不同组织转录水平的对比分析发现,其在眼柄神经节组织中不表达,在雌性脑组织中不表达而在雄性脑组织中表达且在性腺组织中表达水平最高,表明 TG6-3 有可能为一条参与斑节对虾性腺发育调控的基因,为进一步阐明对虾性腺发育的分子调控机制提供了有价值的信息。

关键词:斑节对虾;性腺;差异显示;差异片段

中图分类号:Q 785;S 917

文献标识码:A

对虾存在雌、雄生长和性腺发育不同步现象,雄性个体发育及性成熟明显早于雌性。池塘养殖的斑节对虾,2 月龄后的雌虾生长速度快于雄虾,雌虾 260 日龄左右达到性成熟而雄虾则为 160 日龄左右^[1]。人工养殖的雄虾性腺能自然成熟且精子质量与海捕的野生虾没有差异^[2],可以用作育苗的亲本,而雌性性腺的发育则停留在 I 期,须通过人工催熟的办法,如去除单侧眼柄^[3],注射激素^[4-5],投喂优质饵料或营养强化添加剂^[6-7]等措施以启动其卵巢的后续发育,才能成熟、产

卵,上述人工催熟方法在生产实践中往往不如预期的催熟效果理想^[8]。目前,亲虾的人工催熟仍沿用传统的眼柄去除手术,以去除由眼柄 X 器官—窦腺复合体(X-organ sinus gland complex)分泌的性腺抑制激素(gonad inhibiting hormone, GIH),但这种方法有不少弊端。在养殖中发现,斑节对虾眼柄去除后,常导致亲虾大量死亡,所产卵通常只有第一、二批次质量较好,孵化率较高,幼体发育较为正常;而此后批次的卵质量较差,孵化率较低,幼体发育较差,育成率低甚至为零。在

收稿日期:2009-02-12 修回日期:2009-06-18

资助项目:国家自然科学基金项目(NSFC40976101);国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA10A406);“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD01A13-2);公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-042);广东省自然科学基金项目(7003894);广东省科技计划项目(2006A20204001,2007A020400001)

通讯作者:江世贵, E-mail:jiangsg@21cn.com

人们对对虾性腺发育调控机制知之甚少的情况下,选择眼柄去除等人工催熟技术实属无奈之举,探究对虾性腺发育调控机制势在必行。从分子水平认识斑节对虾性腺发育调控机制,以期建立对虾性腺发育精确调控新技术,已成为当前研究热点。

关于对虾性腺发育的分子作用机制的研究,还处于初始阶段。国外学者先后克隆了斑节对虾的高血糖素(crustacton hyperglycemic hormone, CHH)^[9]、蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)^[10]、性腺发育抑制激素(GIH)^[11]等基因, Leelatanawit 等^[12-13]从斑节对虾性腺差减 cDNA 文库中筛选到抗脂多糖(anti-LPS)和丝氨酸蛋白酶 HTRA3 (serine protease HTRA3 homologues)两个基因,还从斑节对虾精巢 cDNA 文库中筛选到性腺差异表达基因 *Trap240*、*MIPP2* 和 *HSP70-2* 及精巢特异表达基因 *XNF-L* 和 *PMCYA*。Preechaphol 等^[14]从斑节对虾卵巢 cDNA 文库中筛选到卵巢特异表达的雌虾不育(female sterile)和卵巢脂蛋白受体(ovarian lipoprotein receptor)基因及在4月龄性腺的卵巢中特异表达而在成熟卵巢中高表达的泛素特异性蛋白酶9(ubiquitin specific proteinase 9, X chromosome, Usp9X),以及与性别相关的真核细胞翻译起始因子3(X-linked eukaryotic translation initiation factor isoform 3)。Zhang 等^[15]采用 SSH 探针富集技术从日本对虾卵巢 cDNA 文库中筛选到与卵子发生相关的核糖体蛋白 L24 基因(*srpl24*)。作者所在实验室克隆了斑节对虾亲虾细胞周期蛋白 B^[16]、细胞延伸因子 2^[17]、*HSP90*^[18]、组织蛋白 C^[19]等少量与性腺发育相关基因,这些基因的获得对认识斑节对虾的性腺发育调控机制有一定的启示,在此基础上,我们利用 mRNA 差异显示技术^[20]筛选同一生长时期的斑节对虾性腺差异表达基因,并对其中两个基因在雌、雄个体不同组织中的表达差异进行了比较,以期获得该发育阶段对虾性腺发育调控过程中起重要作用的候选基因,从分子水平探讨斑节对虾性腺发育调控机制,为认识对虾性腺发育的分子调控机制奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验虾 试验所用的雌、雄斑节对虾捕自

广东阳江养殖池塘,为全人工培育的同一批次苗种,养殖 250 日龄。充氧后运回实验室,暂养 3 d 待其稳定后,随机选取健康无伤、活力好的雌、雄斑节对虾各 6 尾。雌虾体长为(15.72 ± 0.22) cm,体重为(51.8 ± 4.17) g,纳精囊发育完全,经组织切片鉴定^[21],其卵巢发育处于 I 期;雄虾体长为(14.12 ± 0.19) cm,体重为(38.95 ± 1.82) g,精荚饱满,已达到性成熟。活体解剖取眼柄神经节、脑组织、肝胰腺、性腺、肌肉等组织,液氮保存备用。

试剂 TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司;RNase-Free DNase I、RNase inhibitor、dNTP mix、AMV Reverse Transcriptase、GoTaq DNA Polymerase、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 购自 Promega 公司;DEPC、焦磷酸钠为 Amresco 公司产品;Glycogen、Bis、TEMED 为 Sigma-Aldrich 公司产品;Acr 为 Genview 公司产品;Taq DNA Polymerase 为 TaKaRa 公司产品;T-载体、PCR 产物克隆试剂盒购自上海生工;ReverTRA ace- α -TM 反转录试剂盒、SYBR Green Real-time PCR Master Mix、Genomic DNA Extraction Kit 为 TOYOBO 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

引物 DD-PCR 引物^[22]:3条3'端锚定引物 H-T11M (H=AAGCTT, M=A、G 或 C);8条5'端随机引物 H-AP₍₁₋₈₎ (AP₁ = GATTGCC, AP₂ = TGCTCAG, AP₃ = AGTAGGC, AP₄ = AACGAGG, AP₅ = CGACTGT, AP₆ = CTCAACG, AP₇ = GCACCAT, AP₈ = TTACCGC)。所有引物均由上海生工合成。

1.2 方法

总 RNA 的提取 参照 Trizol Reagent 操作说明书,提取斑节对虾雌、雄各 3 套性腺组织总 RNA。用无 RNase 的 DNase I 消化总 RNA,去除 DNA 污染。酚-氯仿抽提去除总 RNA 中的蛋白质,获得纯净的总 RNA^[23]。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,用紫外分光光度仪测定浓度。分别将电泳检测条带边界清晰、OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 ~ 2.0 之间的卵巢及精巢总 RNA 等量混匀构建总 RNA 混合池,立即反转录。

DD RT-PCR 显示雌雄差异片段 参照反转录酶试剂说明书,对雌、雄总 RNA 分别用 3 种锚定引物进行反转录反应。25 μ L 反应体系含有

5 × Buffer 5 μL, 10 mmol/L dNTP mix 1 μL, 20 U RNasin, 40 mmol/L 焦磷酸钠 1 μL, 1 μg 总 RNA, 10 μmol/L 锚定引物 2 μL, 20 U AMV 反转录酶。反转录反应于 Bio-metre PCR 仪上进行, 反应条件为: 42 °C 1 h, 95 °C 5 min。反转录产物于 -20 °C 保存备用。

6 种反转录产物分别与 8 种随机引物配对, 共进行 48 个 cDNA 扩增反应。在 25 μL 反应体系内含: 5 × Green Buffer 5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.6 μL, 10 mmol/L dNTP mix 0.5 μL, 10 μmol/L 锚定引物和随机引物各 2.5 μL, 1.25 U GoTaq 酶, 1 μL 反转录产物。PCR 程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 40 °C 2 min, 72 °C 1 min 共进行 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 3.5 μL PCR 产物进行 6 % 尿素变性聚丙烯凝胶^[24] (380 mm × 320 mm × 2 mm) 90 W 恒定功率电泳 2 h, 硝酸银染色^[25]后晾干, 在屏灯下拍照, 统计差异片段。

差异片段二次扩增及纯化回收 按照 Liang 等^[23]的方法对胶板上感兴趣的差异片段进行聚丙烯凝胶切胶回收, 取 4 μL cDNA 溶液进行二次扩增, PCR 的各种条件与 DD-PCR 所用的相同(注意前后锚定引物与随即引物的正确配对)。PCR 产物经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测后, 按照 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 凝胶回收试剂盒说明书对阳性的二扩 PCR 产物进行切胶纯化回收。

差异片段的克隆测序 按照 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒进行连接, 转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性转化子, 挑选白色阳性克隆, 提取质粒, Pst I 单酶切鉴定插入片段的大小, 菌液的测序工作委托上海生工完成。

差异片段的验证 根据 GenBank 中报道的斑节对虾 *β-actin* mRNA 序列 (GenBank accession No: AF100987) 和差异片段的测序结果设计引物(表 1)。用 Trizol 试剂提取雌雄斑节对虾各 3 套性腺组织的总 RNA, 紫外分光光度计定量后, DNase-I 消化除去 DNA 污染, 按照 ReverTRA ace-α-TM 反转录试剂盒使用说明书进行反转录, 反转录产物于 -20 °C 保存备用。利用 RT-PCR 对差异片段 TC1 加以验证, 20 μL 反应体系内含: 10 × Buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP mix 0.4 μL, 10 μmol/L 上、下游引物(分别为: 5'-CACGGCGGCTCAGACATACC-3', 5'-AGTCTAT

TGCCTCACCTTCTAACATCA-3') 各 0.4 μL, 1 U rTaq 酶, 10 倍稀释的反转录产物 2 μL, 反应条件为 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测。参照 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 说明书, 对其余 10 条片段在 eppendorf realplex² 上进行 Real-time RT-PCR。20 μL 体系为灭菌水 7.2 μL, 10 μL 2 × SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 10 μmol/L 上、下游引物各 0.4 μL, 10 倍稀释的反转录产物 2 μL。反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 各自 T_m 15 s, 72 °C 30 s 共进行 40 个循环; 在反应结束后执行熔解曲线分析以确定得到的产物为目的产物。每个反应设置 4 个重复, 以 *β-actin* 为内参, 对 cDNA 模板的上样量进行调整, 同时以不加模板的体系和以 RNA 为模板的体系做对照, 以排除试剂污染和基因组 DNA 污染引起的假阳性的可能性。分别将获得的 10 个基因和其对应的 *β-actin* 的 Ct 值, 参照 Livak 等^[26]的处理方法, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 求出每个基因在性腺组织中的相对表达量, 其中 $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\beta-actin}$ 。用 SAS V8.02 统计软件分别对这 10 个基因在卵巢和精巢中的表达差异情况进行单因素方差分析。

差异片段的分析 将所获得的阳性差异片段去除两端载体及上下游引物序列, 分别用 BLASTx 将序列与 GenBank 中的蛋白质数据库进行同源性比较和分析。

差异片段 TC1 及 TG6-3 的组织表达分析 按照“差异片段验证中”的方法获取雌、雄斑节对虾各 3 尾的性腺、眼柄神经节、大脑、肝胰腺、肌肉 10 个组织的 cDNA, 对差异片段 TC1 及 TG6-3 利用 RT-PCR 进行组织表达分析。20 μL 反应体系内含: 10 × Buffer 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP mix 0.4 μL, 10 μmol/L 的各自上、下游引物各 0.4 μL, 1 U rTaq 酶, 10 倍稀释的反转录产物 2 μL。TC1 反应条件为 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。TG6-3 反应条件为 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测。

差异片段 TC1 的 DNA 水平检测 按照 Genomic DNA Extraction Kit, 用磁珠法分别提取雌、雄斑节对虾各 3 尾的肌肉的基因组 DNA, 紫

外分光光度计调整其到相同浓度,分别等体积混合雌、雄斑节对虾的基因组 DNA。对差异片段 TC1 利用 PCR 检测其在雌、雄个体基因组 DNA 水平上的差异情况。20 μL 反应体系内含:10 \times Buffer 2 μL , 2.5 mmol/L dNTP mix 0.4 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物(分别为:5'-CCCTTTGTTT

AGGCGATTC-3', 5'-CATATCTTACGCAGCAAC TCG-3')各 0.4 μL , 1 U *rTaq* 酶, DNA 模板 2 μL , TC1 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 实时定量 PCR 引物信息
Tab.1 Real-time PCR primers information

编号 number	上游引物(5' to 3') upper primer	下游引物(5' to 3') lower primer	退火温度($^{\circ}\text{C}$) T_m	产物大小(bp) fragment size
OA7-1	TAGATGCAAAGGGTGCTCTC	TATATCGATTCCCGAGCAAC	53.5	187
OA7-2	TGTGCAGTGCTTATGACTTGG	CTCGGTCTATCACACCAGCTC	57	162
OG8-1	GAGCAACAAAGATGAGGAGCAGAATG	TCCCAGTAGGGATGACCCGACAGA	58	163
OG8-2	TTTAAGTAGCCCATATCAGAAGA	GATCAAGGAATGAGAAAACAAA	52	152
OC1-3	GGTGAGACCTCGTGACCCAGTAAG	CGATTGTCCCGCCGCTTGTA	58	72
OC4-2	TTGGAATGCAGCGACAG	TAAAGCAAGGGTTTGGAGAA	52	111
OC8	TATGCTGAAGGGTTGCACTG	GGTCTGGAAGCAGGAGTGAC	57	151
TG6-3	CGAGTACGATTTCCCTGAAGACT	CAGCTTATCCGGTCCCCTTA	57	132
TG8	CAATACAGACCAGATAGGAAAA	TATCCCCTTGATTTACGG	52	69
TA3-2	TCGATGGAGAGGACGGTTAC	TGTGCAAAATATGCTGGAAAATG	53.5	171
<i>β-actin</i>	TACTCTACACTCATAAACCAACGA	TTTCGGAATTTTATTATCAACTGTA	52-58	114

注:编号中的“O”表示该片段从卵巢中切胶回收的阳性克隆;“T”表示该片段从精巢中切胶回收的阳性克隆
Notes:“O” indicates that the fragments is excised from ovary; “T” indicates that the fragments is excised from testis

2 结果

2.1 差异片段的显示、回收及克隆测序

DD RT-PCR 产物经 6% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、硝酸银染色的部分结果(图 1)。差异片段的统计结果分为两种类型:第一类为卵巢或精巢特异表达片段,其中 46 条片段仅见于卵巢,53 条片段仅见于精巢;第二类为卵巢和精巢共有片段,但表达量上存在差异,其中 52 条片段

于卵巢中表达量高于精巢,22 条片段于精巢中表达量高于卵巢。这些数据表明此发育阶段的斑节对虾雌、雄性腺间存在差异表达基因。从上述 173 条片段中随机选取 44 条加以二次扩增,回收得到 31 条差异片段,二扩回收率为 70.5%。除去克隆测序失败和测序结果重复(如 OA8-3 与 OG8-2 为同一序列)的片段,获得 11 条均能找到其相对应的上、下游引物且片段大小与预期一致的片段。

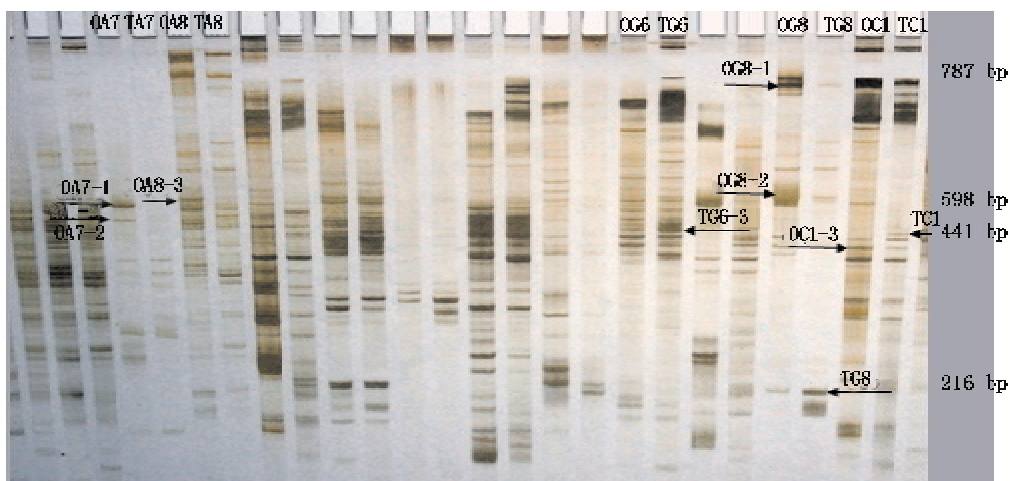


图 1 部分引物组合的差异显示图谱
Fig.1 mRNA differential display with some of primer combination

2.2 差异片段的验证

差异片段 TC1 的凝胶电泳结果(图 2)表明, TC1 在精巢中表达而在卵巢中没有检测到表达信号。Real-time RT-PCR 验证结果显示, 试验重复性良好, 熔解曲线的熔点峰窄而尖, T_m 值与预期一致, 表明反应体系和条件都得到很好的优化, 引物的特异性高, Real-time RT-PCR 的验证结果可信。用 SAS V8.02 统计软件分别对 10 个目的片段在卵巢和精巢这两个性腺组织中的表达差异情况进行单因素方差分析表明, OA7-1、OA7-2、OG8-1、OG8-2、OC1-3、OC4-2、OC8 这 7 个片段在卵巢中表达量极显著($P < 0.01$) 高于精巢; TG6-3、TG8 这 2 个片段在精巢中表达量极显著($P <$

0.01) 高于卵巢; 而 TA3-2 在雌雄性腺组织中的表达差异不显著($P > 0.05$), 将 TA3-2 定为假阳性(图 3)。

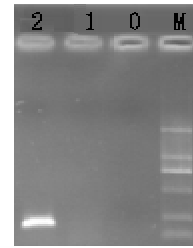


图 2 TC1 在卵巢和精巢中表达电泳图
M: DNA Marker DL2000 Marker; T: 精巢; O: 卵巢
Fig. 2 Electrophoresis of TC1 in ovary and testis
M: DNA Marker DL2000 Marker; T: testis; O: ovary

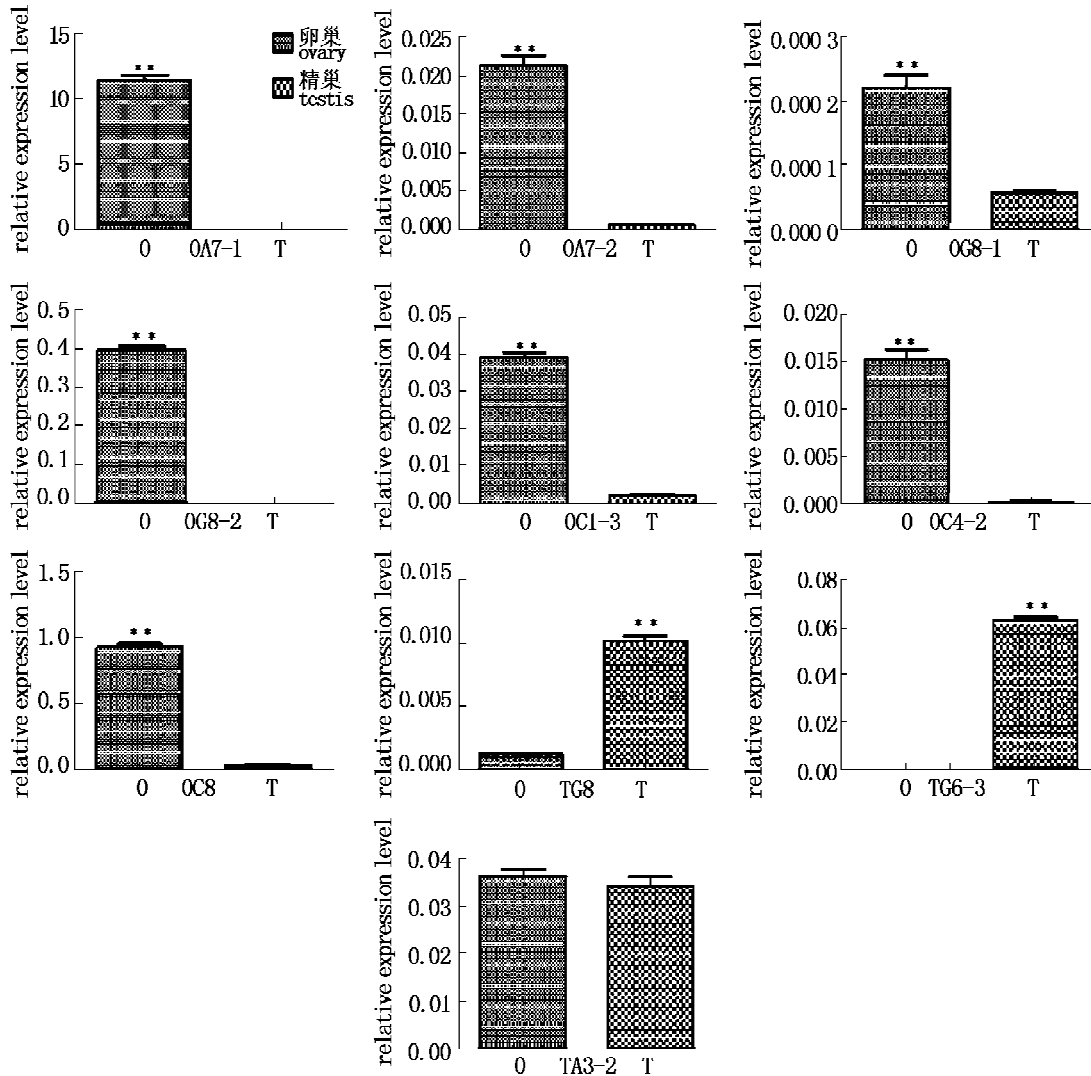


图 3 10 个基因分别在卵巢和精巢中的相对表达水平
O: 卵巢; T: 精巢; n=4; $\bar{X} \pm SE$; * $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著
Fig. 3 The relative expression level of ten genes in ovary and testis
O: ovary; T: testis. n=4; $\bar{X} \pm SE$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 差异片段的比对分析

测序结果与 NCBI 同源比对结果(表 2), OA7-1、OG8-2 和 TC1 分别与单磷酸次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMPDH)、假想膜相关蛋白和斑马鱼的甘露糖 C2 受体(MRC2)有源性($10^{-4} < E < 10$); OA7-2、OG8-1、OC1-3、OC4-2 和 OC8 分别与意蜂的脱氧尿嘧啶三磷酸核苷酸水解酶

(dUTPase)、斑马鱼的真核细胞翻译起始因子 3 亚单位 4(eIF-3 delta)和黑青斑河豚的未命名蛋白产物和大西洋鲑的 60S 核糖体蛋白 L7(RPL7)及 L3(RPL3)有较高的一致性($E < 10^{-4}$); TG6-3 和 TG8 没有找到显著相似序列,将其定义为新的 ESTs(Expressed Sequence Tags, 表达序列标签)。

表 2 克隆测序 cDNA 片段的同源性查询
Tab. 2 Homologue searching of the sequenced cDNA fragments

差异片段 编号 No.	片段 (bp)	与之同源序列 orthologous sequence	E 值 E-value	一致性 identity	GenBank accession No.
OA7-1	561	单磷酸次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 IMP dehydrogenase	0.63	23/74 (31%)	ZP_01167067
OA7-2	490	脱氧尿嘧啶三磷酸核苷酸水解酶 Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase)	6e-54	97/138 (70%)	XP_393899.1
OG8-1	787	真核细胞翻译起始因子 3 亚单位 4 eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 4	9e-58	127/234 (54%)	AAI68153.1
OG8-2	598	假想膜相关蛋白 hypothetical membrane associated protein	8.2	20/64 (31%)	YP_001883778.1
OC1-3	287	未命名蛋白产物 unnamed protein product	2e-17	37/58 (63%)	CAF99338
OC4-2	380	60S 核糖体蛋白 L7 60S ribosomal protein L7	6e-40	71/119 (59%)	NP_001133952
OC8	389	60S 核糖体蛋白 L3 60S ribosomal protein L3	5e-36	71/105 (67%)	ACI68315
TC1	441	甘露糖 C ₂ 受体 mannose receptor, C type 2	2.7	20/60 (33%)	XP_001344010.2
TG6-3	378	未有显著相似序列 No significant similarity			
TG8	216	未有显著相似序列 No significant similarity			

2.4 差异片段 TC1 及 TG6-3 的组织表达分析

对差异片段 TC1 进行 10 个组织表达分析发现,此基因在精巢中表达,而在卵巢及雌、雄性个体的肝胰腺、眼柄神经节、肌肉、脑神经这 9 个组织中都没有检测到表达信号(图 4-A),推测此基因可能是一条与雄性性腺发育相关的精巢特异表达基因。对差异片段 TG6-3 在起始模板浓度等

雄眼柄神经节都不表达;在雌性脑神经中不表达,而在雄性的脑神经则有表达;在雌、雄的肝胰腺及性腺组织中均有表达(图 4-B)。TG6-3 在雄性个体中的表达情况为脑神经 < 肝胰腺 < 精巢;在雌性个体中的表达情况为肝胰腺 < 精巢,而在脑神经中则不表达;Real-time RT-PCR 验证结果显示其在性腺中的表达情况为卵巢 < 精巢。

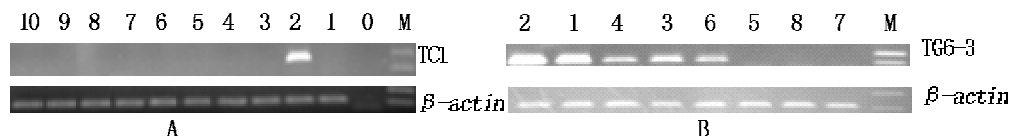


图 4 TC1 (A) 及 TG6-3 (B) 的转录水平情况

M: DNA Marker DL2000 Marker; 0: 空白对照; 1: 卵巢; 2: 精巢; 3: 雄性肝胰腺; 4: 雌性肝胰腺; 5: 雌性脑神经; 6: 雄性脑神经; 7: 雌性眼柄神经节; 8: 雄性眼柄神经节; 9: 雌性肌肉; 10: 雄性肌肉

Fig. 4 The expression level of TC1 (A) and TG6-3 (B)

M: DNA Marker DL2000 Marker; lane 0: NTC; lane 1: ovary; lane 2: testis; lane 3: male's hepatopancreas; lane 4: female's hepatopancreas; lane 5: female's brain; lane 6: male's brain; lane 7: female's eyestalk; lane 8: male's eyestalk; lane 9: female's muscle; lane 10: male's muscle

2.5 差异片段 TC1 的基因组 DNA 水平分析

差异片段 TC1 在雌、雄 DNA 水平上都有目的扩增带(图 5),且没有任何差异,TC1 不是一条由染色体基因组差异所引发的转录水平特异表达的基因。

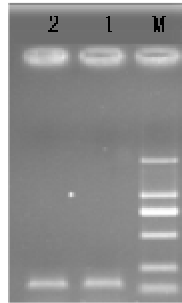


图 5 TC1 的基因组 DNA 水平分析

M: DNA Marker DL2000 Marker; 1: 雌性 DNA; 2: 雄性 DNA

Fig. 5 Genome DNA level analysis of TC1

M: DNA Marker DL2000 Marker; 1: female's and; 2: male's DNA

3 讨论

本研究在斑节对虾中成功建立 DD RT-PCR 方法,得到稳定且重复性较好的差异显示结果,最终筛选到了 10 条斑节对虾雌、雄性腺差异表达阳性片段。其中 OC4-2、OC8 与编码大西洋鲑 60S 核糖体蛋白 L7 和 L3 基因有较高同源性的阳性差异片段,商璇等^[27]报道黄鳝 60S 核糖体蛋白 L7 可能参与包括性腺分化等过程的发育调控。OG8-1 与编码斑马鱼真核细胞翻译起始因子 3 亚基 4 (eIF-3 delta) 基因有很高的同源性,而 eIF-3 delta 被认为是斑马鱼早期发育所必需的基因之一^[28]。OA7-2 与 dUTPase 有较高的同源性,此前并未有关于其与性腺发育相关或性腺差异表达相关的报道。其余 6 条差异片段,大小介于 200 ~ 600 bp 之间且位于 mRNA 3' 端,由于不同生物间 mRNA 3' 端的非编码区的种间差异很大,这样的序列常不能真正代表差异表达基因,限制了通过 Genebank 查找同源序列的可能^[29],所以仍需对相关感兴趣的差异片段进行克隆或者通过文库筛选等方法获取全长 cDNA 或基因组 DNA,获取这些差异表达片段的完整遗传信息,以方便同源比对及相关分析。再通过比较目的基因在不同生长发育阶段的不同组织之间的表达情况以及通过 RNA 干扰、基因敲除等分子生物学手段进一步探

讨这些基因的功能,以寻找与性别分化及调控密切相关的重要基因。

本研究对差异片段 TC1 进行不同组织表达分析时发现其只在精巢中特异表达,而在 DNA 水平上并没有检测到其存在性别差异,功能上推测 TC1 为一条由转录水平调控的参与精子发生及繁殖相关的重要基因,对于该基因在斑节对虾雌雄不同发育阶段的表达差异,还有待于进一步的研究揭示。

甲壳动物性腺活动受神经内分泌系统和内分泌系统等调控,外界信息(如温度,光照周期等)作用于甲壳动物的中枢神经系统,后者将其传递到神经内分泌系统和内分泌系统而产生一些促进因子和抑制因子以对性腺发育进行精确的调控^[30]。去除眼柄能阻断 GIH 等的抑制作用,从而促进雌虾卵巢发育,诱导雄虾精荚早熟,但是如果亲体没有经过充分的营养物质的积累,会导致产卵的质量下降及增加苗种的死亡率^[31-32],这也是亲本性腺催熟时要进行营养强化的原因。本研究在比较 TG6-3 在雌、雄个体组织间的表达差异情况时发现, TG6-3 在雌性脑组织中不表达而在雄性脑组织中表达,对于去除眼柄能否诱导 TG6-3 在雌性脑组织表达和去除眼柄后 TG6-3 在雌雄个体的脑组织、肝胰腺和性腺等组织中表达水平上的变化趋势的深入研究,将有助于了解斑节对虾性腺发育及性腺催熟过程中的分子调控机制,对于未知基因 TG6-3 的克隆及鉴定工作值得深入研究。

本研究仍有 100 多个片段有待于回收二扩,一些与性腺发育或者性别分化相关的基因可能存在其中,在克隆的过程中也可能造成某些重要基因的丢失(回收到 31 条差异片段,可最终只获得 11 个有效克隆)。这些结果将为对虾性腺发育相关重要基因以及主效基因的发现提供大量新的参考信息,对这些基因的深入研究可能为阐明斑节对虾性别分化和性腺发育的分子作用机制提供重要的线索。

参考文献:

- [1] 黄建华,马之明,周发林,等. 池塘养殖斑节对虾的生长特性[J]. 海洋水产研究,2006,27(1):14-20.
- [2] Pratoomchaat B, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P, et al. Sperm quality of pond-reared and wild-caught

- Penaeus monodon* in Thailand [J]. J World Aquacult Soc, 1993, 24(4): 530-540.
- [3] 林汝捧, 何进金, 丘虎三. 诱导池养斑节对虾的性腺发育与产卵[J]. 水产学报, 1990, 14(4): 277-285.
- [4] Benzie J A H. Penaeid genetics and biotechnology [J]. Aquaculture, 1998, 164(1-4): 23-47.
- [5] 温为庚, 黄建华, 杨其彬, 等. 血清素在斑节对虾催熟过程中的作用[J]. 南方水产, 2009, 5(1): 59-63.
- [6] Harrison K E. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans [J]. A Review J Shellfish Res, 1990, 9(1): 1-23.
- [7] Huang J H, Jiang S G, Lin H Z. Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock [J]. Aquac Res, 2008, 39(3): 240-251.
- [8] Kumura T. Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction [J]. JARQ, 2004, 38(1): 49-54.
- [9] Udomkit A, Chooluck S, Sonthayanon B, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding a member of CHH/MIH/GIH family from *Penaeus monodon* and analysis of its gene structure [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2000, 244(1): 145-156.
- [10] Krungkasem C, Ohira T, Yang W J, et al. Identification of two distinct molt-inhibiting hormone related peptides from the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* [J]. Mar Biotechnol, 2002, 4(2): 132-140.
- [11] Treeratrakool S, Panyim S, Chan S M, et al. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference [J]. FEBS J, 2008, 275(5): 970-980.
- [12] Leelatanawit R, Klinbunga S, Puanglarp N, et al. Isolation and characterization of differentially expressed genes in ovaries and testes of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Mar Biotechnol, 2004, 6: S506-S510.
- [13] Leelatanawit R, Sittikankeaw K, Yocawibun P, et al. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Comp Biochem Phys B, 2009, 152(1): 66-76.
- [14] Preechaphol R, Leelatanawit R, Sittikankeaw K, et al. Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of sex-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. J Biochem Mol, 2007, 40(4): 501-510.
- [15] Zhang Z P, Wang Y L, Jiang Y H, et al. Ribosomal protein L24 is differentially expressed in ovary and testis of the marine shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Comp Biochem Phys B, 2007, 147(3): 466-474.
- [16] Qiu L H, Jiang S G, Zhou F L, et al. Molecular cloning and characterization of a cyclin B gene on the ovarian maturation stage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Mol Biol Rep, 2007, (online).
- [17] Qiu L H, Jiang S G, Zhou F L, et al. Molecular cloning of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) elongation factor 2 (EF-2): sequence analysis and its expression on the ovarian maturation stage [J]. Mol Biol Rep, 2008, 35(3): 431-438.
- [18] Jiang S G, Qiu L H, Zhou F L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (*Hsp90*) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(1): 127-134.
- [19] Qiu L H, Jiang S G, Huang J H, et al. Molecular cloning and mRNA expression of cathepsin C gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. Comp Biochem Phys A, 2008, 150(3): 320-325.
- [20] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [21] 黄建华, 周发林, 马之明, 等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察 [J]. 热带海洋学报, 2006, 25(3): 47-52.
- [22] Liang P, Zhu W, Zhang X, et al. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(25): 5763-5764.
- [23] Liang P, Meade J D, Pardee A B. A protocol for differential display of mRNA expression using either fluorescent or radioactive labeling [J]. Nature Protocols, 2007, 2(3): 457-470.
- [24] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 327-333.
- [25] Bassam B J, Caetano-Anolles G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Anal Biochem, 1991, 196

- (1):80-83.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [27] 商璇,何焱,张雷,等. 黄鳝性腺高表达的核糖体蛋白基因 [J]. *遗传*, 2005, 27(2):227-230.
- [28] Amsterdam A, Nissen R M, Sun Z, *et al.* Identification of 315 genes essential for early zebrafish development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(35):12792-12797.
- [29] 张晓军,崔朝霞,樊拥军,等. 用 mRNA 差异显示技术分析中华绒螯蟹早期发育的基因表达 [J]. *海洋科学*, 2001, 25(5):34-36.
- [30] 王在照,相建海. 甲壳动物 CHH 家族神经激素结构和功能研究进展 [J]. *水产学报*, 2001, 25(2):30-34.
- [31] Millamena O M, Quinitio E T. The effects of diets on reproductive performance of eyestalk ablated and intact mud crab *Scylla serrata* [J]. *Aquaculture*, 2000, 181(1-2):81-90.
- [32] Alikunhi K H, Poernomo A, Adisukresno S, *et al.* Preliminary observations on induction of maturity and spawning in *Penaeus monodon* Fabricius and *Penaeus merguensis* de Man by eyestalk extirpation [J]. *Bulletin of the Shrimp Culture Research Center*, 1975, 1(1):1-11.

Screening of differentially expressed genes of gonads from the pond-reared black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

CHEN Liang^{1,2}, HUANG Jian-hua¹, ZHANG Dian-chang¹, SU Tian-feng¹, JIANG Shi-gui^{1*}

- (1. Key Lab of Aquaculture & Ecology and Quality Control of Agriculture Ministry, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to clone and analyze the differentially expressed genes of gonads of domesticated broodstock *Penaeus monodon* Fabricius, total RNA was extracted from the ovary and testis, and differential display technique was performed to screen the differentially expressed genes by using a set of 3 anchored primers for cDNA synthesis and 8 arbitrary primers in the PCR. The differential display DNA bands were separated by denaturing urea-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and displayed by silver staining. Finally 173 cDNA fragments were isolated, and 44 cDNA fragments were excised. After cloning and sequencing, 11 differences in expression of the screened cDNA fragments were confirmed by real-time RT-PCR, and 10 cDNA fragments proved to be real difference. Results show that these 10 fragments were expressed differently between ovary and testis, 7 fragments were expressed significantly higher level in ovary, two fragments were expressed significantly higher level in testis, one fragment was particularly expressed in testis. The nucleotide sequence analysis revealed that two fragments were not homologous to of the known genes or ESTs, may be novel genes. TC1 was only expressed in testis, and there was no any difference between female and male DNA level. TG6-3 revealed a preferential expression level in testes than ovaries, and it was only expressed in male brain but no expression in female brain. This research provided a foundation for further studies of the molecular mechanism of sexual differentiation and gonadal development of *Penaeus monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; gonad; differential display; differentially expressed genes

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com