

刀鲚 *MOR-2AK2* 的克隆、序列分析及组织表达

王 聪^{1,2}, 朱国利^{1,2}, 唐文乔^{1,2*}, 刘 东^{1,2}, 杨金权^{1,2}

(1. 上海海洋大学鱼类研究室, 上海, 201306;

2. 上海市海洋动物系统分类与进化重点实验室, 上海, 201306)

摘要: 嗅觉是鱼类感知周围环境的重要工具, 可能参与生殖洄游的过程。嗅觉由嗅觉受体(olfactory receptor)基因所编码的受体蛋白识别气味分子所引发, 主嗅觉受体(*MOR*)基因是数量最大的一类嗅觉基因, 可识别水溶性气味分子。为了弄清刀鲚定居型与洄游型种群的主嗅觉基因差异, 本研究通过RACE技术获得了洄游型刀鲚*MOR-2AK2*基因, 其开放阅读框长度972 bp, 为单外显子结构, 可编码323个氨基酸残基。预测表明, *MOR-2AK2*基因所编码的蛋白为7个疏水性的 α -螺旋跨膜结构, 属于G-蛋白偶联受体。对10种组织所作的定量分析表明, *MOR-2AK2*基因在嗅囊和性腺中的表达量远远高于其他组织器官, 并且嗅囊中的表达量还高于性腺中的7~25倍。*MOR-2AK2*基因的表达量也存在性别差异, 其中雌性嗅囊中的表达量约为雄性中的2倍, 但精巢中的表达量却约是卵巢中的2倍。序列分析显示, *MOR-2AK2*基因的5'-UTR区域存在着一段微卫星序列(GT)₅, 其中定居型多出洄游型14个碱基(GTGTGTGTGTGTTT), 这导致了二者所编码的氨基酸序列的相似度仅为84%。这些结果表明, *MOR-2AK2*基因不但与嗅觉功能有关, 也可能参与了刀鲚的性腺发育或生殖洄游过程, 同时也可能与定居型种群的形成相关。

关键词: 刀鲚; 生殖洄游; 嗅觉受体基因; 序列分析; 组织表达

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

刀鲚(*Coilia nasus*)隶属于鲱形目(Clupeiformes)、鲱科(Engraulidae), 分布于西太平洋, 在我国东海、黄海、渤海及其通海的江河均有发现^[1-3]。现有研究表明, 分布于长江的刀鲚包括两种生态类型, 一种是洄游生态型, 春季性成熟后自沿海逆流而上进入长江的中下游产卵繁殖, 孵化后的幼鱼顺流而下进入海中肥育; 另一种是淡水定居生态型, 主要生活在长江中下游干流及其附属的太湖、巢湖、鄱阳湖等湖泊^[4-10]。其中, 定居型刀鲚是低值渔品, 洄游型刀鲚则是长江流域名贵的水产品, 自古就被称为“长江三鲜”之一。但长江洄游型刀鲚的资源量正呈急剧下降趋势, 而太湖、巢湖等地的定居型刀鲚数量却在不断地增长^[11-12]。

生殖洄游是洄游型区别于定居型刀鲚的主要表征之一。自20世纪50年代Hasler等^[13]提出生殖

洄游的嗅觉定向(olfactory orientation)假说后, 嗅觉在美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)、大西洋鲑(*Salmo salm*)等鱼类的洄游中所起的重要作用已逐渐被证实^[14-16]。研究发现在具有生殖洄游的鱼类中, 嗅觉识别能力越强的个体, 成熟后洄游到出生地的准确性越高, 并与嗅觉受体基因的数量呈正相关^[17-19]。

鱼类嗅觉依靠水中气味分子如氨基酸、核苷酸、类固醇、前列腺素和胆汁酸等诱导物作用于嗅觉受体(olfactory receptor, OR)蛋白而引起, 参与多种行为活动^[20-21]。嗅觉受体主要在嗅觉上皮组织中表达, 气味分子与嗅觉受体蛋白结合、识别并引发化学信号, 通过嗅神经传送到神经中枢从而实现嗅觉识别^[22], 嗅觉受体蛋白则由嗅觉受体基因所编码^[15, 23-24]。嗅觉受体共分为4个在进化上相互独立的家族, 其中的主嗅觉受

收稿日期: 2015-01-29 修回日期: 2015-11-03

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203065); 国家自然科学基金(31172407, 31472280); 高等学校博士学科点科研专项(20123104110006); 上海高校水产学高峰学科

通信作者: 唐文乔, E-mail: wqtang@shou.edu.cn

体(main olfactory receptors, MOR)是数量最大的一个家族,在斑马鱼(*Danio rerio*)体内已发现约154个,据推测可识别水溶性气味分子^[16,23-25]。本研究在前期文献分析和通过多个转录组的测序、比较,找出差异表达基因的基础上^[16,26],从洄游型刀鲚中获取了主嗅觉受体基因*MOR-2AK2*,分析了其不同组织中的表达,旨在弄清其在刀鲚两种生态型中的序列差异,为长江刀鲚洄游的嗅觉定向和生态型演化的研究提供一些线索。

1 材料与方法

1.1 样本采集

实验所用刀鲚样本分别为2014年5月采自长江靖江江段、2014年3月采自江西鄱阳湖都昌水域以及2013年5月采自上海崇明岛附近水域。所有样本都用定置刺网捕获,尚未死亡的个体立即包埋于-20℃医用冰袋中,使其失去知觉。在现场迅速用医用剪刀剖开腹部,检视性腺发育状况,对性腺发育III期的个体进行实验取样。根据刀鲚体长和体质量与年龄的对应关系^[27],留用2龄个体作为实验样本。剪取(雌/雄)嗅囊、眼、鳃、肌肉、心脏、肝、胃、精巢和卵巢等组织或器官,保存于液氮中。

1.2 *MOR-2AK2*基因cDNA全长的获得

现场剪取长江靖江段刀鲚嗅囊样本,液氮保存。按Trizol (Invitrogen公司)法提取总RNA,并用1.0%凝胶电泳进行完整度检测。总RNA经DNase I处理后,按照SMARTer RACE cDNA扩增

试剂盒(Clontech公司)的说明书进行操作,获得SMART RACE Ready-cDNA文库。

根据本实验前期的转录组数据中的EST(expressed sequence tags)序列^[26],并利用软件Primer Premier 5.0设计5'-RACE (OR-5, OR-5nest)和3'-RACE (OR-3, OR-3nest) PCR引物(表1,本实验所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成),分别用于5'端和3'端扩增。利用引物OR-5和OR-3,以嗅囊提取合成的SMART RACE Ready-cDNA文库作为模板,按照RACE试剂盒(Clontech公司)说明书进行5'和3'的第一轮扩增;将上述产物分别稀释150倍作为模板,以OR-5nest和OR-3nest为引物进行RACE第二轮扩增。回收纯化DNA产物,进行连接、转化、测序后拼接。

1.3 *MOR-2AK2*基因cDNA全长的获得

按照DNA提取试剂盒(Life Feng公司)说明书提供的方法,提取采集于长江靖江段刀鲚的基因组DNA。根据测序后拼接结果设计1对特异性引物(OR-F/OR-R,表1),反应体系:DNA模板50 ng, 10 × PCR Buffer 5 μL, 25 mmol MgCl₂ 3 μL, 10 μmol的上、下游 OR-F和 OR-R各1.0 μL, 10 mmol dNTP 1.0 μL, 2.5 U/μL Tap DNA Polymerase (Sangon Biotech公司) 1.0 μL, 用ddH₂O补充到总体积为50 μL。PCR反应条件:95℃ 5 min; 30个循环(95℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 2 min 30 s); 72℃ 10 min; 10℃保存。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后,进行连接、转化、测序。

表1 本研究所用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	引物序列 primer sequence (5' - 3')
OR-3	TACTCTTCGTCACCTCCTCATCTCCACAA
OR-3nest	CGCCACAGCGAATTTCCACCACTAAGA
OR-5	TGGGCAGCAGGATGACCAACAGAAAGAT
OR-5nest	CACCAGCCCAAAGAACCAAATGGCAGCG
5UTR-F	TCAGCCCAAAGAACCAAATG
5UTR-R	ACGAGGCAGAGAAACACAAG
OR-F	ACTTGTGTTTCTCTGCCTCG
OR-R	GACATTGATTACATTTGGGT
qRT-F	TGACCAACAACACAACAGAAGT
qRT-RGAPDH-FGAPDH-R	GCTCAGGAGTATGACAAACAATAGCTTGCCACCCTTGTGCTAGCCATCAACGACCCCTTC

1.4 MOR-2AK2基因的序列分析

测序结果用软件DNAMAN去除载体序列, 并进行拼接。利用NCBI网站的Blast功能进行序列相似性比对及同源性分析, 软件Jellyfish和DNASar中的Expasy网站进行开放阅读框的搜索及氨基酸序列预测, <http://www.expasy.org/tools/pi>网站在线预测蛋白质的理化性质, SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)在线预测蛋白质的三级结构, 采用软件Clustal W进行多态性分析, 用软件MEGA 6.0构建Neighbor-Joining系统树。

1.5 MOR-2AK2基因的组织表达分析

分别取液氮中保存的长江靖江段刀鲚的(雌/雄)嗅囊、眼、鳃、肌肉、心脏、肝、胃、精巢和卵巢, 放入液氮中研磨, 每种组织器官各取自3个样本。按Trizol (Invitrogen公司)法提取总RNA, 用1.0%凝胶电泳检测完整度。RNA经DNase I处理后, 按照PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa公司)的说明书进行操作, 获得荧光定量PCR的cDNA模板。

根据所获得的嗅觉受体基因阅读框区域, 设计一对特异性引物(qRT-F/qRT-R, 表1), 用于荧光定量PCR反应。同时, 以GAPDH基因作为内参基因(引物为GAPDH-F和GAPDH-R, 表1)。

荧光定量PCR反应体系为25 μ L: 12.5 μ L SYBR预混液(TaKaRa公司), 10 μ mol/L的上、下游引物各0.5 μ L, cDNA模板1.0 μ L, 灭菌超纯水10.5 μ L, 混匀。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 40个循环(95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 32 s)。反应中设置以水为阴性对照, 每个样品进行3次重复测定。所使用的仪器为BioRad公司的iQ5。反应结束后收集Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[28]进行数据分析。

1.6 不同刀鲚种群中MOR-2AK2基因的获得

在MOR-2AK2基因的开放阅读框两侧设计引物OR-F/OR-R, 分别以靖江、鄱阳湖、崇明3个刀鲚群体的基因组DNA为模板, 用高保真酶Tap DNA Polymerase (Sangon Biotech公司)按DNA提取试剂盒说明书提供的方法进行OR基因的获取。各刀鲚群体均取5个样本进行分析。

2 结果

2.1 MOR-2AK2基因的序列组成

以采自长江靖江段的洄游型刀鲚基因组DNA作为模板, 通过两轮5'和3'-RACE扩增后, 分别获得800和1 000 bp左右的扩增片段(图

1)。通过对同一个个体10个平行样本的测序, 5'-RACE获得了4条不同序列, 3'-RACE仅获得了相同的1个序列。利用软件Jellyfish将4种不同的5'-RACE序列和1个相同的3'-RACE序列进行拼接, 经检测均具有相同的开放阅读框(open reading frame, ORF), 长度为972 bp。而5'非编码区(untranslated region, UTR)的开放阅读框则不同, 长度分别为421、425、453和484 bp(图2)。但3'-UTR长度均为311 bp, 因此所获得的4条基因的全长分别为1 704、1 708、1 736和1 767 bp。

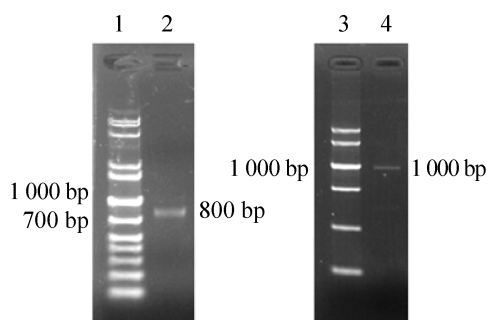


图1 MOR-2AK2基因的RACE扩增产物电泳图

1. 1 kb Plus DNA Ladder, 2. MOR-2AK2基因的5'-RACE扩增产物片段, 3. DNA Marker V, 4. MOR-2AK2基因的3'-RACE扩增产物片段

Fig. 1 Patterns of MOR-2AK2 RACE amplification product electrophoregram

1 represents 1 kb plus DNA ladder, 2 represents the 5-RACE amplification fragment of MOR-2AK2 gene, 3 represents DNA Marker V, 4 represents the 3-RACE amplification fragment of MOR-2AK2

2.2 MOR-2AK2基因的结构

MOR-2AK2基因的编码区域含有1个起始密码子ATG和1个终止密码子TAA, 并含有1个多腺核苷酸信号AATAAA和1个poly(A)尾, 且二者相距18 bp(图3)。利用Jellyfish软件进行预测, 显示MOR-2AK2基因可编码323个氨基酸残基。MOR-2AK2基因的cDNA序列与以基因组DNA为模板、利用特异性引物OR-F/OR-R(表1)扩增所得到的序列大小一致。

2.3 MOR-2AK2基因编码蛋白的结构预测

通过(<http://www.expasy.org/tools/pi>)在线预测, 发现MOR-2AK2基因所编码的蛋白质分子量为37.2 ku, 理论等电点pI为9.46。通过(<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>)在线预测MOR-2AK2蛋白的跨膜结构, 发现MOR-2AK2蛋白具有7个跨膜区域, 跨膜区氨基酸位置分别为29~52, 68~91, 93~118, 141~161,

MOR-2AK2-4	GCAGGTCGAC----GATTCACCAGCCCAAGAACCAAATGGCAGCGTAGCAACGCAGAGG	56
MOR-2AK2-3	*GG*A**CT*TAGA*****CGTAGCAGAGGAAAGC	60
MOR-2AK2-2	*CA*G**GA*-----*****-----	40
MOR-2AK2-1	*GG*A**CT*TAGA*****CGTAGC-----	50
MOR-2AK2-4	AAAGCAGATGGCAGTGTAGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAGCAAC	116
MOR-2AK2-3	AGATG-----GCAGTGTAGC*****	114
MOR-2AK2-2	-----TGTAGCC*****	86
MOR-2AK2-1	-----*****	89
MOR-2AK2-4	GCAGAGTACATGGGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGAATAATGGGGTGTGT	176
MOR-2AK2-3	*****G*****GGA-----ATAATG*****	145
MOR-2AK2-2	*****A*****GAT-----ATAATG*****	117
MOR-2AK2-1	*****G*****GG-----*****	113
MOR-2AK2-4	ATCTTCATACAGCACAGTGCCAAACCACACTCACACGTCTAGGAAAAATACATGTGCTGC	236
MOR-2AK2-3	*****	205
MOR-2AK2-2	*****	177
MOR-2AK2-1	*****	173
MOR-2AK2-4	TTTCATTAGAGAATATTAGTAGAATGTAAGTGTAAACAGTTGTACATGTTACTTGTGTTT	296
MOR-2AK2-3	*****	265
MOR-2AK2-2	*****	237
MOR-2AK2-1	*****	233
MOR-2AK2-4	CTCTGCCTCGTCATGTTGAAAAACATGTTTAAAACAGATGTATTACTGCAATGTGTGTTG	356
MOR-2AK2-3	*****	325
MOR-2AK2-2	*****	297
MOR-2AK2-1	*****	293
MOR-2AK2-4	AGAGAAGATTCTCTGCTGTAGCCTTTTGTGTCTCTAAAGAGTGCCAGTGAAGTACTAGCTG	416
MOR-2AK2-3	*****	385
MOR-2AK2-2	*****	357
MOR-2AK2-1	*****	353
MOR-2AK2-4	CCACTTAGCTAAGAGGGTAGCAGTACCATCATTACGCCTCAGGCCTGTGTGTGTGTTTT	476
MOR-2AK2-3	*****	445
MOR-2AK2-2	*****	417
MOR-2AK2-1	*****	413
MOR-2AK2-4	***** 484	
MOR-2AK2-3	***** 453	
MOR-2AK2-2	***** 425	
MOR-2AK2-1	***** 421	

图 2 MOR-2AK2基因的5'非编码区序列比对

“*”表示碱基一致，“-”表示优化比对后出现的间隙。MOR-2AK2基因的4种5'-UTR均具有不同程度的缺失，个别碱基存在差异

Fig. 2 The sequence alignment of 5'-UTR of MOR-2AK2

“*”represents the same base,“-”represents the base gap after optimization. 4 kinds of 5'-UTR of MOR-2AK2 gene had different degree of deletion, and individual base had difference

195 ~ 219, 236 ~ 265和271 ~ 293(图3)。其中，胞内区域为1 ~ 28, 92, 119 ~ 140, 196 ~ 218和266 ~ 270, 胞外区域为53 ~ 67, 94 ~ 117, 160 ~ 194和220 ~ 235。通过(<http://swissmodel.expasy.org>)在线预测，发现MOR-2AK2蛋白的三级结构为α-螺旋7跨膜结构(图4)。

2.4 MOR-2AK2基因的功能进化关系

将在NCBI数据库中搜索得到的同源序列与

已预测的刀鲚嗅觉受体蛋白MOR-2AK2氨基酸序列进行比对。结果显示，刀鲚与其他鱼类嗅觉受体蛋白的同源性在33% ~ 48%。其中，与墨西哥丽脂鲤(Astyanax mexicanus)的olfactory receptor 2AK2-like序列的同源性最高，为48%；与眼斑雀鲷(Lepisosteus oculatus)的olfactory receptor 52B4-like序列和墨西哥丽脂鲤的olfactory receptor 472-like序列的同源性也比较高，分别为46%和45%。

采用软件MEGA 6.0中的Neighbour-Joining

GCAGGTCGACGATTACACGACCCAAAGAACCAAAATGGCAGCGTAGCAACGCAGACCAAAGCAGATGGCAGTGTAGCCTC	79
TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTGTCAACGCAGAGTACATGGGAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG	160
GAATAATGGGGTGTGTATCTTCATACAGCACAGTGCCAAAGGACACTCACACGTCTAGGAAAATACATGTGCTGCTTCA	241
TTAGAGAATATTAGTAGAATGTAAGTGTAAACAGTTGTACATGTTACTTGTGTTTCTCTGCCTCGTCATGTTGAAAAACAT	322
GTTTAAAAACAGATGTATTACTGCAATGTGTGTTGAGAGAAGATTCTTGTGCTGTAAGCCTTTTGTGCTGTAAGAGTGCC	403
AGTGAAGTACTAGCTGCCACTTAGCTAAGAGGGTAGCAGTACCATCATTACGCTCAGGCCTGTGTGTGTTTTTCTAGGTT	484
ATGGCTCTCATGACCAACAACACAACAGAAGTATTTTCAGCAGATGATCCAAATTGAGATGGCACTTGATCGCAGACTGTTC	565
M A L M T N N T T E V F Q Q M I Q I E M A L D R R L F	27
TMD1	
AAAGTCACTGTCACTATAATCATATCTTTCTTTCTTTTACATTAACACTGTATTGTTTGTGCATACTCTGAGCAAACCA	646
K V T V T I I I S F F F V Y I N T V L F V I L L S K P	54
TMD2	
GTGTTCAAGGACACACCTCGTTATGTGCTCTTCGCACACATGCTCTGCAACGACTCTATTCTGCTGCTCTTCTCTCAATC	727
V F R D T P R Y V L F A V M L C N D S I Q L L F S S I	81
TMD3	
ATCACCATTTTCTCATTTGCTACATCAGACAACTAAAGCTGCATGCTCATTCTTACTCTTCGTCACCTCCTGATCCTCC	808
I T I F S F A Y I R Q T K A A C S F L L F V T S S S S	108
ACAAAAGTCCCTGAATCTGGCCGTCATGTCACCCGAGCGCTACACTGCCATCTGCTTCTCTGCGCCACAGCGAATTT	889
T K A P L N L A V M S P E R Y T A I C F P L R H S E F	135
TMD4	
TCCACCACTAAGAGAACATATGTGGCAATCGCTGCCATTTGGTCTTTGGGCTCCTGAACCCTGTGGTGGATTCAATTTAT	970
S T T K R T Y V A I A A I W F F G L V N P V V D S F Y	162
AACTCTGTGACTGACCGAGATTTTTTACTGAAGAAATTTGTGTGGTAGTCAGACAATATCAACACCACACCATGGCGG	1051
N S V T D R D F F T E E I L C G S Q T T F N T T P W R	189
TMD5	
GCATTGCTCTACCAGGCTCTCAATGGCCTGACTATGTGACTGTGACACTGGTTATCCTCTTCTGCTACATCAACGTCATG	1132
A L L Y Q A L N G L Y Y V T V T L V I L F S Y I N V M	216
CTCGCGGCTCGGTCTGTGTCAGTGATGAGAAGTCCACAAGGAAAGCACACAGGACTTCTGCTTCACCTGATCCTGCTG	1213
L A A R S V S S D E K S T R K A H R T L L L H L I Q L	243
TMD6	
GTCTCTGTCTCAACATGTTGTTGTACATCAGTATAGTCCGTTTCTTGCAGTGGTTTTTCAGTTTCGAAGTTTACAAAGAC	1294
V L C R N M L L Y I S I V R F L A L V F S F E V Y K D	270
TMD7	
GTTAGCTATGTCATCTTCTGTTGGTCATCTGCTGCCAGATGTCTGAGTCCCATCATCTACGGCTTAAGAGACAAGGCT	1375
V S Y V I F L L V I L L P R C L S P I I Y G L R D K A	297
GTTCGCAATTTGTTTATGTTTATTTGAAATGTGGCTTTTCTAGACCAAAGCCGAAAAGTAAACATACAGTGTAAATCACTAA	1456
V R N L F M F Y L K C G F S R A K P K V N I Q C N H *	323
TATCCCTGAATTAAGGAAAGACATACAGACCTATATATAAAATATACTTATGTCTCCTGTGGTACCAATTGAAAATATCA	1537
GCTTGAGAAATGTGACAAGATTCAGTGTGATAATTATGGATGTACATAGAACATGGTGTGCTTGCCTTACCCAAATGTAAT	1618
CAATGTCTTAGATATTAGCTGAAGCAGTCTAACCTTTGTACTTCTGCCATTCATTTATGTCAGTGATTACATGTGCTGGTT	1699
TAGTCTGAGCACTGAATCCACAATAAATGCTAAATTGAATAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1767

图 3 刀鲚嗅觉受体基因 *MOR-2AK2-4* 的核苷酸和氨基酸序列图

“—”的下面部分, TMD1~7表示7个跨膜区域, “*”表示终止密码子, “…”表示保守的氨基酸残基, “=”为多腺苷酸信号AATAA。*MOR-2AK2-4*基因全长1 767 bp, 5'-UTR和3'-UTR长度分别为484和311 bp, 编码区长度为972 bp, 编码323个氨基酸, 存在25处保守的氨基酸残基。起始密码子ATG位于485~487 bp处, 终止密码子TAA位于1444~1456 bp处, 多腺苷酸信号AATAA距poly(A)尾18 bp

Fig. 3 Nucleotide and amino acid sequence of *C. nasus* odorant receptor *MOR-2AK2-4*

The TMD 1-7 under the red line represent 7 transmembrane regions, “*”represents the termination codon, “…”represents conservative amino acid residues, “=”represents multiple adenosine signal AATAA. The full-length of *MOR-2AK2-4* was 1 767 bp, and the length of 5-UTR and 3-UTR were 484 and 311 bp, and the coding region was 972 bp, encoding 323 amino acids. *MOR-2AK2-4* had 25 conservative amino acid residues. The initiation codon ATG was located at 485-487 bp, the termination codon TAA was located at 1 444-1 456 bp, the length between multiple adenosine signal AATAA and poly (A) tail was 18 bp

法, 所构建的*MOR-2AK2*氨基酸序列功能进化树见图5。基于氨基酸序列构建的进化树可分为上下2个大的分支, 其中刀鲚的*MOR-2AK2*氨基酸序列处在下支, 与斑点雀鲷的52B4-like氨基酸序列、墨西哥丽脂鲤的2AK2-like氨基酸序列和472-like氨基酸序列、斑马鱼的2AJ1氨基酸序列处于同一个大的分支, 而与上支的11种鱼类的相关嗅

觉基因的氨基酸序列相对较远。但在下侧的大分支中, 刀鲚单独成为一支, 显示其与斑点雀鲷、墨西哥丽脂鲤和斑马鱼之间的功能进化关系也较远。

2.5 *MOR-2AK2*基因的特异性组织表达

荧光定量分析显示, *MOR-2AK2*基因虽在嗅

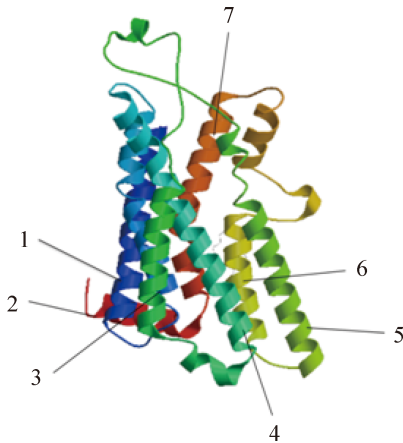


图4 MOR-2AK2蛋白的三级结构预测图

1~7. 7个 α -螺旋的位置

Fig. 4 The predicted three-dimensional structure of MOR-2AK2 protein

The number 1-7 represent 7 α -helix respectively

囊、眼、鳃、肌肉、心脏、肝、胃、精巢和卵

巢等组织器官中均有表达, 但肝、心脏、鳃、眼和胃中的表达量极少, 而肌肉、性腺和嗅囊中的表达量远远高于其他组织器官(图6)。其中以嗅囊中的表达量最高, 约是性腺中表达量的7~25倍。进一步分析显示, 雌性嗅囊中的表达量约为雄性嗅囊中的2倍, 但精巢中的表达量却约为卵巢中的2倍。

2.6 MOR-2AK2基因在刀鲚不同群体间的差异性分析

利用特异性引物OR-F/OR-R, 以采自长江靖江段(JJ)、崇明岛(CMD)和鄱阳湖(PYH)水域的刀鲚基因组DNA为模板, 分别对每个群体5个个体的MOR-2AK2基因开放阅读框进行克隆。PCR产物经测序、比对后, 用软件Clustal W进行多序列比对(图7)。可见, 靖江和崇明岛10个个体的MOR-2AK2基因序列长度完全一致, 均为1 339 bp, 且序列的碱基相似度极高, 仅个别碱基存在差异, 预测编码的氨基酸序列相似度也高达

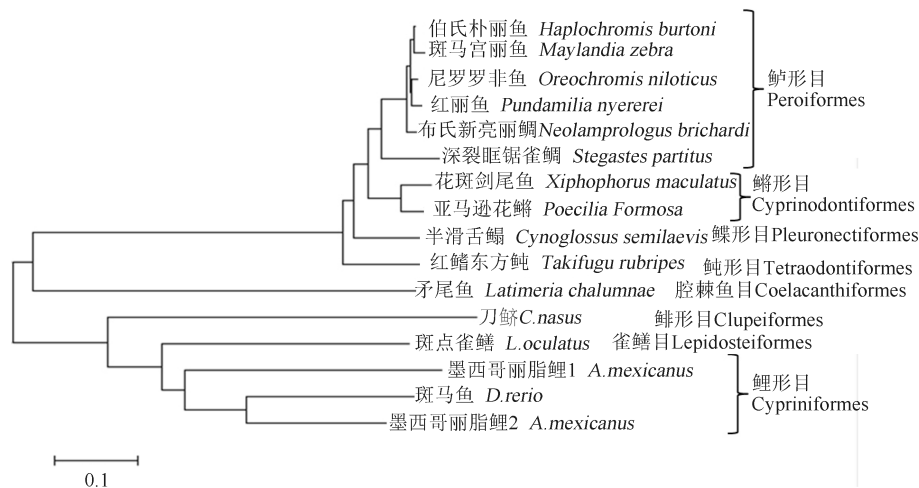


图5 以Neighbour-Joining法构建的刀鲚MOR-2AK2氨基酸序列及其他物种相关氨基酸序列的进化树

序列数据来源: 伯氏朴丽鱼 (*Haplochromis burtoni*), GenBank登录号: XP_005946630.1; 斑马宫丽鱼 (*Maylandia zebra*), GenBank登录号: XP_004559087; 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), GenBank登录号: XP_003451932.1; 红丽鱼(*Pundamilia nyererei*), GenBank登录号: XP_005753728.1; 布氏新亮丽鲷(*Neolamprologus brichardi*), GenBank登录号XP_006807449.1; 深裂眶锯雀鲷 (*Stegastes partitus*), GenBank登录号: XP_008303257.1; 斑剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*) GenBank登录号: XP_005797233.1; 亚马逊花鲈(*Poecilia formosa*), GenBank登录号: XP_007569706.1; 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*), GenBank登录号: XP_008319438.1; 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*), GenBank登录号: XP_003979020.1; 矛尾鱼 (*Latimeria chalumnae*), GenBank登录号: XP_006002807.1; 眼斑雀鲈 (*L. oculatus*), GenBank登录号: XP_006628154.1; 斑马鱼 (*D. rerio*), GenBank登录号: XP_001919585.2; 墨西哥丽脂鲤1和2 (*A. mexicanus*), GenBank登录号: XP_007254257.1和XP_007254258.1

Fig. 5 A phylogenetic tree based on amino acid sequence of MOR-2AK2 in *C. nasus* and related amino acid sequences in other species constructed with the Neighbour-joining method

Sequence data source: *H. burtoni*, GenBank accession no.: XP_005946630.1; *M. zebra*, GenBank accession no.: XP_004559087; *O. niloticus*, GenBank accession no.: XP_003451932.1; *P. nyererei*, GenBank accession no.: XP_005753728.1; *N. brichardi*, GenBank accession no.: XP_006807449.1; *S. partitus*, GenBank accession no.: XP_008303257.1; *X. maculatus*, GenBank accession no.: XP_005797233.1; *P. formosa*, GenBank accession no.: XP_007569706.1; *C. semilaevis*, GenBank accession no.: XP_008319438.1; *T. rubripes*, GenBank accession no.: XP_003979020.1; *L. chalumnae*, GenBank Accession no.: XP_006002807.1; *L. oculatus*, GenBank accession no.: XP_006628154.1; *D. rerio*, GenBank accession no.: XP_001919585.2; *A. mexicanus* GenBank accession no.1 and no.2, GenBank accession no.: XP_007254257.1 and XP_007254258.1

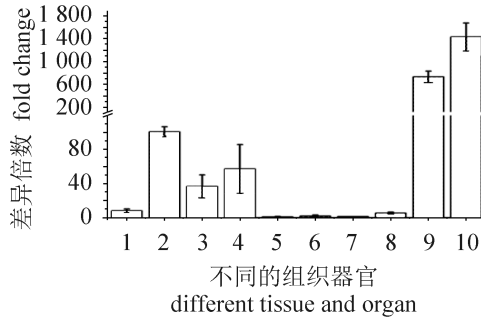


图 6 MOR-2AK2基因在洄游型刀鲚器官、组织中的表达分布

- 1. 肝脏, 2. 精巢, 3. 肌肉, 4. 卵巢, 5. 鳃, 6. 胃, 7. 心脏, 8. 眼, 9. 雄性嗅囊, 10. 雌性嗅囊

Fig. 6 Distribution of MOR-2AK2 transcript in different organs and tissues in migratory C. nasus

- 1. liver, 2. testis, 3. muscle, 4. ovary, 5. gill, 6. stomach, 7. heart, 8. eye, 9. M-olfactory-rosette, 10. F-olfactory-rosette

98%左右。而鄱阳湖水域5个个体的MOR-2AK2基因在5'-非编码区靠近起始密码子的12 bp处, 均与上述10个个体间存在着一个14 bp的碱基片段(GTGTGTGTGTGTTT)差异。另外, 定居型的鄱阳湖群体与洄游型的靖江段和崇明岛群体还有9处明显不同的碱基差别, 其中7处位于开放阅读框内, 2处位于3'-UTR内。预测编码的氨基酸序列比较显示, 定居型群体与洄游型群体之间的相似度仅为84%, 与洄游型个体之间高达98%左右的差异明显。

3 讨论

嗅觉是脊椎动物的重要感觉, 参与动物的定位、摄食、避敌、种间识别、个体和群体辨别、配偶选择和领域标记等功能^[20-21]。鱼类的嗅觉可能还参与了生殖洄游的过程^[15-16,29]。嗅觉

JJ-1	ACTTGTGTTTCTCTGCCTCGTCATGTTGAAAAACATGTTTAAAAACAGATGATTACTGCAATGTGTGTGTGAGAGAAGATTCTCTGCTGTAAGCCTTTTCTGCTGTAAGAGTGCACGT	120
CMD-3	*****	120
JJ-4	*****	120
CMD-4	*****	120
JJ-2	*****T*****C*****	120
JJ-5	*****C*****	120
CMD-2	*****	120
CMD-1	*****	120
CMD-5	*****	120
JJ-3	*****	120
PYH-3	*****C*****	120
PYH-4	*****C*****	120
PYH-5	*****C*****	120
PYH-1	*****C*****	120
PYH-2	*****C*****	120
JJ-1	GGACTAGCTGCCACTTAGCTAAGAGGGTAGCAGTACCATCAATCAGCCTCAGGCCTGTGTGTGTGTTTCTAGGTTATGGCTCTCATGACCAACAACAACAG	226
CMD-3	*****	226
JJ-4	*****	226
CMD-4	*****	226
JJ-2	*****	226
JJ-5	*****	226
CMD-2	*****	226
CMD-1	*****	226
CMD-5	*****	226
JJ-3	*****	226
PYH-3	*****GTGTGTGTGTGTT*****	240
PYH-4	*****GTGTGTGTGTGTT*****	240
PYH-5	*****GTGTGTGTGTGTT*****	240
PYH-1	*****GTGTGTGTGTGTT*****	240
PYH-2	*****GTGTGTGTGTGTT*****	240
JJ-1	AAGTATTTCAGCAGATGATCCAAATTGAGATGCCACTTGATCGCAGACTGTTCAAAGTCACTGTACACATAATCATATCTTCTTCTTTGTTACATTAACACTGTAATGTTTGCATAC	346
CMD-3	*****	346
JJ-4	*****T*****T*****	346
CMD-4	*****T*****T*****	346
JJ-2	*****T*****T*****	346
JJ-5	*****T*****T*****	346
CMD-2	*****T*****T*****	346
CMD-1	*****C*****T*****T*****	346
CMD-5	*****T*****T*****	346
JJ-3	*****	346
PYH-3	*****G*****G*****T*****	360
PYH-4	*****G*****G*****T*****	360
PYH-5	*****C*****C*****T*****	360
PYH-1	*****C*****C*****T*****	360
PYH-2	*****C*****C*****T*****	360
JJ-1	TCCTGAGCAACACAGTGTTCAGGGACACACCTCGTTATGTGCTCTTCGCACACATGCTCTGCAACGACTCTATTAGCTGCTCTTCTCTCAATCATCACCATTTTCTCAITTCCTACA	466
CMD-3	*****	466
JJ-4	*****	466
CMD-4	*****	466
JJ-2	*****	466
JJ-5	*****	466
CMD-2	*****	466
CMD-1	*****T*****	466
CMD-5	*****	466
JJ-3	*****	466
PYH-3	*****C*****	480
PYH-4	*****C*****	480
PYH-5	*****C*****	480
PYH-1	*****C*****	480
PYH-2	*****C*****	480

JJ-1	TCAGACAAACTAAAGCTGCATGCTCATTCTTACTCTTGGTACCTCTCATCTCCACAAATGCTCCCTCAATCTGGCCGTCATGCTACTCGAGCGCTACACTGCCATCTGCTTTCTC	586
CMD-3	*****C*****	586
JJ-4	*****	586
CMD-4	*****	586
JJ-2	*****	586
JJ-5	*****	586
CMD-2	*****	586
CMD-1	*****	586
CMD-5	*****	586
JJ-3	*****	586
PYH-3	*****	600
PYH-4	*****	600
PYH-5	*****	600
PYH-1	*****	600
PYH-2	*****	600
JJ-1	TGGCCACAGCGAATTGGCCACCACTAAGAGAACATATGTGGCAATCGCTGCCATTTGGTCTTTGGGCTGGTGAACCTGTGGTGGATTCAITTTATAACTCTGTACTGACCGAGATT	706
CMD-3	*****	706
JJ-4	*****	706
CMD-4	*****	706
JJ-2	*****	706
JJ-5	*****	706
CMD-2	*****	706
CMD-1	*****	706
CMD-5	*****	706
JJ-3	*****G*****	706
PYH-3	*****T*****	720
PYH-4	*****A*T*****	720
PYH-5	*****T*****	720
PYH-1	*****T*****	720
PYH-2	*****T*****C*****	720
JJ-1	TTTTTACTGAAGAAATTTATGTGGTAGTCAGACAATTTCAACACCACACCATGGCAGGCATGCTCTACCAGGCTCTCAATGGCGTACTATGTACTGTGACTGTGACTGGTTATCTCT	826
CMD-3	*****	826
CMD-4	*****	826
JJ-2	*****	826
JJ-5	*****	826
CMD-2	*****	826
CMD-1	*****C*****	826
CMD-5	*****	826
JJ-3	*****	826
PYH-3	*****	840
PYH-4	*****T*****	840
PYH-5	*****T*****	840
PYH-1	*****T*****	840
PYH-2	*****T*****	840
JJ-1	TCAGCTACATCAACGTCATGCTCGTGGCTCGGTCTGTGTCCAGTGATGAGAAGTCCACAAGGAAGCACACAGGACTCTTCTGCTTCACTGATCCAGCTGGTTCTCTGTCTCAACATGT	946
CMD-3	*****	946
JJ-4	*****	946
CMD-4	*****	946
JJ-2	*****	946
JJ-5	*****	946
CMD-2	*****	946
CMD-1	*****	946
CMD-5	*****	946
JJ-3	*****	946
PYH-3	*****	960
PYH-4	*****T*****	960
PYH-5	*****	960
PYH-1	*****	960
PYH-2	*****	960
JJ-1	TGTTGTACATCAGTATAGTCCGTTTCTGCTGACTGGTTTTTCAGTTTGAAGTTTACAAGACGTTAGCTATGTCATCTTCTGCTGGTCATCTGCTGCCAGATGCTGAGTCCCATCA	1066
CMD-3	*****	1066
JJ-4	*****	1066
CMD-4	*****	1066
JJ-2	*****	1066
JJ-5	*****	1066
CMD-2	*****	1066
CMD-1	*****	1066
CMD-5	*****	1066
JJ-3	*****	1066
PYH-3	*****	1080
PYH-4	*****	1080
PYH-5	*****	1080
PYH-1	*****	1080
PYH-2	*****	1080
JJ-1	TCTACGGCTTAAGAGACAAGGCTGTTGCAATTTGTTTCATGTTTTATTGAAATGTGGCTTTTCTAGAGCCAGCCGAAAGTAAATATACAGTGAATCACTAATATACCTGAATTAAGG	1186
CMD-3	*****	1186
JJ-4	*****	1186
CMD-4	*****C*****	1186
JJ-2	*****	1186
JJ-5	*****	1186
CMD-2	*****C*****	1186
CMD-1	*****C*****	1186
CMD-5	*****C*****	1186
JJ-3	*****	1186
PYH-3	*****C*****	1200
PYH-4	*****C*****	1200
PYH-5	*****C*****	1200
PYH-1	*****C*****	1200
PYH-2	*****C*****	1200

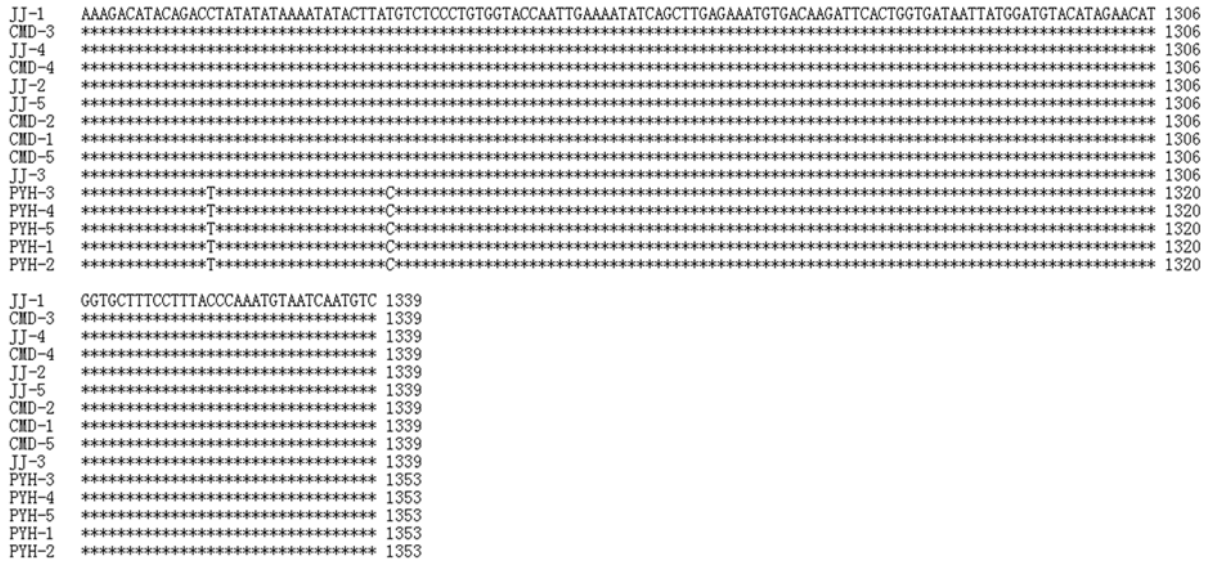


图 7 MOR-2AK2基因在刀鲚不同种群间的差异序列图

“JJ-1~5”代表采自长江靖江段的5尾样本; “CMD-1~5”代表采自鄱阳湖的5尾样本; “PYH-1~5”代表采自崇明岛水域的5尾样本; “*”表示碱基一致; “-”表示出现碱基间隙; 两条红色长竖线内为开放阅读框; 红色方框内为鄱阳湖群体与其他2个群体之间明显的碱基差异

Fig. 7 The different sequences of MOR-2AK2 in C. nasus among different populations

“JJ-1~5” represent 5 samples collected from the Jingjiang section of Yangtze River; “CMD-1~5” represent 5 samples collected from the Poyang Lake; “PYH-1~5” represent 5 samples collected from the Chongming Island; “*” represents a consistent base; “-” represents nucleotide gap; the area in two long red line as one open reading frame; Nucleotide differences significantly in the red box between Poyang Lake group and other two groups

由气味分子通过嗅觉受体基因所编码的受体蛋白所引发。主嗅觉受体(MOR)基因是数量最大的嗅觉受体基因亚家族, 最早发现于褐家鼠(Rattus norvegicus)^[30]体内。目前相关研究主要集中在一些鱼类的模式物种中, 如斑马鱼、红鳍东方鲀、绿斑河鲀(Tetraodon nigroviridis)、三刺鱼(Gasterosteus aculeatus)、青鳞(Oryzias latipes)等^[16, 23, 31-33], 在非模式物种中的研究尚少。MOR基因的编码区长度一般为1 kb左右, 无内含子^[16, 28]。但目前该类基因的命名比较杂乱, 尚无统一的命名方式^[16]。

本研究通过 RACE 技术所获得的洄游型刀鲚 MOR-2AK2基因, 其开放阅读框长度为972 bp, 可编码323个氨基酸残基, 这与已有的鱼类MOR基因编码区长度基本一致^[16, 28, 32]。MOR-2AK2基因的cDNA序列与以基因组DNA为模板利用特异性引物OR-F/OR-R扩增所得到的序列一致, 说明该基因无内含子, 为单外显子结构, 这与现有文献报道的鱼类MOR基因也相符^[28, 32, 34]。预测表明, MOR-2AK2所编码的蛋白具有7个疏水性的α-螺旋跨膜结构, 属于G-蛋白偶联受体家族, 亦符合鱼类嗅觉受体蛋白的分子特性。同源性比对显示, 该基因与已有鱼类嗅觉受体蛋白的氨

基酸序列同源性较高, 与墨西哥丽脂鲤的OR-2AK2-like序列(GenBank登录号: XP_007254257)的同源性高达48%, 且所编码的20多处保守的氨基酸残基也相符^[35], 进一步表明本研究所获得的MOR-2AK2基因为嗅觉受体基因。

基因的组织表达是验证嗅觉基因功能的常用方法之一。本研究分析显示, 虽然刀鲚的MOR-2AK2基因在嗅囊、肌肉、性腺器官、肝脏、心脏、鳃、胃、眼等10种组织器官中均有所表达, 但性腺和嗅囊中的表达量远远高于其他各类组织器官。其中, 又以嗅囊的表达量为最高, 约是性腺器官表达量的7~25倍。值得注意的是, 雌性嗅囊中的表达量约为雄性嗅囊中的2倍, 但精巢中的表达量又约为卵巢中的2倍。这表明, MOR-2AK2基因不但与嗅觉功能有关, 也可能参与了刀鲚的性腺发育或生殖洄游。

对分子结构的进一步分析发现, 在刀鲚MOR-2AK2基因的5'-UTR区域内存在着一段微卫星序列(GT)₅。相比洄游型个体, 定居型个体的微卫星序列内多出14个碱基(GTGTGTGTGTG-TTT)。已有研究表明, 5'-UTR可参与调控基因的转录过程^[36-38]。由于这一区域的序列差异, 使洄游型和定居型MOR-2AK2基因所编码的氨基

酸序列的相似度仅为84%。*MOR-2AK2*基因内这种多余的微卫星序列以及所编码的氨基酸序列差异是否与定居型种群的形成相关,还有待于进一步验证。

本研究在同一个个体的10个平行样本中获得了4条5'-UTR序列,但所有序列的3'-UTR区域均相同。这种多样性的结构可能是*MOR-2AK2*基因的5'-UTR区域在转录过程中发生了可变剪切或“扩张”的缘故,也是对识别更多气味分子的一种适应^[16]。根据其他鱼类的同源基因所编码的氨基酸序列所构建的NJ树比较符合这些物种间的进化关系这一现象(图5),表明刀鲚*MOR-2AK2*基因的进化也与物种的宏进化相关。

参考文献:

- [1] 张世义. 中国动物志(硬骨鱼纲): 鲟形目, 海鲢目, 鲱形目, 鼠鱗目[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 148-156.
Zhang S Y. Chinese Zoography (Osteichthyes): Acipenseriformes, Elopiformes, Clupeiformes, Gonorynchiformes [M]. Beijing: Science Press, 2001: 148-156 (in Chinese).
- [2] 袁传宓, 秦安龄, 刘仁华, 等. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼类种下分类的探讨[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1980(3): 67-82.
Yuan C M, Qin A L, Liu R H, et al. On the classification of the anchovies, *Coilia*, from the lower Yangtze river and the southeast coast of China [J]. Journal of Nanjing University (Natural Sciences), 1980(3): 67-82 (in Chinese).
- [3] 袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状——兼谈改造旧鱼类分类学的几点体会[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1976(2): 1-12.
Yuan C M, Lin J B, Qin A L, et al. The taxonomy history and current situation of fishes on Chinese *Coilia* and talking several realizations of reconstruction old taxonomy of fishes [J]. Journal of Nanjing University (Natural Sciences), 1976(2): 1-12 (in Chinese).
- [4] Cheng Q Q, Lu D R. PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene does not support *Coilia ectenes taihuensis* being a subspecies of *Coilia ectenes* [J]. Journal of Genetics, 2005, 84(3): 307-310.
- [5] 诸廷俊, 杨金权, 唐文乔. 长江口鲚属鱼类线粒体DNA控制区结构分析[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 152-157.
- Zhu T J, Yang J Q, Tang W Q. MtDNA control region sequence structure of the genus *Coilia* in Yangtze river estuary [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(2): 152-157 (in Chinese).
- [6] Ma C Y, Cheng Q Q, Zhang Q Y, et al. Genetic variation of *Coilia ectenes* (Clupeiformes: Engraulidae) revealed by the complete cytochrome b sequences of mitochondrial DNA [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, 385(1-2): 14-19.
- [7] 唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性[J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 224-231.
Tang W Q, Hu X L, Yang J Q. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control region [J]. Biodiversity Science, 2007, 15(3): 224-231 (in Chinese).
- [8] 许志强, 葛家春, 黄成, 等. 基于颌骨长度和线粒体Cyt b序列变异探讨短颌鲚的分类地位[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(3): 242-246.
Xu Z Q, Ge J C, Huang C, et al. Taxonomy of shortjaw tapertail anchovy *Coilia brachygnathus* by jaw length and mitochondrial cytochrome b gene analysis [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(3): 242-246 (in Chinese).
- [9] Liu J X, Gao T X, Wang Y J, et al. Sequence comparison of partial cytochrome b genes of two *Coilia* species [J]. Journal of Ocean University of China, 2005, 4(1): 85-88.
- [10] 郭弘艺, 魏凯, 唐文乔, 等. 基于矢耳石形态特征的中国鲚属鱼类种类识别[J]. 动物分类学报, 2010, 35(1): 127-134.
Guo H Y, Wei K, Tang W Q, et al. Sibling species discrimination for Chinese genus of *Coilia* fishes based on sagittal otolith morphology [J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2010, 35(1): 127-134 (in Chinese).
- [11] 张敏莹, 徐东坡, 刘凯, 等. 长江下游刀鲚生物学及最大持续产量研究[J]. 长江流域资源与环境, 2005, 14(6): 694-698.
Zhang M Y, Xu D P, Liu K, et al. Studies on biological characteristics and change of resource of *Coilia nasus* Schlegel in the lower reaches of the Yangtze river [J].

- Resources and Environment in the Yangtze Basin, 2005, 14(6): 694–698 (in Chinese).
- [12] 黎雨轩, 何文平, 刘佳寿, 等. 长江口刀鲚耳石年轮确证和年龄与生长研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 787–793.
- Li Y X, He W P, Liu J S, *et al.* Annulus validation and age and growth estimation of anadromous *Coilia ectenes* in the Yangtze estuary [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(4): 787–793 (in Chinese).
- [13] Hasler A D, Wisby W J. Discrimination of stream odors by fishes and its relation to parent stream behavior [J]. The American Naturalist, 1951, 85(823): 223–238.
- [14] Dittman A H, Quinn T P. Homing in *Pacific salmon*: Mechanisms and ecological basis [J]. Journal Experiment Biology, 1996, 199(1): 83–91.
- [15] 刘东, 张振玲, 赵亚辉, 等. 鱼类嗅觉器官的形态与生理研究进展[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 122–128.]
- Liu D, Zhang Z L, Zhao Y H, *et al.* Advancements in the morphological and physiological research on the olfactory organ of fishes [J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 122–128 (in Chinese).
- [16] 朱国利, 唐文乔, 刘东. 鱼类嗅觉受体基因研究进展[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 916–927.
- Zhu G L, Tang W Q, Liu D. Research progress of olfactory receptor genes in fishes [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 916–927 (in Chinese).
- [17] Barbin G P, Parker S J, McCleave J D. Olfactory clues play a critical role in the estuarine migration of silver-phase American eels [J]. Environmental Biology of Fishes, 1998, 53(3): 283–291.
- [18] Ueda H. Physiological mechanism of homing migration in *Pacific salmon* from behavioral to molecular biological approaches [J]. General and Comparative Endocrinology, 2011, 170(2): 222–232.
- [19] 陈明, 彭作刚, 何舜平. 青鳉与三刺鱼嗅觉受体(OR)基因的鉴定与进化分析[J]. 中国科学 C辑: 生命科学, 2009, 39(11): 1057–1068.
- Chen M, Peng Z G, He S P. Olfactory receptor gene family evolution in stickleback and medaka fishes [J]. Science in China Life Sciences, 2010, 53(2): 257–266.
- [20] Malakoff D. Following the scent of avian olfaction [J]. Science, 1999, 286(5440): 704–705.
- [21] Stoddart D M. The Ecology of Vertebrate Olfaction [M]. London: Chapman and Hall, 1980: 208–226.
- [22] Hino H, Miles N G, Bandon H, *et al.* Molecular biological research on olfactory chemoreception in fishes [J]. Journal of Fish Biology, 2009, 75(5): 945–959.
- [23] Niimura Y, Nei M. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2005, 102(17): 6039–6044.
- [24] Ngai J, Dowling M M, Buck L, *et al.* The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish [J]. Cell, 1993, 72(5): 657–666.
- [25] Freitag J, Ludwig G, Andreini I, *et al.* Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates [J]. Journal of Comparative Physiology A, 1998, 183(5): 635–650.
- [26] Zhu G L, Wang L J, Tang W Q, *et al.* De novo transcriptomes of olfactory epithelium reveal the genes and pathways for spawning migration in Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e103832.
- [27] 郭弘艺, 唐文乔. 长江口刀鲚矢耳石重量与年龄的关系及其在年龄鉴定中的作用[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 347–352.
- Guo H Y, Tang W Q. The relationship between sagittal otolith weight-age and its use in age determination in *Coilia nasus* from the estuary of Yangtze River [J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 347–352 (in Chinese).
- [28] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [29] Hino H, Iwai T, Yamashita M, *et al.* Identification of an olfactory imprinting-related gene in the lacustrine sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* [J]. Aquaculture, 2007, 273(2–3): 200–208.
- [30] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition [J]. Cell, 1991, 65(1): 175–187.
- [31] Alioto T S, Ngai J. The odorant receptor repertoire of teleost fish [J]. BMC Genomics, 2005, 6: 173.
- [32] Zhang X H, Firestein S. Genomics of olfactory receptors

- [J]. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 2009, 47: 25–36.
- [33] Wellerdieck C, Oles M, Pott L, *et al.* Functional expression of odorant receptors of the zebrafish *Danio rerio* and of the nematode *C. elegans* in HEK293cells [J]. *Chemical Senses*, 1997, 22(4): 467–476.
- [34] Mombaerts P. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors [J]. *Science*, 1999, 286(5440): 707–711.
- [35] Asai H, Kasai H, Matsuda Y, *et al.* Genomic structure and transcription of a murine odorant receptor gene: Differential initiation of transcription in the olfactory and testicular cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 221(2): 240–247.
- [36] Koundrioukoff S, Polo S, Almouzni G. Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints [J]. *DNA Repair*, 2004, 3(8–9): 969–978.
- [37] Meshorer E. Chromatin in embryonic stem cell neuronal differentiation [J]. *Histology Histopathology: Cellular and Molecular Biology*, 2007, 22(3): 311–319.
- [38] Suter B, Livingstone Z M, Thoma F. Chromatin structure modulates DNA repair by photolyase *in vivo* [J]. *The EMBO Journal*, 1997, 16(8): 2150–2160.

Cloning, sequence analysis and tissue expression of *Coilia nasus* olfactory receptor gene *MOR-2AK2*

WANG Cong^{1,2}, ZHU Guoli^{1,2}, TANG Wenqiao^{1,2*}, LIU Dong^{1,2}, YANG Jinquan^{1,2}

(1. Laboratory of Ichthyology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution,

Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201306, China)

Abstract: Olfaction is the important tool of sensing their surroundings to fish and may take part in spawning migration. Fish perform olfactory function by the means of the olfactory receptor proteins that olfactory receptor genes encode. The main olfactory receptor gene is the largest number of olfactory receptor families, which can identify water-soluble odor molecules. To find out the main olfactory receptor genes' differences of *C. nasus* between settlement population and migratory population, the *MOR-2AK2* cDNA sequence of migratory *C. nasus* using rapid amplification of cDNA ends (RACE) was cloned. The sequencing results showed that the open reading frame was 972 bp in length, encoding 323 amino acid residues. The *MOR-2AK2* protein had seven hydrophobic and alpha helix transmembrane structures, belonging to the G-protein-coupled receptor superfamily. Based on qRT-PCR among 10 tissues in migratory *C. nasus*, the result revealed that *MOR-2AK2* was expressed in the olfactory rosettes and sex glands more highly than in others. Further analysis showed, the expression level in olfactory rosettes was 5 to 27 times higher than that in sex glands. In addition, there were differences in tissue expression quantity between male and female. The female olfactory rosette's expression level was 2 times that in male olfactory rosette. But the testis' expression level was 2 times that in ovary. Sequence analysis displayed that the 5 untranslated regions of *MOR-2AK2* gene had microsatellite sequence, (GT)₅. The settlement population had a 14 bp more sequence (GTGTGTGTGTGTTT) than the migratory population. And the amino acid sequence similarity was just 84% between them. From the above, *MOR-2AK2* gene not only took part in olfactory function, but also participated in gonad development or breeding migratory, and may be involved in the formation of settlement population.

Key words: *Coilia nasus*; breeding migration; olfactory receptor gene; sequence analysis; tissue expression

Corresponding author: TANG Wenqiao. E-mail: wqtang@shou.edu.cn

Funding projects: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201203065); National Natural Science Foundation of China (31172407, 31472280); Ministry of Education's Doctoral Discipline Foundation in Higher Educational Institutions (2012310411000); Shanghai Universities Peak Disciplines Project of Fisheries