

不同倍性鲫鱼*MeCP2*基因分子克隆及时空表达分析

周蓉, 伍艳红, 姚潇, 凌欣, 刘文彬, 刘少军*

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081)

摘要: 为了探寻不同倍性鱼生殖育性的表观遗传调控规律, 实验基于不同倍性鲫鱼精巢的转录本信息库设计引物克隆了不同倍性鲫鱼的*MeCP2*基因。序列比对结果发现, 在远缘杂交的过程中基因组发生了遗传重组和变异。基于序列公共部分设计引物, 通过半定量PCR和实时定量PCR的方法分析了*MeCP2*基因在不同倍性鱼发育过程中的时空表达特征。结果还发现, *MeCP2*基因在所有组织中都有表达, 但在脑组织中的表达量最高; 纵向对比性腺的发育过程, *MeCP2*基因的表达量会随着性腺发育成熟而下降; 横向对比不同倍性鱼的性腺发育, *MeCP2*基因在三倍体鱼卵巢中的表达量明显高于二倍体和四倍体鱼, 但在精巢中的表达量随鱼的倍性增加而增加。研究表明, *MeCP2*基因的表达与不同倍性鱼的卵巢发育密切相关, 这为研究鱼类生殖不育的分子机理及其在水产育种上的应用奠定了坚实的基础。

关键词: 异源三倍体鲫鱼; 异源四倍体鲫鱼; *MeCP2*基因; 性腺发育

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

远缘杂交是一种重要的水产养殖育种方式。通过远缘杂交, 可以将亲缘关系较远(属间、种间或者更远)的物种基因组整合在一起。不同物种的基因组整合会使子代在基因型和表现型上与亲本相比均发生一定的变化, 杂交后代表现出杂交优势, 同时也可能出现多倍体个体^[1-2]。以红鲫为母本, 湘江野鲤为父本进行远缘杂交, 获得杂交的二倍体鲫鱼F₁。子代自交, 由于二倍体鲫鱼F₂可以产生不减数的配子, 在子代F₃的群体中选育到两性可育的异源四倍体鲫鱼^[3]。异源四倍体鲫鱼自交形成一个稳定的四倍体鱼的品系, 至今已繁殖到F₂₄。异源四倍体鲫鱼遗传稳定, 遗传背景清晰, 是世界上首例两性可育的异源四倍体脊椎动物, 为研究不同倍性生物的基因表达规律及物种演化提供了理想的研究对象^[3]。同时, 以异源四倍体鲫鱼为父本, 红鲫为母本进行倍间杂交, 获得了异源三

倍体鲫鱼(湘云鲫2号)。异源三倍体鲫鱼在水产应用上具有生殖不育、生长快速、抗病力强等优势经济性状, 是水产养殖的优良品种, 同时也是研究优良经济性状的形成机理的完美模型^[4]。

Zhang等^[5]通过细胞遗传学的方法观察到在异源三倍体鲫鱼进行减数分裂时联会只能形成50个二价体和50个单价体。Long等^[6-8]从生殖内分泌轴相关基因, 如*Gnrh*、*Gth*和*Gthr*, 以及垂体细胞结构研究发现异源三倍体鲫鱼的生殖内分泌轴相对可育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫鱼出现了紊乱的现象。Tao等^[9]通过研究减数分裂相关功能基因*Dmc1*的表达发现异源三倍体鲫鱼卵母细胞减数分裂异常。Zhou等^[10]发现生殖细胞相关的*Piwi-piRNA*通路在异源三倍体鲫鱼卵巢中异常累积。以上证据均表明, 异源三倍体鲫鱼生殖不育会伴随一系列基因表达变化, 而关于基

收稿日期: 2015-01-22 修回日期: 2015-10-19

资助项目: 中国博士后科学基金(2014M560645, 2015T80874); 国家自然科学基金重点项目(31430088); 国家自然科学基金重大国际合作项目(31210103918); 湖南省科技计划资助(2014FJ3084, 2015RS4031); 湖南省生物发育工程及新产品研发协同创新中心(20134486)

通信作者: 刘少军, E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

因表达调控因子在不同倍性鱼生殖发育过程中的作用仍没有报道。

DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式,跟基因表达调控密切相关,因而广泛参与各种重要生命活动和生理过程的调控^[11]。Lewis等^[12]和Meehan等^[13]首次鉴定出MeCP2能特异结合甲基化的CpG双核苷酸,且主要定位在甲基化的近着丝粒区的异染色质上,作为DNA甲基化修饰的阅读器,从分子机制上将表观遗传的DNA甲基化和基因表达调控有机地联系在一起。MeCP2广泛存在于脊椎动物中,尤其是在哺乳动物中高度保守(氨基酸序列相似性达到95%),但是在无脊椎动物和植物中没有被检测到^[14]。MeCP2的主要功能结构域包括MBD(methyl CpG binding domain)结构域和TRD(transcription repression domain)结构域^[15]。MBD结构域有利于和甲基化的CpG双核苷酸结合,尤其是邻近富含A/T的^[16];TRD结构域通过与共抑制因子相互作用来介导MeCP2的转录抑制功能,如mSin3a、N-CoR、c-Ski等^[17-18]。MeCP2作为一种重要的表观遗传调控因子,不仅具备转录抑制功能,还具有其他多重功能,包括能在没有DNA甲基化和组蛋白去乙酰化转移酶的情况下直接调整染色体结构^[19];跟YB-1蛋白相互作用参与RNA剪接^[20];与转录激活因子CREB1结合活化基因转录^[21];与Dnmt1作用共同维持基因组的DNA甲基化^[22]。

本实验通过克隆MeCP2基因的序列,对比MeCP2基因在不同倍性鱼各组织以及不同性腺发育时期的表达差异,发现MeCP2基因的表达与异源三倍体鲫鲤生殖不育的特性、以及多倍体生物体的基因表达规律变化相关,为进一步探寻MeCP2参与调控鱼类生殖不育作用机制及其在水产育种上的应用奠定了前期基础。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及取材

实验所用不同倍性鲫鲤鱼均饲养于湖南师范大学农业部鲫鲤鱼遗传育种中心的池塘里,每天喂食饲料2次。在繁殖季节(每年4—6月份),取性成熟的雌性和雄性红鲫个体催产后进行体外受精,获得二倍体红鲫的受精卵;同样,取性成熟的雌性和雄性异源四倍体鲫鲤个体催产

后进行体外受精,获得异源四倍体鲫鲤的受精卵;取性成熟的雌性红鲫个体和雄性异源四倍体鲫鲤个体催产后进行体外受精,获得异源三倍体鲫鲤的受精卵。所有的受精卵在25℃的水温条件下开始进行胚胎发育。将孵化出的鱼苗放养到池塘,按正常条件饲养,于同年12月份(即8月龄)进行取样,该时期性腺发育未成熟,为非繁殖期样品;次年5月份(即12月龄)再次取样,该时期性腺发育已成熟,为繁殖期样品。Liu等^[23]发现异源三倍体鲫鲤的性腺表现卵巢型、精巢型和脂肪型。由于脂肪型性腺没有精巢或卵巢结构,仅为脂肪组织,故在本实验中只取异源三倍体鲫鲤的卵巢型和精巢型性腺,分别与正常发育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫鲤的卵巢和精巢进行比较。取样时,先将实验鱼用100 mg/L MS-222(Sigma)深度麻醉,再用灭菌的剪刀镊子进行解剖,将分离出的各个组织分别放入标记好的取样管,并迅速放入液氮中速冻,将样品储存在-80℃备用。

1.2 总RNA提取与cDNA第一链合成

取100 mg组织或20颗胚胎样品,在玻璃匀浆器中加入1 mL TRIzol(Invitrogen),匀浆后在12 000 × g, 4℃条件下离心10 min。取上清放入新管,并在室温下静置5 min,加入200 μL氯仿,颠倒混匀然后室温静置3 min,在12 000 × g, 4℃条件下离心15 min。小心取出上层液体,加入500 μL异丙醇,颠倒混匀然后室温静置10 min,在12 000 × g, 4℃条件下离心10 min。去除上清,并加入1 mL 75%乙醇清洗沉淀,在7 500 × g, 4℃条件下离心5 min。去除上清后室温倒置晾干,视沉淀量加入合适体积的RNase Free灭菌水溶解RNA。通过琼脂糖电泳和分光光度计测260 nm和280 nm的吸光值来确定RNA的质量和浓度。

取1 μg总RNA用逆转录试剂盒(TaKaRa)进行逆转录。参照试剂盒说明书,以10 μL反应体系为例,在PCR管中加入0.5 μL Oligo dT Primer(50 μmol/L)、0.5 μL dNTP Mixture(各10 mmol/L)、1 μg总RNA和RNase Free灭菌水至5 μL体积,混匀,65℃变性5 min,取出后迅速放至冰上冷却3 min。继续加入2 μL 5×PrimeScript Buffer、0.25 μL PrimeScript RTase、0.25 μL RNase Inhibitor(40 U/μL)和2.5 μL RNase Free灭菌水,混匀,

42 °C 延伸 60 min, 最后在 70 °C 处理 15 min 使逆转录酶失活。反应结束, 所获产物为 cDNA 第一链, 用作后续 PCR 扩增的模板。

1.3 分子克隆及同源性分析

本实验室前期已测得不同倍性鲫鲤精巢的转录组, 根据转录组信息筛选到 *MeCP2* 基因的部分序列信息。基于对这些序列片段进行 BLAST 比对的结果在翻译起始部分和终止部分设计引物 (*MeCP2-F* 和 *MeCP2-R*) 扩增 3 种不同倍性鲫鲤 *MeCP2* 基因的开放性阅读框。PCR 得到的产物进行 T 载体连接、*E. coli* 转化, 每种鱼分别挑取 10 个克隆测序, 获得 3 种不同倍性鲫鲤 *MeCP2* 基因的编码序列。在 NCBI 的 GenBank 数据库中找到其他脊椎动物中 *MeCP2* 的同源序列, 通过 MEGA 5.1 软件构建邻接系统进化树 (Neighbour-Joining, NJ), 同时采用 Bootstrap 重复检验 1 000 次该进化树的置信度。

1.4 半定量 PCR

半定量 PCR 通过两个步骤完成: 先摸索不同基因合适的扩增循环数, 再用管家基因调齐各样品 cDNA 起始模板量进行目的基因的表达量分析。本研究中, 首先, 在 3 种不同倍性鲫鲤中各取脑和卵巢两种样品进行扩增循环数的摸索, 分别取 20、25、30、35 个循环的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 判断 PCR 的指数扩增期, 以选取合适的循环数, β -actin (β -actin-RTF 和 β -actin-RTR) 为 22 个循环, *MeCP2* (*MeCP2-RTF* 和 *MeCP2-RTR*) 为 30 个循环。然后, 在所有样品中扩增 β -actin 来调齐各样品 cDNA 起始模板量。最后, 以相同量的 β -actin 均一化后的模板, 对 *MeCP2* 基因进行扩增, 用 2% 琼脂糖凝胶跑电泳分析条带亮度, 以确定 *MeCP2* 基因在不同组织中的表达量。本实验所涉及的引物序列均列在表 1 中。

1.5 Real-time PCR

定量 PCR 以 β -actin (β -actin-RTF 和 β -actin-RTR) 为管家基因, *MeCP2* (*MeCP2-RTF* 和 *MeCP2-RTR*) 为目的基因, 使用 2×SYBR GREEN MIX (ABI) 在型号为 ABI 7500 的荧光定量 PCR 扩增仪上完成。先把逆转录模板稀释 40 倍, 再按反应体系加入各个反应物: 10 μ L 2×SYBR GREEN MIX、Primer F/R 各 0.8 μ L、5 μ L 稀释后的 cDNA 模板和 3.4 μ L

表 1 PCR 扩增引物列表

Tab. 1 PCR amplification primers list

引物名称 primer name	引物序列 primer sequence
<i>MeCP2-RTF</i>	AAGGGAACGGCAAGATGTGG
<i>MeCP2-RTR</i>	GCAGTGAAGGGTCGTCATACAG
<i>MeCP2-F</i>	ATGGCCGCCGAGAGAGCGGAG
<i>MeCP2-R</i>	TCAGCTCACTGGCTCGCTCACTG
β -actin-RTF	TCTACAACGAGCTGCGTGTGG
β -actin-RTR	CCTGTTGGCTTTGGGATTGA

DEPC 水, 混匀离心后根据试剂盒指定的程序进行实时荧光定量 PCR 扩增。每个样品均重复 3 次。相对转录本数量用 mean \pm SE 表示, 数据统计分析采用 One-Way ANOVA 方法。

2 结果

2.1 *MeCP2* 基因克隆

根据不同倍性鱼精巢转录组的序列信息设计引物扩增 *MeCP2* 基因的开放性阅读框全长序列。结果表明, 红鲫的 *MeCP2* 基因只有一种 *MeCP2-RCC*, 全长为 1635 bp, 编码 544 个氨基酸; 鲤的 *MeCP2* 基因有两种变异体 *MeCP2-CC1* 和 *MeCP2-CC2*, 全长分别为 1638 和 1623 bp, 分别编码 545 个和 540 个氨基酸。在杂交的异源三倍体鲫鲤和异源四倍体鲫鲤中分别克隆到 2 种 *MeCP2* 变异体。异源三倍体鲫鲤的 *MeCP2* 变异体 (*MeCP2-3n1* 和 *MeCP2-3n2*) 长度分别为 1623 和 1632 bp, 分别编码 540 和 543 个氨基酸。异源四倍体鲫鲤的 *MeCP2* 变异体 (*MeCP2-4n1* 和 *MeCP2-4n2*) 长度分别为 1623 和 1638 bp, 分别编码 540 和 545 个氨基酸。克隆到的 7 种 *MeCP2* 基因的核酸序列和蛋白序列经比对, 其相似性均在 95% 以上, 且均包含 MBD 和 TRD 两个保守结构域 (图 1 和图 2, 表 2 和表 3)。进化树分析显示, 硬骨鱼类和哺乳动物分别聚于不同的分支, 且不同倍性鲫鲤的以上 7 种序列分别聚为 3 个分支。*MeCP2-3n1*、*MeCP2-4n2* 与 *MeCP2-CC2* 相似性较高, 聚在同一个分支上; *MeCP2-4n1* 与 *MeCP2-CC1* 相似性较高, 聚在同一支; *MeCP2-3n2* 与 *MeCP2-RCC* 相似性较高, 分布在同一支 (图 3)。

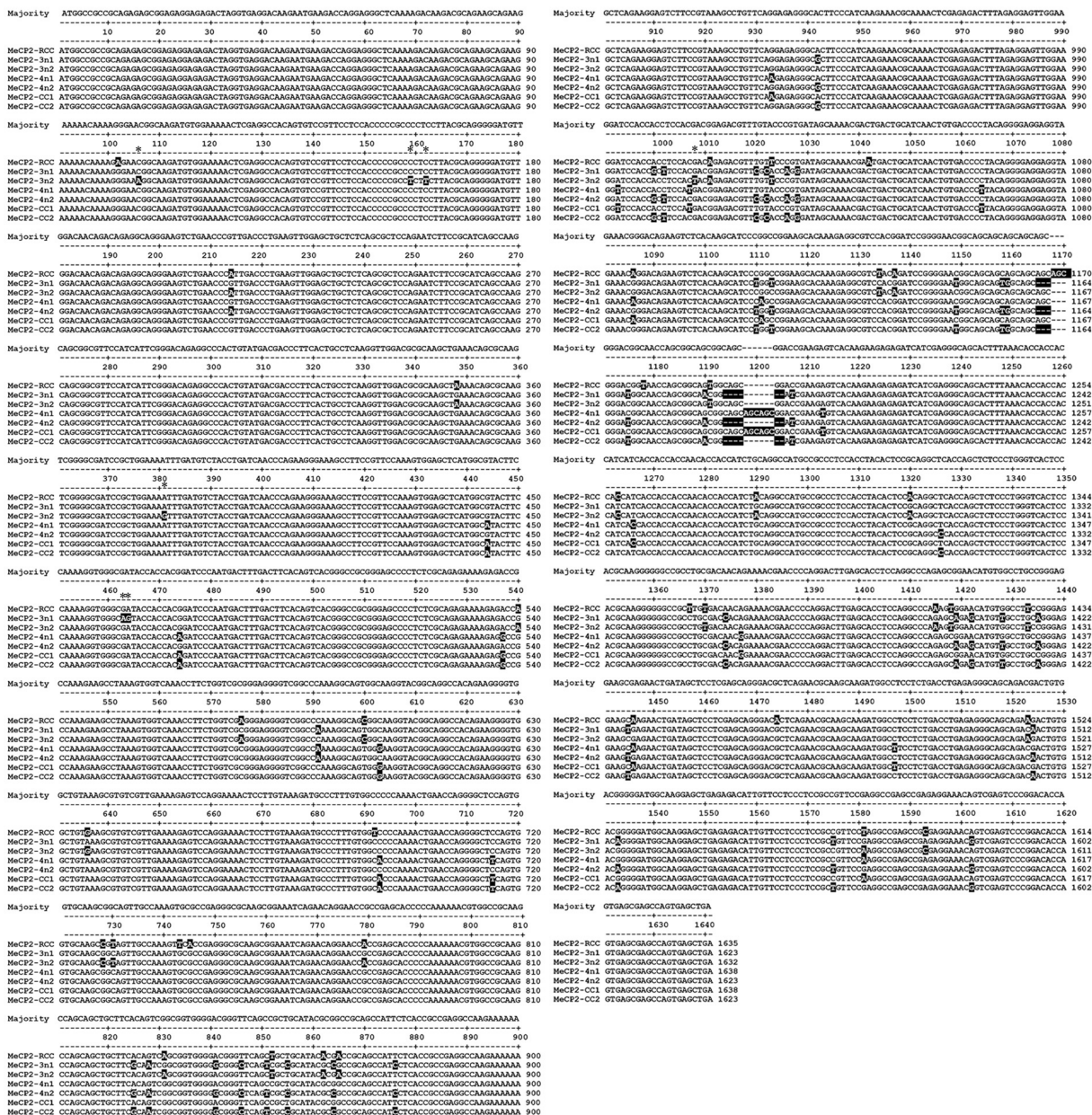


图1 不同倍性鲫MeCP2基因的核苷酸序列比对

*表示在异源三倍体和四倍体鲫中的变异位点

Figure 1. Multiple sequence alignment of MeCP2 gene in different ploidy fishes

* represents the mutations in allotriploid and allotetraploid crucian carp

2.2 MeCP2的组织表达特征

本研究对MeCP2基因在3种不同倍性鲫的肌肉、脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏和性腺(卵巢和精巢)组织中的mRNA表达水平进行了比较分析。结果表明, MeCP2基因在3种不同倍性鲫的各个组织中都能检测到有表达, 且均在脑组织中表达量最高, 在肌肉组织中表达量相对最低, 在心脏、肝脏、脾脏、肾脏和性腺(卵巢和精巢)组织中表达量近似且相对适中(图4)。

2.3 MeCP2在性腺发育过程中的表达特征

本研究继续对MeCP2基因在3种不同倍性鲫的非繁殖期和繁殖期性腺中的表达特征进行了分析。纵观卵巢成熟的过程, 在可育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫的卵巢发育过程中, MeCP2基因的表达量随着卵巢的成熟而降低, 但是在不育的异源三倍体鲫卵巢发育过程中, MeCP2基因在繁殖期的表达量略高于非繁殖期。横向对比MeCP2基因在非繁殖期和繁殖期3种不

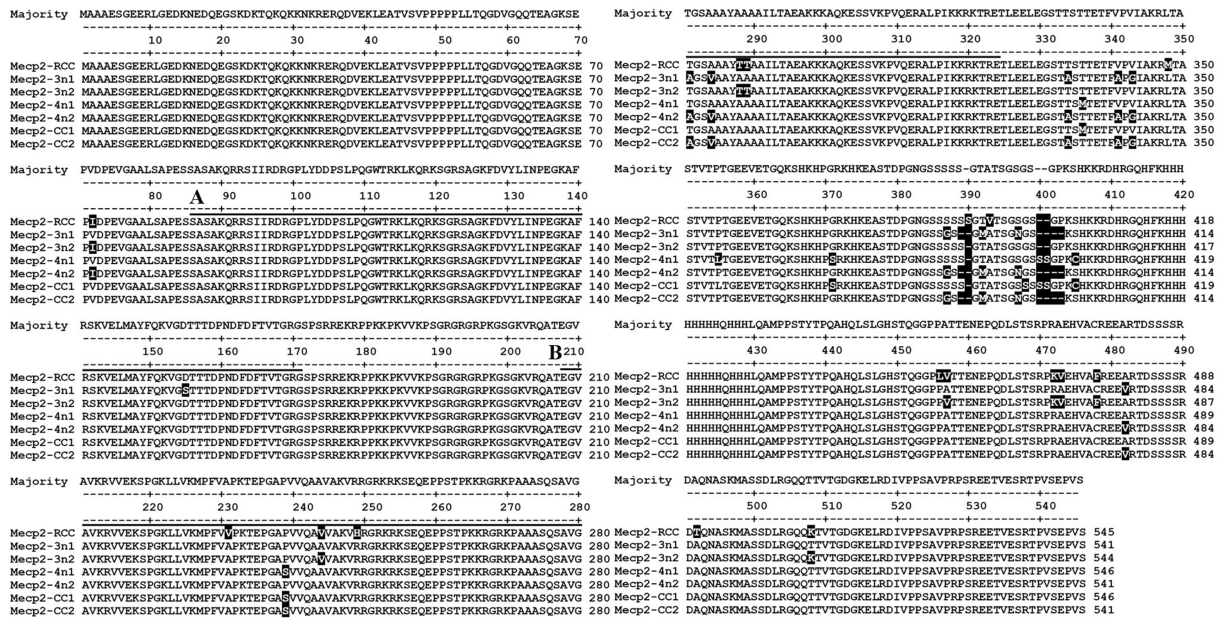


图 2 不同倍性鲫鲤 *MeCP2* 基因的氨基酸序列比对图

A. MBD 结构域; B. TRD 结构域

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of *MeCP2* gene in different ploidy fishes

A. MBD domain; B. TRD domain

表 2 不同倍性鲫鲤 *MeCP2* 基因的核酸序列相似性

Tab. 2 Nucleotide sequence identity of *MeCP2* gene in different ploidy fishes

分离率/ divergence	相似率/ percent identity							
	MeCP2-RCC	MeCP2-CC1	MeCP2-CC2	MeCP2-3n1	MeCP2-3n2	MeCP2-4n1	MeCP2-4n2	
	MeCP2-RCC	96.9	95.2	95.4	99.0	96.8	95.6	MeCP2-RCC
	MeCP2-CC1	3.1		96.7	97.0	99.9	96.7	MeCP2-CC1
	MeCP2-CC2	4.8	2.8		99.4	97.1	99.5	MeCP2-CC2
	MeCP2-3n1	4.6	3.3	0.6		96.7	99.8	MeCP2-3n1
	MeCP2-3n2	1.0	3.0	4.5	4.3		95.9	MeCP2-3n2
	MeCP2-4n1	3.2	0.1	2.9	3.3	3.1		MeCP2-4n1
	MeCP2-4n2	4.4	3.3	0.5	0.2	4.1	3.3	MeCP2-4n2

同倍性鲫鲤的卵巢中的表达量, 发现 *MeCP2* 基因在不育的异源三倍体鲫鲤的卵巢中表达量明显高于可育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫鲤(图 5)。同样, 纵观精巢成熟的过程, *MeCP2* 基因在 3 种不同倍性鲫鲤精巢中的表达量都是表现同样的变化趋势, 随着精巢的成熟而明显降低。但是, 横向对比 *MeCP2* 基因在非繁殖期和繁殖期 3 种不同倍性鲫鲤的精巢中的表达量, 发现 *MeCP2* 基因的表达量在异源四倍体鲫鲤中高于异

源三倍体鲫鲤高于二倍体红鲫, 随着鱼的倍性增加而增加(图 5)。

3 讨论

3.1 *MeCP2* 基因序列在远缘杂交过程中发生了遗传重组变异

Liu 等^[3] 通过 FISH 实验分析了远缘杂交形成的不同倍性鲫鲤的染色体组成, 证明异源三倍体

表3 不同倍性鲫鱼MeCP2基因的氨基酸序列相似性

Tab. 3 Amino acid sequence identity of MeCP2 gene in different ploid fishes

	相似率/% percent identity						
	MeCP2-RCC	MeCP2-CC1	MeCP2-CC2	MeCP2-3n1	MeCP2-3n2	MeCP2-4n1	MeCP2-4n2
MeCP2-RCC	96.1	95.2	95.2	98.9	96.3	95.6	MeCP2-RCC
MeCP2-CC1	3.9	97.4	97.0	97.2	99.8	97.0	MeCP2-CC1
MeCP2-CC2	4.8	2.6	99.6	96.3	97.4	99.6	MeCP2-CC2
MeCP2-3n1	4.8	3.0	0.4	96.3	97.0	99.6	MeCP2-3n1
MeCP2-3n2	1.1	2.8	3.7	3.7	97.4	96.7	MeCP2-3n2
MeCP2-4n1	3.7	0.2	2.6	3.0	2.6	97.0	MeCP2-4n1
MeCP2-4n2	4.4	3.0	0.4	0.4	3.3	3.0	MeCP2-4n2

分离率/%
divergence

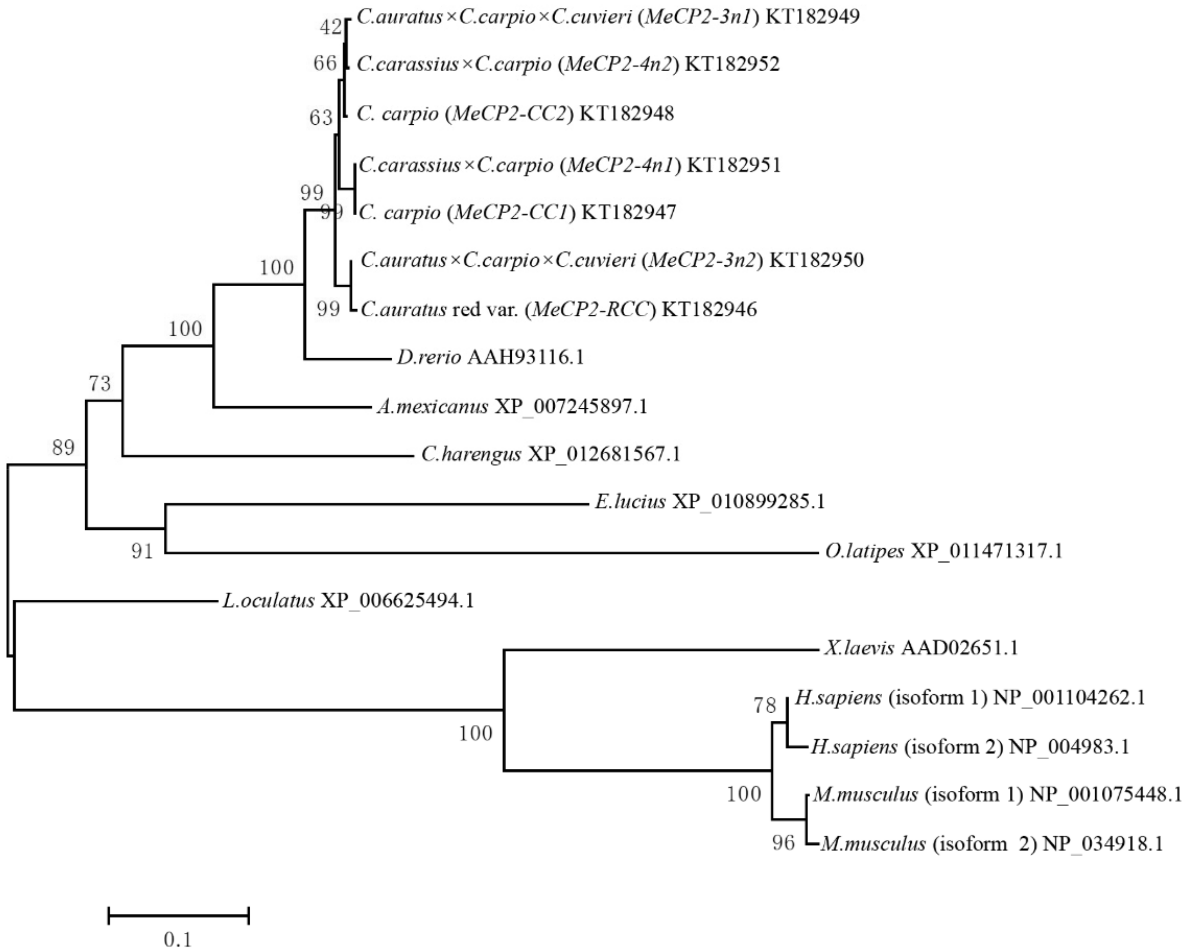


图3 基于不同脊椎动物的MeCP2氨基酸序列构建的NJ系统进化树

异源三倍体鲫鱼 *C. auratus* × *C. carpio* × *C. cuvieri*; 异源四倍体鲫鱼 *C. carassius* × *C. carpio*; 鲤 *C. carpio*; 红鲫 *C. auratus* red var.; 斑马鱼 *D. rerio*; 墨西哥脂鲤 *A. mexicanus*; 大西洋鲱 *C. harengus*; 白斑狗鱼 *E. lucius*; 青鳉 *O. latipes*; 雀鳝 *L. oculatus*; 非洲爪蟾 *X. laevis*; 人 *H. sapiens*; 小鼠 *M. musculus*

Fig. 3 The phylogenetic tree generated by NJ method based on MeCP2 in different species

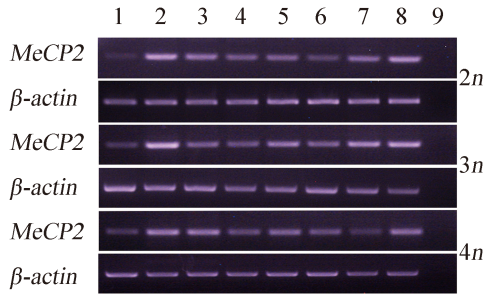


图 4 *MeCP2*基因的组织表达特征

1. 肌肉; 2. 脑; 3. 心脏; 4. 肝脏; 5. 脾脏; 6. 肾脏; 7. 卵巢; 8. 精巢; 9. 阴性对照

Fig. 4 Expressional characteristics of *MeCP2* gene in different tissues

1. muscle, 2. brain, 3. heart, 4. liver, 5. spleen, 6. kidney, 7. ovary, 8. testis, 9. negative control

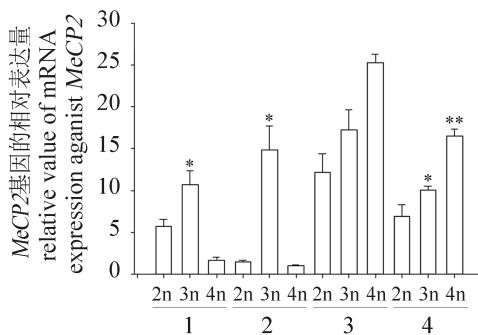


图 5 *MeCP2*基因在不同倍性鱼非繁殖期和繁殖期性腺中的表达特征

*代表差异显著 ($P < 0.05$), **代表差异极显著 ($P < 0.01$)

1. 非繁殖期卵巢; 2. 繁殖期卵巢; 3. 非繁殖期精巢; 4. 繁殖期精巢

Fig. 5 Expressional characteristics of *MeCP2* gene in gonad of non-breeding season and breeding season in different ploidy fishes

* represents significant difference ($P < 0.05$), **represents highly significant difference ($P < 0.01$)

1. non-breeding season ovary, 2. breeding season ovary, 3. non-breeding season testis, 4. breeding season testis

鲫鲤的染色体组包括两套红鲫染色体和一套鲤鱼染色体, 而异源四倍体鲫鲤的染色体组包括两套红鲫染色体和两套鲤鱼染色体。Li等^[24-25]通过RAPD和SSR等分子标记方法从基因组的水平证实了异源四倍体鲫鲤遗传稳定性好, 且偏母性遗传。在本研究中, 在mRNA水平通过对*MeCP2*基因cDNA序列进行比对, 发现远缘杂交后代(异源三倍体鲫鲤和异源四倍体鲫鲤)的*MeCP2*基因序列与父母本相似性很高(>95%), 证

明了远缘杂交过程中基因组的遗传稳定性; 但是后代基因序列与父母本并不完全一致, 而是部分跟母本红鲫一致, 部分跟父本鲤一致, 同时也存在跟父母本均不一致的位点, 说明在杂交过程中出现了重组变异。并且对比异源四倍体鲫鲤中克隆到的两种*MeCP2*基因的序列, 发现这两种序列与父本的相似性均高于母本, 说明该基因在异源四倍体鲫鲤中是偏父性表达的。而异源三倍体鲫鲤中的两种*MeCP2*基因序列, 一种跟母本红鲫的相似性高, 一种跟父本鲤CC2的相似性高, 表达没有明显的偏好性。在异源四倍体鲫鲤中, 本研究发现的*MeCP2*基因在mRNA水平偏父性表达现象与先前Li等^[26-27]报道的基因组水平偏母性遗传出现不一致, 推测有如下两种可能: 第一, 基因组总体偏向母性遗传不能排除少数基因出现与父本更相似的现象; 第二, 在杂交多倍化过程中, 杂交多倍体子代在整合父母本基因组时会通过DNA甲基化、以及基因结构改变等方式选择性表达或沉默父母本基因, 本研究仅分析了cDNA序列, 没有对基因组DNA序列相似性进行分析, 所以可能在异源四倍体鲫鲤中选择性地表达了跟父本更相似的*MeCP2*基因拷贝。

3.2 *MeCP2*与不同倍性鱼性腺发育的相关性

Song等^[28]比较了*MeCP2*基因在16种小鼠组织的60种不同细胞类型中的表达情况, 发现*MeCP2*基因在大部分细胞类型中都有表达, 除了神经胶质细胞等几种细胞。本研究也发现*MeCP2*基因在鱼的各种组织中都有表达。在体细胞分化的过程中, 未分化的细胞中*MeCP2*基因没有表达, 而在已分化的细胞中高量表达, *MeCP2*基因的这种分化标记功能在性腺发育中刚好相反^[28]。本研究中也发现*MeCP2*基因的表达量随雌雄性腺发育成熟而降低。根据Song等^[28]对*MeCP2*基因在卵巢和精巢中的表达分布研究可知, *MeCP2*在两种性腺发育中的作用是不一样的。*MeCP2*基因在卵巢中的早期卵母细胞和滤泡细胞中均有表达, 但在成熟的卵母细胞中没有表达, 说明*MeCP2*跟雌性配子的成熟直接相关; 而在精巢中仅在支撑细胞和成纤维细胞中表达, 在生精细胞的任何阶段都没有表达。此

外, Tao等^[9]发现不育的异源三倍体鲫鲤的卵巢发育停滞在卵黄形成之前, 减数分裂指标 *Dmc1* 基因过量表达, 表明停滞在第一次减数分裂前期, 而可育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫鲤则卵巢发育正常, 均已越过第一次减数分裂前期。在本研究中, 异源三倍体鲫鲤卵巢中 *MeCP2* 基因的表达量明显高于二倍体和四倍体鱼, 说明 *MeCP2* 可能跟卵母细胞的减数分裂进程相关, 从而影响雌性鱼的卵巢发育。在不同倍性鱼的精巢发育过程中, 不育的异源三倍体鲫鲤中 *MeCP2* 基因的表达量介于可育的二倍体红鲫和异源四倍体鲫鲤之间, 表明 *MeCP2* 可能与雄性鱼的精巢发育无关, 其表达模式仅与支撑细胞和成纤维细胞等体细胞的倍性相关。上述结果表明, *MeCP2* 基因表达跟鱼类卵巢发育密切相关, 但是有关 *MeCP2* 调节性腺发育的具体机制仍有待深入研究。本研究将为鱼类生殖不育的形成机理研究奠定坚实的基础, 在水产养殖育种上具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] Zhang Z H, Chen J, Li L, *et al.* Research advances in animal distant hybridization [J]. *Science China Life Sciences*, 2014, 57(9): 889–902.
- [2] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 416–425.
- [3] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, *et al.* The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. *Aquaculture*, 2001, 192(2): 171–186.
- [4] Chen S, Wang J, Liu S J, *et al.* Biological characteristics of an improved triploid crucian carp [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2009, 52(8): 733–738.
- [5] Zhang C, He X X, Liu S J, *et al.* Chromosome pairing in meiosis I in allotetraploid hybrids and allotriploid crucian carp [J]. *Acta zoologica Sinica*, 2004, 51(1): 89–94.
- [6] Long Y, Zhong H, Liu S J, *et al.* Molecular characterization and genetic analysis of *Gnrh2* and *Gthβ* in different ploidy level fishes [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(11): 1569–1579.
- [7] Long Y, Liu S J, Huang W R, *et al.* Comparative studies on histological and ultra-structure of the pituitary of different ploidy level fishes [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(5): 446–453.
- [8] Long Y, Tao M, Liu S J, *et al.* Differential expression of *Gnrh2*, *Gthβ*, and *Gthr* genes in sterile triploids and fertile tetraploids [J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 338(1): 151–159.
- [9] Tao M, Liu S J, Long Y, *et al.* The cloning of *Dmc1* cDNAs and a comparative study of its expression in different ploidy cyprinid fishes [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2008, 51(1): 38–46.
- [10] Zhou Y, Zhong H, Liu S J, *et al.* Elevated expression of *Piwi* and *piRNAs* in ovaries of triploid crucian carp [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 383(1): 1–9.
- [11] Bird A. The essentials of DNA methylation [J]. *Cell*, 1992, 70(1): 5–8.
- [12] Lewis J D, Meehan R R, Henzel W J, *et al.* Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA [J]. *Cell*, 1992, 69(6): 905–914.
- [13] Meehan R R, Lewis J D, Bird A. Characterization of *MeCP2*, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(19): 5085–5092.
- [14] Guy J, Cheval H, Selfridge J, *et al.* The role of *MeCP2* in the brain [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27: 631–652.
- [15] Hite K C, Adams V H, Hansen J C. Recent advances in *MeCP2* structure and function [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2009, 87(1): 219–227.
- [16] Klose R J, Sarraf S A, Schmiedeberg L, *et al.* DNA binding selectivity of *MeCP2* due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG [J]. *Molecular Cell*, 2005, 19(5): 667–678.
- [17] Kokura K, Kaul S C, Wadhwa R, *et al.* The Ski protein family is required for *MeCP2*-mediated transcriptional repression [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(36): 34115–34121.
- [18] Nan X, Ng H H, Johnson C A, *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein *MeCP2* involves a histone deacetylase complex [J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 386–389.
- [19] Georgel P T, Horowitz-Scherer R A, Adkins N, *et al.*

- Chromatin compaction by human MeCP2 assembly of novel secondary chromatin structures in the absence of DNA methylation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(34): 32181–32188.
- [20] Young J I, Hong E P, Castle J C, *et al.* Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(49): 17551–17558.
- [21] Chahrour M, Jung S Y, Shaw C, *et al.* MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription [J]. *Science*, 2008, 320(5880): 1224–1229.
- [22] Kimura H, Shiota K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(7): 4806–4812.
- [23] 刘少军, 胡芳, 周工建, 等. 三倍体湘云鲫繁殖季节的性腺结构观察. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 301–306.
- Liu S J, Hu F, Zhou G J, *et al.* Gonadal structure of triploid crucian carp produced by crossing allotetraploid hybrids of *Carassius auratus* red var. (♀) × *Cyprinus carpio* (♂) with Japanese crucian carp (*Carassius auratus* Cavieri T. et S) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 301–306 (in Chinese).
- [24] 李建中, 鲁双庆, 刘少军, 等. 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本遗传变异的RAPD分析[J]. *水产学报*, 2003, 27(5): 403–408.
- Li J Z, Lu S Q, Liu S J, *et al.* RAPD analysis of genetic variation between the allotetraploid hybrid of red crucian carp × common carp and their original parents [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(5): 403–408 (in Chinese).
- [25] 李建中, 刘少军, 张轩杰, 等. 异源四倍体鲫鲤及其原始亲本遗传变异的微卫星标记分析[J]. *遗传学报*, 2005, 32(4): 378–383.
- Li J Z, Liu S J, Zhang X J, *et al.* Microsatellite marker analysis of genetic variation between the allotetraploid crucian carp and their original parents [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(4): 378–383 (in Chinese).
- [26] Xiao J, Song C, Liu S J, *et al.* DNA methylation analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus* red var.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56409.
- [27] Li Z H, Lu X, Gao Y, *et al.* Polyploidization and epigenetics [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(3): 245–252.
- [28] Song C D, Feodorova Y, Guy J, *et al.* DNA methylation reader MECP2: cell type-and differentiation stage-specific protein distribution [J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2014, 7: 17.

Molecular cloning and spatio-temporal expression characteristic analysis of *MeCP2* gene in different ploidy cyprinid fishes

ZHOU Rong, WU Yanhong, YAO Xiao, LIN Xin, LIU Wenbin, LIU Shaojun*

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Distant hybridization is the important pathway of forming hybrid vigor and polyploid individuals. By combined distant hybridization and interploidy hybridization, we have obtained different ploidy crucian carp. *MeCP2* is a kind of DNA methylation binding protein and functions as a crucial gene expression regulator by translating epigenetic DNA methylation to proper cell response. To discover the epigenetic regulation mechanism of the reproductive ability in different ploidy crucian carp, this study cloned the *MeCP2* gene in different ploidy crucian carp based on the transcriptome of testis. Sequence alignments indicated that there are genetic recombination and variation in genome during distant hybridization. A pair of common primers was designed to analyze the spatial and temporal expressional characteristics of *MeCP2* gene during the development process of different ploidy fish through semi-RT PCR and real-time PCR. The results showed that *MeCP2* gene was expressed widely with the highest expression in the brain. Compared the different stages of gonadal development, the expression of *MeCP2* gene decreased coupled with gonad maturation. While compared the different ploidy crucian carp at the same developmental stages, *MeCP2* gene was expressed significantly higher in the ovary of triploid fish than in diploid and tetraploid fish, while increased in the testis coupled with the ploidy change. Taken together, the expression of *MeCP2* gene is closely related to ovary maturation of different ploidy fish, which lays the foundation for studying the mechanism and application of fish infertility in genetic breeding and aquaculture.

Key words: allotriploid crucian carp; allotetraploid crucian carp; *MeCP2* gene; gonadal development

Corresponding author: LIU Shaojun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn

Funding projects: China Postdoctoral Science Foundation (2014M560645 and 2015T80874); National Natural Science Foundation of China (31430088); Major International Cooperation Projects of the National Natural Science Foundation of China (31210103918); Science and Technology Program of Hunan Province (2014FJ3084, 2015RS4031); Cooperative Innovation Center of Engineering and New Products for Developmental Biology of Hunan Province (20134486)