

文章编号: 1000-0615(2018)02-0204-12

DOI: 10.11964/jfc.20170210712

拟穴青蟹*Sp-Sox14*基因在胚胎发育和性腺发育过程中的表达

梁可莹¹, 张子平², 廖佳倩¹, 邹志华¹, 王艺磊^{1*}

(1. 集美大学水产学院, 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021;

2. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 为了解*Sox14*基因在拟穴青蟹胚胎发育和性腺发育过程中可能起到的调控作用, 实验从青蟹性腺转录组数据库中得到全长为2558 bp的*Sp-Sox14* cDNA序列, 该序列编码一个包含427个氨基酸的蛋白, 包含一个HMG-box。进化树分析表明, *Sp-Sox14*与其他节肢动物的*Sox14*亲缘关系较近。实时定量PCR结果显示, *Sp-Sox14*在成蟹雌雄各组织中均有不同程度的表达, 其中在卵巢和雄蟹心脏中的表达量最高。在胚胎发育过程中, *Sp-Sox14*在复眼色素形成期的表达量显著高于其他时期。在性腺不同发育阶段, *Sp-Sox14*在卵黄发生前期(O2)的表达量显著高于卵巢其他发育阶段; 而在精巢发育过程中, 其表达量在成熟精子期(T3)高于精母细胞期(T1)和精子细胞期(T2)。推测其参与卵巢的前期发育以及精子成熟等过程。整胚原位杂交结果显示, *Sp-Sox14*在青蟹胚胎复眼色素形成期阳性信号定位于头部以及鄂足附近, 在近孵化期定位于复眼附近, 幼体孵出期则在头部仍有少量信号, 暗示其与青蟹神经器官的形成以及体节附肢的发生有关。

关键词: 拟穴青蟹; *Sp-Sox14*; 胚胎发育; 性腺发育; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 968.25

文献标志码: A

早在1990年, Gubbay等^[1]在小鼠体内第一次发现了*Sry* (Y染色体上性别决定区域, sex determining region of Y chromosome)基因, 之后与其序列中保守的HMG-box (高迁移率结构域, high mobility group box)具有高度相似性的*Sox* (*sry*-like high-mobility group box)基因家族相继被发现与证实^[2-4]。HMG结构域蛋白中含有2到多个典型HMG结构域, 该结构域一般含有80个左右的氨基酸残基, 形成一个L型, 并且含有3个 α 螺旋和一个N端的B片层^[5], 使得*Sox*蛋白能以空间特异性的方式与DNA结合, 从而调节靶基因的转录^[2]。对脊椎动物的不同细胞及不同组织的*Sox*基因的突变和敲除的大量研究表明, *Sox*基因编码的蛋白作为一类重要的转录因子, 对胚胎发育、器官形成、性别决定^[1, 6]、神经系统形成^[7-10]、骨骼发育^[11]和血细胞生成^[12-13]等多个过程起着不可

或缺的作用。基于对*Sox*基因的完整HMG-box、基因结构、氨基酸序列及其在不同发育过程的广泛表达功能的比较, 可将*Sox*基因分成A~J共10个亚族^[14-16], 其中, *SoxB*又可分为*SoxB1*和*SoxB2*两个亚族。*SoxB1* (*Sox1*、*Sox2*和*Sox3*)作为转录激活子, 而*SoxB2* (*Sox14*和*Sox21*)作为转录抑制子。*SoxB2*中的HMG-box结构域的C末端中含有一个转录抑制域, 且*Sox14*比*Sox21*的转录抑制效果更为强烈。通过该C末端转录抑制域, *SoxB2*与*SoxB1*竞争结合DNA或者与其他蛋白相互作用, 来调节神经系统的发育和分化^[17]。神经发生(神经元发育)始于胚胎期, 此时神经前驱蛋白能使*Sox14*和*Sox21*基因上调表达, 干扰*SoxB1*转录激活子的活性^[18]。*Sox14*作为转录阻遏物, 可能在脊髓和脑神经的腹侧中间神经特化中产生作用, 与*Sox1-3*拮抗从而促进神经细胞分

收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-04-09

资助项目: 国家自然科学基金(31472266, 41676161, 31672681)

通信作者: 王艺磊, E-mail: yileiwang@jmu.edu.cn

化^[19-20]。*SoxB*基因除了被发现在神经祖细胞有表达以外,在神经嵴及其衍生的组织细胞也有表达,神经嵴在胚胎随后的发育过程中,可迁移至特殊区域,进一步发育形成外周神经系统以及眼睛等重要器官结构^[21]。与脊椎动物相比,无脊椎动物*SoxB*基因的研究甚少。有文献指出,在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)胚胎形成过程中,*Sox14*基因广泛且微量地表达^[22];三角涡虫(*Dugesia japonica*)的*SoxB*基因特异表达于头部和肠道,且对三角涡虫头部进行切除后,*SoxB*基因的表达可参与促进头部和神经再生^[23];中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中发现一个*SoxB2*基因在性腺中特异表达^[24]。有关拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)*Sox14*基因在性腺发育和胚胎发育中可能作用的研究尚未报道。

拟穴青蟹隶属于甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),梭子蟹科(Portunidae),青蟹属(*Scylla*),在我国主要分布于南方沿海各省海域。由于其肉质细嫩鲜美、营养丰富、经济价值高,且个体大、生长快、适应性较强等优点,已成为我国东南沿海重要的海洋经济蟹类之一^[25-26]。目前人工养殖的苗种仍主要来自海区捕捞^[27],近十几年来青蟹养殖面积不断扩大,而可捕捞的蟹苗资源越来越少,苗种问题已成为青蟹养殖的瓶颈,限制了青蟹养殖业的发展^[28],对青蟹胚胎发育的研究将有助于其人工繁育的开展。大部分蟹类在发育过程中存在变态现象,胚胎与成蟹在形态上具有较大差异,同时神经器官和生殖器官的结构也发生相应变化,故研究蟹类胚胎发生发育的规律,对了解其体节分布、附肢形成以及神经系统的形成有重要作用。蟹类胚胎发育研究目前多侧重于形态学上的观察^[29],胚胎发育的分子机制研究甚少,对于胚胎时期神经系统的发生发育的分子机制的研究更是薄弱。本实验室在前期的转录组中获得了拟穴青蟹*Sp-Sox14*序列(GenBank登录号:FJ613627.1),鉴于*Sox*家族在胚胎发育、性别决定、神经系统发育等方面的作用,本实验首先对*Sp-Sox14*序列进行生物信息学分析,同时结合实时定量PCR和整胚原位杂交技术,研究*Sp-Sox14*基因在拟穴青蟹各组织,性腺各发育阶段和胚胎发育中的表达,推测其在性腺发育和胚胎发育中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟穴青蟹购自福建省厦门市集美农贸市场,不同发育阶段性腺的分期参照本实验室已发表的方法^[30]。不同发育阶段的雌雄青蟹各取5只,成熟个体除取性腺外,另取肝胰腺、鳃、肌肉、眼柄、胸神经节、脑神经节、胃、肠等组织,立即放入液氮速冻过夜后转移置-80℃保存备用。实验拟穴青蟹各期胚胎取自2016年1月和2016年2月,分两批从漳州诏安县购入已受精拟穴青蟹共15只,体长约10~13 cm,体质量为330~500 g。青蟹饲养于集美大学海水场,定期进行干露促其抱卵,并用镊烫法去除青蟹单侧眼柄,进一步促进其抱卵。按照陈锦民^[31]的阶段划分,将每一时期胚胎的一部分置于RNAlater,4℃过夜后转至-20℃保存,用于实时定量PCR实验;另一部分置于4%多聚甲醛(PFA, paraformaldehyde),4℃固定过夜后,用1×PBS洗去PFA,并依次于70%、80%、90%、100%甲醇中梯度脱水,每次20 min,最后于新的100%甲醇,-20℃保存,用于整胚原位杂交实验。

RNA抽提试剂盒Total RNA Kit 2(OMEGA, USA);逆转录试剂盒RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Lithuania, EU)与T7 RNA聚合酶(Lithuania, EU)购自Thermo Scientific公司;AceQ®qPCR SYBR®Green Master Mix购自南京诺唯赞公司;10×DIG-RNA Labeling Mix (Indianapolis, IN, USA)与Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments (Indianapolis, IN, USA)购自罗氏公司。

根据*Sp-Sox14*序列设计定量引物和原位杂交引物及内参18S rRNA引物,交由上海捷瑞生物工程公司合成(表1)

1.2 实验方法

生物信息学分析 序列同源性比对用BLAST软件(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行;用NCBI中的ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行开放阅读框确定及序列翻译;使用Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)推测蛋白的等电点和分子量;用InterProScan software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)查找基因的保守结构域;利用NetNGlyc1.0 Server (<http://www.cbs.dtu>

表1 实验中使用的引物及序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers used in this study

引物名称 primer name	核酸序列(5'-3') nucleotide sequence	用途 usage
<i>Sp-Sox14</i> RT-F	GTTACCTGTGCGACAACAC	荧光定量 PCR q-RT PCR
<i>Sp-Sox14</i> RT-R	GGTACTTGCTGTGGGTTCGT	
18s rRNA-F	ATGATAGGGATTGGGGTTTCC	
18s rRNA-R	AGTAGCGACGGGCGGTGT	
<i>Sp-Sox14</i> -ISH-F	GTGGAGAAGGGGCGAGTGT	整胚原位杂交 WISH
<i>Sp-Sox14</i> -ISH-R	TGGGGCAGGGCTGATAGA	
T7-F	TAATACGACTCACTATAGG	

dk/services/NetNGlyc/)查找糖基化位点, NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 查找磷酸化位点; 采用SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)寻找信号肽; TMHMM 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)预测蛋白跨膜结构域; 用MEGA 7.0软件中的Neighbor-Joining(NJ)法构建系统进化树。

总RNA提取与实时定量PCR 根据Total RNA Kit 2(OMEGA, USA)说明书操作方法, 提取青蟹胚胎各时期(卵裂期、囊胚期、原肠胚期、无节幼体期、五对附肢期、七对附肢期、复眼色素形成I期、复眼色素形成II期、复眼色素形成III期、近孵化期、孵化期)、不同组织(性腺、心脏、肌肉、鳃、胃、肠、脑神经节、胸神经节、肝胰腺、眼柄)和性腺发育不同时期(卵巢发育时期: 增殖期、卵黄发生前期、卵黄发生早期、卵黄发生中期、卵黄发生晚期。精巢发育时期: 精母细胞期、精子细胞期、成熟精子期)的总RNA。用分光光度计Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)测定RNA浓度和纯度, 同时取0.5 μ L样品用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性; 取2 μ g总RNA, 在逆转录前用DNase I处理, 然后根据逆转录试剂盒的具体操作说明, 利用随机引物合成cDNA第一条链, 稀释适当倍数用作定量PCR模板; 定量检测时每个样品做5个平行, 使用青蟹18S rRNA作为内参基因。基因表达水平由相对表达量(relative quantification, RQ)的平均值 \pm 标准误(mesn \pm SE)表示; 利用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为显著性差异。

整胚原位杂交 PCR扩增目的基因片段, 目的产物经电泳检测, 割胶回收后, 连接到PGEM-T载体, 使得目的片段的5'端带有T7启动子。转化后进行单克隆检测以确认目的片段插入方向; T7-F引物与目的基因正向引物(*Sp-Sox14*-ISH-F)能检测出的阳性克隆为反向插入; T7-F与目的基因反向引物(*Sp-Sox14*-ISH-R)能检测出的阳性克隆为正向插入; 然后提取质粒并测序, 并且分别用T7-F与目的基因正反向引物, 以质粒为模板进行PCR反应, 以制备线性化cDNA作为体外转录模板; 利用T7 RNA聚合酶进行体外转录制备正义(正向插入的cDNA为模板)与反义(反向插入的cDNA为模板)RNA探针; 探针于-80 $^{\circ}$ C保存备用。根据文献[32]中的方法, 进行整胚原位杂交实验。实验后使用德国徕卡公司Leica DM5500B正置显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 *Sp-Sox14*基因序列分析

Sp-Sox14 cDNA全长2558 bp (图1), 序列包括77 bp的5'UTR, 1284 bp的开放阅读框和1196 bp的3'UTR (包括poly A尾)。3'UTR含有典型的加尾信号AATAA。*Sp-Sox14* cDNA序列可编码含427个氨基酸的蛋白, 预测的蛋白分子量约为47.43 ku, 等电点约为6.04。*Sp-Sox14*蛋白第50~116位氨基酸为Sox基因家族保守结构域HMG-box。

SignalP分析未发现其有信号肽, THMHMM分析其无跨膜区。NetPhos 3.1 Server预测显示其含有40个丝氨酸磷酸化位点, 17个苏氨酸磷酸化位点和5个酪氨酸磷酸化位点。NetNGly 1.0 Serv-

1 TCGCTTCTATCTCAGGTTTTAGGACTTGAGACTTGTACCTAGTGCCTTAATAGACTTTAA 60
 61 CCAATTTAGTGATCAAAAatgttgccacaaaegtaacagatcgttccacatcgeccacca 120
 1 M L P Q S V T D R S T S P T T 15
 121 caactcaggagtaaatatttggatctcaactagtccaagcaaacctccagaactccttaca 180
 16 T Q G V I F G S Q L V Q A N S R T P Y S 35
 181 gcgatgctactcagacgaagaagcataacccaaaccacgtgaagcggccaatgaacgcct 240
 36 D A T Q T K K H N P N H V K R P M N A F 55
 241 tcatggtttggtcacagatggagcgggagaaattgtcaagttcgccttgacatgcaca 300
 56 M V W S Q M E R R E I V K F A P D M H N 75
 301 acgcagagatctccaagcagctgggaagagatggaagaacctgcagaggaccageggc 360
 76 A E I S K Q L G K R W K N L T E D Q R Q 95
 361 agccatacatccaagaggcggaaagactacgtctgctgcacatgcaagaatatccagatt 420
 96 P Y I Q E A E R L R L L H M Q E Y P D Y 115
 421 ataaataccggccacgcaagaagacaaaatctgtaactctaagtcagtgagaaggggc 480
 116 K Y R P R K K T K S G N S K S V E K G R 135
 481 gagtgtcgaagctaaggacaagaacagttccagegttaatgccatcaagggtgtcaagc 540
 136 V S K A K D K N S S S V N A I K G V K L 155
 541 tgaccgcagaccatccaggcgcacgtcaccacaggtctgtcatccataaaccacaaca 600
 156 T A D P S R A H V T T G L S S I N H N K 175
 601 agctcaaaccaagctcaagattgacaaaaagtcaaggactcgatccggaacacaaaaca 660
 176 L K L K L K I D K K F K D S I R N T N 195
 661 acacacacactatgtacgttcccatcgcgcagtgacgtcggcctgaggtgcctgccca 720
 196 T H T M Y V P I A Q C T S P A E V P A T 215
 721 cgcccaacgagatgcagcctcggcggagagcgcctcctctatgacaaccagtgacca 780
 216 P N E M P A S P E S A S L Y D N H V T T 235
 781 ccacgtcctcagtaggagcagcagcgcgcagcctctatcagcctgccccagacaagg 840
 236 T S S S R S S S R A A S I S P A P D K E 255
 841 agcccttcatttatggtctctacacaatcgagagtggcctggcctcaccctccctccggc 900
 256 P F I Y G L Y T I E S A P G L T S L R P 275
 901 cagaggcctcgtgtcctcaccactgtcacatcctctaaagatgacctgacgacgacg 960
 276 E A L V S S T T V T S S K D D H D D D D 295
 961 acgatgatgatgagaaggatgatgaaaacaggacattctgatgtataatcgaaaac 1020
 296 D D D D E K D D V K Q D I L M Y N R K R 315
 1021 gccatgcggtgcgggatgaagtgtttgcacctgcacggctcctccaacttcccttcca 1080
 316 H A V R D E V F A P R P V P P T S L S S 335
 1081 gttcacgcggctgategctccgccatcaagatggagccgtggacatcaagcaggaac 1140
 336 S R A A D P P P I K M E P L D I K Q E P 355
 1141 cgccaacggagtccgcgctggcgcgactcgcactcctgcagcactgctccagataacct 1200
 356 P T E S A L A D L D S L T D L L Q I P S 375
 1201 ccgacttcaaagtcgaagtcgatgaaatcaactctgatctcactttgacgctgtgtcca 1260
 376 D F K V E V D E I N S D L D F D A V S T 395
 1261 catcatcggggtcacactttgagttctctgacgtgtcgggcatgttgagtgatattggtg 1320
 396 S S G S H F E F S D V S G M L S D I G V 415
 1321 tgagcaatgactgttggcgcgacatcggtatcatcaactgaTAACCCCGGCAGGCGAG 1380
 416 S N D C W A D I G I I N * 427
 1381 CCGCGCAGTGTGCCGTCATCGTGCCTGTGGTGCCAAGCGCACGATTCAGCAACATAAAC 1440
 1441 TTCCACTGAAGTTGTGGAGTCGAGGAAAAGCAGCGGTGATCTAGTGTAGTGATGACTT 1500
 1501 CATGATTCTCCGTGTAATTCTTCATGTTATTACATATATTACTTATAGGAATCATGAGAT 1560
 1561 ATGTGGTGGATTGACCTCTCATTTCAGTGATTTCGAAATATAGTCATACCGACTCTAG 1620
 1621 GAACATACACCATTATAGTGTGAAAAGTGCCAGTTTCACAGGTGGTCGCGTAATACAAA 1680
 1681 CAATAAGTTCACCTGTGCGACAACACGCTCCCAGAGGACGTAATGTTAAGTGCATTTTTT 1740
 1741 TTTTCATCTCAGAGCTGTTTTATTACGTTGTCATCCCATCACCAGTACTGCAAGCATCA 1800
 1801 CTCATTTTCATGTATACATCGTTATTTTCATCATTACATAAATGGAGCATTTTTTAAAGC 1860
 1861 CAAAAGCCACAAAACCTCCAAAAGCCACGAACCCACAGCAAGTACCCTGAACCTGAGGTGG 1920
 1921 CGCCAGAACCATTGCCATTAAGTTTGAGTTGAGACGCTGAAGAAGAAAGAAGAACCACTT 1980

(图 1 Fig. 1)

1981 TCCGAAGAGCCATGGAACGGATCCCTCTCAAGTGTGCATTTAGTGGTTCATCATCTCTTC 2040
 2041 GTTGATCTGCTCTTGAGAGGTTTGTGTTTATTCCCTTGAGTAGTACTGGGACTGTTG 2100
 2101 ATCGTTAGAGAGTCACTGATCCACACACAATACATACGCCGTTTGTCTTTTGGCTGGGCG 2160
 2161 AGTCAAGTTGAAGGGAAGGATAACGGTAACGTTTAGTACTTGAGGACACGGGAAGTTCAG 2220
 2221 GATATCAGAGCCTCAGTGTATAATGTTAAGTCTGGTCTCTCCTCACCAGTAAATTA 2280
 2281 TTTCAATAACAGGAATTACCTCCTAACATAATTAGGCCACCAACCACCTCCCCACC 2340
 2341 CCAACCCCTGTCTCTAGTCTTTACGTTTCAAGTTACTCCAGAGAAAGAAAACAAGAAAA 2400
 2401 AATGTATTTAATCATTGACGAAGAAGTCTCCACAACGCATCCGATGGGCATTTAGTC 2460
 2461 TGAACCGTGTGTACACAGATGAGCAGGACGACACGGGCTGGACAAGGAGCTGTTGTTG 2520
 2521 AACTAGCTTGTAAAGTCCCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA 2558

图 1 Sp-Sox14 cDNA全长及其编码的氨基酸序列

字体加粗表示起始和终止密码子；灰色阴影表示保守结构域HMG-box；糖基化位点由方框标示；磷酸化位点由双下划线标出

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of Sp-Sox14 from S. paramamosain

The initiation codon (atg) and the stop codon (taa) are all characterized in bold; the HMG-box is in gray; the glycosylation sites are presented with a frame; the phosphorylation sites are indicated in double underline

er预测其有3个糖基化位点。

使用MEGA 7.0软件对拟穴青蟹及其他18个物种的Sox14氨基酸序列构建系统进化树，采用NJ法分析，结果显示，拟穴青蟹的Sp-Sox14与盲

蝽(Lygus hesperus)和茧蜂(Fopius arisanus)聚为一小支，之后与地中海实蝇(Ceratitis capitata)和黑腹果蝇聚为一大支，而脊椎动物Sox14聚为另一支(图2)。

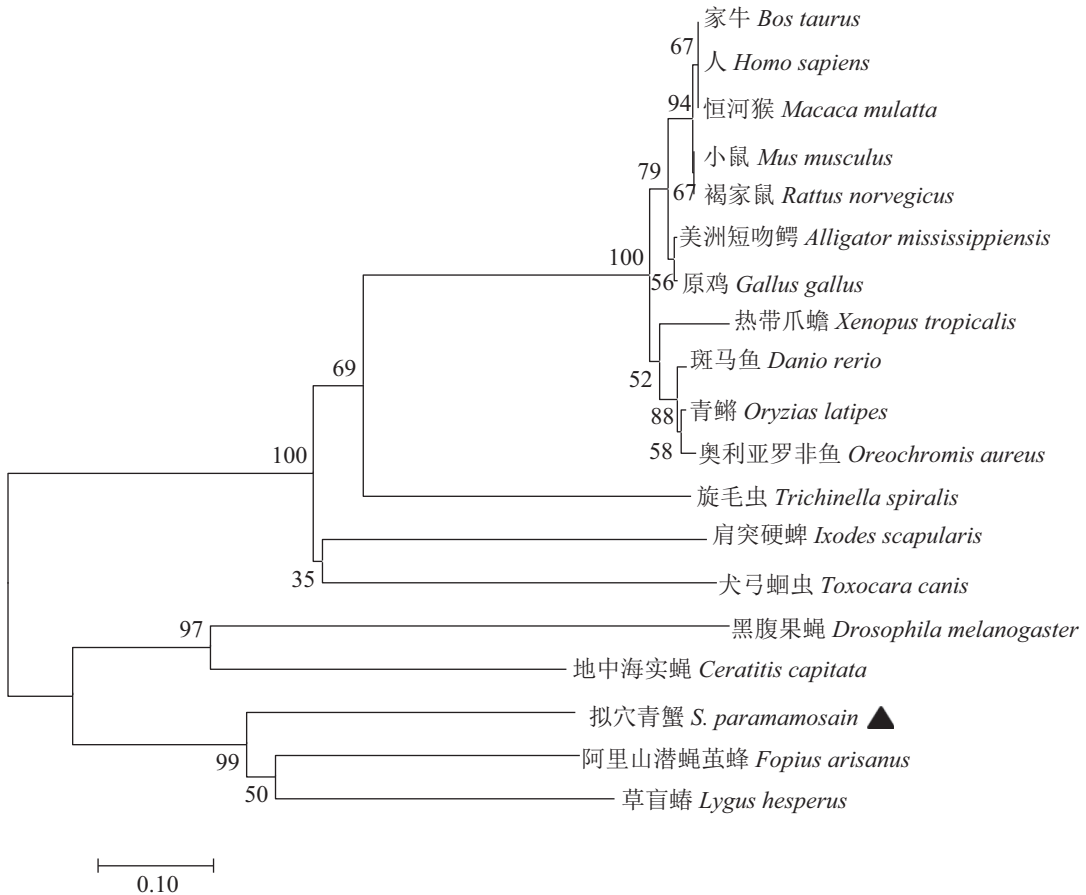


图 2 根据19个物种构建的Sox14氨基酸序列的系统进化树

Sp-Sox14用三角形标出

Fig. 2 The phylogenetic tree of Sox14 amino acid sequences from different species

Sp-Sox14 is marked by triangle

2.2 *Sp-Sox14* mRNA在胚胎各发育时期的表达

实时定量PCR结果表明, *Sp-Sox14* mRNA在青蟹胚胎各时期都有表达(图3), 但在复眼色素形成1、2、3期表达量显著高于其他时期($P<0.05$)。

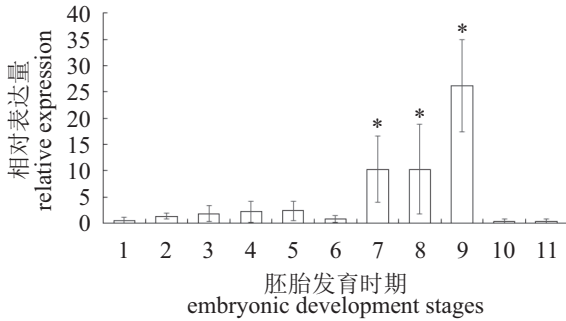


图3 *Sp-Sox14* mRNA在胚胎各发育时期的表达情况

1. 卵裂期; 2. 囊胚期; 3. 原肠胚期; 4. 无节幼体期; 5. 五对附肢期; 6. 七对附肢期; 7. 复眼色素形成I期; 8. 复眼色素形成II期; 9. 复眼色素形成III期; 10. 近孵化期; 11. 孵化期。*代表显著性差异($P<0.05$)

Fig. 3 The expression of *Sp-Sox14* mRNA during embryogenesis

1. cleavage; 2. blastula; 3. gastrula; 4. nauplius; 5. 5 pairs of appendages; 6. 7 pairs of appendages; 7. eye-pigment formation stage I; 8. eye-pigment formation stage II; 9. eye-pigment formation stage III; 10. prehatching; 11. hatching; *represents significant difference ($P<0.05$)

2.3 *Sp-Sox14* mRNA在雌雄各组织中的表达

以18S作为内参基因, 实时定量PCR结果显示, *Sp-Sox14*在拟穴青蟹雌雄各组织中均有不同程度的表达(图4), 其中在卵巢和雄蟹心脏中的表达量最高; 在雌雄青蟹的肌肉中均有较高水平的表达; *Sp-Sox14*在雌蟹肝胰腺中的表达量显著高于雄蟹。

2.4 *Sp-Sox14* mRNA在性腺各发育时期的表达

在卵巢不同发育阶段, *Sp-Sox14*的表达量在O2期(卵黄发生前期)显著高于其他卵巢发育阶段($P<0.05$); 在精巢不同发育阶段, *Sp-Sox14*的表达量虽然呈上升趋势, 但并无显著性差异($P>0.05$); 同时发现, *Sp-Sox14*在卵巢发育O2期(卵黄发生前期)显著高于性腺发育各时期($P<0.05$)(图5)。

2.5 *Sp-Sox14* 整胚原位杂交

用地高辛标记的cRNA探针用于整胚原位杂交的结果显示, *Sp-Sox14*在复眼色素形成期阳性信号定位于胚胎头部以及复眼附近; 在近孵化

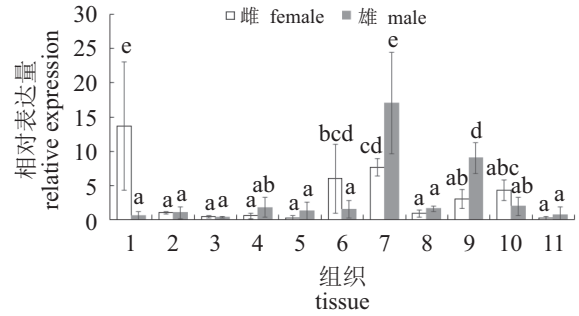


图4 *Sp-Sox14* mRNA在雌雄各组织中的表达情况

1. 性腺(卵巢和精巢); 2. 脑神经节; 3. 眼柄; 4. 鳃; 5. 血细胞; 6. 肝胰腺; 7. 心脏; 8. 肠; 9. 肌肉; 10. 胃; 11. 胸神经节。柱上不同字母代表具有显著性差异($P<0.05$), 下同

Fig. 4 The expression of *Sp-Sox14* mRNA in different tissues of female and male *S. pammamosain*

1. ovary and testis; 2. brain; 3. eyetalk; 4. gill; 5. haemocytes; 6. hepatopancreas; 7. heart; 8. intestines; 9. muscle; 10. stomach; 11. thoracic. Bar with different letters indicates significant differences ($P<0.05$), the same below

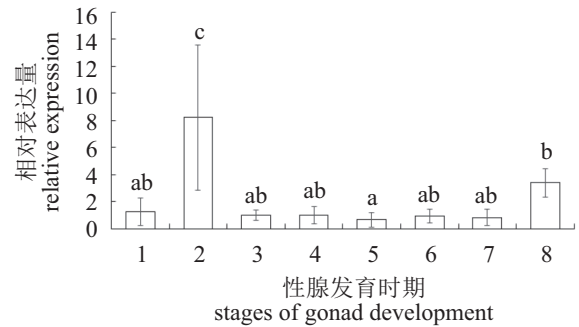


图5 *Sp-Sox14* mRNA在性腺各发育时期的表达情况

1~5. 卵巢各发育时期: 1. 增殖期; 2. 卵黄发生前期; 3. 卵黄发生早期; 4. 卵黄发生中期; 5. 卵黄发生晚期。6~8. 精巢各发育时期: 6. 精母细胞期; 7. 精子细胞期; 8. 成熟精子期

Fig. 5 The expression of *Sp-Sox14* mRNA during different stages of gonadal development

1-5 represents different stages of ovary development: 1. proliferation; 2. previtellogenesis; 3. primary vitellogenesis; 4. secondary vitellogenesis; 5. tertiary vitellogenesis. 6-8 represents different stages of testis development: 6. the spermatocyte stage. 7. the spermatid stage; 8. the mature sperm stage

期, *Sp-Sox14*阳性信号呈条带状位于复眼边缘, 同时亦有点状阳性信号分散在复眼之中; 到孵化期, *Sp-Sox14*阳性信号主要呈点状分布于复眼之间头部位置(图版)。

3 讨论

在脊椎动物中已有大量的研究表明, *Sox*基因家族参与动物性别分化、早期胚胎发育、神经发育等多种重要生物过程, 但*Sox14*基因在蟹

类中的研究尚未见报道。本研究在已获得拟穴青蟹*Sp-Sox14*全长cDNA的基础上,通过生物信息学分析,确定其在第50~116位氨基酸处含有*Sox*基因家族保守结构域HMG-box。进一步通过系统进化树分析表明,青蟹与茧蜂和盲蝽聚为一小支,再与果蝇和实蝇聚为一大支,表明节肢动物的*Sox14*基因可能与哺乳动物有不同的进化过程,有待进一步研究。

目前较多的研究着重于*SoxB*基因对于中枢神经系统的早期建立及发育^[33-35]。例如在小鼠和鸡中,*Sox14*基因仅在大脑和脊髓的神经元中有限地表达^[36],而在爪蟾中该基因只在下丘脑、背侧丘脑和视顶盖中表达^[37]。但有一些研究表明,*SoxB*基因也可能参与性腺发育过程。许宝红等^[38]发现*Sox14*基因在成熟大鲵(*Megalobatrachus davidianus*)的性腺中表达量远高于其他组织,普晓梅^[39]也发现,*Sox14*在大鲵性腺中高表达,并随性腺的发育表达量增加。林浴霜等^[40]发现,文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)的*SoxB2*在雄性生殖上皮细胞和生精细胞中有少量表达,在雌性的卵母细胞细胞质中有高表达。中华绒螯蟹的*SoxB2-1* mRNA高表达于精原细胞和精母细胞,而蛋白则在精细胞和精子中表达^[24]。本研究结果显示,青蟹的*Sp-Sox14*基因在雌蟹卵巢中的表达量远高于其他组织,并在卵黄发生前期表达量最大,但在神经器官中也有少量表达。姚波等^[41]发现,斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)中的一个*SoxB*基因在脑组织及未发育成熟的卵巢中大量表达,而在发育成熟的卵巢中几乎没有表达。*Sp-Sox14*与其有着类似表达模式,推测其可能参与卵巢的发育过程。根据上述研究结果,*Sp-Sox14*氨基酸序列虽然在HMG-box结构上与其他物种的*Sox14*高度保守,但该基因的表达和功能在不同生物中,尤其是高等脊椎动物与低等无脊椎动物有所不同,推测造成这种结果的原因可能与物种进化过程中受到的环境压力不同有关。

如前所述,*SoxB*对于中枢神经系统的早期建立和发育是不可或缺的^[34-35]。*SoxB2*中的*Sox14*和*Sox21*两个基因作为转录阻遏物,表达于发育中的中枢神经系统,与*SoxB1*拮抗从而促进神经细胞分化^[17, 20]。上述研究结果多以高等脊椎动物为研究对象,在较低等的脊索动物和节肢动物中,有研究发现*SoxB*基因也发挥同样的功能。如文昌鱼胚胎发育过程中,*SoxB2*出现于神

经外胚层,之后*SoxB2*出现于发育中的神经管;成体文昌鱼中*Sox14*的转录产物都在神经索中检测到,暗示了*SoxB2*在中枢神经系统发育中的功能保守性^[40]。在蜜蜂(*Apis mellifera*)的胚胎发育后期,*SoxB2*主要在中枢神经和脑中表达^[35]。在黑腹果蝇的神经系统中,*Sox14*基因对于树突和轴突的形成和神经元数量的微调有重要作用^[42]。节肢动物的神经系统在胚胎时期及幼体阶段对调控其体节分布、附肢的组成有密切的关系^[43]。在青蟹胚胎复眼色素形成期,腹部尚未退化,与头胸部也尚未完全愈合,其神经系统为梯状神经系统,神经节不愈合^[44],虽然胚胎不能营自由生活,但已经具有7对附肢以及相关的身体分节,本研究结果显示,*Sp-Sox14*基因在复眼色素形成期的表达量远远高于其他胚胎发育时期,推测*Sp-Sox14*基因在此时参与青蟹胚胎的神经发育与分化、复眼视神经的形成和调控身体分节。

青蟹的胚胎发育需经历卵裂期、囊胚期、原肠胚期、无节幼体期、五对附肢期、七对附肢期、复眼色素形成期、近孵化期、孵化期等9个阶段^[31]。甲壳动物的复眼除了具有视觉功能,还有着重要的神经、激素调节作用^[31]。在青蟹胚胎复眼色素形成期的这三个阶段,2个视叶神经节与大、小触角神经节合并成脑,附肢的雏形出现,胸腹褶已分开形成胸部和腹部,并且腹部已开始分节^[31],实时定量PCR结果显示,*Sp-Sox14* mRNA在复眼色素形成三个时期的表达量显著高于其他胚胎发育时期,推测*Sp-Sox14*参与了这一系列的特征发生。整胚原位杂交结果表明,*Sp-Sox14* mRNA在复眼色素形成期阳性信号大量定位于幼体头部,并呈长棒状分布,少量点状阳性信号分布于颚足附近。参考以往学者对青蟹胚胎发生的形态研究,头部阳性信号定位的位置可认定为脑部^[45-46],推测此阶段*Sp-Sox14*可能参与了脑神经的形成,并且可能参与调控身体及附肢的分节。在近孵化期阶段,有少量*Sp-Sox14*阳性信号呈长条状分布于复眼周围,此时胚胎第一颚足已明显分节^[45],复眼视叶长度达到卵径一半,头胸部附肢发育基本完成,推测此阶段*Sp-Sox14*可能参与调控附肢的分节及发育。在幼体孵化出膜后,仍有极少量的*Sp-Sox14* mRNA阳性信号分散于幼体复眼及头部,推测*Sp-Sox14*可能参与青蟹的神经及其分泌激素的调节,为后续变态发育提供条件。

本研究根据拟穴青蟹*Sp-Sox14*在性腺不同发育时期的表达及在胚胎各时期的表达与定位, 初步推测其在拟穴青蟹的神经发育和分化过程中以及在性腺发育过程中起着一定的作用, 为甲壳动物胚胎时期神经系统发育和性腺发育的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gubbay J, Collignon J, Koopman P, *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes[J]. *Nature*, 1990, 346(6281): 245-250.
- [2] Harley V R, Lovell-Badge R, Goodfellow P N. Definition of a consensus DNA binding site for SRY[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(8): 1500-1501.
- [3] Denny P, Swift S, Brand N, *et al.* A conserved family of genes related to the testis determining gene, *SRY*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(11): 2887.
- [4] Whitfield L S, Lovell-Badge R, Goodfellow P N. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY*[J]. *Nature*, 1993, 364(6439): 713-715.
- [5] Weiss M A. Floppy SOX: mutual induced fit in HMG (high-mobility group) box-DNA recognition[J]. *Molecular Endocrinology*, 2001, 15(3): 353-362.
- [6] Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(6): 1409-1420.
- [7] Hargrave M, Wright E, Kun J, *et al.* Expression of the *Sox11* gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction[J]. *Developmental Dynamics*, 1997, 210(2): 79-86.
- [8] Kamachi Y, Uchikawa M, Collignon J, *et al.* Involvement of *Sox1*, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction[J]. *Development*, 1998, 125(13): 2521-2532.
- [9] Rex M, Orme A, Uwanogho D, *et al.* Dynamic expression of chicken *Sox2* and *Sox3* genes in ectoderm induced to form neural tissue[J]. *Developmental Dynamics*, 1997, 209(3): 323-332.
- [10] Uwanogho D, Rex M, Cartwright E J, *et al.* Embryonic expression of the chicken *Sox2*, *Sox3* and *Sox11* genes suggests an interactive role in neuronal development[J]. *Mechanisms of Development*, 1995, 49(1-2): 23-36.
- [11] Ng L J, Wheatley S, Muscat G E, *et al.* SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse[J]. *Developmental Biology*, 1997, 183(1): 108-121.
- [12] Oosterwegel M, Van de Wetering M, Clevers H. HMG box proteins in early T-cell differentiation[J]. *Thymus*, 1993, 22(2): 67-81.
- [13] Schilham M W, Clevers H. HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation[J]. *Seminars in Immunology*, 1998, 10(2): 127-132.
- [14] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators[J]. *Developmental Biology*, 2000, 227(2): 239-255.
- [15] Schepers G E, Teasdale R D, Koopman P. Twenty pairs of *Sox*: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human *Sox* transcription factor gene families[J]. *Developmental Cell*, 2002, 3(2): 167-170.
- [16] Koopman P, Schepers G, Brenner S, *et al.* Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*[J]. *Gene*, 2004, 328: 177-186.
- [17] Uchikawa M, Kamachi Y, Kondoh H. Two distinct group B *Sox* genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken[J]. *Mechanisms of Development*, 1999, 84(1-2): 103-120.
- [18] Malas S, Duthie S, Deloukas P, *et al.* The isolation and high-resolution chromosomal mapping of human SOX14 and SOX21: two members of the SOX gene family related to SOX1, SOX2, and SOX3[J]. *Mammalian Genome*, 1999, 10(9): 934-937.
- [19] Hargrave M, Karunaratne A, Cox L, *et al.* The HMG box transcription factor gene *Sox14* marks a novel subset of ventral interneurons and is regulated by sonic hedgehog[J]. *Developmental Biology*, 2000, 219(1): 142-153.
- [20] Sandberg M, Källström M, Muhr J. Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis[J]. *Nature Neuroscience*, 2005, 8(8): 995-1001.
- [21] Hong C S, Saint-Jeannet J P. Sox proteins and neural crest development[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2005, 16(6): 694-703.
- [22] Sparkes A C, Mumford K L, Patel U A, *et al.* Character-

- ization of an SRY-like gene, *DSox14*, from *Drosophila*[J]. *Gene*, 2001, 272(1-2): 121-129.
- [23] Dong Z M, Shi C Y, Zhang H X, *et al.* The characteristics of *sox* gene in *Dugesia japonica*[J]. *Gene*, 2014, 544(2): 177-183.
- [24] Liu Z Q, Jiang X H, Qi H Y, *et al.* A novel *SoxB2* gene is required for maturation of sperm nucleus during spermiogenesis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32139.
- [25] 林琪, 李少菁, 黎中宝, 等. 中国东南沿海青蟹属 (*Scylla*) 的种类组成[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 211-219.
Lin Q, Li S J, Li Z B, *et al.* Species composition in genus *Scylla* from the coast of Southeast China[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2007, 31(2): 211-219(in Chinese).
- [26] 王桂忠, 叶海辉, 李少菁. 青蟹(*Scylla* spp.) 养殖现状及拟穴青蟹(*S.paramamosain*) 种群生物学研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 617-623.
Wang G Z, Ye H H, Li S J. Status of mud crabs(*Scylla* spp.) farming and studies on the population biology of *S.paramamosain*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2016, 55(5): 617-623(in Chinese).
- [27] 王桂忠, 叶海辉, 李少菁. 福建青蟹产业发展现状与对策[J]. 福建水产, 2012, 34(2): 87-90.
Wang G Z, Ye H H, Li S J. Status and suggestions of mud crab aquaculture in Fujian Province[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(2): 87-90(in Chinese).
- [28] 朱小明, 邹清, 李少菁, 等. 我国南方沿海虾塘的青蟹养殖[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(S2): 256-260.
Zhu X M, Zou Q, Li S J, *et al.* Aquaculture of the mud cra (*Scylla* spp.) in inshore shrimp ponds throughout southern China[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2006, 45(S2): 256-260(in Chinese).
- [29] 薛俊增, 堵南山, 赖伟. 三疣梭子蟹活体胚胎发育的观察[J]. 动物学杂志, 1998, 33(6): 45-49.
Xue J Z, Du N S, Lai W. Studies on the embryonic development of *Portunus trituberculatus*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1998, 33(6): 45-49(in Chinese).
- [30] Dai Y B, Han K H, Zou Z H, *et al.* *SUMO-1* of mud crab (*Scylla paramamosain*) in gametogenesis[J]. *Gene*, 2012, 503(2): 260-268.
- [31] 陈锦民. 锯缘青蟹 *Scylla serrata* (Forskål) 胚胎发育的基础研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2005: 1-116.
Chen J M. Foundationl studies on the embryonic development of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskål)[D]. Xiamen: Xiamen University, 2005: 1-116(in Chinese).
- [32] 陈仕海, 蔡明夷, 张子平, 等. 基于 *dnd* 基因标记的大黄鱼原始生殖细胞发生发育的初步研究[J]. 水产学报, 2015, 39(9): 1273-1282.
Chen S H, Cai M Y, Zhang Z P, *et al.* Preliminary studies on specification and development of the primordial germ cells from large yellow croaker by *dnd* gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(9): 1273-1282(in Chinese).
- [33] Bergsland M, Werme M, Malewicz M, *et al.* The establishment of neuronal properties is controlled by *Sox4* and *Sox11*[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(24): 3475-3486.
- [34] Jaillon O, Aury J M, Brunet F, *et al.* Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype[J]. *Nature*, 2004, 431(7011): 946-957.
- [35] Wilson M J, Dearden P K. Evolution of the insect *Sox*-genes[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8: 120.
- [36] Hargrave M, James K, Yamada T, *et al.* *Sox14* maps to mouse chromosome 9 and shows no mutations in the neurological mouse mutants *ducky* and *tippy*[J]. *Mammalian Genome*, 2000, 11(3): 231-233.
- [37] Cunningham D D, Meng Z, Fritzsich B, *et al.* Cloning and developmental expression of the *SoxB2* genes, *Sox14* and *Sox21*, during *Xenopus laevis* embryogenesis[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2008, 52(7): 999-1004.
- [38] 许宝红, 肖调义, 肖真明, 等. 大鲵2个 *Sox* 基因 HMG-box 的克隆及分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2012, 38(1): 73-77.
Xu B H, Xiao T Y, Xiao Z M, *et al.* Cloning and sequence analysis of HMG-box of two *Sox* genes in *Andrias davidianus*[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2012, 38(1): 73-77(in Chinese).
- [39] 普晓梅. 大鲵性腺发育及 *Sox14* 基因表达特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016: 1-46.
Pu X M. Gonad development and research of *Sox14* gene in *Andrias davidianus*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016: 1-46(in Chinese).
- [40] 林浴霜, 陈冬艳, 范秋声, 等. 关于青岛文昌鱼 *SoxB2* 和 *SoxC* 基因的研究: 进化保守性分析[J]. 中国科学C辑:

- 生命科学, 2009, 52(9): 813-822(in Chinese).
- Lin Y S, Chen D Y, Fan Q S, *et al.* Characterization of *SoxB2* and *SoxC* genes in amphioxus (*Branchiostoma belcheri*): implications for their evolutionary conservation[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 52(9): 813-822(in Chinese).
- [41] 姚波, 周莉, 桂建芳. 斜带石斑鱼*Sox3*基因cDNA的克隆及其时空表达特征分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(5): 74-81.
- Yao B, Zhou L, Gui J F. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *Sox3* gene in grouper *Epinephelus coioides*[J]. High Technology Letters, 2003, 13(5): 74-81(in Chinese).
- [42] Osterloh J M, Freeman M R. Neuronal death or dismemberment mediated by *Sox14*[J]. Nature Neuroscience, 2009, 12(12): 1479-1480.
- [43] Dove H, Stollewerk A. Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects[J]. Development, 2003, 130(10): 2161-2171.
- [44] Harzsch S, Dawirs R R. Neurogenesis in larval stages of the spider crab *Hyas araneus* (Decapoda, Brachyura): proliferation of neuroblasts in the ventral nerve cord[J]. Roux's Archives of Developmental Biology, 1994, 204(2): 93-100.
- [45] 韦受庆, 罗远裕. 青蟹胚胎发生的研究[J]. 热带海洋, 1986, 5(3): 57-62.
- Wei S Q, Luo Y Y. A study of the embryonic development of *Scylla serrata* (Forskål)[J]. Tropic Oceanology, 1986, 5(3): 57-62(in Chinese).
- [46] 薛俊增. 三疣梭子蟹胚胎期中枢神经系统的发生和发育[J]. 动物学研究, 2005, 26(2): 184-189.
- Xue J Z. Neurogenesis and development of the central nervous system in the embryo stage of swimming crabs, *Portunus trituberculatus*[J]. Zoological Research, 2005, 26(2): 184-189(in Chinese).

Expression analysis of *Sp-Sox14* gene during embryonic and gonadal development in *Scylla paramamosain*

LIANG Keying¹, ZHANG Ziping², LIAO Jiaqian¹, ZOU Zhihua¹, WANG Yilei^{1*}

(1. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

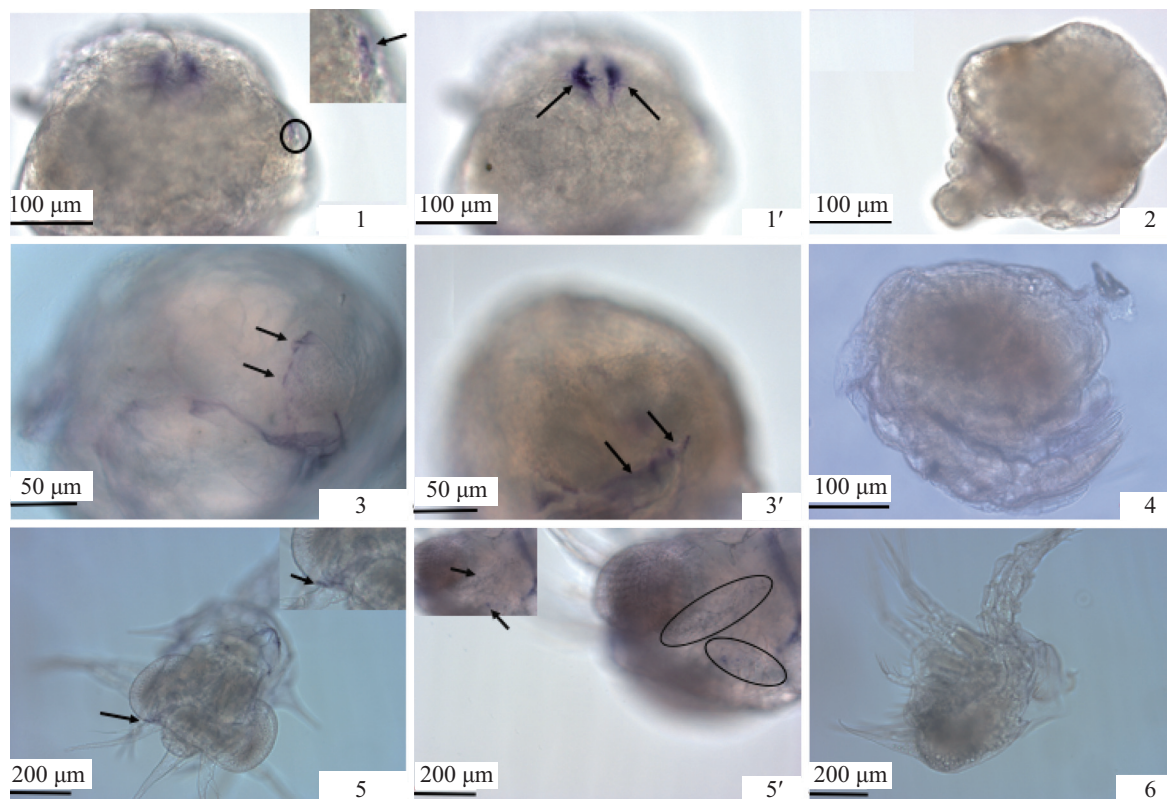
2. College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In this study, a full-length 2558 bp *Sp-Sox14* cDNA sequence was obtained from *Scylla paramamosain* gonadal transcriptome database. The encoded protein consists of 427 amino acids and includes an HMG box domain. Phylogenetic tree analysis showed that *Sp-Sox14* was closely clustered with Sox14 of other arthropods. Quantitative real-time PCR displayed that *Sp-Sox14* had different expression levels in different tissues from mature male and female crabs with the highest expression in ovary and the heart of male crabs. During embryogenesis, *Sp-Sox14* expression was the highest in eye-pigment formation stage. During the different stages of ovarian development, *Sp-Sox14* was expressed at the highest level in previtellogenesis stage (O2) and which was significantly higher than other stages. During the testis development, the expression level of *Sp-Sox14* was higher in mature sperm stage (T3) than in spermatocyte stage (T1) and spermatid stage (T2). It was speculated that *Sp-Sox14* was involved in the early development of ovary and the process of sperm maturation. The whole mount *in situ* hybridization (*WISH*) results indicated that the positive signals of *Sp-Sox14* were mainly distributed in the head and near the maxillipede at eye-pigment formation stage, and near the compound eyes at prehatching stage. A small number of *Sp-Sox14* positive signals were still present in the head and near the appendages at hatching stage. The results of *WISH* implied that *Sp-Sox14* was involved in the formation of the nervous organ as well as related to the occurrence of somite appendages.

Key words: *Scylla paramamosain*; *Sp-Sox14*; embryogenesis; gonadal development; gene expression

Corresponding author: WANG Yilei. E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

Funding projects: National Science Foundation of China (31472266, 41676161, 31672681)



图版 *Sp-Sox14* 整胚原位杂交结果

Sp-Sox14 反义链杂交结果: 1和1'.复眼色素形成期; 3和3'.近孵化期; 5和5': 孵化期; 1'右上小图为图中圈出部分放大。*Sp-Sox14* 正义链杂交结果: 2.复眼色素形成期; 4.近孵化期; 6.孵化期。黑色箭头标示的为 *Sp-Sox14* 阳性信号

Plate Whole mount *in situ* hybridization of *Sp-Sox14*

The positive signal of *Sp-Sox14*: 1 and 1'. eye-pigment formation stage; 3 and 3'. prehatching stage; 5 and 5'. the hatching stage. The counterparts (framed) in 1, and 1' are the larger magnification. The negative signal of *Sp-Sox14*: 2. eye-pigment formation stage; 4. prehatching stage; 6. hatching stage. The black arrows point to the positive signals of *Sp-Sox14*