

光棘球海胆*seali*基因克隆及表达特性分析

王锦 张健 刘炳正 张伟杰 常亚青 孙志惠

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE *SEALI* GENE IN *MESOCENTROTUS NUDUS*

WANG Jin, ZHANG Jian, LIU Bing-Zheng, ZHANG Wei-Jie, CHANG Ya-Qing, SUN Zhi-Hui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.065>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

美洲鲟雄性生殖细胞冷冻保存及移植

STUDIES ON CRYOPRESERVATION AND TRANSPLANTATION OF THE MALE GERM CELL IN AMERICAN SHAD (*ALOSA SAPIDISSIMA*)

水生生物学报. 2018, 42(3): 599–605 <https://doi.org/10.7541/2018.075>

中华鳖*vasa*基因克隆及在卵母细胞中的表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *VASA* IN CHINESE SOFT-SHELL TURTLE OOCYTES

水生生物学报. 2017, 41(2): 306–313 <https://doi.org/10.7541/2017.37>

脊尾白虾血蓝蛋白大亚基基因的克隆及表达分析

cDNA CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEMOCYANIN SUBUNIT GENE IN *EXOPALAEEMON CARINICAUDA*

水生生物学报. 2018, 42(1): 86–93 <https://doi.org/10.7541/2018.011>

东北七鳃鳗*TRAF6*基因克隆、表达分析及亚细胞定位研究

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION ANALYSIS AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-ASSOCIATED FACTOR 6 IN KOREAN LAMPREY, *LETHENTERON MORII*

水生生物学报. 2019, 43(1): 9–16 <https://doi.org/10.7541/2019.002>

虹鳟Fc受体Fc γ R的 α 和 γ 亚基基因的克隆及表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE α AND γ SUBUNIT GENES OF Fc γ R IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

水生生物学报. 2019, 43(1): 27–36 <https://doi.org/10.7541/2019.004>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.065

光棘球海胆*seali*基因克隆及表达特性分析

王锦 张健 刘炳正 张伟杰 常亚青* 孙志惠*

(大连海洋大学农业农村部北方海水增殖重点实验室, 大连 116023)

摘要: *seali*基因隶属于PIWI超家族, 其编码的RNA结合蛋白在生殖细胞发育过程中发挥重要作用。研究经同源比对从光棘球海胆(*Mesocentrotus nudus*)性腺转录组数据库中筛选得到*seali*基因片段, 随后通过cDNA末端快速扩增技术(Rapid amplification of cDNA ends, RACE), 获得其全长cDNA序列。光棘球海胆*seali*基因cDNA全长3462 bp, 其中3'UTR长度为416 bp, 5'UTR长度为180 bp, 其中3'UTR的加尾信号并非经典的AAUAAA或AUUAAA, 而是较少见的AAUACA。开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)2862 bp, 编码954个氨基酸, 具有保守的PIWI和PAZ结构域, 多重序列比对和系统进化分析结果表明其属于Argonaute家族的PIWI亚家族成员。荧光定量PCR技术检测结果表明, *Mnseali*基因在光棘球海胆性腺、肠、管足和体腔细胞中均有表达, 在性腺中表达量最高。此外, *Mnseali*基因为母源因子, 在整个胚胎发育时期均有表达。在卵巢中, 随着卵母细胞的成熟, *Mnseali*的表达量逐渐升高, 而仅在成熟期的精巢中表达量显著上调。RNA原位杂交结果表明, *Mnseali*在光棘球海胆性腺的生殖细胞中特异表达, 是光棘球海胆生殖细胞标记基因。该研究为海胆生殖细胞发育相关的研究提供了支撑。

关键词: 光棘球海胆; *Seali*; *Piwi*; 生殖细胞

中图分类号: Q344+.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)03-0534-07

PIWI (P-element induced wimpy testis)作为一种调控蛋白, 在干细胞维持、生殖细胞发育及体细胞基因调控中发挥重要的作用^[1]。PIWI蛋白最早在果蝇(*Drosophilidae*)生殖干细胞中被鉴定, 是Argonaute蛋白家族的一个亚家族, 具有PIWI和PAZ两个进化上高度保守的结构域^[2]。PIWI亚家族蛋白广泛存在于多种物种。在果蝇中, *piwi*在卵巢、精巢和体细胞中均有表达, 缺失*piwi*, 原始生殖细胞(Primordial germ cell, PGC)的自我更新能力将受到影响, 体细胞中过表达*piwi*导致生殖细胞数量增加^[3, 4]。在斑马鱼(*Danio rerio*)中, *piwi*(*ziwi*)基因在生殖细胞中特异表达, 且在卵巢和精巢中都有表达, 与生殖细胞维持和斑马鱼的性别决定有关^[5, 6]。在小鼠(*Mus musculus*)中, *Piwi*在精母细胞和精子细胞中特异表达, 是精子发生所必需的, 而小鼠的另一*Piwi*同源基因*Mili*在卵母细胞中也有表达^[7, 8]。

在紫色球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)中, 已鉴定出两种*Piwi*同源蛋白, *Seawi*和*Piwi like*

1(也有称*Seali*), 其中*Piwi*的表达模式与*Vasa*非常相似, 均在早期胚胎中呈泛表达状态^[9, 10]。紫色球海胆*seawi*基因在胚泡形成过程中募集, 随后在囊胚期的植物板处局部富集, 原肠期时迁移至肠系膜顶端, 最后合并到棱柱幼虫的两个体腔袋中并于左侧富集, 由此推测*seawi*基因可能在紫色球海胆生殖细胞发育过程中发挥重要作用^[11]。在成体紫色球海胆中, *seawi*于成熟卵巢的卵母细胞均匀分布; 在绿海胆(*Lytechinus variegatus*)和红海胆(*Mesocentrotus franciscanus*)中, *seawi*在各组织中均有表达^[9, 10]。在海胆中, 针对*piwi*相关的研究多集中在胚胎发育时期, 成体水平的相关研究较少, 而光棘球海胆中*piwi*相关基因的表达情况尚不清晰。

光棘球海胆(*Mesocentrotus nudus*), 又称大连紫海胆, 属棘皮动物门, 海胆纲, 主要分布于辽东半岛和黄海、渤海海域。其性腺营养丰富、品质优良, 是我国北方沿海主要的经济种类和出口海产品之一^[12]。本研究以光棘球海胆为研究对象, 克隆获得了光棘

收稿日期: 2019-04-12; 修订日期: 2019-08-24

基金项目: 国家自然科学基金(31802276)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31802276)]

作者简介: 王锦(1998—), 男, 本科在读; 研究方向为棘皮动物性别决定。E-mail: 904099646@qq.com

通信作者: 常亚青, 男, 教授; E-mail: yqchang@dlou.edu.cn; 孙志惠, 女, 博士; E-mail: sunzhahui@dlou.edu.cn *共同通信作者

球海胆*Mnseali*基因的全长cDNA序列, 并利用荧光定量PCR技术检测了其在成体组织中的表达情况, 并由胚胎发育时期持续检测至性成熟时性腺中的表达动态变化。此外, 通过切片原位杂交技术对*Mnseali*基因在性腺中细胞定位进行分析。本研究为进一步探究*Mnseali*在海胆生殖细胞发育中发挥的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验所用光棘球海胆, 捕捞于大连市黑石礁海域(121°33'47"E, 38°51'55"N)。实验前, 所用海胆在大连海洋大学农业农村部北方海水增养殖重点实验室的循环水槽中暂养一周, 培养条件为: pH 为 7.96±0.02; 海水温度为(12.41±0.11)°C; 盐度为(30.13±0.21)‰。每天投喂一次海带及石莼等常见藻类植物, 每两天更换一次海水。

1.2 方法

总RNA的提取及cDNA的合成 在解剖海胆后, 所取样品立即置于液氮中速冻, 备用。总RNA的提取参照SV Total RNA Isolation System (Promega Z3100)说明书进行。利用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检测RNA质量。随后, 取1 μg 卵巢组织总RNA, 参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 634923)建立卵巢cDNA文库。将总RNA反转录为cDNA的合成则参照PrimeScript™ RTreagentKit(TaKaRa634860)说明书进行。

cDNA全长克隆 在前面研究中, 我们获得了光棘球海胆性腺转录组数据库^[13]。在本研究中, 我们以人PIWI蛋白序列为比对序列, 在光棘球海胆性腺转录组数据库中搜索到了*Mnseali*的基因片段。根据所得到的基因片段, 使用PrimerPremier 5.0软件设计5'和3'RACE引物(表 1), 参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 634923)说明书克隆其cDNA全长序列。PCR扩增使用LATaq 酶(TaKaRa RR02MA), PCR程序如下: 94°C 预变性 5min; 94°C, 30s; 62°C, 30s; 72°C, 1.15min; 30个循环; 72°C 延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检验后, 切胶纯化回收DNA, 并将纯化的DNA连接pMD18-TV载体, 转化到Trans1-T1感受态细胞中, 在LB培养基上涂布后于37°C培养箱中过夜。第二天挑取单菌落于装有LB液体培养基的离心管中, 震荡培养, 然后通过菌落PCR筛选阳性克隆并测序。

***seali*序列及系统进化分析** 利用NCBI中 ORF-Finder预测*Mnseali*基因的开放阅读框; 分别使

用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)及Ex-Pasy中的ProtParam工具(<https://web.expasy.org/prot-param/>)预测*MnSeali*蛋白的结构域和基本理化性质; 分别采用Predict(Protein<https://www.predictprotein.org/>)、Swiss-model(<https://swissmodel.expasy.org/>)分析*MnSeali*蛋白的二级结构和三级结构; 随后利用Clustal W进行多重序列比对, 并用MEGA7.0对*MnSeali*进行系统进化分析。

荧光定量PCR验证基因表达分析 使用Light-Cycler®96Instrument(Roche, LightCycler®96)进行荧光定量PCR反应, 反应体系如下: FastStartEssentialDNA Green Master 10 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)0.8 μL, cDNA 2 μL, H₂O 6.4 μL。PCR程序如下: 95°C, 10min; 95°C, 15s; 60°C, 60s; 40个循环; 95°C, 10s; 65°C, 60s; 97°C, 1s。以光棘球海胆*ubiquitin*基因作为内参, 采用2^{-ΔΔC_t}方法计算基因的表达情况。利用SPSS21.0软件对所得荧光定量PCR数据进行ANOVA单因素方差分析, 存在显著性差异和存在极显著性差异分别为P<0.05和P<0.01。

RNA探针合成 根据克隆所得到的*Mnseali*基因cDNA序列, 设计探针引物(表 1)。随后, 参照T7 RNA Polymerase(Roche, 10881767001)和DIG RNA labeling mix(Roche, 11277073910)说明书在体外制备RNA探针, 具体操作如下: PCR扩增得到特

表 1 PCR所用到的引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers used for PCR

引物 Primer	引物序列Primer sequence (5'—3')	用途 Application
seali-H-F	TACAGCCTTGAGATCAGTGACCCAG	同源性核心 片段克隆
seali-H-R	AACTCAGCTGCTTTGGATGCGTCTC	
seali-RE-31F	TACAGCCTTGAGATCAGTGACCCAG	RACE
seali-RE-32F	GGATCTAGCCATGCACACAAGAGT	
seali-RE-33F	TCAGGGAGACAGCTGCCTCTGGAGA	
seali-RE-51R	GCGTGGTAGGGTTGTAGAAATGACG	
seali-RE-52R	GGTCCTATGTAACGAGTCTGTGCTA	荧光定量
seali-RE-53R	GCGTGGTAGGGTTGTAGAAATGACG	
seali-Q-F	TCTTCCTACCTCACAACTTCCTC	
seali-Q-R	TGGTAGGGTTGTAGAAATGACGT	
seali-P-F	GGAGCAGTCCTCTTCCTACCTCAC	原位杂交
seali-P-R	TAATACGACTCACTATAGGATAGCG AGTCAGAACCACTGTCCC	
seali-CP-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGCA	
seali-CP-R	GTCCTCTTCCTACCTCAC ATAGCGAGTCAGAACCACTGTCCC	

异目的片段经切胶纯化回收后备用;在微量离心管中配制总体积为10 μL 的反应体系:PCR product 2.5 μL (DNA浓度为400 ng/ μL ,保证DNA总量为1 μg)、DIG RNA Labeling mix 1 μL 、Transcription buffer 1 μL 、T7 RNA聚合酶1 μL 、RNA酶抑制剂1 μL 、RNase-free water 3.5 μL ,充分混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应2h。在反应完成后,加入1 μL DNA酶37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min,以便充分消化剩余DNA模板。随后,加入2.5 μL LiCl和75 μL 无水乙醇,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜;翌日,4 $^{\circ}\text{C}$,13000 r/min离心15min,之后用75%无水乙醇洗涤两次;最后,用20—30 μL 无RNA酶水重悬RNA。

RNA切片原位杂交 RNA切片原位杂交参照实验室前面的实验方法进行^[14],该实验主要分为6个部分,分别为:样品的处理、样品固定、杂交、洗脱、显色和镜检。所用去离子甲酰胺购自AMRESCO(美国),所用Diethylpyrocarbonate(DEPC)采购于Sigma-Aldrich[®](上海),所用Tween、20 $\times$ SSC、PBS磷酸缓冲液粉末均采购自索莱宝公司(北京)。具体流程如下:

样品处理:将光棘球海胆的性腺组织经4% DEPC处理的Perfluoroalkoxy(DEPC-PFA)4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜;第二天,用DEPC-PBS摇洗三次,每次5min;之后用30%蔗糖于4 $^{\circ}\text{C}$ 渗透过夜;第三天,使用组织包埋剂OCT(Tissue-Tek,上海)进行包埋,用Leica-CM1900-1-1进行冷冻切片;切片后,将玻片于37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤1h。

样品固定:将烘干的玻片置于装满DEPC处理的PBS(DEPC-PBS)的卧式染缸中,室温摇洗2次,每次5min;用4% DEPC-PFA固定载玻片上的组织样品;用DEPC-PBS,室温摇洗2次,每次5min,洗去多余的固定液。

杂交:在每个湿盒上放置三张滤纸,用湿盒缓冲液(20 $\times$ SSC 2.5 mL; DEPC水22.5 mL;去离子甲酰胺25 mL)充分浸透;每张切片加100—200 μL 杂交液(探针含量1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),盖上盖玻片;用封口膜将湿盒密封,置于59 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱杂交18—20h。

洗脱:将玻片置于装满63 $^{\circ}\text{C}$ 预热洗脱液(20 $\times$ SSC 12.5 mL;去离子甲酰胺125 mL; Tween 0.25 mL; DEPC水112.5 mL)的卧式染缸中,63 $^{\circ}\text{C}$ 摇洗2次,每次30min;之后用0.2 $\times$ SSC于63 $^{\circ}\text{C}$ 摇洗2次,每次30min;马来酸于室温摇洗两次,每次20min;接着,用封阻液(10%羊血清+马来酸)室温封阻1h;随后,加抗体于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。

显色和镜检:用马来酸在室温中摇洗三次,每次20min;碱性磷酸酶显色缓冲液,室温摇洗三次,

每次5min;随后按照说明配置碱性磷酸酶显色液(碧云天, C3206),避光显色;显色完成后于装满PBS的卧式染缸中,室温摇洗2次,每次5min,并进行甲醇梯度脱色;脱色完成后用甘油封片,并使用Leica DM4B进行镜检拍照。

2 结果

2.1 *Mnseali*基因cDNA全长序列分析

本研究克隆得到*Mnseali*基因的cDNA全长序列(GenBank登录号: MK775490),该序列全长3462 bp,其中3'UTR长度为416 bp,5'UTR为180 bp,其中3'UTR的加尾信号并非经典的AAUAAA或AUUAAA,而是较少见的AAUACA^[15, 16]。开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)长度为2862 bp,起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)分别位于181 bp处和3040 bp处,共编码954个氨基酸。结构域预测结果表明,*MnSeali*蛋白具有两个进化上高度保守的结构域:PAZ(Arg³⁸⁵-Arg⁵⁰)和Piwi(Arg⁴⁹³-Gln⁹³⁶)(图1A)。此外,*MnSeali*蛋白的理论分子量为107.13 kD,理论等电点为9.43。*MnSeali*蛋白质的二级结构中 α -螺旋(alpha-helix, H)、延伸链(strand, E)和无规则卷曲(coil, L)占比分别约为22.14%、20.78%和57.08%,其不稳定系数为48.26,蛋白质归类为不稳定蛋白质。*MnSeali*蛋白质中有酸性氨基酸残基89个,碱性氨基酸残基120个,其亲水平均值(GRAVY)值为-0.413,为亲水性蛋白(图1)。以已知三维结构的沙蚕(*Sipunculus nudus* Linne)的Piwi蛋白(Swiss-model 模板号: 5 guh.1.A)为模板,进行同源建模,得到*MnSeali*的氨基酸序列与沙蚕Piwi氨基酸序列的一致性为38.37%。*MnSeali*氨基酸序列中含有多个疏水区域,共有295个疏水残基,其数量远小于亲水残基,即该蛋白为亲水性蛋白,与蛋白理化性质预测结果一致。另外,*MnSeali*蛋白中没有跨膜螺旋区,意味着该蛋白不是膜蛋白。此外,*MnSeali*蛋白含有三个糖基化位点,分别位于Asn³²⁴-Thr³²⁶、Asn³⁶⁶-Ser³⁶⁸和Asn⁴⁰⁵-Thr⁴⁰⁸(图1B-C)^[17]。

2.2 多重序列比对和系统进化分析

我们从NCBI下载了其他物种与*Seali*同源的蛋白质序列,使用Clustal W进行多重序列比对。比对结果显示,*MnSeali*的蛋白质序列与紫色球海胆*seali*基因编码的蛋白质序列相似度最高,其一致性为92.41%,而与紫色球海胆*seawi*基因编码的蛋白质序列相似度较低,一致性为36.47%。与其他棘皮动物的蛋白质序列也展示了较高的一致性,譬如:与仿刺参(*Apostichopus japonicus*)*Seali*的一致性为50.83%,与海星(*Asterias rubens*)Piwi-1和Piwi-2的

一致性分别为40.31%和54.87%。但是与脊椎动物如斑马鱼和人的PIWI则展现出较低的同源性, 其一致性分别为39.12%和37.96%。但是, 其PIWI结构域, 无论是在脊椎动物还是在棘皮动物中均展现出较为稳定的一致性(46.22%—65.55%)。基于多重序列比对结果, 利用MEGA7构建了neighbor-joining(NJ)系统进化树, 如图2所示: 光棘球海胆*Seali*蛋白先与同属棘皮动物门的紫色球海胆*Seali*蛋白聚类, 之后与海星的*Piwi-2*蛋白聚类, 再与紫色球海胆的*Seawi*蛋白和海星的*Piwi-1*蛋白聚类, 说明*Seali*/*Piwi-2*蛋白和*Seawi*/*Piwi-1*蛋白应是同属PIWI亚家族蛋白的两种不同基因, 其聚类结果与物种亲缘关系基本一致。

2.3 *Mnseali*组织表达特异性分析

如图3所示, 在光棘球海胆的性腺、肠、体腔细胞和管足四种组织中均检测到了*seali*转录本。*Mnseali*在性腺中表达量最高, 且在精巢和卵巢中呈现差异表达, 在卵巢中表达量是精巢中表达量的1.95倍, 所用海胆性腺均为生长期(Stage II)。在其他成体组织中也有表达, 其相对表达量从高到低依

次为: 体腔细胞>管足>肠。

2.4 *Mnseali*在不同性腺发育时期的动态表达分析

考虑到*Mnseali*在性腺中表达量最高, 通过持续取样, 我们获得了处于不同性腺发育时期的性腺样品: 恢复期(Stage I)、生长期(Stage II)、成熟前期(Stage III)和成熟期(Stage IV)。随后利用荧光定量PCR检测*Mnseali*在性腺发育过程中的动态表达情况。如图4所示, 随卵母细胞的成熟, *Mnseali*基因的表达量逐渐升高, 在成熟期卵巢中其表达量达到峰值。而在雄性个体中, 处于恢复期、生长期及成熟前期的精巢中*Mnseali*基因的表达量并无显著变化, 而到了成熟期, 其表达量显著上调, 是恢复期表达量的2.05倍。

随后, 我们进一步通过RNA切片原位杂交技术分析*Mnseali*基因在性腺中细胞定位, 如图5所示, 在卵巢, *Mnseali*在不同发育时期的雌性生殖细胞中均有表达。精巢中, *Mnseali*在除了成熟精子外的雄性生殖细胞中均有表达, 在营养细胞中未检测到*Mnseali*阳性信号, 且其表达情况与荧光定量结果相似。

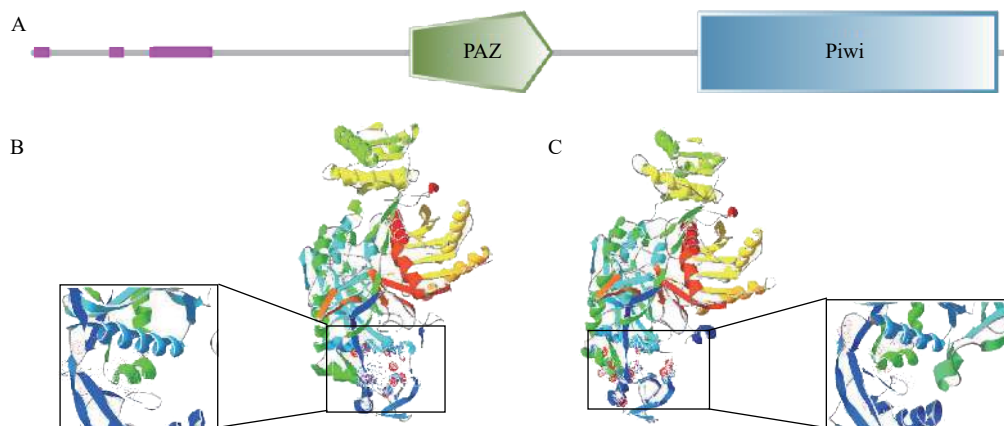


图1 *MnSeali*蛋白结构域预测及其蛋白质三级结构预测

Fig. 1 Prediction of the *MnSeali* protein domain and protein tertiary structure

黑色框内为沙蚕PIWI蛋白的疏水核心区域及由此推测的*MnSeali*蛋白疏水核心区域

The black box indicates the hydrophobic core region of the PIWI protein and the predicted *MnSeali* protein hydrophobic core region

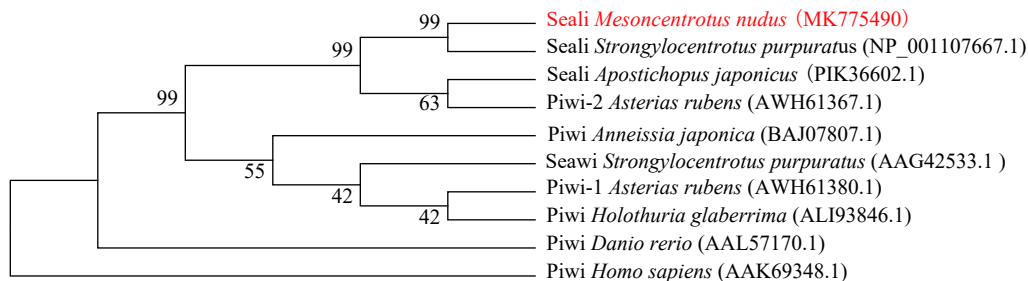


图2 *MnSeali*系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *MnSeali*

2.5 *Mnseali*在胚胎发育时期及早期个体发育时期的表达水平分析

如图6所示, *Mnseali*基因为母源因子, 在未受精卵中即检测到了*Mnseali*转录本, 在四胞、囊胚、棱柱幼虫、四腕、六腕及八腕幼体中可持续检测到转录本, 且逐渐降低, 此结果与之前报道的紫色球海胆胚胎发育时期*piwi*基因表达量的变化趋势大致吻合。

3 讨论

本研究利用同源性克隆和cDNA末端快速扩增首次获得光棘球海胆*Mnseali*基因的全长cDNA序列, 该序列共编码954个氨基酸。经氨基酸序列多重比对分析, 不同物种间*Seali*氨基酸序列的差异较大, 其一致性为37.96%—92.41%。但是其PIWI结

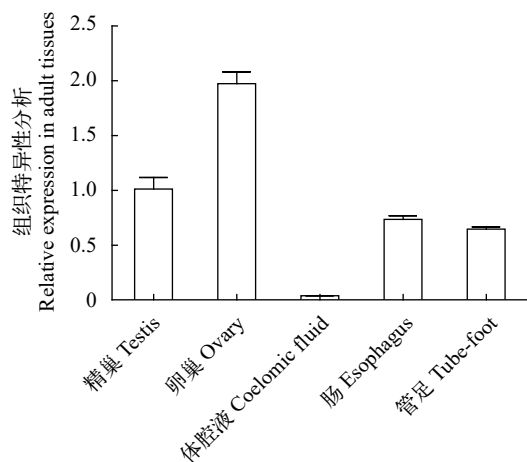


图3 *Mnseali*组织表达特异性分析(以精巢为参照)

Fig. 3 *Mnseali* expression in adult tissues (Relative fold to testis)

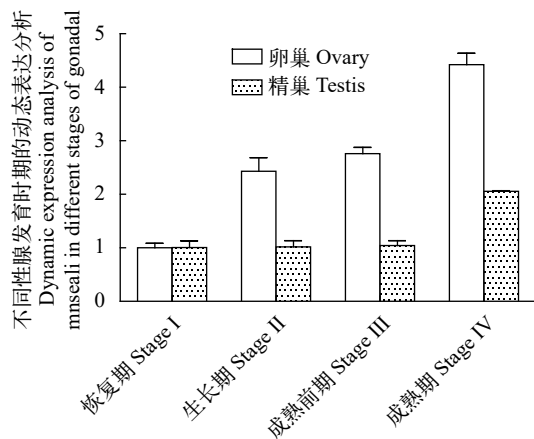


图4 *Mnseali*在不同性腺发育时期的动态表达分析(以恢复期为参照)

Fig. 4 Dynamic expression analysis of *Mnseali* in different stages of gonadal (Relative fold to stage I)

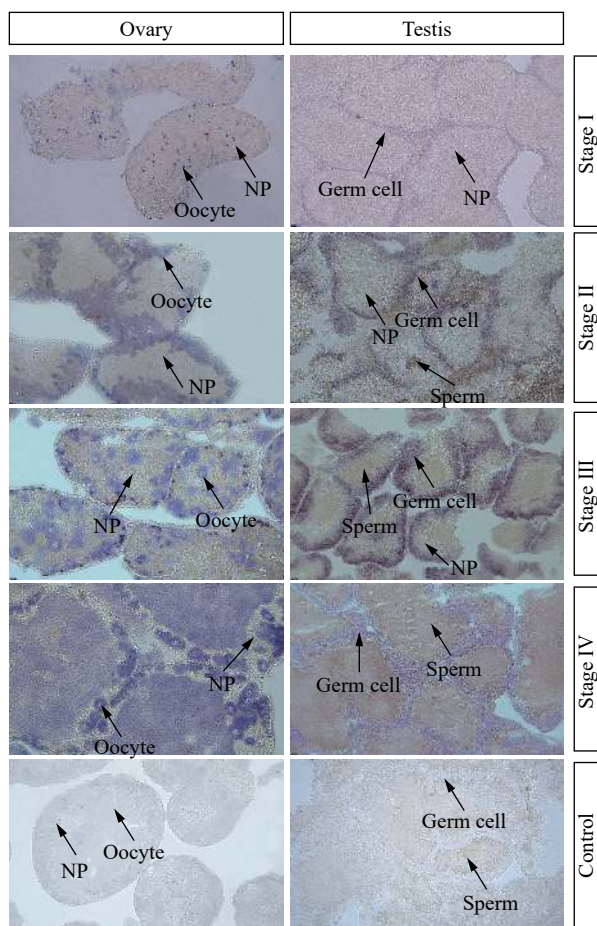


图5 切片原位杂交分析*Mnseali*在不同发育时期性腺中的表达情况

Fig. 5 SISH analyses of *Mnseali* transcripts at different stages of gonadal

NP 营养细胞; Sperm 精细胞; oocyte 卵细胞; germ cell 生殖细胞, 对照组均为成熟期

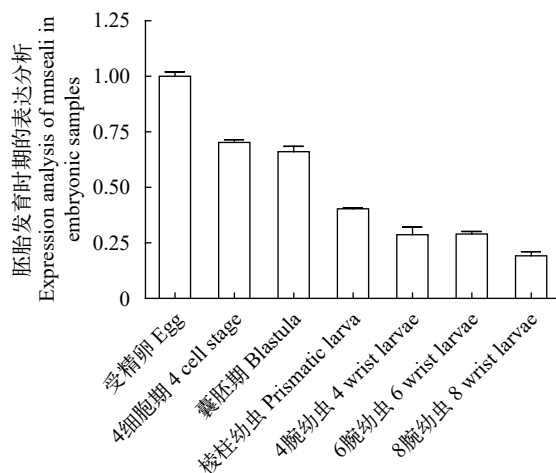


图6 *Mnseali*在胚胎发育时期的表达分析(以受精卵为参照)

Fig. 6 Expression analysis of *Mnseali* in embryonic samples (Relative fold to egg)

构域在不同物种间的一致性差异并不大(46.22%—65.55%), 这与之前报道的研究结果基本一致^[2]。此外, *Mnseali*和紫色球海胆*seali*基因的氨基酸序列相似度极高, 其一致性高达92.41%, 且系统进化分析结果表明, 光棘球海胆*seali*基因与紫色球海胆*seali*基因聚为一支, 以上结果表明*seali*基因的进化符合光棘球海胆的进化和分类地位。

在光棘球海胆中, *seali*不仅在性腺组织的生殖细胞中表达, 还在其他成体组织, 如体腔液、管足、肠中也有表达, 这种表达模式与产自大西洋西部的绿海胆(*L. variegatus*)表达情况相似^[10]。在紫色球海胆中, *seali*也呈广泛表达状态^[18]。但是, 在其他大多数脊椎动物中, 如非洲爪蟾(*Xenopus*)、斑马鱼、小鼠中, *piwi*均在生殖细胞中特异表达^[5-8, 19]。海胆中*seali*这种特殊的表达模式意味着*seali*可能在进化的过程中发生了功能歧化, 其除海胆生殖细胞发育过程中发挥作用外, 可能还有其他尚不明确的生物学功能。

与脊椎动物中一样, *Mnseali*为母源因子, 在囊胚期以前的胚胎中均可以检测到大量的转录本。随着胚胎发育的进行, *Mnseali*持续表达。无论是在精巢还是在卵巢中, *seali*均在生殖细胞中特异表达, 这一结果与绝大多数物种*piwi* mRNA在生殖细胞中特异表达一致。在雌性光棘球海胆个体中, 随着卵母细胞的成熟*seali*基因表达量逐步上调, 这暗示着*seali*可能和光棘球海胆卵母细胞的成熟有关。在成熟期精巢中*seali*的表达量上调, 推测在光棘球海胆中*seali*可能与精子的发生相关^[21, 22]。因此, *Mnseali*有望作为光棘球海胆生殖细胞标记因子, 追踪光棘球海胆生殖细胞的起源、迁移以及性腺的分化, 为海胆生殖细胞发育相关的研究提供了支撑。

参考文献:

- [1] Yajima M, Gustafson E A, Song J L, *et al.* Piwi regulates Vasa accumulation during embryogenesis in the sea urchin [J]. *Developmental Dynamics*, 2014, **243**(3): 451-458.
- [2] Wilczynska A, Minshall N, Armisen J, *et al.* Two Piwi proteins, Xiwi and Xili, are expressed in the *Xenopus* female germline [J]. *RNA*, 2009, **15**(2): 337-345.
- [3] Cox D N, Chao A, Baker J, *et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal [J]. *Genes & Development*, 1998, **12**(23): 3715-3727.
- [4] Cox D N, Chao A, Lin H. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells [J]. *Development*, 2000, **127**(3): 503-514.
- [5] Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E, *et al.* A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish [J]. *Cell*, 2007, **129**(1): 69-82.
- [6] Houwing S, Berezikov E, Ketting R F. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish [J]. *The EMBO Journal*, 2008, **27**(20): 2702-2711.
- [7] Lin H, Spradling A C. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary [J]. *Development*, 1997, **124**(12): 2463-2476.
- [8] Siomi M C, Sato K, Pezic D, *et al.* PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence [J]. *Nature Review, Molecular Cell Biology*, 2011, **12**(4): 246-258.
- [9] Song J L, Wessel G M. Genes involved in the RNA interference pathway are differentially expressed during sea urchin development [J]. *Developmental Dynamics*, 2007, **236**(11): 3180-3190.
- [10] Bodnar A G, Coffman J A. Maintenance of somatic tissue regeneration with age in short- and long-lived species of sea urchins [J]. *Aging Cell*, 2016, **15**(4): 778-787.
- [11] Juliano C E, Voronina E, Stack C, *et al.* Germ line determinants are not localized early in sea urchin development, but do accumulate in the small micromere lineage [J]. *Developmental Biology*, 2006, **300**(1): 406-415.
- [12] Chang Y Q. Biological Research and Cultivation of Sea Cucumber and Sea Urchin [M]. Beijing: China Ocean Press, 2004: 199-220. [常亚青. 海参、海胆生物学研究与养殖 [M]. 北京: 海洋出版社, 2004: 199-220.]
- [13] Sun Z H, Zhang J, Zhang W J, *et al.* Gonadal transcriptomic analysis and identification of candidate sex-related genes in *Mesocentrotus nudus* [J]. *Gene*, 2019, (698): 72-81.
- [14] Sun Z H, Wang Y, Lu W J, *et al.* Divergent expression patterns and function implications of four nanos genes in a hermaphroditic fish, *Epinephelus coioides* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**(4): 685.
- [15] Tian B, Hu J, Zhang H B, *et al.* A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(1): 201-212.
- [16] Beaulieu E, Freier S, Wyatt J R, *et al.* Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes [J]. *Genome Research*, 2000, **10**(7): 1001-1010.
- [17] Matsumoto N, Nishimasu H, Sakakibara K, *et al.* Crystal structure of silkworm PIWI-clade argonaute siwi bound to piRNA [J]. *Cell*, 2016, **167**(2): 484-497.
- [18] Reinardy H C, Emerson C E, Manley J M, *et al.* Tissue regeneration and biomineralization in sea urchins: role of Notch signaling and presence of stem cell markers [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(8): e133860.
- [19] Lau N C, Ohsumi T, Borowsky M, *et al.* Systematic and single cell analysis of *Xenopus* Piwi-interacting RNAs and Xiwi [J]. *EMBO Journal*, 2009, **28**(19): 2945-2958.

- [20] Yuan Z H, Zhao Y M. The regulatory functions of piRNA/PIWI in spermatogenesis [J]. *Hereditas*, 2017, **39**(8): 683-691. [袁志恒, 赵艳梅. piRNA/PIWI功能调控与精子的发生 [J]. 遗传, 2017, **39**(8): 683-691.]
- [21] Wang X, Li Z T, Liu M F. Piwi/piRNA dysregulation and male infertility [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, **30**(2): 169-177. [王鑫, 李智彤, 刘默芳. PIWI/piRNA调控异常与男性不育症 [J]. 生命科学, 2018, **30**(2): 169-177.]
- [22] Juliano C, Wang J, Lin H. Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms [J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, **45**(1): 447-469.
- [23] Bamezai S, Rawat V P, Buske C. Concise review: the Piwi-piRNA Axis: pivotal beyond transposon silencing [J]. *Stem Cells*, 2012, **20**(12): 2603-2611.
- [24] Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, *et al.* Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome [J]. *Genomics*, 2003, (82): 323-330.
- [25] Zhao S, Gou L T, Zhang M, *et al.* piRNA-triggered MIWI ubiquitination and removal by APC/C in late spermatogenesis [J]. *Developmental Cell*, 2013, **24**(1): 13-25.
- [26] Yakovlev K V. Localization of germ plasm - related structures during sea urchin oogenesis [J]. *Developmental Dynamics*, 2015, **245**(1): 56-66.
- [27] Li Y Y, Cui D Y, Chang Y Q, *et al.* Molecular cloning and characterization of gene TGF- β in *Meconocrotus nudus* and its response to seawater acidification [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, **35**(1): 20-40. [李莹莹, 崔东遥, 常亚青, 等. 光棘球海胆(*Mesocentrotus nudus*)TGF- β 基因克隆及其对海水酸化的响应 [J]. 生物技术通报, 2018, **35**(1): 20-40.]
- [28] Zhao S, Liu M F. piRNA and PIWI in animal germ cells [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2010, **22**(7): 623-627. [赵爽, 刘默芳. piRNA和PIWI蛋白的功能机制研究进展 [J]. 生命科学, 2010, **22**(7): 623-627.]
- [29] Yu F F, Gui J F, Zhou L, *et al.* Cloning and expression characterization of DMRT5 in *Pinctada martens* II [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(5): 844-850. [于非非, 桂建芳, 周莉, 等. 马氏珠母贝*Dmrt5*基因的克隆及时序表达模式分析 [J]. 水生生物学报, 2009, **33**(5): 844-850.]

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE *SEALI* GENE IN *MESOCENTROTUS NUDUS*

WANG Jin, ZHANG Jian, LIU Bing-Zheng, ZHANG Wei-Jie, CHANG Ya-Qing and SUN Zhi-Hui

(Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The *seali* gene belongs to the PIWI superfamily and plays an important role in germ cell development. In this study, a unigene annotated as *seali* was screened from the gonad transcriptome database of *Mesocentrotus nudus* and named *Mnseali*. Subsequently, the full-length *Mnseali* cDNA sequence was obtained by 5' and 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends). The full-length cDNA of *Mnseali* was 3462 bp, containing an 84 bp 5'UTR, a 447 bp 3'UTR and a 2862 bp open reading frame (ORF), which encodes a protein of 954 amino acids. The polyadenylation signal of the 3'UTR was not the classic "AAUAAA" or "AUUAAA" sequence but "AAUACA". Similar to that of other species, *Mnseali* also had highly conserved PIWI and PAZ domains and belonged to the PIWI subfamily of the Argonaute family based on the results of domain and phylogenetic analyses. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis revealed that *Mnseali* was expressed in the gonad, intestine, tubular foot and coelomic fluid, with the highest expression level in gonads. In addition, *Mnseali* is a maternal factor and can be detected throughout embryogenesis. The *Mnseali* level significantly increased along with oogenesis. However, there was no significant difference in expression in the testis before maturation, and expression peaked at Stage IV. Moreover, *in situ* hybridization (SISH) of tissue sections showed that *Mnseali* was specifically expressed in the germ cells. The current study identified a germ cell marker to further study the mechanism of germ cell development in sea urchin.

Key words: *Mesocentrotus nudus*; *Seali*; *Piwi*; Germ cells