

长江鲟*org*基因的克隆和表达分析

叶欢 武梦斌 危起伟 岳华梅 阮瑞 杜浩 冷小茜 李创举

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *ORG* GENE IN YANGTZE STURGEON (*ACIPENSER DABRYANUS*)

YE Huan, WU Meng-Bin, WEI Qi-Wei, YUE Hua-Mei, RUAN Rui, DU Hao, LENG Xiao-Qian, LI Chuang-Ju

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.108>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

俄罗斯鲟补体*C7*基因的克隆及表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF THE COMPLEMENT COMPONENT *C7* IN RUSSIAN STURGEON (*ACIPENSER GUELLENSTAEDTI*)

水生生物学报. 2019, 43(4): 763–770 <https://doi.org/10.7541/2019.090>

中华鲟促性腺激素释放激素受体基因cDNA序列的克隆及表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE RECEPTOR, *GNRH-R* IN CHINESE STURGEON (*ACIPENSER SINENSIS*)

水生生物学报. 2018, 42(1): 94–98 <https://doi.org/10.7541/2018.012>

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>

达氏鲟*gpr54*基因的克隆及Kisspeptin注射对其表达的影响

MOLECULAR CLONING OF *GPR54* GENES AND EFFECTS OF KISSPEPTIN INTRAPERITONEAL INJECTION ON ITS EXPRESSION IN *ACIPENSER DABRYANUS*

水生生物学报. 2018, 42(5): 896–902 <https://doi.org/10.7541/2018.110>

达氏鲟*Elov4*、*Elov5*和*Elov7*克隆、组织分布及饥饿对其表达的影响

MOLECULAR CLONING, TISSUE DISTRIBUTION OF *ELOV4*, *ELOV5* AND *ELOV7* FROM *ACIPENSER DABRYANUS*

水生生物学报. 2020, 44(6): 1174–1181 <https://doi.org/10.7541/2020.136>

尼罗罗非鱼*Ikaros*基因的克隆及表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *IKAROS* GENE FROM NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

水生生物学报. 2018, 42(1): 77–85 <https://doi.org/10.7541/2018.010>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.108

长江鲟*org*基因的克隆和表达分析

叶欢 武梦斌 危起伟 岳华梅 阮瑞 杜浩 冷小茜 李创举

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 武汉 430223)

摘要: 为了研究卵子发生相关基因*org*基因在长江鲟(*Acipenser dabryanus*)卵子发生过程的作用, 克隆得到长江鲟*org*基因(命名为*Adorg*)的全长cDNA序列, 该序列为1031 bp, 编码233个氨基酸。氨基酸序列比对分析发现, 长江鲟*Adorg*与斑马鱼(*Danio rerio*)*ZOrg*蛋白序列的一致性最高, 为49.5%。荧光定量PCR研究发现, 长江鲟*Adorg* mRNA特异地表达于性腺, 其在卵巢大量表达, 在精巢微量表达, 而在其他组织(肝、肠、脾、肾、心、肌肉、鳃、垂体和下丘脑)均未检测到其表达; 胚胎发育过程的动态表达分析表明, *Adorg*为母源表达, 在原肠胚之前均具有较高的表达水平, 随后其表达量急剧下降; 进一步研究其在卵子发生的表达模式, 发现*Adorg*基因在未分化性腺中的表达量极低, 随着卵母细胞的生长发育, 其mRNA表达水平急剧上升, 且维持在非常高的水平, 在Ⅱ期卵巢中的表达量最高。性腺切片RNA原位杂交实验结果表明, *Adorg*特异地在生殖细胞表达; 在卵巢中, *Adorg*在卵原细胞的信号较弱, 但在初级卵母细胞中, 其信号急剧增强且分布在卵母细胞的胞质, 且随着初级卵母细胞的生长发育, 其信号也逐渐增强; 在精巢中, 发现*Adorg* mRNA在A型和B型精原细胞中表达, 而在初级和次级精母细胞中未发现阳性信号。上述结果表明, *Adorg*基因可能在长江鲟性别分化和卵子发生过程中都起重要作用, 有待通过基因敲降或敲除技术来进一步阐明其功能。

关键词: 长江鲟; *org*基因; mRNA表达分析; 卵子发生

中图分类号: Q344⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2021)05-0958-08



鱼类有30000余种, 其卵母细胞发育方式和产卵策略不尽相同, 但大多数鱼类卵子发生具有一些共同的特征^[1]。光学和电子显微镜的研究结果表明: 鱼类卵巢腔中初级卵母细胞发育为成熟的卵子, 其形态结构发生了显著的变化, 主要包括以下几个阶段: 小生长期、皮层小泡期、卵黄发生前期、卵黄发生后期和成熟期^[2]。在卵黄生成期, 卵母细胞需要积累其成熟所必需的多种蛋白质、脂类和RNA等物质^[1]。然而, 目前有关鱼类卵子和卵黄发生相关基因的研究不多, 常见的有*bmp15*^[3]、*gdf9*^[4, 5]、*figla*^[6, 7]、*foxl2*^[8-10]和*vlg*^[11]等; 尤其是卵巢特异表达的基因几乎没有报道, 仅见斑马鱼*zorg*基因^[12]和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的*fbxoo*基因^[13]的相关研究, 它们特异地表达于卵母细胞, 且大量存在于卵黄发生前期的卵母细胞的胞质, 推

测其可能在卵子发生过程中起着重要作用。

长江鲟(*Acipenser dabryanus*)又名达氏鲟、沙腊子, 隶属硬骨鱼纲、软骨硬鳞总目、鲟形目、鲟科、鲟属鱼类, 是我国长江流域特有的三种鲟鱼之一。20世纪80年代后, 由于水利工程建设导致的栖息地退化、过度捕捞及环境污染等因素, 长江鲟自然种群严重衰退, 其自然繁殖活动在2000年前后停止, 野外种群几乎灭绝^[14], 2010年被国际自然保护联盟列为极度濒危(CR)物种, 现为国家一级重点保护动物。近30年来, 科研工作者围绕长江鲟的物种保护开展了全人工繁殖^[15, 16]、资源修复^[17]、营养^[18, 19]和疾病^[20, 21]等方面开展了诸多研究。长江鲟性成熟周期长, 雌性初次性成熟为6—8龄, 雄性为3—5龄^[22]。前期我们尝试通过在饲料中添加外源的生长激素及促性腺激素投喂不同年龄段的幼鱼^[23]

收稿日期: 2020-05-12; **修订日期:** 2020-09-14

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2018JBF10和2019GH12); 国家自然科学基金(31902353)资助 [Supported by the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2018JBF10 and 2019GH12); the National Natural Science Foundation of China (31902353)]

作者简介: 叶欢(1985—), 男, 助理研究员; 主要从事鱼类生殖发育研究。E-mail: yehuan@yfi.ac.cn

通信作者: 李创举, 研究员; E-mail: lcj@yfi.ac.cn

和注射Kisspeptin多肽等手段来研究长江鲟生长生殖的调控机制^[24],以期缩短其性成熟时间。然而,它们对长江鲟卵巢发育的促进作用并不明显。因此,有必要开展长江鲟卵子发生相关基因的研究,以期对长江鲟的生殖调控提供新思路。

通过分析长江鲟性腺转录组数据,我们鉴定了卵巢特异表达基因*zorg*的同源基因。基于此,本研究从长江鲟卵巢中克隆得到了*Adorg*的cDNA序列,并进行了序列特征分析,研究了*Adorg* mRNA在长江鲟不同组织和不同发育时期胚胎的表达特征,进一步分析了卵子发生过程中*Adorg*表达量的动态变化规律和性腺中的细胞定位。研究结果为探讨*Adorg*基因对长江鲟卵子发生的作用及机制奠定了基础,对深入了解鲟卵子发生过程及其生殖调控积累资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

长江鲟来自中国水产科学研究院长江水产研究所太湖试验场(荆州)。取2.5龄长江鲟不同组织,包括肝、肠、脾、肾、心、卵巢、精巢、肌肉、鳃、垂体和下丘脑。在长江鲟子二代全人工繁殖期间,取3组来自不同亲本的胚胎,包括2细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、心脏原基期、心跳期和出膜期;同时,还采集了未受精卵样品。另外,采集不同发育时期性腺样品,包括未分化性腺[出膜后45d幼鱼,体长为(10.2±0.3) cm,体重为(3.4±0.2) g]、I期卵巢[1.5龄幼鱼,体长为(59.6±2.4) cm,体重为(1452.3±38.2) g]、II期卵巢和精巢[2.5龄幼鱼,体长为(81.8±4.6) cm,体重为(2521.6±96.5) g]、III期卵巢[5龄成鱼,体长为(103.4±8.2) cm,体重为(8321.7±486.2) g]和IV期卵巢[7龄成鱼,体长为(121.3±12.4) cm,体重为(15050.1±1384.7) g],其中III期和IV期长江鲟卵巢为活体手术取样所得。用于后续RNA提取和定量PCR分析的样品置于RNA later (Biological Industries, 以色列)保存,每个样品3个生物学重复;同时,各发育时期性腺样本置于波恩溶液固定,用于组织切片。取2.5龄长江鲟精巢和卵巢用4%多聚甲醛固定,用于原位杂交。本研究实验鱼的使用得到了中国水产科学研究院长江水产研究所实验动物福利伦理委员会的批准,采样过程遵守了实验动物福利和相关制度。

1.2 长江鲟*Adorg* 基因cDNA全长克隆

按照RNeasy Plus Mini Kit试剂盒(Qiagen)说明书步骤提取卵巢组织总RNA,取1 μL RNA样品分别用琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计(Nano-Drop™ Lite, Thermo)检测其质量和浓度。按照

SMARTer® RACE 5'/3'Kit(TaKaRa)操作手册的方法,以长江鲟卵巢RNA为模板,分别合成SMART 3' cDNA和5' cDNA,置于-20℃冰箱保存备用。

从长江鲟卵巢转录组数据注释结果中获得*Adorg*基因的部分序列,用Oligo 6.0软件设计RACE引物(表1),进行巢氏PCR扩增。以合成的卵巢SMART cDNA为模板,使用引物*Adorg*-5gsp1和*Adorg*-3gsp1与引物UPM分别进行5'和3'RACE的第一次PCR扩增;将PCR产物稀释10倍作为第二次PCR的模板,相应的引物为*Adorg*-5gsp2和*Adorg*-3gsp2与NUP。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并回收目的产物,连接到pMD19-T克隆载体,转化感受态DH5α,菌落PCR筛选阳性克隆并测序。根据3'和5'端序列所包含的重叠序列进行拼接,得到*Adorg*基因全长cDNA序列。

1.3 长江鲟*Adorg* 基因序列分析及特征

将已获得的长江鲟*Adorg* cDNA全长序列与NCBI数据库进行同源分析;用ORF Finder进行开放阅读框查找,并推导其相应的氨基酸序列;氨基酸序列同源性分析采用Clustal W软件和BOXSHADE 3.21。

1.4 长江鲟*Adorg* 基因在不同组织及胚胎发育时期的表达特征

提取2.5龄长江鲟不同组织(肝、肠、脾、脾、

表1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'—3')	用途 Usage
<i>Adorg</i> -3gsp1	GTGACAGCGAGGAGAACA GGACTC	3'RACE-PCR
<i>Adorg</i> -3gsp2	ACTCAGAGCAGCAATCGTG ATCC	3'RACE-PCR
<i>Adorg</i> -5gsp1	TCGCTGCTCGGCTCGTAAGT GGGA	5'RACE-PCR
<i>Adorg</i> -5gsp2	GGACAGGGTAGCCGAGCGC ACTCT	5'RACE-PCR
UPM	CTAATACGACTCACTATAG GGCAAGCAGTGGTATCAAC GCAGAG和 CTAATACGACTCACTATAG GGC	RACE通用引物
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCA GAGT	RACE通用引物
<i>Adorg</i> -qF	CTGGGAAGGGTAACAAGCG TAAAC	荧光定量PCR
<i>Adorg</i> -qR	CCTCTTCTGCCACCTCCTCT ATG	荧光定量PCR
<i>Adorg</i> -anti-F	TGAGAAGCCGCCAGTTGTT G	原位杂交反义探针
<i>Adorg</i> -anti-R	TAATACGACTCACTATAGG GCTGAGGCGTAATCTGTAA AACTTG	原位杂交反义探针
<i>Adorg</i> -sense-F	TAATACGACTCACTATAGG GTGAGAAGCCGCCAGTTGT TG	原位杂交正义探针
<i>Adorg</i> -sense-R	CTGAGGCGTAATCTGTAAA ACTTG	原位杂交正义探针

肾、心、卵巢、精巢、肌肉、鳃、垂体和下丘脑)和各发育时期胚胎(未受精期、2细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、心脏原基期、心跳期和出膜期)总RNA,然后利用PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)合成cDNA。根据*Adorg*基因序列设计定量PCR引物(*Adorg*-qF和*Adorg*-qR,表1),将卵巢cDNA按照1:10的比例梯度稀释,以其为模板进行qPCR扩增,绘制标准曲线,发现目的产物特异,扩增效率为97.32%,相关系数为0.995,说明该对引物满足qPCR要求。根据实验室前期对长江鲟最适内参基因的分析^[25],选取延伸因子1 α (*EF-1 α*)作为内参基因。用荧光定量仪QuantStudio6 Flex(Life Technologies)进行qPCR,反应体系为20.0 μ L:cDNA模板1 μ L,2 $\times$ PowerUp[™] SYBR[™] Green Master Mix 10 μ L (ABI),10 nmol/L正、反引物各0.4 μ L,ddH₂O 8.2 μ L;反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10min;95 $^{\circ}$ C变性15s,58 $^{\circ}$ C,15s,72 $^{\circ}$ C,15s,共40个循环;熔解曲线分析,95 $^{\circ}$ C变性15s,从60 $^{\circ}$ C开始,以0.05 $^{\circ}$ C/s的速度上升到95 $^{\circ}$ C。每个样品进行3个生物学重复和3次技术重复,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算基因的相对表达量。

1.5 长江鲟*Adorg* 基因在不同发育时期卵巢的表达特征

将波恩溶液固定的不同发育时期性腺的样品经酒精梯度脱水1h(70%酒精、80%酒精、90%酒精、95%酒精、100%酒精 I 和100%酒精 II),然后经二甲苯透化(2次,每次30min),接着浸蜡(2次,每次30min),随后包埋和切片,厚度为5 μ m。用苏木精-伊红染色,封片胶Entellan[®] (Merck)封片,最后在正置显微镜下拍照(DM5000B, Leica)。卵巢经确定发育时期后,提取相应的RNA,然后逆转录为cDNA。参照1.4实时荧光定量PCR的反应条件和程序开展*Adorg*基因在不同发育时期卵巢的表达量分析,内参基因为*RPL8*。

1.6 原位杂交

设计引物(表1)从卵巢cDNA中扩增*Adorg* 基因片段,琼脂糖电泳回收,克隆并连接到PGEM-T Easy载体(Promega),转化大肠杆菌感受态,挑选阳性克隆并测序。选择正确插入方向的单克隆,提取质粒PGEM-*Adorg*。采用限制性内切酶*Spe* I 线性化PGEM-*Adorg*质粒,酶切完全后纯化得到相应DNA,测定浓度后用T7 RNA转录酶合成*Adorg*反义和正义的地高辛探针。将经4% PFA固定过夜的2.5龄长江鲟卵巢和精巢用30%蔗糖通透,OTC(SAKURA)包埋后冰冻切片,切片的厚度为7 μ m。利用合成的地高辛反义和正义RNA探针进行切片原位杂交^[26]。

在染色达到合适的效果后,终止染色反应,封片并拍照。

1.7 数据分析

实验数据用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示,利用SPSS 20.0对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),采用Duncan氏法进行多重比较检验分析组间的差异显著性,显著水平定为 $P<0.05$ 。使用Origin 2019软件制图。

2 结果

2.1 长江鲟*Adorg*基因序列特征分析

通过RACE-PCR得到了*Adorg* 基因的全长cDNA序列,为1031 bp(不包括Poly A),开放阅读框为702 bp,编码233个氨基酸,5'非编码区长24 bp,3'非编码区长305 bp。该序列在GenBank中的登录号为MT424753。通过PROSITE和BLAST比对,发现该蛋白没有已知的结构域,仅在斑马鱼(NP_001093540)、大西洋鲑(*Salmo salar*, ADJ38821)和鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*, XP_033478614)中有同源基因的注释结果,为卵子发生相关的基因。多重比对结果表明,长江鲟*Org*与斑马鱼、大西洋鲑和鞍带石斑鱼该蛋白序列的一致性分别为49.5%、45.9%和43.5%(图1)。

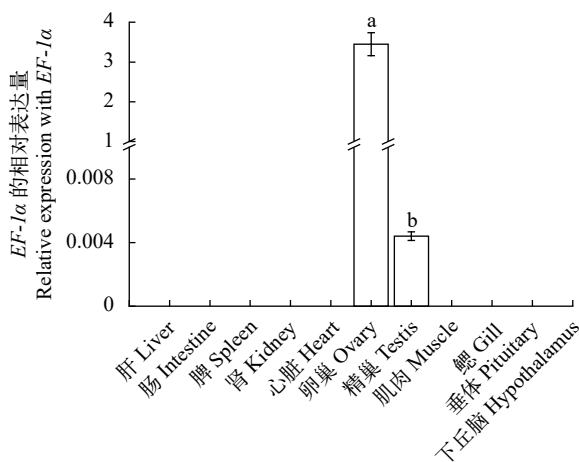
2.2 长江鲟*Adorg*基因在不同组织和不同发育时期胚胎的表达特征

利用荧光定量PCR方法检测了长江鲟成鱼不同组织和不同发育时期胚胎中*Adorg* mRNA表达水平,结果显示:*Adorg*仅在精巢和卵巢中表达,且其在卵巢的表达量远高于精巢(图2, $P<0.05$)。进一步通过石蜡切片,发现该时期卵巢组织处于卵母细胞初级生长期,可观察到少量卵原细胞和大量初级卵母细胞,卵径约为150 μ m(图3C);而精巢已形成了精小叶,主要由A型精原细胞, B型精原细胞和初级精母细胞组成(图3F)。在不同发育时期胚胎中,发现*Adorg*为母源表达,在原肠胚之前均具有较高的表达水平;之后,*Adorg* mRNA的表达量显著减少(图4, $P<0.05$)。以上结果表明,长江鲟*Adorg*不仅是一个母源基因,还是卵巢高表达基因。

2.3 长江鲟*Adorg*基因在不同发育时期卵巢的表达特征

为了揭示*Adorg*基因在卵子发生过程中的表达动态变化,进一步研究其在不同发育时期卵巢的表达特征。首先通过石蜡切片确定性腺或卵巢的发育时期,结果表明:出膜后45d,长江鲟的性腺还未分化,没有出现典型雌性或雄性生殖表皮特征^[27](图3A);1.5龄长江鲟卵巢(图3B),卵原细胞快速进

长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	1	MESLAEPVAVARERENKTE-DKQVTKKKGVLRVFFIQLSHFGPLKPVSVLRNLSWLA	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	1	MTDQCN-YAVESNAEGQEKAVAKRRGAVSAVFCRLSQFWPVSITVRALRGLWSLF	
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	1	MKVIFISKLRVFPQCA---IVVKRDGVLTTVLCLRSQFWPM---RALRGFWLL	
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	1	MTILETHRDVAEADNAEG---SVVRRDGVFRSVLRGL---LWPFQVVRVYRGFWVL	
长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	60	GLSCPVED---LGAFAHTPALVREHRTGKKRLRRVTRVLLSYTPYRLQSALGYVPSSIG	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	57	GFSTPVKSVSLASEEKSSPNERQCRVVRKRLHRVTRILLSTLPRRIQSALGYPVCTSIG	
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	50	GFSPSDEKAFVAPEDDDNPSAREHLAGRKLRRATRILLAILPRRIQSALGYPVCTSIG	
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	52	GFRQPQEKPLVSP---AVPSPARQSLAGRKLHRVTRILLAILPRRVGALGYVPSSIG	
长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	118	KTAVS---EVRCSPTKPSGKGNKRKQEDVDEEH---QSWVEALNKLGDDEL---SEGDP	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	117	CAVSP---EVRCSPTKPCGKSKRKQDDLDEDEVEEQ---QSWVEALTQELAEED---HVADPD	
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	110	CAVSPGMVKVLGSPTKLCKGKNKRKQDDDAEEQ---QTWVEALSQELADEE---PSVDPD	
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	109	RSLSPT---EIRVSPTKPCGKSKRKQDELDEDEEEESQTWVEALTQELAEDEGPEMDPD	
长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	171	YEPSSDGFSDSEENRTHNDTESDIEVAFEKATIK-----ELITAKK-----	
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	172	YEP-SAVETDSEYRSHNDTESDIEV---EKGVVVIK-----	
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	165	YEP-SVVITDSEEYNSRNDTESDIDVS---EKGVVVIDDLKTVQSERLVVMAFHHSARILTR	
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	166	YEP-STTETSEYRSHNNTESDIEVQ---EKGVVIED-----VNTEFEVSN-----	
长江鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	214	-ASTEGGSAGIQNRAHSEQQS-----	Identity 100.0%
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	205	-DLHTVVPSEAG-----	49.5%
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	223	LALNKKSCFCFVCRMFLKWPSGRWHFRYSWCDKHLVFFFKQT	45.9%
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	209	-PSEITCPAVVY-----	43.5%

图1 长江鲟*AdOrg*与其他鱼类*Org*蛋白序列比对Fig. 1 Protein sequence alignment of Yangtze sturgeon *AdOrg* with that of other fish homologues图2 长江鲟*Adorg*基因在成鱼不同组织的表达水平Fig. 2 The expression of *Adorg* gene in different adult tissues of Yangtze sturgeon

行有丝分裂, 大量增殖, 且少部分卵原细胞进入减少分裂, 形成了初级卵母细胞(I期); 2.5龄长江鲟卵巢(图3C), 主要由初级卵母细胞组成(II期); 5龄长江鲟卵巢(图3D), 初级卵母细胞处于卵黄积累期(III期), 卵径达到约1.5 mm; 7龄长江鲟卵巢(图3E), 初级卵母细胞进一步生长(IV期), 卵径接近2.0 mm。随后, 定量PCR检测结果表明: *Adorg*基因在未分化

性腺中的表达量极低, 随着卵母细胞的发育, 其mRNA表达水平急剧上升(图5, $P < 0.05$), 且维持在非常高的水平, 在II期卵巢中的表达量最高(图5)。

2.4 长江鲟*Adorg* mRNA在性腺中的细胞定位

为了进一步了解*Adorg*基因在性腺中的表达特征, 利用原位杂交分技术分析其在2.5龄卵巢和精巢组织中细胞的表达情况。结果显示: *Adorg* mRNA仅在生殖细胞的细胞质中表达, 而在体细胞中没有表达。在卵巢中, *Adorg* mRNA在卵原细胞中微弱表达, 随着卵母细胞的生长, 其表达量增加(图6A)。该结果同qPCR结果相一致。在精巢中发现*Adorg*在A型和B型精原细胞中表达, 而在初级和次级精母细胞中未发现阳性信号(图6B)。此外, 正义探针未发现信号(图6C和6D)。

3 讨论

在本研究中, 我们从长江鲟卵巢组织克隆得到了*Adorg*基因全长cDNA序列, 编码233个氨基酸; 通过与NCBI数据库比对, 发现与已注释的鱼类卵子发生相关基因*org*的同源性不到50.0%。由于只有几种鱼类注释了该基因, 导致无法进一步分析其系统进化关系。但是, 之前我们对中华鲟生殖细胞标记基因*boule*和*dead end*的研究发现^[26, 28], 其氨基酸

序列与其他鱼类相应的一致性也只有40%左右,因此,我们认为长江鲟*Adorg*基因为卵子发生相关基因*org*的同源基因,其与其他物种的系统进化关系,有待更多物种的该基因被鉴定后再进行分析。

斑马鱼的相关研究表明,*zorg* mRNA为卵巢特异表达^[12]。本研究通过定量PCR检测发现,虽然长江鲟*Adorg*基因在卵巢大量表达,但在精巢也存在少

量表达。这可能是由于定量PCR比RT-PCR更灵敏造成的,但也有待在其他鱼类中研究该基因的表达特征来进行印证。在胚胎发育时期,与斑马鱼*zorg*表达模式相似,长江鲟*Adorg*也是母源表达,并在胚胎发育早期高表达。进一步通过胚胎原位杂交发现,斑马鱼*zorg*在原始生殖细胞也有表达,暗示着该基因可能也与早期生殖细胞的形成相关^[12]。另外,我们

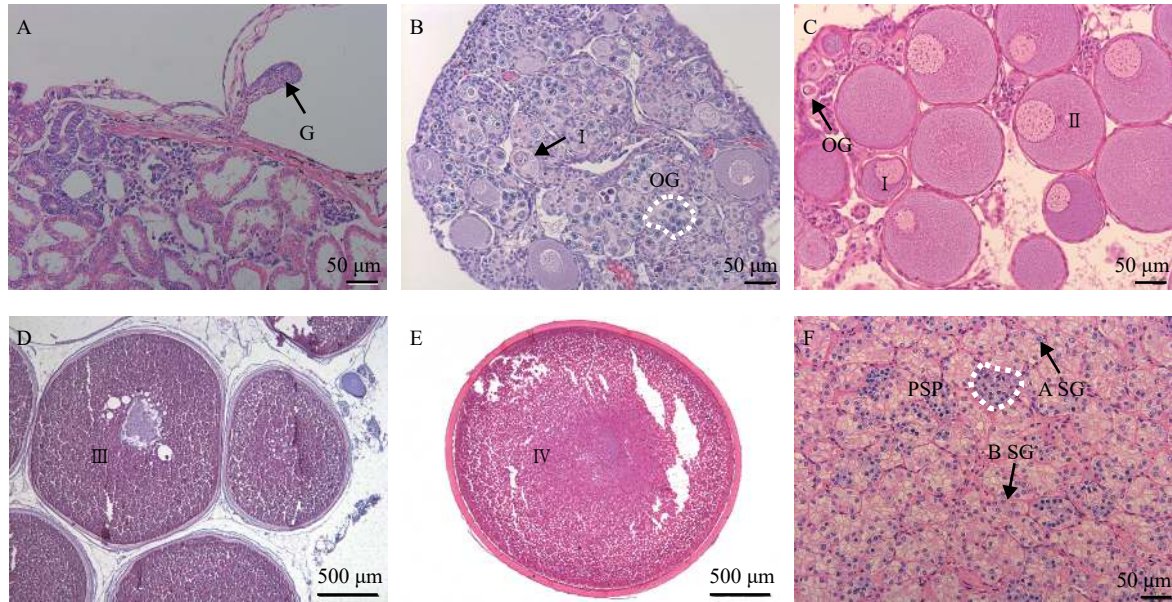


图3 长江鲟不同发育时期性腺的组织学特征

Fig. 3 Histological characteristics of different stages of Yangtze sturgeon gonads

A. 未分化的性腺; B. I 期卵巢; C. II 期卵巢; D. III 期卵巢; E. IV 期卵巢; F. II 期精巢; G. 性腺; Og. 卵原细胞; SG. 精原细胞; PSP, 初级精母细胞

A. undifferentiated gonad; B. ovary at the stage I; C. ovary at the stage II; D. ovary at the stage III; E. ovary at the stage IV; F. testis at the stage II; G. gonad; Og. oogonia; SG. spermatogonia; PSP. primary spermatocytes

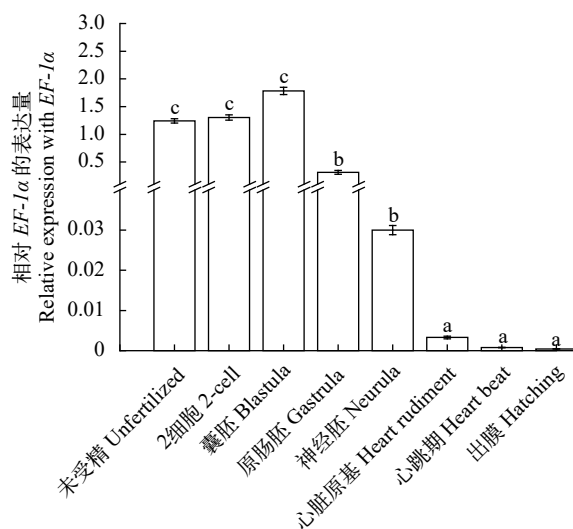


图4 长江鲟*Adorg*基因在未受精卵和不同发育时期胚胎的表达量

Fig. 4 Expression levels of *Adorg* in unfertilized eggs and different development stages of Yangtze sturgeon embryos

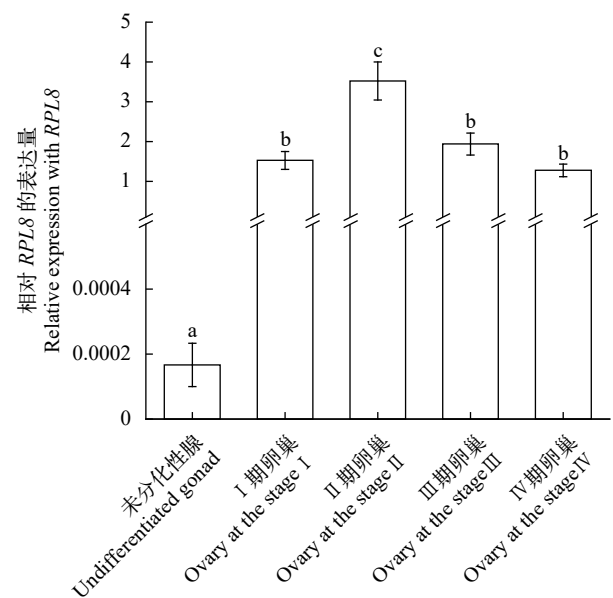


图5 长江鲟*Adorg*基因在卵子发生过程中的表达量变化

Fig. 5 Expression variation of *Adorg* gene during oogenesis

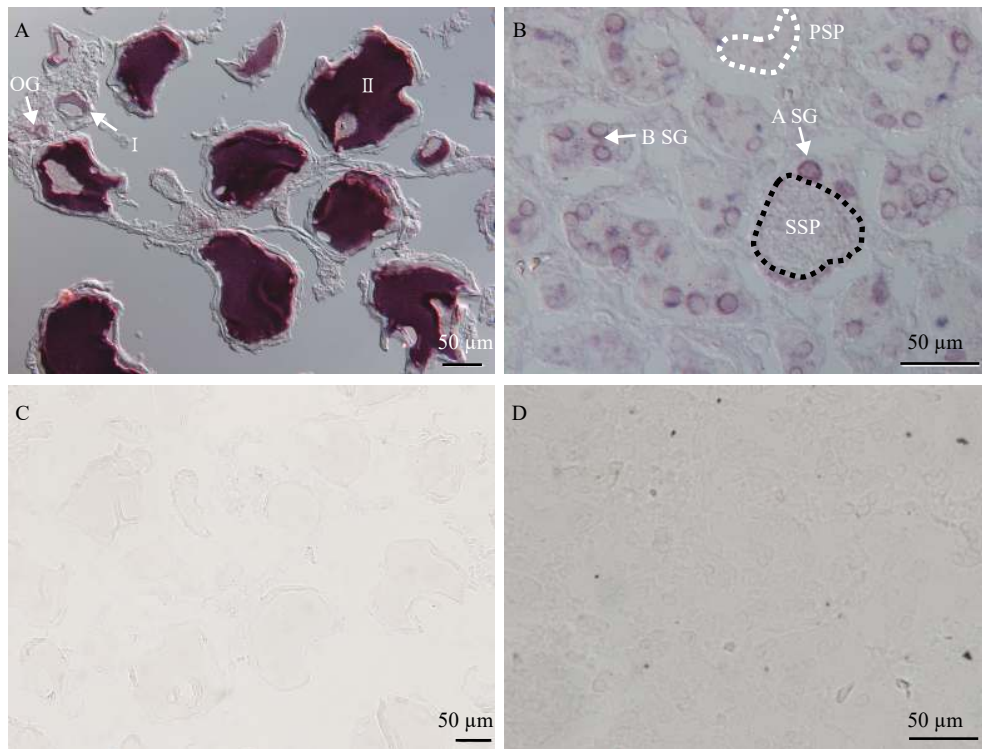


图6 *Adorg*基因在长江鲟卵巢和精巢的细胞定位

Fig. 6 Cellular localization of *Adorg* gene in the ovary and testis of Yangtze sturgeon

A. *Adorg* mRNA在卵巢的细胞定位; B. *Adorg* mRNA在精巢的细胞定位; C. 正义探针在卵巢中没有信号; D. 正义探针在精巢中没有信号; Og. 卵原细胞; SG. 精原细胞; PSP. 初级精母细胞; SSP. 次级精母细胞

A. localization of *Adorg* mRNA in the ovary; B. localization of *Adorg* mRNA in the testis; C. signal of sense probe of *Adorg* mRNA in the ovary; D. signal of sense probe of *Adorg* mRNA in the testis. Og. oogonia; SG. spermatogonia; PSP. primary spermatocytes; SSP. secondary spermatocytes

也研究了*Adorg*在卵子发生过程中的表达模式,发现除了未分化性腺之外,*Adorg* mRNA在其他发育时期的卵巢都维持着非常高的表达量。斑马鱼中也有与之相似的结果,该结果表明,*Adorg*基因在长江鲟卵子发生过程中可能起着非常重要的作用。

根据卵母细胞的生长发育特征,鲟鱼卵子生成的过程被划分为7个发育期^[29]。本研究在此基础上,分析了长江鲟*Adorg*基因在II期卵巢的表达及分布特征。通过原位杂交实验发现,*Adorg* mRNA在初级卵母细胞有很强的信号且均匀分布在其细胞质;随着卵母细胞的生长发育,*Adorg*信号也逐渐增强,而滤泡细胞中没有发现信号。*Adorg* mRNA在初级卵母细胞的高表达,可能与原始卵泡中卵黄还未沉积,而mRNA和蛋白质等物质的积累相对较多相关^[1]。同样,在斑马鱼中,*zorg* mRNA早期初级卵母细胞的细胞质中大量表达;但是,随着初级卵母细胞进入次级生长(III—IV期),导致卵黄的沉积及周围滤泡细胞层的发育完整,*zorg*表达于卵母细胞的皮层区域^[12]。这与斑马鱼*vasa*基因在卵母细胞中的表达特征十分相似^[30],因此,推测*zorg*在生殖细胞正

常发育过程中起着重要作用。随着基因编辑技术的快速发展,关于*Adorg*基因对长江鲟卵巢发育的调控作用,可以借助模式动物斑马鱼的功能研究来阐明。另外,定量PCR及原位杂交结果均表明,长江鲟*Adorg*基因除了在卵巢组织表达之外,在精巢中也有低水平的表达,且分布于A型和B型精原细胞,这一结果与斑马鱼的结果不相同。总之,本研究结果表明长江鲟*Adorg*基因不仅可能在卵子发生过程发挥重要作用,而且对生殖细胞的发育和分化也可能起着作用,有待通过基因敲降或敲除技术来进一步阐明。

参考文献:

- [1] Lubzens E, Young G, Bobe J, *et al.* Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 367-389.
- [2] Urbatzka R, Rocha M J, Rocha E. Regulation of ovarian development and function in teleosts [M]. *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. London: Academic Press, 2011: 65-82.
- [3] Dranow D B, Hu K, Bird A M, *et al.* Bmp15 is an oocyte-

- produced signal required for maintenance of the adult female sexual phenotype in zebrafish [J]. *PLoS Genetics*, 2016, **12**(9): e1006323.
- [4] Liu L, Ge W. Growth differentiation factor 9 and its spatiotemporal expression and regulation in the zebrafish ovary [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, **76**(2): 294-302.
 - [5] Halm S, Ibañez A J, Tyler C R, *et al.* Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, **291**(1): 95-103.
 - [6] Kanamori A, Toyama K, Kitagawa S, *et al.* Comparative genomics approach to the expression of *figa*, one of the earliest marker genes of oocyte differentiation in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Gene*, 2008, **423**(2): 180-187.
 - [7] Qiu Y, Sun S, Charkraborty T, *et al.* Figla favors ovarian differentiation by antagonizing spermatogenesis in a teleosts, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(4): e0123900.
 - [8] Nakamoto M, Matsuda M, Wang D S, *et al.* Molecular cloning and analysis of gonadal expression of *Foxl2* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **344**(1): 353-361.
 - [9] Zhang X, Li M, Ma H, *et al.* Mutation of *foxl2* or *cyp19a1a* results in female to male sex reversal in XX Nile tilapia [J]. *Endocrinology*, 2017, **158**(8): 2634-2647.
 - [10] Zhou Y D, Wu X X, Zhao H P, *et al.* Generation and phenotype analysis on *foxl2* mutant in medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2019, **39**(2): 20-30. [周运迪, 吴星星, 赵海萍, 等. 青鳞 *foxl2* 基因敲除突变体的构建与表型分析 [J]. 广东海洋大学学报, 2019, **39**(2): 20-30.]
 - [11] Babin P J, Carnevali O, Lubzens E, *et al.* Molecular Aspects of Oocyte Vitellogenesis in Fish [M]. The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007: 39-76.
 - [12] Dai L, Ma W, Li J, *et al.* Cloning and characterization of a novel oocyte-specific gene *zorg* in zebrafish [J]. *Theriogenology*, 2009, **71**(3): 441-449.
 - [13] Wang L, Tripurani S K, Wanna W, *et al.* Cloning and characterization of a novel oocyte-specific gene encoding an F-Box protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2013, **11**(1): 86.
 - [14] Wu J M, Wei Q W, Du H, *et al.* Initial evaluation of the release programme for Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus* Duméril, 1868) in the upper Yangtze River [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(6): 1423-1427.
 - [15] Gong Q, Liu Y, Du J, *et al.* Study on artificial reproduction of cultured *Acipenser dabryanus* Dumeril [J]. *South-west China Journal of Agricultural Sciences*, 2013, **26**(4): 1710-1714. [龚全, 刘亚, 杜军, 等. 达氏鲟全人工繁殖技术研究 [J]. 西南农业学报, 2013, **26**(4): 1710-1714.]
 - [16] Du H, Luo J, Zhou L, *et al.* Technologies for reproduction of the third generation of *Acipenser dabryanus* in captive [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2020, **39**(2): 197-203. [杜浩, 罗江, 周亮, 等. 长江鲟三代繁育技术研究 [J]. 四川动物, 2020, **39**(2): 197-203.]
 - [17] Du H, Wei Q W, Xie X, *et al.* Improving swimming capacity of juvenile Dabry's sturgeon, (*Acipenser dabryanus* Duméril, 1869) in current-enriched culture tanks [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2014, **30**(6): 1445-1450.
 - [18] Zhang L, Wei Q W, Zhang S H, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, body composition, digestive enzyme activities and blood biochemical parameters of juvenile *Acipenser dabryanus* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, **46**(6): 79-85. [张磊, 危起伟, 张书环, 等. 饲料蛋白水平对达氏鲟幼鱼生长性能、体组成、消化酶活性以及血液生化指标的影响 [J]. 淡水渔业, 2016, **46**(6): 79-85.]
 - [19] Chu Z P, Wei Q W, Du H, *et al.* Effects of different carbohydrate sources on growth performance, body composition, and physiological and biochemical parameters of juvenile Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, **24**(2): 284-294. [褚志鹏, 危起伟, 杜浩, 等. 不同糖源对达氏鲟幼鱼生长、体成分及生理生化指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2017, **24**(2): 284-294.]
 - [20] Di J, Chu Z, Zhang S, *et al.* Evaluation of the potential probiotic *Bacillus subtilis* isolated from two ancient sturgeons on growth performance, serum immunity and disease resistance of *Acipenser dabryanus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019(93): 711-719.
 - [21] Huang J, Zhang S H, Di J, *et al.* Inactivated *Mycobacterium* vaccine induces innate immunity against *M. ulcerans* ecovar Liflandii (*MuLiflandii* ASM001) infection in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) [J]. *Aquaculture*, 2019(512): 734312.
 - [22] Zhuang P, Ke F, Wei Q, *et al.* Biology and life history of Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus*, in the Yangtze River [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997(48): 257-264.
 - [23] Li C J, Shan X S, Yue H M, *et al.* Effects of recombinant GH on growth, blood biochemistry and body composition of juvenile Dabry's sturgeon *Acipenser dabryanus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1106-1113. [李创举, 单喜双, 岳华梅, 等. GH重组蛋白对达氏鲟生长、血液生化及体组成的影响 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1106-1113.]
 - [24] Yue H M, Ye H, Ruan R, *et al.* Molecular cloning of *gpr54* genes and effects of kisspeptin intraperitoneal injection on its expression in *Acipenser dabryanus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(5): 896-902. [岳华梅, 叶欢, 阮瑞, 等. 达氏鲟 *gpr54* 基因的克隆及 Kisspeptin 注射对其表达的影响 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(5): 896-

- 902.]
- [25] Wu M B, Ye H, Yue H M, *et al.* Identification of the reference genes for qRT-PCR in Dabry's sturgeon, *Acipenser dabryanus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, **27**(7): 759-770. [武梦斌, 叶欢, 岳华梅, 等. 达氏鲟实时荧光定量PCR内参基因的筛选 [J]. 中国水产科学, 2020, **27**(7): 759-770.]
- [26] Ye H, Li C J, Yue H M, *et al.* Differential expression of fertility genes *boule* and *dazl* in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), a basal fish [J]. *Cell and Tissue Research*, 2015, **360**(2): 413-425.
- [27] Ye H, Li C J, Yue H M, *et al.* Establishment of intraperitoneal germ cell transplantation for critically endangered Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* [J]. *Theriogenology*, 2017(94): 37-47.
- [28] Yang X, Yue H, Ye H, *et al.* Identification of a germ cell marker gene, the *dead end* homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* [J]. *Gene*, 2015, **558**(1): 118-125.
- [29] Hochleithner M, Gessner J. The Sturgeons and Paddlefishes of the World: Biology and Aquaculture [M]. Demand: AquaTech Publications, 2012: 120-126.
- [30] Howley C, Ho R K. mRNA localization patterns in zebrafish oocytes [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, **92**(2): 305-309.

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *ORG* GENE IN YANGTZE STURGEON (*ACIPENSER DABRYANUS*)

YE Huan, WU Meng-Bin, WEI Qi-Wei, YUE Hua-Mei, RUAN Rui, DU Hao, LENG Xiao-Qian and LI Chuang-Ju

(Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China)

Abstract: Yangtze sturgeon, *Acipenser dabryanus*, is a freshwater fish that mainly distributed in the upper reaches of Yangtze River and its tributaries. Male and female Yangtze sturgeons in the wild reach sexual maturity at 4—6 and 6—8 years, respectively. Currently, it is a critically endangered species due to overfishing, habitat degradation and pollution. In order to protect and restore this species, many efforts have been made, such as building nature reserves and fishery stock enhancement and releasing. However, the wild population of Yangtze sturgeon has sharply decreased, and it is hardly observed in the Yangtze River now. Previous studies, such as diet supplemented with exogenous hormone and juveniles injected with peptide, were performed to short its sexual maturation time, but no effect has been observed. The oogenesis-related gene, *org*, plays an important role in the growth and development of oocytes in teleost fish. In order to reveal its function during the oogenesis of Yangtze sturgeon, a full-length cDNA of an *org* homologue was isolated (designated as *Adorg*), which was 1031 bp, encoding 233 amino acids. Multiple sequence alignments showed that *AdOrg* shared the highest sequence identity (49.5%) with zebrafish. By quantitative real-time PCR analysis, *Adorg* mRNA was specifically transcribed in the gonad, abundant in the ovary and weak in the testis. Transcription of *Adorg* was not detected in other somatic tissues including liver, intestine, spleen, kidney, heart, muscle, gill, pituitary and hypothalamus. During embryogenesis, *Adorg* was proved to be maternally transcribed, maintaining a high level before the gastrula stage, and then declining dramatically in later developmental stages. The transcription of *Adorg* was very limited in undifferentiated gonads, but it sharply increased in the following process of oogenesis, with its highest expression in stage II oocytes. In situ hybridization of gonad indicated that the signal of *Adorg* mRNA was specifically located in the germ cells. In the ovary, *Adorg* signal was weak in the oogonia, and it increased rapidly in the cytoplasm of primary oocytes, and became stronger with the development of oocytes. In the testes, the expression of *Adorg* was restricted to type A and B spermatogonia, and was barely detectable in spermatocytes. These findings suggested that *Adorg* gene might play vital roles not only in oogenesis, but also in development and differentiation of germ cells. Knock-down or knock-out of this gene is necessary for exploring its specific function. These results paved the way for understanding the function of *Adorg* gene in Yangtze sturgeon during oogenesis.

Key words: *Acipenser dabryanus*; *org* gene; mRNA expression analysis; Oogenesis