

长牡蛎 *Fem-1* 基因 cDNA 克隆和表达分析*

周祖阳, 李琪**, 于红, 孔令锋

(海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 266003)

摘要: 本研究通过 RACE 技术获得了长牡蛎(*Crassostrea gigas*) *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 基因 cDNA 全长序列, 并分析了其编码蛋白和系统进化关系。通过 RT-PCR 技术对采集的长牡蛎周年样品(2015 年 5 月~2016 年 4 月的性腺样品, 2015 年夏季各组织样品以及不同胚胎幼虫发育时期的样品)进行了表达分析。研究显示, 长牡蛎 *Fem-1b* 全长 2 580 bp, 编码 636 个氨基酸; *Fem-1c* 全长 2 417 bp, 编码 622 个氨基酸。蛋白结构预测显示, 两基因分别含有 6 和 7 个典型的锚定蛋白重复序列(Anyrin repeat)。RT-PCR 结果显示, 目的基因在精巢中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$); *Fem-1b* 在 6、7 月的精巢中和 *Fem-1c* 基因在 3、4 月的精巢中的表达量显著高于在其他组织中的表达量 ($P < 0.05$)。胚胎幼虫表达分析显示, 目的基因在胚胎发育早期的表达量显著高于胚胎发育中后期, 并在囊胚期达到最高值。我们推测 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 可能参与了性别决定和性别分化的过程。

关键词: 长牡蛎; *Fem-1b*; *Fem-1c*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S968.3; Q953+.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2018)06-045-10

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20170186

引用格式: 周祖阳, 李琪, 于红, 等. 长牡蛎 *Fem-1* 基因 cDNA 克隆和表达分析[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(6): 45-54.

ZHOU Zu-Yang, LI Qi, YU Hong, et al. Cloning and expression analysis of *Fem-1* gene of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Periodical of Ocean University of China, 2018, 48(6): 45-54.

Fem-1(*Ferminization-1*)基因最早是在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究中被发现, 并且在其性别决定通路中发挥了十分关键的作用。该基因不但对雄性体组织具有致雄化作用, 还可以对雄性和雌雄同体个体中的雄性生殖细胞产生调控作用^[1-4]。在秀丽隐杆线虫的性别决定通路中, *Fem* 基因既可以负调控下游的 *Tra-1* 基因, 又受到了上游 *Tra-2* 和 *Tra-3* 的负调控^[5-7]。除了线虫以外, *Fem-1* 基因家族也在人类、小鼠和斑马鱼中被发现^[8-11]。截止目前的研究表明, *Fem-1* 基因家族包含 *Fem-1a*, *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 三个基因, 尽管这 3 个基因的具体功能还不明确, 但是它们编码的氨基酸序列存在一定的相似性而且在脊椎动物和线虫之间存在一定的保守性。由此推测脊椎动物中 *Fem-1* 基因的功能可能与线虫相似, 在调节细胞凋亡方面发挥重要作用^[12]。迄今, 双壳贝类中 *Fem-1* 基因的研究目前仅在长牡蛎基因组和转录组的研究中有所报道^[13]。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又称太平洋牡蛎, 隶属软体动物门(Mollusca)瓣鳃纲(Lamellivranchia)翼形

亚纲(Pterimorphia)珍珠贝目(Pterioidea)牡蛎科(Ostriedae)巨蛎属(*Crassostrea*)。作为我国优良的海水养殖贝类, 长牡蛎具有抗逆性强、体型大、生长速度快、营养丰富、肉质鲜美等特点, 具有重要的市场经济价值, 现已成为我国北方牡蛎养殖的主要品种。然而, 长牡蛎在繁殖过程中存在很多特殊的繁殖生理现象, 比如性逆转和雌雄同体等现象。截止目前, 这些现象的机理还不清楚, 长牡蛎性别决定和分化机制还不明确^[13-15]。本文通过 RACE 技术和荧光定量技术对长牡蛎 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 两个基因进行克隆并且利用采集的周年样品和不同胚胎发育时期的样品进行表达分析。通过本研究, 旨在为长牡蛎性腺发育的分子机制研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2015 年 5 月—2016 年 4 月每月在齐东路水产市场购买来自乳山海域的长牡蛎 20~25 个。对样品进行解剖得到一部分性腺组织保存于波恩氏液中固定 24 h,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31772843); 泰山学者种业计划专家项目; 山东省科技发展计划项目(2016ZDJS06A06)资助
Supported by National Natural Science Foundation of China (31772843), Taishan Scholars Seed Project of Shandong, Shandong Province (2016ZDJS06A06)

收稿日期: 2017-04-19; 修订日期: 2017-08-28

作者简介: 周祖阳(1991-), 男, 硕士生, 从事水产动物遗传育种学研究。E-mail: 670111020@qq.com

** 通讯作者: E-mail: qili66@ouc.edu.cn

经过数次酒精洗涤后最终保存于70%酒精溶液中等待组织切片的制作,用于观察确定样品所处的性腺发育时期。解剖取得的目标组织保存于RNA保存液中,−30℃待用。目标组织包括所有样品的性腺组织,以及5—8月样品的外套膜、唇瓣、消化腺、闭壳肌和鳃组织。2016年8月采集长牡蛎胚胎各发育时期样品,置于RNA保存液中−30℃保存待用。

1.2 长牡蛎 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 基因克隆

采用 Trizol 法对长牡蛎各组织总 RNA 进行提取。提取结束后利用 Nanodrop 检测所提的 RNA 的浓度,接着利用 1.5% 琼脂糖凝胶电检测所提 RNA 完整性。利用试剂盒 SMARTTM RACE cDNA 完成 RACE cDNA 第一链的合成。在 NCBI 数据库中下载人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、池蝶蚌 (*Hyriopsis*

schlegelii) 和加州海兔 (*Aplisia californica*) 等物种的 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 蛋白序列,利用这些序列与长牡蛎基因组数据库进行比对获得预测长牡蛎 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 基因片段。根据所得片段设计引物扩增核心序列并验证。根据验证所得的核心序列设计 RACE 引物,采用巢式 PCR 的方法扩增得到 2 个基因的 3' 和 5' 端序列。实验所用引物见表 1。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电检测得到 PCR 产物长度符合预期后采用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒的操作对目的片段进行纯化回收。将目的片段连接至 pEASY-T1 载体,后转化至大肠杆菌感受态细胞中。通过蓝白斑筛选的方式挑取阳性克隆,经过菌液 PCR 检测。根据检测结果挑选合适的菌液送至北京华大基因测序。根据测序结果对目的基因片段进行拼接得到目的基因 cDNA 全长序列。

表 1 *Fem-1*

1.3 长牡蛎 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 基因序列分析和系统进化分析

利用 ORF finder 软件对目的基因开放阅读框进行预测。氨基酸序列的同源性比对由 NCBI 网站上的 BLAST 程序完成。通过 NJ 法建立的进化树通过 MEGA5.0 软件完成。除此之外,等电点以及相对分子质量的预测则是通过在线软件工具(http://web.expasy.org/compute_pi/)进行预测。

1.4 RT-PCR 分析

根据周年样品性腺石蜡切片的结果将长牡蛎性腺样品分为增殖期、生长期、成熟期、排放期和休止期(休止期无法分辨雌雄)5 个时期。选择每月占多数时期的样品雌雄各 3 个组成周年样品。他们对应的生长发育时期依次是 10 月至次年 2 月为休止期,3 月为增殖期,4、5 月为生长期,6、7 月为成熟期,8、9 月为排放期。组织分布的分析选择 6、7 月中处于成熟期个体的雌雄性腺、外套膜、闭壳肌、唇瓣、消化腺和鳃。不同胚胎时期的样品包括受精卵、2 细胞期、4 细胞期、囊胚期、壳顶幼虫、D 形幼虫和眼点幼虫。通过 Trizol 法对所有目的组织样品进行总 RNA 的提取,然后利用 Prime-Script™ RT reagent Kit 进行 cDNA 第一链的合成。根据克隆所得的目的基因片段设计荧光定

(A. *Cg-Fem-1b* 编码蛋白结构的预测; B. *Cg-Fem-1c* 编码蛋白结构的预测。A. Prediction of protein structure of *Cg-Fem-1b*. B. Prediction of protein structure of *Cg-Fem-1c*.)

图 2 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 编码蛋白结构的预测

Fig. 2 Prediction of protein structure of *Cg-Fem-1b* and *Cg-Fem-1c*

(GenBank 注册号见表 2 Genbank Accession numbers are indicated in Table 2)

图 3 长牡蛎与其他代表物种 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 氨基酸序列的系统进化分析

Fig. 3 A phylogenetic tree based on the *Fem-1b* and *Fem-1c* family members of *Crassostrea gigas* and other representative species

表2 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 系统进化树中氨基酸序列的来源信息Table 2 The *Fem-1b* and *Fem-1c* protein information used for phylogenetic analysis

名称 Species	登录号 Genbank	名称 Species	登录号 Genbank
人 <i>Homo sapiens Fem-1c</i>	NP_064562.1	人 <i>Homo sapiens Fem-1a</i>	NP_061178.1
鼠 <i>Mus musculus Fem-1c</i>	NP_775599.1	鼠 <i>Mus musculus Fem-1a</i>	NP_034322.3
鸡 <i>Gallus gallus Fem-1c</i>	XP_428816.3	鸡 <i>Gallus gallus Fem-1a</i>	XP_418271.3
蛙 <i>Xenopus laevis Fem-1C</i>	NP_001090163.1	斑马鱼 <i>Danio rerio Fem-1a</i>	NP_956131.1
斑马鱼 <i>Danio rerio Fem-1c</i>	AAO64431.1	青鳉 <i>Oryzias latipes Fem-1a</i>	XP_004079226.1
池蝶蚌 <i>Hyriopsis schlegelii Fem-1c</i>	AIG62900.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_011441062.1
海兔 <i>Aplysia californica Fem-1c</i>	XP_005097434.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_011439298.1
毛蟹 <i>Eriocheir sinensis Fem-1c</i>	AKS25866.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_019924245
人 <i>Homo sapiens Fem-1b</i>	NP_056137.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_011429054.1
鼠 <i>Rattus norvegicus Fem-1b</i>	NP_001101627.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_011418266.1
鸡 <i>Gallus gallus Fem-1b</i>	NP_001025724.1	长牡蛎 <i>Crassostrea gigas Fem-1 like</i>	XP_019924203.1
青鳉 <i>Oryzias latipes Fem-1b</i>	XP_004086250.1	秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans Fem-3</i>	NP_001255365.1
斑马鱼 <i>Danio rerio Fem-1b</i>	XP_695502.4	腐生水果线虫 <i>Caenorhabditis remanei Fem-3</i>	AAX16084.1
蛙 <i>Xenopus laevis Fem-1b</i>	NP_001085685.1	广杆线虫 <i>Caenorhabditis briggsae Fem-3</i>	AAN37405.1
毛蟹 <i>Eriocheir sinensis Fem-1b</i>	AKS25865.1		

Cg-Fem-1b 和 *Cg-Fem-1c* 表达具有明显的性别二态性,即精巢中的表达量显著高于卵巢(见图4)。除此之外,休止期(2015年10月—2016年2月)的表达量显著低于其他性腺发育时期($P < 0.05$)。精巢中 *Cg-Fem-1c* 在3月(增殖期)和4月(生长期)表达量显著高于其他组($P < 0.05$)。相比之下,*Cg-Fem-1b* 在6月

(成熟期)才出现显著地上调,并在之后的7月(成熟期)保持在了显著高于其他组的水平($P < 0.05$)。相比之下,卵巢中两基因的表达量,除了7月表达量显著高于其他组外,其他月份卵巢中的表达量之间没有明显变化($P > 0.05$)(见图5)。

(A. *Cg-Fem-1b* 在不同组织中的表达情况; B. *Cg-Fem-1c* 在不同组织中的表达情况。不同的字母代表差异性显著($P < 0.05$, 平均值±标准差, $n=3$)。A. Relative expression of *Cg-Fem-1b*. B. Relative expression of *Cg-Fem-1c*. Different letters indicate significant differences statistically ($P < 0.05$, Means±SE, $n=3$.)

图4 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 在不同组织中的表达情况Fig. 4 Relative expression of *Cg-Fem-1b* and *Cg-Fem-1c* in different tissues

(A. *Cg-Fem-1b* 在周年性腺样品中的表达情况。B. *Cg-Fem-1c* 在周年性腺样品中的表达情况。不同的字母代表差异性显著 ($P < 0.05$, 平均值 \pm 标准差, $n=3$)。A. Relative expression of *Cg-Fem-1b* during different months. B. Relative expression of *Cg-Fem-1c* during different months. Different letters indicate significant differences statistically ($P < 0.05$, Means \pm SE, $n=3$.)

图 5 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 在周年性腺样品中的表达情况

Fig. 5 Relative expression of *Cg-Fem-1b* and *Cg-Fem-1c* during different months

针对不同胚胎幼虫发育阶段的荧光定量实验结果显示, *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 的整体表达模式类似, 最高表达量都出现在囊胚期并且显著高于其他时期 ($P < 0.05$)。 *Cg-Fem-1b* 在囊胚期的表达量是受精卵表达量的 5.56 倍, 而 *Cg-Fem-1c* 在囊胚期的表达量是受精卵时期表达量的 18.38 倍 (见图 6)。除此之外, *Cg-Fem-1b* 在 2 细胞期、4 细胞期以及幼虫期显著高于除囊胚期

外的其他时期 ($P < 0.05$)。 *Cg-Fem-1c* 和 *Cg-Fem-1b* 在胚胎发育早期, 即 2 细胞期和 4 细胞期以及幼虫期也有显著高于除囊胚期外其他时期的高表达模式 (P)

睾丸中表达丰富,研究者推测 *Fem-1b* 参与了雄性性别决定的过程,而 *Fem-1c* 在精子发生过程中发挥了重要的作用^[9-10]。在本实验中 *Cg-Fem-1b* 除了在精巢中高表达之外,在闭壳肌以及唇瓣中也有显著高于其他组织的表达特点。东亚飞蝗的研究表明,*Fem-1* 基因在精巢中的表达量显著高于其他组织^[21-23]。在毛蟹的研究中发现 *Fem-1a*、*Fem-1b* 和 *Fem-1c* 三个基因的最高表达量分别出现在肝胰腺、精巢和肌肉中^[20]。这种表达模式被认为与毛蟹的性别决定和分化过程具有重要的关联,因为研究表明在毛蟹中肝胰腺可以为性腺的发育提供大量的能量^[23-24]。由此我们推测,*Cg-Fem-1b* 在闭壳肌中的高表达可能暗示了在肌肉为精巢的发育提供了能量。此外,*Cg-Fem-1c* 除了在精巢中表达量显著高于其他组织外,其他组织的表达量之间不存在显著性差异。池蝶蚌 *Fem-1c* 在精巢中表达量最高,此外在肝胰腺、肠和卵巢中也有较高表达量而在肾脏中则几乎不表达^[17]。在已有的长牡蛎组织表达谱中发现,长牡蛎的 *Fem-1b* 和 *Fem-1c* 都在血淋巴中具有较高的表达水平,除了血淋巴之外,*Fem-1b* 在唇瓣和卵巢中具有较高表达量而 *Fem-1c* 在闭壳肌中具有较高的表达^[13]。这与我们的研究结果有一定差别,我们推测这种差别可能是样品所处的不同海域的海区环境条件不同造成的。综上,在长牡蛎中 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 两个基因都具有精巢中的高表达模式,我们推测它们很可能都参与了长牡蛎精巢的发育和精子的形成。此外,*Cg-Fem-1b* 在闭壳肌以及唇瓣中也具有相对较高的表达模式,我们推测 *Cg-Fem-1b* 在闭壳肌中的高表达可能与精巢发育过程中的能量供应有关。

在秀丽隐杆线虫的研究中发现 *Fem-1* 在性别决定和分化过程中发挥了关键的作用^[1-2]。在很多物种的研究中都发现了 *Fem-1* 基因,并且呈现出与性别相关的特征。研究者在大马哈鱼虱 (*Caligus rogercresseyi*) 的研究中通过对雌雄个体的转录组测序结果进行筛选得到了 *Fem-1b*,发现其具有性别表达差异的模式^[25]。同样是通过雌性性腺的转录组分析,斑马鱼中发现 *Fem-1c* 基因在卵巢中具有高表达的特征,然而其具体的功能还不明确^[26]。在斑胸草雀 (*Zebra finch*) 发现 *Fem-1c* 基因存在 2 个拷贝,分别位于 Z 和 W 两条性染色体中^[27]。斑节对虾的研究中发现 *Fem-1* 基因上存在一个与性别决定有着明显关联的 SNP 位点^[28]。在长牡蛎中,*Fem-1b* 和 *Fem-1c* 在精巢中表达量显著高于其他组织,而且在各个繁殖期精巢的表达量都显著高于休止期。2 个基因不同的是,*Cg-Fem-1b* 在 6~9 月(成熟期和排放期)的表达量显著高于其他时期,这暗示了 *Cg-Fem-1b* 基因可能在精巢功能的维持以及诱发精子排放等发面发挥了重要的作用。反观 *Cg-Fem-1c*

基因则是在 3 和 4 月的(增殖期和生长期)表达量显著高于其他组,这种在精巢发育初期高表达的模式说了 *Cg-Fem-1c* 可能参与了精巢早期的发育以及精子的形成。在东亚飞蝗的研究中发现,随着精巢的发育 *Fem-1* 三个基因表达量都有显著的上调,相比 *Fem-1c* 在第 3 天有显著性上调,*Fem-1a* 和 *Fem-1b* 基因的上调发生在第 12 天^[18]。我们推测长牡蛎的 *Fem-1* 基因的表达可能与东亚飞蝗类似,即 *Fem-1c* 表达量的显著性提高的时期与 *Fem-1b* 有所不同,这暗示了 2 个目的基因在精巢发育中可能起到了不同的作用。然而具体作用如何,还需要进一步的分析。在小鼠的研究中发现通过外源干扰的手段降低了 *Fem-1c* 基因的表达,并没有导致雌性幼崽数量的显著提高,研究者得出结论 *Fem-1c* 可能与小鼠的性别分化和性别决定没有关系^[29]。这暗示了 *Fem-1c* 基因在性别分化作用中不保守的特点,因此其基因的具体功能还需要进一步的探究。针对不同胚胎幼虫发育阶段的荧光定量实验结果显示,*Cg-Fem-1c* 在胚胎发育期的表达模式与 *Cg-Fem-1b* 类似,即都在 2 细胞和 4 细胞期显著上调,在之后的囊胚期继续上调至最高值,后随着胚胎幼虫的发育表达量逐渐降低。两者不同的是 *Cg-Fem-1c* 在囊胚期表达量是其在受精卵时期表达量的 18.83 倍,而 *Cg-Fem-1b* 只有 5.56 倍。随着幼虫发育,*Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 表达量持续降低并在壳顶幼虫和眼点幼虫时达到最低水平。在毛蟹的研究中也有类似的表达模式,*Fem-1* 基因从受精卵开始表达,持续上调至囊胚期后剧烈下降并保持在低水平^[20]。囊胚期是细胞分化的关键时期,*Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 在胚胎发育早期,特别是囊胚的高表达模式暗示了其在组织器官早期发育中的作用以及可能参与了性别决定和分化的过程。

4 结论

对不同胚胎发育时期的样品分析显示,*Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 具有类似的表达模式,即都是在胚胎发育早期表达量上升并在囊胚期达到最大值。囊胚期是组织器官形成以及细胞分化的重要时期,我们推测 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 可能参与了性别决定和性别分化的过程。研究还发现,*Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 两基因虽然同源性较低,但是它们的表达模式相像。究竟 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 在性腺发育中起到怎样的作用以及 *Cg-Fem-1b* 和 *Cg-Fem-1c* 之间的相互作用关系如何还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Doniach T, Hodgkin J. A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Developmental Biology*, 1984, 106(1): 223-235.

[2] Hodgkin J. Sex determination and dosage compensation in *Caenorhabditis elegans*[J]. Annual Review of Genetics, 1987, 21(1): 133-154.

[3] Kimble J, Edgar L, Hirsh D. Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: The fem genes[J]. Developmental Biology, 1984, 105(1): 234-239.

[4] Spence A M, Coulson A, Hodgkin J. The product of *fem-1*, a

N 9 f ' C N 9 f ' n e m t o d e S e x D e t e r m i n a t i o n & D o s a g e C o m p e n s a t i o n i n C a e n o r h a b d i t i s e l e g a n s

7# (&5\$(1 DF+3))&(9(\$<)8 ? 6\$880: <)%3 (Cras

ZHOU Zu-Yang, LI C

(Thy Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Qingdao 266003, China)

92%89% We isolated the complete cDNA sequence of Pacific oyster
 (*Crassostrea gigas*) using RACE. The phylogenetic relationship of the
 ankyrin-like protein and its expression pattern were analyzed. The phylo-
 genetic relationship of the ankyrin-like protein and its expression analy-
 sis in the gonads collected in different stages of oyster development. The
 summer of 2015 and the expression pattern of the ankyrin-like protein
 length cDNA of the ankyrin-like protein. The full-length cDNA of the
 bp encoding the ankyrin-like protein. The ankyrin-like protein contained
 ankyrin-like protein. The ankyrin-like protein contained two genes
 was identified. The ankyrin-like protein contained two genes
 in March and April. The ankyrin-like protein contained two genes
 primers. The ankyrin-like protein contained two genes
 with the ankyrin-like protein. The ankyrin-like protein contained two genes
 0.05). The ankyrin-like protein contained two genes
 tion. The ankyrin-like protein contained two genes
 ; "<-' 31) : Cr

编辑 朱宝象