

施氏鲟 *Asnanos1* 基因序列分析及其在雌雄不同组织中表达

肖懿哲¹, 朱友芳¹, 孙玉龙², 张鑫³, 张子平³, 王艺磊²

(1. 莆田市水产科学研究所, 福建 莆田 351100; 2. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 3. 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 本研究首先从施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)性腺转录组中获得 *nanos1*(*Asnanos1*)基因全长 cDNA, 并对其序列的准确性和特征分别进行 PCR 验证和生物信息学分析。进一步利用荧光定量 RT-PCR 技术检测 *Asnanos1* 基因在雌、雄施氏鲟的性腺、心脏、鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等组织中的表达量。利用荧光定量 RT-PCR 技术检测 *Asnanos1* 基因在雌、雄施氏鲟的性腺、心脏、鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等组织中的表达量。结果显示: *Asnanos1* 的 cDNA 全长为 1 389 bp, 其中, 5'非编码区(UTR)为 414 bp, 3'UTR 为 279 bp, ORF 为 696 bp。该基因共编码 231 个氨基酸。*Asnanos1* 基因在施氏鲟除心脏以外的各组织中均有表达, 在雌、雄施氏鲟的鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等组织中表达量无显著差异, 但在卵巢中的表达量显著高于其他各组织($P < 0.05$)。所得到的结果可为人工培育全雌施氏鲟苗种提供一些基础资料。

关键词: 施氏鲟(*Acipenser schrenckii*); *nanos1* 基因; 荧光定量 RT-PCR; 雌雄个体组织; 基因表达

中图分类号: Q785; S968.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)04-0017-07

DOI: 10.11759//hykx20160801001

母源效应基因 *nanos* 最早在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中被发现, *nanos* 基因参与前后体轴的建立、原始生殖细胞的迁移和维持, 并对生殖干细胞的分化及性别分化有一定的作用^[1]。目前的研究结果表明, 每个物种至少含有 1 个 *nanos* 基因同源物, 不同的物种具有不同数目的 *nanos* 基因同源物^[2-7], 同一物种不同 *nanos* 基因同源物所发挥的功能存在着显著差异。迄今 *anos1* 的功能报道还不多, 在线虫(*Caenorhabditis elegans*)*nanos* 基因中, 有 3 种 *nanos* 同源物, 其中 *nanos1* 主要在生殖细胞发育和维持中发挥作用^[2]; 在小鼠(*Mus musculus*)中, *nanos1* 表达于胚胎和成体的脑中以及成熟精巢的曲精小管中, 原始生殖细胞中未见表达且 *nanos1* 缺陷的小鼠中生殖细胞发育也并未受到影响^[8]; 在青鳉(*Oryzias latipes*)胎发育时, *nanos1a* 和 *nanos1b* 主要表达于头部等区域, 并未在原始生殖细胞中表达^[9]。可见 *nanos1* 在不同物种中表达方式不同, 作用也存在差异。鱼类性别分化除受到如激素、环境条件、遗传等因素的影响外, 原始生殖细胞也发挥了重要作用^[10], 为了分析鱼类 *nanos1* 基因与原始生殖细胞及性别分化的关系, 进行鱼类 *nanos1* 基因克隆及在雌雄不同组织中表达的研究是有必要的。目前已克隆出几种鱼类的 *nanos1* 基因, 如斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*, 登录号: XP_006630660.1)、黑脊倒刺鲃(*Spinibarbu*

caldwelli)^[11]、中华鲟(*Acipenser Sinensis*, 登录号: AFD10415.1)^[12]、矛尾鱼(*Latimeria chalumane*, 登录号: XP_005999283.1)、青鳉(登录号: ABU63571.1)^[9]等。但施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)*nanos1* 基因(*Asnanos1*)克隆及在雌雄不同组织中表达未见报道。

施氏鲟是中国黑龙江水系特有珍稀名贵的大型经济鱼类^[13], 目前在施氏鲟养殖中, 施氏鲟雄鱼作为鱼肉销售, 而施氏鲟雌鱼则用于生产鱼籽酱。随着鲟鱼养殖的发展, 鲟鱼养殖的重点已从生产商品鱼向生产高附加值的鱼籽酱转变^[14], 因此人工培育全雌苗种具有重要的理论价值及现实意义, 本研究对 *Asnanos1* 进行克隆、测定 *Asnanos1* 在雌雄不同组织中的表达水平, 以期对施氏鲟性别分化机制的研究及人工培育全雌施氏鲟苗种提供一些基础资料。

收稿日期: 2016-08-01; 修回日期: 2016-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41306174); 福建省农业科技重点资助项目(2013N0024); 莆田市科技局项目(2012N16)

[Foundation: The National Natural Science Foundation of China, No. 41306174; Key Project in Agricultural Science and Technology of Fujian Province, No. 2013N0024; Science and Technology Development Project of Putian, No. 2012N16]

作者简介: 肖懿哲(1964-), 男, 福建莆田人, 副研究员, 主要从事水产养殖技术工作, 电话: 0594-6298821, E-mail: yzxiao@scsio.ac.cn; 王艺磊, 通信作者, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 样品采集

2014 年 12 月, 在福建莆田一水产养殖场。采集体质量为 2.5~3.5 kg 3 龄的雌雄施氏鲟各 5 尾, 参照高艳丽^[15] 对施氏鲟性腺发育阶段的分期, 本研究采集雌雄施氏鲟性腺发育阶段均为二期, 解剖取精巢、卵巢、心脏、鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等组织在液氮中速冻后于-80℃冰箱中保存。

1.2 总 RNA 提取与模板制备

提取施氏鲟精巢、卵巢、心脏、鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等不同的组织的 RNA, 提取过程及模板制备参照李文辉等^[16] 实验方法。从 Promega 公司购买逆转录所用的 M-MLV 酶。

1.3 *Asnanos1* 序列验证

在本课题组完成的施氏鲟性腺(雌雄混合)高通量转录组测序的数据中(由北京百迈客生物科技有限公司采用 PE125 测序方法进行高通量转录组测序), 获得了 *Asnanos1* 的全长序列, 采用验证引物 1(*Asnanos1*-F1: ATGACGGAACTTTTCACACA-GTGG, *Asnanos1*-R1: TTAACGATTTTTTTTCCC-GATG-ATG)对其开放阅读框(ORF)的准确性进行验证, 采用验证引物 2(*Asnanos1*-F2: TTTGATTAAGTAATTGAGAAG, *Asnanos1*-R2: CAGTACATGTTCTTCATAC)对其非编码区(UTR)的准确性进行验证。实验所用引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.4 目的基因的生物信息学分析

对 *Asnanos1* 的全长序列分别使用 Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>)等工具验证所得序列是否为目的基因。使用 ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)预测蛋白的等电点及分子量。可能的磷酸化位点使用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行预测。通过使用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行三级结构的预测。序列的多重比对通过 BioEdit 软件进行, 随后使用 MEGA5.0 软件完成系统进化树的构建。

1.5 荧光定量 RT-PCR

在进行荧光定量 RT-PCR(罗氏公司 LightCycler 480 实时定量 PCR 仪)测定时每个样品设置 3 个平行,

各组织定量使用 β -actin 作为内参基因(β -actin-R: TGTTGGCCTTGGGGTTCAG, β -actin-F: CATCAGGGTGTTCATGGTTGG)。20 μ L 反应体系中, SYBR Green PCR Mix 10 μ L, 目的基因正反向引物(10 μ mol/L) (*Asnanos1*-F: ATCAGACACGCAAACGG-CTA, *Asnanos1*-R: AGCCTCTCTCCCACCTGAA-T)各 0.5 μ L, cDNA 模板 9 μ L。反应参数为: 95℃, 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 10 s, 72℃ 10 s, 40 个循环。采用 $2^{-C_{t\Delta\Delta}}$ 法计算在不同组织中的表达水平, 基因表达水平由相对表达量的平均值(Mean \pm SEM)表示; 利用 SPSS 20.0 软件进行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 *Asnanos1* 基因的克隆与序列分析

采用验证引物所得到 ORF 及 UTR 序列与高通量转录组测序时所得 ORF 及 UTR 序列完全相符, *Asnanos1* 的 cDNA 全长为 1 389 bp, 其中, 5'UTR 为 414 bp, 3'UTR 为 279 bp, ORF 为 696 bp。该基因共编码 231 个氨基酸。经预测, 蛋白质的分子量为 25.8 kD, 等电点为 9.03。经 SingaIP 的分析, *Asnanos1* 不含信号肽序列(图 1)。

2.2 *Asnanos1* 空间结构模拟

通过 SWISS-MODEL 软件的同源建模, 将 *Asnanos1* 蛋白序列与软件搜索得到的模板进行人工配联, 构建其三维结构, 结果显示, 该蛋白共含有 5 个 α -螺旋和 2 个 β -折叠(图 2)。

2.3 编码 *Asnanos1* 蛋白序列的多重比对以及系统进化树的构建

将 *Asnanos1* 的氨基酸序列与别的物种的 *nanos1* 蛋白进行多重序列比对。结果表明 *nanos1* 基因编码的蛋白虽然具有较高的保守型, 但编码的氨基酸的长度却存在一定差异(图 3A)。另外, 通过 Blast 分析可知, *Asnanos1* 蛋白与斑点雀鲳的 *nanos1* 蛋白相似性最高, 达到了 67%。根据已在 NCBI 上注册的 *nanos* 基因的氨基酸序列, 采用 MEGA 7.0 软件, 以 N-J 法构建了 18 种生物的系统进化树(图 3B)。N-J 系统进化树结果显示: *Asnanos1* 与 *nanos2* 和 *nanos3* 在分类进化上的关系更远, 而与 *nanos1* 聚为一大支。在 *nanos1* 的进化中, 施氏鲟与斑点雀鲳聚为一支, 与其他物种的 *nanos1* 分开。

2.4 *Asnanos1* 基因在雌、雄施氏鲟不同组织中的表达

以 β -actin 为内参基因, 实时荧光定量 RT-PCR

```

1 TTTGATTAAGTAATTGAGAAGTCAGTAAGAATGAGACCCAGCAGACACAGGAGTCCTCGA 60
61 GGACCAGGATTGGGAAACCCTGAATTAAGGACTTTCATTGAATGGAGACCTGAGCCTC 120
121 TCTCCACCTGAATCAAACAAAACCTGTGGAACAAAACCTTTTGAGAGACACTGTTTTGC 180
181 CAATCCACAATGGCAGAGGCTAGTAAAAAGGTATCCACCAATCGTCTTACTCAGTGGGAG 240
241 GGTGCTCAAGAATGCTGCTGTTTTAATAATACTAGCCGTTGCGTGTCTGATGCAGACA 300
301 CAGAGAGGCAGAGATAAAGTGTGTGATGCTGGTTCAGAAATAGAGTGGGACAAGTATA 360
361 GTACAACCGCAGTACCGAAACAAACACATTACTGTTCCACATCTGAAAACatgac 420
1 gaaacttttcacacagtgagaacaaccggaaaatccgcaattgattatttgcagggc 480
3 E T F H T V E N K P E N P Q I D Y L Q G 22
481 gccaggtacaacgatgtctacgagaacgctttaaactcttgaacgactatttgggactg 540
23 A R Y N D V Y E N A F N S W N D Y L G L 42
541 tctaccctaattacctgcacgaaagcggcgaccgggtgtaataaaaactgggttaaggacg 600
43 S T L I T C T K A A T G A N K T G L R T 62
601 ggcgcagagtgaaatctgacttctaagcgccttatttcgaaaaagcctgcatttgaaa 660
63 G A E V N L T S K A P Y F E K A L H L K 82
661 ggctttgttatatgtggccacgaggaagacctgttttgggggaaagtttgcagacgac 720
83 G F G I C G H E E D L V L G E R F A D D 102
721 ggctctttctcctgtaggtcgagccctgcgctcttcggcgctctccggagtttttagac 780
103 G S F S C R S S P A L F G G S P E F L D 122
781 cgcgacagagcctggcgtggcgcgtaatggaagtaagcttcagagccagcagactctt 840
123 R D R A L A W R V M E S K L Q S Q Q T L 142
841 cacaagcaaagccgaggggaagatggacctccaagtgtgtgttctgcagaaaaataaaa 900
143 H K Q S R G K M D L Q V C V F C R N N K 162
901 gaaagcgttgcccggttacaccaccatacttgaaggaccgacgggagaatccttgc 960
163 E S V A R Y T T H I L K G P D G R I L C 182
961 cctgtgctgaggcgatacacctgcccgctttgtggtgcaagtggagacaatgcacacaca 1020
183 P V L R R Y T C P L C G A S G D N A H T 202
1021 atcaataactgccctctctccaaactcaagcaaatgctgtaaatcaaatgaaaccgacg 1080
203 I K Y C P L S K L Q A N A V N Q M K P T 222
1081 agaaccatcatcgggaaaaaaatcgtaaAGACTTTCTCTTTTTCTTTTTGTTTAA 1140
223 R T I I G K K N R * 231
1141 AGACGTGTTCAATAATTATACITTTATGAATATGTTCTATACGAATGAAACTATAGAA 1200
1201 ATAAGGAACAGCCGTGTAATCTATTTTTAGCGCACTGTATTTGCAGAATTATGCTGTAG 1260
1261 TCGTCACTTCGTTCCCTCACCTAGAAGAAAATCTATTTAAAGTAAGTAACTAGAAACCC 1320
1321 AATTATTTTCAAAGTTGGATTGTATTATTATTGTTGTTATTAAGCTTGCAATGAATGT 1380
1381 AGGAATTAT 1389
    
```

图1 *Asnanos1* 全长 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of the *Asnanos1* gene

黄色底为磷酸化位点; 起始密码子 atg 用红色线表示; 终止密码子 taa 用加粗表示; 灰色区域为 α 螺旋。下划线所指示的区域为保守的 -CCHC- 锌指结构域, 黑色加粗显示的为核心的 Cys 或 His

Phosphorylation sites are marked in yellow; The initiation codon(atg) is marked by red line; The stop codon(taa) is characterized in bold; Five α -helixes are marked with gray; Conserved -CCHC- zinc finger domain is underlined; Cys or His are in bold

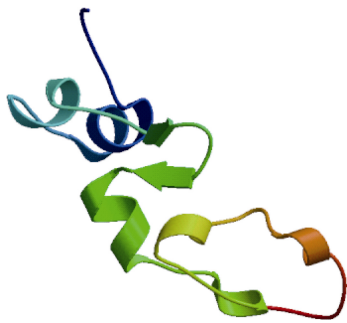


图2 推测的 *Asnanos1* 氨基酸序列的三级结构

Fig. 2 Predicted three-dimensional structure of the *Asnanos1* gene

结果显示(图 4), *Asnanos1* 基因在施氏鲟除心脏以外的各组织中均有表达, 在雌、雄鱼的鳃、脑、肾、肝脏、脾脏等组织中表达量无显著差异, 但在卵巢中的表达量显著高于其他各组织($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

本研究获得了 *Asnanos1* 的 cDNA 全长为 1 389 bp, 其中, 5'UTR 为 414 bp, 3'UTR 为 279 bp 以及 696 bp 的 ORF。该基因共编码 231 个氨基酸。Blast 分析可知, *Asnanos1* 与 *nanos2* 和 *nanos3* 在分类进化上的关系较远, 而与 *nanos1* 聚为一大支。这些结果充分表明本研究所得到的基因序列为 *Asnanos1*。系统进化树结果显示: 在 *nanos1* 的进化中, 施氏鲟与斑点雀鳉聚为一支, 但与中华鲟有一定的距离, 产生这个现象的原因有待于进一步研究。

Asnanos1 蛋白氨基酸序列的 C 端具有两个保守 -CCHC-(-Cys-Cys-His-Cys-) 锌指结构域, 这一结构特征与在其他物种 *nanos1* 中也同样存在, 是 *nanos1* 蛋白发挥功能所必需的。

A		10	20	30	40	50	
<i>Acipenser schrenckii</i>	1	MTETHTVEN	KPEN	PQ	LDYLGARYN	DVYBNA	FNSWNDYGL 42
<i>Lepisosteus oculatus</i>	1	MMETFQAVEN	KLEN	SQ	VEFLQARYV	S-NAYBNA	FNSWNDYGL 43
<i>Latimeria chalumnae</i>	1	MMETFQIMDC	KLKT	PS	VDYLQSGYV	SN-SSYBNA	FNSWNDYGL 44
<i>Pseudopodoces humilis</i>	1	MEAFPGTKL	EQHRHL	PP	VECLPGARYA	GRSHSACGNV	FNSWNDYGL 47
<i>Mus musculus</i>	1	MEAFPPWAPR	SPRRARAPAP		MALVPSARYV	SASGPVHPQP	FSSWNDYGL 49
<i>Homo sapiens</i>	1	MEAFPPWAPR	SPRRGRAPP		MALVPSARYV	SAPGPAHPQP	FSSWNDYGL 49
<i>Xenopus leavis</i>	1	MDGG				LC	FDSWSDYGL 16
<i>Chrysemys picta bellii</i>	1	METFPPGKL	EQH	QP	VEFLQARYG	AKSHPAVGN	FNSWNDYGL 44
Clustal Consensus	1	:	:	:	:	:	*. *.***** 8
		60	70	80	90	100	
<i>Acipenser schrenckii</i>	43	STLITCTKAA	TGA			NK	TGLRTGAEV 66
<i>Lepisosteus oculatus</i>	44	TLTITCTKAV	TSN			TK	NDLRMSAEV 67
<i>Latimeria chalumnae</i>	45	ATLIT-KAV	S			SK	DGFRADSEV 65
<i>Pseudopodoces humilis</i>	48	ATLIT-KAV	RPG			KS	FGAEPSPVW 70
<i>Mus musculus</i>	50	ATLIT-RAS	D	R	G	SP	HEGPGPTAAG 72
<i>Homo sapiens</i>	50	ATLIT-KAV	DGEPRFGCAR	GGNGGGGSP	SSSSSSCCSP	HTGAGPGALG	97
<i>Xenopus leavis</i>	17	SSLIS-RGL	Q			P	QR 28
<i>Chrysemys picta bellii</i>	45	ATLIT-KAV	GEE			KG	FGTQPSSVW 67
Clustal Consensus	9	::**:	::				14
		110	120	130	140	150	
<i>Acipenser schrenckii</i>	66		NLTS	KAPYF-EKAL	HUKGFGICGH	E	EDLV 94
<i>Lepisosteus oculatus</i>	67		DLTS	KASYF-EKSM	DLNDFGFCSH		EDLV 94
<i>Latimeria chalumnae</i>	65		ELFS	KTPYLVDKSL	DLNDFDFCSH		EBAM 93
<i>Pseudopodoces humilis</i>	71	AAAVPPAEE	EEEEEEEEEA	AG-PYFEGAL	DHLDLCCGH		HHHHHGEG 119
<i>Mus musculus</i>	73	PTMGPP-ED	DEDDDGEEPE	AGGRYLGAL	ELRALBLCAG	P	ABPGL 116
<i>Homo sapiens</i>	98	PALGPPDYDE	DDDDSDDEPG	SRGRYLGAL	ELRALBLCAG	P	ABAGL 143
<i>Xenopus leavis</i>	28		EGBRP				33
<i>Chrysemys picta bellii</i>	68	AATVQPAPEE	DEEDDEBED	AGTPYFEGAL	HLDLDFLCS		HHHGESF 113
Clustal Consensus	14	:	:	:	:	:	15
		160	170	180	190	200	
<i>Acipenser schrenckii</i>	95	LEERFADGGS	FSGRSSPA	LFGGSP		EF	LDLDRALAW 129
<i>Lepisosteus oculatus</i>	95	LADRFAEFP	FSGRSSPA	LFNSSP		EY	VDRERALQW 129
<i>Latimeria chalumnae</i>	94	LEDRFADFSP	FSGRSSPA	LFSCSP		AH	LVRDRS-VSW 128
<i>Pseudopodoces humilis</i>	120	LEERFADFSP	FFGRGGPNAV	VFDCSG		EH	PGRGSAHAW 157
<i>Mus musculus</i>	117	LEERFAELNP	FAGRAAAV	LLGCAPTAST	TAAAATAEAV		TPRPEPSPAW 164
<i>Homo sapiens</i>	144	LEERFAELSP	FAGRAAAV	LLGCAPAA	AAAAATTSEA		TPRBERAPAW 189
<i>Xenopus leavis</i>	33		RWDVLS	AS			42
<i>Chrysemys picta bellii</i>	114	LEERFADFSP	FSGRASPAAL	VENCSP		AH	LQRDRSPHAW 151
Clustal Consensus	15	*	.	.			17
		210	220	230	240	250	
<i>Acipenser schrenckii</i>	130	R-VMESKLLQ	SQQLTKQSR	GRMDLQVC/F	CRNNKESVAR	YTTTHLKGPD	177
<i>Lepisosteus oculatus</i>	130	G-IVDNRHQ	NPQAVPKQ-R	AKMDMQVC/F	CRNNKESISR	YSTTHLKGPD	176
<i>Latimeria chalumnae</i>	129	G-IMENRILQ	H-FQKPV	SKAEILQIC/F	CRNNKEAVAL	YTTTHLKGPD	173
<i>Pseudopodoces humilis</i>	158	GGVVVAGRLP	AHPRAASR-L	LKPELQVC/F	CRNNKEAVAL	YTTTHLKGPD	206
<i>Mus musculus</i>	165	A-ABPRLH	AASGATAARL	LKPELQVC/F	CRNNKEAVAL	YTTTHLKGPD	211
<i>Homo sapiens</i>	190	A-ABPRLH	AASGAAAARL	LKPELQVC/F	CRNNKEAVAL	YTTTHLKGPD	236
<i>Xenopus leavis</i>	42		AEPLPS	NESVGHKG	CFE	CRSNREALSL	YTSRRLRALD 79
<i>Chrysemys picta bellii</i>	152	GGGLGDGRLQ	APQKPGSR-L	LKPELQVC/F	CRNNKEAVAL	YTTTHLKGPD	200
Clustal Consensus	17				**	**.*:*:::	*:*:*.* 34
		260	270	280	290	300	
<i>Acipenser schrenckii</i>	178	GRVLCPLVLR	YTCPLCGASG	DNAHTIKYCP	LSKLQANAVN	QMKPRTII	226
<i>Lepisosteus oculatus</i>	177	GRVLCPLVLR	YTCPLCGANG	DNAHTIKYCP	LSKLQASSAK	QLKP-RCLA	224
<i>Latimeria chalumnae</i>	174	GRVLCPLVLR	YTCPLCGANG	DNAHTIKYCP	LSKLQANATK	QLKASRSSL	222
<i>Pseudopodoces humilis</i>	207	GRVLCPLVLR	YTCPLCGASG	DNAHTIKYCP	LSKVPAAR	QLRHARTAL	253
<i>Mus musculus</i>	212	GRVLCPLVLR	YTCPLCGASG	DNAHTIKYCP	LSKVPPPTVR	PPPRSNRDSL	261
<i>Homo sapiens</i>	237	GRVLCPLVLR	YTCPLCGASG	DNAHTIKYCP	LSKVPPPPAR	PPPRSRADGP	286
<i>Xenopus leavis</i>	80	GRVLCPLVLR	YTCPLCGANG	DNAHTIKYCP	LRRLRD	POSNSNP	124
<i>Chrysemys picta bellii</i>	201	GRVLCPLVLR	YTCPLCGASG	DNAHTIKYCP	LSKVQASAAK	QLLRNARTAL	250
Clustal Consensus	35	**:*:*****	*****.*	* ***:***	* ::	:	65
<i>Acipenser schrenckii</i>	227	G-KKNR					231
<i>Lepisosteus oculatus</i>	225	A-KKIR					229
<i>Latimeria chalumnae</i>	223	G-RKTR					227
<i>Pseudopodoces humilis</i>	254	G-RKGR					258
<i>Mus musculus</i>	262	PSKKLR					267
<i>Homo sapiens</i>	287	PGKKLR					292
<i>Xenopus leavis</i>	124	KLRL					128
<i>Chrysemys picta bellii</i>	251	G-KKLR					255
Clustal Consensus	65	**	**	67			

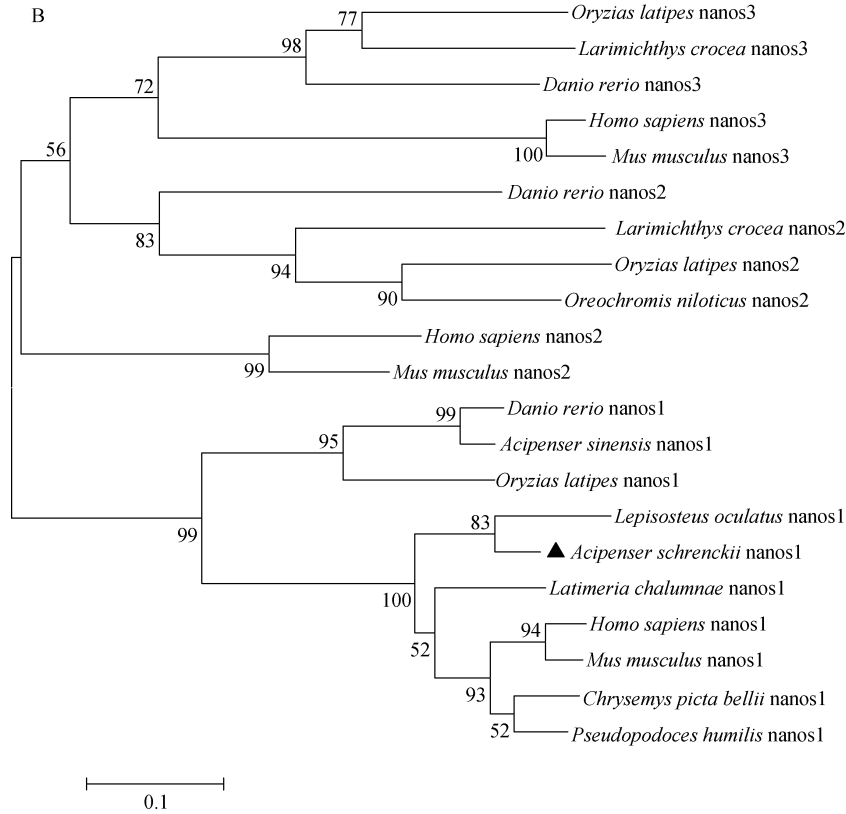


图 3 *Asnanos1* 基因氨基酸序列与其他物种的多重比对及系统进化树

Fig. 3 Multiple alignment and phylogenetic tree analyses of the *Asnanos1* amino acid sequence between *Acipenser schrenckii* and other species

A. *Asnanos1* 基因氨基酸序列与其他物种的 *nanos1* 基因氨基酸序列多重比对。图中方框内为保守的锌指结构域中的 Cys 和 His; B. 不同物种 *nanos* 基因的系统进化树。多重序列比对和系统进化树所用物种的 *Nanos* 氨基酸序列在 GenBank 上的登录号如下: 其中, 人(*Homo sapiens*): *nanos1*, NP_955631; *nanos2*, NP_001025032; *nanos3*, NP_001092092.1; 小鼠(*Mus musculus*): *nanos1*, AAH56473.2; *nanos2*, NP_918953.2; *nanos3*, BAC82558.1; 斑马鱼(*Danio rerio*): *nanos1*, NP_001292590.1; *nanos2*, DAA64468.1; *nanos3*, NP_571953.1; 青鳉(*Oryzias latipes*): *nanos1*, ABU63571.1; *nanos2*, NP_001153919.1; *nanos3*, NP_001116300.1; 斑点雀鲷(*Lepisosteus oculatus*): *nanos1*, XP_006630660.1; 西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*): *nanos1*, XP_005284212.1; 褐背拟地鸦(*Pseudopodoces humilis*): *nanos1*, XP_005520948.1; 矛尾鱼(*Latimeria chalumnae*): *nanos1*, XP_005999283.1; 大黄鱼(*Larimichthys crocea*): *nanos2*, AHN52225.1; *nanos3*, AHE78415; 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*): *nanos2*, XP_005448912.1. 中华鲟 (*Acipenser sinensis*): *nanos1*, AFD10415.1

A. Multiple alignment of the *Asnanos1* amino acid sequence between *A. schrenckii* and other species. Cys and His are conserved. The -CCHC-zinc finger domain is marked with a square. B. Phylogenetic tree of the *nanos* amino acid sequences between *A. schrenckii* and other species

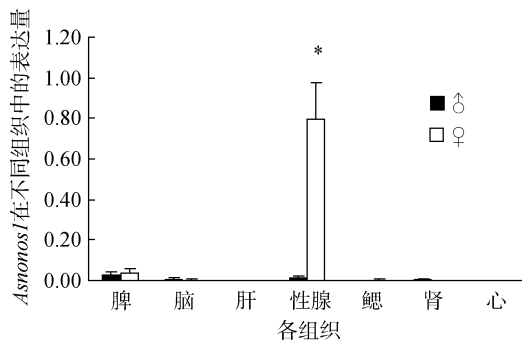


图 4 *Asnanos1* 基因在雌雄各组织器官的表达

Fig. 4 Distribution pattern of the *Asnanos1* gene in different *Acipenser schrenckii* tissues

*. *Asnanos1* 基因在卵巢中的表达量与其他各组织存在显著性差异

*. Significant difference between ovary and other tissues

在青鳉中, *nanos1*(*nanos1a* 和 *nanos1b*) 在脑中有表达, 且 *nanos1a* 存在于精母细胞或卵母细胞周围的体细胞中, 而性腺组织中未检测到 *nanos1b* 的表达^[9]; 中华鲟 *nanos1* mRNA 在肝脏、脾脏、心脏、卵巢、肾、肌肉、肠、脑垂体、下丘脑、端脑、中脑、延脑等组织中都有表达, 在脑垂体、下丘脑、端脑中表达量最高, 在脂肪组织中没有表达^[12]。本次实时荧光定量 RT-PCR 结果显示(图 4), *Asnanos1* 基因除心脏以外, 在雌、雄鱼的脾、脑、肝、鳃和肾等组织中均有表达, 在卵巢中的表达量显著高于其他各组织 ($P < 0.05$), 可见 *nanos1* 在不同的鱼类中表达的模式存在明显的差异。 *Asnanos1* 基因在卵巢中的表达量

显著高于其他各组织, 而青鳉和中华鲟 *nanos1* 没有这种现象, 这是否预示 *Asnanos1* 与施氏鲟性别决定及性别分化有关? 这个问题有待于进一步研究。

总之, 本研究结果表明 *Asnanos1* 的 cDNA 全长为 1 389 bp, 其中, ORF 为 696 bp, 5'UTR 为 414 bp, 3'UTR 为 279 bp。该基因共编码 231 个氨基酸。*Asnanos1* 在施氏鲟精巢和卵巢中表达量存在显著差异, 本研究所得到的结果可为人工培育全雌施氏鲟苗种提供一些基础资料。至于 *Asnanos1* 是否与施氏鲟性别决定及性别分化有关有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lyudmila Y, Yasuaki H, Tammy H L, et al. Translational control of maternal cyclin B mRNA by *nanos* in the *Drosophila germline*[J]. *Development*, 2007, 134(8): 1519-1527.
- [2] Subramaniam K, Seydoux G. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Development*, 1999, 126(21): 4861-4871.
- [3] Kang D, Pilon M, Weisblat D A. Maternal and zygotic expression of a *nanos*-class gene in the leech *Helobdella robusta*: primordial germ cells arise from segmental mesoderm[J]. *Dev Biol*, 2002, 245(1): 28-41.
- [4] Zhao G, Chen K, Yao Q, et al. The *nanos* gene of *Bombix mori* and its expression patterns in developmental embryos and larvae tissues[J]. *Gene Expr Patte*, 2008, 8(4): 254-260.
- [5] Mosquera L, Forristall C, Zhou Y, et al. A mRNA localized to the vegetal cortex of xenopus oocytes encodes a protein with a *nanos*-like zinc finger domain[J]. *Development*, 1993, 117(1): 377-386.
- [6] Kprunner M, Thisse C, Thisse B, et al. A zebrafish *nanos* related gene is essential for the development of primordial germ cells[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(21): 2877-2885.
- [7] Aruzelska J, Kotecki M, Kusz K, et al. Conserved role of *nanos* proteins in germ cell development[J]. *Science*, 2003, 301(5637): 1239-1241.
- [8] Haraguchi S, Tsuda M, Kitajima S, et al. *nanos1*: a mouse *nanos* gene expressed in the central nervous system is dispensable for normal development[J]. *Mech Dev*, 2003, 120(6): 721-731.
- [9] Aoki Y, Nakamura S, Ishikawa Y, et al. Expression and syntenic analyses of four *nanos* genes in medaka[J]. *Zoolog Sci*, 2009, 26(2): 112-118.
- [10] 詹冰津, 池丽影, 张军玲, 等. 鱼类原始生殖细胞与鱼类性别分化的关系[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(2): 622-624.
Zhan Bingjin, Chi Liying, Zhang Junling, et al. Role of fish primordial germ cells in sex differentiation[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2013, 41(2): 622-624.
- [11] 苏敏, 陈元仲, 吕博彦. *nanos* 同源基因在黑脊倒刺鲃生殖细胞中的表达研究[J]. *生物技术*, 2012, 22(4): 28-32.
Su Min, Chen Yuanzhong, Lü Boyan. Expression of *nanos* homolog gene in germ cells of *Spinibarbus caldwelli*[J]. *Biotechnology*, 2012, 22(4): 28-32.
- [12] Ye H, Chen X, Wei Q, et al. Molecular and expression characterization of a *nanos1* homologue in Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. *Gene*, 2012, 511(2): 285-292.
- [13] 李力, 马一丹. 黑龙江鲟鳇鱼资源及其保护[J]. *野生动物*, 1999, 2(1): 10-11.
Li li, Ma Yidan. Status of sturgeons and huso sturgeons in the Amur River of China[J]. *Wildlife Resources*, 1999, 2(1): 10-11.
- [14] 曾圣, 周洲, 杜强, 等. 鲟鱼性别决定与分化研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(15): 3473-3476.
Zeng Sheng, Zhou Zhou, Du Qiang, et al. Advances on sex determination and differentiation of sturgeons[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2014, 53(15): 3473-3476.
- [15] 高艳丽. 施氏鲟的性腺发育及人工性别控制研究[D]. 哈尔滨: 东北农林大学, 2006.
Gao Yanli. Studies on gonad and sex control in amur sturgeon[D]. Haerbin: Northeast Forestry University, 2006.
- [16] 李文辉, 张鑫, 朱友芳, 等. 杂色鲍精氨酸激酶基因的克隆及其在不同应激条件下的表达[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2015, 54(3): 315-323.
Li Wenhui, Zhang Xin, Zhu Youfang, et al. Cloning and differential expression of arginine kinase in *Halotis diversicolor* under different stresses[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2015, 54(3): 315-323.

Sequence and differential expression analyses of the *Asnanos1* gene in different tissues of male and female *Acipenser schrenckii*

XIAO Yi-zhe¹, ZHU You-fang¹, SUN Yu-long², ZHANG Xin³, ZHANG Zi-ping³,
WANG Yi-lei²

(1. Putian Municipal Institute of Fishery Science, Putian 351100, China; 2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Received: Aug. 1, 2016

Key words: *Acipenser schrenckii*; *nanos1*; real-time PCR; female and male; gene expression

Abstract: The full-length cDNA of the *Asnanos1* gene was obtained from the gonadal transcriptome of *Acipenser schrenckii*. The sequence was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed with a bioinformatics tool. The expression levels of *Asnanos1* mRNA in gonad, heart, gill, brain, kidney, and spleen were examined in males and females by quantitative real-time PCR. The results showed that the full-length cDNA was 1 389 bp including a 414 bp 5'-untranslated region (UTR), a 279 bp 3'-UTR, and a 696 bp open reading frame encoding a 231 amino acid. *Asnanos1* was expressed in all tissues tested except the heart. The expression levels of the *Asnanos1* gene in spleen, brain, liver, gill, and kidney were not significantly different between males and females. The expression level was highest in the ovary among all tissues tested ($P < 0.05$). Our results provide insight into the development of all-female breeding technology for *A. schrenckii*.

(本文编辑: 谭雪静)