

# 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)*vasa* 基因 cDNA 克隆及其在卵巢发育中的表达分析\*

徐文斐<sup>1,2</sup> 刘萍<sup>2</sup> 李吉涛<sup>2</sup> 李健<sup>2</sup> 陈萍<sup>2</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116000; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

**提要** VASA 蛋白属于 DEAD-box 家族蛋白, 是一种 RNA 解旋酶, 在生殖细胞的分化中具有重要作用。本研究从脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)卵巢中克隆得到 *vasa* 基因 cDNA 全长(将其命名为 *Ec-vasa*), *Ec-vasa* 序列长度为 2516bp, 开放阅读框(ORF)长度为 1800bp, 编码 600 个氨基酸, 具有 DEAD-box 家族蛋白的 8 个高度保守的结构域, 与日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)的同源性最高(80%)。半定量 RT-PCR 结果显示, *Ec-vasa* 在卵巢组织中特异表达, 在肌肉、肝胰腺、心脏和鳃等组织中均未检测到表达。荧光定量结果显示, *Ec-vasa* 在卵巢发育 期具有较高表达量, 随着卵巢的发育, 表达量逐渐降低, 在第 期达到最低水平。结果表明, *Ec-vasa* 基因可能在脊尾白虾卵巢的早期分化和卵子发生过程中起重要作用。

**关键词** 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*); *vasa*; 基因克隆; mRNA 表达; 卵巢发育

中图分类号 S917.4 doi: 10.11693/hyhz20121215002

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)又名白虾、小白虾等, 隶属于甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属(*Exopalaemon*)。脊尾白虾肉质细嫩、繁殖能力强、生长速度快、环境适应性广, 分布于我国沿海及大河口的咸淡水处, 尤以黄海和渤海产量较多, 是我国特有的一种重要经济虾类。

DEAD-box 家族蛋白是一类三磷酸腺苷(ATP)依赖的 RNA 解旋酶, 广泛存在于从细菌到哺乳动物的许多物种中, 因其具有高度保守的 DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)序列而得名(Linder *et al.*, 1989)。该蛋白在细胞 RNA 代谢中意义重大, 参与 RNA 几乎所有的代谢过程, 如: 翻译起始、核糖体形成、前 mRNA 拼接、mRNA 降解和细胞器的基因表达等(Rocak *et al.*, 2004)。

*vasa* 作为 DEAD-box 基因家族的重要成员之一,

最早在果蝇(*Drosophila melanogaster*)中被发现, 它作为一种母源效应基因在腹节形成和生殖细胞分化中发挥着重要作用(Schüpbach *et al.*, 1986)。基于 *vasa* 基因在动物中的高度保守性, 后来在脊椎动物: 斑马鱼(*Danio rerio*)(Yoon *et al.*, 1997; Krvel *et al.*, 2004), 金鱼(*Carassius auratus*)(陈云贵等, 2005; Otani *et al.*, 2002), 罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)(Kobayashi *et al.*, 2000), 草鱼(*grass carp*)(Li *et al.*, 2010), 南方鲇(*Silurus meridionalis*)(胡重江等, 2008), 革胡子鲇(*Clarias gariepinus*)(Raghuveer *et al.*, 2012), 银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(Xu *et al.*, 2005), 黄鳍(*Monopterus albus*)(吕道远等, 2005), 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis Günther*)(张远青等, 2012), 黑脊倒刺鲃(*Spinibarbus caldwelli*)(唐良华等, 2012)等, 以及无脊椎节肢动物拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)(张凤英等, 2012), 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)

\* 国家高技术研究发展计划课题(2012AA10A409); 山东省自主创新专项(2013CX80202); 国家虾产业技术体系(CARS-47); 公益性行业(农业)科研专项(201103034); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项资金资助项目(2013A0701)。徐文斐, E-mail: 34660104@qq.com

通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2012-12-15, 收修改稿日期: 2013-04-28

(Wang *et al*, 2013), 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) (Nakkrasae *et al*, 2007), 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) (Aflalo *et al*, 2007), 日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicas*) (Sellars *et al*, 2007), 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) (朱小玲, 2010; Qiu *et al*, 2013), 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (Zhou *et al*, 2010) 等物种中均陆续克隆了 *vasa* 的同源基因。在绝大多数物种当中, *vasa* 基因仅限在生殖细胞系中特异性表达, 因此被作为一种分子标记物广泛用于研究配子发生和原生殖细胞 (Primordial Germ Cells, PGCs) 起源、迁移、分化等方面。进一步研究发现: VASA 蛋白对于生殖细胞的形成和卵子极性的建立以及某些发育基因的 mRNA 转录调控都具有重要作用 (Lasko *et al*, 1988; Styhler *et al*, 1998)。

本文以人工养殖的脊尾白虾为对象, 应用分子生物学方法, 克隆得到 *vasa* 基因全长 cDNA 序列, 并对 *vasa* 基因在不同组织和卵巢发育不同时期的表达模式进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用脊尾白虾购自潍坊昌邑海丰水产养殖责任公司, 成虾 200 尾。采集血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、肠、胃、眼柄组织立即放入液氮保存。性成熟不同阶段的雌性脊尾白虾, 暂养于水生实验室, 水温 ( $18\pm 1^\circ\text{C}$ ), 海水盐度 31, 每天换水 2 次, 投喂配合饲料 2 次。根据王绪娥 (1989) 对脊尾白虾卵巢发育外形特征的描述, 取卵巢发育不同阶段的脊尾白虾卵巢组织: 一部分卵巢固定用于组织学观察, 一部分用于 *vasa* 基因表达分析。

### 1.2 组织学实验方法

卵巢用 Bouin's 氏液固定 24h 后, 常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡 (熔点  $54-56^\circ\text{C}$ ) 包埋, LEICARM2145 切片机连续切片, 厚度为  $6\mu\text{m}$ 。采用苏木精-曙红 (H.E) 染色, 中性树胶封片, Nikon E200 型光学显微镜观察及显微摄影 (图 1)。根据卵巢发育形态特征及其卵细胞类型, 将脊尾白虾卵巢发育分为 5 期, 分别为 期 (形成期)、 期 (小生长期)、 期 (大生长期)、 期 (成熟期)、 期 (恢复期) (王绪娥, 1989; 杨筱珍等, 2009)。

### 1.3 总 RNA 提取

采集发育期卵巢, 在研钵中加液氮研磨成粉末

状, 迅速转移至 Trizol 试剂中, 按照说明书步骤提取总 RNA。紫外检测 RNA 浓度和纯度, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。DNase (TaKaRa) 去除基因组 DNA, 利用 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 合成 cDNA 第一链, 用做全长 cDNA 3' 和 5' 端序列快速扩增的模板。

### 1.4 *Ec-vasa* 基因片段 cDNA 克隆

根据 GenBank 公布的罗氏沼虾 (DQ339110), 日本沼虾 (HQ385220), 拟穴青蟹 (GU187045), 凡纳滨对虾 (DQ095772) *vasa* 基因 cDNA 序列, 使用 DNAMAN 在其保守区设计简并引物 V-F、V-R (表 1)。以脊尾白虾卵巢 cDNA 为模板, 采用  $25\mu\text{l}$  PCR 反应体系: TaKaRa Taq ( $5\text{U}/\mu\text{l}$ ),  $0.25\mu\text{l}$ ;  $10\times$  PCR Buffer,  $2.5\mu\text{l}$ ;  $\text{MgCl}_2$  ( $25\text{mmol/L}$ ),  $1.5\mu\text{l}$ ; dNTP Mixture ( $10\text{mmol/L}$ ) (TaKaRa),  $0.5\mu\text{l}$ ; 模板 cDNA,  $1\mu\text{l}$ ; 引物, 各  $2.5\mu\text{l}$ ;  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足  $25\mu\text{l}$ , 置于 PCR 仪中进行扩增。扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  5min;  $94^\circ\text{C}$  30s,  $58^\circ\text{C}$  45s,  $72^\circ\text{C}$  1min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10min;  $4^\circ\text{C}$  保温。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收目的片段, 连接 pMD18-T (TaKaRa) 载体, 重组质粒转化至大肠杆菌 Top10, 蓝白斑筛选阳性克隆经菌落 PCR 初步鉴定后由上海生工测序。

### 1.5 5' RACE 和 3' RACE

以获得的 *Ec-vasa* 基因片段为模板, 使用 Primer 5.0 软件设计用于 3' 和 5' 端 RACE 所需的引物 (表 1)。使用上述合成的 cDNA 第一链为模板, 分别用引物 *Ec-vasa3'* 和 *Ec-vasa5'* 与试剂盒所带通用引物 Universal Primer (UPM) 配对, 并按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 推荐的反应体系和反应条件进行 *Ec-vasa* 基因 3' 和 5' 端基因序列的扩增。PCR 扩增产物的纯化、克隆、测序与 *Ec-vasa* 基因片段的克隆方法相同。

### 1.6 序列拼接与生物信息学分析

利用 DNASTar 软件 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列的去除和拼接。将所得序列提交至 NCBI BLAST 程序进行序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>), 利用 DNASTar 软件 EditSeq 程序进行开放阅读框 (ORF) 的预测。使用 DNAMAN 软件进行氨基酸翻译以及脊尾白虾和它物种的 VASA 氨基酸序列的多重比对。蛋白质分子质量和等电点 (PI) 分析使用 PI/Mw ([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html))。利用 MEGA 5.0 软件 (Saitou *et al*, 1987; Tamura *et al*, 2011) 构建 Neighbor-Joining (NJ) 系统树。

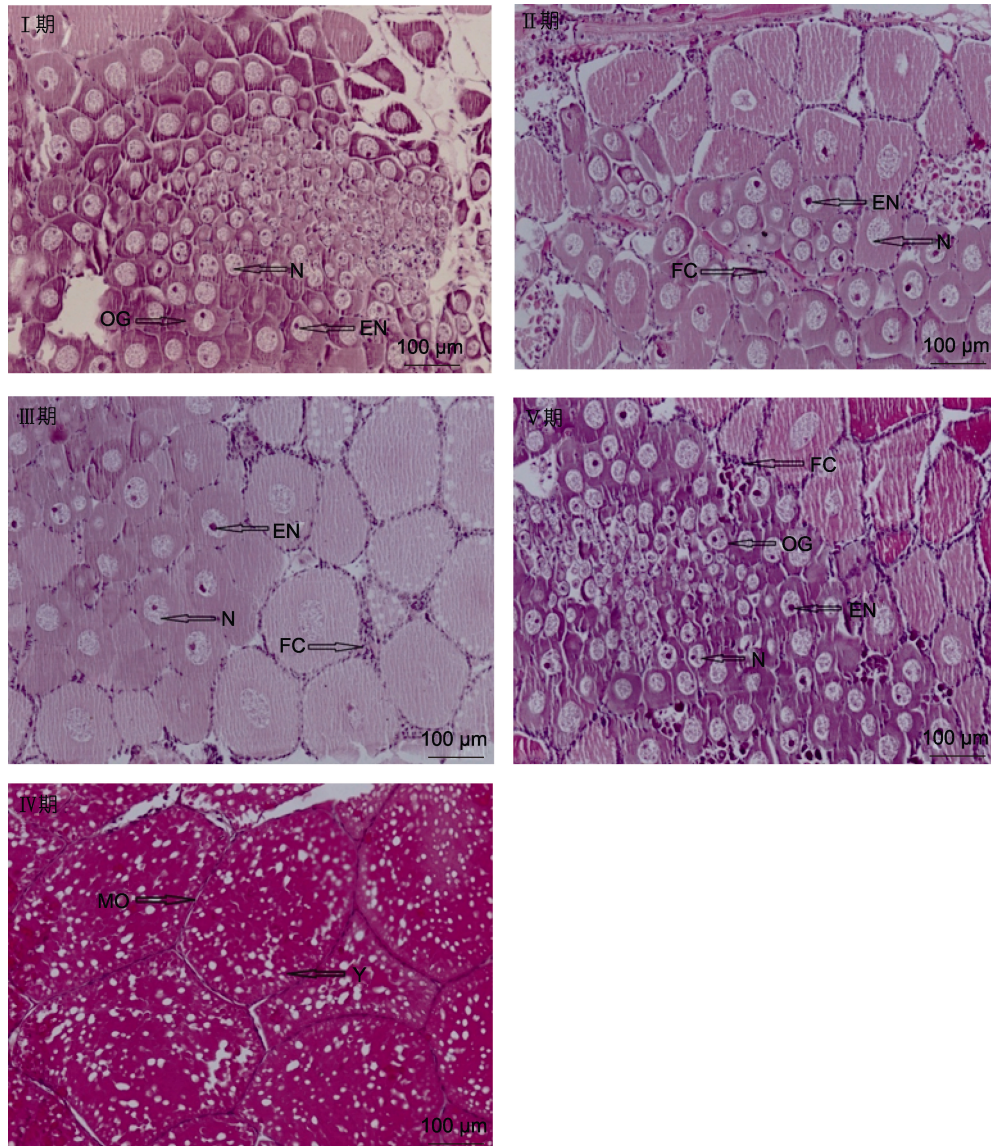


图 1 脊尾白虾卵巢发育周期组织切片

Fig.1 Histological photomicrographs of the ovary in *Exopalaemon carinicauda*  
 OG: 卵原细胞; MO: 成熟卵母细胞; FC: 滤泡细胞; Y: 卵黄颗粒; N: 细胞核; EN: 核仁

### 1.7 半定量 RT-PCR

采集雌性性腺发育脊尾白虾卵巢、血细胞、腮、肝胰腺、肌肉、肠、胃和心脏 8 种组织, 提取各组织中的总 RNA, 反转录为 cDNA, 以 18sRNA 基因作为内参, 来检测 *vasa* 基因在脊尾白虾不同组织中的表达(引物 *Ec-vasa-F*、*Ec-vasa-R*、18S-F、18S-R 序列如表 1 所示)。扩增条件为 94°C 2min; 94°C 30s, 55°C 45s, 72°C 30s, 23 个循环; 72°C 延伸 10min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和紫外凝胶分析。用 ImageJ 软件计算条带亮度以检测相对表达量。

### 1.8 实时荧光定量 RT-PCR

按照上述 1.4 部分的方法分别提取脊尾白虾每一阶段(I~V)卵巢的总 RNA, 反转录为 cDNA, 使用 *Ec-vasa* 基因特异引物 *Ec-vasa-F*、*Ec-vasa-R* 和内参基因 18sRNA 特异引物 18S-F、18S-R(表 1), 采用 7500 Sequence Detection System 进行实时荧光定量 PCR, 扩增体系为 20μl, 包括: SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (2×)(TaKaRa), 10μl; *Ec-vasa-F*(10μmol/L), 0.8μl; *Ec-vasa-R*(10μmol/L), 0.8μl; ROX Reference Dye(50×), 0.4μl; cDNA 模板, 2.0μl; 焦碳酸二乙酯(DEPC)水

(Solarbio), 6.0μl。反应条件: 95°C 30s; 95°C 5s, 60°C 34s, 40 个循环; 95°C 15s, 60°C 1min, 95°C 15s。实验中每 6 只的同一阶段卵巢组织混合作为一个样品, 数据为 3 个重复的平均值±标准差, 采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算数据, 用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

## 2 结果

### 2.1 *Ec-vasa* cDNA 全长序列

克隆得到 *Ec-vasa*(GenBank 登录号: JX122493) cDNA 序列全长 2516bp, 其中 5' 非编码区 77bp, 3'非编码区 636bp, 开放阅读框 1800bp, 编码 600 个氨基酸, 预测其分子量为 65.6kDa, 等电点为 5.17。推导的氨基酸序列中包含 DEAD-box 家族特有的 10 个保守序列中的 8 个: AQTGSGKT(Motif ), PTRELA (motif Ia), TIGR(motif Ib), DEAD(motif ), SAT(motif ), LVFVE (motif ), TAVAARGLD(motif ), HRIGR-TGR (motif ), 此外还有动物 VASA 蛋白保守序列 GG 重复序列, 在 N'端具有 7 个 RG 重复序列和 1 个 RGG 重复序列, 并且发现了一个锌指结构(CCHC)(图 2)。

### 2.2 序列分析和系统进化分析

Blast 分析氨基酸序列结果显示 *Ec-vasa* 与日本沼虾的同源性最高, 为 80%, 与凡纳滨对虾和中国明对虾同源性同为 58%, 与斑节对虾(*Penaeus monodon*)同源性 57%。利用 DNAMAN 将脊尾白虾 VASA 与其他物种 VASA 氨基酸序列多重对比。结果显示, 脊尾白虾 VASA 蛋白与其它甲壳类同源蛋白具有多个高度保守区域(图 3)。

利用 MEGA 5.0 软件构建的基于 VASA 氨基酸序列的 NJ 系统树显示, 脊尾白虾首先与日本沼虾聚为一支, 然后依次为日本囊对虾、凡纳滨对虾、中国明对虾和斑节对虾。位于下方的 PL10 和 P68 分支表明本实验克隆获得的基因确为 *vasa* 基因(图 4)。

### 2.3 *Ec-vasa* 的组织表达模式

利用半定量 RT-PCR 方法研究了 *Ec-vasa* mRNA 在性成熟脊尾白虾各组织中的表达模式, 结果显示: *Ec-vasa* mRNA 在

```

tacatggggtaacgaagtctcttcattcatcaaccgtctccagcaacgtgtgtaaatc
aggttctgtttgaagccatgttcagattggggagccatgatgatgtttggccctagccaggc
M S D W E D N D D U G P S Q
CACTTCAGAAATATGTARCAACTTCATATCAGGCAGGGCAAGATTTTTCATTGGAGGTC
P L P E Y U T T S Y Q A G Q D F S F G G
TGCATCTAGAGATGAGAATTCAGAGATAGATGGTTTTGCAGGAGCCATCAAATGGGG
L H L E D E N S E I D G F D R S H Q N G
ACGGGAGGGGAGGTTAGAGGAGAGGTAGAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
D G R G R G R G R G R G R G R G R G S G R G
GTCAAATGGGGATGTTATAAGTGTGGAARAGGGGACACATATCCAGGGATGTTTCAG
G Q N G G C Y K C G K E G H I S R D C S
AAACTCAGAACCTAAGAATCCCAGGATGGAAAGCCACCTGCACCTCTGTATCCCTA
E N S E P K E S Q D G K P R A P L Y I P
ATGATATTGATGATGACAGATAGCCTCCATGGTATTGAGGCTGGTATAAACCCTTGATA
N D I D D A E I A S H G I E A G I N F D
GCTACGGGAACATTCAGTATTAGTGTATCGGGGAGGAGGATTTCCAGATGTTGGATA
S Y G N I P U S U S G E G U I P S R U D
GCTTTGAAGATATGGATATTAGAAGAATTTACTTGAAATATTCAAAAGCAAGACTACA
S F E D M D I R R I L L E N I Q K A K Y
AAAAGCCAACTCCTATCCAGTCAGCTGCTGATCCCATATTACTTGGGGAGAGAGATACA
K K P T P I Q S A A U P I L L G G R D I
TGGCCTGTCTCAAACCTGGGTACGGAAGACAGTGGCCTATTATTACCTATGCTTAACT
M A C [A Q T G S G K T] U A Y L L P H L N
ATATGTTAAAGCAAGCTGTAAATAGCCATTCAGTGGAGAAACTGCTAGGCCACACAGGGT
Y M L K E S C N S H S M E E T A R P T G
TAGTATTATGTCACAGGGAATAGCCGTGCAGATATACTATGAAGCAAGGAATAT
L U L C [P T R E L A] U Q I Y Y E A R K L
CGTTTGGTCCAGTTCGTCGACCGGTTGCTTATGGTGGACAGCAGCTTTTTCATCAGC
S F G S T L L N R F A Y [G G] T A U V F H Q
TTAAGCAATATTGCTCGGTTGCCATTTGTTAGCAGCAACTATTGGAGAGATGTTAGATT
L K Q I M P G C H L L A G [T I G R] U U D
TTATGGAGAAAGGGAACCTCTCTTTGAGATTGAGTTTTTAGTATTAGATGAGCTG
F M E K G K L S F E D L K F L U L [D E A]
ACAGAACTCCTCCATGGGATTTTACCAGACTGAAGAAGATATTTCCAGCTACCTCGA
D R M L S M G F L P D L K K I F Q H P S
TGCCACCTTGTGAGCAACGGCAACTCTAATGTTCACTGCTACATTTCCCTCTGAGATAC
M P P C E Q R Q T L M F [S A T] F P S E I
AAAATTTGGCAGCACTTTTATGAATCCATATGTTGTTTGTCTGCGGAACTTTGGTG
Q N L A A S F M N P Y U F U U U G N U G
CCGCAAAATCAGATGTATCACAGGAATTTGGAAGTGGATAAAGGGAAATAGAAGATG
A A N T D U S Q E I M E U D K G N K K D
TCCTTAGAATATATCAATGAATGCTTGCACCTGAAGATGCCATGAAATACTGCTGT
U L I E Y I N E M L A T E D G M K I [L U]
TTGTAGAACCACAGAAAGATGGCAGATTTTCATTGGGGCTATTATGTAATAACAGCAT
[F V E T] K K M A D F I G A Y L C N N S I
CCGCCCAACTATTATCGCCGATCGCCATCAGCAACAAAGGGAAGGCCCTTGAACCT
S A T T I H G D R H Q Q R E A L E T
TCAAGAAGGGAAATTTTCTGTTCTTGTGCAACAGCAGTAGCTGCTCGAGGTTAGATA
F K K G K F S U L U A [T A U A A R G L D]
TTCCAGGATAGGATGATGATAAAGCTTTGATTTACCCAAAGAGTGCAGGATATCC
I P G I G C U I N F D L P K E U D E Y U
ATCGTATCGGTCGACCTGGTGGTGTGGAAGAGTGGTGCATGCCGTAAAGCTTTTCGACA
[H R I G R T G R] U G N S G H A U S F F D
AAGGGGATGATTCCTACTTATCCAAAGATTTGTTGAAATATTATCAGAGCTAACCCAGG
K G D D S H L S K D L L K I L S E A N Q
TAGTCCCAGACTGCTGAATCTATTGCTGATGAAGTGGTACCGGGGGGCTACGGTG
U U P D W L K S I A D E S G T G G Y G
GTACTGGAAGATATGCATCCACTGATATCAGGAGAAAGACAGGACTGAAAGGAAATA
G T G R Y A S T D I R R K T G T E K E N
ACTGGGAAGGAATTCATTAGGAGGACCAGCCCTTTAAACCTCCCATGGCAGTGTGATG
N W E G N S L G G P A P F K T P M A U D
ATGATGACTGGGATGCATAGAAAAAaatttatatacagtagtggtggaattgtgtgtaaa
D D D W D A *
ataattdaattgcatactgtatgtggttctattacagataggttgaggcagtagacatatta
gtccatctgaggggttttgatgaggtattctgggaattcaacattattgtcctattgcta
tagatataatgtatgttttattacaatggtttgattatacattatttccagtgctgaaa
gtaaaaaaaaaagggttttccttataatgtataatacaaaattggcttcttagtt
tcaggattgtcaagcgaattggggattatcttcaatcactaaagatagattcccatga
ataaataatgatagtcagatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
gaaattdtaactgttctactcttcagctgtgatgtaaaagtaggtactgtgttctctct
gtttacgtttgatttagataaggaatgtgttatctctatgataattgttccgctagt
tatttctgttcaattgatttacagctcttagttgtgtttgtttggccaacagagca
gcatgtgtctctatagatatacataaaaatgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 2 *Ec-vasa* cDNA 全长的核苷酸序列和推导的氨基酸序列  
 Fig.2 Nucleic acid sequence and deduced amino acid sequence of *Ec-vasa*  
 方框: DEAD-box 家族蛋白共有的 8 个保守基序; 下划线: RG 重复;  
 双下划线: RGG; 粗下划线: 锌指结构



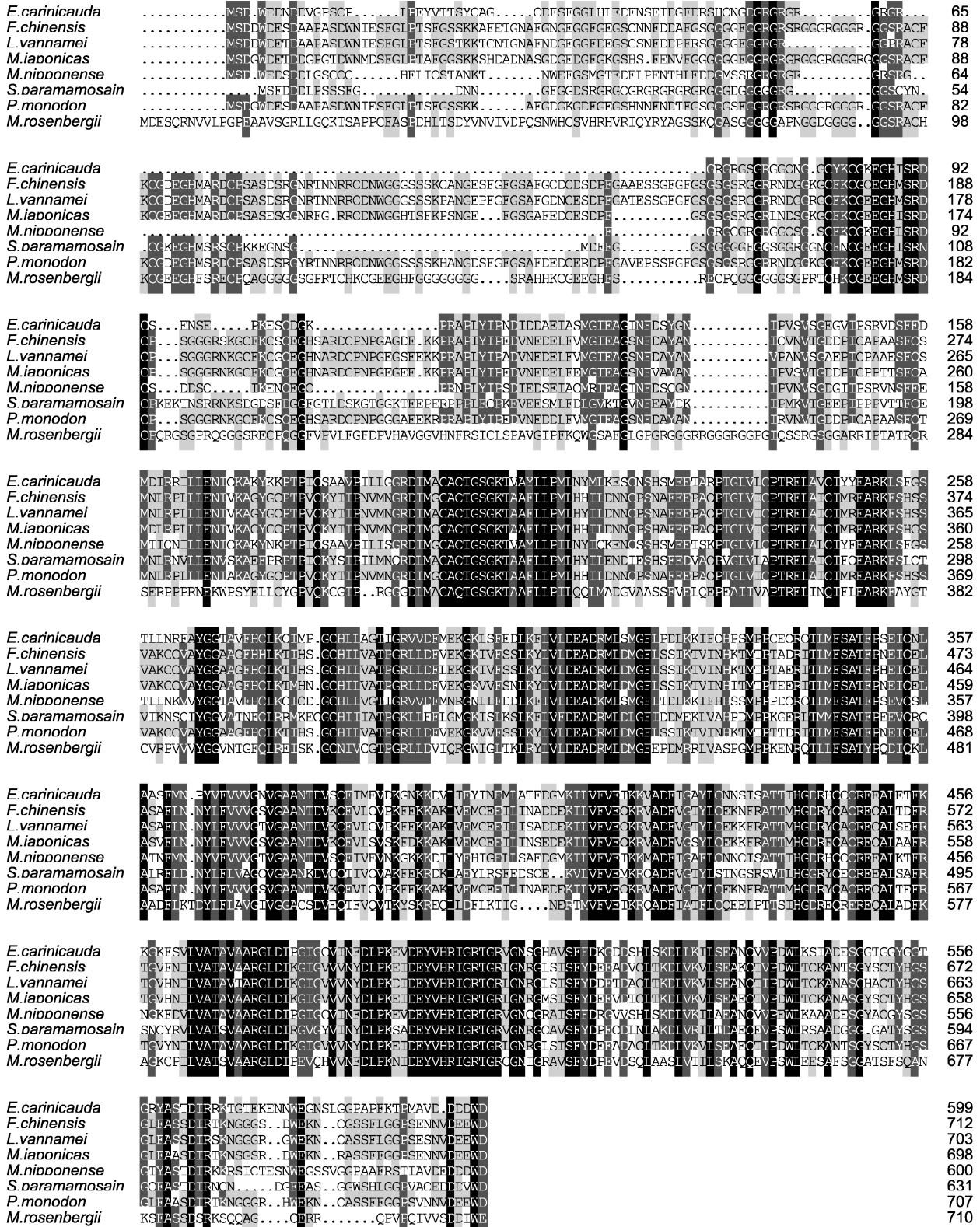


图 3 脊尾白虾 VASA 蛋白氨基酸序列的多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences among the VASA proteins from *Exopalaemon carinicauda* (EF206693), *Litopenaeus vannamei* (DQ095772), *Marsupenaeus japonicas* (HQ385220), *Macrobrachium nipponense* (JF917240), *Scylla paramamosain* (GU187045), *Penaeus monodon* (HQ385221), *Macrobrachium rosenbergii* (DQ339110)

表 1 脊尾白虾 *vasa* 克隆和 mRNA 表达研究所用引物  
Tab. 1 Primers used for *E. carinicauda vasa* cloning and mRNA expression analysis

引物	序列(5'-3')
Degenerate PCR	
V-F	ATGGSWTGTGCTCAGACTAA
V-R	TGKTSGCGATCMCCGTGAAT
RACE PCR	
<i>Ec-vasa</i> 3'	ATCTGAGGGTTTTGGATGAGGTATTC
<i>Ec-vasa</i> 5'	CCTCCAAATGAAAAATCTTGCCCTGC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA GTGGTATCAACGCAGAGT
Real-time PCR	
<i>Ec-vasa</i> -F	GAAGATGGCATGAAAATACTGGTG
<i>Ec-vasa</i> -R	TCTTCCCTTTGTTGCTGATGG
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

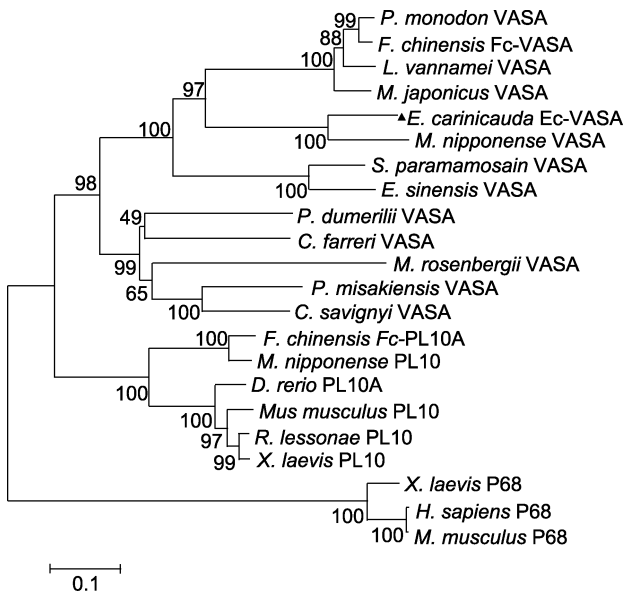


图 4 脊尾白虾 VASA 蛋白的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic analysis of the VASA proteins from *Exopalaemon carinicauda*

▲: 脊尾白虾 VASA 蛋白; 所用物种和 GenBank 注册号: *D. rerio* PL10A (CAA73349), *M. nipponense* PL10 (JF917241), *F. chinensis* Fc-PL10 EF206694, *S. paramamosain* VASA (GU-187045), *M. rosenbergii* VASA (DQ339110), *M. nipponense* VASA (JF917240), *F. chinensis* Fc-VASA (EF206693), *M. japonicus* VASA (HQ385220), *L. vannamei* VASA (DQ095772P), *P. monodon* VASA (HQ385221), *X. laevis* P68 (AAF73861), *M. musculus* P68 (Q61656), *H. sapiens* P68 (P17844), *X. laevis* PL10 (AAH44972), *R. lessonae* PL10 (CAH61467), *Mus musculus* PL10 (AAA39942), *C. savignyi* VASA (BAB12217), *Polyandroca misakiensis* VASA (BAE94497), *P. dumerilii* VASA (CAJ38803), *Chlamys farreri* VASA (DQ452383), *E. sinensis* VASA (HM459853)

脊尾白虾卵巢中特异表达, 且表达量丰富, 在肌肉、肝胰腺、心脏和鳃等组织中均没有表达, 18sRNA 作为阳性对照, 在所有组织中均有表达(图 5)。

图 6 中的数据为 3 个重复的平均值±标准差, 从中可以看出卵巢发育期 *Ec-vasa* 基因的表达量最高, 相对表达量(*vasa*/18S)的平均值为 3.9014, 到了期表达量下降显著 ( $P < 0.01$ ), 相对表达量平均值为 1.6518。随着卵巢的发育, 表达量呈逐渐降低趋势, 在期达到最低水平, 相对表达量平均值为 0.5841。期表达量略回升, 与期相比较差异不显著。

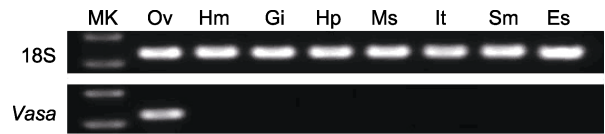


图 5 RT-PCR 分析 *Ec-vasa* 在性成熟雌性脊尾白虾各组织的分布

Fig.5 Tissue distribution of *vasa* detected in adult female *E. carinicauda* by RT-PCR

MK: DNA 分子量标准; Ov: 卵巢; Hm: 血细胞; Gi: 鳃; Hp: 肝胰腺; Ms: 肌肉; It: 肠; Sm: 胃; Es: 眼柄

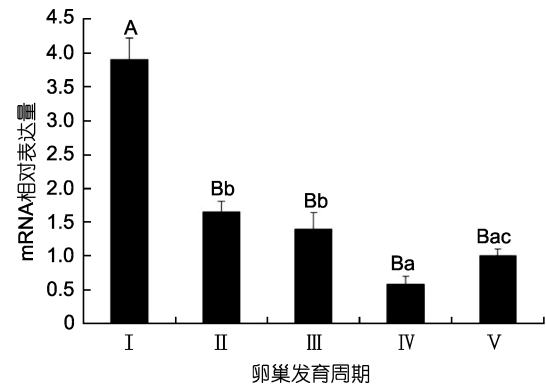


图 6 *Ec-vasa* 在卵巢发育周期中的表达水平

Fig.6 Expression of *Ec-vasa* detected by real-time RT-PCR in the ovary during the development cycle

卵巢发育各期表达量均以与期相比较的倍数表达; 不同大写英文字母: 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 不同小写英文字母: 差异显著 ( $P < 0.05$ )

### 3 讨论

本实验通过 cDNA 克隆成功获得脊尾白虾 *Ec-vasa* 全长 cDNA 序列, 开放阅读框 1800bp; 推导出的氨基酸序列与日本沼虾的同源性最高(80%), 含有 DEAD 蛋白家族 10 个保守序列中的 8 个: AQTGSGKT 序列位于 VASA 蛋白质 N 端第 198-205

位对应 ATP-A 结构域, 是与 ATP 酶和解旋酶活性密切相关的 ATP 结合位点; DEAD 序列位于 312-315 位, 对应的 ATP-B 结构域是 ATP 水解位点, 在 VASA、PL10 和 P68 三大亚蛋白家族中均保守存在(Pause *et al.*, 1992); SAT 保守区被认为与 ATP 水解有关; RGLD 和 HRIGRTGR 保守区是具有 RNA 结合和解旋活性的部位; PTRELA 保守区虽然不直接参与 ATP 结合和水解作用, 但却在 RNA 与 RGLD、HRIGRTGR 两个结构域的结合中发挥关键性作用(周倩如等, 2007); 此外 GG 重复序列参与 eIF4A 因子的蛋白间相互作用(Cordin *et al.*, 2006; Benz *et al.*, 1999)。VASA 蛋白特有的锌指结构(CCHC 框)可能参与核酸的结合, 该结构重复的次数和结构与靶 RNA 分子的特异性有关(Sagawa *et al.*, 2005)。N 末端具有 7 个 RG 重复序列和一个 RGG 序列。上述含有的多个重复序列的甘氨酸富集区(G-rich region)与单链核酸的结合有关, 而这正是 RNA 解旋酶的重要特征(唐良华等, 2012)。这些保守序列在脊尾白虾 VASA 蛋白中均被发现, 充分证明此基因为 *vasa* 同源基因。*vasa* 在进化上非常保守, 这些保守的序列和结构可能对于维持 VASA 蛋白的结构和功能至关重要。

*Ec-vasa* 基因在卵巢组织中特异表达, 在肌肉、肝胰腺、心脏和鳃等组织中均没有表达。这一结果与 *vasa* mRNA 仅在两性生殖细胞中存在较高水平表达, 但在其他组织中几乎检测不到其表达信号的情况相符(张远青等, 2012; Zhou *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; 胡重江等, 2008)。上述结果暗示 *Ec-vasa* 基因是一种有效的分子标记物, 可用于研究脊尾白虾卵巢发育过程。荧光定量 PCR 分析显示, 随着卵巢的发育, *Ec-vasa* 表达量呈逐渐降低趋势, 这与它在中华卵索线虫, 中国对虾, 中华绒螯蟹等多个物种的性腺成熟过程中的表达量逐渐减弱的变化规律相同(任爽等, 2011; Zhou *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013)。

结合卵巢组织学分析(图 1), 在 *Ec-vasa* 基因表达量最高的发育期, 卵巢主要由卵原细胞组成, 细胞处于增殖状态。随着卵巢的发育表达量逐渐降低, 期(小生长期)和 期(大生长期)的卵巢分别主要由初级卵母细胞、卵黄合成前期卵母细胞和卵黄合成中期卵母细胞组成。在卵巢发育期(成熟期)表达量达到最低水平, 此时的卵巢主要由成熟的卵母细胞组成。有研究表明在黑脊倒刺鲃卵子发生过程中, *vasa* mRNA 在卵原细胞中阳性信号最强, 而在随后各时

相的卵母细胞中, *vasa* mRNA 的杂交信号明显减弱(唐良华等, 2012)。此外, 日本沼虾 *Mn-vasa* 基因在卵黄发生前期、卵黄发生早期和中期的卵母细胞细胞质中被检测到, 而在卵黄积累末期卵母细胞中没有信号(朱小玲, 2010)。即在早期的卵母细胞中表达, 随着卵母细胞的成熟, 表达越来越弱, 直至检测不到信号, 这些都与本研究实验结果呈现的规律相近似。在海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)(杨晓飞等, 2010), 银鲫(Xu *et al.*, 2005), 金鱼(陈云贵等, 2005), 南方鲇(胡重江等, 2008), 半滑舌鳎(张远青等, 2012)等物种中也均证明了这一规律。造成这一现象的原因可能是卵细胞中大量卵黄的出现, 以至 *vasa* mRNA 的浓度下降(朱小玲, 2010); 与此同时, *vasa* mRNA 的转录速度也可能下降并逐渐中止(唐良华等, 2012)。在本研究中, 卵巢发育期(恢复期)成熟卵细胞排出, 卵巢恢复初始状态, 此时卵巢内重新以卵原细胞为主, 解释了卵巢发育期表达量出现回升现象的原因。最终, 存在于成熟卵子中的 *vasa* mRNA, 作为母源性遗传物质, 通过受精卵被带入新生的个体中。大量研究表明 VASA 蛋白对于生殖细胞的形成和卵子极性的建立以及某些发育基因的 mRNA 转录调控都具有重要作用(Lasko *et al.*, 1988; Styhler *et al.*, 1998)。

本研究获得了脊尾白虾的全长 *vasa* cDNA, 为从分子水平研究脊尾白虾 PGC 的起源、迁移和分化提供可靠的分子标记。结果表明, *vasa* 基因可能在脊尾白虾卵巢发育的调控过程中起着关键作用; 作为一种母源性基因, *vasa* 基因还可能与子代原始生殖细胞的形成、迁移、分化等发育过程密切相关, 其中相关的调控机制还有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- 王绪峨, 1989. 脊尾白虾早期胚胎发育以及温、盐度与其孵化的关系. 水产学报, 13(1): 59—64
- 朱小玲, 2010. 日本沼虾 DEAD-box 家族基因 *vasa* 和 *PL10* 的克隆及其在卵巢发育过程中的表达. 海洋渔业, 32(2): 132—140
- 任爽, 陈冲, 刘绪生等, 2011. 中华卵索线虫 *vasa* 基因的克隆及其表达模式分析. 植物保护学报, 38(4): 333—338
- 吕道远, 宋平, 陈云贵等, 2005. 黄鳝性腺自然逆转过程中 *vasa* 基因的表达分析. 动物学报, 51(3): 469—475
- 陈云贵, 叶鼎, 宋平等, 2005. 金鱼配子发生中 *vasa* 基因的表达和分布特征. 动物学研究, 26(2): 179—183
- 张凤英, 马凌波, 蒋科技等, 2010. 拟穴青蟹 *vasa* 基因 cDNA 的特征分析与性腺特异表达. 海洋渔业, 32(4): 361—367
- 张远青, 温海深, 何峰等, 2012. 半滑舌鳎 *Vasa* 基因 cDNA 克

- 隆及其在繁殖周期的表达. 水产学报, 36(1): 1—8
- 杨晓飞, 常亚青, 姜玉声等, 2010. 虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) *Vasa* 基因的克隆与表达. 生物技术通报, 12: 142—166
- 杨筱珍, 王金峰, 杨丽娜等, 2009. 日本新糠虾(*Neomysis japonica*)巢发育与卵子发生. 海洋与湖沼, 40(3): 338—346
- 周倩如, 邵明瑜, 张志峰, 2007. *vasa* 基因编码蛋白的结构特征和应用展望. 海洋湖沼通报, 04: 129—134
- 胡重江, 吴风瑞, 刘智皓等, 2008. 南方鲇 *Vasa* 基因两种亚型 cDNA 的克隆及其表达. 动物学报, 54(6): 1051—1060
- 唐良华, 苏敏, 吕博彦等, 2012. 黑脊倒刺鲃 *vasa* 同源基因的克隆及表达分析. 水产学报, 36(6): 869—878
- 颜素芬, 姜永华, 2009. 中国龙虾卵子发生及卵巢发育的组织学研究. 海洋科学, 33(6): 12—17
- Aflalo ED, Bakhrat A, Raviv S *et al*, 2007. Characterization of a *vasa*-like gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis. Mol Reprod Dev, 74(2): 172—177
- Benz J, Trachsel H, Baumann U, 1999. Crystal structure of ATPase domain of translation initiation factor eIF4A from *Saccharomyces cerevisiae*-the prototype of the DEAD box protein family Structure. Folding and Design, 7: 671—679
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK *et al*, 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. Gene, 367: 17—37
- Feng Z F, Zhang Z F, Shao M Y *et al*, 2011. Developmental expression pattern of the *Fc-vasa-like* gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture, 314: 202—209
- Krvel A V, Olsen L C, 2004. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. Developmental Biology, 271(1): 190—197
- Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y, 2000. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. Mechanisms of Development, 99(1—2): 139—142
- Linder P, Lasko P F, Ashburner M *et al*, 1989. Birth of the D-E-A-D box. Nature, 337: 121—122
- Li C J, Liu L, 2010. Identification of a *vasa* homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis. CBP Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 157(2): 159—166
- Lasko P F, Ashburner M, 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. Nature, 335: 611—617
- Linder P, Lasko P F, Ashburner M *et al*, 1989. Birth of the D-E-A-D box. Nature, 337(6203): 121—122
- Nakkrasae L I, Damrongphol P, 2007. A *vasa*-like gene in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Mol Reprod Dev, 74(7): 835—842
- Otani S, Maegawa S, Inoue K *et al*, 2002. The germ cell lineage identified by *vasa*-mRNA during the embryogenesis in goldfish. Zoological Science, 19(5): 519—526
- Pause A, Sonenberg N, 1992. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: The mammalian translation initiation factor eIF-4A. EMBO Journal, 11(7): 2643—2654
- Qiu G F, Chen Y, Cui Z *et al*, 2013. Localization of germline marker *vasa* homolog RNA to a single blastomere at early cleavage stages in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: Evidence for germ cell specification by preformation. Gene, 2013 513: 53—62
- Rocak S, Linder P, 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5(3): 232—241
- Raghuvver K, Senthilkumaran B, 2012. Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. CBP Part A: Molecular & Integrative Physiology, 157(1): 79—85
- Schüpbach T, Wieschaus E, 1986. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. Developmental Biology, 113(2): 443—448
- Schüpbach T, Wieschaus E, 1986. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. Development Genes and Evolution, 195(5): 302—317
- Sellers M J, Lyons R E, Grewe M *et al*, 2007. A PL10 *vasa*-like gene in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, expressed during development and in adult gonad. Marine Biotechnol, 2007, 9(3): 377—387
- Styhler S, Nakamura A, Swan A *et al*, 1998. *Vasa* is required for GURKEN accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. Development, 125: 1569—1578
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 4: 406—425
- Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y, 2005. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing *vasa* as a marker. Gene Expression Patterns, 5(5): 669—678
- Tamura K, Peterson D, Peterson N *et al*, 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 28(10): 2731—2739
- Tanner N K, Linder P, 2001. DexD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. Molecular Cell, 8: 251—262
- Xu H, Gui J, Hong Y, 2005. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and



- gynogenetically reproducing vertebrate. *Development Dynamics*, 233(3): 872—882
- Xu H Y, Peng J X, Gui J F *et al*, 2005. Gibel carp germ cell marker *Vasa*: cDNA cloning and its antibody preparation. *Acta Zoologica Sinica*, 51(4): 732—742
- Wang Q, Fang D A, Sun J L *et al*, 2013. Characterization of the *vasa* gene in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: A germ line molecular marker. *Journal of Insect Physiology*, 9(4): 377—524
- Yoon C, Kawakami K, Hopkins N, 1997. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 124(16): 3157—3165
- Zhou Q R, Zhang Z F, Shao M Y *et al*, 2010. Cloning, characterization and expression analysis of the DEAD-box family genes, *Fc-vasa* and *Fc-PL10a*, in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28 (1): 37—45

## CLONING AND EXPRESSION OF GENE *VASA* DURING OVARIAN DEVELOPMENT CYCLE IN *EXOPALAEEMON CARINICAUDA*

XU Wen-Fei<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, LI Ji-Tao<sup>2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>

(1. Ocean University of Dalian, Dalian 116000, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract** The *vasa* gene encodes DEAD box family protein of ATP-dependent RNA helicase, and it plays a crucial role in primordial germ cell proliferation. In this report, a *vasa* gene was isolated from *Exopalaemon* and named *Ec-vasal carinicauda* using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) coupled with rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches. The *Ec-vasa* cDNA sequence comprises 2516bp with an open reading frame of 1 800bp encoding 600 amino acids. The deduced amino acid sequence contains 8 conserved motifs of DEAD-box family protein. Comparisons in the deduced amino acid sequence with those of other invertebrates revealed the highest homology (80%) with *Macrobrachium nipponense*. In the organs of the adult, the *Ec-vasa* transcripts were detected in ovary. In the ovarian development cycle, the highest mRNA expression level of *vasa* gene was found instage , and then the transcripts decreased with ovarian development. As the time progressed, the expression level of *Ec-vasa* reached the lowest level at stage . These results indicate that *Ec-vasa* gene may play an important role in oogenesis during ovarian development cycle, and it was expected as an effective molecular marker to the origin of PGCs and gonadogenesis.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; *vasa*; gene cloning; mRNA expression; ovarian development cycle