

施氏鲟精巢和卵巢差减 cDNA 文库的构建和差异表达 EST 的筛选

陈金平^{1,2}, 王斌², 吴文化², 梁冰¹, 张树义¹

(1. 中国科学院动物研究所, 北京 100080; 2. 中国水产科学研究院 鲟鱼繁育技术工程中心, 北京 100039)

摘要:应用抑制差减杂交(SSD)技术构建了施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)精巢和卵巢组织的 SMART cDNA 文库及其 dDNA 差减文库,从两个差减文库中随机挑取 200 个克隆进行 PCR 检测,随机挑选其中的 123 个 cDNA 克隆测序,将所测序列经 GenBank 检索和生物信息学比较,发现有 55 个 cDNA 片段序列在 GenBank 上无明显的同源性,68 个片段与已报道的基因有较高的同源性,其中 17 个 cDNA 片段为精巢中特异表达的基因,而 51 个为卵巢中特异表达的基因。精巢中大量表达的主要为延长因子(EF-1)和脂肪酸连接蛋白等与精子生成发育有关的基因,而卵巢主要为 ZPC、组蛋白和周期蛋白等与卵细胞发育成熟相关的基因。这些 EST 数据为进一步筛选和克隆鲟鱼性腺组织特异性表达基因提供了材料平台,为鲟鱼基因组数据增补了大量信息。[中国水产科学,2006,13(1):8-12]

关键词:施氏鲟;差减 cDNA 文库;差异表达;抑制差减杂交

中图分类号:Q959.463 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0008-05

施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)为软骨硬鳞鱼类,起源于白垩纪晚期(距今 4.5 亿~3.5 亿年),是鱼类中比较古老的种类。施氏鲟为多倍体鱼类,具有 $2n=240$ 条染色体,有关施氏鲟性别决定的分子机理研究很少。据 Robert 等^[1]报道的鲟鱼均为雌雄异体,其性别遗传方式为性别异型性染色体或多基因决定。Wrobel^[2]将鲟属鱼作为研究脊椎动物泌尿器官发育的模式生物,认为鲟鱼是用来解释脊椎动物性腺后肾管或前肾管起源的最适合模式种。近些年来,随着鲟鱼养殖业的逐渐兴起,在生产中发现在同样养殖条件下施氏鲟的雌性个体比同龄的雄性个体生长快、个体大,且养殖更多的雌性个体,可增加鲟鱼苗和鲟鱼籽的产量,因此鲟鱼类的性别控制研究对于提高养殖鲟鱼的经济效益起着举足轻重的作用。

为了解鲟鱼卵子发育过程中起主要作用的调控因子和发展雌雄鉴别的分子标记,本研究分别构建了卵巢和精巢的差减 cDNA 文库,筛选出雌雄特异的 cDNA 片段,旨在为今后对施氏鲟乃至鲟鱼类生殖发育相关基因的研究提供素材,进而达到保护该物种,深入了解鱼类和脊椎动物性别决定和发育基因的进化以及功能的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)采自中国水产科学研究院鲟鱼繁育技术工程中心,取 4+ 龄雌雄鱼性腺组织(各 3 尾),放入液氮保存待用。

1.2 总 RNA 的抽提和 poly(A) mRNA 的纯化

采用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)分别提取 3 尾施氏鲟雄性精巢组织与 3 尾施氏鲟雌性卵巢组织的总 RNA,经 DNA 酶消化后,分别混合形成施氏鲟精巢和卵巢组织的 RNA pools。随后利用磁珠法(Promega 公司)从 RNA pools 中分离、纯化 poly(A) mRNA。

1.3 SMART cDNA 的合成

采用 Clontech 公司的 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 合成 SMART cDNA。1 μ g 总 RNA 在 CDS 引物和 SMART 寡聚核苷酸引物存在下,65 $^{\circ}$ C 温育 2 min,42 $^{\circ}$ C 加入逆转录酶, dNTP 反转录 30 min,取稀释后的第一链 cDNA 2 μ L,加入 10 $\times$ Advantage 2 PCR 缓冲液 10 μ L, dNTP 2 μ L, PCR 引物 2 μ L, 50 $\times$ Advantage 2 聚合酶 2 μ L,在 100 μ L 体系中进行 PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 65 $^{\circ}$ C, 30 s;

收稿日期:2005-04-13; 修订日期:2005-06-20.

基金项目:国家自然科学基金杰出青年基金项目(30025007);中国科学院知识创新工程重要创新方向项目(KSCX2-SW-118).

作者简介:陈金平(1962-),男,现工作单位:中国科学院广州生物医药与健康研究院. Tel:020-32290317. E-mail:chen_jinping@gibh.sc.cn

通讯作者:张树义. Tel:010-62537132. E-mail: zhangsy@iscn.ac.cn

68℃, 6 min, 19 个循环。所合成的双链 cDNA 用 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)纯化。

1.4 抑制消减杂交

具体操作按照 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech 公司)进行。分别制备施氏鲟精巢和卵巢组织的 Driver cDNA 和 Tester cDNA。首先制备卵巢消减 cDNA, 其中 Driver cDNA 的制备是将精巢组织的 mRNA 逆转录合成双链 cDNA, 然后用 *Rsa* I 充分酶切 3 h 后完成。Tester cDNA 的制备是将卵巢组织合成的双链 cDNA 用 *Rsa* I 酶切后, 分成两份, 分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 连接后即制成 Tester21 cDNA 和 Tester22 cDNA。然后, 以制备好的精巢 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别进行抑制性消减杂交。当制备精巢组织的消减 cDNA 时, 以精巢 Tester cDNA 与卵巢 Driver cDNA 进行杂交。

抑制性消减杂交过程: 首先将 Tester21 cDNA 和 Tester22 cDNA 分别与 Driver cDNA 进行第 1 次杂交, 混合两种杂交产物, 再与新变性的 Driver cDNA 进行第 2 次杂交, 杂交产物随后以引物 primer 1(试剂盒提供)进行第 1 次 PCR 扩增, 第 1 次 PCR 产物再用引物 Nested primer 1 和 2R(试剂盒提供)进行第 2 次 PCR 扩增, 使特异于精巢组织的差异表达基因得到指数扩增。

1.5 消减效率检测

用施氏鲟 β -actin 特异的上游引物: 5'-CG-GTTTCGCTGGAGATGATG-3', 下游引物: 5'-TCAGTGAGCAGGACGGGGTG-3', 对消减 cDNA 文库进行 PCR 检测消减效率。同时, 以未经抑制性消减杂交的 cDNA(在制备 Tester cDNA 连接两种接头时, 将刚加好样还没有进行连接反应的 Tester21 cDNA 和 Tester22 cDNA 各取 2 μ L 混合, 然后进行连接反应完成)进行 PCR 作为对照。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃, 30 s; 60℃, 30 s; 72℃, 1 min 扩增, 33 个循环, 分别在第 18、23、28、33 循环处取 5 μ L 进行电泳, 检测消减效率。

1.6 消减文库的构建

将 SSH 的第 2 轮 PCR 产物纯化后连接到载体 pGEM-T(Promega), 转化 *E. coli* DH5 α , 将菌液均匀地涂布在 LB/Amp/X-gal/IPTG 琼脂平板上, 在生化培养箱中于 37℃ 培养 16 h, 这样就构建了施氏鲟卵巢差异表达基因的差减文库(正向差减文库)和施氏鲟精巢差异表达基因的差减文库(反向差减文

库)。挑取白色菌落接种于 1 mL LB 液体培养基中, 37℃ 培养过夜。取 1 μ L 菌液, 用引物 M13F 和 M13R 进行扩增检测是否有插入片段。有插入者加甘油保种于 -80℃ 中。

1.7 序列测定与序列分析

对阳性克隆结果进行测序(上海博亚公司), 序列分析用 DNASTar 软件, 将测序结果与 GenBank 中的序列比较。

2 结果

2.1 消减效率

为检测消减 cDNA 文库的消减效率, 以施氏鲟 β -actin 基因在消减杂交后的 cDNA 和未经消减杂交 cDNA 的第 2 次 PCR 产物中量的差异为指标进行检测。结果显示, 以卵巢消减 cDNA 文库为模板 PCR 检测 β -actin 基因, 28 个循环后才有微弱的带, 而以未经消减杂交的产物为模板扩增, 在第 18 个循环处就有产物(图 1A), 表明卵巢消减 cDNA 文库中 β -actin 基因的消减效率高达 $2^{28-18} = 2^{10}$ 倍; PCR 检测 β -actin 在精巢消减 cDNA 文库中的丰度时, 在 28 个循环后才有微弱的扩增, 而在未经消减杂交的产物中 23 个循环处就有较强的带(图 1B), 表明 β -actin 基因在精巢消减 cDNA 文库中的消减效率至少高达 $2^{28-23} = 2^5$ 倍。管家基因 β -actin 在正反向消减 cDNA 和未消减 cDNA 中含量出现显著差异, 表明 Tester 和 Driver 中共有的 cDNA 片段已被有效消除, 同时也表明某些精巢和卵巢的差异表达基因也富集了相同的倍数。

2.2 差异片段阳性克隆的筛选和鉴定

将消减 cDNA 片段全部克隆入 pGEM-T 载体, 成功构建了施氏鲟卵巢和精巢组织间正反向消减 cDNA 文库。每个消减 cDNA 文库随机挑取 200 多个克隆, 用 M13F 和 M13R 为引物进行 PCR 鉴定后, 分别随机选取 70 和 53 个阳性克隆, 插入片段长度主要分布于 250 bp-1.0 kb(图 2), 将这些阳性克隆送博亚公司测序。将所测序列经 GenBank 检索和生物信息学比较, 发现有 55 个 cDNA 片段序列无明显的同源性, 68 个片段与报道的基因有较高的同源性。在这 68 个具同源性的片段中精巢成分表现出明显的差异, 精巢中主要为延长因子(EF-1)和脂肪酸连接蛋白等与精子生成发育有关的基因, 而卵巢主要为 ZPC, 组蛋白和周期蛋白等与卵细胞发育成熟相关的基因(表 1)。

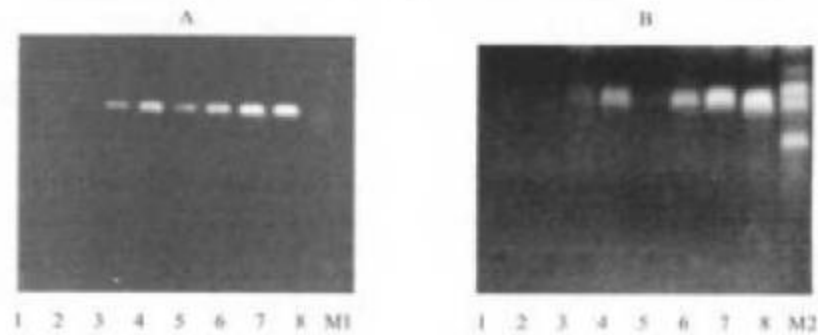


图1 PCR检测 β -actin cDNA的消减效率

A:以卵巢为Tester; B:以精巢为Tester; M1和M2:分子量标准; 1-4:消减cDNA的产物; 5-8:未消减cDNA的产物; 4,8:33个循环; 3,7:28个循环; 2,6:23个循环; 1,5:18个循环。

Fig.1 Subtraction efficiency of β -actin cDNA between subtracted and unsubtracting cDNAs detected by PCR

A:Ovary as Tester; B:Testis as Tester; M1 and M2: DNA molecular weight marker; Lanes 1-4: Products of subtracted cDNAs; Lanes 5-8: Products of unsubtracting cDNAs; Lanes 4 and 8: 33 Cycles; Lanes 3 and 7: 28 Cycles; Lanes 2 and 6: 23 Cycles; Lanes 1 and 5: 18 Cycles.

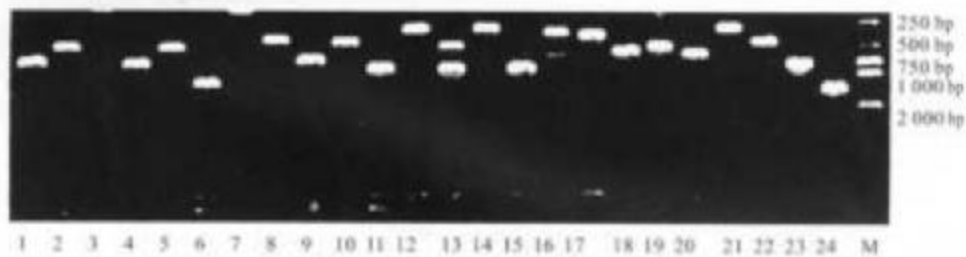


图2 M13引物PCR检测施氏鲟卵巢为Tester消减cDNA文库克隆插入片段

M:DL 2 000 DNA 分子量标准; 1-24:从正向消减文库中随机挑取的24个克隆。

Fig.2 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA libraries with ovary as tester using M13 by PCR

M: DL 2 000 DNA molecular weight marker; Lanes 1-24: The 24 randomly picked clones from the subtractive cDNA libraries.

3 讨论

在施氏鲟精巢中出现频率较高的克隆由大到小依次为:脂肪酸连接蛋白、I型胶原蛋白、延长因子1 beta、核糖体蛋白。说明这些基因在精巢发育和精子生成过程中表达量较高。脂肪酸连接蛋白基因在哺乳动物中主要有9种存在形式,其中FABP5和FABP9在精巢中表达^[3],但鱼类中目前尚未见到有关它的功能的报道。Bein等^[4]报道脂肪酸连接蛋白在底鳉(*Fundulus heteroclitus*)雄性个体的肝脏、鳃和性腺中高表达。此外,尾索动物*Molgula pedunculata*性腺中也具有脂肪酸连接蛋白的存在^[5],施氏鲟精巢中脂肪酸连接蛋白的存在和高表达,说明其在施氏鲟精巢中具有重要作用。I型胶原是生

物体内分布最广、数量最多的胶原成分,它是由2条 $\alpha 1(I)$ 链和1条 $\alpha 2(I)$ 链组成的异三聚体。 $\alpha 1(I)$ 和 $\alpha 2(I)$ 分别由COL1A1(collagen, type I, alpha 1)和COL1A2基因编码。目前已有有人、鼠、斑马鱼、蛙和虹鳟^[6-9]等的COL1A1基因组织结构、表达和功能研究报道。I型胶原在施氏鲟精巢中高表达,所起的功能还有待于进一步研究。延长因子1 beta(EF-1)在脊椎动物中普遍存在并几乎统一表达,其产物与蛋白质的大量翻译和细胞能量代谢有关^[10-11],施氏鲟精巢中EF-1高表达,初步推测可能与精子生成过程中细胞大量增殖,蛋白质大量表达和能量的需求有关。

在施氏鲟卵巢中表达频率较高的由大到小依次为:zona pellucida(ZP)、组蛋白、周期蛋白B1、周期

表1 施氏鲟精巢和卵巢中主要的 cDNA 克隆

Tab. 1 Primary testis and ovary cDNA clones

cDNA 克隆 cDNA clones	68 个克隆中出现频率/次 Frequency in 68 clones
Testis cDNA library	
Fatty acid-binding protein	7
Ribosomal protein (SL3, L26 like 1)	2
Elongation factor 1 beta(EF-1)	2
Collagen type I alpha 2(COL1A2)	3
Collagen type I alpha 1(COL1A1)	2
Annexin V	1
Ovary cDNA library	
Histone protein(H2A, H4, H3)	8
Egg envelope lysozyme (ZP3)	2
Mt 16S rRNA	2
Lactate dehydrogenase B4	1
Cyclin A1	3
Cyclin B1	5
Cyclin dependent kinase	1
sulfotransferase	1
TCP-1 epsilon	1
Ferritin H3	1
Zgc *	6
Ode1 protein	1
ZPAX	1
ZPC	10
Annexin A2	1
Proteasome subunit N3	1
Ferritin H2	1
ZPA	2
Ornithine decarboxylase 1	1
RIKEN	1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2F3	1

注: "*"为斑马鱼基因组项目。

Note: "*" means the Zebrafish Gene Collection (zgc) providing a complete set of full-length (open reading frame) sequences and cDNA clones of expressed genes for zebrafish.

蛋白 A1、ZPA。哺乳动物受精过程中卵细胞中的 zona pellucida 蛋白对精子具有激活作用,在哺乳动物胚胎着床前的发育过程中也起着重要的作用^[12], zona pellucida 蛋白包括 ZPA、ZPB 和 ZPC 3 种形式,其中 ZPC 在卵细胞中特异性表达^[13],施氏鲟卵巢中该物质的大量表达,是否预示着处于该时期的卵细胞具有受精能力还有待于进一步研究。组蛋白(H2A、H3 和 H4)在施氏鲟卵巢中大量表达,与组蛋白 H3 在成年小鼠卵巢滤泡中高度表达结果相一致^[14],说明组蛋白在施氏鲟卵子发生过程中起着重要作用。周期蛋白 B1 mRNA 在卵细胞中表达,是和细胞的减数分裂有关^[15],而周期蛋白 A1 在人和精巢中为特异性表达^[16]。本研究两种周期蛋

白在施氏鲟卵巢中均大量表达。本实验所获得的 cDNA 片断还有很多与斑马鱼基因组计划中的全长表达序列同源性很高,在斑马鱼中这些序列也是从斑马鱼性腺组织中克隆到的,说明这些 zgc 序列与性腺发育和生殖细胞的生成有关,但这些序列的具体功能还有待于进一步研究。

本研究分离的这些 EST 序列均为施氏鲟性成熟个体精巢中差异表达,但这些 cDNA 序列在施氏鲟性别发育和分化过程中是否差异表达还有待于研究。施氏鲟性腺组织差异表达 cDNA 片断的获得将有利于今后分离、鉴定与性腺分化和性细胞发育决定相关的基因,为进一步研究鲟鱼类性别决定的分子机理和卵细胞发育调控的规律奠定基础,对获得鲟鱼性别早期鉴别的分子标记具有重要意义。

参考文献:

- [1] Robert H, Devlin A, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208: 191-364.
- [2] Weibel K H, Gessner S, Schirmer M. The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: ultrastructure of nephrostomal tubule formation and of initial gonadogenesis[J]. *Ann Anat*, 2002, 184(5): 443-454.
- [3] Ann V H, Berulohr D A. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: Molecular and genetic insights into function[J]. *Trend Endocr Metab*, 2000, 11(5): 175-180.
- [4] Bain L J. cDNA cloning, sequencing, and differential expression of a heart-type fatty acid-binding protein in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*)[J]. *Mar Envir Res*, 2002, 54(3-5): 379-383.
- [5] Cavagnari B M, Tatin M, Sebade R J, et al. A fatty acid-binding protein and a protein disulphide isomerase-related protein expressed in urochordate gonad cytosol[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(7): 769-777.
- [6] Fisher S, Jagadeeswarar P, Halpern M E. Radiographic analysis of zebrafish skeletal defects[J]. *Dev Biol*, 2003, 264: 64-76.
- [7] Goto T, Katada T, Kinoshita T, et al. Expression and characterization of Xenopus type I collagen alpha 1 (COL1A1) during embryonic development[J]. *Dev Growth Differ*, 2000, 42: 249-256.
- [8] Monson J M, Friedman J, McCarthy B J. DNA sequence analysis of a mouse pro alpha 1 (I) procollagen gene: evidence for a mouse III element within the gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1982, 2: 1362-1371.
- [9] Strusberg R L, Feingold E A, Grosse L H, et al. Generation and initial analysis of more than 15 000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99

- (26):16 899-16 903.
- [10] Kinoshita M, Nakata T, Adachi K, et al. cDNA cloning of polypeptide chain elongation factor-1 from mudaka *Oryzias latipes*[J]. Fish Sci, 1999, 65:133-137.
- [11] Lee S, Wolfrum L A, Wang E. Differential expression of S1 and elongation factor-1 during rat development[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 24 453-24 459.
- [12] McCartney C A, Mate K E. Cloning and characterisation of a zoon pellucida 3 cDNA from a marsupial, the brushtail possum *Trichosurus Vulpecula*[J]. Zygote, 1999, 7(1):1-9.
- [13] Eberspacher U, Becker A, Bringmann P, et al. Immunohistochemical localization of zoon pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries[J]. Cell Tissue Res, 2001, 303(2):277-287.
- [14] Lopez-Fernandez L A, Lopez-Alarcon D M, Castaneda V, et al. Developmental expression of H3. 3A variant: histone mRNA in mouse[J]. Int J Dev Biol, 1997, 41(5):699-703.
- [15] Robert C, Hue I, McGraw S, et al. Quantification of cyclin B1 and p34(cdk2) in bovine cumulus-oocyte complexes and expression mapping of genes involved in the cell cycle by complementary DNA microarrays[J]. Biol Reprod, 2002, 67(5):1456-1464.
- [16] Yang R, Monsetti R, Koefler H P. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines[J]. Cancer Res, 1997, 57(5):913-920.

Cloning and screening of differentially expressed genes from testis and ovary of Amur sturgeon

CHEN Jin-ping^{1,2}, Wang Bin², Wu Wen-hua², LIANG Bing¹, ZHANG Shu-yi¹

(1. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100080, China; 2. Engineering and Technology Center of Sturgeon Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) is an ancient freshwater Chondrostei species, which is mainly distributed in Asia, including China. This species represents an economically important source of food including caviar. However, little genetic information is available for Amur sturgeon, and there are currently no genetic markers for selection of broodstock or manipulation of its sex. Identification of sex related genes in Amur sturgeon provides data for studying evolution and function and the developmental biology of Amur sturgeon. To find these sex development related genes, A systematic study was initiated to identify differentially expressed genes in the testis and ovary of the Amur sturgeon by using suppression subtractive hybridization (SSH) technique. Some differentially expressed genes between female gonad (FG) and male gonad (MG) in the Amur sturgeon were obtained. Two SSH plasmid libraries for gonads of Amur sturgeon were constructed. And then differentially expressed genes were sequenced. Searching GenBank by using these nucleotide sequences indicated that 55 cDNA fragments could not find their homologous sequences in the database. Of the 68 known genes, 17 cDNAs were differentially expressed in testis, and were made up of fatty acid-binding protein, Collagen type I alpha 2, EF-1, et al., and 51 cDNAs were differentially expressed in ovary, which were mainly ZPC, Histone protein(H2A, H4, H3), Cyclin, et al., closely relevant to egg development whose expression may be good for producing good quality caviar. The results are good enough for further cloning of the gonads specific expression genes and adds much genetics information of sturgeon. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1):8-12]

Key words: *Acipenser schrenckii*; SSH cDNA library; differentially expression; SSH

Corresponding author: ZHANG Shu-yi. E-mail: zhangsy@icaf.ac.cn