

## 刺参 *vasa-like* 基因克隆及其在组织中的表达分析

隋娟, 张志峰, 邵明瑜, 胡景杰

(中国海洋大学 海洋生物遗传学与种质工程实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** *vasa* 基因编码 DEAD-box 家族成员中一种 ATP 依赖的 RNA 解旋酶, 在生殖系分化过程中发挥着重要的作用。本研究采用同源克隆和 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE), 从刺参 (*Apostichopus japonicus*) 精巢中克隆得到 *vasa* 的全长 cDNA 序列。该 cDNA 序列全长 2 167 bp, 开放阅读框 1 593 bp, 编码 530 个氨基酸, 具有 DEAD-box 家族蛋白的全部 9 个保守域。经同源比对和系统进化分析, 确定其属于 DEAD-box 家族的 VASA 亚家族成员。利用半定量 RT-PCR 检测, *vasa* mRNA 专一性的在刺参性腺中表达, 据此, 刺参 *vasa* 基因有望用于其生殖系起源和分化的研究。[中国水产科学, 2008, 15(3): 407-413]

**关键词:** 刺参; *vasa*; 全长 cDNA; 序列分析; 组织表达

**中图分类号:** S917      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1005-8737-(2008)03-0407-07

*vasa* 基因最早在果蝇中被发现, 它作为一种母源效应基因在果蝇腹部形成, 在生殖细胞分化中起重要作用<sup>[1]</sup>。之后, *vasa* 相关基因在一些物种中陆续被克隆, 其中绝大多数物种中被确认仅在生殖系中特异性的表达<sup>[2-6]</sup>。1997 年, Yoon 等采用整体原位杂交技术, 以 *vasa* 为标记基因, 追踪了斑马鱼 (*Brachyolanio rerio*) 原生殖细胞的起源、迁移和分化<sup>[6]</sup>; 随后, 研究人员纷纷报道了 *vasa* 基因的 mRNA 或蛋白在 小鼠<sup>[7]</sup>、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[8]</sup>、水蚤 (*Daphnia magna*)<sup>[9]</sup>、银鲫 (*Carassius gibelio*)<sup>[10]</sup>、沙蚕 (*Platynereis dumerilii*)<sup>[11]</sup> 等多个物种中的时空表达图式, 用以分析原生殖细胞起源、迁移和生殖系的分化。至此, 对于一些尚不知生殖系分化途径的物种来讲, *vasa* 可作为一种有利的研究工具, 来追溯这些物种生殖系的起源和分化。

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 又称仿刺参, 隶属棘皮动物门 (Echinodermata) 海参纲 (Holothuroidea) 楯手目 (Aspidochirotida), 是中国主要的棘皮动物经济种类。棘皮动物中, 仅有关于紫球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 中 *vasa* 基因在卵巢及胚胎幼虫中的表达量以及定位的报道<sup>[12]</sup>。本研究以刺参为材料, 采用同源克隆和

SMART-RACE 技术, 筛选和克隆了刺参 *vasa* 基因的全长 cDNA 序列, 并利用半定量 RT-PCR 技术对其组织分布进行了分析, 旨在为进一步研究刺参原生殖细胞的起源、分化及其性腺发生提供研究基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

实验用刺参健康成体购自青岛市海产品市场, 产地为大连海区。

#### 1.2 主要试剂及药品

DNA 酶 (DNase I)、*rTaq* DNA 聚合酶、pMD18-T 克隆载体、*Hae* III 和 *Taq* I 限制性内切酶购自宝生物 (大连) 公司。M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂 (RNasin)、dNTP 购自 Promega 公司。SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒购自 Clontech 公司, PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase、Advantage 2 Polymerase Mix 等均由该试剂盒提供。6 碱基随机引物、载体引物 M13(-47)、M13(-48) 和 UNIQ-10 柱式胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司, 各类 PCR 引物也均由该公司合成。

#### 1.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成

解剖刺参, 取生长期精巢, 按修改后的酚-氯仿

收稿日期: 2007-08-31; 修订日期: 2007-11-06.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30571417); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 ((2006AA10A411); 留学回国人员科研启动资金资助。

作者简介: 隋娟 (1984-), 女, 硕士生, 主要从事海洋动物发育生物学研究. E-mail: [suijuan0313@yahoo.com.cn](mailto:suijuan0313@yahoo.com.cn)

通讯作者: 张志峰. Tel: 0532-82031647; E-mail: [zzfp107@ouc.edu.cn](mailto:zzfp107@ouc.edu.cn)

法提取其总 RNA<sup>[13]</sup>。琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度仪检测 RNA 质量后,参考 M-MLV 反转录酶说明将总 RNA 反转录为 cDNA。

#### 1.4 目的片段的克隆

采用同源克隆策略,根据已报道的果蝇、牡蛎、斑马鱼、非洲爪蟾以及小鼠的 *vasa* 基因 cDNA 序列,选择保守性高的位点设计引物 VF1、VR1(表 1),以精巢 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因片段。20  $\mu$ L PCR 反应体系包括:精巢 cDNA 模板 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 2  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.6  $\mu$ L, 2  $\mu$ mol/L 正向引物 VF1 2  $\mu$ L, 2  $\mu$ mol/L 反向引物 VR1 2  $\mu$ L, RF 水 10.2  $\mu$ L, *rTaq* DNA 聚合酶 0.1  $\mu$ L。PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 56  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测回收后,连接到 pMD18-T 载体中,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。挑取阳性克隆进行测序(上海博亚公司),并将所得片段序列与 GenBank 中的已知序列作 BLASTx 同源性分析。

#### 1.5 3' 和 5' RACE 扩增

根据已获得的刺参 *vasa* 相关基因的部分 cDNA 片段,分别设计 5' 及 3' RACE 引物 VF2、VR2(表 1)。按照 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒说明,从刺参精巢组织中分别扩增该基因 cDNA 3' 和 5' 端序列。PCR 程序均为:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 67  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 循环 35 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。克隆测序步骤同 1.4。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Sequences of primers

引物 Primer	序列 (5' $\rightarrow$ 3') Sequence (5' $\rightarrow$ 3')
VF1	ATGGCCTGTGCTCAGACGGGG
VR1	GCCCATATCTAGCATTCT
VF2	GGGACGGTCTCCAGAGTAGTGCCTTGA
VR2	AGCCTCGTCCAGCACAAAGGTACTTCACT
VF3	GGTCAGCCAACCGAAGAAAA
VR3	CGTGAACAGAGGGAAAGAGA
18F1	GCAAATGCTTTTCGCTGTCC
18F2	CTCGTAGTCGGATTTCTGG
18F	GAAACGGCTACCATATCCAA
18R	CGGTATCTGATCGCCTTCG

#### 1.6 目的基因的序列和系统进化分析

用 NCBI 中的 BLAST 程序进行序列同源性比对和相似性搜索,以 BLAST 2 软件进行序列拼接获得全长 cDNA 序列;序列分析使用 DNASTar 分析软件,Edit Seq 用于 ORF 分析以及蛋白序列的推测。根据 GenBank 上已注册的 VASA、PL10 及 P68 蛋白质的氨基酸全长序列,选择 30 个典型的 DEAD-box 家族成员蛋白,涉及 VASA、PL10 和 P68 三个亚家族,采用多序列比对软件 Clustal X 1.83 程序和进化树构建软件 Mega3.1,以邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建进化树。1000 次自举 (Bootstrap) 分析计算各节点支持率。

#### 1.7 蛋白质三维结构预测

以果蝇 VASA (PDB code: 2db3A) 的三维结构为模板,利用 Swiss-Model3.5 软件,以同源建模法进行刺参 VASA 蛋白三维结构预测,得到的三维构象用 Swiss-Pdb Viewer 和 PyMOL0.99 软件观察分析。

#### 1.8 半定量 RT-PCR 分析

**1.8.1 18S rRNA 部分 cDNA 序列的获得** 取 2  $\mu$ g 生长期精巢总 RNA,加入 6 碱基随机引物,终浓度 90 pmol/L,反转录以获得总 cDNA,具体方法参考 M-MLV 反转录酶说明。采用同源克隆策略,根据已报道的人、小鼠、斑马鱼、海胆的 18S rRNA cDNA 序列,设计引物 18F、18R(表 1),以刺参生长期精巢总 cDNA 为模板,PCR 扩增 18S rRNA cDNA 片段,步骤同 1.4。

**1.8.2 半定量 RT-PCR** 解剖健康成体,取其呼吸树、消化道、卵巢、精巢 4 种组织,按照 1.3 方法提取总 RNA,加入 6 碱基随机引物,终浓度 90 pmol/L,反转录以获得总 cDNA。根据已获得的 *vasa* 全长 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物 VF3、VR3(表 1),PCR 产物预计长度为 556 bp。根据已获得的 18S rRNA 部分序列设计内参引物 18F1、18F2 作对照分析,检测 *vasa* mRNA 组织分布情况。PCR 产物预计长度为 369 bp。PCR 反应条件为:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 循环 29 次; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。电泳检测和紫外凝胶分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 全长 cDNA 序列的获得

扩增产物经纯化、克隆、测序和片段拼接,得到的序列总长度为 2 167 bp (GenBank 注册号为

EU273885), 其中开放阅读框 (ORF) 1 593 bp, 编码 530 个氨基酸。5' 非翻译区 (UTR) 为 449 bp, 3' UTR 为 125 bp, 含有 29 个碱基的 poly (A) 尾 (图 1)。推导的氨基酸序列具有 DEAD-box 家族蛋白的全部 9 个保守结构域: xYxxPTPVQ(Q 框)、AQTGSGKT(motif I)、PTREL(motif Ia)、TPGR(motif Ib)、DEAD(motif II)、SAT(motif

III)、LVFTE(motif IV)、ASRGLD(motif V) 和 HRIGRTGR(motif VI) 以及 GG 重复序列。同时在该基因的蛋白序列中还发现了 ARKF 框, 该框只在 DEAD-box 家族 VASA 和 PL10 蛋白中保守存在, 而在其他亚家族中并未发现<sup>[14]</sup>。笔者将其定名为 *Aj-vasa*。



图 1 刺参 *Aj-vasa* 全长 cDNA 核酸序列及其编码的氨基酸序列

cDNA 顺序为 5' -3'; 箭头分别为 5'、3' RACE 引物位置; 起始密码子 ATG、终止密码子 TAA 显示为加粗字符; DEAD-box 家族蛋白的 9 个保守结构域和 GG 重复序列用黑框标出, ARKF 框用下划线标出, 阴影部分表示 PCR 扩增片段序列。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Aj-vasa* full-length cDNA from *Ajajaponicus*

cDNA is listed from 5' to 3'; RACE primers are represented by arrowheads. The suggested start codon ATG and stop codon TAA are indicated in bold letters. The nine well-conserved motifs of the DEAD-box protein family are boxed in black; ARKF box is underlined; DNA fragment amplified by PCR is shaded.

2.2 序列比对及系统进化分析

通过 NCBI 的 Blast x 同源相似性搜索发现: *Aj-vasa* 与紫球海胆 (*S. purpuratus*), 太平洋牡蛎 (*C. gigas*), 紫拟菊海鞘 (*Botrylloides violaceus*), 沙蚕 (*P. dumerilii*), 斑马鱼 (*B. rerio*) 的 *vasa* 基因具有较高的相似性, 相似度分别为 65%、62%、

62%、58%、59%。

从构建的 NJ 进化树可见, 本研究中克隆得到的 *Aj-VASA* 先与棘皮动物紫球海胆 (*S. purpuratus*) 的 VASA 蛋白聚类, 然后再与其他物种 VASA 亚家族蛋白相聚类 (图 2)。

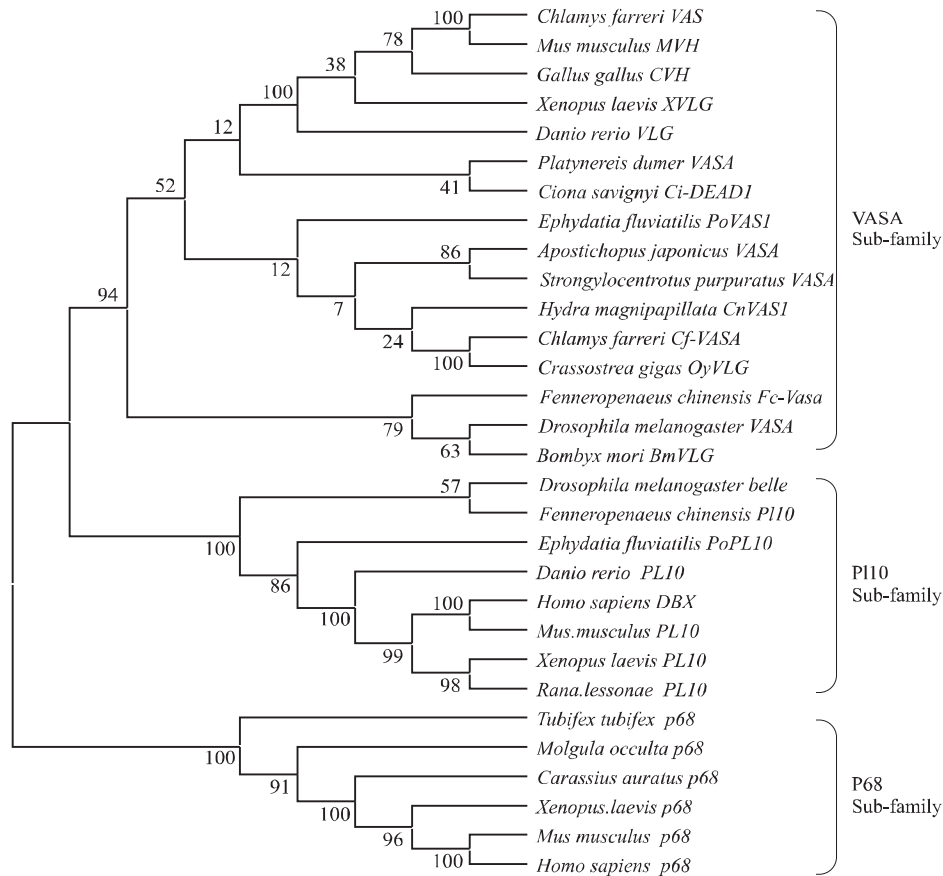


图2 DEAD-box 家族蛋白的系统发生分析

数字代表各分支的置信度

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the DEAD-box family proteins

Numbers indicate the confidence levels of each embranohment

*Homo sapiens* 人; *Mus musculus* 小白鼠; *Gallus gallus* 红原鸡; *Xenopus laevis* 非洲爪蟾; *Danio rerio* 斑马鱼; *Platynereis dumerili* 沙蚕; *Ciona savignyi* 海鞘; *Ephydatia fluviatilis* 海绵; *Apostichopus japonicus* 刺参; *Strongylocentrotus purpuratus* 紫球海胆; *Hydra magnipapillata* 水螅; *Chlamys farreri* 栉孔扇贝; *Crassostrea gigas* 太平洋牡蛎; *Fenneropenaeus chinensis* 中国明对虾; *Drosophila melanogaster* 黑腹果蝇; *Bombyx mori* 家蚕; *Rana lessonae* 莱桑池蛙; *Tubifex tubifex* 正颤蚓; *Molgula occulta* 皮海鞘; *Carassius auratus* 鲫鱼.

### 2.3 蛋白三维结构特征

采用 Swiss-Model 服务器的同源建模方法, 预测的 Aj-VASA 蛋白三维结构模型如图 3 所示。该蛋白的中心结构区分别由两个相互联系的球形结构—RecA-like 结构组成, 每个 RecA-like 结构由一组  $\alpha$  螺旋围绕着一组平行的  $\beta$  折叠构成。N 端 RecA-like 结构包括 DEAD-box 家族保

守结构域中的 Q(xYxxPTPVQ), I(AQTGSGKT), Ia(PTRELA), Ib(TPGRI), II(DEAD), III(SAT) 和 GG doublet, 剩下的 3 个保守域 IV(LVFVE), V(RGLD), VI(HRIGRTGR), 则位于 C 端球形 RecA-like 结构中, 这与已知的 DEAD-box 家族蛋白三维构象是十分相似的。

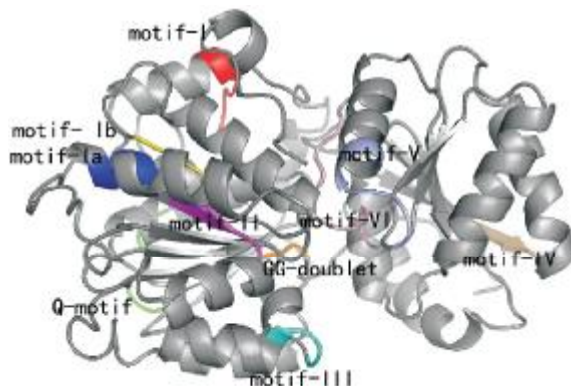


图3 Aj-VASA 蛋白三维结构图

每个保守结构域都用不同颜色标出: Q-motif 绿色, motif I 红色, motif Ia 蓝色, motif Ib 黄色, motif II 桃红色, motif III 青色, motif IV 灰粉色, motif V 浅紫色, motif VI 浅粉色, GG doublet 橙色。

Fig. 3 Three-dimensional structure models of Aj-VASA. Every conserved motif is indicated as follows: Q-motif, green; motif I, red; motif Ia, blue; motif Ib, yellow; motif II, magenta; motif III, cyan; motif IV, light orange; motif V, light purple; motif VI, light pink; GG doublet, orange.

## 2.4 *Aj-vasa* mRNA在不同组织中的半定量RT-PCR表达分析

半定量 RT-PCR 结果显示 (图 4), *Aj-vasa* mRNA 在卵巢和精巢中存在较高水平的表达。但在呼吸树和消化道中则几乎检测不到 *Aj-vasa* 转录本的存在。

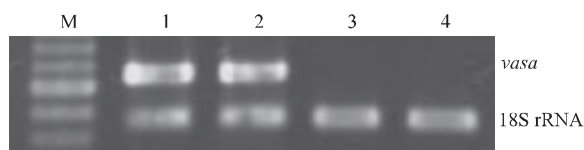


图4 RT-PCR 检测 *Aj-vasa* mRNA 的组织分布

1: 卵巢; 2: 精巢; 3: 呼吸树; 4: 消化道。

Fig. 4 Tissue distribution of *Aj-vasa* mRNA by RT-PCR

1: ovary; 2: testis; 3: respiratory tree; 4: alimentary tract.

## 3 讨论

本研究以 SMART RACE 技术扩增得到了 *Aj-vasa* 基因的全长 cDNA 序列。经同源比对分析, 本实验所得到的基因编码的蛋白质与其他物种的 VASA 相关蛋白序列具有较高的相似性; 系统进化树分析结果显示, 该基因编码的蛋白序列属于

VASA 亚家族蛋白, 而与 DEAD-box 其他亚家族蛋白 (如 PL10, P68) 亲缘关系较远。上述分析验证均表明本实验已成功克隆了刺参 DEAD-box 家族中的 *Aj-vasa* 全长 cDNA。

许多昆虫和脊索动物 VASA 相关蛋白的 N 端区域普遍存在 RGG 重复区<sup>[15]</sup>, 然而本实验在 *Aj-VASA* 序列的 N 端未发现该重复区。该重复区具有 RNA 结合功能<sup>[16]</sup>。在本研究中可见, RGG 重复区在 *Aj-VASA* 中并非必需, 此功能可由不同保守域在空间相互作用来实现<sup>[17]</sup>。*Aj-VASA* C 末端最后 9 个氨基酸中有 5 个为酸性氨基酸残基 (谷氨酸 Glutamate E 和天门冬氨酸 Aspartate D), C 末端多个酸性氨基酸普遍存在于许多单链核酸结合蛋白中, 这些特征均符合 VASA 亚家族蛋白序列特征<sup>[8]</sup>。切除爪蟾 *An3* 基因 (一个与 VASA 同属 DEAD-box 家族 PL10 亚家族基因) N 端 133 个氨基酸对该蛋白 ATP 酶活性没有影响, 而 C 末端序列切除将显著减少酶活性<sup>[18]</sup>。这也提示 DEAD-box 家族蛋白 C 末端相对保守的序列对蛋白功能的保持与 N 末端相比可能具有更为重要的作用。此外, 对 *Aj-vasa* 的核苷酸序列分析发现, 其 3' 末端未出现典型的 aataaa 末端加尾信号。

本实验半定量 RT-PCR 结果显示, *Aj-vasa* mRNA 仅在雌雄生殖腺中表达, 这一结果暗示 *Aj-vasa* mRNA 与绝大多数物种 *vasa* mRNA 在生殖细胞系中特异性表达相一致。因此, *Aj-vasa* 有望作为有效的标记分子来追踪刺参原生殖细胞的起源、迁移以及生殖腺的发生和分化等, 为揭示刺参生殖细胞发生的分子机制奠定基础。

## 参考文献:

- [1] Schupbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo[J]. Roux' s Arch Dev Biol, 1986, 195: 320-317.
- [2] Roussell D L, Bennett K L. Glh-1, a germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 9 300-9 304.
- [3] Komiya T, Itoh K, Ikenishi K, et al. Isolation and characterization of a novel gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells of *Xenopus laevis*[J]. Dev Biol, 1994, 162: 354-363.
- [4] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, et al. Isolation of a

- DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 1 2258-1 2262.
- [ 5 ] Olsen L C, Aasland R, Fjose A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells[J]. Mech Dev, 1997, 66: 95-105.
- [ 6 ] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. 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[J]. Development, 1997, 124: 3 157-3 166.
- [ 7 ] Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, et al. Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development[J]. Mech Develop, 2000, 93: 139-149.
- [ 8 ] Fabioux C, Stéphane P, Frédérique L R, et al. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 315: 897-904.
- [ 9 ] Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing *VASA* as a marker[J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5: 669-678.
- [10] Xu H Y, Gui J F, Hong Y H. Isolation and characterization of a *vasa* gene in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Dev Dynam, 2005, 233: 872-882.
- [11] Rebscher N, Zelada-Gonzalez F, Banisch T U, et al. *Vasa* unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*[J]. Dev Biol, 2007, 306: 599-611.
- [12] Juliano C E, Voronina E, Stack C, et al. Germ line determinants are not localized early in sea urchin development, but do accumulate in the small micromere lineage[J]. Dev Biol, 2006, 300: 406-415.
- [13] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南: 第三版 [M]. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 518-531.
- [14] Chang C C, Dearden P, Akam M. Germ Line Development in the Grasshopper *Schistocerca gregaria*: *vasa* as a Marker[J]. Dev Biol, 2002, 252(1): 100-118.
- [15] Raz E. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development[J]. Genome Biol, 2000, 1 (3): 1017.1-1017.6.
- [16] Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box[J]. EMBO J, 1992, 11: 2 655-2 664.
- [17] Cordin O, Banroques J, Tanner N K, et al. Patrick Linder. The DEAD-box protein family of RNA helicases[J]. Gene, 2006, 367: 17-37.
- [18] Gururajan R, Weeks D L. An3 protein encoded by a localized maternal mRNA in *Xenopus laevis* is an ATPase with substrate-specific RNA helicase activity[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1 350 (2): 169-182.

## Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in *Apostichopus japonicus* and its expression in tissues

SUI Juan, ZHANG Zhi-feng, SHAO Ming-yu, HU Jing-jie

(Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The *vasa* gene encodes an ATP-dependent RNA helicase protein member of the DEAD-box family. The *vasa* mRNA is initially found as a component of germ plasm in *Drosophila* and specifically expressed in the germ cell lineage during its germline differentiation. Subsequently, *vasa* gene has been found to be only limited in the germ cell lineage in many metazoans except for *Hydra* and planarian. Up to now, *vasa* gene has been extensively used as a specific molecular marker of germ-line cells and played an important role in the research of gametogenesis and reproductive regulation. Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) is one of the most commercially important Echinodermata in China. To detect whether *vasa* gene is specifically expressed in the germ cell lineage in sea cucumber is very important for the development of further investigation on the germline origin and differentiation in sea cucumber.

In this study, full-length cDNA sequence of *Aj-vasa* was cloned from testes of sea cucumber, *A. japonicus*, by Rapid Amplification of cDNA End (RACE) methods. The full length of *Aj-vasa* is 2167 bp, containing a 3' untranslated region (UTR) of 449 bp, a 5' UTR of 125 bp, and an open reading frame (ORF) of 1593 bp, encoding 530 amino acids. The putative amino acid sequence shares all the nine conserved motifs of the DEAD-box family: xYxxPTPVQ, AQTGSGKT, PTRELA, TPGRI, DEAD, SAT, LVFVE, RGLD, HRIGRTGR and GG repeats. While, multiple arginine-glycine-arginine (RGG) repeats existing in the NH<sub>2</sub>-terminal portion in other VASA-related proteins in many insects and chordates, which have the function of RNA-binding, were not found in *Aj-VASA*, implying that its function may be realized by space reactions among different motifs. High identity of VASA in amino acid sequence (more than 58 %) was observed between *A. japonicus* and the other organisms including *Strongylocentrotus purpuratus* through Blast analysis, indicating that the cDNA cloned in this study belonged to the subfamily of VASA. Phylogenetic tree showed that *A. japonicus* was closely related to *S. purpuratus* based on amino acid sequences of VASA. Furthermore, tissue expression of *Aj-vasa* was detected by semi-quantitative RT-PCR, and found it specifically expressed in the adult gonads of both male and female. Therefore, it was deduced primarily that the *Aj-vasa* may be a useful maker for investigating the germline origin and differentiation in sea cucumber *A. japonicus*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 407-413]

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; *vasa*; full-length cDNA; sequence analysis; tissue expression

**Corresponding author:** ZHANG Zhi-feng. E-mail: [zzfp107@ouc.edu.cn](mailto:zzfp107@ouc.edu.cn)