

诸氏鲮虾虎鱼卵黄蛋白原基因全长 cDNA 的克隆及表达

余露军, 蔡 磊, 李 炯, 陈小曲, 陈 琳, 李建军

(广东省实验动物监测所 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663)

摘要: 为了探讨诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)卵黄蛋白原组织分布及 17 β -雌二醇(E₂)暴露对雄性诸氏鲮虾虎鱼 Vg 的影响, 作者采用 RT-PCR、RACE 方法克隆并分析了诸氏鲮虾虎鱼卵黄蛋白原(Vg)基因的全长 cDNA 序列, 并对 Vg 在诸氏鲮虾虎鱼体内的组织表达分布及 E₂ 诱导后不同时间表达规律进行了研究。结果表明: 获得的 Vg cDNA 序列全长 5 067 bp, 开放阅读框(ORF)含 4 992 bp, 编码 1 663 个氨基酸, 含有信号肽、多丝氨酸区域, 推测其编码氨基酸分子量为 186.2 ku, 等电点为 9.31。荧光定量 PCR 结果显示, Vg 在诸氏鲮虾虎鱼肝脏中表达量最高。E₂ 诱导后, 诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg mRNA 的表达量第 1 天达到小高峰, 第 3 天达到高峰, 第 7 天开始明显下降, 第 11 天仍能维持较高水平。本研究成功克隆了诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因全长 cDNA 序列, 诸氏鲮虾虎鱼肝脏是 Vg 主要合成场所, E₂ 诱导雄性诸氏鲮虾虎鱼 Vg 的表达作为生物标志物用于近海环境雌激素类物质的检测具有良好的应用前景。

关键词: 诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*); 卵黄蛋白原; cDNA 全长; 荧光定量 PCR; 17 β -雌二醇

中图分类号: X171; S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)09-0023-09

doi: 10.11759/hyxx 20150201004

卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vg)是几乎所有卵生动物中卵黄蛋白(Vitellins, Vn)的前体^[1], 为雌性动物特有的蛋白, 在雄性动物体内含量极低或完全没有, 但在雌激素类物质的诱导下, 雄性动物也能合成卵黄蛋白原^[2], 这种受雌激素类物质诱导的特性, 使得卵黄蛋白原被广泛地应用于环境内分泌干扰物的毒性评价, 已成为外源雌激素和内分泌干扰物毒理研究的理想生物标志物^[3]。

鱼类是水环境生态链中重要的一环, 是理想的水环境污染生物, 目前已有多种鱼类用于环境雌激素的研究^[4-5], 其中斑马鱼(*Danio rerio*)^[6]、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)^[7]、唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[8]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[9]等多种鱼类实验动物在卵黄蛋白原(Vg)水平开展了相关的研究。河口与近海水域是陆地水流与海洋的交汇处, 也是环境污染物的汇聚地, 但河口鱼类在环境雌激素效应方面的研究较少。诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)属于鲈形目(Perciformes), 虾虎鱼科(Gobiidae), 鲮虾虎鱼属(*Mugilogobius*), 为暖水性底层小型鱼类, 栖息于河口、咸淡水水域中, 具有体形小、适应盐度范围广、对许多毒物敏感性强的特点^[10]。诸氏鲮虾虎鱼作为一种海洋水生实验动物, 已开展海洋污染物的相关毒性评价^[11-12]。本研究以诸氏鲮虾虎鱼为实验材料, 克隆了诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因全长 cDNA 序

列, 并对 Vg 在诸氏鲮虾虎鱼体内的组织分布及雌激素诱导后不同时间表达规律进行了研究, 为诸氏鲮虾虎鱼应用于近海环境雌激素类污染物的监测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验用诸氏鲮虾虎为本实验室内繁殖的子 9 代封闭群(4~5 月龄), 半静态方式养殖, 体长 23~34 mm, 水质条件为盐度 25 $\pm$ 2, 温度(26 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 光周期 14 h : 10 h (光照 : 黑暗)。

1.2 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 全长 cDNA 扩增及序列分析

总 RNA 提取: 取 3 尾雌性诸氏鲮虾虎鱼新鲜肝脏组织并混合, 按 Trizol(Invitrogen)试剂盒说明书提

收稿日期: 2015-02-01; 修回日期: 2015-04-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2013BAK11B902); 广东省科技计划项目(2011B010500021, 2012B040302006)

[Foundation: National Key Technology Support Program (2013BAK11B902); Science and Technology Program of Guangdong Province (2011B010500021, 2012B040302006)]

作者简介: 余露军(1982 年-), 男, 湖南岳阳人, 工程师, 硕士, 主要从事水生实验动物及其病害方面的研究, 电话: 020-84106815, E-mail: ljyu1212@163.com; 李建军, 通信作者, E-mail: lijianjun1125@126.com

取总 RNA, 超微量分光光度计(NanoDrop 2000C, Thermo Scientific)测定 RNA 纯度和浓度, 计算加入的 RNA 样本量(Total RNA 400 ng), 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit(TaKaRa)试剂盒说明书进行反转录合成第一链 cDNA。

Vg cDNA 克隆: 根据 GenBank 中已知鱼类黄鳍刺虾虎鱼 (*Acanthogobius flavimanus*)(AB088473.1)Vg-530

cDNA 序列, 合成 1 对引物 PVg(表 1)。以第一链 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 根据获得的 Vg 基因片段分别设计 5'RACE 下游巢式引物 5'GSP 外侧和 5'GSP 内侧、3'RACE 上游巢式引物 3'GSP 外侧和 3'GSP 内侧(表 1), PCR 扩增方法参照刘春等^[13]的方法进行, PCR 产物经胶回收 (Omega) 纯化后与 pMD-19T 载体(Takara) 连接, 挑取阳性克隆送上海生工测序。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
PVg	GATAGGACCACCAAGATGAAGCG	ATTGTTGACGAGAACTCATGCG
5'GSP 外侧	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	CACTCCCATCACAGCAAACG
5'GSP 内侧	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	AGCGGCAGTGGGCATAATAC
3'GSP 外侧	CAGGACAAGCCCATTACCAG	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3'GSP 内侧	TAGCAGCAGACACCAACAAC	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
RT-Vg	AATGCCATGTTCTCCTCAGCGA	TCAGCTTCTCTGCACCCTTG
RT-act	GGAAGGTGGACAGAGAAGCC	TGCTGACAGGATGCAGAAGG

序列分析: 测序获得的序列用 DNASTar7.1 分析软件进行全长拼接, 在 GenBank 数据库与已知鱼类 Vg 氨基酸序列进行同源性比较分析, 用 MEGA4.0 软件构建系统发育进化树。采用在线翻译工具(<http://www.expasy.ch>) 对序列进行翻译和蛋白质组分析^[14]。

1.3 诸氏鲮虾虎鱼不同组织器官中 Vg 的表达

随机挑选 3 尾雌性诸氏鲮虾虎鱼(4~5 月龄), 分别取肝、脾、肠、鳃、肌肉、脑、卵巢组织, 取 3 个平行样品, 按 1.2 中的方法进行总 RNA 提取和反转录合成第一链 cDNA。

根据诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因 cDNA 序列, 用 Primer Premier5.0 设计荧光定量检测引物 RT-Vg 和内参基因 β -actin 的引物 RT-act(表 1), 采用荧光定量 PCR 技术(ABI 7500)对诸氏鲮虾虎鱼肝、脾、肠、鳃、肌肉、脑、卵巢组织($n=3$)中的 Vg 表达情况进行检测, 并以 β -actin 为内参基因对数据进行分析^[13]。实验数据采用 spss17.0 软件进行显著性差异分析, excel 软件作图。

1.4 雌激素诱导不同时间诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg 的表达

挑选已具备性特征的雄性诸氏鲮虾虎鱼(4~5 月龄)暴露于 100 $\mu\text{g/L}$ 的 β -雌二醇^[13](溶解于无水乙醇), 每组 20 尾, 每组 3 个平行, 同时设置海水对照组, 对

照组加入同样浓度的无水乙醇(终浓度<0.01%)。暴露时间为 11 d, 每天更换一次试液。每天投喂适量卤虫 (*Artemia nauplii*)无节幼体, 分别在 1、3、5、7、9、11 d 取 3 尾鱼肝脏组织混合, 冻存于液氮中。

按 1.2 中的方法对上述样品进行总 RNA 提取和反转录合成 cDNA 模板, 采用荧光定量 PCR 技术对雌激素诱导后诸氏鲮虾虎鱼肝脏中的 Vg 进行检测, 检测方法和数据分析同 1.3。

2 结果

2.1 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因 cDNA 序列扩增及结构分析

用 DNASTar 软件对 PCR 扩增获得的诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因核心片段、3'端、5'端序列片段进行拼接, 获得诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因的全长 cDNA 序列。该序列全长 5067 bp, 包含起始密码子 ATG、终止密码子 TAG 及加尾信号 AATAAA, 在 GenBank 库中的登录号为 KP162167。鲮虾虎鱼卵黄蛋白原基因 cDNA 序列含有一个完整的开放阅读框(ORF), 编码 1663 个氨基酸, N-端的前 15 个氨基酸为信号肽, 有 4 个糖基化位点, 其中 2 个可能是有效的糖基化位点在 112~114, 1133~1135。序列还含有一个多聚丝氨酸区(氨基酸位点在 1088~1187)。根据推算, 其编码的蛋白分子量为 186.2 ku, 等电点为 9.31。该基因的核苷酸序列及编码的氨基酸序列如图 1。

2.2 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因氨基酸同源性 比对及系统进化树分析

诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因编码的氨基酸序列在

GenBank 数据库中进行检索、比对, 结果显示与同属于
虾虎鱼科的黄鳍刺虾虎鱼(BAC06190.1)、矛尾刺虾虎
鱼(AAV84912.1)同源性最高, 均为 73%, 与小长臂

信号肽 Signal peptide

```

M R V V V L A L A L A L V A G D H Q N L A P N F A P G N T Y
ATGAGAGTCGTTGTACTGGCCCTGGCACTGGCCCTCGTGGCTGGTACCACCAAAACCTGGCTCCTAATTTTGCTCCTGGAACACAGTAT 90
V Y D Y E A N I M G G L S E Q R L A R A G L K L S S K V K I
GTGTACGATTACGAGGCCAACATAATGGGAGGTCTGTCTGAGCAGCGCCTAGCCAGAGCTGGGCTCAAACCTCTCCAGCAAAGTCAAAATT 180
S V A Q E N I L L L Q L E N P Q I F E Y S D V W P K D S F S
AGTGTGGCCCAAGAAAACATCCTCCTGCTTCAGCTTGAGAACCTCAGATCTTTGAGTACAGTGATGTTTGGCCAAAAGATTCTTTTCAGC 270
R I H L S A D L E S Y L K T P I K F E Y K N G T V R H I L A
CGAATTCACCTGAGCGCAGATCTGGAAAGTTACCTCAAACCCCTATCAAGTTTGAGTACAAAAATGGGACTGTGAGACACATTCGTGGCA 360
P Q N V P A Q V V N I Q K G V I N I F Q L N I K K K Q N I Y
CCTCAGAATGTCCCTGCACAGGTCTGCAACATCAAAAAGGTGTCTCAACATCTTCCAGCTGAACATCAAAAAGAAACAGAACATCTAT 450
E L Q E E G T Q G V C K T Q Y A I V E N E H T E R I L L T K
GAAGTGCAGGAGGAAGGAACCCAGGGTGTGTGCAAGACCCAGTATGCCATCGTAGAGAACGAACACACTGAGCGTATCCTTTTGACCAAG 540
S R N L N H C Q E K V I R D I G L A Y T K T S H K E D Y K S
AGCAGGAATCTGAACCTGCCAGGAGAAGGTACATAGGGACATCGGGTTGGCATACACTAAGACATCTCACAAGGAGGACTATAAGAGC 630
L R G T T G Y T Y K L K P V P G G A L I L E A Y G N E V I Q
CTGAGAGGAACCACTGGATACCTACAAATTGAAGCCAGTCCCAGGCGGTGCTCTCATCCTGGAGGCATATGGAATGAAGTTATTTCAG 720
F T P F N E L N G A A S M Q T K Q K L V F S Q V E S T P I A
TTCACACCTTTTAATGAGCTGAATGGTGTGCTGCTCCTCATGCACTAAACAAAACTGGTCTTCAGCCAGGTTGAAAGCACTCCTATTGCC 810
P V S A E Y H S R G S L K Y E F S T E V K H N P T R I F D M
CCTGTCACTGTGAATACCATCTCGCGGTCTTTTGAATATGAATTCNCACTGAGGTTAAACACAATCTACCAGGATCTTTGACATC 900
T D V R K Q I P E I L N H L V C N N R D K V H E D A P I K F
ACAGAGCTGAGGAACAGCTCCTGAGATCCTGAACCACTGGTCGCTAATAACAGAGACAAAGTACATGAGGATGCTCCTATTAATTT 990
L E L I E L L R F S N I A E L R S L L T T H S T S A E K R Q
TTGGAGCTGATCGAGCTGTTGCGTTTTTCAAATATTGCTGAACCTGCGTTCCCTATTGACAACCCATAGCACATCTGCTGAGAAGCGACAG 1080
W L M D A L P Y V G T K D A F E V S M E K I L R R E L S V P
TGTTGATGGATGCCCTTCCATACGTTGGAACAAAGGATGCTTTTGAGGTTTCCATGGAAAAGATTCTGAGGAGGGAGCTGTCTGTTC 1170
E A T Q I L L Q S L H Q L E A K S E N I Q E V W S Y I E R L
GAAGCCACTCAAATCTGTCTCAGTCTGTGCACAGCTGGAGGCAAGAGTGAGAACATCCAGGAGGTTTGGAGCTACATTGAGAGACTC 1260
S Q K Q E T F E Q L V R K A L Y L G Y G S M I H R H C A D K
TCACAGAAACAAGAAACCTTTGAACAACCTGTGCGCAAGGCTTTGTACCTTGGCTACGGCAGCATGATCCACAGACACTGTGCTGATAAA 1350
P E C P N Q D I L R I Q T H L E K A I D D E N T E E L V L L
CCTGAGTGTCCCAATCAAGACATCTGCGCATCCAGACGCACTTAGAAAAGGCCATTGATGATGAAAACACAGAAGAAGCTTGTCTGTTG 1440
A K V M A N A A H P S S I K A I T K L L P I Y G F S S K K Q
GCCAAGGTTATGGCTAATGCTGTCTATCCTTCAAGCATCAAAGCTACCAAGCTTTTGCCAATTTATGGCTTTAGTAGTAAGAAGCAA 1530
P S R V E A I V L A L R G I A K L R A K E V A L Q
CCCTCTGAAAGAGTTCAAGTTGAGCCATCCTGGCCCTGAGAGGCATCGCCAAACTGAGGGCTAAAGAGGTCAGAACCTCGCTCTGCGAG 1620
L Y M D K T L K P E Q R M L A V M V L F E T K P S M A A V A
CTATACATGGACAAAACGCTGAAGCCCGAGCAGCGTATGCTGTCTGTCATGGTGTCTTTGAGACCAAGCCTTCAATGGCTGCAGTGGCT 1710
N V V N V L K Y D P S L P V S S F T Y S L I K S L S R S M D
AATGTTGTAAACGTTCTCAAGTATGATCCTAGCCTACCAGTGTCAAGCTTCACATACTCTCTCATCAAGTCTCTGTCCAGAAGCATGGAT 1800
A S V A S V S S V A L R L L G Q R R P S I K L S R A L H A D
GCCTCAGTGGCTTCTGTGTCCAGTGTGCTTAAGACTCTTGGGCCAAAGAGACCAAGCATAAAGCTAAGCAGAGCTTTCATGTCAGAC 1890
Y Y N H P L M L G A A A S I Y Y I N D A A S I L P K T V V A
TACTACAATCATCCTCTGATGCTTGGTGTGCTGCAAGTATTTATTACATCAACGACGCTGCATCTATTCTCCCCAAAACCTGTTGTAGCA 1980
K T S A F F A G A A A D V F E I G V R S E G L H E L F Q K K
AAGACCAGTGCCTTCTTTGCTGGAGCTGCAGCTGATGTTTTGAGATAGGAGTTAGAAGTGAGGGACTCCATGAGCTTTTCCAGAAAAA 2070
E L S D D S D R I T K M K R I L K T L S N W K S M S T S K M
GAAGTCTCTGATGACTCTGACAGAATCACCAGATGAAGCGCATCTAAACCTCTCTCAACTGGAAATCTATGTCAACCCAGAAAAATG 2160
L A S S Y I K V L G Q E V A F V D I D K Q L I E A I K L S
CTGGCCTCTTCTACATCAAGGTTCTGGGACAGGAAGTGCCTTTTGTGACATTGACAAGCAGCTAATTGAGGAGGCAATTAAGCTTTCC 2250
S E I N I K E N G M Q V L R H L F L N G L S A R F V K A M L
TCTGAGATCAATATCAAGGAGAATGGCATGCAGGTGCTCCGCCACTGTGTTCTTAATGGTTTATCCGCGCGCTTTGTCAAGGCAATGTTG 2340
P S E I R R I M P T A A G L P M E L A L Y T V A V T V A D V
CCTTCTGAAATCAGGCGTATTATGCCCACTGCCGCTGGTCTGCCAATGGAGCTTGCTCTCTACACTGTTGCTGTCACTGTAGCAGATGTC 2430
H A K F Q A S L P Q A N F H V S D I L N Q K T N I E T E I K P
CAGCCCAAATTCAGGCCAGCTGCCACAGAATTCATGTTTCTGACATCTGAAATCAGAAGACTAACATTGAAACTGAGATCAAGCCA 2520
S I A V N T F A V M G V N T D I A Q V A M V S R A K A K I N
AGCATTGCTGTCAACACGTTTGTGTGATGGGAGTGAACACTGACATTGCTCAGGTTGCCATGGTGTCAAGAGCCAAGGCCAAGATCAAC 2610

```

L P S K I S A S L D F V E N F K I S A L P V S I P E N D A S
 TTGCCAGCAAAATCTCTGCTCTTTGGACTTTGTTGAGAACAACCTTCAAGATCAGCGCTCTGCCCGTCAGCATCCCTGAAAATGATGCA 2700
 V V A D V E T L A I A K H A K R M T P L I P E D I S S H Y S
 GTTTCGCTGATGTTGAGACCCCTGGCCATTGCAAAACACGCCAAAAGGATGACTCCTCTGATTCTCTGAGGACATTTCACTCCACTATTCA 2790
 G S S S S H S S K Q V Q D N V Q V Q D K P I T R S R T P
 GGATCTTCTACTTCTCACTCCTCTCATTTCTAAGCAGGTGCAAGATAATGTGCAAGTTCAGGACAAGCCCATACCAGGAGCCGAACCTCT 2880
 R H D K K F C T E T M G L R S C L S V S S H N A M F L S D S
 CGACATGACAAGAAGTTCTGCACTGAGACTATGGGACTGAGAAGCTGCCTCAGTGTCACTCTCACAAATGCCATGTTCTCTCAGCGATTCT 2970
 I L N R L I G K H R I C L S L H Q S E R E V V E K W E M E L
 ATTCTCAACAGACTGATTGAAAAGCATCGTATCTGTCTCTCTTCCACCAGTCCGAAAGGGGAAGTTGTTGAGAAGTGGGAAATGGAACCT 3060
 Q I G P K G A E K L I K S I N L N M E E I P D G T P I L S K
 CAGATTGGGCCCAAGGTCGACAGAAAGCTGATCAAGAGCATCAACTTGAACATGGAGGAGATCCCCGATGGCAGCACTATTCTGTCTCCAA 3150
 多聚丝氨酸区域 Polyserine domain
 L K R I L T P G L K K Y | T S S S S S S S S S S S S S S S R H R N S R
 CTCAAGAGAATCTGACTCCAGGTCTGAAAAAATACACCTCGTCCAGCTCATCCAGCTCATCCAGCAGCTCCAGGCATCGCAACAGTCGC 3240
 Q S S S S S S K S H I A G K V I S A M G K I M G G K H K S S S
 CAGTCTCTTTCATCATCCAAGTCTCACATTGCTGGCAAAGTCATCAGTGCCATGGGCAAGATTATGGGGGGCAAGCACAAAGAGCAGCAGC 3330
 S S S S S S S S R S S S S S S R H Q Q R Q Q R R N K S T V S S L
 AGCAGCAGCAGCAGCAGTAGCAGAAAGCAGCAGTAGCAGCAGCAACCAACGCAACCAACGCAAGCAAGTCCACTGTGTCCAGCC 3420
 S S L F S A S S S S S S S S S S S I H K S Q R M S S R A K F Q P G
 TTCCTCTCTTTTCAGCGCAAGCTCCAGCTCTAGCTCTTCTGAGTCCATTACAAATCTCAGCGCATGAGTTCTCGCGCCAAATTTCAACCA 3510
 N H Q K K T S K H H S R S H S S G R S L E D I R A Q N K F L
 AACCACCAGAAGAAGACATCTAAGCATCACTCAAGATCTCACTCATCTGGAAGAAGCTTGGAGGACATCAGAGCACAGAACAAATTTCTT 3600
 G D S V P P V F V L I F R A V R A N N K P L G Y Q I A A Y E
 GGCATTCACTTCCCCAGTTTTTTGTACTGATCTTCCGTGCTGTCAAGACTAACAACAAGCCACTGGGCTACCAGATCGCTGCCTATGAA 3690
 D R Q N N R I Q I I M A A L D S E D N W R F C A D A M E L S
 GACAGACAGAAACAAGAATTACAGATTATCATGGCTGCCCTGGATTCTGAGGACAACCTGGAGGTTCTGTGCCGATGCTATGGAACCTAGC 3780
 K N K V A A K I S W G E K C R T Y D T M I T A E T G L V Q N
 AAGAACAAGTTGCTGCTAAAATTTCTTGGGGAGAAAAGTGCAGGACTTATGACACCATGATCACAGCAGAGACAGGCCTGGTCCAGAAC 3870
 K M A A R I R V A W K R L P S S V T K H A K M I Y Q R I L A
 AAGATGGCAGCTCGCATCAGAGTGGCTTGAAGAGACTGCCCTCTTCTGTTACCAAAACATGCCAAATGATCTATCAGCGCATCCTTGCC 3960
 S Y L S S V S K Q K R S D V T K Q I S L T A V V E S E K L V
 TCTTACTTGTCCAGTGCTCTAAGCAAAAGAGATCAGATGTGACGAAGCAGATTCCCTCACC CGGTTGTTGTAATCCGAGAAATGGTC 4050
 N V I L K T S P A A I Y K R N V A L P V S L P I H S L N D Q L
 AATGTTATTCTCAAATCACCAGCAGCTATCTACAAGCGTAATGTGGCTCTCCCTGTGAGTCTGCCAATCCATTCTCTGAACGATCAGCTG 4140
 P Y N D V H N N L H Y L L E K T T G P I C R F E R G Q L T T
 CCCTATAATGACGTGCATAAACCTTCACTATCTGTTGGAAAAGACTACTGGACCTATTTCAGATTGAAAGAGGACAGCTGACCACT 4230
 F S N K R Y E N Y M P D S C F Q V L A Q D C T S S L N F I V
 TTCAGCAACAAGAGATACGAGAAGTCAATGCCAGATTCTTGCTTCCAGGTGCTGGCTCAAGATTGCACTAGCTCACTCAATTTTATTGTT 4320
 L L K K D S N R Y E I N A K I G R D W D I D M R Y N E E R
 TTGCTGAAGAAGGATGCTCAAAACCGTTATGAGATCAATGCAAGATTGGTAGAGATTGGGACATTGACATCGCCTATAACGAAGAAGA 4410
 P T V T I N G Q E I A R E S L P Y N K D S F K I E L K N S N
 CCAACTGTTACCATCAACGGACAGGAGATTGCCAGAGAAAAGCTTGCCATACAACAAGATTCAATTAAGATCGAGCTGAAAAACAGTAAC 4500
 K L V L Y A K E F G I T E L N F S N M E V E L H I L N D Y R
 AAGCTGGTTCTCTACGCTAAGGAGTTTGGTATCACTGAACCTGAACCTCAGCAACATGGAAGTAGAGCTCCATATTCTTAACGATTATAGA 4590
 N R V C G L C T G G Q A N G D K R N D L R M P N G N L N D N P V
 AACAGAGTGTTGGTCTCTGTGGCAAGCCAATGGAGATAAGAGAAATGATGTGCGCATGCCAATGGCAACCTCAATGACAACCCCTGTG 4680
 S F V S S W T L P S Q S C S D E T G C R L R H E S V E L E R
 AGCTTTGTGAGCTCCTGGACTTTGCCCTCCAGAGCTGCAGCGATGAGACTGGTTGCCGTTTGAGGCACGAGTCTGTTGAACTGGAGAGA 4770
 V I N V H G V E S K C E S K D P V L R C R R G C T P T K T R
 GTCATAACGTTTCATGGTGTGGAGTCTAAATGTGAGTCTAAGGACCTGTGCTGCGCTGTAGACGTGGCTGCACCCCACTAAGACCCGT 4860
 M V S V G F H C K P V A D S Q V S K S H E S S I D I T E S V
 ATGGTCAGTGTGGGCTTCCACTGCAAAACCCGTCGCTGACAGCCAAGTCTCAAAGAGCCATGAGAGCAGCATCGACATCACTGAATCTGTG 4950
 E S H E C S C S S QCA*
 GAATCCCATGAAGAATGCAGTTGCTCTTCTCAGTGGCTTAGACTCTTCACTTTTTTATGCTGTGTGTAATCTTACTAAATAAATAAA 5040
 GGCATCTCAAAAGACAAAAAATAA

图1 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Mugilogobius chulae*'s Vg

信号肽位置用水平线标出, 阴影部分为多聚丝氨酸区域, 黑色框为加尾信号

The signal peptide site of vitellogenin is marked by the horizontal line, polyserine domain is indicated by shading, polyadenylation signal is indicated by black border

虾虎鱼(AGO64301.1)、北方蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*) (ACX32463.1)、金头鲷(*Sparus aurata*)(CDK37743.1) 氨基酸同源性分别为 59%、52%、50%, 与其他几种 鱼类氨基酸同源性为 47%~43%(表 2)。选取 GenBank

数据库中 15 种硬骨鱼类的 Vg 基因氨基酸序列, 利用 MEGA4.0 软件构建系统进化树, 分子进化分析表明, 诸氏鲯鲨虎鱼与黄鳍刺虾虎鱼、矛尾刺虾虎鱼聚 为一支, 亲缘关系最近(图 2)。

表 2 诸氏鲯鲨虎鱼与其他鱼类 Vg 基因氨基酸同源性比较

Tab. 2 Homology comparison between *Mugilogobius chulae*'s Vg amino acid and those of other fish

物种	登录号	氨基酸同源性(%)	编码多肽的长度(aa)
黄鳍刺虾虎鱼(<i>Acanthogobius flavimanus</i>)	BAC06190.1	73	1664
矛尾刺虾虎鱼(<i>Acanthogobius hasta</i>)	AAV84912.1	73	1665
小长臂虾虎鱼(<i>Pomatoschistus minutes</i>)	AGO64301.1	59	1650
北方蓝鳍金枪鱼(<i>Thunnus thynnus</i>)	ACX32463.1	52	1715
金头鲷(<i>Sparus aurata</i>)	CDK37743.1	50	1675
美洲条纹狼鲈(<i>Morone saxatilis</i>)	ADZ57172.1	47	1663
海鲈(<i>Dicentrarchus labrax</i>)	AFA26669.1	46	1656
美洲狼鲈(<i>Morone Americana</i>)	AAZ17415.1	46	1667
艾氏异仔鲷(<i>Xenotoca eiseni</i>)	ACI30217.1	45	1679
真鲷(<i>Pagrus major</i>)	BAE43871.1	44	1716
食蚊鱼 <i>Gambusia affinis</i>)	BAD93697.1	44	1695
隆头鱼(<i>Centrolabrus exoletus</i>)	ACK36963.1	44	1640
剑尾鱼(<i>Xiphophorus hellerii</i>)	AFH08752.1	43	1685
斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	NP_001038378.1	43	1631
红纹隆头鱼(<i>Labrus mixtus</i>)	ACK36967.1	43	1644

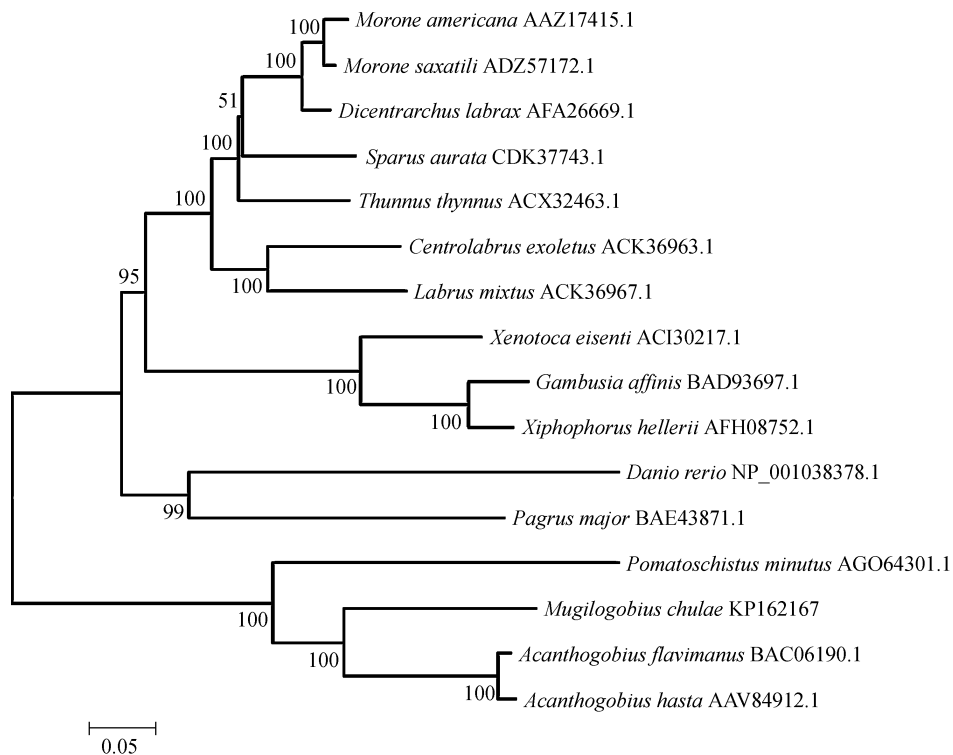


图 2 诸氏鲯鲨虎鱼和其他鱼类 Vg 氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of Vg amino acid sequences in *Mugilogobius chulae* and other fish
节点处数值为自展置信值, 自展重复 1000 次

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1000 repetitions)

2.3 Vg 在诸氏鲮虾虎鱼的组织分布

利用荧光定量 RT-PCR 方法对雌性诸氏鲮虾虎鱼 7 个组织中 Vg 的表达情况结果如图 3 所示。诸氏鲮虾虎鱼 Vg 在肝脏中相对表达量最高,脾、肠中有极微量表达(均小于肝脏表达量的 1%),鳃、脑、肌肉、卵巢中几乎没有检测到表达,肝中的相对表达量显著高于其他各组织中的相对表达量相比($P < 0.01$)。

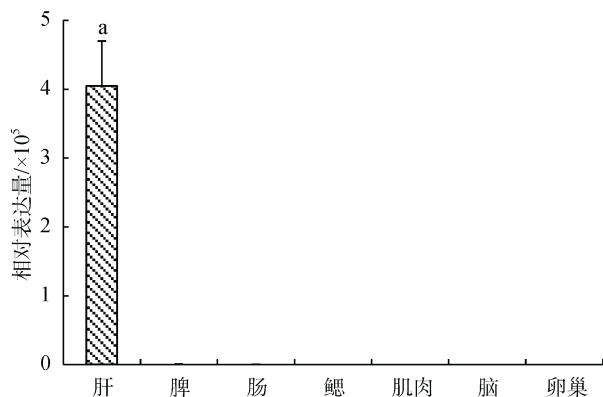


图 3 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 在各组织器官中的相对表达量(a, $P < 0.01$)

Fig. 3 The relative expression levels of *M. chulae*'s Vg in different tissues (a, $P < 0.01$)

2.4 雌激素诱导后诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg 的表达规律

雌激素诱导雄性诸氏鲮虾虎鱼,不同时间肝脏中 Vg 的相对表达结果如图 4。由图可知,在试验期间内, E2 诱导后各时间点诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg 的

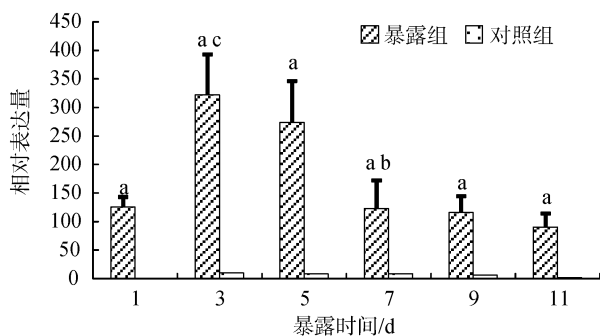


图 4 E2 诱导后诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg 相对表达量

Fig. 4 The relative expression levels of *M. chulae*'s Vg in liver after E2 treatment

a. 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$); b. 与前一时间点相比差异显著($P < 0.05$); c. 与前一时间点相比差异极显著($P < 0.01$)

a. extremely significant difference compared with the control group ($P < 0.01$); b. significant difference compared with the former point ($P < 0.05$); c. extremely significant difference compared with the former point ($P < 0.01$)

相对表达量在雌激素诱导后均显著高于对照组($P < 0.01$); 诸氏鲮虾虎鱼肝脏中 Vg 相对表达量第 1 天即达到小高峰,第 3 天相对表达量显著高于第 1 天相对表达量,达到高峰($P < 0.01$);第 7 天开始明显下降,相对表达量显著低于第 5 天相对表达量($P < 0.05$);至第 11 天仍能维持较高水平,但与第 7 天相比没有显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 诸氏鲮虾虎鱼 Vg 基因结构分析

卵黄蛋白原基因大都起源于一个共同的祖先基因,不同氨基酸功能区域进化速度存在较大差异,既含进化较快的富含丝氨酸区域,也有进化速度极慢的高保守结构区域^[15]。在种间进行系统进化分析时能表现出很高的分辨率,因此可以用于进化关系较近的物种间的系统进化研究^[16]。本实验从雌性诸氏鲮虾虎鱼肝组织中克隆得到 5 067 bp 的 Vg 基因全长 cDNA 序列,该序列 ORF 编码的氨基酸序列与 GenBank 中登陆的 15 种鱼类 Vg 的 ORF 比对,与同属于虾虎鱼科的黄鳍刺虾虎鱼、矛尾刺虾虎鱼同源性最高为 73%,与其他 13 种鱼类同源性为 59%~43%。以扩增得到的诸氏鲮虾虎鱼 Vg 氨基酸序列与 15 种鱼类 Vg 氨基酸序列构建进化树,进行系统进化分析,诸氏鲮虾虎鱼与同为虾虎鱼科的黄鳍刺虾虎鱼、矛尾刺虾虎鱼聚为一支,其亲缘关系较近,上述结果表明,本实验成功克隆了诸氏鲮虾虎鱼 Vg 全长 cDNA 序列。

Vg 基因是由多个基因编码的相关蛋白组成的一个多基因家族,鱼类也被证实存在多种形式的 Vg^[15, 17]。由于 Vg 结构和功能的多样性,目前 Vg 没有统一的命名和分类规则, Hiramatsu 等^[18]根据 Vg 结构氨基酸端脂磷蛋白重链(LvH)-高磷蛋白-脂磷蛋白轻链(LvL)- β 组分-羧基端编码序列(β -c)的区别,将 Vg 分为 VgA、VgB 和 VgC 3 类。在不同种类的鱼类中, Vg 分子结构同样具有多样性,根据卵细胞中降解程度的差异可分为 VgA 和 VgB,但都具有完整的 PV 结构, VgC 结构中则缺乏 PV 结构或 PV 结构较短,分子量也较小^[19]。本研究所得的诸氏鲮虾虎鱼 Vg 序列编码 1663 个氨基酸,明显多于剑尾鱼 VgC(1250 aa)、小长臀虾虎鱼 VgC(1238aa)编码的氨基酸序列,且该序列 ORF 编码的氨基酸序列在 GenBank 中比对结果显示,与其编码的氨基酸序列相似性最高的前 10 种鱼类,除黄鳍刺虾虎鱼、矛尾

刺虾虎鱼 Vg 没有明确分类外, 其余鱼类均为 VgA, 因此所得序列可能为诸氏鲮虾虎鱼 VgA。

3.2 诸氏鲮虾虎鱼 Vg mRNA 表达的组织分布

卵黄蛋白原有内源性卵黄蛋白原合成和外源性卵黄蛋白原合成两种合成方式, 在卵生脊椎动物中, Vg 在肝脏内合成, 通过血液循环运输至卵巢, 最后储存在卵母细胞中为胚胎发育提供能量^[20-21]。目前多数研究认为肝脏是鱼类卵黄蛋白原合成组织, 鱼类主要进行外源性的卵黄蛋白原合成。Yan 等^[22]发现斑马鱼和青鳉 Vg A 基因只在雌鱼肝脏中表达, 在肌肉、肠、卵巢中均无发现。刘春等^[13]研究表明, 肝是剑尾鱼 Vg C 主要合成场所, 表达量最高, 脾、肾、卵巢有微量表达, 脑、肌肉、鳃几乎无表达。本研究用荧光定量 PCR 方法对诸氏鲮虾虎鱼雌鱼 7 个组织器官进行了 Vg mRNA 表达量的检测, 结果显示 Vg mRNA 在肝脏中表达量最高, 脾、肠中有极微量表达 (<1%), 鳃、脑、肌肉、卵巢中几乎没有检测到表达, 表明肝脏是诸氏鲮虾虎鱼 Vg 合成的主要场所。

3.3 雌二醇诱导后的雄性诸氏鲮虾虎鱼 Vg mRNA 表达规律

Vg 是包括鱼类在内的雌性动物特有的一种蛋白, 但在雌激素诱导下雄鱼也能产生该蛋白^[23], 鱼类体内 Vg 这种特性, 使其成为检测外源雌激素和内分泌干扰物的最为普遍的方法之一^[24], 多种鱼类开展了水环境雌激素效应相关的研究。刘春等^[13]研究发现, 100 $\mu\text{g/L}$ 的 17 β -雌二醇(E2)诱导雄性剑尾鱼后, 肝脏 Vg mRNA 相对表达量在诱导后第 1 天达到小高峰, 第 5 天达到高峰, 第 9 天后维持相对低的表达量。Yan 等^[22]研究表明, 1 $\mu\text{g/L}$ E2 诱导后的斑马鱼 Vg A mRNA 在第 2 天达到小高峰, 在 30 d 达到高峰, 0.1 $\mu\text{g/L}$ E2 诱导后的青鳉 Vg A mRNA 在第 3 天和 12 天达到高峰。黄晔等^[6]用 250 ng/L E2 诱导雄性斑马鱼, 第 4 天肝脏 Vg mRNA 才检测到表达。剑尾鱼、斑马鱼、青鳉 Vg mRNA 表达规律不一致, 除物种不同外, 还可能为 E2 诱导浓度不同所致。本研究中诸氏鲮虾虎鱼 Vg mRNA 表达规律与剑尾鱼研究结果相似, 但诸氏鲮虾虎鱼肝脏 Vg mRNA 表达高峰期维持时间更长, 这可能与鱼的种类有关。本实验结果证明, 雌二醇能显著诱导雄性诸氏鲮虾虎鱼 Vg 的表达, 诸氏鲮虾虎鱼体内 Vg 作为生物标志物用于近海环境雌激素类物质的检测具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Utarabhand P, Bunlipatanon P. Plasma vitellogenin of grouper(*Epinephelus malabaricus*): Isolation and properties[J]. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology and Toxicology, 1996, 115 (2): 101-110.
- [2] 汝少国, 潘宗保, 田华. 鱼类卵黄蛋白的研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2012, 2: 22-32.
Ru Shaoguo, Pan Zongbao, Tian Hua. Review on recent progress about teleost vitellogenins[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2012, 2: 22-32.
- [3] Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a bio-marker of reproductive disruption by xenobiotics[J]. Aquaculture, 1999, 177(1-4): 345-352.
- [4] Mills L J, Chichester C. Review of evidence: Are endocrine disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations[J]. Sci Total Environ, 2005.343(1-3): 1-34.
- [5] 宋文婷, 王志军, 朱智. 基于体内生物测试方法的污水处理过程中环境雌激素去除评价[J]. 安全与环境学报, 2013, 13(1): 23-26.
Song Wenting, Wang Zhijun, Zhu Zhi. Evaluation of the environmental estrogens removal from the sewage treatment via an in vivo bioassay [J]. Journal of Safety and Environment, 2013, 13(1): 23-26.
- [6] 黄晔, 任华, 孙竹筠, 等. 壬基酚和双酚 A 对雄性斑马鱼(*Danio rerio*)卵黄蛋白原 mRNA 的诱导效应[J]. 生态毒理学报, 2008, 3(3): 274-279.
Huang Ye, Ren Hua, Sun Zhu Yun, et al. Vitellogenin mRNA expression in male Zebrafish (*Danio rerio*) induced by nonylphenol and bisphenol-A[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(3): 274-279.
- [7] 温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 17 β -雌二醇对剑尾鱼卵黄蛋白原的诱导研究[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 280-285.
Wen Rushu, Fang Zhanqiang, Jiang Shigui et al. Induction of vitellogenin by 17-estradiol in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*)[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2007, 15(4): 280-285.
- [8] 温茹淑, 方展强, 陈伟庭. 17 β -雌二醇对雄性唐鱼卵黄蛋白原的诱导及性腺发育的影响[J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 43- 48.
Wen Rushu, Fang Zhanqiang, Chen Weiting. Effects of 17 β -estradiol on vitellogenin inducement and gonad development in male *Tanichthys albonubes*[J]. Zoological Research, 2008, 29(1): 43- 48.
- [9] Kordes C, Rieber E P, Gutzeit H O. An in vitro vitellogenin bioassay for oestrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*)[J]. Aquatic Toxicology, 2002, 58(3-4): 151-164.
- [10] 李建军, 杨笑波, 魏社林, 等. 裸项栉虾虎鱼的全人

- 工繁殖及其胚胎发育[J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(2): 111-116.
- Li Jianjun, Yang Xiaobo, Wei Shelin, et al. Complete artificial propagation and embryonic development of *Bareneck goby*[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2008, 16(2): 111-116.
- [11] 李建军, 吴美慧, 叶惠欣, 等. 不同发育期诸氏鲮虾虎鱼对钻井液的敏感性比较[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 4(23): 48-51.
- Li Jianjun, Wu Meihui, Ye Huixin, et al. Comparison of the sensitivity of *Mugilogobius chulae* at different developmental stages to drilling fluid[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2013, 4(23): 48-51.
- [12] 李建军, 林忠婷, 陈小曲, 等. 四种重金属离子对诸氏鲮虾虎鱼的单一和联合毒性[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(2): 236-241.
- Li Jianjun, Lin Zhongting, Chen Xiaoqu, et al. Single and joint toxicity of four heavy metal ions on *Mugilogobius chulae*[J]. Marine Environmental Science, 2014, 33(2): 236-241.
- [13] 刘春, 李凯彬, 王芳, 等. 剑尾鱼卵黄蛋白原 C(Vg C)全长 cDNA 的克隆及表达[J]. 水产学报, 2011, 35(10): 1441-1449.
- Liu Chun, Li Kaibin, Wang Fang, et al. , The full length cDNA cloning and expression profile of vitellogenin C(Vg C) gene from swordtail fish *Xiphophorus helleri*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(10): 1441-1449.
- [14] 宋光年, 金松君, 张继泉, 等. 中国明对虾 caspase 基因的克隆与表达分析[J]. 海洋科学, 2010, 34(12): 1-7.
- Song Guangnian, Jin Songjun, Zhang Jiquan, et al. Cloning and expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Marine Sciences, 2010, 34(12): 1-7.
- [15] 刘春, 李凯彬, 耿冬雨, 等. 剑尾鱼 2 种卵黄蛋白原全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 31-43.
- Liu Chun, Li Kaibin, Geng Dongyu, et al. Cloning and characterization of vitellogenin gene from swordtail fish *Xiphophorus helleri*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(1): 31-43.
- [16] Hayward A, Takahashi T, Bendena W G, et al. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans[J]. Febs Letters, 2010, 584(6): 1273-1278.
- [17] Miracle A, Ankley G, Lattier D. Expression of two vitellogenin genes(vg1 and vg3) in fathead minnow(*Pimephales promelas*) liver in response to exposure to steroidal estrogens and androgens[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2006, 63(3): 337-342.
- [18] Hiramatsu N, Cheek A O, Sullivan C V, et al. Vitellogenesis and endocrine disruption[J]. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2005, 6: 431-471.
- [19] Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, et al. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments[J]. Marine Biology, 2006, 149(1): 35-47.
- [20] 翟丽丽, 张育辉. 基于环境雌激素评估的卵黄蛋白原研究进展[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(3): 332-337.
- Zhai Lili, Zhang Yuhui. Review on vitellogenin based on estimating environmental estrogen[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(3): 332-337.
- [21] Nath P, Sahu R, Kabita S, et al. Vitellogenesis with special emphasis on Indian fishes[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2007, 33(4): 359-366.
- [22] Yan T, Tao S, Yew K P, et al. Molecular cloning of zebrafish and medakavitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 α -estradiol[J]. Gene, 2004, 328: 25-36.
- [23] 宋双双, 安立会, 郑丙辉, 等. 浑河流域野生鲫鱼卵黄蛋白原基因表达[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(1): 121-129.
- Song Shuangshuang, An Lihui, Zheng Binghui, et al. Vitellogenin mRNA expression in wild Crucian carp (*Carassius auratus auratus*) from Hun River[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 121-129.
- [24] 马陶武, 王子健. 环境内分泌干扰物筛选和测试研究中的鱼类实验动物[J]. 环境科学学报, 2005, 25(2): 135-140.
- Ma Taowu, Wang Zijian. Fish experimental model in the screening and testing for the environmental endocrine disruptors[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(2): 135-140.

Full-length cDNA cloning and expression analysis of vitellogenin gene in *Mugilogobius chulae*

YU Lu-jun, CAI Lei, LI Ge, CHEN Xiao-qu, CHEN Lin, LI Jian-jun

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Key Laboratory of Guangdong Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

Received: Feb. 1, 2015

Key words: *Mugilogobius chulae*; vitellogenin; full-length cDNA; quantitative real-time RT-PCR; 17 β -estradiol

Abstract: To explore the tissue distribution of the vitellogenin (Vg) gene in *Mugilogobius chulae* and the effect of the pollutant 17 β -estradiol on male *M. chulae*, the full length of vitellogenin (Vg) cDNA in *M. chulae* was cloned by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques using total RNA extracted from the liver of female fish. Meanwhile, the expression of Vg mRNA of *M. chulae* was determined by real-time fluorescent quantitative PCR. The full length of *M. chulae*'s Vg cDNA sequence contains 5 067 bp nucleotides, with a complete open reading frame (ORF) of 4 992 bp, which encodes 1 664 amino acid proteins with a deduced protein molecular weight of 186.2 ku. The ORF contains signal peptides and a polyserine domain. The real-time RT-PCR result showed that *M. chulae*'s Vg mRNA was primarily detected in the liver. Furthermore, Vg mRNA expression levels at different time points of E2 treatment of male fish were determined. *M. chulae*'s Vg mRNA expression levels reached the peak on the third day and then the expression levels declined on the seventh day. These results indicated that the full length of Vg cDNA in *M. chulae* was cloned successfully. This study suggests that Vg in male *M. chulae* can be considered as a valid biomarker for offshore environmental monitoring of estrogenic substances.

(本文编辑: 谭雪静)