

黄颡鱼 *Scp3* 基因全长 cDNA 的克隆和表达模式研究^{*}

吴迪, 李英文, 朱敏, 旷毓焯, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市高校生物活性物质工程研究中心 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331)

摘要:本研究采用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法,从长江流域重要的经济鱼类黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)中克隆了与减数分裂密切相关基因 *Scp3* 的全长 cDNA,并对它的序列、系统进化、组织和细胞表达模式进行了研究。克隆得到的 *Scp3* cDNA 全长为 1 143 bp,编码 240 个氨基酸;系统进化分析表明黄颡鱼 *Scp3* 蛋白与同为鲇形目(Siluriformes)的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)*Scp3* 蛋白同源性最高;序列分析结果表明,黄颡鱼 *Scp3* 蛋白含有脊椎动物 *Scp3* 蛋白保守的卷曲螺旋结构域(Coiled coil domain)和 2 个保守基序(CM1 和 CM2);组织和细胞表达模式的研究显示 *Scp3* 基因仅表达于黄颡鱼雌雄性腺:1)在精巢中仅表达于初级精母细胞和次级精母细胞;2)在卵巢中仅在初级生长期和卵黄发生前期表达。本文首次从黄颡鱼中克隆得到 *Scp3* 全长 cDNA 并对其组织表达模式的研究,为后续研究脊椎动物生殖细胞的分化及其相互作用奠定了基础。

关键词:黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*);*Scp3* 基因;克隆;表达模式

中图分类号:Q96

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)02-0018-05

Scp3(Synaptonemal complex protein 3)蛋白是联会复合体蛋白的核心组分之一,仅表达于减数分裂时期的生殖细胞,对脊椎动物的减数分裂有重要作用^[1-2]。由于 *Scp3* 基因表达的特异性,故常被作为生殖细胞分化(尤其是减数分裂)的标记基因广泛使用^[3]。目前,对 *Scp3* 基因功能的研究主要集中在哺乳类,在鱼类的研究仅集中在模式物种如青鳉(*Oryzias latipes*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等,在经济鱼类的研究报道较少。黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)俗称黄腊丁,属鲇形目(Siluriformes)、鲿科(Bagridae)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*)^[4],是一种小型淡水底栖鱼类,在中国各大水系都有分布,主要分布于长江流域,是重要的经济鱼类。本研究采用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法,在黄颡鱼中克隆了 *Scp3* 基因的全长 cDNA 序列,并对它在黄颡鱼中的组织和细胞表达模式进行了研究,从而为深入研究经济鱼类的生殖细胞减数分裂及其调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 全长 cDNA 的克隆

从黄颡鱼成鱼提取性腺总 RNA,并测定它的浓度和质量。取 1 μ g 总 RNA,经 gDNA Eraser(TaKaRa)去除基因组 DNA 后,按 PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa)说明书合成第一链 cDNA。

根据 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上公布的青鳉、斑马鱼、虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等 *Scp3* 基因的 cDNA 序列,设计简并引物并扩增黄颡鱼 *Scp3* 基因 cDNA 部分开放阅读框序列。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;35 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离、染色后,经凝胶成像系统分析。含目的片段的胶段经胶回收试剂盒(Geneview)回收后,将之亚克隆入 pMD-19T 载体中,随后用 CaCl_2 法转化到大肠杆菌 DH5 α ,经蓝白斑筛选后,将阳性克隆送上海英俊公司(Invitrogen)测序。

根据测序验证后的部分开发阅读框序列设计 RACE 引物,扩增黄颡鱼 *Scp3* 基因 cDNA 的 5' 和 3' 末端,步骤依照 SmartTM RACE cDNA Amplification kit(Clontech)说明书进行。根据测序得到 5' 序列和 3' 序列,进行拼接。并进行 End-to-End PCR 扩增验证。本实验所用引物见表 1。

^{*} 收稿日期:2014-09-25 修回日期:2014-11-26 网络出版时间:2015-01-22 11:30

资助项目:重庆市自然科学基金(No. cstc2012jjA20006);重庆市教委科学技术研究项目(No. KJ130622);重庆师范大学校级基金项目(No. 12XLB005)

作者简介:吴迪,女,研究方向为动物学,E-mail:418658784@qq.com;通讯作者:刘智皓,副教授,E-mail:minenut@163.com

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20150122.1130.002.html>

1.2 在各组织中的表达模式

解剖雌雄黄颡鱼成鱼各组织,提取 1 μ g 总 RNA,用 gDNA Eraser 去除基因组 DNA 后,合成第一链 cDNA。用 Scp3-F 和 Scp3-R 引物扩增,研究 *Scp3* 基因(367 bp)在黄颡鱼各组织中的表达模式,并以 β -actin(β -actin F/R)基因(252 bp)作为内参。含质粒和蒸馏水为模板扩增的产物分别作为阳性和阴性对照。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;25 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色后在凝胶成像系统上进行拍照和分析。

1.3 序列分析和系统进化树的构建

采用 DNASTar 和 Clustal X 软件对黄颡鱼 *Scp3* 基因 cDNA 全长序列进行推导和多重序列对比。用 Mega 5.0 软件构建系统进化树,进化树中的数值表示随机进行 1 000 次计算的重复率,代表该进化树的可靠性。除黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)、欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)和斑点叉尾鲷 *Scp3* 蛋白的部分氨基酸序列由 EST(序列号分别为 AFV31618、CCH75803、FD375644)推导外,其他物种 *Scp3* 蛋白氨基酸序列均从 GenBank 下载。相关物种名和序列号分别为:斑马鱼(NP_001035440)、虹鳟(NP_001117979)、尼罗罗非鱼(XP_003439417)、青鳉(NP_001098182)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes* XP_003967343)、河鲀(*Tetraodon nigroviridis* CAF89756)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis* NP_001072226)、鸡(*Gallus gallus* XP_416330)、大鼠(*Rattus norvegicus* EDM17006)、人(*Homo sapiens* NP_710161)、海鞘(*Ciona intestinalis* XP_002125203)。

表 1 黄颡鱼 *Scp3* 基因全长 cDNA 扩增引物

Tab. 1 Primers used for cloning the *Scp3* gene cDNA of *Pelteobagrus filivitraco*

引物名	序列 (5'~3')	目的
Scp3-F	GGTGTGGGAATGARGTTC	扩增中间片段
Scp3-R	CTCCATCTCACCATGTTCTTGA	
Scp3-RF1	CTGAAAGGCAGCAACCAGAAAATAGAGC	RACE
Scp3-RF2	GGAGATGCTGTCTAGTGTGCGGC	
Scp3-RF3	GCTATATGAGCAGTTTGTCAAGAACATGGAGG	
Scp3-RR1	GCTCCAATGTTTCACCTGTCACCAAGG	
Scp3-RR2	CCATACAAGTTTGTGCAAACAAGCCAGC	
Scp3-RR3	CATGGACTGTAGAGACTTCCTCACGGTGG	
Scp3-F0	GGCAGCAACCAGAAAATAGAG	组织分布
Scp3-R0	TCCAATGTTTCACCTGTACCC	
β -actin F	GCTGTGCTGTCCCTGTATG	扩增内参
β -actin R	GTGCCATCTCCTGCTCG	
CDSIII	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T) ₃₀ N-1N	Smart TM Race 通用引物
SMART IV	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCGGG	
UP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACACGCAGAGT	
Long	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

1.4 原位杂交

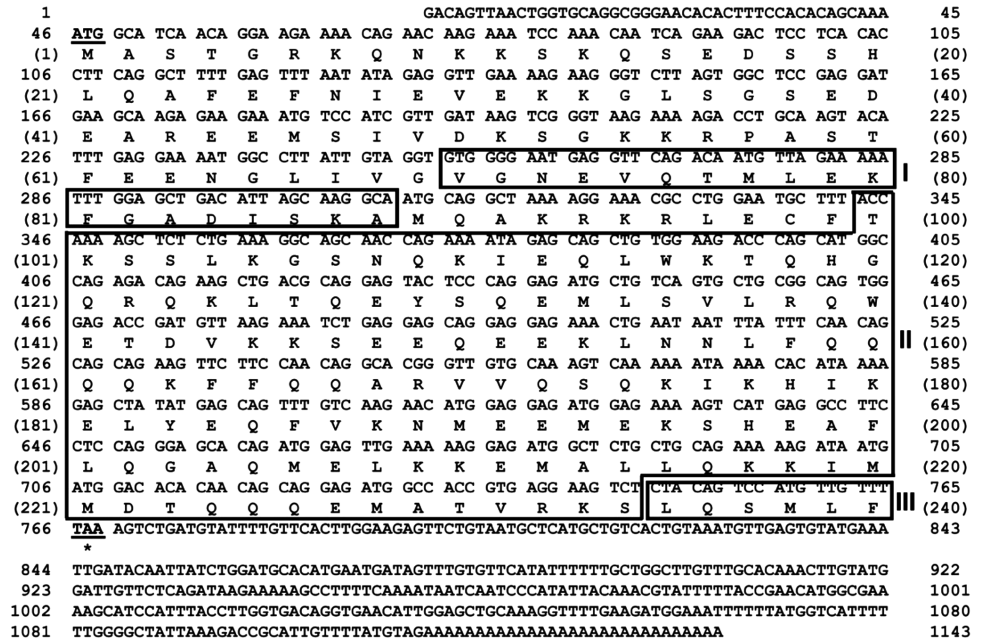
1.4.1 cRNA 探针的制备 根据测序结果,将含有 *Scp3* 基因 cDNA 片段的重组质粒线性化,采用地高辛标记系统(Roche),利用 T7 RNA 聚合酶(Promega)体外转录反义链 cRNA 探针。

1.4.2 原位杂交 解剖出黄颡鱼雌雄成鱼性腺,在 4% PFA 中,4 $^{\circ}$ C 固定 16 h。随后在乙醇(DEPC)和二甲苯中脱水、透明,并在 60 $^{\circ}$ C 包埋。石蜡组织切片经常规二甲苯脱蜡、梯度酒精复水和 0.85 $\times$ PBS 润洗后,蛋白酶 K 室温消化 12 min,用甘氨酸抑制蛋白酶 K 活性。随后经 4%PFA 重新固定和 0.25%乙酰酐溶液乙酰化;切片在 60 $^{\circ}$ C 下预杂交 1 h 后,加入地高辛标记的 *Scp3* cRNA 探针,60 $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后经柠檬酸钠缓冲液(2 $\times$ SSC)和 DIG Buffer I 洗涤,DIG Buffer II 室温封闭至少 1 h,加入 1/2 000 地高辛抗体 anti-DIG-AP 室温孵育 30 min(Roche),Buffer I 洗涤 3 $\times$ 15 min,用 NBT 和 BCIP 显色,封片、拍照。

2 结果

2.1 序列分析

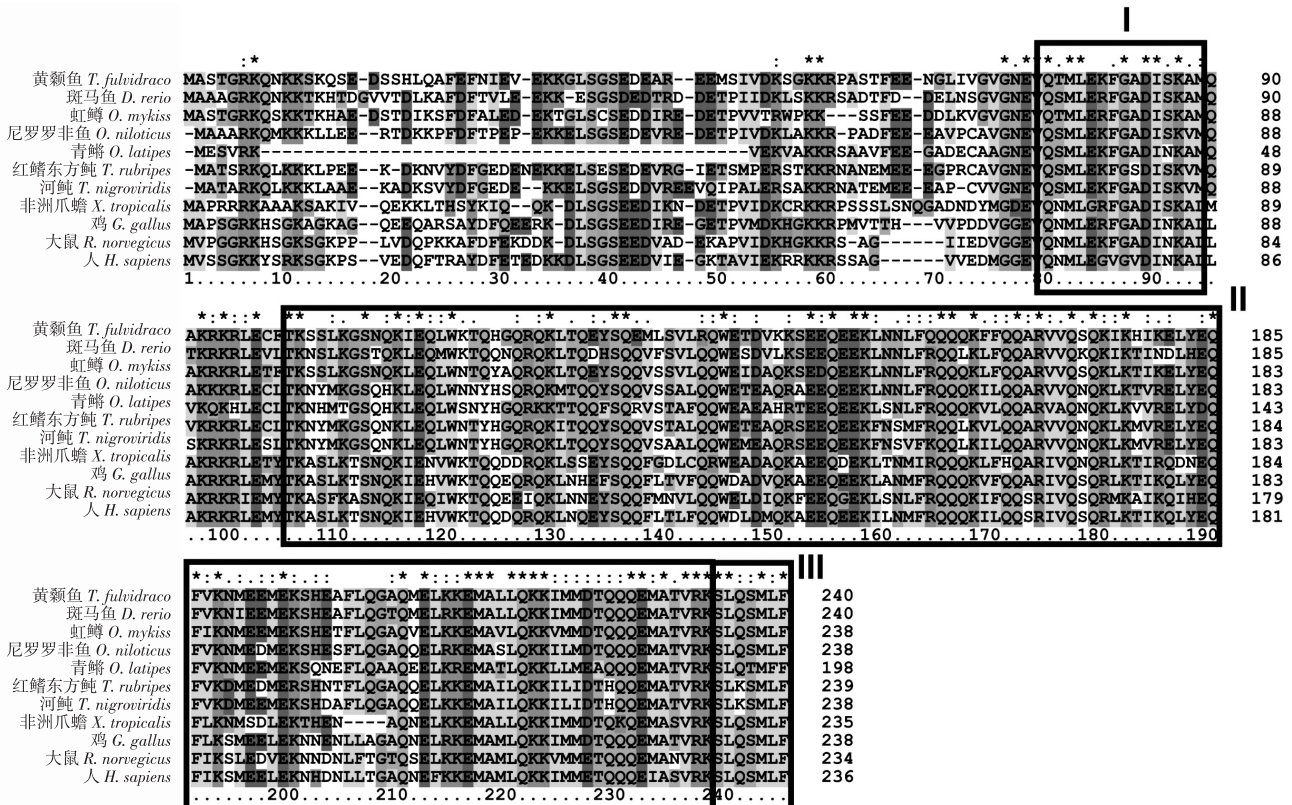
克隆到的黄颡鱼 *Scp3* cDNA 全长为 1 143 bp, 包含 5' 非编码区 (Untranslated region, UTR) 45 bp, 3' UTR 375 bp, 开放阅读框 (ORF) 723 bp, 编码 240 个氨基酸 (图 1)。该 cDNA 在 NCBI 上的序列号为 KJ633047。图 2 为多重序列对比结果, 其中显示黄颡鱼 *Scp3* 蛋白具有所有脊椎动物 *Scp3* 保守的基序: 卷曲螺旋结构域 (Coiled coil domain)、保守基序 1 (Conserved motif 1, CM1) 和保守基序 2 (Conserved motif 2, CM2)。



注: 方框 I、II 和 III 分别表示保守序列 1 (CM1)、卷曲螺旋结构域和保守序列 2 (CM2), 下划线分别示起始、终止密码子。

图 1 黄颡鱼 *Scp3* 基因 cDNA 及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Yellow catfish *Scp3* cDNA and deduced amino acid sequence



注: 方框 I、II 和 III 分别表示保守序列 1 (CM1)、卷曲螺旋结构域和 CM2。

图 2 黄颡鱼与其他脊椎动物 *Scp3* 蛋白多重序列对比分析

Fig. 2 Multiple alignment of *Scp3*s of yellow catfish and other vertebrates

2.2 系统进化分析

系统进化分析结果表明, 鱼类和四足类 *Scp3* 蛋白明显分为两支。其中, 黄颡鱼 *Scp3* 蛋白在鱼类中与同为

鲇形目的斑点叉尾鲷的亲缘关系最近,其次为鲤形目(Cypriniformes)的斑马鱼,再与鲑形目(Salmoniformes)的虹鳟和鲈形目(Perciformes)的尼罗罗非鱼 *Scp3* 蛋白汇为一支,而与四足类 *Scp3* 蛋白亲缘关系较远;与尾索动物(Urochordata)海鞘 *Scp3* 蛋白亲缘关系最远(图3)。

2.3 组织表达模式

组织表达模式结果表明,*Scp3* 基因仅在黄颡鱼性腺(精巢和卵巢)中表达(图4),而在其他非性腺组织中没有表达,精巢中的表达水平略高于卵巢。

2.4 在性腺中的细胞表达模式

封二彩图5A、B为黄颡鱼精巢和卵巢的组织学对照。原位杂交结果显示,*Scp3* 基因仅在黄颡鱼精巢和卵巢的生殖细胞中表达。在卵巢中,黄颡鱼 *Scp3* 基因仅表达于初级生长期和卵黄生成期(封二彩图5C);在精巢中,*Scp3* 基因在初级精母细胞和次级精母细胞中有表达,在其他时期的生殖细胞中不表达(封二彩图5D)。

3 讨论

Scp3 蛋白是脊椎动物雌雄生殖细胞中联会复合体形成的必需组分,在染色体联会、减数分裂和精子发生中起重要的作用^[6]。序列分析和多重序列对比表明,黄颡鱼 *Scp3* 蛋白主要由一个位于中心的 α 螺旋区和位于两侧无螺旋的N末端和C末端构成,存在两个保守基序即CM1和CM2,这与其他脊椎动物 *Scp3* 蛋白的结构保持高度一致^[7]。系统进化分析显示,黄颡鱼与其他脊椎动物 *Scp3* 蛋白的同源性都较高,其中与同为鲇形目的斑点叉尾鲷的 *Scp3* 蛋白同源性最高。因此,可以推测黄颡鱼 *Scp3* 蛋白与其他脊椎动物 *Scp3* 蛋白功能极为相似。

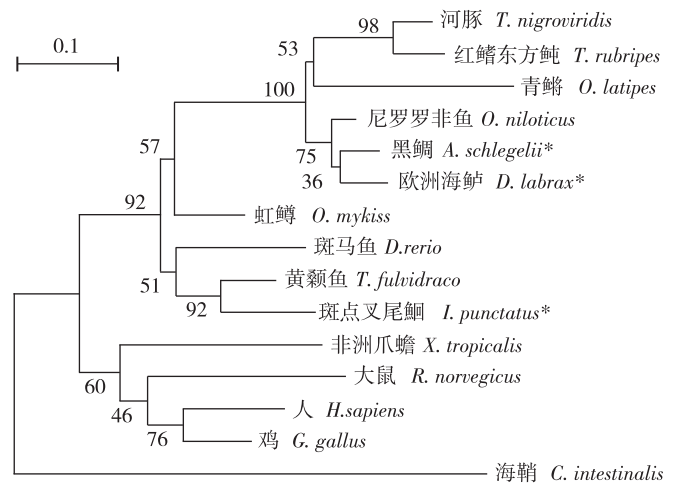
通过RT-PCR分析可知,黄颡鱼 *Scp3* 基因特异表达于雌雄性腺,且雄性性腺中表达量略高于雌性,与南方鲇(*Silurus meridionalis*)、尼罗罗非鱼和黑脊倒刺鲃(*Spinibarbus caldwelli*)的研究相同^[8-9];这种表达差异可能与鱼类雄性性腺正常功能的维持密切相关。

目前,对鱼类 *Scp3* 基因的研究较少,主要集中在虹鳟^[10]和青鳉^[11-12]等少数物种。本研究发现,在卵巢中,黄颡鱼 *Scp3* 基因仅表达于初级生长期和卵黄生成期,在其他时期的生殖细胞中不表达。由此可以推测,黄颡鱼 *Scp3* 基因在生殖细胞早期发育尤其在减数分裂过程中至关重要,而对生殖细胞后期发育的作用不明显。与虹鳟和尼罗罗非鱼的研究相似,该基因主要表达于精巢初级精母细胞^[8,10],暗示与 *Scp3* 蛋白可能也在黄颡鱼减数分裂中起重要作用。但不同的是,黄颡鱼 *Scp3* 基因不仅表达于初级精母细胞,在次级精母细胞中也有表达。有研究发现,黑脊倒刺鲃 *Scp3* 基因不仅表达于初级精母细胞,在精原细胞也有表达^[9]。因此可以推测,鱼类 *Scp3* 基因在精巢中的细胞表达模式可能存在明显的物种差异性,其中原因还需进一步研究。

本研究首次从重要的经济养殖鱼类黄颡鱼中克隆了减数分裂的分子标记基因 *Scp3*。通过RT-PCR和原位杂交的方法,研究了 *Scp3* 基因的组织 and 细胞表达模式,这不仅为后续硬骨鱼类研究提供了初步数据,也为深入研究脊椎动物生殖细胞的分化及相互作用奠定基础。

参考文献:

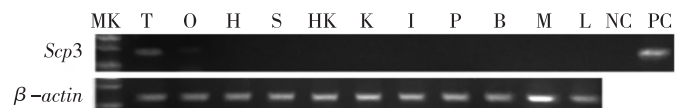
[1] Van G R, Tuerlings J H, Kremer J A, et al. DAZLA: an important candidate gene in male subfertility? [J]. J Assist



注:数值表示随机进行1000次计算的重复率;* :部分序列。

图3 黄颡鱼与其他脊椎动物 *Scp3* 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis with *Scp3* sequences of yellow catfish and other vertebrates



注:T:精巢;O:卵巢;H:心脏;Sp:脾脏;HK:头肾;K:肾脏;I:肠;P:垂体;B:脑;M:肌肉;L:肝脏;NC:阴性对照;PC:阳性对照; β -actin 基因作为内参基因。

图4 *Scp3* 在黄颡鱼各组织中的表达

Fig. 4 Tissue expression pattern of *Scp3* in yellow catfish

Reprod Genet, 2001, 18(7):395-399.

[2] Wang P J, Mccarrey J R, Yang F, et al. An abundance of X-

- linked genes expressed in spermatogonia[J]. Nat Genet, 2001,27(4):422-426.
- [3] Fox M, Urano J, Reijo Pera R A. Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 (PUM2) and deleted in Azoospermia-like (DAZL) bind[J]. Genomics, 2005, 85(1):92-105.
- [4] 倪勇, 伍汉霖. 江苏鱼类志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006:392-404.
- Ni Y, Wu H L. Fishes of Jiangsu, China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006:392-404.
- [5] Liu Z, Wu F, Jiao B, et al. Molecular cloning of Dmrt1, Foxl2, and two types of aromatase in southern catfish and their possible roles in sex differentiation[J]. Journal of Endocrinology, 2007, 194(1):223-241.
- [6] Yuan L, Liu J G, Zhao J, et al. The murine *Scp3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis and male fertility[J]. Mol Cell, 2000, 5(1):73-83.
- [7] Dobson M J, Pearlman R E, Karaiskakis A, et al. Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction[J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 10):2749-2760.
- [8] 胡重江. 罗非鱼和南方鲇生殖细胞几种分子标记的克隆和表达研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- Hu C J. Molecular cloning and expression of several germ cell markers of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and Southern catfish, *Silurus meridionalis*[D]. Chongqing: Southwest University, 2008.
- [9] 苏敏, 吕博彦, 唐良华, 等. 黑脊倒刺鲃 *Scp3* 基因的克隆及其表达[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2011, 27(6):73-76.
- Su M, Tang L H, Zhan B J, et al. Molecular cloning and expression of *Scp3* gene in *Spinibarbus caldwelli*[J]. Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition, 2011, 27(6):73-76.
- [10] Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions[J]. Biology of Reproduction, 2008, 78(1):151-158.
- [11] Iwai T, Lee J, Yoshii A, et al. Changes in the expression and localization of cohesin subunits during meiosis in a non-mammalian vertebrate, the medaka fish[J]. Gene Expression Patterns, 2004, 4(5):495-504.
- [12] Iwai T, Yoshii A, Yokota T, et al. Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes* [J]. Experimental Cell Research, 2006, 312(13):2528-2537.

Animal Sciences

Molecular Cloning of *Scp3* Gene cDNA and Its Expression in Yellow Catfish (*Tachysurus fulvidraco*)

WU Di, LI Yingwen, ZHU Min, KUANG Yuchan, LIU Zhihao

(School of Life Sciences, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substances,

Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: In the present study, full length *Scp3* (synaptonemal complex protein 3) cDNA was isolated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) in yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*), and the sequence and phylogenetic analyses, tissue and cell expression patterns were further examined. The isolated yellow catfish *Scp3* gene was 1 143 bp in length, containing a 45 bp 5' untranslated region (UTR), a 375 bp 3' UTR and a 723 bp open reading frame (ORF), encoding 240 amino acids (aa). Phylogenetic analysis revealed that the high homology of this protein between yellow catfish and channel catfish. Multiple alignment of vertebrate *Scp3*s revealed that yellow catfish *Scp3* shared common domains conserved in vertebrates, namely, conserved motif 1 (CM1), CM2 and coiled coil domain. Tissue distribution analysis showed that, yellow catfish *Scp3* was expressed exclusively in testis and ovary. In the testis, yellow catfish *Scp3* was expressed in primary and secondary spermatocytes. But in the ovary, yellow catfish *Scp3* was expressed in the primary growth (PG) and previtellogenic (PV) oocytes. This is the first time to clone *Scp3* (germ cell meiosis related gene) cDNA from yellow catfish, tissue and cell expression patterns were further examined. The results of the study are important for researches on the differentiation of germ cells and their interactions in vertebrates.

Key words: yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco*); *Scp3* gene; molecular cloning; expression patterns

(责任编辑 方 兴)