动物科学

DOI:10.11721/cqnuj20180405

贵州草海鲫鱼 *Spo11* 基因的克隆、生物信息学和表达分析*

董然然，陈修云，王岗屹，吕昌乾
(贵州大学 动物科学学院，贵阳 550025)

摘要:【目的】探索环境内分泌干扰物壬基酚(Nonylphenol，NP)对贵州草海鲫鱼(*Carassius auratus*)*Spo11* 基因表达的影响。【方法】通过 PCR 方法克隆实验鱼 *Spo11* 基因，利用生物信息学方法分析 SPO11 蛋白的氨基酸序列、理化性质和结构特点；并设置 1 个对照组和低、中、高共 3 个不同剂量 NP 处理组，用 NP 质量浓度分别为 0，25，50 和 100 μg·L^{-1}的水体浸浴实验鱼 28 d 后，检测各组实验鱼 *Spo11* 基因的表达情况。【结果】*Spo11* 基因 cDNA 序列长度为 1 471 bp (GenBank 登录号:MF66470)，包括 66 bp 的 5′非翻译区、编码 383 个氨基酸的 1 152 bp 的开放阅读框和 253 bp 的 3′非翻译区。预测 SPO11 蛋白质相对分子质量为 43.23 kDa，等电点 IP 为 6.89，主要由亮氨酸、丝氨酸和缬氨酸组成。该蛋白是含有信号肽的不稳性亲水蛋白，二级结构以 α-螺旋和无规则卷曲为主。与对照组实验鱼的 *Spo11* 基因相对表达量相比，中剂量和高剂量的 NP 处理组实验鱼 *Spo11* 基因相对表达量均有所升高，与前者的差异均具有统计学意义($p<0.05$)。【结论】环境内分泌干扰物 NP 可以影响贵州草海鲫鱼 *Spo11* 基因的表达。

关键词:贵州草海鲫鱼；*Spo11* 基因；基因克隆；生物信息学；壬基酚
中图分类号:Q78　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-6693(2018)04-0025-06

减数分裂时，SPO11(Meiotic protein covalently bound to DSB homolog，SPO11)蛋白参与 DNA 双链断裂的形成，并且能与 Mre11(MRE11 homolog，double strand break repair nuclease)，Rad50(RAD50 double strand break repair protein)，NBS1(Nijmegen breakage syndrome 1)等蛋白一起形成蛋白质复合体参与染色体重组[1]。目前，*Spo11* 基因在硬骨鱼类中的研究主要集中在日本鳗鲡(*Anguilla anguilla*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中[2-4]。壬基酚(Nonylphenol，NP)是一种典型的环境内分泌干扰物，在世界上多条河流中均检测到这一物质[5-8]。目前，有关 NP 对硬骨鱼类影响的研究主要集中在生殖毒性和生物累积方面，而有关 NP 对鱼类减数分裂影响方面的研究较为少见[9-15]。因此，本研究以贵州草海中主要经济鱼类鲫鱼(*Carassius auratus*)为研究对象，通过 PCR 克隆得到 *Spo11* 基因的 cDNA 序列，并通过生物信息学方法，对 SPO11 蛋白的氨基酸序列、理化性质和结构特点进行了分析。同时，本研究还使用含有不同剂量 NP 的水体浸浴鲫鱼，检测 *Spo11* 基因的表达情况。研究结果有望为后续有关 *Spo11* 基因功能的研究以及有关环境内分泌干扰物对鱼类减数分裂影响的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成

研究用鲫鱼捕自贵州省威宁县草海湖。在实验室暂养 7 d 后取实验鱼性腺，液氮速冻后－80 ℃冰箱保存。总 RNA 提取步骤按 RNAiso Reagent 试剂操作流程进行。用大连宝生物公司试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.2 *Spo11* 基因克隆

从笔者所在实验室草海鲫鱼性腺转录组数据中分离出 *Spo11* 基因序列，设计特异性引物 Spo11-F 和 Spo11-R(表 1)。以性腺 cDNA 为模板，通过 PCR 反应得到 *Spo11* 基因序列。25 μL 反应体系为：10×LA PCR 缓冲液 2.5 μL，25 mmol·$L^{-1}$$MgCl_2$ 2.5 μL，dNTPs 1.0 μL，10 μmol·L^{-1}上述两种引物各 1.0 μL，LA Taq 0.5 μL，模板 1.0 μL，ddH_2O 15.5 μL。反应程序为：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 90 s，

* **收稿日期**:2017-09-08　**修回日期**:2018-06-06　**网络出版时间**:2018-07-26 16:50
资助项目:贵州省科技厅联合基金(黔科合 LH 字[2015]7678)；教育部重点实验室开放课题(No. FFRD-2015-01)
第一作者简介:董然然，女，讲师，博士，研究方向为鱼类生殖生理学，E-mail：drflyinsky@163.com
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180726.1649.008.html

32个循环;72 ℃延伸8 min。目的片段用凝胶回收试剂盒(BioFlux,Tokyo,Japan)回收。回收产物进行亚克隆,参考文献[16]的方法进行相关操作。

1.3 SPO11蛋白的生物信息学分析

从NCBI数据库中下载以下生物的SPO11蛋白氨基酸序列:人(*Homo sapiens*)(GenBank登录号:NP_036576.1)、小鼠(*Mus musculus*)(GenBank登录号:NP_001077429.1)、家鸡(*Gallus gallus*)(GenBank登录号:XP_001232076.2)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)(GenBank登录号:XP_018090447.1)、斑马鱼(GenBank登录号:NP_991245.1)、青鳉(*Oryzias latipes*)(GenBank登录号:XP_004070604.1)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)(GenBank登录号:XP_018931692.1)、尼罗罗非鱼(GenBank登录号:XP_003439029.1)、日本鳗鲡(GenBank登录号:BAE86870.1)、拟果蝇(*Drosophila simulans*)(GenBank登录号:XP_002082235.1),并用拟果蝇的这一序列做外类群,用MEGA 7构建系统进化树。氨基酸序列比对用Genedoc软件进行。开放阅读框预测网址为http://bioinf.ibun.unal.edu.co/servicios/sms/orf_find.html。信号肽预测网址为http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/。CpG岛预测网址为http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot。氨基酸理化性质预测网址为http://web.expasy.org/cgi-bin/ protparam/protparam。蛋白质二级结构预测网址为https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page=/NPSA/npsa_sopm.html。蛋白质空间结构预测网址为https://swissmodel.expasy.org/。

1.4 NP处理方案和*Spo11*基因表达分析

1.4.1 *处理方案* 将NP溶于溶质体积分数为95%的乙醇溶液中,配成NP质量浓度为2 g·L^{-1}的母液。浸浴处理时,分别向装有100 L水的鱼缸中加入0,1,2和4 mL母液,使鱼缸内水体中NP质量浓度分别为0,25,50和100 μg·L^{-1},分别作为1个对照组和低、中、高共3个不同剂量NP处理组的培养水体。每个NP处理组设置3个小组,对照组设置1个小组,总共10个小组。从暂养7 d的实验鱼中,选取80尾健康个体随机平均分配到每个小组中,每小组8尾。浸浴处理时间为28 d。浸浴期间每日9:00和17:00各饱食投喂1次实验鱼,水温范围控制在18~20 ℃,溶氧质量浓度范围为6~8 mg·L^{-1},水体pH控制在7.5左右。浸浴处理结束后,取各组实验鱼的性腺检测*Spo11*基因表达情况。

1.4.2 *Spo11基因表达分析* 总RNA提取和cDNA合成方法同本文1.1部分。25 μL反应体系为:SYBR® Premix Ex Taq TMII (TaKaRa公司) 12.5 μL,10 μmol·L^{-1}的Spo11-QF1,Spo11-QR1,β-actin QF2和β-actin QR2共4种引物各1 μL,模板2 μL,无酶水3.5 μL。反应条件参见试剂盒,定量PCR引物具体信息见表1。采用Excel 2013和SPSS 21软件整理和分析数据,定量PCR结果用2-ΔΔCt法表示,各组数据之间的多重比较采用单因素方差分析中的LSD和Ducan法进行,当$p<0.05$时,比较结果具有统计学意义。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物名称	引物序列	目的
Spo11-F	5′-AGCTACAACTACAGCGAGAC-3′	普通PCR
Spo11-R	5′-TTGACAAAGAAAGGGAAG-3′	
Spo11-QF1	5′-ACCAGATTTGCCCTAACT-3′	定量PCR
Spo11-QR1	5′-GTCGCATCCTTCTCCACTA-3′	
β-actin-QF2	5′-GGCATCACACCTTCTACAACG-3′	内参
β-actin-QR2	5′-CGGTCAGGATCTTCATGAGG-3′	

2 结果

2.1 *Spo11*基因序列及SPO11蛋白的氨基酸序列、理化性质

通过PCR扩增得到草海鲫鱼*Spo11*基因(GenBank登录号:MF66470)cDNA序列长度为1 471 bp。该序列包括66 bp的5′非翻译区、编码383个氨基酸的1 152 bp的开放阅读框和253 bp的3′非翻译区。对不同物种SPO11蛋白的氨基酸序列比对结果显示,脊椎动物中SPO11蛋白的氨基酸序列在N-末端相似性较低,草海鲫鱼SPO11蛋白与鲤鱼、斑马鱼、罗非鱼、日本鳗鲡、青鳉、非洲爪蟾、小鼠、鸡、人和拟果蝇SPO11蛋白的氨基酸序列相似度分别为85%,83%,68%,68%,66%,63%,63%,60%,57%和35%(图1)。系统进化分析显示,脊椎动物中四足类和硬骨鱼类分别聚成两个大的分枝,且本研究中草海鲫鱼SPO11蛋白跟鲤鱼SPO11蛋白聚在一枝(图2)。这一结果表明进化树可以准确地反映出所选物种的进化关系,也基本符合它们的系统演化关系。

SPO11蛋白的理化性质分析结果显示:草海鲫鱼*Spo11*基因cDNA序列编码的蛋白质相对分子质量为

43.23 kDa，等电点为 6.89，共包含负电荷氨基酸（天冬氨酸和谷氨酸）47 个，正电荷氨基酸（精氨酸和赖氨酸）47 个。预测该蛋白的分子式为 $C_{1918}H_{3085}N_{523}O_{574}S_{18}$，原子总数为 6 118 个。SPO11 蛋白主要由亮氨酸、丝氨酸和缬氨酸组成，分别占氨基酸总数的 10.4%，9.7%和 8.1%，半衰期为 30 h。预测该蛋白的不稳定指数为 53.47，表明它是不稳定的蛋白质。SPO11 蛋白的总平均亲水指数为−0.088，说明它是亲水性蛋白。

此外，CpG 岛预测结果显示，*Spo11* 基因 cDNA 序列在 101～338 bp 处胞嘧啶或鸟嘌呤含量较高。Signal P 3.0 Sever 分析也表明，该段序列包含信号肽的概率为 99.8%。

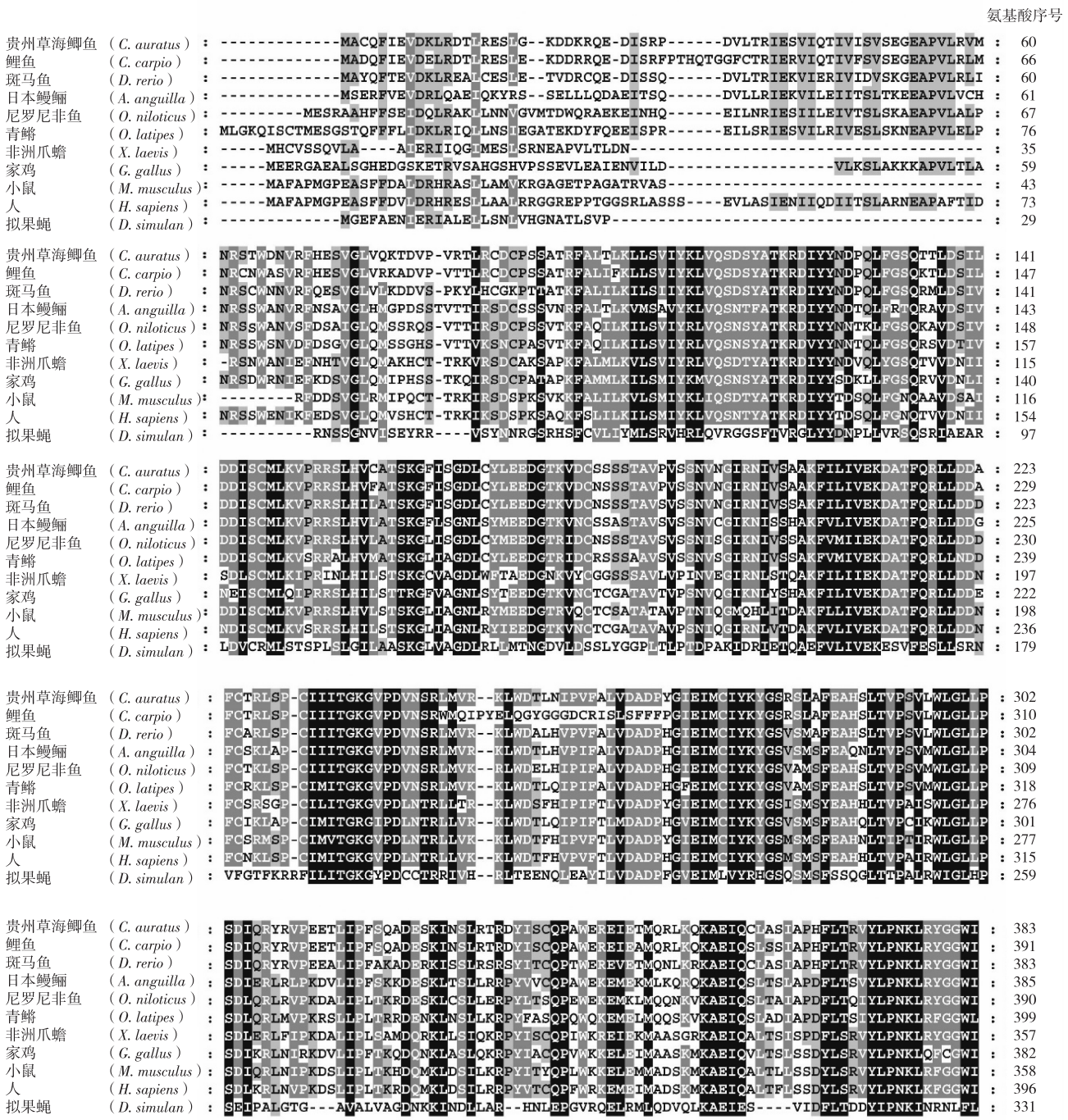


图 1　SPO11 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1　Alignment of the amino acid sequences of SPO11 protein

2.2 SPO11 蛋白结构预测

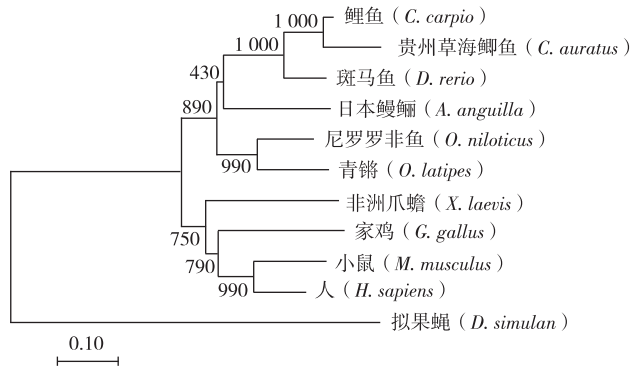
2.2.1 二级结构　通过 SOPM 预测草海鲫鱼 SPO11 蛋白二级结构，结果显示其中无规则卷曲、α-螺旋、延伸链和 β-折叠的比例分别约为 37.6%，35.76%，20.63%和 6.01%（封二彩图 3）。在 NCBI 已公布的 SPO11 蛋白预测

二级结构中,鲤鱼 SPO11 蛋白无规则卷曲,α-螺旋,延伸链和 β-折叠的比例分别约为 35.55%,34.27%,20.97%和 9.21%;而非洲爪蟾 SPO11 蛋白上述 4 种结构分别约为 32.98%,33.51%,23.32%和 10.19%;人 SPO11 蛋白上述 4 种结构则分别约为 34.6%,42.42%,14.39%和 8.59%。通过对上述数据的比较不难发现,脊椎动物的 SPO11 蛋白二级结构相对保守,且贵州草海鲫鱼和鲤鱼 SPO11 蛋白二级结构更为相似。

2.2.2 空间结构 利用 SWISS2MODEL 预测贵州草海鲫鱼 SPO11 蛋白的空间结构[17-19],结果显示该蛋白的空间结构主要是由 9 个 α-螺旋和无规则卷曲组成(封二彩图 4)。预测结果还显示,鲤鱼、非洲爪蟾和人的 SPO11 蛋白的空间结构也均主要由 9 个 α-螺旋和无规则卷曲组成。这表明在脊椎动物中,SPO11 蛋白的空间结构相对保守。

2.3 NP 对 *Spo11* 基因表达的影响

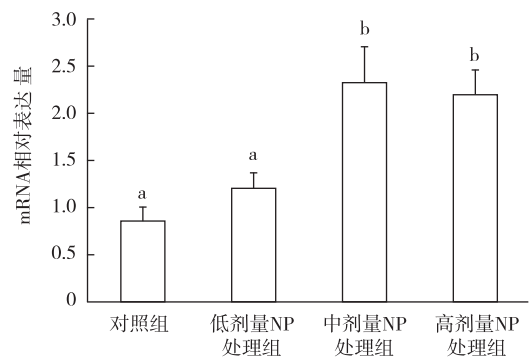
定量 PCR 结果显示:对照组和低剂量 NP 处理组的实验鱼 *Spo11* 基因相对表达量无统计学意义上的差异;中、高剂量 NP 处理组实验鱼 *Spo11* 基因相对表达量均高于对照组实验鱼 *Spo11* 基因相对表达量,与后者的差异均具有统计学意义($p<0.05$);中、高剂量 NP 处理组实验鱼 *Spo11* 基因相对表达量无统计学意义上的差异。



注:进化树用 MEGA 7 构建,以拟果蝇 SPO11 为外类群;图上数字表示进化枝在经过 1 000 次计算后出现的次数

图 2 SPO11 蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic treeof SPO11 protein



注:不同字母代表组间数据差异具有统计学意义($p<0.05$),每组样本量 $n=5$

图 5 NP 对 *Spo11* 基因表达的影响

Fig. 5 Effects of nonylphenolon expression of *Spo11* gene

3 讨论

SPO11 蛋白是减数分裂染色体重组时不可或缺的蛋白质,因此可被用作生殖细胞减数分裂时的特异标记[4,20]。本研究从草海鲫鱼中成功克隆到 *Spo11* 基因,编码 383 个氨基酸。序列分析显示,草海鲫鱼 SPO11 蛋白与鲤鱼 SPO11 蛋白氨基酸序列的相似度最高,与斑马鱼 SPO11 蛋白氨基酸序列的相似度次之。系统进化分析也表明,草海鲫鱼 SPO11 蛋白与其他硬骨鱼类 SPO11 蛋白聚在一枝,然后与四足类聚在一枝,这也证实该蛋白确为 SPO11 蛋白。蛋白质理化性质分析结果显示,草海鲫鱼 SPO11 蛋白主要是由亮氨酸和丝氨酸组成;NCBI 中公布的鲤鱼、非洲爪蟾和人的 SPO11 蛋白也主要是由这两种氨基酸组成。对该蛋白的结构预测表明,SPO11 蛋白的二级结构和空间结构在脊椎动物中也是相对保守的。因此,本研究得到的上述结果为今后研究 SPO11 蛋白在贵州草海鲫鱼中的功能奠定了基础。

NP 通过影响硬骨鱼类生殖器官的发育以及正常功能从而间接影响鱼类的生存和繁殖[21-22]。本研究中,一定剂量的 NP 可以明显上调草海鲫鱼性腺中 *Spo11* 基因的表达。已有研究表明,孕激素和雌激素均可以诱导远东哲罗鱼(*Hucho perryi*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)性腺中 *Spo11* 基因的表达[23]。而孕激素受体拮抗剂米非司酮则可以明显抑制尼罗罗非鱼性腺中 *Spo11* 基因的表达[4]。本研究中一定剂量的 NP 诱导草海鲫鱼 *Spo11* 基因表达上调可能是由于 NP 具有雌激素活性,在生物体内可以模仿雌激素的作用,因此促进了 *Spo11* 基因的表达[23]。

总之,本研究成功从草海鲫鱼中克隆得到 *Spo11* 基因,并对它编码的 SPO11 蛋白氨基酸序列的同源性进行分析,预测了该蛋白的理化性质和结构特点;同时本研究还发现一定剂量的 NP 浸浴处理可明显上调草海鲫鱼 *Spo11* 基因表达,表明环境内分泌干扰物 NP 对鱼类 *Spo11* 基因表达存在一定影响。

参考文献：

[1] INAGAKI A, SCHOENMAKERS S, BAARENDS W M. DNA double strand break repair, chromosome synapsis and transcriptional silencing in meiosis[J]. Epigenetics Official Journal of the DNA Methylation Society, 2010, 5(4): 255.

[2] OZAKI Y, MIURA C, MIURA T. Molecular cloning and gene expression of *Spo11* during spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B, 2006, 143(3): 309-314.

[3] PASQUIER J, CABAU C, NGUYEN T, et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: the Phylo Fish database[J]. Bmc Genomics, 2016, 17(1): 368.

[4] 尚婉婧，罗凤，罗廷文，等. 尼罗罗非鱼 *Spo11* 基因的克隆表达及 RU486 处理对其表达的影响[J]. 水生生物学报，2016，40(2)：403-407.
SHANG W J, LUO F, LUO T W, et al. Molecular cloning and expression analysis of *spo11* gene and expression change under RU486 treatment in Nile tilapia[J]. Acta HydrobiologicaSinica, 2016, 40(2): 403-407.

[5] DACHS J, RY D A V, EISENREICH S J. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson river estuary[J]. Environmental science and technology, 1999, 33(15): 2676-2679.

[6] DONG C D, CHEN C W, CHEN C F. Seasonal and spatial distribution of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in the sediment of Kaohsiung Harbor, Taiwan[J]. Chemosphere, 2015, 134: 588-597.

[7] KANNAN K, KEITH T L, NAYLOR C G, et al. Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in fish, sediment, and water from the Kalamazoo river, Michigan[J]. Archives of Environmental Contamination & Toxicology, 2003, 44(1): 77-82.

[8] LIBER K, KNUTH M L, STAY F S. An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experimental littoral ecosystem[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, 18(3): 357-362.

[9] KINNBERG K, KORSGAARD B, BJERREGAARD P. Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*[J]. Marine Environmental Research, 2016, 50(1): 169-173.

[10] LEE C C, JIANG L Y, KUO Y L, et al. Characteristics of nonylphenol and bisphenol A accumulation by fish and implications for ecological and human health[J]. Science of the Total Environment, 2015, 502: 417-425.

[11] ASIFA K P, CHITRA K C. Effects of nonylphenol-induced oxidative stress in ovary of cichlid fish, *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795)[J]. 2016, 58: 11-15.

[12] CAREGHINI A, MASTORGIO A F, SAPONARO S, et al. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surfacewater, sediments, andfood: a review[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2015, 22(8): 5711-574.

[13] SAYED A E, HAMED H S. Induction of apoptosis and DNA damage by 4-nonylphenol in African catfish (*Clariasgariepinus*) and the antioxidant role of *Cydonia oblonga*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 139: 97.

[14] SHARMA M, CHADHA P. Study on DNA damaging effects of 4-nonylphenol using erythrocytes from peripheral circulation, gill and kidney of fish *Channa punctatus*[J]. Journal of Environmental Biology, 2016, 37(2): 313-318.

[15] THOMAIDI V S, STASINAKIS A S, BOROVA V L, et al. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study[J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 283: 740-747.

[16] 刘晓聪，赵元莙，张金叶. 瓶囊碘泡虫 HSP70 基因的克隆、鉴定及功能预测[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版)，2016，33(2)：37-42.
LIU X C, ZHAO Y J, ZHANG J Y. Cloning, identification and functional prediction of heat shock protein 70 gene in *Myxobolus ampullicapsulatus*[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2016, 33(2): 37-42.

[17] ARNOLD K, BORDOLI L, SCHWEDE T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.

[18] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling[J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714-2723.

[19] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic AcidsResearch, 2003, 31(13): 3381-3385.

[20] YEH H Y, LIN S W, WU Y C, et al. Functional characterization of the meiosis-specific DNA double-strand break inducing factor SPO-11 from *C. elegans*[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2370.

[21] SHARMA M, CHADHA P. 4-Nonylphenol induced DNA damage and repair in fish, *Channa punctatus* after subchronic exposure[J]. Drug and Chemical Toxicology, 2016, 40(3): 320-325.

[22] ZHAO Y, WANG C, XIA S, et al. Biosensor medaka for monitoring intersex caused by estrogenic chemicals[J].

Environmental Science and Technology, 2014, 48(4): 2413-2420.

[23] MIURA C, HIGASHINO T, MIURA T. A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish1[J]. Biology of Reproduction, 2007, 77(5): 822-828.

Animal Sciences

Cloning, Bioinformatic, and Expression Analysis of *Spo11* Gene of Crucian Carp in Caohai Lake of Guizhou Province

DONG Ranran, CHEN Xiuyun, WANG Gangyi, LÜ Changqian

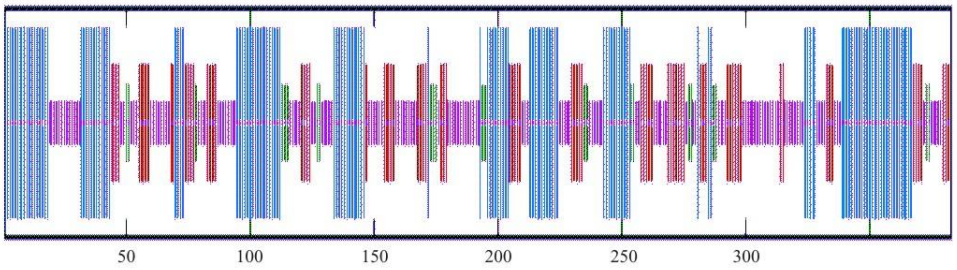
(College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: [**Purposes**]To explore the effect of environmental hormone Nonylphenol (NP) on the *Spo11* gene expression of the crucian carp (*Carassius auratus*) in Caohai lake of Guizhou Province. [**Methods**] The cDNA of *Spo11* gene was cloned by PCR in crucian carp. And its physico-chemical properties and structure characteristics were analyzed by bioinformatics. *Spo11* gene expression were detected after the fish were treated with NP mass concentrations of 0, 25, 50, and 100 $\mu g \cdot L^{-1}$ for 28 days. [**Findings**] It was shown that the sequence of *Spo11* gene was 1 471 bp (GenBank ID: MF66470) in length, containing 66 bp 5′UTR, 1 152 bp ORF, and 253 bp 3′UTR. The predicted molecular weight was 43.23 kDa, and the value of PI was 6.89. Proteins are mainly made up of leucine, serine and valine. And the protein is an unstable hydrophilic protein containing signal peptide. Its secondary structures were shown to be mainly α-helix and random coil. Compared with the control group, the relative expression of *Spo11* gene were significantly higher in medium and high concentration groups after NP treatment ($p<0.05$). [**Conclusions**]It is shown that the environmental endocrine disruptor nonylphenol can affect the *Spo11* gene expression of crucian carp in Caohai lake of Guizhou Province.

Keywords: crucian carp in Caohai lake of Guizhou Province; *Spo11* gene; gene cloning; bioinformatics; nonylphenol

(责任编辑 方 兴)

（接正文27页）



注：蓝色，α-螺旋；红色，延伸链；橙色，无规则卷曲；绿色，β-折叠

图 3　蛋白质二级结构预测图
Fig. 3　Protein secondary structure prediction

（接正文28页）

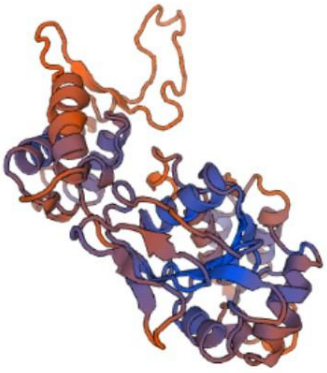
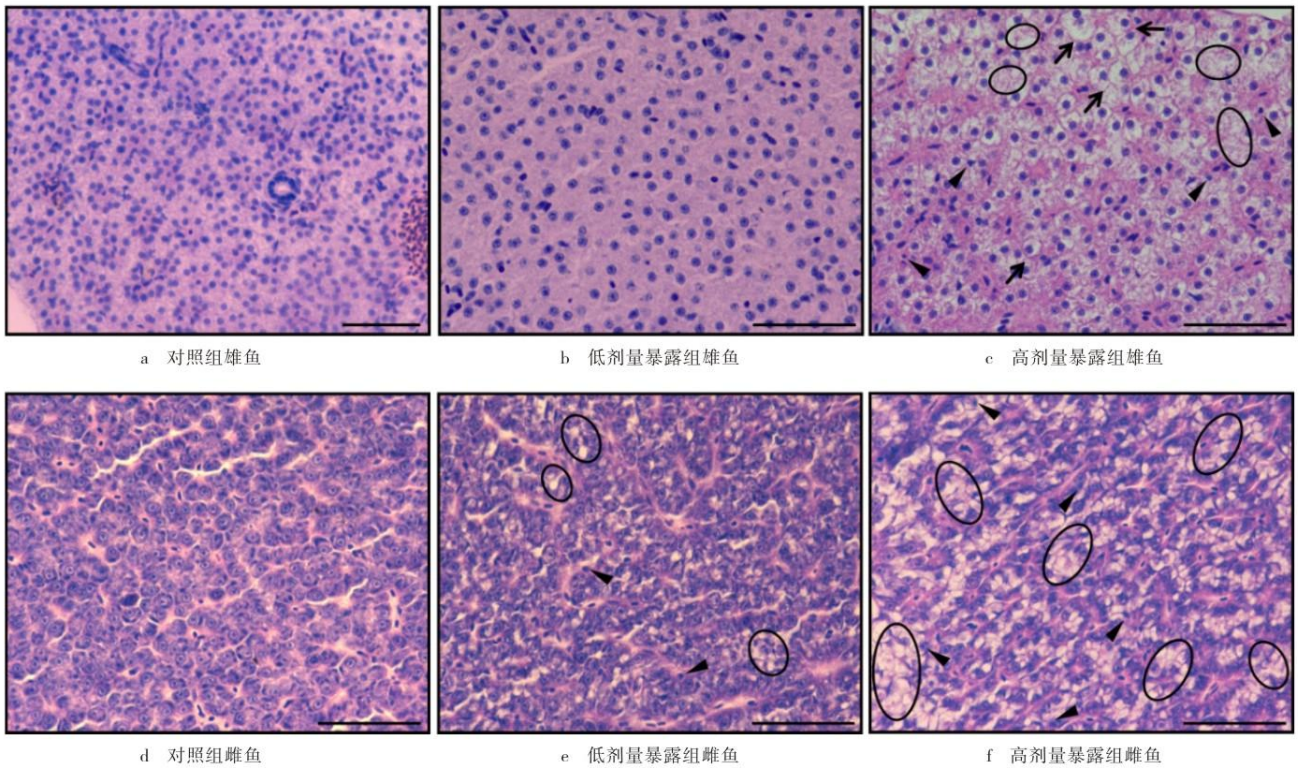


图 4　SPO11蛋白质空间结构预测图
Fig. 4　SPO11 protein space structure prediction

（接正文32页）



a　对照组雄鱼　　b　低剂量暴露组雄鱼　　c　高剂量暴露组雄鱼

d　对照组雌鱼　　e　低剂量暴露组雌鱼　　f　高剂量暴露组雌鱼

注：箭头处为肝细胞肿大核偏离，三角处为核固缩，椭圆处为空泡化，标尺为50 μm

图 1　镉暴露对斑马鱼肝脏组织学的影响
Fig. 1　Effects of cadmium exposure on histology of liver in zebrafish

（接正文37页）

注：红色、绿色和黄色部分分别表示在水库上游、中游和下游的“之”字形调查轨迹；蓝色部分表示整个航段的探测轨迹

图 1　调查轨迹示意图
Fig. 1　Schematic diagram of survey track

（接正文38页）

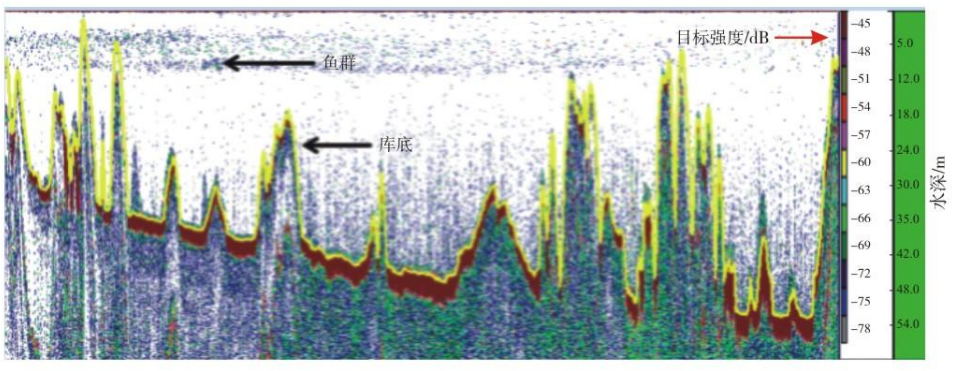


图 2　全航段的水声学探测回波图像
Fig. 2　Underwater acoustic detection echo image of full segment