

单环刺螠 *Vasa* 基因的早期发育表达图式

林娜¹, 霍继革², 王航宁¹, 邵明瑜¹, 张志峰^{1*}

(1. 中国海洋大学海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛市食品药品监督管理局, 山东 青岛 266071)

摘要: *Vasa* 基因编码 DEAD-box 家族成员中一种 ATP 依赖的 RNA 解旋酶, 是决定生殖系发育的重要调控因子之一。采用同源克隆策略及 SMART-RACE 技术, 克隆了海洋经济螠虫动物单环刺螠 *Vasa* 基因的全长 cDNA, 该序列长 4 080 bp, 开放阅读框 2 322 bp, 编码 733 个氨基酸, 具有 DEAD-box 蛋白家族共有的全部 9 个保守域。整体原位杂交和半定量 RT-PCR 结果显示, *Vasa* 基因在未受精卵、受精卵、2~8 细胞的早期胚胎中均有明显的表达, 显示其母源性提供的特点; 从囊胚开始, 表达量明显降低, 在原肠胚表达信号主要集中在内中胚层细胞中; 至担轮幼虫, 表达信号进一步集中在消化道处; 当发育至体节幼虫时, 阳性细胞分布于消化道和体节的隔膜处, 进入蠕虫状幼虫, 信号仅在头部的腹刚毛附近以及后肠周围的细胞中表达。实验结果为探知刺螠动物生殖系的起源和分化以及低等型生殖腺的发生提供重要的数据。

关键词: 单环刺螠; *Vasa*; 克隆; 半定量 RT-PCR; 原位杂交; 早期发育

中图分类号: Q 786; S 917

文献标志码: A

Vasa 基因编码 DEAD-box 家族成员中一种 ATP 依赖的 RNA 解旋酶^[1-3], 广泛存在于从原核生物的细菌到真核生物的酵母、植物和动物中。1986 年在果蝇中首次发现 *Vasa* 基因, 并证明是果蝇腹节形成和生殖细胞发育过程所必须的成分之一^[4]。Yoon 等^[5]首次使用 *Vasa* 基因研究了斑马鱼原生殖细胞 (primordial cells, PGCs) 的起源、迁移和分化。由于该基因仅在大多数物种的生殖细胞中特异表达 (水螅、蜗牛及沙蚕等也在全能性细胞中表达^[6-8]), 因此, *Vasa* 基因的表达产物已成为公认的 PGCs 和生殖细胞的通用标记分子, 并被广泛使用^[9-10]。

单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 俗称“海肠子”, 隶属于螠虫动物门 (Echiura) 的无管螠目 (Xenopneusta), 刺螠科 (Urechidae), 刺螠属 (*Urechis*), 主要分布于俄罗斯、朝鲜半岛、我国的黄渤海和日本北海道、本洲等海区, 也是无管螠目

在我国沿海分布的唯一种类^[11]。因有极高的营养价值^[12-13]和潜在的药用价值^[14]以及在改善底质质量中的作用^[15], 近年来备受关注。面临资源需求量剧增的现状, 开展该物种育苗及养殖技术开发的研究势在必行。然而, 有关单环刺螠生殖腺以及生殖系分化的数据有限, 尤其是生殖腺在何时何地发生、生殖干细胞又是如何分化等生殖生物学基本信息目前尚不清楚。本研究采用同源克隆策略及 SMART-RACE 技术, 克隆了单环刺螠 *Vasa* 基因的全长 cDNA 序列; 采用半定量 RT-PCR 和整体原位杂交技术, 对其在卵子发生和胚胎发育过程中的表达进行了分析。旨在揭示单环刺螠个体发育过程中 *Vasa* 基因的表达图式, 探讨其生殖腺的起源和分化, 为单环刺螠生殖腺的发生、人工繁育以及丰富其生殖生物学研究等提供理论基础。

收稿日期: 2011-03-01 修回日期: 2011-11-04

资助项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (200804230015)

通讯作者: 张志峰, E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

成体单环刺螈购自青岛市四方路海产品市场,产地为莱州海区。实验用各期胚胎及幼虫由本实验室培养获得。选择生殖期的雌、雄个体,解剖,从肾管中获取成熟两性生殖细胞,体外人工授精,受精卵经 3 次洗卵后转入 50 cm × 30 cm × 30 cm 的培养箱中充气培养。水温为室温(16 ~ 20 ℃),pH(7.9 ± 0.05),盐度为(29 ± 1)。每隔 1 ~ 2 天换水 1 次,每次换水量不超过原体积的 1/2。至担轮幼虫(约 48 h)开始投喂单胞藻[小球藻(*Chlorella* sp.)、金藻(*Chrysophyta* sp.)],每天早晚各投喂 1 次。体节幼虫后转入含泥沙底质的水缸中,底质厚 6 cm,培养密度为 0.2 ind/cm²。Olympus BH-2 型显微镜下观察单环刺螈的发育,定期取卵母细胞(用注射针管从体腔液中抽取分离)、受精卵、2 细胞、4 细胞、8 细胞、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、体节幼虫、蠕虫状幼虫和幼螈(体长 5 mm)等各期样本^[16],一部分于液氮中速冻后,保存于 -80 ℃ 冰箱,用于提取总 RNA;另一部分于 4% 多聚甲醛中固定 16 h(4 ℃),梯度脱水后,保存于无水甲醇中(-20 ℃),用于整体原位杂交。担轮幼虫以后采集的样本需空胃 2 d 方能收集。

DNA 酶 I、RNA 酶抑制剂、*rTaq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体以及 *Hae* III 和 *Taq* I 限制性内切酶均购自大连保生物公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。M-MLV 反转录酶、dNTP 购自 Promega 公司。SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒购自 Clontech 公司。*Eco*R I、*Hind* III、*Bam*H I、*Xho* I 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司。DIG RNA Labeling kit(SP6/T7)、DIG Nucleic Acid Detection kit 购自 Roche 公司。胶回收试剂盒购自上海生物工程公司。大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞为本实验室保种。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

取上述单环刺螈各期样本,按照分子克隆实验指南的方法提取总 RNA^[17]。所有的 RNA 样本均用 RNA-free 的 DNA 酶 I 消化,纯化后的 RNA 经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测其质量后,参考 M-MLV 反转录试剂盒说明将总 RNA 反转录为 cDNA,-20 ℃ 保存。

1.3 全长 cDNA 序列的获得

采用同源克隆策略,根据已报道的果蝇(*Drosophila melanogaster*)、太平洋牡蛎(*Crassostre gigas*)、斑马鱼(*Dario rerio*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)以及小鼠(*Mus muscculus*)等物种的 *Vasa* 基因 cDNA 序列,选择保守性高的位点设计简并引物 VPF, VPR1, VPR2(表 1);M13 引物选用通用序列。以单环刺螈成熟卵母细胞第一链 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因片段。PCR 反应体系为 20 μL,循环参数:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 1 min,55、56、57 ℃ 分别退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测回收后,与 pMD18-T 载体连接,并转化到 *E. coli*-DH5α 感受态细胞中。挑取阳性克隆进行测序(上海博亚公司),将测序结果与 GenBank 核酸数据库中的已知序列作 Blast X 同源性分析。

表 1 引物序列
Tab.1 Sequences of primers

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence
VPF	ATGGCNTGYGCNCARACNGG
VPR1	AARCCCATRTCYARCATNCTGTC
VPR2	AARCCCATRTCYARCATNCGATC
M13-(47)	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-(48)	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA
VGSP1	GAGAAAGCACTGCCTTCAACACCATGC
VGSP2	GGAGGGACATCAGTTCGCCATCAGC
VRT1	GGACATCAGTTCGCCATCAGC
VRT2	GGGAGAGGAAAGATGCCAAGTAG
AF	TGGCATCACACCTTCTACAACGA
AR	AGCCAGGATAGAGCCACCGA
VS	CCCAAGCTTCTAGCAGTTACGGTACG
VA	TAAGGGGAATTCCAACACAATCAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGA
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA

根据已获得的单环刺螈 *Vasa* 基因的部分 cDNA 序列,分别设计 5' 及 3' RACE 特异引物 VGSP1, VGSP2(表 1)。按照 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒说明,从单环刺螈卵细胞中分别扩增该基因 cDNA 的 3' 和 5' 端序列。PCR 参数分别为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,66.9 ℃ 1

min, 72 °C 3 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min (3' 端序列)。94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min (5' 端序列)。克隆程序和测序同“整体原位杂交”。

1.4 目的基因的核酸序列特征和氨基酸序列系统进化分析

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; 用 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 程序分析同源蛋白质序列之间的相似性和趋异进化程度; 采用 Clustal W 程序和 MEGA 3.1 软件, 以邻位相连法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树。

1.5 半定量 RT-PCR 分析

根据已获得的单环刺螠 *Vasa* 全长 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物 VRT1 和 VRT2 (表 1), 用引物 AF 和 AR (表 1) 扩增的单环刺螠 β -actin 基因 (GenBank 登录号: GU592178) 片段作为内参照, 检测 *Vasa* 基因在上述各样本中的表达情况。PCR 程序为 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 59 °C 50 s, 72 °C 50 s, 23 个循环; 72 °C 延伸 10 min。实验重复 2 次。

1.6 整体原位杂交

探针制备 根据单环刺螠 *Vasa* 基因全长 cDNA 序列, 选择 5' 端设计 RNA 探针引物 VS、VA (表 1), PCR 扩增获得产物长 493 bp (2430 - 2922)。PCR 参数为 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。按照 DIG RNA Labeling kit (SP6/T7), 以上述扩增片段作为模板合成地高辛标记的正义和反义 RNA 探针。

胚胎和幼虫的整体原位杂交 无水甲醇中保存的样品经梯度甲醇复水, PBT (PBS, 0.1% Tween-20) 洗 3 次, 蛋白酶 K (50 ng/mL) 37 °C 消化 20 min, 60 °C 预杂交 6 h, 然后于含有探针的杂交液中 60 °C 过夜。使用抗地高辛碱性磷酸酶复合物检测杂交信号 (DIG Nucleic Acid Detection kit, Roche), 并于 Nikon E80i 显微镜下观察和拍照。

2 结果

2.1 目的基因的全长 cDNA 序列特征

RACE 扩增产物经纯化、克隆、测序和片段拼

接, 获得目的基因的全长 cDNA 序列。该序列长为 4 080 bp, 包括 5'UTR (untranslated region, 非编码区) 322 bp, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 2 322 bp, 编码 733 个氨基酸, 3'UTR 1 436 bp, 含有 30 个碱基的 poly (A) 尾, 且在 poly (A) 尾上游 18 bp 处可见单一的 poly (A) 加尾信号序列 AATAAA (图 1)。推导的氨基酸序列具有 DEAD-box 家族蛋白共有的 9 个保守基序: AQTGSGKT、PTRELV、GG、TPGR、DEAD、SAT、LVFVE、ARGLD 和 EFPRPTPIQ。在非保守区域, 该基因的氨基酸序列同样与其他物种的 VASA 蛋白具有很多结构相似性: 其 N 末端存在 4 个 RGG 重复序列和 1 个甘氨酸 (glycine, G) 富集区 (前 243 个氨基酸残基中甘氨酸占 34%), RGG 重复区在许多昆虫和脊索动物 VASA 相关蛋白的 N 末端区域普遍存在^[18-19], 在人 hnRNP U 蛋白中显示该重复区可结合 RNA^[20], 因此 VASA 相关蛋白中的 RGG 重复域也被认为是 RNA 结合区域; 上述结果初步表明, 本实验获得的 cDNA 序列编码单环刺螠的 VASA 蛋白, 并被命名为 *Uu-Vasa*。

2.2 序列比对及系统进化分析

拼接后的单环刺螠全长 cDNA 经 Blast X 分析, 发现该序列与褐家鼠 (*Rattus norvegicus*), 非洲爪蟾, 斑马鱼, 果蝇, 沙蚕 (*Platynereis dumerilii*), 太平洋牡蛎, 海鞘 (*Ciona intestinalis*) 的 *Vasa* 基因具有较高的相似性, 相似度分别为 58%、56%、60%、55%、59%、58%、54%。

由所构建的 NJ 系统进化树可见 (图 2), 本实验中 *Uu-VASA* 氨基酸序列与 VASA 亚家族成员的进化关系明显近于 DEAD-box 的另外两个亚家族成员 (PL10 和 P68 亚家族蛋白), 进一步表明该 cDNA 编码的蛋白质就是单环刺螠 VASA 蛋白, 而非其他 DEAD-box 亚家族蛋白。此外, 单环刺螠 VASA 蛋白在进化树中的进化地位与其生物学分类地位是相一致的。

2.3 RT-PCR 分析 *Uu-Vasa* 的发育表达特点

半定量 RT-PCR 检测结果显示, 单环刺螠 *Vasa* 基因在体腔液中的各期未成熟的生殖细胞、成熟的卵细胞、受精卵、2 细胞、4 细胞、8 细胞、囊胚、原肠胚、担轮幼虫、体节幼虫、蠕虫状幼虫及幼螠等发育阶段均有程度不同的表达 (图 3)。在卵母细胞发生过程中, 以近成熟期个体中的卵母细

胞表达量最高,卵母细胞成熟后表达下降;在个体发育过程中,以卵裂期胚胎(尤其是8细胞胚)的表达最高,至囊胚开始减弱,并在担轮幼虫中表达

量最低;之后的体节幼虫、蠕虫状幼虫和幼螈中的表达量又稍有增强。

```

1  acgccccgactgtgagccgattgtcaaacggagacacacctctctgactactatcaagaggagcgaacctctctctcaagtggatgcccagaatgatgactcg
106 gattgtgtgataacaagatagtaaaagccgcaactgaagttttgtggagcgaacctctctctcaagtggatgcccagaatgatgactcggtatgtgtgatagt
211 actacgccacgctccgttccgttgaacaaaatcggtgaagcgcgagaagtgttgaggctcttctacagaattattagtcgaagcgaatttggcgaaaaccag
1  M G H W G D I P G G S G G S G S G G G F G S S G L E S R Q S D F R
316 cgctagcATGGGGCACTGGGGTGATATCCCGGGGGTCTGGTGGCTCTGGCTCTGGGGGGTGGTTTGGATCAAGTGGTTTGAATCAAGGCAGTCTGATTTTAG
34 F G E T D S I D N K L R G F G R G R A R G G K T A I S V V G F E S S G
421 ACCTGGTGAACAGACTCAATAGACAATAAAT TACGAGGCTTCGGTCGGGTCGGCCCGAGGGGTAAAAACCGCGATAAGTGGTGGGGTTTGAAGTAGTGG
69 C E F G S G G G F G G G Q S N G F N D N N N N K G F D G E E S K R Y G
526 CTGTGAATTTTGGCAGCGGAGGAGGTTTGGCGGTGGTCAGAGTAAACCGCTTCAATGACAATAACAATAACAAGGGATTITGATGGAGAAGATCCAAACGATACGG
104 E G D L G A C G G G F Q S S G W G G G G R G S R D G A F G G S S G G G G
631 AGAGGGTGACTTAGGAGCTTGTGGTGGAT TCCAAAGCAGTGGTGGGGGGTGGGGGTAGGGGTAGTCGTGATGGAGCATTGGAGGCAGTGGTGGAGGTGG
139 G D S R G G G F R G R A G D G G G S R G G G F G G S D G G F R G R V G
736 TGGTACAGTCCAGTCCAGGATTTAGAGGCCGTGGTGGGAGCGTGGGGGAGTCGAGGTGGAGGATTTGGAGGCAGTATGGAGGATTTAGAGGCCGTGGTGG
174 D N E G R R G G G F G G S G G G G G S R A C F K C G E E G H M S R D C
841 GGACAATGAAGGCCGTCCAGTGGAGGATTCGAGGCAGTGGTGGAGCGGAGGCTCCCGTCCCTGCTTCAAAATGTCGCAAGAAAGACACATGTCGAGAGACTG
209 P S G G G G G A S R P S S G A P I N S E I G G I G R N G G R C G G G K
946 CCCCAGTGGAGGAGCGGTGGTCCCTACGTCACGTCAGTAGTGGGGCCCCATCAATAGTGAATCGCGGCGATTGGTCGAAATGGAGCAGCATGTGGTGGTGAAA
244 D P G C H K C G E L G H F A R E E P K A M A Y G E K P K E I Y I P F E
1051 AGATCCCTGGCTGCCACAAGTGGAGAACTTGGCCATTTCGCCGTGAATGTCCAAAGCGGATGGCTACGGTGAGAAACCCAAAGAGATCTATATACCCCTGTA
279 P S N I E E E I F M H S M E K G I N F N K F D D I P V E C S G M D P P
1156 GCCATCTAATAT TGAGGAAGAGATATTCATGCTATCCATGGAGAAGGGCATTAACTTTAAACAAGTTTGATGACATCCCTGTGGAATGCTCCGGTATGAGACCCCC
314 S S G I Q R F E Q M E L N E I M K R N I V H A G Y D R P T P I Q K W A
1261 TTCATCTGGCATTCAGAGGTTTGAGCAGATGGAGTTGAATGAGATCATGAAAAAGGAACATCGTTCATGCTGGCTATGACCGTCCTACCCCATTCAGAAATGGGC
349 I P S I L A G R D I M A C A Q T G S G K T A A F L V P V L T S M I E H
1366 CATCCCCAGTATCTTGGCTGGCAGAGATATCATGGCATGCGCCAGACAGCTCTGGCAAACTGCAGCCITCCTTGTGCGCTGTTCTGACCAGCATGATAGAGCA
384 G V E G S A F S E I Q E P Q A I V G P T R E L V V Q T F N E A R K F
1471 TGGTGTGAAGGCAGTGTCTTCTCAGAGATCCAGGAGCCCCAGGCCATCGTGGTGGGCCCACTCGGAGCTCGTGTGTCAGACGTTCATGAAGCAGGAAGT
419 S Y D T M I K P V V V Y G G I S V R H Q L S M V A S G A H I V M G T P
1576 TTCTACGACATATGATCAAGCCGTGGTAGTATATGGAGGACATCAGTGGCCATCAGCTGTCTATGGTGGCAAGTGGAGCTCACATTGTGATGGGACACCC
454 G R L I D F I E K K I G L K K V R Y L V L D E A D R M L D M G F L P
1681 TGGCCGTCTGATAGATTTCATTGAAAAGGGCAAGATTGGTTTTCGGGAAGGTACGTACTCTGGTACTCGATGAGCTGACCCGATGCTGGACATGGGCTTCTTTCGC
489 T I K Q I V E I F G M P G K T E R Q T I L M F S A T F P P E E I Q K L A Q
1786 CACCATCAAGCAAAATTGTGAGACTTTTGGAAATGCCITGGCAAACTGAGAGACAGACACTTATGTTTCTGCGACCTTCCCGCAAGAGATCCAGAAAGCTGGCTCA
524 E Y L N N Y L F V I V G R V G G A N T D I E Q V V H P V P T F E K R D
1891 GGAGTACCTGAACAACCTACCTGTTTGACTGTTGGTCTGTGGGGGGGCTAATACCGACATAGAACAGGTGGTCCACCCCGTGGCAACATTGAAAAAGGAGA
559 K L V S I L N Q I G T D R I L V F V R E K R Q A D Y L A S F L S Q S E
1996 CAAATCGTCAACATATGAACAGACAGGTACAGATAGGACGCTGGTGGTAAAGAGAAAAGACAGGCTGACTACTTGGCATCTTTCCTTCCAGTCAGA
594 F P T T S I H G D R E Q R Q R E E A L A D F T S G R A P I M V A T S V
2101 GTTCCCAACCAACGACATCCACGGTGACCGTGAGCAGAGGCAGCGAGAAGAGCCCTGGCTGACTTCAAGCGGCGGTGCTCCCATCATGGTGGCGACGCTGTG
629 A R G L D I P D V K H V I N F D M P S E I D E Y I H R I G R T G R C
2206 AGCTGCCCGGGGCTCGATATCCCGGATGTCAGCATGTTATCAATTTCGACATGCTCTTCAAAATCGATGAATAATATCCACCTATTTGGCCGACATGGTGGTG
664 G N L G K A T S F F N P E S D G A I A R G L V K K L E E A Q Q V V P A
2311 TGGAAACCTGGGCAAGCCACAGCTTTCTTCAACCCAGAAAAGTGACGGGGCTATTGCAAGAGGTCTTTGTAAGAAAGTTGGAGGAGGCCAGCAAGTGGTGGCTGC
699 F L E E A A A S S Y G T G G F T G G G G R F G S K D T R K F G G G G G
2416 CTTCTGGAGGAAGCTGCCGTAGCAGTTACGGTACGGGTGGATTACCTGGAGGTGGAGGTGCAATTGGCAGCAAGGATACTCGCAAGTTTGGAGGTGGAGGAGG
734 D N F N G G G G N F G G G G G N S N G F G G G S M G G F G G G G G G E A
2521 AGATAACTTTAACGGAGGTGGGGTAACTTTGAGGCGGTGCAACAGTAATGCAATTGGCGGAGGCAGTATGGTGGATTGGAGGGGAGGAGGTGGTGAAGC
769 D E D W D *
2626 CGATGAAGACTGGGATAGatgctgtcactgtaccgctctcttacaacacattgctgctttgggtgaattgacggacttgatttgagcaattgttgggttgaga
2731 gctgtcttttcacagctctcgtgctcttggaaagctccacgtgtgtgtttactgtgttTcgattctgttttaggttattaaacattcacttacagctgacagatg
2836 tagatcaattacaaagatggcaagtggtggaactgtgtcttattcttaccgactcagaacaacgctgattgtgttggaattcaaccttacagctggcattgatgaag
2941 ccagtgattattggaactggtcagtgaaatgctgaaggagctggtatgaatggacacctcaattgtgtgtgttagtttggtagcccatgctgttaggaatggat
3046 cctattttcgtgctgctgtgattagcatatgactcttcaatgtgacccgaagcatcgttctgctacgacggccttccgtctttgttagcaacaagaaga
3151 aactttcgtagaaaattctgtggaactattagtgattgacatgaataggacatttcaatgtcaactggatgattaaaaacctgttgaaagcataggtaca
3256 actacggcaatgcaacaatgaatgctgggctcaagtcagggttttagggcacttgcaaatgtgtaattgcagcagtgcaacattgttgagttgggacgggt
3361 atgggacacaacttgagttgaatagatgtatcttgatcaagctgtgttaagcaagtagagataacgcattctgaagcagctgagacctgtgtgttactgtcog
3466 aggttagggttaggagcaatgatcaatgaagacccggcatgatgtttgaaggcaattaccgggttgaaagtgaatttggttagacgtaccocatccatggtg
3571 atacatagaagatctgctcttctgatttagggaccaagttcgtggccagtttaccacccatgtgtgttctgcttactgttactgtgcaaatctacatccatgtg
3676 cccaagtctttcattccaagtgcacaaagtgtacctttgttttgaggaaagcaggagcctagagttgctccaattgaattgtttcattgattacaagctgata
3781 tatttttgtactgtttgtttattttgtcttgactatagctgtgaagggttaagtagtctgacattccatgttatgttctctgagatatacttaccgtgggt
3886 gaccactaccatgaacccgttccaaactattatgctatctgtgtttgtttgtctcatggaactttgaggaggttaagatgtgtagttttaattgtgatttg
3991 gccatgtgtgtatgtgatgaatccactgcaaatgaacgtaataaaacttattctatctaaaaa

```

图1 单环刺螈 *Vasa* 基因全长 cDNA 核酸序列及其编码的氨基酸序列

cDNA 顺序为 5'-3'; 黑色箭头为正、反向简并 PCR 引物; 红色/绿色箭头分别为 5'/3'RACE 引物; 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAG 及末端加尾信号 aataaa 显示为红色字符; DEAD-box 家族蛋白的 9 个保守结构域用黑色框标出; N 末端 RGG 重复和 G 位点分别用粉色框和下划线标出。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the *U. unicinctus Vasa* full-length cDNA

The cDNA is listed from 5' to 3', forward and reverse primers are represented by right- and left-pointing arrowheads, respectively. The suggested start codon ATG, stopcodon TAG and putative polyadenylation signals are indicated in red letters. The nine well-conserved motifs of the DEAD-box protein family are boxed in black. Glycine(G)-rich region in N-terminal are underlined. Arginine-glycine-glycine motifs are highlighted with pink boxes.

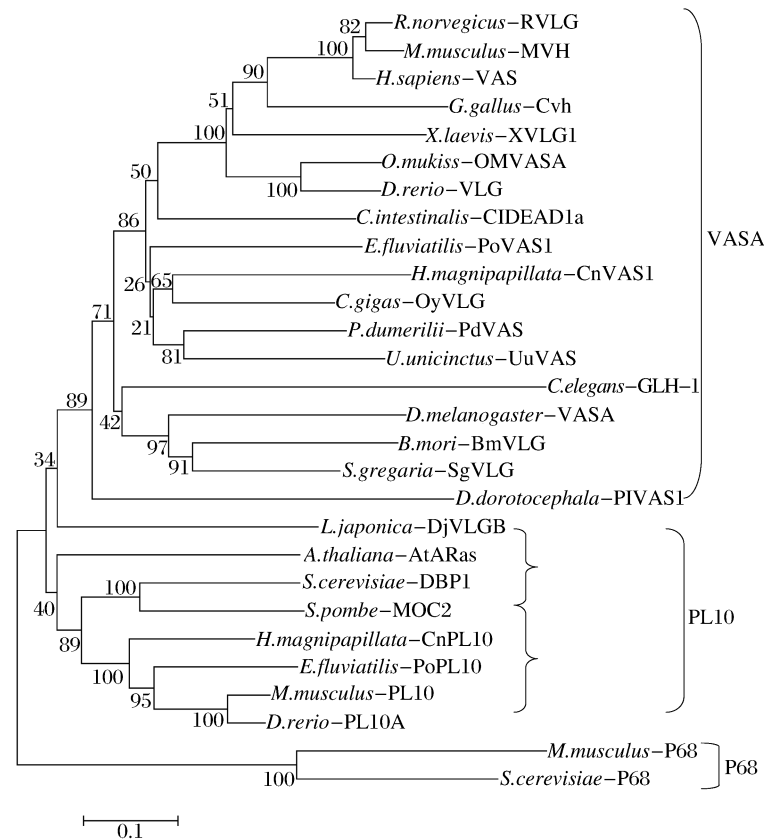


图2 DEAD-box 中的3个亚家族蛋白(VASA、PL10、P68)的系统进化树

采用 Clustal W 程序和 MEGA 3.1 软件,以邻位相连法构建系统进化树。物种的蛋白同源性(%)如图所示。各蛋白的基因登录号如下:RVLG(褐家鼠;AAB33364),MVH(小鼠;BAA03584),VAS(人类;AAF86585),CVH(红原鸡;BAB12337),XVLG1(非洲爪蟾;BAA36711),OmVasa(虹鳟;BAA88059),VLG(斑马鱼;CAA72735),CIDEAD1A(玻璃海鞘;BAA36711),PoVAS1(淡水海绵;BAB13310),CnVAS1(水螅;BAB13307),OyVLG(太平洋牡蛎;AAR37337),PdVAS(沙蚕;CAJ38803),GLH-1(线虫;P34689),VASA(黑腹果蝇;P09052),BmVLG(家蚕;BAA19572),SgVL(蝗虫;AAO15914),PIVAS1(三角涡虫;BAB13313),DjVLGB(海带;BAA34994),AtARas(拟南芥;AAD23001),DBP1(酿酒酵母;NP015206),MOC2(裂殖酵母;BAA25324),CnPL10(水螅;BAB13306),PoPL10(淡水海绵;BAB13309),PL10(小鼠;AAA39942),PL10A(斑马鱼;CAA73349),P68(小鼠;CAA46581),P68(酿酒酵母;CAA36874)。

Fig.2 Phylogenetic analysis of the VASA-, PL10- and P68-related proteins from three DEAD-box proteins sub-families

Sequence alignment was realized using Clustal W and MEGA 3.1. From this alignment a distance based phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining (NJ) algorithm. The Bootstrap probabilities(%) are shown on each branch. GenBank Accession No. of proteins are indicated below. RVLG (*Rattus norvegicus*; AAB33364), MVH (*Mus musculus*; BAA03584), VAS (*Homo sapiens*; AAF86585), CVH (*Gallus gallus*; BAB12337), XVLG1 (*Xenopus laevis*; BAA36711), OmVasa (*Oncorhynchus mykiss*; BAA88059), VLG (*Danio rerio*; CAA72735), CIDEAD1A (*Ciona intestinalis*; BAA36711), PoVAS1 (*Ephydatia fluviatilis*; BAB13310), CnVAS1 (*Hydra magnipapillata*; BAB13307), OyVLG (*Crassostrea gigas*; AAR37337), PdVAS (*Platynereis dumerilii*; CAJ38803), GLH-1 (*Caenorhabditis elegans*; P34689), VASA (*Drosophila melanogaster*; P09052), BmVLG (*Bombyx mori*; BAA19572), SgVL (*Schistocerca gregaria*; AAO15914), PIVAS1 (*Dugesia dorotocephala*; BAB13313), DjVLGB (*Laminaria japonica*; BAA34994), AtARas (*Arabidopsis thaliana*; AAD23001), DBP1 (*Saccharomyces cerevisiae*; NP015206), MOC2 (*Schizosaccharomyces pombe*; BAA25324), CnPL10 (*Hydra magnipapillata*; BAB13306), PoPL10 (*Ephydatia fluviatilis*; BAB13309), PL10 (*Mus musculus*; AAA39942), PL10A (*Danio rerio*; CAA73349), P68 (*Mus musculus*; CAA46581), P68 (*Saccharomyces cerevisiae*; CAA36874).

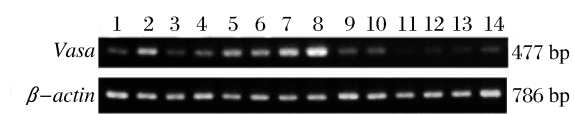


图3 RT-PCR 检测 *Vasa* 不同发育阶段的表达
1. 非生殖期个体体腔液中的早期卵母细胞; 2. 生殖期个体体腔液中的生长期卵母细胞; 3. 生殖期个体肾管中的成熟卵母细胞; 4. 非生殖期个体体腔液中的生殖细胞团; 5. 受精卵; 6. 2-细胞; 7. 4-细胞; 8. 8-细胞; 9. 囊胚; 10. 原肠胚; 11. 担轮幼虫; 12. 体节幼虫; 13. 蠕虫状幼虫; 14. 幼螈。

Fig.3 Temporal expression of *Vasa* RNA in different developing stages by RT-PCR
1. Early oocyte in coelomic fluid during non-reproductive stage; 2. Vitellogenic oocyte in coelomic fluid during reproductive stage; 3. Mature oocyte in nephridial canal during reproductive stage; 4. Germ cell mass in coelomic fluid during non-reproductive stage; 5. Fertilized eggs; 6. 2-cell; 7. 4-cell; 8. 8-cell; 9. Blastula; 10. Gastrula; 11. Trochophore; 12. Somite larva; 13. Worm-like larva; 14. Juvenile.

2.4 整体原位杂交检测 *Uu-Vasa* 在单环刺螈胚胎和幼虫中的表达

与 RT-PCR 检测结果类似,单环刺螈的未受精卵、受精卵、各期胚胎和幼虫中均检测到了 *Uu-Vasa* mRNA 分布(图 4)。

原位杂交结果显示,阳性信号均匀分布在未受精卵、受精卵以及囊胚期以前的各期胚胎细胞的胞质中(图 4-1~5),至原肠胚期,杂交信号主要集中于原肠胚的内中胚层细胞中(图 4-7)。发育至担轮幼虫,杂交信号进一步集中在消化道处(图 4-8)。伴随着体节的产生,担轮幼虫发育成为体节幼虫,此时阳性信号除了继续分布于消化道周围细胞外,在体节隔膜处也出现少量表达细胞(图 4-9)。受精后 40 d,虫体纤毛环及体节消失,变态为蠕虫状幼虫。此时,阳性信号在消化道的大部分区域和体节隔膜处消失,仅在头部腹面腹刚毛附近的体壁内侧以及后肠周围的细胞中表达(图 4-10~12)。

3 讨论

本研究采用同源克隆的策略,首次从螈类动物中克隆得到了 *Vasa* 基因。同源分析表明该基因编码的蛋白质与哺乳动物、两栖类、鱼、昆虫以及一些无脊椎动物的 *VASA* 氨基酸序列均具有较高的相似性;该基因编码的氨基酸序列除具有

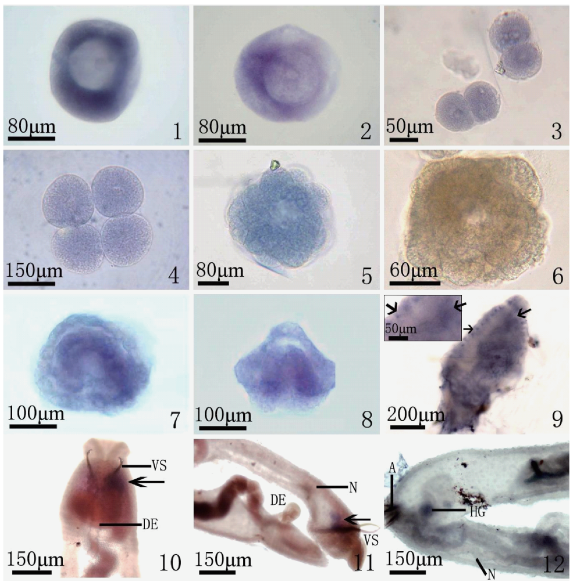


图4 原位杂交检测 *Uu-Vasa* mRNA 在单环刺螈胚胎及幼虫中的表达

Uu-Vasa mRNA 阳性信号呈现蓝色。1. 未受精卵;2. 受精卵;3. 2-细胞;4. 4-细胞;5. 多细胞;6. 早期原肠胚阴性对照;7. 原肠胚;8. 担轮幼虫;9. 体节幼虫;10. 蠕虫状幼虫的头部(腹面观);11. 蠕虫状幼虫(侧面观);12. 蠕虫状幼虫尾部(侧面观)。VS:腹刚毛;OE:食道;N:腹神经索;A:肛门;HG:后肠。

Fig.4 Expression pattern of *Uu-Vasa* mRNA in *U. unicinctus* embryos and larvae by in situ hybridization

The positive signals of *Uu-Vasa* mRNA are in blue. 1. unfertilized egg; 2. fertilized egg; 3. 2-cell; 4. 4-cell; 5. multi-cell; 6. early gastrula as negative control with sense probe; 7. gastrula; 8. trochophore; 9. somite larvae; 10. the front region of worm-like larvae(ventral view); 11. the front region of worm-like larvae(lateral view); 12. the caudal region of worm-like larvae(lateral view). VS:ventral seta; OE:oesophagus; N:ventral nerve cord; A:anus; HG:hind-gut.

DEAD-box 家族共有的 9 个保守基序之外,还具有一些 *VASA* 亚家族专一性的特征结构;系统进化树分析结果显示,该基因编码的氨基酸序列属于 *VASA* 亚家族成员,而与 DEAD-box 其他亚家族蛋白(如 PL10,P68)的亲缘关系较远。上述分析验证均表明,本实验已成功地克隆了单环刺螈 *Vasa* 基因的全长 cDNA 序列。

有学者在 DEAD-box 亚家族系统进化分析过程中发现,*Vasa* 相关基因与动物的 PL10 相关基因进化关系最近,其次才同酵母和植物的 PL10 相关基因形成分支,因而认为 *Vasa* 亚家族基因起

源于 *PL10* 家族基因,同时指出酵母和部分植物的基因组中未鉴定出 *Vasa* 相关基因的存在,从而推测更古老的生物中不存在 *Vasa* 基因^[6]。但在本实验中构建的系统进化树显示,*VASA*、*PL10* 和 *P68* 亚家族成员均各成一支,前两者的进化关系比较近,表明 *DEAD-box* 家族成员之间具有较高的同源性,但同一亚家族中各成员的进化关系更为紧密。系统进化树同时显示,*Vasa* 基因在进化过程中具有较高的保守性,在许多后生动物中均鉴定出它的存在,表明 *Vasa* 基因在后生动物的生命活动中发挥着重要的作用。

对 *Vasa* 基因表达的研究发现,许多物种(如斑马鱼、果蝇、沙漠蝗虫等^[21-23]) *Vasa* 基因的表达在胚胎发育早期由母源性提供,之后随着胚胎发育的进行,才逐渐开启 *Vasa* 的合子表达。本实验利用半定量 RT-PCR 和原位杂交技术均检测出 *Vasa* 基因在单环刺螠两性生殖细胞及早期胚胎中有明显地表达,说明单环刺螠早期胚胎中 *Vasa* 基因的表达是由母源性提供的;RT-PCR 显示,从受精卵至 8 细胞胚期表达呈明显增强趋势,推测受精后逐步启动了 *Vasa* 的合子表达;囊胚期和原肠胚的表达有所减弱,到担轮幼虫表达量极其微弱,之后的发育阶段又逐渐增强,推测产生这种差异的原因,一方面可能是母源性产物完全消耗,个体中仅靠合子基因表达提供,且表达量由少渐增;另一方面也可能是由于随着发育,胚胎中表达 *Vasa* 基因的细胞在个体总细胞数中的比例逐渐减少所致,后者一定程度上可由原位杂交结果所证实。

本实验原位杂交结果显示,随着发育 *Vasa* 阳性信号越来越集中地在少数细胞中表达,如从原肠胚的内中胚层细胞渐集中到担轮幼虫和体节幼虫的消化道周围细胞中分布,并于蠕虫状幼虫仅在身体的前部(头部腹刚毛)和后部(后肠)定位,其中在后肠处的定位,与性腺发生部位相近^[24],推测个体发育至蠕虫状幼虫时,原始生殖细胞已抵达生殖嵴周围。在 5 mm 幼螠中,阳性信号集中在头部腹刚毛及尾部后肠附近,而信号在后肠的位置与未来性腺发生的位置相近。

由 *Uu-Vasa* mRNA 在单环刺螠中的发育表达图式可见,*Uu-Vasa* mRNA 在发育至晚期幼虫(蠕虫状幼虫)时才特异性的定位在未来生殖腺将发生的地方,尽管目前没有足够的证据显示此

处表达目的基因信号的细胞就是原生殖细胞或其前身,但根据该标记分子在单环刺螠发育至幼虫晚期才特异性定位,推测单环刺螠生殖细胞的起源可能为后成模式。

有学者发现在水螅和涡虫中,*Vasa* 基因除了特异性的表达在生殖系细胞中之外,还在一些多潜能的体细胞中大量表达^[6-8]。Oyama 等^[25] 也报道,*Vasa* 基因在环节动物寡毛纲中的颤蚓(*Tubifex tubifex*)未来体节组织和生殖系中表达;在沙蚕中也有类似的表达,*Vasa* 基因除在生殖系中表达外,在中胚层带、后生长带中也有表达^[8]。上述表达 *Vasa* 基因的体细胞的共性是都具有强烈的增殖能力和分化潜能,所以有学者认为 *Vasa* 对保持干细胞分化全能性和再生性有一定作用。本实验对单环刺螠 *Vasa* 基因发育表达图式的研究发现,*Uu-Vasa* 的表达特点与环节动物该基因的表达图式类似,两者的 *Vasa* 基因除了在生殖系中特异表达外,还在体节组织细胞中表达。单环刺螠体节幼虫的体节数量往往表现为在较短的时间内(1 周)快速增加,体长大幅度的延伸(由 240 μm 伸长至 900 μm),表明该处细胞分裂旺盛,推测单环刺螠 *Uu-Vasa* 在此期的大量表达也暗示其可能参与了体节组织细胞的分化过程。但由于单环刺螠与环节动物后期发育模式的不同(前者在一个短暂的体节幼虫之后,体节消失,而后者终生保持分节状态),致使二者在后期的 *Vasa* 基因表达图式不同。

参考文献:

- [1] Lasko P F, Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene *Vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A [J]. *Nature*, 1988, 335: 611-617.
- [2] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *Vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases[J]. *Cell*, 1988, 55(4): 577-587.
- [3] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(3): 232-241.
- [4] Schüpbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo [J]. *Development Genes and Evolution*, 1986, 195(5): 302-317.
- [5] 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 (16):3157-3166.
- [6] Mochizuki K, Nishimiya-Fujisawa C, Fujisawa T. Universal occurrence of the *Vasa*-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra* [J]. *Development Genes and Evolution*, 2001, 211:299-308.
- [7] Shibata N, Umesonon Y, Orii H, *et al.* Expression of *Vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of Planarians [J]. *Developmental Biology*, 1999, 206:73-87.
- [8] Rebscher N, Zelada-González 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 dumerili* [J]. *Developmental Biology*, 2007, 306:599-611.
- [9] Fabious C, Stephane P, Frederique L, *et al.* The oyster *Vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315 (4):897-904.
- [10] 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 Expression Patterns*, 2005, 5(5): 669-678.
- [11] 李凤鲁,王玮,周红. 黄渤海螠虫动物(螠虫动物门)的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1994, 24(2): 203-210.
- [12] 杨桂文,安利国,孙忠军. 单环刺螠营养成分分析[J]. 海洋科学, 1999, 6:13-14.
- [13] 李诺,宋淑莲,唐永政,等. 单环刺螠体壁氨基酸组分与含量的分析[J]. 齐鲁渔业, 2000, 17(5): 26-27.
- [14] 刁勇,局海亮,许瑞安. 单环刺螠抗血栓组分的分离纯化和药效学研究[J]. 中国生化药理学, 2007, 28(3):199-200.
- [15] Kang K H, Zhang Z F, Kim J M, *et al.* Effects of *Urechis unicinctus* juveniles on chemical characteristics of organically contaminated coastal sediment [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2010, 9(1):48-52.
- [16] 康庆浩,郑家声,金在敏. 单环刺螠的人工苗种生产研究 I. 水温对胚胎发育及幼体培育的影响 [J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2):273-278.
- [17] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等(译). 北京:科学出版社, 2002.
- [18] Raz E. The function and regulation for *Vasa*-like genes in germ-cell development [J]. *Genome Biology*, 2000, 1(3):1017. 1-1017. 6.
- [19] Noce T, Fujiwara Y, Ito M, *et al.* A novel murine zinc finger gene mapped within the twl18 deletion region expresses in germ cells and embryonic nervous system [J]. *Developmental Biology*, 1993, 155 (2): 409-422.
- [20] Kiledjian M, Dreyfuss G. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box [J]. *European Molecular Biology Organization*, 1992, 11:2655-2664.
- [21] Koen-Braata A, van-de-Water S, Goos H, *et al.* *Vasa* protein expression and localization in the zebrafish [J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 95: 271-274.
- [22] Tanaka S, Toyooka Y, Akasu R, *et al.* The mouse homologue of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells [J]. *Genes and Development*, 2000, 14:841-853.
- [23] Chang C C, Dearden P, Akam M. Germ line development in the Grasshopper *Schistocerca gregaria*: *Vasa* as a marker [J]. *Developmental Biology*, 2002, 252:100-118.
- [24] 王航宁,邵明瑜,张志峰. 单环刺螠 (*Urechis unicinctus*) 精巢年周期发育及精子发生 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(5):1189-1195.
- [25] Oyama A, Shimizu T. Transient occurrence of *Vasa*-expressing cells in nongenital segments during embryonic development in the oligochaete annelid *Tubifex tubifex* [J]. *Development Genes Evolution*, 2007, 217:675-690.

Developmental expression pattern of *Urechis unicinctus* *Vasa* gene

LIN Na¹, HUO Ji-ge², WANG Hang-ning¹, SHAO Ming-yu¹, ZHANG Zhi-feng^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education,

Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Qingdao Food and Drug Administration, Qingdao 266071, China)

Abstract: The *Vasa* gene encoding an ATP-dependent RNA helicase protein member of the DEAD-box family, is one of the important regulatory factors which determines the germline cells development. In the present study, homolog cloning strategy and SMART RACE technique were used to isolate and clone the *Vasa* gene of *U. unicinctus*, a sole commercial species of Xenopenusta. The full length of the *Vasa* cDNA sequence is 4 080 bp, comprising an open reading frame (ORF) of 2 322 bp encoding a polypeptide of 773 amino acids, sharing nine conserved motifs of all DEAD-box family proteins. Phylogenetic analysis showed the deduced amino acids sequence contributes to the VASA-relate proteins. The temporal expression analysis of *Vasa* mRNA using RT-PCR and *in situ* hybridization techniques indicated *Vasa* mRNA was present in unfertilized eggs, fertilized eggs and 2 – 8 cell embryos, suggesting a maternally-provided characteristic. The expression level decreased obviously at blastula stage, and kept the low level from blastulas to worm-like larvae and juveniles. *In situ* hybridizations showed that *Uu-Vasa* mRNA is distributed equally in the cytoplasm of early embryos from unfertilized egg, fertilized egg to blastula. At gastrula stage, *Uu-Vasa* mRNA concentrated on endoderm and mesoderm of gastrula. In rtochophore, the *Vasa* positive signals are located in cells of alimentary canal. During the somite larvae, the hybridization signals appear in the cells of body segment membrane and alimentary canal. When developing to worm-like larvae, *Un-Vasa* is detected in abdominal bristle of the head region and posterior region of intestine. The location of positive signals in the posterior region of intestine is coincident with that of gonad in the future, and it was deduced that *U. unicinctus* gonad maybe initializes to form in worm-like larva. Our results provide primary data to generate new insight into the origin and differentiation of germ cells as well as the gonad genesis and differentiation in *U. unicinctus*.

Key words: *Urechis unicinctus*; *Vasa*; clone; semi-quantitative RT-PCR; *in situ* hybridization; early development

Corresponding author: ZHANG Zhi-feng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn