

文章编号: 1000-0615(2018)12-0001-13

DOI: 10.11964/jfc.20170410777

金钱鱼三种卵黄蛋白原亚型基因克隆及其在类雌激素处理后的mRNA表达

吴迪¹, 吴美琴², 苏冒亮¹, 仲勇¹, 王武¹, 张俊彬^{1*}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306)

摘要: 111为了解雌激素诱导金钱鱼卵黄蛋白原(Vtg)基因合成的分子机制, 本研究采用反转录PCR (RT-PCR)法与cDNA末端克隆(RACE)法克隆得到金钱鱼卵黄蛋白原3种亚型(*vtgAa*、*vtgAb*、*vtgC*)的cDNA序列全长。*vtgAa* cDNA全长5360 bp (GenBank登录号: KY676847), 编码1696个氨基酸; *vtgAb* cDNA全长5346 bp (KY654346), 编码1699个氨基酸; *vtgC* cDNA全长4244 bp (KY676848), 编码1275个氨基酸。基于氨基酸序列的同源性分析表明, 金钱鱼VtgAa、VtgAb和VtgC与美洲狼鲈的相似性最高(分别为83%、85%和85%)。金钱鱼VtgAa和VtgAb具有卵黄蛋白原完整的脂磷蛋白和高磷蛋白结构域: 卵黄脂磷蛋白重链(LvH)、卵黄脂磷蛋白轻链(LvL)和卵黄高磷蛋白(PV), 而VtgC缺少PV结构域。类雌激素17 α -ethynylestradiol (EE2)腹腔注射后金钱鱼的肝脏*vtg* mRNA表达水平显示, 3种亚型中, *vtgAb*在肝内高水平表达, *vtgAa*、*vtgC*在肝内表达量相对较低。肝脏中*vtgAb* mRNA表达量在注射后72 h达到最高值, 而96 h后表达量明显降低。类雌激素EE2暴露金钱鱼肝原代细胞经EE2暴露后, *vtgAb* mRNA表达水平升高。我们推测EE2诱导了肝脏内*vtgAb*基因的表达。

关键词: 金钱鱼; 卵黄蛋白原; 17 α -ethynylestradiol; 活体内实验; 离体实验; 表达分析
中图分类号: S 917 文献标志码: A

卵黄蛋白原(vitellogenin, Vtg)是卵黄蛋白的前体, 其生成是通过下丘脑—垂体—性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴激活雌激素受体来实现^[1]。卵生脊椎动物的卵可以储蓄大量卵黄。卵黄的主要成分是被称为雌性血清蛋白的卵黄蛋白原, Vtg是卵黄发生的关键性物质, 是一种重要的生殖蛋白, 在卵生动物的生殖、发育等生命过程起重要作用。该蛋白是一类大分子量的糖脂复合蛋白, 含有1%~14%的糖类, 6%~16%的脂类和约84%的氨基酸^[2]。

雌性性成熟期, 下丘脑和垂体分泌的激素进入血液, 刺激滤泡细胞分泌卵黄促进激素—雌二醇(17 β -estradiol, E2), E2经血液循环到达

肝脏, 与肝细胞核膜上的激素受体(estrogen receptor, ER)结合, 形成E2-ER复合体, 识别并结合卵黄蛋白原基因上的启动子序列(雌激素反应元件: ERE), 介导基因转录表达, 合成卵黄蛋白原。合成的卵黄蛋白原通过血液循环输送到卵巢, 为卵细胞和胚胎发育提供营养^[3]。

目前研究已证明Vtg是一个蛋白家族, 在脊椎动物卵母细胞内的主要水解产物为卵黄脂磷蛋白重链(lipovitellin heavy chain, LvH)、卵黄高磷蛋白(phosvitin, PV)和卵黄脂磷蛋白轻链(lipovitellin light chain, LvL)^[3]。近年来有学者按照其功能对Vtg做了更细致的划分(VtgAa、VtgAb、VtgC、VtgAo、VtgAe、VtgAB和VtgAB-

收稿日期: 2017-04-05 修回日期: 2017-05-25

资助项目: 科技部“中国—东盟海水养殖中心”重大国际合作项目

通信作者: 张俊彬, E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

CD等),其中VtgAa和VtgAb在卵细胞中水解程度不同,二者都具有完整的PV结构,VtgC结构中则缺乏PV结构或PV结构不完整^[4]。

对中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*)的研究发现,雌鱼性腺发育过程中,II期卵巢个体血清E2的含量最低,III期卵巢个体E2的含量开始上升并在IV期卵巢个体E2的含量达到高峰^[5],E2的含量变化与整个发育时期肝组织内vtg含量的变化规律相一致。而外源雌激素或类雌激素能诱导未成熟期雌性动物体内Vtg大量表达^[6],根据这一特性Vtg除了可作为判断性腺成熟的一个指标外,也可通过检测鱼体内的Vtg/vtg表达量来评价外源性雌激素物质的影响^[7, 8, 9]。

金钱鱼(*Scatophagus argus*)属鲈形目(Perciformes),为广盐性亚热带鱼类,是我国东海和南海常见的优质经济鱼类。本研究以人工养殖金钱鱼为实验对象,采用RACE技术克隆得到金钱鱼Vtg 3种亚型vtgAa、vtgAb、vtgC基因的cDNA序列,并通过将金钱鱼进行腹腔注射17 α -ethynylestradiol (EE2)(Sigma, USA)以及对金钱鱼肝细胞EE2暴露处理,对vtg mRNA在不同激素浓度和处理时间的活体内、离体表达水平进行研究,该研究为进一步阐明金钱鱼卵黄蛋白原在生殖调控中的分子机制奠定基础。对金钱鱼卵黄蛋白原基因及其结构的分析,有助于预测雌鱼的性成熟时间,从而对金钱鱼的人工繁殖有着非常重要的理论意义;对类雌激素诱导金钱鱼合成卵黄蛋白原的研究,对其作为生物标志物评价外源性雌激素的污染有着广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用金钱鱼取自广东珠海养殖基地,体质量(9.0 \pm 0.27) g,性腺成熟系数0.11%~0.27%(性腺重/体质量 \times 100%),暂养于实验室循环水养殖系统中。水温控制在(27 \pm 1) $^{\circ}$ C,光周期14:10(光照:黑暗)。暂养2周后,取实验鱼125尾,根据注射浓度分组,每25尾为1组,共4组。另取25尾作为空白对照组。

1.2 腹腔注射EE2

EE2粉末(Sigma, USA)10.0 mg溶于10.0 mL无水乙醇,配制浓度为1.0 mg/mL母液。实验分

为4个浓度梯度进行腹腔注射,分别为:0.01、0.1、1.0和10.0 μ g/g(OECD标准)^[10]。对照组使用相同剂量无水乙醇进行注射。注射后分别在24、48、72和96 h采集肝脏和性腺组织,肝脏样品通过液氮迅速冷冻,-80 $^{\circ}$ C保存备用。性腺样品通过波恩氏液固定保存,用于组织学观察。

1.3 总RNA的提取和cDNA合成

使用Trizol Reagent提取肝脏样品总RNA。用琼脂糖电泳检测RNA的完整性,用Nanodrop 2000对RNA浓度进行测定,1.0 μ g RNA为模板,以Oligo d(T)16作为接头引物,合成cDNA第一链。合成的cDNA于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 金钱鱼卵黄蛋白原序列克隆

通过NCBI数据库,检索硬骨鱼类vtg基因序列。通过同源性比对,选择保守区域设计简并引物,用于中间片段扩增。PCR反应体系为25.0 mL:2.5 μ L 10 \times buffer、2.5 μ L MgCl₂、1.0 μ L dNTP(2.5 mmol/L)、上游和下游引物各0.5 μ L(10.0 μ mol/L)、0.3 μ L Taq酶(5.0 U/ μ L)和1.0 mL模板,以ddH₂O补充至25.0 μ L。扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性45 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min 30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。PCR产物经切胶回收后,连接到pGEM-T Easy(Promega, USA)载体,转化至大肠杆菌DH5 α (天根生物,上海),使用蓝白斑筛选方法,挑选阳性克隆,经鉴定后测序(生工生物,上海)。

根据已得到的中间片段序列设计RACE引物(表1),参照SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, USA)试剂盒说明书进行两端扩增。首先按照试剂盒的体系合成5'-RACE-Ready cDNA和3'-RACE-Ready cDNA,-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。分别使用2种cDNA作为模板,以GSP1及为引物UPM(试剂盒内提供)进行扩增,扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性30 s,68 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸4 min,25个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。用第1轮PCR产物为模板,上游巢式引物NGSP1和NUPM(试剂盒内提供)为引物进行巢式PCR扩增。扩增条件:94 $^{\circ}$ C预变性30 s,68 $^{\circ}$ C变性30 s,72 $^{\circ}$ C延伸4 min,25个循环;72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。将获得的PCR产物连接到pGEM-T Easy载体,转化至大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆进行测序(生工生物,上海)。3'端克隆使用引物为GSP2和

表 1 实验用引物序列

Tab. 1 Primer sequences for PCR

引物 primers	序列 sequences (5'-3')
VtgAa F	ACTGYKWCWGGTCTKCCNATGGAGCT
VtgAa R	AGCTTCTCYGCASCCTTWGGKCC
VtgAb F	TTCTKGAGKTYGGAGYSMGADCTG
VtgAb R	GCAGCWGYRAGRYCYTCMACATYT
VtgC F	TWMRGCCVYTGSTGRAHATGG
VtgC R	AKYCCHTCHGSRGRAYACC
VtgAa GSP1	CCTGGACCTTGGCTCTTGAGACTATGG
VtgAa NGSP1	CCTTGGCTCTTGAGACTATGGCAGC
VtgAa GSP2	CGACCTCATCTGGAAAACACCAACAC
VtgAa NGSP2	GCTGGCTTTACATCTTCCATTGCTCTC
VtgAb GSP1	GCAGGAACGATTGTGTAACCTCTGGCTC
VtgAb NGSP1	TGGAAGTTCTCAGGCAGAGGTGG
VtgAb GSP2	ACGCCTACTTGAGAAGCCTTGCC
VtgAb NGSP2	CTGCTGGAGTTGGGTATCCGTGC
VtgC GSP1	AAGGCGGGCTTGTGGCGGGCAG
VtgC NGSP1	CCTTCAGCACGGATACCCAACCTCC
VtgC GSP2	TGGGAACGCAGGTCATCCAGGC
VtgC NGSP2	TTGCCACCTCGTGTGCTGAGTGC
VtgAa full F	GTATCAACGCAGAGTACATGGGGT
VtgAa full R	AGATAGGTGACTGACAGGACAAAAGTGTTA
VtgAb full F	ATGGGGACATTCACCAGCCATGAGGGT
VtgAb full R	GGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
VtgC full F	GTTTCACAAAGGATTTCTGGGT
VtgC full R	GTGGGAGAGGGACTGGAATAGC
VtgAa q-PCR F	TTTGCCACAATCTGCAGAGG
VtgAa q-PCR R	TCAAACCTGAGCTGCTTTGCG
VtgAb q-PCR F	ATTCCCATGACCTGCCAAG
VtgAb q-PCR R	AAAGCGCATTGCGAGATTC
VtgC q-PCR F	TGCAGGGTCAAAATCGTTGG
VtgC q-PCR R	TTTTCCCCGAAAGCCATTG
EF1-a q-PCR F	TGTGAAGCAGCTCATCGTTG
EF1-a q-PCR R	ATGTAGGTGCTCACTTCCTTGG

注: Y=C/T, K=T/G, W=A/T, M=A/C, S=C/G, R=A/G, D=A/T/G, V=A/C/G, H=A/T/C, N=A/G/C/T

UPM, 巢式PCR使用引物为NGSP2和NUPM, 方法与5'端相同。

1.5 序列分析

用MacVector将vtgAa、vtgAb和vtgC的中间片段、3' RACE和5' RACE测序所得序列进行拼接, 并通过设计全长引物克隆获得全长序列。通过NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行同源性分析, 使用ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>)确定开放阅读框(open reading frame, ORF)。利用在线工具SignalP 4.1Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测信号肽^[11]; 用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>)对所推测的蛋白质基本物理化学参数进行分析; 利用Mega 6.0软件采用邻位相连法(Neighbor-joining)结合Clustal X软件构建分子系统进化树。根据模式种斑马鱼(*Danio rerio*) Vtg蛋白结构域比对^[4], 对金钱鱼VtgAa、VtgAb和VtgC结构域进行预测。

1.6 EE2处理后金钱鱼vtg基因绝对定量分析

采用ABI 7500荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, USA)对金钱鱼3种亚型的vtg基因表达进行定量分析。以Elongation factor 1 α (EF1- α)为内参基因, 利用定量引物(表1)进行PCR扩增, PCR反应体系为(共20.0 μ L): SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)10.0 μ L, 上、下游引物(10.0 μ mol/L)各0.4 μ L, ROX II (50 \times)0.4 μ L, cDNA模板1.0 μ L, 用水补至20.0 μ L。二步法反应程序如下: (1)95 $^{\circ}$ C预变性30 s; (2)95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火34 s, PCR反应40个循环; (3)溶解曲线: 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 95 $^{\circ}$ C变性15 s)。实时荧光定量PCR (quantitative real-time reverse transcription PCR, qRT-PCR)数据用标准曲线绝对定量法处理分析, 表达量变化以平均值 \pm 标准误差表示。为确保qRT-PCR反应的准确性和可重复性, 每个样品均重复测定3次, 使用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。

1.7 金钱鱼性腺组织学染色

用新鲜配置的波恩氏液固定性腺组织, 采样时间点分别为24、48、72与96 h。固定好的性腺组织酒精梯度脱水后, 经二甲苯透明、石蜡包埋和石蜡切片(厚度5~6 μ m), 组织切片进行H.E染色, Nikon显微镜观察、拍照。卵巢发育分期参照崔丹等^[12]的方法。

1.8 金钱鱼肝细胞培养

参照酶消化法分离金钱鱼肝细胞^[13]。将金钱鱼用50.0 mg/L的MS-222 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)麻醉后从尾柄部抽去静脉血,在超净工作台中解剖取出肝脏。使用含有双抗(青霉素和链霉素各100.0 IU/mL)的PBS溶液对肝脏组织漂洗3次。将肝脏剪碎至1.0 mm³的小块,将剪碎的组织放入15 mL的离心管内,加入10.0 mL 0.25%的胰酶在28 °C条件下进行消化。100目筛网过滤,1000 r/min离心5 min收集细胞,弃上清液,在沉淀中加入培养液制成细胞悬液。计数细胞密度使其达到5×10⁵个/mL,台盼蓝染色,在光镜下计算肝细胞的产率和即时存活率。肝细胞在培养瓶中培养,每隔3~4 d更换培养液1次,培养温度为28 °C,CO₂浓度为2%。

1.9 EE2处理金钱鱼肝细胞

金钱鱼肝细胞使用含15%胎牛血清的M199培养基于28 °C条件下进行培养^[14],细胞培养2~3 d,待细胞长至50%~70%左右,采用0.25%含EDTA的胰蛋白酶消化细胞,进行传代。处理肝细胞的雌激素浓度梯度:10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶和10⁻⁵ mol/L^[15],分别在24、48、72和96 h时间点进行采样。

待肝细胞稳定生长至第3代时,使用0.25%含EDTA的胰蛋白酶消化、重悬细胞,充分吹打均匀后,取200.0 μL至1.5 mL的EP管内,台盼蓝染色,充分混匀后吸取20.0 μL至血细胞技术板上镜检计数。

根据细胞数量,将细胞接种于24孔板内(约5×10⁵个/孔),每孔培养液为1.0 mL。24 h后,换液50%继续培养。24 h后换液并向培养基中加入相应浓度的EE2。28 °C培养,对照组则加入相同剂量的无水乙醇。

2 结果

2.1 金钱鱼 vtg 基因序列分析

金钱鱼 vtgAa cDNA全长5360 bp,开放阅读框(ORF)为5091 bp (GenBank登录号为KY676847),共编码1696个氨基酸。预测金钱鱼 VtgAa蛋白分子量为186.07 ku,等电点为9.16,N端的前15个氨基酸为信号肽(图1)。金钱鱼 vtgAb的cDNA全长5346 bp,ORF为5100 bp

(KY654346),共编码1699个氨基酸。预测金钱鱼 VtgAb蛋白分子量为186.37 ku,等电点为9.24,N端的前15个氨基酸为信号肽(图1)。金钱鱼 vtgC的cDNA全长4244 bp,ORF为3828 bp (KY676848),共编码1275个氨基酸。预测蛋白分子量142.87 ku,等电点6.43,信号肽为N端前15个氨基酸(图1)。通过斑马鱼 VtgAa2(NP_001038378)的蛋白结构比对预测金钱鱼 Vtg的蛋白结构(图2),结果显示金钱鱼 VtgAa和 VtgAb均含有卵黄蛋白原完整结构:LvH、PV和LvL,而 VtgC结构中则缺乏PV结构。

2.2 VtgAa、VtgAb和VtgC氨基酸同源性分析

根据NCBI GenBank中查找同源序列,利用CLUSTAL X对金钱鱼的氨基酸序列进行比对,金钱鱼 VtgAa与美洲狼鲈(*Morone americana*)同源性较高为83%,与真鲷(*Pagrus major*)的同源性为81%,与大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的同源性为76%,与斑马鱼同源性为55%(表2)。金钱鱼 VtgAb与美洲狼鲈同源性较高为85%,与真鲷的同源性为82%,与大黄鱼的同源性为84%,与斑马鱼同源性为57%(表2)。金钱鱼 VtgC同样与美洲狼鲈同源性较高为85%,与真鲷的同源性为83%,与大黄鱼的同源性为79%,与斑马鱼同源性为49%(表2)。

2.3 金钱鱼性腺组织学观察

根据金钱鱼性腺发育情况,将卵巢分为四个不同的发育时期^[12]。石蜡切片结果显示本实验所用金钱鱼性腺均处于I期(图4),为发育过程中的未成熟期。此阶段生物E2本底低,可以保证外源性激素实验结果的可靠性。

2.4 EE2处理后肝脏 vtg mRNA 表达分析

根据本实验肝脏qRT-PCR分析结果显示,在不同的采样时间及不同剂量的EE2注射条件下,金钱鱼 vtgAb基因表达均高于其他两种亚型,且预实验结果表明 vtgAb基因在表达水平和对雌激素诱导敏感度上均为最高,故选取 vtgAb作为 mRNA表达水平检测的主要基因(图5)。

根据腹腔注射EE2后肝脏组织内 vtgAb的qPCR结果显示,EE2处理浓度为1.0 mg/g和10.0 μg/g时, vtgAb的mRNA表达水平较高,而在浓度为0.01和0.1 mg/g时mRNA表达水平较低(图6),其中 vtgAb在剂量为10.0 μg/g时的mRNA表达水平均显

著升高 ($P < 0.05$)。在表达时间上: 24 h 时 *vtg* Ab 表达水平较低, 48 和 72 h 时表达量逐渐升高并在 72 h 达到最高, 在 96 h 时表达量呈下降趋势。

2.5 EE2 处理后肝细胞 *vtg* Ab mRNA 表达分析

将分离得到的肝细胞进行原代培养至第 3 代后使用 EE2 暴露处理 (图 7)。金钱鱼肝细胞内 *vtg* Ab 基因的表达量在 EE2 暴露浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} 、

10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 时表达量较高, 其中 10^{-5} mol/L 时的表达量低于 10^{-6} mol/L 的表达量 (图 8)。而在 EE2 暴露浓度为 10^{-11} mol/L 时, 表达量最低。*vtg* Ab 基因从 24 h 开始表达, 随后逐渐升高并在 72 h 时达到最高, 在 96 h 时表达量下降至低于 48 h 表达量。

由于 II 期鱼体内激素含量为发育期内最低^[6], 无法诱导 *vtg* 的大量合成, 故经过 EE2 处理的肝细

SsVtgAa	MRVVVLALTL AIVAGQHHL VPEFTAGKTY MYKYETLILG GLPEESLAKV GLKVSSKVL I	60
SsVtgAb	MRVLVLALAV ALTAGYQVSF APEFAAGRTY VYKYEAF LMG GLPEEGLARA GVKVRSKVI	60
SsVtgC	MRG LLLCCLV ALGTSQIVHY ELN LNP K KTY EYK YEGMVNF GLGMPNLAES GVRMTCRVKI	60
SsVtgAa	STAAENIYML KLVEPELYEF SGIWPKDPLI PATKLSTALA TQLVTPIKFE YASGVVGKVF	120
SsVtgAb	SASSADTFML KLVEPEIFEY SGIWPKDAFI PASKLTSALA AQLLTPIKFE YANGVVGKVF	120
SsVtgC	VGASAQTFIL QVSDLA FE EF NGFPKNGFN ASPKLTQRIA AQLVKPFMFG YYSGHISDIR	120
SsVtgAa	APEGTSTMVL NIYRGILNVL QLNKKTQNV YELQEVGAQG VCKTLYAITE DEKTGRILLT	180
SsVtgAb	APAGVSATVL NIYRGILNIF QLNKKTQNV YELQEPGAQG VCMTHYVISE DAKADRIVLT	180
SsVtgC	APEDISDTVV NIVRGILDF QVTVKTTTHRI YELEDIGIHG KCQSTYATEE NIETKEMTIT	180
SsVtgAa	KTRDLNHCQE KIMKDMGLAY TEKCAKQQD SKNLK GATS Y NYILKPVASG VLILEAAVNE	240
SsVtgAb	KTKDMNRCQE RIFKDIGLAY TERCVECEAR GKTLKGA AAF NYIMKPAATG SLILEATATE	240
SsVtgC	QVIDINGCRE KAAMYRGMAT AVLDNVSQRQ GESIISTVRY VYTVKPTAEG GLITRAHGLE	240
SsVtgAa	LIQFSPPTM NGAAQM QTKQ SLVFLEIKRA PILPIEAQYL HRGSLKYEFS TELLQTP IQL	300
SsVtgAb	VIQFSPFNIL NGAAQMEAKQ ILTFVEVAKT PVHPISAEYL HRGSLQYEFG SELLQTP IQL	300
SsVtgC	RQHFSFPNVK GGSFKMEAMK EMALLSVSDT ARAVTFGPME SKGNLVYKVF NAEANVPIMM	300
SsVtgAa	IKINNVQAQI IEILN HMVTH NMERVHEDAP LKFLELIQLL RAARFEDLEM LWSQYRTKAA	360
SsVtgAb	LRISNAEAQI VEILNHLVTF NLAKVHEDAP LKFIELVQLL RVARFESIEA LWTQFKARAD	360
SsVtgC	QNLDDPVPKA IELIKHLAEA NKYQIDSATT EDTIKLYQLL RVVPYEGLEA MWKQFAGNEE	360
SsVtgAa	YRQWILDAIP AIGTPAVLRF IKEKFMVDDL TFAEAAQAF ASIQMTANT EAIKLIESLA	420
SsVtgAb	YRHWILNAV P AIGTHATLRF IKEKFLAGEL TIAEAAQALL ASVHMVTADL EAIRLAEGLA	420
SsVtgC	YRRWFLDMIV EVNDARILKF LEMRFQAADV SETEALETLL LSF DHLQAIP ELVEMAKTFL	420
SsVtgAa	VNSKVAEYPA LREIILLGYG TMISKYCAEM AVCPAELIRP IQDLLVEAVA KDETQDIILF	480
SsVtgAb	MHHKIQANPV LREIAMLGYG TLVAKFCAEN PTCPAELVRP IHELAVQAVA RGEIEALVLA	480
SsVtgC	NMPFSKSNTY LWHTVVLSYG SLVYKLCAYY TPCPVNAAQP LLDMALES LR NGNEADMVIT	480
SsVtgAa	LKVLGNAGHP TSIKPITKIL PIHGTAASL PTRAHVDAIM ALRN IARKEP SMIQELALQL	540
SsVtgAb	LKVLGNAGHP ASLKPIMKLL PGFGTAGASL PHRVHIDTAL ALRN IAKREP KMVQEI AVQL	540
SsVtgC	LKALGNAGHP GSIKTIMRFL PGVAATPVDL PPRVLSAAVQ SMRLIAARDP HSVQEITLSL	540
SsVtgAa	YMDKALHPEL RMLACIVLFE TRPAIGLVTT IANIVRREEN LQVASFY YSH MKSLRSTAA	600
SsVtgAb	FMDKALHPEL RMAAAIILFE TKLPMGLVTT LADALLKEAN LQVASFVY YS MKAMTKNTAP	600
SsVtgC	FLQKNLPPEI RMLAFMILFD TKPSLALVST VTAHLQEEKD LHVVSFAYAY LRSLSRNTP	600
SsVtgAa	IHAPIAAACN VAIKILSPRL GRLSLRFSKA IHMDVYNNPL MLGAAASAFY INDAATVLP R	660
SsVtgAb	DFASVAAACN VAVKILSPKF DRLSYRSRA FYFDAYQNPW MMGAAASAFY INDAATVMPK	660
SsVtgC	ENYFLSTACN VAVKILAPKF GHLSYRSKA MRMDWFNDFF LIGTATEFFM LRSATNVFPT	660
SsVtgAa	AVVAKTSAYL AGAAADVLEF GVRTEGLQEA LLKNPALNDN ADRMTKMKRV IKALSQRSL	720
SsVtgAb	AFVAKARTYL AGAYADVFEF GVRAEGVQEA LLKHQEAHEN VDRIAKMKQV MKALSEWRAN	720
SsVtgC	EIMMKGKFFI IGRILQLEL GIRAEGIKDL FGSSIPGFKG DLSFSDQAV FQV LQNWENL	720
SsVtgAa	PTNTPLASTY VKFFGQELAF ANIDKALIDQ AIALAT-SPS IQTMGKN AIR ALLSGASFHF	779
SsVtgAb	PSSPLASVY VKFFGQEI AF ANIDKAVDQ IIELAS-GPA VHTYGRKVL D AVLSGF AFHY	779
SsVtgC	PANKPAFSAY ARASGQEWFF ADINKEFIRS IIRAVSPSAG KESPLWAVIE NLQRGVSWHR	780
SsVtgAa	VKPVLA TEVR RILPTAAGLP VELSLYTA AV AAAAVQAKAT TTPALPENFL FAHLLKTDIQ	839
SsVtgAb	AKPMLVAEVR RILPTAVGLP MELS FYTA AV AAASVELQAT VSPPLPENFH AAQFLKSDIS	839
SsVtgC	TKPFLIFEAR FFQATTLGFP LEISKYYETI NGITVNAKAA VNPPMTERLG --ELLTSEIS	838
SsVtgAa	LETEIRPSVA VNTFAVMGVN TALIQAAMLS RAKFNSIVPA KIAARLN VNE GHFKFDPLVP	899
SsVtgAb	MRAAISPSVS MHTYAVMGVN TAFIQALLS RARVYIVPA KIEARIDMIK GNFKQFFPV	899
SsVtgC	VESDGF IGFT KDFWVYGVN TELFQCGSEF KSKIPLAIPW KFAAKINVRE KKFELDFPPC	898

SsVtgAa	YVPEHVAAVH	VETLAIARNI	EDLAAPRITP	LIPAQVMQPI	SLEALTSKIT	SSAAASLPQS	959	
SsVtgAb	QGVDKIASAL	VETFAVARNV	EDLAAAKFTP	VIPTPAT--	QLSRAASRMA	YSLAGEMSAS	957	
SsVtgC	KKEFELFSL	SNVYAVTRNS	AEPALAKMTP	IIPSAIDSND	EVVHRDAAVV	RPDSDQLLTP	958	
SsVtgAa	AEVVPVMAD	AKPTINRKA	QFEKKYCAKA	VAVGLKGLK	VATENAFAFIR	DIALYKLAGR	1019	
SsVtgAb	SEIIPIDLPR	KIVSKLKFPK	AFEKKMCAAF	ETLGIKACTE	IESRNAAFIR	DCPLYAIIGK	1017	
SsVtgC	NSWHP-----	-----	--RGKMCAAS	DIYGAGFCVE	SELKREYYHE	EYPLYYFLGS	1001	
SsVtgAa	HTVALSFTPI	EGEVIERLEM	EIQVGPKAAE	KLIKQISLSE	EE-VVEGRPV	LMKLRKILAP	1078	
SsVtgAb	HAVSVEVAPA	AGPVIEKIEI	EIQVGDKAAE	KIIKVINLSE	EEEILEDNRV	LMKLLKILVP	1077	
SsVtgC	TYMAFKVVPV	Q-----	---AIKAVD	KIHFEVNAGP	SRHPMSTRQL	LETLRRISKE	1048	
SsVtgAa	GLKSSSSSFS	SSSSS-SPSR	VSSRSSSSSS	ARVSSKAIDV	AVPTTRLY--	TSSISSRS-R	1135	
SsVtgAb	GLKNRTSASS	SSSSRSISS	ISSSSRSSL	SAASSLSSSS	SRSKSKMVDV	VAAVSKTSKR	1137	
SsVtgC	MTQGVHLSHD	S-----	-----	-----	-----	-----	1059	
SsVtgAa	SSSSSSSRL	SSRSVSRSS	TSSASSLAS	LFSASSSSSR	SSAHLRQVI	NRHKFQKNHK	1195	
SsVtgAb	VSSIFSSSSS	SRSSLRSKSS	SSASSSRSS	LLSSSRSSSS	SLSRSSALSK	YEMKFTKNI	1197	
SsVtgC	-----	-----	SSS	VRGSHSSHG	IVMEGWDSTP	-----	1082	
SsVtgAa	KQALISHATS	AAFSRSRSSA	SSFEAIYRRN	KFLGNEVAPT	FAIFRAVRA	DKMQGYQLA	1255	
SsVtgAb	HQ---HALS	TARANSKSSA	YSFEAIYNKA	KYLANAVTPA	VTLIRAVRA	DHKVQGYQIA	1253	
SsVtgC	-----	-----	-----	-----	EAV	FNIKAFAMSG	NQKPEGYDAA	1105
SsVtgAa	VYLDKPT--A	RLQIILAALA	AENNWKFCAD	GVLLSNHKVT	AKFAWGVECK	QYDIMITAET	1313	
SsVtgAb	AYFDRA--A	RVQVIFANLA	ENDHFRICAD	GVMLSYHKLM	AKVAWGIECK	QYQTEIIAET	1311	
SsVtgC	IYYTPEANIQ	NAQLIVSQVG	EDTNWKMCD	TIVNAHIEAK	THIRWGAECQ	SYEMSLKAAN	1165	
SsVtgAa	G-LVGPSPAA	RLRVAWNELP	SALKRYAKKM	YDYIP-ASMM	ADLIQGDEN	SVKQLSFTVV	1371	
SsVtgAb	G-LVGQEPAL	RLKLTWDKLP	KSMKRYAKQL	SEYISRIawe	TGVNLVKVKN	ARNQIKLSVA	1370	
SsVtgC	AHLPGSKPTL	KAKIHWTRIP	EAMAEMGRF	ESYIPGVAFL	LGFSQQHERN	AMQEVsasv	1225	
SsVtgAa	ATSDRTLDI	WKTPTHTIYK	LALHLPIALP	L-DEIRGLTP	FDG-LADKAH	YLFAGAGAAE	1429	
SsVtgAb	VASETSLNVV	LKTPKRTIYK	LGVGLPISLP	FGDAAAEMET	YQSNWADKIS	YMITKAHAAE	1430	
SsVtgC	AASADSIDVK	IKFPPEYTVYR	QAIPVPLPPA	S-----	FVE	FQHNIRNTTT	DSFGRA----	1275
SsVtgAa	CSFSKGLT	FNNRRYKNEM	PLSCYQVLAQ	DCTDELKFFV	LLKGD-HIEQ	NHINVKIADI	1488	
SsVtgAb	CTMVKDTLIT	FNNRKYKNEM	PHSCYQVLAQ	DCTQELKFMV	LLKRDQTQEQ	NQINVKIADI	1490	
SsVtgC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1275	
SsVtgAa	DIDLYPKNYD	VIVKVNGREI	PISNLPYQHP	TAKIQIRPNG	EGISVYAPSL	GLHEVYFDKY	1548	
SsVtgAb	DVGMPKDNV	IMVKVNGVEI	PLSNLPYQHP	TGKIQRQRG	EGITLHAPSH	GLQEVYFDLN	1550	
SsVtgC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1275	
SsVtgAa	SWKVKVVDWM	KGQTCGICGR	ADGEVRQEYR	TPNGRVTKNA	VSYAHSWVLP	AESCRDTTEC	1608	
SsVtgAb	ALKVKVVDWM	RGQTCGLCGR	ADGEVRQEYR	TPNKRFTKNA	VSYAHSWVLP	GKSCRDASEC	1610	
SsVtgC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1275	
SsVtgAa	RMKLESVQLE	KQMIFHGEDS	KCFSVEPVL	CLPGCFPVKT	TAITVGYHCV	PADFNLNHSE	1668	
SsVtgAb	YIKLESVKLE	KQIDLHGQDS	KCYSVEPVL	CLPGCVVRT	TNVYIGYHCV	PADSNVNRSE	1670	
SsVtgC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
SsVtgAa	GQSSIYEEST	DLRESAEAHL	ACSCTAQCA	1696				
SsVtgAb	GLSSIFEKSV	DLRESAEAHL	ACRCTAQCA	1699				
SsVtgC	-----	-----	-----	1275				

图 1 金钱鱼 Vtg 氨基酸序列

方框. 金钱鱼 Vtg 信号肽; 阴影. VtgAa 和 VtgAb 卵黄高磷蛋白区; 下划线. 金钱鱼 VtgC 卵黄脂磷蛋白轻链区; SsVtgAa、SsVtgAb、SsVtgC. 金钱鱼卵黄蛋白原

Fig. 1 Amino acid sequence of *S. argus* Vtg

.MR. signal peptide; shaded. the PV of VtgAa and VtgAb; underline. LvL of VtgC; SsVtgAa, SsVtgAb, SsVtgC. spotted scat Vtg

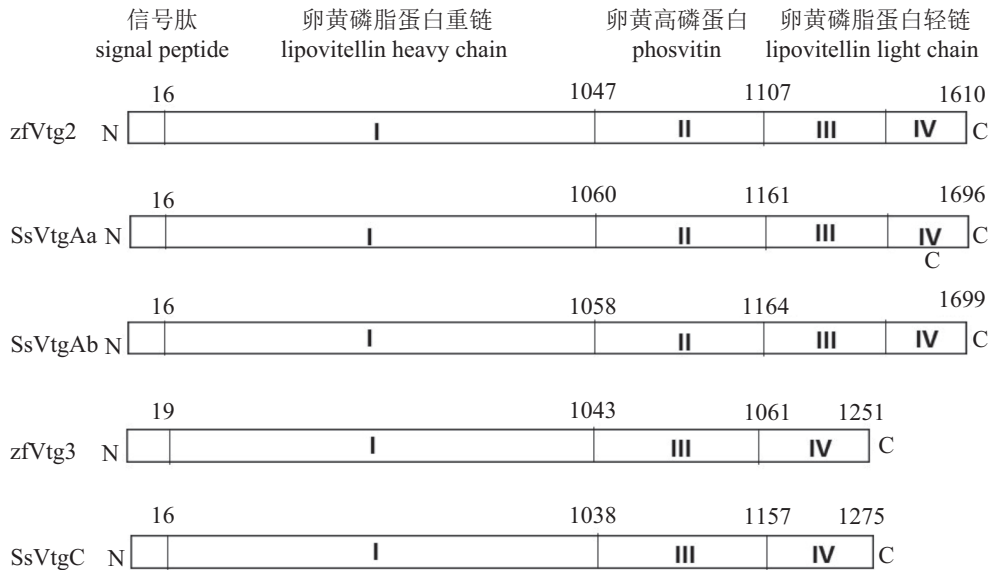


图 2 金钱鱼 Vtg 氨基酸结构域示意图

zfVtg2、zfVtg3. 斑马鱼卵黄蛋白原; SsVtgAa、SsVtgAb、SsVtgC. 金钱鱼卵黄蛋白原

Fig. 2 Diagrams of Vtg proteins domains of *S. argus*

zfVtg2, zfVtg3. *Danio rerio* Vtg; SsVtgAa, SsVtgAb, SsVtgC. *S. argus* Vtg

表 2 Vtg 氨基酸序列的同源性比对

Tab. 2 Comparative identity of amino acid sequence of Vtg

物种(GenBank 登录号) species (GenBank accession No.)	同源性identity %		
	VtgAa	VtgAb	VtgC
斑马鱼 <i>Danio rerio</i> (NP_001038362.3)	55	57	49
青鳉 <i>Oryzias latipes</i> I(NP_001098147.1)	63	69	64
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (CAA63421.1)	62	66	61
美洲狼鲈 <i>Morone americana</i> (AAZ17415.1)	83	85	85
条纹鲈 <i>Morone saxatilis</i> (ADZ57174.1)	79	82	84
真鲷 <i>Pagrus major</i> (BAE43871.1)	81	82	83
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i> (AKK31325.1)	76	84	79
蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i> (ACX32463.1)	81	79	82
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i> (APB93352.1)	57	59	30
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i> (XP_011613259.1)	56	62	65
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i> (XP_014024135.1)	61	65	62

胞内所合成的vtg为外源性EE2的诱导作用所致。EE2处理后肝细胞内vtgAb的表达量最高点为暴露浓度 10^{-7} mol/L处理72 h后, vtgAb的相对表达量达到近30倍, 而在活体内实验中, 使用最大剂量10.0 mg/g腹腔注射金钱鱼后, 其肝脏vtgAb的表达量最高点也为激素处理72 h后, vtgAb的相对表

达量仅达到近3倍, 与离体外实验结果相差较大。推测原因为体内注射实验为腹腔注射, EE2注射进入腹腔内经过血液循环进入肝脏, 在循环过程中, EE2经过血液和体液的稀释后与肝脏内激素受体结合合成vtg, 此时的EE2经过血液和体液稀释后浓度较低。而离体实验中, EE2直接暴露在肝细胞培养液中, 与肝细胞直接接触, 进一步与激素受体结合合成vtg, 所以经过EE2处理的肝细胞的vtgAb的表达量要明显高于腹腔注射EE2的肝脏组织内vtgAb的表达量。

3 讨论

Vtg基因不同的功能区域具有不同的进化速率, 既含有进化较快的富含丝氨酸的结构区域, 也有进化速率极慢的高度保守结构区域。Vtg是一个多亚型基因家族, 鱼类已被证实存在多种亚型的vtg基因^[10, 16]。本研究通过RACE技术克隆得到金钱鱼vtg基因的3种亚型vtgAa、vtgAb、vtgC的cDNA序列全长, 分别编码1696、1699和1275个氨基酸。金钱鱼Vtg三种亚型编码的氨基酸均与美洲狼鲈的同源性最高, 分别为83%、85%和85%, 同样与同为鲈形目的真鲷同源性较高, 分别为81%、82%和83%, 与斑马鱼的同源性分别为55%、57%和49%。与其他8种鱼

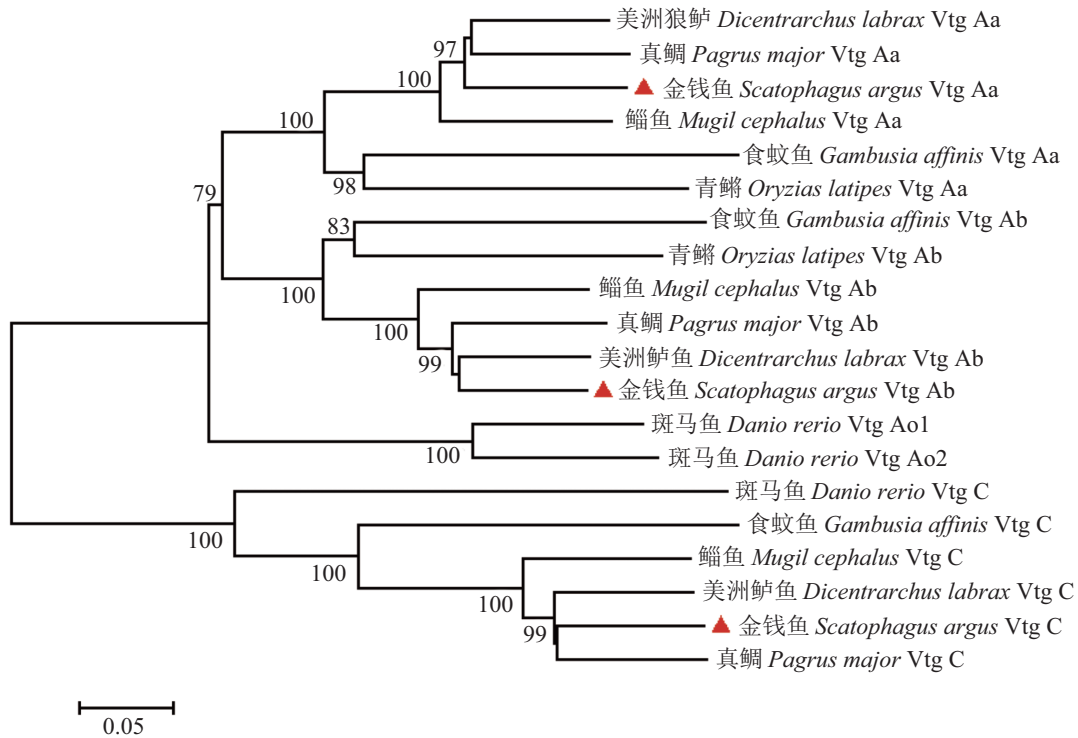


图3 金钱鱼与其他硬骨鱼类卵黄蛋白原的系统进化推论

GenBank登录号: 美洲狼鲈(VtgAa, AAZ17415.1; VtgAb, AAZ17416.1; VtgC, AAZ17417.1), 青鳉(VtgAa, BAB79696; VtgAb, BAB79591; VtgC, ENSORLP00000008173), 真鲷(VtgAa, BAE43870; VtgAb, BAE43871; VtgC, BAE43872), 斑马鱼(VtgAo1, NP_001038362; VtgAo2, NP_001038378; VtgC, AAG30407;), 食蚊鱼(VtgAa, BAD93697.1; VtgAb, BAD93698.1; VtgC, BAD93699.1), 金钱鱼(VtgAa, KY676847; VtgAb, KY654346; VtgC, KY676848)

Fig. 3 Phylogenetic inference of the deduced amino acid sequences of vitellogenin (Vtg) in Spotted scat and various teleosts

GenBank accession number: *Morone americana* (Vtg: VtgAa, AAZ17415.1; VtgAb, AAZ17416.1; VtgC, AAZ17417.1), *Oryzias latipes* (Vtg: VtgAa, BAB79696; VtgAb, BAB79591; VtgC, ENSORLP00000008173), *Pagrus major* (Vtg: VtgAa, BAE43870; VtgAb, BAE43871; VtgC, BAE43872), *Danio rerio* (Vtg: VtgAo1, NP_001038362; VtgAo2, NP_001038378; VtgC, AAG30407), *Gambusia affinis* (Vtg: VtgAa, BAD93697.1; VtgAb, BAD93698.1; VtgC, BAD93699.1), *Scatophagus argus* (Vtg: VtgAa, KY676847; VtgAb, KY654346; VtgC, KY676848)

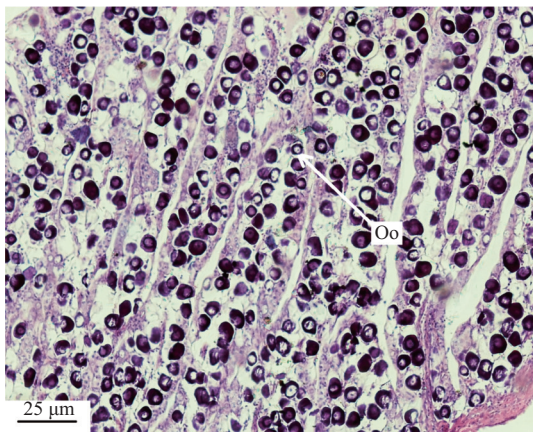


图4 金钱鱼性腺组织学观察

Oo.卵原细胞

Fig. 4 Morphological obseration of gonad in *S. argus*

Oo. oogonia

类的同源性为30%~84%。以金钱鱼Vtg氨基酸序列与其他6种硬骨鱼类Vtg氨基酸序列进行系统进化分析, 其3种亚型皆与同为鲈形目的美洲狼鲈和真鲷聚为一支, 推测金钱鱼Vtg在进化关系中比较保守。

Vtg在脊椎动物的卵母细胞内主要水解为卵黄脂磷蛋白重链(LvH)、卵黄高磷蛋白(PV)和卵黄脂磷蛋白轻链(LvL)^[4]。本研究通过与斑马鱼卵黄蛋白原蛋白结构域的比对, 初步预测金钱鱼3种亚型卵黄蛋白原结构, 其中VtgAa和VtgAb与斑马鱼VtgAo2的蛋白结构相同^[17], 具有LvH、LvL2种脂磷蛋白和PV高磷蛋白完整结构, 而VtgC具有LvH和LvL的完整结构, 而缺少PV结构, 这与斑马鱼VtgC的结构相同^[4]。

在硬骨鱼中, 性成熟雌性动物体内存在大

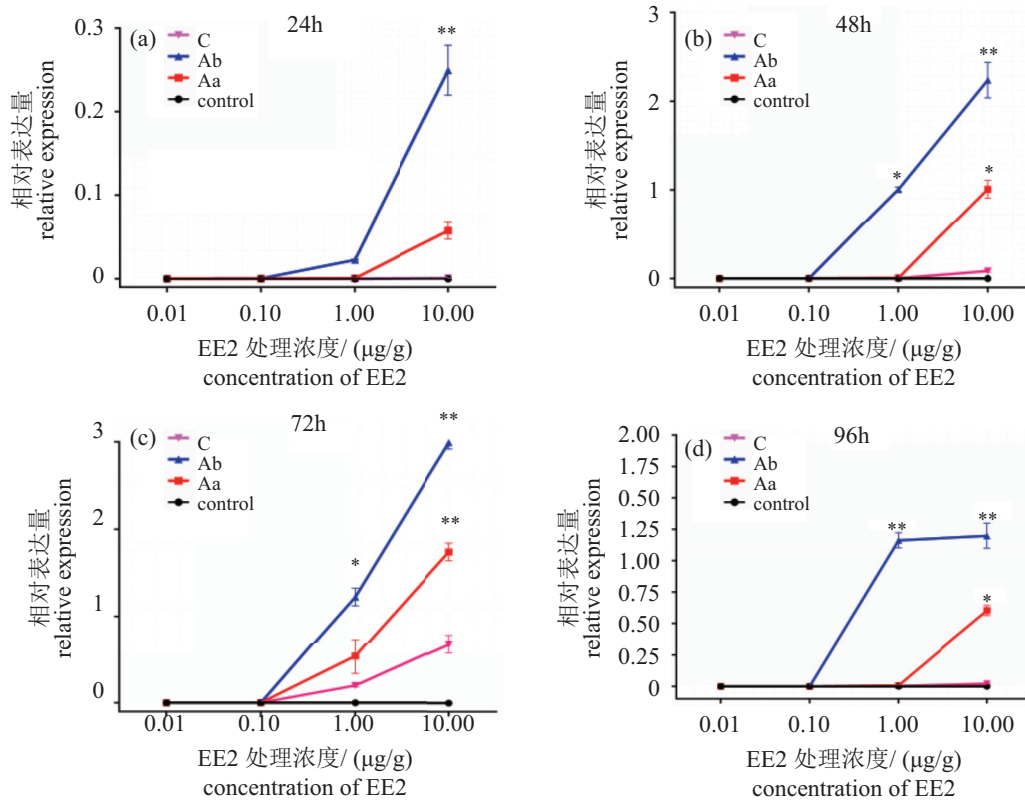


图 5 EE2促进金钱鱼vtg的活体内基因表达

采用时间点a. 24 h, b. 48 h, c. 72 h, d. 96 h; 激素浓度: 0.01、0.1、1.0和10.0 µg/g; 基因类型: vtgAa、vtgAb、vtgC, 不同*表示差异显著 (P<0.05), **表示差异极显著 (P<0.01)

Fig. 5 Analysis vtg mRNA expression in *S. argus* for different processing time and concentration after EE2 injection

Treatment time a. 24 h, b. 48 h, c. 72 h, d. 96 h; concentration: 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 µg/g; types of Vtg: vtgAa, vtgAb, vtgC, bars with * are significantly different (P<0.05), ** are significantly extreme different (P<0.01)

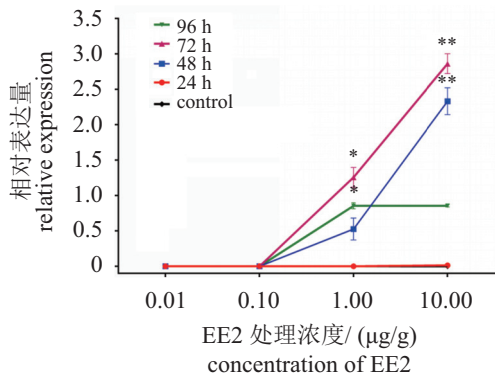


图 6 EE2金钱鱼vtgAb诱导实验的活体内基因表达

激素浓度: 0.0、0.1、1.0、10.0 µg/g; 采样时间点: 24、48、72、96 h, 不同*表示差异显著 (P<0.05)**表示差异极显著 (P<0.01)

Fig. 6 Analysis of vtgAb mRNA expression in *S. argus* for different processing time and concentration after EE2 injection

Concentration: 0.01、0.1、1.0 µg/g、10.0 µg/g; treatment time: 24, 48, 72, 96 h, bars with * are significantly different (P<0.05), ** are significantly extreme different (P<0.01)

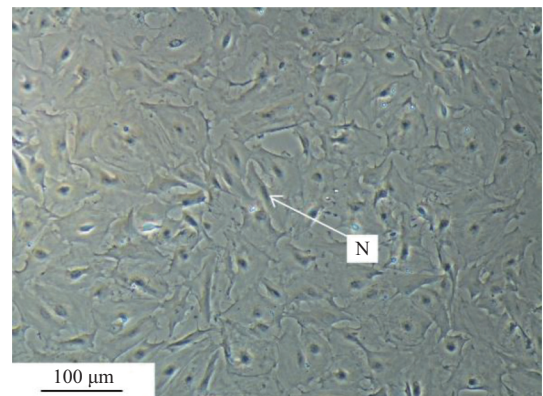


图 7 金钱鱼肝细胞

N. 细胞核

N. nucleus

Fig. 7 Hepatic cells of *S. argus*

量的Vtg蛋白^[18]。然而在EE2诱导下, 未成熟时期的鱼体也能合成此蛋白^[19]。根据这种特性, 硬骨鱼类可用于研究EE2污染和干扰物对水生生物性

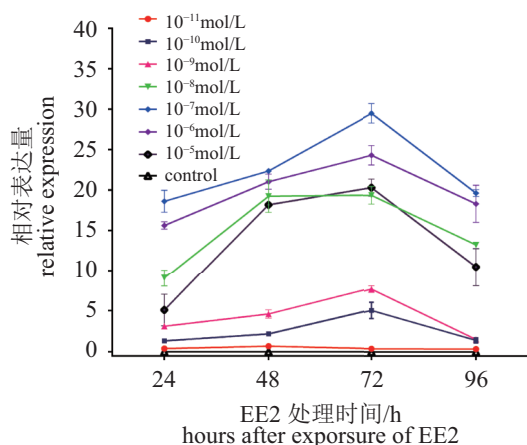


图8 EE2促进金钱鱼 $vtgAb$ 的体外基因表达

Fig. 8 Analysis of $vtgAb$ mRNA expression for different processing time and concentration in *S. argus* hepatocytes after exposure to EE2

腺发育的影响^[20]。海洋鱼类研究表明, 卵巢Ⅱ期个体体内雌二醇的含量为整个发育期内最低水平不能大量合成Vtg^[6, 18]。金钱鱼性腺的石蜡切片结果显示(图4), 本研究所用金钱鱼皆为性腺发育过程中未成熟期的卵巢Ⅱ期, 生物个体本底低, 确保实验结果可靠。EE2注射后肝脏 $vtgAb$ 基因水平大量表达, 推测主要为EE2诱导导致。

卵黄蛋白原的合成方式分为内源性和外源性两种: 一是外源性卵黄合成(heterosynthesis)即由卵母细胞以外的部位合成; 二是内源性卵黄合成 (autosynthesis), 即在卵母细胞内合成^[21]。鱼类主要进行外源性Vtg合成, 肝脏为鱼类Vtg的主要合成器官。肝脏内合成的Vtg经血液循环运输至卵巢, 储存在卵母细胞中为胚胎发育提供能量^[22]。斑马鱼和青鳉 vtg 基因只在雌鱼肝脏中表达^[23]。研究表明, 肝脏是剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*) vtg 表达的主要器官, 表达量明显高于其他器官^[24]。在本实验结果中, 腹腔注射EE2后肝脏内 vtg 的mRNA表达水平证明了“雌二醇进入血液循环到肝脏组织, 与肝脏组织上的雌激素受体相结合, 在肝内合成 vtg ”的观点。

本实验中金钱鱼EE2注射剂量为0.01、0.1、1.0和10.0 $\mu\text{g/g}$, 在0.01和0.1 $\mu\text{g/g}$ 时 $vtgAb$ mRNA表达量较低, 推测注射剂量0.01和0.1 $\mu\text{g/g}$ 接近于金钱鱼卵巢Ⅱ期个体体内雌二醇的含量, 不会大量诱导肝脏内 vtg 的大量表达。而1.0和10.0 mg/g 注射后, $vtgAb$ mRNA表达量升高, 故推测EE2的注射剂量为1.0 $\mu\text{g/g}$ 时, 金钱鱼体内血清中雌二

醇含量大于卵巢Ⅱ期个体体内雌二醇的含量, 诱导了肝脏内 vtg 的大量表达。从表达时间上来看, 星点石斑鱼(*Epinephelus magniscuttis*)通过腹腔注射EE2(5.0 $\mu\text{g/g}$)后, 肝脏 vtg mRNA表达水平在48 h后达到最高值, 表达上调35倍, 但在72 h后又下降到激素注射4 h的表达水平, 研究表明石斑鱼Vtg的合成是由腹腔注射后72 h开始大量合成^[25]。本实验中金钱鱼注射EE2 72 h时, 肝脏中 $vtgAb$ mRNA表达量达到最高值, 但在96 h时又恢复到48 h的表达水平, 在表达时间趋势上与石斑鱼中的实验结果相一致, 根据以上研究结果, 推测金钱鱼Vtg是从腹腔注射后96 h开始大量合成。

EE2对金钱鱼原代培养的肝细胞中 $vtgAb$ mRNA表达水平的影响同样具有剂量以及时间依赖性。EE2暴露浓度为 10^{-11} mol/L时, $vtgAb$ 表达量最低接近于不表达, 当EE2浓度为 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L时, $vtgAb$ 表达量较高, 其中 10^{-5} mol/L浓度的EE2处理相比 10^{-6} mol/L的浓度EE2处理肝细胞时, $vtgAb$ 表达量较低。研究中发现, 不同发育时期的虹鳟肝细胞内 vtg 的含量不同, 其中未成熟时期虹鳟个体的肝细胞内 vtg 的含量最低^[17], 在双棘黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)中, 未成熟时期个体血清雌二醇含量处于整个发育期内最低水平^[13]。这表明EE2暴露浓度为 10^{-11} mol/L时, $vtgAb$ 表达量接近于不表达是由于此时雌二醇浓度与金钱鱼卵巢Ⅱ期个体血清内激素浓度相近, 而后其他浓度均大于卵巢Ⅱ期个体血清内激素浓度, 故诱导了肝细胞内 vtg 的大量表达。其中EE2处理浓度为 10^{-5} mol/L浓度比 10^{-6} mol/L浓度EE2处理肝细胞时, $vtgAb$ 表达量低, 认为过高浓度的EE2对细胞合成 vtg 存在抑制作用或是对细胞造成了损伤, 具体原因还需后续实验深入。

本研究克隆得到金钱鱼 vtg 基因3种亚型的cDNA序列全长, 并对其在EE2处理后进行了mRNA水平表达分析, 初步揭示了金钱鱼 $vtgAb$ 在EE2处理后体内和体外的表达规律, 金钱鱼 $vtgAb$ 用于近海环境雌激素类物质检测的生物标志物具有良好的应用前景, 为进一步研究硬骨鱼类的繁殖及卵黄蛋白原的合成机制奠定基础。雌激素对金钱鱼生长发育过程中Vtg的诱导机制还需进一步探讨。

吴迪和吴美琴并列第一作者。

参考文献:

- [1] Ankley G T, Jensen K M, Durhan E J, *et al.* Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)[J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 86(2): 300-308.
- [2] 董胜张, 叶恭银, 刘朝良. 昆虫卵黄蛋白分子进化的研究进展[J]. *昆虫学报*, 2008, 51(11): 1196-1209.
Dong S Z, Ye G Y, Liu C L. Research progress in molecular evolution of yolk proteins in insects[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2008, 51(11): 1196-1209(in Chinese).
- [3] 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.
- [4] Finn R N, Kristoffersen B A. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R Hypothesis": Correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts[J]. *PLoS One*, 2007, 2(1): e169.
- [5] 洪万树, 吴秋艳, 张其永. 中华乌塘鳢血清性类固醇激素含量与性腺发育的关系及其季节变化[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2009, 48(2): 274-277.
Hong W S, Wu Q Y, Zhang Q Y. Changes of serum sex steroids levels with gonadal development and seasons in *Bostrichthys sinensis*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2009, 48(2): 274-277(in Chinese).
- [6] Hiramatsu N, Hiramatsu K, Hirano K, *et al.* Vitellogenin-derived yolk proteins in a hybrid sturgeon, bester (*Huso huso X Acipenser ruthenus*): Identification, characterization and course of proteolysis during embryogenesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 131(2): 429-441.
- [7] Goodwin A E, Grizzle J M, Bradley J T, *et al.* Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, 101(3): 441-446.
- [8] Sawaguchi S, Kagawa H, Ohkubo N, *et al.* Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs[J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, 73(6): 719-736.
- [9] Hiramatsu N, Shimizu M, Fukada H, *et al.* Transition of serum vitellogenin cycle in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1997, 118(2): 149-157.
- [10] OECD. Fish, acute toxicity test and fish early-life stage toxicity test. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 1992: 201-203. (未找到本条文献信息, 请核对)
- [11] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, *et al.* SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [12] 崔丹, 刘志伟, 刘南希, 等. 金钱鱼性腺发育及其组织结构观察[J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 696-704.
Cui D, Liu Z W, Liu N X, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Scatophagus argus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 696-704(in Chinese).
- [13] Blair J B, Miller M R, Pack D, *et al.* Isolated trout liver cells: Establishing short-term primary cultures exhibiting cell-to-cell interactions[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1990, 26(3): 237-249.
- [14] 张莹莹, 梁雪梅, 曾文刚, 等. 金钱鱼肾细胞系的建立及生长特性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 651-656.
Zhang Y Y, Liang X M, Zeng W G, *et al.* Establishment and characterization of a new euryhaline fish kidney cell line of Spotted Scat *Scatophagus argus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 651-656(in Chinese).
- [15] Hultman M T, Rundberget J T, Tollefsen K E. Evaluation of the sensitivity, responsiveness and reproducibility of primary rainbow trout hepatocyte vitellogenin expression as a screening assay for estrogen mimics[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 159: 233-244.
- [16] 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]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 63(3): 337-342.
- [17] Mouchel N, Trichet V, Betz A, *et al.* Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Gene*, 1996, 174(1): 59-64.
- [18] 沈卓坤, 郑剑辉, 陈怀定, 等. 双棘黄姑鱼血清性类固醇激素的周年变化[J]. *广东海洋大学学报*, 2007,

- 27(3): 16-19.
- Shen Z K, Zheng J H, Chen H D, *et al.* Seasonal cycles of serum sex steroid levels of *Nibeia diacanthus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2007, 27(3): 16-19(in Chinese).
- [19] 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 S S, An L H, Zheng B H, *et al.* Vitellogenin mRNA expression in wild Crucian carp (*Carassius auratus*) from Hun River[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(1): 121-129(in Chinese).
- [20] 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): 135-142.
- Ma T W, Wang Z J. Fish experimental model in the screening and testing for the environmental endocrine disruptors[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2005, 25(2): 135-142(in Chinese).
- [21] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives[M]//Davey K G, Peter R E, Tobe S S. Perspectives in Comparative Endocrinology. Ottawa, Ontario: National Research Council, 1994: 304-315.
- [22] 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.
- [23] Tong Y, Shan T, Poh Y K, *et al.* Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 β -estradiol[J]. *Gene*, 2004, 328: 25-36.
- [24] 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 C, Li K B, Wang F, *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(in Chinese).
- [25] Bowman C J, Kroll K J, Hemmer M J, *et al.* Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2000, 120(3): 300-313.

Molecular cloning of multiple vitellogenins in *Scatophagus argus* and their gene expressions after 17 α -ethynylestradiol exposure *in vivo* and *in vitro*

WU Di¹, WU Meiqin², SU Maoliang¹, ZHONG Yong¹, WANG Wu¹, ZHANG Junbin^{1*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: With the aim to explore the molecular mechanism of vitellogenin (Vtg) in *Scatophagus argus*, we cloned the full-length cDNA sequence of three types of *vtg* by using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) procedures. The length of the *vtgAa* cDNA is 5360 bp (GenBank No. KY676847), and it encodes a protein consist of 1696 amino acids. The length of the *vtgAb* cDNA is 5346 bp (KY654346), and it encodes a protein consist of 1699 amino acids. The length of the *vtgC* cDNA is 4244 bp (KY676848), and it encodes a protein consist of 1275 amino acids. Sequence analysis showed that three vitellogenin homologs of *Scatophagus argus* have highest homology with *Morone americana* (83%, 85% and 85%). VtgAa and VtgAb contain all the three major portions, but VtgC lacks phosvitin (PV). Quantitative real-time PCR (qPCR) assay were employed to determine the mRNA expression of *vtgAb* in the liver after 17 α -ethynylestradiol (EE2) injection *in vivo* and hepatocytes after exposure EE2 *in vitro*. Results of qPCR showed that the hepatic expression of *vtgAb* was higher than *vtgAa* and *vtgC*. 48 h after injection, mRNA expression of *vtgAb* was extremely increased and obviously decreased after 72 h. The expression of *vtgAb* mRNA was elevated after EE2 exposure to hepatic cells. Based on our results, expressions of *vtgAb* could be induced by EE2.

Key words: *Scatophagus argus*; vitellogenin; 17 α -ethynylestradiol; *in vivo*; *in vitro*; gene expression

Corresponding author: ZHANG Junbin. E-mail: jb-zhang@shou.edu.cn

Funding projects: National Science and Technology Major Project of China“Marine Aquaculture center of China-ASEAN”