

# 团头鲂 SPATA4 基因的分子克隆及表达分析

韦新兰 张杰 陈丽萍 王卫民 高泽霞 王焕岭

华中农业大学水产学院/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术从团头鲂精巢中克隆出精子发生相关基因 4 (spermatogenesis associated gene 4, SPATA4)。该基因 cDNA 全长为 1 076 bp, 包括 1 个 678 bp 的完整阅读框架, 编码 225 个氨基酸, 预测的氨基酸序列的分子质量为 25.72 ku, 等电点为 9.32。序列分析显示团头鲂 SPATA4 基因与其他脊椎动物同源性较高。荧光定量 PCR 结果显示 SPATA4 基因在受精后 1~206 h 期间, 该基因在受精后 4 h 和受精后 28 h 的表达量最高, 在受精后 50 h 表达量最低, 而在其他时期的表达水平基本一致; 在所检测的 10 个组织中, SPATA4 基因在精巢中的表达量最高。

**关键词** 团头鲂; 精巢; SPATA4; 克隆; 时空表达

**中图分类号** Q 959.46<sup>+</sup>8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0099-06

SPATA4 (精子发生相关基因 4, spermatogenesis associated gene 4, 曾用名 TSARG2) 于 2001 年首次从小鼠精巢 cDNA 文库中克隆出以来<sup>[1]</sup>, 该基因陆续在人<sup>[2]</sup>、大鼠<sup>[3]</sup>、斑马鱼<sup>[4]</sup>、虹鳟<sup>[5]</sup>和雏鸡<sup>[6]</sup>等物种中分离出来。研究表明, SPATA4 在精子生成中具有重要生理功能, 它可能参与到了脊椎动物的性成熟过程, 同时对生精细胞的分化以及细胞凋亡过程也起着重要的调节作用<sup>[7]</sup>。然而, 精子的发生与凋亡是一个涉及到多个基因相互作用的复杂过程, 许多精巢生精细胞凋亡相关基因都涉及到精子发生及凋亡过程, 如 CREM<sup>[8]</sup>、Hsp<sup>[9-10]</sup>、Fas<sup>[11]</sup>、TRAIL<sup>[12]</sup>和 TR2<sup>[13]</sup>等基因, 但这些基因都不属于精巢特异基因, 而研究证实了 SPATA4 是睾丸组织特异性表达基因, 且该基因通过表达量的上调或下调实现其在机体内的调节功能<sup>[7]</sup>。然而鱼类中关于该基因功能的研究并不多。

由于长期人工养殖和数代人工密集饲养, 以及人为和自然因素等影响, 各天然水域团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 种群混杂繁殖, 其经济性状出现了退化现象<sup>[14]</sup>。此外, 由于养殖环境严重污染、水质恶化等因素, 直接影响着团头鲂性腺发育和正常繁殖。因此, 随着团头鲂选育工作的全面开展<sup>[15-17]</sup>, 进行团头鲂繁殖生物学的相关研究工作是

非常重要的。

笔者采用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术克隆出团头鲂 SPATA4 基因, 并用生物信息学方法分析该基因的 cDNA 和预测的蛋白质序列; 采用荧光定量 PCR 分析 SPATA4 基因在团头鲂受精后不同发育时期及成鱼不同组织中的表达情况, 旨在为团头鲂育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验所用材料取自湖北省鄂州市团头鲂原种场。用于基因时间表达谱分析的样品取自受精后不同发育时期的胚胎及仔鱼 (水温 (24±1) °C); 用于组织表达谱分析的样品来自成鱼的各个组织, 包括精巢、卵巢、肠、肌肉、脊髓、鳃、脑、心脏、肾脏和脾脏等 10 个组织 ( $n=3$ ), 样品取后迅速采用 Trizol (TaKaRa) 法提取总 RNA, 具体方法见说明书, 然后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计分别检测总 RNA 的浓度和质量。

### 1.2 引物设计

从笔者所在实验室构建的团头鲂 cDNA 文库中筛选出 SPATA4 基因的部分 cDNA 序列, 并根据 SPATA4 基因部分序列采用 Primer 5.0 设计 5'

收稿日期: 2012-06-11

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划项目 (NCET-10-0404) 和中央高校基本科研业务专项 (2010PY004)

韦新兰, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: weixinlan813@163.com

通讯作者: 王焕岭, 博士, 副教授. 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: huanlingok@mail.hzau.edu.cn

和 3' RACE 引物,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 试验所需引物序列

Table 1 The primer sequences designed

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	目的 Purpose
SPATA4-GSP3'-O	GAGGAGAGAACCCAAGACCC	3'RACE
SPATA4-GSP3'-I	CCACTCTTGAGAACAGGCT	3'RACE
SPATA4-GSP5'-O	GGTCTTGGGTCTCTCTCTCT	5'RACE
SPATA4-GSP5'-I	CACTGAGGCTGTGGAACGAG	5'RACE
SPATA4-qRT-PCR-F	CTCGTTCCACAGCCTCAGT	qRT-PCR
SPATA4-qRT-PCR-R	GGTCTTGGGTCTCTCTCTCT	qRT-PCR
$\beta$ -actin-F	ACCCACACCGTGCCCATCTA	qRT-PCR
$\beta$ -actin-R	CGGACAATTTCTCTTTCCGGCTG	qRT-PCR
GAPDH-F	YGCYGGCATCTCCCTCAA	qRT-PCR
GAPDH-R	TCAGCAACACGRTGGCTGTAG	qRT-PCR
EF1 $\alpha$ -F	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	qRT-PCR
EF1 $\alpha$ -R	CCGCTAGCATTACCTCC	qRT-PCR

### 1.3 RACE 扩增 cDNA 全长及序列分析

取 5  $\mu$ L 精巢总 RNA,根据 5'和 3' RACE 试剂盒(TaKaRa)使用说明书进行反转录,然后采用巢式 PCR 进行扩增,引物见表 1。将 PCR 扩增产物纯化回收,连接到 pGEM-T Easy 载体上,然后转化到感受态细胞大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,经 PCR 鉴定后将阳性克隆送到上海英骏生物技术有限公司测序。

利用 DNASTAR 软件对基因的全长 cDNA 序列进行拼接,NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)在线软件进行序列同源性比对。应用 NCBI ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)

软件寻找候选基因的开放阅读框(open reading frame, ORF),并将其翻译成氨基酸序列。蛋白质分子质量与等电点由 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线软件进行预测。采用 PROSITE (<http://cn.expasy.org/prosite>)寻找蛋白质基序。Clustal X 软件对氨基酸多序列进行比对,MEGA 5.0 用于构建基因的系统进化树。

### 1.4 荧光定量 PCR

取不同发育时期及不同组织的总 RNA 各 1  $\mu$ g,利用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa)进行反转录以获得相应的 cDNA。以获得的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR(real-time PCR)以分析目的基因的时空表达谱,其反应体系:10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L,20 $\times$  Eva Green 2.0  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L,dNTPs (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L,Ex Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,cDNA 模板 1.0  $\mu$ L,加水至 20  $\mu$ L;反应条件见表 2。通过标准曲线法分析目的基因的时空表达谱。同时选 ACTB ( $\beta$ -actin)、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 和 EF1 $\alpha$  (elongation factor 1, alpha) 3 个基因作为本试验的内参基因,利用 geNorm 软件 (<http://medgen.ugent.be/genorm/>)对 3 个内参基因在不同发育时期及不同组织中的稳定性进行评估,选择最稳定的作为分析时空表达谱的内参基因。

表 2 qRT-PCR 扩增条件

Table 2 The amplifying conditions of qRT-PCR

基因 Gene	预变性 Predenaturation	变性 Denaturation	退火 Annealing	延伸 Extension	循环数 Cycles
SPATA4	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	57 $^{\circ}$ C 15 s	72 $^{\circ}$ C 20 s	40
GAPDH	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	57 $^{\circ}$ C 11 s	72 $^{\circ}$ C 20 s	40
$\beta$ actin	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	55 $^{\circ}$ C 12 s	72 $^{\circ}$ C 20 s	40
EF1 $\alpha$	95 $^{\circ}$ C 30 s	95 $^{\circ}$ C 5 s	57 $^{\circ}$ C 30 s	72 $^{\circ}$ C 20 s	40

### 1.5 数据分析

利用 One-way ANOVA 分析候选基因在不同发育时期的表达差异性,其中  $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 团头鲂 SPATA4 的 cDNA 序列分析

本研究通过 RACE 技术克隆得到团头鲂 SPATA4 基因的 5'端和 3'端,并通过 DNASTAR 软件对

序列进行拼接获得该基因的 cDNA 全长[GenBank: JQ898682]。SPATA4 基因 cDNA 序列全长 1 076 bp,其中 3'和 5'非翻译区(untranslated region, UTR)长度分别为 161 bp 和 237 bp,ORF 为 678 bp,共编码 225 个氨基酸,在 3' UTR 发现 2 个加尾信号(AATAAA)及 1 个 polyA 尾巴(图 1)。Blast 同源性分析显示团头鲂 SPATA4 基因 cDNA 序列与稀有鮰鲫、斑马鱼和虹鳟的同源性较高,分别为 93%、88%和 73%。

```

1 TGAAGACCGTGCATTTCGCGCAGGGCGGTGACGTcttctgtactttatactgatcccgctacgcctcgggctatgcaactg
84  taaacaatgaatgcaggggttcggttcgccaaacaaatgtgagctgctcatcgtttctgtcgttaccattattacaa
162 ATGGCCTATTCACAGTACCTAAGAAGGCTGGTATCCACGAGAGGTTTTGAAGTGGCTGCAAAAGCTTGATTAAAGTTTTCCAAA
1  M A Y S Q S P K K A G I P R E V L K W L Q S L D L T F F P K
252 AACGTGGCAGAGCTTTCCAATGGATACCTAGTGGCGGAAATATTTCTGGTACTCCCAGCGGATTTTCATATGCATTCTCTATGAC
31  N V R L S L D F S N G Y L V A E I F S W Y F P A D F H M H S Y D
342 AATGGAGCTTCCTTGCTGCCAAAACAACTAACTGGTCCAGATGAGAAAATTTCTGTCAAGCAAAACATCAGTCTGATGAAGGAGATC
61  N G A S L P A K Q S N W S Q I E K F L V K Q N I S L M K E I
432 ATAGATGGCAACAATCCACTGTAAACCTGGAGCTGCAGAGCTTCTGTGCAGGAGATTTACACCACTACTGACCAACAGAAGGATCCAAAAC
91  I D G T I H C K P G A A E L L V Q E I Y T I L T N R R I Q N
522 ATCCAGCAGTGGAGCAAGGCTTCACAGATAAGGCTTATCAAGACCAGTTGCCATGGTGGCCCGTTCCACAGCCTCAGTGGCCATAAAG
121 I Q Q V E Q G F T D K A Y Q D Q L P M V A R S T A S V A I K
612 AGCAACTGAGTCTCAGTGGGTTATAGCTGAACCAATATCATCACAATCAGCGCAAGGTCCTTGCAATCATACAGGCACATAGAA
151 S N L S L S E V I A E P N I I T N Q R K V L I I H M H S Y D
702 CAGAGAAAAGAGGAGAGAACCAAGACCCAAAACGATTCAAATGTTAAGCCCACTCTTGAGAACAGGCTGTGAGATTGCGTCCACTGTTA
181 Q R K E E R T Q D P K R F N V K P T L G E Q A V R L R P L L
792 GCGAGCGAGCAAACTGCAGATGAACACCACTCAGGCAGCTGTGTAAGTGCCTGCCCTACATCCCAACAAAAGGATGAGACATATGT
211 A S E P N L Q M N T S Q A A C *
882 TCAGTGCATCTGGATTAGAAGCAAAATGCTTTGGATATTGGAGGCAAAATGAGACTGTTAAGGTAGATGTCCAAGAAGGCTCTT
972 CAAGGCACATCAAAATGAGGCCCTAGAAAATTTGACACAGATTCATCCACATAAAAATAAATAATAATAA
1 062 AGTAAAAAAAAAAAA

```

星号标注的序列为终止密码子 Asterisk represents stop codon; 方框中的序列为加尾信号 The polyadenylation signal sequences are included in the open boxes.

图 1 团头鲂 SPATA4 cDNA 与氨基酸序列

Fig. 1 SPATA4 cDNA and amino acid sequences of *Megalobrama amblycephala*

2.2 团头鲂 SPATA4 的氨基酸序列特征

经 ProtParam 在线分析 SPATA4 氨基酸序列分子质量为 25.72 ku,等电点为 9.32。氨基酸序列分析显示该基因与其他物种的同源基因有较高的同源性(与稀有鮰鲫、斑马鱼和虹鳟 SPATA4 的同源性分别为 92%、88%和 78%),并且在氨基酸 19~

98 之间存在一保守的功能域 CAMSAP-CH,该功能域属于 CH 超家族。经 PROSITE 预测后发现在 SPATA4 序列存在 4 个基序,分别为蛋白激酶 C 磷酸化位点、N-糖基化位点、N-豆蔻酰化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点,如图 2。

mSPATA4	1	MAYSQSPKKAGIPREVLKWLQSLDLTFFPKNVRDRFNSNGYLVAEIIFS WYFPADFHMHSYDNGASLPAKQSNW	72
gSPATA4	1	MAYSQSPKKAGIPREVLKWLQSLDLTFFPKNVRDRFNSNGYLVAEIIFS WYFPDGFHMHSYDNGTSLAAKQSNW	72
dSPATA4	1	MAYSLSPKKAGLIPREVLKWLQSLDLSFFPKNVRDRFNSNGYLVAEVFS WYFPRDFHMHSDNGTSLAAKQSNW	72
oSPATA4	1	MAYAQPPKTKGLPREVLKWLQSLDLSFSPKNMRRDRFNSNGYLVAEVFS WYHYHDFHMHSYDNGTSLPTKQGNW	72
mSPATA4	73	SQIEKFLVKQNIHSLMKEIIDGTHCKPGAAEELLVQEIYITLNRRIQNIQVHGQFDKAYQDQLPMLVARST	144
gSPATA4	73	SLIEKFLVMQNISVMKEIIDGTHCKPGAAEELLVQEMYITLNRRTQTIQKVGQFDKAYQDQLPMLVARST	144
dSPATA4	73	SQIEKFFVKQNISLVKEMIDGTHCKPGAAEELLVQEIYITLNRSIQAIQRVHGQFDTKPYQDQLPMLVARAT	144
oSPATA4	73	AQIERFLVKQNIHLQKEVLDGTHCKPGAAEELLVQEIYITLNRRIKGIQGRIDFTDRDYQDQLPMLVARAT	144
mSPATA4	145	ASVAIKSNLSLSEVIAEPNIIITNQRKVLAIHHRHIEQRKEERTQDPKRFNVKPTLGEQAVRLRPLLAS---	212
gSPATA4	145	ASVAIKSNLSLSEFIAEPNIIITNQCQVLTIIHHRHIEQRKEERTQDPKRFNPKPTLGEQAVRLPPVLAHQ---	213
dSPATA4	145	ASVSIKSNLSLSEVIAEPNIIITNQRKVLAIHHRHIEQRKEERVQDPKRFNVKPTLGEQAVRL---LAHQ---	210
oSPATA4	145	ASKAINSNLRLETVIAEPNISITNQRKVAIIHMHLEQRAAERVQNPKRFNVKPTLGLAVRLPPSSHHGDDS	216
mSPATA4	213	-EPNLQMNSTQAAC-----	225
gSPATA4	214	SEPNLQMNSTQAAC-----	227
dSPATA4	211	HEPNLQMNSTQAAC-----	224
oSPATA4	217	SDSNASVQSGTAKSCEPSIRSKASVHFKEIEVRQMDRRSLIAI	259

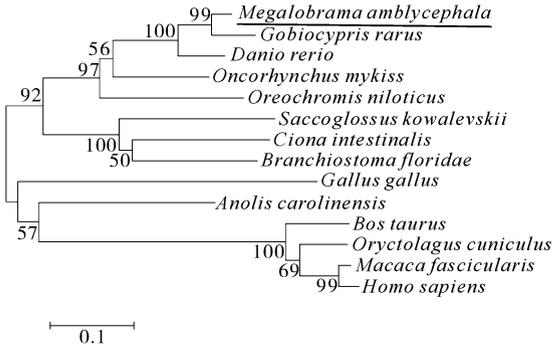
mSPATA4、gSPATA4、dSPATA4 和 oSPATA4 分别代表团头鲂、稀有鮰鲫、斑马鱼和虹鳟 SPATA4 氨基酸序列 mSPATA4; *Megalobrama amblycephala* SPATA4, gSPATA4(AEC33234. 1); *Gobiocypris rarus* SPATA4, dSPATA4(AAH93102. 1); *Danio rerio* SPATA4, oSPATA4(rNP\_001117998. 1); *Oncorhynchus mykiss* SPATA4; 蓝色、红色和绿色标注的分别是蛋白激酶 C 磷酸化位点、N-糖基化位点和 N-豆蔻酰化位点 Blue, red and green represent protein kinase C phosphorylation site, N-glycosylation site and N-myristoylation site, respectively; 方框框住的是酪氨酸硫酸化位点 Framed: Tyrosine sulfation site; 阴影标注的为酪蛋白激酶 II 磷酸化作用位点 Shadowed; Casein kinase II phosphorylation site; 虚线标注的为 CAMSAP-CH 功能区域 Dotted line; CAMSAP-CH domain.

图 2 脊椎动物 SPATA4 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of SPATA4 in vertebrates

### 2.3 团头鲂 SPATA4 的系统进化树

根据团头鲂及其他脊椎动物的 SPATA4 氨基酸序列,应用 MEGA 5.0 和 Cluster X 构建 SPATA4 系统进化树,见图 3。由图 3 可知该进化树主要由两个大的分支构成,哺乳动物和禽类聚为一个大的分支,鱼类的 SPATA4 聚为另一个分支,其中团头鲂与稀有鮡鲫及斑马鱼聚为一个小分支,亲缘关系较近。



下划线标注的为团头鲂 *Megalobrama amblycephala* is underlined; 比对序列及其在 GenBank 中的登录号如下 The sequences used for comparison and their GenBank accession numbers were as following: *Gobio cypris rarus* (AEC33234.1), *Danio rerio* (NP\_001004013.1), *Oncorhynchus mykiss* (NP\_001117998.1), *Ciona intestinalis* (NP\_001029005.1), *Branchiostoma floridae* (XP\_002611669.1), *Anolis carolinensis* (XP\_003221696.1), *Oreochromis niloticus* (XP\_003443449.1), *Saccoglossus kowalevskii* (XP\_002735132.1), *Bos taurus* (NP\_001011677.1), *Macaca fascicularis* (EHH54075.1), *Oryctolagus cuniculus* (XP\_002709370.1), *Homo sapiens* (NP\_653245.2), *Gallus gallus* (NP\_001026309.1).

图 3 SPATA4 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the SPATA4 gene

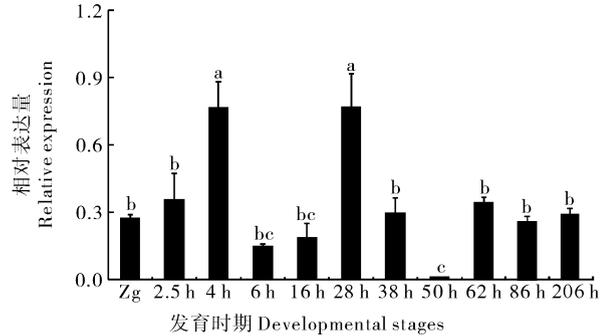
### 2.4 团头鲂 SPATA4 在不同发育时期的表达谱

经过 geNorm 软件对  $\beta$ actin、GAPDH 和 EF1 $\alpha$  3 个内参基因筛选之后发现 EF1 $\alpha$  在团头鲂不同发育时期及不同的组织中表达最稳定,因此将 EF1 $\alpha$  用于分析 SPATA4 基因时空表达谱的内参基因。由图 4 可知,SPATA4 在团头鲂早期胚胎及仔鱼不同发育时期均有表达,从受精后 1 h 到 4 h 其表达量逐渐升高,然后降低,而在受精后 28 h 出现第 2 个波峰,然后又逐渐降低,到受精后 50 h 达到最低,而后升高并保持不变。并且在受精后 4 h 及受精后 28 h 该基因表达量显著高于其他发育时期的表达量( $P < 0.05$ )。

### 2.5 团头鲂 SPATA4 的组织表达谱

利用荧光定量 PCR 方法分析 SPATA4 基因在

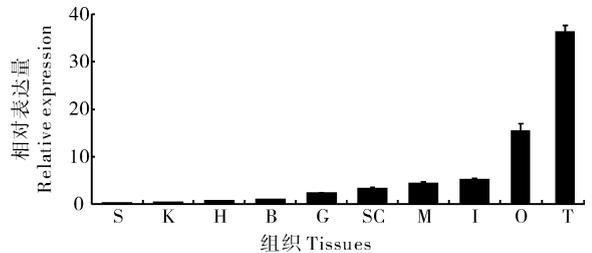
团头鲂 10 个组织中的表达情况。由图 5 可知,SPATA4 基因在脾脏、肾脏、心脏、脑、鳃、脊髓、肌肉、肠、卵巢和精巢等组织中均有表达,而在精巢中的表达量最高,然后依次为卵巢、肠、肌肉、脊髓、鳃、脑和心脏,而在脾脏和肾脏中几乎检测不到表达。



图中不同的字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) The different letters on the top of bars were significantly different ( $P < 0.05$ ); h 为受精后时间(小时) Hours post-fertilization; Zg 表示受精卵 Zg: Zygote.

图 4 团头鲂 SPATA4 在不同发育时期中的表达谱

Fig. 4 SPATA4 expression at different developmental stages of *Megalobrama amblycephala*



图中 S、K、H、B、G、SC、M、I、O 和 T 分别表示脾脏、肾脏、心脏、脑、鳃、脊髓、肌肉、肠、卵巢和精巢 S、K、H、B、G、SC、M、I、O and T represent spleen, kidney, heart, brain, gill, spinal cord, muscle, intestine, ovary and testis, respectively.

图 5 团头鲂 SPATA4 的组织表达谱

Fig. 5 Tissue expression profile of *Megalobrama amblycephala* SPATA4

## 3 讨论

SPATA4 基因作为与细胞凋亡相关的精巢特异基因第一次在小鼠中被克隆。至今,该基因已在多个脊椎动物中克隆出来,且 SPATA4 在人、小鼠、大鼠、黑猩猩等脊椎动物中高度保守<sup>[18]</sup>。为了研究 SPATA4 基因在团头鲂中的表达与分布,本试验采用 RACE 技术克隆出 1 076 bp 的全长 cDNA 序列, Blast 同源性分析发现团头鲂与稀有鮡鲫、斑马鱼和虹鳟 SPATA4 基因 cDNA 序列的同源性在 73%~

93%之间。系统进化分析显示鱼类和哺乳动物的 *SPATA4* 分别聚为 2 个大的分支,其中团头鲂与稀有鮡鲫及斑马鱼聚为 1 个小分支,这与生物的进化程度是一致的。氨基酸序列分析显示团头鲂 *SPATA4* 序列中存在一保守 CAMSAP-CH 功能域,该功能域属于 CH 超家族。而 CH 超家族是钙调蛋白超家族同源结构域,包括肌动结合蛋白,如膜收缩蛋白、 $\alpha$ -辅肌动蛋白、抗肌萎缩蛋白、肌营养相关蛋白和丝束蛋白等,这些蛋白质对于调节细胞形态和信号传导是必不可少的<sup>[19]</sup>。由此可以推测出隶属 CH 超家族的 *SPATA4* 也可能具备这些生物学功能。

胚胎发育受基因表达和细胞间信号等综合调控,调控基因的表达具有时空性,在胚胎发育不同阶段、部位适度表达是胚胎正常发育所必需的<sup>[20]</sup>。在动物发育过程中,*SPATA4* 基因起着重要的调控作用,已有报道提示 *SPATA4* 基因参与大鼠和雏鸡性腺的发育调控<sup>[3,6]</sup>,但目前关于 *SPATA4* 基因胚胎发育全程中时期表达的研究还存在空白。据报道,为了检测 *SPATA4* 基因在大鼠中的表达情况,自大鼠出生后 14 d 开始取其睾丸样,结果表明该基因自大鼠出生后 30 d 开始表达且表达量逐渐增加,至出生后 65 d 达到最高并趋于稳定<sup>[3]</sup>。取 1 月龄雏鸡睾丸检测 *SPATA4* 基因表达情况时发现,该基因自雏鸡出生后 1 个月开始表达且表达量逐渐增加,至出生后 6 个月达到最高并趋于稳定<sup>[6]</sup>。本研究发现 *SPATA4* 基因在团头鲂早期胚胎发育时期均有表达,具体而言,该基因在受精后 1 h 到受精后 4 h 表达量逐渐升高,然后降低,而在受精后 28 h 出现第 2 个波峰,然后又逐渐降低,到受精后 50 h(也可称为出膜后 12 h)达到最低,而后升高并保持不变。本研究中团头鲂受精后 4 h 和 28 h 分别是囊胚期和心跳期,鱼类囊胚腔的形成需要运送胚外离子(如  $\text{Na}^+$ )到胚胎中心,而胚胎进入心跳期后,心脏开始搏动,向这两个期转变的胚胎均需要大量的能量,因此推测该基因在胚胎囊胚期和心跳期对于提高细胞活力和能量的供给方面发挥着重要作用。迄今为止,*SPATA4* 基因在动物早期胚胎发育阶段表达水平的研究尚未见报道,本研究结果中关于该基因在团头鲂早期胚胎发育及稚仔鱼中的动态表达模式推测,该基因在动物早期发育阶段中可能起着重要作用,但具体机制需要进一步研究。而 *SPATA4* 基因在团头鲂稚仔鱼后期至成鱼发育过程中的表达模式与在大鼠及雏鸡中的表达模式是否一致有待于进一

步研究。

组织表达谱的结果显示 *SPATA4* 基因在脾脏、肾脏、心脏、脑、鳃、脊髓、肌肉、肠、卵巢和精巢等组织中均有表达,而在精巢中的表达量最高,其次是卵巢,其他组织中表达量较低(图 5)。以往对 *SPATA4* 基因研究表明,该基因在人<sup>[2]</sup>、大鼠<sup>[3]</sup>和雏鸡<sup>[6]</sup>精巢中特异表达,其他组织中没有表达。因此 *SPATA4* 基因被认为是在精巢中特异表达的基因。而 *SPATA4* 基因在斑马鱼<sup>[4]</sup>和虹鳟<sup>[5]</sup>的精巢中大量表达,在卵巢中表达量较少,而其他组织中没有表达。在小鼠中的研究发现,*SPATA4* 基因主要在精巢中表达,在卵巢和子宫中少量表达,其他组织没有表达<sup>[21]</sup>。以往针对 *SPATA4* 基因在鱼类与哺乳动物及禽类中不同的表达模式,认为造成这一现象的原因可能是由于鱼类与哺乳动物及禽类的不同进化路线和不同性别分化机制所造成的<sup>[4-5]</sup>。而本试验中 *SPATA4* 基因在团头鲂组织中的普遍表达可能是由于本试验采用的是 qRT-PCR 方法,以往对该基因表达谱的分析采用的是半定量 PCR 方法。在准确度和灵敏度方面半定量 PCR 方法都不如 qRT-PCR,因此 *SPATA4* 基因在精巢和卵巢以外组织中的少量表达,半定量 PCR 方法可能检测不到。虽然本试验结果与以往报道结果稍有偏差,但是 *SPATA4* 基因在团头鲂精巢中的表达量显著高于在其他组织中的表达量的结果与以往报道是相符合的,证实该基因在团头鲂精巢发育中也可能起着重要的作用。

## 参 考 文 献

- [1] JIANG H, LI L Y, LU G X. Molecular cloning of genes related to apoptosis in spermatogenic cells of mouse [J]. *Chin J Biochem Biophys*, 2001, 33: 421-425.
- [2] LIU S F, LI L Y, FU J J, et al. Rapid identification of human testis spermatocyte apoptosis-related gene, *TSARG2*, by nested PCR and draft human genome searching [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2002, 34: 378-382.
- [3] LIU S F, HE S, LIU B W, et al. Cloning and characterization of testis-specific spermatogenesis associated gene homologous to human *SPATA4* in rat [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27: 1867-1870.
- [4] LIU S F, LIU B W, HE S, et al. Cloning and characterization of zebrafish *SPATA4* gene and analysis of its gonad specific expression [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70: 773-781.
- [5] LIU B W, LIU S F, HE S, et al. Cloning and expression analysis of gonadogenesis-associated gene *SPATA4* from rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. J Biochem Mol Biol, 2005, 38:206-210.
- [6] XIE M C, AI C, JIN X M, et al. Cloning and characterization of chicken *SPATA4* gene and analysis of its specific expression [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 306:79-85.
- [7] 辜清泉. *SPATA4* 基因启动子结构功能研究及 *SPATA4* 蛋白纯化[D]. 北京:清华大学图书馆, 2010:5-8.
- [8] BLENDY J A, KAESTNER K H, WEINBAUER G F, et al. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the *CREM* gene [J]. Nature, 1996, 380:162-165.
- [9] DIX D J, ALLEN J W, COLLINS B W, et al. Targeted gene disruption of *Hsp70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:3264-3268.
- [10] SARGE K D, CULLEN K E. Regulation of hsp expression during rodent spermatogenesis [J]. Cell Mol Life Sci, 1997, 53:191-197.
- [11] NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor [J]. Science, 1995, 267:1449-1456.
- [12] BRETZ J D, RYMASZEWSKI M, ARSCOTT P L, et al. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells [J]. J Biol Chem, 1999, 274:23627-23632.
- [13] GUO C X, HU Z Y, ZHOU Y J, et al. The expression of orphan receptor TR2 mRNA in spermatocyte of rat and *Macaca mulatta* cryptorchidism [J]. Chin Sci Bull, 1999, 44:2539-2544.
- [14] 陈道印, 欧阳敏, 熊国荣, 等. 鄱阳湖、梁子湖、淤泥湖团头鲂池塘养殖对比试验分析[J]. 江西农业学报, 1999, 11(1):47-51.
- [15] 赵岩, 李思发, 唐首杰. 团头鲂“浦江1号”选育后期世代群体同野生群体间遗传变异的 ISSR 分析 [J]. 水产学报, 2009, 33(6):893-900.
- [16] 曾聪, 阎里清, 高泽霞, 等. 梁子湖、鄱阳湖和淤泥湖团头鲂的形态学比较[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1):88-94.
- [17] 张新辉, 夏新民, 罗伟, 等. 团头鲂雌核发育后代的微卫星标记分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(6):737-743.
- [18] LIU S F, AI C, GE Z, et al. Molecular cloning and bioinformatic analysis of *SPATA4* gene [J]. J Biochem Mol Biol, 2005, 38(6):739-747.
- [19] KORENBAUM E, RIVERO F. Calponin homology domains at a glance[J]. Journal of Cell Science, 2002, 115:3543-3545.
- [20] 贾聪聪, 张小晶, 黄陈平, 等. 斑马鱼胚胎发育过程中 *FGF3* 基因的表达[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(4):355-360.
- [21] 郭睿, 李喜霞, 王惠珍. 小鼠睾丸特异基因在生精细胞中阶段性表达的定量分析[J]. 动物学杂志, 2009, 44(1):39-46.

## Molecular cloning and expression analysis of *Megalobrama amblycephala SPATA4*

WEI Xin-lan ZHANG Jie CHEN Li-ping WANG Wei-min GAO Ze-xia WANG Huan-ling

*College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/*

*Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics,*

*Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The spermatogenesis associated 4 (*SPATA4*) gene from testis of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) were cloned using RACE (rapid amplification of cDNA ends) technology and characterized. The full length cDNA of *SPATA4* was 1 076 bp including a 678 bp open reading frame, which encode a putative protein of 225 amino acids residues with a theoretical molecular weight of 25.72 ku and an isoelectric point of 9.32. Further analysis of *SPATA4* sequence indicated that it had high identity with other vertebrates. Quantitative real time PCR was performed to detect the *SPATA4* mRNA in different tissues of adult fish and various developmental stages. The results showed that during 1-206 h post-fertilization, the *SPATA4* gene had the highest expression levels at 4 h and 28 h, decreased at 50 h to the lowest level, and had similar expression levels at other time points. In the ten tissues tested, the *SPATA4* gene showed highest expression level in testis.

**Key words** *Megalobrama amblycephala*; testis; *SPATA4*; cloning; temporal and spatial expression