

黄鳝粘液雌雄差异的 cDNA-SRAP 分析

胡彬¹ 曹哲明² 丁炜东² 邴旭文^{1,2}

1.南京农业大学无锡渔业学院,无锡 214182; 2.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,无锡 214081

摘要 采用 cDNA-SRAP 技术对黄鳝雌雄粘液进行基因差异表达分析,筛选黄鳝体表粘液中与性别相关的分子标记。从 64 对引物组合中筛选出 12 对引物组合,共获得 123 个稳定清晰的扩增位点,并筛选出 4 条雌雄有差异的条带。这 4 条特异性条带经过回收、克隆、测序后,将测序结果进行 Blast 分析,结果发现在 GenBank 中只有片段 1 与白鳢豚硫酸盐/硫代硫酸盐 CYSA 样进口 ATP 结合盒蛋白有较高的同源性。根据片段 1 的序列设计 1 对引物进行半定量 RT-PCR 反应,结果发现,片段 1 在雌雄黄鳝体表粘液均可获得扩增条带,但其在雄性粘液中的表达量显著高于雌性。这可能是由于雌雄黄鳝粘液中所存在的表皮细胞和粘液腺细胞有差异所致。

关键词 黄鳝; 粘液; cDNA-SRAP 技术; 性别特异; 分子标记

中图分类号 Q 959.482 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0074-05

黄鳝的生命过程中会出现性逆转,刚出生到产卵前为雌性,产卵后变为间性,最后进入雄性阶段。因此,黄鳝一直是研究鱼类性逆转的好材料。一方面,由于黄鳝的性逆转,处于雌性阶段的黄鳝个体小、怀卵量少,导致了其繁殖力低,这也极大地限制了黄鳝的规模化人工繁殖。只有弄清楚黄鳝性逆转的机制,保留更多更大的雌性亲本,才能从根本上解决黄鳝苗种短缺的问题。另一方面,由于目前黄鳝的性别鉴定大都是在解剖取性腺后才能够进行判定,而寻找一种可以在黄鳝存活的情况下用来区分其性别的分子标记就显得尤为重要。因此,近年来寻找黄鳝性别相关的基因以及与性别相关的分子标记成为研究的热点。

对于其他鱼类来说,可以通过采取鳍条、鳞片或尾静脉采血而不致死的方式^[1-4]提取其 DNA 或 RNA 进行分子方面的研究,而黄鳝无鳞片无鳍条,尾静脉采血后也会很快死亡,因此,要在黄鳝存活条件下进行分子方面的研究相当困难。笔者先前研究时尝试从黄鳝粘液中提取其基因组 DNA,并已获得成功^[5],同时由于黄鳝具有性逆转的特性,对于同一条黄鳝来说,不管它处于雌性阶段还是雄性阶

段,其基因组 DNA 是一样的,要想从 DNA 水平来找出雌雄差异是不可能的。因此,本试验尝试从黄鳝的粘液中提取 RNA,旨在从基因表达的差异水平上来寻找雌雄差异的分子标记。

SRAP 技术是由 Li 等^[6]提出的一项分子标记技术,可用于 cDNA 的差异表达分析。随后,cDNA-SRAP 技术开始在植物研究中得到广泛的应用,目前该技术应用于多种植物的遗传多样性分析、比较基因组学分析、遗传图谱构建等方面的研究^[7]。但是 cDNA-SRAP 技术在动物上的研究还比较有限,运用于鱼类的研究则更少。而在水产动物上进行的 SRAP 分子标记大多是以 DNA 为模板进行的,如对青虾^[8]、草鱼^[9]、黄颡鱼^[10]等进行的 SRAP 分子标记筛选。cDNA-SRAP 技术不仅操作简单方便,而且可以稳定地检测到差异表达的基因^[11],并且扩增出来的条带较强,无重叠,可直接回收测序^[6]。

本研究尝试从黄鳝粘液中无损伤地提取 RNA,然后逆转录为 cDNA,运用 cDNA-SRAP 技术来寻找黄鳝粘液中雌雄有差异的片段,旨在为黄鳝性别转化的研究提供更多的借鉴。

收稿日期: 2016-09-30

基金项目: 江苏省科技支撑计划—农业部分项目(BE2013315); 江苏省自然科学基金项目(BK2011184); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015JBFM06)

胡彬,硕士研究生,研究方向:水产动物遗传育种. E-mail: 754935327@qq.com

通信作者: 邴旭文,研究员,研究方向:特种水产养殖. E-mail: bingxw@ffrc.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

黄鳝来自于中国水产科学研究院无锡淡水渔业研究中心南泉实验基地。试验前,随机挑选 50 尾已经性成熟的黄鳝(体质量 35~200 g;体长 30~70 cm)暂养于循环水桶里,水温(25±0.5)℃;pH 7.3,暂养时间为 2 周。

试验前将黄鳝取出,放置于干净容器内加适量生理盐水,待黄鳝适应 30 min 后用薄尺轻轻刮取黄鳝体表的少量粘液,转移到 1.5 mL 的灭菌离心管中,粘液采集量约为 40 μL。每采集完 1 条黄鳝的粘液之后立即解剖,进行性腺组织学鉴定,以判别雌雄。最终选择 10 组(5 雄,5 雌)性腺特征比较明显的粘液样品作为试验材料,冷冻于液氮中,并储存在 -70℃ 冰箱里备用。

1.2 总 RNA 的抽提及 cDNA 的合成

雌雄黄鳝的粘液 RNA 采用 Trizol 法进行抽

提。提取之后采用超微量紫外分光光度计(NANO-DROP LITE, Thermo)测定黄鳝 RNA 溶液 D_{260}/D_{280} 比值和浓度,判断提取得到的 RNA 溶液的质量。再采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,最后 RNA 溶液储存在 -70℃ 冰箱里备用。

采用 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa BIO)将 RNA 溶液反转录成第一链 cDNA,操作按照说明书进行。反转录完成后,产物保存在 -20℃ 冰箱里备用。

1.3 SRAP 扩增

根据先前的研究文献^[12]设计 cDNA-SRAP 通用引物。为了进行 cDNA-SRAP 扩增,选择 64 对不同的引物组合(8 个正向引物,8 个反向引物)。引物由上海申能博彩生物工程公司合成,cDNA-SRAP 通用引物及引物序列如表 1 所示。

总的扩增反应体系为 25 μL,其中 10×PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL, 模板 cDNA 2.0 μL, 正反向引

表 1 cDNA-SRAP 反应的引物及引物序列

Table 1 Primers and their sequences of cDNA-SRAP amplification

正向 Forward	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	反向 Reverse	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
me1	TGAGTCCAAACCGGTGC	em1	GACTGCGTACGAATTCTG
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTCAA
me3	TGAGTCCAAACCGGTCC	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGTAA	em4	GACTGCGTACGAATTGCA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGACC	em6	GACTGCGTACGAATTTGA
me7	TGAGTCCAAACCGGAAT	em7	GACTGCGTACGAATTTGC
me8	TGAGTCCAAACCGGATA	em8	GACTGCGTACGAATTAAT

物各 0.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, 补充无菌水至 25 μL。

cDNA-SRAP 扩增采用 Eppendorf Mastercycler nexus (Eppendorf China Ltd)进行,扩增程序:95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 38℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 5 个循环;95℃ 变性 30 s, 50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 30 个循环;72℃ 延长 5 min;然后放入 4℃ 冰箱保存备用。最后 cDNA-SRAP 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳上进行检测。

1.4 cDNA-SRAP 扩增条带的分离及回收

采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(1×TBE 缓冲液)进行分离,100 V 电泳约 4 h,银染法染色。cDNA-SRAP 图像采用 image analysis system 进行分析。把图像上雌性有差异的片段切割下来,进行回收和二次扩增。扩增之后采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(EB 染色)来确定是否为目的条带。最后使用 3S Spin Agarose Gel DNA Purification Kit (Shen-

ergyBiocolor)对特定的差异条带进行纯化和回收,然后送铂尚生物技术(上海)有限公司进行克隆和测序。

1.5 差异片段在雌雄个体中的 RT-PCR 分析

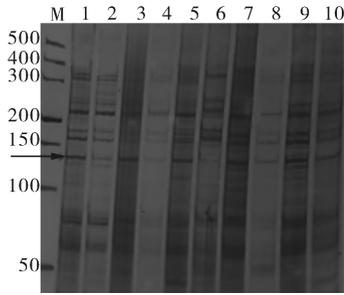
以雌雄黄鳝粘液 cDNA 作为模板,设计特异性引物 F1 (5'-GAGTCCAAACCGGAGCAGAAA-GA-3') 和 R1 (5-GACTGCGTACGAATTGACG-GCTTT-3')来进行 RT-PCR 反应,以检测黄鳝黏液中差异片段的雌雄表达差异,并以 β-actin(252 bp)作为内参。

2 结果与分析

2.1 cDNA-SRAP 引物筛选及扩增图谱

以雌雄黄鳝粘液的 cDNA 为模板,对 64 对 cDNA-SRAP 引物组合进行筛选,得到 12 个条带清晰稳定的引物组合,分别为: me2/em3、me5/em4、

me1/em6、me2/em6、me2/em4、me3/em6、me1/em3、me1/em5、me2/em5、me7/em2、me8/em5、me6/em2, 条带大小主要分布在 40~400 bp 之间, 如图 1 所示。



M: DL500 DNA marker; 1, 3, 5, 7, 9: ♂; 2, 4, 6, 8, 10: ♀; 箭头所指示的为差异片段 The arrow indicates the difference fragments.

图 1 引物组合 me2/em3 的 cDNA-SRAP 扩增图谱

Fig.1 The cDNA-SRAP amplification results of me2/em3 primer combination

2.2 黄鳝性别特征性序列筛选结果

在进行性别差异序列的筛选时, 有数对引物的扩增图谱有雌雄差异, 即相同大小的条带在雌雄中扩增出来的亮度差异较大, 其中以 me2/em3、me5/em4、me1/em6、me2/em6 这 4 组引物组合扩增得到的黄鳝性别特征性序列差异最为明显, 并分别编号 1、2、3、4。

这 4 个可能与雌雄性别相关的片段分子大小从 100~175 bp 不等, 将这些序列上传至 NCBI 上进行比对, 结果如表 2 显示。

2.3 特异片段的雌雄表达差异

由于在 4 个雌雄差异片段中, 只有片段 1 (me2/em3 引物扩增出来的) 蛋白与黄鳝比较接近, 都是动物性蛋白。因此, 只根据片段 1 的测序结果设计 1 对半定量引物来进行雌雄表达的差异分析。半定量 RT-PCR 反应扩增得到的片段大小在 100~150 bp 之间, 与片段 1 大小相符合, 如图 2 所示。

表 2 4 条片段序列的 Blast X 比对结果

Table 2 The Blast X results of the 4 sequences

编号 No.	引物组合 Primer combinations	序列大小/bp Fragment size	比对结果 Blast results	同源性大小/% Identity
1	me2/em3	137	硫酸盐/硫代硫酸盐 CYSA 样进口 ATP 结合盒蛋白[白鳍豚] Sulfate/thiosulfate import ATP binding protein CysA-like [<i>Lipotesoxeillifer</i>]	95
2	me5/em4	175	γ -谷氨酰基- γ 氨基丁酸水解酶 [假单胞菌] Gamma-glutamyl-gamma-aminobutyrate hydrolase [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	82
3	me1/em6	100	粘附 G 蛋白的 E1 状[山羊] Adhesion G protein-coupled receptor E1[<i>Ovisaries</i>]	57
4	me2/em6	106	假定蛋白 THAOC_07892[大洋洲海链藻] Hypothetical protein THAOC_07892 [<i>Thalassiosira oceanica</i>]	50

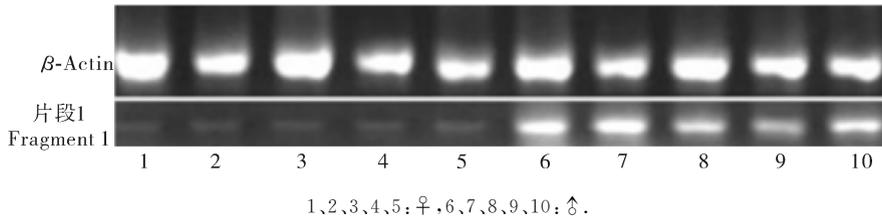


图 2 片段 1 在雌雄黄鳝黏液中的半定量 RT-PCR 分析

Fig.2 The semi-quantitative RT-PCR analysis of fragment 1 in the mucus of rice field eels

结果显示, 片段 1 在雌雄黄鳝粘液中都有表达, 但是表达量差异比较明显, 在雌性黄鳝的粘液中表达量较低, 而在雄性黄鳝的粘液中大量表达。

3 讨论

鱼类的粘液腺在外界的刺激下会分泌粘液, 而黄鳝的粘液腺发达, 分泌的粘液量也非常大。先前

我们已经成功无损伤地从黄鳝粘液中提取得到了基因组DNA,并对其原因进行了分析^[5]。可能在黄鳝的粘液中含有少量的表皮细胞和粘液腺细胞,它们是因衰老而正常脱落的,因此,本次也可以成功提取到其RNA。

cDNA-SRAP技术在分离表达差异基因方面有着广泛的应用,但大部分研究多用于植物上,而在水产动物上的研究则非常少。与本研究在黄鳝上得到的相似蛋白片段结果相比,在植物上都取得了很好的效果,一般都能分离到差异表达的基因片段。例如,马爱芬等^[13]通过cDNA-SRAP技术分析了黄色和黑色甘蓝型油菜种皮之间的表达差异,并获得了可能与种皮颜色相关的两个差异片段;曾黎琼等^[14]用cDNA-SRAP技术分析了在低、中、高钾水平下富源花魔芋叶片基因的差异表达情况,获得4条与已知功能基因高度同源的差异片段。而在水产动物上的研究,如闻海波等^[15]运用cDNA-SRAP技术分析了2种不同壳色三角帆蚌外套膜的表达差异,没有得到相关的差异表达基因片段,只获得了2个与已知蛋白相似的差异片段,这与本研究所得到的结果比较类似。

本研究利用cDNA-SRAP技术来寻找黄鳝体表粘液中的雌雄表达有差异的片段。从全部的64对引物组合中筛选出12对引物组合,并获得123个稳定清晰的扩增位点,这表明SRAP可扩增到多个等位基因,可以应用于黄鳝的分子生物学研究。在进行雌雄性别差异表达片段的筛选过程中,共筛选出4条雌雄有差异的条带,差异条带占总条带的3.2%,它们可能与黄鳝基因的雌雄差异表达相关。这4条特异性条带经过回收、克隆、测序后,片段分子大小从100~175 bp不等,将这些序列上传至NCBI上进行Blast比对分析,未找到相似基因序列,但是片段1与白鳍豚硫酸盐/硫代硫酸盐CYSA样进口ATP结合盒蛋白有较高的同源性,而其他3条都不属于鱼类上的蛋白,且同源性较低。这也进一步证实了cDNA-SRAP技术可以寻找到相关序列蛋白的特点。随后根据片段1的序列设计1对半定量引物来进行雌雄表达的差异分析。结果发现,片段1在雌雄黄鳝粘液中都有表达,但是表达量存在差异,在雌性黄鳝的粘液中,其表达量较低,而在雄性黄鳝的粘液中,其大量表达。

ATP结合盒蛋白(ABC转运蛋白)存在于多种生物中,它可以将与自身结合的物质进行跨膜转运,

期间需要利用ATP水解所释放的能量^[16]。与其结合进行跨膜转运的物质可以是蛋白质、氨基酸、多肽、糖类,也可以是无机盐和细胞代谢产物等。研究发现,ATP结合盒蛋白参与了体内的多种生理功能,而且它在维持细胞渗透压及脂质类物质的转运方面起着重要的作用^[17]。而在试验过程中得到的差异表达序列1(硫酸盐/硫代硫酸盐CYSA样进口ATP结合盒蛋白)即属于ATP结合盒蛋白的一种,而且目前还没有关于它的研究,但我们推测它可能是与黄鳝表皮细胞或粘液腺细胞中的硫酸盐、硫代硫酸盐的转运有关的一种蛋白,以维持细胞内外的渗透压平衡。本研究中虽然没有发现与性别调控相关的基因,但是得到了一种相似蛋白。而在黄鳝性逆转的过程中是否直接伴随着硫酸盐、硫代硫酸盐代谢的某些变化,还需要进一步研究。

在黄鳝的养殖实践中,需要在黄鳝存活的条件下进行性别区分时,通过片段1在黄鳝黏液中的表达水平的高低来推测其性别,这对养殖实践有一定的指导意义,也为黄鳝性别分化提供了一些基础研究。黄鳝的性别转化一直以来都是研究的热点,但是没有取得突破性进展,在这方面应该更多地从分子标记上入手,从而更加全面揭示黄鳝性逆转的分子机制。

参 考 文 献

- [1] 梁利群,孙孝文,王鹏,等.利用鳝条提取样品总DNA的探索[J].生物技术,1994,4(1):45-46.
- [2] BAUMSTEGIER J, KERBY J L. Effectiveness of *Salmon carcass* tissue for use in DNA extraction and amplification in conservation genetic studies[J]. North American journal of fisheries management, 2009, 29(1): 40-49.
- [3] 刘丽,刘楚吾,张明辉,等.不同保存条件下鱼类组织基因组DNA的提取效果分析[J].广东海洋大学学报,2007,27(6):18-21.
- [4] 刘哲,康鹏天,柴文琼,等.鱼类血液基因组DNA提取方法优化[J].水生生态学杂志,2009,2(6):102-106.
- [5] 胡彬,曹哲明,丁炜东,等.黄鳝体表粘液中基因组DNA的提取与分析[J].安徽农业大学学报,2016,43(2):146-149.
- [6] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brossica* [J]. Theoretical and applied genetics, 2001, 103: 455-461.
- [7] 桂琴,王嘉璐,伍晓明,等. SRAP-cDNA方法在植物基因差异表达分析中的应用[J].中国油料作物学报,2007,29(4):497-502.

- [8] 乔慧,吴滢,傅洪拓,等.应用 SSR 和 SRAP 标记构建青虾遗传连锁图谱[J].中国水产科学,2012,19(2):202-210.
- [9] 丁炜东,曹丽萍,曹哲明.草鱼种质相关 SRAP 及 SCAR 的分子标记[J].动物学报,2008,54(3):475-481.
- [10] 辛文婷,孙中武,尹洪滨,等.黄颡鱼雌雄差异的 SRAP 标记[J].东北林业大学学报,2009,37(5):112-113.
- [11] LI G, GAO M, YANG B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 168-180.
- [12] 程长洪,张敏莹,刘凯,等.利用 SRAP 标记研究四个暗纹东方鲀群体的遗传多样性[J].水生生物学报,2012,36(5):858-864.
- [13] 马爱芬,李加纳,谏利,等.甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示[J].作物学报,2008,34(3):526-529.
- [14] 曾黎琼,韩蓉蓉,段玉云,等.不同钾水平下花魔芋差异表达基因分析[J].中国蔬菜,2016(4):38-41.
- [15] 闻海波,曹哲明,金武,等.不同壳色三角帆蚌外套膜基因的 SRAP-cDNA 差异分析[J].水生生物学报,2014,38(5):848-858.
- [16] BURKE M A, MUTHARASAN R H, ARDEHALI H. The sulfonyleurea receptor, an atypical ATP-Binding cassette protein, and its regulation of the KATP channel[J]. J Am Heart Assoc, 2008, 102(2):164-176.
- [17] 王华丙,张振义,包锐,等.ABC 转运蛋白的结构与转运机制[J].生命的化学,2007,23(3):208-210.

Difference analysis of mucus between female and male ricefield eel by cDNA-SRAP

HU Bin¹ CAO Zheming² DING Weidong² BING Xuwen^{1,2}

1. *Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214182, China;*

2. *Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China*

Abstract The cDNA-SRAP technique was applied to analyze the difference of gene expression in the mucus between female and male ricefield eel and to screen sex-related molecular markers. Twelve polymorphic markers selected from 64 pairs of primer were used for cDNA-SRAP amplification and 123 polymorphic loci and 4 sex-special fragments were obtained. After gel extraction, cloning and sequencing, 4 sex-special sequences were obtained and submitted to db GSS (data of genome sequence survey). The result of blast analysis showed that only one sequence hit the *Lipotes vexillifer* sulfate/thiosulfate import ATP-binding protein CysA-like, which was used to design one pair of primer for semi-quantitative RT-PCR. PCR product was amplified in mucus of both female and male ricefield eel. However, there was a significant difference in their expression levels, with the expression in male significantly higher than in female, which may due to the difference of skin cells and mucous gland cells between female and male.

Keywords ricefield eel; mucus; cDNA-SRAP technique; sex-special; molecular markers

(责任编辑:边书京)