

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210407001

http://www.yykxjz.cn/

刘宇岩, 李凤辉, 边力, 朱文静, 陈四清, 曲江波, 常青, 刘长琳, 葛建龙. 中华蛸 *vasa* 基因的克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 118–128

LIU Y Y, LI F H, BIAN L, ZHU W J, CHEN S Q, QU J B, CHANG Q, LIU C L, GE J L. Cloning and expression of the *vasa* gene in the *Octopus sinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 118–128

中华蛸 *vasa* 基因的克隆及表达分析*

刘宇岩^{1,2} 李凤辉² 边力² 朱文静² 陈四清^{2①}
曲江波³ 常青² 刘长琳² 葛建龙²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;
3. 烟台开发区天源水产有限公司 山东 烟台 264006)

摘要 *vasa* 基因编码的蛋白是 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) 蛋白家族成员, 对真核生物生殖细胞的形成具有关键作用。本研究使用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了中华蛸(*Octopus sinensis*) *vasa* 基因全长, 共 2438 bp, 其中, 开放阅读框长 2067 bp, 编码 688 个氨基酸, 5'-UTR 长 128 bp, 3'-UTR 长 244 bp (包含 A 尾巴)。基于 ExPASy、Signal 4.1、TMHMM、SMART 等在线软件对 *Os-vasa* 基因的蛋白质结构进行预测, 得出其氨基酸分子量为 76 580.53 Da, 理论等电点为 5.89。无信号肽, 跨膜区域没有明显的信号, 因此, 推测其为胞内蛋白, 不属于膜蛋白。该蛋白具有 DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域, 而且有 9 个 DEAD-box 家族蛋白的典型保守区域, 表明所得 cDNA 属于 *vasa* 基因家族。使用 qRT-PCR 对中华蛸各时期胚胎、初孵幼体及 2 个发育时期的卵巢及雌雄不同组织的表达模式进行分析。结果显示, *Os-vasa* 基因在性腺中特异性表达, 且在卵巢中的表达大于精巢, 未成熟和成熟卵巢中均有 *vasa* mRNA 表达, 且未成熟期表达量较高。因此, 推测 *Os-vasa* 基因可能在卵巢发育过程和功能维持等方面起到重要作用。在中华蛸早期胚胎发育阶段, 均能检测到 *Os-vasa* 基因转录本, 前 10 d 微弱表达, 从第 13 天开始, 表达量逐渐上升, 至第 19 天达到最高。在初孵幼体阶段, *Os-vasa* 分别在第 8 天和第 20 天出现最低和最高表达量。本研究结果可为中华蛸原始生殖细胞起源、迁移和分化提供理论资料, 有助于加深对中华蛸卵巢发育和卵子发生过程的理解。

关键词 中华蛸; *vasa*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号 S965 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)03-0118-11

vasa 基因编码的蛋白是 DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) 蛋白家族成员, 该蛋白参与多种细胞进程, 如细胞 RNA 转录调节, RNA 剪切、修饰和代谢, 核内 mRNA 的运输及降解等(Dehghani *et al.*, 2015)。

Schüpbach 等(1986)首次在黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)中发现 *vasa* 的存在, 证明其属母源基因, 是生殖质的前体, 在生殖细胞分化中发挥作用(Hay *et al.*, 1988)。原始生殖细胞(PGCs)是由细胞分化

* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系专项资金和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020GH02)共同资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020GH02)]. 刘宇岩, E-mail: 157107719@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-07, 收修改稿日期: 2021-04-29

而来,发育早期从体细胞中掉落,随后经过一系列复杂的趋化因子作用发生转移,至生殖脊时精卵结合促使原始性腺形成。随后通过一系列的分裂增殖与分化过程,在性成熟阶段由卵巢和精巢分泌成熟的配子(胡翔, 2015)。近年来,一些分子标记的发现帮助了PGCs的鉴定,硬骨鱼PGCs的第1个分子标记是 *vasa* 基因(Olsen *et al*, 1997)。*vasa* 基因具有高度保守性,继在果蝇体内被克隆后,在无脊椎动物和脊椎动物相继展开研究,如家蚕(*Bombyx mori*) (Cao *et al*, 2012)、鸡(*Gallus gallus*) (Tsunekawa *et al*, 2000)和小鼠(*Mus musculus*) (Reunov *et al*, 2015)等。*vasa* 基因作为母源性基因,在生殖细胞中特异性表达,因此,可能在生殖发育的调控过程中发挥作用。目前,已在多种鱼类成功克隆 *vasa* 序列并得到其同源基因,如斑马鱼(*Danio rerio*) (Krøvel *et al*, 2004)、青鳉(*Oryzias latipes*) (Herpin *et al*, 2007)、文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*) (Wu *et al*, 2011)和七彩神仙鱼(*Symphysodon haraldi*) (林睿涓等, 2017)等,并深入研究了 *vasa* 在早期性腺分化及发育过程中发挥的作用。但未见有关中华蛸(*Octopus sinensis*) *vasa* 基因的报道。

中华蛸属于八腕目(Octopoda)、蛸科(Octopodidae)、蛸属,在浙江、福建和广东等近海区域广泛分布。中华蛸喜穴居,肉质鲜美,蛋白质含量丰富且营养均衡(郑小东等, 2011),生鲜即食,加工后晒干也可,能食部分占比很高(92%以上),颇受人们喜爱。中华蛸作为我国重要的经济海产类,已开展了对其人工养殖及繁育的研究(蔡厚才等, 2009; 郑小东等, 2011),但目前对中华蛸繁育机制的研究仍处于探索阶段。中华蛸卵母细胞发育不同步,属分批产卵,给规模化苗种繁育增加了困难,工厂化养殖仍需努力。*vasa* 是生殖细胞的分子标记物,开展 *vasa* 基因克隆和表达研究,可为中华蛸人工繁育和养殖提供理论依据。本研究以中华蛸为对象,运用cDNA末端快速扩增技术(RACE)克隆中华蛸 *vasa* 基因,并使用荧光定量PCR技术(qRT-PCR)对其早期发育阶段及各器官组织的表达状况进行检测,旨在完善中华蛸分子生物学和生殖调控方面的知识,为其生殖细胞的分化、早期性别鉴定及性别决定机制提供数据支撑,为实现工厂化繁育提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验样品制备

实验用中华蛸亲体在浙江南麂岛海域捕获,经长途运输至山东省烟台市牟平区天源水产有限公司进

行人工培育,养殖水温为23.2℃~25.6℃,盐度为30~32,日换水量100%~200%。分别取活力旺盛、体质量为1.0~1.5 kg的雌雄成体中华蛸各3尾,观察其右侧第3条腕确认雌雄,经MgCl₂ (浓度为20 g/L)麻醉后迅速解剖,分别取其卵巢、精巢、鳃、心脏、肾脏、肝胰腺、大脑、视腺和皮肤。所用受精卵、孵化出膜后幼体均由成体中华蛸自然产卵、人工培育而来。培育水温为23.8℃~26.0℃,溶氧>5.0 mg/L,受精卵孵化27 d得到初孵幼体。幼体孵出后,移入专用水泥池(6 m×2 m×1.5 m)。根据幼体密度和大小投喂合适密度的卤虫(*Artemia*),并连续充气确保氧气充足,前3 d使用静水培育,第4天使用流水,换水量为50%~70%,并进行吸底、排污。收集不同发育时间的受精卵(5、10、13、16、19、21、24和27 d)、孵化出膜后幼体(2、5、8、11、14、17、20、23和26 d)及未成熟、成熟期的卵巢若干,未成熟期体重为(182.31±20.29) g,性腺指数(GSI)为(0.55±0.22)%,卵母细胞直径在80~100 μm之间;成熟期体重为(1326±100) g, GSI为(5.19±0.81)%,卵母细胞直径在400~500 μm之间。所有样品均快速装入含有RNA保存液的2.0 mL无酶管中,并在4℃冰箱放置12 h,保证保存液完全渗入组织。样品带回后贴上标签,转入-80℃冰箱,防止RNA降解,用于后续基因克隆和表达分析。

1.2 主要试剂

SMARTTM RACE cDNA amplification 试剂盒、PrimeScriptTM RT reagent with gDNA eraser 反转录试剂盒、DNA Marker、Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM V 2.0)大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α菌株感受态细胞和pMDTM 18T vector cloning 试剂盒均购自TaKaRa公司,SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒购自艾克瑞生物,动物组织总RNA提取试剂盒(DP431)购自天根生化科技有限公司,ChamQTM SYBR Color qPCR master mix 试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 总RNA提取及cDNA第一链合成

本实验总RNA的提取使用动物RNA提取试剂盒(DP431),并参照其说明书提取中华蛸胚胎、孵化出膜后幼体各个时期和成体不同组织的总RNA。根据目的片段的长短采用不同浓度(1%~2%)的琼脂糖制成凝胶,点样后检测RNA的质量(条带是否清晰),使用NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)微量分光光度计检测RNA的纯度及浓度(用量1 μL)。5'RACE、3'RACE模板链的制备按照SMARTTM RACE cDNA amplification kit说明进行。

1.4 *vasa* 基因核心序列克隆

从本实验室构建的中华蛸转录组数据的注释信息,筛选比对得到 *vasa* 基因的部分 cDNA 序列。通过 Primer 5.0 软件设计 3 对引物扩增核心序列(表 1),以中华蛸成熟卵巢组织 cDNA 为模板分别进行扩增。20 μL 反应体系: 10 μL Premix *Taq*TM (LA *Taq*TM V2.0), 正向引物 *Os-vasa* F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , 反向引物 *Os-vasa* R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , cDNA 模板 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 6.4 μL 补齐。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。产物扩增完成后,在电泳板中检测扩增条带,切胶仪(DUT-48 超薄型)下观察合适的条带,并用 SteadyPure DNA 回收 DNA。纯化后的 DNA 连接到 pMD18-T vector 中,连接体系: pMD18-T vector 1 μL , Solution I 5 μL 及 DNA 纯化产物 4 μL , 并置于 PCR 反应仪中反应 3 h (16 $^{\circ}\text{C}$)。之后转入冰上融化的 DH5 α 感受态细胞过夜培养,筛选阳性单克隆并进行菌落 PCR 鉴定,将含有目的基因的菌液测序(华大基因)。

1.5 *vasa* 基因全长克隆

测序后,经拼接比对确认为核心序列,设计 RACE 特异性引物 *Os-vasa* 5'GSP-1、*Os-vasa* 5'GSP-2、*Os-vasa* 3'GSP-1 和 *Os-vasa* 3'GSP-2, 使用巢式 PCR 进行 3'和 5' RACE 扩增,5'端扩增: 5'RACE cDNA 为模板,先用 5'GSP-1 与 RACE 通用引物 UPM-long 组合完成第 1 次反应;接着用第 1 次反应获取的目的液稀释后为模板,5'GSP-2 与 RACE 通用引物 UPM-short 或 NUP 组合完成第 2 次反应。3'端扩增: 3'RACE cDNA 为模板,3'GSP-1 与 RACE 通用引物 UPM-long 组合完成第 1 次反应;用第 1 次反应获取的目的液稀释后为模板,*Os-vasa* 3'GSP-2 与 RACE 通用引物 UPM-short 或 NUP 组合进行第 2 轮扩增。

PCR 反应体系(20 μL): 10 μL Premix *Taq*TM (LA *Taq*TM V 2.0), 3'或 5'特异性引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , UPM (或 NUP) 0.8 μL , RACE-cDNA 模板(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , ddH₂O 6.4 μL 补齐。反应程序流程: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 3'和 5'特异性引物退火温度 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 反应 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。获取的产物检测后进行回收、纯化,之后连接转化培养,挑阳性菌株测序(华大基因公司)。

1.6 *vasa* 基因序列分析

测序完成的片段使用 Contig Express 9.1 软件进

行拼接、验证,并用 BLAST 工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比对,确认实验得到的 cDNA 是 DEAD-box 家族的 *vasa* 基因。使用 ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/Orf_finder.cgi)在线软件推导 *vasa* 基因的开放阅读框,利用 ExpASy (https://web.expasy.org/compute_pi/)网站分析分子量、理论等电点,利用 Signal4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测信号肽,使用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)进行跨膜区分析,利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测结构和功能结构域。将 *Os-vasa* 与其他已知物种的 *vasa* 氨基酸序列使用 NCBI 进行同源蛋白比对,并使用 DNAMAN 对同源蛋白多重比较,利用 MEGA 5.2 软件使用邻近法(neighbor-joining)构建系统进化树(Koichiro *et al*, 2011)。

1.7 实时荧光定量 PCR

取不同发育时间的胚胎、孵化出膜后幼体、2 个时期的卵巢和不同组织的总 RNA,反转录为 cDNA。将每个样品浓度加无菌无酶水补齐至 50 ng/ μL ,根据 *Os-vasa* 基因的核心序列,利用 Primer 5.0 设计 2 对荧光定量特异性引物 *Os-vasa*-RT-F/R,以 β -actin 为内参基因,使用 StepOneTM Real-time PCR system (IBM, 美国),配制 20 μL 反应体系: ChamQTM SYBR color qPCR master mix (2 \times) 10 μL , ROX reference dye I (50 \times) 0.4 μL , *Os-vasa*-RT-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , *Os-vasa*-RT-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , cDNA 模板 (50 ng/ μL) 2 μL , ddH₂O 6.8 μL 补齐。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (预变性); 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s) 40 个循环。所有检测样本设 3 个生物学重复,并设置 3 个技术重复,反应结束后查看熔解曲线是否正常。根据所测数据,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法算出 *Os-vasa* 基因相对表达丰度,求其平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE),使用 SPSS 17.0 软件对表达量进行方差检验, $P < 0.05$ 被认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *Os-vasa* 基因序列分析

中华蛸 *vasa* 基因全长为 2438 bp,命名为 *Os-vasa* 其 ORF 长度为 2067 bp,预测蛋白有 688 个氨基酸,5'-UTR 长 128 bp, 3'-UTR 长 244 bp (包含 A 尾巴),理论等电点为 5.89,氨基酸分子质量 76 580.53 Da,无信号肽,跨膜区域没有明显的信号,推测其为胞内

表1 本研究所用引物名称和序列
Tab.1 Names and sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	目的 Purpose
<i>Os-vasa</i> F1	CCCCACGAAAAGGAGCACG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R1	GGTGGTGGAGGGGGGATGT	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> F2	ATGGCACGGGGAAGAGGTC	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R2	GGAGGGGGGATGTATGGAG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> F3	GATTGTTGCCCTACTCGTG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> R3	TCAATCACTTGTCTTGGGGG	核心验证 Core verification
<i>Os-vasa</i> 5'GSP-1	CTGGTGGTGGAGGGGGGATGTATGG	RACE
<i>Os-vasa</i> 5'GSP-2	TGATTACTGTCACCTTGGTCTCTTCTA	RACE
<i>Os-vasa</i> 3'GSP-1	GCATTGGCAGAAGTGGTCGGTGTGGT	RACE
<i>Os-vasa</i> 3'GSP-2	CAAATGGCACATACAATAGTGGACG	RACE
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	菌落 PCR Colony PCR
M13-R	GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG	菌落 PCR Colony PCR
UPM-long	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
UPM-short	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE 通用引物 RACE universal primer
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
β -actin-F	TGATGGCCAAGTTATCACCA	qRT-PCR
β -actin-R	TGGTCTCATGGATACCAGCA	qRT-PCR
<i>Os-vasa</i> -RT-F	TACAAGTCTGGGGATGCTGG	qRT-PCR
<i>Os-vasa</i> -RT-R	ACTCTCGTCTTCTGGTGGTG	qRT-PCR

蛋白, 不属于膜蛋白。具有 *vasa* 基因的 DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域, 且包含 DEAD-box 家族蛋白的典型特点: 9 个保守区域, 分别为 AQTGSGKT(I)、PVLTLQLQ (Q)、PTRELA (I a)、TPGRI (I b)、DEAD (II)、SAT (III)、RGLD (V)、LVFVE (IV) 和 HRIGRTGR(VI)。另外, 预测的氨基酸序列 N 端有多个 RG 重复序列, C 末端存在 *vasa* 基因常见的保守结构色氨酸(W)残基和酸性氨基酸残基(EEEE), 序列中存在多个 GG 重复序列(图 1)。

2.2 氨基酸序列多物种比对及系统进化树构建

通过在线软件 NCBI blastx 和 DNAMAN 软件, 将中华蛸 *Os-vasa* 氨基酸序列与其他物种的 *vasa* 基因编码的氨基酸进行比对。结果发现, 该氨基酸序列与加州双斑蛸(*Octopus bimaculoides*) 同源性最高(98%), 其次是虎斑乌贼(*Sepia pharaonis*)(68.74%)、太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)(67.36%)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)(66.12%)、青螺(*Lottia gigantea*)(65.15%)、海兔(*Aplysia californica*)(63%)和紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)(62%), 与人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)同源性较低, 分别为 54%和 53%。另外, DEXDc 和 HELICc 2 个功能结构域的氨基酸序列保守性较高(图 2)。

为了分析 *vasa* 基因在不同物种中的进化关系, 利用 MEGA 5.2 软件对中华蛸及其他 13 个物种的 DEAD-box 蛋白序列构建系统进化树(图 3), 结果显示, 无脊椎动物和软体动物, 脊椎动物各聚一支, 其中, 中华蛸先与加州双斑蛸、虎斑乌贼聚为一支, 这表明它们的亲缘关系较近, *vasa* 基因在头足类中可能较为保守, 独立形成分支后再与软体动物的腹足纲(Gastropoda)和瓣鳃纲(Lamellibranchia)聚为一支。*Os-vasa* 在系统进化树中呈现的结果与中华蛸在生物学分类中的地位基本一致。

2.3 *vasa* 在不同发育时期及不同组织中的表达分析

在胚胎时期的 qRT-PCR 检测结果如图 4 所示, *Os-vasa* 基因在发育前 10 d 微弱表达, 从第 13 天开始, 表达量逐渐上升, 至第 19 天达到最高, 之后表达量又开始下降, 一直到孵化出膜。在仔蛸阶段, 从出膜到 17 日龄, *Os-vasa* 基因表达量都维持在较低水平, 8 日龄几乎检测不到表达信号, 从 20~23 日龄期间的表达量较高, 且在 20 日龄表达量最高, 后期阶段(26 和 29 日龄)又维持在较低水平(图 5)。

中华蛸雌性个体和雄性个体各组织的 qRT-PCR 检测结果如图 6 所示, *Os-vasa* 基因无论在雌性还是雄性个体性腺组织的表达量均较高, 在其他组织中

表达量均很低，并且在卵巢中的表达量高于精巢。

取未成熟的卵巢和成熟期的卵巢进行 qRT-PCR 检测，结果显示(图 7)，未成熟卵巢表达量显著高于成熟卵巢(P<0.05)，未成熟期的表达量是成熟期的 15.6 倍左右。

3 讨论

本研究从实验室构建的中华蛳性腺转录组注释中筛选得到 *vasa* 基因的部分片段，并通过 NCBI 进

行比对确认，使用 RACE 技术首次克隆了 *vasa* 基因 cDNA 序列，并以 *Os-vasa* 命名。其全长为 2438 bp，共编码 688 个氨基酸，理论等电点为 5.89，氨基酸分子质量为 76 580.53 Da。*vasa* 蛋白属于 DEAD-box 蛋白家族，Ia-Ib 和 II~VI 这 9 个保守区域是 DEAD-box 家族蛋白共有的特点(Tanner *et al*, 2001)，在大部分 DEAD-box 蛋白家族成员中保守性表达。本研究得到的 *Os-vasa* 基因同样发现了这 9 个保守基序的存在，每个保守基序都行使着特殊的生理功能，其中，Q

```

1  AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGATCCGCCGGTCCGAAAGTGCTTTTAAACCACTCTGACCTGCGACGTTTTGCATTCAGCGTTTCCCCACGAAAGGAGCACG
115  TGCATTCGCGCAAGATGGCACGGGGAAGAGGTCGAGGACTGCTTTCTAGACTTCAATGAAAATGACAAAGTTACCAAAACATTCATTCGCCCTCTCTCTGCCAGTTTGA
      M A R G R G R G L A F L D F N E N D K V T K H S I P P P S S G Q F D
229  TGACGAGTGTGGGACGATGACTATTCTGTAATAACAATGTCACCAATGGTAACGTGTGATAACAGCAGCAGCCCTTATCAAATGCTACCTTTTACAATAATGTCCAGTGAA
      D E C W D D D Y S V N N N V T N G N C D N S S S P L S N A T F Y N N V P V N
343  TAGTCACTCTGATTCAGTACCAAAAAATTTGGAGGCCAGACCAACAGAGAAAGCAGCCTGGTTGTAGAGTTTCAGAAACCTGAAATGCTGGGACGAGGAGACTCACCTAG
      S H S D S V P K K F W R P D Q Q R K Q P G C R G F R N L N A G T R R D S P S
457  TCCATCAATCAATAATTCAGAGGAAGATTGGAACCTGTGATGCTGAACAAGAAAAAATACCATAGTGAAGAGGATCCAAATTCAGTCTAGAAGAGACCAAGGTGACAGTAA
      P S I N N S E E D W N S D A E Q E N K Y H S R K E S K F S S R R D Q G D S N
571  TCAAAGTAGACCAGTAAATGGTCTCGCTACAAGTCTGGGATGCTGGTGTGAATGAAGGAATGCATCTCGATTAAATGTCAGTTCATATAAAGTTCAGATCCATTTGACAA
      Q S R P G N G A R Y K S G D A G C N V R N A S R F N V S S Y K R S D P F D K
685  AGTGCCTGACCATATGACATAGGAGATGCTCAAGTGTGAAGTCCATACATCCCCCTCCACCACCAAGAGAGAGTGAATCTTTCAGTCCATTCACCGGATCAAA
      V P D H M T L G D A Q G G E A P Y I P P P P E D E S A I F Q S I P T G I N
799  TTTTCTAAGTATGATGATATTCCAGTCGAGATTCTGGGCGAGCTGCCAAGCGGTTTAGTTGATTGAAAGACGCGCAATCCAGCAAAAAGATAATGAAAACATCTATCG
      F S K Y D D I P V E I S G R A A P S G L V D F E D A Q F Q Q K I M E N I Y R
913  TGCCAAATTTGAAAACCACTCCAATCCAGAAAAATGCCATTCCAATATACAAGCTGGTCGTGATCTAATGGCCTGTGCCAGACTGGCTCTGGTAAAAACGCTGCCTCTCT
      A K F E K P T P I Q K N A I P I I Q A G R D L M A C A Q T G S G K T A A F L
1027  ATGGCCAGTATTAACATTTGTTTACAAGAGGTGTGAAAAGATGTGAACAAMATCTCCACAATACCTGAAATTTGATTGTTGCCCTACTGCTGAACCTGCTGATACAGAT
      L P V L T L L L Q R G V K R C E Q N L P Q Y P E I L I V A P T R E L A V Q I
1141  ATTCATGGACTCGCAAAATTTGCCATGGGACAAGCATAACGATCTGCTGTGTCTATGGTGGTACATCAGTTTCAAGCCAGATAAAGAAATATTTCTGTGGAGTTCATGTGT
      F M D T R K F A Y G T S I R S A V V Y G G T S V S S Q I R N I S C G V H V L
1255  AGTTGGAACCTCCAGGTCGTCTACTTGTATTTATTCAGAAAAATACAGTGAATATATCTCAAGTGAACATTTTCATCTGGATGAAGCAGATCGAATGTTAGATATGGATTGA
      V G T P G R D L D F I Q K N T V N I S Q V K H F I L D E A D R M L D M G F E
1369  GCCAGATATAAGGAGGTTGGTGGATGATCATGGAATGCCAGCAAAACCCAAAGACAGACATGATGTTCACTGCTACATTTCCAGACAAAATCAAGAATTAGCTGCTGATT
      P D I R R L V D D H G M P A K T Q R Q T L M F S A T F P D K I Q E L A A D F
1483  TCTTAATGATTTATTTCTCACCATTGGCTGGTGGTGGTGCATGTTCTGATGTTGAACAGATTCTCTTAAAAGTATCAAGGCAGGAAAAAGAGAGAAATTTGTCAGTTT
      L N D Y L F L T I G L V G G A C S D V E Q I L L K V S R Q E K R E K L C S F
1597  TTTAGATGAATTTGGTTCAGATAAAACCTAGTCTTTGTGGAACAAAAGAGGAATGCAGACTTTTGGCATCTACCTCTCACAAAATGATTACAAAACAAAGTATTCATGG
      L D E F G S D K T L V F V E Q K R N A D F L A S Y L S Q N D Y K T T S I H G
1711  AGACCGTCTTCAACGAGAAGAGAAGAAGCCTTACAAGATTTCAGACAGGAAGAATACCAGTGTAAATGCAACTTCAGTGGCAGCTCGAGGACTTGATATTCCTAATGTGAC
      D R L Q R E R E E A L Q D F K T G R I P V L I A T S V A A R G L D I P N V S
1825  CCAAGTTGAAACTATGACCTTCCAGCTCTGTTGATGATATGTCCACCCGATGGCAGAACTGGTCGGTGTGGTAAATCAGGTGCGCATCTTTATCTCCGATTC
      Q V V N Y D L P S S V D E Y V H R I G R T G R C G N T G R A I S F Y S S D S
1939  AGACTCGAGTCTGGCAAAAGCCTTGACAAAAGATATTGAGTGTGCTCAACAAAATGTCCTGTTGGTTAGAGGAAGAAGCAAAAATGTTAGGCCCTTCAAATGGCAGATACAA
      D S S L A K A L T K I L S D A Q Q N V P V W L E E E A K M V G L S N G T Y N
2053  TAGTGGACGTTTTGGTGGCCGGGATCGGAGGAGAATTAGGAGCTGTGCCACGAAATGGTAAATGATGTTGGTTGGTTGGCAACCTATAAGCAGTGGAGCACCCCAAGCAAGT
      S G R F G G R D R R R I R S C A P E M V N D G C G W Q P I S S G A P P R Q V
2167  GATTTGAAGAGGAAGAGTTGTGGAAATAATTACTTTCCAAGTGTGATAGTATCCATACCAAAAAGTTTCTATTTTTCTCAATCAAAGACTATTTCACTTGATAGTGTGGGTG
      I E E E E L W E *
2281  TTGATCCTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTAAAAATTTTCAATTTGGGAGAAAACAAGATCTGTTAAATAGTAAATGTTTTTTTATAATGCTTATTTGCTTTAAATAA
2395  ATTTGATTTTGGAGTTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG

```

图 1 *Os-vasa* 基因 cDNA 序列全长和编码的氨基酸序列
Fig.1 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *Os-vasa*

起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA 均用灰色阴影标出；PolyA 用双下划线标出；GG 重复序列、酸性氨基酸和色氨酸用方框标出；DExDc 和 HELICc 2 个功能域用下划线标出；阴影加方框部分是 *Os-vasa* 保守基序
Start codon (ATG) and stop codon (TAA) are marked with gray shadow, and PolyA is marked with double underline; Nucleotide with a frame represents GG repeat sequence, acidic amino acid and tryptophan; Open reading fragment; DExDc and HELICc functional domains are underlined; Sequences in gray background and frame represents the *Os-vasa* conserved motifs

motif 框在 ATP 的结合与水解过程中发挥重要作用, 谷氨酰胺残基加上 N 可以参与氢键的形成, 与功能性区域 I 也有关联, 例如, 相互配合促使 ATP、RNA 两两结合(Rocak *et al*, 2004)。motif I ~ III 又可以相互作用形成一个 ATP 水解的作用口袋(Caruthers *et al*, 2002)。motif I a 和 motif I b 则主要参与 RNA 的结合过程, motif IV、V 和 VI 参与 ATP 酶和解旋酶的活性调节(Cordin *et al*, 2006)。经编码氨基酸的多序列比

对, 在保守基序区域, 物种间呈现高度保守性, 仅有少数氨基酸残基存在差异, 表明 *vasa* 基因在进化过程中较为保守。另外, 在 *Os-vasa* 基因中发现了一些 *vasa* 基因的普遍性特征, 例如, 存在多个 GG 重复序列, 氨基酸 C 末端存在酸性氨基酸残基, 终止密码子前端有 1 个色氨酸残基。GG 基序参与蛋白因子 eIF4A 的相互作用(Rogers *et al*, 2002), C 末端的酸性氨基酸残基常与 RNA 结合过程有关(Fabioux *et al*, 2004)。

<i>Octopus sinensis</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNE..... NDKVTKHS. I PPPSS..... GQFDDDE..... CWDDDDYSVNNNV..... T	49
<i>Sepia pharaonis</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNSNDNGNNNNQVQI QRSPLPPTAS..... SQFED..... CWDDDCSSSAQVG..... T	58
<i>Octopus bimaculoides</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNSNDNGNNNNQVQI QRSPLPPTAS..... SQFED..... CWDDDCSSSAQVG..... T	0
<i>Crassostrea gigas</i>	MTGRGRI LGNKNGFGRGGFGRGASSSSDASGGARGRFGRVLRAGFT..... VNGNDVSSNGMADMSLNKP..... GGTA..... NGFGKSDNNSSSGGFGKGGGGGSSGGG..... S	101
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	MAAKR..... GRGRGFGKGGEGDGG..... STGMT..... KGLGRVLRAGFTAVVNGTTNGDGLSGGFSNMSVKSFPGGGSK..... GGRFSSKSSGGG..... GGGGGGGGFSKQTQNG..... R	99
<i>Lottia gigantea</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNE..... NDKVTKHS. I PPPSS..... GQFDDDE..... CWDDDDYSVNNNV..... T	24
<i>Aplysia californica</i>	MDDWMDGAPASTSSDAPSASFSSGG..... GRGAVAKAFGEKVRIGRLGLSSSDSAPQTNGFQGRGRGGGGGGRS RNENGGDDDEPRSNFGFSRNGFGF..... GRRGGGGGFSRGGGGGGGGGG	117
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	MTAVE..... AQG. FGRGGFGRGST. SSGSTSAPI PGFGRVLRREGFTTAAQ..... TNGFSDATEGVKDMSI SKPPAFGGKP..... GGFGSQNGGGGFGSSGGGGGGGNGKSSGG..... D	101
Consensus	m..... f..... g..... r..... g..... r..... ng..... s..... g..... s..... gfgs..... gg..... gfg..... g	
<i>Octopus sinensis</i>	NGNCDNNSPLSNATFYNNVPVNSHS DSVPKKF..... WRPDQQRKQPCGRFRN..... LNAGTRRDS PPSI NNS EEDWNSD..... AEQENK	129
<i>Sepia pharaonis</i>	NS YGRATPDNFSYSGEPTDSSLQLTGFSSSPTG..... WEDQASSSSHSYQNSNG..... YGNRADSSSSHGKRRRRTNGV..... DRTGGG	138
<i>Octopus bimaculoides</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNSNDNGNNNNQVQI QRSPLPPTAS..... SQFED..... CWDDDCSSSAQVG..... T	0
<i>Crassostrea gigas</i>	GGFCKNSDNNNNGSRGGFGGSSGGFGGSSG..... GGFgakkeggfgggf..... GSKNDGESSFGGGFGGGDRPRGG. GFG..... GGGSGG	185
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	GGFGGGSNGMTNGGGGGFGRG..... GGGFGKSGSDGGGGFDRPPRGGFGGGGGSSSGCHKCEDGHFARECP TGGGRRGGGGGGKHCQEGEGRHAR. ECP T. G. GGG..... GGGDRS	210
<i>Lottia gigantea</i>	SGFGGGNSGFS..... GSKGFGGG..... GGGKCFKCCG..... QEGHMSRECPSSGGQSS..... RGKG. CFKCGEGHMSR. ECPKG..... GGGGRG	97
<i>Aplysia californica</i>	NGFGSSHGDDDEEGSSGSSGFRS GRRGGGSGGG..... FGGRRGGGGGGGGGGGGRKRRADWTC PDGDCG..... ANNFAYRRNCFKCDVAKPDGSSSSGGGSGFRSFGGGSGG	228
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	GGFGFS..... KGGFGGGGGGGDGGF..... GGGFG..... GDDPKRRGGGGGSSG..... GGGKCFKCGEGHMSR. ECPSAEQ. GGG..... GGGNRN	175
Consensus	gfg..... g..... gg..... gg..... g..... g..... gfggggg..... c kcg g r e p g g..... ggg g	
<i>Octopus sinensis</i>	YHSRKESK. FSSRRDQG. DSNSRPGNGARYKSDGACNVRNASRFNVS SYKR..... SDPFDKVPDHTLGDAGQG..... EAPYI PPPPEDESAL FQ. SI PTGI NFSKY	228
<i>Sepia pharaonis</i>	CFKCGDSG. HFARECSS. TFQSGSSSSGCKYKCGESHAFARAC..... MNSND..... SRTI DNQ. DQMTLGGSSR..... EAAAYI PPPPEDEETI FK. CVPTGI NESKY	231
<i>Octopus bimaculoides</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNSNDNGNNNNQVQI QRSPLPPTAS..... SQFED..... CWDDDCSSSAQVG..... T	0
<i>Crassostrea gigas</i>	CRNCGEGG. HFARECEPRKGGGGGGDRGCRNCGEGGHFARECPNPRKEGGGG..... GGG. KCFKCGEGHWARDPCNAP..... PODDPRPAPYPPAPSEAEI FK. VI QKGI NFDYS	294
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	CFKCGEGG. HNSRECPKGGGGGGGGDRS CFKCGEGGHMSRECPSSGAGGGGG..... SGDRGCFKCGEGHMSRECPNAEKSI QLDPDRPAPYI PPAPSEAEI FK. GI LKGI NFDYK	324
<i>Lottia gigantea</i>	CFKCGEGG. HNSRECPSS..... GGGQSRGKGGCFKCGEGGHMSRECPSSGSSRS GFSGKGGCFKCGEGHMSRECPNQE..... NKDGEKREI YI PEPSTDEDEI FK. SI ERGI NFNKY	207
<i>Aplysia californica</i>	FGGGGGGGGGFRRRNDSGDSGGGGGGGRRRRRGE..... WTCPDASCGNNN..... FSFRVKCQKGETP..... KPGGS PGD..... GGGKPREAPYI PPAPSEAEI FK. SI ERGI NFDYK	334
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	CFKCGNSG. HMARECPNAEGGGGGGSGNCFKCGESHAFARAC..... MNSND..... SRTI DNQ. DQMTLGGSSR..... EAAAYI PPPPEDEETI FK. CVPTGI NESKY	281
Consensus	cfkckge g h reep gggggg c kege gh r cp g cfkce e ghm r cp d r apyppapsede eifk i kginfdky	
<i>Octopus sinensis</i>	DDI PVEI SGRAAFSGLVDFEDAQFQKQI MENI YRAKFEKPTPI QKNAI PI I QAGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	348
<i>Sepia pharaonis</i>	DEI PVEVSGRAAPANMLS EES. HFKGLLLTNI HRAKYDKPTPVQKYSI PI I HAGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	350
<i>Octopus bimaculoides</i> MARGRCRLGLAFLD..... FNSNDNGNNNNQVQI QRSPLPPTAS..... SQFED..... CWDDDCSSSAQVG..... T	53
<i>Crassostrea gigas</i>	DKI PVEVTRDPPSSI KNFDEAGLYEKFLENVRKAQEKPTPVQKYSI PI I VAGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	414
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	EKI PVEVTRDPPASIS KSFEEAGI YEGFMKNLVKAHFKPTPVQKYSI PI I VMSGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	444
<i>Lottia gigantea</i>	DDI PVEVSGRSFVSI TS FDEAGLRDLS FLKNVRKAKYDRPTPVQKYSI PI I VAGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	327
<i>Aplysia californica</i>	DDI PVEVSGRDCQCFI STFDEAGLYPTFLRNI KRKYKPKPTPI QKYSI PI I TAGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	454
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	EKI PVEVTSNCPKSI SNFDEAGLYDTFLKNVKSNDYRPTPVQKYSI PI I VMSGRDLMACAQTGS GKTAAFLPVL TLLLRQGVKRCQNLQVYPI LI VAPTRRELAQV I PMTRKFAHG	401
Consensus	d i pvevsgr p i fdeagly fl n kakeyepkvqysi pi i magrdl macaqtgs gktaafllpvl t llm n g l s fsevgvqal vva p t r e l a v q i f d a r k t f a h g	
<i>Octopus sinensis</i>	TSI RSAAVYVGGTSVSSQI RNI SCGVHVLVGTGPRLLDPI QKNTVNI SQVHKRIL LDEADRLDMGFPDPI RRLVDDHGMPAKTRQTLMFSAATFPDPI QRLAADFNDYLFVTI GLVGGAC	468
<i>Sepia pharaonis</i>	TNI RSAAVYVGGTSVGSQARTLHVGHVFLVGTGPRLLDPI HKNNTI NLSKVHRI LDEADRLDMGFPDPI RRIWKDSGMPAKTRQTLMFSAATFPDPI QRLAADFNDYLFVTI GLVGGAC	470
<i>Octopus bimaculoides</i>	TSI RSAAVYVGGTSVSSQI KNI SFGVHVLVGTGPRLLDPI HKNNTI SQVHKRIL LDEADRLDMGFPDPI RRLVDDHGMPAKTRQTLMFSAATFPDPI QRLAADFNDYLFVTI GLVGGAC	173
<i>Crassostrea gigas</i>	TMLRAVYVGGTSVGYQLRQVEGCTHI LVGTGPRLLDI I GKGKI SLSKLYL LDEADRLDMGFPDPI RKLWELCTPDKTRQTLMFSAATFPDPI QKMGADFLNDYLFVTI GLVGGAC	534
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	TMLRSVYVGGTSVGYQLRQVEGCAHIVGTGPRLLDI I GKGKI SLSKLYL LDEADRLDMGFPDPI KKI WHELCTPDKTRQTLMFSAATFPDPI QKMGADFLNDYLFVTI GLVGGAC	564
<i>Lottia gigantea</i>	TDLRSVYVGGTSVGYQMKVQEGCAHIVGTGPRLLDI I GKGKI SLSKLYL LDEADRLDMGFPDPI RKLWELCTPDKTRQTLMFSAATFPDPI QKMGADFLNDYLFVTI GLVGGAC	447
<i>Aplysia californica</i>	TEVRAVYVGGTSVGYQMKVQEGCAHIVGTGPRLLDI I GKGKI SLSKLYL LDEADRLDMGFPDPI RKLWELCTPDKTRQTLMFSAATFPDPI QKMGADFLNDYLFVTI GLVGGAC	574
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TMLRSVYVGGTSVGYQLRQVEGCAHIVGTGPRLLDI I GKGKI SLSKLYL LDEADRLDMGFPDPI KKI WHELCTPDKTRQTLMFSAATFPDPI QRLAADFNDYLFVTI GLVGGAC	521
Consensus	t l r s v y l v g g t s v y q r v e g a h l v g t p g r l l d i i g k g i s l s k l l d e a d r l d m g f e p d i r k l v g n p a k t e r t l f n f s a t f p e e l k a a d f n d y l f t v g r v g g a c	
<i>Octopus sinensis</i>	SDVEQI LLLKVSROBKREKLSFIDFSGDKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNDYKPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVSVVNYDLFSS VDEYVHRI GRTG	588
<i>Sepia pharaonis</i>	SDVEQI LLOVNRQKREKLSFIDFSGDKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNSYRPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVNLYNYDLNCVDEYVHRI GRTG	590
<i>Octopus bimaculoides</i>	SDVEQI LLLKVSROBKREKLSFIDFSGDKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNDYKPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVSVVNYDLFSS VDEYVHRI GRTG	293
<i>Crassostrea gigas</i>	TDVTVYVEVDRQKREKLSI DITETGSEKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNGFPPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVKHWI NYDLQSI DEYVHRI GRTG	654
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	SDVTVYVDRQKREKLSI DITETGSEKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNGFPPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVKHWI NYDLQSI DEYVHRI GRTG	684
<i>Lottia gigantea</i>	TDVTVYVEVDRQKREKLSI DITETGSEKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNGFPPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVKHWI NYDLQSI DEYVHRI GRTG	567
<i>Aplysia californica</i>	TDVTVYVEVDRQKREKLSI DITETGSEKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNGFPPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVKHWI NYDLQSI DEYVHRI GRTG	694
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	TDVTVYVEVDRQKREKLSI DITETGSEKTLVFVEQKRNADFLASLYS QNGFPPTSI HGDRLOREBEALDFKTCRIPVLI ATSVAAARGLDI PNVKHWI NYDLQSI DEYVHRI GRTG	641
Consensus	t d v e q i l l l k v s r o b k r e k l s f i d f s g d k t l v f v e q k r n a d f l a s l y s q n g f p t t s i h g d r l o r e b e a l d f k t c r i p v l i a t s v a a r g l d i p n v s v v n y d l f s s v d e y v h r i g r t g	
<i>Octopus sinensis</i>	RCGNCRAI SFYSSSDS SLAKLTKI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	687
<i>Sepia pharaonis</i>	RCGNCRAI SFYSSSDS SLAKLTKI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	683
<i>Octopus bimaculoides</i>	RCGNCRAI SFYSSSDS SLAKLTKI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	392
<i>Crassostrea gigas</i>	RCGNCRAI SFYSSNDTGALAKPLVRI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	758
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	RCGNCRKATS FSDGDSLAKPLVRI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	789
<i>Lottia gigantea</i>	RCGNCRKATS FSDGDSLAKPLVRI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	671
<i>Aplysia californica</i>	RCGNCRKATS FSDGDSLAKPLVRI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	800
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	RCGNCRKATS FSDGDSLAKPLVRI LS EAQNVVWV EBEAKMVLGSLNG. TYNSGRFGGRDRRI RSCAPEMVNDG. CGVQPI SSG..... APPROVI EEE..... BLW	744
Consensus	r c g n i g k a i s f y s s d s s l a k l t k i l s e a q n v v w v e b e a k m v l g s l n g . t y n s g r f g g r d r r i r s c a p e m v n d g . c g v o p i s s g a p p r o v i e e e b l w	

图 2 中华蛸 *Os-vasa* 编码氨基酸序列与其他物种同源序列比对

Fig.2 Homologous amino acid sequences alignment of *Os-vasa* with other species

阴影部分表示氨基酸同源, 左边为物种名称, 右边为比对到的氨基酸位置。

各物种蛋白 NCBI 登录号: 加州双斑蛸(KOF70288.1)、虎斑乌贼(CAE1321294.1)、太平洋牡蛎(XP_034310873.1)、
 虾夷扇贝(XP_021370694.1)、青螺(XP_009057808.1)、海兔(XP_005113588.2)、紫贻贝(BAJ15435.1)

The shaded area indicates amino acid homology species. Species NCBI Login No: *Octopus bimaculoides* (KOF70288.1), *Sepia pharaonis* (CAE1321294.1), *Crassostrea gigas* (XP_034310873.1), *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021370694.1), *Lottia gigantea* (XP_009057808.1), *Aplysia californica* (XP_005113588.2), *Mytilus galloprovincialis* (BAJ15435.1)

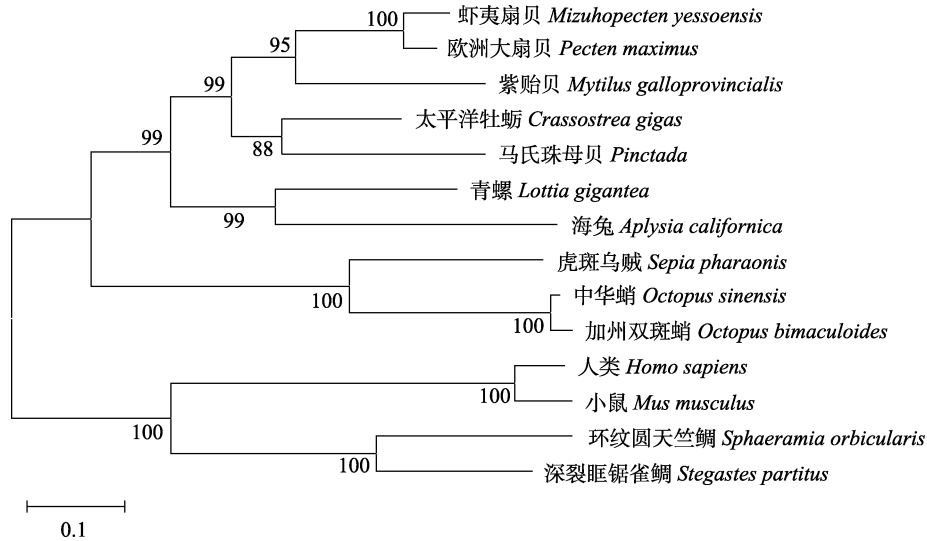
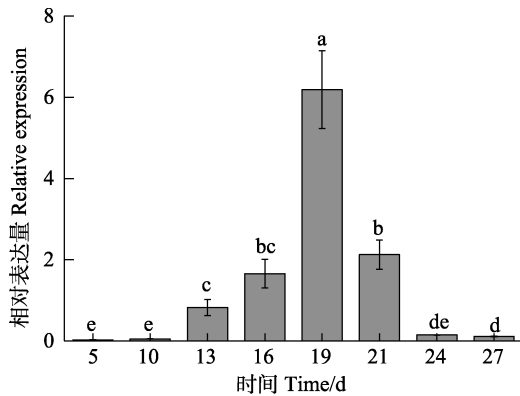


图3 不同物种 vasa 蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of vasa protein from different species

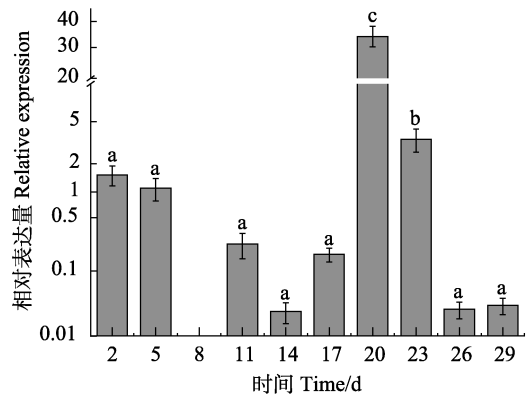
所用到的物种 vasa 基因序列登录号: 虾夷扇贝(XP_021370694.1)、欧洲大扇贝(XP_033738811.1)、紫贻贝(BAJ15435.1)、太平洋牡蛎(XP_034310873.1)、马氏珠母贝(BAM75192.1)、青螺(XP_009057808.1)、海兔(XP_005113588.2)、虎斑乌贼(CAE1321294.1)、加州双斑蛸(KOF70288.1)、人类(CAB70750.1)、小鼠(NP_034159.1)、环纹圆天竺鲷(XP_030008903.1)、深裂眶锯雀鲷(XP_008278033.1)

The Accession number of vasa gene sequence were used: *Mizuhopecten yessoensis* (XP_021370694.1), *Pecten maximus* (XP_033738811.1), *Mytilus galloprovincialis* (BAJ15435.1), *Crassostrea gigas* (XP_034310873.1), *Pinctada fucata* (BAM75192.1), *Lottia gigantean* (XP_009057808.1), *Aplysia californica* (XP_005113588.2), *Sepia pharaonis* (CAE1321294.1), *Octopus bimaculoides* (KOF70288.1), *Homo sapiens* (CAB70750.1), *Mus musculus* (NP_034159.1), *Sphaeramia orbicularis* (XP_030008903.1), *Stegastes partitus* (XP_008278033.1)

图4 *Os-vasa* mRNA 在胚胎发育时期的相对表达量Fig.4 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at different development stages of the embryo

柱上不同字母代表具有显著差异($P < 0.05$), 下同
Bar with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same as below

RGG 重复区也具有相似性, 在昆虫和脊索动物中普遍存在且大多数位于 vasa 蛋白的 N 端, 但并不普遍存在于所有 vasa 蛋白, 例如, 在马氏珠母贝(*Pinctada fucata*) (刘雅等, 2017)、刺参(*Apostichopus japonicus*) (隋娟等, 2008)的 vasa 蛋白的 N 端未发现 RGG 重复区

图5 *Os-vasa* mRNA 在不同发育时期仔蛸中的相对表达量Fig.5 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at the different stages of the larvae

的存在, 本研究结果也是如此, 说明这些序列并不是不可或缺的, 其行使的功能具有可替代性。功能结构域结果显示, *Os-vasa* 基因具有 DEADc 和 HELICc 2 个结构域, 这些都是 vasa 蛋白家族特有的, 表明所得 cDNA 属于 vasa 基因家族且高度保守。

中华蛸 *Os-vasa* 氨基酸序列与其他物种 vasa 基因编码的氨基酸比对结果显示, 与加州双斑蛸相似度高, 达 98%。系统进化树结果显示, 中华蛸 *Os-vasa*

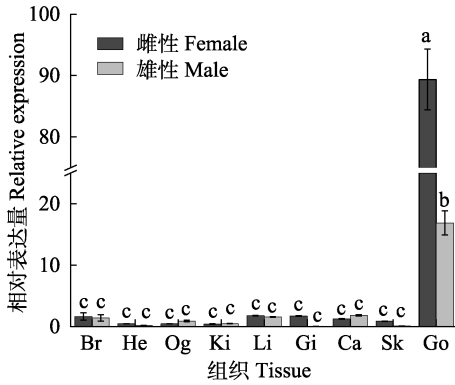


图 6 *Os-vasa* mRNA 在雌雄中华蛸不同组织中的表达
Fig.6 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA in different tissues of female and male *O. sinensis*

Br: 大脑; He: 心脏; Og: 视腺; Ki: 肾; Li: 肝胰腺;
Gi: 鳃; Ca: 胴肌; Sk: 皮肤; Go: 性腺
Br: Brain; He: Heart; Og: Optic gland; Ki: Kidney;
Li: Liver; Gi: Gill; Ca: Carcass; Sk: Skin; Go: Gonad

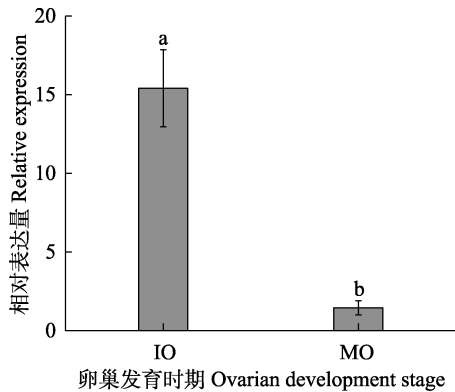


图 7 *Os-vasa* mRNA 在卵巢发育不同时期的表达
Fig.7 Expression distribution of *Os-vasa* mRNA at different stage of ovarian development of *O. sinensis*

IO: 未成熟卵巢; MO: 成熟卵巢
IO: Immature ovary; MO: Mature ovary

蛋白先与加州双斑蛸、虎斑乌贼聚为一支, 预示中华蛸 *Os-vasa* 基因在生物体中发挥的功能与头足类中其他物种高度相似, 然后再与软体动物中腹足纲和瓣鳃纲聚为一支, 与脊椎动物则亲缘关系较远。*Os-vasa* 在系统进化树中的分子学进化地位与中华蛸的生物学分类地位是相符的。

Os-vasa 基因组织 qRT-PCR 结果显示, 其在中华蛸卵巢和精巢中高表达, 而在中华蛸其他组织中表达量较低, 甚至检测不到表达信号, 差异极显著 ($P < 0.01$)。这一结果和多数报道的物种 *vasa* mRNA 表达模式一致, 如栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (邵明瑜等, 2007)、马氏珠母贝、太平洋蓝鳍金枪鱼 (*Thunnus orientalis*) (Nagasawa *et al*, 2009)。研究表明, 通过

RNAi 技术使用 *vasa* dsRNA 处理太平洋牡蛎性腺会导致 *vasa* mRNA 沉默, 性腺 *vasa* mRNA 表达水平明显降低, *vasa* 蛋白表达量也随之降低或者不表达, 且大部分太平洋牡蛎不育 (Fabioux *et al*, 2009)。*vasa* 基因在生殖细胞的特异性表达模式表明其参与调控生殖细胞发育过程并发挥重要作用。也有研究发现, *vasa* 除在性腺组织中表达外, 在其他组织也有表达, 例如, 在半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) (Hay *et al*, 1988) 的心脏组织, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Wu *et al*, 2014) 的脑和心脏组织, 在小鼠 (Zamboni *et al*, 1983) 的肾和肾上腺组织都检测到 *vasa* 基因的表达。*vasa* 基因不仅参与生殖细胞发育, 还可能通过调节有关 mRNAs 的转录参与体细胞的分化 (Ikenishi *et al*, 2000)。*vasa* 基因具体行使的功能随着生物体的进化演变而存在差异, 仍需要大量的研究工作来阐明。

Özhan-Kizil 等 (2009) 研究表明, *vasa* mRNA 在夏威夷钩虾 (*Parhyale hawaiiensis*) 的 1~16-细胞期均能检测到, 且 32-细胞期前均定位在生殖细胞中; 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 最早从 2-细胞期开始能检测到 *vasa* mRNA 的表达, 且在后期表达没有消失, 但有减弱趋势, 出膜后表达信号消失 (周倩如, 2007)。在模式生物斑马鱼中, *vasa* mRNA 表达信号贯穿整个胚胎发育时期, 在胚胎发育早期存在于各个细胞中, 并随着胚胎的发育逐渐在生殖质区域聚集, *vasa* mRNA 是斑马鱼生殖质的重要组成部分 (周倩如等, 2007)。本研究中, *vasa* mRNA 在发育 10 d 前微弱表达, 从第 13 天开始表达量逐渐上升, 至 19 d 达到最高, 之后表达量又开始下降。在斑马鱼、栉孔扇贝中, *vasa* mRNA 具有母源性特征遗传, 在生殖过程中, 随着配子发生传递给下一代, 分配到原始生殖质中, 即早期 *vasa* mRNA 是由母系基因组传递给胚胎的 (徐红艳等, 2010)。中华蛸可能在第 13 天细胞发生了分化, 体细胞分化为原始生殖细胞 (PGCs), 原始生殖细胞逐渐积累并在第 19 天达到顶峰。随后从 21 d 到出膜阶段, 各个组织器官逐渐发育形成, 是体细胞分裂生殖的时期, 体细胞数量大增, 而生殖细胞的数量所占的比例减少, 因此, *vasa* mRNA 表达逐渐降低。这一表达结果和七彩神仙鱼相似 (林睿涓等, 2017), 推测中华蛸的原始生殖细胞在 13 d 时形成。*Os-vasa* 基因在不同发育时期仔蛸中的表达结果显示, 从出膜到 17 日龄, 基因表达量都维持在较低水平, 8 日龄几乎检测不到表达信号, 这可能因为随着受精过程的发生, 母源性的 *vasa* mRNA 被激活以维持合子早期发育所需, 随着发育的进行, 母源性 mRNA 逐渐被消耗, 仔蛸完成正常的生命活动则需依

赖于自身基因组合成转录产物(许莉佳等, 2012); 随着发育的推进, PGCs 将穿过胚胎各组织(体细胞组织)在性原基聚集, 并结合周围的体细胞, 形成完整的初始生殖腺, 进而分化为卵巢或精巢(朱新平等, 2017)。七彩神仙鱼出膜后 30 日龄和 40 日龄 *vasa* 的表达量较高, 认为 PGCs 在分子水平可能已经开始分化(林睿涓等, 2017)。本研究结果与其相似, 出膜后第 20 天和第 23 天 *vasa* mRNA 表达量较高, 之后又维持稳定, 推测第 20 天和第 23 天中华蛸的 PGCs 在分子水平可能已经开始分化, 但这时期的高表达与性腺分化是否有关, 仍需进一步在组织学水平进行鉴定。

未成熟的卵巢和成熟期的卵巢 RT-qPCR 检测结果显示, 中华蛸未成熟和成熟卵巢均有 *vasa* mRNA 表达, 并且未成熟期表达量较高。斑马鱼卵母细胞原位杂交结果显示, 在卵母细胞的各阶段, *vasa* mRNA 表达量存在差异, 在 II 期卵母细胞表达量最高, 且定位到细胞质中, 在第 III 期开始下降并在后期表达量趋于稳定(项方, 2004)。对中华鳖(*Trionyx sinensis*)卵子发生的 4 个时期进行荧光原位杂交, 在初级卵母细胞和最早期生长期卵母细胞检测出高表达信号, 并认为与细胞进行 RNA 和蛋白质的储存有关, 从生长期后表达信号逐渐减弱(朱新平等, 2017)。革胡子鲶(*Clarias gariepinus*) 在性腺发育阶段 qRT-PCR 相关实验表明, 与成熟卵母细胞(III 期和 IV 期卵母细胞)相比, 未成熟卵母细胞(I 期和 II 期)的 *vasa* 转录本较高(Raghuveer *et al.*, 2010)。在罗非鱼(*Oreochromis spp*)(Kobayashi *et al.*, 2000)和银鲫(*Carassius auratus gibelio*)(Xu *et al.*, 2005)的研究中也有同样发现。中华蛸 *vasa* mRNA 在雌性生殖细胞的表达图谱与它们较为类似, 未成熟期表达量较高, 可能与此时期卵母细胞中 RNA、蛋白质等物质大量积累有关; 而在成熟期表达量减弱, 这可能与转录产物的扩散使成熟卵细胞卵黄蛋白原的含量增加有关, 而且随着卵母细胞体积的增大, *Os-vasa* mRNA 相对密度减少。*vasa* mRNA 在卵巢发育各时期的差异性表达表明, *vasa* mRNA 与卵子发生密切相关。

4 结 论

本研究克隆了中华蛸 *vasa* 基因 cDNA 的全长序列, 并以 *Os-vasa* 命名, 对中华蛸胚胎发育、初孵幼体、卵巢的不同时期与中华蛸不同组织进行了表达分析。结果显示, 中华蛸 *Os-vasa* 基因全长为 2438 bp, 其 ORF 长为 2067 bp, 编码 688 个氨基酸。氨基酸同源性序列分析表明, 中华蛸 *Os-vasa* 与加州双斑蛸同源性最高。基因表达结果显示, *Os-vasa* 基因主要在

性腺中表达, 且在卵巢的表达量高于精巢; *vasa* 基因在中华蛸胚胎发育时期和出膜后 29 d 均有表达, 胚胎期第 19 天表达量较高, 出膜后第 20 天和第 23 天表达量较高; 中华蛸未成熟和成熟卵巢均有 *vasa* mRNA 表达, 且未成熟期表达量较高。本研究结果可为中华蛸的性分化、生殖细胞分子标记及发育研究提供参考。

参 考 文 献

- CAI H C, ZHUANG D G, YE P, *et al.* Experiment on stock culturing, spawning and hatching of *Octopus vulgaris*. *Marine Fisheries*, 2009, 31(1): 58–65 [蔡厚才, 庄定根, 叶鹏, 等. 真蛸亲体培育、产卵及孵化试验. *海洋渔业*, 2009, 31(1): 58–65]
- CAO G L, ZHANG Y Y, XUE R Y, *et al.* Alternative splicing, expression patterns and promoter characters of *vasa*-like gene from the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 5967–5976
- CARUTHERS J M, MCKAY D B. Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(1): 123–133
- CORDIN O, BANROQUES J, TANNER N K, *et al.* The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 2006, 367: 17–37
- DEGHANI M, LASKO P. In vivo mapping of the functional regions of the DEAD-box helicase *Vasa*. *Biology Open*, 2015, 4: 450–462
- FABIOUX C, CORPOREAU C, QUILLIEN V, *et al.* In vivo RNA interference in oyster-*vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276(9): 2566–2573
- FABIOUX C, POUVREAU S, ROUX F L. The oyster *vasa*-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897–904
- 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. *Cell*, 1988, 55(4): 577–587
- HERPIN A, ROHR S, RIEDEL D, *et al.* Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Developmental Biology*, 2007, 7(1): 3
- HU X. The effect of atrazine on ICR mice's oocyte development ability. Master's Thesis of Shanghai Ocean University of Shandong Normal University, 2015 [胡翔. 阿特拉津对 ICR 小鼠卵母细胞发育潜能的影响. 山东师范大学硕士研究生学位论文, 2015]
- IKENISHI K, TANAKA T S. Spatio-temporal expression of *Xenopus vasa* homolog, XVLG1, in oocytes and embryos: The presence of XVLG1 RNA in somatic cells as well as germline cells. *Development, Growth and Differentiation*, 2000, 42(2): 95–103

- KOBAYASHI T, KAJIURA-KOBAYASHI H, NAGAHAMA Y. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mechanisms of Development*, 2000, 99(1): 139–142
- KOICHIRO T, DANIEL P, NICHOLAS P, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Narnia*, 2011, 28(10): 2731–2739
- KRØVEL A V, OLSEN L C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. *Developmental Biology*, 2004, 271(1): 190–197
- LIN R J, GAO J Z, JIN S R, *et al.* Cloning and expression analysis of *Vasa* gene in *Symphysodon haraldi*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(3): 330–338 [林睿涓, 高建忠, 金仕容, 等. 七彩神仙鱼 *Vasa* 基因 cDNA 的克隆及表达分析. 上海海洋大学学报, 2017, 26(3): 330–338]
- LIU Y, WANG Q H, HUANG R L, *et al.* Cloning and expression analysis of *vasa* gene from *Pinctada fucata martensii*. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(7): 2832–2839 [刘雅, 王庆恒, 黄荣莲, 等. 马氏珠母贝 *Pm-vasa* 基因的克隆与表达分析. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(7): 2832–2839]
- NAGASAWA K, TAKEUCHI Y, MIWA M, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like gene in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 2009, 75(1): 71–79
- OLSEN L, AASLAND, RFJOSE A. A *vasa*-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of Development*, 1997, 66(1/2): 95–105
- ÖZHAN-KIZIL G, HAVEMANN J, GERBERDING M. Germ cells in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on *Vasa* protein for their maintenance but not for their formation. *Developmental Biology*, 2009, 327(1): 230–239
- RAGHUVEER K, SENTHILKUMARAN B. Cloning and differential expression pattern of *vasa* in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2010, 157(1): 79–85
- REUNOV A A, REUNOVA Y A. In mouse oocytes the mitochondrion-originated germinal body-like structures accumulate mouse *Vasa* homologue (MVH) protein. *Zygote*, 2015, 23(4): 501–506
- ROCAK S, LINDER P. DEAD-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(3): 232–241
- ROGERS G JR, KOMAR A A, MERRICK WC. eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2002, 72: 307–331
- SHAO M Y. CDNA cloning and developmental expression patterns of reproduction-related DEAD-box family and *boule* genes from *Chlamys farreri*. Doctoral Dissertation of Qingdao Ocean University of China, 2007 [邵明瑜. 栉孔扇贝生殖相关基因 DEAD-box 家族和 *boule* 的 cDNA 克隆及其发育表达图. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2007]
- SUI J, ZHANG Z F, SHAO M Y, *et al.* Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in *Apostichopus japonicus* and its expression in tissues. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(3): 407–413 [隋娟, 张志峰, 邵明瑜, 等. 刺参 *vasa*-like 基因克隆及其在组织中的表达分析. 中国水产科学, 2008, 15(3): 407–413]
- TANNER N K, LINDER P. DEXD/H box RNA helicases from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 2001, 8(2): 251–262
- TSUNEKAWA N, NAITO M, SAKAI Y, *et al.* Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000, 127: 2741–2750
- WU H R, CHEN Y T, SU Y H, *et al.* Asymmetric localization of germline markers *Vasa* and *Nanos* during early development in the amphioxus *Branchiostoma floridae*. *Developmental Biology*, 2011, 353(1): 147–159
- WU X, WANG Z, JIANG J, *et al.* Cloning, expression promoter analysis of *vasa* gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 167: 41–50
- XIANG F. The expression of zebrafish *vasa* gene and *gcl* gene during oogenesis. Master's Thesis of Wuhan University, 2004 [项方. 斑马鱼 *vasa* 基因和 *gcl* 基因在卵母细胞发生过程中的表达. 武汉大学硕士研究生学位论文, 2004]
- XU H Y, LI M Y, GUI J F, *et al.* Fish germ-cell. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, 40(2): 124–138 [徐红艳, 李名友, 桂建芳, 等. 鱼类生殖细胞. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(2): 124–138]
- XU H, GUI J, HONG Y. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics*, 2005, 233(3): 82–872
- XU L J, ZHANG X, WU S, *et al.* Progress on research of germ-cell transplantation in fish. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2012, 24(3): 280–286 [许莉佳, 张薪, 伍莎, 等. 鱼类生殖细胞移植的研究进展. 生命科学, 2012, 24(3): 280–286]
- ZAMBONI L, UPADHYAY S. Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *Journal of Experimental Zoology*, 1983, 228(2): 173–193
- ZHENG X D, LIU Z S, ZHAO N, *et al.* Embryonic development and paralarvae growth of *Octopus vulgaris*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(2): 317–323 [郑小东, 刘兆胜, 赵娜, 等. 真蛸 (*Octopus vulgaris*) 胚胎发育及浮游期幼体生长研究. 海洋与湖沼, 2011, 42(2): 317–323]
- ZHOU Q R, SHAO M Y, ZHANG Z F. Structure characterization

and application prospects of *vasa* protein. Transactions of Oceanology and Limnology, 2007(4): 129–134 [周倩如, 邵明瑜, 张志峰. *Vasa* 基因编码蛋白的结构特征和应用展望. 海洋湖沼通报, 2007(4): 129–134]

ZHOU Q R. cDNA cloning and expression analysis of two DEAD-box family genes, *Fc-vasa* and *Fc-PL10a*, from *Fenneropenaeus chinensis*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2007 [周倩如. 中国明对虾

(*Fenneropenaeus chinensis*) 两个 DEAD-box 家族基因 *Fc-vasa* 和 *Fc-PL10* 的克隆和表达分析. 中国海洋大学硕士学位论文, 2007]

ZHU X P, XU H Y, ZHANG P Y, *et al.* Cloning and expression analysis of *vasa* in Chinese soft-shell turtle oocytes. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 3(2): 306–313 [朱新平, 徐红艳, 张飘逸, 等. 中华鳖 *vasa* 基因克隆及在卵母细胞中的表达分析. 水生生物学报, 2017, 3(2): 306–313]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression of the *vasa* Gene in the *Octopus sinensis*

LIU Yuyan^{1,2}, LI Fenghui², BIAN Li², ZHU Wenjing², CHEN Siqing^{2①}, QU Jiangbo³,
CHANG Qing², LIU Changlin², GE Jianlong²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Tianyuan Aquaculture Co., Ltd of Yantai Economic Development Zone, Yantai, Shandong 264006, China)

Abstract The *vasa* gene is a member of the DEAD-box family of proteins and plays a key role in the formation of germ cells in eukaryotes. In this study, we cloned the full length (2438 bp) of *Octopus sinensis vasa* cDNA (*Os-vasa*) via rapid amplification of cDNA end (RACE) methods. With an open reading frame (ORF) of 2067 bp, encoding 688 amino acids, a 5'UTR of 128 bp, a 3'UTR of 244 bp, and included an A-tail. Based on ExpASy, Signal4.1, TMHMM, and SMART biological analysis, the ORF encoded a putative protein, with a predicted molecular weight of 76 580.53 Da, and the theoretical isoelectric point was 5.89. No signal peptide site was detected, and there was a significant signal in the transmembrane region; therefore, it was presumed to be an intracellular protein, and not a membrane protein. There were two domains, DEXDc and HELICc, and nine conserved motifs of the DEAD-box family, indicating that the cDNA cloned in this study belonged to the family of *vasa*. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression patterns of the *Os-vasa* gene at different stages of the embryo and larva, in the ovaries at two growth stages, and in specific tissues for males and females. The results showed that the *Os-vasa* gene was especially expressed in the gonads, and the expression level in the ovary was significantly higher than that in the testis; *vasa* mRNA was expressed in both immature and mature ovaries, and the transcript level of the immature stage was evidently higher than the mature stage, revealing that the *Os-vasa* gene might play an important role in the development process and the maintenance of ovarian functions. *Os-vasa* gene transcripts were detected at whole embryonic developmental stages, were weakly expressed first 10 days, and gradually increased from the 13th day to the highest level on the 19th day. In the larval stages, *vasa* exhibited the lowest and highest expression on the 8th day post-hatching and the 20th day, respectively. The findings of this study can provide information for the study of primordial germ cell origin and migration and differentiation, and can contribute to the understanding of ovarian development and oogenesis of *O. sinensis*.

Key words *Octopus sinensis*; *vasa*; Gene cloning; Expression analysis

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn