

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220227002

http://www.yykxjz.cn/

王雨, 徐伟, 杨建, 耿龙武, 张宇婷. 拟赤梢鱼卵巢早期发育与 *sox3* 基因 cDNA 克隆及表达分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 145–154
WANG Y, XU W, YANG J, GENG L W, ZHANG Y T. Early ovary development, *sox3* gene cDNA cloning and expression analysis of *Pseudaspius leptocephalus*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 145–154

拟赤梢鱼卵巢早期发育与 *sox3* 基因 cDNA 克隆及表达分析*

王雨^{1,2,3} 徐伟^{1,2①} 杨建^{1,2} 耿龙武^{1,2} 张宇婷^{1,2,3}

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 黑龙江省冷水性鱼类种质资源及增殖重点开放实验室 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306)

摘要 为初步阐明拟赤梢鱼(*Pseudaspius leptocephalus*)卵巢发育特征及 *sox3* (*sry* related high mobility group box 3)基因在其卵巢发育过程中的作用,本研究通过组织切片观察了拟赤梢鱼卵巢早期发育过程,利用 RACE 技术克隆了该鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长序列,并进行生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR 技术分析了 *sox3* 基因在拟赤梢鱼不同组织及性腺不同发育时期的表达模式。结果显示,拟赤梢鱼卵巢在孵化后 45 d 分化形成,160 d 时由 I 期进入 II 期,孵化后 360 d,卵巢仍处于 II 期。拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长为 1 800 bp (GenBank 登录号: MT952206),编码 299 个氨基酸,存在保守的 HMG (histidine, methionine, glycine-rich)结构域。氨基酸序列比对和系统进化树分析结果显示,拟赤梢鱼 SOX3 蛋白与斑马鱼(*Danio rerio*)和翘嘴鲇(*Culter alburnus*)亲缘关系最近。此外,*sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢中表达量最高,其次是脑和眼睛,在精巢和其他组织中微量表达;在性腺分化过程中,*sox3* 基因在卵巢中表达量显著高于未分化性腺和精巢,在卵巢发育阶段表达量不断升高,而在精巢中持续低水平表达。综上,本研究推测 *sox3* 基因主要参与拟赤梢鱼卵巢的分化和发育。

关键词 拟赤梢鱼; 卵巢发育; *sox3*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)04-0145-10

拟赤梢鱼(*Pseudaspius leptocephalus*)隶属鲤科(Cyprinidae)、雅罗鱼亚科(Leuciscinae)、拟赤梢鱼属(张觉民, 1995),在中国主要分布于黑龙江流域,是当地珍稀名贵经济鱼类之一。近年来,由于环境污染、过度捕捞,拟赤梢鱼的野生资源量迅速下降(李明德, 2011)。目前,对拟赤梢鱼的研究在肌肉营养(吴善福等, 2016)、胚胎发育(杨建等, 2021)等方面有少量报道。拟赤梢鱼的保护性研究工作于 2015 年陆续展开,

2019 年成功攻克了拟赤梢鱼的人工繁殖难题(张颖等, 2016)。2021 年,实现拟赤梢鱼全人工繁育(杨建等, 2021)。目前,亟需开展拟赤梢鱼性腺分化、发育特征和成鱼性腺发育周年变化规律等方面的研究,为其人工繁育提供理论指导。

性腺分化与发育是一个复杂的基因调控过程,已有多个性别决定相关基因相继被发现。其中, *sox3* 基因(*sry* related high mobility group box 3)作为转录

* 农业财政专项“东北地区重点水域渔业资源与环境调查”、中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2019XT0604; 2020TD56)和国家重点研发计划(2019YFD0900404; 2020YFD0900402)共同资助。王雨, E-mail: wangyu5736@163.com

① 通信作者: 徐伟, 研究员, E-mail: xwsc23@163.com

收稿日期: 2022-02-27, 收修改稿日期: 2022-04-26

调控因子 *sox* 家族成员之一,是唯一定位于 X 染色体上的 *sox* 家族基因,且与雄性性别决定基因 *sry* 在 HMG (histidine, methionine, glycine-rich) 结构域上的同源性最高(Rajakumar *et al*, 2014),被认为是参与个体性别决定和分化相关的重要基因(许可等, 2017)。

本研究通过 RACE 技术克隆了拟赤梢鱼 *sox3* 基因,同时利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测其不同组织和性腺早期分化、发育过程中的时空表达特征,并结合组织切片技术观察拟赤梢鱼早期卵巢分化、发育的结构变化特征,以期初步阐明 *sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢发育与分化中的作用,为开展拟赤梢鱼的人工繁育研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用拟赤梢鱼亲鱼取自中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰试验站,经池塘人工繁育后使用药物催产获得受精卵,将受精卵置于室内水温 22 °C 条件下孵化。仔鱼破膜、平游后,移至室内循环水养殖系统培育,水温 21~23 °C,孵化后 45 d 内投喂丰年虫; 45~85 d 期间,使用丰年虫和升索 S4 级鲤鱼幼鱼商品料混合投喂; 85~360 d,幼鱼置于室内养殖池培育,期间投喂鲤鱼颗粒饲料。

1.2 样品采集

性腺发育组织切片样品采集:仔鱼破膜 0~85 d,每 5 d 采集一次整鱼样本,每个时间点采集 20 尾; 85~360 d,每 20 d 采集一次性腺组织样本,每次采集 20 尾。采集的样品用波恩氏液固定 48 h 后,置于 75% 酒精保存,以备组织切片观察性腺分化时间及各发育时期特点。不同生长时期拟赤梢鱼体长数据见表 1。

qRT-PCR 样品采集:挑选 4 龄雌性、雄性成鱼各 3 尾,体长为(26.862±2.172) cm,体重为(194.033±9.734) g,分别采集其脑、眼睛、鳃、心脏、肝、肾、

脾、肠、肌肉、精巢和卵巢等组织,液氮保存,以备 *sox3* 基因组织表达特征分析;根据组织切片结果,采集性腺分化期仔鱼 20 尾,每条仔鱼于背鳍附近切取 5 mm 厚的鱼段,波恩氏液固定,用于组织切片确定性腺类型,剩余样本液氮保存,以备 *sox3* 基因在性腺分化过程表达特征分析;采集孵化后 85、160、260、360 d 幼鱼及 4 龄成鱼各 20 尾,一侧性腺固定于波恩氏液,用于组织切片确定性腺类型,另一侧液氮保存,以备 *sox3* 基因在性腺发育过程表达特征分析。

1.3 性腺发育组织切片

取波恩氏液固定好的样品,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、连续切片、二甲苯脱蜡、梯度酒精复水、H.E 染色、透明、中性树脂胶封片、烘片等步骤后用显微镜观察、拍照。

1.4 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采取 Trizol 法提取拟赤梢鱼不同组织及性腺不同发育时期样品的总 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白测定仪(Thermo Scientific)检测总 RNA 的完整性和浓度。取 1 μg 总 RNA 作为模板,按照 GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo (dT) 试剂盒(Promega)说明书进行反转录合成第一链 cDNA,产物稀释 5 倍后于 -20 °C 保存备用。

1.5 拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 克隆

根据斑马鱼(*Danio rerio*) *sox3* 基因 cDNA 序列(GenBank: NM_001001811.2)设计引物(表 2)。以拟赤梢鱼成鱼卵巢 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 20 μL,反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收、纯化,纯化片段连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa),转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(TaKaRa),经菌落 PCR 鉴定,挑选阳性克隆菌落送金唯智生物科技有限公司测序。

表 1 拟赤梢鱼生长数据(平均值±标准差)

Tab.1 The growth data of *Pseudaspius leptocephalus* (Mean±SD)

日龄 Days/d	全长 Total length/cm	体重 Body weight/g	日龄 Days/d	全长 Total length/cm	体重 Body weight/g
15	1.172±0.141	0.016±0.001	75	4.650±0.356	1.356±0.285
25	1.964±0.101	0.105±0.018	85	4.754±0.324	1.428±0.180
35	2.718±0.094	0.254±0.031	160	9.126±0.448	7.672±0.477
45	3.508±0.099	0.498±0.046	220	12.185±0.672	9.364±0.563
55	3.943±0.091	0.857±0.087	260	13.748±0.590	10.831±0.664
65	4.424±0.196	1.076±0.072	360	15.748±0.807	12.482±0.626

表 2 实验所用引物及序列
Tab.2 Sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	应用 Application
<i>sox3</i> -F	GAGATTAAAAGCCCCATTCCGC	部分 CDS 区扩增 Part of the CDS amplification
<i>sox3</i> -R	GCTACCCCTAACCCACATTGTA	
GSP5'	GGCCAGCTGGTCCTGCATGAGGGAGT	5'-RACE 扩增 5'-RACE amplification
GSP3'	AAGCATGTACCTGCCGCCCGGAGG	3'-RACE 扩增 3'-RACE amplification
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE 通用引物 RACE universal primer
Q- <i>sox3</i> -F	ACAGCGCATACTCCCTCATG	qRT-PCR
Q- <i>sox3</i> -R	GCCGTGGACATCATTGGGTA	
18S-F	CCGCTTTGGTGACTCTAGAT	内参基因 Internal reference gene
18S-R	CTTGGATGTGGTAGCCGTTTC	
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	阳性克隆验证 Positive clone verification
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	

根据获得的 *sox3* 基因中间片段分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 特异性引物(表 2), 按照 SMARTer[®] RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa)说明书, 以 RACE Ready cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增, 反应程序: 94 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 4 °C 保持。扩增产物经胶回收、纯化、连接、转化及阳性菌落筛选, 挑选阳性克隆菌落送金唯智生物科技有限公司测序。

1.6 *sox3* 基因生物信息学分析

将拟赤梢鱼 *sox3* 基因部分 CDS 区、5'/3'端序列通过 SeqMan 软件进行拼接, 得到 cDNA 全长序列; 使用 DNAMAN 8.0 软件分析开放阅读框(ORF)结构, 推导氨基酸序列, 并进行氨基酸同源对比; 使用专业蛋白分析系统(Expert Protein Analysis System)分析 SOX3 蛋白基本理化性质; 使用 MEGA 5.0 软件, 采用邻接法构建 *sox3* 基因系统进化树, Bootstrap 重复次数设置为 1 000; 使用 Swiss-Model 预测拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三级结构。

1.7 qRT-PCR 检测 *sox3* 基因的表达规律

根据获得的 *sox3* 基因全长 cDNA 序列设计 qRT-PCR 特异性引物(表 2); 以拟赤梢鱼不同发育阶段性腺样本及各组织 cDNA 为模板, 18S 基因为内参, 使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems), 按照 TB Green Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作, 每个样品重复测定 3 次。反应体系 10 μ L, 反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。

1.8 数据处理

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量, 结果用平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较, 显著性水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 拟赤梢鱼性腺发育组织学观察

2.1.1 性腺分化 孵化后 1 d, 拟赤梢鱼原始生殖细胞(PGCs)位于脊索下方体壁腹膜背侧, 体积明显大于周围体细胞, 呈圆形(图 1-a)。孵化后 5 d, PGCs 数量增加至多个, 并在脊索下方前肾管聚集(图 1-b); 15 d 时, PGCs 被上皮细胞包围, 形成纺锤形原始性腺, 由肠系膜粘附在鳔和肠道之间(图 1-c); 40 d 时, 性腺呈现椭圆形和梭形 2 种不同的形态(图 1-e、f); 至 45 d 时, 椭圆形性腺中央可观察到中空的卵巢腔结构, 且性腺细胞数量较多(图 1-h), 卵巢分化形成。

2.1.2 卵巢发育 孵化后 100 d 时, 拟赤梢鱼卵巢体积和生殖细胞数目明显增加, 卵巢处于 I 期发育阶段(图 1-10); 120 d 时, 卵母细胞核增大, 核内含 1~3 个大而圆的核仁, 且分布在细胞核膜附近(图 1-k); 至 160 d 时, 卵母细胞质出现液泡, 及少量的滤泡细胞, 标志着卵巢发育进入 II 期(图 1-l); 260 d 时, 卵母细胞呈不规则多角形, 形态发生改变, 在卵巢中松散分布, 部分卵母细胞质出现卵黄核(图 1-m); 360 d 卵母细胞卵质加厚, 卵黄核明显, 未见辐射带及滤泡层出现, 仍处于 II 期(图 1-n)。

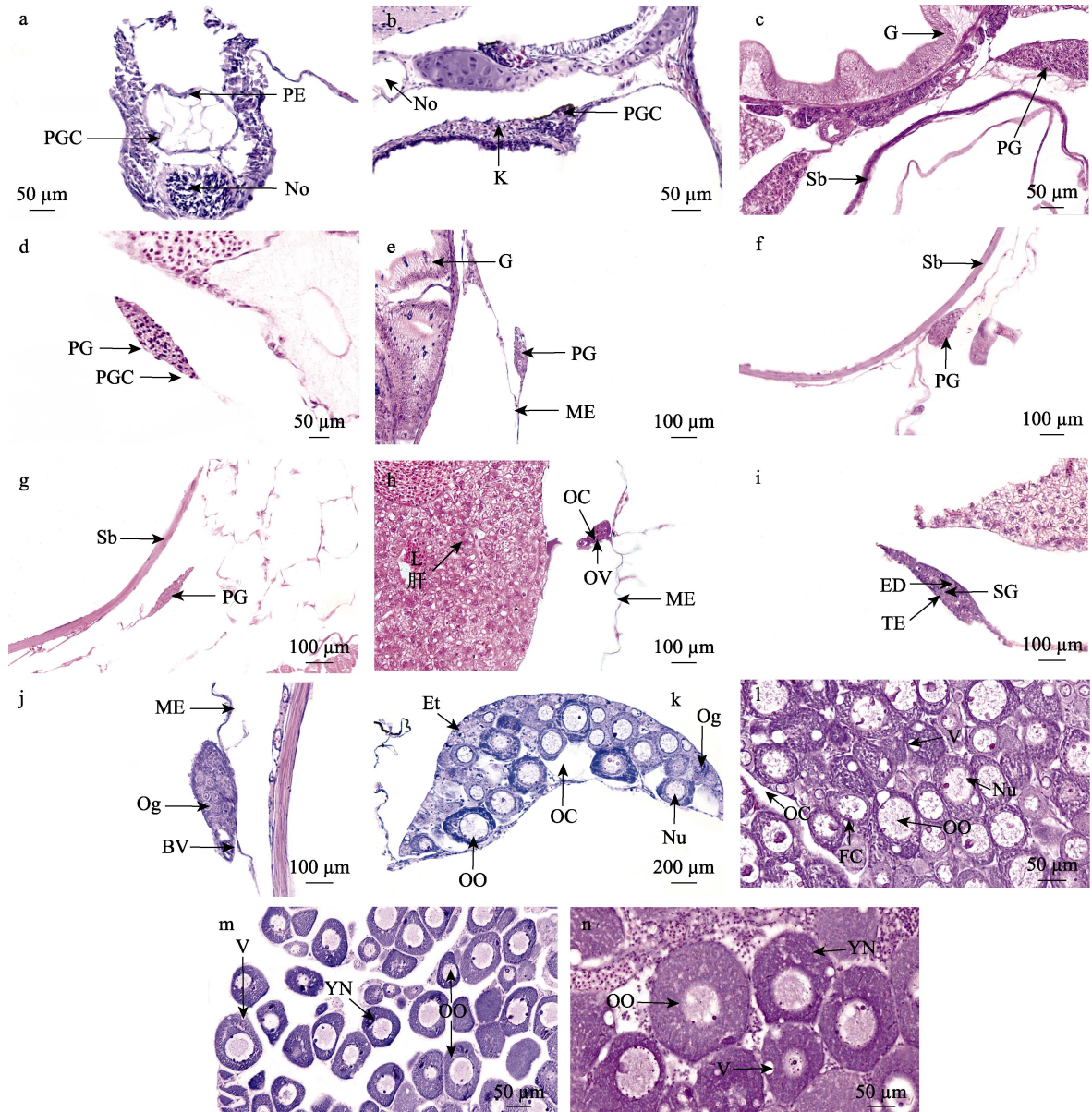


图1 拟赤梢鱼卵巢分化与不同发育时期形态结构变化

Fig.1 The changes of morphosis in ovary differentiation and development of *P. leptocephalus* at different stages

a: 1 d; b: 5 d; c: 15 d; d: 35 d; e 和 f: 40 d; g 和 h: 45 d; i: 75 d;
j: 100 d; k: 120 d; l: 160 d; m: 260 d。n: 360 d

PGC: 原始生殖细胞; No: 脊索; PG: 原始性腺; K: 肾; G: 肠; ME: 肠系膜; Sb: 鳔; GC: 生殖细胞; PE: 腹膜上皮; SC: 体细胞; OC: 卵巢腔; ED: 精小管; OV: 卵巢; TE: 精巢; SG: 精原细胞; Og: 卵原细胞; Nu: 核仁; OO: 卵母细胞; FC: 滤泡细胞; V: 液泡; YN: 卵黄核; BV: 血管; St: 光滑边缘; Et: 生殖上皮
a: 1 d; b: 5 d; c: 15 d; d: 35 d; e and f: 40 d; g and h: 45 d; i: 75 d; j: 100 d; k: 120 d; l: 160 d; m: 260 d; n: 360 d.
PGC: Primordial germ cell; No: Notochord; PG: Primary gonad; K: Kidney; G: Gut; ME: Mesentery; Sb: Swim bladder; Gc: Germ cell; PE: Peritoneum; SC: Somatic cell; OC: Ovarian cavity; ED: Efferent duct; OV: Ovary; TE: Testis; SG: Spermatogonia; Og: Oogonium; Nu: Nucleolus; OO: Oocyte; FC: Follicular cells; V: Vacuole; YN: Yolk nuclear; BV: Blood vessel; St: Smooth type; Et: Germinal epithelium.

2.2 拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 序列分析

拟赤梢鱼 *sox3* 基因 cDNA 全长为 1 800 bp (GenBank 登录号为 MT952206), 包括 5'非编码区

(5'-UTR, 209 bp)、3'非编码区(3'-UTR, 691 bp)和开放阅读框(ORF, 900 bp), 共编码 299 个氨基酸, 第 34~104 位为 HMG 保守结构域(图 2)。拟赤梢鱼 SOX3 蛋白分子式为 $C_{1425}H_{2259}N_{427}O_{443}S_{25}$, 相对分子量为

```

1 ACATGGGGTCAGAGTTCCTGGCAGAGCAGAGTGAAGACACACTGAGGTGAGGTGTGGAGACATTTGAAACTTGAGTTCGGTGCTTATGTG
91 ACTTGAGTTTTTGTCTCTGAACTTTTGACTGACTACCGACTACTTTATTTTGTGAGACTCTTTAAATTCAGCGTGTCTTTTCGAGTGC
181 TTTTAAAGGCACCACCTTTTAAAGTAGTTTGAATGTATAACATGATGAAACCCGAGATTTAAAGCCCCCTTCCGCAGTCCAACACGGGGTCGG
1
1 M Y N M M E T E I K S P L P Q S N T G S
271 CGGCGGGCGGCAAAAACAACAGTGCACGACCAGGACCGGGTGAAGCGGCTATGAATGCTTTCATGGTGTGGTCTCGGGTCAGCGGA
21 A A G G K N N S A N D Q D R V K R P M N A F M V W S R G Q R
361 GGAAGATGGCACAGGAGAAATCCTAAAATGCACAACCTCTGAGATCAGCAAGCGCCTCGGTGCTGACTGGAACCTTTGACTGACGCCGAGA
51 R K M A Q E N P K M H N S E I S K R L G A D W K L L T D A E
451 AGAGACCCCTTTCATTGACGAGGCCAAGCGGTTACGAGCCATGCACATGAAGGAGCACCCGGATTACAATAACCGTCCCCGCAGGAAGACCA
81 K R P F I D E A K R L R A M H M K E H P D Y K Y R P R R K T
541 AGACCCCTGCTGAAGAAAGACAAGTATTCCTTGCCCGGAGGACTCTTGGCGCCCGGTGCCAACGCTGTCAACAGTGGCGTCTCGGTGGGCC
111 K T L L K K D K Y S L P G G L L A P G A N A V N S A V S V G
631 AGCGGATGGACTACACACACATGAACGGCTGGACGAACAGCGCGTACTCCCTCATGCAGGACCAGCTGGCTACACTCAGCATCCCAGCA
141 Q R M D Y T H M N G W T N S A Y S L M Q D Q L A Y T Q H P S
721 TGAACAGCCCCAGATTTCAGCAGATGCACCGCTACGACATGGCGGGACTTCAGTACCCGATGATGTCCACGGCCAGACCTACATGAACG
171 M N S P Q I Q Q M H R Y D M A G L Q Y P M M S T A Q T Y M N
811 CGGCGTCCACGTACAGCATGTCCAGCATACACGACGAACTTCCAGTGCAATGGGTTTGGGCTCCATGGCTTTCAGTGTGCAAGACGG
201 A A S T Y S M S P A Y T Q Q T S S A M G L G S M A S V C K T
901 AACCCAGCTCTCCTCCTCCGGCCATAACCTCTCACTCTCAGCGTGCCTGTTTGGGAGACCTGAGGGATATGATAAGCATGTACCTGCCGC
231 E P S S P P P A I T S H S Q R A C L G D L R D M I S M Y L P
991 CCGGAGGAGACGCGCCGAGCCTCCAGTCTACAGACCAGTCCGTTACACAGCGTTCATCCGCACTATCAAAGCGAGGGACTGCGTGA
261 P G G D S A E H S S L Q T S R L H S V H P H Y Q S A G A T G G V
1081 ACGGAACGCTACCCCTAACCCACATTTGAAGACTCCTAAAAAGACTAAGTAGCCTACTTCGGATACTTGAACATTTTGGTTTGCAAAA
291 N G T L P L T H I *
1171 AAGAATCGAAGTTCAATTTTCGTTTTTAAAAAAGAACTATTTTTAATCTCAATGAGTTGTCCGTTTGAAGCATTATTTATGACGACATAT
1261 CTGGGACTTAAGAATAAATTGCATTGCAGAGGAGCTTTTGTATAAGCTGTAAAGCAATCAACGCTCTGTAGAAGAATATTGGACTTCTGA
1351 CGTATTTGCCGCCAGAGTTTGTCTTTATGAAAAGGCACGTGGCTTCGTGAAGAGGCTGTATTTCAAAAAGAAAAATGGAGGGAGAGAGT
1441 ATGTTCACTCATAAATGTTTACACTTATTTTTAGAATGTGATTTTGTCCAAATCTGTGTAGTATTTTTGTGTTTCAATTTATGAACTAGG
1531 TTTTATTGAAATGAAAGACTGTGCTGGTCGAAGCGCAAAGTTTGTTTTATTTATAGTGAGTTTTTTTTTTTTTAAAGCTTGTGAACCACT
1621 GTACGCTTTTGGCTGAAATGTTCCACTCTTGTGTTTGTGAATCTTCTTTCTGTGATGTTATGGCAGTATCATGTTAATCCATTGTGTGGGA
1711 CTGAGAGTTTTATTAACTGACGTTTCTACTTAAGACTAAATGAATAAATTTGTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 2 拟赤梢鱼 *sox3* cDNA 序列及氨基酸序列
 Fig.2 cDNA and amino acid sequence of *P. leptocephalus sox3*

灰色阴影: 起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA); 黄色阴影: HMG-box 序列;
 黑色方框: SOXp motif; 下划线: 5'/3'-UTR; 斜体加粗: 加强信号和 Poly A 尾。
 Grey shadow: Initiation codon (ATG), termination codon (TGA); Yellow shadow: HMG-box;
 Black box: SOXp motif; Underline: 5'/3'-UTR; Italics bold: Strengthen the signal and poly A tail.

33.26 kDa, 理论 pI 值为 9.63, 蛋白质的不稳定系数为 66.11。

2.3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性分析

在 NCBI 数据库中, 拟赤梢鱼与其他物种 *sox3* 基因编码的氨基酸序列比对结果显示, 拟赤梢鱼与其他硬骨鱼类同源性在 98.66%~92.33%之间; 与翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)氨基酸同源性最高, 与高等哺乳动物小鼠(*Mus musculus*)的同源性达 61.33% (表 3)。利用 DNAMAN 8.0 软件比较分析拟赤梢鱼与其他物种 SOX3 蛋白氨基酸序列, 不同物种 SOX3 蛋白氨基酸序列中均存在高度保守的 HMG 结构域(图 3)。此外, 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三级结构与斑马鱼高度一致, 均含有 3 个 α 螺旋和 2 个环区(图 4)。

2.4 拟赤梢鱼 *sox3* 基因系统进化树分析

拟赤梢鱼与其他硬骨鱼类聚为一支, 人(*Homo*

表 3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性比对
 Tab.3 Homology comparison of amino acid sequence of *P. leptocephalus* SOX3

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank No.	同源性 Identity /%
翘嘴鲌 <i>C. alburnus</i>	QJU11823.1	98.66
鲫鱼 <i>C. auratus</i>	XP_026136346.1	97.32
斑马鱼 <i>D. rerio</i>	XP_016413698.1	97.00
香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i>	AHK05949.1	95.00
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	NP_001098234.1	95.00
牙鲈 <i>P. olivaceus</i>	XP_019939045.1	93.67
黑鲷 <i>A. schlegelii</i>	ABQ96860.1	92.33
大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	AVV62220.1	67.10
人 <i>Homo sapiens</i>	CAA50465.1	66.78
小鼠 <i>M. musculus</i>	AAL40744.1	61.33

sapiens)、小鼠等哺乳动物聚为一支,两栖类单独聚为一支(图 5)。其中,拟赤梢鱼与斑马鱼、翘嘴鲌 *sox3* 基因氨基酸序列相似度最高,与人、鼠和原鸡(*Gallus gallus*)等较高等脊椎动物的亲缘关系较远。

2.5 拟赤梢鱼 *sox3* 基因组织特异性表达分析

如图 6 所示, *sox3* 基因在拟赤梢鱼肝、肾、心、

脾、肠、脑、鳃、肌肉、眼和性腺 10 种组织中的表达水平存在显著差异($P < 0.05$),在卵巢中表达量最高,脑次之,眼睛再次之,在精巢和其他组织中均微量表达。此外, *sox3* 基因在性腺中的表达具有显著的性别差异($P < 0.05$),卵巢中的表达量约为精巢中表达量的 46 倍,而在其他组织中的表达无性别差异($P > 0.05$)。

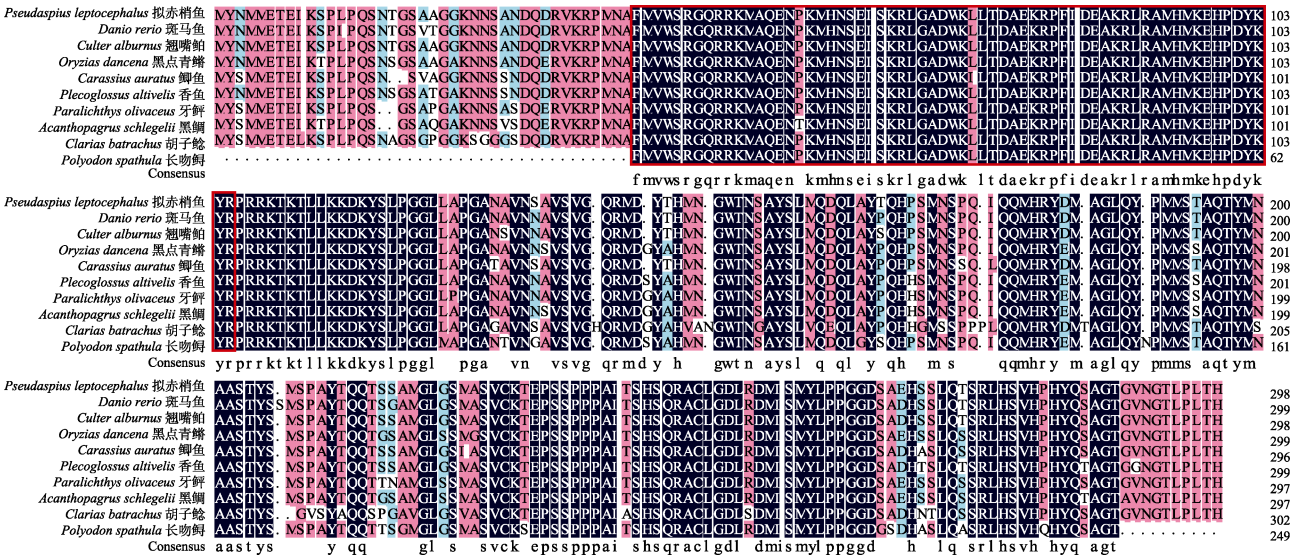


图 3 拟赤梢鱼 SOX3 蛋白氨基酸序列同源性比对

Fig.3 Homology comparison of amino acid sequence of *P. leptocephalus* SOX3

红色方框: HMG 结构域 Red box: HMG domain

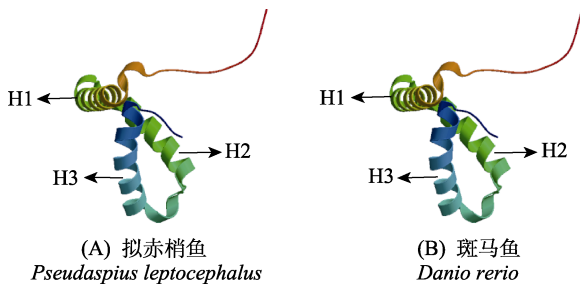


图 4 拟赤梢鱼与斑马鱼 SOX3 蛋白分子三级结构
Fig.4 The spatial structure of SOX3 proteins of *P. leptocephalus* (A) and *Danio rerio* (B)

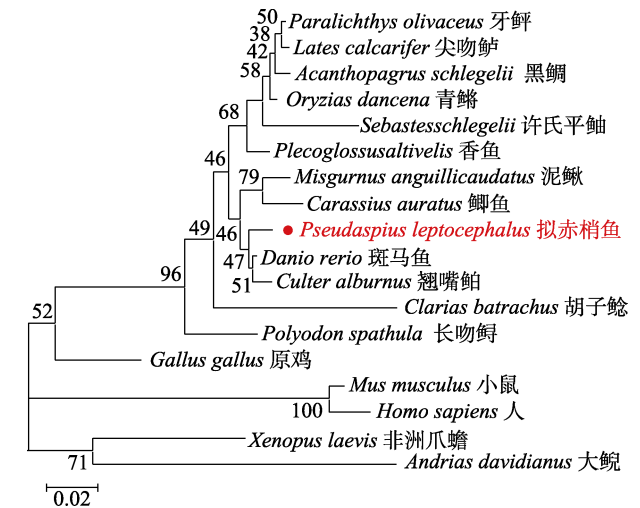
α 螺旋用 H1~H3 表示。
Alpha helices are indicated as H1~H3.

2.6 拟赤梢鱼 *sox3* 基因在早期性腺发育阶段的表达分析

根据组织切片结果选择未分化性腺、卵巢和精巢 3 种类型性腺样品检测 *sox3* 基因表达量, *sox3* 基因在上述 3 种不同类型性腺中的表达存在显著差异,卵巢

图 5 拟赤梢鱼与其他脊椎动物 *sox3* 基因构建的系统进化树
Fig.5 Phylogenetic tree of *sox3* of *P. leptocephalus* and other species

中 *sox3* 基因表达量显著高于未分化性腺和精巢 ($P < 0.05$),精巢中的表达量最低,仅为卵巢表达量的 1/8 (图 7-A)。



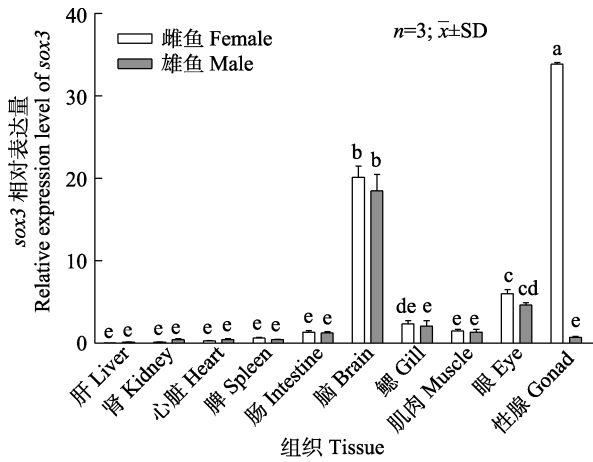


图 6 *sox3* 基因在拟赤梢鱼不同组织中的表达
Fig.6 The expression levels of *sox3* in different tissues of *P. leptocephalus*

不同字母表示组织间存在显著差异($P < 0.05$)。
Different letters indicate significant differences between tissues ($P < 0.05$).

在 85~360 d 卵巢早期发育过程中, *sox3* 基因的表达呈显著上升的变化趋势。其中, 360 d 时, *sox3* 基因表达量约为 85 d 时的 127 倍, 成熟卵巢中 *sox3* 基因的表达量显著高于 85 d、160 d 卵巢发育期 ($P > 0.05$), 但显著低于 260 d、360 d 发育期 ($P > 0.05$); 在孵化后 85 d、360 d 的精巢发育过程及成熟精巢中, *sox3* 基因表达量在各发育阶段无显著差异 ($P > 0.05$), 始终微量表达(图 7-B)。

3 讨论

目前, 关于鱼类性腺分化时间及特征主要从解剖学和细胞学特征来区分, 如卵巢腔、输精管、精小叶的发生(刘亚秋等, 2019; 刘淑琰, 2017); 而细胞学分化主要是以生殖细胞的减数分裂为标志(Nagasawa *et al*, 2013), 但这一划分标准仍存在一定的争议。不同鱼类早期性腺分化时的结构特征存在显著差异, 如南方鲶(*Silurus meridionalis*)性腺横切面呈梨形的分化为卵巢, 呈长条形的将分化成精巢(张修月等, 2005); 而大黄鱼(*Larimichthys crocea*)早期性腺呈梨形的分化为精巢, 呈长条形的分化成卵巢(游秀荣, 2012)。

鱼类的性腺分化方式主要分为两类, 一类是由原始性腺直接发育为精巢或卵巢, 称为可分化的雌雄异体型(刘晨斌等, 2019), 如四大家鱼(刘晓蕾, 2013); 另一类是先由原始性腺发育为类卵巢结构, 类卵巢继续发育为卵巢, 结构退化的类卵巢则发育为精巢, 称为不分化的雌雄异体型, 如斑马鱼(王晶等, 2011)等。本研究结果显示, 拟赤梢鱼原始性腺在孵化后 40 d 时, 出现椭圆形和梭形 2 种形态差异显著的原始性腺; 孵化后 45 d 的椭圆形性腺首次出现卵巢腔结构, 标志着卵巢分化的开始; 75 d 时, 梭形性腺中出现精细小管及精原细胞, 标志着精巢分化形成。在拟赤梢鱼性腺分化期间, 未发现类卵巢结构特征的原始性腺, 因此, 本研究认为拟赤梢鱼性腺分化方式属于可分化的雌雄异体型。

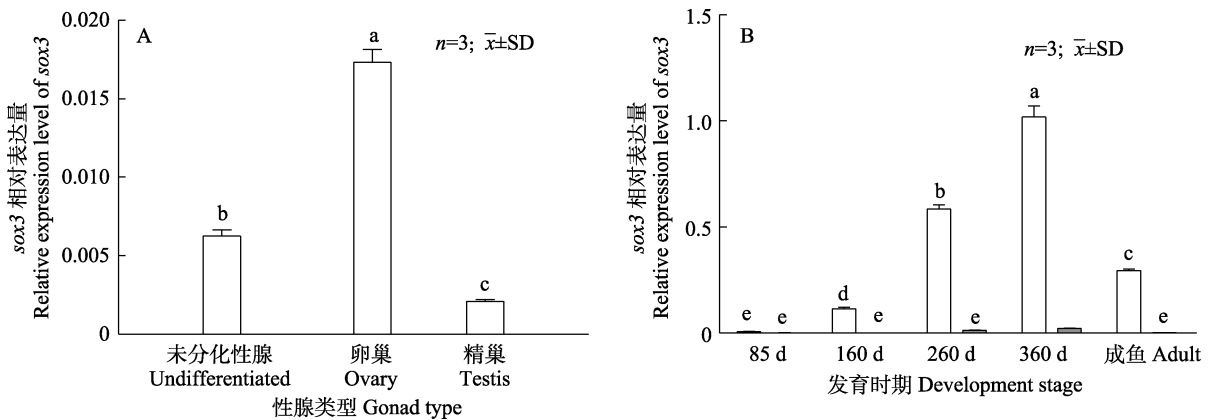


图 7 拟赤梢鱼 *sox3* 基因在性腺分化、发育不同阶段中的表达
Fig.7 Expression of *sox3* of *P. leptocephalus* during different gonad differentiation and development stages

A: 性腺分化阶段; B: 卵巢分化后。不同字母表示存在显著差异($P < 0.05$)。
A: Gonad differentiation stages; B: Gonad development stages after differentiation.
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

鱼类性腺分化的时间存在种属差异,青鳉(*Oryzias latipes*)(张静, 2013)在孵化后 5~10 d 发生性腺分化,人工养殖的中华鲟(*Acipense sinensis*)(陈细华等, 2004)性腺直至 9 月龄才开始分化,而同属鲤科鱼类的鲫鱼(*Carassius auratus*)(岳敏娟等, 2009)与拟赤梢鱼性腺分化时间相近,在 2 月龄开始出现分化。此外,大多数硬骨鱼类卵巢分化要早于精巢分化(Rasmussen *et al.*, 2006),如黄河鲤(*Cyprinus carpio*)(Jiang *et al.*, 2019)、花鲈(*Lateolabrax maculatus*)(李冰玉等, 2021);在本研究中拟赤梢鱼卵巢分化较精巢早约 30 d。

拟赤梢鱼及其他硬骨鱼类和哺乳动物的 *sox3* 基因同源比较和系统进化树分析结果表明,拟赤梢鱼 *sox3* 基因与硬骨鱼类聚为一簇,且 SOX3 蛋白与同属鲤科鱼类翘嘴鲈和斑马鱼 SOX3 蛋白的 HMG 结构域高度一致,亲缘关系最近,这表明 *sox3* 基因在进化上具有一定保守性。拟赤梢鱼 SOX3 蛋白三维结构与 Hou 等(2017)报道 SOX3 蛋白结构相一致,3 个 α 螺旋组成的空间结构是一个 L 型,便于结合 DNA 分子。HMG 结构域能够识别 DNA 特异性结合位点,SOX 蛋白可以依靠 HMG 与目的 DNA 结合,进而调节目的基因的转录(贺超等, 2017),其高度保守性保证了 *sox3* 基因在不同物种间功能的发挥。

sox3 基因参与生物体性腺分化与发育的整个过程,在性别分化和性腺发育中起着不可或缺的作用(Cheah *et al.*, 2015)。目前,关于 *sox3* 基因在鱼类性腺发育中的具体功能还存在一定的争议。在许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)卵巢分化和卵子发生时, *sox3* 基因发挥着重要作用(Ma *et al.*, 2019);而在黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)中的 *sox3* 基因在精巢中表达量强于卵巢(Shin *et al.*, 2009)。本研究中检测到 *sox3* 基因在拟赤梢鱼卵巢中表达量最高,脑次之,其次是眼睛,在精巢等其他组织中均微量表达,具有显著的组织特异性;切片结果可知,卵巢分化早于精巢,孵化后 75 d 精巢出现分化,在该时期同时存在未分化性腺、卵巢和精巢 3 种类型性腺, *sox3* 基因在卵巢中的表达显著高于未分化性腺,而在精巢中的表达处于较低水平,由不同性腺类型表达差异推测, *sox3* 基因可能在拟赤梢鱼卵巢分化过程中发挥一定作用。拟赤梢鱼孵化后 160 d,卵巢发育开始进入 II 期,此时 *sox3* 基因转录水平显著升高,显著高于成熟期卵巢,在精巢中始终持续低水平表达,由组织特异性结果显示, *sox3* 基因在维持拟赤梢鱼卵巢发育过程中可能发挥更重要的作用。这与斑马鱼中的研究结果相一致(Qiang *et al.*, 2019)。 *sox3* 基因同样参与斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)卵巢发生和功能维持,在其未

成熟卵巢中大量表达,在卵母细胞成熟期微弱表达(姚波等, 2003)。

sox3 基因还广泛参与软骨组织生成、血细胞形成以及心脏和神经系统发生发育等(郭稳杰等, 2014)。本研究结果显示, *sox3* 基因在拟赤梢鱼眼睛和脑组织中存在较高表达,这与之前的报道相一致(Kamachi *et al.*, 2013)。推测 *sox3* 基因参与鱼类眼睛晶状体和神经系统的发育。

参 考 文 献

- CHEAH P S, THOMAS P Q. *sox3* expression in the glial system of the developing and adult mouse cerebellum. SpringerPlus, 2015, 1(4): 400–407
- CHEN X H, WEI Q W, YANG D G, *et al.* Histological studies on gonadal origin and differentiation of cultured *Acipenser sinensis*. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(6): 633–639 [陈细华, 危起伟, 杨德国, 等. 养殖中华鲟性腺发生与分化的组织学研究. 水产学报, 2004, 28(6): 633–639]
- GUO W J, YU X M. Cloning and sequence evolution analysis of *sox* genes in bighead carp (*Aristichthys nobilis*). Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(4): 664–668 [郭稳杰, 俞小牧. 鳙 *sox* 基因克隆及序列进化分析. 水生生物学报, 2014, 38(4): 664–668]
- HE C, HONG G, WU J X, *et al.* Study on cloning and tissue expression of *sox9* in *Betta splendens*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 151–155 [贺超, 洪广, 吴静娴, 等. 泰国斗鱼 *sox9* 基因的克隆及组织表达研究. 安徽农业科学, 2017, 45(8): 151–155]
- HOU L, SRIVASTAVA Y, JAUCH R. Molecular basis for the genome engagement by SOX proteins. Seminars in Cell Developmental Biology, 2017, 63: 2–12
- JIANG M, JIA S, CHEN J, *et al.* Timing of gonadal development and dimorphic expression of sex-related genes in gonads during early sex differentiation in the Yellow River carp. Aquaculture, 2020, 518: 734825
- KAMACHI Y, KONDOH H. SOX proteins: Regulators of cell fate specification and differentiation. Development, 2013, 140(20): 4129–4144
- LI B Y, WEN H S, WANG L Y, *et al.* Histology of gonadal differentiation and expression analysis of sex-related genes *cyp11b* and *cyp19a1a* in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 185–193 [李冰玉, 温海深, 王灵钰, 等. 花鲈性腺分化组织学及性别相关基因 *cyp11b* 和 *cyp19a1a* 的表达分析. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 185–193]
- LI M D. The ecology of economic fishes in China. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 2011, 28–30 [李明德. 中国经济鱼类生态学. 天津: 天津科学技术出版社, 2011, 28–30]
- LIU C B, XU G F, HUANG T Q, *et al.* A review of research progress on gonadal development in fish. Chinese Journal of

- Fisheries, 2019, 32(1): 46–54 [刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46–54]
- LIU S Y. The occurrence and development of the testis and the sperm characteristics of *Silurus asotus*. Master's Thesis of Henan Normal University, 2017 [刘淑琰. 鲌精巢发生、发育规律及其精子特性研究. 河南师范大学硕士研究生学位论文, 2017]
- LIU X L. Primary studies on sex differentiation and the ovary development and oogenesis of *Myxocyprinus asiaticus*. Master's Thesis of Southwest University, 2013 [刘晓蕾. 胭脂鱼性腺分化与卵巢发育和卵子发生的初步研究. 西南大学硕士研究生学位论文, 2013]
- LIU Y Q, LI X H, LI Y F, *et al.* A histological study on gonadal development of black amur bream (*Megalobrama terminalis*). South China Fisheries Science, 2019, 15(1): 113–118 [刘亚秋, 李新辉, 李跃飞, 等. 广东鲂性腺发育组织学研究. 南方水产科学, 2019, 15(1): 113–118]
- MA L M, WANG W J, SHANG R J, *et al.* Characterization of *sox3* gene in an ovoviparous teleost, black rockfish (*Sebastes schlegeli*). Journal of Ocean University of China, 2019, 18(2): 431–440
- NAGASAWA K, FERNANDES J, YOSHIKAZI G, *et al.* Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *Salmo salar*: Characterization of *vasa*, *dead end*, and lymphocyte antigen 75 genes. Molecular Reproduction and Development, 2013, 80(2): 118–131
- QIANG H, CONG L, YING R, *et al.* Loss-of-function of *sox3* causes follicle development retardation and reduces fecundity in zebrafish. Protein Cell, 2019, 10(5): 347–364
- RAJAKUMAR A, SRNTHILKUMARAN B, *et al.* Expression analysis of *sox3* during testicular development, recrudescence, and after hCG induction in catfish, *Clarias batrachus*. Sexual Development, 2014, 8(6): 376–386
- RASMUSSEN T H, JESPERSEN A, KORSGAARD B. Gonadal morphogenesis and sex differentiation in intraovarian embryos of the viviparous fish *Zoarces viviparus* (Teleostei, Perciformes, Zoarcidae): A histological and ultrastructural study. Journal of Morphology, 2006, 267(9): 1032–1047
- SHIN H S, AN K W, PARK M S, *et al.* Quantitative mRNA expression of *sox3* and *dmrt1* during sex reversal, and expression profiles after *GnRH α* administration in black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 154(1): 150–156
- WANG J, WANG B, LI J T, *et al.* Histologicals observation of zebrafish gonads developments. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(2): 168–174 [王晶, 王冰, 李纪同, 等. 斑马鱼性腺发育的组织学观察. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(2): 168–174]
- WU S F, ZHANG Y, MA B, *et al.* Evaluation of nutritional quality and proximate composition in the muscle of *Pseudaspius leptocephalus* in Ussuri River. Journal of Biology, 2016, 33(6): 52–56 [吴善福, 张颖, 马波, 等. 乌苏里江拟赤梢鱼肌肉营养成分分析与品质评价. 生物学杂志, 2016, 33(6): 52–56]
- XU K, YANG H B, PAN H, *et al.* Function and mutation of *sox3* gene. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(8): 1214–1216 [许可, 阳洪波, 潘慧. *sox3* 基因的功能及其突变. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(8): 1214–1216]
- YANG J, GENG L W, WANG Y, *et al.* Embryonic and larval-juvenile developmental characteristics of *Pseudaspius leptocephalus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(3): 636–644 [杨建, 耿龙武, 王雨, 等. 拟赤梢鱼的胚胎发育和仔稚鱼生长特性观察. 水生生物学报, 2021, 45(3): 636–644]
- YAO B, ZHOU L, GUI J F. Studies on cDNA cloning and temporal and spatial expression of *sox3* gene in grouper *Epinephelus coioides*. High Technology Letters, 2003, 13(5): 74–81 [姚波, 周莉, 桂建芳. 斜带石斑鱼 *sox3* 基因 cDNA 的克隆及其时空表达特征分析. 高技术通讯, 2003, 13(5): 74–81]
- YOU X R. Histological studies on the origin and migration of the primordial germ cells and gonadal sex differentiation in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Master's Thesis of Jimei University, 2012 [游秀荣. 大黄鱼原始生殖细胞发生、迁移及性腺性别分化的组织学研究. 集美大学硕士研究生学位论文, 2012]
- YUE M J, YOU Y L, LIN D. The influence of temperature on sex differentiation of *Carassius auratus*. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(1): 9–16 [岳敏娟, 尤永隆, 林丹. 温度对鲫鱼性腺分化的影响. 动物学杂志, 2009, 44(1): 9–16]
- ZHANG J. Expression analysis of *dmy* and *dmrt1*, involved in gonad sexual differentiation and histological observation of Medaka, *Oryzias latipes*, gonadal sex development. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2013, 26 [张静. 青鳉性腺发育的组织学观察和 *dmy*、*dmrt1* 基因的表达分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013, 26]
- ZHANG J M. Fishes of Heilongjiang Province. Harbin: Heilongjiang Science and Technology Press, 1995, 243–245 [张觉民. 黑龙江省鱼类志. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1995, 243–245]
- ZHANG X Y, JIAO B W, WU T L, *et al.* Histological observation on gonadal sex differentiation in the southern catfish, *Silurus meridionalis*. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(1): 41–48 [张修月, 焦保卫, 吴天利, 等. 南方鲶性腺分化的组织学观察. 动物学杂志, 2005, 40(1): 41–48]
- ZHANG Y, MA B, ZHANG Y Q, *et al.* Artificial method of oxytocin in *Pseudaspius leptocephalus*, CN105340791A. 2016–2–24 [张颖, 马波, 张永泉, 等. 拟赤梢鱼人工催产方法, CN105340791A. 2016-2-24]

Early Ovary Development, *sox3* Gene cDNA Cloning and Expression Analysis of *Pseudaspius leptcephalus*

WANG Yu^{1,2,3}, XU Wei^{1,2①}, YANG Jian^{1,2}, GENG Longwu^{1,2}, ZHANG Yuting^{1,2,3}

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. Key Open Laboratory of Cold Water Fish Germplasm Resources and Breeding of Heilongjiang Province, Harbin 150070, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract *Pseudaspius leptcephalus* is the famous indigenous fish in Northeast China region, with very important economic and research value. In recent years, environmental pollution and overfishing has caused it to become increasingly scarce. We performed *P. leptcephalus* conservation research, including clarifying the characteristics of ovarian development and the role of the *sox3* gene (SRY-related high-mobility-group-box 3) in the ovarian development of *P. leptcephalus*. The histological characteristics of *P. leptcephalus* ovarian development were investigated using the paraffin section technique. The full length of the cDNA of the *sox3* gene was cloned and analyzed using Rapid Amplification of cDNA End (RACE) technology. The expression pattern of the *sox3* gene in different tissues and at different gonad development stages were analyzed using real-time PCR.

The results revealed the ovarian cavity was clearly visible in the elliptical gonads, indicating ovary formation occurs around 45 d. At 160 d, the nucleoli of the oocytes in the ovaries were distributed along the nucleus and the testis was preparing to form seminiferous lobules and began to enter early stage II development. At 260 d of ovarian development, the yolk nucleus appeared in the cytoplasm of some ovary oocytes, and the ovaries entered the middle stage II phase. Also at 260 d, the number of secondary spermatocytes in the testis increased, and remained at stage II until 360 d (when the study ceased). The differentiation of the testis began later than that of the ovaries. This result is consistent with the gonadal development in most fish. The results indicate the cDNA of the *sox3* gene in *P. leptcephalus* is 1 800 bp (GenBank: MT952206), and encodes 299 amino acids. Among them, the protein contains an HMG conserved domain. The alignment of the amino acid sequence and the phylogenetic tree analysis indicates the SOX3 sequence in *P. leptcephalus* contains highly conserved regions. These regions are highly consistent with the SOX3 sequences in *Danio rerio* and *Carassius auratus*. Furthermore, the RT-PCR demonstrated that *sox3* was highly expressed in the ovary, followed by the brain and eyes. Between the sexes, the expression level of the *sox3* gene only varied significantly in the gonads, with the *sox3* gene expression in the ovary being significantly higher than that in the testis. In the early stage of gonadal differentiation, the expression of *sox3* in the ovaries is obviously higher than that in undifferentiated gonads. The lowest expression levels were detected in the testis. In the developmental stage after gonadal differentiation, *sox3* was continuously expressed throughout ovarian development, while the expression in the testis remained at a low level. Therefore, the *sox3* gene might play an important role in ovary differentiation and development when compared to the testis, but its specific function and mechanism require further research.

Key words *Pseudaspius leptcephalus*; Ovarian development; *sox3*; Gene cloning; Gene expression

① Corresponding author: XU Wei, E-mail: xwsc23@163.com