

文章编号: 1674 - 5566(2012)05 - 0693 - 08

日本白鲫 *BMP15* 和 *GDF9* 基因片段的克隆及组织表达分析

王 瑶, 陈阿琴, 杨志刚, 刘志伟, 郭子好, 曾奇韬, 沈 城

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘 要: 根据斑马鱼 *GDF9*、*BMP15* 基因的保守序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法扩增获得日本白鲫 *GDF9*、*BMP15* 基因片段。日本白鲫 *GDF9* 基因片段长 778 bp, 编码 145 个氨基酸; *BMP15* 基因片段长 811 bp, 编码 270 个氨基酸。氨基酸序列分析表明日本白鲫 *GDF9* 与斑马鱼的同源性最高, 为 78%, 与其他物种的同源性在 58% ~ 78% 之间; 日本白鲫 *BMP15* 与斑马鱼同源性最高, 为 80%, 与其他物种的同源性在 30% ~ 80% 之间。系统进化树分析显示, 鱼类的 *GDF9* 基因独立聚成一支, 其中日本白鲫的 *GDF9* 基因与斑马鱼的 *GDF9* 基因聚成一支; 鱼类的 *BMP15* 基因独立聚成一支, 其中日本白鲫的 *BMP15* 基因与斑马鱼的 *BMP15* 基因聚成一支。半定量 PCR 结果显示, *BMP15* mRNA 在脾脏、肝脏、鳃、脑、心脏、肌肉、肾脏、卵巢中均有表达, 其中卵巢中表达量最高; *GDF9* mRNA 在肝脏、脑、心脏、肌肉、卵巢中均有表达, 而在脾脏、鳃、肾脏中表达量极低或不表达, 在卵巢中表达量最高, 为进一步研究日本白鲫 *GDF9* 与 *BMP15* 基因的结构与功能奠定了基础。

研究亮点: 有关 *BMP15* 基因和 *GDF9* 基因在鱼类中的研究报道较少。本研究首次克隆了日本白鲫 *GDF9* 和 *BMP15* 两条基因片段序列, 且发现其在卵巢组织中表达量最高, 为进一步研究日本白鲫性腺发育的分子生物学机理奠定了基础。

关键词: 日本白鲫; *GDF9*; *BMP15*; 基因克隆; 组织表达
中图分类号: S 917
文献标志码: A

生长分化因子 (growth differentiation factors, GDFs) 与骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是转化生长因子 β (TGF- β) 超家族中的两个亚家族, 它们都是多功能的蛋白质。1993 年 PHERRON 和 LEE 等根据已知 TGF- β 家族成员的保守序列, 通过寡核苷酸变性 PCR 技术发现了 *GDF9*, 随后又发现了其同系物 *GDF9B*, 即 *BMP15*^[1]。随着对这两个基因研究的不断深入, 人们发现 *GDF9* 与 *BMP15* 是由卵母细胞分泌的生长因子, 并且在人类及多种哺乳动物的卵巢组织中高水平表达, 其在促进卵泡发育及调节卵巢功能方面起着重要的作用^[2]。

日本白鲫 (*Carassius auratus cuvieri*) 原产自日本, 又名河内鲫。其肉质细嫩, 味道鲜美, 且适应

性较强, 生长速度较快, 自 20 世纪 70 年代中期引进我国, 已得到广泛的养殖。其成熟时间比在原产地提前, 是一种经济价值很高的养殖品种^[3]。

性腺发育是鱼类繁殖的基础, 鱼类卵巢发育和卵母细胞的成熟除受促性腺激素 (GtH)、成熟诱导激素 (MIH) 和成熟启动因子 (MPF) 等激素调节之外, 还受到生长因子、脑肽、神经递质等因素的调节^[4]。目前, 有关 *GDF9*、*BMP15* 对人类以及畜禽动物卵巢功能与卵泡发育的研究日益增多, 但是在鱼类等低等脊椎动物中, 有关 *GDF9*、*BMP15* 在卵泡发育过程中的研究还十分有限。人们已在斑马鱼及欧洲海鲈等鱼类中克隆得到 *GDF9*, 并发现该基因在早期卵泡中表达量较高, 推测其可能与鱼类卵泡发育密切相关^[5-7], 但其

收稿日期: 2012-03-23 修回日期: 2012-05-04

基金项目: 上海市重点学科水生生物学建设项目 (S30701); 上海市教育委员会科研创新项目 (11YZ151)

作者简介: 王 瑶 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物脂类代谢基因的表达及营养调控。E-mail: wangyao880611@163.com

通讯作者: 陈阿琴, E-mail: aqchen@shou.edu.cn

具体的作用机制仍不清楚。本试验克隆了日本白鲫 *BMP15*、*GDF9* 基因片段并检测两者在不同组织中的表达情况,为进一步研究日本白鲫性腺发育的分子生物学机理积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

性成熟的日本白鲫取自上海海洋大学瀛东村产学研养殖基地,解剖后分别提取脾脏、鳃、肝脏、脑、心脏、肌肉、肾脏、卵巢等 8 个组织,用液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.1.2 试剂

主要试剂为:RNAisoTM Plus、Reverse Transcriptase (RNase H⁻)、dNTPs、*rTaq* 聚合酶、pMD 19-T 载体试剂盒、X-Gal、IPTG、琼脂糖、DNA Marker、TaKaRa SYBR Premix Ex *Taq*TM 购自大连宝生物工程有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、氨苄青霉素、Top10 商用感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司;核酸染料 Gold view 购自上海赛百盛基因技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取与反转录

取冻存的日本白鲫各组织,总 RNA 的提取按照 RNAisoTM Plus (TaKaRa) 操作说明书进行。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整度、紫外分光光度计 (Q5000) 检测 RNA 纯度后,根据 PrimscriptTM Reverse transcriptase (TaKaRa) 说明书操作,取 1 μg 日本白鲫卵巢总 RNA 为反转录模板合成第一链 cDNA,用于 PCR 的扩增。其余 RNA 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

1.2.2 引物设计和 PCR 扩增反应

根据 GenBank 中斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 *BMP15*、*GDF9* 基因 (NM_001020484、AAV91155) 保守区序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计上下游引物见表 1,引物由上海生工生物工程有限公司合成。以日本白鲫卵巢的 cDNA 为模板,进行 *BMP15* 和 *GDF9* 基因片段的扩增。

PCR 反应体系: cDNA 模板 1 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL , 上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 10 \times PCR buffer 2 μL , *rTaq* 酶 (5 U/ μL) 0.25 μL , 加灭菌超纯水至总体积

25 μL 。*GDF9* 的 PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。*BMP15* 的 PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取 PCR 扩增产物 3 μL 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 目的基因的回收与克隆

将目的片段产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Tiangen) 说明书进行回收纯化后,取 1 μL 回收产物与 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 连接,连接产物经热激后转化至大肠杆菌 Top 10 感受态细胞中,转化产物在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 条件下振荡培养 1 h 后涂布于含有 X-Gal、IPTG 以及 Amp 的 LB 固体培养基上,置恒温培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养 (12 ~ 16 h)。次日在长出的蓝白斑菌落中挑选白斑,接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中继续振荡培养 4 h 后,进行菌液 PCR 验证并筛选出阳性克隆后由生工生物工程 (上海) 有限公司进行双向测序。

1.2.4 序列分析与结构特征

用 ORF (open reading frame) finder 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找开放阅读框;用 BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)、Clustal W 等软件进行序列的验证、翻译及蛋白质相似性分析;用 MEGA 4.0 构建系统进化树。

1.2.5 *GDF9*、*BMP15* 基因在不同组织中的半定量分析

以获得的 *GDF9* 和 *BMP15* 基因序列、 β -actin 基因序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计一对用于半定量 PCR 的特异性引物 (表 1)。参照 PrimscriptTM Reverse transcriptase (TaKaRa) 说明书,取 1 μg 脾脏、肝脏、脑、肌肉、肾脏、卵巢、心脏、鳃共 8 个组织的总 RNA 反转录成 cDNA 模板。*GDF9* 的 PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 退火 30 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 30 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。*BMP15* 的 PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 退火 30 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 33 个循环后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。将 3 μL PCR 产物加样至 1.3% 琼脂糖凝胶样品孔中,在 $1 \times$ TAE 电泳缓冲液中电泳鉴定 PCR 产物,紫外灯下观测

电泳结果,用图像分析软件(quantity one)对条带的灰度进行分析。

2 结果与分析

2.1 *GDF9* 和 *BMP15* 基因的序列分析

以日本白鲫卵巢总 RNA 为模板扩增获得的 *GDF9* cDNA 序列片段为 778 bp (GenBank 登录号: JQ339351),经序列分析发现日本白鲫 *GDF9* 包含有 TGF- β 超家族特有的蛋白酶水解位点 (RKRR),并且也含有 6 个半胱氨酸残基(图 1)。经 BLAST 分析,日本白鲫 *GDF9* cDNA 序列与斑马鱼 *GDF9* 同源性最高,其相似性为 78%。以上分析推测这一序列为 TGF- β 超家族中的 *GDF9* 基因片段。

表 1 *GDF9* 和 *BMP15* 基因克隆与表达所用引物
Tab. 1 The primers for cloning and expression of *GDF9* and *BMP15* gene

引物名称	核苷酸序列(5' - 3')	用途
<i>BMP15</i> -F	GCAGATGGACGACCAAAGCA	RT-PCR
<i>BMP15</i> -R	AAGGAACGCAGGAGGGCAAC	
<i>GDF9</i> -F	GAACCAATGGGATCGAAAG	
<i>GDF9</i> -R	GAGACAAGACCACCAACTGAA	
<i>GDF9</i> -RT-F	TCGCTTACAAGGAGTACGAGGAA	SQ-PCR
<i>GDF9</i> -RT-R	CCACCAAGTGAATAACCCAAC	
<i>BMP15</i> -RT-F	GTGTCCCTCTTTGCTCATATATCG	
<i>BMP15</i> -RT-R	GGTTGGGTGAATTGTAGCCGTA	
β -actin-F	TTCCAGCCATCCTTCCTA	
β -actin-R	GTCAGCAATGCCAGGTA	

```

1 GAACCAATGGGATGGAAAGTCTACATGGTGGGATTCAGTTTCACGAAAGAGACGAGGCAC
1 N Q W D G K S T W W D S V S R K R R G T
61 GTTAAAAACCACCAACTCGCCGAAACCAGCAGCCTAAACTCGTCCCAATGTACGACTT
21 L K T T N S P E T S T P K L V P M Y D F
121 TTCCCGGATGACTGTGACCTGCACGATTTCAAAGTGAGCTTCAATCAGCTCAAACCTGGA
61 Y W I I A P H K Y N P R Y C K G S C P R
181 TTATTGGATCATAGCGCTCACAAATACAACCCGAGGTACTGTAAGGGGTCTGTCCGAG
41 S P D D C D L H D F K V S F N Q L K L D
241 GGCTATGGGATATAATTACGGGTCTCCGGTGCACACAA TGGTTCAGAACCTCATTACGA
81 A M G Y I Y G S P V H T M V Q N L I Y E
301 GAAGCTGGACTCCTCTGTGCCTAGACCTTCATGTGTGCCTTTAGAATATAATCCGTTAAG
101 K L D S S V P R P S C V P L E Y N P L S
361 TGTTTGAACATTGAGAACGACGGCTCCATCGCTTACAAGGAGTACGAGGAAATGATTGC
121 V L T I E N D G S I A Y K E Y E E M I A
421 TACCAAATGCACCTGTCGATAAGATTGTTTACGCTTTTGGGATTTGTTGTTGTTGTGA
141 T K C T C R *
481 TGCATTGCTTTGTAACACTGACCTGGCCATCCTTATAATGAAGATGATTAATGACCAC
541 ATGATTGGATAAATTTGCGGCAATAACATTACCTTTTATCTGATTCAATTAATAATCTTT
601 AGAATATTCAAATCAGTTATGGAATGAAGCATTTTGATGTTTTCTTAGACACACTTTT
661 TTTCTTCTGTATAATAGTTATATAAATA TGGGGTATTTAATGGCTTAAATGATACTTT
721 CTTTAAATGAGCGGTTGTGTTATTTAAGTTGGGTATTTCACTTGGTGGTCTGTCTC

```

图 1 日本白鲫 *GDF9* 基因片段及其编码的氨基酸序列推测

Fig. 1 The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Carassius auratus cuvieri* *GDF9* gene

PCR 引物用长下划线表示,终止密码子用“*”表示,蛋白酶水解位点 RXXR 用阴影表示,6 个半胱氨酸残基用短下划线表示。

以日本白鲫卵巢总 RNA 为模板扩增获得的 *BMP15* cDNA 序列片段长 811 bp (GenBank 登录号: JQ339352),经序列分析发现日本白鲫 *BMP15* 包含有 TGF- β 超家族特有的蛋白酶水解位点 (RTRR),并且也含有 4 个半胱氨酸残基(图

2)。经 BLAST 分析,日本白鲫 *BMP15* cDNA 序列与斑马鱼 *BMP15* 同源性最高,其相似性为 80%。以上分析推测这一序列为 TGF- β 超家族中的 *BMP15* 基因片段。

```

1 GCAGATGGACGACCAAAGCAGAACAAAGTTATTTGGGTCCAACACTGTAAGGCTGCTCAA
1 A D G R P K Q N K L F G S N T V R L L Q
61 GCGTCCAGCGTGAAAAACACTTTCTCCGAACTCAAGTGACCTCAATATACTACACA
21 A S S A E K H F L P N S S D L Q Y T Y T
121 GTCAAATATGAACTGGAGAACCTCTCGTTGGACAAATGGTGAGGGCCTTTTATGCAC
41 V K Y E L E N L S L D K L V R A S F M H
181 CTGAGGTCTCTGTGTTCATCGCATCTTCTTTATCTGTGAGGCAAGAGTCAOCTCACTT
61 L R S P V S S H L P F I C E A R V T S L
241 CAAGATCTTCTGCAGGTGAGCATGTTCATCATGGGTCTCGAAGCCTGTTGACCAATCT
81 Q D L P A G E H V I M G P R S L W T E S
301 GATGTCACAAGCCAGTGTCAGAGTCGAAAGATGCCATGTGTCCTCTTTGCTCATTAT
101 D V T S H V S E S K D G H V S L F A H Y
361 CGATGCATAAAACAAGAACTACATGCCAGGTCTATTACACATCGAAAACACTTCCCACCT
121 R C I K Q E L H A R S I T H R K H F P P
421 CAACACCATCTTCCAGGCTCCAGTTTGGCTGCTCTTCTTGGAGGAGAACAAGCAGCCTGTG
141 Q H H L Q A P V L L L F L E E N K Q P V
481 GAATGGGGCAAGCACTTCACGCCCTTTCTCGCCCAGGACCCGTCGGTCCAAGGAAGCT
161 E W G K H F T P L S R P R T R R S K E A
541 GGGAGCATCGTCTCTGACATCCCAACTACAAGCAAGGGCAGAACAGCGTGACCAAAAAC
181 G S I V S D I P N Y K Q G Q N S V T K N
601 CAGTGCAAGCTGCACTCCTACCGTGTGACCTTCAAAGATTGGGATGGGACCACTGGATC
201 Q C K L H S Y R V T F K D L G W D H W I
661 ATGCGCCCAACAAGTACAATCCTCATTACTGTATGGGTGATTGTCCTCGTATCCTGCAT
221 I A P H K Y N P H Y C M G D C P R I L H
721 TACGGCTACAATTCACCCAACCATGCGATCATGCAGACATTAATCAGCGAGCTTGGTGAG
241 Y G Y N S P N H A I M Q T L I S E L G E
781 GCAGATATCCCGTTGCCCTCCTGCGTTCCTT
261 A D I P L P S C V P

```

图2 日本白鲫 *BMP15* 基因片段及其编码的氨基酸序列推测

Fig.2 The partial nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Carassius auratus cuvieri BMP15* gene

PCR 引物用长下划线表示,蛋白酶水解位点 RXXR 用阴影表示,4 个半胱氨酸残基用短下划线表示。

2.2 GDF9 与 BMP15 氨基酸同源性分析及系统进化树的构建

将日本白鲫 GDF9 氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、欧洲海鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 及人 (*Homo sapiens*) 的氨基酸序列进行对比,6 个半胱氨酸残基所处位置完全一致(图 3)。BMP15 氨基酸序列与斑马鱼、欧洲海鲈及人进行对比,4 个半胱氨酸残基所处的位置完全一致(图 4)。日本白鲫 GDF9 氨基酸序列与斑马鱼 (AAV91155)、虹鳟 (ACE74544)、欧洲海鲈 (CAP71884)、猪 (AAT48523)、山羊 (ABR10699)、鼠 (AAA53035) 及人 (NP_005251) 的序列相似性分别为 78%、71%、58%、61%、60%、65% 及 64%;BMP15 氨基

酸序列与斑马鱼 (AA I24107)、欧洲海鲈 (CAP71885)、鸡 (AAU-94351)、猪 (NP_001005155)、牛 (NP_001026922)、山羊 (ACG69781)、鼠 (EDL33879) 和人 (NP_005439) 的相似性分别为 80%、38%、35%、38%、35%、35%、31%、30%。进一步构建日本白鲫 GDF9 及 BMP15 与相关物种的系统进化树(图 5)。从进化树中可以看出,鱼类 GDF9 基因独立聚成一支,其中日本白鲫 GDF9 与斑马鱼聚成一支,与虹鳟和欧洲海鲈聚成的一支再聚成一支;鱼类的 BMP15 基因独立聚成一支,其中日本白鲫 BMP15 与斑马鱼聚成一支,再与欧洲海鲈的 BMP15 的一支再聚为一直。

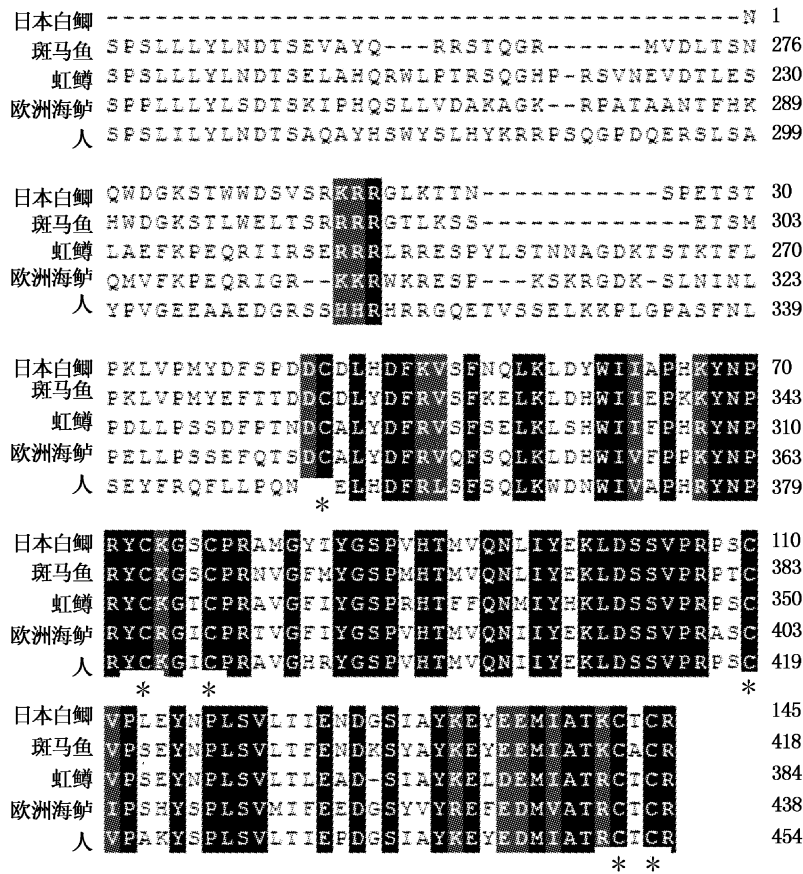


图 3 日本白鲫与斑马鱼、虹鳟、海鲈及人的 *GDF9* 基因氨基酸序列比对图

Fig.3 The amino acid sequences comparison of *GDF9* between *Carassius auratus cuvieri*, zebrafish, rainbow trout, European sea bass and human.

6 个保守的半胱氨酸残基用“*”表示。

2.3 *BMP15*、*GDF9* 基因的表达分析

以表 1 所示引物为半定量 PCR 引物,日本白鲫脾、鳃、肝、脑、心、肌肉、肾、卵巢 8 个组织的 cDNA 为模板, β -actin 为内参基因,利用半定量 PCR 方法研究日本白鲫 *GDF9* 和 *BMP15* mRNA 的组织表达特征。从图 6 可以看出, *BMP15*mRNA 在脾脏、肝脏、鳃、脑、心脏、肌肉、肾脏、卵巢中均有表达,其中在卵巢中表达量最高; *GDF9* mRNA 在肝脏、脑、心脏、肌肉、卵巢中均有表达,其中在肝脏中表达量最低,卵巢中表达量最高,而在脾脏、鳃、肾脏中表达量极低或不表达。

3 讨论

研究表明,鱼类的 *GDF9* 及 *BMP15* 与哺乳动物的相比,序列保守性较低,而各种鱼类之间也存在着较显著的亲缘远近关系。本实验首次克

隆得到日本白鲫 *GDF9* 和 *BMP15* 基因的部分序列, *GDF9* 基因片段长 778 bp, 编码 145 个氨基酸, *BMP15* 基因片段长 811 bp, 编码 270 个氨基酸。在整个氨基酸序列中,包含有 TGF- β 家族基因特有的 RXXR 蛋白酶水解位点, *GDF9* 为 RKRR, *BMP15* 为 RTRR, 而且 *GDF9* 含有 6 个保守的半胱氨酸残基, *BMP15* 含有 4 个保守的半胱氨酸残基。通过 BLAST 同源性搜索,日本白鲫 *GDF9* 氨基酸序列与斑马鱼的序列相似度分别为 78%, 与虹鳟相似度为 71%, 而与人的相似度为 64%。 *BMP15* 氨基酸序列与斑马鱼相似性为 80%, 与鼠和人的相似度分别为 31%、30%, 这种相似性与动物本身的分类地位很吻合,日本白鲫为鲤科鱼类,与同为鲤科鱼类的斑马鱼亲缘关系相对较近,而与鲈科鱼类欧洲海鲈及鲑科鱼类虹鳟相比相似度相对较远,与小鼠、人等其他哺乳动物的亲缘关系则更远。从系统进化树中可以看

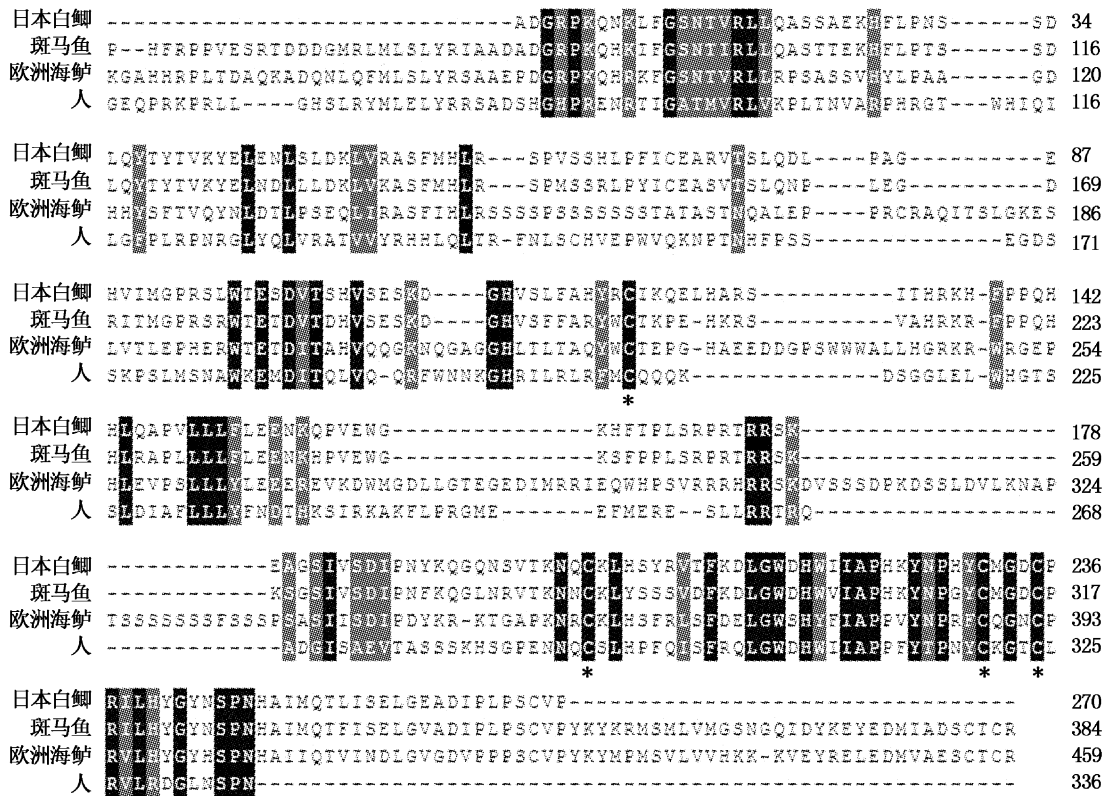


图 4 日本白鲫与斑马鱼、海鲈及人的 BMP15 基因氨基酸序列比对图

Fig. 4 The amino acid sequences comparison of BMP15 between *Carassius auratus cuvieri*, zebrafish, European sea bass and human.

4 个保守的半胱氨酸残基用“*”表示。

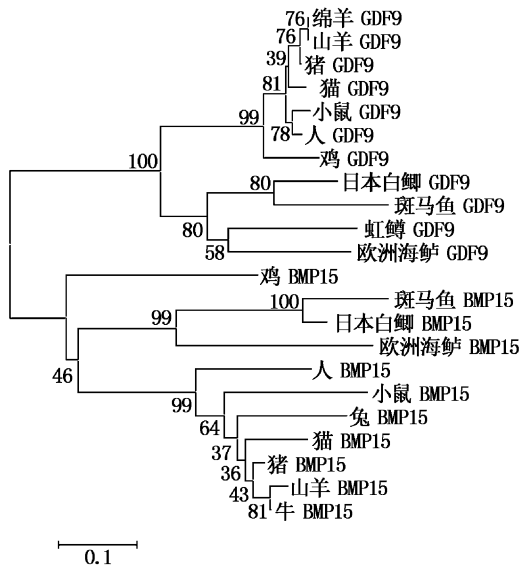


图 5 利用 MEGA 4.0 软件依照 N-J 法构建日本白鲫 GDF9 与 BMP15 的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on GDF9 and BMP15 amino acid sequences with MEGA 4.0 software using the neighbor-joining (N-J) method

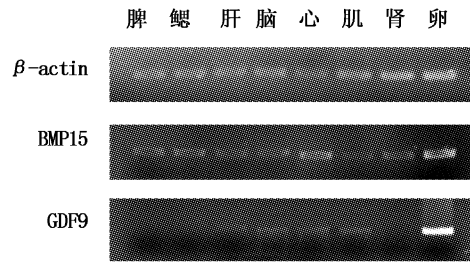


图 6 日本白鲫 GDF9 基因和 BMP15 基因在不同组织中的表达

Fig. 6 The expression of GDF9 and BMP15 mRNA in various tissues

出,鱼类的 GDF9 基因独立聚成一支,其中日本白鲫 GDF9 与斑马鱼聚成一支,与虹鳟和欧洲海鲈聚成的一支再聚成一支;鱼类的 BMP15 基因独立聚成一支,其中日本白鲫 BMP15 与斑马鱼聚成一支,再与欧洲海鲈的 BMP15 的一支再聚为

一支,符合物种分子进化关系。目前,利用半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR 及

免疫组化等实验技术,人们已对 *GDF9* 与 *BMP15* 在不同动物中的组织分布进行了相关研究。在人、鼠等哺乳动物中,*GDF9* 最初被认为是一种卵母细胞特异因子^[8]。然而,随后的研究发现其也会表达于一些其他的组织,如下丘脑、精巢及垂体^[9-10]。在鱼类中,*GDF9* 和 *BMP15* 基因也在不同组织中有表达,但是不同鱼类之间存在差异。本实验利用半定量 PCR 对日本白鲫 *GDF9* 和 *BMP15* 基因在不同组织中的 mRNA 表达量进行分析,结果表明日本白鲫 *GDF9* 基因在卵巢中表达量最高,该结果与一些人、绵羊等哺乳动物研究结果一致^[11-12],而且在斑马鱼及虹鳟等硬骨鱼类中也已证实 *GDF9* mRNA 仅存在于性腺中,在脑、肝脏及肌肉等其他组织中未检测到其转录^[2,13]。同时,本实验也发现 *GDF9* 在脑、心脏和肌肉中也有少量的表达,这与欧洲海鲈中 *GDF9* 的表达模式有所相似^[6]。以上结果表明在不同鱼类间可能确实存在基因表达的种属差异性^[14],也可能是因为 *GDF9* 基因表达随物种所处的个体发育、生长阶段等因素的变化而不同。鱼类 *BMP15* mRNA 的组织表达分布已在斑马鱼和欧洲海鲈中有过报道,斑马鱼 *BMP15* 主要在卵巢、精巢、脑、肠道及肌肉中表达,欧洲海鲈 *BMP15* 主要表达于卵巢、脑、肌肉及肾脏中^[15-16]。本实验发现,日本白鲫 *BMP15* mRNA 的表达特异性与 *GDF9* 相比较低,其在本白鲫卵巢中表达量最高,在其他组织中表达量相对较少,这与斑马鱼 *BMP15* 的表达模式相似^[17]。综上所述,*GDF9* 和 *BMP15* 基因在进化过程中比较保守,但是 *GDF9* 和 *BMP15* 基因在不同物种中功能上是否有很大差异还需要进一步的研究。

在人类及鼠、羊等哺乳动物中,*GDF9* 与 *BMP15* 的作用越来越受到人们的重视,有关它们结构、表达、功能及信号转导机制的研究日益增多,其在卵巢卵泡发育过程中的调控机理也被逐渐阐明^[17-22]。然而,在水产动物中,*GDF9* 与 *BMP15* 在卵细胞发育中的研究还十分有限,仅局限在斑马鱼、虹鳟等少数鱼类之中,研究手段也较单一,对其认识还不够深入。将来有待利用现代生物技术和其他新出现的技术进一步研究 *GDF9* 与 *BMP15* 在鱼类中的作用及功能,为阐明鱼类生殖系统的发生机制提供相关理论依据。

参考文献:

- [1] PHERRON A C, LEE S J. GDF-3 and GDF9: Two new members of the transforming growthfactor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268 (5) :3444 - 3449.
- [2] GILCHRIST R B, LANE M, THOMPSON J G. Oocyte-secreted factors regulators of cumulus cell function and oocyte quality [J]. Human Reproduction Update, 2008, 14 (2) : 159 - 177.
- [3] 胡成玉,洪一江,贾人松,等. 繁殖季节日本白鲫鱼性腺发育的研究 [J]. 南昌大学学报:理工版, 1993, 17(2) :92 - 98.
- [4] ESTHER L, GRAHAM Y, JULIEN B, et al. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are fouled [J]. General and comparative endocrinology, 2010, 165 (3) :367 - 389.
- [5] LIU L, GE W. Growth differentiation factor 9 and its spatiotemporal expression and regulation in the zebrafish ovary [J]. Biology Reproduction, 2007, 76 :294 - 302.
- [6] HALM S, IBANEZ A J, TYLER C R, et al. Molecular characterisation of growth differentiation factor9 (gdf9) and bone morphogenetic protein15 (bmp15) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2008, 291 : 95 - 103.
- [7] LANKFORD S E, WEBER G M. Temporal mRNA expression of transforming growth factor-beta superfamily members and inhibitors in the developing rainbow trout ovary [J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 166 :250 - 258.
- [8] MCGRATH S A, ESQUELA A F, LEE S J. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor-9 [J]. Molecular Endocrinol, 1995, 9 :131 - 136.
- [9] FITZPATRICK S L, SINDONI D M, SHUGHRUE P J, et al. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues [J]. Endocrinology, 1998, 139 :2571 - 2578.
- [10] ECKERY D C, WHALE L J, LAWRENCE S B, et al. Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2002, 192 :115 - 126.
- [11] FITZPATRICK S L, SINDONI D M, SHUGHRUE P J, et al. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues [J]. Endocrinology, 1998, 139 :2571 - 2578.
- [12] JUENGEL J L, HUDSON N L, HEATH D A, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep [J]. Biology Reproduction, 2002, 67 :1777 - 1789.
- [13] BOBE J, NGUYEN T, MAHE S, et al. In silico identification and molecular characterization of genes predominantly expressed in the fish oocyte [J]. BMC Genomics, 2008, 9:

- 499 – 514.
- [14] 吴小凤, 李小勤, 冷向军, 等. 草鱼 JAK2 基因片段序列的克隆及其组织表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(1): 21 – 27.
- [15] HALMA S, IBANEZ A J, TYLER C R, et al. Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (gd9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp15) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 291: 95 – 103.
- [16] ERIC C, GURNEETU K, ROBERT K C, et al. Bone Morphogenetic Protein-15 in the Zebrafish Ovary: Complementary Deoxyribonucleic Acid Cloning, Genomic Organization, Tissue Distribution, and Role in Oocyte Maturation [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 201 – 209.
- [17] OTSUKA F, YAO Z, LEE T, et al. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions[J]. *Biology Chemistry*, 2000, 275(50): 39523 – 39528.
- [18] LAITINEN M, VUOJOLAINEN K, JAATINEN R, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF9) related factor is co-expressed with GDF9 in mouse oocytes during folliculogenesis[J]. *Mechanisms of Development*, 1998, 78: 135 – 140.
- [19] PANGAS S A, MATZUK M M. Genetic models for transforming growth factor β superfamily signaling in ovarian follicle development [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 225: 83 – 91.
- [20] LI H K, KUO T Y, YANG H S, et al. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos [J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 103: 312 – 322.
- [21] JAATINEN R, LAITINEN M P, VUOJOLAINEN K, et al. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF9 and its novel homolog GDF9B [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 156: 189 – 193.
- [22] JUENGEL J L, BODENSTEINER K J, HEATH D A, et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules [J]. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82: 447 – 460.

Cloning and tissue expression of *GDF9* and *BMP15* genes in *Carassius auratus cuvieri*

WANG Yao, CHEN A-qin, YANG Zhi-gang, LIU Zhi-wei, GUO Zi-hao, ZENG Qi-tao, SHEN Cheng
(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: According to zebrafish *GDF9* and *BMP15* gene conservative region of nucleotide sequence to design primers, the *GDF9* and *BMP15* gene fragment of *Carassius auratus cuvieri* was amplified by RT-PCR. The partial sequence of *GDF9* is 778 bp and codes a protein of about 145 amino acids, the partial sequence of *BMP15* is 811 bp and codes a protein of about 270 amino acids. The amino acid sequence comparison results showed that the *GDF9* gene of *Carassius auratus cuvieri* shared 58% – 78% identity with other species, and *Carassius auratus cuvieri* is most similar to zebrafish (78%); *BMP15* gene of *Carassius auratus cuvieri* shared 30% – 80% identity with other species, and it is most similar to zebrafish (80%). Phylogenetic tree of *GDF9* and *BMP15* gene generated by Neighbor Joining method suggested that all teleosts cluster together, and *Carassius auratus cuvieri* *GDF9* is clustered closely with that of zebrafish, rainbow trout and European sea bass, and *Carassius auratus cuvieri* *BMP15* is clustered closely with that of zebrafish and European sea bass. Then the expressions of different tissues including spleen, gill, liver, brain, heart, muscle, kidney and ovary were analyzed by semi-quantitative PCR. The results showed that the *BMP15* gene of *Carassius auratus cuvieri* was expressed in all tissues and highest in ovary; the *GDF9* gene of *Carassius auratus cuvieri* was expressed in liver, brain, heart, muscle and ovary, while highest in ovary and extremely low even no expression in spleen, gill and kidney. This study will be helpful for further understanding the structure and function of *GDF9* and *BMP15* gene.

Key words: *Carassius auratus cuvieri*; *GDF9*; *BMP15*; gene cloning; gene expression