

文章编号: 1674 - 5566(2012)01 - 0001 - 06

## 中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中表达量的实时荧光定量 PCR 检测

程翔, 蔡生力, 刘红, 李媛媛

(上海海洋大学 农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

**摘要:** 中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 基因在卵巢和肝胰腺中都有表达。采用实时荧光定量 PCR 方法测定在卵巢不同发育时期卵巢和肝胰腺这两种组织的卵黄蛋白原 mRNA 的表达水平, 提取组织总 RNA, 设计特异性引物进行荧光定量 PCR 扩增, 对卵巢发育的各个阶段, 卵原细胞增殖期、卵黄发生前期、初级卵黄发生期、次级卵黄发生期和消退期的卵黄蛋白原 mRNA 表达进行相对定量分析。结果表明: 在卵巢中, 卵黄蛋白原 mRNA 在前 3 个阶段随着卵巢的发育, 表达量不断增加, 分别为 0.04、0.23 和 1.03, 次级卵黄发生期开始减少到 0.16, 消退期卵黄蛋白原 mRNA 表达量又增加到 1.00。而在肝胰腺, 前 4 个阶段随着卵巢发育, 表达量逐步增加, 分别为 0.01、0.07、0.19 和 1.29, 至消退期, 表达量减少到 0.74。

**研究亮点:** 使用实时荧光定量的方法, 分析了中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 基因在卵巢发育的不同时期, 卵巢和肝胰腺组织中的相对表达水平。选择敏感性和特异性较好的实验方法, 在前人定性研究的基础上开始相对定量的研究, 清晰地阐述了卵巢和肝胰腺中卵黄蛋白原 mRNA 基因的表达差异。

**关键词:** 中国明对虾; 卵黄蛋白原; 卵巢; 肝胰腺; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

在虾、蟹类甲壳动物中, 卵黄磷蛋白是卵巢中众多蛋白的主要组成成分, 约占卵母细胞中蛋白总量的 60% ~ 90%<sup>[1]</sup>。卵黄磷蛋白是由其前体卵黄蛋白原释放到血液中被卵母细胞吸收后加工而成<sup>[2]</sup>。目前, 针对甲壳动物的卵黄蛋白原合成部位的研究较多, 研究表明: 甲壳动物十足目的虾类卵巢、脂肪组织<sup>[3]</sup>和肝胰腺<sup>[4]</sup>都可能是卵黄蛋白原的合成部位。对中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的卵黄蛋白原合成部位的研究比较多, 研究结论相对一致, 认为中国明对虾的卵巢和肝胰腺都是卵黄蛋白原的合成部位。关于卵黄蛋白的合成, 主要集中在合成部位的定性研究上, 而对甲壳动物不同组织, 不同卵巢发育时期卵黄蛋白原合成进行定量研究很少, 但意义更重要。

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence

quantitative PCR, FQ-PCR) 技术具有操作简便、高效、敏感性和特异性高等特点, 已经广泛用于检测基因的表达水平<sup>[5]</sup>。本文以中国明对虾雌虾为研究对象, 采用实时荧光定量的相对定量法, 对 5 个不同卵巢发育时期雌虾的卵巢和肝胰腺卵黄蛋白原 mRNA 表达水平进行检测, 为对虾卵黄蛋白原的合成机理研究提供参考依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

实验用雌性中国明对虾采集于山东省日照市涛雒镇小海育苗三厂。根据亲虾的卵巢发育不同步的特点, 分别于 2009 年 10 月、2010 年 1 月、3 月、4 月和 9 月共 5 次从日照市采集中国明对虾, 每个卵巢发育时期取 3 尾, 共 15 尾样本。取回的鲜活对虾解剖后取卵巢和肝胰腺部分放

收稿日期: 2011-04-20 修回日期: 2011-10-13

基金项目: 上海市教育委员会重点学科建设项目 (J50701)

作者简介: 程翔 (1984—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物繁殖与发育生物学。E-mail: xiangcheng84@ yahoo. cn

通讯作者: 刘红, E-mail: hliu@ shou. edu. cn

在 1.5 mL 离心管中液氮速冻后  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存,部分用福尔马林磷酸缓冲液固定用于组织切片观察。根据细胞直径、核仁数量、卵黄颗粒、皮质棒、外周有无滤泡细胞包围等特点将卵母细胞的发育分为早期分化时相、滤泡细胞初生期时相、卵黄大量生成时相和皮质棒生成 4 个时相。参考不同发育时相卵母细胞的出现比率,结合卵巢的颜色、性腺指数等将中国明对虾卵巢的发育分为 5 个时期。每个时期取 3 尾实验虾的卵巢和胰腺进行荧光定量 PCR 分析。

## 1.2 方法

### 1.2.1 总 RNA 提取

将样品组织从  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出,按照 TRNzol Reagent 试剂盒(天根生化科技有限公司)说明书提取组织的总 RNA。用 UV-4802H 紫外

可见分光光度计测量吸光值,通过  $\text{OD}_{260/280}$  判断总 RNA 纯度,用 1.5% 的琼脂糖凝胶变性电泳鉴定其完整性,继续后续实验或  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2.2 逆转录合成 cDNA

用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒逆转录,反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ ,1  $\mu\text{L}$  总 RNA、2  $\mu\text{L}$   $10\times\text{RTmix}$ 、2  $\mu\text{L}$  dNTP (2.5 mmol/L)、2  $\mu\text{L}$  oligo (dT)<sub>15</sub> (10  $\mu\text{mol/L}$ )、1  $\mu\text{L}$  Quant-reverse Transcriptase、12  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 混匀后 37  $^{\circ}\text{C}$  温浴 60 min,继续后续实验或  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2.3 引物设计

参照 GenBank 中中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 的序列 (DQ354690) 和斑节对虾 18S ribosomal RNA 的序列 (AY074921) 分别设计目的基因和内标基因的特异性引物(表 1)。

表 1 荧光实时定量 PCR 分析所用引物

Tab.1 Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR analysis

引物	序列
Vitellogenin mRNA-F	5'-GCT GTT GAA GCT GGT GTG GA-3'
Vitellogenin mRNA-R	5'-TGG TAT TGG GAT GTG TGT GGA-3'
18S ribosomal RNA-F	5'-CGT TTT CTC AGA GCG CAG GT-3'
18S ribosomal RNA-R	5'-TCT TTG CTG GGT TTC TCT TTC C-3'

### 1.2.4 普通 PCR 扩增

PCR 扩增 50  $\mu\text{L}$  体系为:cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、2  $\times$  Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:96  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min、65  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 37 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.2.5 荧光定量 PCR 扩增

荧光定量 PCR 扩增体系为:cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 、iQ SYBR Green Supermix 10  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 0.3  $\mu\text{L}$ 、DEPC 处理过的双蒸水 8.4  $\mu\text{L}$ 、总体积 20  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、68  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 40 个循环;55~95  $^{\circ}\text{C}$ , 81 个循环。

### 1.2.6 数据统计及分析

卵黄蛋白原 mRNA 基因相对表达水平用 LIVAK 和 SCHMITTGEN<sup>[5]</sup> 建立的  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算。所有样品重复 3 次,目的基因相对表达量用平均值  $\pm$  标准差表示,数据分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan 法进行多重比较,当  $P < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 基因与 18S rRNA 基因的标准曲线

以次级卵黄发生期的卵巢中总 RNA 反转录而来的 cDNA 为模板,将模板做 10 倍的梯度稀释,共 5 个梯度,每个梯度两个重复,制作目的基因和内标基因的标准曲线(图 1、图 2)。经过优化,实时荧光定量检测系统计算出目的基因(卵黄蛋白原 mRNA)与内标基因(18S rRNA)的标准曲线相关系数  $r$  均为 0.99 以上,分别为 0.999 和 0.998。扩增效率分别为 104.7% 和 106.3%。斜率分别为  $-3.214$  和  $-3.180$ ,由于两者斜率相差小于 0.1,表明两者扩增效率已非常接近,则可以用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行相对定量分析。

### 2.2 方法的特异性

分析溶解曲线可见卵黄蛋白原 mRNA 基因与 18S rRNA 基因的荧光定量产物均呈较为锐利的单一峰(图 3、图 4),溶解温度  $T_m$  分别为 81.63  $^{\circ}\text{C}$  和 82.87  $^{\circ}\text{C}$ 。溶解曲线中没有其他杂峰出现,可知在用 SYBR Green 荧光染料进行 PCR

检测时,荧光信号全部为 PCR 扩增产物,没有其它干扰。荧光定量 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳呈单一条带,卵黄蛋白原 mRNA 基因与内标基因 18S rRNA 基因的 PCR 产物分别位于 119 bp 和 105 bp 左右,且无其他杂带(图 5),这进一步验证了反应的特异性。

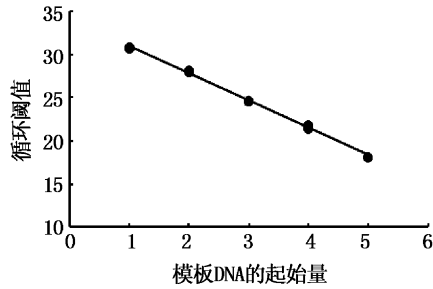


图 1 卵黄蛋白原 mRNA 基因的标准曲线

Fig.1 Standard curve of vitellogenin mRNA gene

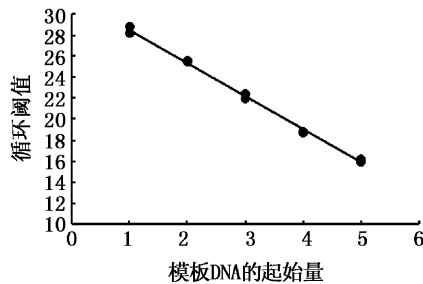


图 2 18S rRNA 基因的标准曲线

Fig.2 Standard curve of 18S rRNA gene

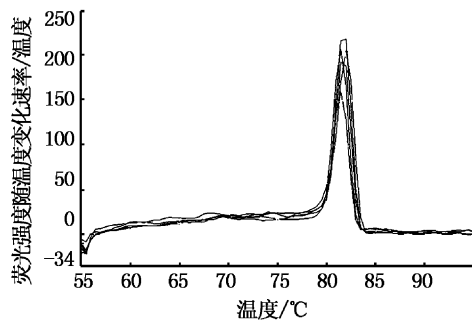


图 3 卵黄蛋白原 mRNA 扩增产物溶解峰图

Fig.3 Melting peaks for vitellogenin mRNA gene

### 2.3 卵巢和肝胰腺中卵黄蛋白原 mRNA 基因的相对表达量

在不同卵巢发育阶段,卵黄蛋白原 mRNA 基

因在卵巢和肝胰腺中的相对表达量见表 2。

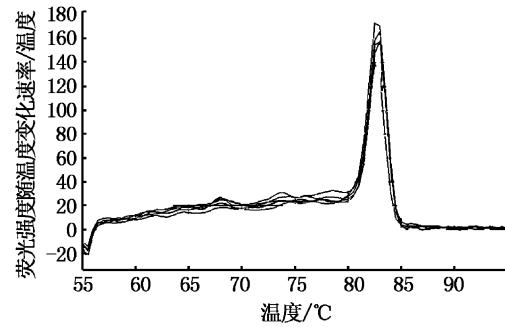


图 4 18S rRNA 基因扩增产物溶解峰图

Fig.4 Melting peaks for 18S rRNA gene

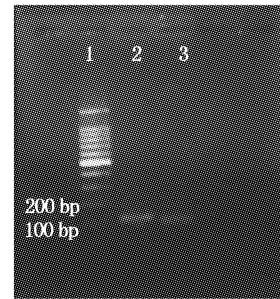


图 5 荧光定量 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图  
1. 100bp DNA Ladder; 2. 卵黄蛋白原 mRNA 基因扩增产物(119 bp);  
3. 18S rRNA 基因扩增产物(105 bp)。

图 5 荧光定量 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.5 Electrophoresis pattern of fluorescence quantitative PCR product

在肝胰腺中,卵黄蛋白原 mRNA 的表达量在前 4 个阶段是不断增加的,在次级卵黄发生期卵黄蛋白原 mRNA 表达量达到最高峰,约为初级卵黄发生期的 7 倍,差异显著 ( $P < 0.05$ )。消退期的卵黄蛋白原 mRNA 的表达量也比较高,为初级卵黄发生期的 4 倍,差异显著 ( $P < 0.05$ )。在卵巢中,卵黄蛋白原 mRNA 的表达量在前 3 个阶段是不断增加的,在初级卵黄发生期卵黄蛋白原 mRNA 表达量达到最高峰,大约为卵黄发生前期的 4.6 倍,差异显著 ( $P < 0.05$ )。次级卵黄发生期的卵黄蛋白原 mRNA 的表达量降低幅度很大,与卵黄发生前期的表达量相当,差异不显著 ( $P > 0.05$ )。而在消退期卵黄蛋白原 mRNA 的表达量又显著升高,与初级卵黄发生期的表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

将处于卵原细胞增殖期的肝胰腺中卵黄蛋白原 mRNA 的相对表达量(0.01)作为一个单位,由此计算出卵巢发育各个时期,卵巢和肝胰腺中

的卵黄蛋白原 mRNA 的相对表达量(图 6)。次级卵黄发生期除外,其他各卵巢发育时期,卵巢

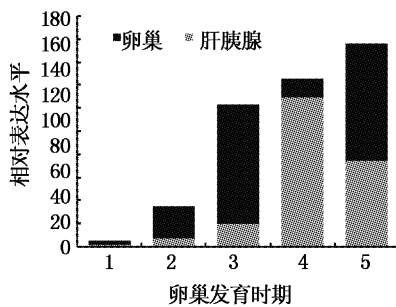
中的卵黄蛋白原的 mRNA 的表达量均比肝胰腺中的高。

表 2 不同发育时期卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺中的相对表达量

Tab. 2 Expression of vitellogenin mRNA in ovary and hepatopancreas at different development stages

卵巢发育时期	卵巢	肝胰腺
卵原细胞增殖期	0.040 ± 0.002 <sup>c</sup>	0.010 ± 0.0003 <sup>c</sup>
卵黄发生前期	0.225 ± 0.005 <sup>d</sup>	0.071 ± 0.014 <sup>c</sup>
初级卵黄发生期	1.025 ± 0.034 <sup>b</sup>	0.189 ± 0.005 <sup>d</sup>
次级卵黄发生期	0.158 ± 0.089 <sup>d</sup>	1.289 ± 0.047 <sup>a</sup>
消退期	1.000 ± 0.056 <sup>b</sup>	0.742 ± 0.017 <sup>c</sup>

注:单因素方差分析,Duncan 多重比较,以平均值 ± 标准误(n = 3)表示,标有不同字母的值之间差异显著(P < 0.05)。



1. 卵原细胞增殖期; 2. 卵黄发生前期; 3. 初级卵黄发生期; 4. 次级卵黄发生期; 5. 消退期。

图 6 不同发育阶段卵黄蛋白原 mRNA 基因在卵巢和肝胰腺中的相对表达量

Fig. 6 Relative expressions of vitellogenin mRNA gene in ovary and hepatopancreas at different development stages quantitative PCR product

### 3 讨论

甲壳动物十足目的虾类卵巢、脂肪组织<sup>[3]</sup>和肝胰腺<sup>[4]</sup>都可能是卵黄蛋白原合成部位。而对虾的卵黄蛋白原合成部位,不同研究者得出的结果不一致。YANO 和 CHINZEI<sup>[6]</sup>用体外培养方法研究发现日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的卵巢是卵黄蛋白的合成场所,而肝胰腺合成的蛋白与抗卵黄磷蛋白血清没有沉淀反应,认为肝胰腺不是卵黄的合成场所。BROWDY 等<sup>[7]</sup>的研究结果表明卵巢是短沟对虾唯一的卵黄蛋白原合成部位。QUACKENBUSH<sup>[8]</sup>用抗体免疫检测的方法对南方滨对虾(*Litopenaeus schmitti*)进行研究,结果显示,肝胰腺和卵巢都有免疫反应,两个组织都可能是卵黄蛋白原的合成部位。FAINZILBER 等<sup>[9]</sup>使用放射性免疫沉淀的实验方法研究了短沟对虾卵黄蛋白原的合成,认为卵巢是其主要的卵黄蛋白原合成场所,处于卵黄合成

早期雌体的肝胰腺也有合成卵黄蛋白原的功能,合成量低于合成总蛋白量的 15%。由此可知:不同种类之间卵黄蛋白原合成部位不一致,不同作者对同一种类的研究结果也有差异。CHANG 和 JENG<sup>[10]</sup>在中国明对虾的血淋巴中发现一种卵黄蛋白原,说明中国明对虾也可能存在着外源性合成部位。谢松等<sup>[11]</sup>利用免疫组织化学的方法,发现中国明对虾的卵巢和肝胰腺都有卵黄蛋白和卵黄蛋白原的积累。孙丽娜等<sup>[12]</sup>在中国明对虾的卵巢和肝胰腺中扩增得到了相同大小的卵黄蛋白原 cDNA,表明卵巢和肝胰腺都是卵黄蛋白原 mRNA 表达的位点,进一步证实了前面的结论。张成锋等<sup>[13]</sup>利用反转录 PCR(reverse transcription PCR)和 Northern 杂交的方法初步研究了不同发育时期的中国明对虾卵巢和肝胰腺中卵黄蛋白原 mRNA 的表达,结果表明,卵巢和肝胰腺都有卵黄蛋白原 mRNA 的表达,都是卵黄蛋白的合成部位。从目前研究来看,对中国明对虾的卵黄蛋白原合成部位的研究结论相对一致,认为中国明对虾的卵巢和肝胰腺都是卵黄蛋白原的合成部位。

本实验主要采用实时荧光定量 PCR 方法,研究了中国明对虾卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺的表达及其表达量的差异。实验结果表明:中国明对虾的卵黄蛋白原 mRNA 在肝胰腺和卵巢中都有表达,进一步证实肝胰腺和卵巢都是中国明对虾卵黄蛋白原的合成部位。中国明对虾肝胰腺的卵黄蛋白原 mRNA 表达量从卵原细胞增殖期到次级卵黄发生期不断增加,次级卵黄发生期急剧增加达到最高,约为卵原细胞增殖期的 129 倍,而在消退期卵黄蛋白原 mRNA 表达量有所减少,但仍维持在一个较高的水平,约为卵原

细胞增殖期的 74 倍。卵巢中的卵黄蛋白原 mRNA 表达量与肝胰腺有所差异,从卵原细胞增殖期到初级卵黄发生前期不断增加,初级卵黄发生期卵黄蛋白原 mRNA 表达量最大,为肝胰腺卵原细胞增殖期的 104 倍。次级卵黄发生期 mRNA 表达水平明显减少,大约为肝胰腺卵原细胞增殖期的 16 倍。消退期又急剧增加到肝胰腺卵原细胞增殖期的 101 倍。

以上结果显示,在卵巢发育的多数阶段,卵巢的 mRNA 表达量都比肝胰腺中多。这与 VAZQUEZ-BOUCARD 等<sup>[14]</sup>对印度明对虾 (*Fenneropenaeus indicus*) 的研究结果类似,他们认为在卵黄生成过程中肝胰腺参与卵黄蛋白原合成,但是对于卵母细胞的充分发育,卵巢合成的卵黄蛋白原起主要作用。在初级卵黄发生期,卵巢的卵黄蛋白原 mRNA 的表达量是肝胰腺的 5.4 倍,两者表达量差异显著 ( $P < 0.05$ )。但在次级卵黄发生期,肝胰腺的合成量反而是卵巢的 8.2 倍,差异显著 ( $P < 0.05$ )。在消退期两种组织的卵黄蛋白原 mRNA 表达量都比较高,表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

本研究结果还显示中国明对虾肝胰腺在次级卵黄发生期的表达量最大,卵巢在初级卵黄发生期的表达量最大,说明肝胰腺的卵黄蛋白原 mRNA 表达高峰期比卵巢要出现得晚。TSUTSUI 等<sup>[15]</sup>发现编码日本囊对虾卵黄蛋白原的 mRNA 在卵巢的滤泡细胞和肝胰腺的实质细胞中都有表达,观察到卵巢卵黄蛋白原的 mRNA 在卵黄发生早期达到最高水平,继而快速下降,而在肝胰腺,直到卵黄发生后期一直保持较高水平。显然中国明对虾和日本囊对虾的卵巢和肝胰腺的卵黄蛋白原 mRNA 表达相类似,都不是同步的,在不同发育阶段它们对卵黄蛋白原的合成是相辅相成的。

经过一次产卵,处于卵巢发育消退期的中国明对虾,无论是肝胰腺还是卵巢,其卵黄蛋白原 mRNA 的表达量都有所降低,但仍维持在一个相对较高的水平。对虾卵巢之所以能够在产卵后一周左右迅速恢复,卵黄蛋白很快积累,卵母细胞再次成熟并产卵,这与进入消退期后,卵黄蛋白原的 mRNA 表达仍很活跃有密切关系。

本实验室在对日本沼虾 (*Macrobrachium nippones*) 的卵黄蛋白原合成研究中,发现从卵原

细胞增殖期到次级卵黄发生期,无论卵巢还是肝胰腺的卵黄蛋白合成持续增强,肝胰腺的卵黄蛋白原 mRNA 表达强度超过卵巢<sup>[16]</sup>,这与本实验的研究结果存在一定的差异,卵黄蛋白原 mRNA 的表达时机和水平在真虾类的沼虾和对虾类的对虾中是否有差异,是否因此而影响这两类甲壳动物的繁殖发育有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] EASTMAN-REKS S, FINGERMAN M. In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab, *Uca pugilator* [J]. *Experimental Zoology*, 1985, 233(1):111-116.
- [2] KHAYAT M, LUBZEN E, TIETZ A, et al. Cell-free synthesis of vitellin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 1994, 93(2): 205-213.
- [3] TOM M, GOREN M, OVADIA M. Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) [J]. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 1987, 12(1): 1-12.
- [4] YANG W J, OHIRA T, TSUTSUI N, et al. Determination of amino acid sequence and site of mRNA express of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Experimental Zoology*, 2000, 287(6): 413-422.
- [5] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] YANO I, CHINZEI Y. Ovary is the site of vitellogenins synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1987, 86B(2): 213-218.
- [7] BROWDY C L, FAINZILBER M, TOM M, et al. Vitellin synthesis in relation to oogenesis in vitro-cubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) [J]. *Experimental Zoology*, 1990, 255(2): 205-215.
- [8] QUACKENBUSH L S. Vitellogenesis in the shrimp *Penaeus vannamei*: in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary [J]. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1989, 94(2): 253-261.
- [9] FAINZILBER M, TOM M, SHAFIR S, et al. Is there extraovarian synthesis of vitellin in penaeid shrimp [J]. *Biological Bulletin*, 1992, 183(2): 233-241.
- [10] CHANG C F, JENG S R. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis* [J]. *Comparative Biochemistry Physiology*, 1995, 112B(2): 257-263.
- [11] 谢松,柳峰松,白涛,等. 中国明对虾雌性特异蛋白在部分组织中的免疫定位 [J]. *动物学报*, 2005, 51(s): 201-206.

- [12] 孙丽娜,柳峰松,谢松. 中国明对虾卵黄蛋白原部分 cDNA 序列和表达部位研究[J]. 河北科技大学学报, 2006, 27(1): 49-53.
- [13] 张成锋,刘红,高祥刚,等. 中国对虾卵黄蛋白原合成部位的研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 7-13.
- [14] VAZQUEZ-BOUCARD C G, LEVY V P, CECCALDI H J, et al. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopcreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indius* [J]. Journal of experimental Marine biology and Ecology, 2002, 281(1): 63-75.
- [15] TSUTSUI N, KAWAZOE I, OHIRA T, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. Zoological Science, 2000, 17(5): 651-660.
- [16] 高祥刚,刘红,徐佳念,等. 日本沼虾卵黄蛋白原合成部位的初步研究[J]. 生物技术通报, 2006(s): 438-444.

## Determination of vitellogenin mRNA expression in ovary and hepatopancreas of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*

CHENG Xiang, CAI Sheng-li, LIU Hong, LI Yuan-yuan

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aqua-cultural Ecosystem Certified by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The vitellogenin mRNA gene was expressed in both ovary and hepatopancreas of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. In this paper, the expression of vitellogenin mRNA in the ovary and hepatopancreas at different ovarian development stages, including multiplication oogonium, previtellogenesis, primary vitellogenesis, secondary vitellogenesis and declining stages was determined by real-time fluorescence quantitative PCR. The total RNA was extracted from the ovary and hepatopancreas and the target gene was amplified by real-time fluorescence quantitative PCR with special primers. The results show that in ovary, the expression of mRNA increased from multiplication oogonium to primary vitellogenesis stage. The relative expression levels were 0.04, 0.23 and 1.03 respectively, but decreased at secondary vitellogenesis stage to 0.16. However, in declining stage it was 1.00. In hepatopancreas, the expression of mRNA increased from multiplication oogonium to secondary vitellogenesis stage. The relative expression levels were 0.01, 0.07, 0.19 and 1.29 respectively, and it decreased to 0.74 at declining stage.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; vitellogenin; ovary; hepatopancreas; real-time fluorescence quantitative PCR