

长江刀鲚 *mor-4k13* 基因的分离鉴定及表达分析

王晓梅^{①②} 朱国利^{①②} 唐文乔^{①②*}

① 上海海洋大学鱼类研究室 上海 201306; ② 上海市海洋动物系统分类与进化重点实验室 上海 201306

摘要: 分布于长江的刀鲚 (*Coilia nasus*) 具有洄游和定居两个生态型, 生殖洄游是区别两者的主要表征。为了探索嗅觉受体 (OR) 基因是否参与了刀鲚的生殖洄游过程, 本文采用 RACE 技术从洄游型刀鲚中获得了 *mor-4k13* 基因, 该基因全长 1 098 bp, 编码区长 963 bp, 单外显子结构, 可编码 320 个氨基酸。预测表明, *mor-4k13* 基因编码的蛋白质, 为 7 个疏水性的 α -螺旋跨膜结构, 属 G-蛋白偶联受体, 有胆固醇和油酸两个配体。MOR-4K13 蛋白与已报道的其他鱼类 OR 蛋白的同源性在 40% ~ 68% 之间, 其中, 与近缘种大西洋鲱 (*Clupea harengus*) 嗅觉受体蛋白同源性高达 68%。采用 Real-time PCR 方法对 10 个组织或器官所作的荧光定量分析显示, *mor-4k13* 基因在定居型刀鲚嗅囊和性腺中高表达, 在肌肉、眼球、胃壁、肝和鳃中低表达, 心肌中几乎不表达。*mor-4k13* 基因在洄游型刀鲚嗅囊中的表达量总体高于定居型, 且洄游型雄性刀鲚嗅囊中此基因的表达量约是其雌性嗅囊中的 3 倍。这表明 *mor-4k13* 基因不仅与嗅觉功能和性腺发育相关, 也可能与生殖洄游习性相关, 不同性别的个体间也存在着嗅觉能力的差异。

关键词: 刀鲚; 嗅觉受体基因; 序列分析; 组织表达; 生态型

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 01-64-11

Isolation, Identification and Expression of *mor-4k13* Gene in Japanese Grenadier Anchovy (*Coilia nasus*) from the Yangtze River

WANG Xiao-Mei^{①②} ZHU Guo-Li^{①②} TANG Wen-Qiao^{①②*}

① Laboratory of Ichthyology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; ② Shanghai Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai 201306, China

Abstract: Japanese Grenadier Anchovy (*Coilia nasus*) in the Yangtze River has migratory and sedentary ecotypes, and spawning migration is a major phenotypic difference between the two groups. In order to explore whether olfactory receptor genes are involved in the process of spawning migration in *C. nasus*, the

基金项目 公益性行业 (农业) 科研专项 (No. 201203065), 国家自然科学基金项目 (No. 31172407, 31472280), 高等学校博士学科点科研专项 (No. 20123104110006), 上海高校水产学高峰学科;

* 通讯作者, E-mail: wqtang@shou.edu.cn;

第一作者介绍 王晓梅, 女, 硕士研究生; 研究方向: 分子生物学; E-mail: xmw0212@163.com.

收稿日期: 2016-03-27, 修回日期: 2016-08-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201701008

mor-4k13 gene encoding olfactory receptor was cloned from olfactory rosette RNA of migratory *C. nasus* using RACE. The *mor-4k13* gene was 1 098 bp in length with an open reading frame of 963 bp which encoded 320 amino acid residues, and this gene was single exon (Fig. 2). Gene structure analysis indicated that this protein had seven hydrophobic and alpha helix transmembrane structure, belonging to the G-protein-coupled receptor superfamily (Fig. 4), and had two ligands including cholesterol and oleic acid. The homology between *mor-4k13* protein of *C. nasus* and OR protein of other reported fishes ranged from 40% to 68%, and the homology of closely related species Atlantic Herring (*Clupea harengus*) was 68% (Table 2). The result based on qRT-PCR among 10 tissues and organs of the settlement population revealed that the *mor-4k13* gene was expressed strongly in female olfactory rosette and ovary. Its expression in female olfactory rosette and gonad was high, but weak in muscle, eyes, stomach, liver and gills, and almost no expression was found in the heart (Fig. 5). In addition, the overall expression of the *mor-4k13* gene in migratory *C. nasus* olfactory rosette was higher than in the sedentary group. In the migratory population, its expression in male olfactory rosette was 3 times higher than in female olfactory rosette (Fig. 6). In summary, the *mor-4k13* gene not only was related to olfactory function, but also participated in gonadal development or associated with reproductive migration, and there existed gender gap in the olfactory ability.

Key words: Japanese Grenadier Anchovy, *Coilia nasus*; Olfactory receptor gene; Sequence analysis; Tissues expression; Ecotype

刀鲚 (*Coilia nasus*) 是鲱形目 (Clupeiformes) 鲱科 (Engraulidae) 的一种中小型鱼类, 也是长江中下游重要的经济鱼类, 具有洄游型和定居型两种生态型 (唐文乔等 2007)。洄游型刀鲚的幼体栖息于近海水域, 春季性成熟后溯河进入河流的中、下游产卵繁殖, 孵化后的幼鱼顺流而下进入海中肥育, 在我国东海、黄海、渤海、日本有名海及其通海的江河等均有分布 (袁传宓等 1980)。定居型刀鲚则在淡水中完成整个生活史, 见于长江中下游及其附属的鄱阳湖、太湖、巢湖等水域 (袁传宓等 1984)。定居型刀鲚是低值渔品, 洄游型刀鲚则是长江流域最名贵的水产品之一。

生殖洄游是洄游型刀鲚区别于定居型的主要表征之一 (唐文乔等 2007)。目前, 有关鱼类洄游的定向机制问题仍没有彻底阐明, 许多解释也还停留在假说阶段。自 Hasler 等 (1951) 提出鱼类生殖洄游的嗅觉定向 (olfactory orientation) 假说后, 相继发现嗅觉基因在美洲鳗 (*Anguilla rostrata*) (Barbin et al. 1998)、大西洋鲑 (*Atlantic salmon*) (Dittman et al. 1996)、

红大麻哈鱼 (*Oncorhynchus nerka*) (Hino et al. 2007) 等的生殖洄游中具有重要作用。鱼类嗅觉受体 (olfactory receptor, OR) 蛋白主要分布在嗅觉上皮, 由纤毛感觉细胞、微绒毛感觉细胞和隐窝细胞 3 种细胞表达 (Hoover 2013)。水中的氨基酸、核苷酸、类固醇、前列腺素和胆汁酸等作为诱导物, 刺激嗅觉上皮的嗅觉受体 OR 蛋白引起化学信号, 通过嗅觉神经把信息传送到神经中枢从而实现嗅觉识别 (Putnam et al. 2008)。嗅觉受体 OR 蛋白由嗅觉受体基因所编码, 在进化上分为 4 个相互独立的家族, 其中的主嗅觉受体 (main olfactory receptors, MOR) 是数量最大的一个家族, 据推测可识别水溶性气味分子 (Ngai et al. 1993)。本研究在前期通过多个转录组的测序比较并找出差异表达基因的基础上 (Zhu et al. 2014, 2016), 利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术从洄游型刀鲚获取了主嗅觉受体基因 *mor-4k13*, 分析了该基因的结构以及在两种生态型间的表达差异, 旨在为探索长江刀鲚洄游的嗅觉定向机制提供一些线索。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验所用刀鲚定居型样本 6 尾, 雌雄各 3 尾, 2014 年 3 月采自江西鄱阳湖都昌水域; 洄游型样本 6 尾, 雌雄各 3 尾, 2014 年 5 月采自长江靖江江段; 所有样本的性腺发育均为 III 期。使用灭菌解剖刀现场剪取所需组织或器官, 并立即放入液氮中冷冻保存。定居型刀鲚取嗅囊、性腺(精巢、卵巢)、肌肉、心、眼球、胃、肝和鳃, 洄游型刀鲚仅取嗅囊和肌肉。实验前组织或器官样本从液氮中取出, 放置 -80℃ 保存备用。

1.2 基因组 DNA 及总 RNA 的提取

利用动物组织基因组 DNA 小量提取试剂盒(上海莱枫生物科技有限公司)分别提取 6 尾洄游型和 6 尾定居型刀鲚的肌肉组织基因组 DNA, 保存于 -20℃ 冰箱。用 Eastep™ 总 RNA 提取试剂盒(上海普洛麦格生物产品有限公司)提取每尾定居型刀鲚 10 种组织或器官及洄游型刀鲚嗅囊的总 RNA。提取后的基因组 DNA 和总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 判断其完整性; Thermo Nandrop2000 分光光度计测定总 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值, 评价纯度, 估测浓度大小。产物置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 *mor-4k13* 基因序列的获取

本实验室前期已从洄游型刀鲚嗅囊 cDNA

文库中获得了 *mor-4k13* 基因序列片段, 根据 SMARTer® RACE 5'/3' 试剂盒 (User Manual) [宝生物工程(大连)有限公司] 设计获取 3' 端未知序列引物 (RACE-3-1 和 RACE-3-2) 和 5' 端未知序列引物 (RACE-5-1 和 RACE-5-2, 表 1)。制备 5' 和 3' RACE-Ready cDNA, 以洄游型刀鲚嗅囊提取的总 RNA (< 200 ng) 为模板, 以 3'/5'-CDS Primer A 为随机引物获取 RACE-Ready cDNA。随后优化反应体系和反应条件, 以 UPM (10 × Universal Primer A Mix) 和 RACE-5-1/RACE-3-1 为引物进行 5' 和 3' RACE 反应, 获得第一轮扩增反应产物。以第一轮反应产物为模板, 利用 NUP primers 和 RACE-5-2/RACE-3-2 扩增获得产物并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。条带切胶后, 用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司)进行回收纯化, 再对纯化产物进行 TA 克隆并外送测序。采用 ABI-PRISM3730XL 仪(上海迈浦生物有限公司)测序, 获得目的基因序列。

1.4 *mor-4k13* 基因开放阅读框的获取

经 5' 和 3' RACE 反应所获得的产物进行测序后, 利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>) 在线去除载体。采用 DNA MAN 软件与引物比对, 进行序列拼接。利用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	用途 Usage
RACE-3-1	TTCATCGGGCTCACCTGGGCAGTTGGAT	3'RACE-PCR
RACE-3-2	ATACATCAGCCAAATCTATGCTCAGAAAACG	
RACE-5-1	TATTGTGGAGCGATGGACTGGGAAGA	5'RACE-PCR
RACE-5-2	ATCAGCATCAGCCACACGAACGACAT	
Q221-F	CGGCTTTGGTGAAAAACCTA	Real-time PCR
Q221-R	ACACACGGAGGAGTTTACGG	
ORF-F	TGGAGATACTGGGTGATGAA	扩增具有完整编码区的目的基因序列 Amplification of target gene sequences with a full coding region
ORF-R	AACATAATGCAATATGGAATTAACC	
GAPDH-F	AGCTTGCCACCCTCTTGCT	Real-time PCR
GAPDH-R	AGCCATCAACGACCCCTTC	

Blastx 工具, 对 *mor-4k13* 基因序列进行比对, 寻找同源性最高的基因序列, 并结合 Jellyfish 软件预测该基因的开放阅读框区域。根据预测结果, 在 *mor-4k13* 基因的开放阅读框区域两侧设计特异性引物 (ORF-F/ORF-R, 表 1), 进行基因序列的验证, 判断是否具有内含子并获取基因的开放阅读框。使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司], 以 Oligo dT Primer 为引物对洄游型刀鲚嗅囊总 RNA 进行反转录, 获得第一链 cDNA。为判断该基因是否包含内含子, 以洄游型刀鲚基因组 DNA 和嗅囊 cDNA 为模板, 进行 PCR 反应。反应体系为: 模板 < 1 μg, ORF-R 和 ORF-F 各 0.5 μl (10 μmol/L), 10 × Taq Plus Buffer 2.5 μl, dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2 μl, Taq Plus DNA 聚合酶 (2.5 U/μl) 0.5 μl, 加 ddH₂O 至 25 μl。反应条件为: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。反应产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。为比较该基因在两种生态型刀鲚间的差异性, 利用此对引物分别对 6 尾洄游型刀鲚和定居型刀鲚的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 反应体系和反应条件同上。反应产物外送测序(上海迈浦生物科技有限公司), 测序引物为 ORF-F/ORF-R, 拼接后获得目的基因片段。

1.5 *mor-4k13* 基因序列分析

根据对 *mor-4k13* 基因开放阅读框区域的预测结果, 经 Jellyfish 软件预测其编码的氨基酸序列。利用 ExPasy 网站 (<http://expasy.org/tools/>) 中的 ProtParam 工具分析蛋白质的基本理化性质, TMpred 工具 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析蛋白质的跨膜区, PredictProtein 工具 (<http://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白质的绑定位点; SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测蛋白质的三级结构。通过 NCBI 中 Protein Blast 下载同源蛋白序列, 利用 ClustalX 软件进行序列比对, MEGA 6.0 软件构建邻接 (neighbor-joining) 进化树。

1.6 *mor-4k13* 基因的组织表达分析

以洄游型刀鲚的嗅囊和定居型刀鲚 10 个组织或器官提取的总 RNA (< 1 μg) 为模板, 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司], 获得反转录 cDNA。将 cDNA 产物进行 5 倍稀释, 保存于 -20℃ 备用。从 6 尾定居型和 6 尾洄游型样本中, 随机取 3 尾个体的组织或器官, 通过 qRT-PCR 反应, 定量分析 *mor-4k13* 基因在定居型刀鲚 10 个组织或器官以及洄游型刀鲚嗅囊中的相对表达水平。在 *mor-4k13* 基因编码区内设计特异性引物 (Q221-F/Q221-R, 表 1), 以编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因为内参基因, 根据该基因已知的序列设计内参引物 (GAPDH-R/GAPDH-F, 表 1)。利用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 经过优化后, 用 Bio-rad CFX Connet 实时定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR, 分析该基因在各组织或器官中的相对表达量。反应体系: SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 10 μl, 正反向引物各 0.4 μl (10 μmol/L), ROX Reference Dye 0.4 μl, cDNA 模板 < 100 ng, 灭菌双蒸水补足 20 μl。同时, 用灭菌双蒸水替代模板 DNA 作为阴性对照进行同样的 PCR 扩增。每个组织和对照样本均进行 3 个生物重复。反应条件: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 72℃ 32 s, 40 个循环; 并做溶解曲线。反应结束后获得并导出各样本的循环阈值 (threshold cycle, Ct), 随后采用 2^{-ΔΔCt} 法及方差法进行表达量的差异性分析。

2 结果

2.1 刀鲚 *mor-4k13* 基因结构

经 5'、3' RACE 反应和两轮扩增后, 从洄游型刀鲚中分别获得 5'端 700 bp 和 3'端 550 bp 左右的基因片段 (图 1)。经 TA 克隆及测序, 所得结果用 DNAMAN 软件拼接, 获得了长度

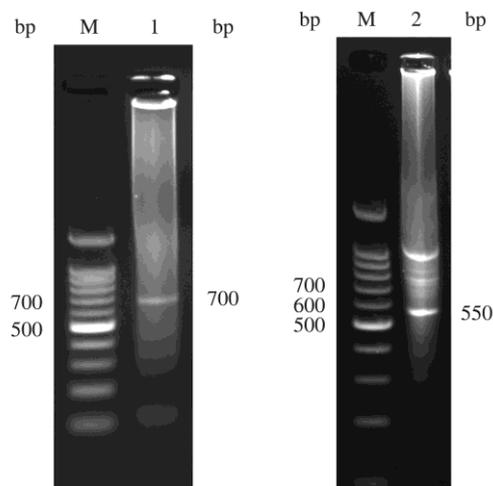


图1 *mor-4k13* 基因的 RACE 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram patterns of *mor-4k13*

RACE amplification product

M. 100 bp Plus DNA 分子量标准; 1. 5'-RACE 扩增产物片段;
2. 3'-RACE 扩增产物片段。

M. 100 bp Plus DNA Ladder; 1. The fragment of 5'-RACE
amplification product; 2. The fragment of 3'-RACE
amplification product.

为 1 098 bp 的 *mor-4k13* 基因, 其中的开放阅读框位于序列中第 51 位至 1013 位碱基之间 (图 2)。经特异性引物 ORF-F 和 ORF-R 对洄游型刀鲚嗅囊 cDNA 和基因组 DNA 进行检测后发现, 该基因的编码区域无内含子结构。

利用 Jellyfish 软件对 *mor-4k13* 基因序列进行结构预测, 编码区长 963 bp, 具有起始密码子 ATG 和终止子 TAA。编码区的碱基组成中, 碱基 A 为 233 个, 占 24.20%; C 为 251 个, 占 26.06%; G 为 204 个, 占 21.18%; T 为 275 个, 占 28.56%; 碱基 (A+T) 所占比例大于 50%, (G+C) 所占比例小于 50%。3'-端非编码区 (untranslated region, 3'-UTR) 有多腺核苷酸信号 (AATTTAT), poly (A) 尾紧邻其后, 终止密码子 TAA 与 poly (A) 尾间隔 60 个核苷酸残基 (图 2)。

2.2 *mor-4k13* 基因编码的蛋白质结构预测

经 Jellyfish 软件预测, 刀鲚 *mor-4k13* 基因

可编码 320 个氨基酸残基。经 ProtParam 在线预测蛋白质的理化性质, 发现其分子式为 $C_{1667}H_{2660}N_{422}O_{431}S_{28}$, 原子总数 5 208, 相对分子质量 36 407.7, 理论 PI 值 9.49, 带负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 数 12, 带正电荷氨基酸残基数 (Arg + Lys) 数 30, 半衰期 30 h, 不稳定系数 (II) 44.41 (> 40, 表明该蛋白不稳定), 脂肪系数 114.81 及总平均亲水性 (GRAVY) 0.623。

经 Predict Protein 在线预测该蛋白质的二级结构, 结果见图 2。可见该蛋白共有 8 个蛋白类定位点, 分别为: 1, 1; 126, 126; 174, 174; 214, 214; 252 ~ 255; 297 ~ 306; 315, 315; 318, 318。核苷酸类定位点有 5 个: 124, 124; 210 ~ 213; 218, 218; 280, 280; 290, 290。RNA 类定位点也有 5 个: 126, 126; 212 ~ 213; 215 ~ 218; 294, 294; 298, 298。二级结构中有 52.19% 的 α -型螺旋、10.63% 的 β -型螺旋和 37.19% 的 β -型转角, 但无二硫键结构。

经 TMpred 在线预测, 发现 *mor-4k13* 基因编码的蛋白质有 7 个跨膜区 (图 2, 图 3), 分别为: TM1 (17 ~ 38, 长 22, 方向 1o-1i)、TM2 (50 ~ 76, 长 27, 方向 2i-2o)、TM3 (71 ~ 92, 长 22, 方向 3o-3i)、TM4 (128 ~ 148, 长 21, 方向 4i-4o)、TM5 (182 ~ 200, 长 19, 方向 5o-5i)、TM6 (222 ~ 247, 长 26, 方向 6i-6o)、TM7 (257 ~ 279, 长 23, 方向 7o-7i)。经 SWISS-MODEL 在线预测, 该蛋白质的三级结构具有 7 个 α -型螺旋跨膜结构 (图 4) 及胆固醇 (cholesterol) 配体和油酸 (oleic acid) 配体。

2.3 MOR-4K13 蛋白与其他鱼类相关蛋白间的同源性

利用 NCBI 中 protein blast 在线比对刀鲚 MOR-4K13 蛋白序列, 发现与其他 21 种鱼类的相关嗅觉受体蛋白的氨基酸残基序列 (表 2) 同源性为 40% ~ 68%。其中与大西洋鲱 (*Clupea harengus*) OR 4K13-like 的同源性最高, 为 68%。与墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*) OR

```

TGGGGACTGCTGTCAGGTTGGACAAGTCTACTCTGGAGATACTGGTGatgaatctcactattaagatgcctttgagagcgttttggtgaaaaact 100
                                     1
                                     M N L T I K D A F E T A L V K N L 17
agtcattgtgcccattggtattgcatcaatgcatcaatgggatcataatttggactttctcaggaaactctgttttctcactgtaaacagatacatt 200
V I V A M G I V L M C I N G I I I L T F F R N S V F H C E T R Y I 50
                                     TM1
ctgtacatgaacctgttgatgacatgacgatgtttttcagtgacactgcacgttttgacgacgccacttcggcgtaaactctccgtgt 300
L Y M N L V V N D M T M I F V S V T L H V L T H A T S A V N S S V 83
                                     TM2
ggtgcactctgattgttatctaccactgacatgaacactcctattatctcggcggcatggctattgagcgtacattgccatctgcaagcctct 400
C C T L I V I S S T T Y M N T P I I L A G M A I E R Y I A I C K P L 117
ccatcacactcagatctgcacggtgcaggacctacgtttctcatcgggctcactggggcagttgattcacaccaacaatagttgacgtcttcattgtg 500
H H T Q I C T V R R T Y V L I G L T W A V G F T P T I V D V F I V 150
                                     2 1(3)
                                     TM4
tatgccattgaccccagcgcgttttctcctcgtgggcttgcaccgccctaccatacatcagccaatctatgctcagaaaacgcaggtgggtc 600
Y A I E P T R F F S S V G L C H P L T I Y I S Q I Y A Q K T Q V V 183
                                     1
agggcctctacatgctcgttggtgctgatgctacacttacctcagggttttctaacagccagcagccacgtgcgacgcccctcgcctgcctgcaa 700
Q G L Y M S F V W L M L I Y T L R V F L T A R A A T C D A A S A K 217
                                     TM5
aaaggcagagatcaccatttctcagcagcagctcagctgctctctcagctgctctacatcactcctgacatgagatgctttagcctcttctc 800
K A Q S T I L L H G A Q L L L C M L S Y I T P Y I E M A L V P F 250
                                     2
                                     TM6
ccagtccatgctccacaataattcctgctgctacatgacccatgctccttccaaggttgcctcagtcactcatatagttatagggatcagaat 900
P V H R S T I M F L C Y L I T M L L P R L L S P L I Y S I R D Q K 283
                                     1
                                     TM7
ttgccaatgatgtcacagctactactcctgttaggtgacagaccagaagaacatgcgaagaggagagaatgactcttccagcaagaatttcttc 1000
F A K C M S Q Y Y S C R V D R P K E H R K R R R M S S F S K K Y C S 317
                                     2
actgaaagtttaattccatattgccattatgtgtgaaacaaacatcattggcagcagctgctgtaatttataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1098
L K G *
                                     1

```

图 2 刀鲚 *mor-4k13* 基因核苷酸序列和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and amino acid sequence of odorant receptor gene *mor-4k13* in Japanese grenadier anchovy
TM1 ~ TM7. 7 个跨膜区域; “*” 终止密码子 TAA; △. 多腺核苷酸信号; ☆. Poly (A) 尾; 数字 1. 蛋白质绑定位点; 数字 2. DNA 绑定位点; 数字 3. RNA 绑定位点。

TM1 - TM7. Seven transmembrane regions; “*” The termination codon TAA; △. Multiple adenosine signal; ☆. Poly (A) tail; Number 1. Protein binding sites; Number 2. DNA binding sites; Number 3. RNA binding sites.

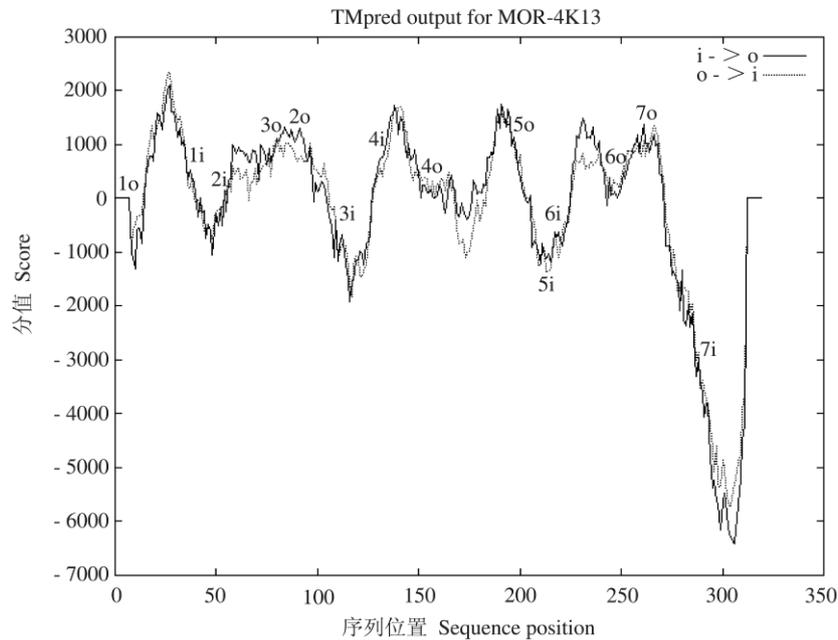


图 3 MOR-4K13 蛋白最优拓扑结构预测图及每一位置所得分值

Fig. 3 The graph of predicted MOR-4K13 protein, optimal topological structure and the resulting scores of each position

分数 > 500, 该区域才具有形成跨膜区域的可能性; 1o-1i、2i-2o、3o-3i、4i-4o、5o-5i、6i-6o、7o-7i. 蛋白定向。

Scores > 500, the region has the possibility of forming a transmembrane region; 1o-1i、2i-2o、3o-3i、4i-4o、5o-5i、6i-6o、7o-7i. Protein orientation.

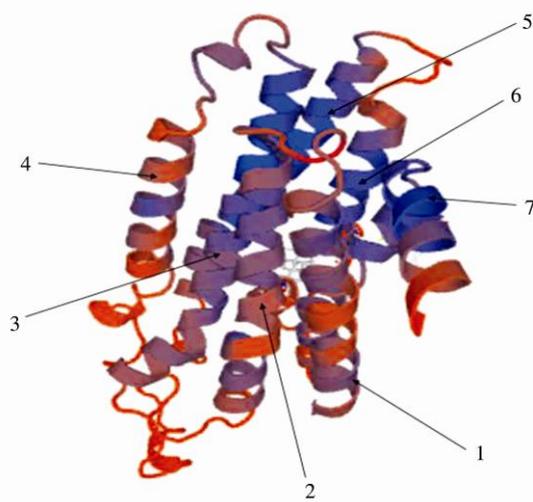


图4 MOR-4K13蛋白的三级结构预测图

Fig. 4 The predicted three-dimensional structure of MOR-4K13 protein

1 ~ 7. 蛋白质 7 个 α -型螺旋的位置。1 - 7. Seven α -helix position.

2AK2-like、白斑狗鱼 (*Esox lucius*) OR 2AK2-like 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) OR 2T1-like 同源性也较高, 分别为 50%、50% 和 52%。而与鲑形目、鲈形目、雀鳊目、鲀形目及鲽形目鱼类 OR 蛋白的关系较远, 同源性仅为 42% ~ 47%。

2.4 *mor-4k13* 基因的组织表达分析

以定居型刀鲚的组织 cDNA 产物为模板, 经 5 倍稀释后, 利用特异性引物 (Q221-F/Q221-R) 进行 qRT-PCR 反应, 得出各样品的 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析, 结果见图 5。可见, *mor-4k13* 基因在定居型刀鲚 10 种组织或器官中的相对表达水平, 以雌性嗅囊为最高, 约是雄性嗅囊的 3 倍; 卵巢次之, 约是精巢的 3 倍; 肝、肌肉、眼球、胃和鳃的表达量较低; 在心脏则几乎不表达。

表 2 MOR-4K13 同源蛋白的序列比较

Table 2 Comparison of MOR-4K13 homologous protein sequences

物种 Species	GenBank 登陆号 GenBank accession no.	与 MOR-4K13 的同源性 (%) Homology with MOR-4K13
大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	XP_012694061.1	68
墨西哥脂鲤 <i>Astyanax mexicanus</i>	XP_007238369.1	50
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	XP_014021307.1	52
白斑狗鱼 <i>Esox lucius</i>	XP_012987937.1	50
斑马宫丽鱼 <i>Maylandia zebra</i>	XP_012776691.1	46
伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	XP_005946631.1	47
深裂眶锯雀鲷 <i>Stegastes partitus</i>	XP_008303256.1	46
罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_003451931.1	45
布氏新亮丽鲷 <i>Neolamprologus brichardi</i>	XP_006807450.1	45
花斑剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	XP_005797234.1	39
孔雀鱼 <i>Poecilia reticulata</i>	XP_008407442.1	46
半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	XP_008319436.1	46
亚马逊帆鳍鲷 <i>Poecilia formosa</i>	XP_007569705.1	47
林奈氏澳鲷 <i>Austrofundulus limnaeus</i>	XP_013874577.1	46
底鲷 <i>Fundulus heteroclitus</i>	XP_012711028.1	47
斑点雀鳊 <i>Lepisosteus oculatus</i>	XP_006639820.1	47
红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	XP_011618701.1	44
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_004086242.1	43
大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP_010752453.1	46
红丽鱼 <i>Pundamilia nyererei</i>	XP_005753728.1	46
革首南极鱼 <i>Notothenia coriiceps</i>	XP_010792995.1	42

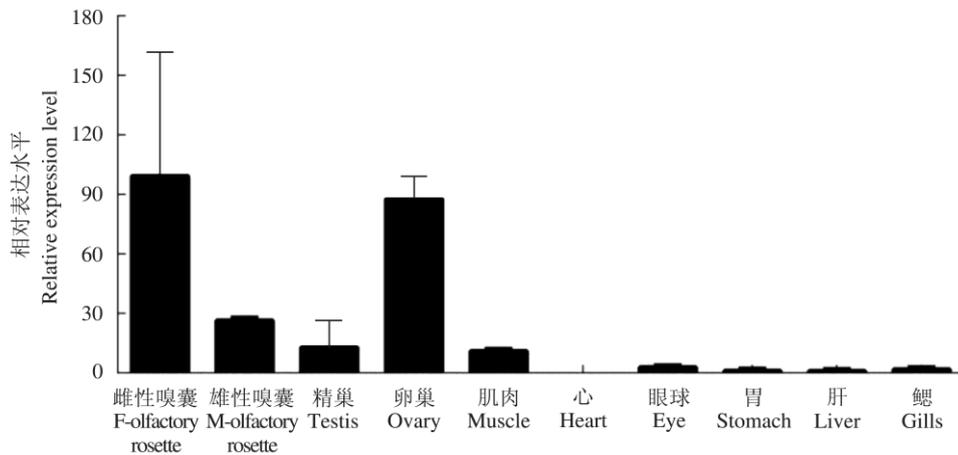


图 5 *mor-4k13* 基因在定居型刀鲚组织/器官中的表达 ($n = 3$)

Fig. 5 The *mor-4k13* expression in different organs and tissues in the settlement Japanese Grenadier Anchovy ($n = 3$)

以相同方法对 *mor-4k13* 基因在洄游型与定居型刀鲚嗅囊中的相对表达量进行比较, 结果见图 6。可见, *mor-4k13* 基因在洄游型刀鲚嗅囊中的表达量总体上要高于定居型; 但在洄游型群体中, *mor-4k13* 基因在雄性嗅囊中的表达量约是雌性嗅囊中的 3 倍; 而在定居型群体中, *mor-4k13* 基因在雌性嗅囊中的表达量却是雄性嗅囊中的 3 倍。

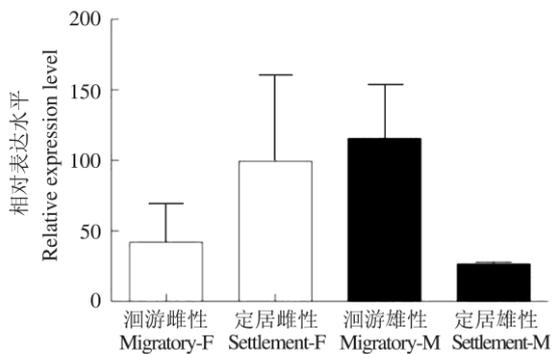


图 6 *mor-4k13* 基因不同生态型刀鲚嗅囊中表达 ($n = 3$)

Fig. 6 The *mor-4k13* expression in rosettes in the different ecotypes of Japanese Grenadier Anchovy ($n = 3$)

2.5 MOR-4K13 蛋白在不同生态型群体间的差异性

以洄游型刀鲚和定居型刀鲚的基因组 DNA 为模板, 利用正反向引物 ORF-F/ORF-R 获取了刀鲚 *mor-4k13* 基因的编码区序列, Jellyfish 软件预测了所表达的蛋白质序列。用 DNAMAN 软件比对两个生态型之间的基因编码区及编码蛋白序列后发现, 两者的基因编码区序列的一致性为 99.70%, 而蛋白质序列的一致性为 99.44%。由图 7 可见, 蛋白质序列差异仅出现在第 2、第 11、第 194、第 296、第 297 和第 307 位氨基酸残基上, 其中第 194 位氨基酸残基位于跨膜区内, 其他有差异的氨基酸残基均位于跨膜区外。

3 讨论

嗅觉参与脊椎动物的定位、摄食、避敌、种间识别、个体辨别、配偶选择和领域标记, 鱼类的生殖洄游过程也可能有嗅觉参与 (Niimura 2009, Zhou et al. 2011, 朱国利等 2015)。嗅觉由气味分子通过嗅觉受体基因编码的受体蛋白所引发, 主嗅觉受体 (MOR) 基因是数量最大的一类嗅觉受体基因亚家族, 最早

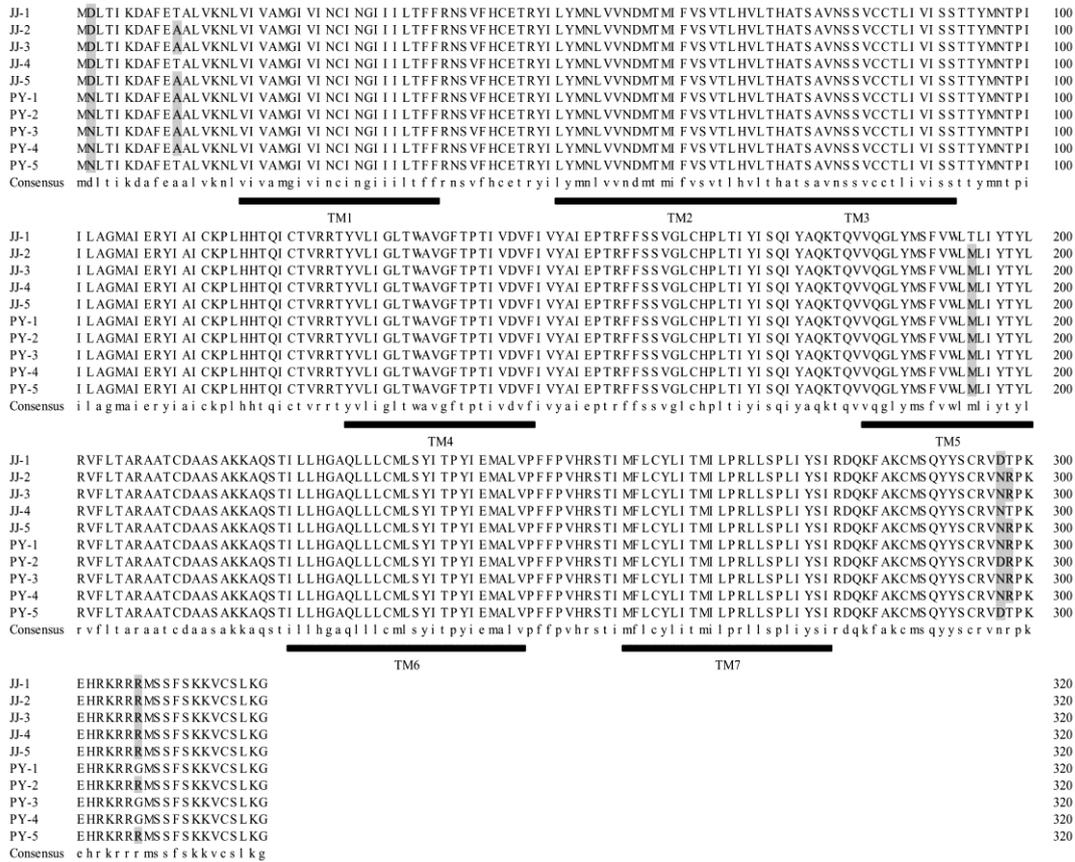


图 7 不同生态型刀鲚群体嗅觉受体蛋白 MOR-4K13 氨基酸序列比较

Fig. 7 The alignment of amino acid residues of olfactory receptor MOR-4K13 between different ecotypes of Japanese Grenadier Anchovy

JJ-1 ~ JJ-5. 洄游型刀鲚的 5 尾个体; PY-1 ~ PY-5. 定居型刀鲚的 5 尾个体; TM1 ~ TM7. 蛋白质跨膜区域。Consensus. 一致序列。

JJ-1 - JJ-5. Migratory *C. nasus*; PY-1 - PY-5. Settlement *C. nasus*; TM1 - TM7. Protein transmembrane region; Consensus. Consensus sequence.

发现于褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) (Pilpel et al. 1999)。目前鱼类的 *mor* 基因研究主要集中在一些模式物种, 如斑马鱼 (*Danio rerio*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、绿斑河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*)、青鲙等 (朱国利等 2015), 该类基因尚无统一的命名方式。

本文利用 RACE 技术从洄游型刀鲚获得具有完整编码区的 *mor-4k13* 基因, 长 1 098 bp, 编码区长 963 bp, 无内含子, 具有 poly (A) 尾, 可编码 320 个氨基酸残基, 这与已有的鱼类 *mor* 基因编码区长度一般 1 kb 左右、无内含子的基本特点相一致 (Buck et al. 1991, Pilpel et

al. 1999, Niimura et al. 2005a, b, Zhang et al. 2009, 朱国利等 2015)。分析发现 *mor* 基因编码的蛋白质具有 8 个蛋白类绑定位点、5 个核苷酸类绑定位点和 5 个 RNA 类绑定位点。这些绑定位点由相对较少的氨基酸残基组成, 被认为可能参与气味分子的结合, 可决定气味分子的特异性 (Pilpel et al. 1999, Man et al. 2004)。

近一步的功能预测发现, 刀鲚 MOR-4K13 蛋白不含二硫键结构, 具有胆固醇和油酸两个配体, 能够形成 7 个疏水性 α -型螺旋跨膜结构, 是典型的 G 蛋白偶联受体。序列同源性比较显示, 刀鲚 MOR-4K13 蛋白与已报道的其他鱼类 OR 蛋白的同源性在 40% ~ 68% 之间, 其中与

近缘种大西洋鲱 OR 4K13-LIKE 蛋白的同源性为 68%。

对定居型刀鲚样本的组织表达定量分析显示, *mor-4k13* 基因在嗅囊和卵巢中高表达, 在肝、肌肉、眼球、胃和鳃中也有较低表达, 但在心中几乎不表达。这表明 *mor-4k13* 基因不仅与嗅觉功能相关, 也与性腺的发育有关。分析发现, *mor-4k13* 基因在洄游型刀鲚嗅囊中的表达量要高于定居型, 表明该基因在生殖洄游过程中起到了一定的作用。分析还发现, *mor-4k13* 基因在洄游型雄性刀鲚嗅囊中的表达量约是其雌性嗅囊中的 3 倍, 而在定居型雌性刀鲚嗅囊中的表达量却是其雄性嗅囊中的 3 倍。这表明不论是洄游型还是定居型, 不同性别的个体间均存在着明显的嗅觉能力差异。这种性别间的差异表达是否也预示着, 洄游型刀鲚的雄性个体在溯河生殖洄游中起着带头作用, 而定居型刀鲚的雌性个体在寻找产卵场时起主导作用? 还需要克隆更多的基因加以证实。至于洄游型与定居型之间所显示的 MOR-4K13 蛋白存在若干氨基酸残基上的差异, 是否与生态型的分化相关抑或可以识别不同的气味分子, 还有待于进一步验证。

参 考 文 献

- Barbin G P, Parker S J, McCleave J D. 1998. Olfactory clues play a critical role in the estuarine migration of silver-phase American eels. *Environmental Biology of Fishes*, 53(3): 283–291.
- Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1): 175–187.
- Dittman A H, Quinn T P. 1996. Homing in Pacific salmon: Mechanisms and ecological basis. *Journal Experiment Biology*, 199(1): 83–91.
- Hasler A D, Wisby W J. 1951. Discrimination of stream odors by fishes and its relation to parent stream behavior. *The American Naturalist*, 85(823): 223–238.
- Hino H, Iwai T, Yamashita M, et al. 2007. Identification of an olfactory imprinting-related gene in the lacustrine sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Aquaculture*, 273(2/3): 200–208.
- Hoover K C. 2013. Evolution of olfactory receptors. *Methods in Molecular Biology*, 1003(1003): 241–249.
- Man O, Gilad Y, Lancet D. 2004. Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons. *Protein Science*, 13(1): 240–254.
- Ngai J, Dowling M M, Buck L, et al. 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell*, 72(5): 657–666.
- Niimura Y. 2009. On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: comparative genome analysis among 23 chordate species. *Genome Biology Evolution*, 1(1): 34–44.
- Niimura Y, Nei M. 2005a. Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in fishes and tetrapods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17): 6039–6044.
- Niimura Y, Nei M. 2005b. Evolutionary changes of the number of olfactory receptor genes in the human and mouse lineages. *Gene*, 346(1): 23–28.
- Pilpel Y, Lancet D. 1999. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Science*, 8(5): 969–977.
- Putnam N H, Butts T, Ferrier D E, et al. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature*, 453(7198): 1064–1071.
- Zhang X H, Firestein S. 2009. Genomics of olfactory receptors. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 47(47): 25–36.
- Zhou Y S, Yan X J, Xu S L, et al. 2011. Family structure and phylogenetic analysis of odorant receptor genes in the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1717): 2546–2552.
- Zhu G L, Tang W Q, Wang L J, et al. 2016. Identification of a uniquely expanded V1R (ORA) gene family in the Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*). *Marine Biology*, 163(5): 125–139.
- Zhu G L, Wang L J, Tang W Q, et al. 2014. De Novo Transcriptomes of olfactory epithelium reveal the genes and pathways for spawning migration in Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*). *PLoS One*, 9(8): e103832.

- 唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 2007. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. *生物多样性*, 15(3): 224-231.
- 袁传宓, 秦安黔, 刘仁华, 等. 1980. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼类种下分类的探讨. *南京大学学报: 自然科学版*, (3): 67-82.
- 袁传宓, 秦安黔. 1984. 我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况. *海洋科学*, 8(5): 35-37.
- 朱国利, 唐文乔, 刘东. 2015. 鱼类嗅觉受体基因研究进展. *水产学报*, 39(6): 916-927.