

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.01.007

张清清, 游慧芹, 杜康, 等. Exportin 家族鉴定及其在尼罗罗非鱼中的表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(1): 77-86.

Exportin 家族鉴定 及其在尼罗罗非鱼中的表达分析

张清清, 游慧芹, 杜康, 陶文静

西南大学 生命科学院/淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 输出蛋白(Exportins, XPOs)负责细胞核中蛋白质和 RNA 的输出, 对基因表达调控起着重要的作用, 然而 Exportin 家族的系统进化和表达模式尚不清楚. 研究首先对 22 种代表性动物的 Exportin 家族进行鉴定并分析了其系统进化, 再通过转录组分析和 qRT-PCR 探究了 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼各组织中的表达水平, 最后通过荧光原位杂交对 *xpo1a*, *xpo1b* 和 *xpo5* 在尼罗罗非鱼性腺中的细胞定位进行了分析. 结果表明: 脊椎动物 Exportin 家族成员的数量在经过第 2 轮和第 3 轮全基因组复制的物种中变化不大, 而在经过第 4 轮时显著增加, 暗示 Exportin 家族成员在第 4 轮全基因组复制中发生了扩张. *xpos* 主要在精巢中表达, 其中 *xpo1a* 表达最高; *xpos* 在尼罗罗非鱼孵化后 5 d 和 30 d 的表达没有雌雄差异, 而在孵化后 90, 180 和 300 d 出现明显差异, 其中负责 miRNA 出核转运的 *xpo5* 在精巢中的表达明显高于卵巢. 在尼罗罗非鱼卵巢中, *xpo1a*, *xpo1b* 和 *xpo5* 主要在卵原细胞和卵母细胞中表达; 在精巢中, *xpo1a* 和 *xpo5* 主要在精原细胞和精母细胞中表达, 而 *xpo1b* 主要在精细胞中表达. 研究系统分析了 Exportin 家族成员的进化及其在尼罗罗非鱼性腺中的表达, 为解析其在脊椎动物生殖发育中的作用奠定了基础.

关键词: 输出蛋白; 系统进化分析; 表达分析; 尼罗罗非鱼

中图分类号: Q111

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2024)01-0077-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of Exportin Family and Its Expression in *Oreochromis niloticus*

ZHANG Qingqing, YOU Huiqin, DU Kang, TAO Wenjing

School of Life Sciences, Southwest University/Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development (Ministry of Education), Chongqing 400715, China

Abstract: Exportins (XPOs) are responsible for the export of proteins and RNAs in the nucleus, which

收稿日期: 2022-01-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31972778); 西南大学大学生创新创业训练计划项目(S202110635298).

作者简介: 张清清, 硕士研究生, 主要从事鱼类性别决定与分化研究.

通信作者: 陶文静, 副研究员.

play an important role in the regulation of gene expression. The evolution and the expression pattern of the XPOs remain unclear. In this study, we firstly characterized XPOs in 22 representative animal species and analyzed its evolution systematically. Then, we analyzed the expression level of XPOs in different tissues of *Oreochromis niloticus* by transcriptome analysis and qRT-PCR. Finally, we analyzed the cellular location of *xpo1a*, *xpo1b* and *xpo5* in tilapia gonads by fluorescence in situ hybridization. The results showed that the number of XPOs changed slightly in species with the second and third rounds of whole genome duplication, but increased significantly in species with the fourth round of whole genome duplication, indicating an expansion of this gene family. *xpos* was mainly expressed in the testis, where the expression of *xpo1a* was the highest. *xpos* displayed sexual dimorphic expression at 90, 180 and 300 days after hatching (dah). Among them, *xpo5*, a gene responsible for miRNA export, expressed higher in testis than in ovary. No sexual dimorphic expression of *xpos* was found in the gonads of tilapia at 5 dah and 30 dah. Our results showed that *xpo1a*, *xpo1b* and *xpo5* were expressed in oocytes and somatic cells. *xpo1a* and *xpo5* were mainly expressed in spermatogonia and spermatocytes, *xpo1b* was mainly expressed in spermatocytes. Taken together, in this study, we analyzed the evolution of XPOs and their expressions in tilapia. Our results laid the foundation for elucidating the role of XPOs in the reproduction of vertebrates.

Key words: Exportins; phylogenetic analysis; expression analysis; *Oreochromis niloticus*

出核转运是基因发挥功能的重要一环, 因对出核转运相关蛋白的研究一直是生物学的热点. 输出蛋白(Exportins, XPOs)家族属于 Karyopherin 超家族, 包含 IBN-N 和 CRM-1 结构域, 对 RNA 和蛋白质的出核转运起重要作用^[1]. 在细胞核内, Exportins 与 GTP 和 RNA/蛋白质结合形成三聚体; 出核后, 伴随着 GTP 的水解, RNA/蛋白质被释放, Exportins 在核转运因子作用下重回细胞核^[2-3]. 迄今为止, 真核生物中共鉴定出 8 个 Exportins, 分别是 XPO1, XPO2, XPOT, XPO4, XPO5, XPO6, XPO7 和 IPO13^[4]. 2011 年, 有报道发现斑马鱼中不存在 XPO1, 而人的 XPO7 有 2 个拷贝^[5]. 另一研究发现斑马鱼的 XPO1 有 2 个拷贝(XPO1a 和 XPO1b), 而人所有的 Exportin 家族成员都只有 1 个拷贝^[6]. 由此可见, Exportin 家族在脊椎动物中的分离鉴定与系统进化存在争议, 有待进一步开展研究.

Exportin 的表达对 RNA 和蛋白质的调控至关重要. 最早在酵母中鉴定出的 Exportin 家族成员是 XPO1, 又称 CRM1. XPO1 对多种 RNA 与蛋白质出核以及细胞内环境稳态的维持具有重要作用^[7-9]. XPO2 是输入蛋白 α 的出核载体, 输入蛋白 α 将细胞质的货物输入到细胞核内, 通过 XPO2 回到细胞质中^[10-11]. XPO4 是核转化起始因子 5(AeIF-5A)的核输出受体, 也可以作为其他底物的输出受体^[12]. XPO5 可以运输多种 RNA, 主要参与 pre-miRNA 的运输, 在 miRNA 成熟过程中起重要作用^[13-14]. XPO6 介导肌动蛋白复合物的核输出^[15]. XPO7 可以运输蛋白^[16]. IPO13 专一输出翻译起始因子 1(AeIF-1A)^[17]. 以上研究主要是在细胞系中鉴定了出核蛋白的成员及功能, 然而在脊椎动物, 特别是鱼类中的表达模式未见报道.

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)是世界性经济水产养殖鱼类, 其性别决定系统为 XX/XY, 实验室前期已经建立了全雄和全雌的繁殖体系, 可生产全雄和全雌单性鱼. 此外, 其基因组序列、多个组织转录组数据以及不同发育时期的性腺转录组已公布^[18-20], 有助于基因的分离鉴定与表达模式分析. 本研究分析了 Exportin 家族成员在 22 种代表性动物中的系统进化, 并探究了其在尼罗罗非鱼各组织和各时期性腺的表达水平及细胞定位, 为深入解析 Exportin 家族在脊椎动物生殖发育中的作用奠定基础.

1 材料

尼罗罗非鱼由西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室提供. 饲养于室内循环水系统中, 自然光周期, 水温常年保持在 26 ± 1 °C. XX 单性鱼苗是由 XX 伪雄鱼(XX 雌鱼用激素处理后转变为可产

精子)与正常的 XX 雌性鱼交配获得, XY 单性鱼苗由 YY 超雄鱼和正常 XX 雌性鱼交配获得. 动物实验严格按照《实验动物饲养和使用指南》操作, 并获得审委会批准.

2 方法

2.1 基因家族成员的鉴定与系统进化树的构建

将尼罗罗非鱼 Exportin 全序列作为 query, 在 NCBI 对果蝇(*Drosophila melanogaster*)、玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)、象鲨(*Callorhinchus milii*)、矛尾鱼(*Latimeria chalumnae*)、非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、壁虎(*Gekko japonicus*)、鸡(*Gallus gallus*)、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、斑点雀鲷(*Lepidosteus oculatus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、金鱼(*Carassius auratus*)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)、半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*)的蛋白库进行比对. Bioedit 软件用于氨基酸序列的编辑、保存, 采用邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)以 MEGA X^[21] 软件构建系统进化树, 并用 Adobe Illustrator CS6 软件编辑系统进化树.

2.2 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼中的表达模式

通过前期对尼罗罗非鱼成鱼 8 个不同组织(头肾、肾脏、肝脏、卵巢、肌肉、脑、心脏和精巢)^[20]和尼罗罗非鱼孵化后 5, 30, 90, 180, 300 d 性腺的转录组数据进行分析, 获得 *xpos* 在各组织和性腺发育各时期的表达数据, 基因表达以 FPKM(Fragments Per Kilobase per Million)计量, 用 TBtools 绘制 heatmap, 最终数据制图在 GraphPad Prism 5(GraphPad Software, San Diego, CA)上完成.

2.3 实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)验证 Exportin 家族成员的表达模式

对孵化后 180 d 的尼罗罗非鱼脑、垂体、鳃、心脏、脾脏、肝脏、肠、卵巢、精巢、肾脏、头肾、肌肉进行取材, 液氮速冻后加入 RNAiso plus 裂解并通过氯仿抽提的方式提取各组织总 RNA($n=3$). 利用 TaKaRa 公司反转录试剂盒进行反转录获得各组织 cDNA. 将制备的 cDNA 稀释 10 倍后作为 qPCR 模板, 按照 SYBR Green I Master Mix (TaKaRa, 大连)说明书配制 qPCR 体系并通过 Stepone Plus 实时荧光定量 PCR 仪进行检测, qPCR 引物见表 1. 扩增参数: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 34 s(采集), 循环 40 圈. 持家基因 β -actin 作为内参, 基因的相对表达水平采用公式 $R=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 GraphPad Prism 5 软件中单因素方差分析(one-way ANOVA)方法进行差异显著性检验, $p<0.05$ 表示差异有统计学意义.

表 1 Exportin 家族成员实时定量 PCR 引物序列

基因名称	上游引物(5'~3')	下游引物(3'~5')
<i>xpol1a</i>	GCGATGCATGAGGAGGATGA	GAGGAACCTCCAGTGGGCTC
<i>xpol1b</i>	TGGATCCATCAGTGGGGCTA	CGAGGGTACTGGCCAACAAT
<i>xpo2</i>	TACACGAAACTCTGGACCCCA	TGAGAAGGCGGTCTGATAGC
<i>xpo4</i>	GCAAGCACATCTTGGAGACCA	GTGAGAAGGAATGCCCGGAG
<i>xpo5</i>	AGAAATGCGCCCTGATGGAA	ACCCGGACACATTCTTGTC
<i>xpo6</i>	AGCATGTTCACCAGGGAGC	ACCTGCTCCATGCACAAAGA
<i>xpo7</i>	CATCGATATCCGGAACATATGTGC	TGACAGTCGAACCAGCCCAG
<i>xpot</i>	ATGAGGACGCTGGTTTCCTG	ATCAGCACGCCAGGAATGTG
<i>ipo13a</i>	AGATGAGACGCCTAATCCTTCT	GCTGTTTTGACAGGTGGTGC
<i>ipo13b</i>	GGTGTCACAGGATGTACTGGT	TGTGAGGCGTGATGAGTGAG
β -actin	ACAACGGATCCGGTATGTGC	CTCATCACCAACGTAGCTGTC

2.4 *xpol* 和 *xpo5* 在性腺中的细胞定位

通过荧光原位杂交(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)检测 *xpol1a*, *xpol1b* 和 *xpo5* 在孵化后 120 d 尼罗罗非鱼性腺中的细胞定位. 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精复水后, 放入 1×PBS 缓冲液中洗 3 次, 每次 5 min. 经蛋白酶 K 消化(10 μg/mL)和 4%多聚甲醛再固定后(每步 10 min, 室温), 将片子依次放入 2 mg/mL 甘氨酸, 0.1 mol/L 三乙胺盐酸盐(Sigama, USA)和 0.25%乙酰酐(Sigama, USA)溶液中, 每步 5 min. 之后将片子放入 66%甲酰胺/2×SSC 缓冲液中 60 ℃预杂交 2 h. 随后, 配制杂交缓冲液并加入地高辛标记的反义探针(1 000 ng/mL)在 60 ℃湿盒中杂交 14~16 h, 探针引物序列见表 2. 杂交完成后, 将片子依次放入 50%甲酰胺/2×SSC, 2×SSC(60 ℃)以及 DIG I (RT)缓冲液中各洗 2 次, 每次 20 min. 经 1% BSA 封闭后(30 min, 室温), 加入 anti-DIG-POD(Roche, Germany, 1 : 500)室温孵育 30 min. DIG I 室温洗涤 4 次后, DIG II 封闭, 孵育 VASA 抗体 37 ℃ 30 min, 1×PBS 缓冲液洗 4 次后, 孵育绿色荧光二抗, 稀释比例参考厂家说明书(abcam), 37 ℃ 30 min 后用 1×PBS 缓冲液洗 4 次, 再孵育 DIPI(1 : 1 000) 37 ℃ 15 min, 后用 1×PBS 缓冲液洗 5 次并用水溶性封片剂封片, 最后在 FV3000 激光共聚焦显微镜(OLYMPUS, 日本)下拍照.

表 2 *xpol1a*, *xpol1b* 和 *xpo5* 探针引物序列

基因名称	上游引物(5'~3')	下游引物(3'~5')
<i>xpol1a</i>	CCTCAGCACCATGGCAACTA	TTTGAAGTCTGAGCTGGGGCAA
<i>xpol1b</i>	CCTCAGCACCATGGCAACTA	CGAGGAAGTCCCTCAGATGC
<i>xpo5</i>	TTCAGTGCAGTCAGCGTCTC	CTACAGGGCATCATTCTCGGG

3 结果与分析

3.1 Exportin 家族进化分析

通过同源比对, 本研究从代表性动物中分离 *xpos*. 在节肢动物果蝇中只分离到 4 个 *xpos* (*xpol1*, *xpo5*, *xpo6* 和 *ipol13*); 尾索动物玻璃海鞘、四足动物非洲爪蟾、壁虎、鸡、小鼠和人中, 分离到 8 个 *xpos*. 从矛尾鱼、象鲨和斑点雀鲷中分离到 9 个 *xpos*, 出现了 *xpol1* 的复制(*xpol1a* 和 *xpol1b*); 硬骨鱼中斑马拟丽鱼、大西洋鲱鱼、斑点叉尾鲷、黄颡鱼、青鳉、尼罗罗非鱼等 *xpos* 数量为 10 个, 它们既有 *xpol1* 的复制, 也有 *ipol13* 的复制(*ipol13a* 和 *ipol13b*), 但半滑舌鳎没出现 *xpol1* 和 *ipol13* 的复制. 斑马鱼和红鳍东方鲀 *xpos* 数量为 9 个, 丢失了 *xpot*. 在虹鳟和金鱼中分别分离到 24, 25 个 *xpos*, 其数量在经过第 2 轮和第 3 轮全基因组复制后变化不大, 而在经过第 4 轮基因组复制中数量显著扩张(图 1).

为了分析脊椎动物中 Exportin 家族成员的系统发育关系, 我们构建了 22 种代表动物 Exportin 家族的系统发育树, 结果显示, Exportin 家族有 8 个分支: *xpol1*, *xpo2*, *xpo4*, *xpo5*, *xpo6*, *xpo7*, *xpot* 和 *ipol13*, 其中, *xpol1* 和 *ipol13* 聚为一支, *xpot* 和 *xpo5* 聚为一支, *xpo2*, *xpo4*, *xpo6* 和 *xpo7* 聚为一支(图 2).

3.2 Exportin 家族成员表达分析

3.2.1 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼各组织中的表达

基于成体尼罗罗非鱼 8 个组织转录组数据的表达分析, 从聚类热图可以看出, *xpos* 多数在精巢和头肾中高表达, 在肝脏和肾脏中表达很低. *xpol1a* 和 *xpo2* 在精巢和头肾中表达高于其他 7 个成员, 且 *xpol1a* 在精巢中表达最高. *xpo4*, *xpo5*, *ipol13a* 和 *ipol13b* 整体表达较低, 但 *ipol13b* 在肌肉中高表达(图 3).

3.2.2 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼发育关键时期性腺中的表达

对尼罗罗非鱼性腺发育 5 个关键时期(孵化后 5, 30, 90, 180 和 300 d)的性腺转录组数据进行分析, 结果显示, 在孵化后 5 d 时, 只有 *xpol1a*, *xpol1b* 和 *xpo7* 性腺中表达水平超过了 50. 在孵化后 30 d 时, 8 个 *xpos* 表达水平都低于 50, 没有表现出性别二态性. 在孵化后 90, 180 和 300 d 时, *xpol1b*, *xpo4*, *xpo5*, *xpo6*, *xpo7*, *xpot* 和 *ipol13a* 都表现出性别二态性, *xpol1b*, *xpo5* 和 *xpot* 在 XY 尼罗罗非鱼中表达量高于 XX 尼罗罗非鱼, *xpo4*, *xpo6*, *xpo7* 和 *ipol13a* 在 XX 尼罗罗非鱼中表达量高于 XY 尼罗罗非鱼(图 4).

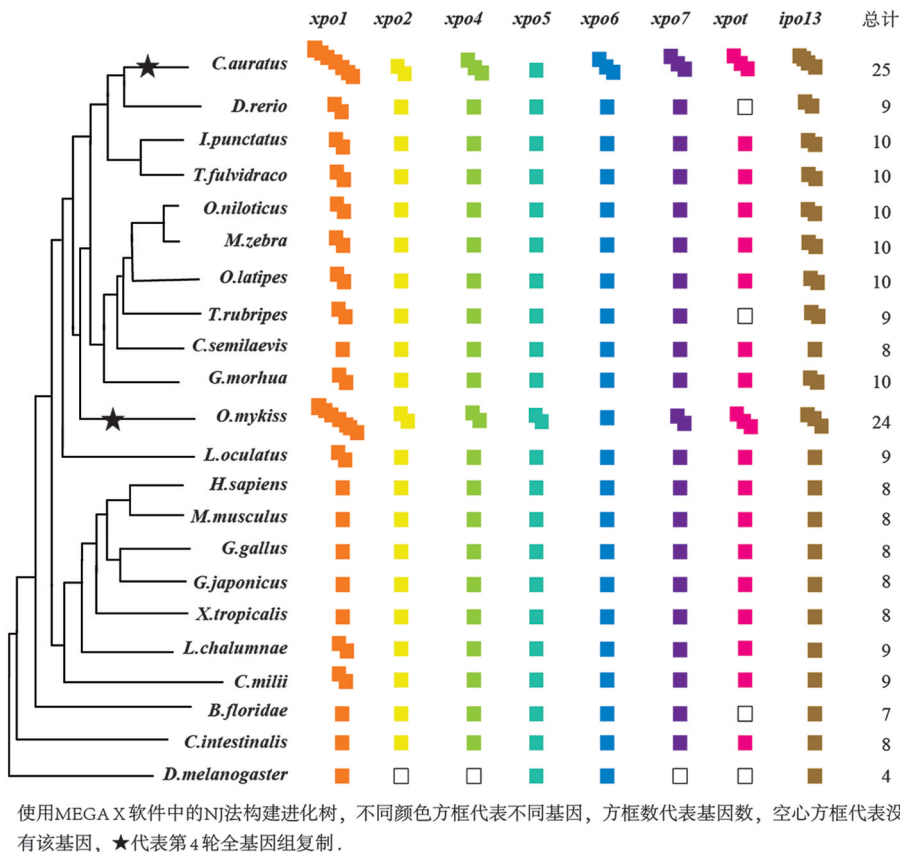
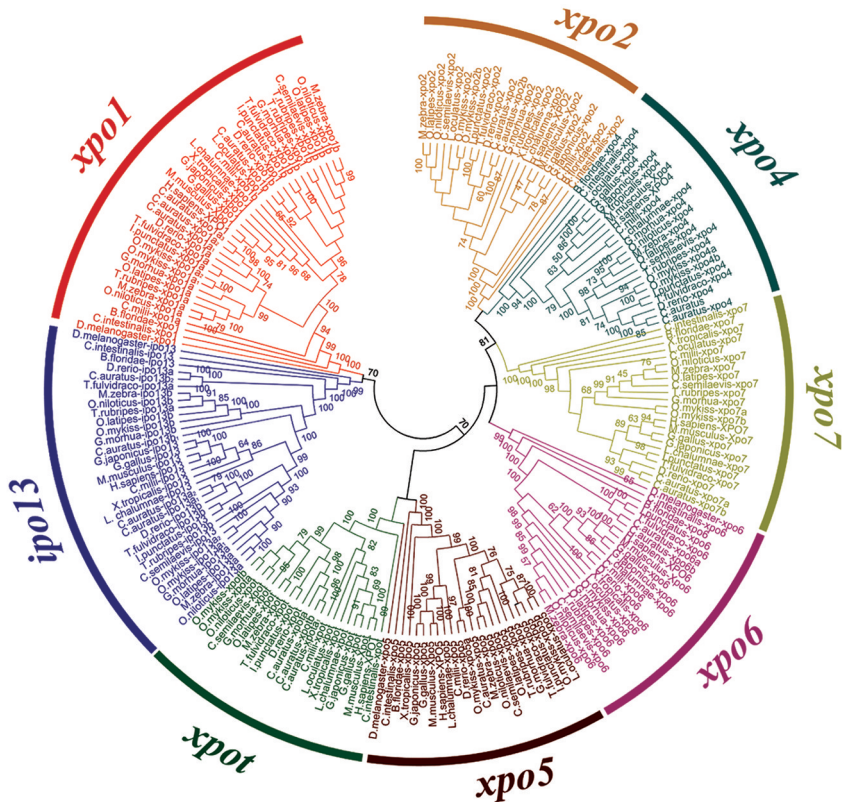


图 1 22 种代表性动物的系统发育关系及 Exportin 家族成员数量的变化



使用MEGA X 软件中的NJ法构建进化树, 自展值代表进化树的可信度, 为进化枝在计算 1000 次中出现的概率。

图 2 Exportin 家族的系统进化树

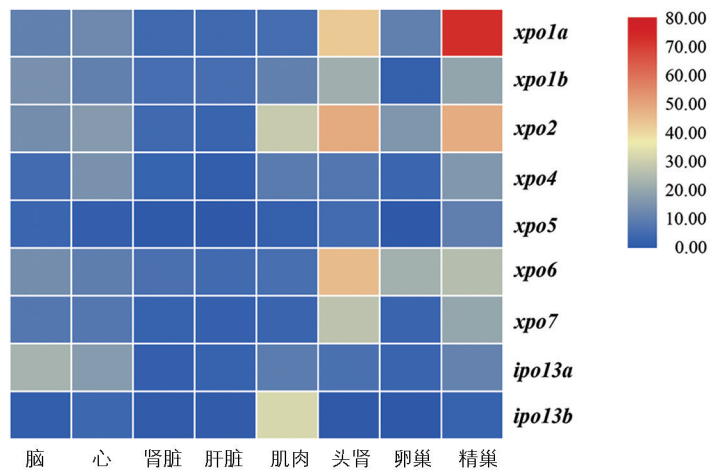


图 3 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼各组织中的表达 (FPKM)

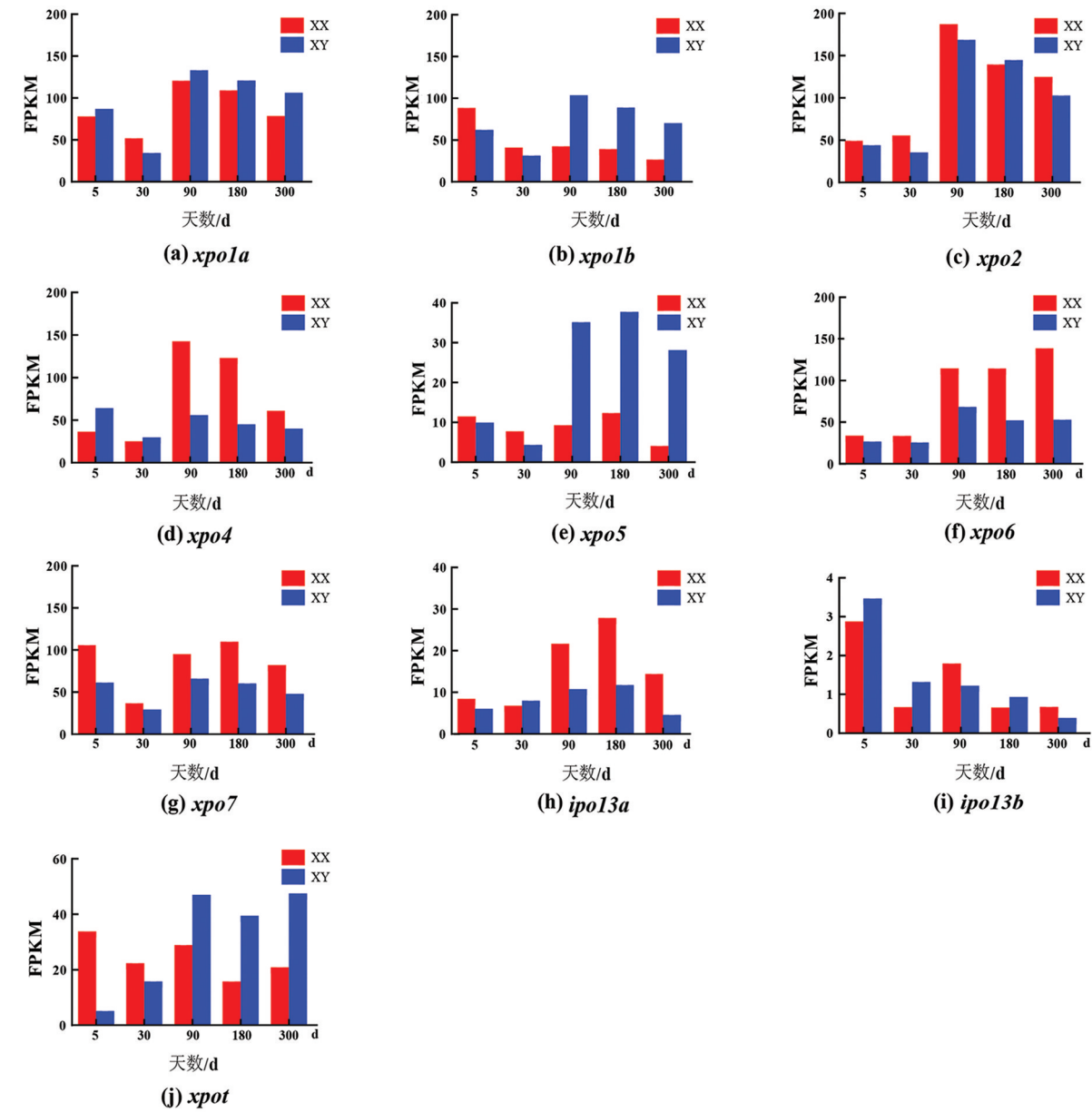
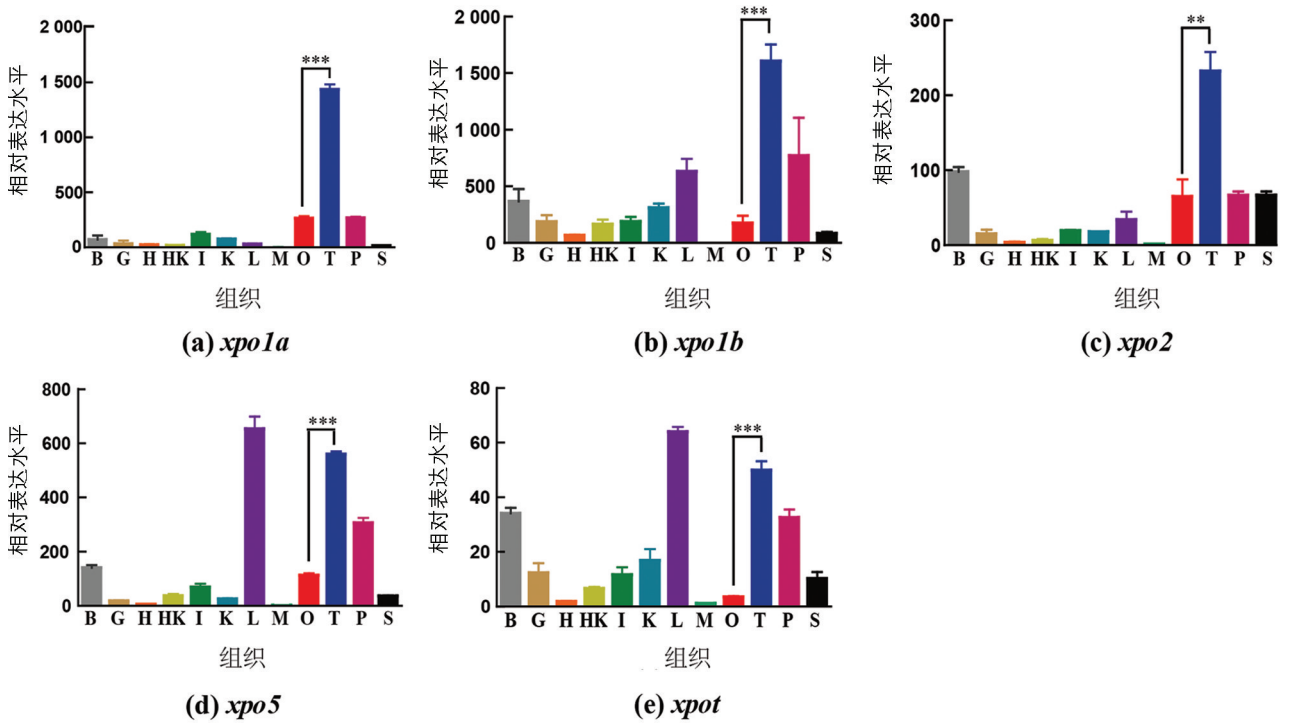


图 4 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼各时期性腺中的表达 (FPKM) 情况

3.3 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼组织中的表达模式验证

从组织和性腺时期转录组数据可以看出, *xpol1a*, *xpol1b*, *xpo2* 和 *xpo5* 总体表达较高, *xpot* 总体表达较低, 但它们都在尼罗罗非鱼精巢中表达高. 通过 qRT-PCR 对这些基因的表达进行验证, 结果显示, *xpol1a* 和 *xpol1b* 在精巢中表达最高, 且显著高于卵巢; *xpo2* 在精巢中表达最高, 其次是在脑中; *xpo5* 在精巢中表达显著高于卵巢, 在肝脏和垂体中的表达比其他组织高; *xpot* 在肝脏中表达最高, 在精巢中表达较高, 且显著高于卵巢, 在脑和垂体中的表达比其余组织高. *xpol1a*, *xpol1b*, *xpo2*, *xpo5* 和 *xpot* 在肌肉中表达低于其余组织(图 5).



*β-actin*作为内参基因, *表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义; B为脑, G为鳃, H为心脏, HK为头肾, I为肠, K为肾脏, L为肝脏, M为肌肉, O为卵巢, T为精巢, P为垂体, S为脾脏.

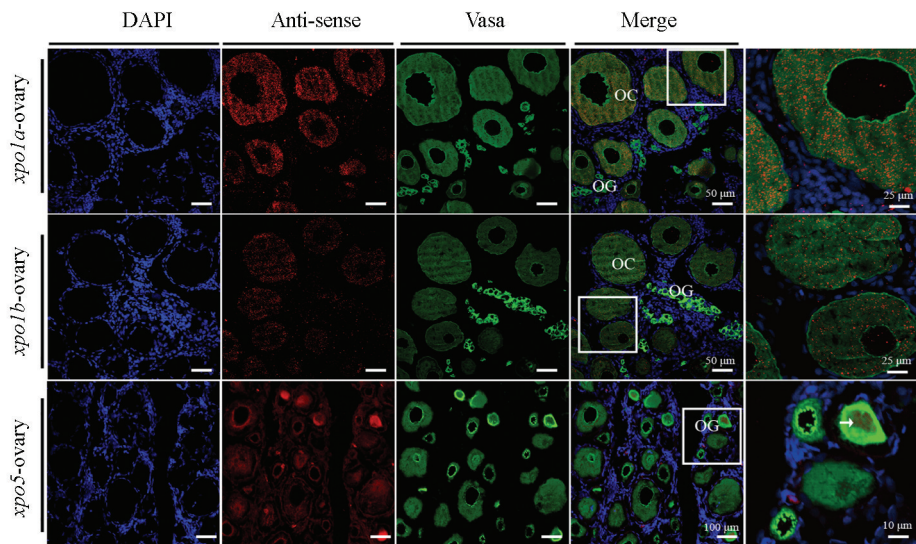
图 5 Exportin 家族成员在尼罗罗非鱼中的表达模式

3.4 *xpol1* 和 *xpo5* 在尼罗罗非鱼性腺中表达的细胞类型定位

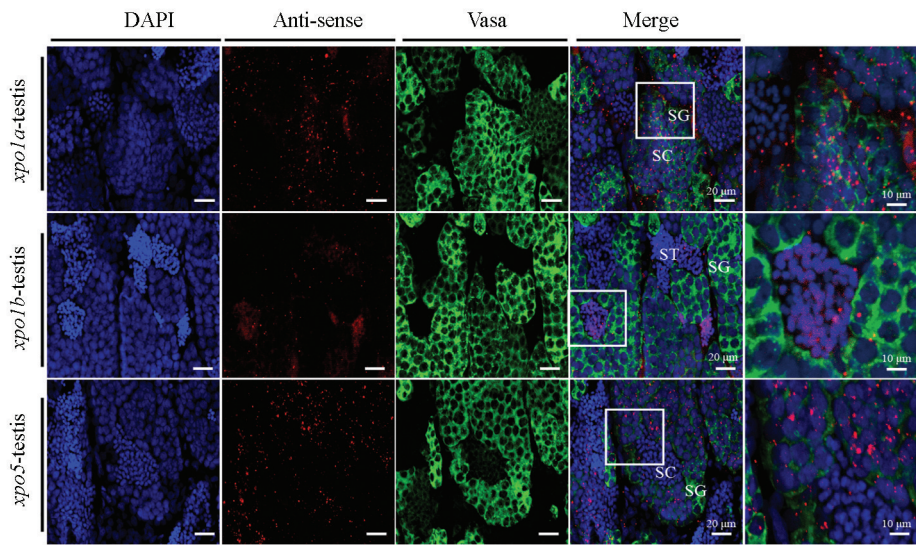
为了进一步探究 *xpol1a*, *xpol1b* 和 *xpo5* 在性腺中可能的功能, 本研究通过荧光原位杂交对尼罗罗非鱼 *xpol1a*, *xpol1b* 和 *xpo5* 基因表达的细胞类型进行定位. 结果显示, *xpol1a* 和 *xpol1b* 在卵巢中具有相似的细胞定位, *xpol1a* 和 *xpol1b* 在卵原细胞和有时相卵母细胞的细胞质中表达. *xpo5* 主要在卵原细胞以及卵母细胞中表达(图 6a), 体细胞也有表达. 精巢中, *xpol1a* 和 *xpo5* 主要在精原细胞和精母细胞中表达, *xpol1b* 主要在精细胞中表达(图 6b).

4 讨论与结论

信号分子的出核转运是多种信号通路的基础^[22], 输出蛋白(Exportins)扮演了重要的角色. 全基因组复制一般被认为是基因家族扩张的原因^[23], 本研究通过对 22 种代表物种 Exportin 家族成员的鉴定分析, 发现 Exportin 家族基因的数量在经过第 2 轮基因组复制和第 3 轮基因组复制^[24]后整体数量变化不大, 而在经过第 4 轮基因组复制^[25-26]的鱼类, 如虹鳟和金鱼数量显著扩张. 核糖体蛋白家族在脊椎动物进化中也出现了类似的扩张情况^[23], 表明输出蛋白在蛋白质调控过程中起重要作用. 我们还发现 Exportin 家族在进化过程中出现了部分基因的复制和缺失, 本研究中 *xpol1* 最先在象鲨中出现复制, 表



(a) *xpo1a*, *xpo1b*和*xpo5*在罗非鱼卵巢中的细胞定位



(b) *xpo1a*, *xpo1b*和*xpo5*在罗非鱼精巢中的细胞定位

白色方框为选中放大区域；蓝色为DAPI信号，标记细胞核；绿色为Vasa 信号，标记生殖细胞；红色为 Anti-sense 信号，标记所探究基因的表达。OG为卵原细胞，OC为卵母细胞，SG为精原细胞，SC为精母细胞，ST为精细胞。

图 6 *xpo1a*, *xpo1b* 和 *xpo5* 在孵化后 180 d 尼罗罗非鱼性腺中的细胞定位

明 *xpol* 作为最主要的输出蛋白，在核转运中扮演重要角色^[27]。在硬骨鱼中由于第 3 轮基因组复制，出现了 *ipol3* 的复制，但半滑舌鳎的 *xpol* 和 *ipol3* 都没有产生复制，可能是由于发生了次生性丢失或者基因组测序和组装不完整。斑马鱼和红鳍东方鲀丢失了 *xpot*，有研究报道，斑马鱼较其他硬骨鱼更容易出现重复基因的丢失^[28]，红鳍东方鲀的基因组小且紧密可能是 *xpot* 丢失的主要原因^[29]。 *xpot* 与 *xpo5* 在四足动物、斑马鱼和果蝇中分别聚在一起^[6]，也有研究报道在人、海葵、大豆疫霉菌和拟南芥中 *xpo2* 与其他转运蛋白聚在一起， *xpo4* 和 *xpo7* 聚为一支， *xpo6* 单独一支^[5]。血吸虫中输出蛋白 *xpol*， *xpot* 和 *xpo5* 聚为一支^[30]。我们通过 Exportin 家族系统进化分析发现， *xpo1* 和 *ipol3* 聚为一支， *xpot* 和 *xpo5* 聚为一支， *xpo2*， *xpo4*， *xpo6* 和 *xpo7* 聚为一支。

输出蛋白通过运输的调节可能影响动物生殖。 *xpol* 核运输的调节对哺乳动物生发泡的维持和卵母细胞减数分裂的恢复有重要作用^[31]。小鼠中， *xpol* 在卵母细胞整个发育过程中都有表达，且主要在细胞质

中表达^[32]. 与此一致的是, 本研究发现 *xpo1a* 和 *xpo1b* 主要在尼罗罗非鱼卵原细胞、卵母细胞的细胞质中表达, 表明 *xpo1* 在卵子发生中可能有重要作用. 此外, *xpo1a* 和 *xpo1b* 在尼罗罗非鱼精巢生殖细胞中表达, 且在精巢中的表达高于卵巢, 表明 *xpo1* 可能在精子发生中也有作用, 有待进一步功能研究. 众所周知, miRNAs 广泛参与动物生殖调控^[33], 而 *xpo5* 对 miRNA 转运出核和成熟至关重要^[34]. *xpo5* 在卵原细胞、卵母细胞和体细胞中表达, 说明 *xpo5* 对 miRNA 调控广泛存在. 在三疣梭子蟹中, *xpo5* 的表达随着卵巢发育逐渐升高, 在精巢中表达高于其他组织, 说明 *xpo5* 可能通过调控 miRNA 合成来影响其性腺发育^[35]. *xpo5* 在尼罗罗非鱼精巢中的表达比卵巢高, 这与三疣梭子蟹表达一致.

本研究系统分析了输出蛋白在脊椎动物中的进化, 探究了其在尼罗罗非鱼性腺中的表达模式, 为进一步研究输出蛋白在脊椎动物生殖发育中的作用奠定了基础.

参考文献:

- [1] CHOOK Y M, SÜEL K E. Nuclear Import by Karyopherin- β s: Recognition and Inhibition [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1813(9): 1593-1606.
- [2] MUQBIL I, BAO B, ABOU-SAMRA A B, et al. Nuclear Export Mediated Regulation of microRNAs: Potential Target for Drug Intervention [J]. *Current Drug Targets*, 2013, 14(10): 1094-1100.
- [3] ULLMAN K S, POWERS M A, FORBES D J. Nuclear Export Receptors: From Importin to Exportin [J]. *Cell*, 1997, 90(6): 967-970.
- [4] GÜTTLER T, GÖRLICH D. Ran-dependent Nuclear Export Mediators: A Structural Perspective [J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(17): 3457-3474.
- [5] O'REILLY A J, DACKS J B, FIELD M C. Evolution of the Karyopherin- β Family of Nucleocytoplasmic Transport Factors: Ancient Origins and Continued Specialization [J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19308.
- [6] QUAN Y, JI Z L, WANG X, et al. Evolutionary and Transcriptional Analysis of Karyopherin Beta Superfamily Proteins [J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2008, 7(7): 1254-1269.
- [7] AZMI A S, UDDIN M H, MOHAMMAD R M. The Nuclear Export Protein XPO1-from Biology to Targeted Therapy [J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2021, 18(3): 152-169.
- [8] FORNEROD M, OHNO M, YOSHIDA M, et al. CRM1 is an Export Receptor for Leucine-rich Nuclear Export Signals [J]. *Cell*, 1997, 90(6): 1051-1060.
- [9] JAILLARD S, BELL K, AKLOUL L, et al. New Insights into the Genetic Basis of Premature Ovarian Insufficiency: Novel Causative Variants and Candidate Genes Revealed by Genomic Sequencing [J]. *Maturitas*, 2020, 141: 9-19.
- [10] KUTAY U, BISCHOFF F R, KOSTKA S, et al. Export of Importin Alpha from the Nucleus is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor [J]. *Cell*, 1997, 90(6): 1061-1071.
- [11] KUTAY U, LIPOWSKY G, IZAURRALDE E, et al. Identification of a tRNA-specific Nuclear Export Receptor [J]. *Molecular Cell*, 1998, 1(3): 359-369.
- [12] LIPOWSKY G, BISCHOFF F R, SCHWARZMAIER P, et al. Exportin 4: a Mediator of a Novel Nuclear Export Pathway in Higher Eukaryotes [J]. *EMBO Journal*, 2000, 19(16): 4362-4371.
- [13] KIM V N. MicroRNA Precursors in Motion: Exportin-5 Mediates Their Nuclear Export [J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(4): 156-159.
- [14] BROWNAWELL A M, MACARA I G. Exportin-5, a Novel Karyopherin, Mediates Nuclear Export of Double-stranded RNA Binding Proteins [J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 156(1): 53-64.
- [15] STÜVEN T, HARTMANN E, GÖRLICH D. Exportin 6: a Novel Nuclear Export Receptor that is Specific for Profilin, actin Complexes [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(21): 5928-5940.
- [16] MINGOT J M, BOHNSACK M T, JÄKLE U, et al. Exportin 7 Defines a Novel General Nuclear Export Pathway [J]. *EMBO Journal*, 2004, 23(16): 3227-3236.

- [17] MINGOT J M, KOSTKA S, KRAFT R, et al. Importin 13: a Novel Mediator of Nuclear Import and Export [J]. EMBO Journal, 2001, 20(14): 3685-3694.
- [18] CONTE M A, GAMMERDINGER W J, BARTIE K L, et al. A High Quality Assembly of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Genome Reveals the Structure of Two Sex Determination Regions [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 341.
- [19] TAO W J, CHEN J L, TAN D J, et al. Transcriptome Display during Tilapia Sex Determination and Differentiation as Revealed by RNA-Seq Analysis [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 363.
- [20] BRAWAND D, WAGNER C E, LI Y I, et al. The Genomic Substrate for Adaptive Radiation in African Cichlid Fish [J]. Nature, 2014, 513(7518): 375-381.
- [21] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [22] 迟斌凯, 王可, 范静, 等. mRNA 的出核转运 [J]. 生命的化学, 2014, 34(4): 442-448.
- [23] KUANG G Q, TAO W J, ZHENG S Q, et al. Genome-wide Identification, Evolution and Expression of the Complete Set of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in Nile Tilapia [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1230.
- [24] MEYER A, VAN DE PEER Y. From 2R to 3R: Evidence for a Fish-specific Genome Duplication (FSGD) [J]. BioEssays, 2005, 27(9): 937-945.
- [25] BERTHELOT C, BRUNET F, CHALOPIN D, et al. The Rainbow Trout Genome Provides Novel Insights into Evolution after Whole-genome Duplication in Vertebrates [J]. Nature Communications, 2014, 5: 3657.
- [26] XU P, ZHANG X F, WANG X M, et al. Genome Sequence and Genetic Diversity of the Common Carp, *Cyprinus Carpio* [J]. Nature Genetics, 2014, 46(11): 1212-1219.
- [27] AZIZIAN N G, LI Y L. XPO1-dependent Nuclear Export as a Target for Cancer Therapy [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2020, 13(1): 1-9.
- [28] ALSOP D, VIJAYAN M. The Zebrafish Stress Axis: Molecular Fallout from the Teleost-specific Genome Duplication Event [J]. General and Comparative Endocrinology, 2009, 161(1): 62-66.
- [29] APARICIO S, CHAPMAN J, STUPKA E, et al. Whole-genome Shotgun Assembly and Analysis of the Genome of *Fugu rubripes* [J]. Science, 2002, 297(5585): 1301-1310.
- [30] ABREUF C P, PEREIRA R V, OLIVEIRA V F, et al. Characterization of Export Receptor Exportins (XPOs) in the Parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitology Research, 2013, 112(12): 4151-4159.
- [31] ONUMA A, FUJIOKA Y A, FUJII W, et al. Effects of Exportin 1 on Nuclear Transport and Meiotic Resumption in Porcine Full-grown and Growing Oocytes [J]. Biology of Reproduction, 2018, 98(4): 501-509.
- [32] MIHALAS B P, WESTERN P S, LOVELAND K L, et al. Changing Expression and Subcellular Distribution of Karyopherins during Murine Oogenesis [J]. Reproduction, 2015, 150(6): 485-496.
- [33] XIU Y J, LU Y R, LIU X F, et al. Full-length Transcriptome Sequencing from Multiple Immune-Related Tissues of *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 930-937.
- [34] LI C J, CHEN S X, LI H J, et al. MicroRNA-16 Modulates Melatonin-induced Cell Growth in the Mouse-derived Spermatogonia Cell Line GC-1 Spg Cells by Targeting Ccnd1 [J]. Biology of Reproduction, 2016, 95(3): 1-10.
- [35] ZHANG X, MENG X, GAO B, et al. Molecular Cloning of Drosha and Exportin 5 and Their Expression During Gonadal Development in the Swimming Crab (*Portunus trituberculatus*) [J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 126-136.