

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2019.06.010

尼罗罗非鱼雌性性腺关键 LncRNA 的鉴定和表达分析^①

彭 锬^{1,2}, 宋凌云^{1,2}, 乔栖梧³, 林艳华⁴

1. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715; 2. 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;
3. 肇庆海关综合技术中心, 广东 肇庆 526040; 4. 西南大学 附属中学, 重庆 400715

摘要: 生殖细胞的分化与发育是硬骨鱼类性别分化的重要环节, 并受到遗传和环境 2 个因素的影响. 为研究 LncRNA 在硬骨鱼类卵母细胞发育以及性别分化中的作用, 课题组通过转录组测序获得了尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 雌、雄性腺中呈现差异表达的 LncRNA, 并选取 LncRNA (TCONS_02477925) 开展研究. 发现该 LncRNA 具有 2 个外显子, 属于典型的基因间 LncRNA (Intergenic LncRNA), 转录本全长 1 537 nt, 基因组定位于 19 号连锁群 (Linkage Group 19, LG19) 上, 并且该基因在卵巢的表达水平显著高于精巢. 荧光原位杂交结果表明, 该 LncRNA 主要表达在 I 和 II 时相的卵母细胞的细胞质中. 转录组测序结果及生物信息学分析发现, *qrs1l* 和 *rtn4ip1* 可能是该 LncRNA 的 *cis* 靶基因, 并且 2 个靶基因在卵巢中表达丰度较高. 因此, 本研究表明该 LncRNA 在罗非鱼卵母细胞发育和性别分化中可能有重要的作用.

关键词: 尼罗罗非鱼; LncRNA; 卵母细胞; 性别决定与分化

中图分类号: Q174

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2019)06-0040-06

性别决定与分化作为基本的生物学问题之一, 一直以来都是生命科学领域的研究重点. 脊椎动物性别决定与分化方式既具有保守性, 同时又在进化过程中呈现出多样性. 现普遍认为脊椎动物的性别决定方式分为遗传性别决定 (GSD) 和环境性别决定 (ESD). 在哺乳类中, 大多数物种属于遗传性别决定, 其性别决定系统是 XX/XY 型. 1990 年, 哺乳类的性别总开关 SRY 基因的发现是性别决定领域的重大突破^[1]. 鸟类的性别决定系统是 ZZ/ZW 型, 在 Z 染色体上特异存在一个 *Dmrt1* 基因, 含有保守的 DM 结构域^[2], 已有的研究结果暗示 Z 染色体上的 *Dmrt1* 基因很有可能就是鸟类的性别决定基因^[3]. 爬行类动物普遍被认为有 GSD 和 ESD 2 种性别决定方式. 但其性别决定的具体机制尚不清楚, 并且至今未找到性别决定基因. 在两栖动物中也有 GSD 和 ESD 2 种性别决定方式, 不过两栖动物的染色体组成非常复杂^[4]. 在非洲爪蟾中发现的 W 染色体连锁基因 *DMW* 是在两栖类动物中发现的首个性别决定候选基因^[5]. 与其它脊椎动物相比, 鱼类的性别决定更为复杂. 对超过 2 000 种硬骨鱼类作过的性染色体组型的分析发现, 仅有 72 种被认定有性染色体^[6]. 硬骨鱼的性染色体组成方式多样, 既有 XX/XY 型, 也具有 ZZ/ZW 型, 还有一些鱼类对于这 2 种性别决定系统兼而有之^[7]. 在鱼类的性别决定系统中, 环境因素对于鱼类的性别决定也有调控作用, 包括 pH 值、群体结构、温度等. 同时, 外源激素也可以引起鱼类的性逆转, 比如外源性的雌激素可以完全诱导雄性尼罗罗非鱼性逆转为功能性的雌性尼罗罗非鱼^[8]. 正是由于鱼类性别决定的原始性和多样性, 使得其性别决定与分化的机制变得更为复杂, 但也更具有研究意义.

① 收稿日期: 2018-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772825).

作者简介: 彭 锬(1994-), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类内分泌学的研究.

通信作者: 林艳华, 高级教师.

生殖细胞的分化方向并不是依靠性染色体本身, 而是依靠其所处的环境. 如雄性生殖细胞可以在雌性的性腺中被诱导成卵母细胞, 同时雌性生殖细胞也可以在雄性的性腺中被诱导为前精原细胞, 这种现象在低等脊椎动物中更常见, 尤其是鱼类^[9]. 在斑马鱼的性腺发育过程中, 早期先发育为卵巢样组织, 该组织具有发育为精巢或者卵巢的双向潜能, 若卵巢样组织中的卵母细胞凋亡, 则会性逆转为精巢. 如果在斑马鱼中敲降早期生殖细胞标记基因 DND(Dead end)可以导致雄性不育. 此外, 在罗非鱼中, 雌性生殖细胞的丢失会使性腺雄性化^[10]. 在青鳉中, 生殖细胞的缺失会导致由雌向雄的性逆转^[11-12]. 综上所述, 生殖细胞在鱼类性别决定与分化中发挥着非常重要的作用.

长链非编码 RNA(Long non-coding RNA, LncRNA)是一类长度大于 200 个核苷酸、无编码蛋白质功能的 RNA 分子^[13]. 很长一段时间内, LncRNA 被当做转录噪声, 随着测序技术以及生物信息学的发展, 它的生物学功能才逐渐被了解, 比如剪接调控、转录激活、染色质重构、X 染色体失活等^[14]. 与蛋白编码基因相比, LncRNA 表现出更明显的组织特异性^[15]. 在鸡的卵母细胞发育过程中, 人们发现有一系列特异表达的 LncRNA, 但这些特异的 LncRNA 是否与卵母细胞的分化以及发育有关, 现在并不清楚^[16]. 到目前为止, 还没有关于 LncRNA 在硬骨鱼类卵母细胞分化以及发育过程中的作用报道.

本研究采用尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)作为研究对象, 通过二代高通量测序技术, 筛选出在雌、雄性腺中呈现出差异表达的 LncRNA. 采用生物信息学、Real-time PCR 和原位杂交技术研究其在硬骨鱼类卵母细胞分化与发育过程中的作用. 在研究硬骨鱼类生殖细胞分化与发育方面, 尼罗罗非鱼具有其他硬骨鱼类不可比拟的优点, 其性成熟时间短, 产卵周期为 14 天, 易于获得全雌和全雄鱼苗. 罗非鱼是世界性的养殖鱼类, 是联合国粮农组织向世界各国推荐的优良养殖对象, 雄鱼比雌鱼生长速度快约 50%, 全雄鱼养殖具有更好的经济价值^[17]. 因此, 通过研究非编码 RNA 在硬骨鱼类卵母细胞分化与发育中的作用, 可以加深我们对于硬骨鱼类性别决定与分化的理解, 为性控育种提供理论基础, 并更好地服务于水产养殖业.

1 材料和方法

1.1 实验鱼

尼罗罗非鱼全雌♀(XX)鱼苗由正常雌鱼♀(XX)的卵子与性逆转假雄鱼♂(XX)的精子通过人工授精获得. 全雄♂(XY)鱼苗由正常雌鱼(XX)♀的卵子与超雄鱼♂(YY)的精子通过人工授精后得到, 受精卵置于孵化器中, 在 26 °C 循环水孵化系统中孵化. 孵化后的尼罗罗非鱼饲养于 26 °C 循环水系统中, 光照时间与自然光周期保持一致.

1.2 实验方法

1.2.1 LncRNA 测序及其靶基因的生物信息学分析

分别提取孵化后 4 个月的罗非鱼精巢和卵巢的 RNA, 委托诺禾致源生物信息科技有限公司进行转录组测序, 筛选到一系列具有明显性别二态性的 LncRNA. 以其中一个 LncRNA (TCONS_02477925)为例, 初步研究非编码 RNA 在硬骨鱼类卵母细胞发育及性别分化过程中的作用. 将获得的 TCONS_02477925 序列输入 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 通过序列比对分析, 将 LncRNA 序列定位于罗非鱼基因组(版本为 Jan. 2011(Broad oreNil1.1/oreNil2))上, 分析此基因具有的外显子数目及其染色体定位, 确定 TCONS_02477925 作用的靶基因, 最后通过分析靶基因在罗非鱼各组织中的表达预测对应的 LncRNA 可能具有的功能.

1.2.2 雌、雄性腺中 TCONS_02477925 的转录组分析及 Real-time PCR 验证

以 LncRNA 在雌、雄性腺中的 FPKM(每百万测序碱基中每千个转录子测序碱基中所包含的测序片断数, 是目前最为常用的基因表达水平的估算方法)的比值为依据, 设定比值大于 2 即为有显著的性别二态性. 进一步采用 Real-time PCR 的方法验证该 LncRNA 在雌、雄性腺中的表达模式. 其中 LncRNA 逆转录合成 cDNA 的步骤参照 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 大连)使用说明书. 扩增方法按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Perfect Real-Time)实验手册进行. 反应条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 20 s, 重复 40 个循环. 以 β -actin 为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算得出相对表达水平.

表 1 引物设计表

基因	引物	序列(5'-3')	备注
TCONS_02477925	F1	GACTCGTGGAGGTGATCCTG	Real-time PCR
	R1	GTTTTGGTCCCGAGGCAGTT	
	M13F	TGTAACACGACGCCAGT	
	F2	CTGTAACACATTTGGGACT	原位杂交
	R2	TGGTCATTGATGAGGGTT	
<i>βactin</i>	F	GGCATCACACCTTCTACAACGA	内参基因
	R	ACGCTCTGTCAGGATCTTCA	

1.2.3 荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)

1) 探针的制备. 以 F2, R2 为上下游引物, 以上述逆转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 循环 36 圈, 72 °C 延伸 7 min. 目的片段的回收纯化步骤参照 BioSpin Gel Extraction Kit (Bioflux, 杭州) 的操作说明书进行. 然后将回收后的 PCR 产物与 pGEM-T easy 克隆载体进行连接, 并进行亚克隆扩大培养和测序验证. 以测序验证后的质粒为模板, 用通用引物 M13F 和 F2 进行 PCR 扩增, 扩增参数: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 循环 36 圈; 72 °C 延伸 7min, 12 °C 保存. 最后电泳, 切胶回收. 以回收的 DNA 为模板, 采用 MEGAscript™ T7 Transcription Kit(美国, 赛默飞公司)体外转录出探针, 放置于 -80 °C 备用.

2) FISH 步骤. 预处理: ①固定. 将所取材料放在 4% 多聚甲醛中, 在室温放置 2~3 h. ②脱水. 将固定好的材料依次放入梯度酒精中脱水. ③包埋. 二甲苯透明(30 min×3, 具体视材料而定, 直至材料完全透明为止); 石蜡浸润(30 min×3). ④切片和展片. 组织切片厚度为 5 μm, 用无酶水展片, 置于 37 °C 烘片机上干燥过夜.

脱蜡: ①将预先处理好的石蜡切片进行二甲苯脱蜡. ②梯度酒精复水.

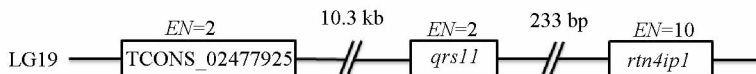
蛋白酶 K 处理: ①每个染色缸 40 mL 蛋白酶 K 消化溶液. ②37 °C 水浴槽中预热染色缸和蛋白酶 K 溶液 20 min. ③1XSSC 在室温下漂洗. ④梯度酒精脱水.

变性: ①每一个立式染色缸配置 40 mL 变性溶液. ②80 °C 水浴槽中平衡预热混合液染色缸. ③80 °C 孵育 8 min.

杂交: ①准备探针. ②加 10 μL 探针在组织切片上, 加盖玻片. ③43 °C 预热杂交后水洗切片 15 min. ④60 °C 孵育 12~16 h. ⑤2xSSC 漂洗. ⑥从 1XPBS 中取出切片, 每张切片加入 60 μL 抗地高辛抗体, 加盖塑料膜孵育 20 min. ⑦1XPBS 室温下洗 3 次, 每次 2 min; 细胞核染色, 拍照观察.

2 结 果

本研究发现, LncRNA(TCONS_02477925)基因定位于 LG19 上, 具有 2 个外显子, 其转录本全长为 1 537 nt (图 1). 生物信息学预测发现, *qrs11* 和 *rtn4ip1* 分别位于 TCONS_02477925 下游 10.3K 和 10.5K 位置的 2 个基因座上. 因此上述 2 个基因可能是该 LncRNA 的 *cis* 靶基因, 并且 *qrs11* 和 *rtn4ip1* 都位于 LG19 上. *qrs11* 具有 12 个外显子, 转录本全长为 1 735 nt, 而 *rtn4ip1* 具有 10 个外显子, 转录本全长为 1 666 bp(图 1).



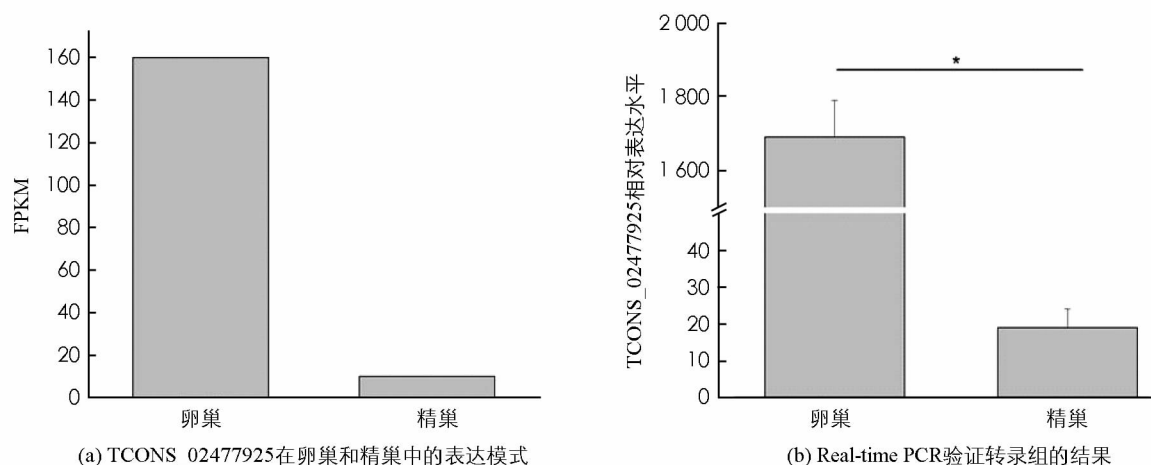
注: 该基因及其靶基因均位于 19 号连锁群, LG19(Link Group 19); EN(Exon Number), 外显子数目;

斜杠上面的数字表示 2 个基因间的距离.

图 1 LncRNA 及其靶基因在染色体上的位置关系

转录组的结果表明, 卵巢中 TCONS_02477925 的表达水平远高于精巢(图 2-a). Real-time PCR 数据进一步表明, 该基因在卵巢中的表达水平显著高于精巢(图 2-b), 暗示该 LncRNA 可能在卵巢分化和功能维系中发挥重要作用. 荧光原位杂交结果显示, TCONS_02477925 仅在卵巢中表达, 并且主要表达在 I-II 时相的卵母细胞的细胞质中(图 3), 在精巢中未检测到表达(未展示).

TCONS_02477925 的 *cis* 靶基因之一 *qrs11* (glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A, 编码谷氨酰胺转移酶, 作用是参与谷氨酰胺与 tRNA 的结合反应), 依据本实验室测得的罗非鱼不同组织转录组数据发现, 虽然 *qrs11* 在罗非鱼中是一个泛表达的基因, 但在卵巢中的表达水平远远高于其它组织 (图 4)。TCONS_02477925 的另一个靶基因 *rtn4ip1* (reticulon 4 interacting protein 1, 编码一种线粒体蛋白质) 参与细胞内吞噬和胞吐作用、血管重建, 以及 β 肽加工和分泌调控等功能^[18]。从转录组数据中发现 *rtn4ip1* 在肾、卵巢和精巢中的表达水平都比较高, 在其它组织中的表达水平相对较低 (图 5)。这些数据初步表明, LncRNA 可能是通过作用于上述靶基因影响卵母细胞的发育从而影响鱼类的性别分化。



* 表示显著性差异, $p < 0.05$ 。

图 2 TCONS_02477925 在性腺的转录组表达水平及其实验验证

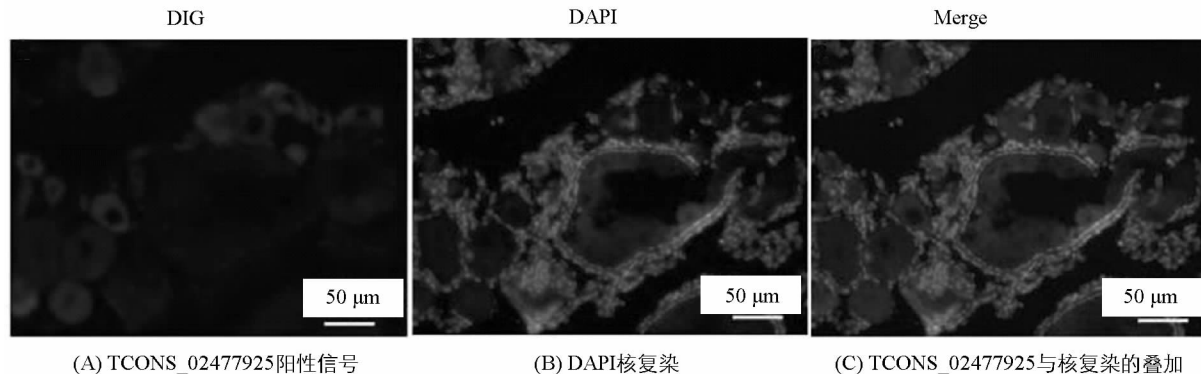


图 3 荧光原位杂交结果显示 TCONS_02477925 在卵巢中的表达

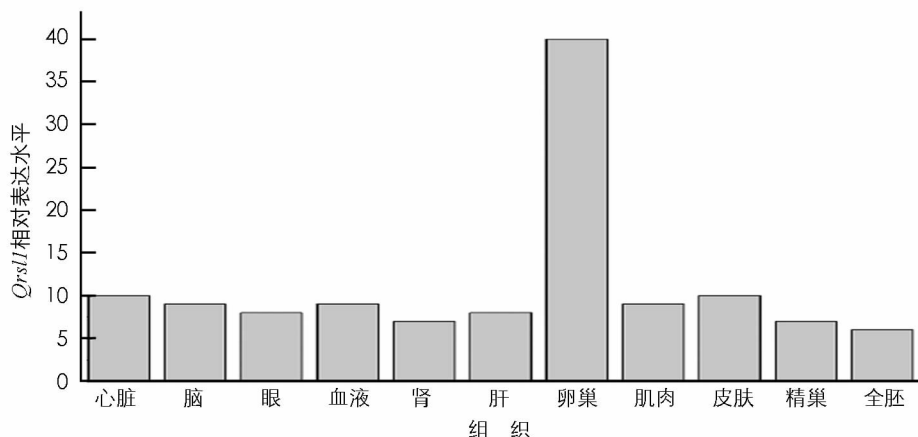


图 4 *Qrs11* 在罗非鱼不同组织中的转录水平表达模式

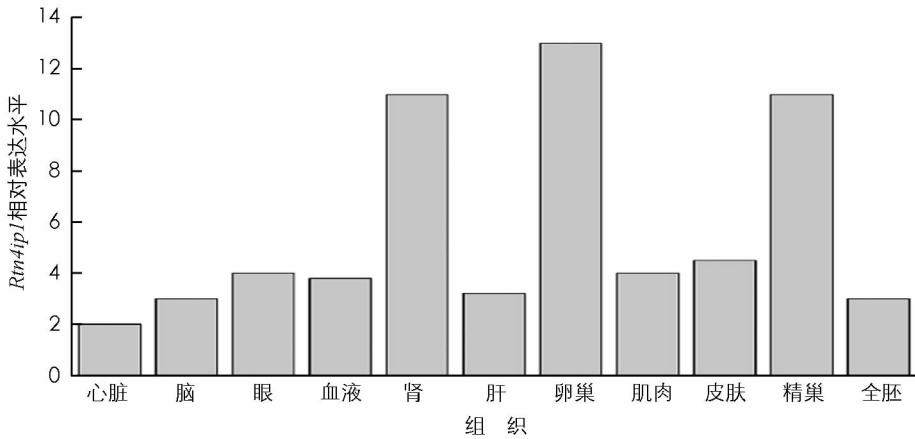


图 5 *Rtn4ip1* 在罗非鱼不同组织中的转录水平表达模式

3 讨 论

近年来,随着高通量测序技术的发展,转录组测序技术打破了传统的单基因研究模式,在性别决定与分化研究领域得到了广泛应用.在哺乳动物的卵子发生过程中,对卵丘细胞、卵丘卵母细胞复合体测序结果发现了大量差异表达的 LncRNA.同时,在减数分裂过程中,LncRNA 在精母细胞中大量表达^[19].有报道显示,LncRNA 对雌性黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)发育的性别致死基因具有一定的调控作用.多方面研究表明,LncRNA 对于脊椎动物的性别决定和性腺发育有着重要作用^[20].本课题组采用转录组测序,在罗非鱼雌、雄性腺获得了一系列高水平表达的 LncRNA 基因.其中 TCONS_02477925 在卵巢中的表达水平要远高于精巢中的表达水平.同时,TCONS_02477925 的 *cis* 靶基因 *qrs11* 和 *rtn4ip1* 在卵巢中高表达,这暗示着 TCONS_02477925 可能是通过调控 *qrs11* 和 *rtn4ip1* 的表达从而调控卵母细胞的生长.后期,本课题组将通过分别敲除 TCONS_02477925(TCONS_02477925),及其靶基因 *qrs11* 和 *rtn4ip1*,进而研究 TCONS_02477925 及这 2 个靶基因在罗非鱼卵母细胞发育以及性别分化中的作用.

参考文献:

- [1] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry [J]. *Nature*, 1991, 351(6322): 117-121.
- [2] NANDA I, SHAN Z, SCHARTL M, et al. 300 Million Years of Conserved Synteny Between Chicken Z and Human Chromosome 9 [J]. *Nature Genetics*, 1999, 21(3): 258-259.
- [3] SHAN Z, NANDA I, WANG Y, et al. Sex-specific Expression of an Evolutionarily Conserved Male Regulatory Gene, DMRT1, in Birds [J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2000, 89(34): 252-257.
- [4] SCHMID M, STEINLEIN C. Sex chromosomes, Sex-linked Genes, and Sex Determination in the Vertebrate Class Amphibia [J]. *Birkhäuser Basel*, 2001, 91(91): 143-176.
- [5] UNO Y, NISHIDA C, YOSHIMOTO S, et al. Diversity in the Origins of Sex Chromosomes in Anurans inferred From Comparative Mapping of Sexual Differentiation Genes for Three Species of the Raninae and Xenopodinae [J]. *Chromosome research*, 2008, 16(7): 999-1011.
- [6] DEVLIN R H, NAGAHAMA Y. Sex Determination and Sex Differentiation in Fish: an Overview of Genetic, Physiological, and Environmental Influences [J]. *Aquaculture*, 2002, 208(3-4): 191-364.
- [7] CAPEL B. Vertebrate Sex Determination: Evolutionary Plasticity of a Fundamental Switch [J]. *Nature Reviews Genetics* volume, 2017, 18(11): 675-689.
- [8] SUN L N, JIANG X L, WANG D S, et al. Transdifferentiation of Differentiated Ovary into Functional Testis by Long-Term Treatment of Aromatase Inhibitor in Nile Tilapia [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(4): 1476-1488.
- [9] 魏焯昕. 哺乳动物生殖细胞的性别决定 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(14): 8083-8085.
- [10] SIEGFRIED K R, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Germ Line Control of Female Sex Determination in Zebrafish [J]. *Dev*

Biol, 2008, 324(2): 277-287.

- [11] 邹芝英, 杨 弘, 李大宇. 罗非鱼性别决定和分化机制的研究进展 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 139-145.
- [12] KUROKAWA H, SAITO D, NAKAMURA S, et al. Germ Cells Are Essential for Sexual Dimorphism in the Medaka Gonad [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(43): 16958-16963.
- [13] 孙 磊, 张 林, 刘 辉. 基于 RNA-Seq 的长非编码 RNA 预测 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(12): 1156-1166.
- [14] 刘志宇, 曹 安, 蒋林树, 等. 长链非编码 RNA(lncRNA)生物学功能及其调控机制 [J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(8): 1419-1430.
- [15] 朱 雯, 王朝霞. 长链非编码 RNA 与肿瘤研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(8): 330-342.
- [16] 程少泽. 调控鸡生殖干细胞分化的 lncRNA 筛选及 PGClnc1 功能机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [17] QIU Y X, SUN S H, CHARKRABORTY T, et al. Figla Favors Ovarian Differentiation by Antagonizing Spermatogenesis in a Teleosts, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. PLoS One, 2015, 10(4): 0123900.
- [18] ELECTRON KEBEBEW. RTN4IP1 Is Down-Regulated in Thyroid Cancer and Has Tumor-Suppressive Function [J]. J Clin Endocrinol Metab, March 2013, 98(3): 446-454.
- [19] 蔡 欣. LncRNA 在哺乳动物精子发生中的功能研究进展 [EB/OL]. (2016-11-29)[2018-09-30]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1193.Q.20161129.1559.018.html>.
- [20] 贺小云, 狄 冉, 胡文萍, 等. 动物繁殖相关 LncRNA 的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(9): 1749-1756.

Identification and Expression Analysis of a Key LncRNA in the Gonads of Female Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*)

PENG Kun^{1,2}, SONG Ling-yun^{1,2}, QIAO Xi-wu³, LIN Yan-hua⁴

1. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fish Resources and Reproductive Development, Ministry of Education, Chongqing 400715, China;

3. Technology Center of Zhaoqing Customs District, Zhaoqing Guangdong 526040, China;

4. Affiliated High School of Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The differentiation and development of germ cells in teleosts are important for the sex differentiation, which is regulated by many factors, including genetic factors and environmental factors. More and more studies show that non-coding RNAs play an important role in gonad development. Through transcriptome sequencing, hundreds of sexually dimorphic LncRNAs were obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). LncRNA (TCONS_02477925) as an example was researched. This LncRNA has 2 exons and it is a typical Intergenic LncRNA. The full length of the transcript is 1537nt (nucleotide), which is located on LG19 (linkage Group 19). The expression level of this gene in ovary was significantly higher than testis. Fluorescence in situ hybridization showed that the LncRNA was mainly expressed in cytoplasm of oocytes in phase I and II. Transcriptome sequencing results and bioinformatics analysis indicated that *grsl1* and *rtn4ip1* might be the cis target genes of this LncRNA, and the abundance expression of the two target genes was higher in ovary than the testis. In conclusion, LncRNA may play an important role in tilapia oocyte development and sex differentiation.

Key words: Nile tilapia; LncRNA; Oocytes; sex determination and differentiation