

# 双须骨舌鱼卵黄蛋白原基因 *vtg* 的克隆、组织表达和原核表达分析

潘贤辉<sup>①②</sup> 刘奕<sup>②</sup> 周康奇<sup>①②</sup> 胡隐昌<sup>②\*</sup> 郑曙明<sup>①</sup> 宋红梅<sup>②</sup>  
牟希东<sup>②</sup> 杨叶欣<sup>②</sup>

① 西南大学, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室 重庆 400715; ② 农业部休闲渔业重点实验室, 广东省现代休闲渔业工程技术研究中心, 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380

**摘要:** 为探究双须骨舌鱼 (*Osteoglossum bicirrhosum*) 卵黄蛋白原 *vtg* 基因的结构和表达特征, 本研究运用 RACE 技术克隆双须骨舌鱼 *vtg* 全长 cDNA 序列。序列分析发现, 双须骨舌鱼 *vtg* 的 cDNA 全长为 5 325 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 5 121 bp, 其 5'和 3'非编码区 (UTR) 分别为 46 bp 和 159 bp, 共编码 1 706 个氨基酸, 预测蛋白质分子量约为 186.79 ku。同源性分析发现, 双须骨舌鱼与同科的美丽仆骨舌鱼 (*Scleropages formosus*) 相似度达到 84.78%, 与鲤形目、鲈形目、鲱形目、鲽形目鱼类的相似度均高于 50%。系统进化树分析结果显示, 本文获得的双须骨舌鱼 *vtg* 基因与骨舌鱼目聚为一类, 与鳗鲡目硬骨鱼类亲缘关系较近, 与双须骨舌鱼进化地位相符。荧光定量 PCR 检测结果表明, 在雌雄鱼性腺和肝中 *vtg* 均有表达, 且在雌鱼肝中的相对表达量显著高于雄鱼 ( $P < 0.05$ ), 卵巢和精巢表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在雌雄鱼鳃、脾、肾、肌肉、心、头肾、脑等 7 个组织中均极微量表达, 且无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在 II、III、IV 期卵巢中 *vtg* 相对表达量依次增加, IV 期显著高于 II 和 III 期 ( $P < 0.05$ ), 也显著高于精巢 IV 期 ( $P < 0.05$ ); 在雌鱼肝组织中呈先增后减趋势, 且 II、III、IV 期之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但每个时期都显著高于雄性 ( $P < 0.05$ )。成功构建了原核表达载体 pEASY-BluntE2-*vtg*, 并转入 *Transetta* (DE3) 表达感受态细胞中成功诱导出融合蛋白。Western-blotting 检测显示, 融合蛋白可被抗 His 标签特异性识别。综上所述, *vtg* 表达水平高低与性别相关, 并与性腺发育程度有关。此外, 本研究结果也为后续深入研究卵黄蛋白原的生理功能打下基础。

**关键词:** 双须骨舌鱼; 卵黄蛋白原; 克隆; 组织表达; 原核表达

中图分类号: Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 04-597-18

## Molecular Cloning, Expression Pattern and Prokaryotic Expression of Vitellogenin Gene (*vtg*) from *Osteoglossum bicirrhosum*

PAN Xian-Hui<sup>①②</sup> LIU Yi<sup>②</sup> ZHOU Kang-Qi<sup>①②</sup> HU Yin-Chang<sup>②\*</sup> ZHENG Shu-Ming<sup>①</sup>

**基金项目** 广州市科技计划项目 (No. 201707010309), 渔港建设和渔业产业发展专项 (No. A201701A07), 国家水产种质资源平台项目 (No. 2018DKA30470), 广东省自然科学基金项目 (No. 2014A030310397);

\* 通讯作者, E-mail: huyc22@163.com;

**第一作者介绍** 潘贤辉, 男, 硕士研究生; 研究方向: 遗传繁育与资源增殖; E-mail: 408797187@qq.com。

收稿日期: 2017-09-15, 修回日期: 2018-01-20 DOI: 10.13859/j.cjz.201804011

SONG Hong-Mei<sup>①</sup> MU Xi-Dong<sup>②</sup> YANG Ye-Xin<sup>②</sup>

① *Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education, China Southwest University, Chongqing 400715;*

② *Key Laboratory of Recreational Fisheries, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China*

**Abstract:** In order to investigate the structure and expression of *vlg* encoding vitellogenin (VTG) in *Osteoglossum bicirrhosum*, full-length cDNA sequence of *vlg* was cloned by the rapid-amplification of cDNA ends (RACE). Sequence analysis found that the full length of *vlg* was 5 325 bp, including 5 121 bp of the open reading frame (ORF), 46 bp of the 5' untranslated region (UTR) and 159 bp of 3' UTR. The ORF contained a total of 1 706 encoded amino acids with a predicted molecular mass of 186.79 ku. The results of domain analysis showed that there were 4 conserved domains in ORF, lipoprotein amino terminal region (vitellogenin-N), von Willebrand factor type D domain (vWD), domain of unknown function (DUF) 1943 and DUF 1944 (Fig. 2). The results of homologous analysis showed that the similarity comparing with *Scleropages formosus* was the highest of 84.78%, and higher than 50% comparing with Cypriniformes, Perciformes, Clupeiformes, Heterosomata. Phylogenetic analysis showed that *vlg* of *O. bicirrhosum* came to be a cluster with Osteoglossiformes, and was closely related with Anguilliformes, which was consistent with the evolutionary position of *O. bicirrhosum* (Fig. 5). The expression pattern of *vlg* was evaluated using real-time fluorescent quantitative PCR, and the results showed that the expression of *vlg* was the highest in the liver of female, significantly higher than that in males ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in its expression between ovary and testis ( $P > 0.05$ ). The expression quantity of *vlg* in gills, spleen, kidney, muscle, heart, head-kidney or brain of males and females was all very low ( $P > 0.05$ ) (Fig. 6). The relative expression of *vlg* in the ovary at stage II, III and IV was increased successively, and its expression at the stage IV was significantly higher than that at stage II and III ( $P < 0.05$ ), and was significantly higher than that of stage IV testis. In the liver of female *vlg* expression was increased at first and then decreased, and no significant difference among the 3 stages ( $P > 0.05$ ) was found, but *vlg* expression at each stage was significantly higher than that of males ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7). We successfully constructed the prokaryotic expression vector, and transferred it to Transetta (DE3) expression competent cells to induce expression the fusion protein (Fig. 8, 9). Western-blotting showed that the fusion protein could be specifically recognized by anti-His tag (Fig. 10). In conclusion, the expression level of *vlg* is related to sex, and it is also related to gonadal development stage. In addition, this study has laid a foundation to further investigating the physiological function of VTG.

**Key words:** *Osteoglossum bicirrhosum*; Vitellogenin; Cloning; Tissue expression; Prokaryotic expression

卵黄蛋白原 (vitellogenin, VTG) 是卵黄蛋白的前体, 是一种高分子量的磷酸脂糖蛋白 (lipoproteinphosphate), 具有种间特异性 (Utarabhand et al. 1996)。其在雌鱼卵黄发生期通过分泌 17 $\beta$ -雌二醇诱导肝细胞产生, 随后经血液循环进入卵巢, 再被卵母细胞上的卵黄蛋白原受体 (vitellogenin receptor, Vtgr) 介导吸

收, 并在卵巢内的组织蛋白酶 D 参与下将其分解成卵黄高磷蛋白 (phosvitin, Pv)、卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, Lv) 和  $\beta'$  成分 ( $\beta'$ -component), 为胚胎与幼体早期发育提供所需营养来源 (Sire et al. 1994)。此外, VTG 不仅能对金属离子、维生素 A、类胡萝卜素等物质进行转运 (Idler et al. 1980), 而且还发挥着重要的免疫

功能, 如促进吞噬细胞的吞噬作用 (Turner et al. 1981)。

近年来, 已有学者将血清 VTG 含量检测作为一种鉴定鱼类性别的方法进行研究, 并已在施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) (Zhang et al. 2011) 和大马哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) (Pottinger et al. 2005) 上得以验证。在彭泽鲫 (*Carassius auratus* var. *Pengze*) (郑尧等 2016)、哲罗鲑 (*Hucho taimen*) (王凤等 2009)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) (罗明坤等 2015) 等种类中也开展了雌性个体在生长过程中血清内 VTG 含量的差异及变化规律的探究。在瓦氏黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli*) (李育培等 2010)、青鳉 (*Oryzias latipes*) (Shimizu et al. 2002)、剑尾鱼 (*Xiphophorus hellerii*) (刘春等 2007)、唐鱼 (*Tanichthys albonubes*) (姚静等 2010) 等鱼类上利用 VTG 建立酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测方法, 该方法用于检测养殖水体中雄鱼激素含量变化, 从而监测水体中的激素是否超标。这也是现今学者研究的热点, 同时也为本研究的开展奠定了基础。对于 VTG 的免疫功能已在斑马鱼 (*Danio rerio*) (李磊 2009)、玫瑰无须鲃 (*Puntius conchonius*) (师晓栋 2004)、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) (吴美琴等 2014) 等种类上得到分析。

双须骨舌鱼 (*Osteoglossum bicirrhosum*), 隶属于骨舌鱼目 (Osteoglossiformes) 骨舌鱼科 (Osteoglossidae), 俗称银龙鱼, 是中型淡水鱼类, 原产于南美洲的亚马孙河流域圭亚那和巴西等地, 主要栖息在湖泊或河流的缓流区, 是原产地一种不可缺少的食用鱼类, 在亚洲国家属于名贵的观赏鱼 (汪学杰等 2011)。近几年, 双须骨舌鱼的市场经济价值日益增高, 但由于双须骨舌鱼性成熟晚, 雌雄鱼的第二性特征极不显著, 繁殖习性特殊等原因, 尚未发现有效鉴定双须骨舌鱼性别的方法。田媛等 (2013) 研究发现双须骨舌鱼的雌雄性形态特征、核型和染色体形态都不存在明显差异, 而通过简单

重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 引物进行性别鉴定, 也未找到性别特异性条带; 汪学杰等 (2014) 等对双须骨舌鱼的雌雄性腺发育进行组织学观察, 发现 II 期前的雌雄个体性腺外观均呈现带状且无明显差异, 但通过组织学观察能明显观察到精巢和卵巢组织结构差异以及初级精母细胞和初级卵母细胞; 王且鲁等 (2016) 对双须骨舌鱼性别相关基因 *amh* 进行研究, 发现该基因存在两个亚型, 且在性腺中的表达量雄性显著高于雌性。目前关于双须骨舌鱼卵黄蛋白原基因及蛋白的研究尚未见报道。因此, 本研究拟克隆 *vtg* 基因, 分析其表达特征、构建原核表达载体并探索蛋白诱导的最佳条件, 为深入研究该基因及其编码蛋白在双须骨舌鱼性腺发育中的功能提供依据, 也为寻找有效的性别鉴定方法提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼均采自中国水产科学研究院珠江水产研究所观赏鱼基地, 选择体态完整, 体表无损伤个体。养殖水温 28 ~ 30 °C, pH 为 6 ~ 7。本研究共用鱼 24 尾, 雌鱼 12 尾, 雄鱼 12 尾, 相关数据见表 1。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成** 取性成熟雌性双须骨舌鱼肝组织, 经总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司) 获得肝组织总 RNA, 用 Synergy™ NEO HTS 多功能酶标仪与 1.0% 凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和完整性。取 1.2 ng RNA 经 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 获得 cDNA 第一链, -20 °C 保存, 备用。

**1.2.2 *vtg* 的克隆** 根据美丽硬仆骨舌鱼 (*Scleropages formosus*) *vtg* (KPP59788.1) 的转录组拼接序列, 并参考日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) (AAR82898.1)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) (XP\_014024135.1)、鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) (BAD51933.1) 的 *vtg* 序列设计双须骨

表 1 实验用鱼的数据

Table 1 Experimental fish data

| 性腺发育时期<br>Gonadal development stage | 性别<br>Gender             | 体长 (cm)<br>Body length | 体重 (g)<br>Body mass |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|
| II                                  | 雌 Female ( <i>n</i> = 3) | 41.43 ± 0.49           | 358.07 ± 5.13       |
|                                     | 雄 Male ( <i>n</i> = 3)   | 41.83 ± 0.97           | 364.40 ± 13.03      |
| III                                 | 雌 Female ( <i>n</i> = 6) | 44.68 ± 1.23           | 622.18 ± 5.66       |
|                                     | 雄 Male ( <i>n</i> = 6)   | 41.77 ± 1.94           | 586.35 ± 4.92       |
| IV                                  | 雌 Female ( <i>n</i> = 3) | 46.47 ± 1.81           | 745.00 ± 11.16      |
|                                     | 雄 Male ( <i>n</i> = 3)   | 44.77 ± 1.16           | 633.67 ± 4.69       |

数据以平均值 ± 标准误表示。Data are expressed as Mean ± SE.

舌鱼 *vtg* 保守序列引物。因该基因全序列较长, 本实验设计多对引物 (表 2), 引物由广州艾基生物技术有限公司合成。PCR 体系 (50 μl) 包括 ddH<sub>2</sub>O 37.8 μl, 10 × Buffer 5 μl, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μl, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.8 μl, 模板 cDNA 1.2 μl (50 ng/μl), *rTaq* 0.4 μl (5 U/μl)。PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30

s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 经胶回收试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 纯化后, 连接至 PMD19-T (TaKaRa 公司), 16 °C 30 min。随后转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 37 °C 摇菌 1 h, 取 20 μl 菌液涂在含有氨苄青霉素 (Amp<sup>+</sup>) 的

表 2 实验中的合成引物

Table 2 Synthetic primers in experiments

| 引物名称<br>Primer code | 引物序列 (5' - 3')<br>Primer sequence (5' - 3') | 用途<br>Usage                                   |
|---------------------|---|---|
| vtg-F5              | GTTGTTCTTGCACTGACTTTGGCCC                   |   |
| vtg-R5              | CCCTTGGCAAATAGTGGCAGCATC                    |   |
| vtg-F6              | TCAACGATGCTGCCACTATTTTGCC                   |   |
| vtg-R6              | ATCTTGGCCATGACTTTGTGCATGC                   |   |
| vtg-F13             | GAGTATCCTGAAGAGGGCAATCGT                    | 中间序列扩增<br>Intermediate sequence amplification |
| vtg-R13             | CACTGGCATCACGACAACCTTTCA                    |   |
| vtg-F15             | GCCAGCTTACCTATTCTCACA                       |   |
| vtg-R15             | GAATAATGTCCGTGTTACTCCC                      |   |
| vtg-3'n             | CAAGTGGTGGACTGGATGAAAGC                     | 3'RACE  |
| vtg-3'w             | ATGAAAGTTAATGGGATGGACG                      |   |
| vtg-5'n             | TCCAGCCTCCTGCAACTCATAACA                    | 5'RACE  |
| vtg-5'w             | TCCATTGTCTCGCTTTCATCT                       |   |
| vtg-RT-F            | TGGGAGTAAACACGGACATT                        | rt-PCR  |
| vtg-RT-R            | AGATAGTTGGGCTACAAGACG                       |   |
| GAPDH-RT-F          | TACAGCCACCCAGAAGACAGT                       | rt-PCR  |
| GAPDH-RT-R          | CTCCTTGATCTCTCGGTAGCT                       |   |
| vtg-orf-F           | ATGAAGAAGACACAGAATGTGTATG                   | 原核表达<br>Prokaryotic expression                |
| vtg-orf-R           | CTAAGCACAAATCCCCTGAACAC                     |   |

固体培养基上, 37 °C 过夜培养。次日筛选阳性克隆测序, 测序工作由广州艾基生物技术有限公司完成。

用 VectorNTI 软件将 4 对引物测序结果进行拼接获得 *vtg* 保守序列, 并根据该序列设计 3'RACE 巢式 PCR 引物 *vtg*-3'w、*vtg*-3'n 和 5'RACE 巢式 PCR 引物 *vtg*-5'n、*vtg*-5'w(表 2), 经巢式 PCR 分别扩增获得 *vtg* 3'端和 5'端序列。将 *vtg* 中间序列、3'端序列和 5'端序列用 VectorNTI 软件进行拼接, 得到完整的双须骨舌鱼 *vtg* cDNA 序列(图 1)。

**1.2.3 *vtg* 基因序列分析** 运用 NCBI 上 ORF Finder 工具对拼接完整的 *vtg* 全序列进行开放阅读框(ORF)查找, 并用 BioEdit 软件翻译获得编码蛋白 VTG 的氨基酸序列。用 ProtParam 软件分析蛋白质理化性质(<http://web.expasy.org/protparam/>); 用 SignalP 软件分析信号肽(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>); 用 ProtScale 软件进行亲疏水性分析(<http://web.expasy.org/protscale/>); 用 TMHMM 软件进行跨膜区结构预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>); 用 NCBI 保守结构域数据库 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 和 SMART 软件进行结构域分析(<http://smart.embl-heidelberg.de/>); 用 Predictprotein(<https://www.predictprotein.org/>) 和 SWISSMODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>) 软件分别预测二级和三级结构; 用 NCBI 中的 BLASTP 程序进行氨基酸序列同源性检索; 用 ClustalX1.83 软件和 Clustal Omega 软件进行 VTG 的氨基酸序列多序

列比对(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), 并用 MAGE 5.2 软件构建系统进化树(表 3)。

**1.2.4 组织表达分析** 根据汪学杰等(2014)对双须骨舌鱼性腺分期方法, 随机选取 6 尾 III 期双须骨舌鱼(雌雄各 3 尾), 分别提取性腺、鳃、肝、脾、肾、肌肉、心、头肾、脑共 9 种组织总 RNA。另外将选取性腺发育至 II 期、III 期和 IV 期雌雄双须骨舌鱼, 分别提取性腺和肝组织总 RNA。用多功能酶标仪与凝胶电泳仪测定 RNA 浓度、纯度和完整性, 各取 1.5 ng RNA 经 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa 公司)获得 cDNA 样品, -20 °C 保存, 备用。

选用双须骨舌鱼 *GAPDH* 作为内参基因(王且鲁等 2016), 引物 *GAPDH*-RT-F 和 *GAPDH*-RT-R 见表 2。根据测得的双须骨舌鱼 *vtg* 的 cDNA 序列设计一对荧光定量 PCR(rt-PCR)引物 *vtg*-RT-F 和 *vtg*-RT-R(表 2)。分别将以上两对引物的 PCR 扩增产物连接到载体并转入大肠杆菌中, 经测序比对后, 将阳性克隆进行扩增培养, 再提取质粒, -20 °C 保存。

用 Synergy™ NEO HTS 多功能酶标仪测定质粒浓度, 然后对其进行 10 倍梯度稀释, 共设 12 个梯度, 分别为原浓度的  $10^{-1} \sim 10^{-12}$  倍, 用 QuantStudio6 Flex 仪器制作标准曲线, 若  $R^2 > 0.99$ , 斜率在 -3.3 左右, 则表明标准曲线制作合格, 可进行样品检测。rt-PCR 体系共 20  $\mu$ l, 含 ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ l, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ l, SYBR Green Master Mix 10  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l (50 ng/ $\mu$ l)。反应条件: 50 °C 预热 2 min, 95 °C 预变性 5 min;

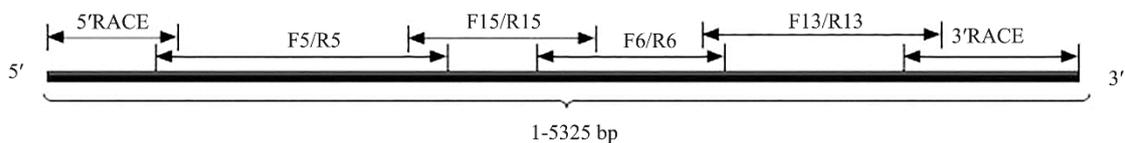


图 1 双须骨舌鱼 *vtg* 克隆策略

Fig. 1 Cloning strategy of *vtg* from *Osteoglossum bicirrhosum*

图中用 F5/R5、F15/R15、F6/R6 和 F13/R13 分别与表 2 中引物相对应。

F5/R5, F15/R15, F6/R6 and F13/R13 correspond to the primers in Table 1 respectively.

表 3 用于构建系统进化树的物种

Table 3 Species used to construct phylogenetic trees

| 物种<br>Species                           | 分类地位<br>Taxonomic status | GenBank 序列号<br>GenBank serial number |
|---|--------------------------|--------------------------------------|
| 美丽硬仆骨舌鱼 <i>Scleropages formosus</i>     | 骨舌鱼目 Osteoglossiformes   | KPP59788.1                           |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>                  | 鲤形目 Cypriniformes        | NP_001038759.2                       |
| 滇池金线鲃 <i>Sinocyclocheilus grahami</i>   | 鲤形目 Cypriniformes        | XP_016298362.1                       |
| 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>               | 鲤形目 Cypriniformes        | BAD51933.1                           |
| 大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>                 | 鲑形目 Salmoniformes        | XP_014024135.1                       |
| 白斑红点鲑 <i>Salvelinus leucomaenis</i>     | 鲑形目 Salmoniformes        | BAM22589.1                           |
| 克拉克大马哈鱼 <i>Oncorhynchus clarkii</i>     | 鲑形目 Salmoniformes        | AGQ04606.1                           |
| 日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>           | 鳗鲡目 Anguilliformes       | AAR82898.1                           |
| 星康吉鳗 <i>Conger myriaster</i>            | 鳗鲡目 Anguilliformes       | BAD93275.1                           |
| 美洲狼鲈 <i>Morone americana</i>            | 鲈形目 Perciformes          | AAZ17416.1                           |
| 尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>             | 鲈形目 Perciformes          | XP_018528704.1                       |
| 欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>         | 鲈形目 Perciformes          | AFA26670.1                           |
| 大西洋比目鱼 <i>Hippoglossus hippoglossus</i> | 鲽形目 Heterosomata         | ABQ58114.1                           |
| 条斑星鲽 <i>Verasper moseri</i>             | 鲽形目 Heterosomata         | BAD93696.1                           |
| 大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>             | 鲱形目 Clupiformes          | XP_012677160.1                       |
| 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>               | 鹤鱚目 Beloniformes         | NP_001098147.1                       |
| 史氏鲟 <i>Acipenser schrenckii</i>         | 鲟形目 Acipenseriformes     | AOH96642.1                           |
| 鲮鱼 <i>Mugil cephalus</i>                | 鲮形目 Mugiliformes         | BAF64836.1                           |
| 秀丽隐杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>    | 小杆线虫目 Rhabditida         | NP_001294839.1                       |
| 非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>              | 无尾目 Anura                | XP_018116181.1                       |
| 家蚕 <i>Bombyx mori</i>                   | 鳞翅目 Lepidoptera          | NP_001037309.1                       |
| 安乐蜥 <i>Anolis carolinensis</i>          | 有鳞目 Scalesmesh           | AAF13711.1                           |
| 原鸡 <i>Gallus gallus</i>                 | 鸡形目 Galliformes          | AAA49139.1                           |
| 川金丝猴 <i>Rhinopithecus roxellana</i>     | 灵长目 Primates             | XP_010368567.1                       |

95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 溶酶曲线: 95 °C 15 s, 60 °C 2 min, 95 °C 15 s; 每个样品重复 3 次。用 QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.2 软件计算每个样品的目的基因和内参基因扩增后的拷贝数 (quantity, Qty), 各样品目的基因和内参基因拷贝数 (Qty) 值之比即为目的基因相对表达量。实验数据运用 SPSS 20 软件进行单因素方差方法 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 多重比较分析显著性差异。

**1.2.5 原核表达载体的构建** 根据双须骨舌鱼 vtg 序列分析结果设计引物 vtg-orf-F 和 vtg-orf-R (表 2) 扩增 vtg 的开放阅读框 (ORF), 将扩

增产物链接到 pEASY-BluntE2 (TransGen Biotech) 载体后, 再转入大肠杆菌中, 选取测序完全正确的阳性克隆进行扩增培养提取质粒。最终获得双须骨舌鱼的重组表达载体, 并将其命名为 pEASY-BluntE2-vtg。

**1.2.6 重组蛋白诱导表达** 根据蒋艳玲等 (2016) 重组蛋白诱导表达方法, 有略微修改。取 1 μl 的 pEASY-BluntE2-vtg 分别转化至 BL21 (DE3)、TransB (DE3) 和 Transetta (DE3) 3 种感受态细胞内, 轻弹混匀, 冰浴 30 min, 42 °C 准确热激 45 s, 冰上静置 2 min, 加入 250 μl 的 LB 培养基, 摇菌 1 h, 涂于含氨苄青霉素 (Amp<sup>+</sup>) 的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。挑取

阳性克隆接种到 2 ml LB 液体培养基中 (含 100 mg/L 的 Amp<sup>+</sup>), 37 °C 摇菌培养至  $A_{600}$  约为 0.5 时, 分别加入浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG), 置于 37 °C 进行诱导表达, 诱导 5 h 后, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 使用 650  $\mu$ l PBS 缓冲液悬浮菌液。以 pEASY-BluntE2-*vtg* 质粒添加 IPTG 诱导为正对照, 以未加 IPTG 诱导为负对照。取 50  $\mu$ l 悬菌液加入 10  $\mu$ l 6  $\times$  Protein Load Buffer 混匀, 沸水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 10  $\mu$ l 上清点样至 10% SDS-PAGE 胶, 考马斯亮蓝染色液染色, 脱色, 观察蛋白表达结果。将剩余的菌液超声破碎后, 分别取 10  $\mu$ l 上清和沉淀经 10% SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色检测蛋白表达情况。

**1.2.7 融合蛋白的 Western-blotting 分析** 在 2  $\mu$ g 融合蛋白样品中加入 5  $\times$  loading buffer, 混匀后煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后上样。经 SDS-PAGE (分离胶 15%, 浓缩胶 5%) 电泳后, 将蛋白条带通过转膜仪 (上海天能科技有限公司) 转印至 PVDF 膜 (Millipore 公司) 上, 用立春红 S 染色 2 min, 用蒸馏水清洗至 marker 条带显出。将胶放置于 5% 脱脂牛奶封闭液中 4 °C 封闭过夜; 加入 1 : 2 000 稀释的鼠抗 His 标签抗体 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 在室温摇动孵育 40 min, 经 TBST 缓冲液洗膜 15 min, 重复 3 次; 再加入 1 : 5 000 稀释的羊抗鼠酶标二抗 (KPL), 室温摇动孵育 30 min, TBST 缓冲液洗膜 15 min, 重复 5 次。最后用二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) [天根生化科技 (北京) 有限公司] 显色后观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 双须骨舌鱼 *vtg* 序列与其编码蛋白质序列生物信息学分析

**2.1.1 基因序列分析** 用 VectorNTI 软件拼接获得双须骨舌鱼 *vtg* 的 cDNA 全序列为 5 325 bp,

5'端非编码区 (UTR) 为 46 bp, 3'端非编码区 (UTR) 为 159 bp, 开放阅读框 (ORF) 为 5 121 bp, 共编码氨基酸 1 706 个。3'端具有典型性 AATAAA 加尾信号和 Poly (A) 尾。预测卵黄蛋白原 (VTG) 的分子量约为 186.79 ku, 理论等电点 pI 为 9.41 (图 2)。

用 SignalP 软件预测所得信号肽区域分值 (S)、信号肽剪切位点分值 (C) 分别为 0.892、0.646。综合考虑 S 值与 C 值得出的剪切位点分值 (Y) 为 0.493, 能更为准确地确定信号肽酶切位点的最大值。三个数据都大于分界值 0.45。出现较高的 C 值和较大的 Y 值、S 值, 表明双须骨舌鱼 *vtg* 基因编码蛋白质 VTG 的序列含有信号肽。该信号肽位于 N 端, 跨度为 15 个氨基酸, 且为分泌型信号肽。结合目前认为蛋白质 N 端信号肽是指导分泌蛋白在内质网上合成的决定因素, 推测该蛋白为分泌蛋白。

**2.1.2 *vtg* 编码蛋白质的跨膜区域结构预测** 运用 TMHMM 软件对蛋白序列进行跨膜区域结构预测, 发现该蛋白不存在跨膜区域, 故推测其为非跨膜蛋白。

**2.1.3 *vtg* 编码蛋白质的亲/疏水性预测** 用 ExpASy 中的 ProtScale 工具预测 *vtg* 编码蛋白质的亲/疏水性, 结果显示负值区域的氨基酸数值分布在 0 至 4 之间, 而正值区域的氨基酸数值分布在 0 至 3 之间, 且负值的氨基酸个数多于正值的氨基酸。预测结果中正值代表疏水性, 数值越大表明疏水性越强, 负值代表亲水性, 数值越大表明亲水性越强。从整体正负值氨基酸分布来看, 该蛋白的亲水性强于疏水性, 可认为该蛋白为亲水性蛋白质。

**2.1.4 *vtg* 编码蛋白质保守结构域预测** 用 NCBI 中保守结构域数据库 CDD 和 SMART 软件分析, *vtg* 编码蛋白含有 4 个保守域, 分别为脂蛋白氨基末端结构域 (vitellogenin-N), 也称脂蛋白 N-末端结构域 (lipoprotein N-terminal domain, LPD-N, 24~449 位氨基酸)、D 型血管血友病因子结构域 (von Willebrand factor type D domain, vWD, 1 287~1 451 位氨基酸)

1 AAGCAGTGGTATCAACCCAGCAGTACATGGGGACATCCAGAGCCATgaagcagctgttctgcgctgaetttggccctcgtggcgggtcaacagaacaacctatcactgactttgccc 119  
 120 actggttaagacctatgtatacaagatgaagcactgctccaggggggtctacctgaagaaggtcggccaggcggactgaagattgtagcacaattctcatcagccacattagccag 239  
 240 accaccatctgc lcaagc lcaaggaacctcagatctcaglacaaatggccggagatcaallcagcccgc lgc aaaaagc lcaaccaagcctggcctgclcagllc lcaall 359  
 360 cctgtgaagtttgatgtatcaatgggtggtggcnaagttgttgcctccggcggatttcagaaacgatctcaatctcaacagagaattctcaactcctctcagctgaacatgaag 479  
 480 aagacacagaatgtatgagttgacaggagctggatcccaggagctgttaaaaccgattatcaatcagtgagacacaaaatccgaaaacctccatgtatgaagttatgcaagctcg 599  
 600 gggaagtcgcagaagggctcagccaacctggaatggcttacacagagacttggccaatgtagcagaaaaacaagaacctgagaggagctgcaacctcagactatgctatgaag 719  
 720 cccaccgaagtgkacgtatatactggaagcactgcccaggagctcactgattctcactcttccatgaacttagtgagcactcagatgaaagcagacaaatgagctggtt 839  
 840 gaggccagaatggcccggtgcagcctgttcaagcagactatctggcagcggatctcgcgaatgaattgcatctgagctctccagataccatcaactaatgaaagtcaccaat 959  
 960 atccagacagatlgagagcagctlgaatcaccatg lcaaaaacaaatgggg lgaag lcca lgaagagc lccac ltaag lttgt lgaag lgc lcaag c lclgc lglgc lcaaa lta 1079  
 1080 gagaccataaataactttggcctcaagctcaatgcaagccagcctcagggcaggttctcggatctgctccctgcaatggaactcaagtagctctgagatctcaagaaaagt 1199  
 1200 ctgttggtgaagctcagtgacagaacatgcccagctttgctgactgctcgcactgtagtaaaagcacttggacacatacaacttagctgtagtgggtatgtagcacaact 1319  
 1320 caagcaatcccctgctgctggaactgcccactgctggttacggcttctgtagttagcttctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagct 1439  
 1440 gcaagcaattagtaagcaaacatgcaaaaatggcctgctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagct 1559  
 1560 gcagcagctgcaactcagtcgaactcagctgtagctggtgcttggagacacatcctcatatgggaacagagaaaagtgcaaaaatggcctgcaagttgctgtagcacaact 1679  
 1680 cttccaccagaatgtagcagctgctgctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagct 1799  
 1800 ttaccatctcaccatgaagcctlgaccagagcaccgcccagagcctlgcccaggttggcctgctlgaatgttgcctcaagatctgagcccaagttagacagactgagctat 1919  
 1920 cgtttcagaacaaactcactgcaacttcaacacccacttgaagcttctcagcactgctgctgactgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 2039  
 2040 gtctgctcctataggttggggcagcagcagctgctgctgaggttgggtggaacatggaagatcagggagcttctgaaagaccagctgctaatgcaagttgtagcagctcct 2159  
 2160 aggatgagcagctgaagctcctcaactgaagcctgtaaacagctgtagcagctgctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagct 2279  
 2280 gaagctcagagagcctgacatgctgctcagcgaactgctgcaagcgaactgctggaagaatgctgaatcactgagctggggtgacatcaactcaagcttctgtagc 2399  
 2400 accctcaggtgctgctgctcctcactgctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagct 2519  
 2520 agggagaactcagcctgctcactgcaacatgacatgctgctgtagcagctgctgctgtagcagctgctgctgtagcagctgctgctgtagcagctgctgctgtagc 2639  
 2640 gctgaatttggcgaacaaagttcaatgaagctcctcctggaattcagcgaagctcagctgctcagggacactcaagatcagggctcctcctgtagcagctgtagc 2759  
 2760 cttctggatggcgaatggaacactgctgctgcaaggaatgtagaacttctcggagcctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagc 2879  
 2880 acgttagtgccagctgtagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagt 2999  
 3000 tgtgtcacaatggcagcttaggagagcagctgctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagttagctgtagt 3119  
 3120 gtagaacctgctcagcagctgctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagct 3239  
 3240 aatcgtggagctcctcagctgtagttagcagaactggaacaaatcctggaactggaacacagaatlgagaactcagcagctcagctgtagcagctgctcagcagct 3359  
 3360 cagaanaagcagcttctcagcagctcctcctcagcagctcctcctcagcagctcctcctcagcagctcctcctcagcagctcctcctcagcagctcctcctcagcag 3479  
 3480 aagaagaatagctcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagc 3599  
 3600 tcaactgtagcagcagctgctcagcagctgtagc 3719  
 3720 agctlgagcagcttcaagaagctgctgctcctggaagatgtgctcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 3839  
 3840 tcaatggcaaacctgtagcagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcagctgtagcag 3959  
 3960 cgttggggagaagatgcccagcctcagagcagctcactcagcagcagctggcctcctggatcacaactgagccagatgagctcctggaacagagcccccctgcaag 4079  
 4080 aaatagctcagctgatttctgagctacatcccagct 4199  
 4200 aggatcactcagctatctccttaaaaccccaagatgaccatgtagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagcagcagctgctgtagc 4319  
 4320 gctgagcagctgtagcagctgctcagc 4439  
 4440 caagctgtagcagcagctgctcagc 4559  
 4560 gctgtagcagcagctgcaatgaaatgtaggagctgtagc 4679  
 4680 tatgctcacaagaagcctgcatgagctgtagttagc 4779  
 4800 agccaagaattcagc 4919  
 4920 tcaagctgtagc 5039  
 5040 gggctcactgtagc 5159  
 5160 gcttagtggcttctcagc 5278  
 A \*

5278 AAGTATAATTGATCAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 5325

(接上页) 图 2 双须骨舌鱼 *vtg* 的 cDNA 序列与推导蛋白序列Fig. 2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *vtg* in *Osteoglossum bicirrhosum*

方框内的 atg 为起始密码子; “\*” 符号为 tag 终止密码子; 单下划线为加尾信号与 Ploy (A) 尾; 黄色区为 Vitellogenin-N 结构域; 灰色区为 DUF1943 和 DUF1944 结构域; 绿色区为 VWD 结构域。

The ATG in the box is the start codon; “\*” symbol for tag termination codon; single underline for adding tail signal with Ploy (A) tail, yellow region is Vitellogenin-N domain; grey region is DUF1943 and DUF1944 domain; green region is VWD domain.

和 2 个未知功能结构域 (domain of unknown function, DUF), 分别是 DUF1943 (626~910 位氨基酸) 和 DUF1944 区域 (1 243~1 408 位氨基酸)。这两个未知功能结构域均由多个开放的  $\beta$ - 折叠构成。对比斑马鱼 *vtg* (XP\_021330153.1) 的保守域分析结果发现两者结构域相同 (图 3)。此外, SMART 软件分析发现该蛋白未含有跨膜区域, 与 TMHMM 软件分析结果相一致。

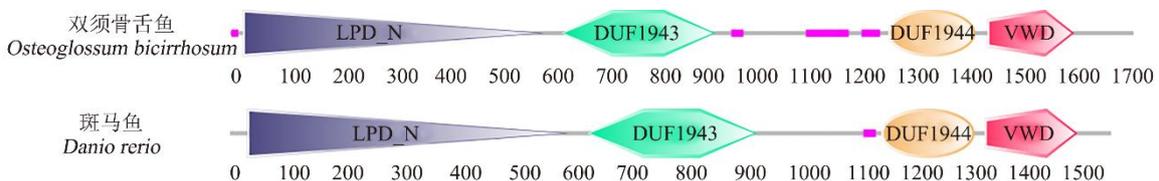
**2.1.5 *vtg* 编码蛋白质的二级结构和三级结构预测** 用 Predictprotein 软件预测该蛋白的二级结构, 该蛋白存在  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲结构, 其比例分别为 23.51%、18.58% 和 57.91% (图 4a)。同时, 该蛋白不存在跨膜区域, 这与 TMHMM 预测结果一致, 且不存在二硫键。通过 SWISS-MODEL 软件预测该蛋白三级结构是由  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲结构包围成的一个酷似心型立体空间结构, 其中  $\beta$ -折叠位于表面,  $\alpha$ -螺旋位于底面, 而无规则卷曲在其中起到纽带作用, 将两者紧密链接一起 (图 4b)。

## 2.2 双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质的同源性与系

### 统发育分析

**2.2.1 *vtg* 编码蛋白质同源性分析** 运用 clustalx1.83 软件将双须骨舌鱼与在 GenBank 中选取的其他代表动物的 VTG 的氨基酸序列进行比对, 发现双须骨舌鱼的 *vtg* 基因推导的氨基酸序列保守性较低。其与美丽硬仆骨舌鱼相似度最高, 达到 84.78%, 与日本鳗鲡、星康吉鳗相似度分别为 62.53%、62.38%。与克拉克大马哈鱼、比目鱼、尖吻鲈、大西洋鲱、斑马鱼、鲤鱼相似度都高于 50%, 分别达到 55.34%、53.45%、53.83%、54.93%、50.93%、53.5%, 而与两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类的物种的序列相似度较低, 与非洲爪蟾、安乐蜥、原鸡、金丝猴相似度分别为 39.63%、40.05%、36.94%、21.56%。

**2.2.2 *vtg* 编码蛋白质系统发育分析** 为更加深入了解双须骨舌鱼与其他动物的 VTG 的氨基酸序列之间的进化关系, 使用 MEGE5.2 软件对其进行同源与聚类分析, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树。发现 *vtg* 基因推导的氨基酸序列双须骨舌鱼与同属于骨舌鱼科的美丽硬仆舌鱼同源性最高, 这与

图 3 双须骨舌鱼和斑马鱼 *vtg* 编码蛋白质序列保守域Fig. 3 Conserved domain of *vtg* encoding protein sequence in *Osteoglossum bicirrhosum* and *Danio rerio*

LPD-N 为 N 端脂蛋白保守域; DUF1943 和 DUF1944 都为未知功能区保守域; vWD 为 D 型血管血友病因子保守域; 粉色为复杂结构域。

LPD-N is lipoprotein N-terminal domain; both DUF1943 and DUF1944 are conserved domains of unknown function; vWD is von Willebrand factor type D domain; pink is complex domain.

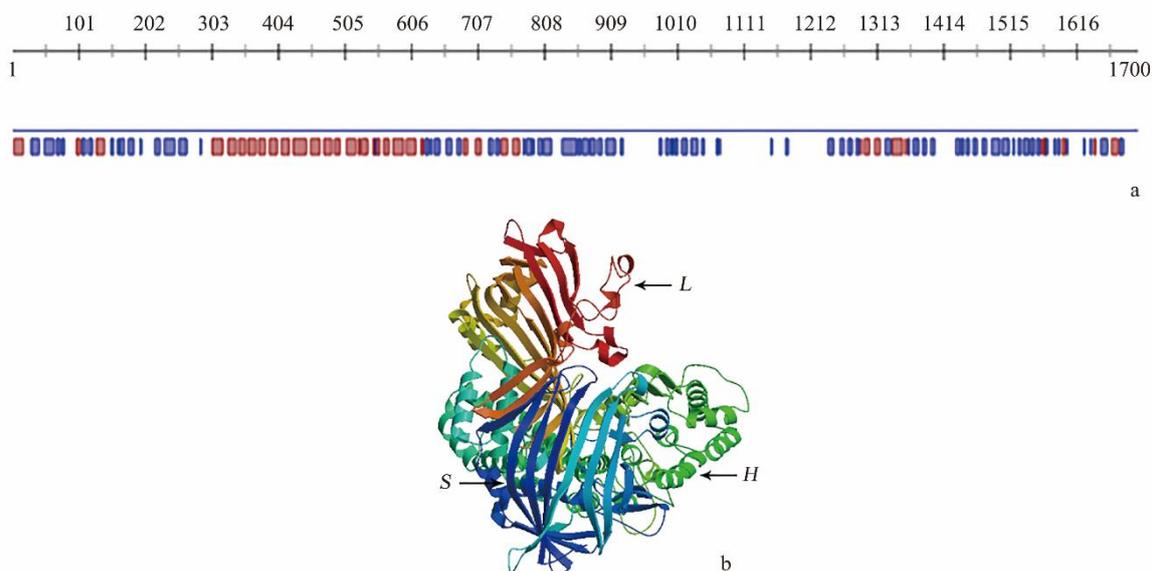


图 4 双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质结构预测

Fig. 4 Prediction of the *vtg* encoding protein structure from *Osteoglossum bicirrhosum*

a. 二级结构; b. 三级结构。a. Secondary structure; b. Tertiary structure.

图 a 中的蓝色为  $\beta$ -折叠, 图 a 中的红色为  $\alpha$ -螺旋, 图 a 中的空白处为无规则卷曲。图 b 中的为 S 为  $\beta$ -折叠, H 为  $\alpha$ -螺旋, L 为无规则卷曲。

In the Fig. a, the blue is beta-sheet, the red is alpha-helix, the blanks is irregular curl. In the Fig. b, S is beta-sheet, H is alpha-helix, L is irregular curl.

传统分类结果一致, 二者同属于骨舌鱼目, 其次与日本鳗鲡和星康吉鳗亲缘性达到 98% (图 5)。

### 2.3 双须骨舌鱼 *vtg* 基因在不同组织和性别中的表达分析

采用荧光定量 PCR 方法检测双须骨舌鱼性腺、鳃、肝、脾、肾、肌肉、心、头肾、脑等 9 种组织中 *vtg* 的表达量 (图 6), *vtg* 在上述所有组织中均有表达且在肝中相对表达量最高, 其次是卵巢、精巢。雌鱼肝和卵巢中相对表达显著高于其他 7 种组织 ( $P < 0.05$ ), 雄鱼肝和精巢相对表达量显著亦显著高于其他 7 种组织 ( $P < 0.05$ ), 且雌雄鱼后 7 种组织间相对表达量均无显著差异且均为极微量表达。雌鱼肝中表达量显著高于雄鱼肝 ( $P < 0.05$ ), 卵巢和精巢相对表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 另外 7 种组织相对表达量在雌雄鱼间差异也不显

著 ( $P > 0.05$ )。

在雌雄双须骨舌鱼 3 个不同时期 (II、III 和 IV 期) 的性腺和肝中 *vtg* 相对表达量检测结果见图 7。雌性个体卵巢中 *vtg* 相对表达量逐渐升高, IV 期显著高于 II 和 III 期 ( $P < 0.05$ ), 但 II 和 III 期无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 在肝组织中呈现先增后减的趋势, 但在 3 个时期相对表达量均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。雄性精巢和肝中 *vtg* 相对表达量变化与雌性变化趋势相似, 精巢中 III 期相对表达量显著高于 II 和 IV 期 ( $P < 0.05$ ), 而 II 和 IV 期无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 3 个时期的肝中相对表达量均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在 II 和 III 期的精巢和卵巢的 *vtg* 相对表达量均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 发育至 IV 期, *vtg* 相对表达量卵巢显著高于精巢 ( $P < 0.05$ ); 性腺发育的 3 个时期 *vtg* 在肝组织的相对表达量雌雄均差异显著 ( $P < 0.05$ )。

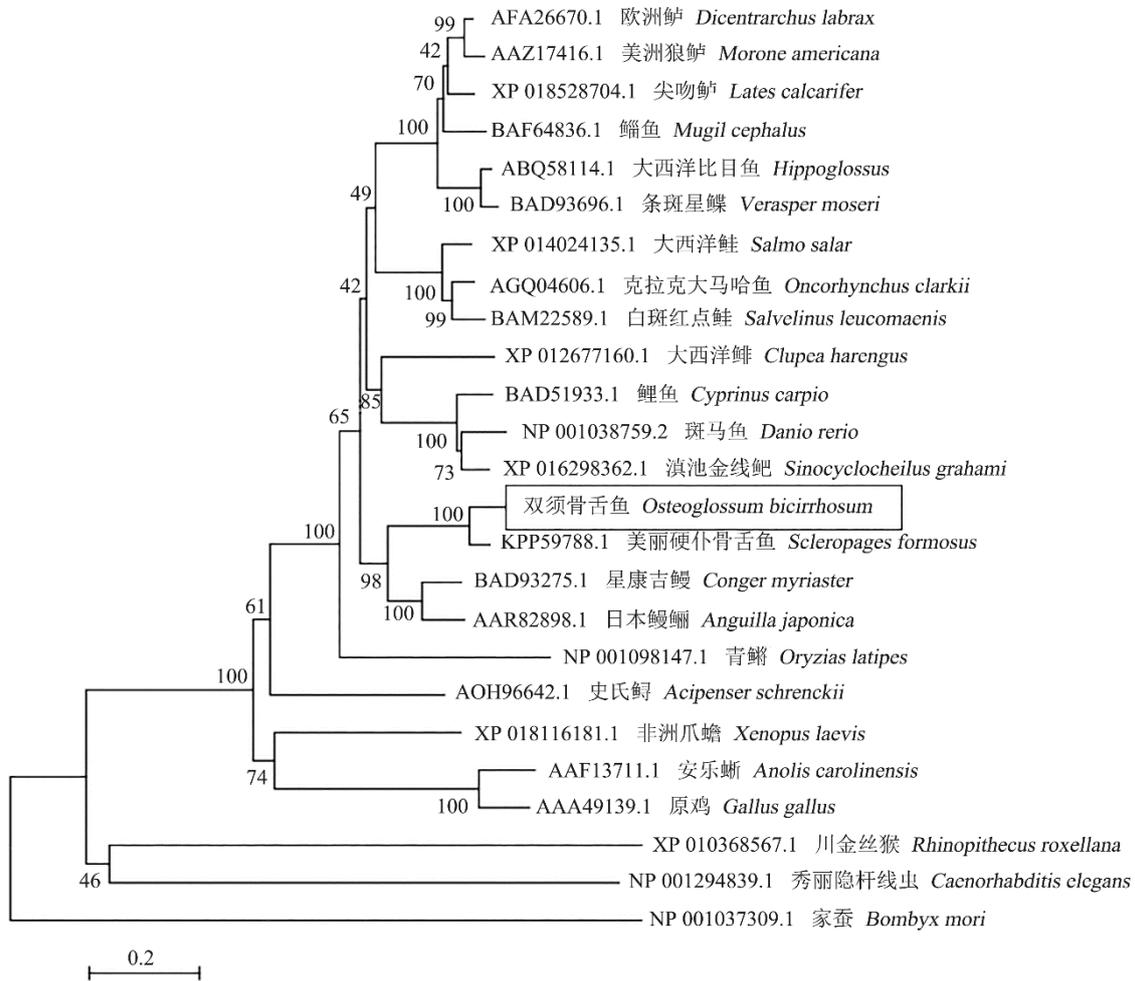


图 5 基于 *vtg* 基因编码蛋白质序列构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on *vtg* gene coding protein sequence

各支上数值表示经 1 000 次运算得到的引导值; 标尺表示每单位氨基酸的变化率。

The values on each branch represent the guiding values obtained by 1 000 operations; The scale represents the rate of change per unit of amino acid.

#### 2.4 双须骨舌鱼 *vtg* 基因的原核表达分析

重组的 pEASY-BluntE2-*vtg* 原核表达载体经测序和序列比对确认未出现移码现象和碱基突变, 是正确的开放阅读框 (ORF)。将重组质粒分别转化至 BL21 (DE3)、TransB (DE3) 和 Transetta (DE3) 表达感受态细胞中, 在 37 °C 下, 添加不同浓度的 IPTG 进行诱导表达后, 用 PBS 悬浮菌液, 10% SDS-PAGE 胶电泳后经考马斯亮蓝染色液染色, 脱色观察, 在 IPTG 浓

度为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L 诱导条件下, 在 BL21 (DE3) 和 TransB (DE3) 感受态细胞中都未表达 (图 8), 而在 4 种不同 IPTG 浓度诱导下的 Transetta (DE3) 感受态细胞中均出现分子量为 180 ku 左右与目的蛋白大小相符的表达信号带 (图 8)。

为确认该蛋白表达情况, 将重组 pEASY-BluntE2-*vtg* 质粒转入 Transetta (DE3) 表达感受态细胞中, 经不同 IPTG 浓度诱导表达成功

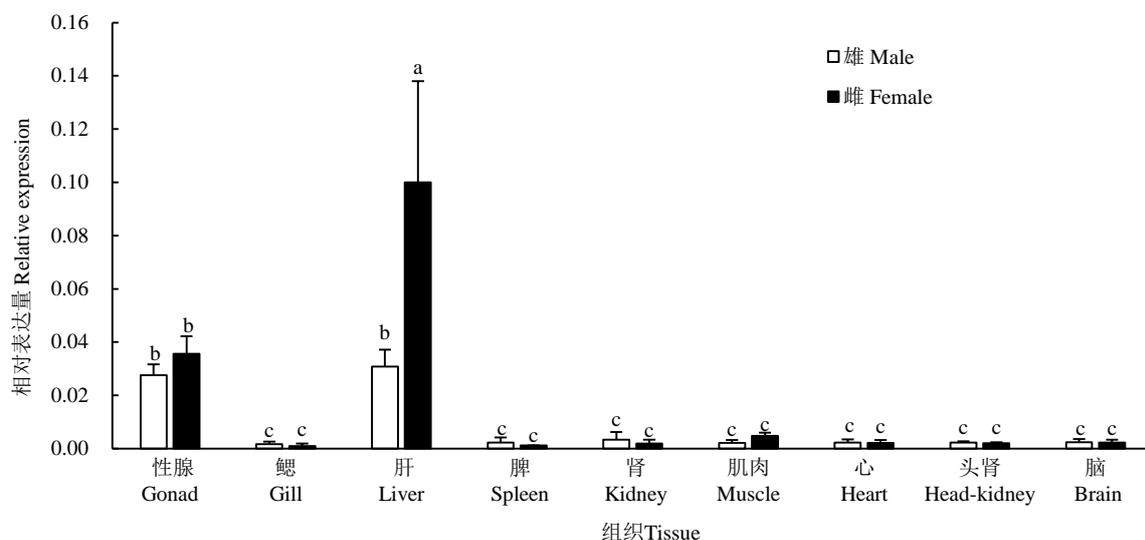


图 6 双须骨舌鱼不同组织中 vtg 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of vtg gene in different tissues of *Osteoglossum bicirrhosum*

不同字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母则差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

Different letters indicated significant difference between groups ( $P < 0.05$ ), the same letters indicated non-significant difference ( $P > 0.05$ ).

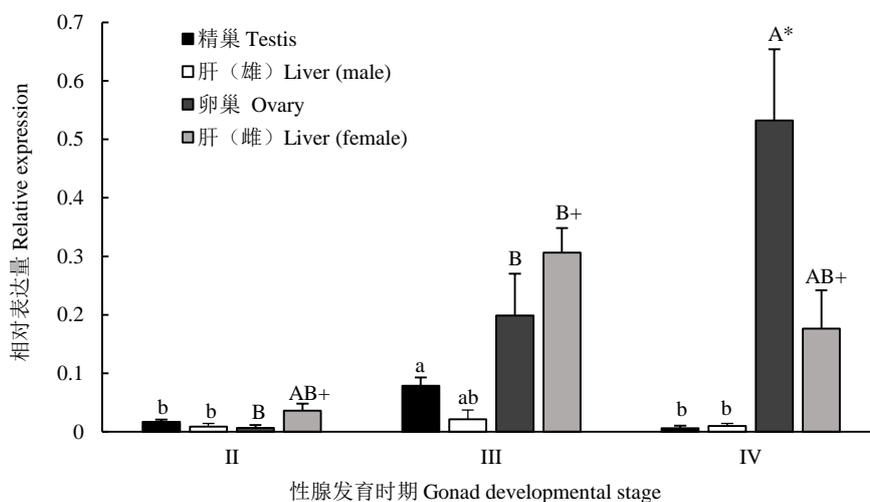


图 7 双须骨舌鱼不同时期 vtg 基因相对表达量

Fig. 7 Relative expression of vtg gene at different developmental phases of *Osteoglossum bicirrhosum*

小写字母表示雄鱼精巢和肝的差异显著分析, 大写字母表示雌鱼卵巢和肝的差异显著分析; 在不同发育期的同一组织中, 不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 含相同字母则差异不显著 ( $P > 0.05$ ); “\*”代表雌雄鱼性腺组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); “+”表示雌雄肝组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 并都标于高的一端。

The lowercase letters indicate the significant difference between the testis and the liver of the male; the capital letters indicate the significant difference between the testis and the liver of the female; In the same tissue at different developmental stages, different letters indicated significant difference between groups ( $P < 0.05$ ), the same letters showed non-significantly difference ( $P > 0.05$ ); “\*” represented significant difference between male and female gonad groups ( $P < 0.05$ ); “+” indicated significant difference between male and female liver groups ( $P < 0.05$ ), and were marked at the high end.

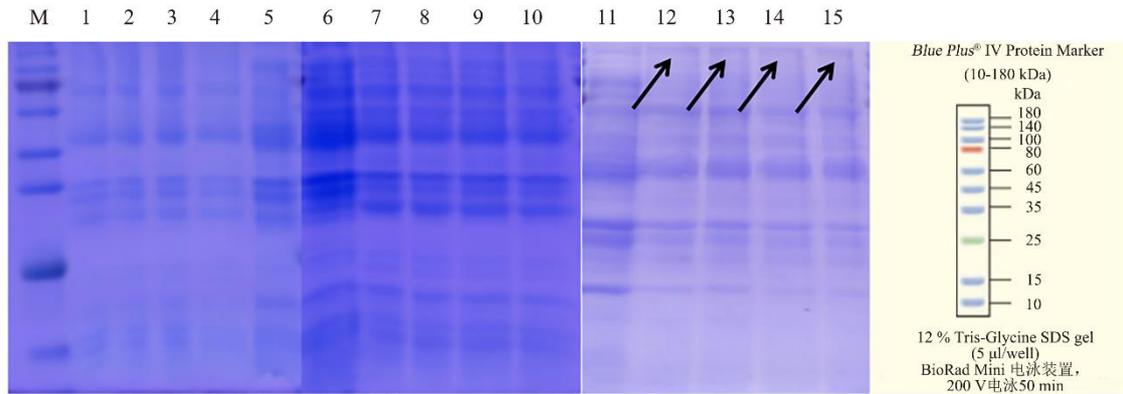


图 8 10% SDS-PAGE 凝胶检测蛋白表达

Fig. 8 Determination of protein expression by 10% SDS-PAGE gel

M. Blue Plus IV 蛋白分子量标准; 2~5. BL21 (DE3) 表达感受态菌体蛋白; 7~10. TransB (DE3) 表达感受态菌体蛋白; 12~15. Transetta (DE3) 表达感受态菌体蛋白; 1, 6, 11 为未加 IPTG 诱导的菌体蛋白; 2, 7, 12 为 0.1 mmol/L IPTG 诱导; 3, 8, 13 为 0.2 mmol/L IPTG 诱导; 4, 9, 10 为 0.5 mmol/L IPTG 诱导; 5, 10, 15 为 1.0 mmol/L IPTG 诱导; 箭头为目的蛋白。

M. Blue Plus IV Protein Marker; 2 - 5. BL21 (DE3) Chemically Competent Cell bacteria protein; 7 - 10. TransB (DE3) Chemically Competent Cell bacteria protein; 12 - 15. Transetta (DE3) Chemically Competent Cell bacteria protein; 1, 6, 11 showed a protein that was not induced by IPTG; 2, 7, 12 are induced by 0.1 mmol/L IPTG; 3, 8, 13 were induced by 0.2 mmol/L IPTG; 4, 9, 10 are induced by 0.5 mmol/L IPTG; 5, 10, 15 were induced by 1.0 mmol/L IPTG; arrows indicated the expected protein.

的剩余菌体超声破碎后, 分别取上清和沉淀点样至 10% SDS-PAGE 胶, 考马斯亮蓝染色, 观察结果显示该蛋白只在沉淀菌体中表达, 而在上清菌体中无信号, 表明在 Transetta (DE3) 载体的表达体系中该蛋白表达形式为包涵体形式存在 (图 9)。将获取的融合蛋白用抗 His 标签的抗体作为一抗进行 Western-blotting 检测, 在 180 ku 附近出现特异性目的条带, 与预期的大小相符, 说明该重组质粒在 Transetta (DE3) 表达感受态细胞中成功表达 (图 10)。

### 3 讨论

#### 3.1 序列分析

本研究以雌性双须骨舌鱼肝组织总 RNA 反转录 cDNA 为模板, 用 RACE 技术克隆获得双须骨舌鱼 *vtg* 全序列, 经 BLASTP 系统进行氨基酸序列同源性检索发现与其他脊椎动物的 *vtg* 基因结构相似, 含有 4 个结构域, 分别为脂蛋白氨基末端结构域 (LPD-N)、血管血友病因子 D 型结构域 (vWD) 和 2 个未知功能结构域 (DUF1943 和 DUF1944)。根据用 NCBI 中的 CDD 保守结构域数据库分析发现, 脂蛋白氨基末端结构域包含卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, LV) LV1n 链的两个结构域、微粒体甘油三酯转运蛋白和载脂蛋白 B-100, 这些蛋白质都参与脂质运输。这与 Babin 等 (1999) 研究发现 VTG 是属于古老的超家族脂转运蛋白的结果相一致。说明双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质属于脂类运输蛋白。还有研究者在剑尾鱼 (刘春等 2010)、泥鳅 (吴美琴等 2014) 等鱼类 *vtg* 基因序列分析也发现含有相类似的卵黄脂磷蛋白 (LV) 结构, 具有结合维生素、脂类和金属离子 ( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等) 功能。推测双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质也可能对能量和营养物质供应发挥重要作用。

血管血友病因子 D 型结构域 (vWD) 是血管血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 与血液凝集因子 VIII 结合的重要区域, 也是正常聚

血管血友病因子 D 型结构域 (vWD) 是血管血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 与血液凝集因子 VIII 结合的重要区域, 也是正常聚

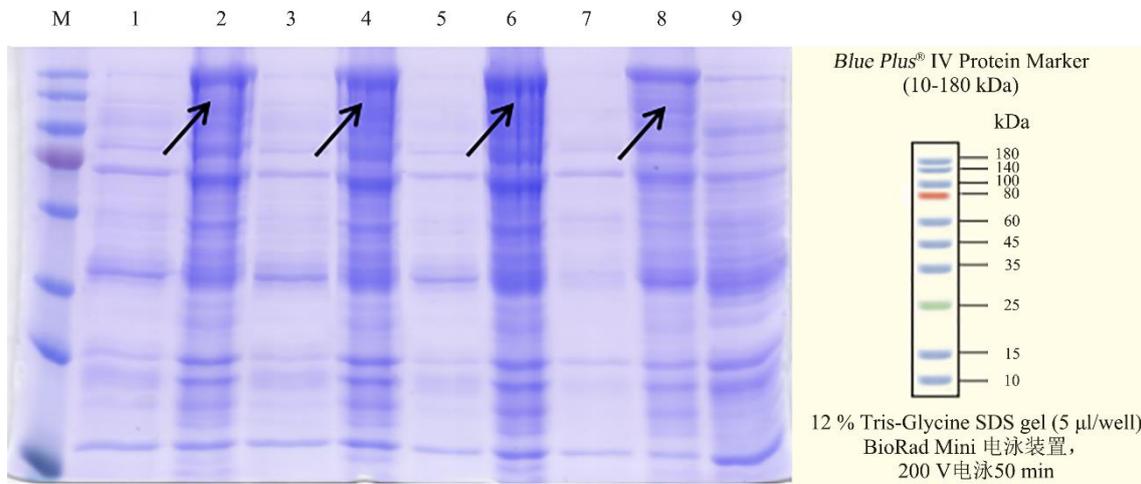


图 9 10% SDS-PAGE 凝胶检测蛋白表达

Fig. 9 Determination of protein expression by 10% SDS-PAGE gel

M. Blue Plus IV 蛋白分子量标准；1、2. 0.1 mmol/L IPTG 诱导破碎后的上清和沉淀；3、4. 0.2 mmol/L IPTG 诱导破碎后的上清和沉淀；5、6. 0.5 mmol/L IPTG 诱导破碎后的上清和沉淀；7、8. 1.0 mmol/L IPTG 诱导破碎后的上清和沉淀；9 为未诱导的全菌；箭头为目的蛋白。

M. Blue Plus IV Protein Marker; 1, 2 were induced by 0.1 mmol/L IPTG after the breakup of the supernatant and precipitation; 3, 4 were induced by 0.2 mmol/L IPTG after the breakup of the supernatant and precipitation; 5, 6 were induced by 0.5 mmol/L IPTG after the breakup of the supernatant and precipitation; 7, 8 were induced by 1.0 mmol/L IPTG after the breakup of the supernatant and precipitation; 9 for the whole bacteria don't induce; arrows indicated the expected protein.

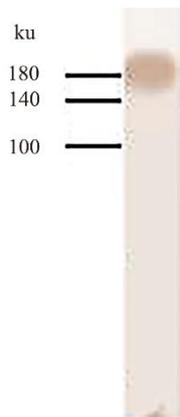


图 10 Western-blotting 融合蛋白分析图

Fig. 10 Western blotting analysis of fusion protein

合血管血友病因子 (vWF) 所必需的场所 (Pauling et al. 1951)。玫瑰无须鲃 (师晓栋 2004) 和文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) (Zhang et al. 2005) 的 VTG 均具有凝集血细

胞的活性,推测双须骨舌鱼 VTG 也可能具有凝血功能,且可能是双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质序列中存在血管血友病因子 D 型结构域 (vWD) 对血液凝集发挥着重要的作用。此外,根据双须骨舌鱼 *vtg* 序列预测蛋白含有 2 个未知功能的结构域 (DUF),由多个  $\beta$ -折叠结构组成,这与免疫球蛋白 IgG 蛋白结构相似。在李磊 (2009) 对斑马鱼 VTG 研究中也发现类似结构域 (图 3),并且该结构对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有抑制作用,据此推测双须骨舌鱼 *vtg* 推导的蛋白序列中这两个结构域与其机体免疫功能有关。

通常鱼类 VTG 结构域是由信号肽 (signal peptide)、脂磷蛋白重链 (lipophosphoprotein heavy chain, LvH)、高磷蛋白 (phosphorus protein, Pv)、脂磷蛋白轻链 (lipophosphoprotein light chain, LvL)、 $\beta'$ 成分 ( $\beta'$ -c) 和 C 端编码

区 (Ct) 依次排列形成 NH<sub>2</sub>-LvH-Pv-LvL-β' c - Ct-COOH (Hiramatsu et al. 2006)。依据理化性质、生理功能和代谢方式的不同, Hiramatsu 等 (2002) 将含有完整结构域的 *vtg* 基因分为 *vtg-A* 和 *vtg-B* 两个基因类型。Wang 等 (2000) 研究斑马鱼 *vtg* 基因发现, *vtg3* 基因推导的蛋白质氨基酸编码内未找到高磷蛋白 (Pv) 结构, 因此将其命名为高磷蛋白 (Pv) 缺失型 (Pv-less *vtg*, *vtg-C*)。分析本研究双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质序列也不含有高磷蛋白 (Pv) 结构域, 与已报道的真骨鱼类中的真鲷 (*Pagrus major*) (Sawaguchi et al. 2006)、食蚊鱼 (*Gambusia affinis*) (Sawaguchi et al. 2005)、美洲白鲈 (*Morone americana*) (Ma et al. 2006) 等的 *vtg* 都同属于 *vtg-C* 类。Wang 等 (2000) 研究认为, *vtg-C* 类为脊椎动物中较为古老的 *vtg* 类型, 是无脊椎动物向脊椎动物过渡的一种 *vtg* 结构。双须骨舌鱼 *vtg* 编码蛋白质系统发育分析结果表明, 其与美丽硬仆骨舌鱼聚为一支, 二者均为骨舌鱼科中现存 7 种鱼类活化石代表之一 (汪学杰等 2011)。

### 3.2 各组织表达差异性分析

VTG 合成方式分为内源性和外源性两种, 而目前研究表明, 大多数鱼类 VTG 合成方式为外源性, 即由卵巢以外的其他器官合成, 再通过血液循环运输至卵巢, 被卵母细胞吸收, 从而为胚胎发育提供营养。现今绝大部分研究者认为, 肝是鱼类 VTG 合成主要器官, 但有学者发现在斑马鱼卵巢滤泡细胞也能合成 VTG, 从而表明鱼类也可能有内源性合成 VTG 的途径 (Liu et al. 2013)。有研究表明, 诸氏鲮虾虎鱼 (*Mugilogobius chulae*) *vtg* 基因类型属于 *vtg-C* 类, 在肝中 *vtg-C* 的相对表达量最高, 肠和脾只有微量表达, 而在鳃、肌肉、脑和卵巢组织中未检测到表达 (余露军等 2016)。刘春等 (2011) 发现剑尾鱼的 *vtg-C* 在肝中相对表达量最高, 在卵巢、脾和肾组织中微量表达, 鳃、肌肉和脑组织无表达。Tong 等 (2004) 只在青鳉和斑马鱼肝中检测到 *vtg-A* 表达, 而在其他

组织中均未表达。本研究利用 rt-PCR 方法对发育至 III 期左右的雌雄双须骨舌鱼的 9 个组织进行 *vtg* 相对表达量检测, *vtg* 在雌雄鱼的肝组织中相对表达量最高, 其次是卵巢和精巢, 在鳃、脾、肾、肌肉、心、头肾、脑 7 个组织均为极微量表达, 说明双须骨舌鱼 *vtg* 也主要是在肝组织中表达。本研究在卵巢和肝中都检测到 *vtg* 的表达, 推测双须骨舌鱼 VTG 合成方式可能同时存在内源和外源性。Unuma 等 (1998) 对海胆 (*Pseudocentrotus depressus*) 雌雄个体进行免疫印迹与免疫组化研究, 发现 *vtg* 在雌雄个体的性腺均有表达, 且 *vtg* 在精巢的表达量随着雄性个体的发育逐渐变少, 因此他们推断 VTG 可能是为精子发育提供营养物质。本研究在双须骨舌鱼精巢内也检测到 *vtg* 的表达, 其生理功能还需进一步研究。

本研究发现, *vtg* 在雌鱼 3 个时期的肝组织与第 IV 期卵巢中的表达量都显著高于雄鱼, 再一次说明 *vtg* 主要在雌性个体中表达。在雌鱼肝组织中的 *vtg* 表达量呈现先增后减的变化趋势, 这一结果与 Perazzolo 等 (1999) 所报道的虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 组织中 *vtg* 表达量变化规律基本相似。出现这一变化趋势可能是由于在卵巢发育的早期 (II 和 III 期) 双须骨舌鱼肝组织合成 VTG 较为旺盛, 其表达水平也不断上升, 至 III 期达到最大值; 卵巢发育至 IV 或 V 期时, VTG 合成并积累到一定程度, 机体通过负反馈调节, 抑制了肝组织合成 VTG, 致使肝中的 *vtg* 的表达量降低, 但本研究处于初期阶段, 还未对不同时期双须骨舌鱼的蛋白含量进行检测, 所以还需下一步实验来验证以上推论。卵巢中 *vtg* 的表达量随卵巢不断发育, 呈逐步升高趋势, 其中第 IV 期 *vtg* 表达量显著高于 II 和 III 期。而因本研究对象性成熟较晚, 受雌雄难辨等因素影响, 未能收集到 V 和 VI 期双须骨舌鱼。但是根据其他研究者在尼罗罗非鱼 (罗明坤等 2015)、河川沙塘鳢 (*Odontobutis potamophila*) (李加敏等 2013)、斑鳅 (*Siniperca scherzri*) (Yang et al. 2010)、哲罗鲑 (王凤等

2009) 等鱼类的研究发现卵巢中 *vtg* 表达量最高应该为第 V 期。双须骨舌鱼是否如此尚需进一步实验证实。以上结果表明, *vtg* 基因在雌性双须骨舌鱼的卵巢和肝中均有较高水平表达, 故推测卵巢和肝都可能为 VTG 的合成器官, 且在 III 期前肝组织合成 VTG 较为活跃, 而至 IV 后则卵巢合成 VTG 表现活跃。

### 3.3 原核表达分析

构建原核表达系统是探究 VTG 的表达情况与研究蛋白功能的简便、快捷和高效的方法, 该方法具有易操作、稳定性强、产量高等特点 (Esposito et al. 2006)。目前已经在剑尾鱼 (刘春等 2007)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) (刘文生等 2014)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonica*) (陈吉刚等 2010) 等多种鱼类上实现通过分子生物学技术构建原核表达体系来探究 *vtg* 的表达模式。本研究共选用了 BL21 (DE3)、TransB (DE3) 和 Transetta (DE3) 3 种表达感受态细胞, 发现重组质粒只在 Transetta (DE3) 中可获得分子量 180 ku 左右的表达产物。表达产物经 Western-blotting 检测表明该产物能被抗 His 标签特异性识别, 分子量大小与预期目的蛋白大小相符, 证实其为目的融合蛋白。Transetta (DE3) 是携带氯霉素抗性质粒 BL21 的衍生菌, 补充大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子 (AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA) 对应的 tRNA 可提高外源基因尤其是真核基因在原核系统中的表达水平。结果发现, 在相同诱导温度和诱导时间, 在 4 种浓度的 IPTG 诱导下该载体都能成功表达, 而最适诱导浓度还需进一步用标准品建立标准曲线来分析确定。本研究所得融合蛋白以包涵体形式表达, 主要原因可能是因为大肠杆菌细胞质偏还原性的环境中蛋白质容易形成错配的二硫键。后续会进行多克隆抗体制备, 形成包涵体并不影响抗体制备。本研究通过优化诱导条件获得纯度较高的双须骨舌鱼 VTG 菌体蛋白, 可用于后期制备多克隆抗体以建立酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 检测方法, 从而为建立准确、高效和

便捷的性别鉴定方法, 提高双须骨舌鱼人工繁殖效率奠定基础。

### 参 考 文 献

- Babin P J, Bogerd J, Kooiman F P, et al. 1999. Apolipoprotein II/ I, apolipoprotein b, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *Journal of Molecular Evolution*, 49(1): 150–160.
- Esposito D, Chatterjee D K. 2006. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4): 353–358.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, et al. 2006. Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biology*, 149(1): 35–47.
- Hiramatsu N, Matsubara T, Hara A, et al. 2002. Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(4): 355–370.
- Idler D R, Campbell C M. 1980. Gonadotropin stimulation of estrogen and yolk precursor synthesis in juvenile rainbow trout. *General & Comparative Endocrinology*, 41(3): 384–391.
- Liu K C, Wu R S S, Ge W. 2013. Luteinizing hormone receptor (*lhcr*) as marker gene for characterizing estrogenic endocrine-disrupting chemicals in zebrafish ovarian follicle cells. *General and Comparative Endocrinology*, 192: 89–94.
- Ma M, Ot C. 2006. Potential threat of the international aquarium fish trade to silver arowana *Osteoglossum bicirrhosum* in the Peruvian Amazon. *Oryx*, 40(4): 152–160.
- Pauling L, Corey R B, Branson H R. 1951. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37(4): 205–211.
- Perazzolo L M, Coward K, Davail B, et al. 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biology of Reproduction*, 60(5): 1057–1068.
- Pottinger T G, Pulman K G T, Carrick T R, et al. 2005. Evaluation of

- biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. *Journal of Fish Biology*, 67(6): 1514–1533.
- Sawaguchi S, Kagawa H, Ohkubo N, et al. 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Molecular Reproduction & Development*, 73(6): 719–736.
- Sawaguchi S, Koya Y, Yoshizaki N, et al. 2005. Multiple vitellogenins (vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): identification and characterization of three functional vg genes and their circulating and yolk protein products 1. *Biology of Reproduction*, 72(4): 1045–1060.
- Shimizu M, Fujiwara Y, Fukada H, et al. 2002. Purification and identification of a second form of vitellogenin from ascites of medaka (*Oryzias latipes*) treated with estrogen. *Journal of Experimental Zoology*, 293(7): 726–735.
- Sire M F, Babin P J, Vernier J M. 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *Journal of Experimental Zoology*, 269(1): 69–83.
- Tong Y, Shan T, Poh Y K, et al. 2004. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 $\beta$ -estradiol. *Gene*, 328(7): 25–36.
- Turner R T, Dickhoff W W, Gorbman A. 1981. Estrogen binding to hepatic nuclei of Pacific hagfish, *Eptatretus stouti*. *General & Comparative Endocrinology*, 45(1): 26–29.
- Unuma T, Suzuki T, Kurokawa T, et al. 1998. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin, *pseudocentrotus depressus*. *The Biological Bulletin*, 194(1): 92–97.
- Utarabhand P, Bunlipatanon P. 1996. Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): isolation and properties. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 115(2): 101–110.
- Wang H, Yan T, Tan J T, et al. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (*vg3*) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, 256(2): 303–310.
- Yang W, Zhao J L, Deng Y F, et al. 2010. A preliminary study on the relationship between ovary development and the content changes of serum phosphoprotein of *Siniperca scherzeri*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 19(2): 162–166.
- Zhang S, Sun Y, Pang Q, et al. 2005. Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(1): 93–95.
- Zhang Y, Qu Q, Sun D, et al. 2011. Vitellogenin in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): induction, purification and changes during the reproductive cycle. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2): 660–665.
- 陈吉刚, 杨季芳, 任萍, 等. 2010. 鲈鱼 *hepcidin* 原核表达及生物学活性测定. *水生生物学报*, 34(3): 554–561.
- 李加敏, 朱嘉洁, 杨威, 等. 2013. 河川沙塘鳢雌鱼性成熟过程中卵黄蛋白原含量变化. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 30(2): 17–21.
- 李磊. 2009. 斑马鱼 *Danio rerio* 卵黄蛋白原的免疫功能研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文.
- 李育培, 刁晓明, 盛晓洒, 等. 2010. 瓦氏黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli*) 卵黄蛋白原的纯化、性质鉴定及 ELISA 检测方法的建立. *海洋与湖沼*, 41(1): 91–98.
- 刘春, 李凯彬, 耿冬雨, 等. 2010. 剑尾鱼 2 种卵黄蛋白原全长 cDNA 的克隆及序列分析. *中国水产科学*, 17(1): 31–43.
- 刘春, 李凯彬, 王芳, 等. 2007. 剑尾鱼卵黄蛋白原基因片段克隆、表达及蛋白检测方法的建立. *中国水产科学*, 14(6): 883–888.
- 刘春, 李凯彬, 王芳, 等. 2011. 剑尾鱼卵黄蛋白原 C (VgC) 全长 cDNA 的克隆及表达. *水产学报*, 35(10): 1441–1449.
- 刘文生, 苏莲娇, 李美娟, 等. 2014. 黄颡鱼 IGF-I 基因 cDNA 的克隆及原核表达. 长沙: 中国水产学会学术年会论文摘要集.
- 罗明坤, 赵金良, Jeerawat T, 等. 2015. 尼罗罗非鱼卵巢发育过程中中性类固醇激素与卵黄蛋白原含量变化及 Vtg mRNA 表达特征. *中国水产科学*, 22(6): 1123–1132.
- 师晓栋. 2004. 玫瑰无须鲷卵黄蛋白原和卵磷脂蛋白的纯化、鉴定、免疫分析和功能研究. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文.
- 田媛, 牟希东, 汪学杰, 等. 2013. 双须骨舌鱼形态特征与核型分析. *上海海洋大学学报*, 22(2): 173–177.
- 汪学杰, 胡隐昌, 牟希东, 等. 2011. 龙鱼的养护与鉴赏. 广东: 广东科技出版社, 8–10.
- 汪学杰, 田媛, 刘奕, 等. 2014. 双须骨舌鱼性腺发育的组织学观

- 察. 水产学报, 38(4): 525–531.
- 王凤, 张颖, 佟广香, 等. 2009. 哲罗鲑生殖周期中血清卵黄蛋白原浓度的 ELISA 检测. 上海海洋大学学报, 18(6): 673–679.
- 王且鲁, 刘奕, 宋红梅, 等. 2016. 双须骨舌鱼抗缪勒氏管激素基因 *amh* 的克隆、组织表达分析和原核表达. 水产学报, 40(12): 1801–1812.
- 吴美琴, 西宫攻, 平松尚志, 等. 2014. 泥鳅卵黄蛋白原的分子生物学及免疫学研究. 长沙: 中国水产学会学术年会论文摘要集.
- 姚静, 方展强. 2010. 唐鱼卵黄蛋白原的 ELISA 检测方法的建立. 中国实验动物学报, 18(3): 242–246.
- 余露军, 蔡磊, 李舸, 等. 2016. 诸氏鲮虾虎鱼卵黄蛋白原基因全长 cDNA 的克隆及表达. 海洋科学, 40(9): 23–31.
- 郑尧, 陈家长, 邢旭文, 等. 2016. 彭泽鲫 F-1、F-2 代雌雄鱼 VtgB 和 ZP2 表达及卵黄蛋白原含量差异研究. 水产科学, 35(4): 370–375.

(上接第 581 页)



图 1 2017 年 5 月 6 日无人机拍摄到重引入丹顶鹤 BJJ008 (左 1, ♀) 家庭在江苏盐城野外成功繁育后代, 箭头指示新出生幼鹤

Fig. 1 Successful breeding of re-introduced Red-Crowned Crane (left 1, ♀) in Yancheng, Jiangsu Province, China, the red arrow points the chick, photo by unmanned aerial vehicle on 6 May 2017

2015 年 3 月在黑龙江林甸湿地野化放飞的丹顶鹤雌鸟 (环志号: BJJ0014), 于当年春季在放飞地与野生丹顶鹤配对并成功繁殖 1 只雏鸟。BJJ0014 号丹顶鹤 2010 年春季出生于吉林向海国家级自然保护区, 亲鸟孵化, 人工育幼。2015 年 3 月 25 日因重引入项目放飞于黑龙江林甸湿地, 该丹顶鹤放飞后 GPS 追踪器即失去信号, 处于失联状态。2015 年 5 月 25 日, 护林员付建国在林甸芦苇 (*Phragmites australis*) 沼泽发现该丹顶鹤 (右腿红色旗标: Q0014) 与野生丹顶鹤的繁殖巢, 并发现巢中有 1 只孵化出壳约 2 ~ 3 d 的雏鸟, 约 20 d 后在巢址附近再次观察到该丹顶鹤家庭幼鸟随亲鸟活动。

2015 年 1 月在江苏盐城湿地珍禽国家级自然保护区野化放飞的 2 只丹顶鹤雌鸟 (环志号: BJJ001、BJJ008), 于 2017 年春季在盐城湿地分别配对成功, 并且各繁殖成功 1 只雏鹤。这 2 只雌性丹顶鹤均是 2012 年出生于北京动物园, 亲鸟孵化, 人工育幼。2017 年春季, 根据 GPS 追踪器监测活动规律, 发现其坐巢行为。2017 年 4 月 28 日, 借助无人机发现雌性丹顶鹤 BJJ001 家庭在芦苇荡成功孵化出壳 1 只雏

鸟。2017 年 5 月 6 日, 借助无人机发现并拍摄到雌性丹顶鹤 BJJ008 家庭也在芦苇荡成功孵化出壳 1 只雏鸟 (图 1); 11 月下旬, 在盐城芦苇荡里再次目击丹顶鹤 BJJ008 家庭幼鸟随亲鸟活动, 至此, 该幼鹤野外出生并存活超过 180 d。