

vasa 基因研究进展

陈玉冬^① 邹志华^① 王艺磊^{①*} 张子平^②

(^① 集美大学水产学院 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室 厦门 361021;

^② 德克萨斯州立大学化学和生物化学系 圣马克斯 美国 TX 78666)

摘要: DEAD-box 家族基因编码一类 ATP 依赖的 RNA 解旋酶。经系统进化分析可将该家族蛋白分为 VASA、PL10 和 p68 三个亚家族。其中 *vasa* 基因最先在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中被发现,在许多动物中都已经克隆得到其同源基因,研究显示 *vasa* 基因在生殖细胞系中特异性表达,在许多生物中为生殖细胞形成和配子发生所需。有趣的是在果蝇中 VASA 蛋白是生殖质的组成部分,而在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中 *vasa* mRNA 才是生殖质的组成部分。本文主要综述了 *vasa* 基因及其蛋白的结构、功能、表达和作为原生殖细胞分子标记物的应用等方面的内容,并展望了其研究前景。

关键词: *vasa*; VASA 蛋白; DEAD-box; 生殖细胞; 配子发生

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)04-173-08

Progress in Studies of *vasa* Gene

CHEN Yu-Dong^① ZOU Zhi-Hua^① WANG Yi-Lei^{①*} ZHANG Zi-Ping^②

(^① The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

^② Department of Chemistry and Biochemistry, Texas State University, San Marcos TX 78666, USA)

Abstract: DEAD-box family genes encode ATP-dependent RNA helicase proteins, which are divided into VASA, PL10 and p68 sub-families by phylogenetic analysis. *vasa* gene was firstly discovered in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) and since then its homologous genes have been cloned in various animal species. Researches revealed a specific expression of *vasa* gene in the germ cells. The *vasa* gene is essential for germ cell formation and gametogenesis. Interestingly in fruit fly, VASA protein is a component of the germ plasm, while *vasa* mRNA is a component of the germ plasm in zebrafish (*Danio rerio*). In this paper, the structure, function, expression pattern and the application of the *vasa* gene as a molecular marker of primordial germ cells are reviewed, and the perspective of *vasa* gene studies is also introduced.

Key words: *vasa*; VASA-protein; DEAD-box; Germ cells; Gametogenesis

DEAD-box RNA 解旋酶是一个依赖 ATP 的 RNA 解旋酶大家族^[1],广泛存在于从原核生物的细菌到真核生物的酵母、植物和动物中,该家族是以具有保守的 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 序列来命名的^[2]。此蛋白参与细胞 RNA 转录调节、前体 mRNA 的剪接、核内 mRNA 的运输、翻译起始的调控、细胞器基因的表达及 RNA 的降解等过程,因此在 RNA 代谢过程中起重要作用^[1]。VASA 蛋

白是 DEAD-box 蛋白家族的重要成员^[3-4] 是决定

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30571430),福建省自然科学基金项目 (No. 2009J01179),集美大学创新团队基金项目 (No. 2008A001);

* 通讯作者, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn;

第一作者介绍 陈玉冬,女,硕士研究生;研究方向:甲壳动物功能基因组学;E-mail: chen Yudong@hotmail.com.

收稿日期:2009-12-22,修回日期:2010-04-26

生殖系发育的重要调控因子之一。

vasa 是 Schüpbach 等于 1986 年在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中首次报道, 并发现其是腹节形成和生殖细胞发育过程所必需的成分之一^[5]。此后, 这一基因也在许多其他物种中相继被发现, *vasa* 基因在已研究的大部分物种中仅在生殖细胞中特异表达。本文就 *vasa* 基因的研究进展进行综述。

1 *vasa* 基因克隆及结构的研究

vasa 基因具有高度的保守性, 继果蝇的 *vasa* 基因被克隆后, 在线虫 (*Caenorhabditis elegans*, CEU62772)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, AAB33364)、斑马鱼 (*Danio rerio*, AF461759)、家蚕 (*Bombyx mori*, NM_001043882)、涡虫 (*Dugesia japonica*, AB017002)、鸡 (*Gallus gallus domesticus*, AB004836)、人 (*Homo sapiens*, AY004154)、水螅 (*Hydra magnipapillata*, XM_002161837)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*, AY423380)、水蚤 (*Daphnia magna*, AB193324)、紫球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*, NM_001146193)、沙蚕 (*Platynereis dumerilii*, AM114778)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*, DQ095772)、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*, DQ452383)、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*, EF206693)、刺参 (*Apostichopus japonicus*, EU273885)、夏威夷明钩虾 (*Parhyale hawaiiensis*, EU289291) 和本实验室研究的拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*, GU187045) 等物种中均陆续克隆了 *vasa* 的同源基因。由于该基因仅在大多数物种的生殖细胞中特异表达, 因此已经被作为一种分子标记物来研究原生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的起源、迁移、分化的过程及应用于配子发生过程。

统计分析发现不同物种之间的 *vasa* 基因编码的氨基酸数存在较大的差异, 最少为 93 个氨基酸, 最多为 801 个氨基酸。例如栉孔扇贝的 *vasa* 基因编码 801 个氨基酸; 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) *vasa* 基因编码 647 个氨基酸; 而家蚕 *vasa* 基因的其中一种型 (strain

Dazao clone 2, FJ542312) 只编码 93 个氨基酸; 本实验室研究的拟穴青蟹 *vasa* 基因则编码 632 个氨基酸。而且不同物种间 *vasa* 基因外显子和内含子也存在很大差异, 斑马鱼 *vasa* 基因含有 27 个外显子和 26 个内含子; 而家蚕的 *vasa* 基因只含有 13 个外显子和 12 个内含子。此外, 研究者发现 *vasa* 基因在同一物种中存在选择性剪接。如斑马鱼 VASA 蛋白短型在 N 末端比长型缺少 16 个氨基酸, 即缺少第 4 个外显子^[6]; 罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) VASA 蛋白短型在 N 末端比长型缺少 24 个氨基酸^[7]; 南方鲇 (*Silurus meridionalis*) *vasa* 基因中靠近 N 端的一段编码 21 个氨基酸的核苷酸序列在短型 *vasa* 基因中被选择性剪接掉^[8]; 同样, 家蚕雄性性腺中 *vasa* 样基因也存在选择性剪接, 与完整的 *vasa* 样基因相比, 其他 3 个短型 *vasa* 样基因分别缺少 8 个、6 个和 1 个外显子^[9], *vasa* 基因的这种选择性剪接与蛋白多样性的产生及其所执行的功能有关。

VASA 蛋白作为 DEAD-box 蛋白家族成员之一, 也具有 DEAD-box 的 9 个保守区域: AQTGSGKT (I)、PTRELA (Ia)、TPGRI (Ib)、DEAD (II)、SAT (III)、LVFVE (IV)、RGLD (V)、HRIGRTGR (VI) 和 xYxxPTPVQ (Q)^[10], 其中第 9 个保守区域 Q 框调节 ATP 的结合与水解, 该基序中保守的谷氨酰胺残基与腺嘌呤的第 6 和第 7 个 N 形成氢键^[11], 同样 Q 框与基序 I 相互作用对 ATP 和 RNA 的结合具有重要作用^[11]。基序 I、II 和 III 相互作用形成一个 ATP 水解的作用口袋, 其中基序 I 及 II 与 NTP 的结合和水解有关, 对 ATP 酶和解旋酶的活性起着至关重要的作用, 其任何一个关键氨基酸残基的突变均会导致这两种酶的活性降低, 甚至丧失其活性, 但不会影响 RNA 结合^[11-13]; 基序 III 对 ATP 酶和解旋酶的活性起桥梁作用, 其突变会导致解旋酶活性的丧失, 但是对 ATP 结合、RNA 水解和 RNA 结合的影响较小; IV、V、VI、Ia 和 Ib 结构域共同参与 RNA 的结合, IV、V 和 VI 共同调节 ATP 酶和解旋酶的活性, 保守区域 V 可以把 RNA 连接的信号传递给 ATP 酶

的作用区域,起到调控 ATP 的水解作用,然而 Ia、Ib 并不直接参与 ATP 的结合和水解^[13-14]; VASA 蛋白特有的锌指结构(CCHC 框)在 N 端随机分布,其可能参与核酸的结合,该结构重复的次数和结构与靶 RNA 分子的特异性有关^[15];此外,N 端 RGG 重复和 GG 富集区可能与 RNA 的结合有关,GG 基序参与翻译起始因子 4A (translation initiation factor 4A, eIF4A) 的相互作用^[16-17]。许多昆虫和脊索动物 VASA 蛋白的 N 端区域普遍存在 RGG 重复区,但并不是所有的 VASA 蛋白都存在 RGG 重复区和 GG 富集区,如刺参^[18]中的 VASA 蛋白的 N 末端比其他物种稍短,而且未发现 RGG 重复序列、GG 富集区和锌指结构,可见这些区域在刺参的 VASA 蛋白中并不是必需的,缺失的保守区域的功能可能由其他保守区域在空间上相互作用来实现^[13]。另外,在一些物种的 VASA 氨基酸中还具有 ARKF 框、GXVGXA 框和 EXEEXW 框等^[9,18-20]特异的结构,其中 ARKF 框位于 PTRELA 框和 GG 框之间,GXVGXA 框位于 SAT 和 RGLD 框之间,EXEEXW 框分布在 C 末端^[21],ARKF 框和 GXVGXA 框也存在于本实验室研究的拟穴青蟹 VASA 氨基酸中,但这 3 个保守结构具体功能还不清楚,有待进一步研究。

2 *vasa* 基因表达及其定位的研究

斑马鱼^[22]的原位杂交结果表明,在卵母细胞生长、发育的过程中,第 II 期卵母细胞的细胞质中 *vasa* mRNA 大量表达;第 III 期卵母细胞中的 *vasa* mRNA 分布在液泡之间;到第 IV 和 V 期,*vasa* mRNA 逐渐向皮层富集,最后定位于皮层区域。荧光定量 RT-PCR 显示,斑马鱼 *vasa* 基因在第 II 期卵母细胞中的表达量最高,第 III 期有所降低,从第 III 期到第 V 期表达量相对恒定。这种 *vasa* mRNA 量的变化,可能是第 II 期卵母细胞中 *vasa* mRNA 大量转录,转录后又发生了一定程度的降解,然后保持相对恒定。*vasa* mRNA 在卵子发生过程中各个阶段表达的差异表明, *vasa* 基因在卵子发生过程中起着重要的作用。

在非模式生物中,夏威夷明钩虾^[23]的 *vasa* mRNA 普遍分布在 1-细胞期至 16-细胞期,而且在 32-细胞之前均定位在生殖细胞中,但 VASA 蛋白在 100 细胞期才有表达。另外,中国明对虾^[20]的 *vasa* 基因在成体的性腺组织中特异表达,其主要在精原细胞和卵母细胞的胞质中表达显著,生长期的卵巢和精巢中 *vasa* 基因表达量明显高于成熟期的卵巢和精巢,这说明 *vasa* 基因表达量随着性腺成熟逐渐降低;荧光定量 RT-PCR 分析发现 2-细胞期至膜内无节幼体的各期胚胎都含有 *vasa* mRNA,但表达量逐渐降低,自出膜后的无节幼体开始检测不到表达信号。其精巢原位杂交显示杂交信号明显存在于精原细胞的胞质中,信号强度由小管边缘向中央依次减弱,精细胞中看不到明显的杂交信号;而卵巢原位杂交显示卵母细胞的胞质中有很强的杂交信号,其他体细胞中未发现明显杂交信号。本实验室研究的拟穴青蟹 *vasa* 基因在组织中的表达情况显示, *vasa* mRNA 只在精巢和卵巢中表达。此外,栉孔扇贝^[19]中的非性腺组织几乎检测不到 *vasa* 基因,而在性腺中,除了精子外的所有生殖细胞中均有表达;细胞进行有丝分裂时, *vasa* 基因在精原细胞和卵原细胞中的表达量达最高,减数分裂时生殖细胞中 *vasa* 基因的表达量则逐渐降低,成熟配子中降到最低,这与罗非鱼等物种中的表达情况十分相似。罗非鱼^[24]的 *vasa* 同源基因只在精原细胞和初级精母细胞中明显表达,减数分裂后期的生殖细胞(如次级精母细胞、精细胞及成熟卵)中表达不明显或未发现表达。*vasa* 基因在两性生殖细胞发育过程中表达情况存在明显差异,由此可推测 *vasa* 基因对非模式生物精子和卵子的产生与分化具有调控作用。

3 *vasa* 基因可能作为原生殖细胞的分子标记物

近年来,随着分子生物学技术的发展和广泛应用,关于生殖细胞的分子标记物的研究已有不少报道。如碱性磷酸酶在不同种属的 PGCs 中存在不同程度的表达,是研究生殖细胞

常用的分子标记物。碱性磷酸酶曾被作为家畜 PGCs 的标记物^[25],但是在后来 Palombi 等^[26]的研究中发现碱性磷酸酶不仅在 PGCs 中表达,而且在管周肌样细胞中也有表达,因此该标记方法特异性不好;此外碱性磷酸酶并不是在所有发育阶段的 PGCs 都有表达,它只适合于特定的发育阶段鉴定生殖细胞^[27],所以碱性磷酸酶并不是 PGCs 的理想标记物。Noce 等^[28]通过原位杂交技术发现锌指蛋白(zinc finger protein, Zfp)在精巢的精原细胞、初期精母细胞、睾丸索、生殖嵴及卵巢的卵母细胞和滤泡细胞中均有特异表达,因而曾被用作小鼠(*Mus musculus*)生殖细胞标记物,但因其特异性差,在神经外胚层也有表达,如外周神经节、神经嵴和运动神经,因此也不适宜作为 PGCs 的特异分子标记。Leroy 等^[29]曾应用 *PL10* 基因作为雄性生殖细胞的分子标记物,*PL10* 蛋白属于 DEAD-box 家族 ATP 依赖的 RNA 解旋酶,在多种生殖细胞中特异表达,但是彭茂宇等^[30]在研究中发现 *PL10* 基因在各组织中有广泛的表达,如 *PL10A* 基因和 *PL10B* 基因广泛存在于黄鳝(*Monopterus albus*)的各种组织中,*PL10A* 基因在卵巢、脾和肌肉中的量最多,在脑中略少,在精巢和肾中更少,在肝和心组织中未见存在;而 *PL10B* 基因在卵巢、脾、心和肾中较多,精巢、脑和肝中表达中等,在肌肉中未能检测到,所以 *PL10* 基因也不能作为生殖细胞的专一标记。

vasa 基因已经成为公认的 PGCs 和生殖细胞较为理想的分子标记物,在很多物种的生殖细胞中均有特异表达,可以很好的跟踪 PGCs 信号,从而揭示 PGCs 的产生、迁移和分化途径^[31]。

Yoon 等^[31]在 1997 年首次采用 *vasa* 基因标记斑马鱼 PGCs 的起源,研究中采用整体原位杂交发现 *vasa* 基因转录子定位在 2-细胞和 4-细胞期胚胎的卵裂面;在之后的卵裂中, *vasa* mRNA 将分布在少量的亚细胞群中,这些亚细胞群最终将分化成原始生殖细胞。在之后的研究中发现斑马鱼^[32]中 *vasa* mRNA 是生殖质的

组成部分,而不是 VASA 蛋白。这与果蝇中的发现不一致, VASA 蛋白才是果蝇生殖质的组成部分,对于生殖质的形成和生殖细胞的分化起着重要的作用^[33-34]。之后 Braat 等^[35]从蛋白的角度研究 VASA 蛋白,研究表明在最初的斑马鱼胚胎中 VASA 蛋白是母源性表达,其存在贯穿于整个胚胎发育过程中,但从 2-细胞到 1 000-细胞的胚胎中 VASA 蛋白则在卵裂球中央附近高度浓缩成“两点”,并长时间集中在分裂球的动物极。PGCs 中的 VASA 蛋白由亚细胞中颗粒状的结构组装而成,这种结构在整个发育过程中呈动态变化。继斑马鱼之后,有研究者用 *vasa* 基因作为标记物陆续在小鼠^[36]、鸡^[37]、太平洋牡蛎^[38]、水蚤(*Daphnia magna*)^[15]、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[39]及栉孔扇贝^[19]等物种中确认了 PGCs 的起源、迁移和分化。

4 *vasa* 基因参与配子发生的研究

配子发生是发育生物学研究的重要内容之一,不仅在理论上具有重大意义,在人工繁殖中也具有很好的指导作用。配子发生包括精子发生和卵子发生,其发生过程在后生动物中是大致相似的,即两性配子都要经过增殖、生长和成熟 3 个阶段。

vasa 基因在果蝇和斑马鱼中一样均为一母源性基因,如同真核生物的 *elF4A*,是卵母细胞中极质组成成分之一^[40],其产物存在于卵母细胞胞质中,在受精卵基因表达之前发挥重要的作用,是卵子发生顺利完成的关键基因^[4, 34]。VASA 蛋白是 RNA 结合蛋白之一,是极质的重要成分^[41],该基因发生任何突变都会导致生殖细胞无法正常形成。在卵子发生过程中, Gurken 蛋白对背腹侧极性的建立起关键性的作用^[40],而 VASA 蛋白的功能缺失将导致 Gurken 蛋白有效积累的减少,即 *vasa* 基因的突变会导致 Gurken 蛋白表达量的降低,从而影响卵子发生阶段极性的建立,但是 *vasa* 基因无效突变并不影响卵子中 *gurken* 基因 RNA 的表达量,因此 *vasa* 基因对果蝇卵母细胞中 *gurken* 基

因的翻译可能起调控作用^[34,40]。此外,一些在其他动物生殖细胞中表达的 *nanos* RNA 在母体中合成, *nanos* 基因调节极细胞中 90% 的基因的表达^[42], 其可以抑制生殖细胞中的基因翻译, 如转录阻遏物 *hunchback* 基因的翻译^[33], 从而允许与胚胎腹部形成有关的基因的表达。有研究表明 *vasa* 基因不仅是 *nanos* RNA 定位所必需的, 而且对促进 *nanos* 基因翻译起着至关重要的作用^[33,43]。同样在卵子发生期间, *vasa* 基因突变将导致 *nanos* 基因的突变, 从而导致性腺中的极细胞不能正常迁移, 也无法形成生殖细胞, 并在胚胎发生过程中大量死亡^[44]。进一步研究表明, 雌性纯合子 *vasa* 部分等位基因功能缺失后所产生的卵子虽然可以受精, 但是由该受精卵发育而成的胚胎将失去形成生殖细胞的能力^[45]。Sano 等^[46]利用基因融合、转基因和免疫荧光等技术确定 *vasa* 基因在果蝇卵子发生过程中和胚胎发育中的特异性表达起重要的作用。

在精子发生过程中, *vasa* 基因的作用也不可忽视。果蝇中 *vasa* 基因参与生殖细胞建立, VASA 蛋白作为拟染色体的主要成分之一, 充当 RNA 分子伴侣的角色, 而拟染色体在精子发生中可能作为翻译元件参与转录后加工^[47]。*vasa* 基因被敲除后, 小鼠精子发生过程中第一次减数分裂的细线期过渡到偶线期的过程受阻, 即精原细胞分化受阻并发生细胞凋亡^[48], 所以 *vasa* 基因的表达对于小鼠雄性生殖细胞的减数分裂, 尤其是偶线期的完成是不可缺少的。在人类的研究中, 郭新等^[49]发现少精子症患者精子 *vasa* 基因表达量只是正常精子的 1/5, 说明 *vasa* 基因影响精子发生。

在两性生殖细胞发育过程中, Fabioux 等^[50]利用 RNAi 技术, 将 *vasa* dsRNA 注射到太平洋牡蛎性腺中, 从而导致体内 *vasa* mRNA 沉默, 研究结果表明, 性腺中 *vasa* mRNA 的表达量均降低, VASA 蛋白表达也明显降低甚至消失, 而且大部分雌雄牡蛎表现出不育状态, 这说明 *vasa* 基因是太平洋牡蛎生殖细胞发育过程中必不可少的因子之一。

5 与 *vasa* 基因相互作用的因子及影响 *vasa* 基因表达的因子的研究

有关与 *vasa* 基因相互作用的因子的研究已有不少报道。如 eIF5B 对 *vasa* 基因功能的实现起着至关重要的作用, 在卵子发生过程中 *vasa*-eIF5B 的结合将调控特定的 mRNA 的翻译。与 *vasa* 基因突变一样, 如果 *vasa*-eIF5B 的结合减少, 将导致雌性不育及胚胎发育时期不能形成生殖细胞, 并且对后期的体细胞发育模式有一定的影响^[45,51]。

研究者发现在卵子发生中期, 果蝇的 VASA 蛋白与其他蛋白(如 OSKAR、STAUFEN 等)相互作用共同参与生殖质的形成, *oskar* 基因对生殖质的形成和装配起着极其重要的调控作用^[52]。OSKAR-VASA 的相互作用对极粒的组装起最重要的作用, 而且 OSKAR 蛋白影响 *vasa* 基因的定位^[41]; 同时, *vasa* 基因是 OSKAR 蛋白在后极中的稳定积累必不可缺的因子。在早期胚胎发育过程中, VASA 蛋白也可促进 OSKAR 蛋白翻译后修饰^[43]。另外, STAUFEN 蛋白分布在果蝇卵母细胞的后极, 产卵后则集中在前极, 该蛋白对生殖系的形成及胚胎前后极母源性 RNA 的定位都有极其重要的作用。用吗啉代反义寡核苷酸抑制 STAUFEN 相关蛋白的表达, 不影响斑马鱼原始生殖细胞的分化, 但是在受精 24 h 后, 46% 的斑马鱼胚胎不再表达 PGCs 的标志物 *vasa* 基因^[53]; 进一步研究表明, 如果用吗啉寡核苷酸介导抑制夏威夷明钩虾 *vasa* 基因的转录将会导致原肠胚形成后的生殖细胞死亡^[23]。

同样, 表观遗传调控因子 PIWI 蛋白属于 Argonaute 家族蛋白成员之一, 对生殖细胞维持起着调节作用。在雄性精巢中, PIWI 蛋白能够阻止逆转录转座子(如 LTR)的转录^[54]。Megosh 等^[55]对果蝇中的 PIWI 蛋白研究发现, PIWI 蛋白的减少不会影响 OSKAR 蛋白和 VASA 蛋白的表达, 但能导致极质的维持和 PGCs 形成的失败; 而成倍增加 PIWI 蛋白的表达量能相应地提高 OSKAR 蛋白和 VASA 蛋白

的水平,PGCs的数量也成倍地提高。

另外 *vasa* 基因也受到各种激素及药物的调节,Cardinali 等^[56]发现经雌激素(estradiol, E_2)和生长激素(growth hormone, GH)分别暴露处理金头鲷(*Sparus aurata*)可以促进 *vasa* 基因表达水平提高,这与经促性腺素释放素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)和 GH 混合暴露处理的效果是一致的;相反,单独用 GnRH 或者 E_2 和 GH 混合处理后,则导致 *vasa* 基因表达水平降低,从而影响金头鲷卵母细胞成熟过程。 E_2 和 GH 均控制卵子发生的过程,与卵黄蛋白原的合成有关,因此两种激素分别提高均可促进 *vasa* 基因表达水平提高;然而如果混合使用 GH 和 E_2 时,可能抑制 GH 受体和 GH 结合蛋白的表达,所以 *vasa* 基因表达水平反而降低。GnRH 对卵母细胞减数分裂起负作用,同时对胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGFs)起负调控作用,可抑制 *vasa* 基因的表达;但是 GnRH 和 GH 混合使用时,可能是由于 GnRH 对高水平的 GH 产生剂量效应,从而促进 *vasa* 基因表达水平提高。除此之外,把斑马鱼^[57]幼鱼暴露在 0.01、0.1 mg/L 久效磷和 E_2 中 21、30 和 42 d 后,均能够使幼鱼体内 *vasa* 基因表达水平出现极显著提高,此结果可能是由于久效磷引起特异性表达 *vasa* 基因的生殖细胞数量增多,从而导致幼鱼体内 *vasa* 基因表达量升高。

6 结 语

目前已经在脊椎动物(鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类等)及无脊椎动物(腔肠动物、环节动物、线形动物、软体动物和节肢动物等)中克隆了 *vasa* 基因,但对其功能探索主要局限在模式生物中,而且对其功能的认识局限于利用 *vasa* 基因的突变^[34]、敲除^[48]、RNA 干扰^[50]及转基因^[58]等方法来推测,因此对 *vasa* 基因的研究还有非常广泛的空间,对该基因在机体内的转录、翻译、修饰、上下游因子调控机理及在非模式生物中的功能机制进行进一步研究,将有助于人们对 *vasa* 基因在配子发生及生殖细胞形成

的作用机理有更深刻的理解。

参 考 文 献

- [1] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(3): 232–241.
- [2] Linder P, Lasko P F, Ashburner M, et al. Birth of the DEAD box. *Nature*, 1989, 337(6203): 121–122.
- [3] Lasko P F, Ashburner M. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature*, 1988, 335: 611–617.
- [4] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell*, 1988, 55(4): 577–587.
- [5] Schüpbach T, Wieschaus E. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Development Genes and Evolution*, 1986, 195(5): 302–317.
- [6] Krøvel A V, Olsen L C. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish *vasa* during gonadal development. *Developmental Biology*, 2004, 271(1): 190–197.
- [7] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Nagahama Y. Two isoforms of *vasa* homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mechanisms of Development*, 2002, 111(1/2): 167–171.
- [8] 胡重江, 吴风瑞, 刘智皓, 等. 南方鲇 *vasa* 基因两种亚型 cDNA 的克隆及其表达. *动物学报*, 2008, 54(6): 1051–1060.
- [9] 盛洁, 贡成良, 薛仁宇, 等. 家蚕 *vasa* 样基因表达的可变剪接. *蚕业科学*, 2009, 35(2): 390–393.
- [10] Tanner N K, Linder P. DEXD/H box RNA helicases from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 2001, 8(2): 251–262.
- [11] Tanner N K. The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. *Cell Cycle-Landes Bioscience*, 2003, 2(1): 18–19.
- [12] Caruthers J, McKay D. Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 12(1): 123–133.
- [13] Cordin O, Banroques J, Tanner N K, et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 2006, 367: 17–37.
- [14] Rocak S, Emery B, Tanner N K, et al. Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the

- conserved motifs. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(3): 999 – 1009.
- [15] Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing *vasa* as a marker. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(5): 669 – 678.
- [16] Rogers Jr G, Komar A A, Merrick W C. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2002, 72: 307 – 331.
- [17] Benz J, Trachsel H, Baumann U. Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae* — the prototype of the DEAD box protein family. *Structure*, 1999, 7(6): 671 – 679.
- [18] 隋娟, 张志峰, 邵明瑜, 等. 刺参 *vasa*-like 基因克隆及其在组织中的表达分析. *中国水产科学*, 2008, 15(3): 407 – 413.
- [19] 邵明瑜. 栉孔扇贝生殖相关基因 DEAD-box 家族和 *boule* 的 cDNA 克隆及其发育表达图式. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2006.
- [20] 周倩如. 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 两个 DEAD-box 家族基因 *Fc-vasa* 和 *Fc-PL10a* 的克隆和表达分析. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2007.
- [21] 周倩如, 邵明瑜, 张志峰. *vasa* 基因编码蛋白的结构特征和应用展望. *海洋湖沼通报*, 2007, (4): 129 – 134.
- [22] 项方. 斑马鱼 *vasa* 基因和 *gcl* 基因在卵母细胞发生过程中的表达. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2004.
- [23] Ozhan-Kizil G, Havemann J, Gerberding M. Germ cells in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* depend on VASA protein for their maintenance but not for their formation. *Developmental Biology*, 2009, 327(1): 230 – 239.
- [24] Kobayashi T, Kajiuira-Kobayashi H, Nagahama Y. Differential expression of *vasa* homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mechanisms of Development*, 2000, 99(1/2): 139 – 142.
- [25] Takagi Y, Talbot N C, Rexroad C E J, et al. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Molecular Reproduction and Development*, 1997, 46(4): 567 – 580.
- [26] Palombi F, Di Carlo C. Alkaline phosphatase is a marker for myoid cells in cultures of rat peritubular and tubular tissue. *Biology of Reproduction*, 1988, 39(5): 1101 – 1109.
- [27] Extavour C, Akam M. Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 2003, 130(24): 5869 – 5884.
- [28] Noce T, Fujiwara Y, Ito M, et al. A novel murine *zinc finger* gene mapped within the tw18 deletion region expresses in germ cells and embryonic nervous system. *Developmental Biology*, 1993, 155(2): 409 – 422.
- [29] Leroy P, Alzari P, Sassoon D, et al. The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell*, 1989, 57(4): 549 – 559.
- [30] 彭茂宇, 宋平, 桂建芳. 黄鳍 DEAD-box 家族 *PL10* 基因的克隆与序列分析. *武汉大学学报: 理学版*, 2005, 51(2): 227 – 234.
- [31] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 1997, 124(16): 3157 – 3165.
- [32] Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, et al. Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *Journal of Cell Biology*, 2000, 149(4): 875 – 888.
- [33] Gavis E, Lunsford L, Bergsten S, et al. A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of *nanos* RNA. *Development*, 1996, 122(9): 2791 – 2800.
- [34] Styhler S, Nakamura A, Swan A, et al. *vasa* is required for Gurken accumulation in the oocyte, and is involved in oocyte differentiation and germline cyst development. *Development*, 1998, 125(9): 1569 – 1578.
- [35] Braat A K, van de Water S, Goos H, et al. *vasa* protein expression and localization in the zebrafish. *Mechanisms of Development*, 2000, 95(1/2): 271 – 274.
- [36] Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, et al. Expression and intracellular localization of mouse VASA-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*, 2000, 93(1/2): 139 – 149.
- [37] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, et al. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000, 127(12): 2741 – 2750.
- [38] Fabioux C, Pouvreau S, Roux F L, et al. The oyster *vasa*-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 315(4): 897 – 904.
- [39] 徐红艳, 彭金霞, 桂建芳, 等. 银鲫种系细胞标记分子

- vasa*: cDNA 克隆及其抗体制备. 动物学报, 2005, 51 (4): 732 - 742.
- [40] Tomancak P, Guichet A, Zavorsky P, et al. Oocyte polarity depends on regulation of gurken by *vasa*. *Development*, 1998, 125 (9): 1723 - 1732.
- [41] Breitwieser W, Markussen F H, Horstmann H, et al. OSKAR protein interaction with *vasa* represents an essential step in polar granule assembly. *Genes & Development*, 1996, 10 (17): 2179 - 2188.
- [42] Asaoka M, Sano H, Obara Y, et al. Maternal *nanos* regulates zygotic gene expression in germline progenitors of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 1998, 78 (1/2): 153 - 158.
- [43] Rongo C, Gavis E R, Lehmann R. Localization of *oskar* RNA regulates oskar translation and requires OSKAR protein. *Development*, 1995, 121 (9): 2737 - 2746.
- [44] Wang Z, Lin H. *nanos* maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science*, 2004, 303 (5666): 2016 - 2019.
- [45] Castrillon D H, Quade B J, Wang T Y, et al. The human *vasa* gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97 (17): 9585 - 9590.
- [46] Sano H, Nakamura A, Kobayashi S. Identification of a transcriptional regulatory region for germline-specific expression of *vasa* gene in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Development*, 2002, 112 (1/2): 129 - 139.
- [47] Parvinen M. The chromatoid body in spermatogenesis. *International Journal of Andrology*, 2005, 28 (4): 189 - 201.
- [48] Tanaka S S, Toyooka Y, Akasu R, et al. The mouse homolog of *Drosophila vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes & Development*, 2000, 14 (7): 841 - 853.
- [49] 郭新, 桂耀庭, 唐爱发, 等. 精子发生相关基因 *vasa* 在正常和少精子症患者精子中的表达及意义. *中国男科学杂志*, 2006, 20 (5): 4 - 9.
- [50] Fabioux C, Corporeau C, Quillien V, et al. *In vivo* RNA interference in oyster *vasa* silencing inhibits germ cell development. *FEBS Journal*, 2009, 276 (9): 2566 - 2573.
- [51] Johnstone O, Lasko P. Interaction with eIF5B is essential for *vasa* function during development. *Development*, 2004, 131 (17): 4167 - 4178.
- [52] Williamson A, Lehmann R. Germ cell development in *Drosophila*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996, 12 (1): 365 - 391.
- [53] Ramasamy S, Wang H, Quach H N B, et al. Zebrafish *staufen1* and *staufen2* are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Developmental Biology*, 2006, 292 (2): 393 - 406.
- [54] Kalmykova A I, Klenov M S, Gvozdev V A. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (6): 2052 - 2059.
- [55] Megosh H B, Cox D N, Campbell C, et al. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Current Biology*, 2006, 16 (19): 1884 - 1894.
- [56] Cardinali M, Gioacchini G, Candiani S, et al. Hormonal regulation of *vasa*-like messenger RNA expression in the ovary of the marine teleost *Sparus aurata*. *Biology of Reproduction*, 2004, 70 (3): 737 - 743.
- [57] 尹德玉. 久效磷对斑马鱼性别决定相关基因 *vasa* 和 *cyp3cl* 基因表达影响的研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2009.
- [58] 童芳芳. I. 用 RAPD 和 SCAR 复合分子标记对黄颡鱼属进行种质鉴定. II. 斑马鱼 *vasa* 基因的转基因表达. 武汉: 武汉大学硕士学位论文, 2005.