

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220511002

http://www.yykxjz.cn/

黄孝泉, 刘炳正, 孙志惠, 丛晶晶, 苏唯一, 魏金亮. 刺参 *germ cell-less* 基因表达分析及转录因子预测. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 203–213

HUANG X X, LIU B Z, SUN Z H, CONG J J, SU W Y, WEI J L. Expression of *germ cell-less* and its putative regulatory region in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 203–213

刺参 *germ cell-less* 基因表达分析及 转录因子预测*

黄孝泉 刘炳正 孙志惠^① 丛晶晶 苏唯一 魏金亮

(大连海洋大学 农业农村部北方海水增殖重点实验室 辽宁 大连 116023)

摘要 不同性别的刺参(*Apostichopus japonicus*)在生长速度、免疫能力等方面具有显著差异, 解析其性别决定和性别分化机制具有重要的理论和经济价值。目前, 刺参的性腺发育机制尚不清晰, 挖掘性腺发育相关基因是解析其发育机制的重要途径。研究表明, *germ cell-less* 基因在哺乳动物性腺发生中起重要作用, 但无脊椎动物中关于 *germ cell-less* 基因的研究较少。本研究从刺参基因组中鉴定了 *germ cell-less* (*Ajgcl*) 基因片段, 随后通过 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得其全长 cDNA 序列。通过荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 揭示了 *Ajgcl* 在成体组织中呈现泛表达状态, 性腺中表达量最高, 且雌性性腺中的表达量是雄性性腺中表达量的 2.25 倍。随着卵子的发生, *Ajgcl* 的表达量呈现先上升后下降的动态表达变化, 而在精子发生的过程中其表达量变化不大, 意味着其可能在卵子发生过程中发挥重要作用。在整个胚胎发育过程中均能检测到 *Ajgcl* 转录本, 意味着 *Ajgcl* 作为母源因子可能与原始生殖细胞的形成有关。此外, *Ajgcl* 基因启动子中具有 *Oct-1*、*FOXD3*、*PAX-6*、*CRP*、*c-Myb* 和 *NF-1* 等转录因子的结合位点。本研究为深入解析 *germ cell-less* 基因在刺参等无脊椎动物性腺发育中发挥的功能奠定了基础。

关键词 刺参; *germ cell-less*; 生殖细胞; 母源因子

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)06-0203-11

刺参(*Apostichopus japonicus*)是我国重要的海水养殖品种之一, 广泛分布于辽宁、山东和河北沿海地区。刺参在我国水产品行业具有极高的经济和产业价值, 根据 2021 年中国渔业统计年鉴的数据显示, 2020 年刺参的养殖产量为 19.65 万 t, 经济产值近 600 亿元。刺参除了具有极高的经济价值外, 还具有夏眠和再生等生物学特性, 因此, 也成为研究组织、器官发育和进化的良好模型(常亚青等, 2004)。

刺参为雌雄异体生物, 不同性别刺参在生长速

度、免疫能力等方面具有显著差异。研究表明, 产卵后, 雄性刺参与雌性刺参相比具有较快的生长速度(Jiang *et al*, 2020), 且雄性刺参比雌性刺参具有更强的免疫活性(Jiang *et al*, 2019、2017)。针对刺参性腺发育机制、性别决定和性别分化相关的研究逐渐成为热点之一(孙志惠等, 2021)。目前, 针对刺参性腺发育机制的研究多集中在组织学观察、转录组测序及性腺发育相关基因的鉴定等方面。研究表明, 最早可在体长为 0.1 cm 的稚参中观察到原始性腺(晏萌等,

* 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2018YFD0900201)资助。黄孝泉, E-mail: huangxiaoxiao0331@163.com

① 通信作者: 孙志惠, 副教授, E-mail: sunzhihui@dlou.edu.cn

收稿日期: 2022-05-11, 收修改稿日期: 2022-07-11

2011), 随后其性腺开始出现管腔并不断拉长变宽、产生分支, 再由分支汇集成生殖总管, 最后生殖总管变细进入生殖孔中(隋锡林等, 1985)。鉴定性腺发育相关基因是解析性腺发育机制的重要途径, 随着刺参基因组测序的完成(Zhang *et al.*, 2017), 从基因组水平陆续鉴定了一些与刺参性腺发育相关的基因, 如 *piwil* (Sun *et al.*, 2021)、*dmrt*、*vasa*、*nodal* (Sun *et al.*, 2022)、*foxl2* (Sun *et al.*, 2022)等, 但刺参的性腺发育机制仍是谜团。

germ cell-less 基因在果蝇(*Drosophila*)的生殖系形成中被首次鉴定(Jongens *et al.*, 1992), *germ cell-less* 基因中包含一个进化上保守的 BTB/POZ 结构域。BTB/POZ(简称 BTB)结构域几乎存在于所有真核细胞中, 由约 115 个氨基酸残基组成, 能够介导蛋白与蛋白之间形成同源或异源二聚体(Puccetti *et al.*, 2001; Sameshima *et al.*, 2018), BTB 结构域与哺乳动物的性腺发育息息相关(Chaharbakhshi *et al.*, 2016)。*Germ cell-less* 基因在果蝇原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)中高表达, 是参与 PGC 形成的一个重要的母源因子(Jongens *et al.*, 1992; Kimura *et al.*, 1999; Leatherman *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2004), 对维持转录沉默及 PGC 存活具有重要作用。随后, *germ cell-less* 的同源基因在其他脊椎动物物种中被陆续鉴定, 如小鼠(*Mus musculus*)中 *germ cell-less* 同源基因(*mgcl-1*) 在 PGC 中表达量较低, 但在成体睾丸中高表达, 卵巢中低表达(Leatherman *et al.*, 2000)。*mgcl-1* 基因缺失会导致小鼠部分器官的核结构异常。值得注意的是, 该基因缺失会使精母细胞核畸变, 进而影响染色质重塑, 导致精子形态缺陷(Kimura *et al.*, 2003)。斑马鱼(*Danio rerio*)中, *germ cell-less* mRNA 在 PGCs 中特异表达, 意味着斑马鱼的 PGCs 形成需要 *germ cell-less* 基因参与。无脊椎动物尤其是棘皮动物中 *germ cell-less* 基因的研究较少。

本研究克隆了刺参 *germ cell-less* (*Ajgcl*)基因的全长 cDNA 序列, 利用荧光定量 PCR (RT-qPCR)技术分析 *Ajgcl* 基因在成体各组织、胚胎不同发育时期和性腺不同发育阶段的动态表达情况, 调取并下载 *Ajgcl* 的启动子序列, 预测其潜在调控因子, 以期为解析 *germ cell-less* 基因在刺参的生殖细胞发育和性腺发育中发挥的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用刺参取自大连海洋大学农业农村部

北方海水增殖重点实验室。2021 年 2—7 月, 每个月进行一次取样工作, 从实验室自繁刺参家系中选取体重为 100 g 左右的 2~3 龄刺参, 解剖刺参后取性腺、体壁、管足、肠、胃、纵肌、体腔细胞和呼吸树等组织样品, 每个组织取约 100 mg 样品于无酶离心管中, 立即置于液氮中速冻, 并放到 -80 °C 冰箱保存备用。通过性腺样品组织学检测分析刺参的性别及性腺所处发育时期, 每次取样均含 3 只雌性和 3 只雄性刺参。

2021 年 5 月, 选取生长状态良好的刺参, 用 0.5 mol/L 的 KCl 和 1 μmol/L 的天冬氨酸-甘氨酸-亮氨酸-色氨酸-酪氨酸(NGLWY)五肽酰胺(Cubifrin-L)诱导繁殖, 分别收集精子和卵子后, 人工授精, 用海水灌洗 3 次受精卵以洗去多余的精子, 将胚胎置于过滤海水中培养。随后, 收集刺参不同发育阶段的样本, 包括受精卵、2 细胞期、32 细胞期、囊胚期、囊胚后期、原肠期、小耳幼体、大耳幼体、樽形幼体、五触手幼体, 取每个时期约 100 mg 样品于无酶离心管中, 立即置于液氮中速冻, 并于 -80 °C 冰箱保存备用。研究未涉及任何濒危或受保护物种。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

总 RNA 的提取参照 SV Total RNA isolation system (Promega Z3100)说明书进行, 利用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计检验所提取的 RNA 的浓度及质量。选取性腺发育处于生长期的雌性性腺样品的总 RNA 1 μg, 按照 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 634923)说明书构建到加接头的 cDNA 集合。同时, 取 0.5 μg 各成体组织及胚胎发育时期样品的总 RNA, 按照 PrimerScript™ RT 试剂盒(TaRaKa 634860)说明书合成 cDNA。

1.3 cDNA 全长克隆

以斑马鱼 *germ cell-less* 基因的氨基酸序列为查询序列, 在刺参基因组数据库中进行比对查询, 得到刺参 *germ cell-less* 基因片段。随后, 通过 5'和 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR, 按照 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech 634923)说明书克隆刺参 *germ cell-less* 基因的 cDNA 全长。实验所用引物见表 1, 由网站(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)和软件 Primer Premier 5.0 设计。

1.4 *germ cell-less* 序列分析

使用 NCBI 中的 ORF-Finder, 预测 *germ cell-less* 基因的开放阅读框(open reading frame, ORF), 随后使用 NCBI 中的 Splign 工具比对出 *germ cell-less* 基因的

外显子和内含子位点; 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测 *Germ cell-less* 蛋白结构域, 然后用 ExPASy 中的 ProtParam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *Germ cell-less* 蛋白的基本理化性质; 使用 Predict Protein (<https://www.predict-protein.org/>) 分析 *Germ cell-less* 蛋白的二级结构; 利用 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分析其三级结构; 最后利用 ClustalW 进行多重序列比对, 并使用 MEGA7 进行系统发生树分析, 实验所用基因序列的 NCBI 登录号见表 2。

表 1 本实验所用引物

Tab.1 Sequences of the primers used in this study

| 引物 Primer | 引物序列 Primer sequence (5'~3') | 用途 Application |
|---------------------|---------------------------------|-------------------|
| Germ-RE-1F | GGAGTGAAAGGTCAGAAAA G | 5'RACE |
| Germ-RE-1R | ACAGCTTAAACAAAGATGA GGAACGA | 3'RACE |
| Germ cell-less-F1-5 | ACCTCCACATACTCCGCTACC AG | RT-qPCR |
| Germ cell-less-R1-5 | CGTAGACGACTTGAGCTTCT CCTC | RT-qPCR |
| NADH-F | GTCCTACGACCCAATCTGGA | RT-qPCR |
| NADH-R | ATGAGCCTTGTTACGTTGG | RT-qPCR |

表 2 多重序列比对和系统进化树所用的 *germ cell-less* 同源基因Tab.2 Information on *germ cell-less* homologous for multiple sequence alignment and phylogenetic analysis

| 物种 Species | NCBI 登录号 NCBI accession No. |
|---|--------------------------------|
| 紫球海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | XP_030835792.1 |
| 棘冠海星 <i>Acanthaster planci</i> | XP_022080170.1 |
| 刺参 <i>Apostichopus japonicus</i> | PIK45933.1 |
| 舌形贝 <i>Lingula anatina</i> | XP_013416803.1 |
| 黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> | AGL08236.1 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> | NP_996933.1 |
| 金鱼 <i>Carassius auratus</i> | XP_026103865.1 |
| 爪蟾 <i>Xenopus laevis</i> | XP_018108888.1 |
| 小鼠 <i>Mus musculus</i> | AAK69515.1 |
| 人 <i>Homo sapiens</i> | NP_848526.1 |

1.5 启动子分析

在刺参基因组数据库中调取并下载 *germ cell-less* 基因起始密码子(ATG)上游 2 000 bp 序列, 利用 Match (<http://gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/b/in/match.cgi>) 对其启动子序列进行转录结合位点预测。

1.6 RT-qPCR 检测基因表达

RT-qPCR 在 LightCycler[®] 96 Instrument (Roche) 上进行, 反应体系(共 20 μ L): fast start essential DNA green master 为 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 为 2 μ L, DEPC H₂O 为 6.4 μ L。RT-qPCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 循环变性 15 s; 60 $^{\circ}$ C 退火复性 60 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s; 65 $^{\circ}$ C 60 s; 97 $^{\circ}$ C 1 s。以 NADH 作为内参基因, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因表达量。利用 SPSS 25.0 软件进行数据统计分析, 采用单因素方差(one-way ANOVA)分析, 选择 Duncan 法进行组间多重对比, 显著性差异水平数值设置为 0.05。

2 结果与分析

2.1 *germ cell-less* cDNA 全长序列及其编码的蛋白结构预测分析

本研究从雌性性腺 cDNA 文库中克隆得到刺参 *germ cell-less* 基因的 cDNA 全长(NCBI 序列号: ON932433), 序列全长为 2 316 bp, 5'UTR 为 139 bp, 3'UTR 为 725 bp, ORF 长度为 1 455 bp, 共编码 484 个氨基酸(图 1)。与刺参全基因组比对得出, *germ cell-less* 基因编码区共存在 15 个外显子序列和内含子序列, 其中, 外显子序列最长为 141 bp(图 1)。结构域预测结果显示, Ajgcl 具有一个保守的 BTB (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac)结构域(图 2)。Ajgcl 蛋白的理论分子质量为 55.40 kDa, 理论等电点为 5.80, 为亲水性蛋白。Ajgcl 的蛋白二级结构中 α -螺旋(alpha helix, H)、延长链(extended strand, E)和无规则卷曲(random coil, C)的占比分别为 35.40%、18.84%和 45.76% (图 3)。蛋白质三级结构中显示, Ajgcl 蛋白含有锌指结构, 此结构能与 DNA 特异性结合(图 4)。

2.2 多重序列比对和系统进化分析

从 NCBI 网站下载其他物种中 *germ cell-less* 的同源基因, 进行氨基酸序列比对分析。结果表明, 刺参 *germ cell-less* 基因与紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) *germ cell-less* 基因的氨基酸序列一致性最高, 为 55.38%, 与棘冠海星(*Acanthaster planci*) *germ cell-less* 基因的一致性为 52.34%, 与其他非棘皮动物门的物种如爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼、金鱼(*Carassius auratus*)、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)、小鼠和人(*Homo sapiens*)的一致性较低, 分别为 44.98%、44.86%、43.87%、43.08%、42.00%、

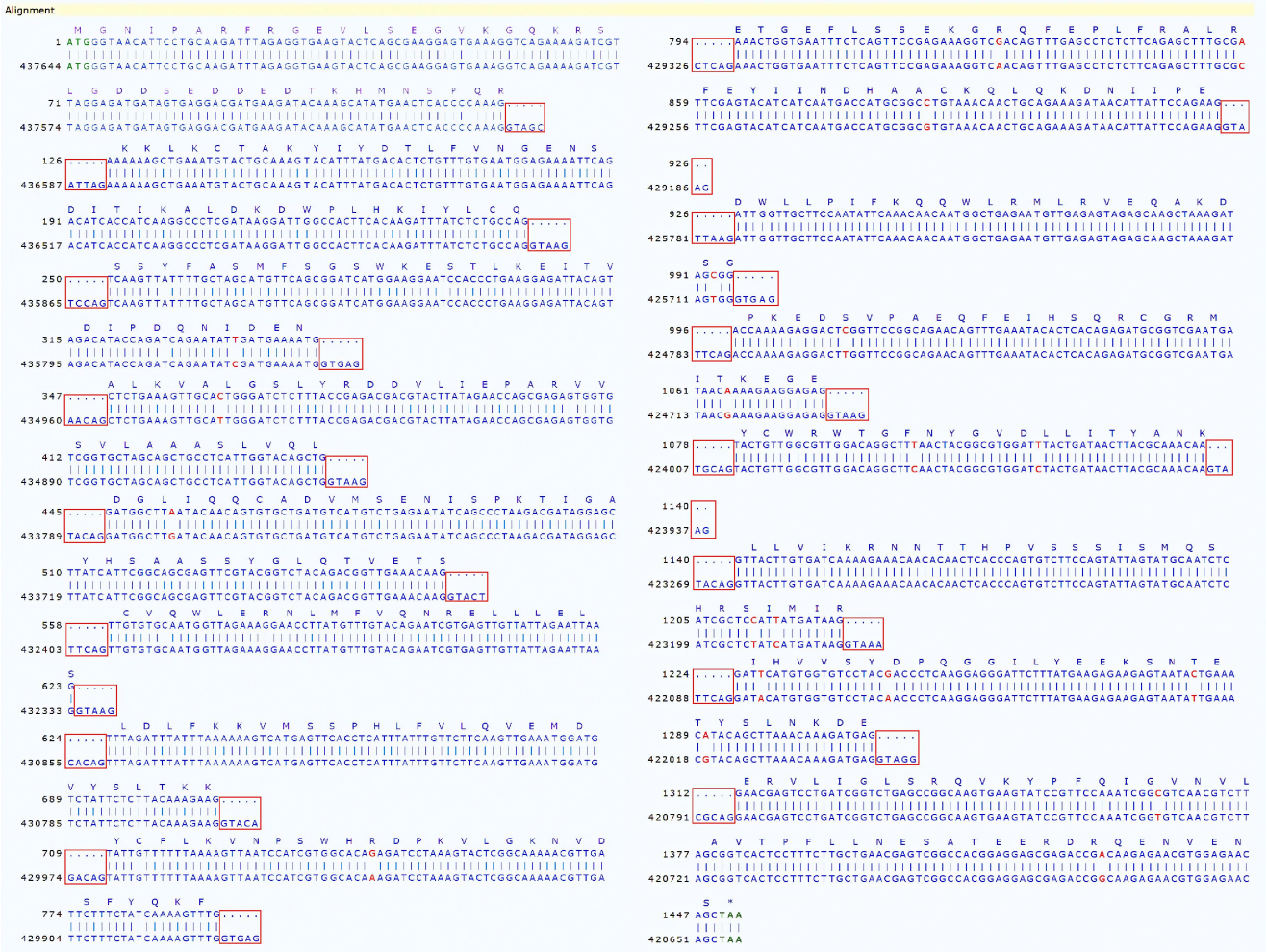


图 1 *germ cell-less* 基因外显子序列和内含子序列
 Fig.1 Exon and intron sequences of *germ cell-less*

绿色字母表示起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA，红色方框表示基因的内含子序列，其余部分表示 DNA 外显子序列。
 ATG and TAA are in green. The red frames indicate the intron sequences, and the rest of letters indicate the exon sequences.

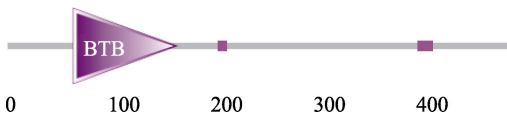


图 2 *Germ cell-less* 蛋白结构域预测
 Fig.2 Prediction of *Germ cell-less* protein domain

Germ cell-less 蛋白结构域预测为 BTB/POZ 结构域，长度为 101 aa (63~163)，紫色方框表示低复杂度区域：

- ELLLESLDL 长度为 10 aa (202~211)，
- SSSISMQSHRSIMIRI 长度为 16 aa (394~409)。

The prediction of *Germ cell-less* protein is BTB/POZ domain which contains 101 aa (63~163), purple frames indicate low complexity regions: ELLLESLDL contains 10 aa (202~211), and SSSISMQSHRSIMIRI contains 16 aa (394~409).

42.02% (图 2)。此外，其 BTB/POZ 结构域在进化上较为保守，不同物种中的一致性为 74.09%~59.59%

(图 5A)。基于以上氨基酸序列比对的结果，构建了系统进化树。结果表明，刺参、紫球海胆和棘冠海星的 *germ cell-less* 氨基酸序列聚为一支，*germ cell-less* 基因的聚类结果和物种进化趋势基本一致(图 5B)。

2.3 启动子分析

利用在线分析网站对 *germ cell-less* 基因的起始密码子上游 2 000 bp 序列进行转录因子结合位点预测分析。结果显示，在其启动子序列中，有 4 个 *Oct-1* 和 4 个 *FOXD3* 结合位点，以及 *c-Myb*、*NF-1*、*CRP*、*PAX-6* 等的结合位点(图 6)。

2.4 *germ cell-less* 基因组织表达特异性分析

RT-qPCR 结果表明，在刺参的性腺、肠、胃、纵肌、呼吸树、管足和体腔细胞中均检测到 *germ*

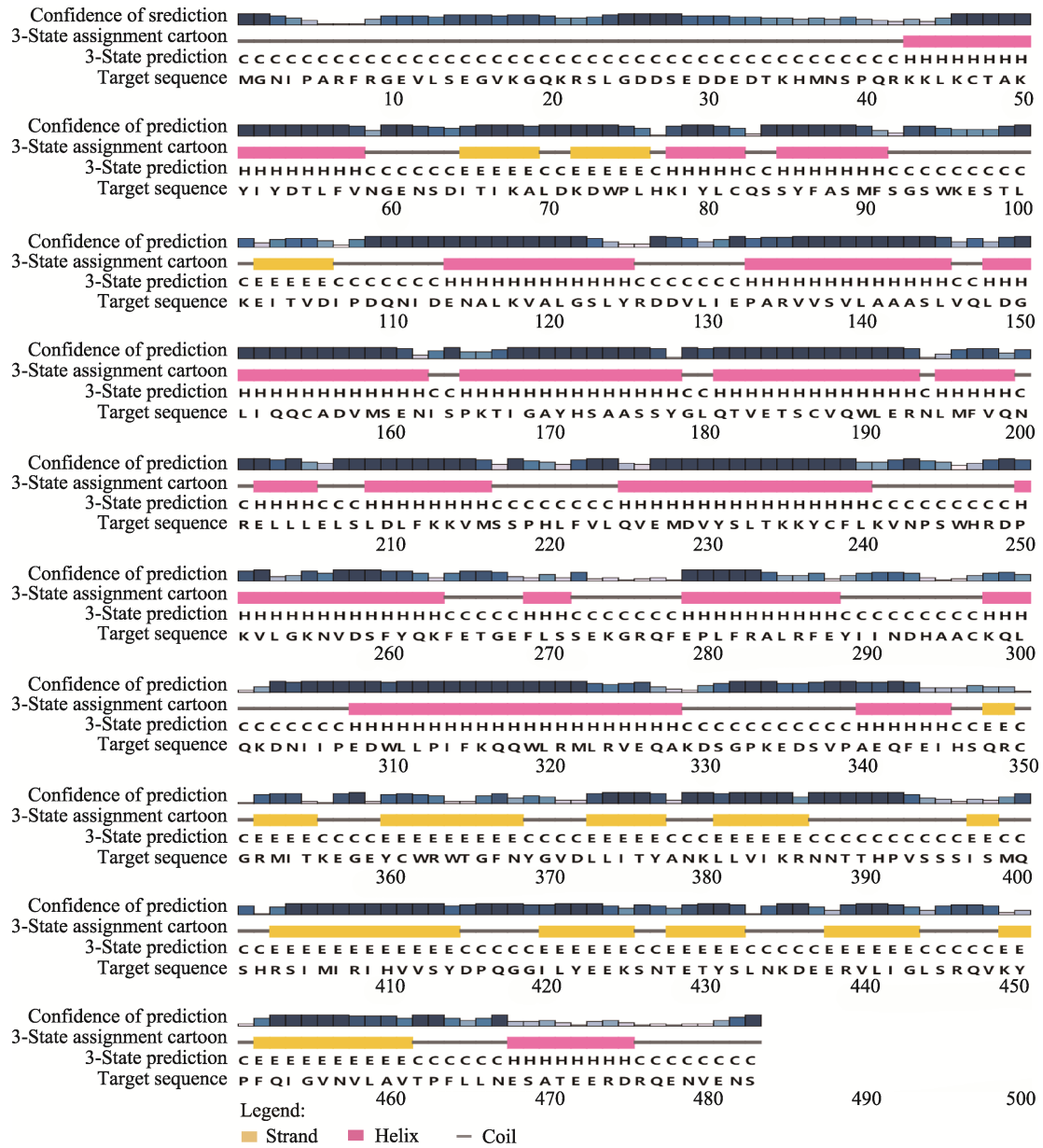


图 3 Germ cell-less 蛋白质的二级结构预测

Fig.3 Prediction of Germ cell-less protein secondary structure

黄色条表示延长链, 粉色条表示 α -螺旋, 灰色线条表示无规则卷曲。

Yellow stripes indicate extended strand, pink stripes indicate alpha helix, and grey lines indicate random coil.

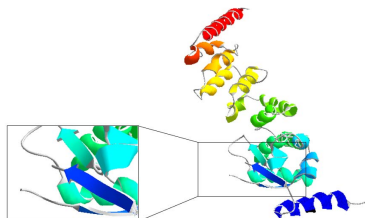


图 4 Germ cell-less 蛋白质三级结构预测

Fig.4 Prediction of Germ cell-less protein tertiary structure

黑色框内表示 Germ cell-less 蛋白的锌指结构区域。

The black box indicates the Zinc finger structural area of Germ cell-less.

cell-less 转录本。其中, 在雌性性腺中表达量最高, 雌性性腺中的表达量是雄性性腺中表达量的 2.25 倍。其余组织中相对表达量从高到低排序为管足>肠>体腔细胞>胃>呼吸树>纵肌, 但在刺参体壁中未检测出 *germ cell-less* 转录本(图 7)。

2.5 *germ cell-less* 基因在性腺不同发育时期中的动态表达分析

鉴于 *germ cell-less* 基因在刺参性腺中表达量最高, 通过持续采样, 获得刺参性腺不同发育时期的样

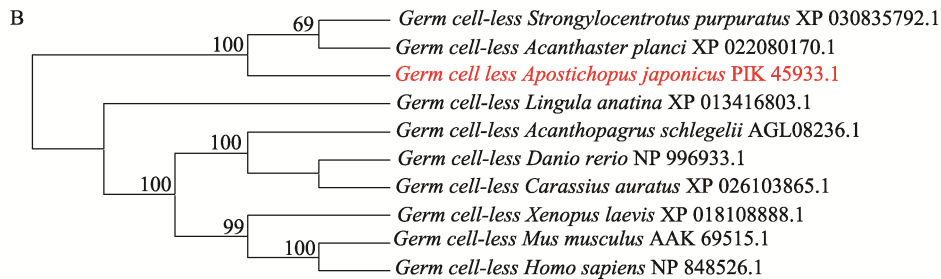
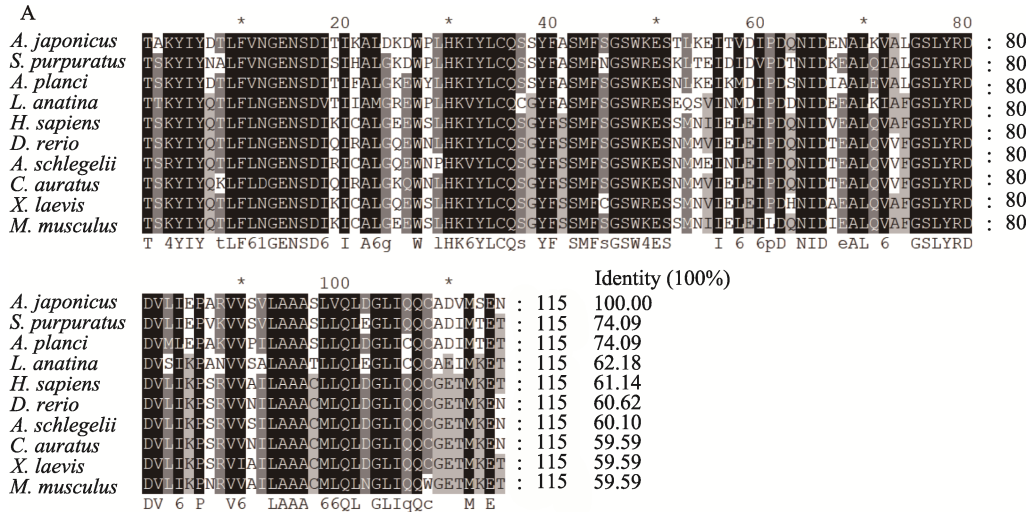


图 5 Germ cell-less 的 BTB/POZ 结构域多重氨基酸序列比对(A)及其氨基酸序列的系统进化树(B)
 Fig.5 Multiple amino acid sequence alignment in the BTB/POZ domain (A) and phylogenetic tree of Germ cell-less amino acid sequence (B)

本。前期研究表明，刺参的性腺发育分为 4 个时期，分别为增殖期(Stage 1)、生长期(Stage 2)、成熟期(Stage 3)和放出期(Stage 4)(隋锡林等, 1985; Yan *et al.*, 2013)。随后利用 RT-qPCR 检测不同发育时期 *germ cell-less* 基因的动态表达情况。结果显示，在雌性性腺中，与增殖期相比，生长期中 *germ cell-less* 基因表达量轻微升高(图 8)；随着雌性性腺发育到成熟期时，其表达量显著下调，与增殖期相比下调至 0.79。配子发生结束后，其表达量又恢复到原有的水平。在雄性性腺中，*germ cell-less* 在 4 个时期中的表达量变化不大，都处于较低的表达水平。将雌性性腺和雄性性腺中 *germ cell-less* 相对表达量比较后，雌性性腺中的表达量远远高于雄性性腺中的表达量，甚至在生长期中表达量达到了雄性性腺中的 6.7 倍。

2.6 *Germ cell-less* 基因在胚胎发育时期的表达水平分析

如图 9 所示，在受精卵、2 细胞期、32 细胞期时胚胎样品中均可检测出大量的 *germ cell-less* 转录本，表明 *germ cell-less* 基因是母源因子。随着胚胎发育的进行，囊胚期其表达量急剧降低，随后表达量维持在

较低水平。

3 讨论

3.1 刺参 *germ cell-less* 基因序列全长及 BTB/POZ 结构域分析

本研究首次克隆获得刺参 *germ cell-less* 基因的 cDNA 序列全长，共编码 484 个氨基酸。*Germ cell-less* 基因是 BTB/POZ 蛋白家族中的一员，该蛋白家族 BTB 结构域几乎存在于所有的真核细胞中，且与动物的性腺发生、生殖细胞生长发育和分化息息相关(Bardwell *et al.*, 1994)。BTB/POZ 结构域通常存在于蛋白质氨基末端尾，是一个保守且具有疏水性的结构域。其在果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 *ttk* 基因和 *BR-C* 基因比对中首次被证实功能(Numoto *et al.*, 1993; Sugawara *et al.*, 1994)。值得注意的是，*ttk* 基因是果蝇胚胎发育所必需的基因，果蝇 *ttk* 基因的 BTB/POZ 结构域能够特异性与自身结合形成同源二聚体(Bardwell *et al.*, 1994)。此外，Albagli 等(1995)研究表明，一部分具有 BTB/POZ 结构域的蛋白能影响染色

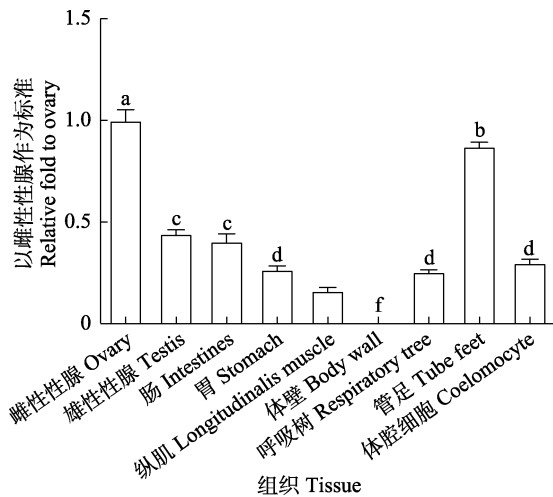


图7 *germ cell-less* 基因组织表达的 RT-qPCR 分析
Fig.7 RT-qPCR analysis of *germ cell-less* expression in adult tissues

使用单因素方差检验进行数据分析。将 *germ cell-less* 在卵巢中的表达量设为 1。条带代表平均值±标准差。以 NADH 为内参。不同字母表示存在显著差异 ($P \leq 0.05$)。下同。
One-way ANOVA test was used to perform statistical analysis. The expression of *germ cell-less* in ovary was set to 1. Each bar indicates Mean±SD. NADH was used as the control. Different letters represent significant differences among the tissues ($P \leq 0.05$). The same as below.

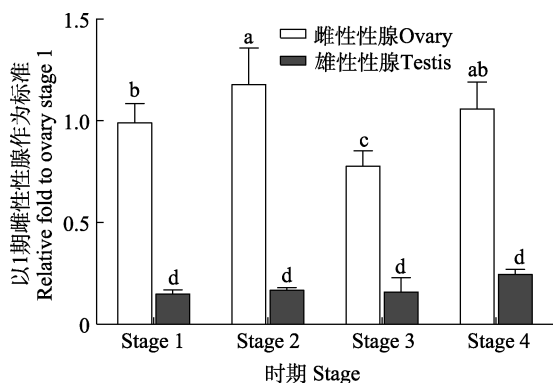


图8 *germ cell-less* 基因在性腺不同发育时期的动态表达分析
Fig.8 Dynamic expression analysis of *germ cell-less* gene in gonads at different development stages

Stage 1: 增殖期; Stage 2: 生长期;
Stage 3: 成熟期; Stage 4: 放出期。

Stage 1: Early growing stage; Stage 2: Growing stage;
Stage 3: Mature stage; Stage 4: Post-spawning stage.

质缩合,可能会进而影响生殖细胞减数分裂的效率和质量;其他具有此结构域的蛋白甚至自身就是一种肌动蛋白结合蛋白,结合后可能影响生殖细胞发生过程中的细胞骨架重排。而刺参 *Germ cell-less* 蛋白三级结构显示,该基因存在能与 DNA 特异结合的锌指结构,这也暗示刺参 *germ cell-less* 基因可能参与核中高级大分子复合物的形成,如胚胎极细胞的形成。

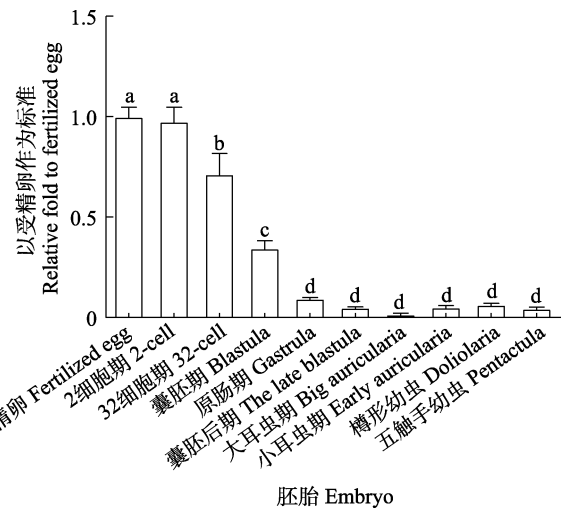


图9 *germ cell-less* 基因胚胎发育时期的表达分析
Fig.9 Expression analysis of *germ cell-less* gene in embryo

3.2 刺参 *germ cell-less* 基因转录结合位点预测分析

通过在线工具预测出刺参 *germ cell-less* 基因启动子中存在 *Oct-1*、*FOXD3*、*c-Myb*、*NF-1*、*CRP*、*PAX-6* 等的转录结合位点。*Oct-1* 是一种普遍存在的活性转录因子,但其功能在不同调控通路中存在差异。一般情况下, *Oct-1* 可作为转录激活剂,通常需要辅助因子的帮助(Inamoto *et al*, 1997)。研究表明,无论是在人体肝脏还是海拉细胞(Hela cells)中,只有 *Oct-1* 转录位点存在,才能使 *HNF-1* 转录因子与其协同激活 preS1 启动子转录,否则二者都无法单独激活 preS1 启动子的转录(Zhou *et al*, 1991);同时,在小鼠中, *Oct-1* 还可以通过与催乳素受体(STAT-5)以及糖皮质激素受体(GR)相互作用来参与乳蛋白 β -酪蛋白转录的激素调节(Dong *et al*, 2009)。*Oct-1* 还可启动并调控海胆早期幼虫的 *nodal* 和 *vg1/univin* 基因,若抑制 *Oct-1* mRNA 翻译会造成海胆早期胚胎发育为放射状,即腹侧不再呈平坦状且腹侧初级间充质细胞簇(primary mesenchymal cells, PMC)不再组织聚集等海胆胚胎发育缺陷(Range *et al*, 2011)。此外, *Oct-1* 也能抑制一些基因的转录。*Oct-1* 转录因子能够与小鼠(*Rattus norvegicus*) *CYP11A1* 基因的一部分负调控元件相互作用,以抑制该基因的表达(Brat *et al*, 1996)。有趣的是, *Oct-1* 还可以通过涉及核小体重塑和组蛋白去乙酰化(NuRD)的机制维持抑制,然后,又能通过涉及 *Jmjd1a* 组蛋白的抗抑制机制来维持平衡的基因表达。可以推测 *Oct-1* 在该环境下又可作为一种可切换的转录调节因子(Shakya *et al*, 2011)。*FOXD3* 则是胚胎发育的转录调控因子之一,是小鼠外胚层形成的一个必要因素(Hanna *et al*, 2002),若将 *FOXD3* 敲

除, 胚胎将会死亡并导致上皮细胞缺失。在斑马鱼中, *FOXD3* 通过诱导神经嵴细胞中谱系相关转录因子的表达来调节这些细胞的迁移, 以选择性地指定迁移前神经嵴细胞的神经元、神经胶质或软骨的发展结果 (Stewart *et al*, 2006)。此外, *FOXD3* 也是爪蟾神经嵴发育的重要上游调控因子 (Sasai *et al*, 2001)。而以上转录因子在刺参中的作用尚不明显, 因此, *Oct-1*、*FOXD3*、*c-Myb* 等在刺参生殖发育中的作用值得进一步探究。

3.3 刺参 *germ cell-less* 基因在组织及性腺不同发育时期中的表达情况

不同种类动物 *germ cell-less* 基因的表达模式存在差异。在果蝇中, *germ cell-less* 基因在卵母细胞中表达, 而其蛋白则在极细胞以及极细胞的核膜中被检测到 (Jongens *et al*, 1992)。在小鼠中, 精巢内可检测到大量 *germ cell-less* 基因表达, 而在卵巢及其他成体组织中未检测到表达 (Kimura *et al*, 1999; Leatherman *et al*, 2000)。青鳉 (*Oryzias latipes*) 中, *germ cell-less* 基因在卵巢中的表达量较高, 而精巢中表达量相对较低 (Scholz *et al*, 2004)。刺参 *germ cell-less* 基因表达模式明显有别于其他物种, 刺参 *germ cell-less* 基因在成体组织中呈泛表达状态, 且在雌性性腺中的表达量远远高于雄性性腺中的表达量, 甚至在生长期中表达量达到了雄性性腺的 6.7 倍。此外, 不同物种 *germ cell-less* 基因的功能也存在差异。在斑马鱼中, *germ cell-less* 在 PGCs 中特异且大量表达, 这也暗示着 *germ cell-less* 基因是斑马鱼 PGCs 形成发生所必不可少的组成基础。在果蝇中, *germ cell-less* 基因被证实过量表达会导致有丝分裂延迟 (Jongens *et al*, 1994)。有趣的是, 小鼠 *mgcl-1* 基因通过自身 BTB/POZ 结构域与调控细胞周期进入 S 期的 *E2F* 转录因子相结合, 进而导致细胞周期阻滞 (de la Luna *et al*, 1999)。刺参 *germ cell-less* 基因在刺参生殖细胞分裂分化和增殖过程中可能发挥保守功能。

3.4 刺参 *germ cell-less* 基因在早期胚胎发育过程中的表达情况

脊椎动物中, 小鼠 *mgcl-1* 基因在初级精母细胞中高表达, 尤其在粗线期精母细胞中, 但精原细胞和精细胞中却检测不到 *germ cell-less* 基因 (Kimura *et al*, 1999)。硬骨鱼类中, *germ cell-less* 基因作为母源因子在斑马鱼胚胎发育早期高度表达, 但随着胚胎发育进程其表达量相对降低 (Li *et al*, 2006)。同样, 在青鳉中, *germ cell-less* 基因在胚胎发育前期高表达, 但随

后便消失, 直至孵化后才能被检测到 (Scholz *et al*, 2004)。无脊椎动物中, 暂没有相关报道。但与 *germ cell-less* 基因同为母源因子的 *piwi* 基因在刺参的早期胚胎发育过程中也存在类似的表达模式, 受精卵中 *piwi* 基因呈高表达状态, 随着胚胎发育, *piwi* 基因的表达便迅速下调并呈较低水平 (Sun *et al*, 2021)。而刺参中 *germ cell-less* 基因在刺参胚胎发育早期呈高表达, 随着胚胎发育的进行, 其表达量逐渐下调, 特别是囊胚期后出现指数型下降, 之后一直保持低水平表达 (图 9)。因此, 推测 *germ cell-less* 基因作为母源因子可能和 *piwi* 基因一起调控刺参早期生殖细胞发育。

4 结论

本研究对刺参 *germ cell-less* 基因进行了表达特性分析与启动子生物信息学分析, 揭示了其分子特征, 并阐明了其在刺参成体组织中呈泛表达, 雌性性腺高表达的表达特性。此外, 还揭示了刺参 *germ cell-less* 是母源因子, 在刺参胚胎发育过程中可检测到大量转录本, 且其启动子序列中存在 *Oct-1*、*FOXD3* 等转录因子的结合位点。综上, 本研究为揭示 *germ cell-less* 基因在刺参性腺形成、分化和发育中发挥的作用提供了重要支撑。

参 考 文 献

- ALBAGLI O, DHORDAIN P, DEWEINDT C, *et al*. The BTB/POZ domain: A new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth and Differentiation: the Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 1995, 6(9): 1193–1198
- BARDWELL V J, TREISMAN R. The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes and Development*, 1994, 8(14): 1664–1677
- BRAT R, WEAVER J A, STERLING K M, *et al*. Nuclear transcription factor *Oct-1* binds to the 5'-upstream region of *CYP11A1* and negatively regulates its expression. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1996, 28(2): 217–227
- CHAHARBAKHSI E, JEMC J C. Broad-complex, tramtrack, and bric-à-brac (BTB) proteins: Critical regulators of development. *Genesis*, 2016, 54(10): 505–518
- CHANG Y Q, DING J, SONG J, *et al*. Biological research and breeding of sea cucumber and sea urchin. Beijing: China Ocean Press, 2004 [常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖. 北京: 海洋出版社, 2004]
- DE LA LUNA S, ALLEN K E, MASON S L, *et al*. Integration of a growth-suppressing BTB/POZ domain protein with the DP

- component of the *E2F* transcription factor. *EMBO Journal*, 1999, 18(1): 212–228
- DONG B, HUANG C, LI D, *et al.* *Oct-1* functions as a transactivator in the hormonal induction of β -casein gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009, 328(1/2): 93–99
- HANNA L A, FOREMAN R K, TARASENKO I A, *et al.* Requirement for *Foxd3* in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes and Development*, 2002, 16(20): 2650–2661
- INAMOTO S, SEGIL N, PAN Z Q, *et al.* The cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, *MAT1*, targets and enhances CAK activity on the POU domains of octamer transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(47): 29852–29858
- JIANG J, ZHAO Z, PAN Y, *et al.* Gender specific differences of immune competence in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* before and after spawning. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 90: 73–79
- JIANG J, ZHAO Z, PAN Y, *et al.* Proteomics reveals the gender differences in humoral immunity and physiological characteristics associated with reproduction in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of Proteomics*, 2020, 217: 103687
- JIANG J, ZHOU Z, DONG Y, *et al.* Comparative analysis of immunocompetence between females and males in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 63: 438–443
- JONGENS T A, ACKERMAN L D, SWEDLOW J R, *et al.* *Germ cell-less* encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes and Development*, 1994, 8(18): 2123–2136
- JONGENS T A, HAY B, JAN L Y, *et al.* The *germ cell-less* gene product: A posteriorly localized component necessary for germ cell development in *Drosophila*. *Cell*, 1992, 70(4): 569–584
- KIMURA T, ITO C, WATANABE S, *et al.* Mouse *germ cell-less* as an essential component for nuclear integrity. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(4): 1304–1315
- KIMURA T, YOMOGIDA K, IWAI N, *et al.* Molecular cloning and genomic organization of mouse homologue of *Drosophila germ cell-less* and its expression in germ lineage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 262(1): 223–230
- LEATHERMAN J L, KAESTNER K H, JONGENS T A. Identification of a mouse *germ cell-less* homologue with conserved activity in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, 2000, 92(2): 145–153
- LI W Y, DENG F J, WANG H N, *et al.* Germ cell-less expression in zebrafish embryos. *Development, Growth and Differentiation*, 2006, 48(5): 333–338
- NUMOTO M, NIWA O, KAPLAN J, *et al.* Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3767–3775
- PUC CETTI E, SENNEWALD B, FOSCA-FERRARA F, *et al.* Down-stream regions of the POZ-domain influence the interaction of the t(11; 17)-associated PLZF/RAR α fusion protein with the histone-deacetylase recruiting co-repressor complex. *Hematology Journal*, 2001, 2: 385–392
- RANGE R, LEPAGE T. Maternal *Oct1/2* is required for *Nodal* and *Vg1/Univin* expression during dorsal-ventral axis specification in the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, 2011, 357(2): 440–449
- SAMESHIMA T, YAMAMOTO T, SANO O, *et al.* Discovery of an irreversible and cell-active *BCL6* inhibitor selectively targeting *Cys53* located at the protein-protein interaction interface. *Biochemistry*, 2018, 57(8): 1369–1379
- SASAI N, MIZUSEKI K, SASAI Y. Requirement of *FoxD3*-class signaling for neural crest determination in *Xenopus*. 2001, 128: 2525–2536
- SCHOLZ S, DOMASCHKE H, KANAMORI A, *et al.* *Germ cell-less* expression in medaka (*Oryzias latipes*). *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 67(1): 15–18
- SHAKYA A, KANG J, CHUMLEY J, *et al.* *Oct1* is a switchable, bipotential stabilizer of repressed and inducible transcriptional states. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(1): 450–459
- STEWART R A, ARDUINI B L, BERGHMANS S, *et al.* Zebrafish *foxd3* is selectively required for neural crest specification, migration and survival. *Developmental Biology*, 2006, 292(1): 174–188
- SUGAWARA M, SCHOLL T, PONATH P D, *et al.* A factor that regulates the class II major histocompatibility complex gene *DPA* is a member of subfamily of zinc finger proteins that includes a *Drosophila* developmental control protein. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12): 8438–8450
- SUI X L, LIU Y X, LIU Y F, *et al.* A study on the reproductive cycle of sea cucumber. *Journal of Fisheries of China*, 1985, 9(4): 303–310 [隋锡林, 刘永襄, 刘永峰, 等. 刺参生殖周期的研究. *水产学报*, 1985, 9(4): 303–310]
- SUN J J, SUN Z H, WEI J L, *et al.* Identification and functional analysis of *foxl2* and *nodal* in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Gene Expression Patterns*, 2022, 44: 119245
- SUN Z H, CUI Z P, SONG J, *et al.* Research progress on sex determination and sexual differentiation in Echinodermata: A review. *Journal of Dalian Ocean University*, 2021, 36(4): 679–686 [孙志惠, 崔洲平, 宋坚, 等. 棘皮动物性别决定与分化研究进展. *大连海洋大学学报*, 2021, 36(4): 679–686]
- SUN Z H, WEI J L, CUI Z P, *et al.* Identification and functional characterization of *piwil* gene in sea cucumber, *Apostichopus japonicas*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part*

- B: *Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 252: 110536
- YAN M, SUI J, SHAO M Y, *et al.* Histological observation on genesis and early differentiation of gonad in *Apostichopus japonicus*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 2011, 41(5): 49–52 [晏萌, 隋娟, 邵明瑜, 等. 仿刺参生殖腺发生与早期分化的组织学观察. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2011, 41(5): 49–52]
- YAN M, SUI J, SHENG W, *et al.* Expression pattern of *vasa* in gonads of sea cucumber *Apostichopus japonicus* during gametogenesis and reproductive cycle. *Gene Expression Patterns*, 2013, 13(5/6): 171–176
- ZHANG X, SUN L, YUAN J, *et al.* The sea cucumber genome provides insights into morphological evolution and visceral regeneration. *PLoS Biology*, 2017, 15(10): e2003790
- ZHOU D X, YEN T S. The ubiquitous transcription factor *Oct-1* and the liver-specific factor *HNF-1* are both required to activate transcription of a hepatitis B virus promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 1991, 11(3): 1353–1359

(编辑 冯小花)

Expression of *germ cell-less* and Its Putative Regulatory Region in the Sea Cucumber, *Apostichopus japonicus*

HUANG Xiaoxiao, LIU Bingzheng, SUN Zhihui^①, CONG Jingjing, SU Weiyi, WEI Jinliang
(Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract The *germ cell-less* gene belongs to the BTB/POZ protein-family, whose structural domain plays an important role in the occurrence of mammalian gonads as it specifically combines with other DNA proteins. In this study, a unigene annotated as *germ cell-less* (*Ajgcl*) was screened from the gonadal genome of *Apostichopus japonicus* (sea cucumber) through homology. The full-length *Ajgcl* cDNA sequence was obtained by 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE). Subsequently, we analyzed the expression characteristic of *germ cell-less* in *A. japonicus* using several methods, including multiple sequence alignment, phylogenetic analysis, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The results showed that *germ cell-less* attaches to the BTB/POZ superfamily. The full-length cDNA of *Ajgcl* was 2 316 bp, which contained a 725 bp 3'UTR, a 139 bp 5'UTR, and a 1 455 bp open reading frame (ORF), encoding a protein of 484 amino acids including a conservative BTB/POZ domain. RT-qPCR analysis revealed that *germ cell-less* was expressed in the ovary, testis, intestines, stomach, longitudinal muscle, respiratory tree, tube feet, and coelomocyte. Remarkably, the expression level in the ovary was the highest and 2.25 times that in the testis. Moreover, as a maternal factor, *germ cell-less* was expressed throughout embryonic development. During ovarian development, the expression of *germ cell-less* in growing stage 2 was slightly elevated, but when the ovum developed into mature stage 3, the expression level was significantly down-regulated. It was not until the end of gametogenesis that its expression level returned to its original level. The expression of *germ cell-less* did not change significantly throughout the developmental stages of the testis. In addition, the online tool Match was used to predict the transcription factor binding sites in the *germ cell-less* promoter of *A. japonicus*. Subsequently, a total of 12 transcription factor binding sites were projected, namely *Oct-1*, *FOXD3*, *PAX-6*, *CRP*, *c-Myb* and *NF-1*. Notably, there were four *Oct-1* binding sites between -1890 and -608. The characteristics of *germ cell-less* gene promoter were obtained, and *germ cell-less* was shown to be a germ cell marker gene for *A. japonicus*. This study provides data for future studies related to germ cell development in *A. japonicus*.

Key words *Apostichopus japonicus*; *Germ cell-less*; Germ cell; Maternal factor

① Corresponding author: SUN Zhihui, E-mail: sunzhihui@dlou.edu.cn