

文章编号: 1674-5566(2013)06-0815-06

## 青海湖裸鲤核糖体蛋白 S3a 基因的克隆和表达特性研究

卫福磊<sup>1</sup>, 王朝溪<sup>1</sup>, 师园<sup>1</sup>, 王辰龙<sup>1</sup>, 史建全<sup>2</sup>, 祁洪芳<sup>2</sup>, 李长忠<sup>1</sup>

(1. 青海大学 生态环境工程学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海湖裸鲤救护中心, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 青海湖裸鲤是青海湖及其周边流域唯一的经济鱼类, 在鱼-鸟-草地生态系统中处于核心地位。核糖体蛋白 S3a (RPS3a) 是真核细胞中核糖体 40S 小亚基的组成成分, 为一种多功能性蛋白。开展青海湖裸鲤高盐适应机理的研究, 有助于揭示青海湖裸鲤的基本生命活动规律, 为该鱼种的资源保护和人工增殖放流提供理论依据。我们通过 RT-PCR 和 RACE 技术, 得到了青海湖裸鲤 RPS3a 的完整编码序列 [KC818610.1]。通过实时荧光定量检测胚胎发育不同阶段和不同盐度胁迫条件下 RPS3a 表达水平的变化, 显示其在盐度胁迫条件下和胚胎发育过程中表达水平逐步上升, 初步表明 RPS3a 对于青海湖裸鲤胚胎发育和盐度适应性生理机制的变化有着重要作用。

**研究亮点:** 青海湖裸鲤在青海湖生态系统中处于核心地位, 为使青海湖生态尽快恢复, 大量增殖放流工作正在进行, 但是从分子水平研究青海湖裸鲤高盐适应机理的工作还很少, 青海湖裸鲤胚胎发育和盐度适应分子机理的研究将为其增殖放流、人工保护繁育工作提供理论基础。

**关键词:** 青海湖裸鲤; 核糖体蛋白 S3a; 胚胎发育; 盐度胁迫

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

核糖体蛋白是细胞中广泛存在的 RNA 结合蛋白, 在真核细胞中, 它与 rRNA 组成核糖体的大小亚基 (60S 和 40S), 在细胞中行使蛋白合成的作用<sup>[1]</sup>。RPS3a 是真核细胞中核糖体 40S 小亚基的组成成分, 在 40S 核糖体与起始因子、mRNA 结合以及 80S 亚基与延长因子结合中起着重要的作用<sup>[2-6]</sup>。除此之外, RPS3a 也是一种多功能性蛋白, 对于癌症发生<sup>[7-9]</sup>、卵巢发育<sup>[10-11]</sup>、胚胎发育<sup>[12]</sup> 以及细胞凋亡<sup>[13-14]</sup> 发挥重要作用。在牛和青鳉胚胎发育过程中 RPS3a 表达量不断增加<sup>[15-16]</sup>, 而 RPS3a 表达量水平的突然性下调通常会导致细胞凋亡发生<sup>[13-14]</sup>。

青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 俗称湟鱼, 属鲤形目 (Cypriniformes), 鲤科 (Cyprinidae), 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae), 裸鲤属 (*Gymnocypris*), 是世界上濒危物种之一<sup>[17]</sup>, 其分布于青藏高原青海湖流域, 每年会从青海湖洄游至淡水河流中产卵繁殖<sup>[18]</sup>。由于青海湖盐度的

增加<sup>[19]</sup> 以及人工过度捕捞, 在过去的 50 年中, 青海湖中裸鲤存储量从 1960 年的  $2 \times 10^5$  t<sup>[20]</sup> 减少到了现在不足  $0.5 \times 10^4$  t<sup>[21]</sup>。人工增殖放流是一种有效地恢复青海湖生态的方法, 同时, 对于人工孵化中胚胎发育和仔鱼增殖放流中盐度适应过程的研究将有助于物种保护和地区渔业发展。

本研究的主要目的在于通过 RT-PCR 和 RACE 方法克隆得到 RPS3a 基因完整的 cDNA 序列, 并进行序列和表达模式分析, 研究其在胚胎发育和盐度胁迫过程中的作用, 为解释青海湖裸鲤特殊环境的适应性机制提供分子生物学理论基础, 进一步指导青海湖裸鲤人工保护繁育工作。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用青海湖裸鲤个体取自青海湖裸鲤救护中心原种培育基地养殖场 (青海, 西宁), 均为

收稿日期: 2013-03-24

修回日期: 2013-09-24

基金项目: 国家科技支撑计划 (2012BAD26B01); 青藏高原冷水鱼类养殖产业化关键技术研究 (2011-QN2-1)

作者简介: 卫福磊 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生物学。E-mail: lixia05318@163.com

通信作者: 李长忠, E-mail: licz05@gmail.com

淡水池塘养殖的 1<sup>+</sup> 龄鱼, 体重 50 ~ 100 g, 体长 12 ~ 18 cm。试验用鱼于养殖场循环水养殖池进行盐度胁迫, 每种处理随机选取健康的青海湖裸鲤 3 条以上, 取鳃组织于液氮中保存。青海湖裸鲤胚胎发育不同阶段取自青海湖裸鲤救护中心刚察孵化站, 青海湖裸鲤卵细胞人工受精后于淡水中孵化, 孵化用水引自沙柳河(青海, 西宁), 为地表径流水, 水温保持在 13 ~ 17 °C, 溶氧量大于 5.0 mg/L。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 总 RNA 的提取和 *RPS3a* 基因末端扩增 (RACE) cDNAs 末端模板制备

取液氮中保存的鳃组织液氮研磨, 加入 RNAliso Plus reagent (TaKaRa, Kyoto, Japan) 中提取 RNA。提取的总 RNA 样品经过定量并电泳检测后, 依照 5' Full RACE Kit (TaKaRa, Kyoto, Japan)、3' Full RACE Core Set Ver. 2.0 (TaKaRa, Kyoto, Japan) 制备 RACE 扩增模板。

### 1.2.2 *RPS3a* 基因全长扩增

比对不同物种来源的 *RPS3a* 编码序列, 在保守区设计 *RPS3a* 特异扩增引物 (GPS3AF1 和 GPS3AR1), 以青海湖裸鲤鳃组织 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到青海湖裸鲤 *RPS3a* 特异扩增片段。

根据 5' Full RACE Kit 说明和 *RPS3a* 特异性基因片段设计 5' 末端扩增用引物 GPS3AR1 和 GPS3AR2, 通过巢式 PCR 扩增得到 5' 端非编码区。同样设计 3' 末端扩增特异引物 GPS3AF1 和巢式 GPS3AF2, 使用 3' Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒进行 PCR 扩增得到 3' 端非编码区。将上述获得的序列进行拼接, 依据拼接序列设计位于 *RPS3a* 末端的验证性引物 GPS3ACF1 和 GPS3ACR1, 通过 PCR 反应获得 *RPS3a* 编码区全长 cDNA 序列。各引物序列见表 1。

### 1.2.3 *RPS3a* 基因序列分析

利用在线工具 ExPaSy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) 进行蛋白质序列基本性质预测。利用在线工具 IntroPro 进行蛋白质结构域预测。下载不同物种的 *RPS3a* 氨基酸序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 进行同源性比较及系统进化树的绘制 (Infor-Max, Frederick, USA)。

### 1.2.4 青海湖裸鲤胚胎发育不同阶段 *RPS3a* 基因表达水平检测

青海湖裸鲤产沉粘性卵, 人工脱粘之后, 调控水温和水流量, 于溶氧大于 5.0 mg/L 流动淡水中孵化, 全部仔鱼出膜约 7 d 左右<sup>[22]</sup>。保存未发育成熟的 IV 期卵母细胞、以及发育至多细胞期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期和器官形成期的胚胎于液氮中, 提取各发育阶段总 RNA, 设计并选择扩增效率达到要求的引物 GPS3ARTF1 和 GPS3ARTF2 (表 1), 以  $\beta$ -actin 为参照, 通过 RT-PCR 方法检测 *RPS3a* 在卵母细胞和胚胎不同发育阶段的表达水平。RT-PCR 扩增条件为: 预变性 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 56 °C 30 s, 72 °C 25 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 PCR 引物名称及序列  
Tab. 1 Primer names and primer sequences used in PCR

引物名称	引物序列	扩增效率
GPS3AF1	ATGGGAAATGAAGCAAGTT	
GPS3AR1	GATGTCGGTGACCCTCTG	
GPS3AR1	GATGTCGGTGACCCTCTG	
GPS3AR2	GAGACAGACGGAGAAGAAAGC	
GPS3AF1	GCCTGCCAGTCCATCTACCCTCTAC	
GPS3AF2	AAAGCCCAAGTTTGAGCCTGCTAAGC	
GPS3ACF1	ATGGCACTCGGCAAGAATAAGAGG	
GPS3ACR1	TTTTAGACCGACTCCTGGATGGG	
GPS3ARTF1	TCAACATCCGCAACCTGG	99%
GPS3ARTF2	CGGAGAAGATAGCCATCAGTG	
$\beta$ -actinRTF1	ATGGGAACCGCTGCCTCTT	99%
$\beta$ -actinRTR1	GGTCAGCAATGCCAGGGTA	

### 1.2.5 盐度胁迫条件下 *RPS3a* 基因表达水平检测

青海湖裸鲤在洄游产卵过程中经历了盐度的变化刺激。为了研究 *RPS3a* 基因在盐度适应中的功能, 通过加入 NaCl 逐步增加盐度对 1<sup>+</sup> 龄鱼种进行刺激, 选取了 0、4、8、12 和 16 盐度胁迫 7 d 后个体鳃组织于液氮中保存、提取总 RNA, 检测 *RPS3a* 表达水平(方法同 1.2.4)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *RPS3a* 基因序列分析

如图 1, *RPS3a* 的完整 cDNA 序列全长为 904 bp, 其中包括 44 bp 的 5' 端非编码区, 编码 267 个

氨基酸的开放阅读框(801 bp), TAA 终止密码子, 包含 poly(A) 尾的 3' 端非编码区(56 bp)。根

据其所编码的氨基酸序列, 推测其蛋白分子量为 30.2。

```

-44                                     CTGATGATCAGTCGATGGAACTCTTTCACTCTCTGTGTTCAAC
1  ATGGCAGTCGGCAAGAATAAGAGGCTGACCAAAGGTGGCAAAAAGGTCGCAAAAAGAAGATCGTGGATCCATTTCCAAGAAGGATTGG
1  M A V G K N K R L T K G G K K G A K K K I V D P F S K K D W
91  TATGATGTCAAGGCACCAGCCATGTTCAACATCCGCAACCTGGGCAAGACACTGGTCACCAGGACTCAGGGAACCAGAAATGCTCTGAT
31  Y D V K A P A M F N I R N L G K T L V T R T Q G T R I A S D
181 GGTCTGAAGGACGTGTGTCGAAGTCAGTCTGGCTGATCTGCAGAACGATGAGGTGGCCTCCCGCAAGTTCAGGCTGGTCACAGAAGAC
61  G L K G R V F E V S L A D L Q N D E V A F R K F K L V T E D
271 GTGCAGGGCAAGAACTGCCTCACCAACTTCCACGGCATGGACCTCACGCGGACAAGATGTGCTCCATGGTCAAGAAGTGGCAGACTATG
91  V Q G K N C L T N F H G M D L T R D K M C S M V K K W Q T M
361 ATTGAGGCCACGTTGATGTGAAGACCAGTATGGCTATCTTCTCCGCTGTCTCGGTGGGTTTACCAAGAAGCGACCAACCAGATC
121 I E A H V D V K T T D G Y L L R L F C V G F T K K R T N Q I
451 AGAAAGACCTCTACGCTCAGCACCAGCAGGTCCGTCAGATTCGCAAGAAGATGATGGAATCATGACCCGTGAGGTCCAGACCAATGAC
151 R K T S Y A Q H Q Q Y R Q I R K K M E I M I R E V Q T N D
541 CTCAAGGAGTGGTCAACAACTGATTCCTGACAGTGTAGGCAAGGACATCGAAAAGGCTGCCAGTCCATCTACCTCTACATGATGTC
181 L K E V V N K L I P D S V G K D I E K A C Q S I Y P L H D V
631 TATGTCAGGAAGTTAAGATGCTGAGAAAGCCCAAGTTTGAACCTGGTAAAGCTGATGGAGCTGCACGGTGAGGGTGGAAACGACAGTGTG
211 Y V R K V K M L R K P K F E P G K L M E L H G E G G T S S A
721 GCTGCAAAACCTGCAGAGGGTGACACTGGGGCTAAGGTGGAGAGAGCTGATGGATACGAGCCCCCATCCAGGAGTGGTCTAA
241 A A K P A E G D T G A K V E R A D G Y E P P I Q E S V *
849 AACTCCCAACAAAAAGCTGGTCAATAAATATGTAATTTGAAAAA

```

图 1 青海湖裸鲤 RPS3a 氨基酸序列与 cDNA 序列

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of RPS3a

青海湖裸鲤 RPS3a 氨基酸序列与其他硬骨鱼 RPS3a 氨基酸序列相似性较高, 分别为: 斑马鱼 98% (DrS3A)、大西洋鲑鱼 94% (SsS3A), 而与拟南芥 (AiS3A)、玉米 (ZmS3A)、酵母 (SpS3A)、原肠动物 (SmS3A) 和人类 (HsS3A) 相似性较低。通过进化树分析, 推测 S3a 基因在物种分化初期便已经发生变异(图 2)。

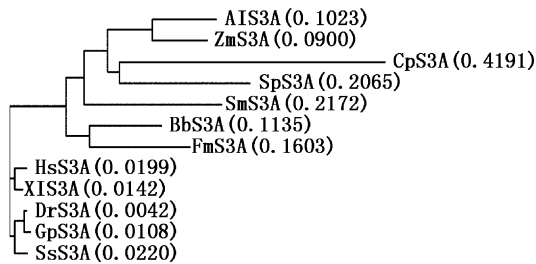


图 2 不同物种 RPS3a 氨基酸序列比及 NJ 法构建进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *G. przewalskii* RPS3a with those of other species

GenBank 登录号: AiS3A, RPS3a [拟南芥] (XP\_002882377.1); ZmS3A, RPS3a [玉米] (NP\_001149096.1); CpS3A, RPS3a [隐藻草履虫] (XP\_003239957.1); SpS3A, RPS3a [酵母] (AAD33346.1); SmS3A, RPS3a [曼森氏裂体吸虫] (XP\_002578561.1); BbS3A, RPS3a [桦尺蛾] (AEP43788.1); FmS3A, RPS3a [墨吉对虾] (ADY16617.1); HsS3A, RPS3a [人类] (NP\_000997.1); XIS3A, RPS3a [爪蟾] (NP\_001080325.1); DrS3A, RPS3a [斑马鱼] (NP\_956353.1); SsS3A, RPS3a [鲑鱼] (ADM16028.1); GpS3A, RPS3a [青海湖裸鲤] (KC818610.1)。

### 2.2 胚胎发育不同阶段 RPS3a 基因表达水平检测

如图 3 所示, 以青海湖裸鲤  $\beta$ -actin 为内参基因, 调查了 RPS3a 基因在第 4 时相卵母细胞及青海湖裸鲤胚胎发育不同阶段表达水平变化, 显示 RPS3a 表达量在青海湖裸鲤胚胎发育不同阶段差异性较大。青海湖裸鲤 IV 期卵巢主要由处于第 4 时相的卵母细胞构成<sup>[23]</sup>, 在第 4 时相卵母细胞中, RPS3a 表达量略高于胚胎发育初期多细胞期和囊胚期, 在胚胎发育过程中, 其表达量显著升高。

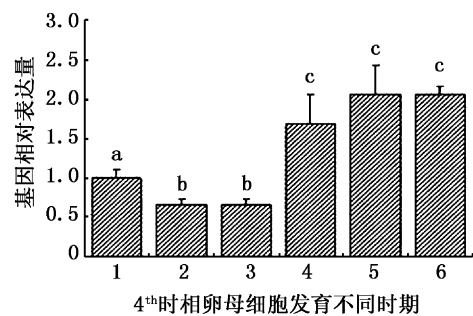


图 3 4<sup>th</sup> 时相卵母细胞及胚胎发育不同阶段 RPS3a 表达模式

Fig. 3 Expression pattern of RPS3a in oocytes of phase 4 and different stages of embryogenesis

1. 4<sup>th</sup> 时相卵母细胞; 2. 多细胞期; 3. 囊胚期; 4. 原肠胚期; 5. 神经胚期; 6. 器官形成期。柱形图上相同字符代表经过单因素方差分析无显著性差异,  $P = 0.05$ 。

### 2.3 盐度胁迫条件下 *RPS3a* 基因表达水平检测

我们通过人工模拟盐度变化,对 *RPS3a* 表达模式进行研究。如图 4 所示,*RPS3a* 基因转录水平随着盐度的不断增加逐步升高,当盐度逐步增加至 16 时,转录水平增加至淡水中约 2 倍左右。

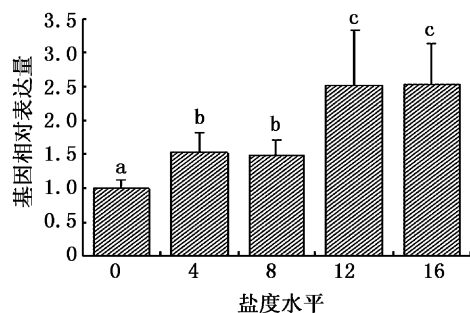


图 4 不同盐度胁迫条件下 *RPS3a* 表达模式  
Fig 4 Expression pattern of *RPS3a* under different salinity stress

## 3 讨论

### 3.1 *RPS3a* 与胚胎发育

已有的研究表明,*RPS3a* 基因在胚胎发育过程中表达量显著升高<sup>[15-16]</sup>,这与本次试验所得到的结果一致。鱼类卵细胞通常需经历受精、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、神经胚器和器官形成期后进入孵化阶段,当鱼类胚胎发育至器官形成期,细胞进入分化与凋亡活动更加活跃的阶段。

PIP2 是一种重要的调节分子,他可以激活 Slo3 蛋白活性,引起卵细胞超极化和受精作用<sup>[24]</sup>。同时,精子中的磷脂酶 C (PLC) 通过水解卵细胞中 PIP2 得到肌醇 3-磷酸 (PI3) 和磷脂酰甘油 (DG),在这两种信号分子的作用下,游离  $Ca^{2+}$  大量释放,从而引起卵细胞的激活<sup>[25-26]</sup>, $Ca^{2+}$  释放缺陷也会导致斑马鱼卵细胞不能被激活<sup>[27-28]</sup>。*RPS3a* 蛋白存在于细胞核与细胞质中,但是活性却存在些许差异,位于细胞核中的 *RPS3a* 被证实是可以与磷脂酰肌醇 4,5,6-三磷酸结合的<sup>[29]</sup>。

*RPS3a* 基因的表达量在未分化的细胞中往往处于较高的水平,突然性下调 *RPS3a* 表达量会导致细胞的凋亡<sup>[14]</sup>,但是在细胞的分化过程中,*RPS3a* 的表达量也会下调<sup>[13]</sup>。青海湖裸鲤胚胎发育过程中 *RPS3a* 表达量持续升高,我们可以认为这是为进入器官形成期后细胞分化和凋亡所做的前期准备。

### 3.2 *RPS3a* 与盐度胁迫

*RPS3a* 蛋白位于核糖体 40S 亚基和 60S 亚基的接触面上,能够与转录起始因子 (EIF)、tRNA、18S RNA 及 mRNA 等结合,具有调节转录、RNA 加工、DNA 复制等功能,广泛参与细胞的生长发育和分化。鱼类鳃组织是一种重要的多功能器官,与鱼类渗透平衡、代谢物排出、呼吸作用相关。其中泌氯细胞存在于鳃丝上,可在高渗的环境下将过多的盐排出体外,日本花鲈在淡水适应过程中泌氯细胞相对于海水中发生了显著的改变<sup>[30]</sup>。在罗非鱼由淡水向海水转变的过程中,单个的淡水型泌氯细胞也会转变为多细胞型泌氯细胞,这些说明盐度适应的过程伴随着鳃组织细胞结构分化<sup>[31]</sup>。

在盐度适应过程中,我们观察了青海湖裸鲤鳃组织 *RPS3a* 基因的表达模式。发现随着盐度的升高,其表达量也逐步升高,因此我们可以判断 *RPS3a* 具有调节青海湖裸鲤盐度适应的功能,而在适应过程中是否与鳃组织细胞分化相关还需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] WOOL I G, The structure and function of eukaryotic ribosomes [J]. Annual Review of Biochemistry, 1979, 48: 719-54.
- [2] NAGAHISA H, NAGATA Y, OHNUKI T, et al. Bone marrow stromal cells produce thrombopoietin and stimulate megakaryocyte growth and maturation but suppress proplatelet formation [J]. Blood, 1996, 87(4): 1309-1316.
- [3] BOMMER U A, STAHL J, HENSKE A, et al. Identification of proteins of the 40 S ribosomal subunit involved in interaction with initiation factor eIF-2 in the quaternary initiation complex by means of monospecific antibodies [J] FEBS Lett, 1988, 233(1): 114-118.
- [4] NYGARD O, NILSSON L, WESTERMANN P. Characterisation of the ribosomal binding site for eukaryotic elongation factor 2 by chemical cross-linking [J]. Biochim et Biophys Acta, 1987, 910(3): 245-253.
- [5] WESTERMANN P, NYGARD O. The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40 S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins [J]. Biochim et Biophys Acta, 1983, 741(1): 103-108.
- [6] WESTERMANN P, NYGARD O, BIELKA H. Cross-linking of Met-tRNA<sup>f</sup> to eIF-2 beta and to the ribosomal proteins S3a and S6 within the eukaryotic initiation complex, eIF-2. GMPPCP. Met-tRNA<sup>f</sup>. small ribosomal subunit [J]. Nucleic Acids Research, 1981, 9(10): 2387-2396.

- [7] LIM K H, KIM K H, CHOI S I, et al. RPS3a over-expressed in HBV-associated hepatocellular carcinoma enhances the HBx-induced NF-kappaB signaling via its novel chaperoning function [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22258.
- [8] SONG D, SAKAMOTO S, TANIGUCHI T. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the ribosomal protein S3a [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (3): 929-934.
- [9] LECOMTE F, SZPIRER J, SZPIRER C. The S3a ribosomal protein gene is identical to the Fte-1 (v-fos transformation effector) gene and the TNF-alpha-induced TU-11 gene, and its transcript level is altered in transformed and tumor cells [J]. *Gene*, 1997, 186(2): 271 - 277.
- [10] REYNAUD E, BOLSHAKOV V N, BARAIAS V, et al. Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3A gene disrupts ovarian development in *Drosophila melanogaster* [J]. *Molecular and General Genetic*, 1997, 256(4): 462 - 467.
- [11] KIM M, SIM C, DENLINGER D L. RNA interference directed against ribosomal protein S3a suggests a link between this gene and arrested ovarian development during adult diapause in *Culex pipiens* [J]. *Insect Molecular Biology*, 2010, 19 (1): 27 - 33.
- [12] UECHI T, NAKAJIMA Y. Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in Zebrafish [J]. *PLoS One*, 2006, 1: e37.
- [13] RUSSELL L, NAORA H. Down-regulated RPS3a/nbl expression during retinoid-induced differentiation of HL-60 cells; a close association with diminished susceptibility to actinomycin D-stimulated apoptosis [J]. *Cell Structure and Function*, 2000, 25(2): 103 - 113.
- [14] NAORA H, TAKAI I, ADACHI M. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 141(3): 741 - 753.
- [15] KANKA J, BRYOVA A, DURANTHON V, et al. Identification of differentially expressed mRNAs in bovine preimplantation embryos [J]. *Zygote*, 2003, 11(1): 43 - 52.
- [16] SHEMER R, EIBSCHITZ I, CAVARI B. Isolation and characterization of medaka ribosomal protein S3a (fte-1) cDNA and gene [J]. *Gene*, 2000, 250(1/2): 209 - 217.
- [17] XIONG F, CHEN D, DUAN X. Threatened fishes of the world: *Gymnocypris przewalskii*; (Kessler, 1876) (Cyprinidae: Schizothoracinae) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 87(4): 351 - 352.
- [18] 杨建新, 祁洪芳, 史建全, 等. 青海湖水化学特性及水质分析 [J]. *淡水渔业*, 2005, 35(3): 24 - 28.
- [19] WALKER K F, DUNN I G, EDWARDS D, et al. A fishery in a changing lake environment: The naked carp (*Gymnocypris przewalskii*); (Kessler) (Cyprinidae: schizothoracinae) in Qinghai Hu, China [J]. *International Journal of Salt Lake Research*, 1995, 4(3): 169 - 222.
- [20] 史建全, 祁洪芳, 杨建新, 等. 青海湖裸鲤资源评析 [J]. *淡水渔业*, 2000(11): 38 - 40.
- [21] CHEN D, ZHANG X, TAN T, et al. Hydroacoustic study of spatial and temporal distribution of (*Gymnocypris przewalskii*); (Kessler, 1876) in Qinghai Lake, China [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2009, 84(2): 231 - 239.
- [22] 赵秀梅. 青海湖裸鲤人工孵化注意事项 [J]. *青海科技*, 2010, 30(3): 12 - 13.
- [23] 史建全, 唐洪玉, 祁洪芳, 等. 青海湖裸鲤性腺发育观察 [J]. *淡水渔业*, 2004, 34(3): 7 - 9.
- [24] TANG Q Y, ZHANG Z, XIA J, et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate activates Slo3 currents and its hydrolysis underlies the epidermal growth factor-induced current inhibition [J]. *Journal of Biological*, 2010, 285 (25): 19259 - 19266.
- [25] RICE A, PARRINGTON J, GONES K T, et al. Mammalian sperm contain a Ca<sup>2+</sup>-sensitive phospholipase C activity that can generate InsP3 from PIP2 associated with intracellular organelles [J]. *Developmental Biology*, 2000, 228(1): 125 - 135.
- [26] HOWELL K P, SKIPWITH A, GALIONE A, et al. Phospholipase C-dependent Ca<sup>2+</sup> release by worm and mammal sperm factors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 307(1): 47 - 51.
- [27] RICHARD A, EPEL D. Activation of Sea-Urchin Eggs by a Calcium Ionophore [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1974, 71(5): 1915 - 1919.
- [28] MEI W, LEE K W, MARLOW F L, et al. HnRNP I is required to generate the Ca<sup>2+</sup> signal that causes egg activation in zebrafish [J]. *Development*, 2009, 136 (17): 3007 - 3017.
- [29] HAMAGUCHI N, OHDAIRA T, SHINOHARA A, et al. Identification of ribosomal protein S3a as a candidate for a novel PI 3-kinase target in the nucleus [J]. *Cytotechnology*, 2002, 40(1/3): 85 - 92.
- [30] HIRAI N, TAGAWA M. Distributional changes in Branchial Chloride Cells during freshwater adaptation in Japanese Sea Bass *Lateolabrax japonicus* [J]. *Zoological Science*, 1999, 16(1): 43 - 49.
- [31] KANEKO T, SHIRAISHI K, KATOH F, et al. Chloride cells during early life stages of fish and their functional differentiation [J]. *Fisheries Science*, 2002, 68(1): 1 - 9.

## Cloning and characterization of ribosomal protein S3a mRNA from *Gymnocypris przewalskii*

WEI Fu-lei<sup>1</sup>, WANG Zhao-xi<sup>1</sup>, SHI Yuan<sup>1</sup>, WANG Chen-long<sup>1</sup>, SHI Jian-quan<sup>2</sup>, QI Hong-fang<sup>2</sup>, LI Chang-zhong<sup>1</sup>

(1. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China; 2. Emergency Centre of *Gymnocypris przewalskii*, Xining 810016, Qinghai, China)

**Abstract:** *Gymnocypris przewalskii* is the only kind of economic fishes distributed in Qinghai Lake located on the Qinghai-Tibet plateau. Ribosomal protein S3a (RPS3a) is one kind of multifunctional protein known as a component of the 40s small ribosomal subunit. Research concerning molecular mechanism of *G. przewalskii* under salinity stress will contribute to discovering the basic pattern of vital activity and provide theories for conservation and artificial reproduction of this species. In this study, the cDNA sequences of RPS3a [KC818610.1] were obtained from the naked carp through reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE-PCR). According to real time PCR analysis, the transcriptions of RPS3a increased in embryogenesis and under salinity stress, and it was demonstrated that RPS3a played an important role in embryogenesis and salinity adaptation.

**Key words:** *Gymnocypris przewalskii*; RPS3a; embryogenesis; salinity stress