

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210107002

http://www.yykxjz.cn/

邝杰华, 马骞, 陈刚, 毛非凡, 周启苓, 黄建盛, 施钢, 张健东. 军曹鱼 *dnd* 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 119-128

KUANG J H, MA Q, CHEN G, MAO F F, ZHOU Q L, HUANG J S, SHI G, ZHANG J D. Cloning and expression analysis of *dnd* during annual gonadal development of cobia (*Rachycentron canadum*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 119-128

# 军曹鱼 *dnd* 基因 cDNA 克隆及其在性腺周年发育过程中的表达\*

邝杰华<sup>1</sup> 马骞<sup>1,2①</sup> 陈刚<sup>1,2①</sup> 毛非凡<sup>1</sup>  
周启苓<sup>1</sup> 黄建盛<sup>1,2</sup> 施钢<sup>1</sup> 张健东<sup>1,2</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院 广东 湛江 524025;

2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江) 广东 湛江 524025)

**摘要** 本研究通过 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)克隆了军曹鱼(*Rachycentron canadum*) *dnd* 基因(*Rcdnd*)的 cDNA 序列,全长 1339 bp,其中,5'非编码区 59 bp,3'非编码区 173 bp,开放阅读框(ORF) 1107 bp,共编码 368 个氨基酸。*Rcdnd* 氨基酸序列含有 1 段 RNA 识别保守基序(RRM)以及 4 个 C 端保守结构域(CR1~4),与高体鲷(*Seriola dumerili*) *dnd* 的一致性最高(72.3%)。系统进化分析表明,*Rcdnd* 与高体鲷的同源蛋白亲缘关系最接近。基于半定量 RT-PCR 的组织表达分布分析结果显示,*Rcdnd* 在性腺中特异表达,在其他组织中均无表达。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)结果显示,在精巢发育过程(II~V 期),*Rcdnd* 的表达水平呈逐渐上升趋势;在卵巢发育过程(I~III 期),*Rcdnd* 的表达水平先显著升高后趋于稳定,在 150 dph (II 期)时的表达量最高。原位杂交结果显示,不同发育时期性腺组织中,*Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达。在精巢中,*Rcdnd* mRNA 集中表达于精原细胞和初级精母细胞的周缘,次级精母细胞中的杂交信号明显减弱,而精细胞和成熟精子中几乎检测不到杂交信号。在卵巢中,*Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达最强,在初级卵母细胞中的表达较弱,其中, I、II 和 III 时相卵母细胞检测到的杂交信号强度无显著差异,且杂交信号均匀分布于细胞质中。研究结果表明,*Rcdnd* 基因可能参与军曹鱼性腺发育过程,上述结果可为揭示军曹鱼两性生殖细胞发生发育的调控机理提供理论依据。

**关键词** 军曹鱼; *dnd*; 基因克隆; 性腺发育; 表达分析

中图分类号 Q785; S917 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0119-10

*dnd* 基因最初鉴定于斑马鱼(*Danio rerio*)中 RNA 结合蛋白,作为脊椎动物生殖质的重要组成部分之一,特异表达于生殖系细胞中,并在生殖细胞的发生(Weidinger *et al*, 2003),可编码一种进化上保守的

\* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系专项资金、南方海洋科学与工程广东省实验室(湛江)(ZJW-2019-06)和广东海洋大学科研启动经费资助项目(R19022)共同资助 [This work was funded by China Agriculture Research System of MOF and MARA, Fund of Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang) (ZJW-2019-06), and Program for Scientific Research Start-up Funds of Guangdong Ocean University (R19022)]. 邝杰华, E-mail: 3242864479@qq.com

① 通讯作者: 马骞, 副研究员, E-mail: maq@gdou.edu.cn; 陈刚, 教授, E-mail: cheng@gdou.edu.cn

收稿日期: 2021-01-07, 收修改稿日期: 2021-02-05

及发育过程中发挥着重要作用(Gross-Thebing *et al.*, 2017)。基于此特性, *dnd* 基因常作为分子标记物, 广泛应用于鱼类生殖细胞的相关研究(程琳等, 2020)。目前, 已在多种脊椎动物中克隆和鉴定出 *dnd* 的同源基因, 包括小鼠(*Mus musculus*) (Bhattacharya *et al.*, 2007)、红原鸡(*Gallus gallus*) (Aramaki *et al.*, 2009)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (Horvay *et al.*, 2006)、大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*) (Škugor *et al.*, 2014)、大西洋鲑(*Salmo salar*) (Wargelius *et al.*, 2016)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Fujimoto *et al.*, 2010)、银鲫(*Carassius gibelio*) (Li *et al.*, 2016)等。

据报道, *dnd* 基因的表达模式在不同物种中存在明显的差异, 如 *dnd* 基因仅在小鼠精巢中特异表达(Bhattacharya *et al.*, 2007); 在非洲爪蟾中, *dnd* 基因则特异表达于卵巢(Horvay *et al.*, 2006); 而大黄鱼(*Larimichthys crocea*) (陈仕海等, 2015)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (Lin *et al.*, 2013)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) (Wang *et al.*, 2015) *dnd* 基因均在性腺中特异表达, 但在卵巢中的表达水平要高于精巢。关于 *dnd* 基因功能方面, 小鼠 *dnd* 基因发生突变后, 将抑制原始生殖细胞(PGCs)的产生, 导致部分特定遗传背景的个体产生睾丸生殖细胞瘤(Youngren *et al.*, 2005); 抑制非洲爪蟾胚胎发育时期 *dnd* 基因的表达将直接导致其 PGCs 的缺失(Horvay *et al.*, 2006); 敲除斑马鱼 *dnd* 基因可引起 PGCs 的迁移发生异常, 随后凋亡, 部分雌性个体甚至出现性逆转的现象(Weidinger *et al.*, 2003)。以上研究结果表明, *dnd* 基因在 PGCs 发生、迁移及性别分化中发挥着重要的调节作用。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)隶属鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron*), 为广盐暖水性海水鱼类, 俗称海鲷、海龙鱼, 广泛分布于热带和亚热带海域(东太平洋除外)(Castellanos-Galindo *et al.*, 2016), 在中国南海部分海域亦有少量分布(陈刚等, 2004)。由于军曹鱼具有生长速率快、易于驯化、抗病力强、肉厚质地细腻等特点(Hamilton *et al.*, 2013), 近年来在南方沿海地区的养殖发展迅猛, 随着人工繁殖和大规模育苗技术的突破, 军曹鱼已成为我国极具前景的海水网箱养殖鱼类之一。

本研究克隆分析军曹鱼 *dnd* (*Rcdnd*)基因 cDNA 全长序列, 利用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)检测 *Rcdnd* 的组织表达分布及其在不同发育期性腺组织中的表达水平, 利用原位杂交技术初步分析 *Rcdnd* mRNA 在配子形成过程中的表达定位分布, 旨在从分子水平阐明 *dnd* 基因在军曹鱼配子

发生过程中的作用, 同时也为进一步研究鱼类 PGCs 发生、迁移和分化的分子机理提供基础理论资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及处理

实验用军曹鱼于 2019 年 6 月—2020 年 4 月采自广东省茂名市电白县某室内养殖基地, 军曹鱼幼鱼饲养于直径 9 m、水深 2.5 m 的金属圆形水池内, 流水充气, 养殖盐度 27.0~30.5, 温度 25.0℃~30.0℃, 分别对 90、120、150、185、210 和 360 dph 体质良好的军曹鱼进行采样, 其中, 实验用雌鱼共 23 尾, 体重 215.0~5050.0 g, 体长 29.8~68.5 cm; 雄鱼共 18 尾, 体重 230.0~4225.0 g, 体长 29.2~64.5 cm。

对随机采集的军曹鱼活体进行形态学指标的测量, 随后立即解剖, 取出性腺, 鉴定其性别, 将同一尾鱼的两叶性腺分开保存, 其中一叶性腺于 4℃在 RNA Later 中静置过夜, 最后转移至-80℃超低温冰箱保存, 用于 qRT-PCR 实验; 另外一叶性腺从中间剪为两段, 分别放入 4%多聚甲醛(PFA)中, 固定 24 h 后转入焦碳酸二乙酯(DEPC)配制的 70%乙醇中, 用于切片原位杂交实验。此外, 选取 150 dph 军曹鱼雌雄各 1 尾, 将其脑、肌肉、鳃、肝、肠、胃、脾、体肾、心、皮肤、眼睛、精巢和卵巢分离, 经 DEPC 水冲洗后放入 RNA Later 中, -80℃保存待用。

### 1.2 *Rcdnd* 基因全长 cDNA 的克隆

将采集的军曹鱼卵巢放入液氮中研磨, 采用 Trizol 法(Invitrogen)提取总 RNA。通过 SimpliNano 超微量核酸蛋白测定仪检测总 RNA 的浓度和纯度, 并以 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。参考 EasyScript One-step cDNA Synthesis 试剂盒(TransGen)说明书, 将 2 μg 总 RNA 反转录合成第一链 cDNA, 另取 2 μg 总 RNA, 按照 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'试剂盒(Clontech)说明书, 合成 5'/3' RACE-Ready cDNA。

从课题组前期获得的军曹鱼全基因组数据库(暂未上传至 NCBI 数据库)中提取 *dnd* 基因的 CDS 序列信息, 分别在序列两端设计上下游特异性引物 *Rcdnd*-F 和 *Rcdnd*-R(表 1), PCR 反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 67℃ 30 s, 72℃ 1 min 20 s, 共 35 个循环; 72℃ 10 min, PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 确定为目的片段后用胶回收试剂盒(TransGen)纯化回收, 并将纯化产物连接到 pMD-18T (TaKaRa)载体, 进而转化至 DH-5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选挑取单克隆阳性菌落由生工生物工程(上海)股份有

限公司测序。根据测序片段, 分别在靠近序列 5'和 3'末端各设计 2 条 RACE 引物 Rcdnd 5'-R1/R2 和 Rcdnd 3'-F1/F2 (表 1), 采用巢式 PCR 获取 *Rcdnd* 基因 5'和 3'末端序列。

使用 NCBI 数据库上的 BLASTP 对克隆所得 *Rcdnd* 氨基酸序列进行比对, 下载其他硬骨鱼类及高等脊椎动物的 *dnd* 氨基酸序列, 利用 GenDoc 进行氨基酸序列多重比对分析。利用 MEGA 5.0 软件, 以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统进化树, 针对进化树各分支结点均进行 1000 次重复计算检验。

### 1.3 *Rcvasa* 基因在各组织及性腺发育过程中的表达

通过组织学观察并参照国内学者(刘筠, 1993)对鱼类性腺的分期方法, 依据性腺中生殖细胞的种类、成熟度、数量占比及排列方式进行发育分期的划分, 提取不同发育时期军曹鱼的性腺以及 150 dph 军曹鱼个体各组织的总 RNA, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。基于测序获得的 *Rcdnd* 基因序列, 设计一对特异性扩增引物 Rcdnd-F1/R1, 并以军曹鱼  $\beta$ -actin 作为内参基因(表 1)。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 20 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。通过琼脂糖凝胶电泳检测 *Rcdnd* 在不同组织中的半

定量 RT-PCR 结果, 利用 Tanon 4100 凝胶成像系统采集图像。qRT-PCR 实验流程按照 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 试剂盒(TaKaRa)说明书进行操作, 使用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪检测 *Rcdnd* 在不同发育时期精巢和卵巢中的表达, 每个实验样品设置 3 个重复。根据测得的 *Ct* 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法(Schmittgen *et al*, 2008)计算 *Rcdnd* 的相对表达量。所得数据结果均以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD,  $n=3$ )表示, 利用统计学软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Duncan's 多重比较,  $P<0.05$  表示有显著性差异。

### 1.4 性腺组织原位杂交

根据已获得的 *Rcdnd* 基因序列, 利用 Primer Premier 6.0 软件设计具有特异性的寡核苷酸探针序列(表 1), 探针的 5'和 3'端用地高辛(DIG)标记, 由武汉赛维尔生物科技有限公司合成。

将石蜡包埋的 120、210 和 360 dph 军曹鱼精巢和卵巢样品进行组织切片(5~6  $\mu$ m), 具体杂交过程综合参考相关研究中的方法(李晓妮等, 2017; 史宝等, 2017)。滴加 BCIP/NBT 显色液进行化学显色, 显微镜观察阳性后再滴加核固红染核, 中性树胶封片, 最后显微镜检, 采集图像分析。

表 1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
Rcdnd-F	ATGGAGGACGAGCAGAACCAGGT	CDS 序列克隆 CDS sequence cloning
Rcdnd-R	TCAAAATAGGCTGTTCATGGGAGGGT	
Rcdnd3'-F1	ATTGGAGACCTGCCAGTTGC	3'末端序列克隆 3' RACE
Rcdnd3'-F2	GATGGATTCTCTACTTCACCTACA	
Rcdnd5'-R1	CTTGATTGAGATGGTCAGAGCA	5'末端序列克隆 5' RACE
Rcdnd5'-R2	CTGTATTTGGCATAGGCGAAGC	
Rcdnd-F1	GAACCGTGGCTTCGCCTATG	PCR 扩增 PCR amplification
Rcdnd-R1	AGACTCTCTCCACCCCGT	
$\beta$ -actin-F	AGGGAAATTGTGCGTGAC	内参基因 Internal control gene
$\beta$ -actin-R	AGGCAGCTCGTAGCTCTT	
Rcdnd-Pro	GGTTGTTTTAGCCAGGATTTCCAGTGCC	原位杂交探针 Probe of CISH

## 2 结果与分析

### 2.1 *Rcdnd* cDNA 全长及序列分析

实验克隆所得的 *Rcdnd* 序列全长 1339 bp, 其中, 5'非编码区 59 bp, 3'非编码区 173 bp, 开放阅读框(ORF) 1107 bp, 共编码 368 个氨基酸, 已提交 NCBI GenBank (登录号: MW436697); 预测的编码蛋白的分子质量为 40.36 kDa, 等电点(pI)为 6.30。蛋白结构域

预测结果显示, 在推导的 *Rcdnd* 氨基酸序列中, 42~114 aa 为一段 RNA 结合蛋白保守的 RNA 识别基序(RRM) (图 1)。此外, 通过氨基酸序列多重比对分析发现, *Rcdnd* 氨基酸序列还具有 4 个 C 端保守结构域(CR1~4), 同时发现, 军曹鱼 *dnd* 氨基酸序列与鲮科(Carangidae)鱼类的一致性最高, 如高体鲮(*Seriola dumerili*)和黄条鲮(*Seriola lalandi*)分别达 72.3%和 71.8%, 与哺乳类的一致性较低, 如小鼠仅为 28.2% (图 2)。

```

1   AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGCGCCGCGAACACGGTATCGTGGAACTGATGGAGGACGAGCAGAACCAGGTGCTGAACCTTGAGCGTGTGCAGGCACTGGAATCTCTGG
1   M E D E Q N Q V L N L E R V Q A L E I L
121 CTGAAAACAACCAACACAAAGCTTACACAATATGGGATGGTCCCTGTCCAGGAACCCACTGTGAGGTCTTCATCAATCAGATCCCACGGACACCTACGAGGACCTGCTGATCCCCTGT
21 A E N N Q H K A Y T I W D G P V P G T H C E V F I N Q I P R D T Y E D L L I P L
241 TTAGCTCAGTGGCCCACTCTGGGAGTTCAGGCTCATGATGAACTTCAGTGGCCAGAACCCTGGCTTCGCCTATGCCAAATACAGCTCATCTGGGGTAGCTGCTGACGCAATCCGCCTGC
61 F S S V G P L W E F R L M M N F S G Q N R G F A Y A K Y S S S G V A A D A I R L
361 TGCATGGACACATGCTGGAGCCTGGCTTCCACCTCAGCGTCCGACGAGTACGGAGAGAGACACCTCTGTATTGGAGACCTGCCAGTGGCCACCAGGCAAGAGGACCTACTGACGGTAA
101 L H G H M L E P G F H L S V R R S T E K R H L C I G D L P V A T R Q E D L L Q V
481 TGAGTGTGCTGGCCGACGGGTGGAGAGAGTGTCTCTGAAGGCAGGGCTGGTATAGAAGGGGTGTCTGTATAGTGGCCTTCTCATCCCACCATGCTGCTTCTATAGCCAAGAAGATGC
141 M S V L A D G V E R V S L K A E A G I E G V S A I V A F S S H H A A S I A K K M
601 TGGTGAAGTATTCAAGAAGCAGTTTGTCTGACCATCTCAATCAAGTGGCATTACCTGTGACCTCAAGCTCTGATGAGCCACTGCCTCCACATAAACCTTCAAAGAGCCTCTGATGT
181 L V E V F K K Q F A L T I S I K W H S P V T S S S D E P L P P H K P S K S L L M
721 CACCTCTGAAGCCGTTCACCTCTGAATGCTCAATGGGCCAGTCCGCTCTCATCTCACCATTATCCATCCATCTCCAGGGTTTCTGCCAAGCAGTGGGGGACCAGCTGTAC
221 S P L K P L H L L N A Q W A P V L P P H L T I H P S I S Q G F C Q A V G G P A V
841 CTCCTGTTCTCCACCTTGTCTCTTTGGGGCAGCTGGTACTGTAGTGTCCCAACAATGGTCTGCAGAGACTGTGTGAGGCGTCTGGGGTCGGCCAGCCTCTATGAGATCTGCT
261 P P C S S T L S S L G Q L V T V V S P T M V L Q R L C E A S G V G Q P L Y E I C
961 ACAGCCACTGGCCAGATGGATTCTCTACTTACCTACATGATGGTGTGTGTCCTAGGGTGTGGAGCCCTTCAGAGGGTGGTCTAGGTCTTACCTGGACCCACTGCCACCAGCAGC
301 Y S H T G P D G F L Y F T Y M V C V P R V M E P F R G L V M V L P G P T A T S T
1081 TGGAGGAGCTCAGCAGGTGCAGCCAGCAGTCTCGAGAGGGTTCAGAGTAACTCTCACCCTCCATGACAGCCTATTTGAAAATGATGACTATCCCAAGTGTGATTGAAA
341 L E E A Q Q V A A Q Q V L Q R V Q S K L S P S H D S L F *
1201 TGTAGTGTATTTTGCATGTTTTTATTATAGTCCATTGGAGTGTATTGTTCTGTGGTTCATGCTTTTGTGTTGATTGTTCTTCATTTTAAATTAATGAGTAATAGGAAAAA
1321 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 军曹鱼 *dnd* cDNA 全长序列和氨基酸序列分析

Fig.1 Complete sequence of *R. canadum dnd* and analysis of deduced amino acid sequence

下划线指示起始密码子和终止密码子，粗体斜体指示加尾信号，灰色阴影指示 RRM 识别基序  
The initiation codon ATG and stop codon TAA are underlined. The polyadenylation signal AATTAAT are in bold and italic.  
The RNA recognition motif (RRM) are highlighted in grey shadow

基于军曹鱼与 GenBank 数据库中已发表的其他物种 *dnd* 氨基酸序列所构建的系统进化树中(图 3)，硬骨鱼类均聚为一簇，而两栖类、鸟类和哺乳类等高等脊椎动物则聚为另一簇，其中，军曹鱼与高体鲷、蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)和大菱鲆的亲缘关系较近，最先聚为一支，随后进一步与鲈形目、鲑形目、鲉形目和鲂形目等分支聚为一簇。

## 2.2 *Rcdnd* 的组织表达模式

采用半定量 RT-PCR 检测了 *Rcdnd* 在 150 dph 军曹鱼各组织中的表达水平，结果表明，*Rcdnd* 在性腺中特异表达，且卵巢和精巢中均检测到较高的表达水平，在性腺外的其他组织中均无表达(图 4)。

## 2.3 *Rcdnd* 在性腺周年发育过程中的表达模式

在精巢发育过程中，*Rcdnd* 的表达水平呈逐渐上升趋势，其在 90 dph (II期)的表达量最低，120 dph (II~III期)时表达量无显著变化，而在 150 dph (III期)~

360 dph (V期)的表达量均出现显著升高，其中，185 dph (III期)时表达量上升至 90 dph 的 2.68 倍，210 dph (IV期)的表达量与 185 dph (III期)无显著差异，而 360 dph (V期)时表达量进一步显著升高并达到最大值，约为 90 dph 的 3.33 倍(图 5A)。

卵巢发育过程中，*Rcdnd* 的表达水平先显著升高后趋于平稳，90 dph (I期)时的表达量最低，随后在 120 dph (I~II期)~360 dph (III期)的表达量均显著高于 90 dph，其中，150 dph 表达量上升至最大值，约为 90 dph 的 2.25 倍，185 dph (II期)和 210 dph (II期)的表达量均较 150 dph 显著降低，而 185、210 和 360 dph 发育时间点的相对表达量无显著差异(图 5B)。

## 2.4 *Rcdnd* 在性腺发育过程中的表达定位

利用切片原位杂交技术检测 *Rcdnd* mRNA 在军曹鱼不同发育期性腺中的表达定位，结果显示，120 dph 军曹鱼的精巢中，*Rcdnd* mRNA 的杂交信号主要分布于精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞

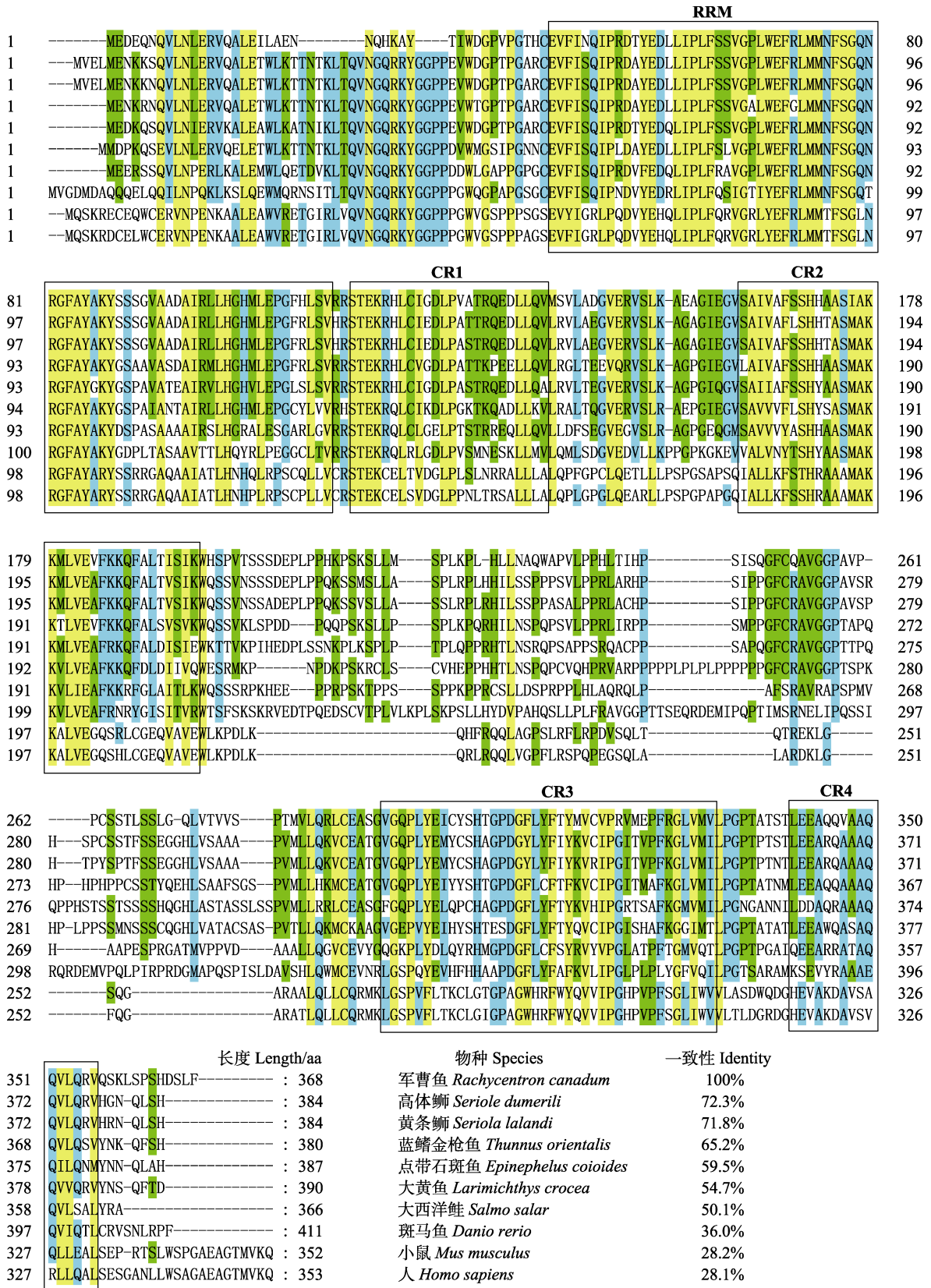


图 2 军曹鱼 *dnd* 氨基酸序列的多重比对

Fig.2 Multiple alignment of *R. canadum dnd* deduced amino acid sequence

方框表示 5 个氨基酸特异性保守结构域

The frame regions indicate the five amino acid specific conserved regions

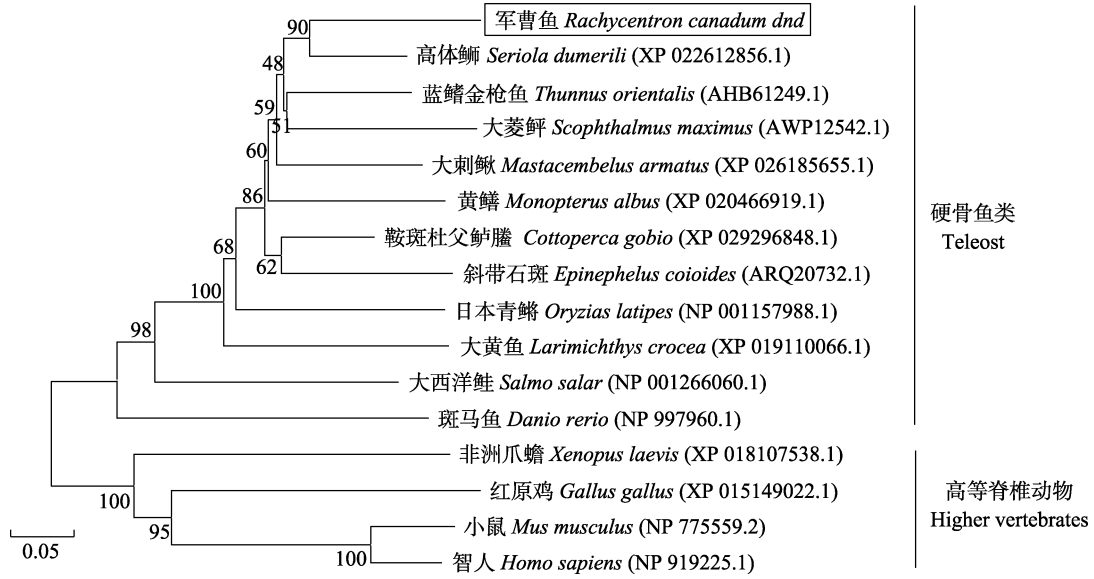


图 3 基于 dnd 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 树)

Fig.3 Phylogenetic tree of dnd amino acid sequences based on neighbor-joining (NJ) method

Bootstrap 检验的重复次数为 1000 次, 标尺 0.05 为进化距离

The tree is based on a 1000 bootstrap procedure, the scale bar 0.05 in terms of genetic distance is indicated below the tree

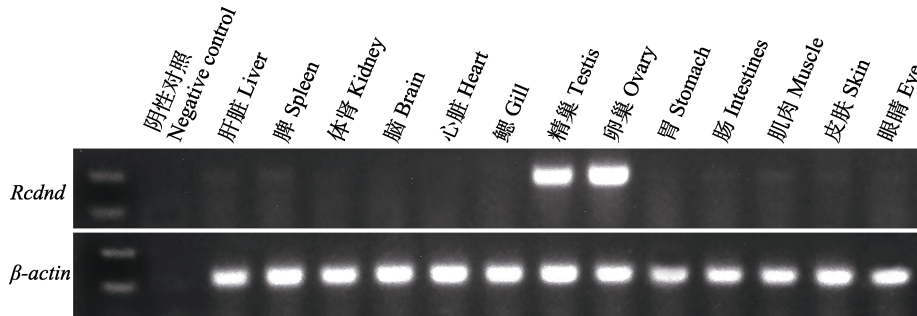


图 4 RT-PCR 分析 Rcdnd 在军曹鱼不同组织中的表达

Fig.4 Tissue distribution of dnd expression in *R. canadum* by RT-PCR

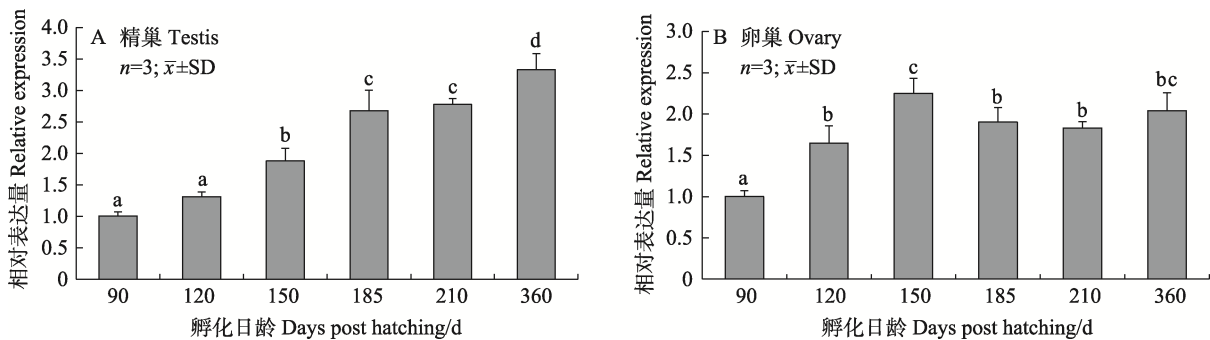


图 5 军曹鱼性腺周年发育过程中 Rcdnd mRNA 的表达水平

Fig.5 *Rcdnd* mRNA expression level in annual gonadal development of *R. canadum*

上标不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

的周缘, 其中, 在精原细胞和初级精母细胞中检测到的杂交信号最强, 次级精母细胞中的杂交信号明显减

弱, 而精细胞中几乎检测不到杂交信号(图 6A1)。Rcdnd mRNA 在 210 dph 和 360 dph 军曹鱼精巢中的

表达定位模式与 120 dph 相似, 杂交信号主要分布于精子形成过程中的精原细胞和精母细胞, 在精细胞和成熟精子中的表达极其微弱(图 6B1、C1)。

在卵巢发育过程中, *Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达, 杂交信号均匀分布于细胞质及核仁内。*Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达最强, 而在初级卵母细胞中的表达相对较弱, 且随着卵母细胞的生长发育, 在第 I、II 和 III 时相卵母细胞中检测到的杂交信号强度无明显变化(图 6A1、B1 和 C1)。

### 3 讨论

本研究首次克隆了军曹鱼 *dnd* 基因的 cDNA 序列, 其全长为 1339 bp, 编码 368 个氨基酸, 推导的氨基酸序列与鲈科鱼类的一致性较高, 和高体鲈相比为 72.3%, 与已报道的大多数硬骨鱼类 *dnd* 蛋白一样具有典型的 RNA 识别基序(RRM)及 4 个 C 端保守区(CR1~4)(Lin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015); 通过构建系统进化树发现, 军曹鱼 *dnd* 属于

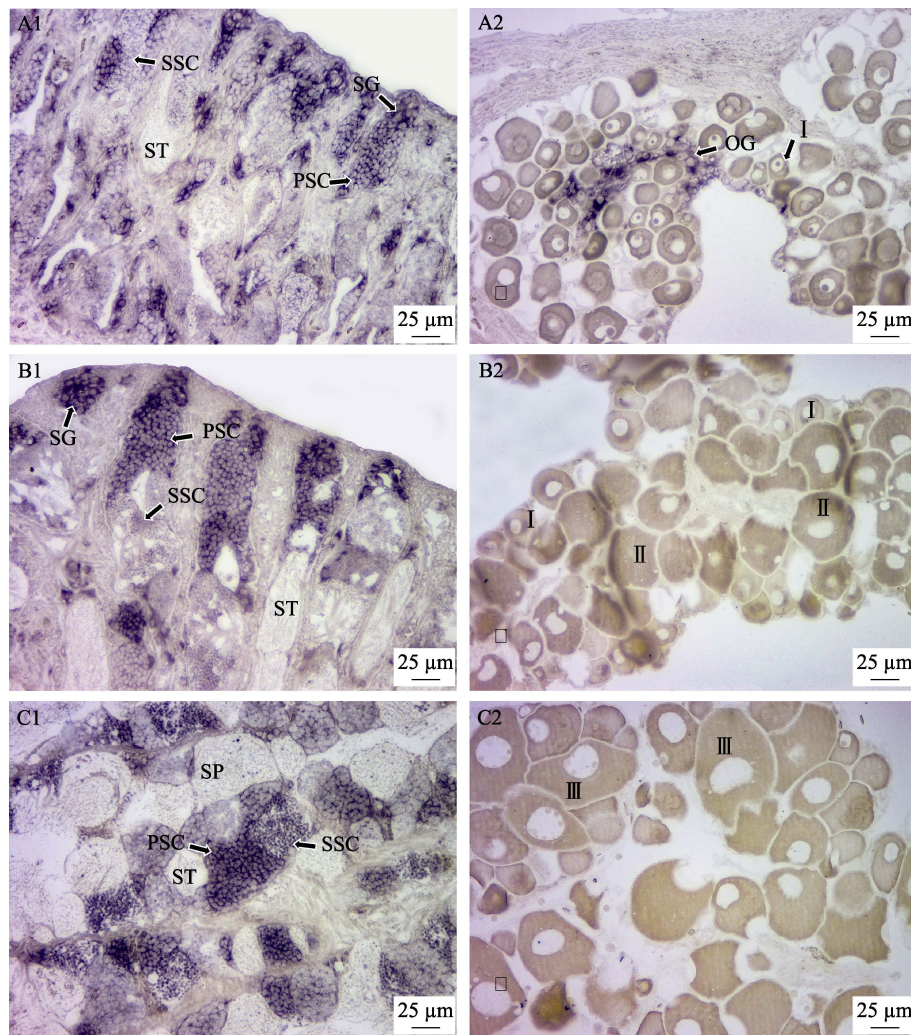


图 6 原位杂交法分析不同发育期性腺中 *Rcdnd* mRNA 的定位

Fig.6 Distribution of *Rcdnd* mRNA in different developmental stages of gonads by chemical *in situ* hybridization (CISH)

A1、B1 和 C1: 120 dph、210 dph 和 360 dph 精巢切片;

A2、B2 和 C2: 120 dph、210 dph 和 360 dph 卵巢切片

SG: 精原细胞; PSC: 初级精母细胞; SSC: 次级精母细胞; ST: 精细胞; SP: 精子; OG: 卵原细胞;

I: 第 I 时相卵母细胞; II: 第 II 时相卵母细胞; III: 第 III 时相卵母细胞

A1, B1 and C1: Sections of testis at 120 dph, 210 dph and 360 dph;

A2, B2 and C2: Sections of ovary at 120 dph, 210 dph and 360 dph

SG: Spermatogonia; PSC: Primary spermatocyte; SSC: Secondary spermatocyte; ST: Spermatid; SP: Spermatozoa;

OG: Oogonium; I: Oocyte at Stage I; II: Oocyte at Stage II; III: Oocyte at Stage II

硬骨鱼类的进化分支,与高体鲮的亲缘关系最为接近。据此,本研究克隆的 *Rcdnd* 属于 *dnd* 同源基因,尽管与其他物种 *dnd* 基因相比, *Rcdnd* 在进化过程中发生较大的结构变化,但仍保留了一定的保守性功能结构,推测其在维持 *dnd* 基因的功能稳定性上起到关键作用(Hong *et al.*, 2016)。

基于半定量 RT-PCR 的组织表达分析结果显示, *Rcdnd* 基因在精巢和卵巢中特异表达,这与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)、牙鲈(Wang *et al.*, 2015)、微鲤(*Paedocypris progenetica*) (陈克让等, 2018)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (Jin *et al.*, 2019)、稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*) (Duan *et al.*, 2015)、蓝鳍金枪鱼(Yazawa *et al.*, 2013)等硬骨鱼类中的研究结果一致,由此推测, *Rcdnd* 基因可能参与调节军曹鱼性腺发育过程。

本研究采集的军曹鱼精巢样品包含了性腺发育分期的 II~V 期,其中, 90 dph 时,精巢处于精母细胞增长期(II 期); 120 dph 时,精巢处于 II~III 期; 150 dph 和 185 dph 时,精巢均处于精母细胞成熟期(III 期),而 210 和 360 dph 精巢分别处于精子细胞变态期(IV 期)和精子成熟期(V 期)。这些样品中, *Rcdnd* 的表达量随着精巢的发育呈逐渐上升趋势,在精子成熟期达到最大值,表明 *Rcdnd* 在军曹鱼精子发生过程中发挥一定的调控作用,这与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)和蓝鳍金枪鱼(Yazawa *et al.*, 2013)的研究结果相似。采集的卵巢样品包含 3 个发育分期,其中, 90 dph 卵巢属于卵原细胞增殖期(I 期), 120 dph 卵巢处于 I~II 期, 150、185 和 210 dph 卵巢均属于卵母细胞小生长期(II 期), 360 dph 卵巢发育至初级卵母细胞大生长期(III 期)。*Rcdnd* 表达量在卵原细胞增殖期最低,随着卵巢的发育, *Rcdnd* 表达量显著升高并趋于稳定,卵巢由 I 期发育至 III 期的过程中,卵母细胞通过积累糖类、蛋白质、核酸等原生质,细胞体积不断增大(Nishimura *et al.*, 2014),因此, *Rcdnd* 在卵巢发育过程中较高的表达水平可能与生殖细胞原生质的积累密切相关。此外,大菱鲂卵巢发育过程中, *dnd* 基因的表达量在由 I 期发育至 II 期时出现显著的升高,但随着卵巢进一步发育至 III、IV 期,其表达量呈下降趋势(Lin *et al.*, 2013),这与 *dnd* 基因在军曹鱼卵巢发育过程中的表达模式存在一定差异,由此推测, *dnd* 基因在卵巢发育过程中的表达模式存在物种差异性。

性腺切片原位杂交结果进一步证实, *Rcdnd* mRNA 主要在生殖细胞中表达,而在性腺体细胞中的表达极微弱。*Rcdnd* mRNA 在精巢发育过程中的表达定位与大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)、稀有鮈鲫(Duan *et al.*,

2015)和青鳉(Liu *et al.*, 2009)相似, *Rcdnd* mRNA 杂交信号主要分布于精原细胞和初级精母细胞的周缘,次级精母细胞中的杂交信号明显减弱,而精细胞和成熟精子中几乎检测不到杂交信号。据此推测, *Rcdnd* 基因可能在精子发生早期(如精原细胞向初级精母细胞转化的过程)具有重要作用,但在后期精细胞发育和成熟过程中的作用不显著。卵巢发育过程中, *Rcdnd* mRNA 在卵原细胞中的表达较强,卵母细胞中杂交信号均匀分布于细胞质和核仁,在第 I、II 和 III 时相卵母细胞间的杂交信号强度无明显变化;卵母细胞发育至第 III 时相后,细胞质内开始沉积卵黄(刘晨斌等, 2019),表明 *Rcdnd* 基因主要在卵黄形成前期尤其是卵原细胞向初级卵母细胞分化阶段发挥调节作用。然而,大菱鲂(Lin *et al.*, 2013)和牙鲈(Wang *et al.*, 2015) *dnd* mRNA 在卵原细胞和第 I 时相卵母细胞中的表达较弱,当卵母细胞发育至第 II 时相, *dnd* mRNA 的表达也达到最强,而第 III 时相卵母细胞中的杂交信号明显减弱,随着卵母细胞进一步发育至第 IV 时相后,几乎检测不到杂交信号。据此推测, *dnd* 基因在鱼类卵子形成过程中发挥作用的时期存在明显的种间差异。已有研究表明,卵质内卵黄的大量积累可导致 RNA 转录速度减慢(张红卫等, 2006),本研究未采集到 III 期早期之后的卵巢样本,因此,关于 *Rcdnd* mRNA 在卵巢发育晚期(卵黄充塞阶段卵母细胞)中的表达仍有待进一步探究。

## 参 考 文 献

- ARAMAKI S, KUBOTA K, SOH T, *et al.* Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55(2): 214–218
- BHATTACHARYA C, AGGARWAL S, ZHU R, *et al.* The mouse *dead end* gene isoform  $\alpha$  is necessary for germ cell and embryonic viability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355(1): 194–199
- CASTELLANOS-GALINDO G A, BAOS R, ZAPATA L A. Mariculture-induced introduction of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766), a large predatory fish, in the tropical eastern Pacific. *BioInvasions Records*, 2016, 5(1): 55–58
- CHEN G, ZHANG J D, YE N, *et al.* Introduction of culture technology of cobia, *Rachycentron canadum* (I). *Scientific Fish Farming*, 2004(1): 10–11 [陈刚, 张健东, 叶宁, 等. 军曹鱼的养殖技术介绍(上). *科学养鱼*, 2004(1): 10–11]
- CHEN K R, DING T Y, LI M Y. Cloning and expression analysis of *dazl* and *dnd* genes in minifish. *Genomics and Applied Biology*, 2018, 37(7): 2795–2803 [陈克让, 丁天宜, 李名



- 友. Minifish *dazl* 和 *dnd* 基因的克隆及表达分析. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2795–2803]
- CHEN S H, CAI M Y, ZHANG Z P, *et al.* Preliminary studies on specification and development of the primordial germ cells from large yellowcroaker by *dnd* gene. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(9): 1273–1282 [陈仕海, 蔡明夷, 张子平, 等. 基于 *dnd* 基因标记的大黄鱼原始生殖细胞发生发育的初步研究. 水产学报, 2015, 39(9): 1273–1282]
- CHENG L, HUANG T Q, LIU C B, *et al.* Research perspectives: Marker genes of primordial germ cells in fishes. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(6): 80–88 [程琳, 黄天晴, 刘晨斌, 等. 鱼类原始生殖细胞标记基因研究进展. 水产学杂志, 2020, 33(6): 80–88]
- DUAN J D, FENG G Q, CHANG P, *et al.* Germ cell-specific expression of *dead end* (*dnd*) in rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(2): 561–571
- FUJIMOTO T, NISHIMURA T, GOTO-KAZETO R, *et al.* Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(40): 17211–17216
- GROSS-THEBING T, YIGIT S, PFEIFFER J, *et al.* The vertebrate protein Dead End maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation. Development Cell, 2017, 43(6): 704–715
- HAMILTON S, SEVERI W, CAVALLI R O. Biology and aquaculture of cobia: A review. Boletim do Instituto de Pesca, 2013, 39(4): 461–477
- HONG N, LI M Y, YUAN Y M, *et al.* *Dnd* is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish. Stem Cell Reports, 2016, 6(3): 411–421
- HORVAY K, CLAUBEN M, KATZER M, *et al.* *Xenopus Dead end* mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. Developmental Biology, 2006, 291(1): 1–11
- JIN Y H, DAVIE A, MIGAUD H. Expression pattern of *nanos*, *piwil*, *dnd*, *vasa* and *pum* genes during ontogenic development in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Gene, 2019, 688: 62–70
- LI S Z, LIU W, LI Z, *et al.* Molecular characterization and expression pattern of a germ cell marker gene *dnd* in gibel carp (*Carassius gibelio*). Gene, 2016, 591(1): 183–190
- LI X N, LIU X Z, SHI B, *et al.* The expression patterns of membrane progesterin receptor  $\alpha$  (*mPRA*) during oocytes maturation in *Cynoglossus semilaevis*. Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 25–33 [李晓妮, 柳学周, 史宝, 等. 膜孕激素受体(*mPRA*)在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 卵母细胞成熟过程中的表达特征. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 25–33]
- LIN F, ZHAO C Y, XU S H, *et al.* Germline-specific and sexually dimorphic expression of a *dead end* gene homologue in turbot (*Scophthalmus maximus*). Theriogenology, 2013, 80(6): 665–672
- LIU C B, XU G F, HUANG T Q, *et al.* A review of research progress on gonadal development in fish. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(1): 46–54 [刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46–54]
- LIU L X, HONG N, XU H Y, *et al.* *Medaka dead end* encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. Gene Expression Patterns, 2009, 9(7): 541–548
- LIU Y. Propagation physiology of main cultivated fish in China. Beijing: Agricultural Publishing Press, 1993, 20–42 [刘筠. 中国养殖鱼类繁育生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 20–42]
- NISHIMURA T, TANAKA M. Gonadal development in fish. Sexual Development, 2014, 8(5): 252–261
- SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing realtime PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101–1108
- SHI B, LIU X Z, XU T, *et al.* Expression characterization of the novel membrane progesterin receptor (*mPR-Like*) gene during the oocyte maturation of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2017, 38(1): 10–17 [史宝, 柳学周, 徐涛, 等. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*) 新型膜孕激素受体基因(*mPRL*) 在卵母细胞成熟过程中的表达特征. 渔业科学进展, 2017, 38(1): 10–17]
- ŠKUGOR A, TVEITEN H, KRASNOV A, *et al.* Knockdown of the germ cell factor *Dead end* induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) hatchlings. Animal Reproduction Science, 2014, 144(3/4): 129–137
- WANG X Y, LIU Q H, XIAO Y S, *et al.* The *dnd* RNA identifies germ cell origin and migration in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). BioMed Research International, 2015: 428591
- WARGELIUS A, LEININGER S, SKAFTNESMO K O, *et al.* *Dnd* knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. Scientific Reports, 2016, 6: 21284
- WEIDINGER G, JÜRIG S, SLANCHEV K, *et al.* *Dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. Current Biology, 2003, 13(16): 1429–1434
- YANG X G, YUE H M, YE H, *et al.* Identification of a germ cell marker gene, the *dead end* homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis*. Gene, 2015, 558(1): 118–125
- YAZAWA R, TAKEUCHI Y, MORITA T, *et al.* The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) *dead end* gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. Molecular Reproduction and Development, 2013, 80(10): 871–880
- YOUNGREN K, COVENEY D, PENG X, *et al.* The Ter mutation in the *dead end* gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. Nature, 2005, 435(7040): 360–364
- ZHANG H W, WANG Z R, ZHANG S C. Developmental Biology. Beijing: Higher Education Press, 2006, 399–407 [张红卫, 王子仁, 张士瑾. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社, 2006, 399–407]

## Cloning and Expression Analysis of *dnd* During Annual Gonadal Development of Cobia (*Rachycentron canadum*)

KUANG Jiehua<sup>1</sup>, MA Qian<sup>1,2</sup>①, CHEN Gang<sup>1,2</sup>①, MAO Feifan<sup>1</sup>, ZHOU Qiling<sup>1</sup>,  
HUANG Jiansheng<sup>1,2</sup>, SHI Gang<sup>1</sup>, ZHANG Jiandong<sup>1,2</sup>

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025, China;

2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Zhanjiang), Zhanjiang, Guangdong 524025, China)

**Abstract** In this study, the full length cDNA sequence of *Rachycentron canadum dnd* (*Rcdnd*) was cloned using RACE technology for the first time. In total, the sequence comprises 1339 bp, including a 5'-UTR of 59 bp, a 3'-UTR of 173 bp, and an open reading frame of 1107 bp, encoding a protein of 368 amino acids. The deduced amino acid sequence contains a conserved RNA recognition motif and four conserved regions (CR1~4). Comparisons of the deduced amino acid sequence with those of other teleosts revealed the highest percentage identity (72.3%) with *Seriola dumerili*. Phylogenetic tree analysis also showed that the *dnd* of *R. canadum* was most closely related to the homologous proteins of *S. dumerili*. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) results indicated that *Rcdnd* was specifically expressed in the gonads, but not in other tissues. The results of real-time quantitative PCR (qRT-PCR) revealed that *Rcdnd* expression tended to gradually increase as the testis developed (Stages II to V). During the development of the ovary (Stage I to III), *Rcdnd* expression first increased substantially and then stabilized; the highest expression level was found at 150 days post hatching (dph) (Stage II). Furthermore, the results of chemical in situ hybridization revealed that *Rcdnd* mRNA was mainly expressed in germ cells but barely detected in somatic cells. In the testis, *Rcdnd* mRNA signals were concentrated in the periphery of spermatogonia and primary spermatocytes; they were only weakly detected in secondary spermatocytes and barely detected in spermatids and spermatozoa. In the ovary, *Rcdnd* mRNA was highly expressed in oogonia, and the signals became weak in primary oocytes dispersed in the perinuclear cytoplasm. There were no significant differences in *Rcdnd* mRNA signals detected in oocytes in phases I, II, and III. In conclusion, these findings suggest that the *Rcdnd* gene may play an important role in gonadal development and provide a theoretical reference for revealing the regulatory mechanism of germ cell differentiation during gametogenesis in *R. canadum*.

**Key words** *Rachycentron canadum*; *dnd*; Gene cloning; Gonadal development; Expression analysis

① Corresponding author: MA Qian, E-mail: maq@gdou.edu.cn; CHEN Gang, E-mail: cheng@gdou.edu.cn