

文章编号: 1000-0615(2019)02-0400-10

DOI: 10.11964/jfc.20180111147

## 中华鳖 *dazl* 基因克隆及在生殖细胞中的表达

唐舟凯<sup>1</sup>, 张飘逸<sup>2</sup>, 储张杰<sup>1\*</sup>, 朱新平<sup>1,2</sup>,  
李伟<sup>2</sup>, 吴栩灵<sup>2</sup>, 徐红艳<sup>1,2\*</sup>

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316000;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,

农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

**摘要:** 为探索龟鳖类生殖细胞的发育分化机制, 实验通过特异性引物克隆了中华鳖 *dazl* 基因的 cDNA 片段, 长 1 007 bp, 其中包括 5' 端非编码区 197 bp, 3' 端非编码区 33 bp, 开放阅读框 777 bp, 编码 258 个氨基酸。氨基酸序列比对显示其与西部锦龟 *Dazl* 同源性最高, 达 96%; 与小鼠 *Dazl* 同源性达 75%。荧光定量 PCR 分析结果显示, 中华鳖 *dazl* mRNA 主要在精巢和卵巢中表达, 在体细胞组织中仅检测到微量表达。冰冻切片原位杂交结果显示, 中华鳖 *dazl* mRNA 在生殖细胞中特异表达, 且在不同时期的生殖细胞中呈动态表达模式。在精巢中, 中华鳖 *dazl* mRNA 在初级和次级精母细胞中表达最强, 在精原干细胞中表达水平次之, 在精子细胞中未检测到信号; 在卵巢中, 中华鳖 *dazl* mRNA 信号在初级卵母细胞胞质中均匀分布且在最早期的初级卵母细胞中信号最强, 随着卵母细胞的增大, 信号逐渐聚集并逐渐减弱。研究表明, *dazl* 基因可能对中华鳖两性生殖细胞的发生具有重要的调控作用。

**关键词:** 中华鳖; *dazl*; 生殖细胞; 精子发生; 卵子发生

**中图分类号:** Q 785; S 966.5

**文献标志码:** A

*Dazl* 是动物生殖细胞特异基因, 编码一种含有 RNA 识别域和独特 DAZ 结构域的 RNA 结合蛋白<sup>[1-2]</sup>。*Dazl* 蛋白在生殖细胞的发育和分化过程中起重要作用<sup>[3-5]</sup>。*Dazl* 基因隶属于 *DAZ* (deleted in azoospermia) 基因家族<sup>[1-3]</sup>, 该家族包括 *daz*、*dazl* 和 *boule3* 个成员, 其中人 (*Homo sapiens*) *daz* 基因是 *DAZ* 基因家族的起始成员, 其缺失会引发精子缺失症并导致男性不育, *DAZ* 基因家族也因此而得名<sup>[2]</sup>。*Dazl* 基因存在于各类脊椎动物中, 目前在斑马鱼 (*Danio rerio*)<sup>[6]</sup>、青鳉 (*Oryzias latipes*)<sup>[7]</sup>、虹鳉 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[8]</sup>、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)<sup>[9]</sup>、美西钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*)<sup>[10]</sup>、鸡 (*Gallus gallus*)<sup>[11]</sup>、小鼠 (*Mus musculus*)<sup>[12]</sup> 和人<sup>[13]</sup>

中均克隆得到了 *dazl* 同源基因。除牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[14]</sup>、安大略鳟 (*Salmo salar*)<sup>[15]</sup> 等个别物种外, *dazl* 基因在大多数动物中仅在生殖细胞中特异表达<sup>[6-9, 12]</sup>。研究证明, *dazl* 基因是动物配子发生过程中不可缺少的调控因子<sup>[16]</sup>。在小鼠中, *dazl* 基因的缺失会导致雄性和雌性都无法正常产生配子<sup>[17]</sup>; 在热带爪蟾中, *dazl* 基因的缺失会导致其生殖细胞无法完成迁移和增殖<sup>[9]</sup>。不仅如此, *Dazl* 蛋白通过参与调控动物生殖质 mRNA 的翻译和运输, 在原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 起源、迁移、分化等过程中发挥重要作用<sup>[16, 18]</sup>。在多种鱼类卵母细胞中, *dazl* 基因产物与其他生殖质因子一起集中于

收稿日期: 2018-01-19 修回日期: 2018-04-04

资助项目: 广东省科技计划项目 (2016A050502029, 2014A020208037); 引进国际先进农业科学技术“九四八”项目 (2015-Z019); 浙江省科技计划重点研发项目 (2016C02SAA20536); “水产”浙江省一流学科 2016 年度开放课题 (2016013); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2016HY-ZC04)

通信作者: 储张杰, E-mail: czj0501@sina.com; 徐红艳, E-mail: xuhyzqh@163.com

生殖质颗粒,而生殖质颗粒在胚胎发育早期被分配到部分细胞中,使这一部分细胞最终发育为PGCs,因此,鱼类PGCs的起源受生殖质因子的调控;而小鼠等哺乳类动物早期胚胎中无生殖质颗粒,其生殖质颗粒只在生殖细胞分化后,如精子或卵子生成时出现,因此哺乳类动物PGCs的起源不受生殖质的调控,而是由细胞间的信号分子诱导发育而成<sup>[18-20]</sup>。*dazl*基因作为生殖质颗粒的重要组成因子,其细胞表达及分布预示着生殖质颗粒的出现及PGCs的形成模式。目前对龟鳖类动物生殖细胞的发育,特别是其PGCs的形成模式及相关调控机制的认知还非常有限<sup>[21-22]</sup>。因此,探明龟鳖类生殖细胞相关基因的表达及分布对于探索其PGCs的起源、形成及发育等研究都具有十分重要的意义。

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*),是一种常见的龟鳖类动物,也是我国淡水养殖中重要的经济物种之一。本研究以中华鳖为模型,克隆了中华鳖*dazl*基因cDNA序列,探明了中华鳖*dazl*转录本的组织特异性,观察分析了中华鳖*dazl*转录本在两性生殖细胞发生过程中的表达模式。研究结果为深入了解爬行动物生殖细胞发育机制提供参考,为其他龟鳖类及爬行动物生殖发育调控机制的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所用的中华鳖采自广东惠州财兴实业有限公司中华鳖养殖场,于2016年7月随机选取2冬龄雌、雄中华鳖各5只。所有中华鳖在实验室无菌环境解剖,麻醉放血,对心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、卵巢和精巢组织进行取样并浸入TriPure isolation Reagent(Trizol, Roche)中,于-80 °C冰箱保存,待用于RNA提取。

本研究所用试剂:RNA保存及提取所用的TriPure isolation Reagent(Trizol)、合成探针及杂交所用的digoxigenin(DIG)RNA Labeling Kit、Blocking solution、Anti-Digoxigenin-AP、NBT/BCIP Stocksolution均购自罗氏(Roche)公司;制备探针所用的SP6/T7 Enzyme Mix、Lithium Chloride(LiCl)、合成cDNA第一条链所用的SuperScript®Frist-Strand Synthesis System及抗淬灭封片剂均购自Invetrogen公司;LA Taq酶、限制性内切酶、pMD19-

T载体均购自TaKaRa公司;质粒提取所用的Plasmid Mini Kit I和凝胶提取所用的Gel Extraction Kit购自OMEGA公司;荧光定量PCR(RT-PCR)所用的2×Realstar Green Fast Mixture(with ROX)购自GenStar公司;TURBO DNase购自Ambion公司;碘化丙啶(PI)购自Life公司;包埋剂OCT Compound购自SAKURA公司;多聚甲酯(PFA)购自BOSTER公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

**RNA提取与cDNA合成** 使用Trizol对采集的组织样品进行总RNA提取并用DNase去除基因组DNA污染。使用NanoQ™微型分光光度计检测RNA的浓度和纯度,并通过在琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。使用SuperScript®Frist-Strand Synthesis System试剂盒合成cDNA第一条链。

**中华鳖*dazl*基因cDNA克隆** 根据NCBI数据库中预测的中华鳖*dazl*(XM\_006133258.2)基因序列,设计了一对特异性引物PsdazlF1和PsdazlR1(表1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。使用LA Taq进行PCR克隆扩增,扩增反应程序:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35个循环; 72 °C 10 min。PCR产物在琼脂糖凝胶中电泳检测,并用凝胶提取试剂盒Gel Extraction Kit回收,克隆到pMD19-T载体中,重组质粒转化至DH5α感受态细胞中,筛选后由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。使用Primer Premier 5软件预测氨基酸序列,使用Vector NTI Advance 11软件进行多重氨基酸序列比对。使用NCBI数据库中的BLASTN软件对核苷酸序列进行比对,使用BLASTP软件对氨基酸序列进行比对。使用MEGA 6软件,按邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建系统进化树,用自展法(Bootstrap)进行1 000次检验。

**组织特异性分析** 根据测序所得中华鳖*dazl* cDNA序列设计一对特异性引物PsdazlF2和PsdazlR2(表1),以中华鳖 $\beta$ -actin为内参基因,设计引物 $\beta$ -actinF和 $\beta$ -actinR(表1)。以2冬龄中华鳖卵巢、精巢、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑组织提取并转录合成的cDNA为模板进行RT-PCR扩增,每组设3个重复。使用Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems进行扩增反应,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量(以相对表达量

表1 实验所用引物

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')	长度/bp size
PsdazlF1	TTCTCCTCTAGCAGGCGTGGATGCAAG	27
PsdazlR1	CTGTGACTTCTAAATTCACGGACATAA	28
PsdazlF2	CTTACCATGTGCAACCCAGA	20
PsdazlR2	TGTAGGTGGGCTGGTATCC	19
β-actinF	CTACTGCTGCTTCATCATCTCTCC	23
β-actinR	TTGGCATAACAGGTCCTTTCG	20

最低的组织作对照，进行组织间表达差异性分析)，PCR程序：50 °C 2 min，95 °C 2 min；95 °C 15 s，60 °C 30 s，72 °C 30 s，40个循环；熔解曲线程序：95 °C 15 s，60 °C 30 s，95 °C 15 s。

**RNA探针制备** 使用*Apal*和*SacII*限制性内切酶剪切含中华鳖*dazl* cDNA片段的质粒，得到一段长773 bp的序列，作为制备反义和正义RNA探针的模板。使用SP6/T7 Enzyme Mix和Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Kit合成正反义探针，并用LiCl沉淀提纯。用无酶水溶解RNA探针，用DNase(Ambion)去除残留DNA，并通过琼脂糖凝胶电泳检测。

**冰冻切片制备** 制备中华鳖性腺组织冷冻切片具体步骤参照已有报道<sup>[23]</sup>。使用4% PFA对中华鳖卵巢和精巢组织进行固定处理，在甲

醇中梯度脱水后-20 °C冰箱保存。将上述保存样品复水处理后使用OCT Compound包埋，用Leica冷冻切片器(CM1950)切片，切片组织厚度4~8 μm。

**原位杂交** 原位杂交具体操作步骤参照已有报道进行<sup>[23]</sup>。使用BCIP/NBT显色液对探针信号进行显色，PI染细胞核，抗淬灭封片剂封片。

**观察与拍摄** 使用Axio Observer Z1(ZEISS)显微镜和Axiocam 506 color(ZEISS)成像系统进行观察和拍照。

## 2 结果

### 2.1 中华鳖*dazl* cDNA序列克隆及分析

本研究通过PCR克隆得到了长度为1 007 bp的中华鳖*dazl* cDNA序列片段，该序列与NCBI数据库预测的中华鳖*dazl*序列的相似性达99% (XM\_006133258.2)，其中包括5'端非编码区197 bp，3'端非编码区33 bp和开放阅读框777 bp，共编码258个氨基酸，其包含一个保守的RNA识别域(RRM)和一个DAZ结构域(图1)。氨基酸序列比对分析结果显示，推导所得的中华鳖与西部锦龟(*Chrysemys picta bellii*)、绿海龟(*Chelonia mydas*)同源性最高，达96%；与密河短吻鳄(*Alligator mississippiensis*)和鸡同源性分别为86%和82%，与原矛头蝮(*Protobothrops mucrosquamatus*)、

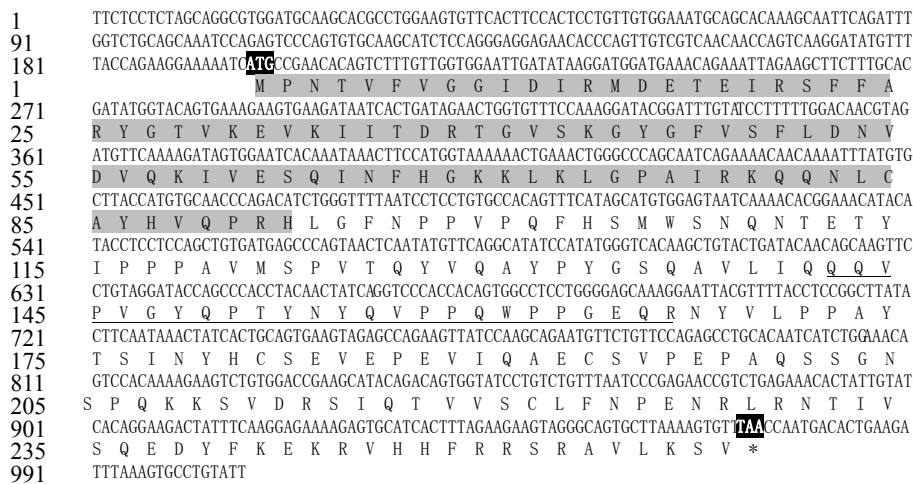


图1 中华鳖*dazl* cDNA的核苷酸序列

起始密码子和终止密码子(黑色阴影); RNA识别基序(RRM)(灰色阴影); DAZ重复基序(下划线)

Fig. 1 Nucleotide sequence of the *P. sinensis dazl* cDNA

The translation start codon ATG and stop codon TAA are highlighted in black shadow, RNA recognition motif (RRM) are highlighted in grey shadow, DAZ repeat is highlighted in underlines

鬃狮蜥(*Pogona vitticeps*)和美西钝口螈同源性分别为81%、80%和76%,与人和小鼠同源性都为75%;而与热带爪蟾、斑马鱼、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)的同源性在46%至57%之间(图2)。NJ系统进化树显示中华鳖*Dazl*属于DAZ家族,在进化树中的位置处在爬行类与哺乳类之间,与哺乳类具有较高的同源性,与鱼类同源性较低(图3)。

## 2.2 中华鳖*dazl* mRNA的组织特异性表达分析

本研究选用中华鳖 $\beta$ -*actin*基因为内参基因进行RT-PCR检测。相对表达量计算结果显示,*dazl* mRNA在心脏、脑、肝脏、脾脏、肾脏等体细胞组织中表达极低,在卵巢和精巢组织中有较强的表达(图4),证明*dazl* mRNA仅在性腺中特异表达。

## 2.3 中华鳖*dazl* mRNA在精子发生过程中的表达分布

本研究通过对1~3冬龄雄性中华鳖精巢的解剖及大量切片观察发现,1冬龄中华鳖精巢主要包含各种支持细胞及少量早期雄性生殖细胞;2冬龄中华鳖精巢包含了大量生殖细胞,包括从精原干细胞到精子细胞的各时期雄性生殖细胞;3冬龄中华鳖精巢主要包含精原干细胞、精母细胞及极少量精子细胞,其成熟的精子已经被释放并主要被储存在雄性附睾中。因此,本研究中选用2冬龄中华鳖精巢为研究样本,进行精子发生过程中*dazl* mRNA表达模式的分析。制备中华鳖精巢组织(2冬龄)冰冻切片,进行化学原位杂交,PI染核,并根据细胞核形态特点将雄性生殖细胞分为精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子<sup>[24]</sup>。化学原位杂交结果显示,*dazl* mRNA仅在生殖细胞中表达,在体细胞中检测不到表达,在精子发生过程中的不同发育时期,生殖细胞中呈动态的表达模式:*dazl* mRNA在初级精母细胞和次级精母细胞中表达最强,在精原细胞中表达较弱,在精子细胞中未检测到表达信号(图5)。

## 2.4 中华鳖*dazl* mRNA在卵子发生过程中的表达分布

制备中华鳖卵巢组织(2冬龄)的冰冻切片,根据透明带、滤泡细胞等结构特点将雌性生殖细胞分为卵原细胞、初级卵母细胞、生长期卵母细胞和成熟期卵母细胞<sup>[21]</sup>。通过观察化学原位

杂交染色结果发现,*dazl* mRNA主要在生殖细胞中表达,在体细胞中检测不到表达,在卵子发生过程中的不同发育时期,生殖细胞中呈动态的表达模式:*dazl* mRNA在最早期初级卵母细胞中信号最强,且在早期初级卵母细胞胞质中均匀分布,随后信号聚集于卵母细胞的核周区域,并随着生长期卵母细胞的长大而逐渐变弱(图6)。

## 3 讨论

### 3.1 中华鳖*dazl* cDNA序列鉴定

本研究从中华鳖组织中克隆获得了一段中华鳖*dazl* cDNA序列,比对结果显示,该序列与NCBI数据库预测的中华鳖*dazl*序列(XM\_006133258.2)相似性达99%。氨基酸序列比对结果显示,该cDNA序列编码的蛋白共含258个氨基酸,具有DAZ蛋白家族特有的RNA识别域和DAZ结构域,与其他物种*Dazl*蛋白具有高度同源性,属于DAZ家族中的*Dazl*蛋白一支,而非DAZ家族中的*Daz*蛋白或*Boule*蛋白。NJ系统进化树分析结果同样显示,中华鳖*Dazl*位于*Dazl*蛋白一支中。进化树显示*Boule*蛋白、*Dazl*蛋白和*Daz*蛋白分支明显,其分支顺序与其他报道中关于DAZ家族起源的推测结果相似<sup>[25]</sup>;中华鳖*Dazl*在进化树中处于爬行类与哺乳类之间,与尖吻鲈、斑马鱼等鱼类同源性较低,与小鼠等哺乳类具有较高的同源性。这些结果预示了中华鳖*Dazl*在生殖细胞中的调控方式可能与哺乳类的更为相似。

### 3.2 中华鳖*dazl*基因转录本在生殖细胞中的表达分析

本研究通过RT-PCR检测发现,中华鳖*dazl* mRNA在心脏、脑、肝脏、脾脏、肾脏等体组织中仅检测到微量表达,而在性腺组织中有较高表达。该结果与已有报道的结果一致,即*dazl*基因仅在性腺组织中特异表达。

原位杂交结果显示,*dazl* mRNA同样主要在生殖细胞中表达,在体细胞中未检测到表达信号。而且*dazl* mRNA信号在初级精母细胞和次级精母细胞中最强,在精原细胞中较弱,在精子细胞中未检测到表达信号。在小鼠中,*dazl* mRNA在初级精母细胞中表达最强,在精原细胞和次级精母细胞中次之,在精子细胞和精子中无表达<sup>[17]</sup>;人*dazl* mRNA也呈现出类似的表达模

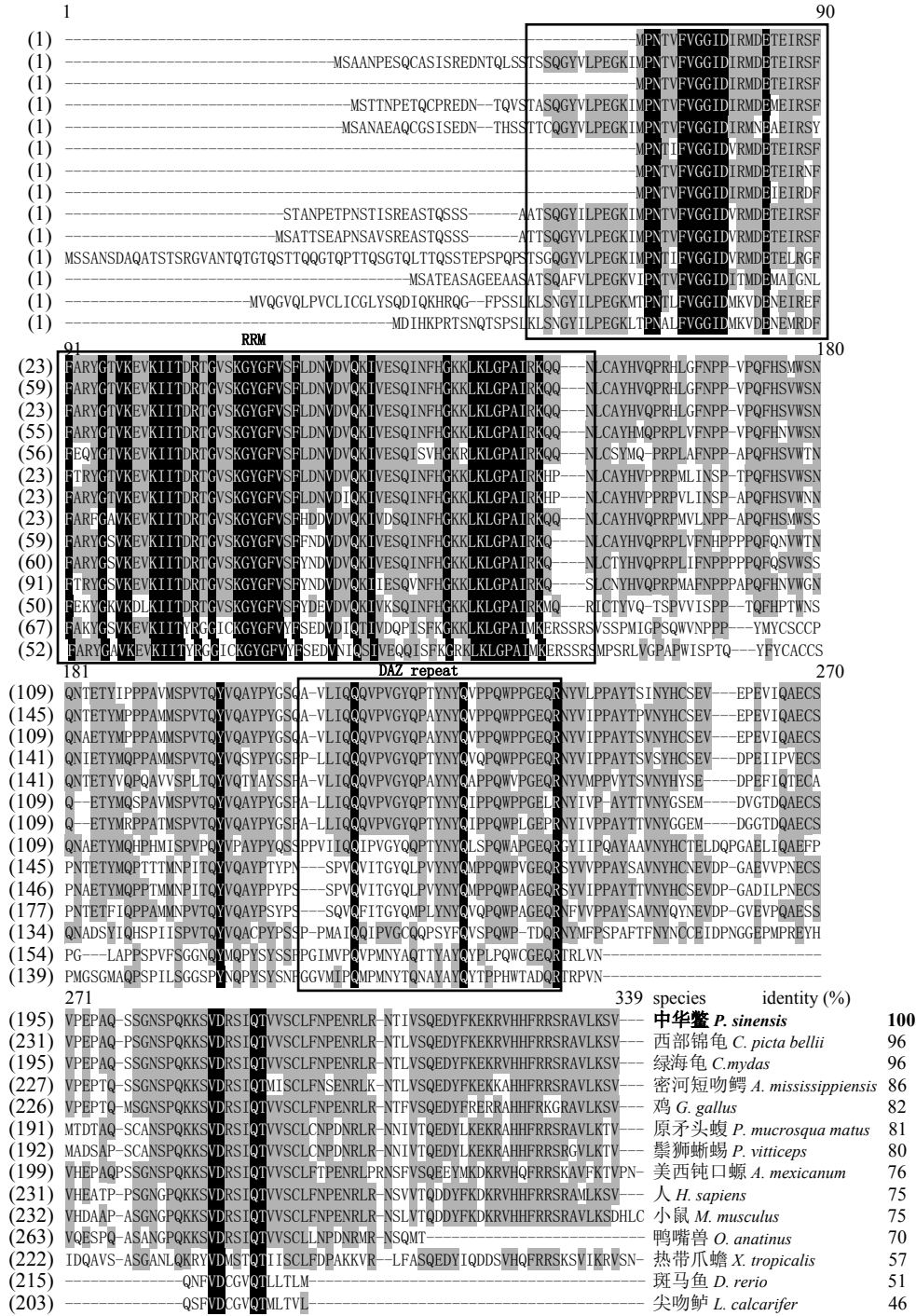


图2 Dazl氨基酸同源序列比对

所有氨基酸序列来自于NCBI数据：中华鳖 (*P. sinensis*, MG711318)；西部锦龟 (*C. picta bellii*, XP\_005297093.1)，绿海龟 (*C. mydas*, XP\_007053304.1)，密河短吻鳄 (*A. mississippiensis*, XP\_006262446.1)，鸡 (*G. gallus*, NP\_989549.1)，原矛头蝮 (*P. mucrosquamatus*, XP\_015666237.1)，鬃狮蜥蜴 (*P. vitticeps*, XP\_020635769.1)，美西钝口螈 (*A. mexicanum*, AAK58846.1)，人 (*H. sapiens*, NP\_001177740.1)，小鼠 (*M. musculus*, XP\_006523646.1)，鸭嘴兽 (*Ornithorhynchus anatinus*, XP\_007664381.1)，热带爪蟾 (*X. tropicalis*, NP\_989079.1)，斑马鱼 (*D. rerio*, XP\_005170127.1)，尖吻鲈 (*L. calcarifer*, XP\_018522938.1)；黑色阴影为氨基酸序列比对相同的位点，灰色阴影为相近位点，黑色方框内为RNA识别域和DAZ结构域，序列末尾为各物种名和同源性比值；下同

Fig. 2 Sequence alignment of Dazl proteins

Positions of identical residues are highlighted with black shadow, those of shared residues are in grey shadow; protein numbering is shown to the left; the RNA recognition motif (RRM) and DAZ repeat are shown in frames; the species' names and percentage identity values of the *P. sinensis* Dazl to its homologs are given at the end of alignment; the same below

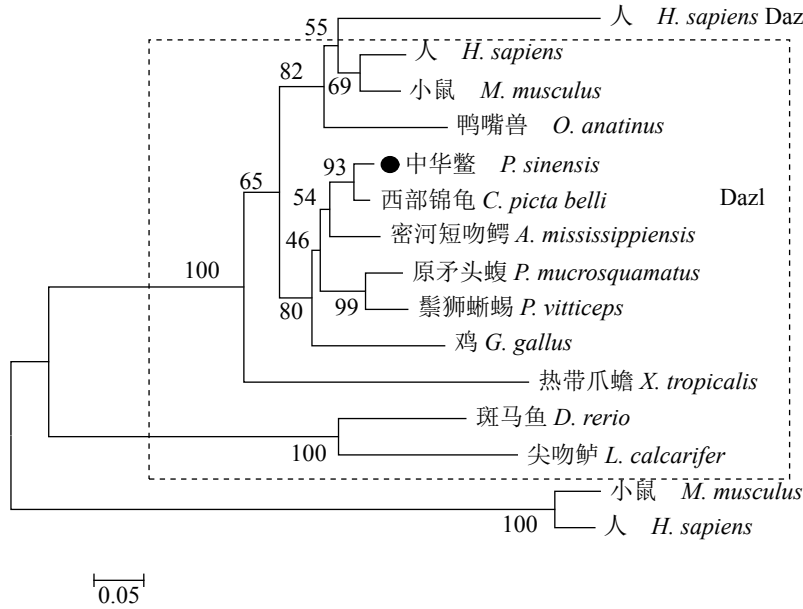


图 3 NJ方法构建系统进化树

人 (*H. sapiens*)Boule (NP\_932074.1), 小鼠 (*M. musculus*)Boule (NP\_083543.2)

Fig. 3 Phylogenetic tree generated with the Neighbor-joining method

Human (*H. sapiens*)Boule (NP\_932074.1), mouse (*M. musculus*)Boule (NP\_083543.2)

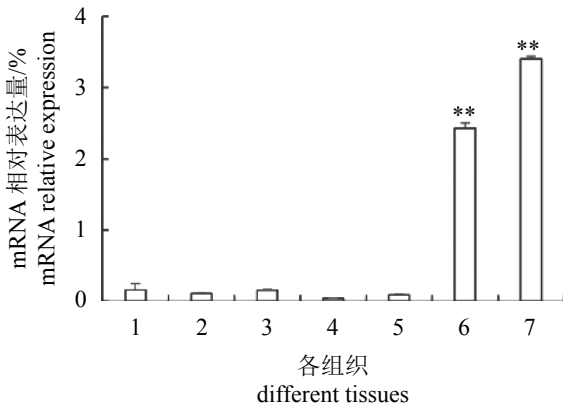


图 4 中华鳖 *dazl* 基因转录本的组织特异性表达分析

1. 心脏, 2. 脑, 3. 肝脏, 4. 脾脏, 5. 肾脏, 6. 精巢, 7. 卵巢; 以脾脏为对照做差异显著性分析, \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 4 The mRNA relative expression level of *dazl* in multiple tissues of *P. sinensis*

1. heart, 2. brain, 3. liver, 4. spleen, 5. kidney, 6. testis, 7. ovary; use spleen as control to do significant difference analysis, \*\*represents  $P < 0.01$

式<sup>[4]</sup>。因此, 中华鳖 *dazl* mRNA 在精子发生过程中的表达模式与小鼠的非常相似。而鱼类 *dazl* mRNA 的表达模式则与中华鳖 *dazl* mRNA 的存在明显差异。如尖吻鲈 *dazl* mRNA 在初级精母细胞中信号最强, 在次级精母细胞和精子细胞也有表达信号<sup>[9]</sup>; 虹鳟 *dazl* mRNA 在其精子发生的整个过程中均有

表达, 且在精子细胞和精子中定位于拟染色体 (chromatoid bodies, CB) 上<sup>[8]</sup>; 另外在蛙类爪蟾中, *dazl* mRNA 在精原细胞、精母细胞和精子细胞中均有表达信号, 在精母细胞中最强, 在精子细胞中呈斑点状分布<sup>[26]</sup>。

有研究报道了同为龟鳖类的红耳龟 (*Trachemys scripta*) *dazl* 基因的表达, *dazl* mRNA 信号在初级卵母细胞胞质中均匀分布且表达最强, 之后随着卵母细胞的增大, *dazl* mRNA 信号也开始聚集在核周, 最后随着生长期卵母细胞趋于成熟而逐渐减弱<sup>[27]</sup>。本研究发现在中华鳖卵巢中, *dazl* mRNA 主要在卵巢生殖细胞中表达, 在体细胞中难以检测到表达信号, 而且 *dazl* mRNA 信号在最早期初级卵母细胞中最强, 并均匀分布于初级卵母细胞的胞质中, 随着生长期卵母细胞的增大, *dazl* mRNA 信号逐渐聚集于卵母细胞的核周胞质并随着卵黄的生成而逐渐减弱。可见, 中华鳖 *dazl* mRNA 在卵子发生过程中的表达模式与红耳龟的非常相似。在哺乳类小鼠的卵子发生过程中, 小鼠 *dazl* mRNA 在卵子发生过程中均匀分布在细胞质中, 在初级卵母细胞中表达最强, 并随着卵母细胞增大而逐渐减弱<sup>[17]</sup>, 与中华鳖 *dazl* mRNA 的表达模式非常相似。而鱼类 *dazl* mRNA 的表达模式与中华鳖 *dazl* mRNA 存在

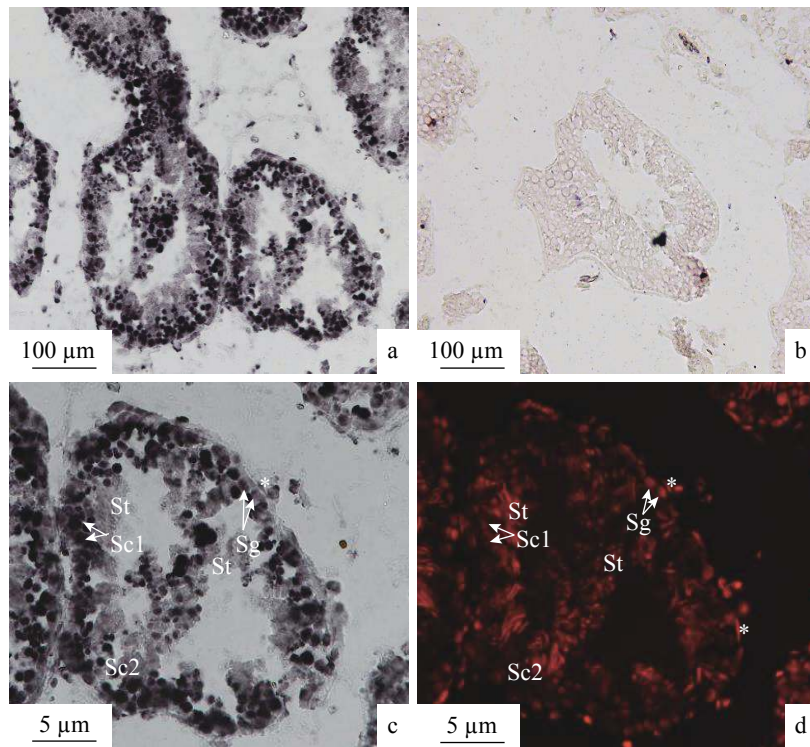


图5 化学原位杂交法分析卵巢中 *dazl* 转录本的表达

a-d. 2冬龄个体精巢切片进行原位杂交, 包括反义探针和正义探针, *dazl* 信号使用碱性磷酸酶(AP), 信号为紫色; b. 正义探针作为阴性对照没有信号; c. 2冬龄中华鳖精巢中, *dazl* mRNA信号在初级精母细胞和次级精母细胞中表达水平最强, 在精原细胞中表达水平次之, 在精子细胞核体细胞中未检测到信号; d. 细胞核用PI染红色; Sg. 精原细胞, Sc1. 初级精母细胞, Sc2. 次级精母细胞, St. 精子细胞, \*. 体细胞

Fig. 5 The *dazl* mRNA level in adult ovary by chemical *in situ* hybridization (CISH)

a-d. Adult testicular (2+ years old) cryosections were hybridized with RNA including antisense and sense; the signals of testicular cryosections were developed by alkaline phosphatase (AP, purple); b. no signal is detected by sense probe; c. the *dazl* mRNA signals are strongly dispersed in primary spermatocyte and secondary spermatocyte, weakly in spermatogonia, barely detected in spermatids and somatic cell; d. the nuclear is stained with PI (red); Sg. spermatogonia, Sc1. primary spermatocyte, Sc2. Secondary spermatocyte, St. spermatids, somatic cells labelled with stars

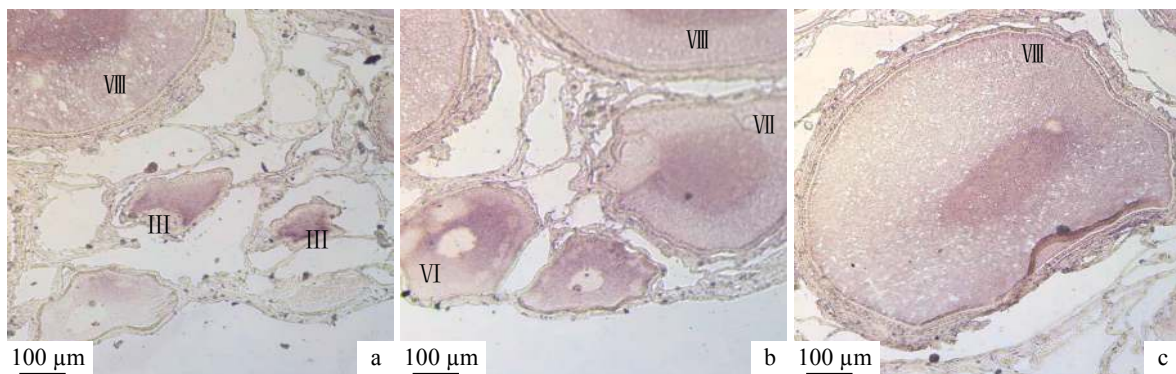


图6 化学原位杂交法分析卵巢中 *dazl* 转录本的表达

a-c. 2冬龄个体的卵巢切片组织RNA探针杂交; 使用碱性磷酸酶(AP)显色, 信号为紫色; a-b. *dazl* mRNA在卵原细胞、初级卵母细胞、生长期卵母细胞中均有表达, 信号在最早期初级卵母细胞中最强, 并且在早期初级卵母细胞胞质中均匀分布, b-c. 随后信号聚集于卵母细胞核周区域并随着生长期卵母细胞长大而逐渐减弱; III~V. 初级卵母细胞期, VI~VIII. 生长期卵母细胞

Fig. 6 The *dazl* mRNA level in adult ovary by chemical *in situ* hybridization (CISH)

a-c. Adult ovary (2+ years old) cryosections were hybridized with antisense RNA probes; the signals were developed by alkaline phosphatase (AP) staining (purple); a-b. the *dazl* mRNA signals were strong in early primary oocyte stage and displayed a uniform distribution, b-c. as oocyte grew into larger size, the signal in the perinuclear cytoplasm became weak; stage III~V. primary oocytes; stage VI~VIII. growing oocytes

明显的不同。如青鳉 *dazl* mRNA 信号在卵原细胞和初级卵母细胞的细胞质中表达较弱且分布均匀, 并且在初级卵母细胞中聚集于巴氏小体 (balbiani bodies, BB), 随着卵母细胞的生长增大, 聚集的信号随之增强, 在接近成熟的生长期卵母细胞中信号减弱并散布在卵黄颗粒之间, 最后在成熟卵母细胞中定位于细胞质边缘<sup>[25]</sup>; 尖吻鲈和虹鳟 *dazl* mRNA 的表达模式与青鳉相似, 且信号也会定位于巴氏小体<sup>[8-9]</sup>。同时有研究证明在爪蟾和许多鱼类中, 生殖质颗粒会聚集在巴氏小体<sup>[7-8, 20, 28-29]</sup>。与鱼类相比, 中华鳖 *dazl* mRNA 在初级卵母细胞的最早期表达水平最高, 而鱼类, 特别是青鳉 *dazl* mRNA 则在生长期卵母细胞的中后期表达最强; 其次中华鳖 *dazl* mRNA 表达信号在生长期卵母细胞中逐渐聚集于核区周围并在之后的发育成熟过程中逐渐减弱, 在各时期卵母细胞中均未发现类似巴氏小体的结构和特殊的信号定位, 因此中华鳖 *dazl* mRNA 的表达模式与鱼类的差异较大。另外, *vasa* 基因作为母源性遗传基因在动物 PGCs 的相关研究中应用广泛, 其在鱼类和哺乳类生殖细胞中的表达模式也显示出很大的差异。如在尖吻鲈中, *vasa* 信号在整个卵子发生过程中表达并聚集于巴氏小体; 而在中华鳖和小鼠卵子发生的过程中, *vasa* 基因产物在早期卵母细胞中均匀分布, 在发育成熟过程中逐渐减弱, 在成熟卵母细胞中未检测到信号<sup>[30-32]</sup>。综上所述, 中华鳖 *dazl* mRNA 在精子和卵子发生过程中的表达模式与小鼠等哺乳类更为相似, 与青鳉等鱼类明显不同, 这表明中华鳖 PGCs 形成过程更接近哺乳类所属的后成模式, 而非鱼类所属的先成模式<sup>[18, 20]</sup>。然而要确认中华鳖 PGCs 是否真的属于后成模式还需要更多的研究来加以证实。

综上所述, *dazl* mRNA 在中华鳖生殖细胞中的特异表达, 及在中华鳖精子和卵子发生过程中呈现出时间和空间上的动态表达模式, 均表明 *dazl* 在中华鳖两性配子发生过程中具有重要的调控作用。研究结果将为今后利用 *dazl* 分子标记进行龟鳖类及其他爬行动物的生殖发育调控机制研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Reijo R, Lee T Y, Salo P, *et al.* Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene[J]. *Nature Genetics*, 1995, 10(4): 383-393.
- [2] Saxena R, Brown L G, Hawkins T, *et al.* The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned[J]. *Nature Genetics*, 1996, 14(3): 292-299.
- [3] Gill M E, Hu Y C, Lin Y F, *et al.* Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein *DAZL*, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(18): 7443-7448.
- [4] Reijo R A, Dorfman D M, Slee R, *et al.* *DAZ* family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice[J]. *Biology of Reproduction*, 2000, 63(5): 1490-1496.
- [5] Spradling A, Fuller M T, Braun R E, *et al.* Germline stem cells[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011, 3(11): a002642.
- [6] Maegawa S, Yamashita M, Yasuda K, *et al.* Zebrafish *DAZ*-like protein controls translation via the sequence 'GUUC'[J]. *Genes to Cells*, 2002, 7(9): 971-984.
- [7] Xu H Y, Li M Y, Gui J F, *et al.* Cloning and expression of medaka *dazl* during embryogenesis and gametogenesis[J]. *Gene Expression Patterns*, 2007, 7(3): 332-338.
- [8] Li M Y, Shen Q, Xu H Y, *et al.* Differential conservation and divergence of fertility genes *boule* and *dazl* in the rainbow trout[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15910.
- [9] Houston D W, King M L. A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*[J]. *Development*, 2000, 127(3): 447-456.
- [10] Johnson A D, Bachvarova R F, Drum M, *et al.* Expression of axolotl *DAZL* RNA, a marker of germ plasm: widespread maternal RNA and onset of expression in germ cells approaching the gonad[J]. *Developmental Biology*, 2001, 234(2): 402-415.
- [11] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, *et al.* Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells[J]. *Development*, 2000, 127(12): 2741-2750.



- [12] Cooke H J, Lee M, Kerr S, *et al.* A murine homologue of the human *DAZ* gene is autosomal and expressed only in male and female gonads[J]. *Human Molecular Genetics*, 1996, 5(4): 513-516.
- [13] Yen P H. Putative biological functions of the DAZ family[J]. *International Journal of Andrology*, 2004, 27(3): 125-129.
- [14] 孙近近, 张俊玲, 孙文慧, 等. 牙鲆*dazl*基因的克隆与表达分析[J]. *海洋渔业*, 2016, 38(4): 391-399.  
Sun J J, Zhang J L, Sun W H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *dazl* gene in *Paralichthys olivaceus*[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(4): 391-399(in Chinese).
- [15] Kleppe L, Wargelius A, Johnsen H, *et al.* Gonad specific genes in Atlantic salmon (*Salmon salar*): characterization of *tdrd7-2*, *dazl-2*, *piwill1* and *tdrd1* genes[J]. *Gene*, 2015, 560(2): 217-225.
- [16] Reynolds N, Collier B, Maratou K, *et al.* *Dazl* binds *in vivo* to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of *Mvh* in germ cells[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14(24): 3899-3909.
- [17] Ruggiu M, Speed R, Taggart M, *et al.* The mouse *Dazla* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis[J]. *Nature*, 1997, 389(6646): 73-77.
- [18] Johnson A D, Drum M, Bachvarova R F, *et al.* Evolution of predetermined germ cells in vertebrate embryos: implications for macroevolution[J]. *Evolution & Development*, 2003, 5(4): 414-431.
- [19] Dwarakanath M, Lim M, Xu H Y, *et al.* Differential expression of *boule* and *dazl* in adult germ cells of the Asian seabass[J]. *Gene*, 2014, 549(2): 237-242.
- [20] Xu H Y, Li M Y, Gui J F, *et al.* Fish germ cells[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(4): 435-446.
- [21] Hei N N, Bian X G, Liu Y, *et al.* Fine structural observation on the oogenesis and vitellogenesis in Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2012, 44(S1): 251.
- [22] 朱道玉. 中华鳖性腺的发生与发育研究[J]. *水生生物学学报*, 2009, 33(5): 924-930.  
Zhu D Y. Morphological and histological observation of gonadal development in soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(5): 924-930(in Chinese).
- [23] Xu H Y, Gui J F, Hong Y H. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate[J]. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 2005, 233(3): 872-882.
- [24] Zhang L, Han X K, Li M Y, *et al.* Spermiogenesis in soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. *Anatomical Record*, 2007, 290(10): 1213-1222.
- [25] Xu H Y, Li Z D, Li M Y, *et al.* *Boule* is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of medaka[J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): e6097.
- [26] Tada H, Orii H. Dynamic intracellular localization of *Dazl* protein during *Xenopus* germline development[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2015, 144(2): 157-166.
- [27] Bachvarova R F, Crother B I, Manova K, *et al.* Expression of *Dazl* and *Vasa* in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells[J]. *Evolution & Development*, 2009, 11(5): 525-534.
- [28] Kloc M, Etkin L D. RNA localization mechanisms in oocytes[J]. *Journal of Cell Science*, 2005, 118: 269-282.
- [29] Hay B, Jan L Y, Jan Y N. Localization of *vasa*, a component of drosophila polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity[J]. *Development*, 1990, 109(2): 425-433.
- [30] Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, *et al.* Expression and intracellular localization of mouse *Vasa*-homologue protein during germ cell development[J]. *Mechanisms of Development*, 2000, 93(1-2): 139-149.
- [31] Li W, Zhang P Y, Wu X L, *et al.* A Novel Dynamic expression of *vasa* in male germ cells during spermatogenesis in the Chinese soft-shell turtle (*Pelidiscus sinensis*)[J]. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, 2017, 328(3): 230-239.
- [32] Xu H Y, Lim M, Dwarakanath M, *et al.* *Vasa* identifies germ cells and critical stages of oogenesis in the Asian seabass[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2014, 10(2): 225-235.

## The cloning and expression analysis of *dazl* in germ cells in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)

TANG Zhoukai<sup>1</sup>, ZHANG Piaoyi<sup>2</sup>, CHU Zhangjie<sup>1\*</sup>, ZHU Xinping<sup>1,2</sup>,  
LI Wei<sup>2</sup>, WU Xuling<sup>2</sup>, XU Hongyan<sup>1,2\*</sup>

(1. Fishery School of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

2. Key Laboratory of Tropical & Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** In this study, we used *Pelodiscus sinensis* as a model to study the germ cells differentiation in reptiles. Firstly, we cloned *P. sinensis dazl* cDNA fragment of 1 007 bp, containing a 197 bp 5' untranslated region (UTR), a 33 bp 3' UTR and an open reading frame (ORF) for 258 amino acid residues. The predicted *P. sinensis Dazl* was maximally 96% identical with *Chrysemys picta bellii Dazl* protein, 75% identical with *Mus musculus Dazl* protein. The RT-PCR result showed that the *P. sinensis dazl* mRNA was absent in all somatic tissues, but abundant in adult ovary and testis. Chemical *in situ* hybridization revealed that the *P. sinensis dazl* mRNA was exclusively expressed in germ cells but barely detected in somatic cells, and displayed a dynamic distribution expression pattern in germ cells during gametogenesis. In adult testis, the *dazl* mRNA signals were strongly dispersed in primary spermatocyte and secondary spermatocyte, weakly in spermatogonia, barely detected in spermatids. In adult ovary, the *dazl* mRNA signals were strong in early primary stages of oocytes and displayed a uniform distribution; as oocytes grew into larger size, the *dazl* mRNA signals were concentrated in the perinuclear cytoplasm and became weak as vitellogenesis further developed. In conclusion, the findings in this study suggested that *dazl* gene would play important roles in germ cells differentiation during gametogenesis in *P. sinensis*. The characterization of *dazl* gene in *P. sinensis* would provide the basis for further investigations into reproductive development in turtles or reptiles.

**Key words:** *Pelodiscus sinensis*; *dazl*; germ cell; spermatogenesis; oogenesis

**Corresponding author:** CHU Zhangjie. E-mail: czj0501@sina.com; XU Hongyan. E-mail: xuhzqh@163.com

**Funding projects:** Science and Technology Projects of Guangdong Province (2016A050502029, 2014A020208037); '948' Foundation of Ministry of Agriculture (2015-Z019); Major Science and Technology Projects of Zhejiang Province (2016C02SAA20536); 2016 Annual Open Topics of First-class Subject "Fishery" of Zhejiang Province (2016013); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (2016HY-ZC04)