



中华鳖 *dnd* 基因克隆及在生殖细胞中的表达

陈凯利, 李玉林, 班文卓, 徐建飞, 谭智敏, 徐红艳*

(西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,
水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 402460)

摘要: 为了研究龟鳖类生殖细胞发育分化机制, 实验通过 RACE 技术克隆获得了中华鳖 *dead end (dnd)* 基因全长 cDNA, RT-PCR 分析了其在不同组织的转录表达情况, 并通过原位杂交技术检测了 *dnd* mRNA 在中华鳖雌雄性腺配子发生过程中的表达变化。结果显示, 中华鳖 *dnd* cDNA 全长 1 251 bp (GenBank 登录号为 OL757532), 包括 234 bp 的 3' 端非翻译区和 1 017 bp 开放读码框, 开放读码框编码 338 个氨基酸。氨基酸序列比对和系统进化树分析结果表明, 中华鳖 Dnd 蛋白与其他物种同源蛋白一样, 均具有 6 个保守的结构域, 其中高度保守的 RNA 识别结构域是主要的功能结构域。中华鳖 Dnd 与绿海龟 Dnd 氨基酸序列一致性最高, 亲缘关系最近。RT-PCR 结果显示, *Psnd* 特异性地在中华鳖性腺组织中表达, 且在卵巢中的表达明显高于精巢。原位杂交分析结果显示, *Psnd* mRNA 在生殖细胞中特异表达。在卵巢中, *Psnd* mRNA 主要在 II 期初级卵母细胞的细胞质中表达, 随着卵母细胞的增大, 在 IV 期及以后的卵母细胞中检测不到其表达。在精巢中, *Psnd* mRNA 信号在初级精母细胞中表达最强, 在次级精母细胞和精原细胞中表达水平次之, 在精子细胞中未检测到信号。研究表明, *dnd* 基因可能在调控中华鳖雌雄生殖细胞的发育中起重要作用。

关键词: 中华鳖; 生殖细胞; RNA 结合蛋白; 原位杂交; 配子发生

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

Dead end (Dnd) 是一种脊椎动物生殖细胞特异性标记的因子, 属于 RNA 结合蛋白 (RNA-binding proteins, RBPs) 家族, 对维持原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的生存、迁移等至关重要^[1-2]。在很多物种中, Dnd 的功能缺失可使 PGCs 的迁移被阻断, 导致 PGCs 在向性原基迁移的过程中分化成其他细胞类型, 造成生殖细胞的完全缺失而致使动物不育^[3-5]。因此, Dnd 对脊椎动物生殖细胞的生存和发育是必不可少的^[1-4]。

dnd 基因存在于各种脊椎动物中, 且已被鉴

定为大多数脊椎动物的生殖细胞标记基因^[1]。*dnd* 首次在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中被克隆出来, 对其功能的研究发现, Dnd 负责斑马鱼 PGCs 的极化和迁移, 敲除 *dnd* 导致斑马鱼 PGCs 的异常迁移和生殖细胞消失^[6]。在小鼠 (*Mus musculus*) 中, *dnd1* 基因表达的蛋白有 2 个异构体: Dnd1- α 主要在早期胚胎和胚胎性腺中表达; Dnd1- β 特异性地在成体精巢中表达^[5,7]; Dnd1^{ter} 突变导致精巢肿瘤癌症的发生和不能形成早期精原细胞^[5,7]。鸡 (*Gallus gallus*) Dnd 同源蛋白 CDH 在 PGCs 和 2 种性别

收稿日期: 2022-01-28 修回日期: 2022-08-22

资助项目: 国家自然科学基金 (31873035); 中央高校基本业务费专项 (SWU020014)

第一作者: 陈凯利 (照片), 从事水产动物生殖发育研究, E-mail: cklzz369@163.com

通信作者: 徐红艳, 从事水产动物生殖发育研究, E-mail: xuhyzqh@163.com



的生殖细胞中都有表达^[8]。在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 中, *dnd* 仅在卵巢中表达^[9]; *Dnd* 先后定位于皮层的生殖质、核周的生殖质然后进入细胞核中, 这表明 *Dnd* 可携带 RNA 进入细胞核引发生殖细胞系的特化^[10]。*Dnd* 在青鳉 (*Oryzias latipes*) 中已被鉴定为一个保守的 PGCs 标记因子^[11-12]。在西里伯斯青鳉 (*O. celebensis*) 中, *dnd* 也决定了 PGCs 的特化, 其 RNA 在雌、雄性腺中均有表达^[12]。在其他鱼类, 如稀有鲟 (*Gobiocypris rarus*)^[13]、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*)^[14]、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)^[15]、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)^[16], *dnd* 在成体组织中的表达模式比较相似, 特异性地在性腺中表达, 且在卵巢中的表达量高于精巢。虽然, *dnd* 在从鱼类到哺乳动物中对维持 PGCs 的生存和迁移过程中的作用较为保守, 但在生殖细胞发育过程中的表达模式又因物种不同而呈现出差异。因此, 鉴于 *dnd* 在脊椎动物 PGCs 迁移和生殖细胞发育过程中的重要作用, 在龟鳖类动物中进行 *dnd* 序列特征、基因表达和分布研究, 对后续开展龟鳖类 PGCs 的起源、形成及配子发生发育等研究具有重大意义。

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是四足动物中最古老的一类, 在研究物种形态演化、生殖方式进化等领域具有独特的科研价值。此外, 中华鳖营养丰富、药用价值高, 在我国淡水养殖中占有重要地位。本研究以中华鳖为模型, 采用 RACE 方法克隆了中华鳖 *dnd* 基因 (命名为 *Psdnd*) cDNA 全长序列, 分析了其序列特征, 检测了 *Psdnd* 转录本在不同组织器官中的表达情况, 观察分析了 *Psdnd* mRNA 在中华鳖雌、雄生殖细胞发育过程中的表达模式。研究结果为进一步探明龟鳖类动物生殖细胞发生发育机制提供理论参考, 为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

实验用中华鳖购自重庆市合川区某中华鳖养殖场。随机选取 1 冬龄雌、雄中华鳖各 3 只, 经消毒后在实验室无菌环境中麻醉, 放血解剖, 对心脏、脑、肝脏、脾脏、肾脏、精巢和卵巢组织进行取样, 液氮冷冻后存于 -80°C 冰箱冷冻保存, 用于 RNA 的提取。此外, 随机选取 2 冬龄雌、雄中华鳖各 3 只, 取其性腺组织, 用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定处理后, 用于切片实验。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

1.2 中华鳖组织 RNA 的提取和 cDNA 合成

使用 TRIzol Reagent 将保存的 1 冬龄雌、雄中华鳖体组织 (心脏、脑、肝脏、脾脏、肾脏、精巢和卵巢) 进行总 RNA 提取, 并用 NanoDrop 2000 微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量, 质检合格的 RNA 备用。使用生工生物工程 (上海) 股份有限公司生产的 3'RACE 试剂盒合成 3'RACE cDNA (用于 3'RACE PCR), 使用 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit 反转录获得 cDNA (用于 RT-PCR), 存于 -20°C 冰箱保存备用。

1.3 *Psdnd* 全长 cDNA 克隆

从美国国家生物技术信息中心数据库 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 中获取中华鳖 *dnd* 相关序列信息 (表 1), 经序列分析发现该 *dnd* 的编码区序列 3' 端不完整。因此, 根据已有序列, 使用 Primer premier 6.0 软件设计特异引物 (表 1), 使用生工生物工程 (上海) 股份有限公司生产的 3'RACE 试剂盒进行 PCR 扩增, PCR 反应体

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 primer names	引物序列 (5'→3') sequences	用途 usage
Psdnd-3' RACE out	GGCAAGCTCCCGCAGGACATCTACG	3'端扩增
Psdnd-3' RACE in	GCGGCTTCGCCTACGCCAAGTATGG	3'RACE
Psdnd-F	ATGTGGAGCGATGCTGTCAATC	克隆cDNA
Psdnd-R	ACCTACAACAAACACGCTGAACA	cloning cDNA
Psdnd-rt-F	GGCGTGTGGACCGTCTGAA	RT-PCR
Psdnd-rt-R	TGCCCGACATATCCGCTTTGAG	RT-PCR
Psβ-actin-rt-F	AAAGGGAAATTGTGCGTGAC	内参
Psβ-actin-rt-R	TTCCATACCCAGGAAGGATG	reference

系和程序均按说明书进行。将获得的3'端编码区和非翻译区(untranslated region, UTR)与已知序列进行拼接, 获得*dnd*的cDNA全长序列。进一步设计全长引物, 以中华鳖性腺组织的cDNA为模板, 使用TaKaRa PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase进行RT-PCR, 反应体系配制和反应程序均按说明书进行, 经DNA A-Tailing Kit加A后连接pGEM-T easy载体, 转化大肠杆菌感受态Top 10后, PCR鉴定阳性克隆后测序, 获得基因序列后提交至GenBank获得登录号(OL757532)。引物合成和基因测序全部交由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.4 生物信息学分析

通过NCBI网站上的ORF finder在线工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)获得开放读码框(Open read frame, ORF), 使用DNAMAN 8.0软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列。采用Vector NTI 11软件对其推导的氨基酸序列进行多重序列比对分析。采用Mega 6.0软件中的Clustal W进行比对后, 用Neighbor-joining法进行系统发育分析, bootstrap值设置为1 000。

1.5 *Psdnd*在中华鳖不同组织中的表达分析

为了确定中华鳖*Psdnd*的组织表达特异性, 根据*Psdnd*的全长cDNA序列设计RT-PCR定量引物, 选择中华鳖的 β -actin(登录号: EU727174)作为内参基因, 引物序列见表1。RT-PCR反应体系: 上、下游引物各0.8 μ L, 2 \times Taq Master Mix 10 μ L, ddH₂O 7.4 μ L, 模板cDNA 1 μ L, 共20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 第2~4步进行32个循环。PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 冷冻切片制备

将性腺组织样本解剖, 4% PFA固定过夜, 用磷酸盐缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)冲洗后, 在30%蔗糖-PBS缓冲液中浸泡并4 $^{\circ}$ C过夜。然后将样本浸入OCT包埋剂(Tissue-Tek)中, 用Leica低温恒温切片机将精巢(4 μ m)和卵巢切片(8 μ m)。将冷冻组织切片贴附在载玻片后保存于-80 $^{\circ}$ C备用。

1.7 原位杂交分析

原位杂交分析的实验步骤参照已有文献^[7]。即使用限制性内切酶Aat II和Sal I分别对携带

*Psdnd*基因片段的质粒进行酶切, 获得制备探针的线性化模板, 分别使用SP6/T7 Enzyme Mix和Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Kit合成正义和反义探针, 使用DNase和LiCl纯化探针后, 琼脂糖凝胶电泳检测。使用BCIP/NBT显色液对探针信号进行显色, 用碘化丙啶(propidium iodide, PI)对细胞核进行染色。所有图像均使用ZEISS Vert A1显微镜和ZEISS Axiocam 506 color成像系统进行观察和拍照。

2 结果

2.1 中华鳖*dnd*基因cDNA克隆及生物信息学分析

实验根据已有序列设计特异性引物, 通过3'RACE获得了*Psdnd*的3'序列(图1-a), 然后通过拼接获得了中华鳖*dnd*基因的cDNA全长序列。进一步采用RT-PCR获得了该基因的cDNA全长(图1-b), 命名为*Psdnd*, 登录至GenBank, 登录号为OL757532。该序列与NCBI数据库中预测的中华鳖*dnd*序列一致性为98.87%。本研究克隆获得的*Psdnd*cDNA全长1 251 bp(图2), 包括3'UTR 234 bp和编码338个氨基酸的1 017 bp ORF, 其中高度保守的RNA识别结构域(RNA recognition motif, RRM)是主要的功能结构域(用灰色阴影标注, Glu⁴¹~Val¹²³)。

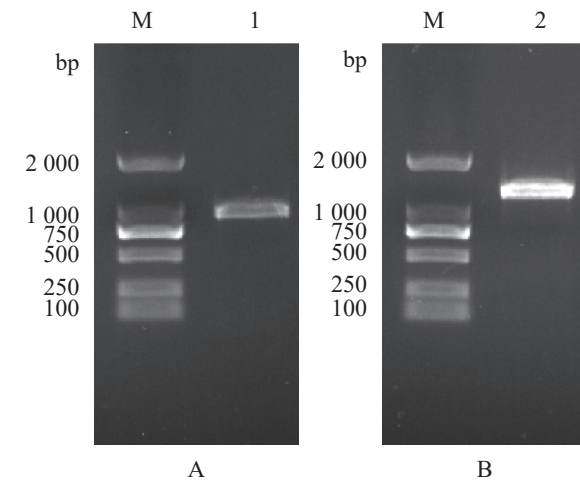


图1 *Psdnd*基因3'RACE(a)和全长cDNA PCR(b)扩增产物电泳图

M. 标准物质 2000。

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of *Psdnd* 3'RACE (a) and full-length cDNA (b) amplification products

M. marker 2000.

```

1 ATGTGGAGCGATGTGTCATCAATCAGGCCAACAGCAAGCCCTGTTGGCCTGGTGAAGGAGACGGGCATCCAGCTGGTGCAGGTGAATGGC
1 M W S D A V N Q A N K Q A L L A W V K E T G I Q L V Q V N G
91 CAGAGGAAGTACGGAGGCCCTCCCCAGGCTGGATCGGGGACCCCTCCCCCGGCTCGGAGGTGTTTCATTGGCAAGCTCCCCGAGGAC
31 Q R K Y G G P P P G W I G D P P P P G S E V F I G K L P Q D
181 ATCTACGAGAACAAGTGAATCCGCTCTCCAAAGCGTGGGCAAGCTGTACGAGTTCGGCTCATGATGACCTTCAGCGGGTGAACCGC
61 I Y E N K L I P L F Q S V G K L Y E F R L M M T F S G L N R
271 GGCTTCGCCTACGCCAAGTATGGCAACCGGCGCGCGCAAAATCGCCATCGCGCGCTCAACAGCTTCGAAGTGCAGAAGGGCTGCCCC
91 G F A Y A K Y G N R R G A Q I A I A A L N S F E V Q K G C P
361 ATCACGGTGTCCGGAGCACGGAGAAGTGCAGCTGTGCGTAGACGGCCTGTCCGCCCGGTGGAGCAGGGCCAGCTGCGGATGCTGCTG
121 I T V C R S T E K C E L C V D G L S A A V E Q G Q L R M L L
451 CAGGAGATGACTGCGGGCGTCTGAGCATCTGCTGTATCCAGCCCTCCCCGAAAGGGGGGCGAGCTCGCGTGTGAAATACAACCTCG
151 Q E M T A G V L S I S L Y P S P S R K G G Q L A V L K Y N S
541 CACCGAGCCGCGGCATGGCCAAGAAAACCTGGTGAAGGTCACTTGGCCGTGTGGCAGCAGGAGATCGAAGTGGACTGGCTGAAGCTG
181 H R A A A M A K K T L V E G H L G L C G Q E I E V D W L K L
631 GACGTGAAGACAGCGCTCCGGGCCAGCTTGGCGAGCGCGTCCCGCAAGGTTCAGCCTGGTGTCTTCAGAGGGCGCGGTCCCAGCCAG
211 D V K Q R L R A S L A S A V P A R L Q P G V F E G G G P S Q
721 GTGCCGGCGAGGCCGAGAGCTGCCCTTGGCCCGCGCCGCGCGTGTGGACCGTCTGAACGCCCTGTGCAAGAACGAGCAGCTGGGC
241 V P G E A E T C P L P P A R G V L D R L N A L C K K Q Q L G
811 CCCCCGTGTTCTGACCAAATGTGTCCAAGCCACCCCGCGGCTGGCTGCGGTTCTGGTATCAGTGGTGTATCCCGGTTACCCCTCC
271 P P V F L T K C V Q A T P A G W L R F W Y Q V V I P G Y P S
901 CCCTTCAGCGGTTCTGTGGCTCAAAGCGGATATGTCCGGCATGGATGGACACGCGGAGGCCAAGAACGCCATCGCGTGCAGCTGCTC
301 P F S G F L W L K A D M S G M D G H A E A K N A I A L Q L L
991 CGGACGCTGGGGTGCCTGGCGGTGTAGgctggatgctggacagagccacacgctgcccctcgtggggggggatgctcctctggtcct
331 R T L G C L A V *
1 081 gtggctggtccggggcgggggcggggtgtgcggaagctgctgaagctggtcttacagggcgaggtgctgagcagccgctccgccccggg
1 171 ccgctcggtttggtttctctgtttcagcgtggtttgttaggttttaaatgtttgggctctgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图2 中华鳖 *dnd* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

起始密码子、终止密码子为粗体，灰色阴影部分为 RRM 结构域。

Fig. 2 The sequences of nucleotide and deduced amino acids of *P. sinensis dnd*

Initiation codon and termination codon are in bold, the RRM is shaded gray.

用 Vector NTI 11 软件对中华鳖 Dnd 蛋白与其他物种同源蛋白序列进行多重比对。结果发现，中华鳖与其他物种的 Dnd 氨基酸序列一样，均具有 6 个保守的结构域：1 个位于 N 端的结构域 (N-terminal region, NR)，1 个典型的 RRM 和 4 个 C 端的结构域 (C-terminal region, CR: CR1~4) (图 3)。中华鳖 Dnd 与绿海龟 Dnd 的氨基酸序列一致性最高，达 80%；其次与爬行动物中扬子鳄 Dnd 的氨基酸序列一致性较高，为 71%；与哺乳类动物人、鸡和小鼠等 Dnd 的氨基酸序列一致性分别为 57%、57% 和 56%；与两栖类非洲爪蟾 Dnd 的氨基酸序列一致性也为 56%；然而，与鱼类(异育银鲫、斑马鱼、青鳉和中华鲟) Dnd 的氨基酸序列一致性较低，为 35%~41%。

基于中华鳖和其他物种 Dnd 的氨基酸序列，通过 Mega 6.0 软件采用邻接法构建了系统发育树，评估预测的 PsDnd 与其他物种的同蛋白之间的进化关系 (图 4)。结果显示，Dnd 主要聚为四足动物类(哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类)和硬骨鱼类两大分支。中华鳖 Dnd 聚类到爬行类，与绿海龟和乌龟聚为一支；与爬行类亲缘关系最高、与哺乳类亲缘关系较高，与两栖类亲缘关系较低，与硬骨鱼类亲缘关系最低 (图 4)。

2.2 中华鳖 *dnd* mRNA 的组织特异性表达分析

以 1 冬龄中华鳖各组织 RNA 反转录获得的第一条链 (cDNA) 为模板，以 *Psβ-actin* 为内参基

因，利用特异性引物，以 RT-PCR 分析中华鳖 *dnd* 在不同组织(心脏、脑、肝脏、脾脏、肾脏、精巢、卵巢)中的转录表达丰度。电泳检测 PCR 产物结果显示，中华鳖卵巢对应清晰单一的条带，精巢对应微弱的条带，而在各组织中没有条带。说明 *Psdnd* mRNA 仅在性腺组织中有表达，且在卵巢中的表达量明显高于为精巢 (图 5)。

2.3 中华鳖 *dnd* mRNA 在卵子发生过程中的表达分布

为明确 *dnd* mRNA 在中华鳖卵巢各期生殖细胞中的表达，分析其在卵巢发育过程中的调控作用，实验对中华鳖卵巢组织冷冻切片进行了化学原位杂交分析。根据滤泡细胞结构、透明带等相关特征发现，中华鳖卵子发生过程分为 10 个连续的阶段(即 I~X 期)，包括卵原细胞、初级卵母细胞 (I~V 期)、生长期卵母细胞 (VI~IX 期) 和成熟卵母细胞 (X 期)^[18]。实验前期结果发现 2 冬龄中华鳖卵巢的卵母细胞包含了各个发育时期^[19]，所以本实验采用 2 冬龄中华鳖卵巢组织为研究材料，结果显示，在 2 冬龄中华鳖的卵巢组织中，*Psdnd* mRNA 主要在 II 期初级卵母细胞的细胞质中表达，随着卵母细胞的发育，信号逐渐减弱，在 IV 期及以后的卵母细胞中检测不到信号 (图版 I)。

2.4 中华鳖 *dnd* mRNA 在精子发生过程中的表达分布

中华鳖的精巢由曲细精管组成，内衬有生精

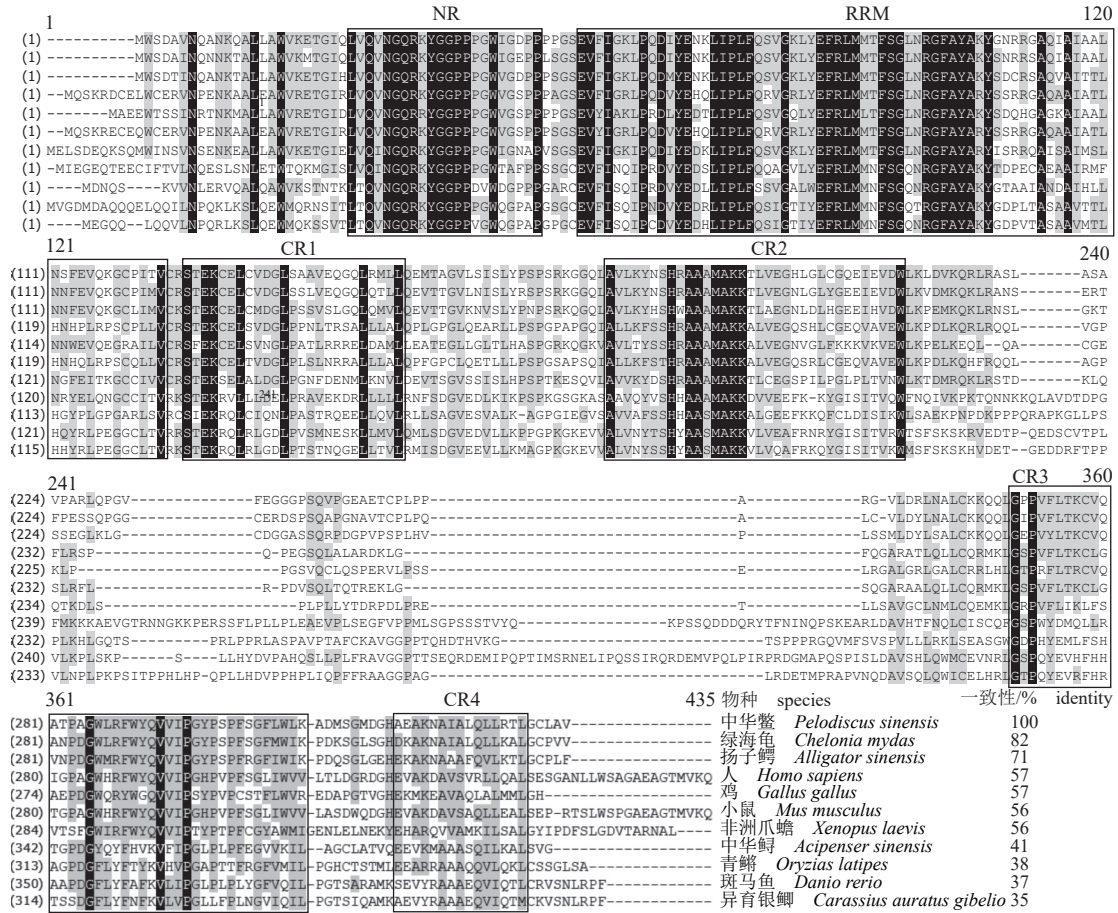


图3 中华鳖和其他脊椎动物Dnd氨基酸序列的多重对比

其他脊椎动物的Dnd氨基酸序列来源于NCBI, 方框内为Dnd的保守结构域。NR. N 端结构域, RRM. RNA 识别基序, CR1-CR4. C 端结构域。

Fig. 3 Multiple alignment of Dnd amino acid sequences of P. sinensis and other vertebrates

All the other sequences of Dnd homologues were obtained from NCBI. The conserved motifs are indicated in the frame. NR. N-terminal region; RRM. RNA recognition motif; CR1-CR4. C-terminal regions.

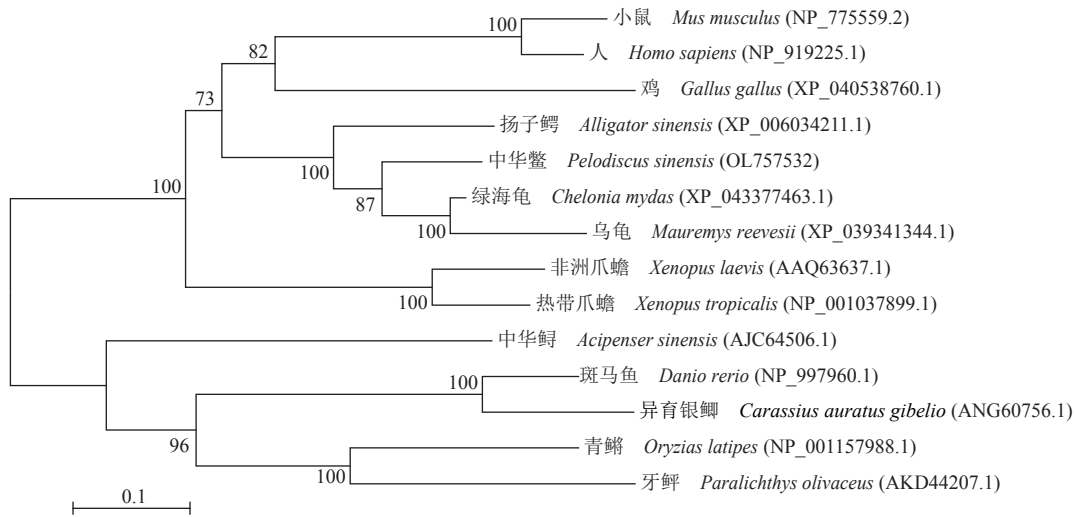


图4 Dnd蛋白的系统进化树

Dnd蛋白的系统进化树用邻接法在Mega 6.0软件中进行1000次bootstraps验证。

Fig. 4 Phylogenetic tree of Dnd proteins

The phylogenetic relationship of Dnd proteins was analyzed by Mega 6.0 with the neighbor joining method (1 000 replicates).

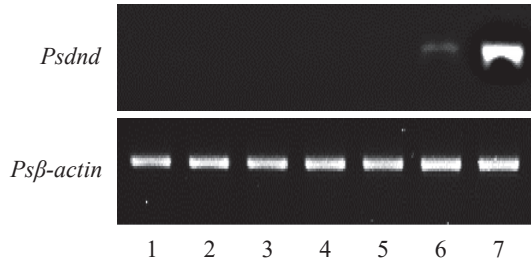


图5 中华鳖 *dnd* 基因在各组织中的表达特征

1. 心脏, 2. 脑, 3. 肝脏, 4. 脾脏, 5. 肾脏, 6. 精巢, 7. 卵巢。

Fig. 5 RT-PCR of *dnd* expression in different tissues of *P. sinensis*

1. heart, 2. brain, 3. liver, 4. spleen, 5. kidney, 6. testis, 7. ovary.

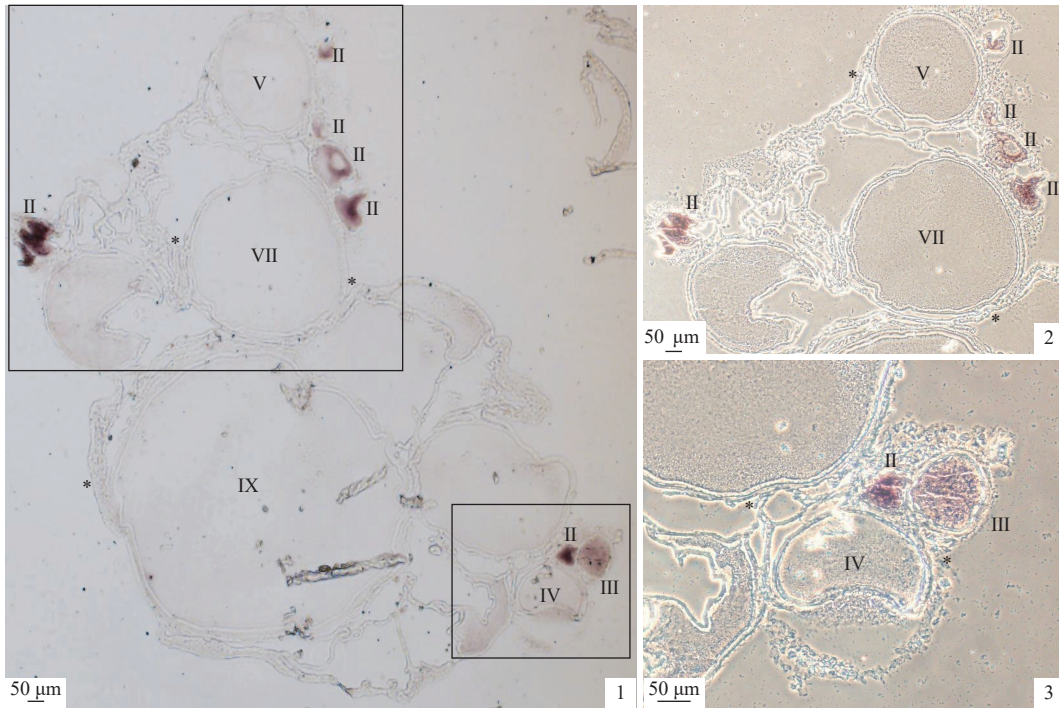
上皮, 其中包括体细胞和发育中的生殖细胞: 精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子细胞、延长精子细胞和精子^[20]。本实验前期结果发现, 2冬龄中华鳖精巢包含了精子发生过程中的绝大多数时期细胞(精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞)^[19]。因此, 本实验选用

2冬龄中华鳖精巢作为研究材料, 制备其精巢组织的冷冻切片, 然后通过化学原位杂交分析, PI染核, 检测 *dnd* 转录本在中华鳖精子发生过程中的表达模式。结果显示, *Psdnd* 仅在生殖细胞中表达, 在体细胞中未检测到其表达。*Psdnd* mRNA 在精母细胞中较强表达, 在精原细胞中有弱表达, 在精子细胞中不表达(图版 II)。

3 讨论

3.1 中华鳖 *dnd* 基因 cDNA 序列鉴定

通过序列拼接和 RT-PCR 获得中华鳖 *dnd* cDNA 全长, 该序列与 NCBI 数据库预测的中华鳖 *dnd* 序列 (XM_025188074.1) 一致性为 98.87%。该基因编码的蛋白有 338 个氨基酸, 具有 1 个典型的 RRM 结构域和其他 5 个保守的结构域, 与其他物种 Dnd 蛋白具有高度同源性。中华鳖 Dnd 与绿海龟、扬子鳄等爬行动物 Dnd 氨基酸序列一致性较高; 与人、鸡和小鼠等哺乳动物和非洲爪蟾

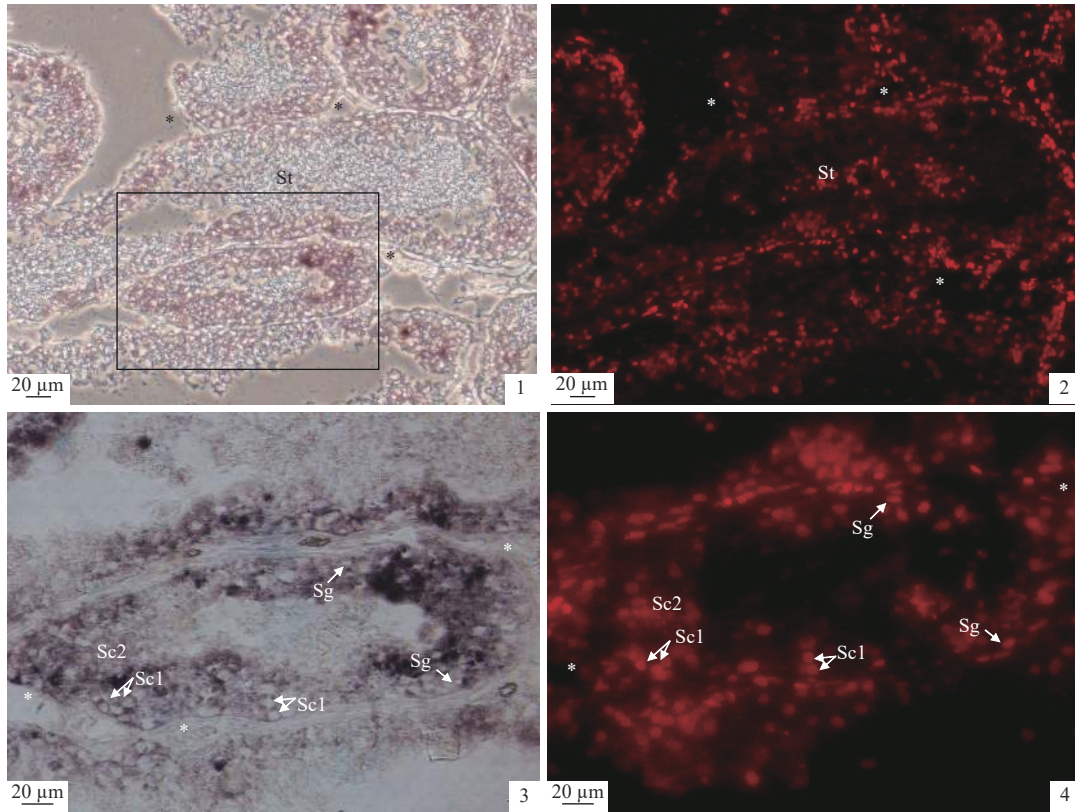


图版 I 原位杂交分析 *Psdnd* mRNA 在中华鳖卵巢中的表达

1~3. 2冬龄中华鳖卵巢组织切片原位杂交分析, *dnd* mRNA 信号使用碱性磷酸酶, 信号为紫色, 图片 2 和图片 3 分别为图片 1 中方形区域的放大。2冬龄中华鳖卵巢组织中, *dnd* mRNA 信号在 II 期初级卵母细胞的细胞质中最强, 随着卵母细胞发育, 信号减弱, 在 IV 期及以后卵母细胞和体细胞中未检测到信号; II~V 期为初级卵母细胞, VII~IX 期为生长期卵母细胞; *表示体细胞。

Plate I Chemical *in situ* hybridization (CISH) detection of the expression of *Psdnd* mRNA in ovary of *P. sinensis*

1-3. CISH analysis of ovary in 2-year-old *P. sinensis*, the CISH signals were stained in purple by alkaline phosphatase (AP). 2, 3. exhibiting magnification of square areas in picture 1, respectively. *Psdnd* signals were mainly detected in the cytoplasm of stage II primary oocytes, then weakened with the development, and not detected in oocytes stage IV onwards. Stage II - V, primary oocytes, stage VII-IX, growth oocytes. Somatic cells were labeled with stars.



图版 II 原位杂交分析 *Psdnd* mRNA 在中华鳖精巢中的表达

1~4. 2 龄中华鳖精巢组织切片原位杂交分析; 1, 3. *dnd* mRNA 信号使用碱性磷酸酶, 信号为紫色; 2, 4. 用 PI 染精巢细胞的细胞核呈红色; 3. 图 1 中矩形框的局部放大图; *dnd* mRNA 信号在精母细胞中最强, 在精原细胞中次之, 在精子细胞和体细胞中未检出; Sg. 精原细胞, Sc1. 初级精母细胞, Sc2. 次级精母细胞, St. 精子细胞, *表示体细胞。

Plate II Chemical *in situ* hybridization (CISH) detection of the expression of *Psdnd* mRNA in the testis of *Pelodiscus sinensis*

1-4. CISH analysis of testis in 2 year-old *P. sinensis*. The CISH signals were in purple stained by alkaline phosphatase (AP) (1, 3), and sections were counterstained by propidium iodide (PI) for nuclear staining in red color (2, 4). 3. Exhibiting magnification of circle areas in picture 1. *Psdnd* signals were mainly detected in primary spermatocytes (Sc1) and secondary spermatocytes (Sc2), then weaken in spermatogonia (Sg), and not detected in spermatids (St) and somatic cells. Somatic cells were labeled with stars.

等两栖类 *Dnd* 氨基酸序列一致性次之; 与异育银鲫、斑马鱼、青鳉和中华鲟等的 *Dnd* 氨基酸序列一致性最低。通过 NJ 法构建的系统发育树分析结果同样表明, 中华鳖 *Dnd* 聚类到爬行类, 与绿海龟和乌龟聚为一支; 与爬行类亲缘关系最高, 与哺乳类亲缘关系较高, 与两栖类亲缘关系较低, 与硬骨鱼类亲缘关系最低 (图 4)。这些结果表明, 中华鳖 *Dnd* 既有与其他物种相同的保守结构域, 又与其他物种的 *Dnd* 序列的一致性有差异, 表明其在行使保守功能的同时又展示了其功能的物种特异性。

3.2 中华鳖 *dnd* mRNA 在生殖细胞中的表达

RT-PCR 检测 *Psdnd* mRNA 的组织表达发现, 在心脏、脑、肝脏、脾脏和肾脏等组织中难以检

测到其表达, 而在性腺组织中表达, 且在卵巢组织中的表达明显高于精巢, 与 *dnd* 在西里伯斯青鳉^[12]、稀有鲟^[13]、异育银鲫^[14]、牙鲈^[15] 和中华鲟^[16] 中的表达模式相似, 与非洲爪蟾只在卵巢中表达不一致^[9], 与小鼠的 *dnd1-β* 仅在精巢中有表达不一致^[7]。

原位杂交结果显示, *Psdnd* 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 (图版 I, 图版 II)。在中华鳖卵巢组织中, *Psdnd* mRNA 在初级卵母细胞的细胞质中表达, 且在 II 期初级卵母细胞中信号最强, 随着卵母细胞的发育, 信号逐渐减弱, 在 IV 期及以后的卵母细胞中未检测到信号 (图版 I)。这与 *dnd* 在异育银鲫^[14] 和牙鲈^[15] 卵子发育过程中的表达有相似之

处。此外, 异育银鲫 *dnd* 在其卵原细胞和 I 期卵母细胞中可以检测到较弱信号, 随着卵母细胞的生长和卵黄发生前阶段的到来, 该信号逐渐增强, 并在 II 期达到峰值, 随后逐渐减弱^[14]。牙鲆 *dnd* 在其 II 期卵母细胞的胞质中检测到强的信号, 而在 V 期的卵母细胞中未检测到信号^[15]。*Dnd* 在西里伯斯青鲙^[12]、稀有鮑鲫^[13] 和中华鲟^[16] 中均是在初级卵母细胞中表达较强, 随着卵子而发生而逐渐减弱。

在中华鳖精巢组织中, *Psdnd* mRNA 信号在初级和次级精母细胞中表达最强, 在精原细胞中次之, 在精子细胞中未检测到表达信号 (图版 II), 与 *dnd* 在小鼠或鱼类等雄性生殖细胞发育过程中的表达模式均不同。小鼠 *dnd1* 基因表达的蛋白有两个异构体: *Dnd1-α* 主要在早期胚胎和胚胎性腺中表达; *Dnd1-β* 却在减数分裂开始和减数分裂后的精巢生殖细胞中表达, 在延长的精子细胞中表达量最高^[7]。*Dnd* mRNA 在西里伯斯青鲙^[12]、稀有鮑鲫^[13]、异育银鲫^[14]、牙鲆^[15] 和中华鲟^[16] 等精原细胞中表达信号最强, 随着精子发生进程, 信号逐渐减弱, 在精子细胞和精子中消失。

本实验结果显示, 中华鳖 *dnd* 的组织特异性表达与鱼类相似, 均在性腺中特异性表达, 且在卵巢中的表达量高于精巢。在雌性配子发生过程中, *dnd* 在生殖细胞中的动态表达模式与鱼类也有相似之处, 均在初级卵母细胞的早期有较高转录丰度。但 *Psdnd* 在雄性配子发生过程中, 其动态表达模式与小鼠和鱼类均有差异。由此可见, 在进化上, 龟鳖类作为低等脊椎动物与哺乳动物的中间物种, *dnd* 在其雌性配子发育过程中与低等脊椎动物有相似之处, 在雄性配子发育过程中又异于低等脊椎动物和哺乳动物, 表现出其特异性。本研究结果推测, *Psdnd* 在中华鳖生殖细胞发育过程中也扮演着重要角色。

综上所述, *Psdnd* mRNA 在中华鳖生殖细胞中特异性表达, 且在中华鳖两性配子发生过程中动态表达, 表明 *dnd* 在中华鳖卵子和精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 *dnd* 研究龟鳖类及其他爬行动物的生殖发育调控机制奠定基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Baloch A R, Franěk R, Saito T, *et al.* Dead-end (*dnd*) protein in fish—a review[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(3): 777-784.
- [2] Ruthig V A, Yokonishi T, Friedersdorf M B, *et al.* A transgenic DND1^{GFP} fusion allele reports in vivo expression and RNA-binding targets in undifferentiated mouse germ cells[J]. *Biology of Reproduction*, 2021, 104(4): 861-874.
- [3] Gross-Thebing T, Yigit S, Pfeiffer J, *et al.* The vertebrate protein dead end maintains primordial germ cell fate by inhibiting somatic differentiation[J]. *Developmental Cell*, 2017, 43(6): 704-715.e5.
- [4] Ruthig V A, Friedersdorf M B, Garness J A, *et al.* The RNA-binding protein DND1 acts sequentially as a negative regulator of pluripotency and a positive regulator of epigenetic modifiers required for germ cell reprogramming[J]. *Development*, 2019, 146(19): dev175950.
- [5] Youngren K K, Coveney D, Peng X N, *et al.* The *Ter* mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours[J]. *Nature*, 2005, 435(7040): 360-364.
- [6] Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, *et al.* *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival[J]. *Current Biology*, 2003, 13(16): 1429-1434.
- [7] Bhattacharya C, Aggarwal S, Zhu R, *et al.* The mouse *dead-end* gene isoform α is necessary for germ cell and embryonic viability[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355(1): 194-199.
- [8] Aramaki S, Kubota K, Soh T, *et al.* Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2009, 55(2): 214-218.
- [9] Horvay K, Claußen M, Katzer M, *et al.* *Xenopus Dead end* mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development[J]. *Developmental Biology*, 2006, 291(1): 1-11.
- [10] Taguchi A, Watanabe K, Orii H. Intracellular localizations of the Dead End protein in *Xenopus* primordial germ cells[J]. *International Journal of Developmental Biology*, 2014, 58(10-12): 793-798.
- [11] Hong N, Li M Y, Yuan Y M, *et al.* *Dnd* is a critical specifier of primordial germ cells in the medaka fish[J].

- [Stem Cell Reports](#), 2016, 6(3): 411-421.
- [12] Zhu T Y, Gui L, Zhu Y F, *et al.* Dnd is required for primordial germ cell specification in *Oryzias celebensis*[J]. [Gene](#), 2018, 679: 36-43.
- [13] Duan J D, Feng G Q, Chang P, *et al.* Germ cell-specific expression of *dead end (dnd)* in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)[J]. [Fish Physiology and Biochemistry](#), 2015, 41(2): 561-571.
- [14] 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*)[J]. [Gene](#), 2016, 591(1): 183-190.
- [15] 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*)[J]. [Biomed Research International](#), 2015, 2015: 428591.
- [16] 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*[J]. [Gene](#), 2015, 558(1): 118-125.
- [17] 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](#), 2005, 233(3): 872-882.
- [18] Hei N N, Yang P, Yang Y, *et al.* Fine structural observation on the oogenesis and vitellogenesis of the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. [Zygote](#), 2010, 18(2): 109-120.
- [19] 唐舟凯, 张飘逸, 储张杰, 等. 中华鳖*dazl*基因克隆及在生殖细胞中的表达[J]. 水产学报, 2019, 43(2): 400-409. Tang Z K, Zhang P Y, Chu Z J, *et al.* The cloning and expression analysis of *dazl* in germ cells in the Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. [Journal of fisheries of China](#), 2019, 43(2): 400-409 (in Chinese).
- [20] Zhang L, Han X K, Li M Y, *et al.* Spermiogenesis in soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*[J]. [The Anatomical Record](#), 2007, 290(10): 1213-1222.

Cloning of *dead end (dnd)* gene in Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus sinensis*) and its expression in germ cells

CHEN Kaili, LI Yulin, BAN Wenzhuo, XU Jianfei, TAN Zhimin, XU Hongyan*

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development,
Ministry of Education, Key Laboratory of Aquatics Science of Chongqing, College of Fisheries,
Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract: Dead end (*dnd*) is a germ cell-specific molecular marker in most vertebrates, belonging to RNA-binding protein family. It is essential for the maintenance of the survival and migration of primordial germ cells (PGCs). In many species, *dnd* deficiency could block the migration of PGCs, and then they transdifferentiate into other cell types, resulting in complete loss of germ cells and sterility. Thus, *dnd* is essential for the survival and development of vertebrate germ cells. *Dnd* is originally identified in *Danio rerio*, proved that deletion of *Dnd* leads to abnormal polarization and migration of PGCs and loss of germ cells. Thereafter, *dnd1* is characterized in *Mus musculus* and *Dnd1-β* is specifically expressed in adult testis. However, chicken *Dnd* homologue (CDH) is expressed in both gonads. In *Xenopus laevis*, *dnd* is only expressed in ovary. In teleosts, *dnd* has been identified as a PGCs marker and is specifically expressed in gonads that the expression level is higher in ovary than testis. Therefore, *dnd* shows distinct expression patterns among species. Although *dnd* plays a conserved role in maintaining the survival and migration of PGCs from teleosts to mammals, its expression pattern in gametogenesis varies with species. Thus, it is of great significance to identify the sequence characteristics, gene expression and distribution of *dnd* in turtles, to lay the foundation for studying on the origin and formation of PGCs, and gametogenesis of turtles. *Pelodiscus sinensis* is one of the oldest tetrapods and has unique scientific research value in study of animal morphological and reproductive evolution. Additionally, because of its high medicinal and economic values, *P. sinensis* occupies an important position in freshwater aquaculture in China. Here, in order to study the development and differentiation mechanism of turtles' germ cells, the full-length cDNA of *dnd* was obtained by RACE from *P. sinensis*. The total length of *P. sinensis dnd (Psdnd)* cDNA was 1 251 bp (GenBank ID OL757532), including 254 bp 3' untranslated region and 1 017 bp open reading frame encoding 338 amino acids. Multiple alignment and phylogenetic tree analysis showed that *Psdnd* had 6 conserved domains, the same as homologous proteins of other species had, and the highly conserved RNA recognition domain was the main functional region. Besides, *Psdnd* had the highest sequence identity with and was the closest relative to *Chelonia mydas dnd*. RT-PCR showed that *Psdnd* was specifically expressed in gonads and the mRNA level was higher in ovary than testis. Chemical *in situ* hybridization showed that *Psdnd* mRNA was specifically expressed in germ cells. Particularly, *Psdnd* mRNA was mainly expressed in the cytoplasm of stage II primary oocytes, and not expressed in oocytes stage IV onwards. Moreover, *Psdnd* mRNA signals were strongly detected in primary spermatocytes, followed by secondary spermatocytes and spermatogonia, and barely in spermatids. Our study indicates that *dnd* may play a key role in regulating the development of male and female germ cells in *P. sinensis*. This study lays the basis for further study of turtles' germ cells development and differentiation mechanism.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; germ cell; RNA binding protein; *in situ* hybridization; gametogenesis

Corresponding author: XU Hongyan. E-mail: xuhyzqh@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31873035); Fundamental Research Funds for the Central Universities (SWU020014)