网络出版时间:2025-10-31 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.04.003

大鳍鳠*dnd*基因的克隆与表达特征分析

余乐[1],王锐[1],叶欢[2],岳华梅[2],谢勇[3],易沫[4],陈元坤[3],李创举[1,2]

(1 武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院,湖北 武汉 430023;2 中国水产科学研究院 长江水产研究所 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室,湖北 武汉 430223;3 重庆市水产科学研究所,重庆 400020;4 石首市农业技术推广中心,湖北 石首 434400)

[摘 要] 【目的】探究鱼类生殖细胞特异标记基因*dnd*在大鳍鳠性腺发育过程中的表达特征。【方法】采集1龄、2龄和4龄雌雄大鳍鳠的心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、脑、鳃及性腺组织卵巢和精巢,提取4龄大鳍鳠的卵巢总RNA,反转录合成cDNA,采用RACE技术克隆大鳍鳠*dnd*基因(*Hmdnd*)全长cDNA序列,测序后进行分析;以*β-actin*为内参基因,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)方法,检测*dnd*基因在1龄大鳍鳠不同组织以及不同发育时期性腺中的表达量;利用原位杂交技术分析*dnd* mRNA在生殖细胞中的表达定位。【结果】*Hmdnd*基因cDNA序列全长2 035 bp(GenBank登录号为PQ626051),其中开放读码框1 131 bp,编码376个氨基酸。氨基酸序列比对和系统进化树分析结果表明,大鳍鳠与黄颡鱼dnd蛋白序列一致性最高(79.24%)。RT-qPCR结果表明,*Hmdnd*基因在大鳍鳠性腺组织特异表达,且在卵巢的表达量显著高于精巢,在其他组织中不表达。随着配子发育的进行,*Hmdnd*基因表达量显著下降。性腺切片RNA原位杂交研究结果显示,*Hmdnd*基因主要在生殖细胞的细胞质表达;在卵巢中,随着初级卵母细胞从Ⅰ期发育到Ⅱ期,*Hmdnd*表达量急剧增加,但随着初级卵母细胞发育到Ⅲ期,*Hmdnd*表达量下降至Ⅰ期初级卵母细胞水平;在精巢中,*Hmdnd*在精原细胞中表达水平最高,随着精子发育的推进,其表达水平逐渐降低,在精子细胞中不表达。【结论】*Hmdnd*基因可能在大鳍鳠性腺发育早期发挥着重要的作用。

[关键词] 大鳍鳠;*dnd*基因;生殖细胞;性腺发育

[中图分类号] S965.199 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)04-0017-09

Cloning and expression analysis of the *dnd* gene in *Hemibagrus macropterus*

YU Le[1], WANG Rui[1], YE Huan[2], YUE Huamei[2], XIE Yong[3], YI Mo[4], CHEN Yuankun[3], LI Chuangju[1,2]

(1 *School of Animal Science and Nutritional Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei* 430023, *China*; 2 *Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan, Hubei* 430223, *China*; 3 *Chongqing Fisheries Science Research Institute, Chongqing* 400020, *China*; 4 *Shishou Agricultural Technology Extention Center, Shishou, Hubei* 434400, *China*)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the expression patterns of the germ cell-specific marker gene dead end *(dnd)* during gonadal development in *Hemibagrus macropterus*. 【Method】 Tissues including the heart, liver, spleen, kidney, intestine, brain, gills, and gonads (ovary and testis) were collected from 1-, 2-, and 4-year-old male and female *H. macropterus*. Total RNA was extracted from the ovaries of 4-year-old *H. macropterus*, which was reverse-transcribed into cDNA, and the full-length cDNA sequence of *H. mac-*

[收稿日期] 2025-01-18 [修回日期] 2025-03-05

[基金项目] 重庆市科研机构绩效激励引导专项(CSTB2023JXJL-YFX0084);重庆市财政项目(C20240103);国家重点研发计划项目(2022YFD2400101);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2023TD23)

[作者简介] 余乐(2000—),男,湖北襄阳人,在读硕士,主要从事鱼类生殖发育与细胞工程研究。E-mail:1186163384@qq.com

[通信作者] 李创举(1980—),男,湖南邵阳人,研究员,博士生导师,主要从事水产生物技术研究。E-mail:lcj@yfi.ac.cn

陈元坤(1968—),男,重庆万州人,正高级工程师,主要从事水产养殖技术研究。E-mail:404070431@qq.com

中国知网 https://www.cnki.net

ropterus dnd (*Hmdnd*) was cloned using RACE technology. Subsequently, sequence analysis was conducted. Using *β-actin* as the reference gene, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was employed to quantify *dnd* expression in various tissues of 1-year-old *H. macropterus* and in gonads at different developmental stages. RNA in situ hybridization (ISH) was applied to localize *dnd* mRNA within germ cells.【Result】The full-length *Hmdnd* cDNA sequence was 2 035 bp (GenBank accession: PQ626051), containing an open reading frame (ORF) of 1 131 bp that encodes 376 amino acids. Sequence alignment and phylogenetic analysis revealed the highest protein sequence identity (79.24%) between *H. macropterus* and *Pelteobagrus fulvidraco* (yellow catfish). RT-qPCR demonstrated that *Hmdnd* was exclusively expressed in gonads, with significantly higher levels in ovaries than in testes, and no expression in somatic tissues. *Hmdnd* expression declined markedly during gamete maturation. RNA in ISH of gonadal sections revealed that *Hmdnd* mRNA was predominantly localized in the cytoplasm of germ cells. In ovaries, *Hmdnd* expression increased sharply as primary oocytes developed from stage Ⅰ to stage Ⅱ, but dropped to stage-Ⅰ-equivalent levels in stage Ⅲ primary oocytes. In testes, the strongest *Hmdnd* signals were detected in spermatogonia and diminished progressively during spermatogenesis, with no expression observed in spermatozoa.【Conclusion】*Hmdnd* is likely to play a critical role in the early gonadal development of *H. macropterus*.

Key words: *Hemibagrus macropterus*; *dnd* gene; germ cell; gonadal development

两性生殖动物具有两大细胞系,即生殖细胞系和体细胞系,生殖细胞系负责遗传信息的传递,而体细胞系维持生物个体生长和发育[1]。原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是生殖细胞的祖细胞,为早期胚胎发育过程中最早建立的一群生殖干细胞,其形成后逐渐迁移到性腺原基,经过有丝分裂和减数分裂最终发育为成熟的配子[1]。*dnd*(dead end)基因是脊椎动物生殖细胞的特异性标记基因,编码RNA结合蛋白,对原始生殖细胞的形成和迁移至关重要[2]。科研人员对多种鱼类的研究结果表明,*dnd*基因功能的缺失会导致PGCs无法正常迁移,造成生殖细胞缺失,从而发育为不育的个体[3-5]。

*dnd*基因最初是在斑马鱼(*Danio rerio*)中发现的,敲除斑马鱼*dnd*基因会导致PGCs异常迁移,但体细胞的发育不受影响[6]。人们对非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的研究表明,*dnd*基因仅在卵巢中表达,且当*dnd*基因的转录和翻译受到抑制时,PGCs无法正常迁移[7]。在鱼类中,*dnd*基因的表达模式相对保守,为性腺特异表达,例如在稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)[8]、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)[9]、褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)[10]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)[11]和中华鲟(*Acipenser sinensis*)[12]中,均能在性腺中检测到*dnd*基因的表达,且在卵巢的表达量高于精巢。另外,*dnd*基因在爬行动物中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)[13]中也具有相似的表达模式。上述研究表明,*dnd*基因在性腺发育过程中发挥着重要的作用。

大鳍鳠(*Hemibagrus macropterus*)俗称石扁头、石胡子、江鼠等,隶属于硬骨鱼纲、鲇形目、鲿科、鳠属,广泛分布于长江和珠江各水系的干流及其支流中,在长江上游江段渔获物中曾占有一定比例[14]。大鳍鳠肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富,具有较高的食用价值。目前科研人员已经开展了大鳍鳠人工繁殖、养殖、胚胎及仔稚鱼发育方面的研究[15-17],而对其生殖细胞了解甚少。因此,本试验采用RACE方法克隆大鳍鳠*dnd*基因(*Hmdnd*)的全长cDNA序列,通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)研究了*Hmdnd*基因在大鳍鳠不同组织和发育时期性腺中的表达特征,并通过原位杂交技术鉴定了*Hmdnd*基因在性腺细胞的定位特征,以期为大鳍鳠生殖细胞的鉴定及发育研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验所用大鳍鳠样本来自于重庆市水产研究所长寿基地,1龄雌鱼和雄鱼体长分别为(19.5±1.2)和(18.7±0.4) cm,体质量分别为(45.5±2.1)和(41.1±2.6) g/尾;2龄雌鱼和雄鱼体长分别为(25.4±0.4)和(27.5±1.8) cm,体质量分别为(123.3±9.8)和(125.6±2.9) g/尾;4龄雌鱼和雄鱼体长分别为(44.6±0.6)和(41.9±0.7) cm,体质量分别为(383.7±21.2)和(381.5±2.5) g/尾。取1,2,4龄鱼各6尾(雌雄各半),断尾放血后分别采集

中国知网 https://www.cnki.net

心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肠、脑、鳃及性腺组织精巢和卵巢，置于RNA保存液（Vivacell，中国）中4 ℃过夜，然后保存于－20 ℃冰箱，分别用于后续RNA提取。同时，取每个个体的性腺，用波恩氏液（Scientific Phygene，中国）和40 g/L多聚甲醛（paraformaldehyde，PFA）固定，用于后续石蜡切片制备和原位杂交试验。所有试验程序均按照中国水产科学院长江水产研究所制定的《实验动物养护和使用指导原则》实施。

1.2　*Hmdnd* 基因cDNA全长序列克隆与分析

1.2.1　序列克隆　用FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2（Vazyme，中国）试剂盒提取4龄大鳍鳠卵巢组织总RNA，用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计（Thermo Scientific，美国，NanoDrop One）检测RNA质量和浓度。按照SMARTer® RACE 5′/3′ Kit（TaKaRa，日本）说明书，以大鳍鳠卵巢RNA为模板，分别合成SMART 3′ cDNA和5′cDNA，置于－20 ℃冰箱保存备用。

根据大鳍鳠转录组获得 *dnd* 基因部分序列，用Prime5软件设计RACE引物（表1），进行巢式PCR扩增。以合成的卵巢SMART cDNA为模板，使用引物Hmdnd-5′RACE-1和Hmdnd-3′RACE-1与RACE通用引物UPM分别进行5′RACE和3′RACE的第1次PCR扩增；将PCR产物稀释10倍，作为第2次PCR的模板，用引物Hmdnd-5′RACE-2和Hmdnd-3′ RACE-2与RACE通用引物NUP分别进行5′RACE和3′ RACE的第2次PCR扩增。反应体系：上下游引物各0.5 μL，mix Vazyme 2× *Taq* Plus Master MIX Ⅱ（Dye Plus）（Vazyme，中国）10 μL，模板cDNA 1 μL，无菌去离子水8 μL。设置PCR反应条件为：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性30 s，59 ℃退火30 s，72 ℃延伸10 s，35次循环；72 ℃终延伸10 min。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物，并回收目的片段，然后连接到pMD19-T载体上（16 ℃连接12～16 h），将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞DH5α，在超净工作台中用涂布棒将菌液均匀涂布在含有氨苄青霉素的培养皿上，37 ℃培养过夜，次日挑选单个菌落进行PCR鉴定，PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。将PCR鉴定阳性样品送至武汉天一华煜基因公司测序。最后用DNAMAN 9.0软件根据3′和5′端序列所包含的重叠序列进行拼接，得到 *Hmdnd* 基因全长cDNA序列。

表1　本试验所用引物

Table 1　Primers used in this study

引物名称 Primer names	引物序列（5′→3′） Sequences（5′→3′）	用途 Usage
Hmdnd-5′RACE-1	GGCACCACCACCCTGTAGGAAAA	5′RACE第1次扩增 5′RACE primary amplification
Hmdnd-5′RACE-2	CTCTTCTCCGTGCTCCTCTTGA	5′RACE第2次扩增 5′RACE secondary amplification
Hmdnd-3′RACE-1	CTCCACCTTTCACCCGCAGTCTT	3′RACE第1次扩增 3′RACE primary amplification
Hmdnd-3′RACE-2	CCTCGATTACACGATGTTTTATG	3′RACE第2次扩增 3′RACE secondary amplification
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAG-TGGTATCAACGCAGAG	RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE
Hmdnd-RT-F	GCAGATTAACGGCCAGCGCAGATAT	RT-qPCR
Hmdnd-RT-R	TTTGGCGTAGGCGAAGCCTCGGTTC	RT-qPCR
β-actin-RT-F	GCTACAGCTTCACTACCACA	RT-qPCR内参 RT-qPCR internal control
β-actin-RT-R	GCCAATGGTGATGACCTGTC	RT-qPCR内参 RT-qPCR internal control
ISH-dnd-F^{+}	TAATACGACTCACTATAGCTTCGGTG CCCTTTGGAAGG	正义探针合成 Sense probe synthesis
ISH-dnd-R^{+}	GCAGCTCAACTCGACGTATTTTC	正义探针合成 Sense probe synthesis
ISH-dnd-F-	CTTCGGTGCCCTTTGGAAGG	反义探针合成 Antisense probe synthesis
ISH-dnd-R-	TAATACGACTCACTATAGGCAGCTCA ACTCGACGTATTTTC	反义探针合成 Antisense probe synthesis

1.2.2　序列分析　通过NCBI网站上的ORF finder在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder）获得 *Hmdnd* 基因开放阅读框（open read frame，ORF）。使用DNAMAN 9.0软件将 *Hmdnd*

中国知网　https://www.cnki.net

基因核苷酸序列翻译成氨基酸序列,并通过Vector NTI 11.5.1比对分析核苷酸序列;通过NCBI数据库工具(Protein BLAST: Align two or more sequences using BLAST(nih.gov))计算物种间dnd蛋白序列的一致性;采用Mega 11.0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;通过MEGA 11.0软件和ESPript 3.0(https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)进行氨基酸序列多重比对和绘图。

1.3 *Hmdnd*基因在不同组织中的表达特征

提取1龄雌、雄大鳍鳐不同组织的总RNA,使用微量分光光度计(Thermo Scientific,美国,NanoDrop One)测定RNA浓度,通过1.5%琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,选择260和280 nm处吸光度比值(A_{260}/A_{280})在1.8~2.0,且电泳条带完整的样品用于后续cDNA的合成,质检合格的总RNA于-80 ℃冰箱储存备用。使用TaKaRa Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit对RNA进行反转录,获得cDNA,-20 ℃冰箱保存,用于RT-qPCR试验。

根据*Hmdnd*基因的基因组和cDNA序列设计出跨内含子的RT-qPCR引物Hmdnd-RT-F/R,选择*β-actin*作为内参基因并设计引物*β-actin*-RT-F/R(表1)。通过标准曲线和熔解曲线进行引物筛选,所有定量引物扩增效率为90%~110%,$R^2 \geqslant 0.99$。RT-qPCR反应体系:上、下游引物各0.35 μL,SYBR Mix 10 μL,ddH_2O 8.3 μL,模板cDNA 1 μL,共20 μL。反应程序:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min;95 ℃ 15 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,循环40次;60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。最终采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算得出各组织的表达量。

1.4 *Hmdnd*基因在不同发育时期性腺中的表达特征

对波恩氏液固定的1,2,4龄大鳍鳐性腺样本进行脱水包埋后制备石蜡切片,用苏木精-伊红染液进行染色,封片后在显微镜(DM5000B,Leica)下观察并拍照。确定性腺样本处于不同发育时期后,进行RNA提取和反转录,参照1.3节中引物Hmdnd-RT-F/R和反应体系进行RT-qPCR试验,通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法得到*Hmdnd*基因在不同发育时期性腺的表达量。

1.5 *Hmdnd* mRNA在性腺中的细胞定位分析

采用原位杂交试验分析*Hmdnd* mRNA在精巢和卵巢中的细胞定位。性腺样本经40 g/L多聚甲醛固定过夜后,在4 ℃冰箱中用0.3 kg/L的蔗糖溶液进行渗透,次日用OCT包埋剂(Tissue-Tek)包埋,最终使用Leica低温恒温切片机制备冰冻切片。

探针合成:在大鳍鳐cDNA序列的3′端设计探针引物ISH-dnd(表1),取1龄大鳍鳐的卵巢cDNA进行PCR扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳后回收目的片段,获得制备探针的线性化模板,使用NanoDrop One微量分光光度计和1.5%琼脂糖凝胶电泳分别检测其浓度和质量后进行探针合成。使用Digoxigenin(DIG) RNA Labeling Kit合成正义和反义探针,经DNase和LiCl纯化后,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测合成探针的质量。

用PBS将冰冻切片复水,经蛋白酶K(10 μg/mL)室温消化10 min后,再用40 g/L多聚甲醛固定15 min,最后加入含有探针的杂交液65 ℃杂交16~20 h;次日,在65 ℃孵育箱中用wash buffer、2×SSCT和0.2×SSCT充分摇洗,再用MABT室温摇洗后加入杂交封闭阻断液封闭3~4 h,然后加入Fab-AP抗地高抗体反应液4 ℃过夜;用MABT洗干净玻片后加入BCIP/NBT显色液对探针信号进行避光显色,显色过程中每间隔1 h在显微镜下观察一次,待显色达到合适效果后用体积分数50%的甘油封片,在显微镜下拍照。

1.6 数据分析

利用IBM SPSS Statistics 27.0.1(IBM,美国)对试验数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),采用LSD和Duncan法进行多重比较,分析组间的差异显著性,显著水平定为$P<0.05$。所有结果以"平均值±标准差"表示。使用Graphpad prism 5.0软件(Graphpad,美国)制图。

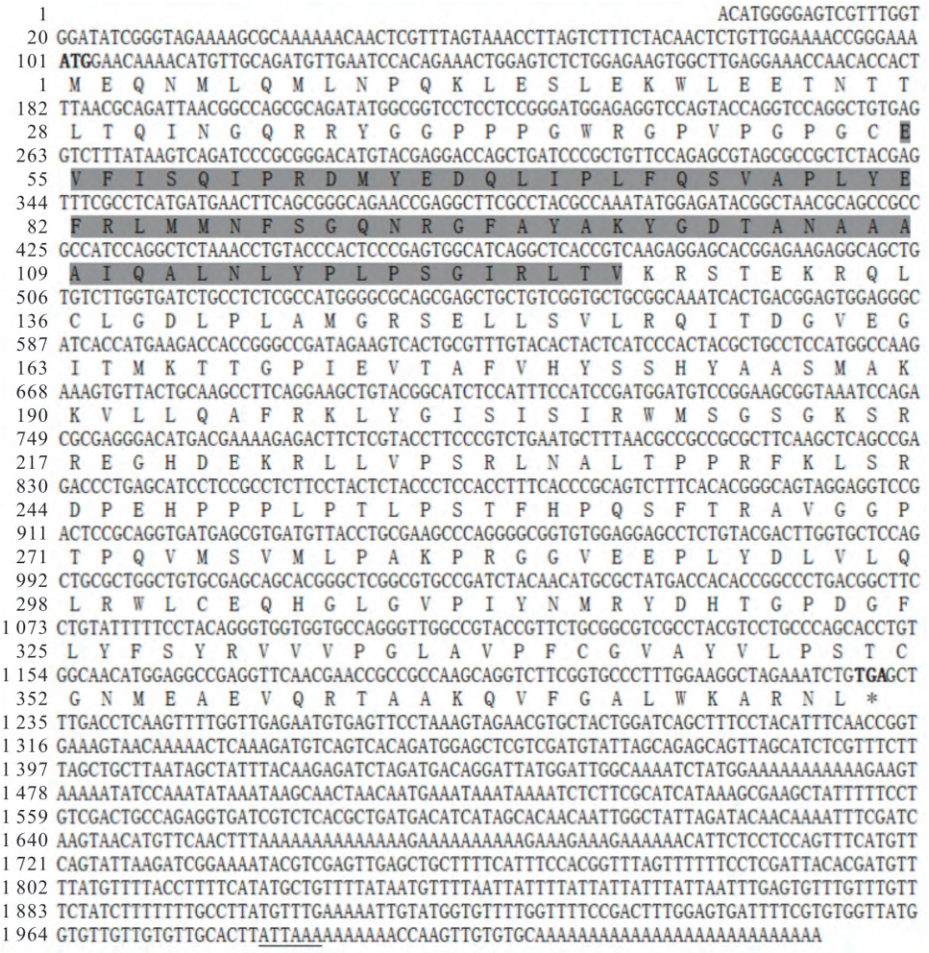
2 结果与分析

2.1 *Hmdnd*基因克隆与序列特征分析

经RACE-PCR克隆测序获得了2 035 bp的*Hmdnd*基因全长cDNA序列(GenBank登录号为PQ626051),包括5′端起始密码子上游长度为100 bp的非编码区、3′端终止密码子下游长度为804 bp的非编码区和编码376个氨基酸的1 131 bp的ORF(图1),其中高度保守的RNA识别结构域(RNA recognition motif, RRM)为主要的功能结构域

中国知网 https://www.cnki.net

（Glu^{54}—Val^{126}）。



ATC 为起始密码子；TGA 为终止密码子；阴影部分为 RRM 结构域；ATTAAA 为加尾信号。

ATC is the start codon; TGA is the stop codon; The shaded region is the RRM domain; ATTAAA is the polyadenylate signal.

图 1　*Hmdnd* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced amino acid sequences of *Hmdnd* gene

对大鳍鳜 dnd 蛋白与其他物种同源蛋白序列进行多重比对，结果表明，大鳍鳜与其他物种 dnd 氨基酸序列相似，具有 6 个保守的结构域，其中包括 1 个 N 端结构域（N-terminal region，NR）、1 个高度保守的 RRM 和 4 个 C 端结构域（C-terminal region（CR），CR1～CR 4）（图 2）。大鳍鳜与黄颡鱼 dnd 氨基酸序列的一致性最高（79.24%），与其他硬骨鱼类如大西洋鲑鱼、青鳉、斑马鱼序列的一致性分别为 51.45%，50.00% 和 48.42%；与两栖动物非洲爪蟾序列的一致性为 37.71%；与爬行动物中华鳖和哺乳动物人、鼠、鸡序列的一致性比较低，分别为 37.23%，37.43%，35.59% 和 35.81%。

dnd 蛋白系统进化分析表明，除外类群黑腹果蝇外，脊椎动物 dnd 蛋白主要分为 2 支，一支由硬骨鱼类组成，其中大鳍鳜和黄颡鱼聚在一起，其遗传距离最近；另一支由四足类动物组成（图 3）。

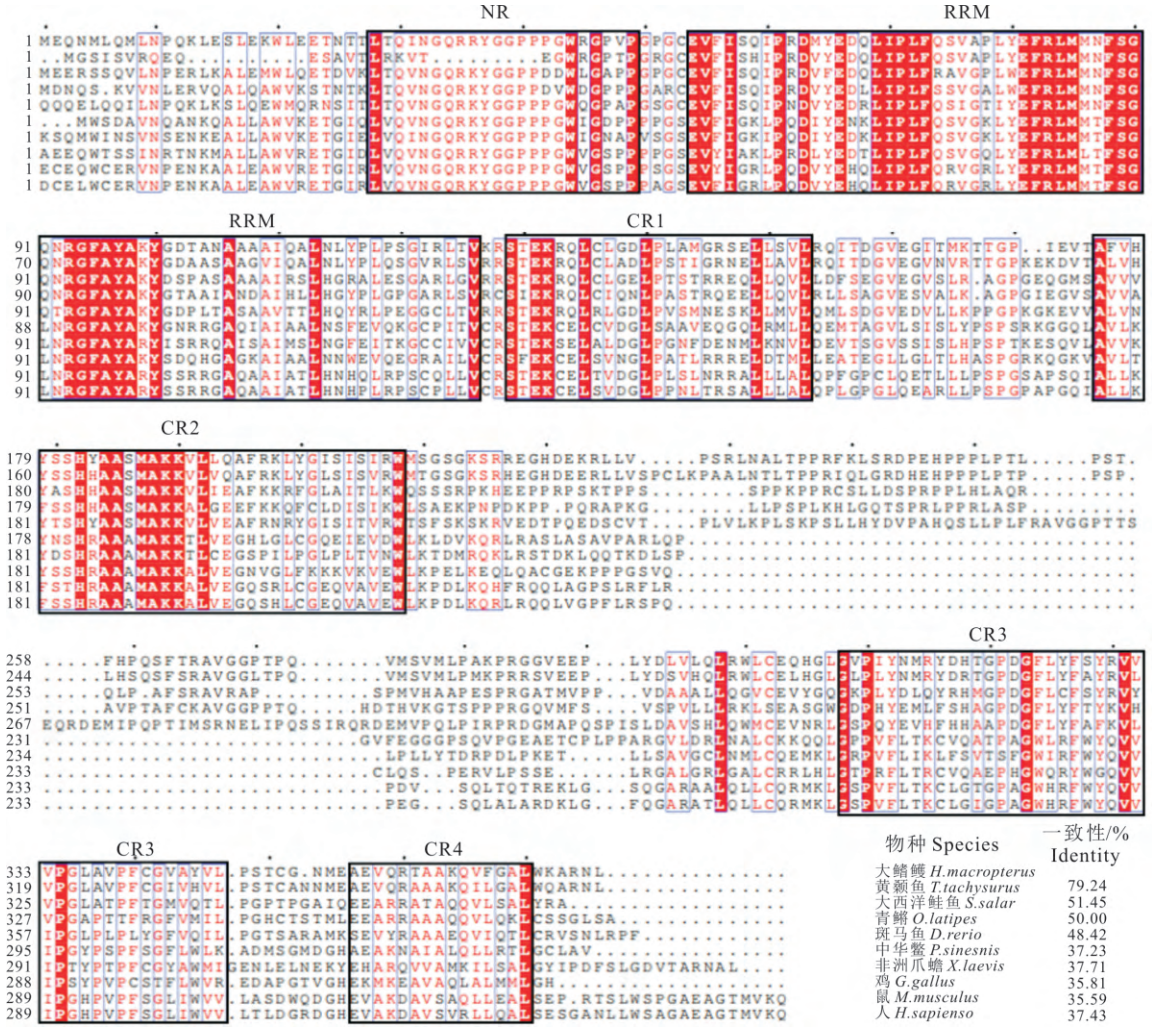
2.2　*Hmdnd* 基因在不同组织和发育时期性腺的表达特征

利用 RT-qPCR 方法检测 1 龄大鳍鳜不同组织中 *Hmdnd* mRNA 表达水平，结果（图 4）显示，*Hmdnd* 仅在精巢和卵巢中表达，且在卵巢的表达量显著高于精巢（$P<0.05$）。

通过石蜡切片确定性腺的发育时期，结果表明，1 龄大鳍鳜卵巢主要由卵黄发生前期的Ⅰ期和Ⅱ期初级卵母细胞组成（图 5-A）；此时，精巢处于有丝分裂时期，主要由精原细胞组成（图 5-D）。2 龄大鳍鳜卵巢主要由卵黄发生期的Ⅲ期初级卵母细胞组成（图 5-B）；此时，精巢处于减数分裂时期，主要由初级精母细胞、次级精母细胞和少量的精子细胞组成（图 5-E）。4 龄大鳍鳜卵巢主要由卵黄成熟期的Ⅳ期初级卵母细胞组成（图 5-C）；此时，精巢处于精子生成时期，主要由精子组成（图 5-F）。RT-

中国知网　https://www.cnki.net

qPCR 检测结果表明,*Hmdnd* 基因在 1 龄大鳍鳗卵黄发生前期的卵巢(图 5-G)和有丝分裂时期的精巢(图 5-H)中的表达量最高,随着配子发生的进行,*Hmdnd* 表达量显著降低(图 5-G 和 H,$P<0.05$)。



方框标示 *dnd* 的保守结构域。NR. N 端结构域;RRM. RNA 识别结构域;CR1~CR4. C 端结构域 1~4。

The box shows the conserved domains of *dnd*. NR. N-terminal domain; RRM. RNA recognition domain; CR1—CR4. C-terminal domain 1—4.

图 2 大鳍鳗与其他脊椎动物 dnd 蛋白序列的多重比对分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment analysis of dnd proteins from *H. macropterus* and other vertebrates

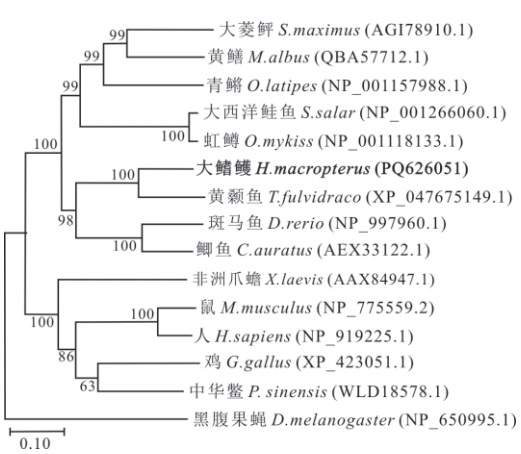
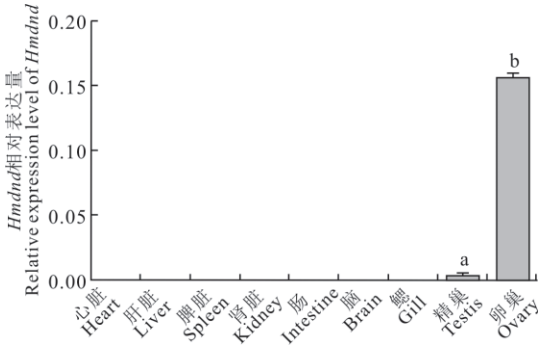


图 3 Hmdnd 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Hmdnd proteins



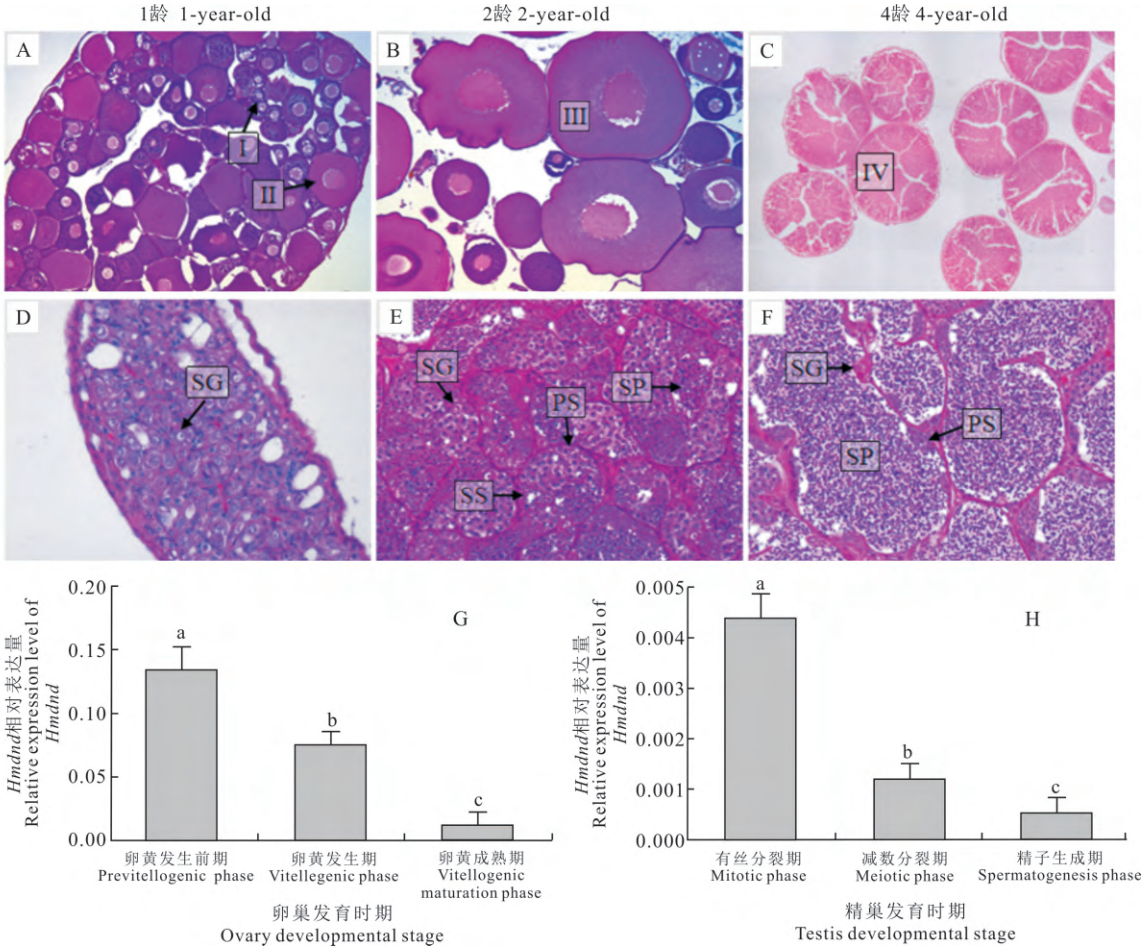
图柱上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下图同。

Bars labeled with different lowercase letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$). The same below.

图 4 *Hmdnd* 基因在 1 龄大鳍鳗不同组织中的表达特征

Fig. 4 Expression characterization of the *Hmdnd* gene in various tissues of 1-year-old *H. macropterus*

中国知网 https://www.cnki.net



A. 卵黄发生前期卵巢（×100）；B. 卵黄发生期卵巢（×100）；C. 卵黄成熟期卵巢（×40）；D. 有丝分裂期精巢（×400）；E. 减数分裂期精巢（×400）；F. 精子生成期精巢（×400）；G. *Hmdnd* 基因在大鳍鱊卵巢中的表达特征；H. *Hmdnd* 基因在大鳍鱊精巢中的表达特征。Ⅰ. Ⅰ期初级卵母细胞；Ⅱ. Ⅱ期初级卵母细胞；Ⅲ. Ⅲ期初级卵母细胞；Ⅳ. Ⅳ期初级卵母细胞；SG. 精原细胞，PS. 初级精母细胞，SS. 次级精母细胞，SP. 精子细胞。下图同。

A. Previtellogenic ovary（×100）；B. Spermiogenic-phase ovary（×100）；C. Mature-vitellogenic ovary（×40）；D. Mitotic-phase testis（×400）；E. Meiotic-phase testis（×400）；F. Spermiogenic-phase testis（×400）；G. Expression of *Hmdnd* gene in ovary of *H. macropterus*；H. Expression of *Hmdnd* gene in testis of *H. macropterus*. Ⅰ. Primary oocyte at stage Ⅰ；Ⅱ. Primary oocyte at stage Ⅱ；Ⅲ. Primary oocyte at stage Ⅲ；Ⅳ. Primary oocyte at stage Ⅳ；SG. Spermatogonia，PS. Primary spermatocyte，SS. Secondary spermatocyte，SP. Spermatids. The same below.

图 5　*Hmdnd* 基因在配子发生过程中的表达特征

Fig. 5　Expression characterization of *Hmdnd* gene druing gametogenesis in *H. macropterus*

2.3　*Hmdnd* mRNA 在性腺中的细胞定位

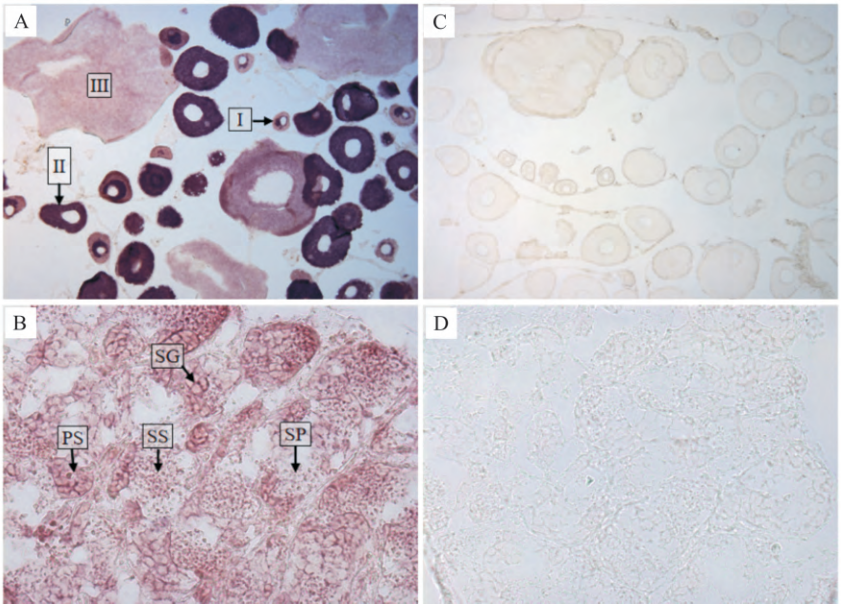
为了进一步了解 *Hmdnd* 基因在性腺的表达特征，利用 RNA 原位杂交技术研究其在 2 龄大鳍鱊卵巢和精巢细胞的定位表达情况。结果显示，*Hmdnd* 主要在生殖细胞的细胞质中表达。卵巢中，*Hmdnd* 在Ⅰ期初级卵母细胞有少量表达，随着初级卵母细胞发育到Ⅱ期，其表达量急剧增加（图 6-A）；然后，当初级卵母细胞发育至Ⅲ期时，*Hmdnd* 表达量恢复到Ⅰ期初级卵母细胞的表达水平。精巢中，*Hmdnd* mRNA 在精原细胞的表达量最高，在初级精母细胞中的表达量次之，而在次级精母细胞和精子细胞中几乎不表达（图 6-B）。*Hmdnd* mRNA 正义探针在卵巢和精巢中均未检测到任何表达信号（图 6-C，D）。

3　讨　论

本研究采用 RACE 克隆方法获得 *Hmdnd* 基因全长 cDNA 序列，通过氨基酸序列比对分析发现，大鳍鱊 dnd 蛋白具有 6 个保守结构域，表明这几个结构域在进化过程中非常保守。dnd 蛋白系统进化分析结果表明，大鳍鱊与同为鲿科鱼类的黄颡鱼首先聚为一支，亲缘关系最近，随后与其他硬骨鱼类聚为一支，这与其形态学上的分类关系相一致[18]。结果表明，*Hmdnd* 基因在进化过程中非常保守。

中国知网　https://www.cnki.net

鱼类 *dnd* 基因的研究表明,*dnd* mRNA 仅在性腺中表达,且在卵巢的表达量高于精巢[19]。在银鲫[9]和中华鲟[12]中,*dnd* 基因在卵巢的表达量大约是精巢的 2 倍。同样地,在斑马鱼[7]、西里伯斯青鳉(*Oryzias celebensis*)[20-21]、星突江鳕(*Platichthys stellatus*)[22]和黄鳝(*Monopterus albus*)[23]中的研究也发现,*dnd* 基因在卵巢的表达量显著高于精巢。本研究中,大鳍鳗 *Hmdnd* 基因在卵巢的表达量远高于精巢,且表达量随着配子发育的推进呈现下降的趋势,在成熟性腺的表达量最低。对太平洋蓝鳍金枪鱼(*Thunnus orientalis*)[24]的研究发现,*dnd* 基因在早期和晚期精巢的表达量较低,在青春期精巢的表达量最高。上述结果表明,虽然鱼类 *dnd* 基因只在性腺中表达,但是不同鱼类间的表达特征存在一定差异。



A. 卵巢中 *Hmdnd* mRNA 反义探针检测结果(×100);B. 精巢中 *Hmdnd* mRNA 反义探针检测结果(×400);
C. 卵巢中 *Hmdnd* mRNA 正义探针检测结果(×100);D. 精巢中 *Hmdnd* mRNA 正义探针检测结果(×400)。
A. The result detected with *Hmdnd* mRNA antisense probe in ovary(×100);B. The result detected with *Hmdnd* mRNA antisense probe in testis(×400);C. The result detected with *Hmdnd* mRNA sense probe in ovary(×100);D. The result detected with *Hmdnd* mRNA sense probe in testis(×400).

图 6 *Hmdnd* 基因在大鳍鳗卵巢和精巢中的细胞定位

Fig. 6 Cellular localization of *Hmdnd* gene in ovary and testis of *H. macropterus*

基因的细胞表达定位对于了解基因的功能至关重要。目前,通过 RNA 原位杂交研究发现,鱼类 *dnd* 基因主要在生殖细胞的细胞质中表达。对稀有鮈鲫[8]、异育银鲫[9]、中华鲟[12]、西里伯斯青鳉[20]和大西洋牙鲆(*Paralichthys dentatus*)[25]的研究表明,*dnd* mRNA 在卵巢卵原细胞和Ⅰ期初级卵母细胞中弱表达,在Ⅱ期初级卵母细胞中强表达,之后随着卵子的发生逐渐减弱。在精巢中,多数鱼类的 *dnd* mRNA 在精原细胞中的表达最强,在初级精母细胞和次级精母细胞中次之,在精子细胞和精子中不表达[8-9,12,20]。本研究中,大鳍鳗 *Hmdnd* 基因也在性腺的生殖细胞中特异表达,且其动态表达趋势与上述鱼类的研究结果相类似。然而,在中华鳖中,*dnd* 在初级和次级精母细胞中表达最强,在精原细胞中减弱,在精子细胞中不表达[13]。这可能是由于中华鳖属于爬行动物,与鱼类的亲缘关系相对较远,在进化过程中,*dnd* mRNA 的表达特征发生了变化。总体而言,*dnd* 基因为生殖细胞特异表达基因,其在生殖细胞的发育过程中起着重要作用。

本研究结果表明,大鳍鳗 *Hmdnd* 基因在生殖细胞中特异性表达,在配子发生过程中其表达水平呈现动态变化特征,说明其在生殖细胞的发育过程中发挥重要作用,但其具体作用机制有待通过基因编辑技术来进一步阐明。

[参考文献]

[1] XU H Y, LI M Y, GUI J F, et al. Fish germ cells[J]. Science China Life Sciences, 2010, 53(4): 435-446.

[2] 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.

中国知网 https://www.cnki.net

[3] RUTHIG V A, YOKONISHI T, FRIEDERSDORF M B, et al. A transgenic DND1GFP fusion allele reports *in vivo* expression and RNA-binding targets in undifferentiated mouse germ cells[J]. Biology of Reproduction, 2021, 104(4): 861-874.

[4] 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.

[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] 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.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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*)[J]. Theriogenology, 2013, 80(6): 665-672.

[12] 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.

[13] 陈凯利，李玉林，班文卓，等. 中华鳖 dnd 基因克隆及在生殖细胞中的表达[J]. 水产学报，2023，47(5)：65-74.
CHEN K L, LI Y L, BAN W Z, et al. Cloning of dead end (dnd) gene in Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus* sinensis) and its expression in germ cells[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(5): 65-74.

[14] 周仰璟. 大鳍鱎的生物学资料[J]. 动物学杂志，1983，18(2)：39-42.
ZHOU Y J. Biological data of largefin longbarbel catfish (*Hemibagrus macropterus*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 1983, 18(2): 39-42.

[15] 王德寿，罗泉笙. 大鳍鱎的繁殖生物学研究[J]. 水产学报，1992，16(1)：50-59.
WANG D S, LUO Q S. Aspects of the reproductive biology of the Bagridae catfish *Mystus macropterus* in the Jia Ling river[J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16(1): 50-59.

[16] 李晓莉，朱永久，杨德国，等. 大鳍鱎人工繁殖研究进展及前景展望[J]. 水产科技情报，2023，50(2)：128-132.
LI X L, ZHU Y J, YANG D G, et al. Research progress and prospect of artificial propagation of *Mystus macropterus*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2023, 50(2): 128-132.

[17] 陈思奇，朱永久，吴兴兵，等. 大鳍鱎胚胎及仔稚鱼发育观察[J]. 南方水产科学，2023，19(6)：60-70.
CHEN S Q, ZHU Y J, WU X B, et al. Morphological development of embryos and larvae of *Mystus macropterus*[J]. South China Fisheries Science, 2023, 19(6): 60-70.

[18] 刘红艳，熊飞，翟东东，等. 鲿科鱼类 DNA 条形码鉴定及系统进化研究[J]. 水产科学，2023，42(4)：575-584.
LIU H Y, XIONG F, ZHAI D D, et al. DNA barcode for species identification and phylogenetic relationship of Bagridae fish[J]. Fisheries Science, 2023, 42(4): 575-584.

[19] HAYASHIDA T, HIGUCHI K, OKITA K, et al. Expression of the dead end gene during embryogenesis and its role in primordial germ cell development in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel)[J]. Aquaculture Research, 2022, 53(10): 3872-3876.

[20] 朱天彧. 西里伯斯青鳉(*Oryzias celebensis*)生殖细胞标记基因 dnd 和 vasa 的表达模式和功能研究[D]. 上海：上海海洋大学，2019.
ZHU T Y. Expression pattern and function analysis of germ cell marker gene *dnd/vasa* in *Oryzias Celebensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.

[21] 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.

[22] YOON J H, CHO Y S, LEE H B, et al. Dead-end (*dnd*) gene cloning and gonad-specific expression pattern in starry flounder (*Platichthys stellatus*)[J]. Animals, 2021, 11(8): 2256.

[23] HU Q M, XIAO Q, TIAN H F, et al. Crucial role of dead end gene for primordial germ cell survival in rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. Theriogenology, 2021, 176: 188-193.

[24] 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[J]. Molecular Reproduction and Development, 2013, 80(10): 871-880.

[25] DU S R, ZHOU L, WANG X Y, et al. Characterization of vasa and dnd homologs in summer flounder, *Paralichthys dentatus*: expression analysis and colocalization of PGCs during embryogenesis[J]. Theriogenology, 2022, 181: 180-189.

（责任编辑：马秋明）

中国知网 https://www.cnki.net