

中华鳖 *boule* 基因在生殖细胞中的表达分析

刘晓莉^① 唐舟凯^{①②} 张飘逸^① 朱新平^① 储张杰^② 李伟^①
吴栩灵^① 徐红艳^{①*}

① 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室 广州 510380;

② 浙江海洋大学水产学院 舟山 316000

摘要: *boule* 基因为 *DAZ* 基因家族成员之一, 是动物生殖细胞特异表达基因。在哺乳动物中, *boule* 基因的缺失会引起精子生成障碍而导致雄性不育。在无脊椎动物秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中, *boule* 基因同源物的缺失会引起其卵子发生障碍而导致雌性不育。龟鳖动物是最古老的爬行类, 是从无羊膜卵到羊膜卵动物飞跃的过渡物种。相比于哺乳类及一些无脊椎动物, 目前关于龟鳖动物生殖细胞发育模式的研究还非常有限。因此, 本文以中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 为研究对象, 以期揭示 *boule* 基因对龟鳖动物生殖细胞发育分化的调控作用。首先, 利用特异引物克隆获得中华鳖 *boule* 基因的 cDNA 序列, 共 1 005 bp, 其中, 3'端非编码区 57 bp, 开放阅读框 948 bp, 共编码 315 个氨基酸。氨基酸序列多重比对分析显示, 中华鳖与绿海龟 (*Chelonia mydas*) 同源性最高, 达 92%, 与小鼠 (*Mus musculus*) 的同源性达 83%, 与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的同源性达 53%, 与青鳉 (*Oryzias latipes*) 的同源性达 42%。反转录实时定量 PCR (RT-qPCR) 分析结果显示, 中华鳖 *boule* mRNA 主要在性腺组织精巢和卵巢中表达, 而在其他体细胞组织中几乎检测不到表达。原位杂交结果显示, 中华鳖 *boule* mRNA 在两性生殖细胞中特异表达, 且在不同分化时期的生殖细胞中呈动态表达。在精巢中, *boule* 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表达较弱, 在精子细胞和精子中难以检测到表达信号; 在卵巢中, *boule* mRNA 在初级卵母细胞中表达信号最强且信号在初级卵母细胞胞质中均匀分布, 生殖细胞发育进入卵母细胞生长期后, 信号开始聚集在核周胞质, 随着卵母细胞的成熟, 信号逐渐变弱。本研究结果表明, *boule* 基因可能在中华鳖两性生殖细胞的减数分裂过程中均具有重要的调控作用。

关键词: 中华鳖; *boule*; 生殖细胞; 精子发生; 卵子发生

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 01-66-10

The Expression Profile of *boule* Gene in Germ Cells of the Chinese Soft-shell Turtle (*Pelodiscus sinensis*)

LIU Xiao-Li^① TANG Zhou-Kai^{①②} ZHANG Piao-Yi^① ZHU Xin-Ping^① CHU Zhang-Jie^②
LI Wei^① WU Xu-Ling^① XU Hong-Yan^{①*}

基金项目 广东省科技计划项目 (No. 2016A050502029), 社会公益研究项目 (No. 9180238);

* 通讯作者, E-mail: xuhyzqh@163.com;

第一作者介绍 刘晓莉, 女, 助理研究员; 研究方向: 水产种质资源与遗传育种; E-mail: liu_xiaoli1988@126.com.

收稿日期: 2018-08-13, 修回日期: 2018-11-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201901009

① Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation of Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380; ② Fishery School of Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China

Abstract: *Boule* gene, one of the *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*) gene family members, is specifically expressed in animal germ cells. In mammals, the *boule* null caused spermatogenic failure, leading to male infertility, while the loss of *boule* in invertebrate, such as *Caenorhabditis elegans* resulted in female sterility due to a failure of oogenesis. Turtles are considered as a link between the high and low vertebrates, however, the molecular mechanisms behind germ cell development in reptile including turtles remain largely unclear. In this study, we used the Chinese Soft-shell Turtle (*Pelodiscus sinensis*) as a model to reveal the mechanisms under germ cell differentiation in turtles. Firstly, we cloned a turtle *boule* cDNA fragment of 1 005 bp, containing a 3' untranslated region (UTR) of 57 bp and an open reading frame (ORF) of 948 bp, encoding 315 amino acid residues (Fig. 1). The predicted turtle *Boule* is maximally 92% identical to that of *Chelonia mydas*, 83% to that of mouse, 53% to that of *Drosophila melanogaster* and 42% to that of *Oryzias latipes* (Fig. 2). The reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) showed that *boule* transcript of *P. sinensis* was abundantly expressed in adult ovary and testis but barely in all the somatic tissues examined in this study (Fig. 4). Chemical *in situ* hybridization revealed that the *boule* mRNA of *P. sinensis* was exclusively expressed in germ cells but absent in somatic cells, and displayed dynamic expression patterns in germ cells during gametogenesis (Fig. 5 & 6). In testis, the *boule* mRNA signals were strongly dispersed in cytoplasm of primary spermatocytes and weakly in spermatogonia and secondary spermatocyte, hardly detected in spermatids and spermatozoa (Fig. 5). In ovary, the *boule* mRNA signals were strongly dispersed in cytoplasm of oocytes at early stages. Subsequently, the signals were concentrated in the perinuclear area of growing oocytes and weakened gradually with the growth of oocytes (Fig. 6). Therefore, our findings indicated that *boule* gene might play an important role in germ cell meiosis in *Pelodiscus sinensis*, which shed new insight into understanding the functions of *boule* gene during germ cell differentiation in vertebrates.

Key words: Chinese Soft-shell Turtle, *Pelodiscus sinensis*; *boule*; Germ cell; Spermatogenesis; Oogenesis

boule 基因是动物生殖细胞特异表达基因，与脊椎动物 *dazl* 基因、灵长类 *daz* 基因同属于 *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*) 基因家族 (Xu et al. 2001)，在动物生殖细胞的发育和分化过程中起重要作用 (Li et al. 2011, Ye et al. 2015)。其编码的 RNA 结合蛋白具有高度保守的 RNA 识别域和独特的 *DAZ* 结构域，是 *DAZ* 基因家族中进化最为保守的成员，被认为是该家族的始祖基因 (Xu et al. 2003, Tung et al. 2006)。*boule* 及其同源基因广泛存在于无脊椎动物如果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (Eberhart et al. 1996)、秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*)

(Karashima et al. 2000)，哺乳类如人 (*Homo sapiens*) (Xu et al. 2001)、小鼠 (*Mus musculus*) (Vangompel et al. 2010)，鸟类如鸡 (*Gallus gallus*) (Shah et al. 2010) 及鱼类如青鳉 (*Oryzias latipes*) (Xu et al. 2009)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (Li et al. 2011)、中华鲟 (*Acipenser sinensis*) (Ye et al. 2015) 等物种中，且 *boule* 基因在大多数已有报道的动物中均为生殖细胞特异表达，是动物配子发生过程中不可缺少的调控因子。在无脊椎动物秀丽线虫中，*boule* 基因的同源物 *daz-1* 仅在卵巢组织中表达，是线虫雌性生殖系统发育的必需因子，*daz-1* 基因

缺失会使得雌雄同体的虫体卵子发生障碍造成雌性不育 (Otori et al. 2006)。在果蝇中, *boule* 基因在雄性生殖细胞发育的晚期开始表达, 首先出现在精母细胞的核周区域, 并且在减数分裂初期就从细胞核转移到细胞质, 将 *boule* 基因敲除后, 果蝇的精巢无精子产生, 而将 *boule* 基因的正常拷贝插入到有减数分裂缺陷果蝇中, 果蝇精巢中又有精子的出现 (Eberhart et al. 1996)。精子发生异常患者的男性睾丸组织中, *boule* 基因表达降低或缺乏, 使得精子发生停留在初级精母细胞阶段, 减数分裂阻滞患者睾丸组织中 *boule* 基因完全不表达 (Lin et al. 2005)。区别于秀丽线虫、果蝇及哺乳动物中 *boule* 基因的单性表达模式, 在青鳉 (Xu et al. 2009) 及尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) (Dwarakanath et al. 2014) 等鱼类中, *boule* 基因在两性配子发生过程中均有表达, 且呈现时空动态模式。龟鳖动物是最古老的爬行类, 是从无羊膜卵到羊膜卵动物飞跃的过渡物种 (Shine 2013), 然而目前爬行类包括龟鳖动物生殖细胞发育分化过程中的分子调控机制尚不清楚。因此, 对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) *boule* 基因的表达分析能为进一步进行脊椎动物生殖细胞发育方式演化及遗传基础的系统深入研究奠定一定的理论基础。

中华鳖隶属龟鳖目 (Testudinata) 鳖科 (Trionychidae) 中华鳖属 (*Pelodiscus*)。近年来由于对龟鳖物种的过度捕捞使得大量龟鳖野生种群濒临灭绝, 养殖产业也面临种质退化等问题。因此, 在龟鳖动物中进行生殖细胞发育分化机制的研究对于龟鳖动物种质资源的保护有重要意义。本研究克隆了中华鳖 *boule* 基因 cDNA 序列, 通过反转录实时定量 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 方法分析了中华鳖 *boule* 转录本表达的组织特异性, 对比了中华鳖 *boule* 转录本在两性生殖细胞发生过程中的表达。本研究结果不仅可以为揭示爬行动物生殖细胞发育机制提供基础资料, 也为今后进行龟鳖动物细胞工

程育种的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用中华鳖均采自广东省惠州市财兴实业有限公司中华鳖养殖场, 于 2016 年 7 月随机选取 2 冬龄体表完好健康的雌雄中华鳖各 5 只。麻醉放血, 取心、肝、脾、肾、脑、卵巢和精巢组织, 浸入 TriPure isolation Reagent (Trizol, 赛默飞世尔科技公司, 广州) 中, 置于 -80 °C 冰箱保存, 用于 RNA 提取; 另取一部分性腺组织浸入 4% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA, 索莱宝科技有限公司, 北京) 中固定, 然后用梯度甲醇脱水处理并置于 -20 °C 冰箱保存, 用于切片制备。

1.2 中华鳖 *boule* 基因 cDNA 克隆

1.2.1 RNA 提取与 cDNA 合成 Trizol 法提取采集组织样品总 RNA 并用 DNA 酶 I (威佳科技有限公司, 广州) 去除基因组 DNA 污染。琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, NanoQTM 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。使用 SuperScript®Frist-Strand Synthesis System 试剂盒 (Invitrogen) 进行第一链 cDNA 的合成。

1.2.2 *boule* 基因 cDNA 克隆 根据 NCBI 公共数据库已有的中华鳖 *boule* 基因序列 (XM_006133258.2), 设计了特异性上下游引物 PsbouleF1 和 PsbouleR1 (表 1)。以性腺组织 (精巢和卵巢) 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers and their sequences used in this experiment

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
PsbouleF1	ATGTGTGAGTGCAGAAACCCAGAAGC
PsbouleR1	ATCAACAGGTGTTGGGCAATGGGCTATTCCG
PsbouleF2	GTCTCCATCCCCAACACC
PsbouleR2	TCTTCACTTCTTTCACACACCCA
β-actinF	CTACTGCTGCTTCATCATCTCC
β-actinR	TTGGCATAACAGGTCCTTTCCG

反应条件如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的条带, 连接至 pMD19-T 载体 (TaKaRa) 后, 通过 DH5 α 感受态细胞转化、克隆筛选, 获得的阳性克隆由上海生工生物技术有限公司测序。

1.2.3 *boule* 基因序列分析 使用 primer5 软件预测氨基酸序列, 使用 Vector NTI Advance 11 进行多重氨基酸序列比对。利用 NCBI 数据库中的 BLASTN 软件及 BLASTP 软件分别对核苷酸序列及氨基酸序列进行比对。使用 MEGA6 软件, 按邻近法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统进化树, 树中各节点置信度的检验采用自举法 (Bootstrap) (Felsenstein 1985) 检验 1 000 次。

1.3 组织特异性分析

根据测序所得中华鳖 *boule* cDNA 序列设计特异性上下游引物 PsbouleF2 和 PsbouleR2 (表 1), 以中华鳖 β -actin 为内参基因, 设计上下游引物 β -actinF 和 β -actinR (表 1)。以成体中华鳖卵巢、精巢、心、肝、脾、肾、脑组织提取总 RNA 并转录合成的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR, 每组样品至少重复检测 3 次。使用 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems 进行扩增反应, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法来计算相对表达量。反应条件如下: 50 °C 2 min, 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 溶解曲线程序: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 95 °C 15 s。显著性分析采用 SPSS 统计分析软件 Duncan's 法进行多重比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

1.4 细胞定位分析

1.4.1 RNA 探针制备 使用 *Apa* I 和 *Sac* II 限制性内切酶分别线性化含中华鳖 *boule* cDNA 片段的质粒, 酶切产物进行切胶回收, 使用 SP6/T7 Enzyme Mix (Invitrogen) digoxigenin (DIG) RNA Labeling 试剂盒 (Roche) 并依照试剂盒说明书合成正 (检测目标信号)、反义

探针 (阴性对照), 并用 LiCl (Invitrogen) 沉淀法纯化探针备用。

1.4.2 化学显色法原位杂交分析 将多聚甲醛固定并脱水保存的组织样品复水处理后, 用 30% 蔗糖溶液浸泡过夜, 次日使用 OCT Compound (SAKURA) 包埋, 用 Leica 冷冻切片机 (CM1950) 进行切片, 切片厚度 4~8 μ m。

原位杂交具体操作步骤参照文献方法 (Xu et al. 2005)。使用 BCIP/NBT 显色液 (Roche) 对探针信号进行显色, 碘化丙啶 (propidium iodide, PI, Life) 染细胞核, 抗淬灭封片剂 (Invitrogen) 封片。使用 leica 正置显微镜成像系统进行观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 中华鳖 *boule* cDNA 序列克隆及分析

本研究通过 PCR 克隆获得了长度为 1 005 bp 的中华鳖 *boule* cDNA 序列, 该序列与 NCBI 数据库已有的中华鳖 *boule* 序列 (XM_006117957.1) 的一致性达 95%, 其中包括 3'端的非编码区 57 bp 以及开放阅读框 948 bp, 共编码 315 个氨基酸, 其中包含一个保守的 RNA 识别域 (RNA recognition motif, RRM) 和一个 DAZ 结构域 (图 1), 我们将该 cDNA 序列命名为 *Psboule*。

Boule 氨基酸序列比对分析显示, 中华鳖氨基酸序列与和绿海龟 (*Chelonia mydas*) 的同源性最高, 达 92%, 与短吻鳄 (*Alligator mississippiensis*) 和鸡 (*Gallus gallus*) 的同源性分别为 88% 和 77%, 与哺乳动物小鼠 (*Mus musculus*) 和人 (*Homo sapiens*) 的同源性分别为 83% 和 82%, 与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、金目鲈 (*Lates calcarifer*) 及青鳉 (*Oryzias latipes*) 等鱼类的同源性在 42% 至 58% 之间; 与果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的同源性为 53% (图 2)。邻接系统进化树显示, 中华鳖 *Boule* 属于 DAZ 家族, 进化地位上其处于鱼类与哺乳类之间, 与哺乳类同源性较高, 与鱼类同源性较低, 与无脊椎动物同源性也能达到 50% 以上

```

1      ATGTTGTGAGTGCAGAAACCCAGAAGCACACAGGGAATGGAGGAGCAGCCAGCAGCTTTGTGCTGCCTTCTCCTGCTACTCCAGGCCTGGA
1      M C E C R N P E A H R E W R S S Q Q L C A A F S C Y S R P G
91     AATAAGAAACCAACCTCTACCCAGCTGCAGTACTGGTGGCGCCCAGGGTTAGTAACTCACTCTGGGGAGCAAACCCAGATCAGACA
31     N K K P T S T Q L Q L L V A P Q G L V T H S G E Q T T D Q T
181    CAAAAAGAATCTTGTCTCCATCCCCAACACCGTATCACCTGTGCCTTAAATAATCCGACGAGTGCCCAAGATTTGGAACAATTATT
61     Q K E S L S P S P N T V S P V P L N N P T S A P R F G T I I
271    CCTAATCGCATCTTTGTAGGAGGAATCGATTTAAGACTAATGAAAATGACCTAAGGAAATTTTTGCCAGTATGGGTGTGTGAAAGAA
91     P N R I F V G G I D F K T N E N D L R K F F A Q Y G C V K E
361    GTGAAGATAGTGAATGACAGAGCTGGAGTATCAAAGGGTATGGTTTCATTACATTGAAACTCAAGAAGATGCACAAAAAATTTACAA
121    V K I V N D R A G V S K G Y G F I T F E T Q E D A Q K I L Q
451    GAGGCTGAAAACTTAATTATAAGGATAAGAACTGAATATTGGTCCAGCAATAAGAAAGCAACAAGTAGGATTCCTCGATCTAGCATA
151    E A E K L N Y K D K K L N I G P A I R K Q Q V G I P R S S I
541    ATGCCAGCAGCCGGAACAATGTAAGTACTTGACCACTTCAACTGGATATCCTTACACTTATCACAATGGAGTAGCTTATTTTCATACTCCTGAA
181    M P A A G T M Y L T T S T G Y P Y T Y H N G V A Y F H T P E
631    GTTGCATCTGTCCACAGCCATGGCCTTACGCTCCATTTCCAGTTCCTGTAATGGTAGCTCAACCTGTTTATCATCAACCTGCATAT
211    V A S V P Q P W P S R S I S S S P V M V A Q P V Y H Q P A Y
721    CCTTACCAGCACCTCCACAGTGTCTTTCAGGGCAGTGGCAATGGAGTATCCACAGTCTCCTGCCTTCAACCTCATTCTTTTATCTG
241    P Y Q A P P Q C L S G Q W Q W S I P Q S P A S S T S F F Y L
811    CACCCTTCTGAAGTTATTTATCAGCCATTAGAAAATTGCACAGGGACAGTGGATGTGTACCCTCCTCCTTCTCTCTAATGAAAGCTG
271    H P S E V I Y Q P L E N C T G T V D V Y P P P F L S N G K L
901    CAATTTCCAGAGCCATATTCTGATCATGGCAGTTTCAAAGCAGCAATAATCAATCAAGTTTTATGCACAGAAGTGCGAATAGCCATTGC
301    Q F P E P Y S D H G S F K A A *
991    CCAACACCTGTTGAT
    
```

图 1 中华鳖 *boule* cDNA 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1 *boule* cDNA and its deduced amino acid sequence of the Chinese soft-shell turtle

黑色阴影部分的 ATG 和 TAA 分别为起始密码子和终止密码子；灰色阴影部分为 RNA 识别基序 (RRM)；下划线部分为 DAZ 重复基序。
The translation start codon “ATG” and stop codon “TAA” are shown in black shadows, RNA recognition motif (RRM) is highlighted in grey shadow, DAZ repeat is underlined.

(图 3)。

2.2 中华鳖 *boule* mRNA 的组织特异性表达

本研究选用中华鳖 *β-actin* 基因为内参基因，通过实时定量 PCR 进行 *boule* 基因的组织表达分析。相对表达量计算结果显示，中华鳖 *boule* mRNA 在心、脑、肝、脾、肾等 5 种体细胞组织中表达极低，而在卵巢和精巢组织中表达量极显著高于上述 5 种组织 ($P < 0.01$)。且 *boule* 基因在精巢中的表达量极显著地高于卵巢组织 ($P < 0.01$) (图 4)。

2.3 中华鳖 *boule* mRNA 在精子发生过程中的表达分布

化学显色法原位杂交结果显示，中华鳖 *boule* mRNA 信号在精巢的体细胞中几乎检测不到，主要在生殖细胞中表达，并且在精子发生过程中呈动态的表达。在 2 龄精巢中，中华

鳖 *boule* 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表达较弱，在精子细胞中难以检测到表达信号 (图 5)。

2.4 中华鳖 *boule* mRNA 在卵子发生过程中的表达分布

化学显色法原位杂交结果显示，中华鳖 *boule* mRNA 在卵巢组织的体细胞中检测不到表达，而在生殖细胞中特异表达，并且在卵子发生过程中呈动态的表达模式。中华鳖 *boule* mRNA 在早期初级卵母细胞中表达信号最强，信号在整个初级卵母细胞胞质中均匀分布，卵母细胞发育进入生长期后，信号开始聚集在细胞核周区域，随着生长期卵母细胞的长大成熟，信号逐渐变弱 (图 6)。相对于中华鳖 *boule* mRNA 在精巢中的高表达量 (图 5)，其在卵巢组织中的表达信号较弱。

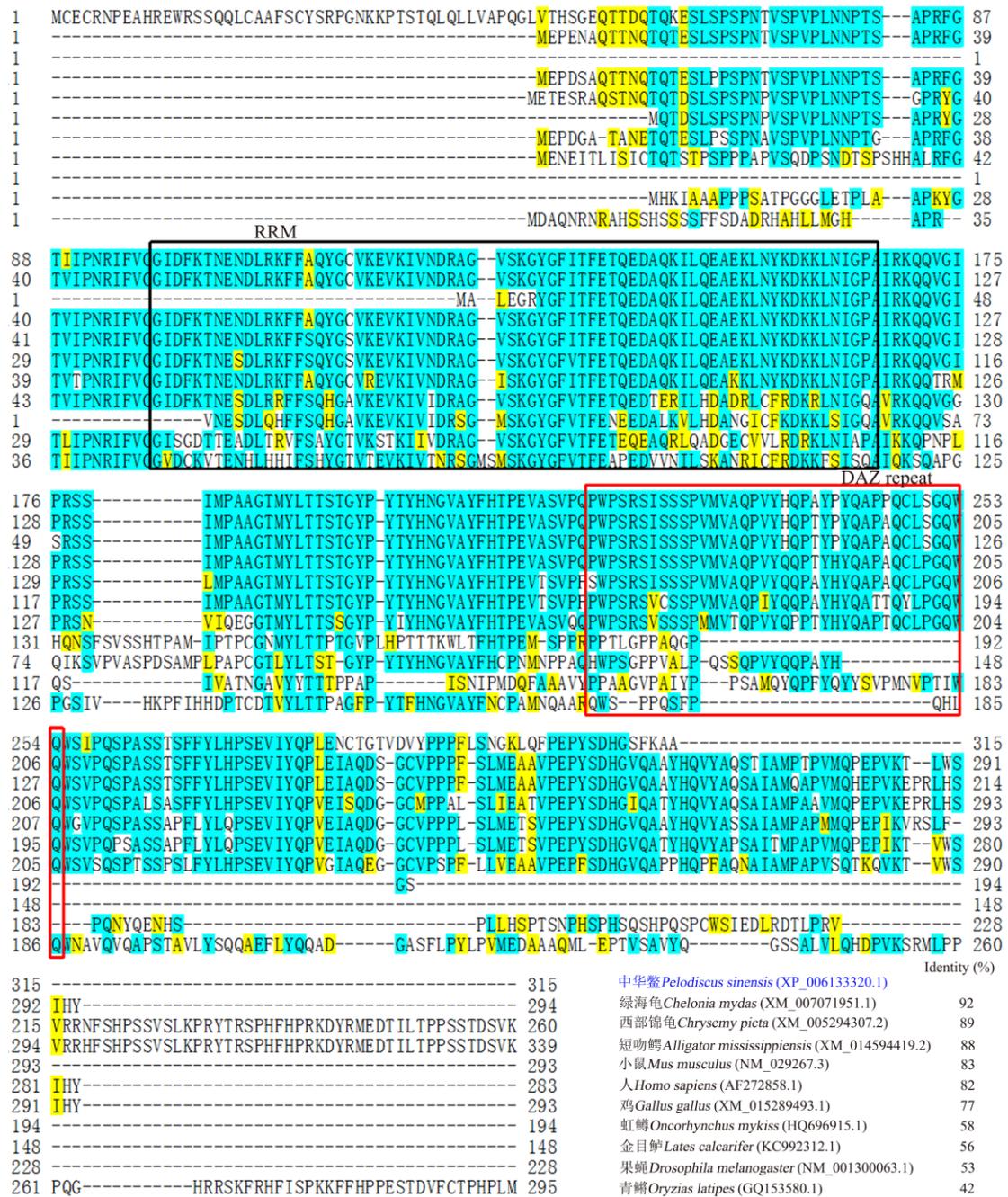


图 2 Boule 氨基酸同源序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of Boule amino acids

所有氨基酸序列来自于 NCBI 数据库。绿色表示氨基酸序列相似性达 80% 以上位点；黄色表示变异位点；黑色方框表示 RNA 识别域；红色方框表示 DAZ 结构域。序列末尾为各行序列的物种名和各序列与中华鳖序列的同源性百分比。

All amino acid sequences are retrieved from NCBI database. Identity of positions of shared residues higher than 80% are highlighted with green shadow, and variable residues are shown in yellow shadow. The RNA recognition motif (RRM) is shown in black frame, DAZ repeat is shown in red frame. The species names and percentage identity values of the *PsBoule* to its homologs are shown at the end of the alignment.

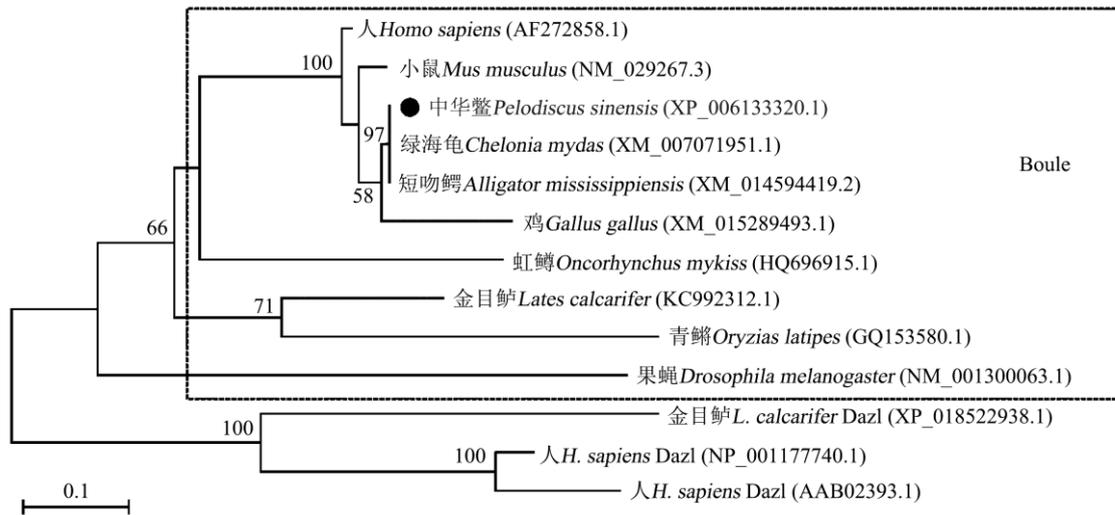


图 3 基于邻接法构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed through the neighbor-joining method

所有氨基酸序列来自于 NCBI 数据库。支持率超过 50% 的值在节点旁显示，比例尺代表每个位点的氨基酸平均替换值为 0.1。

All amino acid sequences are retrieved from NCBI database. The bootstrap values (> 50%) are given at each node. The scale bar represents the average number of amino acid substitutions per site is 0.1.

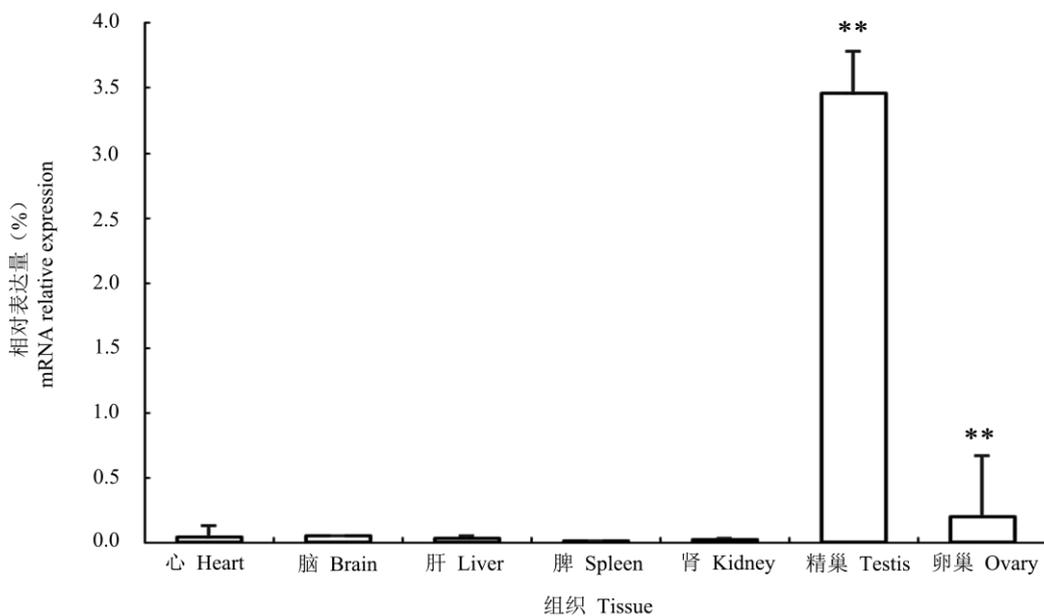


图 4 *boule* 基因转录本的组织特异性表达

Fig. 4 The mRNA expression of *boule* in multiple tissues

** $P < 0.01$ 。

3 讨论

本研究从中华鳖性腺组织中克隆获得了中

华鳖 *boule* cDNA 序列 (图 1)，比对结果显示该序列与 NCBI 数据库已有的中华鳖 *boule* 序

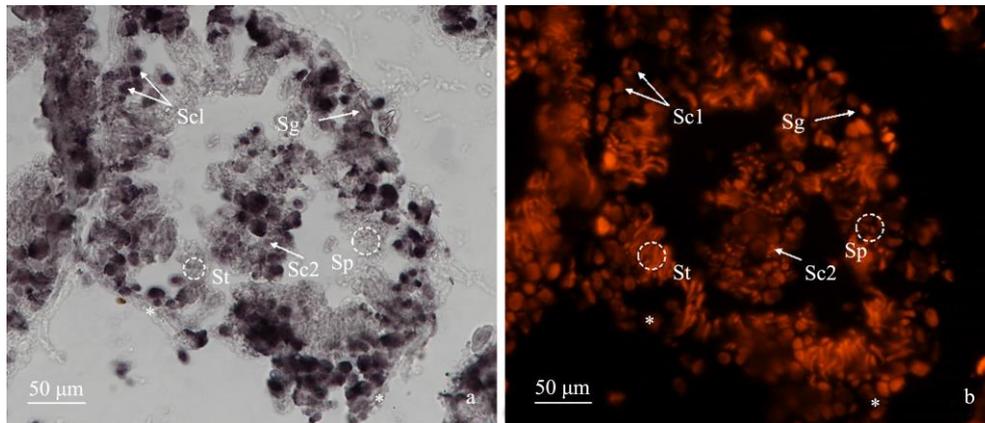


图 5 *boule* 转录本在精巢中的表达

Fig. 5 The *boule* mRNA expression in testis

对 2 龄精巢切片进行化学显色法原位杂交检测。a. 使用碱性磷酸酶 (AP) 显色, 信号为暗紫色; b. 细胞核用碘化丙啶染色 (红色)。

Testicular cryosections of 2 years old testis were hybridized with RNA probes. a. The signals were developed by alkaline phosphatase (AP) staining (purple); b. Nucleus was stained with PI (red).

Sc1. 初级精母细胞; Sc2. 次级精母细胞; Sg. 精原细胞; Sp. 精子; St. 精子细胞; *. 体细胞。

Sc1. Primary spermatocyte; Sc2. Secondary spermatocyte; Sg. Spermatogonia; Sp. Sperm; St. Spermatids; *. Somatic cells.

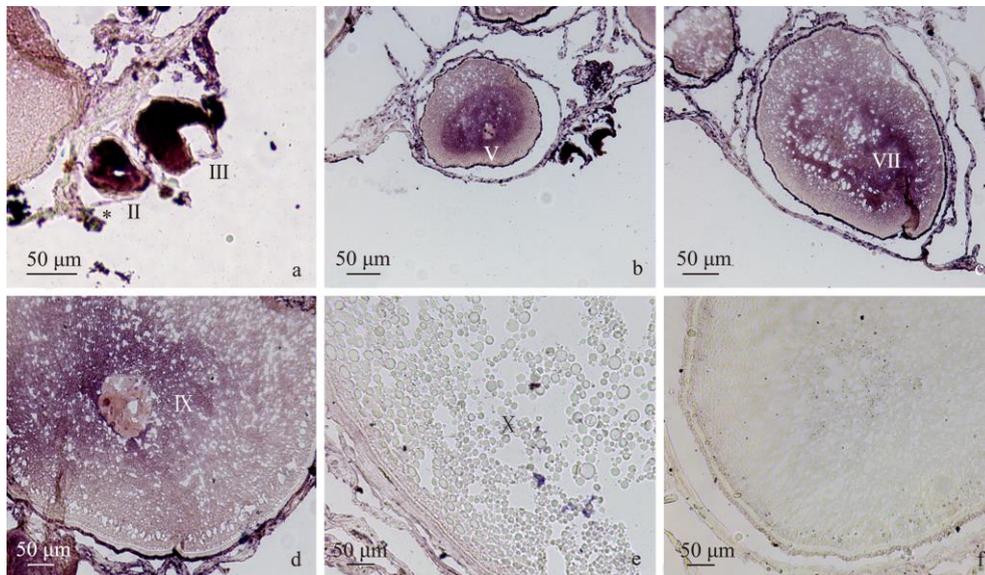


图 6 *boule* 转录本在卵巢中的表达

Fig. 6 The *boule* mRNA expression in ovary

各发育时期卵母细胞进行化学显色法原位杂交。a~e. 碱性磷酸酶 (AP) 显色, 信号为暗紫色; f. 反义探针杂交显色作为阴性对照, 无信号。

Chemical *in situ* hybridization in oocytes at different developmental stages. a - e. The signals were developed by alkaline phosphatase (AP) staining (purple); f. No signal was detected by antisense probe.

II、III、V. 初级卵母细胞期; VII. 生长期卵母细胞; IX. 生长期卵母细胞; X. 成熟期卵母细胞; *. 体细胞。

II, III, V. Primary oocytes; VII. Growing oocytes; IX. Growing oocytes; X. Mature oocytes; *. Somatic cells.

列(XM_006117957.1)一致性达 95%，编码的蛋白共含 315 个氨基酸，具有 DAZ 家族蛋白高度保守的 RNA 识别域和 DAZ 结构域，与其他物种 Boule 蛋白具有高度同源性，属于 DAZ 家族中的 Boule 蛋白一支(图 2)，因此将其命名为中华鳖 Boule (PsBoule)。邻接系统进化树分析结果也显示，中华鳖 Boule 位于 Boule 蛋白一支中(图 3)，与 *Dazl* 蛋白、*Daz* 分化较为明显，其分支顺序与其他报道中关于 DAZ 家族起源的分析结果相似(Xu et al. 2009)，且中华鳖 Boule 进化地位介于鱼类与哺乳类之间。

在已报道过的绝大多数物种中，*boule* 基因均为动物生殖细胞中特异表达(Xu et al. 2009, Vangompel et al. 2010, Li et al. 2011, Dwarakanath et al. 2014)，且分布在动物生殖细胞的细胞质中。本研究中，中华鳖 *boule* mRNA 在中华鳖心、脑、肝、脾、肾等体细胞组织中几乎检测不到有表达，而在精巢和卵巢组织中表达量较高(图 4)。在哺乳动物如小鼠的睾丸组织中，*boule* 基因在精原细胞期开始表达，在初级精母细胞和次级精母细胞中表达最强，信号持续到圆形精子细胞中(Xu et al. 2001)。敲除了 *boule* 基因的小鼠，其减数分裂并未受影响，且可以观察到单倍体次级精母细胞，然而，单倍体次级精母细胞除第 6 阶段外均未发育，表明 *boule* 基因的主要作用为促进次级精母细胞向成熟精子分化(Vangompel et al. 2010)。中华鳖 *boule* mRNA 在中华鳖精子发生过程中的表达模式与小鼠 *boule* 表达模式较为相似，在 2 龄精巢中，中华鳖 *boule* mRNA 在初级精母细胞中表达最强，精原细胞和次级精母细胞中表达较弱，精子细胞中没有检测到表达信号(图 5)。而在鱼类如金目鲈中，*boule* mRNA 在除精子外的各个阶段生殖细胞中均有表达信号(Dwarakanath et al. 2014)。在青鲮中，*boule* mRNA 在减数分裂前后均有表达，在精原细胞中最弱，在精母细胞中最强，在精子中较强(Xu et al. 2009)。因此，中华鳖 *boule* mRNA 与哺乳类更为相似，其主要在初级精母细胞中表达。

boule mRNA 在卵巢中的表达最初仅发现于线虫中(Karashima et al. 2000)，其同源物 *daz-1* 基因是线虫雌性生殖系统所必需的，*daz-1* 基因的缺失会导致雌雄同体的虫体卵子发生过程停留在第一次减数分裂粗线期，最终导致雌性不育。随后，研究者又在脊椎动物如青鲮、虹鳟、中华鲟等鱼类卵巢中检测到 Boule 蛋白的存在。在青鲮卵巢中，*boule* mRNA 在减数分裂前后均有表达，且在初级卵母细胞中信号最强(Xu et al. 2009)。与青鲮不同的是，在虹鳟中，*boule* mRNA 只在减数分裂阶段有表达，且在卵原细胞中无信号，在初级卵母细胞中表达最强，随着卵母细胞的成熟，信号逐渐减弱(Li et al. 2011)。本研究中，中华鳖 *boule* mRNA 在中华鳖卵子发生过程中在初级卵母细胞中表达最强，在生长期卵母细胞中信号聚集于核周并随细胞发育成熟逐渐减弱，这与在中华鳖中鉴定出的 *boule* 同家族基因 *dazl* mRNA 在卵巢中的表达模式相似(唐舟凯等 2019)。此外，在缺失 *boule* 基因的果蝇中导入爪蟾(*Xenopus laevis*) *dazl* 能够使缺陷果蝇的精子恢复减数分裂起始的过程(Xu et al. 2003)，这也暗示着 *boule* 与 *dazl* 基因均为 DAZ 家族成员，其结构的保守性可能使其在物种生殖细胞中发挥相似的功能。与中华鳖 *dazl* 在其雌雄生殖细胞中主要表达于雌性生殖细胞不同的是，中华鳖 *boule* 主要在其初级精母细胞中表达，说明中华鳖 *boule* 基因在中华鳖雄性生殖细胞的减数分裂过程中扮演了重要角色。

综上所述，中华鳖 *boule* mRNA 在中华鳖两性生殖细胞中特异表达且在精巢中表达量最高，在中华鳖精子发生过程中呈现出时空动态表达模式，这表明中华鳖 *boule* 在中华鳖雄性生殖细胞发生过程中，特别是雄性生殖细胞减数分裂起始过程中具有重要的调控作用。本研究克隆并分析了中华鳖 *boule* 基因的细胞表达分布特征，为今后深入探索中华鳖的配子发生机制，特别是为进一步解析龟鳖类及其他爬行动物生殖细胞发育调控机制研究提供了一定的

前期基础。

参 考 文 献

- Dwarakanath M, Lim M, Xu H, et al. 2014. Differential expression of *boule* and *dazl* in adult germ cells of the Asian seabass. *Gene*, 549(2): 237–242.
- Eberhart C G, Maines J Z, Wasserman S A. 1996. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature*, 381(6585): 783–785.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4): 783–791.
- Karashima T, Sugimoto A, Yamamoto M. 2000. *Caenorhabditis elegans* homologue of the human azoospermia factor *DAZ* is required for oogenesis but not for spermatogenesis. *Development*, 127(5): 1069–1079.
- Li M, Shen Q, Xu H, et al. 2011. Differential conservation and divergence of fertility genes *boule* and *dazl* in the rainbow trout. *PLoS One*, 6(1): e15910.
- Lin Y M, Kuo P L, Lin Y H, et al. 2005. Messenger RNA transcripts of the meiotic regulator *BOULE* in the testis of azoospermic men and their application in predicting the success of sperm retrieval. *Human Reproduction*, 20(3): 782–788.
- Otori M, Karashima T, Yamamoto M. 2006. The *Caenorhabditis elegans* homologue of deleted in azoospermia is involved in the sperm/oocyte switch. *Molecular Biology of the Cell*, 17(7): 3147–3155.
- Shah C, Vangompel M J W, Naeem V, et al. 2010. Widespread presence of human *BOULE* homologs among animals and conservation of their ancient reproductive function. *PLoS Genetics*, 6(7): e1001022.
- Shine R. 2013. Reptiles. *Current Biology*, 23(6): R227–R231.
- Tung J Y, Luetjens C M, Wistuba J, et al. 2006. Evolutionary comparison of the reproductive genes, *DAZL* and *BOULE*, in primates with and without *DAZ*. *Development Genes and Evolution*, 216(3): 158–168.
- Vangompel M J W, Xu E Y. 2010. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the *DAZ*-family protein *Boule*. *Human Molecular Genetics*, 19(12): 2360–2369.
- Xu E Y, Lee D F, Klebes A, et al. 2003. Human *BOULE* gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Human Molecular Genetics*, 12(2): 169–175.
- Xu E Y, Moore F L, Pera R A. 2001. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13): 7414–7419.
- Xu H, Gui J F, Hong Y H. 2005. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Developmental Dynamics*, 233(3): 872–882.
- Xu H, Li Z, Li M, et al. 2009. *Boule* is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of Medaka. *PLoS One* 4(6): e6097.
- Ye H, Li C J, Yue H M, et al. 2015. Differential expression of fertility genes *boule* and *dazl* in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), a basal fish. *Science Foundation in China*, 360(4): 413–425.
- 唐舟凯, 张飘逸, 储张杰, 等. 2019. 中华鳖 *dazl* 基因克隆及在生殖细胞中的表达分析. *水产学报*, 已接收.