

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.09.006

唐娜, 田佳明, 徐建飞, 等. 尖吻鲈 *dnajb1* 和 *dnd1* 基因克隆及细胞表达定位分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(9): 53-67.

尖吻鲈 *dnajb1* 和 *dnd1* 基因克隆及 细胞表达定位分析

唐娜, 田佳明, 徐建飞, 张若冰,
陈凯利, 冯科, 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 荣昌 402460

摘要: 通过分子克隆技术获得尖吻鲈热休克蛋白基因 *dnajb1* (*Lcdnajb1*) 和 *dnd1* (*Lcdnd1*) 的 cDNA 序列, 并探究这两个基因在性腺细胞中的表达定位。结果显示: *Lcdnajb1* cDNA 长度为 1 287 bp, 包含 1 047 bp 的完整开放阅读框, 编码 348 个氨基酸; *Lcdnd1* cDNA 长度为 1 185 bp, 包含 1 128 bp 的完整开放阅读框, 编码 375 个氨基酸。氨基酸序列多重比对和系统发育进化树分析结果显示: *LcDnajb1* 蛋白序列与大口黑鲈的 *Dnajb1* 相似性最高 (94.1%); *LcDnd1* 与鳊的 *Dnd1* 相似性最高 (85.5%)。半定量 RT-PCR 结果显示: *Lcdnajb1* mRNA 在各组织中均有表达, 其中肝脏中表达量最高, 而 *Lcdnd1* mRNA 仅在性腺组织中表达; 进一步通过实时荧光定量 RT-PCR (qRT-PCR) 确证了 *Lcdnajb1* mRNA 在尖吻鲈各组织中的相对表达量。原位杂交结果显示: *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* mRNA 在精巢和卵巢早期生殖细胞中表达量较高, 随着生殖细胞的发育成熟, 表达量均呈逐渐下降趋势。综上所述, *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 基因可能参与了调控尖吻鲈性腺的发育过程。

关键词: 尖吻鲈; 热休克蛋白; 基因表达

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)09-0053-15

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Cloning and Cellular Localization Analysis of *dnajb1* and *dnd1* Genes in Asian Seabass (*Lates calcarifer*)

TANG Na, TIAN Jiaming, XU Jianfei, ZHANG Ruobing,
CHEN Kaili, FENG Ke, XU HongyanCollege of Fisheries, Southwest University/Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and
Development (Ministry of Education)/Key Laboratory of Aquatics Science of Chongqing, Rongchang Chongqing 402460, China

收稿日期: 2024-06-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400902); 中央高校基本业务费项目(SWU020014)。

作者简介: 唐娜, 硕士研究生, 主要从事水产动物生殖发育研究。

通信作者: 徐红艳, 教授。

Abstract: To explore the functions of the *dnajb1* and *dnd1* genes in *Lates calcarifer*, a fish with the characteristics of sex reversal, the cDNA sequences of *dnajb1* (*Lcdnajb1*) and *dnd1* (*Lcdnd1*) were obtained by cloning, and the expression pattern of *dnajb1* and *dnd1* genes in gonadal cells was also analyzed in this study. The results indicated that the length of the *Lcdnajb1* cDNA was 1 287 bp, which contained a complete open reading frame (ORF) of 1 047 bp, encoding a putative peptide of 348 amino acids. The length of the cDNA of *Lcdnd1* was 1 185 bp, containing a complete ORF of 1 128 bp, encoding a putative peptide of 375 amino acids. Amino acid sequence alignments and phylogenetic analyses revealed that LcDnajb1 shared the highest similarity (94.1%) with the MsDnajb1 (*Micropterus salmoides*), and LcDnd1 was the most similar (85.5%) with the ScDnd1 (*Siniperca chuatsi*). Semi-quantitative RT-PCR showed that *Lcdnajb1* was expressed extensively in various tissues, with the highest expression in liver, while the *Lcdnd1* expression was restricted in gonadal tissues. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to confirm the expression profile of *Lcdnajb1* in adult fish tissues. Meanwhile, *in situ* hybridization results demonstrated that the expressions of *Lcdnajb1* and *Lcdnd1* were higher in the early developmental stages of germ cells. In addition, with the development and maturity of germ cells, the expression of *Lcdnajb1* and *Lcdnd1* decreased gradually. These findings suggested that *Lcdnajb1* and *Lcdnd1* could play roles during gonads' development in *Lates calcarifer*. Thus, this study provided a foundation for further investigations on the functions of *Lcdnajb1* and *Lcdnd1* in the development and sex reversal of gonadal cells in *Lates calcarifer*.

Key words: *Lates calcarifer*; heat shock protein; gene expression

鱼类生殖发育与配子发生是探究低等脊椎动物繁殖的关键,性腺发育相关基因在其中发挥着至关重要的作用^[1-3]。性腺由生殖细胞及其周围的体细胞所组成,因此性别决定也由二者相互构成,而性别分化通常指生殖细胞及其周围体细胞的分化,相较于高等脊椎动物,鱼类性别决定和性腺分化过程具有很强的可塑性^[4-5]。目前已经克隆获得很多与性腺分化和发育相关的基因,如 *nanos3*、*vasa*、*dazl*、*piwi*、*wt1*、*zar1*、*cyp19a1a*、*foxl2*、*rspol*、*dmrt1*、*amh* 和 *sox9* 等^[6-10]。近年来,*dnajb1* 和 *dnd1* 基因也被发现可能参与了鱼类性别分化的调控过程^[11-12]。

热休克蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs)是多种蛋白折叠的伴侣分子,当温度发生变化时,与其他激素共同作用以防止机体损伤。Jolly 等^[13]按照分子量大小将热休克蛋白分为 6 类,其中就有 Hsp40 家族,该家族拥有 3 个亚型,分别为 DNAJA、DNAJB 和 DNAJC^[14]。DNAJB1 作为 Hsp40 家族中的重要成员,具有高度保守的 J 结构,该结构与其他蛋白协同作用,共同维持细胞内稳态^[15-18]。此外,研究发现 HSPs 在早期胚胎和生殖细胞发育过程中起重要作用,可能与动物机体生长发育过程中的细胞增殖、分化和凋亡有关^[19-20]。Hsp40 家族中的 *dnajb1* 基因广泛存在于体细胞和生殖细胞中^[11, 21-22],然而,关于热休克蛋白基因 *dnajb1* 在鱼类性腺中的功能研究相对较少。

dnd1 基因是一种脊椎动物特有的种质特异性标记的母源性 RNA,其编码的 RNA-binding 蛋白对原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)的特化、增殖和迁移至关重要^[23]。2003 年,*dnd1* 基因首次在斑马鱼(*Danio rerio*)中被分离鉴定,经深入研究发现,*dnd1* 基因主要参与维持生殖细胞的发育及相关细胞的生理活动^[24-26];随后,陆续在青鳉(*Oryzias latipes*)^[27]、异育银鲫(*Carassius gibelio*)^[28]、非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*)^[29]、小鼠(*Mus musculus*)^[30]、原鸡(*Gallus gallus*)^[31]和智人(*Homo sapiens*)^[32]中鉴定了 *dnd1* 基因^[33]。在非洲爪蟾中,*dnd1* 只在卵巢中表达^[29];在小鼠中,*dnd1* 仅在生殖细胞中表达^[30],敲降 *dnd1* 基因的表达,可导致小鼠卵巢生殖细胞缺失和精巢生殖细胞癌变^[34];在斑马鱼中则会导致 PGCs 的迁移发生紊乱^[25]。研究表明,在大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[35]、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[36]以及西斯伯里青鳉(*Oryzias celebensis*)^[37]等鱼类中,*dnd1* 基因在生殖细胞中特异性表达,

暗示其在各种鱼类的生殖细胞发育中的功能均具有较强的保守性。基于 *dnd1* 在生殖发育过程中的重要性, 在鱼类中开展 *dnd1* 基因序列分析及表达分布检测, 可为后续开展的生殖细胞发育和配子发生等研究提供思路。

尖吻鲈 (*Lates calcarifer*), 又名金目鲈、盲曹鱼, 隶属于鲈形目、尖吻鲈科, 原产于印度太平洋地区, 具有较强的繁殖和耐受能力, 在淡水与咸水中均能快速生长, 是一种重要的水生经济鱼类^[38]。尖吻鲈为雌雄同体雄性先熟鱼类, 从幼鱼到初次性成熟雄鱼需 3~4 年, 而发育为性成熟雌鱼则需 6 年。鉴于其特殊的性逆转特征, 尖吻鲈被认为是研究鱼类性别分化机制和性控育种的理想模型。本研究以尖吻鲈为研究对象, 克隆获得 *dnajb1* 和 *dnd1* 基因, 分析其序列特征, 检测其在组织中的表达分布以及在雌雄生殖细胞发育过程中的表达特征, 为进一步开展鱼类生殖细胞发生发育及调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

尖吻鲈购自广东珠海某养殖场。采用 30 mg/L 丁香酚 (Solarbio, 中国) 麻醉, 分离肠、脑、心、肝、脾、肾、精巢和卵巢, 用于 RNA 提取的组织在液氮中速冻后保存于 -80 °C 冰箱中备用。另取一部分尖吻鲈性腺组织, 4% 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 固定后, 转移至甲醇中于 -20 °C 冰箱中保存, 用于后续冰冻切片。

1.2 尖吻鲈组织总 RNA 的提取和 cDNA 合成

采用 TRIzol Reagent (Solarbio) 进行尖吻鲈组织总 RNA 提取, 并分别用 NanoDrop 2000 微量分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度、纯度和完整性。调整总 RNA 为 1 000 ng/ μ L, 使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit (Takara) 进行基因组 DNA 去除并反转录为 cDNA, 然后 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.3 全长 cDNA 克隆

根据美国国家生物技术信息中心数据库 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 中预测的尖吻鲈 *dnajb1* (XM_018679787.2) 和 *dnd1* (XM_018694390.2) 基因序列, 设计引物扩增 cDNA 序列 (表 1)。用 TaKaRa PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Takara) 进行 PCR 扩增。反应体系为: 25 μ L 2 \times Master Mix, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ L, cDNA 1 μ g, 补充 dd H₂O 使总体积至 50 μ L。扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环数为 30; 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 然后用 TIANGel Midi Purification Kit (天根) 进行胶回收, 经 DNA A-Tailing Kit (Takara) 加 A 后连接 pGEM-Teasy 载体 (Takara), 转化大肠杆菌感受态 Top 10 后, 进行菌液 PCR 扩增, 挑选阳性克隆进行测序。本研究中的引物合成和 DNA 测序均由擎科生物 (重庆) 科技有限公司完成。

表 1 本研究所用引物

引物	序列 (5'-3')	长度/bp	用途
<i>Lcdnd1</i> F	CAGAAAGACGGTGGAGATGATG	22	基因克隆
<i>Lcdnd1</i> R	CAAACAGAGCCTGACACAGAG	21	基因克隆
<i>Lcdnajb1</i> F	CCGCAATGGAGGCATGGATGAG	22	基因克隆
<i>Lcdnajb1</i> R	GGGTCCTGCTGCTTCTTTACAACA	24	基因克隆
<i>Lcdnd1-rt</i> -F	GCTGGAAACCTGGCTGAAAGT	21	PCR 检测
<i>Lcdnd1-rt</i> -R	GATCTGGCTGATGAAGACCTCCG	23	PCR 检测
<i>Lcdnajb1-rt</i> -F	GCTTACGACGTGTTGAGCGAC	21	PCR 检测
<i>Lcdnajb1-rt</i> -R	CTCATCCATGCCTCCATTGCG	21	PCR 检测
β - <i>actin</i> F	CGGAATCCACGAGACCACCTAC	22	PCR 检测
β - <i>actin</i> R	ACTCCTGCTTGCTGATCCACAT	22	PCR 检测

1.4 组织特异性表达分析

根据获得的尖吻鲈 *dnajb1* 和 *dnd1* cDNA 序列设计特异性扩增引物 *Lcdnajb1*-rt-F/R 和 *Lcdnd1*-rt-F/R(表 1), 选用 β -actin(XM_018667666.2) 作为内参基因, 设计引物 β -actinF/R(表 1)。以尖吻鲈肠、脑、心、肝、脾、肾、精巢和卵巢组织 cDNA 为模板(稀释 5 倍后使用)进行 RT-PCR 扩增。反应体系为 20 μ L (10 μ L 2 \times Taq Mix, 引物各 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 添加至 20 μ L)。RT-PCR 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环数为 32; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并在生物成像系统(Bio-Rad)中进行观察。

按照 TB Green[®] Premix Ex TaqTM 试剂盒(Takara)说明书进行 qRT-PCR 实验, 使用 ABI QuantStudio 3 Real-Time PCR 检测 *Lcdnajb1* 在尖吻鲈不同组织中的表达, 每个样品重复数为 3。反应体系为 10 μ L (5 μ L 2 \times TB Green Premix Ex Taq II (Takara), 0.2 μ L ROX Reference Dye II (50 \times), 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA(稀释成 2 ng/ μ L)1 μ L, ddH₂O 添加至 10 μ L)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[39]进行不同组织中 *Lcdnajb1* 基因分析。qRT-PCR 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示($n=3$), 并用 Prism 9.5.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 采用 Duncan's 法进行多重比较检验组间差异并绘图, 设 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 生物信息学分析

通过 NCBI 网站上的 ORF finder 在线工具(ORFfinder Home-NCBI(nih.gov))进行开放阅读框(Open Read Frame, ORF)预测。利用在线工具 Interpro(InterProScan-InterPro(ebi.ac.uk))查找基因家族序列和结构域。使用 DNAMAN 8.0 软件将核苷酸序列翻译成氨基酸序列, 并对翻译得到的氨基酸序列进行多重比对分析。使用 MEGA 11 软件, 按邻接法(NeighbourJoining, N-J)构建系统进化树, 用自展法(Bootstrap)进行 1 000 次检验。

1.6 性腺组织切片原位杂交

原位杂交技术具体操作步骤参考相关报道^[40]。根据获得的 *Lcdnajb1* 序列, 利用限制性内切酶 NcoI (Solarbio)进行酶切反应; *Lcdnd1* 序列用限制性内切酶 SacII(Solarbio)进行酶切反应, 进一步回收获得制备探针的线性化模板。分别利用 SP6/T7 Enzyme Mix 和 Digoxigenin(DIG)RNA Labeling Kit 合成正义和反义探针, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。洗涤后以抗地高辛抗体标记的碱性磷酸酶和硝基蓝四氮唑/5-溴-4 氯-3-吡啶基磷酸(NBT/BCIP)为显色底物进行显色, 用碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)对细胞核进行染色, 经 4% PFA 固定后用中性树脂封片进行观察。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 结果与分析

2.1 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* cDNA 克隆及序列分析

通过基因克隆获得 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* cDNA 序列, 其中 *Lcdnajb1* 长度为 1 287 bp, 与 NCBI 数据库中预测的 *Lcdnajb1* 序列相似性为 100% (GenBank 登录号为 XP_018535303.1), 开放阅读框为 1 047 bp, 编码 348 个氨基酸, 包含 1 个 DNAJ 保守结构域和 1 个 DNAJ-C 保守结构域(图 1a)。*Lcdnd1* 长度为 1 185 bp, 与 NCBI 数据库中预测的尖吻鲈 *dnd1* 序列相似性为 98.53%

(XM_018694390.2), 开放阅读框为 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸, 包含 1 个典型的 RRM 识别基序结构域(图 1b)。

```

1                                     GGCCGTAACGACTAC
16  TATAGTGGCGATGCGGAGCTAGACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGCCGGGAATTCGATTTCACAGCCGTTTCTGGACAGCTTCAACACTTAACAAGCCGCTGGATAGTCAAA
136 ATGGGTAAGATTACTACGACATTTGGGAATTAAGAAAGAGCGCTGGAGGACGACATAAAGAAAGCTTATCGTAAACAGGCTCTGGCCTATCACCTGACAAAAACAAGTACCCGGGA
1   M G K D Y Y D I L G I K K G A S E D D I K K A Y R K Q A L R Y H P D K N K S P G
256 GCGAGGAGAAATCAAAGAGATTGCTGAAGCTTACGACGTTGAGCGACCCAAAGAAGAAGACATCTACGACCGTATGTTGAAGAAGGTTTAAAGTGGTGGCCCTCAGGTGGT
41  A E E K F K E I A E A Y D V L S D P K K K D I Y D R Y G E E G L K G G G P S G G
376 GGTGGTGGTGGTCCCGACCTTCAGCTACACCTCCAGGGCACCCTACGCTCTTTGCGGAATCTTTGGTGGACGCAACCCCTCGAACAGTCTTTGGTGGCCCGCAATGGA
81  G G G G G P G T F S Y T F Q G D P H A I F A E F F G G R N P F E Q F F G A R N G
496 GGCATGGATGAGGACATGGACACTGACGACCCCTTTGCGCGTTGGGATGGGGGGCGGTGAATGGGTGGTCCCGCTCCTTCAGCTCTGGCATGGGAGCATGGTGGCCACAGT
121 G M D E D M D T D D P F A R F G M G G G M G G F P R S F S S G M G G M G G H S
616 AGTGTGTAAGAAGCAGCAGGACCCCGCTGGTTCAGCATCTCCGGTGACCTGGAGGAAGTCTGTCAGTTGCACAAAGAAGAATGAAGATTTCTGTAAGACTGAACCTGAT
161 S V V K K Q Q D P P V V H D L R V T L E E V L S G C T K R M K I S R K R L N P D
736 GGGCGTCAGTAAAGACTGAGGATAAAGCTCTGGAGGTCAGATAAAGAGGGGTGAAGAGGGCACCACAAATCACATTTCTAAAGAGGGGACGAGAGTCCCAAAAATTCCAGCT
201 G R S V K T E D K V L E V Q I K K G W K E G T K I T F P K E G D E S P T N I P A
856 GACGTGGTCTTTGTTGAAGGACAAACACATCTGTGTTAAAGCTGATGGCTCTGACATCATTTACCCAGCAAGATCTCACTCAGAGATGCCCTGTGTGGATGATCAATCAACGCA
241 D V V F V L K D K P H P V F K R D G S D I I Y P A K I S L R D A L C G C T I N A
976 CCCACGCTGGATGGCAGAACGGTACCGTGTCAACAACAGACATCGTCAACAGGGATGAAGCGGGGTTAGTGGCGAAGGGCTACCTTACCCCAAGCGCCGATCGTCGAGGTGAC
281 P T L D G R T V T V S T T D I V Q P G M K R R V S G E G L P Y P K R P D R R G D
1096 CTGATAATCGATGATAGGTCAGTTCACAGAAAGGCTCAGTCAGAGCCCGGGACACCATCGCTCAGTCTCCCAAGATCTGAAATCACTAGTGAATTCGCGCCGCTCGAGGTC
321 L I I E Y E V K F P E R L S Q S A R D T I A Q V L P R S *
1216 GACCATATGGGAGAGTCCCAACGGTGGATGCATAGCTTGAGATTCTATAGGTCACCTAAATGGCGCC

```

a. *Lcdnajb1*

```

1                                     CAGAAAGCGGTGGAG
17  ATGATGGAGCGGAGCAGAGACAGGTGCTGAACCTCGAGCGGGTGCAGGCGCTGGAAACCTGGCTGAAAGTAACCAACACAAAAGTACTGACT
1   M M E R E Q R Q V L N L E R V Q A L E T W L K V T N T K L T
107 CAAGTAAACGGCCAGAGGAAGTATGGAGGACCCTGAGGTGTTGGGATGGCCCGACCCCGGAGCCGCTGCGAGGTCTTCATCAGCCAG
31  C A V N G Q R K Y G G P P E V W D G P T P G A R C E V F I S Q
197 ATCCACGGGACACCTACGAGGACCTGCTGATCCCCCTGTTTCAGATCGGTGGGCGGCTCTGGGARTCAGGCTCATGATGAAGTTCAGC
61  I P R D T Y E D L L I P L F R S V G P L W E F R L M M N F S
287 GGGCAGAACCGGGGCTTTGGCTACGCCAAATACAGCTCCTCAGAGTGTAGCCGCCAACGACAGTCCGCTGCTGCACGGCCACATGCTGGAG
91  G Q N R G F A Y A K Y S S S S V A A N A V R L L H G H M L E
377 CCTGGCTTCCACCTCAGTGTCCGCGGAGCAGGAGAAGAGACACCTCTGTATCGGAGACCTGCGGCCACCACCGAGCAAGAGGACCTA
121 P G F H L S V R R S T E K R H L C I G D L P A T T E Q E D L
467 CTGAAGGTGCTCGGTGCTGTCGACAGAGGGGGTGGAGGGGGTGTCTCTGAAGGACGGGGCTGGGATAGACGGGGTGTGACGGCCATCGTGGCT
151 L K V L R V L A E G V E G V S L K A G P G I D G V S A I V A
557 TTCTCATCCACACACCGCTTCTATGGCCAAGAAGATGCTGGTGAAGCATCAAGAAGCAGTTCGCGTGAACGCTCTCATCAAGTGG
181 F S S H H T A S M A K K M L V E A F K K Q F A L N V S I K W
647 CAGTTGACGGTGAAGCCGCTCAGACGAGTGTGCTCCTCAGAAACCCCTGAAGCCGCCACACCATCTGACTTCTCCACAGCC
211 Q L T V K P P G P D E L L P P Q K P L K P P H H I L T S P Q P
737 TCAGTCTGCTCCTGCTGTCGCGCCGCTTCCATCCATCCCGGGTTCGTCAGAGCAGTGGGAGGGCCTTCTGCCCCCACCACCT
241 V C L P P R L A R L P S I P P G F C R A V G P S A P P H P
827 TTCCTCCTGCTCCTCCACCTTCTCCTCCTGAGGGGATCCGGTGTCCGACGCTCCCAATGACACTCTGCACAAGGTTGTGAG
971 F P P C S S T F S S S E G H P V S A A S P M T L L H K V C E
217 GCGACGGGGTGGCCAGCCGCTCTATGAGATGTACTACAGCCACTGGGACAGATGGATTCCTACTTTACCTATACAGTATCCATC
301 A T G V G Q P L Y E M Y Y S H T G P D G F F L Y T Y T V S I
1007 CCGGGATAACCATGCCCTCAAAGGGCTGGTCATGATTTGCCGGGACCACTTCCACGCCATGTAGAGGAAGCTCAGCAGGTCGG
331 P G I T M P F F K G L V M I L P G P T S T A M L E E A Q Q A A
1097 GCCACGAGATCTCGAGAGGGTCTGACGTCAGCAGCTACCCCTGATCAGCTCCTCAGACAACAGCTCTGTGTCAGGCTCTGTTT
361 A Q Q I L Q R V C S Q Q L T P *

```

b. *Lcdnd1*

起始密码子、终止密码子为粗体; 下划线为 DNAJ 结构域, 灰色阴影部分为 DNAJ-C 保守结构域(图 1a)和 RRM 识别基序结构域(图 1b)。

图 1 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 核苷酸和编码的氨基酸序列

用 DNAMAN 8.0 软件对尖吻鲈 *Dnajb1* 和 *Dnd1* 蛋白与其他物种同源蛋白序列进行多重比对, 结果发现, 尖吻鲈 *Dnajb1* 与大口黑鲈同源性最高, 为 94.1%; 与大菱鲂、尼罗罗非鱼和青鲮的同源性在 90.0%~92.8%; 与斑马鱼的同源性为 76.6%; 与两栖动物非洲爪蟾、爬行动物绿海龟和蜥蜴的同源性在 70.4%~71.0%; 与哺乳动物(智人、小鼠、穴兔)的同源性在 69.5%~71.0%; 与鸟类原鸡的同源性最低, 为 66.4%(图 2)。尖吻鲈与其他物种的 *Dnajb1* 氨基酸序列具有高度的保守性, 即都具有 DNAJ 结构域和 DNAJ-C 保守结构域。尖吻鲈 *Dnd1* 与鳊的同源性最高, 为 85.5%; 与射水鱼和剑鱼的同源性都是 71.0%; 与青鳉、虹鳟、异育银鲫、斑马鱼和泥鳅的同源性在 48.1%~66.8%; 与智人和小鼠的同源性分别为 39.3%和 36.6%; 与非洲爪蟾、中华鳖和绿海龟的同源性在 34.0%~38.5%(图 3)。尖吻鲈与

其他物种的 Dnd1 氨基酸具有高度的同源性, 即 1 个 RRM 识别基序结构域和 5 个保守结构域(NR、CR1、CR2、CR3、CR4)。

Table with 2 columns: Species (Lc, Ms, Sm, On, Ol, Dr, Xt, Hs, Oc, Mm, Gg, Cm, Zv) and Amino Acid Sequence. The sequences are aligned and show high conservation across species.

DNAJ

Table with 2 columns: Species (Lc, Ms, Sm, On, Ol, Dr, Xt, Hs, Oc, Mm, Gg, Cm, Zv) and Amino Acid Sequence. This section shows the DNAJ domain alignment.

Table with 2 columns: Species (Lc, Ms, Sm, On, Ol, Dr, Xt, Hs, Oc, Mm, Gg, Cm, Zv) and Amino Acid Sequence. This section shows a conserved region alignment.

DNAJ-C

Table with 4 columns: Species (Lc, Ms, Sm, On, Ol, Dr, Xt, Hs, Oc, Mm, Gg, Cm, Zv), Amino Acid Sequence, Species Name (物种), and Identity Percentage (同一性). This section compares DNAJ-C across various species.

其他物种的氨基酸序列均来源于 NCBI, 划线区域为 Dnajb1 的保守结构域, 即 DNAJ 结构域和 DNAJ-C 保守结构域。

图 2 尖吻鲈与其他物种的 Dnajb1 氨基酸序列的多重比对分析

基于尖吻鲈和其他物种 Dnajb1 和 Dnd1 的氨基酸序列, 通过 Mega 11.0 采用邻接法构建系统发育进化树, 结果显示, 尖吻鲈 Dnajb1 属于 Hsp40 家族, 主要分为低等脊椎动物和高等脊椎动物两大支。Dnajb1 与硬骨鱼类聚为一支, 与鱼类同源性较高, 与鸟类、爬行类和哺乳类同源性较低(图 4a); Dnd1 主要聚为四足动物和硬骨鱼类两大分支, 尖吻鲈 Dnd1 属于硬骨鱼类, 与鱼类的同源性较高, 与哺乳类的同源性较低, 与龟、鳖类的同源性最低(图 4b)。

LcMEREQRQVNLERVQAEITWLVKINTLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	113
TjMVEMERKQCVNLERVQAEITWLVKINTLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	116
Xg	TSVRCVTWMEANNQCQVNLKRVQAEITWLVKINTLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	120
ScMESKQCVNLERVQAEITWLVKINTLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	113
OiMNCQVNLERVQAEITWLVKINTLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	111
OmMEERSQVNLPERLKAEMWQETDVLKIQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	112
MsMEGALLCLFPCALKAKKVAQKSSITLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	113
CaMEGQCCQVNLQRLKSKCEVAQKSSVITLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	113
Dr	AVGCMACQCCQLCIINPKLKSCEVAQRNSITLQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	119
Xl	MELSEDEKSCQVAVSNSENKELALAWKETGIEIQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	119
MmMQSKRECEVCWERPENKAHEAWVREITGIRVQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	117
HsMQSKRDECEVCWERPENKAHEAWVREITGIRVQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	117
PsMVDANCAKCAALAWKETGIEIQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	99
CmMDGALEAQSALDANCKNTALAWKMGIEIQVNGCRKYGCPPEWDGPTGARGCEVFIHQIQRDTEDELLIPLFRSVPGLVEFRLLANFSGCRGFAYATSSSSVAIAVRL	117

NR		RRM	
Lc	IIGHMLPEGFHLSRRSDEKRRHICIDPATTCEEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEAFKKCFALNVSIKWQITVKPDPDELLPPQKP	227
Tj	IIGHMLPEGFCLSRRSDEKRRHICIDPATTCEEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEGVSQCEAFCAIDLKQVAVHSECEPGRS	225
Xg	IIGHMLPEGFRLSRRSDEKRRHICIDPAAATRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEGSIQVAVNDRNLQVAVNSEPGR	228
Sc	IIGHMLCPGFRLSRRSDEKRRHICIDPAAATRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	232
Oi	IHCYLPGPGRISRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	227
Om	IHGRLAESGRLSRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	227
Ms	IHQHRIADGRLSRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	229
Ca	IHHYRLPEGGCLTVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	227
Dr	IHCYRLPEGGCLTVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	234
Xl	IHFGEITKGCICVCRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	227
Mm	IHNHLCRPSQCLLTVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	225
Hs	IHNHLCRPSQCLLTVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	225
Ps	IHFVEFKGCPITVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	207
Cm	IHNVEFKGCPITVRRSDEKRRHICIDPASTRCEDLKVIRVLAEGVEVSLKACPGIEGVAIVAFSSHTPSMARRMVEEFKFKCFALTIKWCSTVRPSPDELPKPKSKILL	225

CR1		CR2					
LcLKPPPHHILTSQPSVLPRLARLPSIPPGFCRAVCGPSAPPHPFPSSSTFSSSEGHVPSAASPNTLLHKVCEATCGVCPQLYEMYSHT	316			
TjTACTETSRPPGAPPFKFPRALSPASSGCRPIHYPGFLCQSGRTRYPPIPSPSLLLLCQAASFGRIASADP	298	
XgATATETSKEPGVTPEDAVPHPEFSTALSPASSGPPSIHPPGFLCQSGRTRCPTPSLLHLHLLFLPGASSFCSI	PSDAP	310
ScPSPPLKPRHINSQCPVLPRLARLPSIPPGFCRAVCGPTAPCHPPPPSSSTISSSSQGHVSTASSASPVRLRKKCEAIRVGCPQLYEMYSHT	328	
OiLLPSLKLHLCQTSRBLPRLASPVATFAFCRAVCGPTQCHDTHVKGTSPPPRGQVAFVSPVPLLRLKLEASGVCDPHYELFSHA	313	
OmPSPKPHCSLLESPPRLRLACRCLPAFSAVRAVAPPPMVHAAPFSLREVTVPVDALLCGVEVCGCKPLVYLCYRHM	309	
MsPPAPPKPLKSKPFSLHHTQSHHIIPTHHTPQPFTRAVGAPVTQPRNEPISQSRDAASQLKLVCEVNLKGTPIREYRINH	311
CaRFTPPVNLNPKPSTPPHLHPCLLHVAHSPIQPFRAVCGPASLRDEMPRANVQCAVSLQVCELHRLGTPQVYVFRHRT	314
DrCVTPLVLPKSKPSLLHYDVPAHCSLPLFRVAVGPTTSECRDEMPPCPTIMSRNELIPQSSIRCRDEMPCLPIRPRDGAQPSISLDAVSHLQVCEVNLKGTPIREYRINH	350
XlSTDKLQCTKLSLLPLLYTDRELPRETLLSAVCCLNLQCEAKLGRPVFLIKLFSV	284
MmCQLAGPSLRLRPDVSQTLQTRFKLGSCGARAALQLLQCRNLKGSVPFLTKCLGT	280
HsCQLVGFPLRSPEGSLALARDKLGFCGARATLQLLQCRNLKGSVPFLTKCLGT	280
PsASLASAVPARLQPGVFECGGPSVCPGEAETCPLPPARGVLRLNLCKKQCLGPPVFLTKCVQA	271
CmANSERTFPSSQPGGCERDSQSPACNAVTCPLPQALCVLDYLNLCKKQCLGPPVFLTKCVQA	289

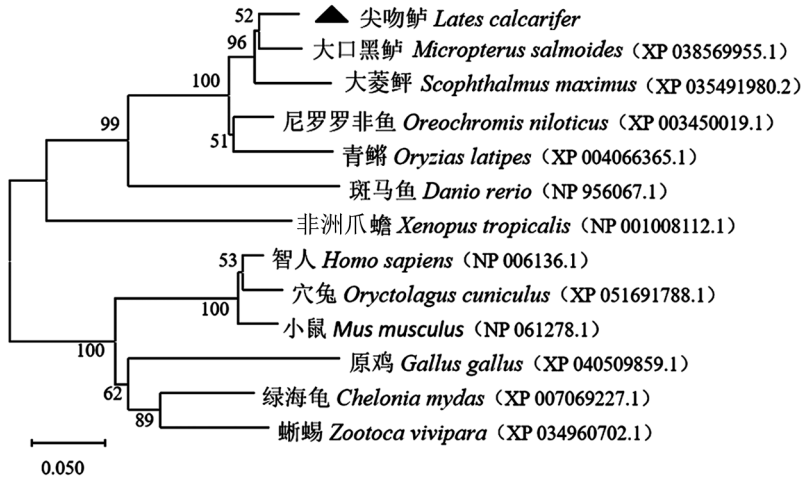
Lc	GPDGLFYFTYVSI	PGITAPFKGLVM	LPG	PTSTAMLEEAC	AAAQCI	LQVCSQCLTP	物种	同一性	
Tj	A						尖吻鲈	100%	375
Xg	A						射水鱼	71.0%	299
A							剑鱼	71.0%	311
Sc	GPDGLFYFTYVSI	PGITAFKGLVM	LPG	PTDITALEEACRAAAQCVL	CRVYNCLAH		鳊	85.5%	387
Oi	GPDGLFYFTYVSI	HVPGATPFRGVM	LPG	HCTSTMLEEARRAAQCVL	QKLCSSGLSA		青鳉	66.8%	372
Om	GPDGLFYFTYVSI	VPGLATPFTGVM	CLPG	PTPGATCEEARATAQCVLSALYRA			虹鳟	60.3%	364
Ms	GPDGLFYFTYVSI	PALSFPLYGVC	QLPG	TSARANKGVHRAAEQVI	QTIYTAARQCFP		泥鳅	48.9%	372
Ca	SSDGLFYFNKLVLPCLL	FPLNGVIE	LPG	TSIQAQKAEVYRAAAEQVI	QTMCKVSNLRF		异育银鲫	50.4%	375
Dr	APDGLFYAFKVL	PLGLPLLYGFV	QLPG	TSARANKSEVYRAAAEQVI	QTLCRVSNLRF		斑马鱼	48.1%	411
Xl	TSFGVIRFYCVVI	PTVPTPCGYAWI	GENLE	NEKYEHARCVAAKI	LSALGYIPDFSLGCVTARNAL		非洲爪蟾	38.5%	351
Mm	GPAGVHRFYCVVI	PCHPVPFSLI	WVLS	ASDVQCDHEVAKDAVSAQLEAL	SEPRTSLVSPGAEAGTVMK		小鼠	36.6%	351
Hs	GPAGVHRFYCVVI	PCHPVPFSLI	WVLT	LEGRDHEVAKDAVSNLQAL	SESGANLVSAGAEAGTVMK		智人	39.3%	352
Ps	TPAGVLRFYCVVI	PGVPSPFSCFL	WLKAD	SGMCGHAQAKNA			中华鳖	34.0%	314
Cm	NPDCVLRFYCVVI	PGVPSPFSGF	WIKPKS	GLSGHKA	KNAALCLLKLALGCPVV		绿海龟	37.0%	346

其他生物的氨基酸序列均来源于 NCBI, 划线区域为 *Dnd1* 的保守结构域, 即 NR 为 N 端结构域, RRM 识别基序结构域, CR1~CR4 为 C 端结构域。

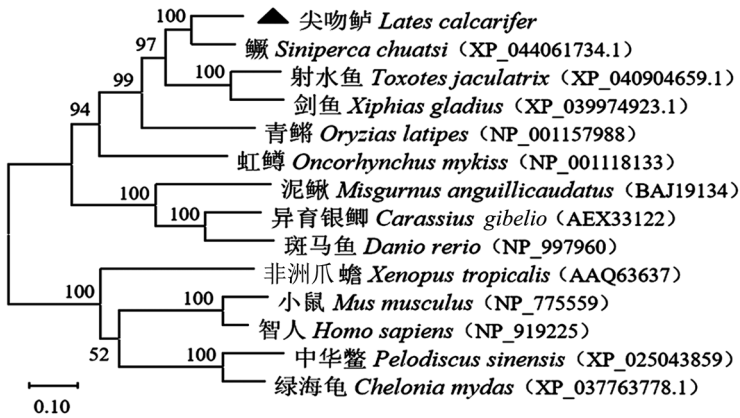
图 3 尖吻鲈与其他物种的 *Dnd1* 氨基酸序列的多重比对分析

2.2 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* mRNA 的组织表达

采用 RT-PCR 检测尖吻鲈 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 基因在不同组织中的表达, 结果显示, *Lcdnajb1* 在心、肝、脾、肾、肠、脑、精巢、卵巢中均有表达, 肝中表达量最高, 精巢和卵巢中的表达量次之, 其他组织中的表达量相对较低; *Lcdnd1* 仅在性腺组织中表达, 且卵巢中的表达量高于精巢, 其他组织中检测不到(图 5)。进一步采用 qRT-PCR 检测 *Lcdnajb1* 基因的组织表达, 结果显示, 肝脏中的表达最高(图 6), 显著高于其他组织, 检测结果同 RT-PCR 中的结果类似。



a. Dnajb1 蛋白系统进化树



b. Dnd1 蛋白系统进化树

蛋白的系统进化树用邻接法在 Mega 11.0 软件中进行 1 000 次 bootstraps 验证; 系统发育树分岔点处的数字是自展值。

图 4 Dnajb1 和 Dnd1 蛋白的系统进化树

2.3 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* mRNA 在卵

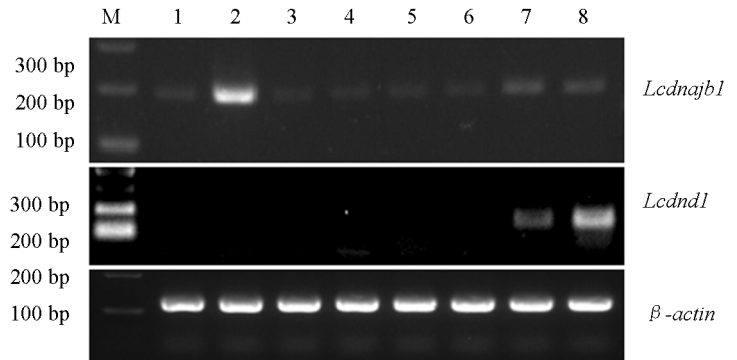
巢中的表达定位

采用化学原位杂交检测 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在尖吻鲈卵巢中的表达定位, 结果显示, *dnajb1* 基因主要在雌性生殖细胞的第 II、III 期表达, 而在 IV 期表达量开始减弱。有趣的是, 成熟尖吻鲈的 *dnd1* 基因表达呈现出与 *Lcdnajb1* 基因类似的特征, 即集中在雌性生殖细胞的第 II、III 期表达, IV 期表达减弱。

不同的是, *Lcdnajb1* 在体细胞和生殖细胞中均有表达, 而 *Lcdnd1* 仅在生殖细胞中表达, 体细胞中几乎不表达(图 7)。

2.4 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在精巢中的表达定位

采用化学原位杂交检测 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在尖吻鲈精巢中的表达定位, 结果显示, *Lcdnajb1* 在雄



1 为心, 2 为肝, 3 为脾, 4 为肾, 5 为肠, 6 为脑, 7 为精巢, 8 为卵巢

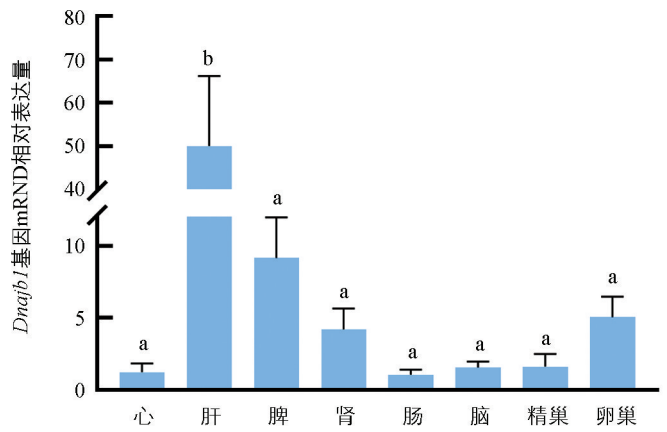
图 5 尖吻鲈 *dnajb1* 和 *dnd1* 基因 mRNA 在各组织中的表达

性生殖细胞和体细胞中均有表达, 而 *Lcdnd1* 仅在生殖细胞中表达, 其他细胞中检测不到。*Lcdnajb1* 在精原细胞和精母细胞中表达强烈, 精子细胞中表达减少。*Lcdnd1* 在生殖细胞中也出现相应的表达特征, 但在精子中几乎检测不到(图 8)。

3 讨论与结论

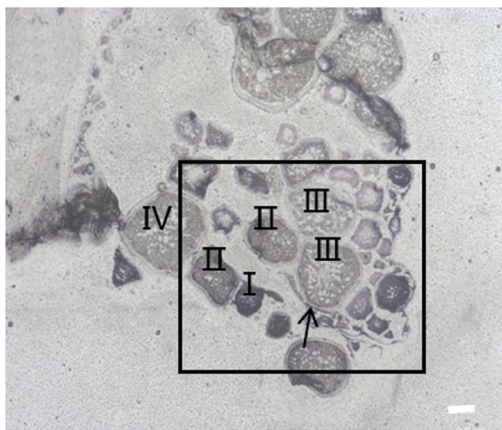
3.1 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 基因序列鉴定

早在 1962 年, 在果蝇 (*Drosophila*) 中就开展了有关热休克蛋白 Hsp 家族的研究^[41]。随着研究的深入, 有关其基因家族

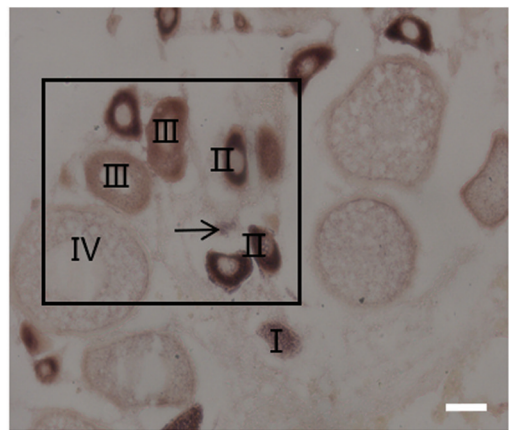


β -actin 为内参基因, 对照为肠组织, 小写字母不同表示差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

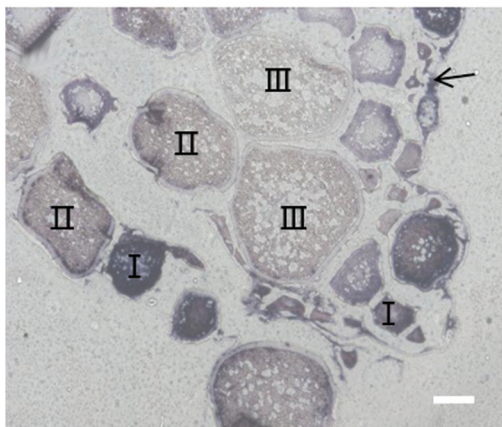
图 6 *Dnajb1* 基因 mRNA 在尖吻鲈不同组织中的相对表达量



a. *Lcdnajb1*



b. *Lcdnd1*



c. *Lcdnajb1*(方框放大)

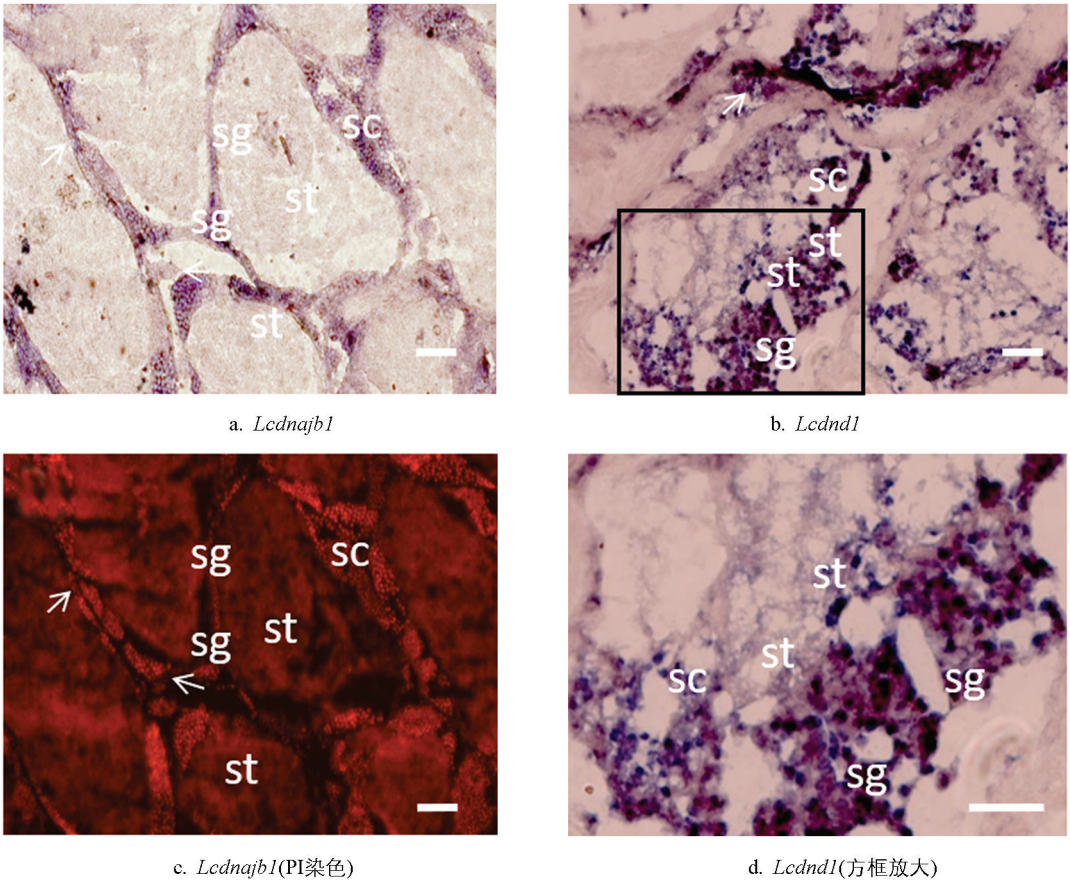


d. *Lcdnd1*(方框放大)

I-IV 表示不同发育时期的卵巢, *dnajb1* 和 *dnd1* mRNA 信号使用碱性磷酸酶, 信号为紫色, “→”为体细胞, 比例尺为 50 μ m。

图 7 化学原位杂交法分析卵巢中 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 转录本的表达分布

结构与功能的研究越来越多^[42-43]。目前研究大多侧重于大分子热休克蛋白 Hsp90 和 Hsp70 等, 而对小分子热休克蛋白研究较少^[44]。本研究采用基因克隆技术获得尖吻鲈小分子热休克蛋白基因 *dnajb1*, 其氨基酸包含 DNAJ 和 DNAJ-C 两个保守结构域, 与 Hsp 家族基因的多肽序列具有高度保守性^[45-46]。本实



sg 为精原细胞, sc 为精母细胞, st 为精子细胞, “→”为体细胞; a、b、d 图中 *dnajb1* 和 *dnd1* mRNA 信号使用碱性磷酸酶, 信号为紫色, c 图中精巢细胞的细胞核用 PI 复染(红色), 比例尺为 50 μm 。

图 8 化学原位杂交法分析精巢中 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 转录本的表达分布

验同时也克隆获得了 *dnd1* 基因, 典型的 RRM 与大多数硬骨鱼类 Dnd1 蛋白一样^[23, 47], Dnd1 隶属于 hnRNP-R-Q 蛋白家族, 包含 1 个 RRM 识别基序结构域和 5 个保守结构域, 表明 *dnd1* 基因虽然在进化过程中存在着一定的变化, 但仍然具有相对的保守性, 推测其保守域可能是 *dnd1* 基因行使功能的重要结构域^[48]。在本研究中, LcDnajb1 和 LcDnd1 蛋白序列都表现出高度的保守性, 但不同物种间仍然存在一定的差异。

3.2 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* mRNA 表达分析

Lcdnajb1 的 RT-PCR 和 qRT-PCR 结果显示, *Lcdnajb1* 在各组织中均有表达, 其中在性腺中呈现差异性表达, 即卵巢高于精巢, 意味着 *Lcdnajb1* 在卵巢中发挥更为重要的作用, 可能在雌雄同体雄性先熟鱼类尖吻鲈性逆转过程中发挥着一定的功能。有研究表明, HSPs 在胚胎发育过程中具有一定的发育阶段依赖性和组织特异性^[19], 而 *Dnajb1* 与一些细胞过程相关, 如蛋白酶体途径^[49]、内质网(ER)应激^[49]、病毒感染^[50]等。在鱼类中, 有关小分子热休克蛋白 *Dnajb1* 的研究相对较少, 大多数集中在 Hsp70 大分子热休克蛋白上^[51]。Hsp70 在牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)^[52] 肠中的表达量最高, 而在唐鱼(*Tanichthys albonubes*)^[53] 的肝脏中表达量最高。在淞江鲈(*Trachidermus fasciatus* Heckel)^[54]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[55] 和泥鳅(*Oriental weatherfish*)^[56] 组织中均有 HSP 的表达, 与本研究相似; 在罗非鱼^[11]中, *dnajb1* 基因在精巢中的表达量高于卵巢。在本研究中, *Lcdnajb1* mRNA 在心、肝、脾、肾、肠、脑、卵巢和精巢中广泛表

达,且在性腺中呈现差异性表达,而 *Lcdnd1* 只在卵巢和精巢中特异性表达,且卵巢的表达高于精巢,这与异育银鲫 (*Carassius gibelio*)^[29]、星斑川鲮 (*Paralichthy sdentatus*)^[23]、西斯伯里青鲮^[38]、稀有鮡鲫^[37]、中华鲟 (*Acipenser sinensis*)^[45] 和牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[23] 等的表达模式相似; *dnd1* 基因只在小鼠^[30] 精巢中表达,卵巢中未见表达;而 *dnd1* 在非洲爪蟾^[29] 中的表达与小鼠恰恰相反,即只在卵巢中表达,在精巢中不表达。由此推测 *dnd1* 基因可能参与动物性腺发育,但不同物种间其调控性腺发育的作用机制可能存在差异。本研究中, *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在尖吻鲈性腺中的表达均表现为在卵巢中的表达水平高于精巢,这种表达模式是否与尖吻鲈性逆转发生有关,有待进一步验证。

化学原位杂交结果显示 *Lcdnajb1* 在体细胞和生殖细胞中均有表达,而 *Lcdnd1* 于生殖细胞中特异表达。在卵巢中, *Lcdnajb1* mRNA 在 II 期卵母细胞中的表达最强,随着卵母细胞的生长发育分化,其表达量逐渐减弱。曾有报道在斑马鱼^[57-58] 卵母细胞中检测出了 *hsp* 基因的表达,且在海龟^[59]、美洲鳄^[60] 等物种的卵巢组织中均有表达,但具体在哪个卵母细胞时期表达尚不明确。高温刺激尼罗罗非鱼^[11] 后,卵巢中 *dnajb1* 的表达量下降,热刺激恢复后回到正常水平。*Lcdnajb1* 可能参与了卵细胞的发育,且当应激源出现时,可发生较显著的表达变化。*Lcdnd1* 表达情况与 *Lcdnajb1* 的相似,主要集中在 II、III 期卵母细胞中,随着卵母细胞的发育分化而不断降低。在异育银鲫^[28]、中华鲟^[47] 和稀有鮡鲫^[36] 卵巢中, *dnd1* 的细胞表达分布情况也与此基本一致。值得一提的是,在西斯伯里青鲮^[37] 中, *dnd1* 在卵巢发育的整个过程中都存在,并且随着卵子发生的进行, *dnd1* 的表达逐渐减少。在中华鳖卵巢中, *dnd1* 主要集中在 II 期初级卵母细胞的细胞质中,随着卵细胞的发育,信号逐渐减弱,并在 IV 期之后的卵母细胞中检测不到^[12]。在热带爪蟾成体组织中, *dnd1* 的转录本是在卵巢中特异性表达,在精巢中几乎检测不到^[29]。卵巢发育过程中,卵母细胞发育为第 III 期时,细胞质中开始存积大量卵黄^[61],所以 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 基因有可能主要参与卵黄沉积前期,特别是初级卵母细胞向次级卵母细胞的发育过程,并在其中发挥一定作用。

在尖吻鲈精巢中, *Lcdnajb1* 在雄性生殖细胞和体细胞中均有表达,其中在精原细胞和精母细胞中表达水平较高,而精细胞中表达量较低。相较于哺乳动物,水产动物 Hsp 家族成员的研究相对滞后,主要集中在腔肠动物和软体动物^[62]。有研究发现, Hsp27、Hsp86 在精子发生和胚胎发育过程中表达量显著升高^[63-64]。雄海龟中 Hsp72 表达显著高于雌海龟^[59]。在小鼠中, *dnajb1* 基因^[65] 主要表达于精母细胞和圆形精细胞,这与本研究结果相似。尖吻鲈 *dnd1* 的表达结果显示,其在精巢中的表达集中在精原细胞与精母细胞中,精细胞中表达微弱,精子中未检测到信号。在西斯伯里青鲮^[37] 精巢中,精原细胞中的表达最为强烈,精母细胞中明显减少,而精子中不表达。在异育银鲫^[28]、青鲮^[27]、稀有鮡鲫^[36]、中华鲟^[47] 中也呈现出一致的表达。有研究表明, *dnd1* 基因在非洲爪蟾精巢中未见表达^[29],而小鼠中 *dnd1* 分两种类型, *dnd1- α* 集中在早期胚胎和胚胎性腺中, *dnd1- β* 则在减数分裂起始及减数分裂后的精巢生殖细胞中表达^[30],这些发现暗示 *dnd1* 在精子生成过程中起到了关键作用。*Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在尖吻鲈精巢中的表达分析,推测 *dnd1* 基因主要在精子发生前期和中期作用,而 *dnajb1* 基因则在鱼类精子发生的整个时期都有一定作用,不仅在生殖细胞中表达,周围体细胞中也有表达,表明其在性腺发育过程中发挥着重要作用。

综上所述,本研究通过基因克隆获得了尖吻鲈 *dnajb1* 和 *dnd1* 的 cDNA 序列,进一步分析发现, *Dnajb1* 蛋白具有 DNAJ 和 DNAJ-C 两个保守结构域; *Dnd1* 蛋白具有 1 个典型的 RRM 识别基序结构

域和 5 个保守结构域(NR、CR1、CR2、CR3、CR4)。RT-PCR 检测结果显示, *dnajb1* 基因在尖吻鲈各组织中广泛表达, 而 *dnd1* 特异性地在精巢和卵巢组织中表达。进一步采用化学原位杂交方法检测 *Lcdnajb1* 和 *Lcdnd1* 在性腺组织细胞中的表达定位, 发现 *dnajb1* mRNA 在生殖细胞和周围体细胞中均有表达, 而 *dnd1* mRNA 仅在生殖细胞中表达。研究结果表明, *dnajb1* 和 *dnd1* 基因可能共同参与了尖吻鲈两性配子发生发育过程, 为后续开展雌雄同体鱼类的生殖细胞发育、配子发生和性逆转等研究提供了理论依据。

参考文献:

- [1] DODSON A E, KENNEDY S. Phase Separation in Germ Cells and Development [J]. *Developmental Cell*, 2020, 55(1): 4-17.
- [2] ROBLES V, RIESCO M F, PSENICKA M, et al. Biology of Teleost Primordial Germ Cells (PGCs) and Spermatogonia: Biotechnological Applications [J]. *Aquaculture*, 2017, 472: 4-20.
- [3] WILLIAMSON A, LEHMANN R. Germ Cell Development in *Drosophila* [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996, 12: 365-391.
- [4] BAROILLER J F, GUIGUEN Y. Endocrine and Environmental Aspects of Sex Differentiation in Gonochoristic Fish [J]. *EXS*, 2001(91): 177-201.
- [5] NAGAHAMA Y. Molecular Mechanisms of Sex Determination and Gonadal Sex Differentiation in Fish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2005, 31(2-3): 105-109.
- [6] QU L, WU X, LIU M F, et al. Identification and Characterization of Germ Cell Genes *Vasa* and *Dazl* in a Protogynous Hermaphroditic Fish, Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Gene Expression Patterns*, 2020, 35: 119095.
- [7] SUN Z H, WANG Y, LU W J, et al. Divergent Expression Patterns and Function Implications of Four *Nanos* Genes in a Hermaphroditic Fish, *Epinephelus coioides* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 685.
- [8] ZHAO H B, DUAN J D, CHENG N N, et al. Specific Expression of *Olpiwil* and *Olpiwi2* in Medaka (*Oryzias latipes*) Germ Cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 418(4): 592-597.
- [9] CUI H, ZHU H Y, BAN W Z, et al. Characterization of Two Gonadal Genes, *Zar1* and *Wt1b*, in Hermaphroditic Fish Asian Seabass (*Lates calcarifer*) [J]. *Animals*, 2024, 14(3): 508.
- [10] LI X Y, MEI J, GE C T, et al. Sex Determination Mechanisms and Sex Control Approaches in Aquaculture Animals [J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(6): 1091-1122.
- [11] 李春歌. 高温诱导对罗非鱼性别分化相关基因表达的影响研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [12] 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.
- [13] JOLLY C, MORIMOTO R I. Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92(19): 1564-1572.
- [14] 马芳, 刘哲, 康玉军, 等. 虹鳟 Hsp40 家族基因鉴定及其热应激下的表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(10): 1782-1792.
- [15] ZAROUCHELIOTI C, PARFITT D A, LI W W, et al. DNAJ Proteins in Neurodegeneration: Essential and Protective Factors [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2018, 373(1738):

20160534.

- [16] 李雨轩, 包勇. 热休克蛋白 40 在肺癌中的研究进展 [J]. 生命的化学, 2016, 36(4): 487-490.
- [17] HASEGAWA T, YOSHIDA S, SUGENO N, et al. DnaJ/Hsp40 Family and Parkinson's Disease [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2018(11): 743.
- [18] 金新萍, 谢倩, 吕斌, 等. 金鱼 *HSC70* 和 *HSP40* 基因克隆及其原核表达 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(2): 367-374.
- [19] RUPIK W, JASIK K, BEMBENEK J, et al. The Expression Patterns of Heat Shock Genes and Proteins and Their Role during Vertebrate's Development [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2011, 159(4): 349-366.
- [20] WANG P F, ZENG S, XU P, et al. Two HSP90 Genes in Mandarin Fish *Siniperca chuatsi*: Identification, Characterization and Their Specific Expression Profiles during Embryogenesis and under Stresses [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(4): 1123-1136.
- [21] 张新生, 张越, 孙纳. 斑马鱼急性无机砷暴露后肝脏差异表达基因的生物信息学分析 [J]. 生物信息学, 2024, 22(1): 70-78.
- [22] 李春歌, 赵燕, 陈红菊, 等. 高温诱导对性成熟尼罗罗非鱼性腺中性别分化相关基因表达的影响 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 214-224.
- [23] 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.
- [24] KEDDE M, STRASSER M J, BOLDAJIPOUR B, et al. RNA-Binding Protein *Dnd1* Inhibits microRNA Access to Target mRNA [J]. *Cell*, 2007, 131(7): 1273-1286.
- [25] WEIDINGER G, STEBLER J, SLANCHEV K, et al. Dead End, a Novel Vertebrate Germ Plasm Component, is Required for *Zebra fish* Primordial Germ Cell Migration and Survival [J]. *Current Biology*, 2003, 13(16): 1429-1434.
- [26] GIRALDEZ A J, MISHIMA Y, RIHEL J, et al. *Zebra fish* miR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs [J]. *Science*, 2006, 312(5770): 75-79.
- [27] LIU L X, HONG N, XU H Y, et al. *Medaka* Dead End Encodes a Cytoplasmic Protein and Identifies Embryonic and Adult Germ Cells [J]. *Gene Expression Patterns*, 2009, 9(7): 541-548.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] BHATTACHARYA C, AGGARWAL S, ZHU R, et al. The Mouse Dead-End Gene Isoform Alpha is Necessary for Germ Cell and Embryonic Viability [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 355(1): 194-199.
- [31] ARAMAKI S, SATO F, KATO T, et al. Molecular Cloning and Expression of Dead End Homologue in Chicken Primordial Germ Cells [J]. *Cell and Tissue Research*, 2007, 330(1): 45-52.
- [32] KUMARI P, BHAVESH N S. Human DND1-RRM2 Forms a Non-Canonical Domain Swapped Dimer [J]. *Protein Science*, 2021, 30(6): 1184-1195.
- [33] 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.

- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] DUAN J D, FENG G Q, CHANG P, et al. Germ Cell-Specific Expression of Dead End (*Dnd*) in Rare Minnow (*Gobio-cypris rarus*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 41(2): 561-571.
- [37] 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.
- [38] KHANG P V, PHUONG T H, DAT N K, et al. An 8-Year Breeding Program for Asian Seabass *Lates calcarifer*: Genetic Evaluation, Experiences, and Challenges [J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 191.
- [39] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [40] 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.
- [41] RITOSSA F. A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila* [J]. *Experientia*, 1962, 18(12): 571-573.
- [42] 乔新派, 郝文乾, 叶希琛, 等. 油茶 CKX 基因家族鉴定及表达分析 [J]. *河南农业大学学报*, 2025, 59(4): 614-624.
- [43] 杨巍, 赵丽芬, 杨娟, 等. 芥菜 SBP-box 基因家族全基因组鉴定与表达分析 [J]. *东北农业大学学报*, 2023, 54(8): 1-16.
- [44] 陈明帅, 徐超, 宋兴超, 等. 热休克蛋白的研究进展 [J]. *经济动物学报*, 2016, 20(1): 44-53.
- [45] GETHING M J, SAMBROOK J. Protein Folding in the Cell [J]. *Nature*, 1992, 355(6355): 33-45.
- [46] 何颖慧, 王志萍. 分子伴侣 HSP40/DNAJ 蛋白家族及其在神经退行性疾病中的作用 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(5): 640-646.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] YAMAZAKI S, UCHIUMI A, KATAGATA Y. Hsp40 Regulates the Amount of Keratin Proteins via Ubiquitin-Proteasome Pathway in Cultured Human Cells [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2012, 29(2): 165-168.
- [50] LENNA S, FARINA A G, MARTYANOV V, et al. Increased Expression of Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Limited Cutaneous Sclerosis and Pulmonary Arterial Hypertension [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2013, 65(5): 1357-1366.
- [51] SHARMA K, TRIPATHI S, RANJAN P, et al. Influenza Virus Nucleoprotein Exploits Hsp40 to Inhibit PKR Activation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20215.
- [52] 黄琳. 牙鲈免疫相关基因及热休克蛋白基因的转录表达 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2015.
- [53] 刘海超. 唐鱼三个分子伴侣基因的克隆及重金属对其 mRNA 表达的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [54] 刘庆全, 罗武松, 郑映荷, 等. 淞江鲈 *HSP70* 基因 cDNA 部分序列克隆及其组织表达差异 [J]. *复旦学报(自然科学*

- 版), 2013, 52(4): 558-563.
- [55] 林亚秋, 李瑞文. 鲤鱼 *HSP70* 基因组织表达差异研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 10(2): 59-61, 117.
- [56] 王佳. 菲胁迫对泥鳅热休克蛋白表达的影响 [D]. 延安: 延安大学, 2021.
- [57] EVANS T G, YAMAMOTO Y, JEFFERY W R, et al. *Zebrafish* Hsp70 is Required for Embryonic Lens Formation [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2005, 10(1): 66-78.
- [58] EVANS T G, BELAK Z, OVSENEK N, et al. Heat Shock Factor 1 is Required for Constitutive Hsp70 Expression and Normal Lens Development in Embryonic *Zebrafish* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 146(1): 131-140.
- [59] YAMAGUCHI A, LEE K H, FUJIMOTO H, et al. Expression of the DMRT Gene and Its Roles in Early Gonadal Development of the Japanese Pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(1): 59-68.
- [60] KOHNO S, KATSU Y, URUSHITANI H, et al. Potential Contributions of Heat Shock Proteins to Temperature-Dependent Sex Determination in the *American alligator* [J]. *Sexual Development*, 2010, 4(1-2): 73-87.
- [61] 刘晨斌, 徐革锋, 黄天晴, 等. 鱼类性腺发育研究进展 [J]. 水产学杂志, 2019, 32(1): 46-54.
- [62] 李婷婷, 孙继红, 韩森荣等. 水产动物小分子热休克蛋白家族研究进展 [J]. 水产学杂志, 2022, 35(4): 101-109.
- [63] 蔡令波. Hsp27 在卵母细胞成熟和植入前胚胎发育过程中的功能研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2014.
- [64] CIOCCA D R, OESTERREICH S, CHAMNESS G C, et al. Biological and Clinical Implications of Heat Shock Protein 27 000 (Hsp27): A Review [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993, 85(19): 1558-1570.
- [65] DOIGUCHI M, KANEKO T, URASOKO A, et al. Identification of a Heat-Shock Protein Hsp40, DjB1, as an Acrosome- and a Tail-Associated Component in Rodent Spermatozoa [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2007, 74(2): 223-232.

责任编辑 周仁惠

