

青 *tsn* 的克隆与表达分析

汪丝雨, 郭海燕, 李茜, 廖敏, 李雅园, 关桂君

Cloning and expression analysis of *tsn* in medaka (*Oryzias latipes*)

WANG Siyu, GUO Haiyan, LI Xi, LIAO Min, LI Yayuan, GUAN Guijun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210203303>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[卵胎生许氏平 *Sox9* 基因的克隆、启动子分析、表达及其细胞定位研究](#)

Cloning, promoter analysis, expression and cell localization of *Sox9* gene in an ovoviviparous teleost, black rockfish *Sebastes schlegeli*

上海海洋大学学报. 2020, 35(5): 671 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-277>

[三角帆蚌中 *WNT4* 基因克隆及表达分析](#)

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

[三角帆蚌 *KLHL10* 基因的特征和表达分析](#)

Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 389 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402983>

[红鳍东方卵巢与精巢的蛋白质组比较分析](#)

Comparative proteome analysis of ovary and testis in tiger puffer *Takifugu rubripes*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 847 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2020-007>

[三角帆蚌 *cyclin B* 基因克隆及功能](#)

Expression and function of *cyclin B* gene in *Hyriopsis cumingii*

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 496 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190402584>

文章编号: 1674-5566(2022)01-0011-08

DOI:10.12024/jsou.20210203303

青鳉 *tsn* 的克隆与表达分析

汪丝雨^{1,2,3}, 郭海燕^{1,2,3}, 李 茜^{1,2,3}, 廖 敏^{1,2,3}, 李雅园^{1,2,3}, 关桂君^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 国家海洋生物科学国际联合研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 有性繁殖的性别决定机制虽具有多样性,但其生殖细胞都经过几轮有丝分裂和增殖后进入减数分裂,最终产生雌性或雄性配子。尽管有丝分裂过程中的生殖细胞在形态上没有雌雄差异,然而,未分化的生殖细胞在有丝分裂过程中如何获得雌雄性别特征尚不清楚。青鳉(*Oryzias latipes*)正常 XX 卵巢、正常 XY 精巢以及性腺体细胞衍生因子(gonadal soma-derived factor, *gsdf*)缺失型(*gsdf*^{-/-})卵巢的蛋白质组学质谱比对分析结果显示,*gsdf*^{-/-}XY 卵巢中 Tsn(Translin)蛋白产物显著高于 *gsdf*^{+/+}XX 卵巢,提示 Tsn 蛋白表达可能受 *dmy*(DM-domain on Y chromosome,又名 *dmrt1bY*)及下游 *Gsdf* 雄性信号调控。从青鳉性腺组织的 cDNA 中克隆了 *tsn* 基因的 ORF(Open Reading Frame)片段。氨基酸序列的同源性比对分析及系统发育树评估显示,Tsn 在脊椎动物物种间具有进化保守性,青鳉和斑马鱼(*Danio rerio*)的 Tsn 氨基酸序列高度同源。反转录 PCR 和实时荧光定量 PCR 检测结果显示,*tsn* 的 mRNA 在野生型青鳉多个组织中广泛表达,其中在精巢中的表达量显著高于卵巢。免疫荧光检测发现,*gsdf*^{-/-}XY 卵巢中抗青鳉 Tsn 抗体阳性反应的囊性生殖细胞异常增多,同蛋白组学分析得到的 *gsdf*^{-/-}XY 卵巢中 Tsn 蛋白表达量高于 *gsdf*^{+/+}XX 卵巢的结果相一致。在青鳉性腺分化发育过程中,*Gsdf* 信号可能抑制 Tsn 阳性的雄性囊性生殖细胞增殖,当该信号被破坏后,这种抑制作用消失,导致 Tsn 阳性生殖细胞在 *gsdf*^{-/-}XY 卵巢中大量积累。青鳉 Tsn 阳性生殖细胞的囊性增殖,是青鳉有丝分裂期生殖细胞雄性分化的特征之一,为脊椎动物有丝分裂期生殖细胞的雌雄性别鉴定提供了线索。

关键词: *gsdf*; *tsn*; 生殖细胞; 性别分化; 卵巢; 青鳉

中图分类号: Q 786; S 917 **文献标志码:** A

体细胞通过 TGF- β (transforming growth factor- β) 信号途径与生殖细胞相互作用,促进性腺发育和配子成熟^[1]。TGF- β 家族在控制细胞增殖与性分化中起着重要的作用^[2],并且与多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)密切相关^[3]。*gsdf* 属于 TGF- β 家族,受雄性决定因子 *dmy* 直接调控,参与启动生殖细胞的雄性分化通路^[4]。胚胎发育早期(St. 35,外周血循环开启期),*gsdf* 在雌雄性腺中微弱表达,随着胚胎发育及性腺体细胞 *dmy* 的表达(St. 36,心脏形成),*gsdf* mRNA 表达量开始在雄性性腺中表达 *dmy* 的体细胞中增加,呈现出明显的雌雄差异^[5]; *gsdf* 缺失可导致野生型 XY 雄性青鳉雌性化,形成 XY 巨大卵巢^[4,6-7],卵巢中含有大量的卵黄发生前卵

母细胞,生育能力下降^[7]。此外,在 *gsdf* 缺失的斑马鱼卵巢中,发现第 III 期卵母细胞发育受阻,早期卵母细胞积累^[8]。以上研究显示,*gsdf* 对雄性和雌性性腺以及生殖细胞的发育均具有重要作用。前期蛋白组学分析比对青鳉 *gsdf*^{+/+}XX 卵巢、*gsdf*^{+/+}XY 精巢以及 *gsdf*^{-/-}XY 卵巢,发现 *gsdf*^{+/+}XY 精巢和 *gsdf*^{-/-}XY 卵巢的 Tsn 蛋白表达量明显高于 *gsdf*^{+/+}XX 卵巢^[9]。

TSN 最初被鉴定为单链 DNA 结合蛋白,随后在体外被证明也可与 RNA 结合^[10]。在哺乳动物中已发现,TSN 蛋白家族参与调控细胞分裂和细胞增殖。它在多种生物体中表达,包括裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、两栖类(Amphibian)、昆虫(Insect)和哺乳动物

收稿日期: 2021-02-20 修回日期: 2021-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(81771545)

作者简介: 汪丝雨(1994—),女,硕士研究生,研究方向为鱼类性别调控分化机制。E-mail: M180100049@st.shou.edu.cn

通信作者: 关桂君, E-mail: gjguan@shou.edu.cn

(Mammalia)。该蛋白在精子和卵子发生过程中可进行不同水平的转录后调控,例如促进基因表达,维持基因稳定性,进行亚细胞定位等^[11-13]。在小鼠中,*Tsn* 缺失可导致 2 月龄雄性小鼠精巢小区域出现空泡,并且空泡会随着个体增长而增多,同时精子数目发生减少^[11],表明 *tsn* 对雄性生殖细胞及精巢的发育具有重要影响。

为探究青鳉 *tsn* 在配子发生中的作用及 *tsn* 与 *gsdf* 之间的关系,利用免疫荧光技术分析 *tsn* 在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢和 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢中的差异表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

在实验中用到的正常野生型青鳉 HdrR 品系和 *gsdf* 缺失型青鳉,人工饲养于 26 ~ 28 °C 的循环系统中,光周期为光照期 14 h、黑暗期 10 h。*gsdf* 缺失型青鳉采用锌指核酸酶 (Zinc-finger nuclease, ZFN) 基因编辑技术获得^[4]。

1.2 实验方法

1.2.1 *tsn* 序列分析与系统发育树构建

从 Ensembl 数据库中查找该因子在无脊椎动物(果蝇, *Drosophila melanogaster*)、鱼类(青鳉;斑马鱼)、两栖类(爪蟾, *Xenopus tropicalis*)、高等脊椎动物(小鼠, *Mus musculus*; 人, *Homo sapiens*) 中编码的氨基酸序列;通过 Vector NTI 软件比对多物种的氨基酸序列,比较分析进化保守性;利用 MEGA 7.0 软件,以果蝇 *Trsn* 为外类群,选用参数邻接法构建系统发育树。

1.2.2 青鳉多个组织 cDNA 的获取

分别取 3 条野生型雌性青鳉和 3 条野生型雄性青鳉的脑、卵巢、精巢、肝脏、头肾、肠、眼睛,将雌雄个体相应的组织混合,以减少个体间的差异。采用 Trizol 法 (ThermoFisher, 美国) 提取 RNA,用 M-MLV Reverse Transcriptase (TaKaRa 大连,中国) 逆转录酶和 RNA 模板合成 cDNA。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR)

以 cDNA 为模板,进行 RT-PCR,检测 cDNA 和引物质量。然后通过 SYBR Green I (TaKaRa 大连,中国) 荧光染料法进行 qPCR。qPCR 的反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 3 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,循环数 40。以青鳉肌动

蛋白 β -actin 作为内参基因。引物见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 分析的基因及引物
Tab.1 Genes and primers for qPCR analysis

引物 Primer	序列 Sequence	片段长度 Fragment length/bp
<i>tsn</i> Fw1	5'- CATGGCAAGTGAAGTGTCCCG	210
<i>tsn</i> RV2	5'- CCGCGGATAGACAAGTCGTAG	
<i>actin</i> QFw	5'- GAGACCTTCAACAGCCCTGC	200
<i>actin</i> QRv	5'- CGCTCCGTCAGGATCTTCATG	

1.2.4 双色免疫荧光

将组织用 4% 多聚甲醛固定液 PFA (生工,中国) 固定,置于摇床上 (35 r/min, 37 °C) 每 15 min 更换新鲜的 4% PFA,更换 3 次后,4 °C 过夜;第 2 天用体积分数 50% 至 100% 乙醇 (国药,中国) 进行梯度脱水处理,4 °C 过夜;第 3 天用 Lemosol (Wako,日本) 进行 2 次组织通透处理后,浸蜡包埋。用组织切片仪 (LeicaRM2265,德国) 进行石蜡切片 (厚度 6 μ m)。切片在 42 °C 条件下过夜烘片,之后用二甲苯 (生工,中国) 脱蜡 3 次,每次 20 min;用体积分数 100% 至 50% 乙醇进行梯度复水处理;0.1% Triton X-100 现配现用,浸泡 40 min,增强细胞通透性;5% 羊血清 (生工,中国) 阻断封闭非特异抗原 30 min 后,敷特异性一抗 (Abmart,中国) 4 °C 过夜。第 2 天复温 30 min,分别用 1 \times PBS 和 1 \times PBST 洗片去除未结合的游离一抗 30 min,然后分别与鼠源和兔源二抗 (MBL,中国) 在室温下避光孵育,在此期间用 TSATM-Plus TMR/Fluorescein System (PerkinElmer,德国) 进行荧光信号增强放大染色,随后 DAPI 负染,用体积分数 50% 至 100% 乙醇梯度脱水处理后,加抗荧光淬灭封片剂 (Sigma-Aldrich,美国) 封片;共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8,德国) 观察并拍摄图片。

2 结果与分析

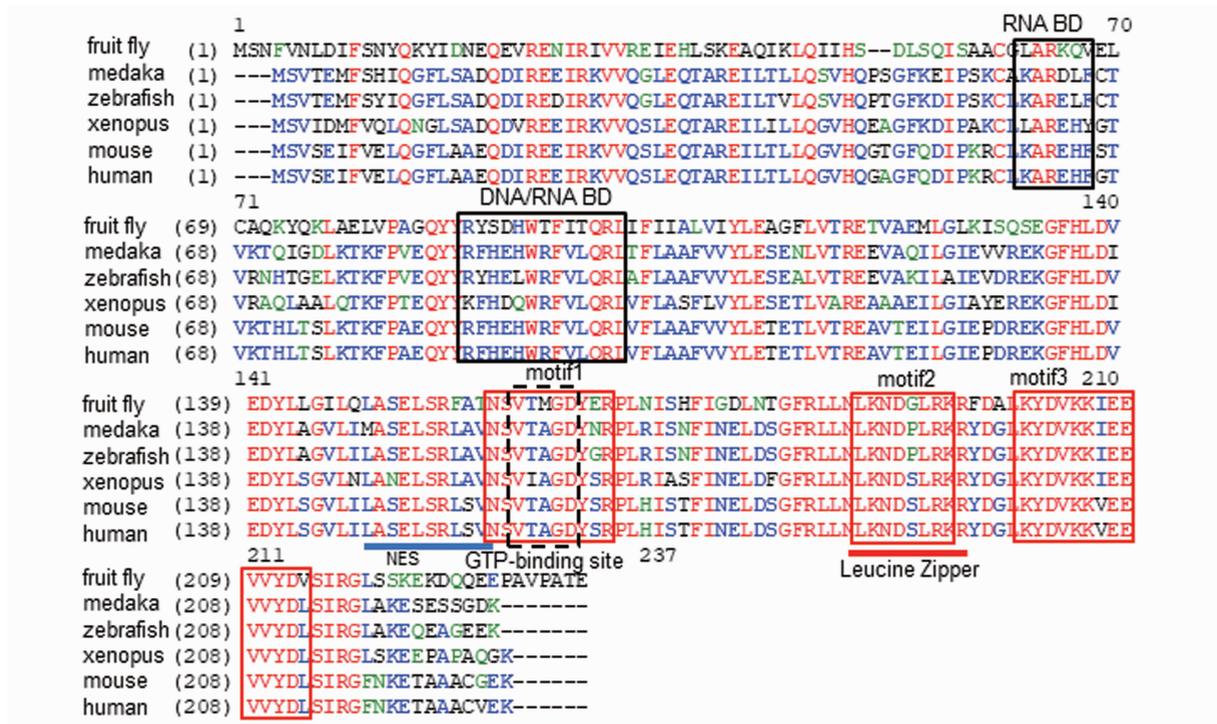
2.1 青鳉 *tsn* 的进化保守性

青鳉 *tsn* 编码 227 个氨基酸,将其与果蝇、斑马鱼、爪蟾、小鼠和人的氨基酸序列进行比对发现,青鳉的氨基酸序列与哺乳类小鼠和人具有较高的相似性 (78%),N 端的 RNA 结合位点 (RNA 结合结构域, RNA BD),DNA/RNA 结合位点 (DNA/RNA 结合结构域, DNA/RNA BD),C 端的核输出信号 (nuclear export signal, NES),与 GTP 结合域 (GTP-binding site) 关联的 motif1,含

有亮氨酸拉链结构 (Leucine Zipper) 的 motif2, 以及位于 C 末端的 motif3, 从无脊椎动物至高等脊椎动物高度保守(图 1)。

利用 MEGA 7.0 软件, 选用参数邻接法以果蝇 *Trsn* 为外类群, 对鱼类、两栖类、鸟类和哺乳类多物种的 *tsn* 进行系统发育树分析。结果显示: 青鳞和斑马鱼等鱼类聚在硬骨鱼分支上, 而哺乳类、鸟类和两栖类聚在另一个大的分支(图 2a) 上。根据基因同线性 (synteny) 分析发现, *tsn* 位于青鳞 21 号染色体, 同人 2 号染色体的 *TSN* 相对应。人 *TSN* 附近的 *STAM2* 也在青鳞 *tsn* 附近能找到, 但是 *INHBB* 和 *GLI2* 等紧密连锁基因却

独立于青鳞 *tsn*, 在青鳞 2 号染色体上。值得注意的是, 人 *TSN* 的连锁基因 *INHBB*、*GLI2*、*MAP3K2*、*ACVR2A* 与青鳞 *tsn* 连锁基因 *acvr2ab*、*map3k2*、*gli2b*、*inhbb* 在染色体上的排列方向正好相反。这些结果表明, 青鳞 2 号染色体和人 2 号染色体的这一区域可能起源于一个共同祖先, 并且在向高等哺乳动物的进化过程中发生了反转及 *TSN*、*STAM2* 等片段的插入。*GLI2*、*INHBB* 和 *MAP3K2*、*ACVR2A* 都是生殖细胞发生发育重要关联因子^[14-15], *TSN* 的插入可能改变这些基因在生殖细胞性分化和发育过程的表达, 影响其生理功能的发挥(图 2b)。

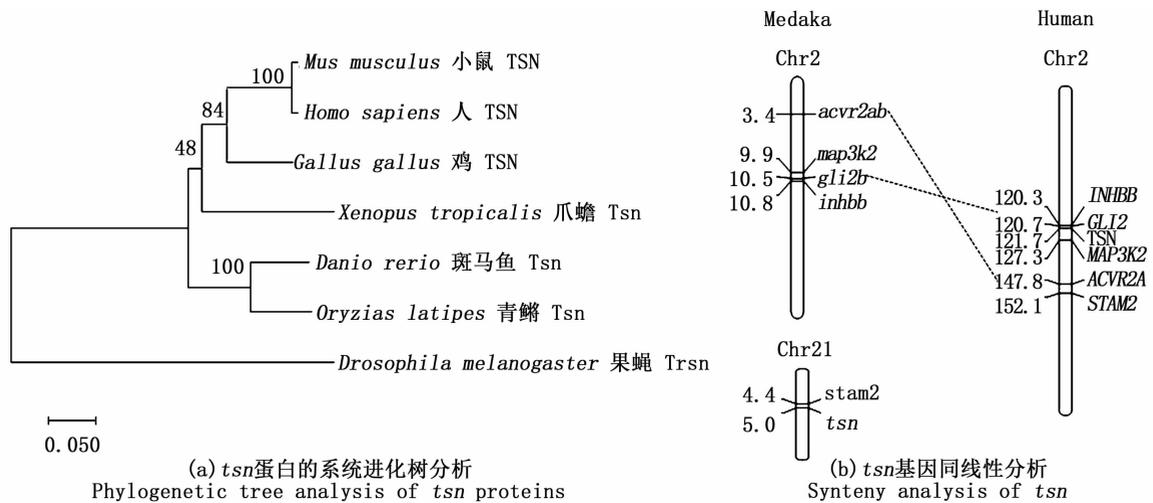


结构域 RNA 结合位点和 DNA 结合位点用黑色框标出;基序 1,基序 2 和基序 3 用红色框标出;GTP 结合位点用黑色虚线框标出;核输出信号用蓝色下划线标出;亮氨酸拉链结构用红色下划线标出。

RNA BD (RNA-binding site), DNA/RNA BD (DNA/RNA-binding site) are boxed in black; motif1, motif2, motif3 are boxed in red; GTP-binding site are boxed with dotted lines in black; NES (nuclear export-signal) (blue underlined); Leucine Zipper (red underlined).

图 1 青鳞与哺乳动物(人、鼠)、两栖类(爪蟾)以及无脊椎动物(果蝇)的氨基酸序列比对

Fig.1 Amino acid alignment of the domains of mammal (human, mouse), amphibian(xenopus), fish (medaka, zebrafish) and invertebrate (fruit fly)

图2 *tsn* 分子序列和结构的保守性Fig. 2 Evolutionary conservation of *tsn* across phyla

2.2 青鳉 *tsn* 的时空表达

通过 RT-PCR 分析 *tsn* mRNA 在胚胎多个时期的表达,发现 *tsn* mRNA 在囊胚期、原肠胚期、神经胚期、受精后 3 d (St. 29:34 体节期, *dmy* 未表达)、受精后 7 d (St. 37: 心包腔形成期, *dmy* 表达) 均有表达 (图 3a)。同时,利用 RT-PCR 分析 *tsn* mRNA 在青鳉多个组织中的表达,结果显示, *tsn* mRNA 在脑、眼睛、肝脏、头肾、肠、精巢、卵巢中广泛表达 (图 3b)。以脑、眼睛、肝脏、头肾、肠、精巢、卵巢的 cDNA 为模板,对 *tsn* mRNA 在多个组织中的表达进行相对定量分析,发现 *tsn* mRNA 在精巢中表达量最高,并且 *tsn* mRNA 在精巢中的表达量极显著高于雄性脑及卵巢。此外,该结果也显示在卵巢中的表达量极显著高于雌性脑 ($P < 0.001$),见图 3c。

2.3 青鳉 *tsn* 在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢和 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢中的差异表达

在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢中,细线期卵母细胞的细胞核中有微弱 Igf2BP3 蛋白表达,偶线期卵母细胞 (根据细胞形态学判断) 的细胞核和细胞质中有大量抗 Igf2BP3 红色信号, Tsn 仅在细胞质中表达,这使核周细胞质呈黄色,细胞核呈现红色 (图版-2); 随着卵母细胞减数分裂进行到双线期,核中只检测到抗 Tsn 绿色信号附着在双线期卵母细胞的染色体上 (图版-2); I 期减数分裂末期, Tsn 和 Igf2BP3 完全移出到细胞质中 (图版-1)。

gsdf^{-/-} XY 型卵巢囊性生殖细胞的细胞质含

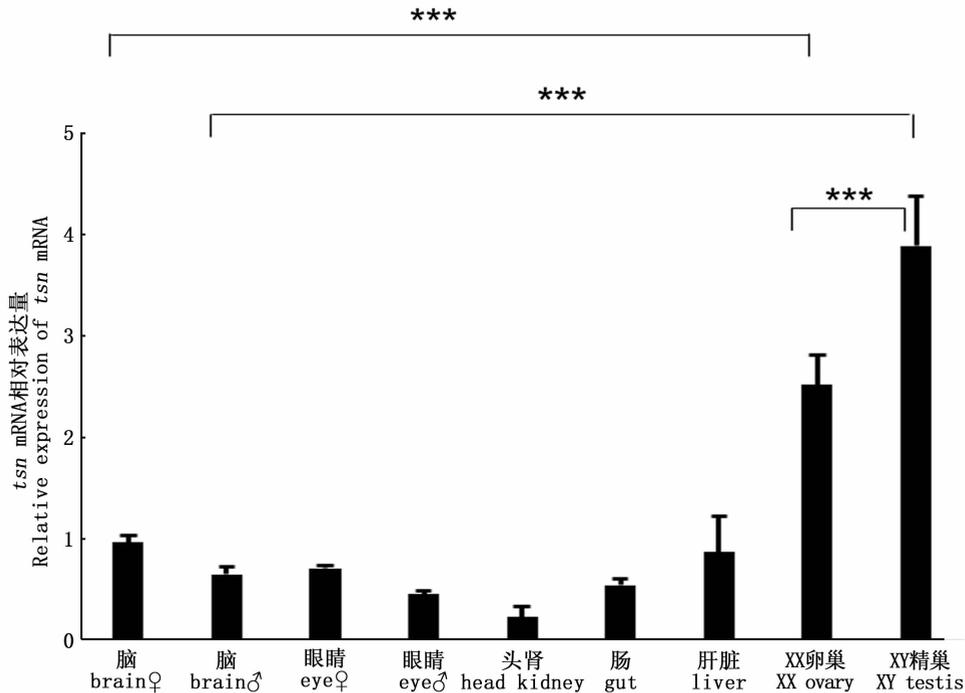
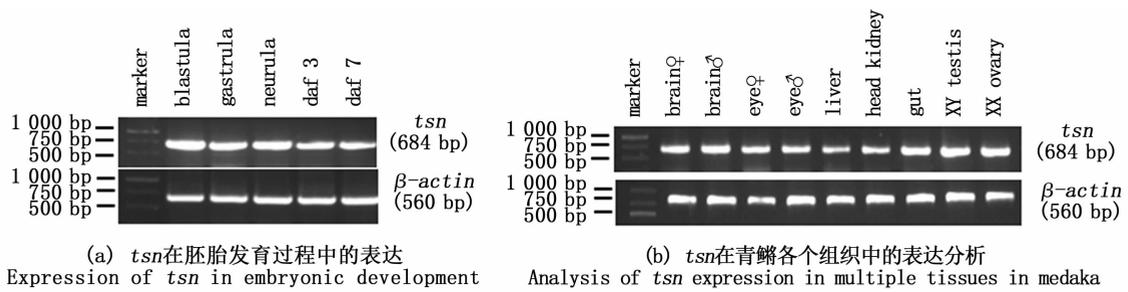
有大量的抗 Tsn (绿色) 信号 (图版-6 白色箭头所示, 7), 即使这些生殖细胞进入减数分裂, Tsn 信号也大多停留在细胞质中 (图版-8 白色箭头所示), 少有进入细胞核 (图版-8 三角箭头所示); Igf2BP3 在卵母细胞中大量表达 (图版-6), 同时还有一些 Tsn 和 Igf2BP3 共表达的初级卵母细胞 (图版-8 中 *) 以及抗 Igf2BP3 深染的死细胞残骸 (图版-8 中 **)。

3 讨论

本研究首次在青鳉上克隆了 *tsn*, 并对其结构进行分析, 同时, 在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢和 *gsdf*^{-/-} XY 的卵巢中对 Igf2BP3 和 Tsn 进行定位, 针对青鳉 Tsn 的表达展开研究。

通过对 *tsn* 时空表达分析发现, *tsn* 在青鳉性成熟期的多个组织中表达, 与果蝇和小鼠 *tsn* 研究结果相一致; SUSEENDRANATHAN 等^[16] 发现 *tsn* 在果蝇胚胎期, 幼虫和成虫的各个组织中表达; CHENNATHUKUZI 等^[11] 也发现 *tsn* 在小鼠脑、头肾、肝脏、精巢中表达, 提示了 *tsn* 在组织生长时发挥重要作用。此外, *tsn* 在青鳉胚胎发育的多个时期也均有表达, 表明 *tsn* 对胚胎发育同样具有重要功能。值得注意的是, *tsn* 在精巢中的表达量显著高于卵巢, 由此推测 *tsn* 在精巢发育过程中的作用机制不同于卵巢。目前, 已有研究^[11] 提出在肝脏中 Tsn 可与 microRNAs 结合, 但 Tsn/microRNAs 复合体的调节功能有待确定, 因此 Tsn 在组织生长和胚胎发育中的具体调控机制仍需

进一步深入探究。



daf 3. 受精后 3 天; daf 7. 受精后 7 天。星号表示 *tsn* 在青鳉精巢和脑中有显著性差异 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

daf 3.3 days after fertilization; daf 7.7 days after fertilization; The asterisks indicate significant differences among testis, ovary and brain (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

图 3 *tsn* 在多组织中的时空表达分析

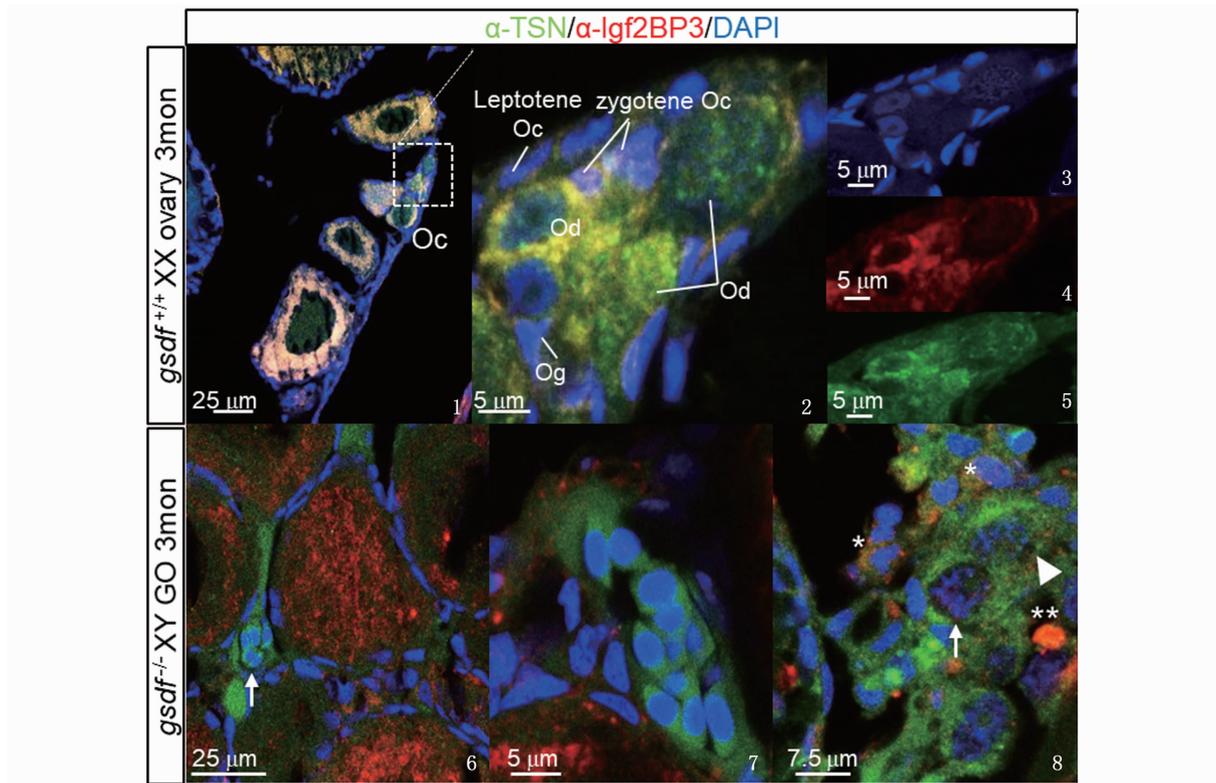
Fig. 3 Temporal and spatial expression of *tsn* in multiple tissues

基因的表达和在细胞内的定位,蛋白质翻译以及翻译后的修饰,对调控生殖细胞在早期胚胎发育过程中的增殖和性别分化十分重要。RNA 结合蛋白(核糖核酸结合蛋白)参与转录后调控,与哺乳动物的生育能力有关,如 IMPs (IGF-II mRNA-binding proteins) 在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中大量表达。介导生殖细胞发育^[17]。CHO 等^[18]发现, RNA 结合蛋白 TSN 在粗线期生殖细胞的细胞核与 I 期减数分裂末期的生殖细胞质

中表达,本研究抗 Tsn/抗 Igf2BP3 双色免疫荧光结果显示, Tsn 蛋白产物穿梭于青鳉雌性生殖细胞的细胞质及细胞核中,与小鼠 TSN 的研究结果类似。氨基酸序列比对分析发现, Tsn 的核输出信号以及亮氨酸拉链结构在青鳉中完全保守(图 1),提示了在青鳉雌雄生殖细胞发育过程中 Tsn 的核质间进出可能与靶转录物的阶段特异性输出和释放有关。小鼠 TSN 与 TRAX (Translin-associated factor X) 的相对比例影响二者在雄性

生殖细胞中的核质分布^[18],青鳉 *Trax* 同其他物种(鱼至哺乳动物)的氨基酸序列和功能域高度保守,*Tsn/Trax* 蛋白复合体可能参与青鳉雌雄生

殖细胞分化和发育过程,为进一步深入理解脊椎动物生殖细胞性分化的调控机制奠定了坚实的基础。



1. *Tsn/Igf2BP3* 在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢中的定位; 2. 1 的放大图; 3-5. 2 的单通道图像; 6-8. *Tsn/Igf2BP3* 在 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢中的定位; * . 初级卵母细胞; ** . 死细胞残骸; Oc. 卵母细胞; Og. 卵原细胞; Od. 双线期卵母细胞; GO. 巨大卵巢; 绿色. anti-Tsn; 红色. anti-Igf2BP3; 蓝色. DAPI。

1. Localization of *Tsn/Igf2BP3* in *gsdf*^{+/+} XX ovaries; 2. magnified images of 1; 3-5. the single channels of 2; 6-8. Localization of *Tsn/Igf2BP3* in *gsdf*^{-/-} XY ovaries; * . primary oocyte; ** . dead cell debris; Oc. oocyte; Og. oogonia; Od. diplotene oocyte; GO. giant ovary; Green. anti-Tsn; Red. anti-Igf2BP3; Blue. chromatin (DAPI).

图版 *Tsn* 在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢和 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢中的差异表达

Plate Expression of *Tsn* in *gsdf*^{+/+} XX ovaries and *gsdf*^{-/-} XY ovaries

抗 *Tsn*/抗 *Igf2BP3* 双色免疫荧光结果也显示,在 *gsdf*^{+/+} XX 卵巢和 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢减数分裂不同时期的卵母细胞中,*Tsn* 蛋白表达有明显差异。*gsdf*^{+/+} XX 卵母细胞的细胞核和细胞质中检测到大量的抗 *Tsn* 信号(图版-2),而 *gsdf*^{-/-} XY 卵母细胞中,*Tsn* 蛋白大量聚集在细胞质,只有少量附着在细胞核内(图版-8 白色箭头所示);抗 *Igf2BP3* 信号在减数分裂早期(细线期,偶线期)卵母细胞的细胞核中,随着卵母细胞发育到双线期,该信号转移至细胞质。这表明 *Igf2BP3* 与 *Tsn* 蛋白质产物进出细胞核的动态变化,可能同生殖细胞减数分裂特定时期的染色体复制和亚细胞

结构变化有关。

与此同时,根据抗 *Tsn*/抗 *Igf2BP3* 双色免疫荧光结果发现,*gsdf*^{-/-} XY 卵巢中,*Igf2BP3* 在早期生殖细胞的细胞质中与 *Tsn* 共同表达(图版-8 中*),然而有一部分 *Tsn* 表达的囊性生殖细胞异常增殖,这部分囊性生殖细胞没有表达 *Igf2BP3*(图版-6,7)。本研究在早期发现的 *gsdf*^{-/-} XY 卵巢囊性生殖细胞异常增殖的基础上^[19],发现了 *Tsn* 的表达量以及进出细胞核的胞内动态变化同 *Gsd f* 信号相关联,并且 *Tsn* 在 *Gsd f* 缺失的异质化有丝分裂囊性增殖的生殖细胞中大量表达,提示了 *Tsn* 可能同 *Igf2BP3* 和/或其他 RNA 结合蛋白

一起,参与 RNA 代谢并介导囊性生殖细胞的增殖和凋亡。而 Tsn 如何参与调控生殖细胞发育和性分化,最终产生精子或卵细胞的分子机制还有待研究。

综上所述,本研究以青鳉为模式生物发现了 Tsn 是潜在的雄性生殖细胞增殖的分子标志物,可能受 *dmy-gsdf* 信号直接或间接调控,参与生殖细胞有丝分裂和增殖,并介导生殖细胞从有丝分裂向减数分裂转换。青鳉 Gsdf 调控 Tsn 介导的生殖细胞增殖以及胞内动态变化为研究脊椎动物配子发生和性分化提供了线索。

参考文献:

- [1] YOUNG J C, WAKITANI S, LOVELAND K L. TGF- β superfamily signaling in testis formation and early male germline development [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 45: 94-103.
- [2] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2016, 8(5): a021873.
- [3] RAJA-KHAN N, URBANEK M, RODGERS R J, et al. The role of TGF- β in polycystic ovary syndrome [J]. *Reproductive Sciences*, 2014, 21(1): 20-31.
- [4] ZHANG X, GUAN G J, LI M Y, et al. Autosomal *gsdf* acts as a male sex initiator in the fish medaka [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 19738.
- [5] SHIBATA Y, PAUL-PRASANTH B, SUZUKI A, et al. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka [J]. *Gene Expression Patterns*, 2010, 10(6): 283-289.
- [6] IMAI T, SAINO K, MATSUDA M. Mutation of gonadal soma-derived factor induces medaka XY gonads to undergo ovarian development [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 467(1): 109-114.
- [7] GUAN G J, SUN K Q, ZHANG X, et al. Developmental tracing of oocyte development in gonadal soma-derived factor deficiency medaka (*Oryzias latipes*) using a transgenic approach[J]. *Mechanisms of Development*, 2017, 143: 53-61.
- [8] YAN Y L, DESVIGNES T, BREMILLER R, et al. Gonadal soma controls ovarian follicle proliferation through Gsdf in zebrafish[J]. *Developmental Dynamics*, 2017, 246(11): 925-945.
- [9] ZHANG X T, CHANG Y Y, ZHAI W Y, et al. A potential role for the Gsdf-eEF1 α complex in inhibiting germ cell proliferation: a protein-interaction analysis in medaka (*Oryzias latipes*) from a proteomics perspective [J]. *Molecular and Cellular Proteomics*, 2021, 20: 100023.
- [10] ISHIDA R, OKADO H, SATO H, et al. A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division[J]. *FEBS Letters*, 2002, 525(1/3): 105-110.
- [11] CHENNATHUKUZI V, STEIN J M, ABEL T, et al. Mice deficient for testis-brain RNA-binding protein exhibit a coordinate loss of TRAX, reduced fertility, altered gene expression in the brain, and behavioral changes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(18): 6419-6434.
- [12] HAN J R, GU W, HECHT N B. Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs[J]. *Biology of Reproduction*, 1995, 53(3): 707-717.
- [13] HAN J R, YIU G K, HECHT N B. Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(21): 9550-9554.
- [14] M'BAYE M, HUA G H, KHAN H A, et al. RNAi-mediated knockdown of *INHBB* increases apoptosis and inhibits steroidogenesis in mouse granulosa cells [J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2015, 61(5): 391-397.
- [15] GAO Y, FANG X, VINCENT D F, et al. Disruption of postnatal folliculogenesis and development of ovarian tumor in a mouse model with aberrant transforming growth factor beta signaling [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2017, 15(1): 94.
- [16] SUSEENDRANATHAN K, SENGUPTA K, RIKHY R, et al. Expression pattern of *Drosophila* translin and behavioral analyses of the mutant[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2007, 86(3): 173-186.
- [17] HAMMER N A, HANSEN T V O, BYSKOV A G, et al. Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer[J]. *Reproduction*, 2005, 130(2): 203-212.
- [18] CHO Y S, CHENNATHUKUZI V M, HANDEL M A, et al. The relative levels of translin-associated factor X (TRAX) and testis brain RNA-binding protein determine their nucleocytoplasmic distribution in male germ cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 31514-31523.
- [19] WU X W, ZHANG Y Q, XU S M, et al. Loss of Gsdf leads to a dysregulation of Igf2BP3-mediated oocyte development in medaka[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 277: 122-129.

Cloning and expression analysis of *tsn* in medaka (*Oryzias latipes*)

WANG Siyu^{1,2,3}, GUO Haiyan^{1,2,3}, LI Xi^{1,2,3}, LIAO Min^{1,2,3}, LI Yayuan^{1,2,3}, GUAN Guijun^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Although mechanisms of sex determination in sexual reproduction are diverse, there is a common feature of germ cells to undergo mitotic division and proliferation, following the entry of meiosis to develop oocyte or sperm. It is unclear whether germ cells are sexually dimorphic during the mitotic proliferation prior to the onset of meiosis, or how spermatogenesis or oogenesis is initiated. Tsn (Translin) protein products were significantly higher in *gsdf* deficient (*gsdf*^{-/-}) XY ovaries than that in normal (*gsdf*^{+/+}) XX ovaries, revealed by the proteomic expression profiles among normal (*gsdf*^{+/+}) XX ovaries, normal (*gsdf*^{+/+}) XY testises and *gsdf* (gonadal soma-derived factor) deficient (*gsdf*^{-/-}) ovaries in medaka (*Oryzias latipes*), suggesting that Tsn protein expression might be regulated by *dmy* (DM domain on Y chromosome) and downstream *Gsdf* male signals in gonad development. The full-length Open Reading Frame (ORF) fragment of *tsn* was cloned from gonadal cDNA libraries in medaka. Phylogenetic tree and alignment of amino acid sequence analysis shows that Tsn is well conserved in vertebrates with the high homology of amino acid sequence sharing between medaka and zebrafish (*Danio rerio*). Although the *tsn* transcription was detectable in multiple tissues by reverse transcription PCR and real-time quantitative PCR, the testicular level of *tsn* mRNA was significantly higher than that of ovaries in medaka. Immunofluorescence revealed that cystic germ cells positive to anti-medaka Tsn antibody were significantly increased in *gsdf*^{-/-} XY ovaries than that in *gsdf*^{+/+} XX ovaries as a control. This is consistent with the previous report of high Tsn protein products in *gsdf*^{-/-} XY ovaries detected by the high-throughput proteomics analysis. A conclusion has been drawn that Tsn-mediated germ cell proliferation was promoted in male pathway under the regulation of *dmy* (DM-domain on Y chromosome) but inhibited by *Gsdf* signaling. Lack of *Gsdf* released the inhibition of Tsn expressing germ cell proliferation during medaka testicular differentiation. The results may provide clues for defining sexual difference between male and female germ cells in the process of vertebrate mitosis and proliferation.

Key words: *gsdf*; *tsn*; germ cell; sex differentiation; ovary; medaka