

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221230001

http://www.yykxjz.cn/

晏科文, 马晓东, 史宝, 程汉良, 王重女, 赵新宇. 半滑舌鲷生物钟相关基因克隆及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析. 渔业科学进展, 2024, 45(3): 101-116

YAN K W, MA X D, SHI B, CHENG H L, WANG C N, ZHAO X Y. Cloning and expression analysis of clock genes during ovarian development and maturation of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Progress in Fishery Sciences, 2024, 45(3): 101-116

半滑舌鲷生物钟相关基因克隆 及在卵巢发育成熟过程中表达特征分析*

晏科文^{1,2} 马晓东² 史宝^{1,2①} 程汉良¹ 王重女² 赵新宇^{1,2}

(1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院 江苏 连云港 222005; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 青岛海洋科技中心海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

摘要 为阐明生物钟相关基因在半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)卵巢成熟过程中的作用及机制, 采集性成熟半滑舌鲷不同发育期的卵巢组织提取总 RNA, 通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术对5个核心生物钟基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的编码区(CDS)序列进行克隆和序列分析。结果显示, *Clock1a* 的 CDS 序列编码 712 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PASD1 和 PAS11。*Bmal1a* 的 CDS 序列编码 626 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PASD3 和 PAS11。*Cry1a* 和 *Cry2* 的 CDS 序列分别编码 631 个、669 个氨基酸, 序列中均有功能性结构域 FAD7。*Per2* 的 CDS 序列编码 1 415 个氨基酸, 序列中有功能性结构域 PeriodC 和 PAS11。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析 5 个生物钟基因 mRNA 在性成熟半滑舌鲷卵巢不同发育期的表达特性, 发现 5 个生物钟基因存在性腺发育周年表达规律, 且在卵巢 II 期和 III 期相对高表达($P<0.05$), 在卵巢 IV、V 和 VI 期相对低表达, 这说明生物钟基因对半滑舌鲷的卵巢发育成熟起到重要的调节作用。研究结果为进一步探究生物钟基因调控半滑舌鲷卵巢发育成熟的机制提供了重要参考, 为提高半滑舌鲷的繁育效率提供了理论基础。

关键词 生物钟基因; 半滑舌鲷; 卵巢; 周年表达规律

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2024)03-0101-16

生物钟包括视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)中枢生物钟与各组织外周生物钟(Yu, 2017; Khan *et al*, 2016)。生物钟基因(BioClock genes)广泛存在于真核生物的神经中枢和外周组织中, 参与调节生物机体众多生理活动。真核生物的诸多生理活动存在周期性, 这是由于内源性节律变化的存在, 这种节律

变化统称为生物学节律。生物钟核心环路由 Clock:Bmal 组成的正调节因子和 Per:Cry 组成的负调节因子构成, 呈现出核心生物钟的负反馈环路调节, 继而影响松果体(pineal gland, PG)中褪黑素(melatonin, MLT)的合成节律, MLT 又通过影响“脑/下丘脑-脑垂体-性腺”轴(brain/hypophysis-pituitary-

* 国家重点研发计划项目(2022YFD2400401)、国家自然科学基金项目(31772829)、山东省重点研发计划项目(2021LZGC028)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022023023; 2020TD47)和国家现代农业产业技术体系(CARS-47)共同资助。晏科文, E-mail: yankewen1201@126.com

① 通信作者: 史宝, 副研究员, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2022-12-30, 收修改稿日期: 2023-02-01

gonad axis, BPG 轴)中的下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的分泌, GnRH 调节垂体前叶远端部(pars distalis, PD)促黄体激素(luteinizing hormone, LH)和促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的分泌, 最终导致鱼类及其他动物的生殖机能呈现周期性变化(Keisuke *et al*, 2016; Saha *et al*, 2019; Zhang D *et al*, 2022)。

随着生物钟基因在生物机体内的作用逐渐被揭示, 关于生物钟基因在生物繁殖过程中的作用引起了国内外相关领域研究者的重视。目前, 对生物钟基因节律变化的研究以日变化规律为主。诸多研究发现, 生物钟基因在哺乳类、禽类、鱼类和甲壳类的性腺中的表达存在着日节律(Takashi *et al*, 2000; Chen *et al*, 2017; Saha *et al*, 2019)。随着季节的更替, 一年中的日照时长、温度等季节性因素有着规律性的变化, 生物钟基因的表达也存在着相应的季节性变化规律。在旗鱼(*Xiphias gladius*)、大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)、日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)、马岗鹅、小鼠(*Mus musculus*)、苏尼特羊(*Ovis aries*)的卵巢中, 均发现生物钟基因的表达存在季节性变化规律(Davie *et al*, 2009; Wharfe *et al*, 2011; Chen *et al*, 2017; Takashi *et al*, 2017; 劳永聪等, 2019; 向光明等, 2019a、b; Basili *et al*, 2021)。Wharfe 等(2011)研究发现, 非繁殖期小鼠卵巢中 *Clock*、*Bmal*、*Cry1*、*Cry2*、*Per1* 和 *Per2* 基因表达量高于繁殖期, 并证明了生物钟基因在性成熟小鼠卵巢中的表达存在月周期性规律, 同时, 发现母体皮质酮的分泌与 *Clock*、*Bmal1* 和 *Per2* 的表达密切相关, 推测生物钟基因与蛋白质、脂肪和糖类的代谢存在关联。向光明等(2019a、b)通过对比季节性发情的苏尼特羊和常年发情的小尾寒羊(*O. aries*)卵巢中 *Per1*、*Per2* 基因的表达差异发现, 生物钟基因在苏尼特羊卵巢中存在季节性表达规律, 同时, 推测 *Per1*、*Per2* 基因的高表达不利于绵羊的发情。Basili 等(2021)通过对繁殖季节(6—8月)和非繁殖季节(10—12月)捕获的雌性旗鱼进行研究, 发现非繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节, 且生物钟基因的季节性表达可调节 MLT 的表达量, 证明生物钟基因可参与调节旗鱼卵巢的成熟, 同时证明生物钟基因在鱼类卵巢组织中的表达也存在着季节性变化规律, 但受到旗鱼习性影响, 该研究未能对性成熟旗鱼卵巢组织的完整发育周期中生物钟基因的表达规律进行探究。

半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)是我国北方名贵的海水养殖鱼类。众多研究表明, 鱼类的繁殖主要

受具有周期性的光照和温度等因素的影响; 在繁殖过程中, 生物钟基因也存在周期性表达。关于生物钟基因与鱼类繁殖调控机制之间的研究逐渐兴起(Herrero *et al*, 2014; Pérez *et al*, 2019)。本研究以半滑舌鲷为研究对象, 克隆其生物钟核心环路的正负调节因子(*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2*)基因, 并分析其在 II、III、IV、V 和 VI 期卵巢组织中的表达变化规律, 以期丰富半滑舌鲷等海水硬骨鱼类繁育理论, 并更好地提高半滑舌鲷的繁育技术与苗种生产效率。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼及样品处理

实验用半滑舌鲷取自本实验室在山东省日照市的培育基地, 卵巢发育不同时期所用半滑舌鲷选自 300 尾人工养殖达到性成熟(3 龄以上)的雌鱼, 体重为 $(1\ 795.7 \pm 82.5)$ g。实验用鱼的培育条件: 在室内水泥池中(5 m × 5 m × 1 m)流水培育(日换水率达到 600%), 水温为 8~25 °C, 盐度为 28~31, pH 为 7.8~8.4, 溶解氧(DO)为 5 mg/L 以上, 每日光照 14 h, 每日饲喂 2 次虾和干饲料。人工控制水温和光照周期来调控亲鱼性腺发育成熟, 不同繁殖期在相同亲鱼培育池中随机选取 4 尾半滑舌鲷雌鱼, 连续采集 1 年。解剖前先用 240 mg/L 的 MS-222 麻醉, 通过将塑料管插入泄殖孔取少量卵母细胞进行活检, 初判卵巢的发育阶段(Shi *et al*, 2016)。在卵巢发育的各个阶段, 选取符合采样要求的 4 尾半滑舌鲷雌鱼, 采用 MS-222 (240 mg/L) 将半滑舌鲷雌鱼麻醉后迅速进行解剖, 切取适量半滑舌鲷卵巢组织放入无 RNA 酶 EP 管中并立即放入液氮中, 转至实验室置于超低温冰箱(-80 °C)中保存留用。留取每个个体适量的卵巢中段, 固定在 Bouin's 固定液中。根据本实验室半滑舌鲷卵巢发育期判定标准对所取卵巢组织样品所处发育阶段进行判断(Shi *et al*, 2015、2016)。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成

取保存于-80 °C 的 II、III、IV、V 和 VI 期半滑舌鲷卵巢组织, 参照艾科瑞生物的 RNAex Pro RNA 提取试剂(AG21101)操作说明提取卵巢组织的总 RNA, 通过 NanoDrop 2000C 超微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 确保 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间, RNA 浓度在 300~500 ng/μL 之间。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 的完整性, 28S 条带亮度达到 18S 条带的 2 倍则为纯度高且完整的 RNA 提取样品。将装有符合要求的 RNA 样品的离心管短暂离心

后置于-80℃保存。

取1 μg III期卵巢组织的总RNA,参照TaKaRa公司的PrimerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis反转录试剂盒(6110A)说明,反转录成cDNA模板,置于-20℃保存备用。

1.3 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因克隆和序列测定

在NCBI的GenBank数据库中搜索鱼类*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的同源cDNA序列,并分析*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的编码区和保守区,采用Primer 6.0设计特异性引物(表1)。使用Bio-Rad S1000 PCR仪(伯乐,新加坡),按照TaKaRa公司的Taq™ HS Perfect Mix (R300A)操作说明进行克隆。PCR扩增体系:TaKaRa Taq HS Perfect Mix (2×) 12 μL, cDNA模板1 μL,上下游引物各1 μL,灭菌水补至25 μL。PCR扩增条件:95℃ 5 min,之后35个循环(95℃ 5 s, T_m 30 s, 72℃, 1.5 min), 72℃ 5 min,最后4℃保存。*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*的 T_m 分别为51、54、52、53和53℃。

半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后,使用北京天根生化的TIANGel Midi Purification Kit (DP209)对目的片段进行回收并纯化。回收的*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*的PCR产物与TaKaRa公司的pMD™19-T Vector载体(D102A)连接,转化至T感受态细胞中,挑取其中的阳性克隆,送至睿博兴科生物技术有限公司测序。

1.4 基因序列分析

使用DNAMAN 6.0软件将测序所得的序列片段

表1 半滑舌鲷生物钟基因克隆所用引物

Tab.1 Cloning primer of BioClock genes in *C. semilaevis*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')
Clock1a-F	GAGCAAGAGCACAGGGAT
Clock1a-R	TAAATGGGCGGTGGC
Bmal1a-F	CGGCTGGGATTCGTT
Bmal1a-R	TTCTTCTGTTTGGGACTCTA
Cry1a-F	TTGGCAAGGAGCGAGAT
Cry1a-R	CAGGAAAGCTGCTGGTAGA
Cry2-F	CCTCTGCCTGTCATCACTC
Cry2-R	TGCTGCGTCGTATCTTGT
Per2-F	TCCGCCTGAATGAACCT
Per2-R	CACTGGTGGAGGGATTGT

进行对比拼接,获得半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的完整编码区(ORF)序列并推导其氨基酸序列;利用NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行结构域的预测;利用Jalview进行多重序列比对;利用DNAMAN 6.0进行序列同源性分析;利用在线软件ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/)推断氨基酸序列的分子量及等电点;利用软件MEGA7通过邻接法(NJ)构建进化树,1000次自举(bootstrap)重复检验进化树的置信度。

1.5 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在繁殖周期的表达分析

以克隆获得的半滑舌鲷*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因序列为模板,设计定量引物(表2),同时,以半滑舌鲷18S基因作为内参基因,合成其特异性引物(表2),引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。使用Mastercycler ep realplex Real-time PCR仪(Eppendorf),按照TaKaRa Ex Taq®(Mg²⁺ free Buffer)(TaKaRa)操作说明进行PCR扩增。qRT-PCR扩增体系:TaKaRa Ex Taq (5 U/μL) 0.125 μL, 10×Ex Taq Buffer (Mg²⁺ free) 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP Mixture (各2.5 mmol/L) 2 μL, cDNA模板1 μL,上下游引物各1 μL,灭菌水补至25 μL。qRT-PCR扩增条件:95℃预变性30 s,之后40个循环(95℃ 5 s, T_m 30 s, 72℃ 30 s),*Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2*和*Per2*基因的 T_m 分别为50.5、53.6、52.3、53和52.5℃。以18S作为内参基因对样品中RNA的量进行校正。程序运行结束后,对熔解曲线进行分析,检验产物特异性。实验样品设3个平行,并设阴性对照(cDNA模板用灭菌水代替),以确定实验结果的可靠性。

1.6 数据处理与分析

基因相对表达量参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al*, 2001)法计算,结果以平均值±标准误(Mean±SE)表示。采用SPSS 26进行单因素方差分析(one-way ANOVA)与Duncan多重比较, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷*Clock1a*和*Bmal1a*的序列和结构特征

从半滑舌鲷卵巢内分离得到了*Clock1a*和*Bmal1a*基因cDNA序列,并分别获得了NCBI登录号OQ054330和OQ054331。*Clock1a*基因的编码区

表 2 半滑舌鲷生物钟基因表达分析所用引物
Tab.2 Primers for expression of BioClock genes in *C. semilaevis*

Table with 2 columns: 引物名称/Primer name and 引物序列/Primer sequence (5'~3'). Rows include Clock1a-F, Clock1a-R, Bmal1a-F, Bmal1a-R, Cry1a-F, Cry1a-R, Cry2-F, Cry2-R, Per2-F, Per2-R, 18S-F, and 18S-R.

序列长为 2 139 bp, 编码 712 个氨基酸, 分子量为 81.9 kDa, 等电点为 6.35, 序列中存在保守性较强的 PAS11 (由 271~373 位的 103 个氨基酸组成)、PASD1 (由 28~91 位的 64 个氨基酸组成)结构域(图 1)。*Bmal1a* 基

因的编码区序列长为 1 881 bp, 编码 626 个氨基酸, 分子量为 68.9 kDa, 等电点为 6.35, 序列中存在保守性较强的 PAS11 (由 71~134 位的 63 个氨基酸组成)、PASD3 (由 343~446 位的 103 个氨基酸组成)结构域(图 2)。

2.2 半滑舌鲷 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的序列和结构特征

从半滑舌鲷卵巢得到 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因 cDNA 序列, NCBI 登录号分别为 OQ054332、OQ054333 和 OQ054334。*Cry1a* 基因的编码区序列长为 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸, 分子量为 71.4 kDa, 等电点为 8.12, 序列中存在功能性结构域 FAD7 (由 288~486 的 199 个氨基酸组成)(图 3)。*Cry2* 基因的编码区序列长为 2 007 bp, 编码 669 个氨基酸, 分子量为 76.0 kDa, 等电点为 6.18, 序列中存在功能性结构域 FAD7 (由 288~486 位的 199 个氨基酸组成)(图 4)。*Per2* 基因的编码区序列长为 4 248 bp, 编码 1 415 个氨基酸, 分子量为 154.0 kDa, 等电点为 5.99, 序列中存在功能性结构域 PAS11 (由 373~474 位的 102 个氨基酸组成)和保守性较强的 PeriodC (由 1 190~1 384 位的 295 个氨基酸组成)(图 5)。

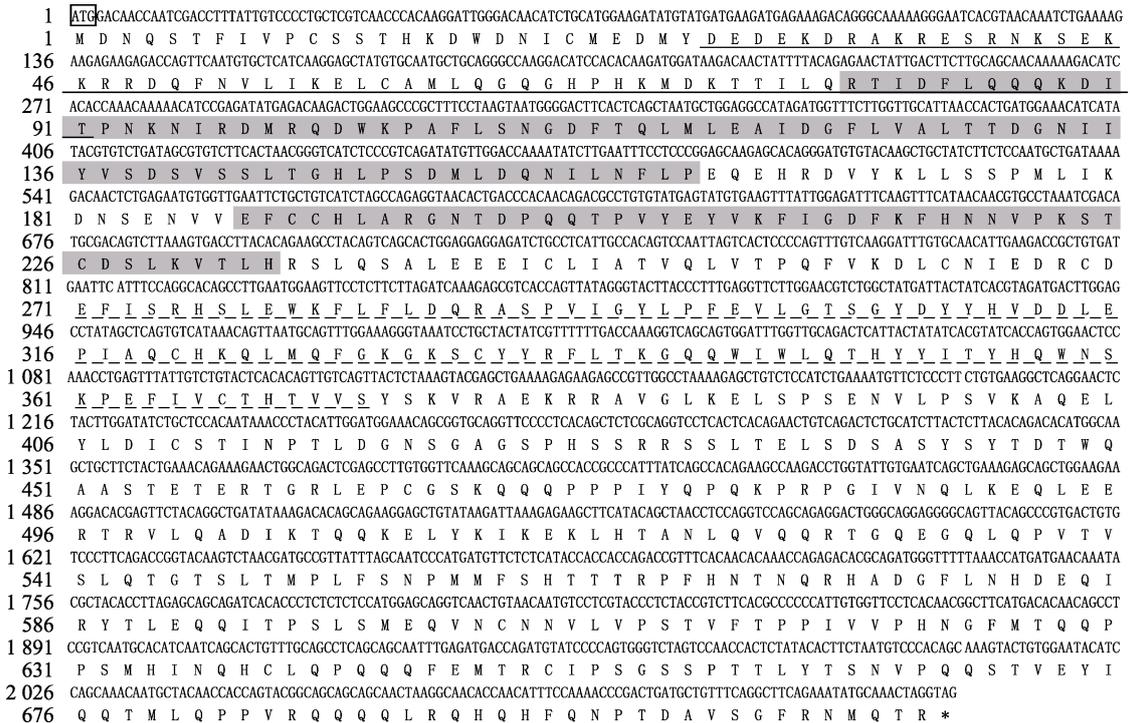


图 1 半滑舌鲷 *Clock1a* 基因 ORF 序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Open reading frame sequence of *C. semilaevis Clock1a* gene and the deduced amino acid sequence

方框部分: 起始密码子; 下划线: 功能结构域 PASD1; 虚下划线: 功能结构域 PAS11; 阴影部分: 保守序列; 终止密码子用*表示。

Start codon is marked with frame. Functional domain PASD1 is marked with underline. Functional domain PAS11 is indicated with virtual underline. Conserved sequence is marked in gray, and the termination codon is denoted by *.

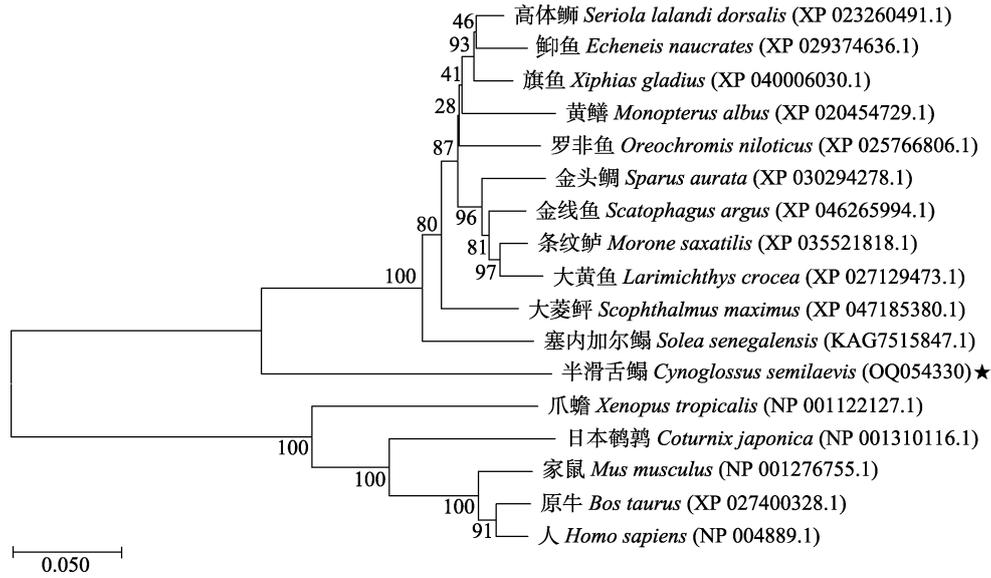


图 6 Clock1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.6 Phylogenetic tree based on Clock1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

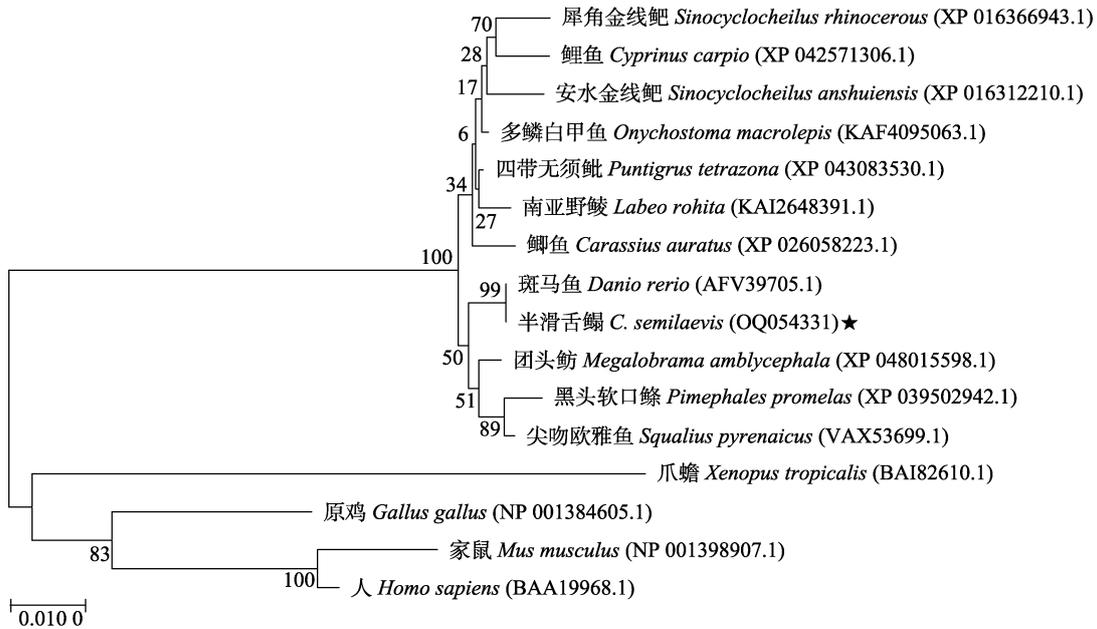


图 7 Bmal1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.7 Phylogenetic tree based on Bmal1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

序列与其他鱼类的 Cry1a 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 Cry1a 氨基酸序列与多个物种的 Cry1a 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 Cry1a 与塞内加尔鲷的同源性为 88%,与鲷鱼的同源性为 89%,与龟壳攀鲈的同源性为 88%,与爪蟾(XP 031753830.1)的同源性为 78%,与日本鹌鹑(XP 015719355.1)的同源性为 78%,与人(AAH 30519.1)的同源性为 82%。半滑舌鲷的 Cry1a 与其他硬骨鱼类及哺乳类、禽类、两栖类等同源性均

较高,说明 Cry1a 在进化进程中保守性较高(图 8)。

对半滑舌鲷 Cry2 氨基酸序列与高体鲷(*Seriola dumerili*: XP 022611640.1)、大刺鲈(*Mastacembelus armatus*: XP 026166734.1)、射水鱼(*Toxotes jaculatrix*: XP 040893925.1)的 Cry2 氨基酸序列进行比对并绘制多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 9)。发现半滑舌鲷的 Cry2 氨基酸序列与其他鱼类的 Cry2 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷和多个物种的 Cry2 氨基酸序列的同源性进行分

析。结果显示, 半滑舌鲷 Cry2 与高体鲷的同源性为 93%, 与大刺鲷的同源性为 94%, 与射水鱼的同源性为 93%, 与爪蟾(XP 031756344.1)的同源性为 68%, 与原鸡(NP 989575.1)的同源性为 70%, 与人(ABM

64210.1)的同源性为 70%。半滑舌鲷的 Cry2 与其他硬骨鱼类的同源性极高, 与哺乳类、禽类、两栖类等同源性也较高, 说明 Cry2 在进化进程中保守性较高, 与其他硬骨鱼类间具有极高的同源性(图 9)。

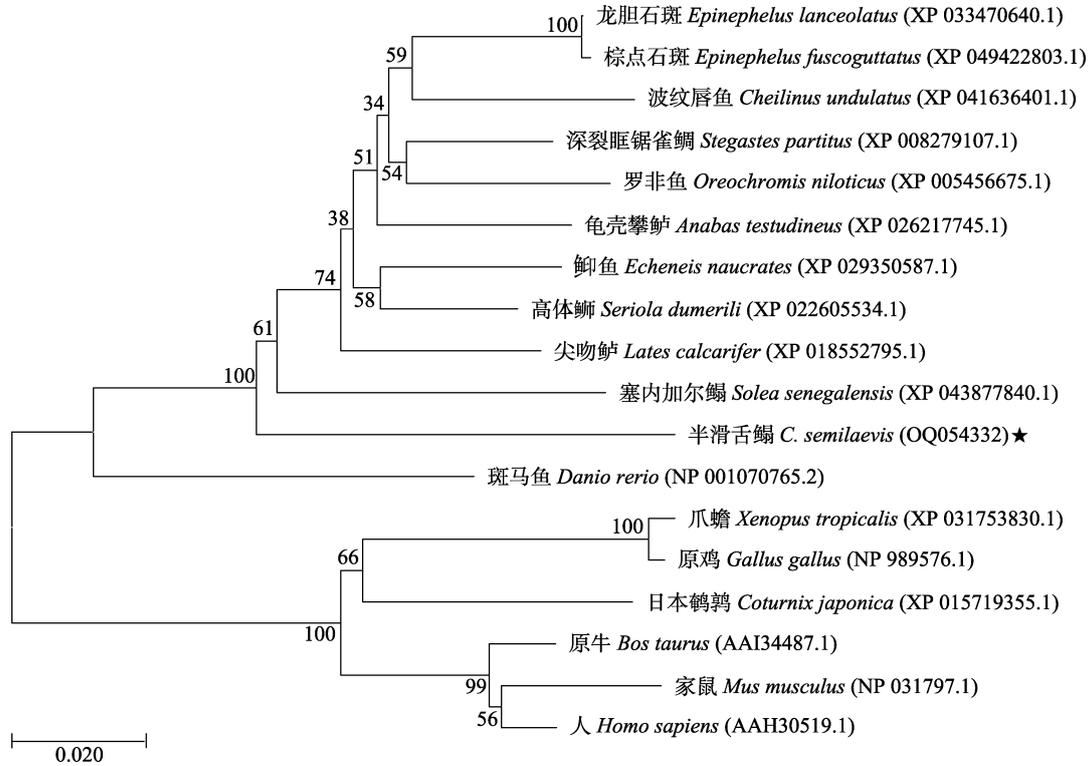


图 8 Cry1a 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.8 Phylogenetic tree based on Cry1a amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

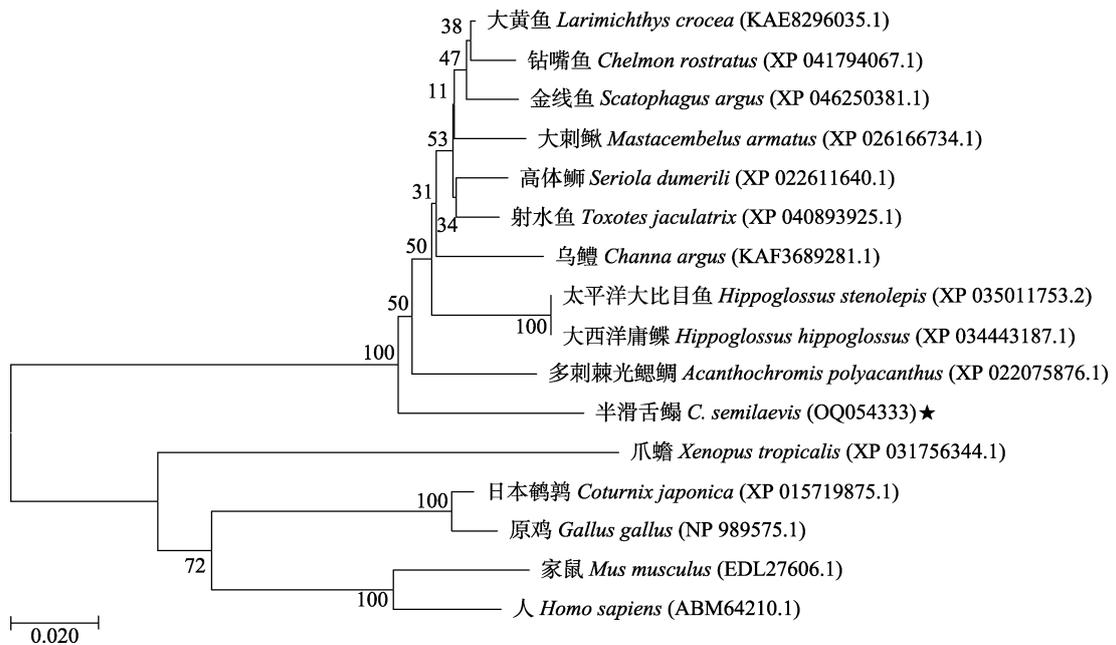


图 9 Cry2 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.9 Phylogenetic tree based on Cry2 amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

对半滑舌鲷 *Per2* 氨基酸序列与尖吻鲈鱼(*Lates calcarifer*: XP 018539634.1)、射水鱼(XP 040903216.1)、大刺鳅(XP 026175360.1)的 *Per2* 氨基酸序列进行比对并绘制了多个物种基于氨基酸序列的 NJ 系统进化树(图 10)。发现半滑舌鲷的 *Per2* 氨基酸序列与其他鱼类的 *Per2* 氨基酸序列较为保守,且在进化树上聚为一簇。对半滑舌鲷的 *Per2* 氨基酸序列与多个物种的 *Per2* 氨基酸序列同源性进行分析,结果显示,半滑舌鲷 *Per2* 与尖吻鲈鱼和射水鱼的同源性为 84%,与大刺鳅的同源性为 82%,与爪蟾(XP 031757399.1)的同源性为 61%,与日本鹌鹑(NP 001310155.1)的同源性为 67%,与人(NP 073728.1)的同源性为 71%。半滑舌鲷的 *Per2* 与其他硬骨鱼类的同源性极高,与哺乳类、禽类、两栖类等同源性也较高,说明 *Per2* 在进化进

程中保守性较强(图 10)。

2.5 *Clock1a* 和 *Bmal1a* 在半滑舌鲷卵巢不同发育时期的表达特性

在性成熟半滑舌鲷卵巢的不同发育时期, *Clock1a* mRNA 在卵巢 II 和 III 期表达量显著增加,在 III 期达到最大值($P<0.05$),随后急剧下降,在 V 期达到最小值($P<0.05$),在 VI 期又显著增加($P<0.05$)。 *Clock1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 1.78 倍,是 V 期的 8.31 倍(图 11A)。 *Bmal1a* mRNA 从卵巢 II 期至 III 期表达量增加至最大值,随后显著下降,在 V 期达到最小值($P<0.05$),随后逐渐增加。 *Bmal1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 1.36 倍,是 V 期的 4.28 倍(图 11B)。

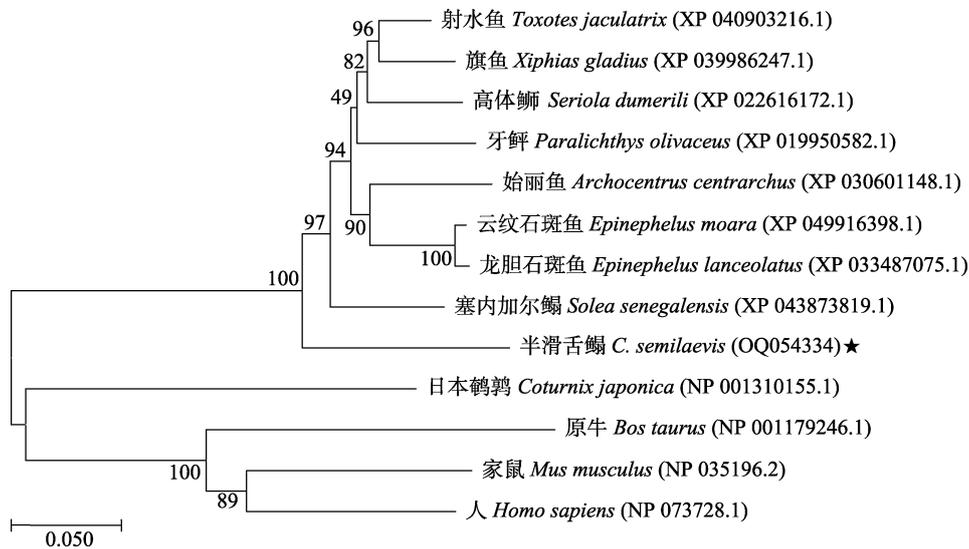


图 10 *Per2* 氨基酸序列的系统进化树分析(枝上数字表示自展值)

Fig.10 Phylogenetic tree based on *Per2* amino acid sequences (Numbers on branches indicate bootstrap support values)

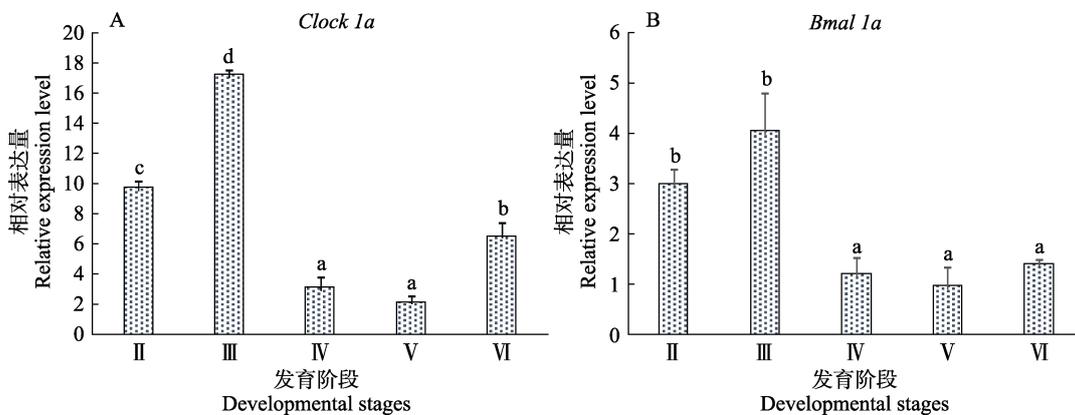


图 11 半滑舌鲷卵巢不同发育时期的 *Clock1a* 和 *Bmal1a* mRNA 表达分析

Fig.11 Expression profiles of *Clock1a* and *Bmal1a* mRNA in the different developmental stages of ovary in *C. semilaevis*

不同字母间差异显著($P<0.05$)。下同。

Different letters represent significant difference ($P<0.05$). The same as below.

2.6 *Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 在半滑舌鳎卵巢不同发育时期的表达特性

在性成熟半滑舌鳎卵巢的不同发育时期, *Cry1a* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 V 期达到最小值($P<0.05$), 在 VI 期略有升高。*Cry1a* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.35 倍, 是卵巢 V 期的 16.29 倍(图 12A)。*Cry2* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增

加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 IV 期达到最小值($P<0.05$), 随后逐渐增加。*Cry2* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.16 倍, 是 V 期的 9.50 倍(图 12B)。*Per2* mRNA 在卵巢 II~III 期表达量显著增加, 在 III 期达到最大值($P<0.05$), 随后急剧下降, 在 IV 期达到最小值($P<0.05$), 随后无明显变化。*Per2* mRNA 在卵巢 III 期的表达量是 II 期的 2.76 倍, 是 V 期的 3.09 倍(图 12C)。

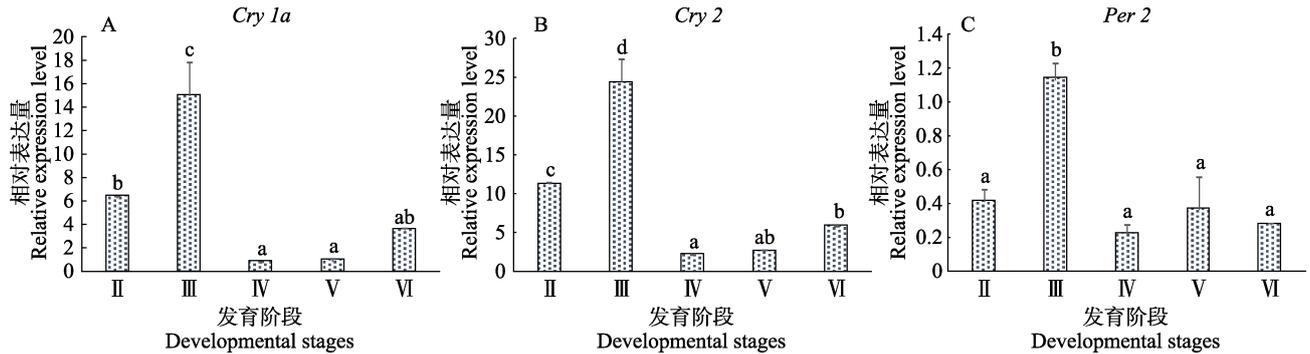


图 12 半滑舌鳎卵巢不同发育时期的 *Cry1a*、*Cry2*、*Per2* mRNA 表达分析

Fig.12 Expression profiles of *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* mRNA in the different developmental stages of ovary in *C. semilaevis*

3 讨论

本研究利用克隆技术获得了半滑舌鳎的生物钟相关基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的编码区序列。经预测均未发现跨膜结构域和信号肽。*Clock1a* 氨基酸序列中发现功能性结构域 PASD1 和 PAS11。*Bmal1a* 氨基酸序列中发现功能性结构域 PASD3 和 PAS11。PAS11、PASD1、PASD3 是 PAS (PER-ARNT-SIM)同源结构域, 结构域 PAS 可与结构域 bHLH 形成的功能性 DNA 结合复合物 bHLH: PAS, 与顺式元件 E-box 结合激活靶基因的转录, 形成 Clock: Bmal 异二聚体的转录因子(Marco *et al*, 2004; Bian *et al*, 2017)。在青鳉(*Oryzias latipes*)的 *Clock1* 和 *Bmal1* 序列中也存在功能性结构域 PAS-A 和 PAS-B, 且在功能性结构域 PAS-A 上发现了参与形成 Clock: Bmal 异二聚体的氨基酸残基 Ala174、Ala175 和 Leu179 (Teika *et al*, 2019)。半滑舌鳎 *Clock1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PASD1、PAS11 以及 *Bmal1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PASD3、PAS11 可能与 E-box 结合, 在半滑舌鳎生物钟基因环路调节过程中起到促进 Clock: Bmal 异二聚体形成的作用, 正向调节生物钟基因环路。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a* 与其他硬骨鱼类的

同源性分别达到 60%~79%、94%~100%, 与爪蟾同源性分别为 47%、84%, *Clock1a* 与日本鹌鹑同源性为 46%, *Bmal1a* 与原鸡同源性为 88%, 与人同源性分别为 46%、88%。在构建的进化树中, 半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a* 序列分别与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Clock1a*、*Bmal1a* 序列分别聚为一簇。说明, 半滑舌鳎 *Clock1a* 基因在进化进程中出现了进化差异, 但在硬骨鱼类中保守性较强, *Bmal1a* 基因则在脊椎动物进化进程中保守性强。

Cry1a 氨基酸序列中发现功能性结构域 FAD7。*Cry2* 氨基酸序列发现功能性结构域 FAD7; 并且 *Cry1a* 和 *Cry2* 序列中 FAD7 同源性达到 75%。*Cry* 包含一个光解酶同源区(PHR), PHR 由初级口袋(与功能性结构域 FAD 结合)、次级口袋和扩展的 C 端区域组成, *Cry* 通过 PHR 结构域上 2 个不同的区域直接与 Clock 和 Bmal 相互作用(Gul *et al*, 2020)。当 *Cry*: *Per* 异二聚体与 Clock: Bmal 异二聚体结合后, *Cry* 氨基酸序列中的 FAD7 结构域通过切除 Clock: Bmal 异二聚体氨基酸序列中的胸腺嘧啶二聚体使其序列发生改变, 从而不能与 E-box 结合, 实现负反馈调节(Saha *et al*, 2019)。在欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)的 *Cry1* 和 *Cry2* 序列中发现了功能性结构域 FAD7 (Pozo *et al*, 2012)。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *Cry1* 序列中发现了功能性结构域 FAD (Zhang *et al*, 2022)。在哺

乳动物黑线仓鼠(*Cricetulus barabensis*)的 *Cry1* 和 *Cry2* 序列中也发现了功能性结构域 FAD (朱涵毅等, 2019)。半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 氨基酸序列中的功能性结构域 FAD7 可能通过抑制 Clock:Bmal 异二聚体与 E-box 结合, 在半滑舌鳎生物钟基因环路调节过程中起到抑制 Clock:Bmal 异二聚体形成的作用, 逆向调节生物钟基因环路。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 与其他硬骨鱼类的同源性分别达到 85%~91%和 84%~94%, 与爪蟾的同源性分别为 78%和 68%, *Cry1a* 与日本鹌鹑的同源性为 78%, *Cry2* 与原鸡的同源性为 70%, 与人的同源性分别为 82%和 70%。在构建的进化树中, 半滑舌鳎 *Cry1a* 和 *Cry2* 分别与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Cry1* 和 *Cry2* 聚为一簇。说明半滑舌鳎 *Cry1a* 基因在进化进程中保守性较强, *Cry2* 基因在进化进程中出现了进化差异, 但在硬骨鱼类中保守性较强。同时, 半滑舌鳎 *Cry1a* 与 *Cry2* 的同源性达 62%, 表明 2 种半滑舌鳎 *Cry* 基因在进化进程中出现了进化差异。

Per2 氨基酸序列中发现功能性结构域 PeriodC 和 PAS11。在卡氏欧雅鱼(*Squalius carolitertii*)、尖吻欧雅鱼、勐欧雅鱼(*S. torgalensis*)、阿拉丁欧雅鱼(*S. aradensis*)等 4 种硬骨鱼生物钟基因适应与趋同的研究中发现, *Per* 序列中有功能性结构域 PAS3 或 PAS11, 以及末端区域的功能性结构域 PeriodC。功能性结构域 PeriodC 可与 *Clock1a* 和 *Bmal1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 结合, 功能性结构域 PAS 具有光接收活性且在蛋白质形成二聚体的过程中发挥作用, 功能性结构域 PeriodC 可能在 FAD7 切除 Clock:Bmal 异二聚体氨基酸序列中的胸腺嘧啶二聚体的过程中发挥作用(Moreno *et al*, 2021)。在瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachellii*)的 *Per2* 氨基酸序列中存在功能性结构域 PAS(Qin *et al*, 2021)。王明勇等(2012)研究发现, 斑马鱼 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS11 能与 E-box 结合, 使限速酶 AANAT2 的表达受到抑制, 同时, PAS11 可通过 RORE 增强 *Bmal1b* 的表达, 从而使 *Per2* 基因在斑马鱼生物钟中发挥双重作用。半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PeriodC 可能通过与 *Clock1a* 或 *Bmal1a* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 结合, 使 Clock:Bmal 异二聚体的形成受到抑制。而半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 可能与 *Clock1a* 或 *Bmal1a* 的氨基酸序列中的功能性结构域 PAS 形成竞争, 抑制 Clock:Bmal 异二聚体的形成, 半滑舌鳎 *Per2* 氨基酸序列中的功能性结构域 PeriodC 与功能性结构域 PAS11 共同逆向调节生物钟基因环路。同时, 功能性

结构域 PAS11 可能通过抑制限速酶 AANAT2 的表达, 达到调节 MLT 表达的作用。氨基酸同源性分析显示, 半滑舌鳎 *Per2* 与其他硬骨鱼类的同源性达到 70%~84%, 与爪蟾的同源性为 61%, 与日本鹌鹑的同源性为 67%, 与人的同源性为 71%; 半滑舌鳎 *Per2* 在构建的进化树中与其他硬骨鱼类聚为一簇, 其他脊椎动物的 *Per2* 也聚为一簇, 说明 *Per2* 基因在进化进程中保守性较强。

生物钟核心环路由 Clock 和 Bmal 组成的正调节因子 Clock:Bmal 和 *Per*、*Cry* 组成的负调节因子 *Per:Cry* 构成。二聚化的 Clock:Bmal 蛋白能结合位于启动子上游的 E/E'-box 核苷酸序列, 从而启动 *Per* 和 *Cry* 以及钟控制基因(circadian controlled genes, CCGs)等基因的表达, 表达产物中的 *Per* 和 *Cry* 蛋白在细胞质内形成异二聚体 *Per:Cry*, *Per:Cry* 入核后, 通过与 Clock:Bmal 异二聚体结合, 抑制该二聚体与启动子上游的 E/E'-box 的结合, 从而呈现出核心生物钟的负反馈环路调节(Saha *et al*, 2019)。生物钟基因可抑制 MLT 合成过程的限速酶 AANAT2 的表达, 从而参与调节 PG 中 MLT 的合成节律, 继而影响 BPG 轴中 GnRH 的分泌(Saha *et al*, 2019)。在大菱鲆季节性繁殖过程中, MLT 受体 *Mtnr1* 和 *Mtnr2* 的表达量随着卵巢的发育成熟逐渐增加, 在产卵期达到最高值, 说明 MLT 是调节大菱鲆卵巢发育的一种有效激素(Zhao *et al*, 2022)。在非繁殖季节和繁殖季节的点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)脑和垂体中以及三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)和旗鱼的性腺中, MLT 的表达也存在着季节性规律, 繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 MLT 表达量高于非繁殖季节的卵巢组织, 同时, 在非繁殖季节的旗鱼卵巢组织中 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节, 说明 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2h* 和 *Per2* 基因是旗鱼卵巢发育成熟过程中的重要基因(Sokoyowska *et al*, 2004; Chai *et al*, 2013; Basili *et al*, 2021)。本研究通过 qRT-PCR 技术检测了半滑舌鳎性成熟过程中 II、III、IV、V 和 VI 期卵巢组织中的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达变化规律, 它们在卵巢发育过程中的表达均从 II 期到 III 期显著升高, 并在 III 期达到最大值($P < 0.05$), 随后显著性降低, 在 IV 期到 VI 期呈相对低的表达量。说明半滑舌鳎的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因是参与调节卵巢发育成熟的重要基因。

在本研究中, 半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达变化趋势与卵巢发育成熟过程呈负相关, 与季节性光照周期呈正相关并呈现出周

年表达规律。生物钟基因的周期性表达能使生物体产生食物摄入周期, 从而影响脂肪累积和热量消耗(Oike *et al*, 2014); 孙学亮等(2012)通过模拟不同光照周期对半滑舌鳎生长发育的影响进行研究, 发现长光照周期条件下饲料系数低。半滑舌鳎亲鱼培育过程中, 卵巢Ⅱ期和Ⅲ期的光照条件为长光照, Ⅳ期和Ⅴ期的光照条件为相对短光照, 生物钟基因可能通过在卵巢Ⅳ期和Ⅴ期的低表达影响半滑舌鳎的摄食和能量平衡, 有助于满足卵巢发育过程中的能量需求。生物钟基因对硬骨鱼类卵巢发育周期影响的具体机制目前仍不明确, 徐倏豪(2016)通过细胞转染实验发现, 斑马鱼胚胎组织中 *Clock1a*:*Bmal1b* 异二聚体可激活骨形态发生蛋白 2a (*Bmp2a*) 的表达, *Bmp2a* 可通过影响 *Per2* 的表达参与生物钟的调控, 且 *Bmp2a* 参与脂肪的生成与代谢。Shi 等(2016)研究发现, 半滑舌鳎卵巢组织中的孕激素和脂联素受体 *Paqr7b* 在卵巢发育Ⅱ~Ⅴ期的卵母细胞中表达量逐渐增加, 在Ⅴ期达到最大值, 在Ⅵ期急剧下降。生物钟基因可能与以上蛋白共同作用, 达到调节半滑舌鳎卵巢周期性发育成熟。Khan 等(2016)通过模拟不同光照条件发现, 斑马鱼卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry2a* 和 *Per1b* 在长光照条件下的表达量高于短光照条件。在日本鹌鹑卵巢中, *Clock*、*Per2*、*Per3* 基因在长光照条件下的表达量高于短光照条件(Takashi *et al*, 2000)。本研究中, 半滑舌鳎生物钟基因的表达变化规律与上述斑马鱼和日本鹌鹑卵巢中表达变化特征的公告相似。

受光照条件等具有季节性变化规律的外在条件以及外围生物钟机制的共同影响, 卵巢组织中生物钟基因的表达也呈现出年周期性表达规律。在人工控制培育水温和光照周期的条件下, 对半滑舌鳎亲鱼卵巢的发育成熟过程研究发现, 半滑舌鳎亲鱼卵巢发育与水温和光周期具有显著的相关关系(柳学周等, 2009)。在非发情期的苏尼特羊卵巢中, *Per1* 和 *Per2* 基因的表达量高于发情期(向光明等, 2019a、b); Basili 等(2021)通过对繁殖季节和非繁殖季节的旗鱼性成熟个体和非成熟个体的卵巢中重要基因表达特征进行研究, 发现卵巢中生物钟基因(*Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2*) 的表达存在季节性差异, 且非繁殖季节 *Clock*、*Bmal1*、*Cry2* 和 *Per2* 基因的表达量高于繁殖季节, 性成熟个体和非成熟个体间在非繁殖季节的表达差异不明显, 说明了生物钟基因季节性表达在旗鱼卵巢的成熟过程中具有潜在的调控作用。本研究中, 对半滑舌鳎卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在卵巢发育的Ⅱ~Ⅵ期的表达量变化分析贯

穿了一个年周期, 且半滑舌鳎卵巢组织中的 5 个生物钟基因表达量相对高的Ⅱ期和Ⅲ期处于非繁殖季节, 而 5 个生物钟基因表达量相对低的Ⅳ期和Ⅴ期处于繁殖季节, 因此, 半滑舌鳎卵巢组织中 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的表达也存在季节性规律。生物钟基因表达随着半滑舌鳎卵巢发育经历Ⅱ~Ⅵ期后再度处于Ⅱ期并开始新的发育周期时, 即表现为年周期性的表达规律。在生产实践中, 可以结合半滑舌鳎生物钟表达特征, 通过调控半滑舌鳎亲鱼培育期的光照长短, 促进其性腺发育成熟, 有望获取繁殖期提前半滑舌鳎亲鱼, 将有助于半滑舌鳎苗种繁育效率的提升。

综上所述, 本研究克隆了半滑舌鳎生物钟相关基因 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 的序列, 通过构建的系统进化树, 发现半滑舌鳎 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 分别与其他硬骨鱼类的 *Clock1a*、*Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 聚为一簇, 说明其在长期进化过程中具有较近的亲缘关系。半滑舌鳎 *Clock1a* 与哺乳类、禽类和两栖类同源性较低, 说明 *Clock1a* 在进化过程中出现了进化差异。半滑舌鳎 *Bmal1a*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 与哺乳类、禽类和两栖类同源性较高, 说明其在进化进程中保守性较强。本研究初步探明了 *Clock1a*、*Bmal1*、*Cry1a*、*Cry2* 和 *Per2* 基因在性成熟半滑舌鳎卵巢组织的Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ期的表达变化规律, 为进一步揭示生物钟相关基因参与调控半滑舌鳎繁殖机理奠定了基础。

参 考 文 献

- BASILI D, GIOACCHINI G, TODISCO V, *et al*. Opsins and gonadal circadian rhythm in the swordfish (*Xiphias gladius*) ovary: Their potential roles in puberty and reproductive seasonality. *General and Comparative Endocrinology*, 2021, 303: 113707
- BIAN S S, ZHENG X L, SUN H Q, *et al*. *Clock1a* affects mesoderm development and primitive hematopoiesis by regulating Nodal-Smad3 signaling in the zebrafish embryo. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(34): 14165–14175
- CHAI K, LIU X C, ZHANG Y, *et al*. Day-night and reproductive cycle profiles of melatonin receptor, *kiss*, and *gnrh* expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Molecular Reproduction and Development*, 2013, 80(7): 535–548
- CHEN S H, QIAO H, FU H T, *et al*. Molecular cloning, characterization, and temporal expression of the clock genes period and timeless in the oriental river prawn

- Macrobrachium nipponense* during female reproductive development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2017, 207: 43–51
- DAVIE A, MINGHETTI M, MIGAUD H. Seasonal variations in Clock-gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Chronobiology International*, 2009, 26(3): 379–395
- GUL S, AYDIN C, OZCAN O, *et al.* The Arg-293 of Cryptochrome1 is responsible for the allosteric regulation of Clock-Cry1 binding in circadian rhythm. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(50): 17187–17199
- HERRERO M J, LEPESANT J M J. Daily and seasonal expression of clock genes in the pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 208: 30–38
- KEISUKE I, TAKASHI Y. Comparative analysis reveals the underlying mechanism of vertebrate seasonal reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 227: 64–68
- KHAN Z A, YUMNAMCHA T, RAJIV C, *et al.* Melatonin biosynthesizing enzyme genes and clock genes in ovary and whole brain of zebrafish (*Danio rerio*): Differential expression and a possible interplay. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 233: 16–31
- LAO Y C, SHI Y F, CHEN Y H, *et al.* Tissue expression of clock gene in female Magang goose at different reproductive stages. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering*, 2019, 32(2): 11–16 [劳永聪, 石逸夫, 陈永浩, 等. Clock 基因在不同繁殖时期雌性马岗鹅中的组织表达. 仲恺农业工程学院学报, 2019, 32(2): 11–16]
- LIU X Z, XU Y J, LIU N Z, *et al.* Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25–35 [柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鳎卵巢发育的组织学和形态学数量特征研究. 渔业科学进展, 2009, 30(6): 25–35]
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- MARCO H, KEES F, SACCO C, *et al.* The PAS fold a redefinition of the PAS domain based upon structural prediction. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271: 1198–1208
- MORENO J M, JESUS T F, COELHO M M, *et al.* Adaptation and convergence in circadian-related genes in Iberian freshwater fish. *BMC Ecology and Evolution*, 2021, 21(38): 1–15
- OIKE H, OISHI K, KOBORI M. Nutrients, clock genes, and chrononutrition. *Current Nutrition Reports*, 2014, 3(3): 204–212
- PEREZ J H, TOLLA E D, DUNN I C, *et al.* A comparative perspective on extra-retinal photoreception. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2019, 30(1): 39–53
- POZO A, VERA L M, SÁNCHEZ J A, *et al.* Molecular cloning, tissue distribution and daily expression of *cry1* and *cry2* clock genes in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2012, 3: 364–371
- QIN C J, SHAO T, LIAO X F, *et al.* Diurnal expression of circadian clock genes *period1* and *period3* in *Pelteobagrus vachellii*. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2021, 39(2): 652–660
- SAHA S, SINGH K M, GUPTA B B P. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. *General and Comparative Endocrinology*, 2019, 279: 27–34
- SHI B, LIU X Z, THOMAS P, *et al.* Identification and characterization of a progestin and adipoQ receptor (PAQR) structurally related to *Paqr7* in the ovary of *Cynoglossus semilaevis* and its potential role in regulating oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 237: 109–120
- SHI B, LIU X Z, XU Y J. Molecular characterization of three gonadotropin subunits and their expression patterns during ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2): 2767–2793
- SOKOYOWSKA E, KALAMARZ H, KULCZYKOWSKA E. Seasonal changes in brain melatonin concentration in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): towards an endocrine calendar. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, 139: 365–369
- SUN X L, YANG S Y, CHEN C X, *et al.* Effects of photoperiod on growth and antioxidant indices in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(2): 23–27 [孙学亮, 杨树元, 陈成勋, 等. 光照周期对半滑舌鳎生长和抗氧化指标的影响. 水产学杂志, 2012, 25(2): 23–27]
- TAKASHI Y, YOSHIKAZU S, ERI M, *et al.* Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Molecular Brain Research*, 2000, 78: 207–215
- TEIKA O, GOSHI N, JUN-ICHI H, *et al.* Circadian oscillation of TNF- α gene expression regulated by clock gene, *Bmal1* and *Clock1*, in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *International Immunopharmacology*, 2019, 70: 362–371
- WANG M Y, HUANG G D, WANG H. Advances in the zebrafish circadian clock mechanisms. *Hereditas*, 2012, 34(9): 1133–1143 [王明勇, 黄国栋, 王晗. 斑马鱼生物钟研究进展. 遗传, 2012, 34(9): 1133–1143]
- WHARFE M D, MARK P J, WADDELL B J. Circadian variation in placental and hepatic clock genes in rat pregnancy. *Endocrinology*, 2011, 152(9): 3552–3560
- XIANG G M, LIU Q Y, WANG X Y, *et al.* Tissue expression and polymorphism of *Per1* gene and their association with seasonal reproduction in sheep (*Ovis aries*). *Journal of*

- Agricultural Biotechnology, 2019a, 27(7): 1215–1223 [向光明, 刘秋月, 王翔宇, 等. *Per1* 基因组织表达及多态性与绵羊季节性繁殖的相关性研究. 农业生物技术学报, 2019a, 27(7): 1215–1223]
- XIANG G M, LIU Q Y, WANG X Y, *et al.* Tissue expression and polymorphism of *Per2* gene and their association with seasonal reproduction in sheep (*Ovis aries*). Chinese Journal of Animal Science, 2019b, 55(11): 74–78 [向光明, 刘秋月, 王翔宇, 等. *Per2* 基因组织表达及多态性与绵羊季节性繁殖的相关性研究. 中国畜牧杂志, 2019b, 55(11): 74–78]
- XU S H. Bmp2a signaling plays a role in the circadian clock through direct facilitating *Per2* expression in zebrafish. Master's Thesis of Soochow University, 2016 [徐倏豪. 骨形态发生蛋白 Bmp2a 调控斑马鱼生物钟研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2016]
- YU Q. Biological clock: The oscillator of gene expression. Science China: Life Science, 2017, 61(1): 128–130
- ZHANG D Q, SHI B, SHAO P, *et al.* The identification of miRNAs that regulate ovarian maturation in *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture, 2022, 555: 738250
- ZHANG P, SUN B G. Cryptochrome 1 is involved in anti-bacterial immunity in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture, 2022, 561: 738675
- ZHAO C Y, XU S H, LIU Y F, *et al.* Changes of melatonin and its receptors in synchronizing turbot (*Scophthalmus maximus*) seasonal reproduction and maturation rhythm. Acta Oceanologica Sinica, 2022, 41(1): 84–98
- ZHU H Y, XUE H L, XU J H, *et al.* Clone and bioinformatics analysis of *Cry1* and *Cry2* in *Criecetulus barabensis*. Journal of Qufu Normal University, 2019, 45(4): 74–82 [朱涵毅, 薛慧良, 徐金会, 等. 黑线仓鼠 *Cry1*、*Cry2* 克隆及生物信息学分析. 曲阜师范大学学报, 2019, 45(4): 74–82]

(编辑 冯小花)

Cloning and Expression Analysis of Clock Genes During Ovarian Development and Maturation of Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

YAN Kewen^{1,2}, MA Xiaodong², SHI Bao^{1,2}^①, CHENG Hanliang¹, WANG Chongnü², ZHAO Xinyu^{1,2}

(1. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, State Key Laboratory of Mariculture Breeding and Sustainable Goods; Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao Marine Science and Technology Center, Qingdao 266071, China)

Abstract Clock genes play a pivotal role in the rhythm maturation of bony fish ovaries. To explore the role of clock genes in the rhythmic ovarian development and maturation of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*), we used real-time fluorescent quantitative PCR technique to analyze the expression profiles of circadian locomotor output cycles Kaput 1a (*Clock1a*), brain and muscle Arntl-like 1a (*Bmall1a*), Cryptochrome 1a (*Cry1a*), Cryptochrome 2 (*Cry2*), and Period 2 (*Per2*) at the ovarian stages II, III, IV, V, and VI.

The coding DNA sequence (CDS) of five clock genes were cloned and phylogenetically analyzed. We found that the CDS sequence length of *Clock1a* was 1 620 bp and encoded 539 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Clock1a* having a predicted molecular weight of 81.9 kDa. *Clock1a* has the functional domain PASD1 (consisting of 64 amino acids) and PAS11 (consisting of 103 amino acids). The CDS sequence length of *Bmall1a* was 1 881 bp and encoded 626 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Bmall1a* having a predicted molecular weight of 68.9 kDa. In the *Bmall1a* sequence, the functional domain PASD3 is composed of 63 amino acids, and the functional domain PAS11 is composed of 103 amino acids. The CDS sequence length of *Cry1a* was 1 896 bp and encoded 631 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Cry1a* having a predicted molecular weight of 71.4 kDa. Its functional domain FAD7 was composed of 199 amino

① Corresponding author: SHI Bao, E-mail: shibao@ysfri.ac.cn

acids. The CDS sequence length of *Cry2* was 2 007 bp and encoded 669 amino acids, with the encoded amino acid sequence of *Cry2* having a predicted molecular weight of 76.0 kDa. The *Cry2* sequence contains a functional domain FAD7 consisting of 199 amino acids. The CDS sequence length of *Per2* was 4 248 bp, encoding 1 415 amino acids, and the encoded amino acid sequence of *Per2* has a predicted molecular weight of 154.0 kDa. In the *Per2* sequence, the functional domain PeriodC consists of 295 amino acids and a functional domain PAS11 consists of 102 amino acids.

The neighbor-joining method was used to analyze the *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* phylogenetic relationships between *C. semilaevis* and other bony fish, amphibians, birds, and mammals. The homology of *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* with other bony fish was 60%–79%, 94%–100%, 85%–91%, 84%–94%, and 70%–84%, respectively. Therefore, we believe that these five amino acid sequences show strong conserved property. In addition, the homology of *Cry1a* and *Cry2* was 62%, indicating that *Cry1a* and *Cry2* evolved differently during the evolution of *C. semilaevis*. In the constructed phylogenetic tree, *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* of *C. semilaevis* were clustered together with other bony fishes, indicating a close relationship between *C. semilaevis* and other bony fish in the evolutionary process. Moreover, the homology of *Clock1a* between *C. semilaevis* and mammals, birds, and amphibians is low, indicating that there are evolutionary differences in the evolutionary process of *Clock1a*. The high homology of *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* with mammals, birds, and amphibians suggests that these four clock genes were strongly conserved during the evolution of *C. semilaevis*.

In the present study, we found that the expression levels of five clock genes were high in stages II and III, which were equivalent to the non-reproductive season ($P < 0.05$). However, the expression levels of five clock genes were low in stages IV and V, which were equivalent to the reproductive season ($P < 0.05$). Therefore, the expression profiles of *Clock1a*, *Bmall1a*, *Cry1a*, *Cry2*, and *Per2* in the ovaries of *C. semilaevis* also have seasonal characteristics. The ovarian development and maturation of *C. semilaevis* goes through stages II, III, IV, V, and VI, and then reaches stage II again and starts a new reproductive cycle. The variation patterns of seasonal factors, such as light and temperature, in fish ovaries were consistent with the annual expression patterns of the five clock genes in this study. Therefore, it can be considered that the expression of clock genes in *C. semilaevis* has an annual cycle. The findings presented in this study can enrich the theory of ovarian development and maturation of *C. semilaevis* and provide a theoretical basis for improving breeding technology and seedling efficiency.

Key words Clock gene; *Cynoglossus semilaevis*; Ovary; Expression profiles