

朱德杰, 吴亚明, 陈宇龙, 等. 团头鲂咽齿发育相关基因系统进化及其表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(6): 192-200.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.06.022

## 团头鲂咽齿发育相关基因系统进化及其表达分析

朱德杰<sup>1</sup>, 吴亚明<sup>1</sup>, 陈宇龙<sup>1</sup>, 高泽霞<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室/农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室/  
湖北省名优鱼育种与健康养殖工程技术研究中心/长江经济带大宗水生生物产业绿色发展  
教育部工程研究中心, 武汉 430070; 2. 湖北洪山实验室, 武汉 430070

**摘要** 为探明鱼类咽齿发生发育的分子机制, 以我国特有的经济鱼类团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)为研究对象, 通过团头鲂全基因组序列 Blast 获得团头鲂分泌型钙结合磷蛋白(secretory calciumbinding phosphoprotein, SCPP)家族基因的 cDNA 序列, 采用实时荧光定量方法比较分析 SCPP 家族基因在团头鲂咽齿发育关键时期第四、第五鳃弓中的表达情况, 以及在 1 龄团头鲂不同组织中的表达情况, 筛选调控咽齿发育的关键调控基因。研究结果显示, 团头鲂 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam*、*spp1* 与斑马鱼具有较高同源性, 进化树中距离较近; 通过比对不同脊椎动物 *enam* 与 *odam* 这 2 个基因编码的氨基酸序列, 发现在鱼类中均存在 2 段氨基酸序列的缺失。1 龄团头鲂不同组织的 SCPP 家族基因定量表达结果显示, *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9* 和 *spp1* 在第五鳃弓(有咽齿)和肋骨里面有很高的表达量, 与其他组织中的表达水平大多存在显著性差异( $P < 0.05$ ), 且在第四鳃弓(无咽齿)中的表达量最低。团头鲂第四、第五鳃弓早期(9~54 d)咽齿发育阶段定量结果显示 *enam*、*ambn*、*scpp9*、*odam*、*spp1* 在第五鳃弓表达量显著高于第四鳃弓表达量, 其中 *scpp9* 在第五鳃弓中的表达量极高。以上研究结果表明 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam*、*spp1* 均参与团头鲂咽齿发育的调控, 其中 *scpp9* 在团头鲂咽齿发育过程中调控作用较为明显, 推测其与咽齿发育关系更为密切。

**关键词** 团头鲂; 咽齿发育; SCPP 家族基因; 系统进化; 基因表达

**中图分类号** Q786; Q959.46<sup>+</sup>8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)06-0192-09

分泌型钙结合磷蛋白(secretory calciumbinding phosphoprotein, SCPP)基因家族编码的多种磷酸蛋白参与骨的骨化<sup>[1-2]</sup>, 在哺乳动物骨骼、牙釉质和牙本质的形成中发挥着重要作用<sup>[3-4]</sup>。咽齿的出现是脊椎动物进化的一种方式, 根据其大小、形状、数量和位置的差异, 在脊椎动物分类群中呈现多样性<sup>[5]</sup>。咽齿属于骨骼系统的一部分, 在形成过程中涉及到矿化, 这些矿化组织的形成涉及多种因素, 其中就包括一些关键基因, 如分泌型钙结合磷蛋白 SCPP 家族基因<sup>[1]</sup>。鱼类基因组中确定了 13 个 SCPP 家族基因, 且这些 SCPP 家族基因都来自同一个祖先 *spar-cl1* (the secreted protein acidic cysteine-rich like 1) 基因。SCPPs 可分为 2 个亚类: 含有大于 25% Glu、Asp 和磷酸化 Ser 残基的酸性 SCPP 以及含有大于 20%

Pro 和 Gln 的富含 Pro/Gln(P/Q)的 SCPP<sup>[2]</sup>。在哺乳动物中, 酸性 SCPP 主要与骨和牙本质矿化有关, 而富含 P/Q 的 SCPP 可使釉质矿化<sup>[6]</sup>。

鱼类已有 SCPP 家族基因研究主要集中于从基因组水平比较基因序列的差异, 这些差异可能与矿化组织的表型转化有关<sup>[7]</sup>。Venkatesh 等<sup>[8]</sup>在软骨鱼类象鲨(*Callorhynchus milii*)的基因组中只发现了 2 个与 SCPP 相关的祖先基因(即 *sparc* 和 *sparcl1*)。Laue 等<sup>[9]</sup>发现斑马鱼(*Danio rerio*) SCPP 家族基因组中 *spp1* 基因的靶向突变导致骨形成减少。Lin 等<sup>[10]</sup>在虎尾海马(*Hippocampus comes*)中发现了 2 个酸性 SCPP 基因(*scpp1* 和 *spp1*), 但与牙本质和釉质样矿化有关的 P/Q 丰富的基因如 *amel*、*enam*、*ambn* 和 *odam* 等在基因组中完全缺失。

收稿日期: 2022-04-25

基金项目: 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-45-01); 国家自然科学基金项目(31872559); 武汉市科技计划项目(2020020601012253)

朱德杰, E-mail: 515948889@qq.com

通信作者: 高泽霞, E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 又名武昌鱼, 是我国特有的草食性经济鱼类之一, 具有营养价值高、生长较快、存活率高和易捕捞等特点, 华中农业大学王卫民、高泽霞团队针对其种质资源保护及遗传改良方向进行了相关研究<sup>[11-12]</sup>。目前关于团头鲂咽齿方面的研究还较少, 本研究通过全基因组 Blast 获得了团头鲂咽齿发育相关基因 *fa93e10* (*enam*)、*scpp1*、*scpp6* (*ambn*)、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 的序列信息, 并分析其在团头鲂不同组织和咽齿关键发育时期的表达情况, 以期了解鱼类咽齿发生发育分子机制提供一定的基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验所用团头鲂均来自湖北省阳新县百容水产良种有限公司(湖北省黄石市阳新县浮屠镇)。试验共采集3尾1龄团头鲂第五鳃弓(含咽齿)、第四鳃弓(不含咽齿)、肌间刺、大脑、鳍条、心脏、肝脏、脾脏、肌肉、肋骨10种组织样品, 每个组织3个样品。同时, 分别采集鱼苗孵出后9、18、27、36、45、54 d 团头鲂的第五和第四鳃弓, 每个阶段3个重复样品。所有采样用鱼使用MS-222麻醉后进行采样, 样品采集完成后置于液氮中速冻后, 转入-80℃冰箱保存、备用。

### 1.2 总RNA提取及cDNA合成

取-80℃冻存的9~54 d 团头鲂第四、第五鳃弓及1龄团头鲂10种组织样品, 用Trizol法(TAKARA, 大连)提取总RNA并电泳检测完整性, Nano-Drop ND-2000核酸蛋白仪(Thermo, 美国)测定RNA浓度及OD值。按照HiScript® II Q RT Super-Mix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme, 南京)的说明书合成各样品的cDNA, 将合成的cDNA稀释5倍后, 置于-20℃冰箱保存。

### 1.3 基因克隆

Ensembl 网站上下 载 斑 马 鱼 *enam* (ENSDART00000132089.3)、*scpp1* (ENSDART00000127579.3)、*ambn* (ENSDART00000121605.4)、*scpp9* (ENSDART00000129813.2)、*odam* (ENSDART00000137646.3) 和 *spp1* (ENSDART00000101261.6) 的 cDNA 序列, 与团头鲂的全基因组序列<sup>[13]</sup>(BioprojectID:PRJNA343584) 进行 Blast 比对, 获得团头鲂 *enam* (NP\_14992)、*scpp1* (NP\_15021)、*ambn* (NP\_15032)、*scpp9* (NP\_14953)、

*odam* (NP\_15082) 和 *spp1* (NP\_25259) 的完整 CDS 序列。利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 由北京擎科生物科技有限公司武汉分公司合成, 以转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。用 1% 琼脂糖检测产物质量后, 将条带单一的 PCR 产物送武汉擎科生物科技有限公司测序。将测序获得的 目的基因片段与已知片段 比对 拼接, 获得团头鲂上述 6 个基因的完整 CDS 序列。

### 1.4 基因生物信息学分析

利用 NCBI 的 ORF finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析基因开放阅读框; 使用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 6 个 SCPP 家族基因的理化性质。使用 DNAMAN 软件对 不同脊椎动物 6 个 SCPP 家族基因进行 同源性分析, 并使用 MEGA 7.0 软件构建基因系统进化树。进化树各基因物种信息如下:

*enam*: 人 (*Homo sapiens*)、牛 (*Bos taurus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、雀鳝 (*Lepisosteus oculatus*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、牙鲮 (*Paralichthys olivaceus*)、秀美花鲮 (*Poecilia formosa*);

*scpp1*: 半滑舌鳎、斑马鱼、斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)、大黄鱼、雀鳝、团头鲂、青鳉、牙鲮、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*);

*ambn*: 人、牛、斑马鱼、雀鳝、团头鲂、小鼠;

*scpp9*: 雀鳝、鲤、斑马鱼、团头鲂、青鳉、秀美花鲮;

*odam*: 人、牛、小鼠、半滑舌鳎、鲤、斑马鱼、斑点叉尾鲷、大黄鱼、团头鲂、黄鳝 (*Monopterus albus*)、青鳉、牙鲮、秀美花鲮、红鳍东方鲀;

*spp1*: 人、牛、半滑舌鳎、斑马鱼、斑点叉尾鲷、大黄鱼、雀鳝、团头鲂、小鼠、青鳉、牙鲮、秀美花鲮、红鳍东方鲀。

### 1.5 qRT-PCR 基因定量分析

参照 Blast 获得的 6 个基因的序列信息, 以  $\beta$ -actin 为内参, 利用 NCBI 网站的 Primer-Blast 设计其定量引物。由武汉擎科公司合成(表 1)。荧光定量 PCR 使用 Hieff® qPCR SYBR® Green Master Mix (Low Rox) 试剂盒 (YEASEN, 上海), 以团头鲂咽齿

发育关键时期1龄团头鲂不同组织样品cDNA为模板,参照试剂盒说明书进行qRT-PCR反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的mRNA相对表达量。使用SPSS软件中的Duncan's Multiple Range Test比较基因在咽齿发育关键时期及不同组织中的相对表达水平差异性。

表1 基因荧光定量PCR引物信息

Table 1 Primer information for real time PCR of genes

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	扩增片段长度/bp Amplified length
<i>enam</i>	F:TTACCCTCCCTACGGCTACC R:AAGGTTCGACGGAACATCC	62	194
<i>scpp1</i>	F:AAGAGGATAACGGTGCCGAC R:TCGCTGTCACATTCTTGCT	62	190
<i>ambn</i>	F:GCCTGCGTTTAGAGGCAATG R:GGTCATTCCATTGGCAGGGA	62	118
<i>scpp9</i>	F:GCAGCTGCTCTTTCCCCATA R:GGAGCGAAAGGTAAGCCAT	62	101
<i>odam</i>	F:AGGGCAGCCTCCATTAACAC R:CTGGGGCCCACCAATGTAAT	62	172
<i>spp1</i>	F:GAGAACTGAGACCACGCA R:ACCGCCCAACTTTTCATTGC	62	188
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F:ACCCACACCGTGCCCATCTA R:CGGACAATTTCTTTTCGGCTG	62	204

## 2 结果与分析

### 2.1 SCPP家族基因理化性质分析

利用Blast获得了团头鲂SCPP基因家族6个咽齿发育相关基因的cDNA核心序列,根据ProtParam软件预测结果显示各基因的理化性质如表2所示,其中*enam*的分子式为 $C_{1106}H_{1709}N_{281}O_{357}S_6$ ,氨基酸残基中Ala(A)、Pro(P)、Val(V)、Glu(E)的频率较高。

*scpp1*的分子式为 $C_{1107}H_{1746}N_{306}O_{457}S_8$ ,氨基酸残基中Ser(S)、Glu(E)、Asp(D)、Thr(T)的频率较高。*ambn*的分子式为 $C_{1511}H_{2333}N_{415}O_{448}S_{13}$ ,氨基酸残基中Pro(P)、Val(V)、Gln(Q)、Ser(S)的频率较高。*scpp9*的分子式为 $C_{1580}H_{2432}N_{420}O_{444}S_4$ ,氨基酸残基中Pro(P)、Gln(Q)、Gly(G)、Leu(L)的频率较高。*odam*的分子式为 $C_{3441}H_{5366}N_{918}O_{1026}S_{30}$ ,氨基酸残基中Pro(P)、Leu(L)、Val(V)、Gly(G)的频率较高。

表2 团头鲂SCPP家族基因的理化性质

Table 2 Physical and chemical properties of SCPP family genes in *M. amblycephala*

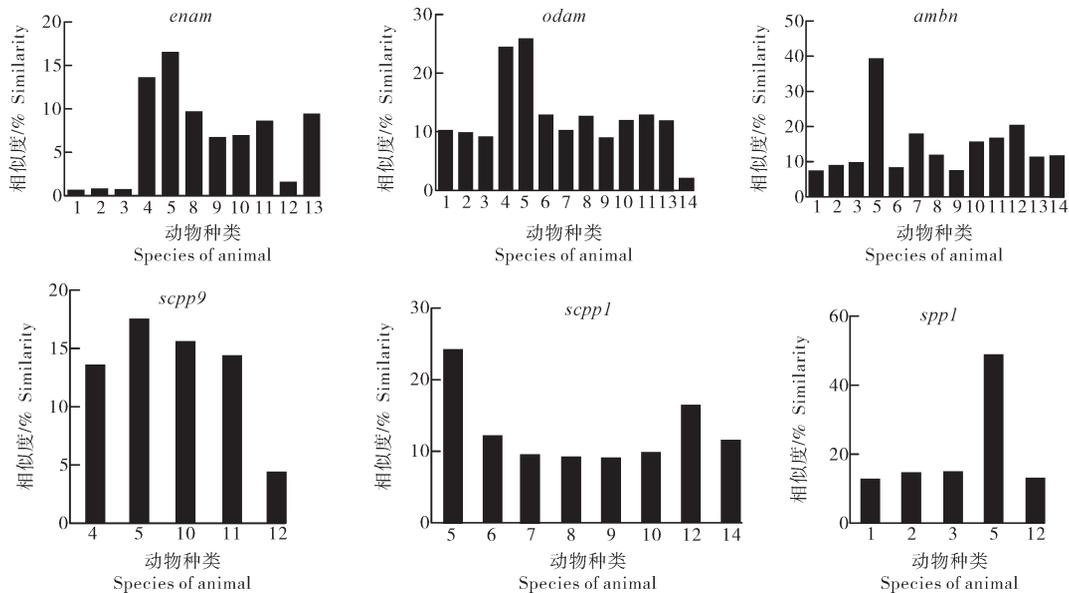
参数 Parameter	<i>enam</i>	<i>scpp1</i>	<i>ambn</i>	<i>scpp9</i>	<i>odam</i>	<i>spp1</i>
CDS序列/bp CDS sequence	735	756	948	987	2 130	1 077
编码氨基酸个数 Number of coding amino acids	244	251	315	329	709	358
分子质量/ku Molecular weight	24.85	26.91	33.90	34.54	76.97	38.49
理论等电点 pI	3.67	4.15	6.01	9.22	5.73	4.16
蛋白质性质 Protein properties	酸性 Acidity	酸性 Acidity	酸性 Acidity	碱性 Alkalinity	酸性 Acidity	酸性 Acidity
消光系数 Extinction coefficient	7 575	17 085	14 565	20 400	58 300	10 555
不稳定系数 Instability coefficient	58.47	79.13	64.65	62.72	44.61	68.92
稳定性 Stability	不稳定 Unstable	不稳定 Unstable	不稳定 Unstable	不稳定 Unstable	不稳定 Unstable	不稳定 Unstable
疏水指数 Hydrophobic index	84.96	50.16	73.59	83.86	81.07	55.39
平均亲水性 Hydrophilicity	0.082	-0.976	-0.267	-0.188	-0.197	-0.885

*spp1* 的分子式为  $C_{1615}H_{2561}N_{435}O_{635}S_8$ , 氨基酸残基中 Ser (S)、Glu (E)、Thr (T)、Ala (A) 的频率较高。

## 2.2 SCPP家族基因同源性分析

使用 DNAMAN 软件对人、鼠、牛、团头鲂及其他鱼类 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 与 *spp1* 编码的氨基酸序列进行同源性比较, 并使用 MEGA 软件构建进化树。结果显示, 团头鲂 *enam* 编码的氨基酸序列与斑马鱼 (16.47%)、鲤 (13.56%) 具有相对较高的同源性 (图 1), 在进化树中距离最近 (图 2); 与其他鱼类同源性相对较低 (1.53%~9.62%); 与人 (0.61%)、鼠 (0.78%)、牛 (0.70%) 具有极低同源性; 在进化树

中鱼类与哺乳类和家禽类的遗传距离比较远, 形成 2 个大分支。与团头鲂其他 5 个基因同源性最高的也都是斑马鱼 (图 1), 进化树中距离较近, 其中 *odam* 和 *scpp9* 在进化树中距离最近的物种为鲤 (图 2), 与其他物种的同源性较低。除此以外我们发现同样是 SCPP 家族基因, 团头鲂 *enam* 和 *scpp9* 编码的氨基酸序列与斑点雀鲷同源性较低, 分别为 1.53% 和 4.38% (图 1), 但在 *scpp1*、*ambn* 和 *spp1* 这 3 个基因与斑点雀鲷的同源性相对较高, 分别为 16.38%、12.95% 和 20.25% (图 1)。通过比对不同脊椎动物 *enam* 与 *odam* 这 2 个基因编码的氨基酸序列, 发现在鱼类中均存在这两段氨基酸序列的缺失 (图 3)。



1: 人 *Homo sapiens*; 2: 鼠 *Mus musculus*; 3: 牛 *Bos taurus*; 4: 鲤 *Cyprinus carpio*; 5: 斑马鱼 *Danio rerio*; 6: 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*; 7: 黄鳝 *Monopterus albus*; 8: 大黄鱼 *Larimichthys crocea*; 9: 牙鲆 *Paralichthys olivaceus*; 10: 青鳉 *Oryzias latipes*; 11: 亚马逊花鲈 *Poecilia formosa*; 12: 斑点雀鲷 *Lepisosteus oculatus*; 13: 半滑舌鳎 *Cynoglossus semilaevis*; 14: 红鳍东方鲀 *Takifugu rubripes*。

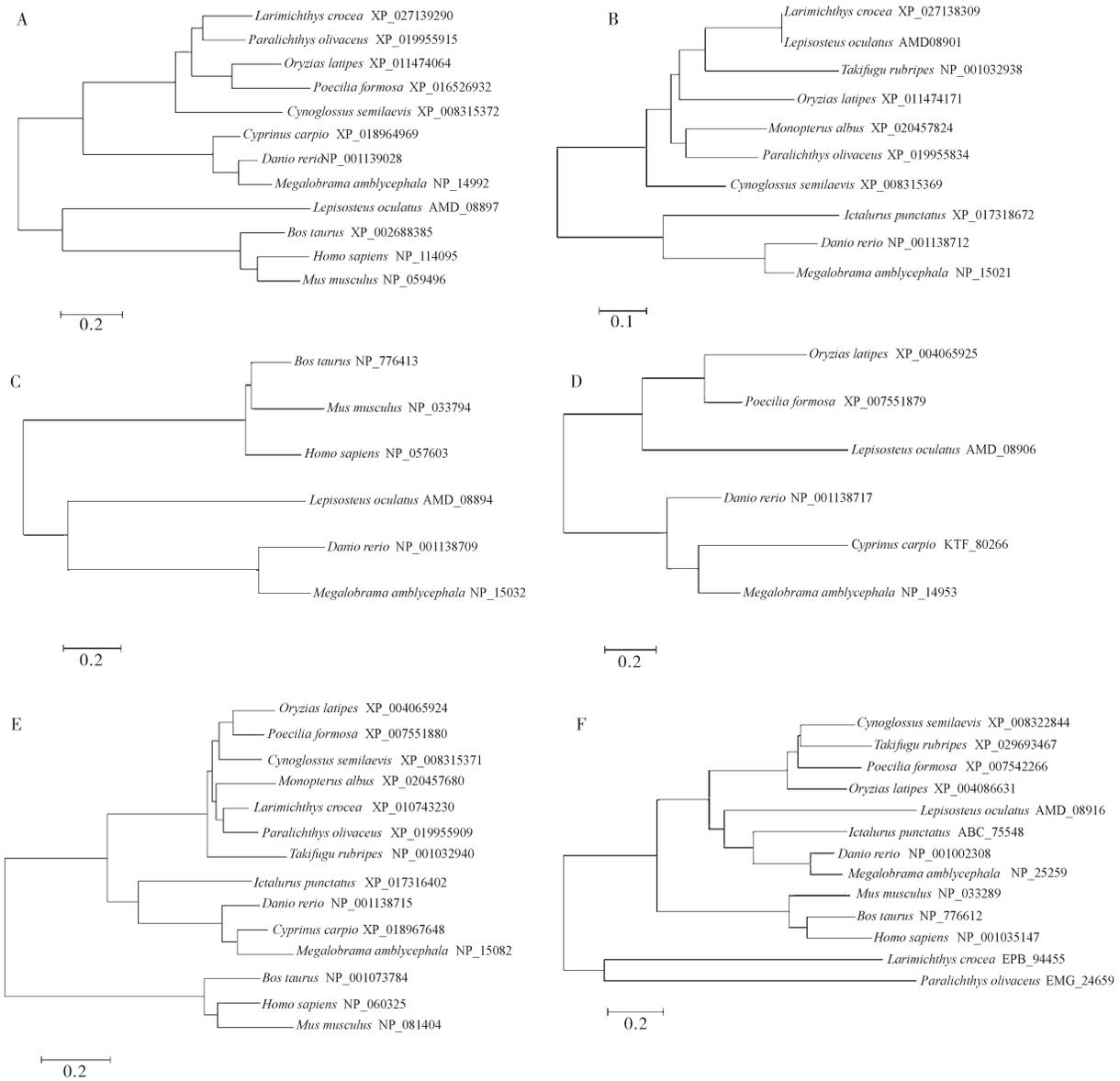
图 1 团头鲂 SCPP 家族基因与其他脊椎动物基因的同源性比较

Fig.1 Comparison of homology between SCPP family genes of *M. amblycephala* and genes of other vertebrates

## 2.3 SCPP家族基因在不同组织的表达分析

采用 qRT-PCR 方法分析 1 龄团头鲂 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 在不同组织中的表达情况, 结果 (图 4) 显示: *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9* 和 *spp1* 基因在第五鳃弓和肋骨中具有较高的表达量, 与其他组织中的表达水平大多存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 且在第四鳃弓中的表达量极低 (图 4A-D, F)。 *odam* 基因仅在肋骨里面有很高的表达量, 与其他所有组织的表达水平均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4E)。 *enam* 和 *scpp1* 基因在脑中的表达量比在肌间骨中高, 但相较于第五鳃弓和肋骨仍存在显著性差异

( $P < 0.05$ ) (图 4A-B)。 *ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 在脑中的表达量则显著低于第四、第五鳃弓、肌间骨以及肋骨 ( $P < 0.05$ ) (图 4C-F)。 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9* 和 *spp1* 基因在肌间骨中也存在着近似的表达模式, 表达量相较于第五鳃弓明显降低且有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但相较于第四鳃弓表达量还是有所上升 (图 4A-D, F)。 *enam*、*scpp1*、*ambn* 和 *spp1* 基因在鳍条中也具有较高的表达量 (图 4A-C, F), 且 *enam*、*ambn* 和 *spp1* 基因在鳍条中的表达量高于在第四鳃弓中的表达量, 且存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4A, C, F)。 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因



A: *enam*; B: *scpp1*; C: *ambn*; D: *scpp9*; E: *odam*; F: *spp1*.

图2 团头鲂SCPP家族基因与其他脊椎动物基因的系统进化树

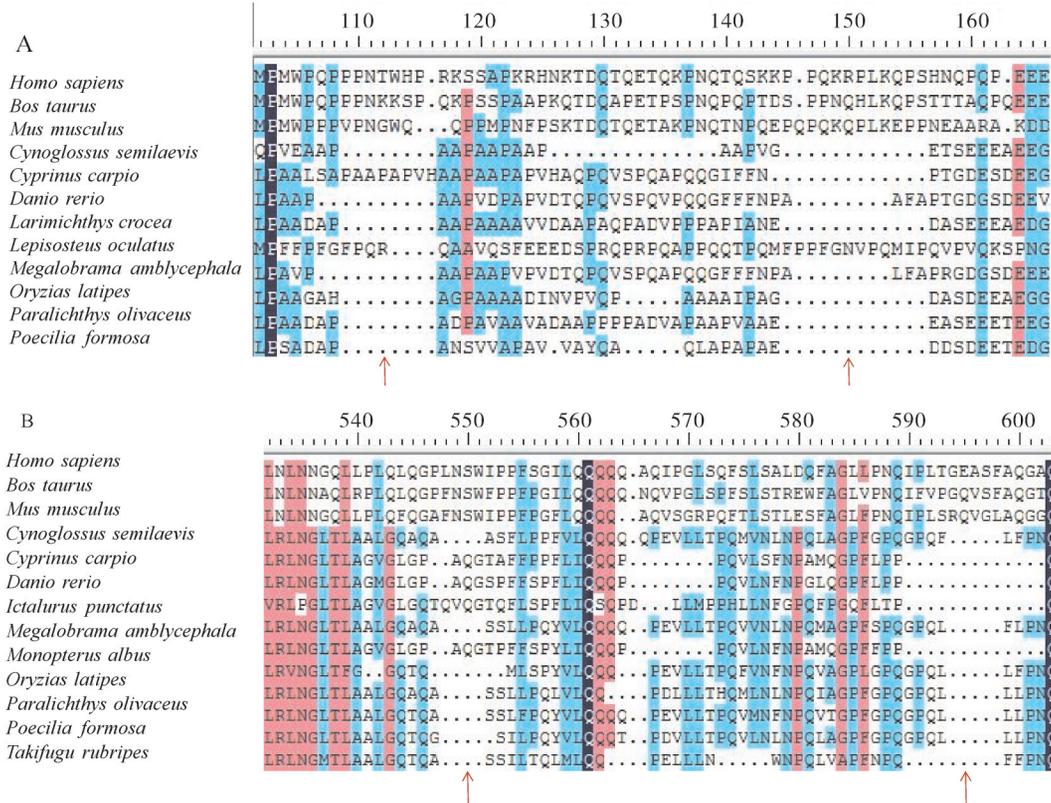
Fig. 2 Phylogenetic tree of SCPP family genes between *M. amblycephala* and other vertebrates

在心脏、肝、脾和肌肉中的表达量相较于其他组织均较低,且存在显著性差异( $P < 0.05$ )(图4A-F)。

## 2.4 SCPP家族基因在早期咽齿发育阶段的表达分析

基因表达分析结果如图5所示。*enam*基因于鱼苗孵出后第9、18、27天在第四鳃弓与第五鳃弓的表达量相近,无显著性差异,第36、45和54天在第五鳃弓表达量显著高于第四鳃弓( $P < 0.05$ )(图5A)。*scpp1*基因在第9、18、27天第五鳃弓表达量略高于第四鳃弓,在第36、45和54天第四鳃弓中的表达量高于第五鳃弓(图5B)。*ambn*基因在第9~54天第五鳃

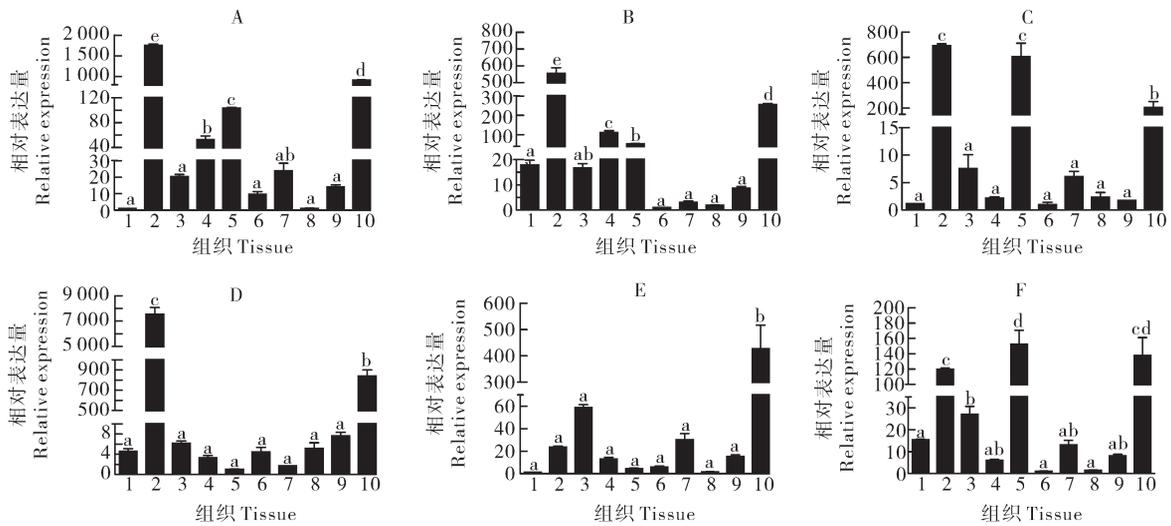
弓中的表达量均大于第四鳃弓,其中第9天第四、第五鳃弓中的表达量无显著性差异,在第54天第五鳃弓中的表达量显著高于第四鳃弓( $P < 0.05$ )(图5C)。*scpp9*基因在第9~54天第五鳃弓中的表达量均大于第四鳃弓,且具有显著性差异( $P < 0.05$ )(图5D)。*odam*基因在第9天第五鳃弓表达量略高于第四鳃弓,第18天第四鳃弓表达量高于第五鳃弓,在第27~45天第五鳃弓表达量显著大于第四鳃弓( $P < 0.05$ ),在第54天第四、第五鳃弓表达量相近(图5E)。*spp1*基因在第9天和第18天第四、第五鳃弓表达量相差不大,在第27~54天第五鳃弓表达量显



A: *enam*; B: *odam*. 红色箭头标注位置为鱼类相比于哺乳动物氨基酸序列缺失位点。Red arrow marks the position of the deletion of fish compared with mammalian amino acid sequence.

图3 不同脊椎动物 *enam* 和 *odam* 部分编码序列比对分析

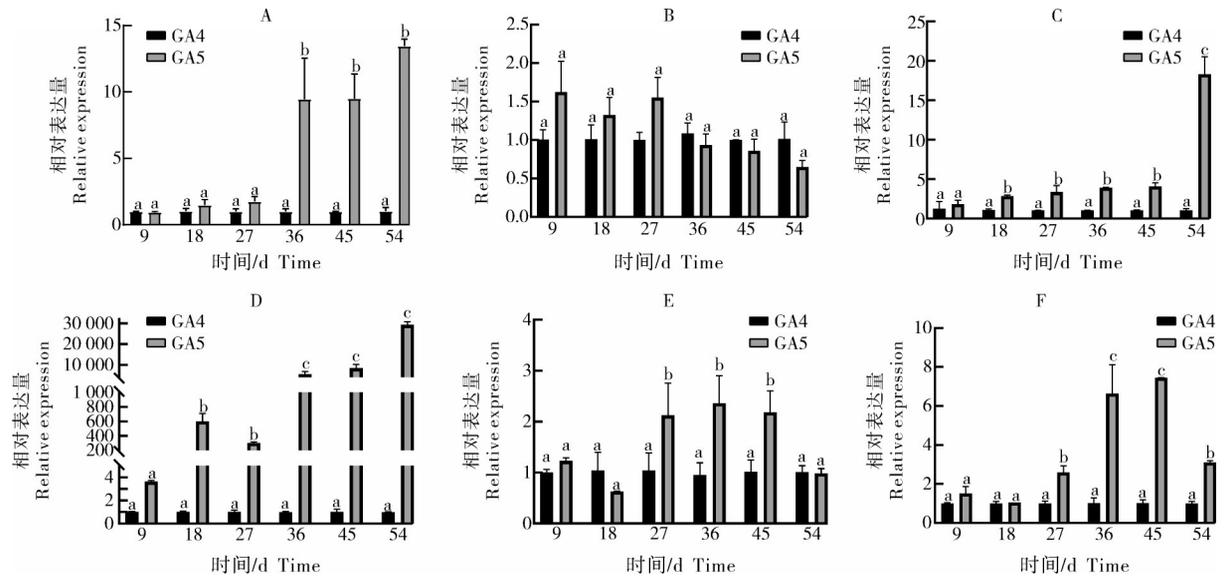
Fig.3 Partial alignment sequences of *enam* and *odam* in the different vertebrates



A: *enam*; B: *scpp1*; C: *ambn*; D: *scpp9*; E: *odam*; F: *spp1*. 1:第四鳃弓 Gill arch 4; 2:第五鳃弓 Gill arch 5; 3:肌间骨 Intermuscular bone; 4:脑 Brain; 5:鳍条 Fin; 6:心脏 Heart; 7:肝 Liver; 8:脾 Spleen; 9:肌肉 Muscle; 10:肋骨 Rib。不同小写字母表示各基因在不同组织中具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。Different lowercase letters indicate the significant difference for different genes in the different tissues, respectively ( $P < 0.05$ ).

图4 团头鲂 SPP 家族基因在不同组织的相对表达量

Fig.4 Relative expression of SPP family genes in the different tissues of *M. amblycephala*



A: *enam*; B: *scpp1*; C: *ambn*; D: *scpp9*; E: *odam*; F: *spp1*. GA4: 第四鳃弓 Gill arch 4; GA5: 第五鳃弓 Gill arch 5.

图5 团头鲂 SCPP 家族基因在早期咽齿发育阶段的相对表达量  
Fig.5 Relative expression of SCPP family genes in the early pharyngeal tooth developmental stages in *M. amblycephala*

著高于第四鳃弓 ( $P < 0.05$ ), 其中 36 和 45 d 的表达量差异更为明显(图 5F)。

### 3 讨论

本研究中系统进化分析表明, *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 在鲤科鱼类与人、鼠和鸡等高等脊椎动物类都各自聚为一支, 青鳉与秀美花鱈 *enam*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因聚为一支, 这表明这 2 个物种不仅亲缘关系较为接近, 且与咽齿发育的形成潜在相关。在 *enam* 基因的进化树中斑点雀鲷与人、鼠、鸡等高等脊椎动物聚为一支, 推测鱼类的 *enam* 在基因复制过程中发生了功能的分化<sup>[14]</sup>, 鱼类 *enam* 与高等脊椎动物同源性更高, 但在不同物种中的同源性变异性较大, 在同一科中存在高度保守性。

已有研究表明分泌型钙结合磷蛋白(SCPP)基因家族对咽齿的形成至关重要<sup>[15-16]</sup>, 富含(P/Q)的 SCPP 家族基因的假基因化可能导致许多脊椎动物如鸟类、海龟和一些哺乳动物失去其牙颌<sup>[17]</sup>。以前的研究假设, 大多数富含(P/Q)的 SCPP 基因的丢失可能是导致合颌动物咽齿缺失的原因<sup>[18-19]</sup>。在慈鲷科鱼类中, 与小齿鱼类相比, *scpp5* 在大齿鱼类的下咽颌中有着更高的表达<sup>[20]</sup>, 这表明富含(P/Q)的 SCPP 基因可能在咽部咽齿的形成中发挥调控作用。

*enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因在

1 龄团头鲂不同组织中的表达分析结果显示, *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因在 1 龄团头鲂的第五鳃弓表达量显著高于第四鳃弓 ( $P < 0.05$ ), 且在肋骨中也有较高的表达, 这与 Kawasaki 等<sup>[1]</sup>所报道的酸性 SCPP 蛋白参与骨和牙本质矿化、而富含脯氨酸和谷氨酰胺的 SCPP 蛋白则参与釉质和类珥琅质矿化的过程相一致。已有研究表明硬骨鱼都有连续咽齿替换的现象, 在口腔或咽腔的咽齿过了功能期后, 一颗咽齿被同一位置(位点)的新咽齿替换, 这种咽齿的更替持续终生, 如斑马鱼和青鳉<sup>[21-22]</sup>。*enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因在 9~54 d 团头鲂第四、第五鳃弓中的定量表达结果恰恰证实了这一观点。*enam*、*ambn* 和 *scpp9* 基因在 9~54 d 第四鳃弓始终处于一个较低的表达量, 而第五鳃弓中的表达量呈现上升趋势, 推测 *enam*、*ambn* 和 *scpp9* 在团头鲂早期咽齿生长发育过程中起关键调控作用。*scpp1* 在 9~54 d 团头鲂第四鳃弓中的表达量与第五鳃弓表达量无明显差异, 9~27 d 第五鳃弓中表达量大于第四鳃弓, 36~54 d 第四鳃弓中的表达量略高于第五鳃弓, 综合 1 龄团头鲂的定量表达结果, 推测 *scpp1* 基因在团头鲂早期咽齿发育过程中并无明显调控作用, 其发挥调控作用的时间可能在 2 月龄后。在本研究中团头鲂 *odam* 和 *spp1* 基因调控蛋白在第 36 和 45 天出现峰值, 可能是团头鲂早期咽齿发育循环

周期结束的时期。

本研究通过对咽齿发育相关的 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因的 CDS 区克隆和同源性分析,推测鱼类 SCPP 基因与鱼类咽齿发育相关。结合团头鲂 9~54 d 第四、第五鳃弓和 1 龄团头鲂不同组织的基因表达分析,明确了 *enam*、*scpp1*、*ambn*、*scpp9*、*odam* 和 *spp1* 基因的表达与鱼类咽齿发育具有一定的相关性。

## 参考文献 References

- [1] KAWASAKI K, WEISS K M. SCPP gene evolution and the dental mineralization continuum [J]. *Journal of dental research*, 2008, 87(6): 520-531.
- [2] KAZUHIKO K, AMEMIYA C T. SCPP genes in the coelacanth: tissue mineralization genes shared by sarcopterygians [J]. *Journal of experimental zoology part B: molecular and developmental evolution*, 2014, 322(6): 390-402.
- [3] SIRE J Y, DAVIT-BEAL T, DELGADO S, et al. First-generation teeth in nonmammalian lineages: evidence for a conserved ancestral character [J]. *Microscopy research and technique*, 2002, 59(5): 408-434.
- [4] SIRE J Y, HUYSEUNE A. Formation of dermal skeletal and dental tissues in fish: a comparative and evolutionary approach [J]. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2003, 78(2): 219-249.
- [5] STOCK D W. The genetic basis of modularity in the development and evolution of the vertebrate dentition [J]. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, biological sciences*, 2001, 356(1414): 1633-1653.
- [6] KAWASAKI K, SUZUKI T, WEISS K M. Phenogenetic drift in evolution: the changing genetic basis of vertebrate teeth [J]. *PNAS*, 2005, 102: 18063-18068.
- [7] CHAI Y, JIANG X, ITO Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis [J]. *Development (Cambridge, England)*, 2000, 127(8): 1671-1679.
- [8] VENKATESH B, LEE A P, RAVI V, et al. Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution [J]. *Nature*, 2014, 505(7482): 174-179.
- [9] LAUE K, JÄNICKE M, PLASTER N, et al. Restriction of retinoic acid activity by *Cyp26b1* is required for proper timing and patterning of osteogenesis during zebrafish development [J]. *Development (Cambridge, England)*, 2008, 135(22): 3775-3787.
- [10] LIN Q, FAN S H, ZHANG Y H, et al. The seahorse genome and the evolution of its specialized morphology [J]. *Nature*, 2016, 540(7633): 395-399.
- [11] 王旭东,唐雨甜,熊雪梅,等.团头鲂 *scxa* 基因 SNP 位点与肌间骨数目的关联性分析 [J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(4): 149-156. WANG X D, TANG Y T, XIONG X M, et al. Expression of *scxa* and correlation analysis between SNP and number of intermuscular bones in *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(4): 149-156 (in Chinese with English abstract).
- [12] 高泽霞,王卫民,蒋恩明,等.团头鲂种质资源及遗传改良研究进展 [J]. *华中农业大学学报*, 2014, 33(3): 138-144. GAO Z X, WANG W M, JIANG E M, et al. Research advances on germplasm resources and genetic improvement of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2014, 33(3): 138-144 (in Chinese with English abstract).
- [13] LIU H, CHEN C H, LÜ M L, et al. A chromosome-level assembly of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) genome reveals an expansion of olfactory receptor genes in freshwater fish [J]. *Molecular biology and evolution*, 2021, 38(10): 4238-4251.
- [14] GANSNER J M, MENDELSON B A, HULTMAN K A, et al. Essential role of lysyl oxidases in notochord development [J]. *Developmental biology*, 2007, 307(2): 202-213.
- [15] MEREDITH R W, ZHANG G J, GILBERT M T P, et al. Evidence for a single loss of mineralized teeth in the common avian ancestor [J/OL]. *Science*, 2014, 346(6215): 1254390 [2022-04-25]. <https://doi.org/10.1126/science.1254390>.
- [16] BRAASCH I, GEHRKE A R, SMITH J J, et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons [J]. *Nature genetics*, 2016, 48(4): 427-437.
- [17] KAWASAKI K. The SCPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues [J]. *Development genes and evolution*, 2009, 219(3): 147-157.
- [18] LIU Z J, LIU S K, YAO J, et al. The channel catfish genome sequence provides insights into the evolution of scale formation in teleosts [J/OL]. *Nature communications*, 2016, 7: 11757 [2022-04-25]. <https://doi.org/10.1038/ncomms11757>.
- [19] LV Y Y, KAWASAKI K, LI J, et al. A genomic survey of SCPP family genes in fishes provides novel insights into the evolution of fish scales [J/OL]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(11): 2432 [2022-04-25]. <https://doi.org/10.3390/ijms18112432>.
- [20] KARAGIC N, SCHNEIDER R F, MEYER A, et al. A genomic cluster containing novel and conserved genes is associated with cichlid fish dental developmental convergence [J]. *Molecular biology and evolution*, 2020, 37(11): 3165-3174.
- [21] KAGUE E, WITTEN P E, SOENENS M, et al. Zebrafish *sp7* mutants show tooth cycling independent of attachment, eruption and poor differentiation of teeth [J]. *Developmental biology*, 2018, 435(2): 176-184.
- [22] ABDUWELI D, BABA O, TABATA M J, et al. Tooth replacement and putative odontogenic stem cell niches in pharyngeal dentition of medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Microscopy*, 2014, 63(2): 141-153.

## Phylogeny and expression analysis of genes related to tooth development in *Megalobrama amblycephala*

ZHU Dejie<sup>1</sup>, WU Yaming<sup>1</sup>, CHEN Yulong<sup>1</sup>, GAO Zexia<sup>1,2</sup>

1.College of Fisheries, Huazhong Agricultural University/ Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education/ Engineering Technology Research Center for Fish Breeding and Culture in Hubei Province/ Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China; 2.Hubei Hongshan Lab, Wuhan 430070, China

**Abstract** In order to clarify the molecular mechanism of fish pharyngeal tooth development, taking *Megalobrama amblycephala*, a unique economic fish in China, as the research object, the cDNA sequence of secretory calciumbinding phosphoprotein (SCPP) family genes was obtained through whole genome sequence Blast. The expression of SCPP family genes in the fourth and fifth branchial arches during the critical stages of pharyngeal tooth development and in different tissues of one-year-old *M. amblycephala* was analyzed by qRT-PCR method to screen the key genes regulating the development of pharyngeal teeth. Multiple sequence alignment of amino acids showed that *enam*, *scpp1*, *ambn*, *scpp9*, *odam*, and *spp1* of *M. amblycephala* and zebrafish share high identity, which were close to each other in the phylogenetic tree. By comparing the amino acid sequences encoded by *enam* and *odam* in different vertebrates, it was found that there were two amino acid sequence deletions in fish. The expression levels of *enam*, *scpp1*, *ambn*, *scpp9* and *spp1* in the fifth branchial arch (with pharyngeal teeth) and ribs were significantly higher than those in other tissues ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of them were lowest in the fourth branchial arch (without pharyngeal teeth). The expression levels of *enam*, *ambn*, *scpp9*, *odam*, and *spp1* in the fifth branchial arch were significantly higher than those in the fourth branchial arch, and the expression level of *scpp9* in the fifth branchial arch was extremely high. The results above showed that *enam*, *scpp1*, *ambn*, *scpp9*, *odam*, and *spp1* were all involved in the regulation of pharyngeal tooth development, among which, *scpp9* played a more important role in the regulation of pharyngeal tooth development, suggesting that it was more closely related to the development of pharyngeal teeth.

**Keywords** *Megalobrama amblycephala*; pharyngeal tooth development; SCPP family genes; phylogenetic evolution; gene expression

(责任编辑:边书京)