

DOI: 10.12264/JFSC2024-0063

栉孔扇贝 miR-124-3p_4 靶基因的筛选及 *dpgn-like* 基因的表达特征

陈越¹, 张瑞琦¹, 李茜茜¹, 黄晓婷¹, 张志峰^{1,2}, 秦贞奎¹

1. 中国海洋大学, 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;
2. 中国海洋大学三亚海洋研究院, 海南省热带水产种质重点实验室, 海南 三亚 572000

摘要: 为探究微小 RNA (miRNA) 在贝类性腺发育过程中发挥的作用, 以栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 为研究材料, 以在幼贝早期性别分化阶段精巢中高表达的 miR-124-3p_4 为研究对象开展研究, 预测并验证了其靶向调控的基因, 揭示关键靶基因的表达模式。软件综合预测可知 miR-124-3p_4 调控 8 个卵巢偏向性基因, 其中与 miR-124-3p_4 互作能力最强的基因为 *dpgn-like* 基因; 表达结果显示 *dpgn-like* 基因在卵巢中的表达显著高于精巢, 且其表达定位于卵原和卵母细胞胞质; 双荧光素酶报告基因分析以及体内过表达 miRNA 实验从体外和体内两个方面验证了 miR-124-3p_4 能够下调 *dpgn-like* 基因的表达。研究结果表明, miR-124-3p_4 可以抑制卵巢高表达基因 *dpgn-like* 在精巢中的表达, 暗示其可能在栉孔扇贝性腺发育中发挥调控作用。

关键词: 栉孔扇贝; miR-124-3p_4; *dpgn-like* 基因; 表达特征

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)06-0627-13

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是调控基因表达的一大类重要的内源调控因子, 具有高度保守性、时序性和组织特异性等特点, 其通过特定的种子序列与靶标 mRNA 相互识别并介导基因沉默, 参与调控性腺发育和性别分化等生物学过程^[1-2]。目前已知许多基因可调控模式生物的性腺发育, 并且研究发现 miRNA 可以通过靶向抑制 *sox9*、*tra* 等关键基因的表达, 调控小鼠 (*Mus musculus*)、橘小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 等动物性别和性腺的发育^[3-5]。在贝类中的相关研究发现了包括 *dmrt1*、*foxl2*、*klf4* 在内的多个性别分化和性腺发育关键基因^[6-8], 以及少量的雌雄差异表达 miRNA^[9-12], 但这些基因的表达调控特别是 miRNA 对其的调控作用研究十分欠缺, 并且 miRNA 在贝类性腺发育中调控作用尚无相关的研究报道。目前, 在贝类性腺中雌雄

差异表达 miRNA 调控基因表达的研究仅在三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)、长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、魁蚶 (*Scapharca broughtonii*) 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中有所报道^[9-12], 且相关研究主要是针对雌雄性腺差异 miRNAs 进行了筛选, 然而有关 miRNA 与靶基因相互作用关系的验证及其作用的研究存在一定的缺失, 特别是 miRNA 通过靶基因调控个体性腺发育的研究存在大量空白。栉孔扇贝 (*C. farreri*) 是我国北方沿海重要的养殖贝类, 其为雌雄异体且性别稳定, 是研究贝类性别和性腺发育机制的良好生物模型。本研究以栉孔扇贝为研究材料, 以课题组前期研究中发现的精巢高表达 miR-124-3p_4 为研究对象, 对其靶基因进行筛选鉴定, 采用双荧光素酶报告基因系统和体内过表达研究确定 miR-124-3p_4 与靶基因的互作关系, 并对靶基因的表达特征进行揭

收稿日期: 2024-03-19; 修订日期: 2024-04-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901400).

作者简介: 陈越(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 1290078914@qq.com

通信作者: 秦贞奎, 副教授, 研究方向为贝类生殖与发育生物学. E-mail: qinzk@ouc.edu.cn

示。研究旨在为贝类性别和性腺发育调控机制的解析提供重要的基础数据和新的科研思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的雌性二龄栉孔扇贝购买于青岛南山水产市场,壳高为 (6.28 ± 0.16) cm。在实验室条件下,过滤海水暂养。以其性腺指数(gonad somatic index, $GSI = \text{性腺重} / \text{软体重} \times 100\%$)为指标挑取发育至各阶段(休止期 $GSI = 3.70 \pm 0.62$, 增殖期 $GSI = 4.08 \pm 0.91$, 生长期 $GSI = 6.95 \pm 0.45$ 和成熟期 $GSI = 9.03 \pm 0.97$)高活性的个体,将部分性腺组织在 4% 多聚甲醛中固定 18 h,用梯度甲醇脱水,并储存在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于切片的原位杂交。剩余雌性扇贝用于 miRNA 过表达实验,并将性腺样品分别固定储存在 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和液氮速冻后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2 栉孔扇贝性腺总 RNA 提取

根据已报道文献,采用酚-氯仿抽提法提取栉孔扇贝性腺组织总 RNA^[13]。并使用 NanoPhotometer[®]N60 超微量分光光度计测定总 RNA 浓度,以及 OD260、OD280 和 OD230 的相对吸收值;使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 质量,将合格的 RNA 样品储存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

1.3 栉孔扇贝性腺组织 cDNA 合成以及 miRNA cDNA 合成

使用 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒(艾科瑞,中国),按照说明书合成栉孔扇贝成熟期卵巢 cDNA,用于双荧光素酶报告基因载体的构建。同时,使用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 Ver.2 (艾科瑞,中国)合成栉孔扇贝成熟期卵巢 cDNA;使用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(艾科瑞,中国)合成栉孔扇贝成熟期精巢与卵巢的 miRNA cDNA,用于后续定量检测。

1.4 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的序列分析与靶基因预测

课题组前期研究获得了栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的成熟体序列:5'-UAAGGCACGCGGUGAAUG-CCA-3',其种子序列为 AAGGCAC^[11]。

从 RNAcentral (<https://rnacentral.org/>)数据库中获取人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)和玻璃海鞘(*Ciona intestinalis*)等不同物种的 miR-124-3p 序列。使用 Jalview 2.11 软件对上述不同物种的 miR-124-3p 序列进行比对。

从 MolluscDB 数据库(<http://mgbase.qnlm.ac/home>)中获取栉孔扇贝基因组及转录组数据^[14],使用 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/rnahybrid/>)和 miRanda (<http://www.miranda.org/>)软件预测栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的靶基因;通过 RNAhybrid 在线网站预测靶基因与 miR-124-3p_4 的结合自由能和结合位点(参数设置: hits per target=5, energy Threshold=-20 kcal/mol),并根据栉孔扇贝转录组数据库得到靶基因在栉孔扇贝各组织中的表达量。

1.5 靶基因的序列分析

从栉孔扇贝基因组数据库的基因编码序列文件中^[14]获得 miR-124-3p_4 结合自由能最低靶基因 *dpgn-like* 的全长 DNA 序列(基因 ID: evm.model.scaffold42795.18),通过 NCBI 在线 BLAST 将该靶基因进行比对,获取序列同源信息。根据 *dpgn-like* 基因所编码的蛋白序列,从 NCBI 数据库中下载保存以下动物的 serine protease inhibitor dipetalogastin (DPGN)蛋白序列:雪蟹(*Chionoecetes opilio*, KAG0725198.1)、家蚕(*Bombyx mori*, XP_004924430.1)、大水蚤(*Daphnia magna* JAN14733.1)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*, XP_034332063.1)、葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*, XP_052710578.1)、砂海螂(*Mya arenaria*, XP_052797244.1)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*, OWF44643.1)、翡翠海葵(*Exaiptasia diaphana*, XP_020897061.1)和星状海葵(*Nematostella vectensis*, XP_032222071.2)。通过 Jalview 2.11 软件对上述不同物种的蛋白序列进行多重比对,使用 IQ-TREE Web Serve 程序构建最大似然系统发育树^[15],并使用 iTOL v5 程序对构建的系统发育树进行可视化^[16]。再使用 NCBI 与 TBTools 软件预测该靶基因的功能域,对

其基因结构进行可视化。

1.6 双荧光素酶报告基因载体的构建

为进一步探究 *dpgn-like* 基因与 miR-124-3p₄ 是否存在相互作用关系。通过 RNAhybrid 在线网址预测靶基因与栉孔扇贝 miR-124-3p₄ 的结合位点, 选取位点上下游 250 bp 左右位置设计 PCR 引物(SF: 5'-GAGCTCATGTGGGGCAAATG-3', 下划线为 Sac I 内切酶位点; SR: 5'-CTCGAGTCAA-TTCCACAGACAGG-3', 下划线为 *Xho* I 内切酶位点), 并以栉孔扇贝成熟期卵巢 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 所获产物经凝胶纯化后连入线性化的 pmirGLO 载体(Promega, 美国), 构建双荧光素酶报告基因系统载体。使用无内毒素中量小提试剂盒(天根, 中国)提取质粒, 经 NanoPhotometer[®]N60 超微量分光光度计和 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 保存于 -20 °C 备用。

1.7 HEK293T 细胞转染与荧光素酶活性检测

通过 Sangon Biotech (中国上海)公司合成 miR-124-3p₄ 模拟物(正义序列: 5'-UAAGGCAC-GCGGUGAAUGCCA-3', 反义序列: 5'-GCAUUC-ACCGCGUGCCUUAUU-3'), 以及阴性对照(NC)模拟物(正义序列: 5'-UUGUACUACACAAAAG-UACUG-3', 反义序列: 5'-GUACUUUUGUGUA-GUACAAUU-3'), 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国)脂质体转染法将 miR-124-3p₄ 模拟物(miR-124-3p₄-mimic)及含有目的片段的双荧光素酶报告基因载体共转染 HEK293T 细胞, 每组设置 3 个技术重复和 3 个生物学重复。转染 48 h 后, 使用 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Pro-

mega, 美国)按照说明书方法测量细胞中的荧光素酶活性。

1.8 体内过表达 miR-124-3p₄ 并检测 *dpgn-like* 基因的表达情况

将二龄栉孔扇贝雌贝分为空白对照组(blank control group, BC)、阴性对照组(negative control group, NC)和实验组(experimental group), 每组各 35 只二龄雌贝。对 NC 组的每只贝分别注射溶于 80 μL PBS 的 30 μg agomir NC, 对实验组的每只贝分别注射溶于 80 μL PBS 的 30 μg miRNA agomir (agomir 由上海生工公司合成)。BC 组未进行注射。本次实验共注射 4 次, 分别在第 0 天、第 7 天、第 14 天和第 28 天进行一次注射, 并分别在每次注射后 3 d, 即第 3 天、第 10 天、第 17 天和第 31 天进行取样。

课题组前期研究发现, 通过 miRNA agomir 注射进行 miRNA 过表达的有效性最早可在第一次注射后即可测出, 故本研究通过 RT-qPCR 技术以第一次注射后的 3 组卵巢为模板, 对 miR-124-3p₄ 及 *dpgn-like* 的相对表达量进行检测。设计合成 miR-124-3p₄ 和 *U6* 特异性引物, 使用 *U6* 基因作为内参基因^[17]; 设计合成 *dpgn-like* 和 *ef-1α* 特异性引物, 使用延伸因子 *ef-1α* 作为内参基因(表 1)。

使用 SYBR Green Pro Taq HS qPCR Kit II 试剂盒(艾科瑞, 中国)和 ABI QuantStudioTM5 定量 PCR 仪(ThermoFisher, 美国), 按照操作说明进行 PCR 扩增, 即保温阶段 95 °C 反应 30 s; PCR 阶段 95 °C 反应 3 s, 60 °C 反应 30 s 循环 40 次, 熔解曲线阶段 95 °C 反应 5 s, 60 °C 反应 60 s, 95 °C 离解反应 1 s, 40 °C 反应 60 s。每组设置 3 个技术重复和 3 个生物

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers for real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	产物长度/bp product length
miR-124-3p ₄ -S	TAAGGCACGCGGTGAATGCCA	-
<i>U6</i> -S	CGGCAGTACATATATTAATAATTGGAACGA	90
<i>U6</i> -AS	TGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTCATC	
<i>dpgn-like</i> -S	TCTCGACCCTACCTACTGGCAC	103
<i>dpgn-like</i> -AS	CATCCTTCCTCCATCTCGTCC	
<i>ef-1α</i> -S	TCTCGACCCTACCTACTGGCAC	102
<i>ef-1α</i> -AS	CATCCTTCCTCCATCTCGTCC	

注: miR-124-3p₄ 下游引物由 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒提供。

Note: miR-124-3p₄ downstream primers are provided by the miRNA cDNA First Strand Synthesis Kit.

学重复。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算获得 miR-124-3p_4 及 *dpgn-like* 的相对表达量。

1.9 原位杂交

根据获得的栉孔扇贝 *dpgn-like* 基因序列设计原位杂交探针引物, 如表 2 所示。以栉孔扇贝成熟期卵巢为模板, 通过 PCR 扩增目的片段。经

NanoPhotometer[®]N60 超微量分光光度计和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 DIG RNA Labeling kit (SP6/T7) 试剂盒 (Roche, 瑞士) 通过体外转录合成原位杂交探针。根据实验室已建立的栉孔扇贝组织切片原位杂交方法^[18], 对栉孔扇贝卵巢中 *dpgn-like* 基因的细胞学定位进行检测。

表 2 *dpgn-like* 基因原位杂交探针引物
Tab. 2 Primers for *in situ* hybridization of *dpgn-like* gene

引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	下划线 underline	产物长度/bp product length
<i>dpgn-like</i> -PS	<u>ATTTAGGTGACACTATAGAAGCG</u> TCCTATTAGTAAAGCAAGCTGAAG	SP6 启动子	426
<i>dpgn-like</i> -PAS	TAATACGACTCACTATAGGGAGACA CTCGAATCATACATTGACGGATT	T7 启动子	

2 结果与分析

2.1 miR-124-3p_4 序列分析

对获取的以下物种的 miR-124-3p 序列进行比对(人类, URS00000ADB79_9606; 小鼠, URS00020BE6A_10090; 家兔, URS00007E3485_9986; 斑马鱼, URS00000ADB79_7955; 果蝇, URS000056E1DA_7227; 玻璃海鞘, URS00000ADB79_7719), 序列比对结果显示, 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的序列 5'-UAAGGCACGCGGUGAAUGCCA-3' 的核心序列与其他物种保持一致。(图 1)

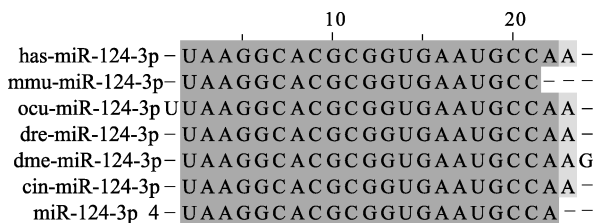


图 1 不同物种的 miR-124-3p 序列比对
Fig. 1 Sequence alignment of miR-124-3p from different species

2.2 miR-124-3p_4 的靶基因预测及表达情况分析

RNAhybrid 预测结果显示栉孔扇贝 miR-124-3p_4 有 729 个靶基因, miRanda 预测结果显示其有 436 个靶基因, 其中交集数目为 260 个(图 2a)。结合 MolluscDB 数据库获取的栉孔扇贝转录组数据, 在 260 个共同预测到的靶基因中, 存在雌雄表达差异的靶基因共 20 个(表 3), 其中在精巢中高表

达的有 12 个, 在卵巢中高表达的有 8 个(图 2b)。

RNAhybrid 在线网址预测获得靶基因与栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的结合位点和结合自由能的结果显示, 该 miRNA 种子序列与 8 个预测的卵巢偏向性靶基因能够完全匹配, 且结合自由能均小于 -20 kcal/mol (图 3), 初步说明了栉孔扇贝 miR-124-3p_4 与上述 8 个卵巢偏向性靶基因存在靶向关系。

2.3 栉孔扇贝 *dpgn-like* 的序列分析和表达特征分析

上述 8 个卵巢偏向性表达的基因中, 与 miR-124-3p_4 结合自由能最低的靶基因为 serpin protease inhibitor dipetalogastin-like (*dpgn-like*) 基因, 因此首先对该基因的基本情况进行了分析。

生物信息学分析结果显示, 该基因由 14 个外显子组成, 其 cDNA 序列中 5' 非编码区(untranslated region, UTR)长 333 bp, 3'-UTR 长 2525 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 1668 bp, 编码 559 个氨基酸(图 4a)。栉孔扇贝 DPGNL 包含 4 个 MFS 保守结构域, 2 个 KAZAL_FS 保守结构域和 1 个 OATP 保守结构域(图 4b, 图 5)。系统进化树分析结果显示, 栉孔扇贝该蛋白首先与虾夷扇贝、三角帆蚌、葡萄牙牡蛎和砂海螂聚集在一个分支上, 这几种贝类再一起与家蚕聚类; 而翡翠海葵与星状海葵聚类, 它们一同与大型蚤聚集在同一个分支上, 最后这两个分支与雪蟹聚类在一起(图 4b)。

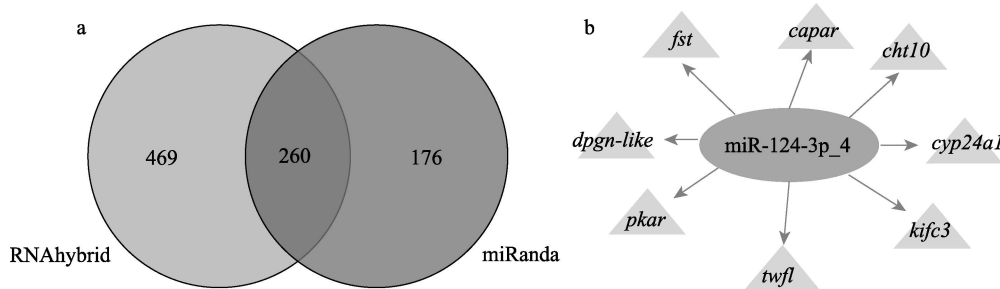


图 2 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 靶基因的预测

a. 由两个软件预测到的靶基因; b. 栉孔扇贝卵巢中偏向性表达的靶基因.

Fig. 2 Prediction of *cfa*-miR-124-3p_4 target genes

a. Target genes predicted by two software; b. the target genes highly expressed in the ovaries of *Chlamys farreri*.

表 3 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 雌雄差异靶基因

Tab. 3 miR-124-3p_4 male and female differential target genes in *Chlamys farreri*

基因 ID	gene ID	基因名	gene name	diffexp_log ₂ fc_F-vs-M	注释信息	annotation
evm.model.scaffold14347.9		<i>fst</i>		1.719866269	Follistatin OS= <i>Bos taurus</i> GN=FST PE=2 SV=2	
evm.model.scaffold231.9		<i>cht10</i>		1.275221446	Probable chitinase 3 OS= <i>Drosophila melanogaster</i> GN=Cht3 PE=2 SV=2	
evm.model.scaffold55147.16		<i>cyp24a1</i>		0.92516052	1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial OS= <i>Homo sapiens</i> GN=CYP24A1 PE=1 SV=2	
evm.model.scaffold6995.1		<i>kifc3</i>		1.159119879	Kinesin-like protein KIFC3 OS= <i>Homo sapiens</i> GN=KIFC3 PE=1 SV=4	
evm.model.scaffold42795.18		<i>dpgn-like</i>		1.624920555	Serine protease inhibitor dipetalogastin (Fragment) OS= <i>Dipetalogaster maximus</i> PE=1 SV=2	
evm.model.scaffold16525.13		<i>pkar</i>		3.618195563	cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit OS= <i>Blastocladiella emersonii</i> GN=PKAR PE=2 SV=1	
evm.model.scaffold40565.1		<i>twfl</i>		0.809443763	Twincillin-1 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Twf1 PE=2 SV=1	
evm.model.scaffold60559.2		<i>capar</i>		3.545763807	Neuropeptides capa receptor OS= <i>Drosophila melanogaster</i> GN=capaR PE=2 SV=3	
evm.model.scaffold39217.8		<i>psap</i>		-2.108481472	Sulfated glycoprotein 1 OS= <i>Rattus norvegicus</i> GN=Psap PE=1 SV=1	
evm.model.scaffold20385.1		<i>mfsdl</i>		-1.20153343637627	Major facilitator superfamily domain-containing protein 1 OS= <i>Danio rerio</i> GN=mfsdl PE=2 SV=1	
evm.model.scaffold231.38		<i>srsf2</i>		-0.837842213	Probable chitinase 3 OS= <i>Drosophila melanogaster</i> GN=Cht3 PE=2 SV=2	
evm.model.scaffold231.40		<i>tmem184b</i>		-1.239474721	Transmembrane protein 184B OS= <i>Bos taurus</i> GN=TMEM184B PE=2 SV=1	
evm.model.scaffold44307.16		<i>elav-like3</i>		-4.111495731	K1QC02_CRAGI ELAV-like protein 2 OS= <i>Crassostrea gigas</i> GN=CGI_10018933 PE=4 SV=1 (trembl-id)	
evm.model.scaffold45925.2		<i>loc105347452</i>		-1.987099845	K1QPA9_CRAGI Uncharacterized protein OS= <i>Crassostrea gigas</i> GN=CGI_10024719 PE=4 SV=1 (trembl-id)	
evm.model.scaffold59425.3		<i>perlucin</i>		-4.471203559	Perlucin OS= <i>Halictis laevigata</i> PE=1 SV=3	
evm.model.scaffold62393.29		<i>celCCG</i>		-2.523300519	Endoglucanase G OS= <i>Clostridium cellulolyticum</i> (strain ATCC 35319/DSM 5812/JCM 6584/H10) GN=celCCG PE=1 SV=2	
evm.model.scaffold726251.1		<i>loc128183496</i>		-3.753544787	K1PR61_CRAGI Uncharacterized protein OS= <i>Crassostrea gigas</i> GN=CGI_10026320 PE=4 SV=1 (trembl-id)	
evm.model.scaffold44735.15		<i>postn</i>		-4.091848203	Periostin OS= <i>Homo sapiens</i> GN=POSTN PE=1 SV=2	
evm.model.scaffold42681.3		<i>ces3</i>		-0.879486067	Carboxylesterase 3 OS= <i>Pongo abelii</i> GN=CES3 PE=2 SV=2	
evm.model.scaffold26497.7		<i>ces5a</i>		-1.950461207	Carboxylesterase 5A OS= <i>Mus musculus</i> GN=Ces5a PE=2 SV=1	

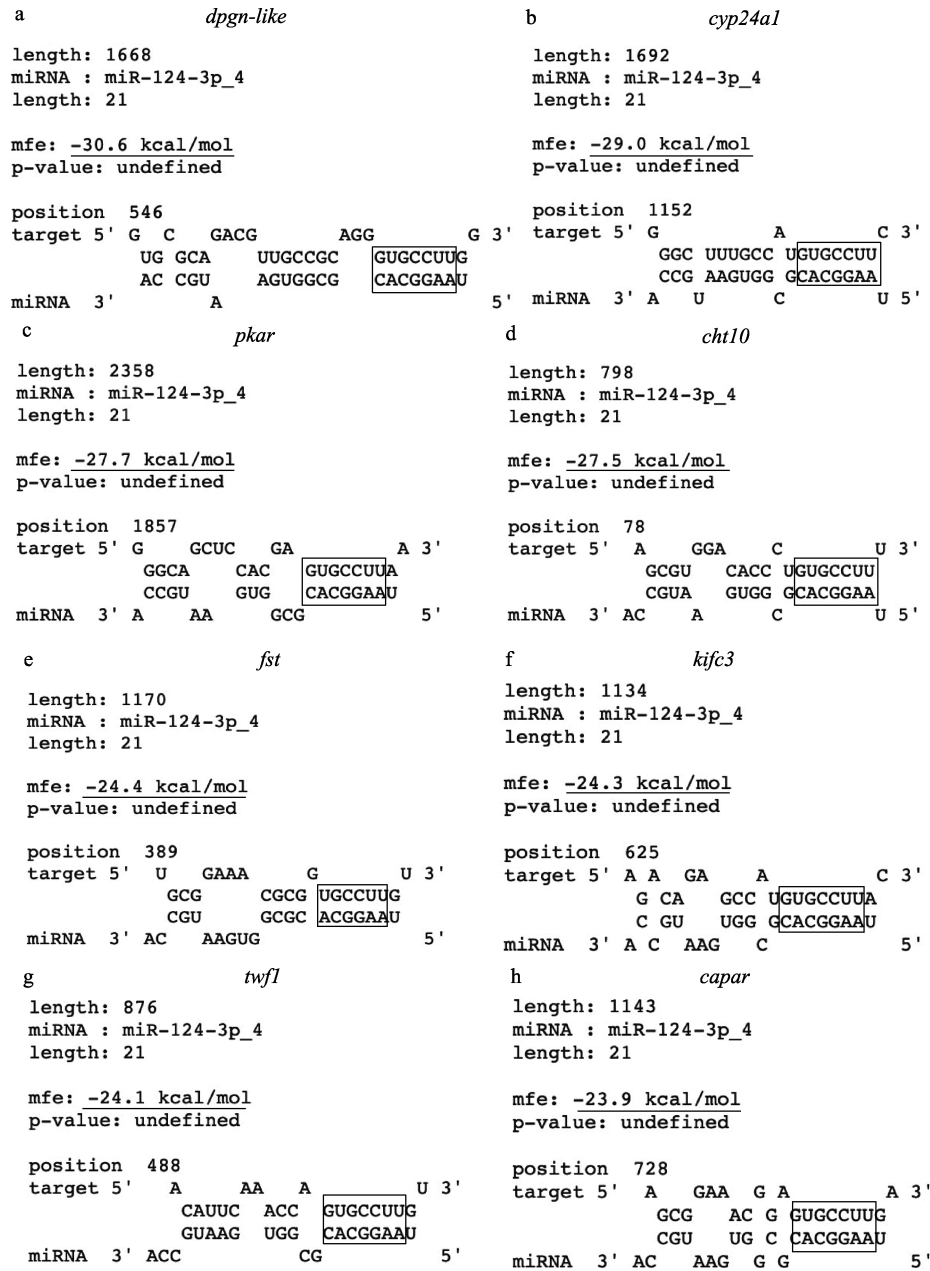


图 3 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 与 8 个卵巢偏向性靶基因结合位点与结合自由能预测

结合位点由框线表示, 结合自由能由下划线表示; a—h 分别表示靶基因 *dpgn-like*、*cyp24a1*、*pkar*、*cht10*、*fst*、*kifc3*、*twf1* 和 *capar*。

Fig. 3 Prediction of binding sites and binding free energy of miR-124-3p_4 in *Chlamys farreri* to ovary-biased target genes

The boxed lines indicate binding sites, and the underlines indicate binding free energy; a—h show the target genes *dpgn-like*, *cyp24a1*, *pkar*, *cht10*, *fst*, *kifc3*, *twf1* and *capar*, respectively.

根据栉孔扇贝数据库^[15], *dpgn-like* 在成熟期栉孔扇贝各组织均有表达。其中, 在外套膜中的表达量最高, 其次是足, 在精巢中的表达量最低(图 6a)。而在栉孔扇贝性腺中 *dpgn-like* 的表达存在显著差异, 在卵巢中表达较高, 为精巢表达量的 4.4 倍(图 6b)。

原位杂交结果显示, *dpgn-like* mRNA 在栉孔扇贝卵巢各发育阶段的生殖细胞, 包括卵原细胞和卵母细胞中均有表达, 且其表达部位主要定位于细胞质中, 而在滤泡细胞中几乎观察不到该基因表达(图 7)。在栉孔扇贝卵巢的整个发育周期中, *dpgn-like* mRNA 在增殖期卵巢的生殖细胞开始出

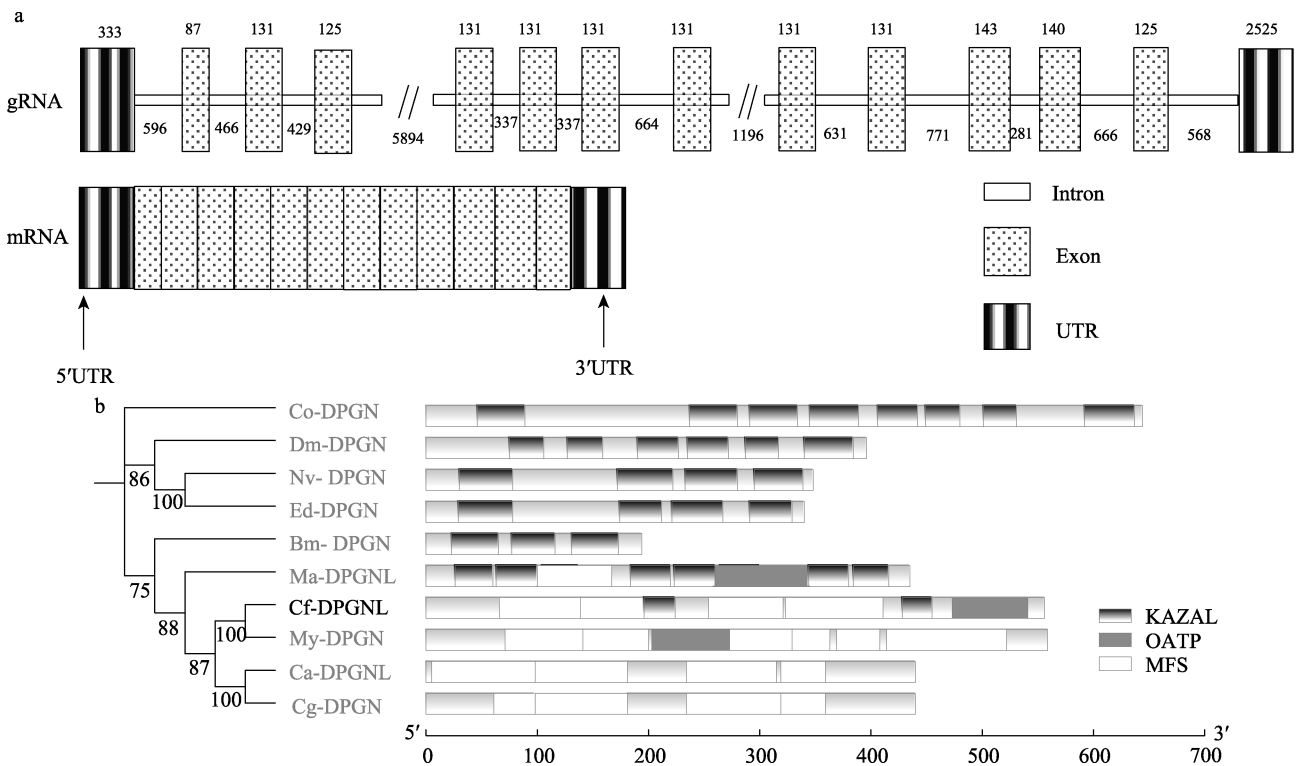


图 4 栉孔扇贝 *dpgn-like* 基因与其编码蛋白 DPGNL

- a. 栉孔扇贝 *dpgn-like* 基因结构框架图, gDNA 中各元件上的数字代表核苷酸个数(bp);
- b. 多物种系统发育进化树与保守域结构.

Fig. 4 *dpgn-like* gene and its encoded protein DPGN in *Chlamys farreri*

- a. Structural framework diagram of *dpgn-like* in *Chlamys farreri*. The numbers on each element in gDNA represent the nucleotide number (bp);
- b. Phylogenetic tree and conserved domain structures in multiple species.

现比较微弱的表达, 随着发育的进行, 其阳性信号强度逐渐增强, 在成熟期卵巢中信号达到最强。

2.4 栉孔扇贝 miR-124-3p₄ 可以调控 *dpgn-like* 的表达

RNAhybrid 在线网站预测结果表明, miR-124-3p₄ 的种子序列能够与 *dpgn-like* 基因序列完全结合, 且结合自由能为 -30.6 kcal/mol (图 8a), 在所有预测到的卵巢偏向性靶基因中最低 (图 3a)。

双荧光素酶报告基因分析结果表明, 栉孔扇贝 miR-124-3p₄ 与 *dpgn-like* 基因具有靶向调控关系。与对照组相比, miR-124-3p₄ 模拟物与 *dpgn-like* 共转染的细胞中的相对荧光活性显著下降, 下降了 64% (图 8b)。

进一步, 当向栉孔扇贝体内注射 miR-124-3p₄ agomir 使该 miRNA 在卵巢中过表达 3 d 后, RT-qPCR 检测到 miR-124-3p₄ 的表达量显著增加,

为对照组的 16.28 倍(图 8c); 同时, 也检测到靶基因 *dpgn-like* 的表达量显著下降 36% (图 8d)。

3 讨论

miRNA 作为内源性调控因子在基因表达调控研究领域备受关注, 现已证明 miRNA 参与了生物体的多种生物过程的调控。在研究线虫发育过程中首次发现了 miRNA 的作用, *lin-4* 可以参与调控秀丽隐杆线虫各种胚胎后的发育事件, 它通过反义 RNA-RNA 相互作用调节 *lin-14* 的翻译^[19]。此外, *let-7* 在线虫和果蝇中被确定为异时基因, 影响着其幼虫细胞的命运; 在哺乳动物中, *let-7* 参与胚胎发生和大脑发育过程, 还可能与肿瘤治疗和癌症发生相关^[20-22]。此外, miRNA 在动物性腺发育的研究也有报道, 在小鼠中 miR-124 的过表达会抑制卵巢细胞中 *sox9* 翻译和转录^[3], 在橘小实蝇中 miR-1-3p 靶向早期胚胎雄性分化基因

```

1 M K S V L L Q V L V L V S V C Y L V H Q S E A R H M R R R C N A L S E
1 ATGAAAAGTTCCTTACAAGTGTAGTATGGTGTCTGTATGTTACCTAGTGCACCAGTCTGAAGCACGCCACATGAGACGGCGATGTAATGCCTTGAGTGAA
36 P V C G V N G R S Y R N R C V A I R R K V N I K C D G R C P C D V D G
106 CCAAGTGTGGCGTTAATGGACGGTCATACAGAAACAGATGTGTCGCTATCCGAGGAAAGTCAATATCAAGTGTGATGGTATAGTGTCCCTGTGACGTGGACGGT
MFS I
71 R C L C T K E Y D P V C G I D G N N Y D N P C L A K C A R T T I G C H
211 AGATGCCATATACCAAGGAATACGACCCGTCTGTGGAAATAGATGGCAATACTACGACAACCCTGTCTAGCCAAATGCGCGGAACCACCAATCGGCTGTACAC
MFS I
106 G K C P C R A G C A C T R E L N P V C G T D G K T Y N N P C G A K C A
316 GGGAAATGTCTTGTAGGCTGGATGTCTGTACCCGGGAATTAACCCCTGTTGTGGCAGGACGGCAAACCTACAACAATCCATGTGGGCAAATGGCGG
MFS I
141 G V S E A C R G K C P C N R P T L C R C T K E Y N P V C G M D G K T Y
421 GGTGTGTCGGAGCTTGTAGAGGGAAGTGTCTTGTAAACAGACCCACGCTCTGTGCGTGTACCAAAGAATAACAATCCAGTGTGTGGATGGGAAACCTTAC
MFS II
176 G N K C V L K C A D V A A G C L G E C P C T Q P K P C I C P L N F D P
526 GAAATAAATGTATTAAGTGGCAGACGTTGCGCAGGGTGCCTTGGTGTGTCCATGTACTCAACCAAAACCATGTATATGCCCTTTGAACCTTTGACCTT
MFS II
211 V C G I D G K T Y G N K C G A N C A G V A E A C K G E C P C N K T T P
631 GTCTGTGGAAATGATGGGAAACCTACGGAAACAAAGTGTGGGCAAAATGCGCGGGCTGGCAGAGGCTGTAAAGGGGAGTGTCCGTGTAAACAAAACCAACCC
KAZAL FS I
246 C I C T A D Y K P V C G V D G K T Y G N V C G A N C V G V D I E C Q G
736 TGATATGTACCCTGATFACAAGCCTGTGTGTGGTGTAGATGGGAAAACGTACGGAACGTTTGGCGGAGCTAACTGTGTGGTGTGGACATGAATGTCAAGGT
MFS III
281 E C P C R R Q T P C M C T R E F R P V C G Q N G K T Y S N P C E A K C
841 GAATGTCCATGAGGCGTCAAACCTCCGTGTATGTGTACACGGGAATTCAGACCTGTGTGGCAGAGAATGGGAAAACCTACAGTAACCCCTGTGAGGCGAAGTGC
MFS III
316 A G V S E D C T G E C P C N K R K P C I C T L E Y N P V C G V D G K T
946 GCGGGTGTGTCGGAGGACTGACAGGGGAGTGTCTTGTAAAGCGTAAGCCCTGCATATGACACATAGAATAACAACCCGGTCTGTGGTGTGTGAAAGAACT
MFS III MFS IV
351 Y G N A C G A K C A N V Q E D C K G E C P C P K K K K C A C P K I L R
1051 TACGAAACCGCATGCGAGCTAAGTGTCAAGAGATTGTAAGGCGAATGTCCATGCCCTAAAAGAAGAAGTGTCTGTGCAAAAGATTTTGAGA
MFS IV
386 P V C G K D G R T Y S N G C E A S C Q N V S I E C K D A C P C D T R K
1156 CCCGTTTGGCAAGGAGCGTTCGGACATATCTAACGGATGTGAGGCGTCAATGTCAAACGTTAGCATTGAATGCAAAGACCATGCGCGTGTGATACAGAAAA
MFS IV
421 M P S R V C A C P R I Y R P V C G K D G K M Y N N A C L A R C S R S K
1261 ATGCTTACAGTGTGTCATGTCCTAGAAATTTATCGTCCGGTGTGTGGAAAGGATGGCAAGATGTATAATAACCGATGTTAGCAAGATGCAGCGGCTAAG
KAZAL FS II
456 I A C K G A C P C K L K V Q K P K C A C P R T F R P V C G V N G R T Y
1366 ATTGCATGTAAGGGCGTGTCCGTGTAACCTCAAAGTACAGAAGCCGAAAGTGTCTTGTCTAGAACGTTCCGCCCTGTCTGTGGAGTTAATGGAAGGACCTAC
OATP
491 S N S C T A T C R N T E V E C N G K C P C K K H C V C P F I L K P V C
1471 TCGAACTCGTACTGCAACATGCAGAAACCGGAGGTGCAATGTAACGGTATGATGTCATGCAAGAAACACTGCGTATGCCATTTATCCTAAACCTGTGTGT
OATP
1526 G V N G Q T F P N S C S A Q C K G V R V E C N R R C P C D K *
1576 GGTGTCAATGGACAGACTTCCCAAACCTCGTGCAGCGCCCAATGCAAGGGTGTGCGCGTGAATGTAACAGGCGTTGCTCTGTGACAAGTGA
OATP

```

图 5 栉孔扇贝 *dpgn-like* 基因 cDNA 全长的核酸序列及其编码的氨基酸序列
保守结构域在序列下方标出，终止密码子用星号表示。

Fig. 5 The full-length cDNA sequences of the *dpgn-like* gene and the amino acid sequences of DPGN of *Chlamys farreri*. The conserved domains are indicated below the sequence. The termination codons are indicated by an asterisk.

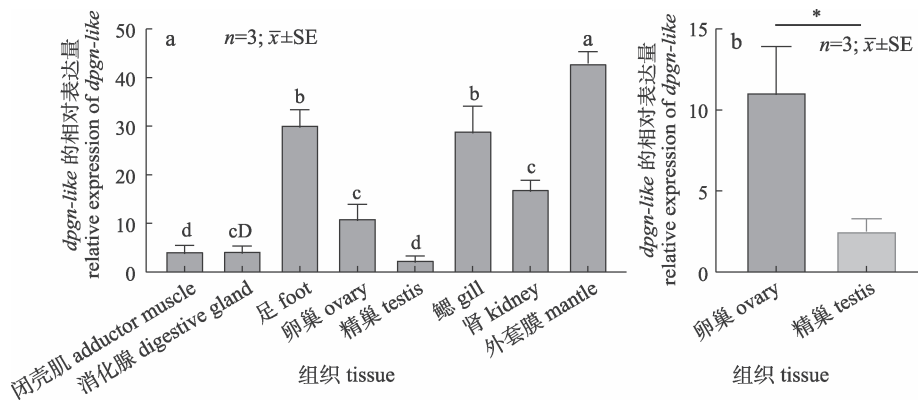


图 6 栉孔扇贝 miR-124-3p_4 的卵巢偏向性靶基因 *dpgn-like* 在成熟期栉孔扇贝中的表达

a. 在各组织中的相对表达; b. 在性腺中的相对表达。

不同字母表示各组数据之间存在显著性差异 ($P < 0.05$); *代表两组数据间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Relative expression of ovary-biased target gene *dpgn-like* of miR-124-3p_4 in mature *Chlamys farreri*

a. Relative expression in the organizations; b. Relative expression in the gonads.

Different letters indicated significant differences between groups ($P < 0.05$); * indicated significant differences between groups ($P < 0.05$).

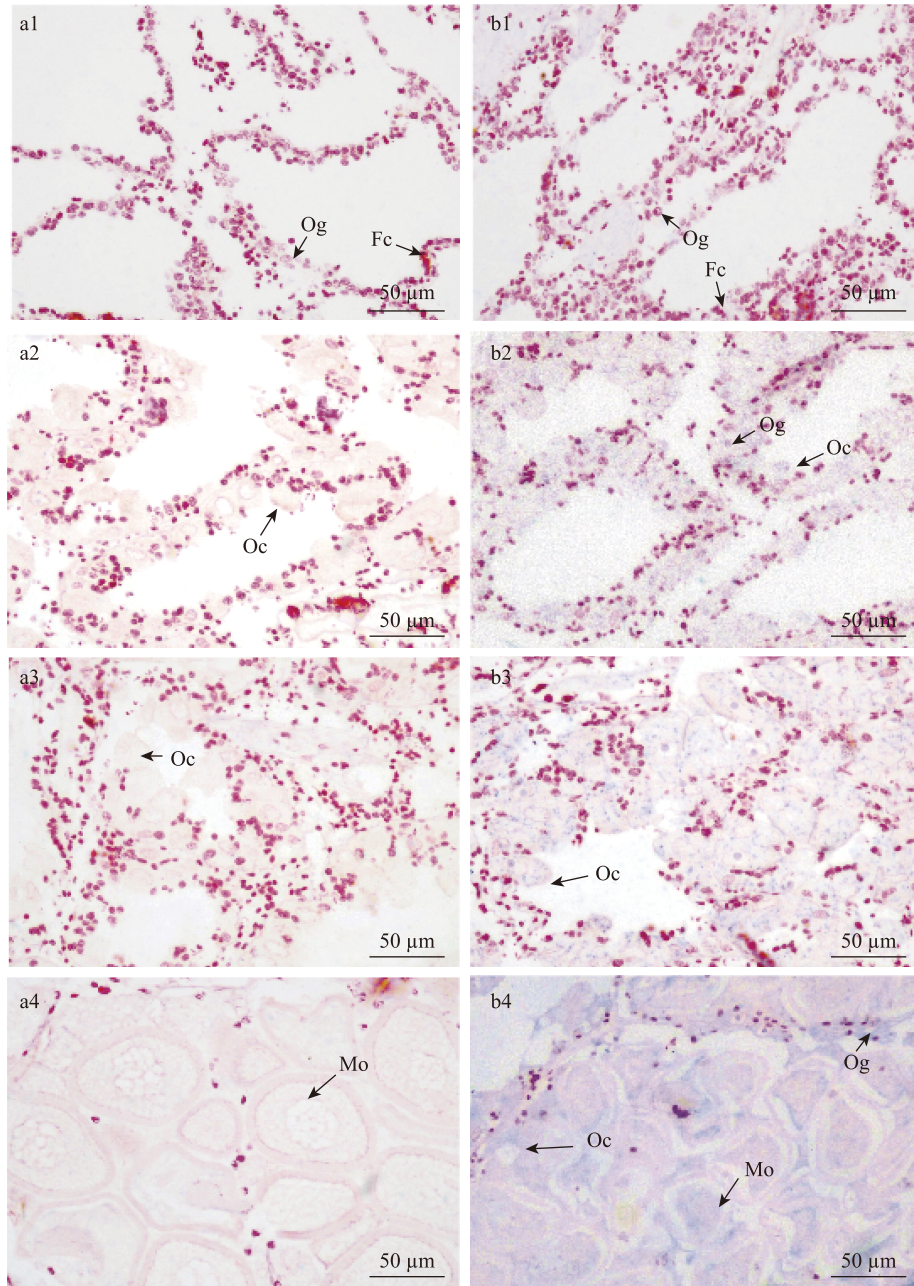


图 7 *dpgn-like* 基因在栉孔扇贝成体卵巢中的细胞学定位
 a. 阴性探针; b. 阳性探针; 1-4: 休止期、增殖期、生长期、成熟期.

Fc: 滤泡细胞; Og: 卵原细胞; Oc: 卵母细胞; Mo: 成熟卵.

Fig. 7 Cytological localization of *dpgn-like* mRNA in mature ovaries of *Chlamys farreri*
 a. Negative probe; b. Positive probe. 1-4: resting, proliferative, growing, mature stages.

Fc: follicular cell; Og: oogonia; Oc: oocyte; Mo: mature ovum.

Bdtra 调控雄性表型的发生^[4]。然而在非模式生物中相关研究仍处于探索阶段, 尚未有明确的调控机制被完整解析。贝类性别差异表达 miRNA 的发现, 为科研人员研究 miRNA 参与调控性别分化和性腺发育的相关机制提供了重要的线索。在

本课题组前期研究工作中, 获得了栉孔扇贝幼贝中差异表达的 miRNAs, 并确定了 miR-124-3p_4 在性别起始分化阶段具有雄性特异性高表达的特征, 表明其可能参与栉孔扇贝性腺发育。为了进一步探究其在贝类性腺发育中作用, 本研究以栉

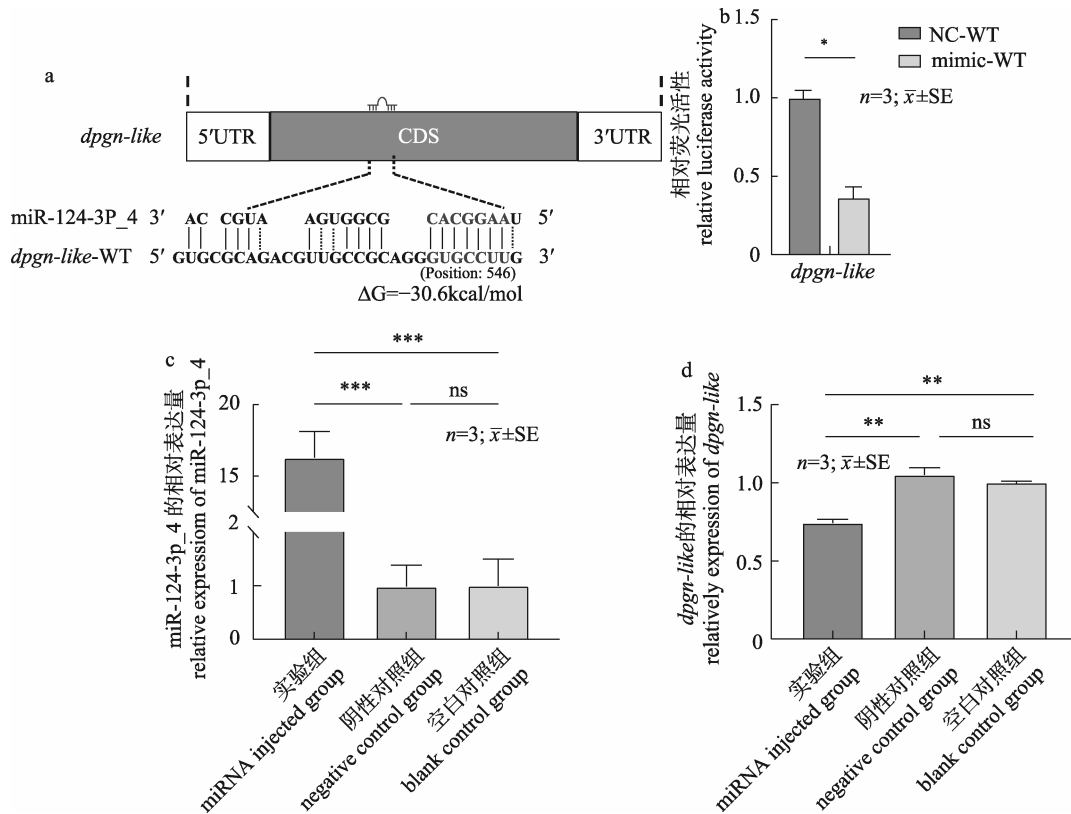


图 8 栉孔扇贝 miR-124-3p₄ 与靶基因 *dpgn-like* 相互作用关系的验证

a. miR-124-3p₄ 与 *dpgn-like* 结合位点预测, 下划线表示种子序列; b. 双荧光素酶报告基因分析; c-d. 过表达 miR-124-3p₄ 后栉孔扇贝卵巢中 miR-124-3p₄ 与 *dpgn-like* 的相对表达量. 对相对荧光活性和相对表达进行了归一化处理, NC-WT 的荧光活性以及过表达 miRNA 后空白对照组中的 miRNA 与 *dpgn-like* 表达被设置为 1.00. ns, 无显著差异; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. 8 Verification of the interaction between miR-124-3p₄ and the target gene *dpgn-like* in *Chlamys farreri* a. miR-124-3p₄ binding site prediction with *dpgn-like*, and the underline indicates the seed sequences; b. Dual luciferase reporter analysis; c-d. Relative expression of miR-124-3p₄ and *dpgn-like* in the *Chlamys farreri* ovaries after overexpression of miR-124-3p₄. The relative luciferase activity and relative expression were normalized. The luciferase activity of NC-WT, miRNA and *dpgn-like* expression in the blank control group after overexpression of miRNA were set to 1.00. ns, no significant difference; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

孔扇贝为研究对象, 对 miR-124-3p₄ 及靶基因的互作和表达情况进行了解析, 对其在栉孔扇贝性腺发育中发挥的功能进行了初步探索, 证实了在栉孔扇贝卵巢中 miR-124-3p₄ 能够靶向 *dpgn-like* 基因并可能参与栉孔扇贝卵巢的发育。

在本研究中, 首先对 miR-124-3p₄ 的靶基因进行了预测, 为增加结果的可靠性, 同时使用 RNAhybrid 与 miRanda 两种软件对 miR-124-3p₄ 的靶基因进行预测。两个软件共同预测到 260 个相同的靶基因。结合栉孔扇贝转录组数据库中基因在栉孔扇贝性腺中的 logFoldChange (Female/Male) 值, 在 260 个共同预测到的靶基因中, 存在

20 个雌雄差异表达的靶基因, 其中有 12 个在精巢中高表达, 有 8 个在卵巢中高表达(分别是: *fst*、*cht10*、*cyp24a1*、*kifc3*、*dpgn-like*、*pkar*、*twf1* 和 *capar*)。miRNA 通常在转录后的水平负向调控靶基因的表达, 而前期研究发现 miR-124-3p₄ 在精巢中高表达^[11], 因此本研究选择在栉孔扇贝卵巢偏向性高表达的基因作为靶基因进行后续研究。

通过 RNAhybrid 在线网站预测了 8 个卵巢偏向性靶基因与栉孔扇贝 miR-124-3p₄ 的结合位点与结合自由能, 结果表明这 8 个靶基因均能与 miR-124-3p₄ 种子序列相结合, 且结合自由能均小于 -20 kcal/mol。其中, 靶基因 *dpgn-like* 与

miR-124-3p_4 的结合自由能最低, 表明两者间存在很强的靶向作用关系。本研究获得的栉孔扇贝 *dpgn-like* 基因由 14 个外显子组成, ORF 长度为 1668 bp, 编码 559 个氨基酸; 所编码的 DPGNL 蛋白包含 4 个 MFS 保守结构域, 2 个 KAZAL_FS 保守结构域和 1 个 OATP 保守结构域; 将该基因的序列分析在 NCBI 进行比对, 结果显示与其同源性最高的是虾夷扇贝的 *dpgn-like* 基因, 同源性高达 83%; 系统发育进化分析, 该基因编码蛋白 DPGN 在贝类中高度保守, 且与其他物种的 DPGN 可相互聚类。

根据栉孔扇贝数据库中 *dpgn-like* 基因的 TPM 值, 对其在栉孔扇贝成体各组织中的表达进行量分析, 发现栉孔扇贝 *dpgn-like* 在外套膜中表达量最高, 其次是足和鳃, 在精巢中的表达量最低; 且 *dpgn-like* 的表达在精巢和卵巢中存在显著差异, 在卵巢中的表达量是精巢的 4.4 倍。原位杂交结果显示, *dpgn-like* 的阳性信号定位于栉孔扇贝卵巢各发育阶段的生殖细胞中, 且在成熟期卵巢中表达强度最高。依据上述表达特征, 笔者推测 *dpgn-like* 可能参与了栉孔扇贝的卵巢发育。DPGN 蛋白最早被发现于一种吸血昆虫 *Dipetalogaster maximus*, 其可以防止血液凝固^[23-24], 同时它还具有胰蛋白酶和纤溶酶的抑制剂作用^[25], 本研究结果表明 DPGN 蛋白在贝类卵巢发育中也发挥了特定的功能。

目前, miRNA-mRNA 相互作用的研究在脊椎动物中研究较多、较为透彻, 而相关研究在贝类中十分缺乏。本研究对 miR-124-3p_4 与 *dpgn-like* 基因的靶向关系进行了验证。通过双荧光素酶报告基因系统在体外验证了 miR-124-3p_4 与对 *dpgn-like* 的负向调控, 同时通过在栉孔扇贝卵巢中过表达 miR-124-3p_4 也验证确定 miR-124-3p_4 在体内可负向调控 *dpgn-like* 的表达, 通过体内体外实验综合验证, 表明栉孔扇贝 miR-124-3p_4 与 *dpgn-like* 之间具有明确的靶向关系, 它们相互作用可能在栉孔扇贝卵巢发育中发挥特定作用。综合上述结果, 本研究初步探索了栉孔扇贝中 miR-124-3p_4 与 *dpgn-like* 基因的相互作用关系, 并解析了 *dpgn-like* 基因在卵巢中的表达模式。

相关结果完善了贝类 miRNA-mRNA 的相互作用途径, 对 miRNA 参与贝类性腺发育的调控机制提供了科学数据。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Saliminejad K, Khorram Khorshid H R, Soleymani Fard S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [3] Real F M, Sekido R, Lupiáñez D G, et al. A microRNA (mmu-miR-124) prevents *Sox9* expression in developing mouse ovarian cells[J]. Biology of Reproduction, 2013, 89(4): Article No.78.
- [4] Peng W, Yu S, Handler A M, et al. miRNA-1-3p is an early embryonic male sex-determining factor in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): Article No.932.
- [5] McJunkin K, Ambros V. A microRNA family exerts maternal control on sex determination in *Caenorhabditis elegans*[J]. Genes & Development, 2017, 31(4): 422-437.
- [6] Sun D F, Yu H, Li Q. Examination of the roles of *Foxl2* and *Dmrt1* in sex differentiation and gonadal development of oysters by using RNA interference[J]. Aquaculture, 2022, 548: 737732.
- [7] Yang D D, Zhang Z F, Liang S S, et al. A novel role of Krüppel-like factor 4 in Zhikong scallop *Chlamys farreri* during spermatogenesis[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0180351.
- [8] Wei P Y, He P P, Zhang X Z, et al. Identification and characterization of microRNAs in the gonads of *Crassostrea hongkongensis* using high-throughput sequencing[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics, 2019, 31: 100606.
- [9] Wang Y Y, Duan S H, Wang G L, et al. Integrated mRNA and miRNA expression profile analysis of female and male gonads in *Hyriopsis cumingii*[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): Article No.665.
- [10] Yue C Y, Li Q, Yu H. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles identifies potential regulatory interactions during sexual development of Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Aquaculture, 2022, 546: 737294.
- [11] Li X X, Lin S Y, Fan S T, et al. Identification and characterization of microRNAs involving in initial sex differentiation of *Chlamys farreri* gonads[J]. Biology (Basel), 2022, 11(3): 456.
- [12] Wu L L, Tian X, Zuo H W, et al. MiR-124-3p delivered by exosomes from heme oxygenase-1 modified bone marrow

- mesenchymal stem cells inhibits ferroptosis to attenuate ischemia-reperfusion injury in steatotic grafts[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): Article No.196.
- [13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162(1): 156-159.
- [14] Liu F Y, Li Y L, Yu H W, et al. MolluscDB: An integrated functional and evolutionary genomics database for the hyper-diverse animal phylum Mollusca[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D988-D997.
- [15] Trifinopoulos J, Nguyen L T, von Haeseler A, et al. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W232-W235.
- [16] Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [17] Dai M Q, Zhang Y T, Jiao Y, et al. Immunomodulatory effects of one novel microRNA miR-63 in pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2023, 140: 109002.
- [18] Li X X, Qin Z K, Wei M K, et al. Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(11): 1277-1284. [李茜茜, 秦贞奎, 魏茂凯, 等. 栉孔扇贝 *Dmrt1* 的分子鉴定及表达模式分析[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(11): 1277-1284.]
- [19] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [20] Reinhart B J, Slack F J, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [21] Maller Schulman B R, Esquela-Kerscher A, Slack F J. Reciprocal expression of *lin-41* and the microRNAs *let-7* and *mir-125* during mouse embryogenesis[J]. *Development Dynamics*, 2005, 234(4): 1046-1054.
- [22] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [23] Mende K, Petoukhova O, Koulitchkova V, et al. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266(2): 583-590.
- [24] Lange U, Keilholz W, Schaub G A, et al. Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*[J]. *Haemostasis*, 1999, 29(4): 204-211.
- [25] Schlott B, Wöhnert J, Icke C, et al. Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: Biochemical and structural studies[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318(2): 533-546.

Target genes identification of miR-124-3p_4 and expression characteristics of *dpgn-like* gene in *Chlamys farreri*

CHEN Yue¹, ZHANG Ruiqi¹, LI Xixi¹, HUANG Xiaoting¹, ZHANG Zhifeng^{1,2}, QIN Zhenkui¹

1. Ministry of Education Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Key Laboratory of Tropical Aquatic Germplasm of Hainan Province, Sanya Oceanographic Institution, Ocean University of China, Sanya 572000, China

Abstract: Scallops belong to bivalves of the mollusc phylum and are important shellfish culture species in China. Important varieties of scallops and their complex reproductive regulation mechanisms have been the focus of research in shellfish biology. Many genes have been reported to be involved in the sex differentiation and gonadal development of scallops, whereas the regulation of these genes has rarely been reported. MicroRNA is a class of important endogenous regulatory factors that can participate in the regulation of gene expression. To explore the role of microRNAs in the gonadal development of shellfish, this study took the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*), a hermaphroditic and sex-stable bivalve species and thus good material for such a mechanism exploration, as the research material. In a previous study, we found that miR-124-3p_4 was highly expressed in the testes of juveniles during the early stage of sexual differentiation, and thus took this microRNA as the research object. The sequence of miR-124-3p_4 was compared with other species and the core sequence was consistent. The genes targeted by miR-124-3p_4 were predicted through RNAhybrid and miRanda, from which 729 and 436 target genes were obtained, respectively, and the intersection was 260. Combining with the transcriptome data of *C. farreri*, eight ovary bias genes and twelve testis genes were obtained. Based on the binding site and binding-free energy analysis, all eight ovary bias genes matched perfectly with miR-124-3p_4 and their free energy was all below -20 kcal/mol, indicating the interaction activities between them. Among these genes, *dpgn-like* was found to have the strongest interaction with miR-124-3p_4. Sequence and structure analyses of the *dpgn-like* gene showed that its cDNA full length was 4526 bp, coding 559 amino acids. Four MFS, two KAZAL_FS, and one OATP conserved domain were identified in the DPGNL protein. Phylogenetic results clarified its identity and evolutionary status. The expression of the *dpgn-like* gene was mainly in the mantle, foot, gill and gonads, of which the expression in the ovaries was significantly higher than that in the testis with a fold change of 4.4. *In situ* hybridization was performed in mature ovaries and results showed that the *dpgn-like* gene expression was localized in oogonia and oocyte cytoplasm, but not in follicle cells, indicating its potential involvement in ovary development. To test whether miR-124-3p_4 and the *dpgn-like* gene were directly interacted, a dual luciferase reporter gene analysis was conducted. Through co-transfer of miR-124-3p_4 and the *dpgn-like* gene into HEK293T cells, the *dpgn-like* gene expression was significantly reduced by 64%. Furthermore, *in vivo* overexpression of miR-124-3p_4 in the ovary was explored by the microinjection of miR-124-3p_4 agomir. After 3 d of microRNA overexpression, a 16.28-fold increase of miR-124-3p_4 to the control group was confirmed by RT-qPCR. Meanwhile, the *dpgn-like* gene expression was reduced to 0.74, again indicating that miR-124-3p_4 could combine and down-regulate *dpgn-like* gene expression in ovaries. In summary, this study screened for the potential target genes of miR-124-3p_4, identified the *dpgn-like* gene which had the strongest interaction with it, revealed the sequence and structure characteristic of the *dpgn-like* gene, and uncovered its expressional patterns. These results suggest that the *dpgn-like* gene may be involved in gonadal development. In addition, both *in vitro* and *in vivo* analyses indicated that miR-124-3p_4 could directly target the *dpgn-like* gene. Collectively, these outcomes reveal that male-biased miR-124-3p_4 negatively regulated ovary-biased *dpgn-like* gene expression in the testis, implying its potential role during the development of gonads.

Key words: *Chlamys farreri*; miR-124-3p_4; *dpgn-like* gene; expression characteristics

Corresponding author: QIN Zhenkui. E-mail: qinzk@ouc.edu.cn