

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20068

栉孔扇贝 *Dmrt1* 的分子鉴定及表达模式分析

李茜茜, 秦贞奎, 魏茂凯, 张志峰

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

摘要: DMRT1 是 DMRT 家族重要成员之一, 主要参与动物性别决定和分化调控, 但在不同动物中其表达和功能调控作用存在差异。本研究采用生物信息学方法分析了栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) *Dmrt1* 的序列特征, 采用半定量 RT-PCR 技术确定了其 mRNA 在成体性腺、闭壳肌、外套膜、鳃和肾等组织中的分布, 定量 RT-PCR 和原位杂交技术揭示了 *Dmrt1* mRNA 在性腺中的时空表达特征。结果显示: 栉孔扇贝 *Dmrt1* 序列中含有 DMRT 家族保守的 DM 结构域; 其 mRNA 仅在栉孔扇贝性腺中表达, 在精巢中的表达明显高于卵巢, 并且以生长期精巢的表达水平最高; 原位杂交检测 *Dmrt1* 阳性信号主要定位于生殖细胞的细胞质中。研究结果表明, *Dmrt1* 在栉孔扇贝性腺中的表达特征与大部分动物性腺中的表达特征基本一致, 推测其可能参与性别分化和精巢发育的功能调节。

关键词: 栉孔扇贝; *Dmrt1*; 分子特征; 基因表达; 性腺

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1277-08

DMRT (doublesex and Mab-3-related transcription factor) 是一类含有锌指 DM 结构域的转录因子, 目前已经发现了 10 多个 DMRT 家族成员, 它们在动物性别决定和分化、组织和器官形成与功能维持中发挥重要作用^[1-2]。DMRT1 被认为是从无脊椎动物到脊椎动物唯一进化保守的性别相关基因^[3-4]。DMRT1 主要参与动物性别决定和分化调控, 但在不同物种性别决定和分化过程中的表达和功能存在差异。在 小鼠 (*Mus musculus*)、鸡 (*Gallus gallus*)^[5]、粗皮蛙 (*Ranarugosa*)^[6] 和尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[7] 等物种中, *Dmrt1* 仅在精巢中特异表达, 在海蟾蜍 (*Bufo marinus*)^[8]、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*)^[9]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[10] 等物种中, *Dmrt1* 在精巢和卵巢中均表达, 而在河川沙塘鳢 (*Odontobutis potamophila*)^[11]、三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*)^[12]、海湾扇贝 (*Argopecten irradians*)^[13] 中, *Dmrt1* 不仅仅局限在性腺中表达, 在成体其他组织中也有表达。已有的功能研究表明, *Dmrt1* 与哺乳类、鸟类等动

物雄性性别决定和性别分化相关^[5]。但 DMRT1 在无脊椎动物性别决定和性别分化中尚无相关的功能研究。本研究以性别组成稳定的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 为实验对象, 采用半定量 RT-PCR 技术检测了 *Dmrt1* mRNA 在其成体中的组织分布, 采用荧光定量 qRT-PCR 和原位杂交技术确定了 *Dmrt1* 在性腺中的表达特征, 以阐述 *Dmrt1* 在栉孔扇贝性腺发育中的重要作用, 旨在探究 *Dmrt1* 在双壳纲动物中的功能研究奠定基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及取样

实验所用二龄栉孔扇贝购自青岛市南山水产市场, 壳高为 (6.01±0.67) cm。在实验室过滤海水中暂养 1 d 后, 选取活力旺盛的个体解剖取其性腺、闭壳肌、外套膜、鳃、肾等样本, 分别剪成约 4 mm³ 的组织块, 迅速于液氮中速冻并保存于 -80 °C 冰箱中, 用于总 RNA 提取; 部分性腺组织于 4% 多聚甲醛中固定 18 h, 经梯度甲醇 (25%,

收稿日期: 2020-03-17; 修订日期: 2020-05-31.

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2018YFD0901400).

作者简介: 李茜茜 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为细胞生物学. E-mail: lclixixi@163.com

通信作者: 张志峰, 教授, 研究方向为海洋生物遗传与育种. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

50%, 75%, 100%)脱水后, 保存于-30 °C 冰箱, 用于切片原位杂交。

根据 Lin 等^[14]描述的组织学特征和性腺指数 (gonad somatic index, GSI=性腺重/软体重×100%), 计算各时期精巢和卵巢的 GSI, 将栉孔扇贝性腺分为休止期 (精巢 GSI=3.85±0.45, 卵巢 GSI=3.70±0.62)、增殖期 (精巢 GSI=4.65±0.25, 卵巢 GSI=4.08±0.91)、生长期 (精巢 GSI=7.19±0.69, 卵巢 GSI=6.95±0.45) 和成熟期 (精巢 GSI=9.72±1.21, 卵巢 GSI=9.03±0.97)。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

采用异硫氰酸胍法提取栉孔扇贝各样本的总 RNA, 使用 DNase I 消化样本中的基因组 DNA, 紫外分光光度法和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 浓度和质量。使用 PrimeScript™ Kit reagent RT Eraser gDNA with 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 并参照操作说明将总 RNA 反转录为 cDNA, -30 °C 保存。

1.3 *Dmrt1* 的生物信息学分析

从栉孔扇贝基因组数据分析获得的基因编码序列文件中, 获得靶基因的 cDNA 序列, 使用 SMART 软件预测功能域, 使用 DMAMAN 软件对 DMRT1 蛋白进行多序列比对, 使用 MEGA 6.0 软件并采用邻接法 (neighbor joining) 对物种中普遍存在的 DMRT 家族成员构建进化树。

1.4 半定量 RT-PCR

根据 1.3 获得的栉孔扇贝 *Dmrt1* cDNA 序列设计半定量 RT-PCR 引物 sqPCR-S 和 sqPCR-AS (表 1), 以延伸因子 *ef-1α* (*elongation factor 1-alpha*) 作为内参基因 (GenBank 序列号: JQ278034.1), 内参引物为 EF-S 和 EF-AS (表 1)。以栉孔扇贝生长期各组织样本的 cDNA 为模板进行目的基因 PCR。反应体系为 10 μL, 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 28 个循环; *ef-1α* 的 cDNA 扩增为 23 个循环。PCR 检测共进行 3 次。

表 1 本实验所用引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

基因名称 gene name	引物序列 (5'-3') primer sequence	扩增片段长度/bp fragment length	用途 purpose
<i>Dmrt1</i>	sqPCR-S: TGACGGAGATACACAGAAGGC	550	半定量 RT-PCR semi-quantitative real-time PCR
	sqPCR-AS :CTCTGCCTCGGATTCTGTAG		
	qPCR-S: GACGGAGATACACAGAAGGC	185	定量 RT-PCR quantitative real-time PCR
	qPCR-AS : CCAATGAGCCCCATACCGAC		
Probe-S: <u>ATTTAGGTGACACTATAGAAGCG</u> <u>TATCCCAAGGTATCGGAAGTGAACG</u>	536	扩增原位杂交探针 <i>in situ</i> hybridization probe amplification	
Probe-AS : <u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> <u>ACATCAGTTACTTTCGCTTTCGTTCC</u>			
<i>ef-1α</i>	EF-S: GAAAGCGACAGACAAGCCAC	124	半定量和定量 RT-PCR semi-quantitative real-time PCR and quantitative real-time PCR
	EF-AS :GGTAAGTTCATCAGAGCGAGCA		

注: 下划线分别为 T7 启动子序列 (Probe-S) 和 SP6 启动子序列 (Probe-AS)。

Note: The T7 promoter (Probe-S) and SP6 promoter (Probe-AS) are underlined respectively.

1.5 荧光定量 qRT-PCR

设计栉孔扇贝 *Dmrt1* 定量 qRT-PCR 引物 qPCR-S、qPCR-AS 和内参基因引物 EF-S、EF-AS (表 1), 以栉孔扇贝各发育时期精巢和卵巢 cDNA 为模板, 对内参基因和目的基因进行 PCR 扩增。使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 和 LightCycler® 480 实时定量 PCR 仪 (Roche,

瑞士) 并按照操作说明进行扩增。PCR 反应条件: 50 °C 2 min; 94 °C 10 min; 94 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。每个发育时期性腺设置 3 个样品重复, 每个样本设置两个技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。将增殖期卵巢 *Dmrt1* mRNA 的表达量设定为 1, 其他各时期性腺中靶基因的表达量均以与它的倍数表示。

所有数据表述为平均值±标准误, 使用 SPSS 17.0 软件进行显著性分析, 设定 $P < 0.05$ 为显著性差异。

1.6 切片原位杂交

使用表 1 中的一对引物 Probe-AS 和 Probe-S, 以成熟期精巢的 cDNA 为模板, PCR 扩增获得长度为 536 bp 的探针序列。DNase I 消除残留 DNA 后, 将扩增产物胶回收并验证序列, 然后以该序列为模板, 使用 DIG RNA Labeling kit (Roche, 瑞士) 并按照操作指南进行体外转录, 获得栉孔扇贝 *Dmrt1* 地高辛标记的 RNA 正义和反义探针。

取保存于甲醇中的栉孔扇贝成熟期精巢和卵巢样本, 常规石蜡切片, 卵巢的切片厚度为 5 μm , 精巢为 4 μm 。按照 Ling^[15] 的方法并稍加改动进行组织原位杂交, 其中使用 2 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶 K 消化 30 min (37 $^{\circ}\text{C}$)。Nikon E80i 显微镜进行观察

和拍照。

2 结果与分析

2.1 栉孔扇贝 *Dmrt1* 的序列特征

生物信息学分析结果显示, 栉孔扇贝 *Dmrt1* 由 3 个外显子组成, 长度分别为 259 bp、245 bp 和 453 bp。其 cDNA 序列中 5'非编码区(untranslated region, UTR)长 138 bp, 3' UTR 长 52 bp, 开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 957 bp, 编码 319 个氨基酸, 并在第一个外显子编码的氨基酸序列中含有 DMRT 家族保守的 DM 结构域(图 1)。DM 结构域的多序列比对结果显示, 其中含有锌指结构(CCHC 的 Site I 和 HCCC 的 Site II)和 1 个核定位信号(nuclear localization signal, NLS) KGHKR 序列(图 2)。

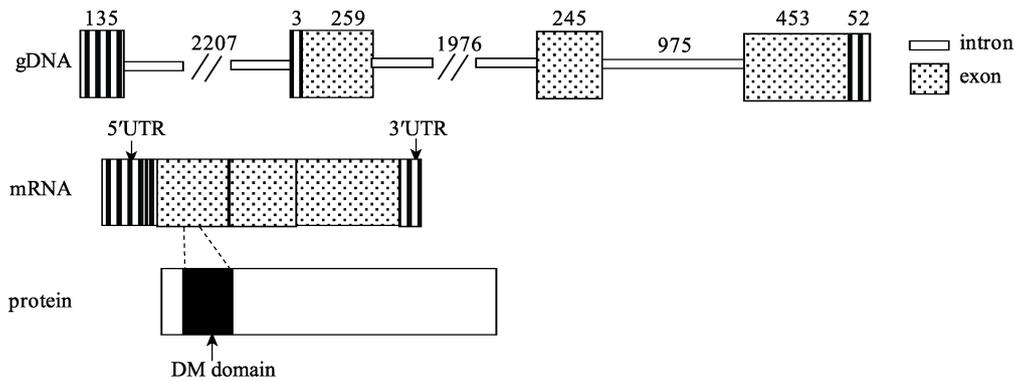


图 1 栉孔扇贝 *Dmrt1* 基因结构框架图

gDNA 中各元件上的数字代表核苷酸个数(bp).

Fig. 1 Structure frameworks of *Dmrt1* in *Chlamys farreri*

The numbers on elements in gDNA represent the nucleotide number (bp).

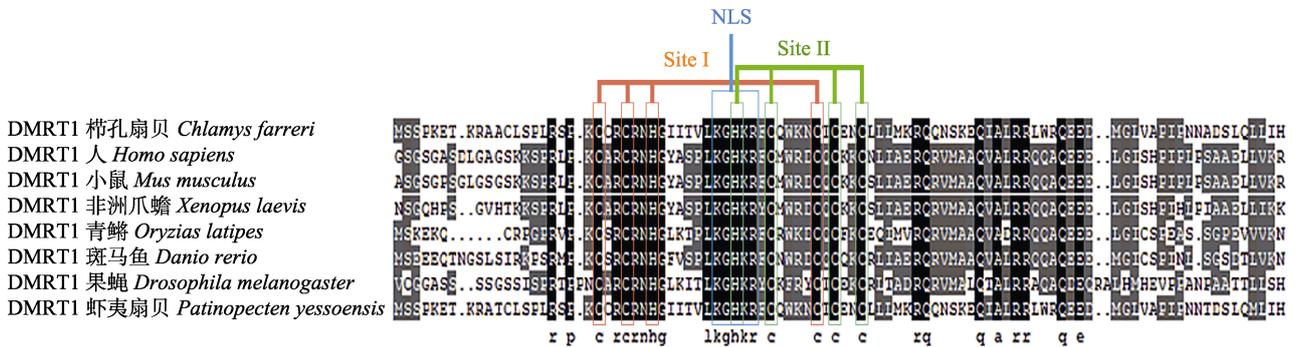


图 2 不同物种 DMRT1 中的 DM 结构域多序列比对

保守的锌指结构中包含橙色框(Site I)和绿色框(Site II)位点, 预测的核定位序列用蓝框表示。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the DM domain from DMRT1s among the different species

The conserved zinc finger domains are shown in orange (Site I) and green (Site II) boxes.

The predicated NLS is shown in blue.

系统进化分析结果显示, 栉孔扇贝 *DMRT1* 首先与大多数物种的 *DMRT1* 聚类, 然后再依次与其他 *DMRT* 成员聚类。在 *DMRT1* 聚类中, 栉

孔扇贝首先与双壳贝类虾夷扇贝 *DMRT1* 聚类, 然后再与脊椎动物 *DMRT1*、果蝇 *DSX* 和线虫 *MAB-3* 进一步聚成更大的分支(图 3)。

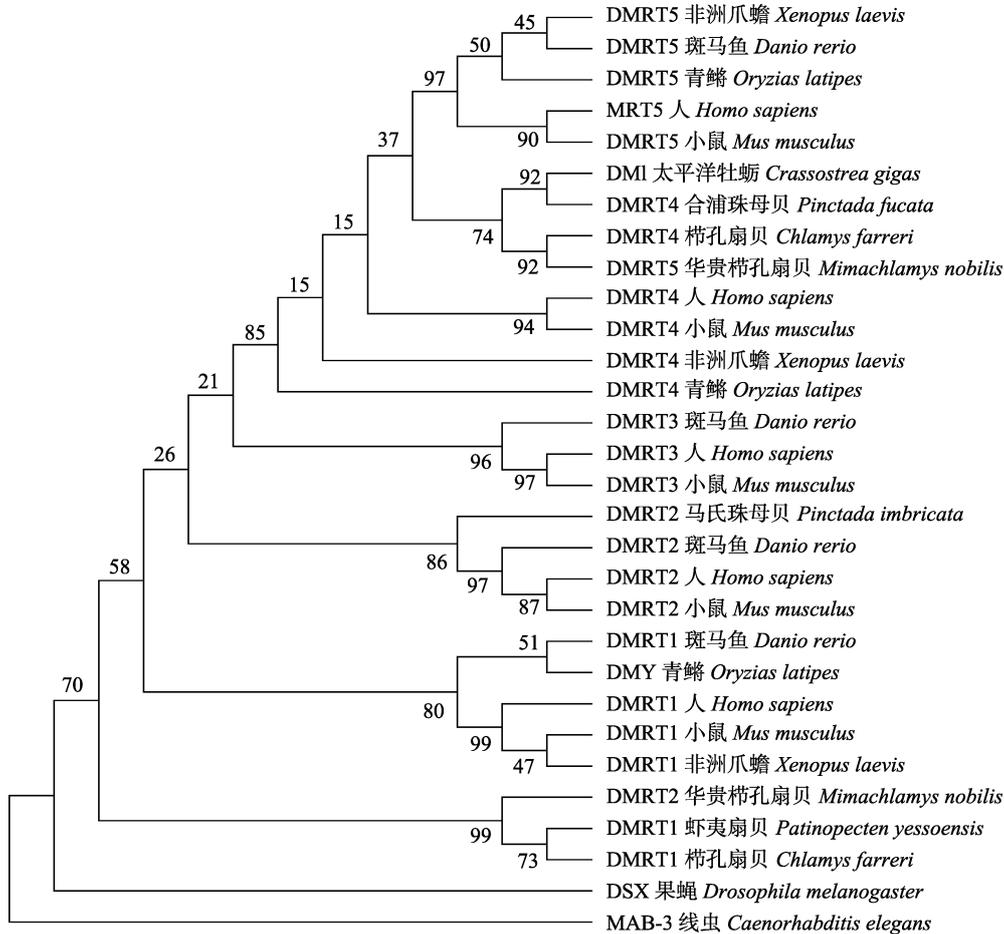


图 3 不同物种 *DMRT* 家族蛋白的系统进化分析

使用 MEGA 6.0 软件采用 Neighbor Joining 法构建进化树, Bootstrap 设置为 1000.

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *DMRT* proteins from different species

Phylogenetic trees of *DMRT* constructed by MAGA version 6.0. Numbers show the bootstrap percentage (1000 replicates) using the neighbor-joining (NJ) method.

2.2 栉孔扇贝 *Dmrt1* 在成体各组织中的表达

半定量 RT-PCR 结果显示, 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 仅在精巢中检测到高水平表达, 在鳃、外套膜、肾、闭壳肌和卵巢组织中均未检测到靶基因表达(图 4)。

2.3 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 在不同发育时期性腺中的定量表达分析

qRT-PCR 结果表明, 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 水平在精巢和卵巢中存在显著差异, 其在精巢中的表达量极显著高于同时期卵巢中的表达量, 分

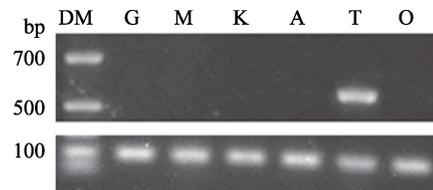


图 4 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 的组织分布

DM, DL 1000 marker; A, 闭壳肌; G, 鳃; K, 肾; M, 外套膜; O, 卵巢; T, 精巢.

Fig. 4 Tissue distribution of *Dmrt1* mRNA detected by semi-quantitative RT-PCR

DM, DL 1000 marker; A, adductor muscle; G, gill; K, kidney; M, mantle; O, ovary; T, testis.

别是 15 倍(休止期)、18 倍(增殖期)、40 倍(生长期)和 5 倍(成熟期)。此外, *Dmrt1* mRNA 在生长期精巢中的表达水平显著高于其他发育时期精巢的水平; 但在各期卵巢中未见明显差异(图 5)。

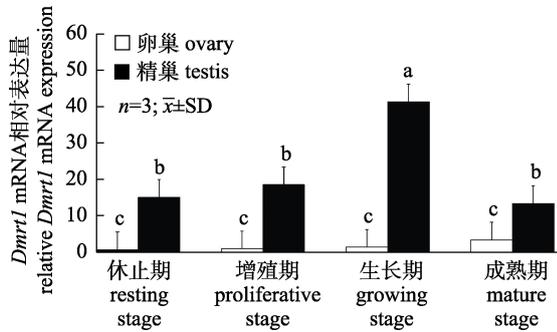


图 5 孔扇贝不同发育时期性腺中 *Dmrt1* mRNA 的相对表达量

增殖期卵巢中 *Dmrt1* 的表达水平设为标准 1,

其他时期性腺中的表达量均以与其的倍数表示;

不同字母表示各组数据之间存在显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Relative levels of the *Dmrt1* mRNA in *Chlamys farreri* gonads at the different stages detected by qRT-PCR

The expression level in the ovaries at proliferative stage is set as 1 to calibrate the relative levels in gonads at other stages. Different letters indicate significant differences from each other ($P < 0.05$).

2.4 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 在成熟期性腺中的细胞学定位

原位杂交结果显示, *Dmrt1* mRNA 在成熟期精巢的所有生精细胞的细胞质中均检测到阳性信号, 且阳性信号的强度在精原细胞和初级精母细胞中明显高于精细胞和精子(图 6 m1, 图 6 m2, 图 6 m3), 在精子中的阳性信号定位于精子头部基部的细胞质中(图 6 m3)。在卵巢中, *Dmrt1* mRNA 定位于所有细胞的细胞质中, 其中卵巢体细胞、卵原细胞和早期卵母细胞中的阳性信号高于晚期卵母细胞(图 6 f1)。

3 讨论

贝类拥有多样的性别模式, 包括雌雄异体、雌雄同体, 一些物种甚至具有性逆转特性, 迄今对各种模式的性别决定、性别分化以及性别维持的分子机制还是不清楚的。筛选和鉴定有效的性别关键基因为阐释贝类性别分化调控机制以及未来的性控育种都是非常必要的。本研究鉴定了栉

孔扇贝 *Dmrt1* 的序列特征, 揭示其在性腺中的二态性表达模式与已报道的大部分物种的特征基本一致, 即: 在精巢中的表达水平显著高于卵巢, 初步确定其可能也是栉孔扇贝雄性关键基因。

栉孔扇贝 *Dmrt1* 由 3 个外显子组成, 根据栉孔扇贝转录组数据, 它们形成一种 mRNA 转录本, 未见选择性剪接现象, 这一特征与已报道的虾夷扇贝 *Dmrt1* 序列特征一致^[16]。但是, 鱼类的 *Dmrt1* 拼接现象时常发生, 例如: 斑马鱼的 *Dmrt1* 中 7 个外显子以不同方式的剪接产生 3 种转录本^[17]; 泥鳅 *Dmrt1* 中的 5 个外显子剪接产生了 3 种转录本^[18]。由此, 不同物种 *Dmrt1* 的转录本形成机制存在差异。多序列分析结果显示, 栉孔扇贝 *Dmrt1* ORF 所推导的氨基酸序列中具有 DMRT 家族保守的 DM 结构域, 该结构域中包含由保守的 6 个半胱氨酸(C)和 2 个组氨酸(H)形成的锌指结构, 其中还具有 1 个核定位信号 KGHKR。已有研究发现, DMRT1 保守域中的核定位信号序列的突变将导致其聚集在细胞核外而不能顺利入核, 由此影响其正常的功能^[19]。本研究结果显示, 栉孔扇贝 DMRT1 功能结构完整, 推测其保留了该蛋白保守的功能。

在哺乳动物(小鼠^[5])、两栖类(日本粗皮蛙^[6])和大部分鱼类(尼罗罗非鱼^[7]等)中, *Dmrt1* 仅在精巢中表达, 在其他成体组织中未见表达。本研究在栉孔扇贝中检测到类似的 *Dmrt1* 组织表达特征(图 4), 表明栉孔扇贝在成体中的组织分布特征遵循多数物种的特征。然而, 在已报道的几种双壳贝类中, *Dmrt1* 的组织分布并不完全一致, 三角帆蚌、海湾扇贝等双壳贝类 *Dmrt1* 的组织分布与栉孔扇贝存在差异, 在三角帆蚌中, *Dmrt1* 在性腺、外套膜、斧足和鳃中均有表达^[12]; 海湾扇贝中 *Dmrt1* 在性腺、外套膜、鳃、足、肾脏、肝胰腺、平滑肌和横纹肌中普遍表达^[13]。类似的现象也发生在鱼类, 例如: 尼罗罗非鱼^[7]、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[20]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Gunther)^[21]、胡子鲇(*Clarias fuscus*)^[22]等大部分鱼类中, *Dmrt1* 仅在精巢中表达; 而在个别鱼类中 *Dmrt1* 则呈现多组织表达特征, 例如, 河川沙塘鳢中的 *Dmrt1* 在精巢中大量表达, 同时在卵

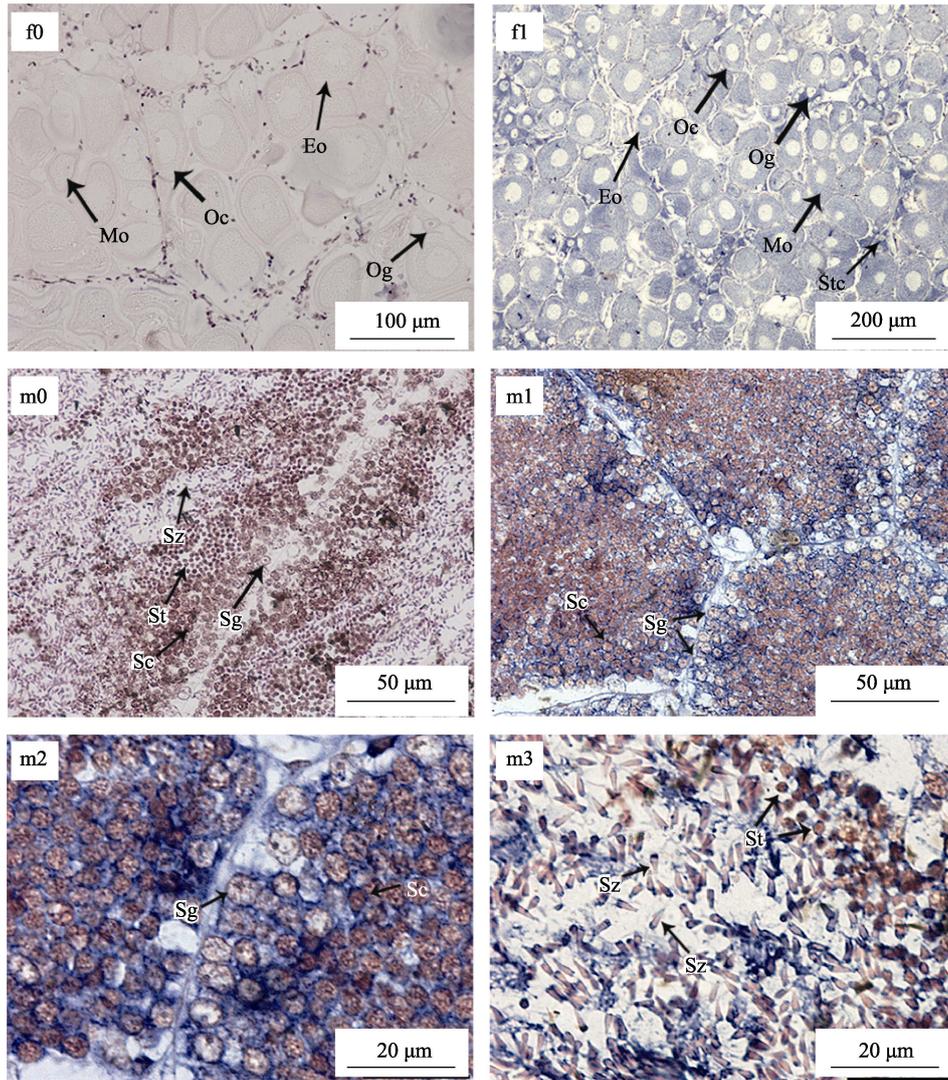


图 6 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 在成熟期性腺中的细胞学定位

f1 和 m1-3 为 *Dmrt1* 反义探针检测结果, 蓝色是阳性信号; f0 和 m0 为 *Dmrt1* 正义探针检测结果; f: 卵巢; m: 精巢; m2 和 m3 为 m1 的局部放大图; Eo: 早期卵母细胞; Mo: 近成熟卵母细胞; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Stc: 体细胞; Sz: 精子。

Fig. 6 Localization of *Dmrt1* mRNA in *Chlamys farreri* gonads at the mature stage demonstrated by *in situ* hybridization f1 and m1-3, the gonads detected using the *Dmrt1* antisense probe, blue is the positive signal; f0 and m0, the gonads detected using the *Dmrt1* sense probe; f, ovary; m, testis; m2 and m3, the partial enlargement of m1. Eo, early oocyte; Mo, mature oocyte; Oc, oocyte; Og, oogonium; Sg, spermatogonium; Sc, spermatocyte; St, spermatid; Stc, somatic cell; Sz, spermatozoon.

巢、肌肉、心脏、肝中表达^[11]; 在大鳞副泥鳅^[9]和斑马鱼^[10]中的精巢和卵巢中都有表达, 但在精巢中的表达水平高于卵巢。可见 *Dmrt1* 在不同物种中的组织分布具有一定的差异, 但各物种中均呈现精巢表达特点。

本研究结果显示, 栉孔扇贝 *Dmrt1* 在精巢中的表达量显著高于卵巢, 呈现了一种保守的性别二态性表达特征^[16, 23]。定量 RT-PCR 结果显示, 栉

孔扇贝 *Dmrt1* 在生长期精巢中的 mRNA 水平最高, 成熟期精巢中的表达水平最低(图 5), 这与贝类虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[16]以及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[23]和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[24]的特征一致。但与胡子鲇的表达特征不完全一致, 在胡子鲇中, *Dmrt1* 在 II 期(精原细胞)、III 期(初级精母)、IV 期(次级精母细胞)、V 期(成熟精子)精巢中恒定表达^[21]。此外, 原位杂交结果

显示, 栉孔扇贝 *Dmrt1* mRNA 阳性信号定位在精巢及卵巢中的所有生殖细胞中, 这一定位特点与已报道的小鼠^[5]、许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)^[25]和虾夷扇贝^[15]中的结果基本一致。依据上述表达特征, 提出 *Dmrt1* 可能是栉孔扇贝精巢发生和功能维持的关键基因。

参考文献:

- [1] Hong C S, Park B Y, Saint-Jeannet J P. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: It is not just about sex[J]. *Developmental Biology*, 2007, 310(1): 1-9.
- [2] Zhang Y Y, Wang C L. Advances in the *DMRT* gene family research[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2013, 35(11): 1660-1665. [张月圆, 王昌留. *DMRT* 基因家族研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(11): 1660-1665.]
- [3] Hu Q M, Wang K L, Chen S L. Protein expression, purification, and elementary function of *Dmrt1* in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(6): 1132-1138. [胡乔木, 王凯琳, 陈松林. 半滑舌鲷 *Dmrt1* 蛋白表达、纯化及功能[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(6): 1132-1138.]
- [4] LI Y Y, Chen S L, Lin F, et al. Integration and expression comparative analysis of heterologous and homologous *dmrt1* expression vector in Medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 425-431. [李亚亚, 陈松林, 林帆, 等. 异源和同源 *dmrt1* 基因过表达载体在青鳉体内的整合和表达[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(3): 425-431.]
- [5] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, et al. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development[J]. *Developmental Biology*, 1999, 215(2): 208-220.
- [6] Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 127(3): 232-241.
- [7] Yang D. Sex determination mechanism and sex related molecular markers of *Oreochromis niloticus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. [杨东. 尼罗罗非鱼性别决定机制和性别相关的分子标记[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.]
- [8] Abramyan J, Feng C W, Koopman P. Cloning and expression of candidate sexual development genes in the cane toad (*Bufo marinus*)[J]. *Developmental Dynamics*, 2009, 238(9): 2430-2441.
- [9] Xu L H. Cloning, spatiotemporal expression and phylogenetic analysis of *Dmrt1* and *GNB2L1* genes in *Paramisgurnus dabryanus*[D]. Wuhan: Hubei University, 2007. [徐玲花. 大鳞副泥鳅 *Dmrt1* 基因和 *GNB2L1* 基因的克隆、时空表达及系统进化分析[D]. 武汉: 湖北大学, 2007.]
- [10] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 950-957.
- [11] Zhang H Y, Zhu W X, Zhao C, et al. Cloning and expression analysis of *DMRT1* gene in *Odontobutis potamophila*[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(5): 569-580. [张红燕, 朱文旭, 赵诚, 等. 河川沙塘鳢 *DMRT1* 基因的克隆及其表达分析[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(5): 569-580.]
- [12] Guo P F, Duan S H, Dong S S, et al. Molecular characteristics and expression analysis of *Dmrt1* gene in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(5): 2033-2041. [郭鹏飞, 段胜华, 董赛赛, 等. 三角帆蚌 *Dmrt1* 基因的分子特征和表达研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(5): 2033-2041.]
- [13] Li W R. Dynamics of FOXL2, DMRT1L and sex steroids on gonadal development in the bay scallops, *Argopecten irradians*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2019. [李婉茹. FOXL2、DMRT1L 及性类固醇激素在海湾扇贝性腺发育中的变化[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2019.]
- [14] Liu J, Zhang Z, Zhang L, et al. Variations of estradiol-17 β and testosterone levels correlated with gametogenesis in the gonad of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) during annual reproductive cycle[J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2014, 92(3): 195-204.
- [15] Liu X L, Zhang Z F, Shao M Y, et al. Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates[J]. *Development Genes and Evolution*, 2012, 222: 279-286.
- [16] Li R J, Zhang L L, Li W R, et al. FOXL2 and DMRT1L are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patinopecten yessoensis*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1166.
- [17] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 950-957.
- [18] Zhao J. Cloning, expression and alternative splicing analysis of *DMRT1* in *Misgurnus anguillicaudatus*[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2011. [赵洁. 泥鳅中 *DMRT1* 基因的克隆、表达和选择性剪接分析[D]. 新乡: 河南师范大学, 2011.]
- [19] Ying M, Chen B, Tian Y H, et al. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin- β [J]. *Bio-*

- chimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007, 1773(6): 804-813.
- [20] Liu X S, Liang B, Zhang S Y. cDNA cloning, tissue distribution and mRNA transcription of DMRT1 gene in the protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegelii*[J]. Zoological Research, 2004, 25(2): 158-161. [刘绪生, 梁冰, 张树义. 黑鲷 DMRT1 基因 cDNA 的克隆、组织表达谱及在性别逆转前后性腺中的表达[J]. 动物学研究, 2004, 25(2): 158-161.]
- [21] Sun Y Y, Zhang Q Q, Qi J, et al. Cloning and expression analysis of DMRT1 gene in *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 2008, 54(2): 221-226. [孙业盈, 张全启, 齐洁, 等. 半滑舌鳎 DMRT1 基因的克隆与表达分析[J]. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(2): 221-226.]
- [22] Deng S P, Wang J J, Wu T L, et al. cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(4): 610-617. [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 610-617.]
- [23] Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2000, 1493(1-2): 180-187.
- [24] Li L, Liang H W, Li Z, et al. Cloning and expression analysis of *DMRT1* gene in *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(2): 220-226. [李林, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼 *DMRT1* 基因 cDNA 全长克隆及其表达分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(2): 220-226.]
- [25] Ma L M. Study on sex related genes *Sox3*, *Sox9* and *Dmrt1* in black rockfish, *Sebastes schlegelii*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014. [马丽曼. 许氏平鲷性别相关基因 *Sox3*、*Sox9* 和 *Dmrt1* 的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.]

Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop *Chlamys farreri*

LI Xixi, QIN Zhenkui, WEI Maokai, ZHANG Zhifeng

Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: DMRT1, an important member of the DMRT family, is mainly involved in sex determination and sex differentiation regulation in animals, but its expression characteristics and function are different in different species. In the present study, we analyzed *Chlamys farreri Dmrt1* sequence characteristics using bioinformatics methods; determined *Dmrt1* mRNA tissue distribution in adult gonad, adductor muscle, mantle, gill, and kidney tissue using semi-quantitative RT-PCR; and revealed its spatiotemporal expression pattern in *C. farreri* gonads using quantitative RT-PCR and *in situ* hybridization. The results showed that the deduced amino acid sequence of DMRT1 contained the conserved DM domain of the DMRT family; its mRNA was expressed exclusively in the gonads, and the mRNA levels in the testes were significantly higher than those in the ovaries, and it was the highest in the testis at the growing stage. Moreover, *Dmrt1* positive signals were located in *C. farreri* germ cell cytoplasm. We suggested that *Dmrt1* expression characteristics in *C. farreri* adult gonads is consistent with that in most animals, and may be involved in regulating *C. farreri* sex differentiation and testis development.

Key words: *Chlamys farreri*; *Dmrt1*; molecular characteristics; gene expression; gonad

Corresponding author: ZHANG Zhifeng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn