

DOI: 10.12264/JFSC2020-0032

虾夷扇贝 *Dmrt1* 基因的分子鉴定及表达模式分析

赵丹^{1,2}, 周丽青^{1,2}, 郑言鑫⁵, 孙秀俊², 吴彪², 刘志鸿², 吴宙^{2,3}, 吴磊^{2,4}

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022;
4. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005;
5. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站, 山东 烟台 265800

摘要: *Dmrt1* 是 *Dmrt* 双性和 *mab-3* 相关转录因子基因家族的重要成员之一, 在生殖细胞分化和性别调控中发挥着重要作用。为探究其在虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性别分化中的表达调控模式, 本研究利用生物信息学的方法分析了虾夷扇贝 *Dmrt1* 的序列特征; 采用半定量 PCR (RT-PCR)检测了 *Dmrt1* 在不同组织中的表达量差异; 应用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)和原位杂交技术 ISH (*in situ hybridization*)揭示了 *Dmrt1* 在性腺发育 4 个时期(增殖期、生长期、成熟期、排放期)中的时空表达变化。结果显示, 虾夷扇贝 *Dmrt1* 序列包含 *Dmrt* 基因家族共有的 DM 结构域; 与已知物种同源序列比对后发现, 虾夷扇贝 *Dmrt1* 序列与欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)同源性最高; 原位杂交检测到的阳性信号主要定位在生殖细胞的细胞质中; qRT-PCR 定量结果发现, *Dmrt1* 在精巢生长期和成熟期的表达水平显著高于卵巢, 在卵巢各发育时期中的表达量无明显变化且维持低水平状态。此外, 在外套膜、鳃、肾、和闭壳肌中检测到少量表达的 *Dmrt1* 转录本, 而在肝胰腺中未检测到。研究结果表明, *Dmrt1* 在虾夷扇贝生殖细胞分化过程中的表达特征与在其他动物性腺发育中的表达特征基本一致, 推测其是虾夷扇贝性别分化调控中的关键基因。

关键词: 虾夷扇贝; *Dmrt1*; 荧光定量 PCR; 原位杂交; 性别分化

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)05-0541-09

无脊椎动物的性别类型和表现形式相对脊椎动物表现得更加丰富多彩, 其性别决定呈现原始性、多样性和可塑性。双壳贝类是一类具有多种繁殖策略的软体动物, 有雌雄异体型, 雌雄同体型, 不少种类还存在性逆转现象^[1-5]。尽管已经对双壳贝类性别分化进行了大量研究, 但仍没有明确证据表明这些动物存在性染色体^[6], 也没有相应的模式物种来展示性别形成的过程。双壳贝类隶属低等动物, 其性别决定往往受相关基因和环境因素的共同影响^[6]。

Dmrt (double-sex and *mab-3* related transcription factor, 双性和 *mab-3* 相关转录因子)是一类编

码与性别决定相关的转录因子的基因家族, 最早发现于果蝇(*Drosophila melanogaster*)中^[7], 其编码的蛋白含有一个 DM 结构域, 可通过锌指方式结合特异性的 DNA 片段^[8], 与动物的性别分化和胚胎发育等密切相关。*Dmrt1* 是 *Dmrt* 基因家族的主要成员。近年来, *Dmrt1* 基因的研究在脊椎动物中较多, 特别是在鱼类^[9-15]、爬行类^[16-17]、哺乳类^[18]中, 而有关无脊椎动物的研究相对较少。郭鹏飞等^[19]证明 *Dmrt1* 参与了三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)早期的性腺发育。胡芳琴^[20]发现池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)*Dmrt1* 基因在精子形成和性别调控中起重要作用, 这个结果与 Hong 等^[21]的研究结果一

收稿日期: 2020-11-25; 修订日期: 2021-01-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672637); 浙江重中之重开放课题(KF2018008); 国家重点研发计划项目(2018YFD0900800).

作者简介: 赵丹(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: 1282095341@qq.com

通信作者: 周丽青, 副研究员, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

致, 即 *Dmrt1* 参与调节脊椎动物性腺发育的过程, 调控了下游基因的表达。Li 等^[22]证实 *Dmrt1* 在精细胞和卵细胞中均被检测到, 且在雄性生殖细胞中的含量大于雌性生殖细胞。由此可见, *Dmrt1* 在贝类性别分化中起着关键性的作用。虾夷扇贝是我国北方扇贝养殖业结构调整及辅助发展的重要养殖品种。近些年来, 利用养殖贝类中雌雄同体构建自交家系改良品种已在科研人员中达成共识, 但有关贝类性别分化分子机制的研究还不透彻。通过虾夷扇贝性腺转录组的 WGCNA 分析, 我们构建了虾夷扇贝性别分化的遗传通路, 初步推断虾夷扇贝 *Dmrt1* 是调控其性别分化的关键基因^[23]。为进一步探讨虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) *Dmrt1* 基因(*PyDmrt1*) 在性别分化中的作用, 本研究采用荧光定量 qRT-PCR 和原位杂交技术 ISH 确定了虾夷扇贝 *Dmrt1* 基因在性腺中的表达特征, 旨在充实完善 *Dmrt1* 基因性别分化调控的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 2 龄虾夷扇贝于 2019 年 10 月至 2020 年 6 月购自烟台长岛生鲜市场, 体重为 (73.34 ± 20.5) g。取部分扇贝性腺组织, 液氮速冻后存于 -80°C 冰箱用于 RNA 提取和组织分布检测。另取部分性腺组织浸入原位杂交固定液(Servicebio, 中国)中。组织切片法结合性腺组织涂片法鉴定性别。

1.2 总 RNA 提取和 *PyDmrt1* 的 cDNA 合成

采用 Trizol 法(Solarbio, 中国)提取虾夷扇贝性腺总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific, Wilmington, 美国)检测其纯度与浓度, 选取 $\text{OD}_{260/280}$ 的值在 1.90~2.2 范围、RNA 浓度大于 800 ng/ μL 的样本进行反转录。RNA 鉴定合格后, 采用 HiScript III^{RT} SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)试剂盒(Vazyme, 中国)并参照说明书合成 cDNA。 -20°C 保存。

1.3 *PyDmrt1* 基因的生物学分析

从虾夷扇贝转录组数据分析获得的基因编码序列(登录号: KP79_PYT09461)命名为 *PyDmrt1*。

采用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

orffinder/)确定 *PyDmrt1* 的开放阅读框。在线分析软 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)预测结构和功能域。使用 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测 *PyDmrt1* 蛋白的信号肽, 并使用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜区域。使用 BLAST 程序(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *PyDmrt1* 进行碱基同源性分析并进行蛋白质序列相似性搜索。通过 Jalview 比对来自不同种类 *Dmrt1* 的序列, 并使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining(NJ)方法构建 *PyDmrt1* 系统发育树。

1.4 半定量 RT-PCR

根据所获得的 *PyDmrt1* mRNA 转录本序列, 设计半定量(semi-quantitative) RT-PCR 引物 *Dmrt1*-F 和 *Dmrt1*-R (表 1)。以虾夷扇贝生长期的 cDNA 为模板, 使用 2×Taq Master Mix for PAGE 试剂盒(Vazyme, 中国)对目的基因进行 PCR 扩增。反应条件为 95°C 3 min (预变性); 95°C 15 s, 60°C 15 s (退火), 循环 35 次; 72°C 5 min (彻底延伸)。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因条带。

1.5 荧光定量

根据开放阅读框 ORF (open reading frame) 区设计 *PyDmrt1* 定量 qRT-PCR 引物: *QDmrt1*-F 和 *QDmrt1*-R (表 1)。使用 β -actin 基因^[24]作为内参基因校正 cDNA 模板(表 1)。

分别以虾夷扇贝不同发育时期的性腺、鳃 cDNA 和增殖期雌性和雄性的鳃 cDNA 为模板对目的基因进行扩增。使用 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 试剂盒(Vazyme, 中国)按照下列参数配置 qPCR 反应液体系: 2×ChamQ STBR Color qPCR master Mix 10 μL ; 上下游引物各 0.4 μL ; cDNA 模板 2 μL ; 50×ROX Reference Dye 1 0.4 μL ; 灭菌蒸馏水 6.8 μL 。反应条件为: 95°C 30 s (预变性); 95°C 10 s; 60°C 30 s (退火); 循环 40 次; 在 StepOnePlusTM(America)进行 qPCR 反应。本实验采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *PyDmrt1* 基因的相对表达量。实验数据输入 Prism 5 和 SPSS 26.0 进行单因素方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表 1 本实验所用引物
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage
Dmrt1-F	GGTACCCCGTCCAGAAAAGTT	半定量 PCR RT-PCR
Dmrt1-R	TCATTCTCAAGTAACCTTCATCA	半定量 PCR RT-PCR
β -actin-F	AGTCCCAATCTACGAAGGTTATG	半定量和荧光定量 PCR RT-PCR and qRT-PCR
β -actin-R	CCAGTGATGAGGAGGAAGCAG	半定量和荧光定量 PCR RT-PCR and qRT-PCR
QDmrt1-F	CTGGACACCATCACGCATAC	荧光定量 PCR qRT-PCR
QDmrt1-R	TGAACCCCATACCGACATTT	荧光定量 PCR qRT-PCR
YDmrt1	GGCGGCGUCAUCUUUCCUAUGGUCUUC	原位杂交探针 <i>in situ</i> hybridization probe

1.6 原位杂交

原位杂交探针设计由武汉赛维尔生物科技有限公司设计, 阳性探针 YDmrt1: 5'-GGCGGCGUCAUCUUUCCUAUGGUCUUC-3'。取部分性腺组织切成 2 mm 左右的厚度, 用灭菌的镊子置于原位杂交液中常温固定 24 h 用于切片原位杂交。正式原位杂交步骤如下: 固定的组织经石蜡切片后依次放入二甲苯 I 15 min、二甲苯 II 15 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、85%乙醇 5 min、75%乙醇 5 min、DEPC 水洗。用胃蛋白酶处理使靶核酸片段暴露, 预杂交缓冲液(不含探针和硫酸葡聚糖)37 ℃ 孵育 1 h, 接着滴加含探针的杂交液 55 ℃ 杂交过夜, 进行非特异结合探针的洗脱和残余 RNA 的消化后, 用 BSA (Bovine Serum

Albumin)封闭非特异性抗体 1 h, 滴加鼠抗地高辛标记 488 (anti-DIG-488)进行抗体孵育 37 ℃ 40 min, 洗涤, 最后显色液(DAPI)进行显色, 于尼康正置荧光显微镜(Japan)下观察并采集图像。

2 结果与分析

2.1 *PyDmrt1* 序列分析

生物信息学分析结果显示, *PyDmrt1* ORF 序列长 918 bp, 编码 306 个氨基酸。存在保守的 DM 结构域(49~189 bp); DM 结构域存在一个核定位信号序列(nuclear localization signal sequence) KGHKR(图 1)。*PyDmrt1* 蛋白无信号肽, 不存在明显的跨膜区域。因此推测其为一个胞内蛋白, 不属于膜蛋白。

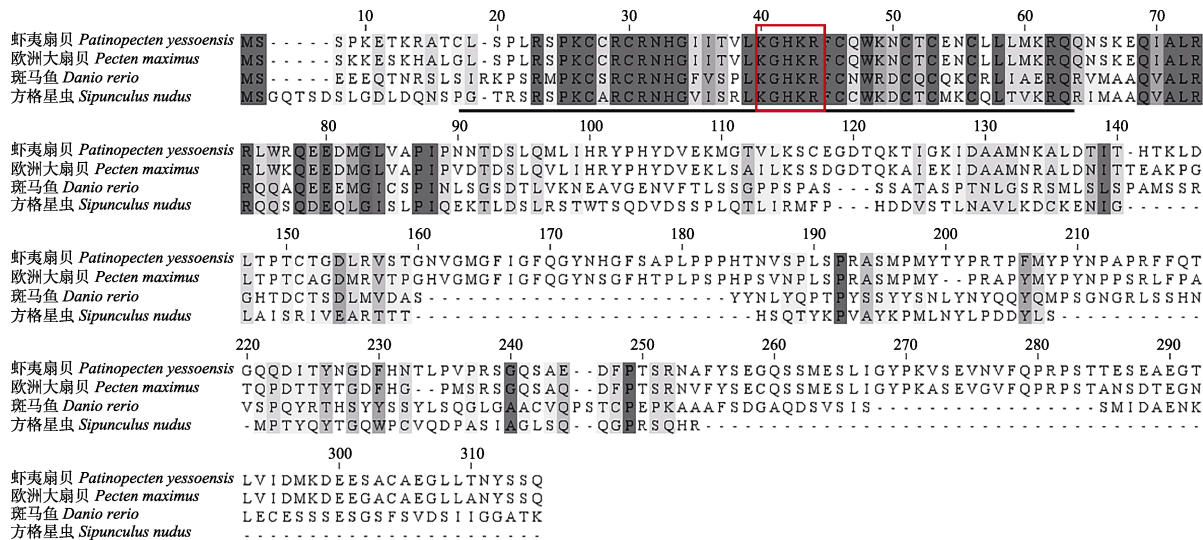


图 1 虾夷扇贝 *Dmrt1* 与其他物种的同源性序列比对

物种 NCBI 登录号: 虾夷扇贝(XP_021353714.1); 欧洲大扇贝(XP_033733655.1); 斑马鱼(AAN61060.1); 方格星虫 (QGP74528.1)。横线为 DM 结构域, 方框内为核定位信号序列。

Fig. 1 *Dmrt1* homologous sequence alignment between *Patinopecten yessoensis* and other species
Species NCBI login No.: *Patinopecten yessoensis* (XP_021353714.1); *Pecten maximus* (XP_033733655.1); *Danio rerio* (AAN61060.1); *Sipunculus nudus* (QGP74528.1). The horizontal line is the DM domain, and the box is the nuclear localization signal sequence.

2.2 PyDmrt1 氨基酸序列同源性及进化树分析

从 NCBI 数据库里选择 4 个 Dmrt1 代表性物种的氨基酸序列进行同源比对分析, 结果发现虾夷扇贝与欧洲大扇贝(*P. maximus*)的相似性最高, 为 79%。图中画横线处为保守的 DM 结构域, 红色方框为核定位信号序列(图 1)。

为了解 Dmrt1 在不同物种中的进化关系, 使用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-joining 法对 17 个物种构建系统进化树, 结果显示脊椎动物聚为一支, 无脊椎动物软体动物聚为一支。其中虾夷扇贝先与栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)、欧洲大扇贝等聚为一支, 这显示它们的亲缘关系较近, 形成的独立分支再与三角帆蚌(*H. cumingii*)聚为一支。*PyDmrt1* 在系统进化树中的分子生物学进化地位与虾夷扇贝在生物学分类地位是相符的(图 2)。

2.3 PyDmrt1 在各组织中的表达

RT-PCR 分析 *PyDmrt1* 在生长期不同组织中的表达。结果显示, 在外套膜、闭壳肌、肾、鳃中都可检测到少量 *PyDmrt1* 转录本的存在, 但在肝胰腺中未见表达。*PyDmrt1* 在精巢中的表达量最高, 其表达量显著高于卵巢(图 3)。

2.4 PyDmrt1 在 2 龄虾夷扇贝性腺发育不同时期的相对表达量

qRT-PCR 结果表明, *PyDmrt1* 的表达量在雄性性腺的生长期和成熟期中存在显著性差异($P < 0.05$), 雄性个体的表达量显著高于雌性; 而在排放期无显著性差异($P > 0.05$, 图 4)。通过对性腺处于不同发育时期的大量个体开展 *PyDmrt1* 基因的表达量分析, 构建了该基因在虾夷扇贝性腺发育的时空表达模型, 发现 *PyDmrt1* 在雌性性腺发育的不同时期一直处于低水平状态, 且无明显变化(图 5)。

2.5 PyDmrt1 mRNA 在虾夷扇贝性腺组织中的细胞学定位

原位杂交结果显示, *PyDmrt1* 定位于所有细胞的细胞质。在卵巢中, 与阴性对照组相比, *PyDmrt1* mRNA 在各时期的性腺分化细胞中均检测到阳性信号, 但其表达量没有明显的变化(图 6A1~图 6A4)。在精巢中, 与阴性对照组相比, *PyDmrt1* 在精原和精母细胞中的表达呈阳性, 精细胞因为细胞质的缺失, 原位杂交检测不到 *PyDmrt1* mRNA (图 6B1~图 6B4)。

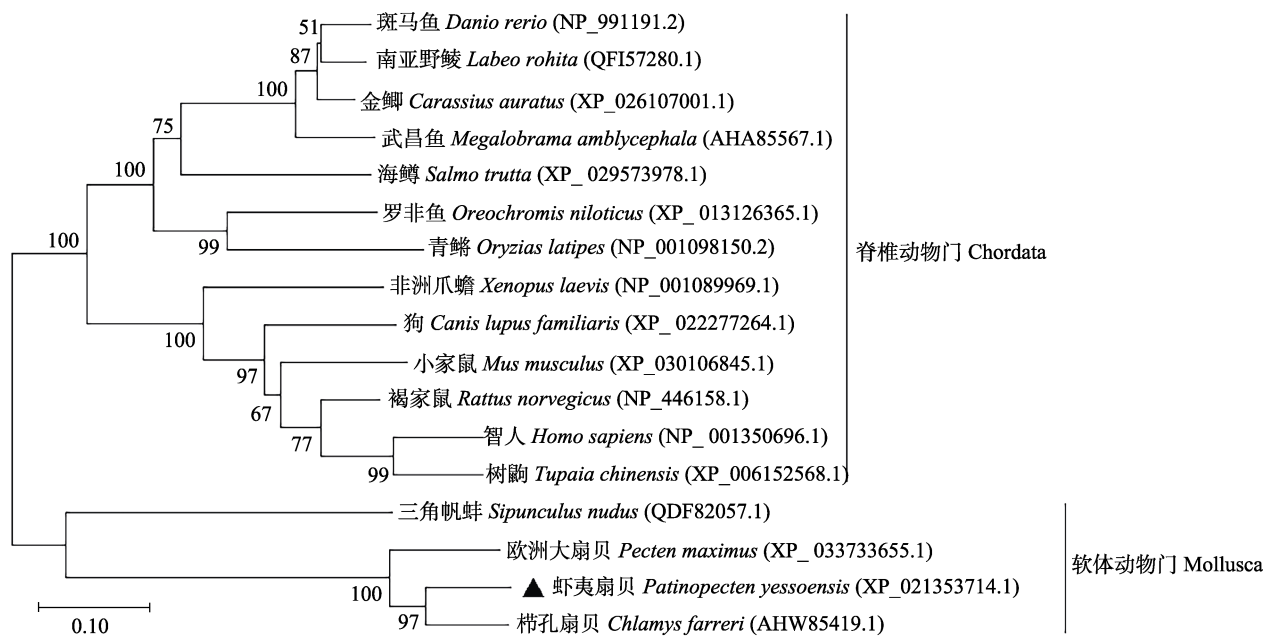


图 2 不同物种 Dmrt1 蛋白系统进化分析

括号中为物种 NCBI 登录号。

Fig. 2 Phylogenetic analysis of Dmrt1 protein from different species
Species NCBI login number are shown in bracket.

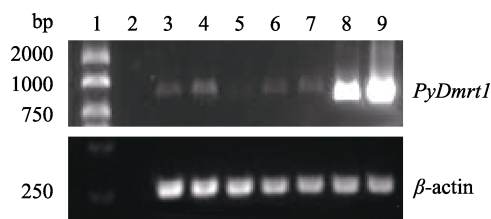


图 3 虾夷扇贝 *Dmrt1* 基因在不同组织中的表达

1. DL 2000 marker; 2. 去离子水; 3. 外套膜; 4. 闭壳肌;
5. 肝胰腺; 6. 肾; 7. 鳃; 8. 卵巢; 9. 精巢.

Fig. 3 The expression of *Dmrt1* gene in different tissues of *Patinopecten yessoensis*

1. DL 2000 marker; 2. Pure water; 3. Mantle; 4. Adductor muscle; 5. Hepatopancreas; 6. Kidney; 7. Gill; 8. Ovary; 9. Testis.

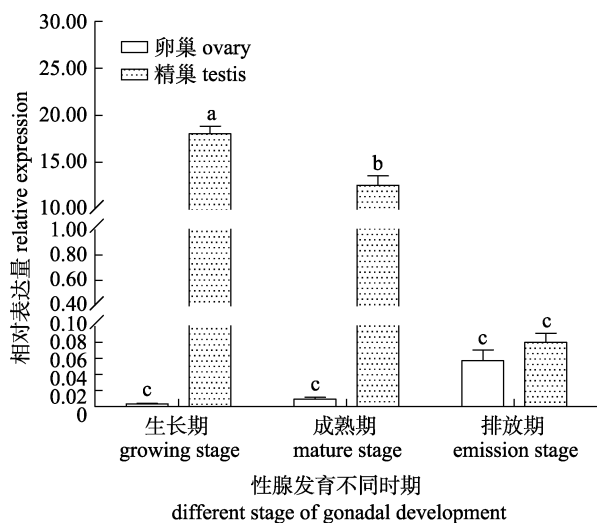


图 4 *PyDmrt1* 在虾夷扇贝雌雄性腺发育不同时期的相对表达量对比
不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 The relative expression comparison of *PyDmrt1* at different stages between female and male *Patinopecten yessoensis* gonads
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

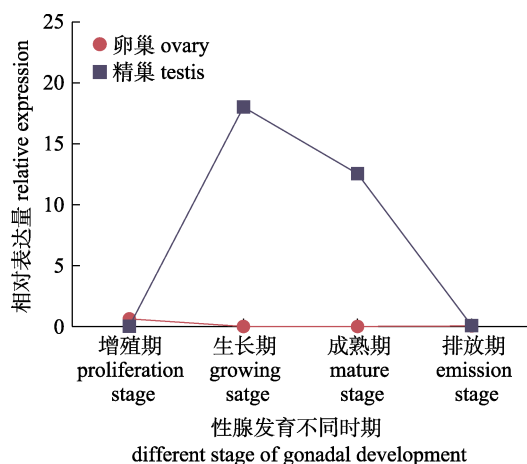


图 5 *PyDmrt1* 在虾夷扇贝性腺发育的时空表达模型

Fig. 5 The expression pattern of *PyDmrt1* in gonadal development of *Patinopecten yessoensis*

2.6 *PyDmrt1* mRNA 在性腺发育不同时期鳃组织中的表达

经组织切片鉴定性别之后, 从性腺发育各期中随机选取 3 个个体鳃组织的 qRT-PCR, 结果表明, *PyDmrt1* 在雌性性腺发育不同时期鳃组织中的表达无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在雄性成熟期和排放期的表达量显著高于增殖期 ($P < 0.05$); 在增殖期, 雌性鳃组织的表达量高于雄性 (图 7)。为进一步验证 *PyDmrt1* 在增殖期鳃组织中的表达是否存在性别差异, 本研究又随机挑选增殖期雌雄各 5 个个体进行 qRT-PCR 分析, 结果发现, 增殖期雌性鳃组织 *PyDmrt1* 基因相对表达量为 0.3381 ± 0.3765 , 雄性相对表达量为 0.4885 ± 0.4268 , 雌性和雄性表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

本研究分析了 *PyDmrt1* 的序列, 发现其含有 *Dmrt* 基因家族的 DM 保守结构域序列特征。DM 结构域包含 6 个半胱氨酸(C)和 2 个组氨酸(H)形成的锌指结构, 还有一个核定位信号序列 KGHKR, 该序列可与特定的 DNA 序列结合, Li 等^[22]认为 *Dmrt1* 的 DM 结构域参与了虾夷扇贝性别决定的过程。还有研究表明, *Dmrt1* 蛋白以和 importin- β 1 结合的方式运入细胞核内。核定位信号序列的突变不能有效地将 *Dmrt1* 蛋白和 importin- β 1 结合, 导致 *Dmrt1* 无法进入到细胞核内, 从而对其调控下游基因的表达产生影响^[24]。据此验证了笔者的推测, 即 *PyDmrt1* 是一个胞内蛋白。

不同组织分布检测发现, 虾夷扇贝 *Dmrt1* 基因在性腺中的表达量显著高于其他组织。在肾组织中有少量的 *PyDmrt1* 表达。这与周丽青等^[25]研究结果一致, 即通过生殖腺组织学观察发现, 成熟的精卵皆从肾外孔排出体外, 这也是肾组织含有少量 *PyDmrt1* 转录本的原因。鳃、外套膜和闭壳肌的生理位置相近, *PyDmrt1* 通过血液流通, 可在这些组织中检测到少量的 *PyDmrt1* 转录本。为进一步验证 *Dmrt1* 是性腺发育和生殖细胞分化相关基因, 且保证实验对象存活以验证性别, 本研究剪取少量鳃组织进行荧光定量分析。研究发现, 鳃组织 *PyDmrt1* 在性腺发育各期中的表达没有显著

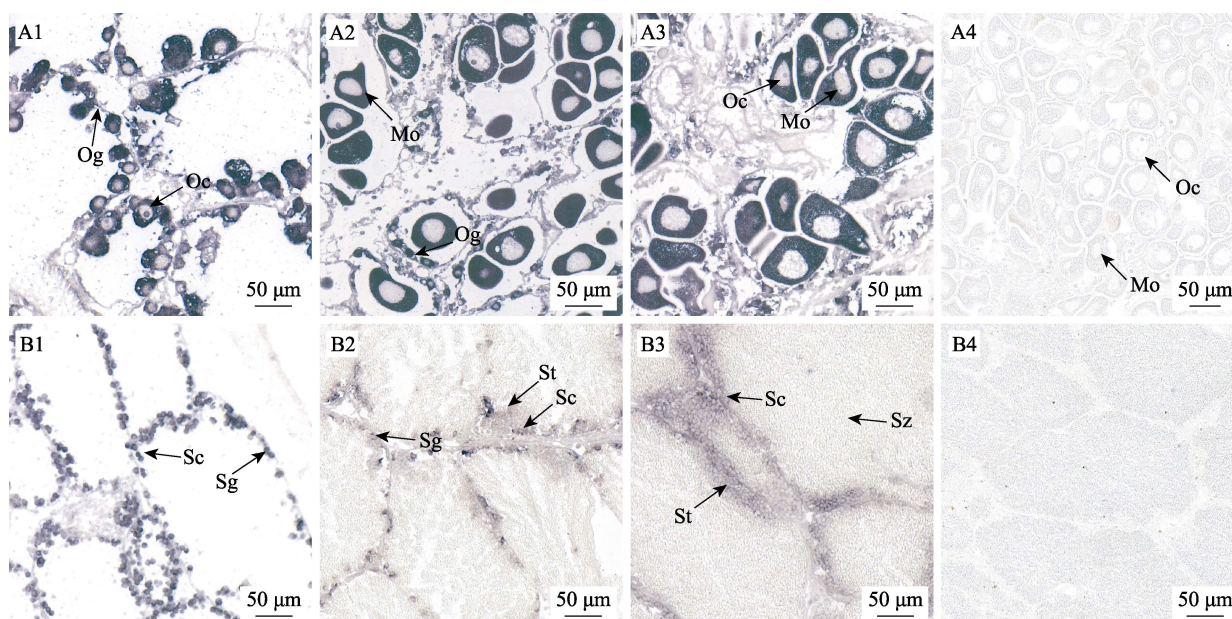


图 6 *PyDmrt1* 在虾夷扇贝性腺发育不同时期的细胞学定位

A: 卵巢; B: 精巢. 1. 增殖期; 2. 生长期; 3. 成熟期; 4. 阴性对照. Mo: 成熟卵; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Sz: 精子. 标尺: 50 μm .

Fig. 6 Cytological localization of *PyDmrt1* at different stages of gonadal development in *Patinopecten yessoensis*
A: ovary; B: testis. 1. Proliferation stage; 2. Growing stage; 3. Mature stage; 4. Negative control. Mo: mature eggs; Oc: oocyte; Og: oogonium; Sc: spermatocyte; Sg: spermatogonium; St: sperm cells; Sz: sperm. Scale bar: 50 μm .

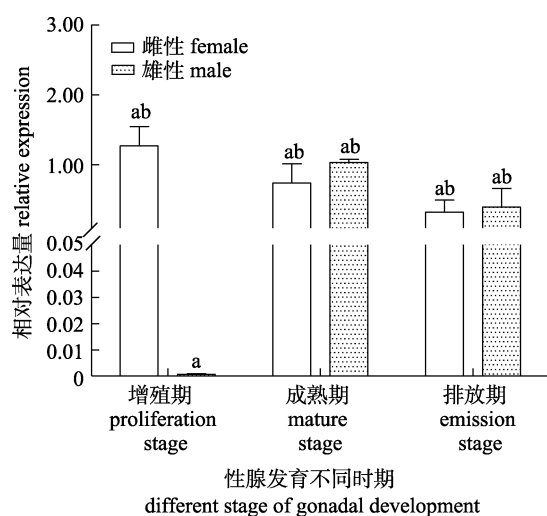


图 7 *PyDmrt1* 在虾夷扇贝雌雄性腺不同发育时期鳃组织中的表达

不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 7 The expression of *PyDmrt1* in female and male *Patinopecten yessoensis* gill tissues at different gonadal development stages
Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

性差异, 而且与性别也无明显相关性。以上研究结果从侧面验证了 *PyDmrt1* 是一个仅与性腺发育密切相关的基因。

通过 qRT-PCR 和原位杂交技术初步揭示其在

性腺不同发育时期中的表达模式与已报道的大部分物种的特征基本一致。在虾夷扇贝性腺发育不同时期的组织分布检测中, *PyDmrt1* 在性腺发育不同时期都有表达, 但不同性别间及各发育时期的表达水平存在差异。在性腺发育的生长期和成熟期阶段, *PyDmrt1* 在精巢的表达量显著高于卵巢, 这个结果与栉孔扇贝 (*C. farreri*)^[26] 和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)^[27] 研究结果一致, 说明 *PyDmrt1* 确实参与了雄性性腺发育的调控, 是雄性特有的性别分化的关键基因。然而, 该基因在卵巢不同时期的表达量并未随着性腺的发育周期出现明显的规律性变化, 而是一直处于低水平的表达, 这和本课题组在虾夷扇贝生殖腺转录组 WGCNA 分析中的结果^[23] 是一致的, 说明 *Dmrt1* 是虾夷扇贝雄性特有的性别分化的关键基因, 但决定生殖细胞分化为雌雄的有可能不是 *Dmrt1*, 推测其上游还有更加关键的基因尚未被发现, 有待进一步研究。

本研究中, *Dmrt1* 基因在不同发育时期生殖腺细胞中的定位结果与荧光定量的结果是一致

的。该基因分布在早期的雄性生殖细胞和所有时期的雌性生殖细胞中, 这与其他双壳贝类中的观察结果一致^[20,24], 这一定位特点与已报道的在小鼠^[29]中的研究结果也很相似。此外, 雄性性腺滤泡腔内的精原和精母细胞中强阳性信号, 表明该基因参与了精子的形成过程^[30]。综上所述, 本研究进一步证实 *PyDmrt1* 是虾夷扇贝精巢发育和性别分化过程中的一个关键基因。

参考文献:

- [1] Wu H L, Wu C Y, Chen X F, et al. Histological studies on male gonad in *Paphia(Paratapes) undulata* [J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2000, 18(2): 169-174. [吴洪流, 伍春雨, 陈雪芬, 等. 波纹巴非蛤雄性生殖腺的组织学观察[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2000, 18(2): 169-174.]
- [2] Shen Y P. A primary study on sex reversal of *Pinctada martensii* Dunker[J]. Journal of Wuhan University (Natural Science Edition), 1990, 36(4): 117-118. [沈亦平. 合浦珠母贝性变现象的初步研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版), 1990, 36(4): 117-118.]
- [3] Wang M F, Yu X Y, Liu Y, et al. Study on hermaphrodites and self-fertilization of the pearl oyster *Pinctada martensii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(4): 420-424. [王梅芳, 余祥勇, 刘永, 等. 马氏珠母贝雌雄同体和自体受精的研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 420-424.]
- [4] Yu R H, Wang Z P, Zhao X L, et al. Reproductive biology of self fertilization in hermaphrodite Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*)[J]. Periodical of Ocean University of China, 2011, 41(11): 23-26, 56. [于瑞海, 王昭萍, 赵雪琳, 等. 虾夷扇贝雌雄同体自体受精繁殖生物学的研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2011, 41(11): 23-26, 56.]
- [5] Liao C Y, Xu Y F, Wang Y L. Reproductive cycle of the scallop *Chlamys farreri* (Jones et Etpreston) at Qingdao[J]. Journal of Fisheries of China, 1983, 7(1): 1-13. [廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期[J]. 水产学报, 1983, 7(1): 1-13.]
- [6] Cai Y, Zhou Y C, Feng Y Q, et al. Review of chromosome studies of mollusks in China[J]. Journal of Tropical Biology, 2014, 5(3): 297-306. [蔡岩, 周永灿, 冯永勤, 等. 中国贝类染色体研究现状与进展[J]. 热带生物学报, 2014, 5(3): 297-306.]
- [7] Hildreth P E. Doublesex, recessive gene that transforms both males and females of *Drosophila* into intersexes[J]. Genetics, 1965, 51: 659-678.
- [8] Naimi A, Martinez A S, Specq M L, et al. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 152(2): 189-196.
- [9] Yan N N. Cloning and expression of the *Dmrt1* gene of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [闫宁宁. 大口黑鲈 *Dmrt1* 基因的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [10] Gao Y X. Preliminary study on function of *Dmrt1*, a candidate gene for sex determination of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2018. [高玉雪. 大黄鱼性别决定候选基因 *Dmrt1* 功能的初步研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018.]
- [11] Du L. Molecular cloning sequence identification and gene expression analysis of Japanese eel *Dmrt2* gene[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017. [杜力. 日本鳗鲡 *Dmrt2* 基因 cDNA 的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.]
- [12] Zhao J. Cloning, expression and alternative splicing of *Dmrt1* in *Misgurnus anguillicaudatus*[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2011. [赵洁. 泥鳅 *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.]
- [13] 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.]
- [14] Wang Q, Cui Z K, Guo H, et al. Functional analysis of the promoter of the *Dmrt1* gene in Chinese tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2019, 37(4): 1333-1341.
- [15] Wei L, Li X Y, Li M H, et al. *Dmrt1* directly regulates the transcription of the testis-biased *Sox9b* gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Gene, 2019, 687: 109-115.
- [16] Zhang Y, Zhang H Y, Zhang H H, et al. Functional analysis of *Dmrt1* in temperature dependent sex determination in *Trachemys scripta*[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2016, 46(6): 735-743. [张一, 张海艳, 张辉皇, 等. *Dmrt1* 基因在红耳龟温度依赖型性别决定中的功能研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(6): 735-743.]
- [17] Wang L. The effect of *Dmrt1* gene on male gonadal development in *Pelodiscus sinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014. [王莉. 中华鳖 *Dmrt1* 基因在雄性性腺发育中的影响研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.]
- [18] Wei Y D, Shen D, Cheng H L, et al. *Dmrt1* in mammalian

- germ cell development[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2015, 37(2): 278-283. [魏于栋, 申单, 程慧玲, 等. Dmrt1 与哺乳动物生殖细胞发育[J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(2): 278-283.]
- [19] Guo P F, Duan S H, Dong S S, et al. Molecular characterization 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.]
- [20] Hu F Q. Study on the molecular characteristics and function of Dmrt1 in freshwater pearl mussel, *Hyriopsis schlegelii*[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016. [胡芳琴. 池螺蚌 Dmrt1 的分子特征与蛋白功能研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.]
- [21] 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.
- [22] Li R J, Zhang L L, Li W R, et al. *FOXL2* and *DMRTIL* are Yin and Yang genes for determining timing of sex differentiation in the bivalve mollusk *Patinopecten yessoensis*[J]. Frontiers in Physiology, 2018, 9: 1166.
- [23] Bao X B, Liu W D, Jiang B, et al. Expression stability of reference genes for quantitative PCR in Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*[J]. Fisheries Science, 2011, 30(10): 603-608. [鲍相渤, 刘卫东, 姜冰, 等. 内参基因在虾夷扇贝定量 PCR 中表达稳定性的比较[J]. 水产科学, 2011, 30(10): 603-608.]
- [24] Ying M, Chen B, Tian Y H, et al. Nuclear import of human sexual regulator DMRT1 is mediated by importin- β [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2007, 1773(6): 804-813.
- [25] Zhou L Q, Yang A G, Wang Q Y, et al. Histological research on the gonad of hermaphrodite *Patinopecten yessoensis* in breeding period[J]. Chinese High Technology Letters, 2014, 24(8): 874-880. [周丽青, 杨爱国, 王清印, 等. 繁殖期雌雄同体虾夷扇贝生殖腺组织学观察[J]. 高技术通讯, 2014, 24(8): 874-880.]
- [26] Feng Z F. Cloning, expression and functional analysis of *Cf-dmrt4-like* genes in *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010. [冯政夫. 栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、表达及功能分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.]
- [27] 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.]
- [28] Zhou L Q, Liu Z H, Dong Y H, et al. Transcriptomics analysis revealing candidate genes and networks for sex differentiation of yesso scallop(*Patinopecten yessoensis*)[J]. BMC Genomics, 2019, 20: 671.
- [29] 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.
- [30] Teaniniuraitemoana V, Huvet A, Levy P, et al. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera*: Identification of potential sex differentiation and sex determining genes[J]. BMC Genomics, 2014, 15: 491.

Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop, *Patinopecten yessoensis*

ZHAO Dan^{1,2}, ZHOU Liqing^{1,2}, ZHENG Yanxin⁵, SUN Xiujun², WU Biao², LIU Zhihong², WU Zhou^{2,3}, WU Lei^{2,4}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
4. College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
5. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, 265800, China

Abstract: *Dmrt1* is one of the most important members of the *Dmrt* family and plays an important role in germ cell differentiation and sex regulation. To explore its regulatory expression mode in the sex differentiation of the scallop *Patinopecten yessoensis*, we analyzed the sequence characteristics of *P. yessoensis Dmrt1* using bioinformatics methods. The expression of *Dmrt1* in different tissues was detected using semi-quantitative reverse-transcription PCR (RT-PCR). Quantitative fluorescence RT-PCR (qRT-PCR) and *in situ* hybridization were used to reveal temporal and spatial expression changes of *Dmrt1* in the four stages of gonadal development (proliferation stage, growing stage, mature stage, emission stage). The results showed the following: the sequence of *P. yessoensis Dmrt1* contains the DM domain shared by *Dmrt* family; *P. yessoensis Dmrt1* sequence had high homology with *Pecten maximus*, compared with multiple sequences of other known species; the positive signal detected by *in situ* hybridization, was mainly located in the cytoplasm of germ cells; and qRT-PCR showed that the expression level of *Dmrt1* was significantly higher in the testis than in the ovaries during the growing and mature stages. However, there was no significant change in the ovarian development cycle and the expression level of *Dmrt1* remained low. In addition, *Dmrt1* transcripts were weakly expressed in the mantle, gill, kidney, and adductor muscle but not in the hepatopancreas. The results of the study showed that the expression characteristics of *Dmrt1* in gonadal and sex differentiation of *P. yessoensis* are generally similar to those of other animals. We speculated that *Dmrt1* is a key gene for the regulation of sex differentiation in *P. yessoensis*.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; *Dmrt1*; quantitative reverse-transcription PCR; *in situ* hybridization; sex differentiation

Corresponding author: ZHOU Liqing. E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn