

# 克氏原螯虾 *PcDsx* 基因的克隆及表达分析

石林林<sup>1</sup>, 陈家豪<sup>1</sup>, 石瑞雪<sup>1</sup>, 费佳敏<sup>1</sup>, 张龙<sup>1</sup>, 李艳和<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, 武汉 430070;

2. 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

**摘要** 为阐明克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) doublesex (*PcDsx*) 的功能, 采用 RACE 技术克隆获得 *PcDsx* cDNA 序列, 利用 qRT-PCR 检测该基因的表达情况。生物信息学分析结果显示, 该基因 cDNA 全长 1 584 bp, 包括 243 bp 5' UTR, 765 bp ORF (编码 254 aa) 和 576 bp 3' UTR; *PcDsx* 蛋白包含 1 个保守的 DM 结构域, 与东方刺龙虾 (*Sagmariasus verreauxi*) SvDsx 的 DM 结构域相似性较高。基因表达分析结果显示, *PcDsx* 广泛表达于成年克氏原螯虾的各组织中, 其中克氏原螯虾触角腺中该基因的相对表达量最高, 性腺和肌肉中的相对表达量也较高, 并且发现该基因在成年雌虾多种组织中的表达与相应雄虾组织中的表达存在显著性差异; 克氏原螯虾早期发育不同时期表达分析结果表明, *PcDsx* 的表达水平在出膜后 3 d 达到一个高峰, 而幼虾中 *PcDsx* 的最高表达分别出现在出膜后 41 d 和 115 d, 此外, 该基因在出膜后期雌雄幼虾中的表达亦表现出显著性差异。

**关键词** 克氏原螯虾; *Dsx*; 性别决定; 分子克隆; 基因表达; 单性养殖; 性别调控基因

**中图分类号** Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0129-08

Doublesex (*Dsx*) 最早在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中发现, 是果蝇性别决定级联通路下游的两性基因。该基因与秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的性别决定基因 Maleabnormal-3 (*Mab-3*) 及其同源基因均属于 *Dmrt* 基因家族 (doublesex and *Mab-3* related transcription factor), 它们编码的蛋白均含有 1 个保守的 DM (double-sex and *mab-3*) 结构域<sup>[1-2]</sup>。性别决定机制的进化过程十分迅速, 但 *Dmrt* 家族是个例外, 它参与了从无脊椎动物到人类的性别发育, 是一个保守性较高的古老的性别调控基因家族。*Dsx* 在昆虫性别决定的整个级联通路中最为保守, 因此, *Dsx* 常被作为其他昆虫及昆虫以外的动物性别决定和分化研究的突破口。

甲壳纲动物被认为与昆虫纲动物有着较近的进化关系, 昆虫类性别决定机制的研究发现给甲壳动物性别调控相关的研究人员带来了新思路。目前, 研究者已对多种甲壳动物的 *Dsx* 及同源基因进行

了研究。研究者在大型溞 (*Daphnia magna*) 中获得了 *Dmrt93B* 基因, 发现其只在精巢中表达<sup>[3]</sup>; 此外, 还获得 *Dsx* 基因, 其中 *Dsx1* 已被确定为环境性别决定过程中调控大型溞雄性特征发育的决定基因<sup>[4]</sup>。在罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中, 克隆出了 *Dmrt11E* 基因, 发现其在精子发生过程中可以定位到精原细胞和精子中<sup>[5]</sup>。在东方刺龙虾 (*Sagmariasus verreauxi*) 中还发现了 1 个 Y 连锁的含有 DM 结构域的基因 (*iDMY*), 是常染色体上 *iDmrt1* 的删减版本, 该基因可能通过显性负效应调控常染色体上 *iDmrt1* 基因的功能而发挥性别决定与分化的作用<sup>[6]</sup>。

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*), 俗名淡水小龙虾, 是我国重要的淡水虾类养殖品种。因其独特的风味, 较高的营养价值, 深受人们的喜爱, 被称为夏季消费的“网红”。克氏原螯虾整体产业在我国具有重要的经济地位, 2018 年, 全国小龙虾养殖总面积达 112 万  $\text{hm}^2$ , 其主要养殖方式为稻田养殖

收稿日期: 2020-05-18

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31501858); 中央高校基本科研业务费专项 (2662020SCP004); 湖北省第二批现代农业产业技术体系“稻田综合种养创新团队”; 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2019HY-JC)

石林林, E-mail: 376603966@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 李艳和, E-mail: liyanhe@mail.hzau.edu.cn

(84 万  $\text{hm}^2$ )和池塘养殖(近 20 万  $\text{hm}^2$ ),养殖总产量达 163.87 万 t,经济总产值达 3 690 亿元(中国小龙虾产业发展报告 [https://www.360kuai.com/pc/90bd39d9c1a16c541?cota=3&kuai\\_so=1&sign=360\\_57c3bbd1&refer\\_scene=so\\_1](https://www.360kuai.com/pc/90bd39d9c1a16c541?cota=3&kuai_so=1&sign=360_57c3bbd1&refer_scene=so_1))。克氏原螯虾单性养殖模式的实现,有助于提高经济效益;同时还可以作为其传播的一道防线,降低养殖过程中逃逸虾在外界环境中泛滥孳生,从一定程度上对生态环境起到保护作用。

性别决定和性别分化机制的了解是实现单性选育的基础。目前,克氏原螯虾性别调控相关基因的研究,除了胰岛素样促雄性腺激素基因(insulin-like androgenic gland hormone gene, *IAG*)<sup>[7]</sup>外,未见有其他报道。因此,本研究利用 RACE 技术从克氏原螯虾中获得了 *PcDsx* cDNA,并利用 qRT-PCR 检测该基因在成年克氏原螯虾不同组织及早期发育阶段不同时期的表达情况,以期为甲壳动物性别调控机制的研究提供理论基础,为克氏原螯虾的单性选育提供理论和技术指导。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本收集

试验所用克氏原螯虾来自华中农业大学水产养殖示范基地,养殖水温 20~23  $^{\circ}\text{C}$ 。为了解克氏原螯

虾 *Dsx* 基因的表达特征,采集成年克氏原螯虾(雌、雄)个体的神经、脑、心脏、肝胰腺、肠、触角腺、肌肉、鳃、血细胞、皮肤、性腺等组织,收集克氏原螯虾无节幼体期、蚤状幼体期的受精卵及出膜后 1、3、6、13、15、17、23、28、41、48、98、103、109、115 d 的克氏原螯虾头胸甲样品( $n=5$ )。所有的样品保存于 RNA 保存液中,用于后续 RNA 提取。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

取得的 RNA 组织样品用 TRIZol 法(QIAGEN, 德国)提取总 RNA,用 ThermoScientific DNase I(RNase-free)试剂盒除去基因组 DNA 后,按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(Thermo Fisher Scientific, 美国)说明书反转录成 cDNA。

### 1.3 克氏原螯虾 *PcDsx* 基因克隆

克氏原螯虾 *PcDsx* 基因的 cDNA 部分序列从笔者所在实验室测得的克氏原螯虾 Survey 序列中获得<sup>[8]</sup>,利用 Primer 5 软件设计特异性引物 *PcDsx* F/R,然后,根据获得的 cDNA 部分序列按照 SMARTer © RACE 5'/3' Kit(TaKaRa, 日本)的说明书设计扩增 3'和 5'端序列的引物,并反转录特异性 cDNA 模板,扩增 *PcDsx* 3'和 5'端序列。以上引物均由武汉擎科创新生物科技有限公司合成,扩增 *PcDsx* cDNA 序列所用引物信息详见表 1。

表 1 实验所用引物信息表

Table 1 Primer used in the experiment

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列(5' -3')<br>Primer sequence(5'-3')           | 产物长度/bp<br>Product length | 用途<br>Description |
|---------------------|--|---------------------------|-------------------|
| <i>PcDsx</i> F      | AGTACCCTACCGACTACCCCATCC                         | 815                       | 克隆 Clone          |
| <i>PcDsx</i> R      | TGTCTGTGGCAACTTTGAAATGAGG                        |                           |                   |
| <i>PcDsx</i> 5' R1  | <u>GATTACGCCAAGCTTTCGCTTGCCTTCTTCTTGCTTCG</u>    | 约 500                     | 克隆                |
| <i>PcDsx</i> 5' R2  | <u>GATTACGCCAAGCTTCGGACTGTGTGGATTGTAGCCGTTTG</u> | About 500                 | Clone             |
| <i>PcDsx</i> 3' F1  | <u>GATTACGCCAAGCTTCTGGATGAACTGGTGCGGGAGACGT</u>  | 约 200                     | 克隆                |
| <i>PcDsx</i> 3' F2  | <u>GATTACGCCAAGCTTAGATGATCAACCAGGTGGTGAGGCC</u>  | About 200                 | Clone             |
| <i>PcDsx</i> F2     | CAACAGCACTCATAGCCAC                              | 163                       | qRT-PCR           |
| <i>PcDsx</i> R2     | TCGCTTGCCTTCTTCTTGG                              |                           |                   |
| 18S-RNA F           | TATACGCTAGTGGAGCTGGAA                            | 147                       | qRT-PCR           |
| 18S-RNA R           | GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT                            |                           |                   |

注:带下划线的序列是按照 RACE 试剂盒说明书添加的序列。Note:The underlined sequence was added in the primer according to the instructions of the RACE kit.

### 1.4 生物信息学分析

将测得的序列修剪后进行拼接(DNASTAR Lasergene, USA),拼接后的序列用在线软件 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 和 Blast (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 分析,用 DTU Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.dtu.dk/>) 和 ExPASy([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 推导其氨基酸序列,并分析其蛋白分子质量和等电点,通过 SMART 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.gov/>)

分析,用 DTU Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.dtu.dk/>) 和 ExPASy([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 推导其氨基酸序列,并分析其蛋白分子质量和等电点,通过 SMART 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.gov/>)

de/) 预测结构域。用在线软件 I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) 预测蛋白的三维结构。各物种的同源氨基酸序列来自 NCBI, 在 MEGA 5.1 软件上, 用 clustalW 法对各物种 *Dsx* DM 结构域氨基酸序列进行比较分析, 并用邻接法 (NJ) 构建系统进化树, 各物种 *Dsx* DM 结构域氨基酸序列如表 2 所示。

表 2 序列比对及建树所用的 *Dsx*/*Dmrt* 氨基酸序列信息

Table 2 The sequences information of *Dsx*/*Dmrt* used in sequence alignment and phylogenetic tree analysis

| 缩写<br>Abbreviation | 物种<br>Species                    | 序列号<br>Accession<br>number | 基因名<br>Gene<br>name |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------|
| DpDmrt3            | <i>Daphnia pulex</i>             | EFX89054.1                 | <i>Dmrt3</i>        |
| MrDmrt99B          | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | AH147025.1                 | <i>Dmrt99B</i>      |
| MrDmrt11E          | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | AH147024.1                 | <i>Dmrt11E</i>      |
| DmDmrt             | <i>Daphnia magna</i>             | A0A0P6CC91                 | <i>Dmrt</i>         |
| PvDmrt1-like       | <i>Penaeus vannamei</i>          | XP_027230501.1             | <i>Dmrt1-like</i>   |
| AvDmrtA1           | <i>Armadillidium vulgare</i>     | RXG70637.1                 | <i>DmrtA1</i>       |
| HsDmrt1            | <i>Homo sapiens</i>              | Q9Y5R6                     | <i>Dmrt1</i>        |
| DrDmrt1            | <i>Danio rerio</i>               | Q71MM5                     | <i>Dmrt1</i>        |
| MmuDmrt1           | <i>Mus musculus</i>              | Q9QZ59                     | <i>Dmrt1</i>        |
| SviDMY             | <i>Sagmariasus verreauxi</i>     | ARK36623.1                 | <i>iDMY</i>         |
| SviDmrt1           | <i>Sagmariasus verreauxi</i>     | ARK36620.1                 | <i>iDmrt1</i>       |
| SvDmrt11E          | <i>Sagmariasus verreauxi</i>     | ARK36622.1                 | <i>Dmrt11E</i>      |
| EsDmrt-like        | <i>Eriocheir sinensis</i>        | ADH15934.1                 | <i>Dmrt-like</i>    |
| AfDsx1             | <i>Artemia franciscana</i>       | A0A2S0XSU1                 | Doublesex-1         |
| SvDsx              | <i>Sagmariasus verreauxi</i>     | ARK36621.1                 | Doublesex           |
| PchDsx             | <i>Penaeus chinensis</i>         | AFU60552.1                 | Doublesex           |
| MmaDsx             | <i>Moina macrocopa</i>           | BAM33613.1                 | Doublesex           |
| DmeDsx             | <i>Drosophila melanogaster</i>   | AAF54169.1                 | Doublesex           |
| PcDsx              | <i>Procambarus clarkii</i>       | /                          | Doublesex           |

### 1.5 qRT-PCR

通过 qRT-PCR 检测克氏原螯虾 *PcDsx* 的表达情况。反应体系为 20  $\mu$ L, 包括 F/R 引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.2  $\mu$ L、双蒸水 8.6  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L 和 SYBR Green (TaKaRa, 日本) 10  $\mu$ L。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s 57  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。18S-RNA 作为内参基因, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *PcDsx* 的相对表达量。

### 1.6 数据分析

试验数据在 Microsoft Excel 2016 软件上进行统计, 所有试验数据均以平均数士标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 在 SPSS 23.0 软件上进行单因素方差分

析 (One-way ANOVA), 采用 LSD 法进行多重比较检验差异显著性, 以字母或 “\*” 代表差异显著性 ( $P < 0.05$ ), 用软件 GraphPad Prism 7 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 克氏原螯虾 *PcDsx* 基因的克隆

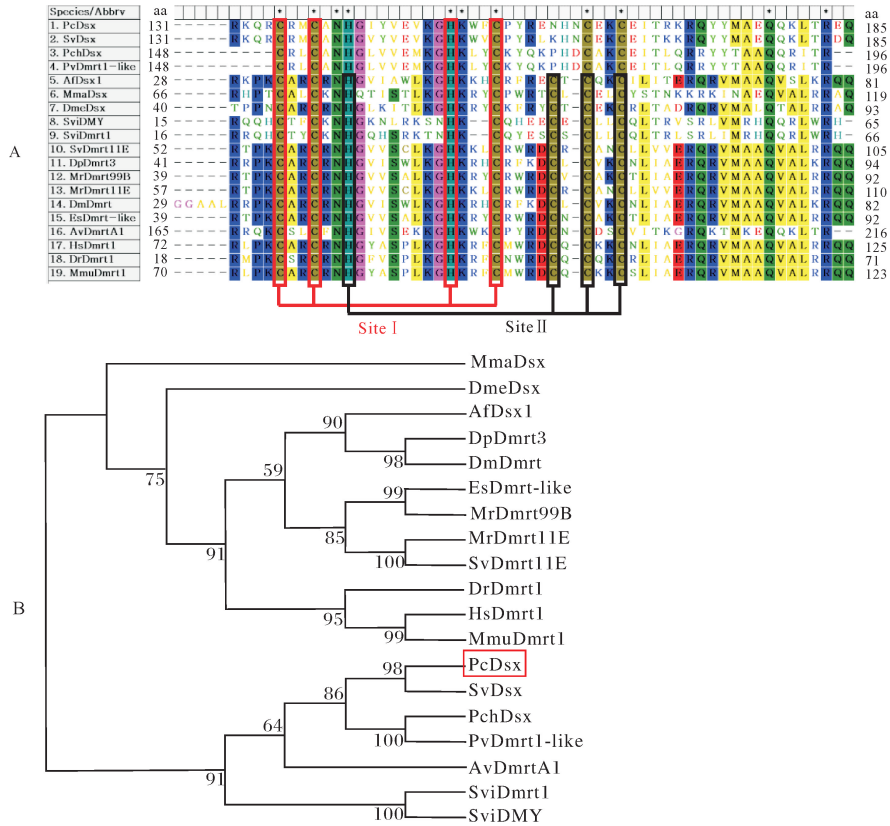
从精巢组织中获得了 *PcDsx* cDNA 全长序列 (1 584 bp), 包括 243 bp 5' UTR、765 bp ORF (编码 254 aa) 和 576 bp 3' UTR (图 1)。该基因的 3' UTR 区有 2 个 mRNA 快速降解信号 (ATTTA), 在降解信号之后有 1 个 GT 富集和 2 个 “TTTTTT” (图 1)。该基因编码的蛋白有 254 aa, 相对分子质量和等电点分别为 28 559.80 和 6.46, 预测的 *PcDsx* 蛋白含有 1 个 N-糖基化位点 (N<sub>78</sub>) 和 1 个由 55 个氨基酸残基组成的 DM 结构域, 其二级结构和三维结构如图 2 所示。

利用 MEGA 5.1 软件将表 2 中所有基因的 DM 结构域氨基酸进行多重序列比较及进化树分析, 结果如图 3A 和图 3B 所示。克氏原螯虾 *PcDsx* 与南美对虾 (*Penaeus vannamei*) *Dmrt1-like*、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) *PchDsx*、东方刺龙虾 *SvDsx* 的 DM 结构域有 5 个保守的半胱氨酸残基 (C), 可以形成一个锌结合位点 (CCHC), 在进化树中其蛋白也聚为一支, 其中 *PcDsx* 与 *SvDsx* 的同源性最高; 而果蝇和丰年虫 (*Artemia franciscana*) 的 *Dsx* 以及甲壳类、哺乳类 *Dmrt* 的 DM 结构域则有 6 个保守的半胱氨酸残基 (C), 可以形成 2 个锌结合位点 (CCHC 和 HCCC), 而其蛋白与 *PcDsx* 的同源性也较远 (图 3B)。

### 2.2 *PcDsx* 在成年克氏原螯虾各组织中的表达情况

*PcDsx* 在成年雌雄克氏原螯虾不同组织中的表达情况如图 4 所示, 在成年雄性克氏原螯虾中, 触角腺中 *PcDsx* 表达量最高, 其次是食道下神经节、肌肉组织、精巢、心脏, 其他各组织 *PcDsx* 表达相对较低, 尤其在血和皮肤中; 在成年雌性克氏原螯虾中, *PcDsx* 表达量最高的组织亦是触角腺, 其次是卵巢、肝胰腺、后肠和肌肉。此外, 除了食道下神经节、脑、肌肉组织、精巢、心脏和血中的 *PcDsx* 表达水平在雌雄个体间不存在差异, 其他组织中 *PcDsx* 的表达在雌雄个体间均有显著性差异, 其中, 在雌性的触角腺、卵巢、肝胰腺、前肠、中肠、后肠、鳃和皮肤中表达水平显著性高于雄性组织。

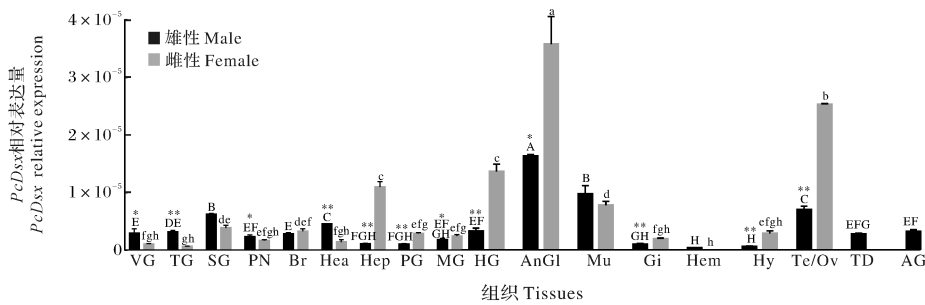




A: Dsx/Dmrt DM 结构域的多重比较分析, 多序列比较的方法为 clustal W 法, 保守性大于 50% 的氨基酸残基用彩方形背景突出。B: Dsx/Dmrt DM 结构域的进化分析。在 MEGA 5.1 软件上采用 Neighbor-Joining 法构建进化树, bootstrap 值设置为 1 000 次计算重复; 克氏原螯虾加红色方框标记。多重比较及建树所用 Dsx 或 Dmrt 相关序列信息见表 2。A: Multiple alignment analysis of Dsx/Dmrt DM domains. The alignment was performed by the clustal W algorithm. The identical residue sites in regions with more than 50% conserved level were highlighted with a colored square background. B: Evolutionary analysis of Dsx/Dmrt amino acid sequences. The analysis was constructed by the Neighbor-Joining method with bootstrapping 1 000 replicates, using MEGA 5.1 software. *P. clarkii* was marked with a red box. The Dsx/Dmrt related information used for multiple alignment and evolutionary analysis were listed in Table 2.

图 3 多重比较及进化分析

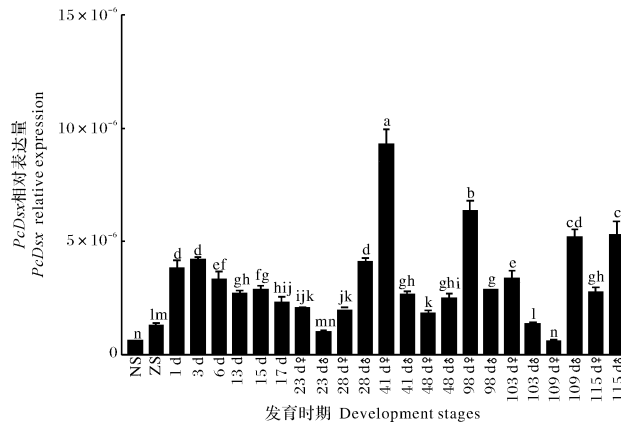
Fig.3 Multiple alignment and evolutionary analysis



VG: 腹部腹神经索 Ventral ganglia; TG: 胸部腹神经索 Thoracic ganglia; SG: 食道下神经节 Subesophageal ganglia; PN: 围食道神经 Periesophageal nerve; Br: 脑 Brain; Hea: 心脏 Heart; Hep: 肝胰腺 Hepatopancreas; FG: 前肠 Foregut; MG: 中肠 Midgut; HG: 后肠 Hindgut; An-GI: 触角腺 Antennary glands; Mu: 肌肉 Muscle; Gi: 鳃 Gill; Hem: 血 Hemocytes; Hy: 皮肤 Hypodermis; Te: 精巢 Testis; Ov: 卵巢 Ovary; TD: 输精管 Testicular ducts; AG: 促雄性腺 Androgenic gland; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . *PcDsx* 在成年雄性克氏原螯虾各组织中表达的显著性差异用大写字母表示 ( $P < 0.05$ ), *PcDsx* 在成年雌性克氏原螯虾各组织中表达的显著性差异用小写字母表示 ( $P < 0.05$ ), *PcDsx* 在雌雄相同组织中表达的显著性差异用星号表示。Different upper-case letters indicated significant differences in the expression levels of *PcDsx* in different tissues of male *P. clarkii* ( $P < 0.05$ ). Different lower-case letters indicated significant differences in the expression levels of *PcDsx* in different tissues of female *P. clarkii* ( $P < 0.05$ ). Asterisks indicated significant differences in the expression levels of *PcDsx* between male and female the same tissue.

图 4 *PcDsx* 在成年克氏原螯虾组织中的表达模式

Fig.4 Expression pattern of *PcDsx* in adult *P. clarkii*



NS: 无节幼体期 Nauplius stage; ZS: 蚤状幼体期 Zoea stage; 1-115 d: 出膜后第 1~115 天 The first-115 days after hatching.

图 5 *PcDsx* 在克氏原螯虾早期不同发育时期的表达模式

Fig.5 Expression pattern of *PcDsx* in the early development period of *P. clarkii*

### 3 讨论

在本研究中,我们获得了 *PcDsx* cDNA 的全长序列,该基因具有 *Dmrt* 基因家族的特征,与同源性较高的南美白对虾 *Dmrt1-like*、中国明对虾 *PchDsx*、东方刺龙虾 *SvDsx* 的 DM 结构域相同,都只含有 1 个锌结合位点(CCHC),而同源性较远的果蝇和丰年虫的 *Dsx* 以及甲壳类和哺乳类 *Dmrt* 的 DM 结构域则含有 2 个锌结合位点(CCHC 和 HCCC)。在 *PcDsx* 中发现了 2 个降解信号,降解信号会影响 mRNA 的稳定性,不知该基因的 mRNA 的稳定性在雌雄克氏原螯虾间是否有差异,进而影响其在不同性别的克氏原螯虾中的功能。

在东方刺龙虾中,对性发育相关基因 *SvTKIR* 和 *SvDmrt1* 的研究发现,这 2 个基因在雌雄未成年虾的触角腺中表达水平均较高,而在成年虾的触角腺中的表达则表现出性别二态性,雌性中的表达水平显著高于雄性<sup>[9]</sup>。在本研究中,*PcDsx* 在成年雌性克氏原螯虾的触角腺组织中表达水平最高,且表达水平显著高于雄性,笔者所在研究小组在对克氏原螯虾 *PcSxl* 的研究中发现,该基因在成年雄虾触角腺组织中表达最高,而在雌性中的表达远低于雄性(数据待发表)。目前,尚无法解释这些基因在触角腺中的性别二态性表达现象。触角腺在虾蟹类中的作用类似于哺乳动物的肾脏,用于调节渗透压和离子平衡以及代谢废弃物如尿液的排泄。有证据表明尿液中混有独特的物质,可以传达社会地位、交

配、聚合退敌、协调公共生活及其他社会行为的化学信号<sup>[10-12]</sup>,如若触角腺参与这些信号或者交配信号的调节过程,那么这些基因在触角腺中表现出性别二态性表达也有据可依<sup>[9]</sup>,但目前未见相关报道,尚需进一步深入研究。

在甲壳动物中,有的与昆虫性别决定通路上的基因的同源基因,其表达水平对性别具有偏好性,例如, *Sxl* 多具有偏雄性表达的特点,日本沼虾 (*M. nipponense*)<sup>[13]</sup> 和中华绒蟹 (*Eriocheir sinensis*)<sup>[14]</sup> 如此,南美白对虾中的 *Sxl-1*、*Sxl-3*、*Sxl-5* 和 *Sxl-6*<sup>[15]</sup> 亦是如此。日本沼虾中 *Fem-1* 和 *Fem-1b*<sup>[16-17]</sup> 的表达对性别也具有偏好性。甲壳动物性别调控机制具有复杂多样性,性别偏好性表达现象在不同物种中可能不尽相同,如淡水枝角水蚤 (*D. pulex*) 中的 *Tra* 基因<sup>[18]</sup> 和中国明对虾中的 *Tra-2* 基因<sup>[19]</sup> 的表达存在性别二态性,而大型蚤中的 *Tra*<sup>[20]</sup> 和斑节对虾 (*P. monodon*) 中的 *Tra-2*<sup>[21]</sup> 在雌雄间表达则并无明显差异;本研究中 *PcDsx* 在雌性克氏原螯虾的卵巢组织中的表达水平高于雄性精巢,而同源性较高的中国明对虾 *Dsx* 以及长牡蛎 *Dsx* 则在雄性性腺中高表达<sup>[22-23]</sup>。

*IAG* 是目前唯一被证实参与雄性甲壳动物性别分化的关键因子<sup>[24-25]</sup>,其可能与 *Dsx* 间存在直接或间接的调节关系。在罗氏沼虾中,*Dmrt11E* 基因的沉默会引起 *IAG* 转录水平下调<sup>[5]</sup>,同样的,在中国明对虾中,dsRNA 干扰 *Dsx* 基因的表达后,也会使 *IAG* 基因表达水平下降,并且在 *IAG* 启动子区域上预测出了 *Dsx* 结合位点,推测 *Dsx* 基因可能是 *IAG* 基因上游调节基因<sup>[22]</sup>。根据 *PcDsx* 和 *PcIAG* 在克氏原螯虾早期发育时期的表达情况分析,推测 *PcIAG* 基因在直接或间接接收到 *PcDsx* 的调节信号后做出相应的反应,在出膜后 1~3 d 表达水平达到最高,进而调控克氏原螯虾的雄性第二性征,在出膜后 23 d 长出雄性特化的第一游泳足,至于克氏原螯虾性别形成的时间我们无法判断,还有待于深入研究。

### 参考文献 References

- [1] BURTIS K C, BAKER B S. *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides[J]. Cell, 1989, 56(6): 997-1010.

- [2] ZHU L, WILKEN J, PHILLIPS N B, et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers[J]. *Genes & development*, 2000, 14: 1750-1764.
- [3] KATO Y, KOBAYASHI K, ODA S, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*[J]. *Genomics*, 2008, 91(1): 94-101.
- [4] KATO Y, KOBAYASHI K, WATANABE H, et al. Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a doublesex gene in the sex-determining pathway[J/OL]. *PLoS genetics*, 2011, 7(3): e1001345 [2020-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21455482>. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001345.
- [5] YU Y Q, MA W M, ZENG Q G, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of two *Dmrt* genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Agricultural research*, 2014, 3(2): 181-191.
- [6] CHANDLER J C, FITZGIBBON Q P, SMITH G, et al. Y-linked *iDmrt1* paralogue (*iDMY*) in the eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*: the first invertebrate sex-linked *Dmrt*[J]. *Developmental biology*, 2017, 430(2): 337-345.
- [7] SHI L L, YI S K, LI Y H, et al. Genome survey sequencing of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. *Molecular biology reports*, 2018, 45(5): 799-806.
- [8] SHI L L, HAN S X, FEI J M, et al. Molecular characterization and functional study of insulin-like and rogenic gland hormone gene in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J/OL]. *Genes*, 2019, 10(9): 645 [2020-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31455039>. DOI: 10.3390/genes10090645.
- [9] CHANDLER J C, AIZEN J, FITZGIBBON Q, et al. Applying the power of transcriptomics: understanding male sexual development in decapod crustacea[J]. *Integrative and comparative biology*, 2016, 56(6): 1144-1156.
- [10] AGGIO J, DERBY C D. Chemical communication in crustaceans[M]. New York: Springer, 2011: 239-256.
- [11] SHABANI S, KAMIO M, DERBY C D. Spiny lobsters use urine-borne olfactory signaling and physical aggressive behaviors to influence social status of conspecifics[J]. *Journal of experimental biology*, 2009, 212(15): 2464-2474.
- [12] THIEL M, BREITHAUPT T. Chemical communication in crustaceans: research challenges for the twenty-first century[M]//BREITHAUPT T, THIEL M. Chemical communication in crustaceans. New York: Springer, 2011.
- [13] ZHANG Y P, QIAO H, ZHANG W Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of two sex-lethal homolog genes during development in the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. *Genetics and molecular research*, 2013, 12(4): 4698-4711.
- [14] SHEN H S, HU Y C, ZHOU X. Sex-lethal gene of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: cDNA cloning, induction by eyestalk ablation, and expression of two splice variants in males and females[J]. *Development genes and evolution*, 2014, 224(2): 97-105.
- [15] LOPEZ-CUADROS I, GARCIA-GASCA A, GOMEZ-ANDURÓ G, et al. Isolation of the sex-determining gene sex-lethal (*Sxl*) in *Penaues (Litopenaeus) vannamei* (Boone, 1931) and characterization of its embryogenic, gametogenic, and tissue-specific expression[J]. *Gene*, 2018, 668: 33-47.
- [16] MA K, LIU Z, LIN J, et al. Molecular characterization of a novel ovary-specific gene *fem-1* homolog from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 244-252.
- [17] RAHMAN N M A, FU H, QIAO H, et al. Molecular cloning and expression analysis of *Fem1b* from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J/OL]. *Genetics and molecular research*, 2016, 15(2): gmr7950 [2020-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27323097>. DOI: 10.4238/gmr.15027950.
- [18] CHEN P, XU S, ZHOU W, et al. Cloning and expression analysis of a transformer gene in *Daphnia pulex* during different reproduction stages[J]. *Animal reproduction science*, 2014, 146(3/4): 227-237.
- [19] LI S H, LI F H, WEN R, et al. Identification and characterization of the sex-determiner transformer-2 homologue in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Sexual development*, 2012, 6(5): 267-278.
- [20] KATO Y, KOBAYASHI K, ODA S, et al. Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*[J]. *Genomics*, 2010, 95(3): 160-165.
- [21] LEELATANAWIT R, SITTIKANKEAW K, YOCAWIBUN P, et al. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaues monodon*[J]. *Comparative biochemistry and physiology-part A: molecular & integrative physiology*, 2009, 152(1): 66-76.
- [22] LI S H, LI F H, YU K J, et al. Identification and characterization of a doublesex gene which regulates the expression of insulin-like androgenic gland hormone in *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Gene*, 2018, 649(5): 1-7.
- [23] 张娜, 黄雯, 许飞. 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 两个 *Dmrt* 家族基因的时空表达[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 717-724. ZHANG N, HUANG W, XU F, et al. Expression of two *Dmrt* family genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Oceanologia et limnologia sinica*, 2015, 46(3): 717-724 (in Chinese with English abstract).
- [24] VENTURA T, MANOR R, AFLALO E D, et al. Temporal silencing of an androgenic gland-specific insulin-like gene affecting phenotypical gender differences and spermatogenesis[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(3): 1278-1286.

- [25] 张亚群,王克坚. 甲壳动物促雄腺激素功能、生化和分子结构的研究[J]. 水产科学,2014,33(5):67-72. ZHANG Y Q,WANG K J. A review:current research of function,biochemistry and molecular structure of androgenic gland hormone in crustacean [J]. Fisheries science,2014,33(5):67-72 (in Chinese with English abstract).

## Molecular cloning and expression analysis of *PcDsx* in *Procambarus clarkii*

SHI Linlin<sup>1</sup>,CHEN Jiahao<sup>1</sup>,SHI Ruixue<sup>1</sup>,FEI Jiamin<sup>1</sup>,ZHANG Long<sup>1</sup>,LI Yanhe<sup>1,2</sup>

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

**Abstract** To elucidate the function of the doublesex (*PcDsx*) gene in *Procambarus clarkii*, the *PcDsx* cDNA sequence was obtained by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) and the expression of *PcDsx* was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results of bioinformatics analysis showed that the full-length *PcDsx* cDNA was 1 584 bp, with a 243 bp 5' untranslated region, a 765 bp open reading frame (ORF) (coded 254 aa) and a 576 bp 3' untranslated region. The deduced protein of *PcDsx* was 254 aa and the predicted *PcDsx* protein was found to contain a conserved DM domain. Phylogenetic analysis revealed that the *PcDsx* DM domain share high similarity to the DM domain of *Sagmariasus verreauxi* doublesex. The gene expression analysis showed that *PcDsx* was widely expressed in various tissues of the adult crayfish, highest in the antennary glands, followed by the muscle and gonads. The expression of *PcDsx* in various adult female tissues was significantly different from that in adult male tissues. During the early development of *P. clarkii*, the expression level of *PcDsx* reached a peak at 3 day after hatching, while the highest expression of *PcDsx* in male and female juveniles appeared at 41 and 115 day after hatching, respectively. Besides, the expression of *PcDsx* also showed significant differences between male and female juveniles.

**Keywords** *Procambarus clarkii*; *Dsx*; sex determination; molecular cloning; gene expression; monosex cultivation; sex-regulated genes

(责任编辑:边书京)