

克氏原螯虾 sex-lethal 基因的克隆与表达分析

费佳敏¹, 石林林¹, 李艳和^{1,2}

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 为探究克氏原螯虾 sex-lethal 基因(*Sxl*)的功能与分子机制, 采用 RACE(rapid amplification of cDNA ends)技术克隆获得 4 个克氏原螯虾 *Sxl* cDNA 序列, 利用荧光定量 PCR 技术检测其不同组织以及早期发育时期的表达情况。生物信息学分析发现, *PcSxlβ* 和 *PcSxlδ* 比 *PcSxlγ* 多了一段 77 bp 的碱基序列, 而 *PcSxlβ* 和 *PcSxlδ* 预测所得的氨基酸序列较 *PcSxlγ* 短。克氏原螯虾的 *Sxl* 氨基酸序列与红螯螯虾的序列相似性较高(75.76%)。保守结构域分析显示, 这 4 种转录异构体序列预测的氨基酸序列都具有 2 个相同的高度保守的 RRM 结构域。表达分析结果显示, *PcSxl* 在成年雄性克氏原螯虾的触角腺和鳃中表达量较高, 在成年雌性中则是中肠和前肠的表达量较高, 雌性卵巢中的表达量要显著高于雄性精巢。早期发育时期中, 无节幼体时期的表达量最高, 在蚤状幼体期表达量出现下降, 但在出膜后第 1 天表达量又有所升高, 随后整体则呈现出逐渐下降的趋势。以上结果表明克氏原螯虾 *PcSxl* 与其性别分化有关。

关键词 克氏原螯虾; *Sxl* 基因; 性别决定; 性别调控基因; 转录异构体; 基因表达; 单性养殖

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0120-09

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 俗称小龙虾, 因其生长迅速、适应性强、肉味鲜美、蛋白质含量高特点, 目前已成为我国重要的淡水经济养殖品种之一。在自然发育和人工养殖过程中, 雌雄个体间的生长速度存在一定的差异。在达到性成熟之前, 雌雄个体相差不大且生长速度相当; 接近性成熟时, 由于雌虾需要为卵巢提供大量的营养物质, 雄虾的体长和体质量增长较雌虾快^[1]。因此, 研究克氏原螯虾中与性别分化相关的基因, 将有利于人为控制其性别的分化, 达到在养殖过程中进行单性养殖以获得更高利益的目的, 并推动我国小龙虾产业的发展。

目前有关昆虫雌雄性别发育相关基因的研究已有一定的进展, 其中关于黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)性别决定机制的研究最为成熟, 可为其他物种的研究提供一定的参考作用。在昆虫的体细胞中性别决定信号的调控是由一系列涉及多个基

因的联级反应组成的, 其中一些基因编码 RNA 结合蛋白来控制前体 mRNA 的性别特异性剪接^[2], 从而达到对昆虫性别分化的调控作用。在这些性别决定相关的基因中, *Sxl* 位于联级反应的最上游, 被认为是黑腹果蝇性别决定的关键基因, 是控制着体细胞的性别分化、生殖细胞的分化以及剂量补偿的枢纽^[3], 其表达受到 X:A 的信号调控^[2]。当 X:A (2X:2A) 的比值为 1 时, *Sxl* 被激活产生有活性的 *Sxl* 蛋白, 调控下游性别分化相关基因的表达, 使果蝇个体发育成雌性。相反当 X:A (XY:2A) 为 0.5 时, *Sxl* 没有被激活, 一系列的联级调控反应无法进行, 促使果蝇个体发育成雄性^[4]。

在一些甲壳动物中, 与性别决定联级反应有关的一些基因已经被报道, 如, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的 1 个 *Sxl* 基因, 2 个 *Dmrt* 转录异构体^[5]; 南美白对虾(*Penaeus vannamei*)的 *Sxl* 基因^[6]; 中华绒螯蟹的(*Eriocheir sinensis*)

收稿日期: 2020-06-20

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”

费佳敏, E-mail: 1255864545@qq.com

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

4 种 *Sxl* 转录异构体^[7]；红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 的 4 种 *Sxl* 转录异构体^[8]；中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 的 1 个 *Tra-2* 基因^[9]；日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 的 2 个 *Sxl* 异构体和 1 个 *Tra-2* 基因^[10-11]。甲壳动物的这些基因大多与昆虫的同源基因具有高度的序列相似性,但是这些基因在甲壳动物的性别决定中的作用仍然没有被明确,而研究与其性别调控相关基因的结构与功能又是探明甲壳动物的性别决定机制的突破口。因此,笔者克隆和分析克氏原螯虾性别相关基因 *Sxl* 的结构和表达情况,以期为克氏原螯虾性别决定和性别分化机制的研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 动物材料

试验用虾来自华中农业大学水产养殖示范基地,养殖水温 20~23 ℃,每天投喂 2 次,1 周换水 1 次。采集健康的(20±5) g 成年雌雄克氏原螯虾的腹部腹神经索、胸部腹神经索、食道下神经节、围食道神经、脑、眼柄、心、肝胰腺、胃、前肠、中肠、后肠、触角腺、肌肉、鳃、血、皮肤、精巢、输精管、促雄性腺、卵巢等 21 种组织样品,以及克氏原螯虾无节幼体期和蚤状幼体期的受精卵,出膜后 1、3、6、13、15、17 d 的整只虾样品,出膜后出现雌雄分化的 23、28、36、41、48、98、103、109、115 d 的雌雄虾的头胸甲样品,共计 26 种样品。其中每种试验样品采集 3 只虾为 1 组,采集后的样品经液氮罐速冻后于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

采用 TRIZol[®] Reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 法提取各个试验样品的总 RNA。取 1 μL RNA,使用紫外分光光度计 Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 进行上机检测,测定其 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间,质量浓度在 20 ng/μL 以上;根据反转录试剂盒 ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 操作步骤对提取的总 RNA(1 μg) 进行反转录,以获得 cDNA 第一条链。剩余 RNA 样品以及反转录得到的 cDNA 样品保存于-80 ℃冰箱备用。

1.3 *Sxl* 的 cDNA 序列的克隆

根据 NCBI 数据库中已知的甲壳类动物的 *Sxl* cDNA 序列,利用 MEGA 5.1 软件,找出其高度保

守区域。遵循引物设计的原则,利用生物学软件 Primer Premier 6.0 设计简并引物 *Sxl*-F/R(表 1),扩增获得 *Sxl* 基因的部分 cDNA 片段。基于获得的 *Sxl* cDNA 的中间序列,按照 SMARTer[™] RACE (TaKaRa, 大连) 试剂盒要求,用 Primer Premier 6.0 设计用于扩增 *Sxl* cDNA 5' 端的特异性引物 *Sxl* 5'R1/2 (Kit) 以及 3' 端的特异性引物 *Sxl* 3'F1/2 (Kit) (表 1)。根据试剂盒的方法扩增 3'、5' 末端未知序列。

| Table 1 Sequence of different primers used in this experiment | |
|---|-------------------------------|
| 引物 Primer | 引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3') |
| Sxl3'F1 (Kit) | <u>GATTACGCCAAGCTT</u> |
| | GCAGACTGGCTATTTCGTTTGGCTTCG |
| Sxl3'F2 (Kit) | <u>GATTACGCCAAGCTT</u> |
| | TACCAGAAGCCCGAAGATGCCGC |
| Sxl5'R1 (Kit) | <u>GATTACGCCAAGCTT</u> |
| | AATGGCTTTAGCGGCATCTTCGGG |
| Sxl5'R2 (Kit) | <u>GATTACGCCAAGCTT</u> |
| | TACTCCACAAAGCCGAAGCCAAACG |
| Sxl-F | ATGGCCATACCCATATTCCAA |
| Sxl-R | CTACTTGATGCGTTTATGCTG |
| Sxl-qF | AGACTGGCTATTTCGTTTGG |
| Sxl-qR | TACTTGATGCGTTTATGCTG |

注:表中下划线部分为按照 RACE 试剂盒要求所添加的序列。
Note: In the table, the sequence with the underlined were added in accordance with the requirements of the RACE kit.

1.4 序列分析

使用 Seqman 软件对序列进行拼接,得到 *Sxl* cDNA 全长。用在线生物软件 Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将获得的全长与其他物种的 *Sxl* 序列进行比对,用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测其 ORF 区,用 DTU Bioinformatics (<http://www.bioinformatics.dtu.dk/>) 和 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) 推导其氨基酸序列结构特点,并分析其蛋白质分子质量和等电点,通过 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测结构域。使用 DNAMAN 软件的 Clustal W 对各物种的 *Sxl* 氨基酸序列(表 2) 进行比较分析。使用 MEGA 5.1 构建系统进化树(邻接法),其中分支节点值(bootstrap-value) 设置为 1 000 次重复抽样试验,检验各节点的置信度。

1.5 荧光定量 PCR

基于已获得的 *PcSxlα*、*PcSxlβ*、*PcSxlγ* 和 *PcSxlδ* 4 种转录异构体序列的保守区域,遵循引物

表 2 序列比对及聚类分析所用 Sxl 氨基酸序列信息

Table 2 Information of Sxl used in sequence alignment and phylogeny analysis

| 名称 Name | 物种 Organism | 登录号 Accession number |
|----------------|----------------------------------|--|
| DpSxl | <i>Daphnia pulex</i> | EFX75394.1 |
| CqSxl1 | <i>Cherax quadricarinatus</i> | QCZ24930.1 |
| CqSxl2 | <i>Cherax quadricarinatus</i> | QCZ24931.1 |
| CqSxl3 | <i>Cherax quadricarinatus</i> | QCZ24932.1 |
| CqSxl4 | <i>Cherax quadricarinatus</i> | QCZ24933.1 |
| PvSxl | <i>Penaeus vannamei</i> | AUS89446.1 |
| MrSxl | <i>Macrobrachium rosenbergii</i> | AP014323.1 |
| MnSxl | <i>Macrobrachium nipponense</i> | AGI44577.1 |
| LsSxl | <i>Lepeophtheirus salmonis</i> | ADD38031.1 |
| CfSxl | <i>Camponotus floridanus</i> | EFN65860.1 |
| EsSxl | <i>Eriocheir sinensis</i> | AHA33391.1 |
| PtSxl | <i>Portunus trituberculatus</i> | QBA30953.1 |
| DmSxl | <i>Drosophila melanogaster</i> | AAO41638.2 |
| BmSxl | <i>Bombyx mori</i> | NP_001166854.1 |
| PcSxl α | <i>Procambarus clarkii</i> | MT680909(本研究克隆,obtained in this study) |
| PcSxl β | <i>Procambarus clarkii</i> | MT680910(本研究克隆,obtained in this study) |
| PcSxl γ | <i>Procambarus clarkii</i> | MT680911(本研究克隆,obtained in this study) |
| PcSxl δ | <i>Procambarus clarkii</i> | MT680912(本研究克隆,obtained in this study) |

设计原则,利用 Primer Premier 6.0 设计荧光定量 PCR 引物 *Sxl*-qF/R(表 1),使用 SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] II 荧光染料试剂(TaKaRa,大连),以及 Quant Studio 6 荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)对成年雌雄克氏原螯虾各组织以及各发育阶段的组织样品中的 *Sxl* 表达情况进行定量分析。每个样品重复 3 次,反应程序如下:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s;59 °C 退火 45 s;72 °C 延伸 30 s;40 个循环。同时选用 18S RNA 为内参基因进行对照。

使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析克氏原螯虾 *Sxl* 基因在不同组织及发育时期的相对表达情况。使用生物统计学软件 GraphPad Prism 7 对数据进行统计分析,使用单因素方差分析和多因素方差分析的方法进行显著性差异分析。 $P < 0.05$ 代表存在显著性差异, $P < 0.01$ 代表存在极显著性差异。

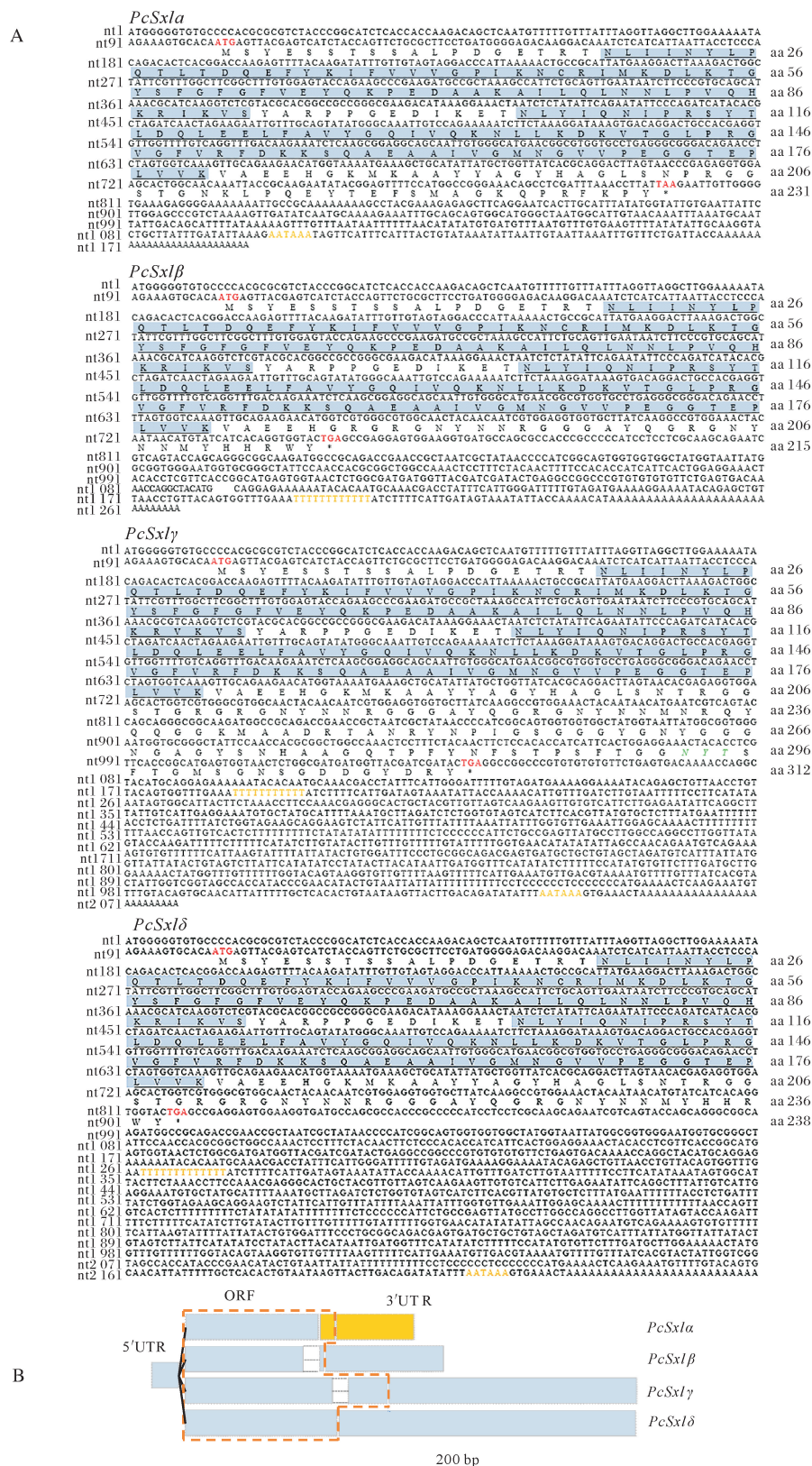
2 结果与分析

2.1 克氏原螯虾 *Sxl* 基因的序列分析

从雄性克氏原螯虾精巢中扩增出了 4 个不同转录异构体的 *Sxl* cDNA 序列,分别命名为 *PcSxl α* 、*PcSxl β* 、*PcSxl γ* 和 *PcSxl δ* ,序列提交至 Genbank 数据库,登录号分别为 MT680909~MT680912。其中,*PcSxl α* 有 102 bp 5' UTR、696 bp ORF(编码 231 aa)和 392 bp 3' UTR;起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TAA,3' 端有 1 个加尾信号

AATAAA;预测的 *PcSxl α* 多肽的分子质量为 25.75 ku,理论等电点 pI 为 9.06。*PcSxl β* 有 102 bp 5' UTR、648 bp ORF(编码 215 aa)和 518 bp 3' UTR;起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA,3' 端无加尾信号 AATAAA,但有 U 元素富集区;预测的 *PcSxl β* 多肽的分子质量为 24.24 ku,理论等电点 pI 为 9.13。*PcSxl γ* 有 102 bp 5' UTR、939 bp ORF(编码 322 aa)和 1 128 bp 3' UTR;起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA,3' 端有 1 个加尾信号 AATAAA;预测的 *PcSxl γ* 多肽的分子质量为 33.97 ku,理论等电点 pI 为 9.25,有 2 个 N-糖基化位点 N₂₈₃ 和 N₂₉₃。*PcSxl δ* 有 102 bp 5' UTR、717 bp ORF(编码 238 aa)和 1 429 bp 3' UTR;起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA,3' 端有 1 个加尾信号 AATAAA;预测的 *PcSxl δ* 多肽的分子质量为 26.59 ku,理论等电点 pI 为 9.36。这 4 种不同的 *PcSxl* cDNA 序列及编码的氨基酸序列具体如图 1A 所示。

如图 1B 所示,这 4 种不同剪接方式的 *PcSxl* mRNA 具有相同的 5' UTR 及部分相同的 ORF。*PcSxl α* 、*PcSxl β* 、*PcSxl γ* 与 *PcSxl δ* 相比,*PcSxl α* 只有前 729 bp 与 *PcSxl δ* 相同,而图 1B 中黄色方块区域则是与 *PcSxl δ* 不同的序列;*PcSxl β* 缺失了 2 个片段,一段在 *PcSxl δ* ORF,长度为 69 bp,另一段在 3' 端,长度为 914 bp;*PcSxl γ* 缺失 77 bp,缺失的区域包含 *PcSxl δ* 的部分 ORF 序列和部分 3' 端序列。



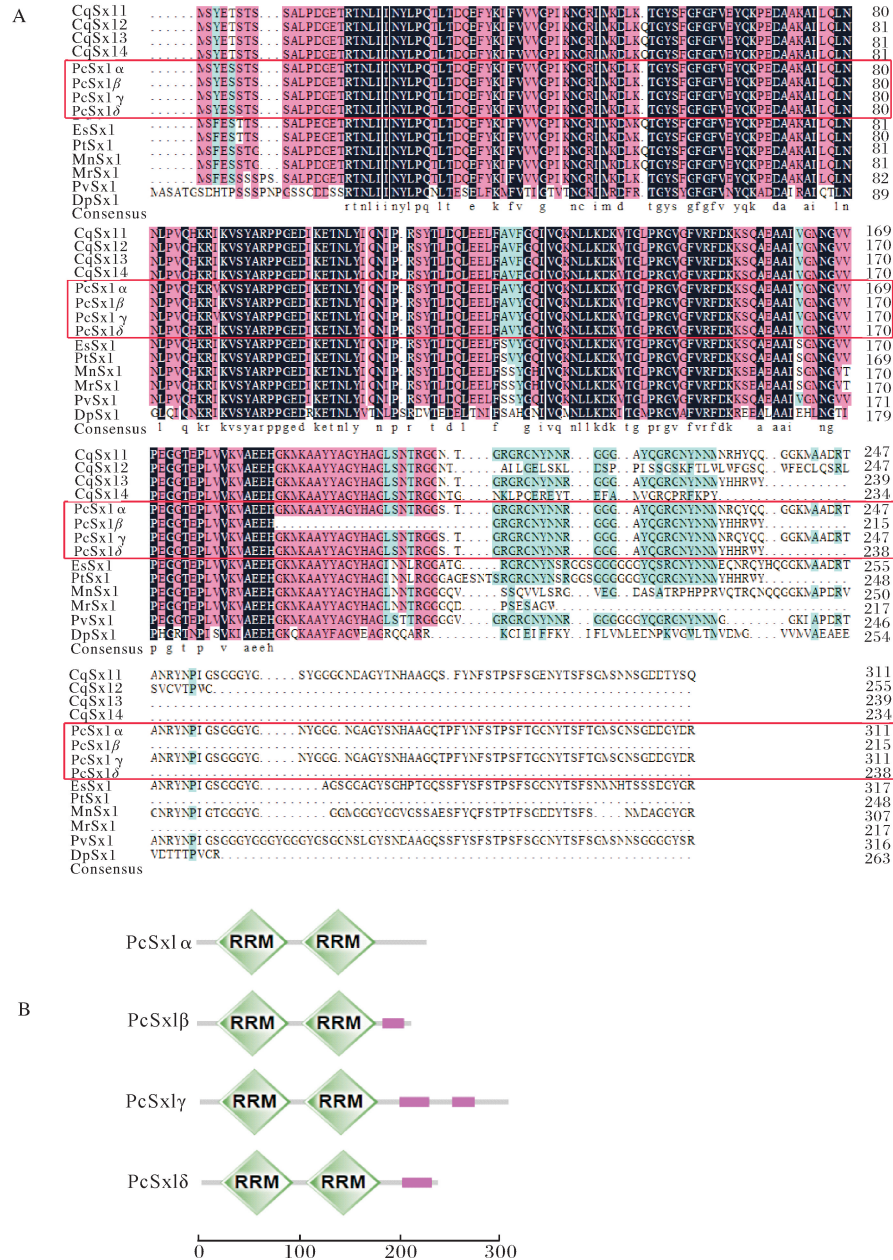
A: 4 种不同的 *PcSxl* cDNA 序列及预测的氨基酸序列。图中蓝色阴影加下划线为 *PcSxl*s 的 2 个 RRM 结构域。B: *PcSxl* mRNA 对比图。A: The nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *PcSxl* cDNA. The two RRM domains of *PcSxl* are indicated by blue shade with an underline. B: The comparison of *PcSxl*s.

图 1 4 种不同的 *PcSxl* 结构图
Fig.1 Four different *PcSxl* structure

2.2 克氏原螯虾 Sxl 氨基酸序列分析

在 DANMAN 软件上,用 Clustal W 算法将测得的序列与其他物种的 Sxl 氨基酸序列和 RRM 结构域氨基酸序列分别进行多重比较分析,所得到的结果见图 2A。通过多序列比较分析发现,螯虾类的

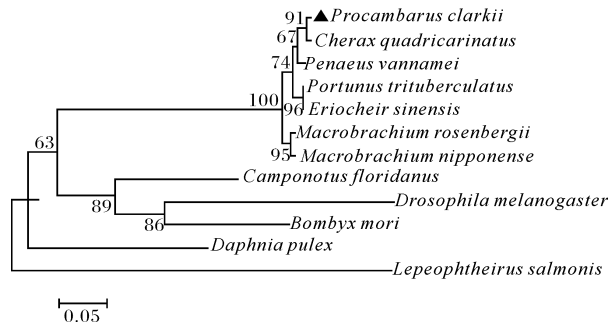
Sxl 氨基酸序列一致性高达 75.76%; 蟹类的高达 72.24%; 而整个甲壳类的一致性则为 68.98%。PcSxl α 与红螯螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 的 Sxl4 (CqSxl4) 一致性达 66.47%; PcSxl γ 与 CqSxl1 的一致性高达 87.54%; PcSxl δ 与 CqSxl3 的一致性



A: 甲壳动物 Sxl 氨基酸序列的多重比较。彩色背景标识的氨基酸残基为保守性大于 50% 的氨基酸残基。克氏原螯虾的 Sxl 氨基酸序列在图中用红色方框标出。B: 预测的 PcSxl 蛋白结构域。RRM 表示 RNA 识别模体区, 粉色方块表示低复杂度区。A: The multiple-sequence alignment analyses of deduced Sxl amino acid sequences in different crustaceans. The amino acid residues identified by color background in the figure are those whose conservation is greater than 50%. The *P. clarkii* Sxl amino acid sequences were shown in the red box. B: The predicted domains of PcSxls. RRM represents the region of RNA recognition motif, and the pink square represents the region of low complexity.

图 2 克氏原螯虾 Sxl 氨基酸序列分析

Fig.2 Amino acid sequence analysis of *Procambarus clarkii* Sxl



克氏原螯虾的 Sxl 序列在图中用黑色三角标出。The Sxl amino acid sequences of the red swamp crayfish were shown in black triangles.

图 3 Sxl 氨基酸序列的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of Sxl amino acid sequence 为 69.83%; 而 PcSxl β 与 CqSxl3 的一致性只有 63.2%。总的来说整个甲壳类的 Sxl 氨基酸序列较为一致。

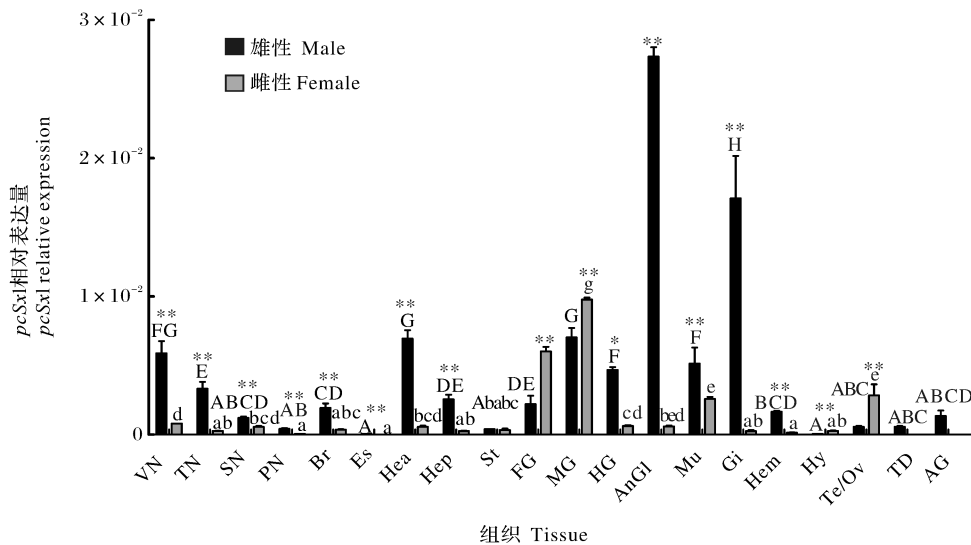
如图 2B 所示,在相同的 ORF 序列中,其对应编码的氨基酸序列包含 2 个 RRM 结构域,即这 4 个 PcSxl 转录异构体拥有相同的 RRM 结构域,其中 1 个 RRM 结构域包含 74 个氨基酸,另 1 个包含 76 个氨基酸,2 个 RRM 结构域之间还有 12 个氨基酸。

使用 MEGA 5.1 软件对 Sxl 基因氨基酸序列

进行系统进化分析,采用邻接法构建系统进化树,bootstrap-value 设置为 1 000 次用于计算重复。构建的系统发育进化树如图 3 所示,其中,佛罗里达弓背蚁 (*Camponotus floridanus*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 3 种昆虫聚为一支;淡水枝角水蚤 (*Daphnia pulex*) 和鲑疮痂鱼虱 (*Lepeophtheirus salmonis*) 又各聚为一支;整个虾蟹类单独聚为一支,而在虾蟹一支中,又分枝为螯虾类 (*P. clarkii* 和 *C. quadricarinatus*)、对虾类 (*P. vannamei*)、沼虾类 (*M. rosenbergii* 和 *M. nipponense*) 以及蟹类 (*E. sinensis* 和 *P. trituberculatus*)。

2.3 克氏原螯虾 Sxl 在成年雌雄不同组织中的表达分析

对成年雌雄克氏原螯虾的腹部腹神经索 (VN)、脑 (Br)、眼柄 (Es)、触角腺 (AnGl)、肌肉 (Mu)、鳃 (Gi)、血 (Hem)、精巢 (Te)、输精管 (TD)、促雄性腺 (AG)、卵巢 (Ov) 等各组织的 Sxl 表达情况进行了分析。结果显示, Sxl 在所检测的雄性和雌性组织中均有所表达,但不同的组织存在着较大的差异 (图 4)。



雌雄间的差异用“*” ($P < 0.05$) 和“**” ($P < 0.01$) 表示,各组织间的差异用标字母法表示 ($P < 0.05$)。VN: 腹部腹神经索; TN: 胸部腹神经索; SN: 食道下神经节; PN: 围食道神经; Br: 脑; Es: 眼柄; Hea: 心脏; Hep: 肝胰腺; St: 胃; FG: 前肠; MG: 中肠; HG: 后肠; AnGl: 触角腺; Mu: 肌肉; Gi: 鳃; Hem: 血; Hy: 皮肤; Te: 精巢; TD: 输精管; AG: 促雄性腺; Ov: 卵巢。The difference between males and females was marked by “*” ($P < 0.05$) and “**” ($P < 0.01$). Differences between tissues are indicated by alphabetical notation ($P < 0.05$). VN: Ventral nerve cord; TN: Thoracic ventral nerve cord; SN: Subesophageal nerve; PN: Periesophageal nerve; Br: Brain; Es: Eyestalk; Hea: Heart; Hep: Hepatopancreas; St: Stomach; FG: Foregut; MG: Midgut; HG: Hindgut; AnGl: Antennary glands; Mu: Muscle; Gi: Gill; Hem: Hemocytes; Hy: Hypodermis; Te: Testis; TD: Testicular ducts; AG: Androgenic gland; Ov: Ovary.

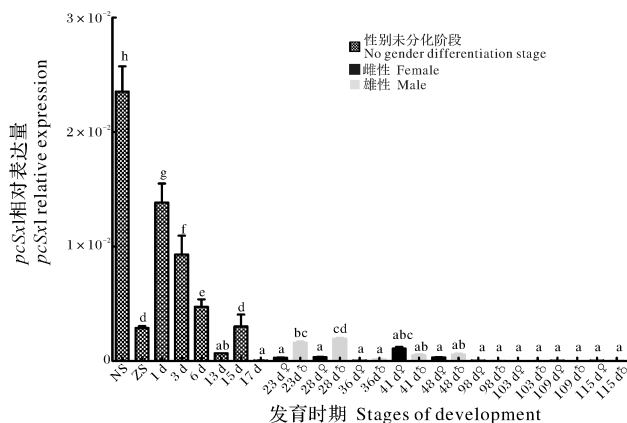
图 4 PcSxl 在成年雌雄克氏原螯虾组织中的表达情况

Fig.4 Expression pattern of PcSxl in adult male and female tissues

从图 4 中可以看出, *PcSxl* 在成年雄性克氏原螯虾的触角腺和鳃中表达量最高, 其次是心脏、中肠、腹部腹神经索、后肠及肌肉组织, 其他各组织 *PcSxl* 表达相对较低, 特别是在眼柄和皮肤中; *PcSxl* 在成年雌性克氏原螯虾的中肠中表达量最高, 其次是前肠、肌肉和卵巢, 而在其他组织中 *PcSxl* 表达相对较低, 尤其是在围食道神经、眼柄和血中。此外, *PcSxl* 在胃中的表达水平不存在雌雄差异; 在雌性的前肠、中肠、皮肤和卵巢中 *PcSxl* 的表达量极显著高于雄性相应组织中 *PcSxl* 的表达量 (图 4); 而在触角腺和鳃及其他组织中, *PcSxl* 在雄性组织中的表达水平要高于雌性相应组织中 *PcSxl* 表达水平。

2.4 克氏原螯虾 *Sxl* 在不同发育时期的表达分析

PcSxl 在不同发育时期的表达模式如图 5 所示, 荧光定量 PCR 的结果显示 *PcSxl* 在所检测的发育时期中都有所表达, 其在蚤状幼体期的表达量达到高峰, 出膜后的 1~6 d *PcSxl* 的表达水平量次之; 并且从出膜后的第 1 天起其表达量整体呈现出下降趋势; 在出膜后第 23 天和第 28 天, 雄性幼虾的 *PcSxl* 表达水平显著高于雌性 *PcSxl* 表达水平。



NS: 无节幼体; ZS: 蚤状幼体; 1~115 d: 出膜后 1~115 d。显著性差异在图中用标字母法表示 ($P < 0.05$)。NS: Nauplius stage; ZS: Zoea stage; 1-115 d: 1-115 days after hatching. The significant differences are indicated by alphabetical notation ($P < 0.05$).

图 5 *PcSxl* 在早期不同发育时期的表达模式

Fig.5 Expression pattern of *PcSxl* in the early stages of development

3 讨论

Sxl 在黑腹果蝇中可以通过性别特异性的剪接对体细胞的性别分化起到调控作用, 但是在其他非

果蝇的物种, 如家蚕、地中海实蝇、中华绒螯蟹中, *Sxl* 在雌雄两性中均有表达, 并且在 mRNA 和蛋白质表达水平上并没有明显的差异性。由此可见, *Sxl* 的雌雄特异性剪接并不是普遍适用于其他非果蝇昆虫^[12-13]。在甲壳动物中虽然有关于在同一物种中 *Sxl* 不同剪接异构体的报道^[7-8], 如在罗氏沼虾中发现 4 种 *Sxl* 异构体, 红螯螯虾中发现 4 种, 中华绒螯蟹和日本沼虾中发现 2 种, 而在南美白对虾中报道有 6 种不同异构体的存在, 但是却还没有关于其存在性别特异性剪接异构体的相关报道。虽然 *Sxl* 在不同的物种中存在着不同的转录异构体以及不同的功能, 但是 *Sxl* 家族蛋白在不同生物体中具有较高的同源性, 均具有 2 个保守的 RRM 结构域^[14-15]。在本研究中, 我们从克氏原螯虾的雄性性腺中一共克隆了 4 种 *PcSxl* cDNA 序列, 预测的氨基酸序列也具有 2 个保守的 RRM 结构域。由于这 4 种转录异构体的 *PcSxl* 有部分相同的序列, 所以它们的 RRM 结构域也是相同的。在甲壳类氨基酸序列比对中发现, 尽管 *Sxl* 家族蛋白在 N-端和 C-端部分没有明显的保守性, 但 RRM 结构域的氨基酸序列都表现出较高的保守性, 这也可以说明虾蟹类处于同一个进化水平, 系统进化树显示聚为一支。

4 种 *PcSxl* 转录异构体 cDNA 的核苷酸序列大小顺序为 $PcSxl\alpha < PcSxl\beta < PcSxl\gamma < PcSxl\delta$, 预测的氨基酸序列大小 $PcSxl\beta < PcSxl\alpha < PcSxl\delta < PcSxl\gamma$ 。 *PcSxl\alpha* 从 755 bp 始到 PolyA 位点的这段序列与另外 3 种转录异构体的序列均不同; *PcSxl\gamma* 的 cDNA 序列不是最长的, 但预测的氨基酸序列是最长的, *PcSxl\beta* 与其相比少了 2 段核苷酸序列而多 1 段 77 bp 核苷酸序列, 而且这 3 段序列不连续; *PcSxl\beta* 多的这段 77 bp 的核苷酸序列靠近于 3' 端, 同时也存在于 *PcSxl\delta* 中, 因此 *PcSxl\delta* 在翻译时提前终止。同样的情况也存在于中华绒螯蟹^[7] 和日本沼虾^[10] 中, 其被认为是一个选择性剪接的内含子, 并且克氏原螯虾中的这段 77 bp 的序列与中华绒螯蟹及日本沼虾相比具有较高的保守性^[13]。虽然 *PcSxl\beta* 和 *PcSxl\delta* 都含有这个选择性剪接内含子, 并使得翻译提前终止, 但是 *PcSxl\beta*、*PcSxl\gamma*、*PcSxl\delta* 都具有 2 个相同的 RRM 结构域。因此推测其仍然具有完整的 RNA 结合蛋白的功能。

克氏原螯虾 *PcSxl* 在成年雄性触角腺的表达

量显著高于雌性的,表现出性别二态性表达。在东方岩石龙虾(*Sagmariasus verreauxi*)的2个性别发育相关基因 *SvTKIR* 和 *SvDmrt1* 的研究中发现,这2个基因在雌雄未成年虾的触角腺中表达水平较高,而在成年虾的触角腺中的表达则表现出性二态性,雌性中的表达水平显著高于雄性^[16]。虾蟹类的触角腺的作用类似于哺乳动物的肾脏,具有排泄和调节渗透压及离子浓度的功能^[17]。有研究表明龙虾的尿液中具有一些特殊的物质,可以传达交配、聚合退敌、划分领地及其他社会行为的化学信号^[18-20]。如果触角腺在克氏原螯虾中参与了这些信号的调节过程,那么也就可以解释 *Sxl* 基因在触角腺中表现出性二态性表达的现象,但目前尚未见相关报道,还需进一步深入研究。

在成年雌雄克氏原螯虾的眼柄中 *PcSxl* 的表达量均较低,这与中华绒螯蟹的 *EsSxl* 在眼柄中的表达情况相似,但是在摘除中华绒螯蟹的眼柄之后, *EsSxl* 在雌性卵巢中的表达量下调,在雄性中出现上调的情况^[7];除此之外, *PcSxl* 在雄性精巢中的表达量要明显低于雌性的卵巢,而在红螯螯虾中 *CqSxls* 的精巢表达量要显著高于雌性卵巢,但其在红螯螯虾中并未表现出性别特异性^[8]。 *PcSxl* 在无节幼体期表达量达到顶峰,但出膜后其表达量逐渐下降;出现性别分化之后,更是表现出性别表达差异。调控雄性性别分化的 *PcIAG* 基因则是恰恰相反,在出现性别分化前表达量都较低,但是在出膜第23天,出现性别分化时,其在雄性中的表达量达到最高^[20]。由此推测,在早期性别发育中, *PcSxl* 可能直接或间接正调控下游的性别分化基因 *PcIAG*, 从而影响克氏原螯虾的性别分化。这些都可以说明克氏原螯虾中 *PcSxl* 与其性别分化相关,但其具体作用机制仍有待进一步的探究与验证。此外,本研究中各转录异构体的表达情况是否存在差异和存在不同的功能亦需要进一步的研究。

参考文献 References

[1] 魏青山. 武汉地区克氏原螯虾的生物学研究[J]. 华中农学院学报, 1985, 4(1): 16-24. WEI Q S. Biological study of *Procambarus clarkii* in Wuhan [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1985, 4(1): 16-24 (in Chinese).

[2] PENALVA L O, SANCHEZ L. RNA binding protein sex-lethal (*Sxl*) and control of *Drosophila* sex determination and

dosage compensation[J]. Microbiology and molecular biology reviews, 2003, 67(3): 343-359.

[3] SCHUTT C, NOTHIGER R. Structure, function and evolution of sex determining systems in Dipteran insects[J]. Development, 2000, 127(4): 667-677.

[4] SÁNCHEZ L. Sex-determining mechanisms in insects[J]. Developmental biology, 2008, 52(7): 837-856.

[5] 俞炎琴. 罗氏沼虾中性别发育相关基因 *Sxl* 和 *Dmrt* 基因的分子特征和功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013. YU Y Q. Molecular characteristics and functions of sex development related genes *Sxl* and *Dmrt* in *Macrobrachium rosenbergii* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013 (in Chinese with English abstract).

[6] ITZIA L C, ALEJANDRA G G, GRACIA G A, et al. Isolation of the sex-determining gene sex-lethal (*Sxl*) in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Boone, 1931) and characterization of its embryogenic, gametogenic, and tissue-specific expression [J]. Gene, 2018, 668: 33-47.

[7] 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.

[8] ZHENG J B, CHENG S, JIA Y Y, et al. Molecular identification and expression profiles of four splice variants of sex-lethal gene in *Cherax quadricarinatus* [J]. Comparative biochemistry and physiology, part B, 2019, 234: 26-33.

[9] LI S, LI F, 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.

[10] 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.

[11] ZHANG Y P, FU H T, QIAO H, et al. Molecular cloning and expression analysis of transformer-2 gene during development in *Macrobrachium nipponense* [J]. J World Aquacult Soc, 2013, 44(3): 338-349.

[12] MEISE M, HILFIKER-KLEINER D, DUBENDORFER A, et al. sex-lethal, the master sex-determining gene in *Drosophila*, is not sex-specifically regulated in *Musca domestica* [J]. Development, 1998, 125(8): 1487-1494.

[13] SACCONI G, PELUSO I, ARTIACO D, et al. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene sex-lethal is structurally conserved, but not sex-specifically regulated [J]. Development, 1998, 125(8): 1495-1500.

[14] SIEVERT V, KUHN S, PAULULAT A, et al. Sequence conservation and expression of the sex-lethal homologue in the fly *Megaselia scalaris* [J]. Genome, 2000, 43(2): 382-390.

- [15] TRAUT W, NIIMI T, IKEO K, et al. Phylogeny of the sex-determining gene sex-lethal in insects[J]. *Genome*, 2006, 49(3): 254-262.
- [16] CHANDLER J C, AIZEN J, FITZGIBBON Q P, et al. Applying the power of transcriptomics: understanding male sexual development in decapod crustacea[J]. *Integrative and comparative biology*, 2016, 56(6): 1144-1156.
- [17] VOGT G. Functional anatomy[M]. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002: 53-151.
- [18] 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.
- [19] AGGIO J, DERBY C D. Chemical communication in lobsters[M]. New York: Springer Science + Business Media, 2011: 239-256.
- [20] SHI L L, HAN S X, FEI J M. Molecular characterization and functional study of insulin-like androgenic gland hormone gene in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 1-18.

Cloning and expression analyses of sex-lethal gene in *Procambarus clarkii*

FEI Jiamin¹, SHI Linlin¹, LI Yanhe^{1,2}

1.College of Fisheries /Key Lab of Freshwater Animal Breeding,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs/

Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction,
Ministry of Education, 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 In order to explore the function and molecular mechanism of sex-lethal gene in *Procambarus clarkii*, four *Sxl* cDNA sequences from *P. clarkii* were obtained using rapid amplification of cDNA ends, and their expression in different tissues and at early developmental stages were detected by quantitative fluorescence PCR. Bioinformatics analyses revealed that *PcSxlβ* and *PcSxlδ* were 77 bp longer than *PcSxlγ*, and the predicted amino acid sequence of *PcSxlβ* and *PcSxlδ* were shorter than that of *PcSxlγ*. The *PcSxl* sequences were highly similar to that of *Cherax quadricarinatus* (75.76%). The analysis of conservative domain showed that all the predicted amino acid sequences of the four transcriptional isomers had two highly conservative RRM domains. The expression analyses showed that *PcSxl* was highly expressed in the antennal glands and gills of adult males, and in the midgut and foregut of adult females, and was significantly higher in the female ovaries than the male testis. During the early developmental period of the crayfish, the expression of the genes was the highest at the nauplius stage, but decreased at the zoea stage; however, the expression level increased at the first day after hatching, and then showed a gradually decreasing trend. The results of this study suggested that *PcSxl* was involved in sexual differentiation in *P. clarkii*.

Keywords *Procambarus clarkii*; sex-lethal gene; sex-determination; sexual-regulated genes; transcription isoform; gene expression; monosex cultivation

(责任编辑:边书京)