

三角帆蚌*KLHL10*基因的特征和表达分析

董赛赛, 崔晓羽, 段胜华, 夏思宇, 刘斐斐, 葛静远, 汪桂玲, 李家乐

Characterization and expression analysis of *KLHL 10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

DONG Saisai, CUI Xiaoyu, DUAN Shenghua, XIA Siyu, LIU Feifei, GE Jingyuan, WANG Guiling, LI Jiale

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200402983>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

三角帆蚌钙网蛋白基因cDNA的分子特征与表达分析

Molecular characterization and expression analysis of calreticulin cDNA from *Hyriopsis cumingii*
水产学报. 2013, 37(5): 679 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38454>

三角帆蚌中*WNT4*基因克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *WNT4* gene in the *Hyriopsis cumingii*
上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 801 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191202894>

三角帆蚌*HcCUBDC*基因cDNA的全长克隆与表达分析

Full-length cDNA cloning and expression analysis of *HcCUBDC* gene from *Hyriopsis cumingii*
水产学报. 2015, 39(9): 1313 <https://doi.org/10.11964/jfc.20150109679>

三角帆蚌热休克蛋白60基因克隆及其表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 60 GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*
水生生物学报. 2014, 38(5): 897 <https://doi.org/10.7541/2014.134>

三角帆蚌热休克蛋白70基因克隆及其表达分析

CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 GENE FROM *HYRIOPSIS CUMINGII*
水生生物学报. 2017, 41(1): 50 <https://doi.org/10.7541/2017.7>

三角帆蚌CAT基因cDNA全长克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of CAT gene from *Hyriopsis cumingii*
水产学报. 2011, 35(4): 481 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2011.17149>

文章编号: 1674-5566(2021)03-0389-10

DOI:10.12024/jsou.20200402983

三角帆蚌 *KLHL10* 基因的特征和表达分析

董赛赛¹, 崔晓羽¹, 段胜华¹, 夏思宇¹, 刘斐斐¹, 葛静远¹, 汪桂玲^{1,2,3}, 李家乐^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为了探究 *KLHL10* 基因在三角帆蚌性别分化中的作用, 利用 RACE (Rapid-amplification of cDNA ends) 克隆了其 cDNA 全长, 使用实时荧光定量分析比较其在 6 个不同组织 (性腺、鳃、肝胰腺、斧足、闭壳肌、外套膜) 早期发育阶段 (1~8 月龄) 性腺及 12、24、36 月龄雌雄性腺中表达水平的差异, 运用 RNA 干扰 (RNAi) 对其功能进行初步探究。结果显示 *KLHL10* 基因 cDNA 全长为 2 361 bp, 其中 5' 非编码区长 93 bp, 3' 非编码区长 447 bp, 开放阅读框 (ORF 区) 长 1 821 bp, 编码 606 个氨基酸; qRT-PCR 结果显示 *KLHL10* 基因在精巢中高表达; 早期发育阶段在 6 月龄时表达量最高; 12、24、36 月龄的表达结果显示, *KLHL10* 基因在精巢中的表达量均高于同时期在卵巢中的表达量 ($P < 0.05$)。同时, 设计 *KLHL10* 基因的 3 条 dsRNA 干扰链, 结果显示 RNA 干扰能有效减少 *KLHL10* 基因在性腺组织的表达量。根据以上结果推测 *KLHL10* 基因在三角帆蚌中是雄性相关基因, 其可能参与三角帆蚌的性别分化与精巢发育。

关键词: 三角帆蚌; *KLHL10* 基因; 性别分化; qRT-PCR; RNA 干扰

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国淡水珍珠行业的主要育珠品种之一, 在人工养殖的淡水蚌中, 三角帆蚌的育珠量占 80% 以上^[1]。三角帆蚌所产珍珠珠质细腻光滑、色泽鲜艳、形状较圆^[2-3], 但是三角帆蚌的育珠能力与性别相关, 雄性三角帆蚌培育的珍珠在总质量、直径、色泽等方面均优于雌性三角帆蚌所育珍珠^[4]。目前, 三角帆蚌性别决定和性别分化基因尚未发现, 性别决定机制还不清楚, 所以研究相关基因以实现单性化养殖至关重要。

KLHL10 是大型 BTB (Broad-complex, Tramtrack, and Bric-a-brac) kelch 蛋白家族的成员, 又称为 BBK (BTB, BACK 和 Kelch) 蛋白家族。*KLHL10* 基因的特征是氨基末端的 BTB/POZ 结构域和羧基末端的 6 个 kelch 重复序列^[5-6]。在哺乳动物中, 其对受精、雄性生殖器形态发生、雄性生殖腺发育、精细胞的发展至关重要^[7]。小鼠中,

KLHL10 蛋白在生长和成熟的精子细胞中表达, 且 *KLHL10* 一个等位基因的突变会导致雄性小鼠不育, 因为基因突变使精子形成被破坏, 精子成熟不同步, 晚期精子数量减少^[8-10]。在软体动物方面, 已证明 *KLHL10* 基因与雄性玛雅章鱼 (*Octopus maya*) 的生殖能力有关^[11]。但是 *KLHL10* 基因的功能在其他贝类尚未报道。

RNAi 近年来普遍应用于基因功能探究和信号转导通路等方面^[12-13]。目前已广泛应用于贝类基因功能的研究^[14-16], 但是不同干扰链的干扰效率存在很大的差异^[17]。本研究初次克隆了三角帆蚌 *KLHL10* 基因, 通过荧光定量技术 (qRT-PCR) 检测了其在多个组织及不同年龄性腺组织中的表达量, 同时利用干扰技术对 *KLHL10* 在性腺中的功能进行初探, 为探索 *KLHL10* 基因在三角帆蚌性别分化和决定中的功能和作用做准备。

收稿日期: 2020-04-03 修回日期: 2020-07-08

基金项目: 国家自然科学基金(31772835); 国家重点研发计划(2018YFD0901406)

作者简介: 董赛赛(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为三角帆蚌性别决定和分化。E-mail: 1490910050@qq.com

通信作者: 汪桂玲, E-mail: glwang@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

1~8 月龄和 12、24、36 月龄健康三角帆蚌取自浙江省金华市武义伟明水产有限公司养殖基地,带回实验室后取样,取 24 月龄三角帆蚌的性腺、鳃、闭壳肌、斧足、外套膜、肝胰腺,及 1~8 月龄、12 月龄和 36 月龄三角帆蚌的性腺组织,立即保存在液氮中, -80 °C 冰箱保存备用,每组 3 个重复。

实验所用引物序列合成及测序均由生工生物技术(上海)有限公司完成,见表 1。

1.2 三角帆蚌总 RNA 提取和 *KLHL10* 基因全长克隆

利用 TRIZOL 法提取 24 月龄三角帆蚌各组织的 RNA,用 NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, US) 检查 RNA 的纯度,再通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性,根据 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase 试剂盒反转成 cDNA 第一条链作为克隆 3' 的模板。根据已知序列设计 *KLHL10* 基因 3' RACE 引物 KLHL10-3'-outer 和 KLHL10-3'-inner(表 1),进行巢式 PCR 反应。以 RACE cDNA 第一链作为模板,用 KLHL10-3'-outer 引物和 3' RACE-outer 引物进行第 1 轮 PCR,然后以第 1 轮 PCR 产物作为模板,用 KLHL10-3'-inner 引物和 3' RACE-inner 引物进行第 2 轮 PCR。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收,连接到 pMD® 19-T 载体中,转化至感受态大肠杆菌 DH5 α ,蓝白斑筛选后挑选白色菌株进行摇菌、送测。

1.3 *KLHL10* 基因生物信息学分析

通过 NCBI 的 ORF Finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获得氨基酸序列的开放阅读框预测;通过 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将所得到的基因序列与同源物种进行核苷酸和氨基酸序列相似性分析;通过 SignalP 4.1 Server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽;通过 TMHMM Server v2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜结构;通过 NetPhos 3.1 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 查找磷酸化位点。通过 ProtParam 程序 (<https://web.expasy.org/>)

<http://www.shhydxxb.com>

(<http://www.expasy.org/>) 预测蛋白质的物理化学参数;SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质的二级结构;SWISS-MODEL 程序 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构;DNAMAN 软件将克隆的 cDNA 全长和氨基酸序列进行整理分析;Bioedit 软件进行多重序列比对;MEGA 7.0 软件进行系统进化树的构建,Bootstrap 重复 1 000 次计算各物种间的置信值。

1.4 荧光定量 PCR 分析

将上述所取组织利用 TRIZOL 法提取 RNA,并按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa, 日本)反转,将 3 个平行等量混合,稀释 5 倍,以此作为实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的模板,反应体系如下:5 × gDNA Eraser Buffer 5 μ L, gDNA Eraser 1 μ L,总 RNA 适量(500 ng),RNase Free dH₂O 补足至 10 μ L,42 °C 反应 2 min;在上述反应液中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L,RT Primer Mix 4 μ L,5 × PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Free dH₂O 1 μ L,37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 保存,使用前稀释 5 倍。根据 *KLHL10* 基因的 ORF 区设计荧光定量的引物,以 EF1- α 作为内参,反应体系(20 μ L):2 × TB Green Premix Ex Taq(TaKaRa) 10 μ L,引物各 0.6 μ L,cDNA 模板 1.6 μ L,ddH₂O 7.2 μ L,每个样品 3 个重复。用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法计算相对表达量,用 SPSS 18.0 软件进行差异显著分析,用 SigmaPlot 12.3 作图。

1.5 RNA 干扰

根据三角帆蚌 *KLHL10* 基因序列用 Prime Prime 5 设计 3 对引物,长 200~500 bp,在每对正反引物前加上 T7 序列(表 1),发送至生工生物(上海)工程有限公司合成。dsRNA 合成步骤:(1)通过普通 PCR 扩增所需探针片段,将产物切胶回收并进行纯化,测定其浓度,浓度符合要求者将作为后续的体外转录反应模板。(2)体外转录体系为模板 RNA 适量(共 1 μ g),5 × T7 Transcription 4 μ L,10 mmol/L NTP Mix 8 μ L,T7 Transcription E-Mix 2 μ L, RNase Free dH₂O 补足至 20 μ L,PCR 仪 37 °C 孵育 2 h。(3)去除 DNA,退火形成双链 RNA,并去除单链 RNA。取相同浓度的 RNA 混匀,置于 PCR 仪中 70 °C、10 min,随后室温放置 20 min,然后每 20 μ L 体系中加入 1 μ L RNase Solution 和 1 μ L DNase I,PCR 仪 37

℃ 孵育 30 min。(4)纯化双链 RNA。上述液体中加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠和相同体积的异丙醇,混匀,冰浴 5 min,高速离心 10 min;去上清后加入 0.5 mL 的 70% 乙醇洗涤;去除乙醇,室温风干 15 min,将纯化后的 dsRNA 用无酶水溶解,稀释至一定浓度后, -80 ℃ 冰箱保存。将 3 条干扰链分别命名为 G1、G2、G3。

干扰实验所用 12 月龄三角帆蚌在实验室暂

养 7 d 后开始注射,分为 4 组,空白对照组、干扰组 1(G1)、干扰组 2(G2)和干扰组 3(G3),每组 10 只,分别置于箱体中。将 3 条干扰链均稀释为 120 ng/μL,实验组每只蚌注射 100 μL 干扰链,注射部位为闭壳肌,7 d 后进行性腺组织取样,并提取 RNA。将反转后的 cDNA 进行荧光定量。每组 3 只三角帆蚌 RNA 进行混样。

表 1 引物名称及序列

Tab.1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5' to 3')	目的 Purpose
KLHL10-1F	CGCTGGATAGTTTGTGACGC	片段序列验证
KLHL10-1R	TCAGTGCCATTGAAGCCTCC	
KLHL10-2F	AGAATGAACACTGGGGAACG	
KLHL10-2R	TTGCTGAGGCGGTGCTACGG	
KLHL10-3F	ATGTCAACGGTTTGGTCAAA	
KLHL10-3R	TATCTATCGCTGCCGTCCG	
KLHL10-3'-outer	CCTGCCAAATGTTCAAGACT	3' RACE 克隆
3' RACE-outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
KLHL10-3'-inner	ACAAGCAAGAGGACAACAAG	
3' RACE-inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	
Q-KLHL10-F	TATGACGGCCATAACAGGCA	荧光定量引物
Q-KLHL10-R	CGGCGTTATTCAAGCACTCA	
EFl-αF	GGAACTTCCCAGGCAGACTGTGC	内参引物
EFl-αR	TCAAACGGGCCGAGAGAAT	
G1-F	TAATACGACTCACTATAGGGGGAACGGCAGCGATAGATAA	干扰链 G1 引物
G1-R	TAATACGACTCACTATAGGGTAGGGCTGAGGAACTCGCAT	
G2-F	TAATACGACTCACTATAGGGATCCGCTTGGTCTCCTTAC	干扰链 G2 引物
G2-R	TAATACGACTCACTATAGGGAAGGGCGTCACAACTATCC	
G3-F	TAATACGACTCACTATAGGGATAGTTTGTGACGCCCTTGA	干扰链 G3 引物
G3-R	TAATACGACTCACTATAGGGCTCCAAGAGCGTAAATGTG	

2 结果

2.1 *KLHL10* 基因 cDNA 全长和氨基酸序列分析

本实验克隆获得了三角帆蚌 *KLHL10* 基因 cDNA 全长,为 2 361 bp(登录号:MT257263),包括 93 bp 的 5'非编码区(5'-UTR)、447 bp 的 3'非编码区(3'-UTR)和 1 821 bp 的 ORF 区,编码 606 个氨基酸(图 1)。评估该蛋白质分子质量约为 69.3 ku,理论等电点(PI)为 5.20,不具备信号肽和跨膜结构,磷酸化位点分析发现 17 个丝氨酸

(S)磷酸化位点,20 个苏氨酸(T)磷酸化位点,11 个酪氨酸(Y)磷酸化位点。利用 SMART 进行结构域分析发现 *KLHL10* 基因具有 BTB/POZ 结构域(37~134 位氨基酸)、BACK 结构域(139~242 位氨基酸)和 6 个 kelch(290~572 位氨基酸)重复序列(图 2a)。利用 SWISS-MODEL 预测了 *KLHL10* 基因的蛋白三级结构(图 2b),QMEAN 为 -3.56,说明该蛋白与模板蛋白匹配度较高。其中 α 螺旋占 27%,β 折叠占 32%,无规则卷曲为 12%。

```

1 taggggtatctcttgcaatgggagatttggatgaaagcggacagtaaaacatgttta
61 aggtggaagaaaaaaaataatgttgcagaaatgtagatggatggatgaccactct
1 M E M D W D D H S
121 CGGGATAAAAATTTGCTGGAGAAGAAGTTCAGCACTCAAGCTGCATNACTAATGA
R D K N L L E K K F S T Q A C N I L N E
181 CTTGAAAAACAGGTCAACTATGATGATGATTAATCAAGGTTGAAAATCAGAAATTC
L R K T G Q L C D A I I K V E N Q E F F
241 ATACATCGGCCATAATGTCGCATGACGCCCTTATTTAGGGCTTATTTACTAAGCA
H R A I M S A C S P Y F R A L F T N E
50 ATGTTTAACACAGATCGCAGAGAAATAAATTCAGGTGTCTCTGCAGATATGATGA
M E F N T D R R E I I F E G V S A B M M K
70 TTGATCATCGAGTTTCTTACACACTGAGTGCATGTTACACAAGAAATGTGGACAG
L I I E F A Y T R E L H Y T Q E N Y E Q
90 CTTTACCTGTCAGATTCATGTCACCGTTCACCGTTCGCAAGCTGTGTGATTTT
L L P A A D Q F H V N G L V K A C C D F
110 CTGGCTCAGAGATATGCGCAGAAAACCTGATGGAATTTACAATTCCTTGACAGTAT
L A S E I C A E N C I G I Y K F S C T Y
130 TTTTGCACAATTTAGAAAAGGCCACTTTTAGGTATCTGATGCAGAACTTACGGATGT
F C H N L E R A T F R Y L M Q N F T D V
150 TACTCCACAGCACGAGTATCTGCAAGCTTACCGTTCAGGATGAGTATGCAATTTTCA
Y S N S E Y L Q L T V D E V C S F L A
170 TCAGTGAACATGATGTAATAAAGTGAAGAAATGTTTGTGATGCATTTTGAATGGAT
S D E L L N V K N E E I V F D A I L R W I
190 GATATGATCCAGAAAGAAAGAAATATATAGCTAGATTAATGAAAGCCATCCGCTT
D Y D P E R R K N Y I A R L L K T I R L
210 GGTCCTTACTACTCAATTTTGTGAGAAAATAAACCCTTCTTGTGGAGAC
G L L T T Q Y F V E K V K T H P Y V R D
230 AGTGATGCATGCAGCCCTTATTCAGAACCTTAAAGTTCCTTACGACTTGGATATG
S D A C K P V I I E T L K F L Y D L D M
250 GATGAAGAAAAGAAAGTGGATTCGAAATACCCCTTCTGCTGACCCCGGTGACAGACGAA
D E E K E V D L N N P L A R P R V P H E
270 ATTCCTTCTGTTGGAGGATGGAAGCGAGATGCGCAACAACATTTAGAAAGATAT
I L L F V G W S G G S P T N I V E T Y
290 GATCAAGGGCAGATCGCTGGAATGTTGGAAGCCCTTGTGATGAGCGCCACGAGCCTAC
D T R A D R W I V C D A L D A G A R A Y
310 CACGGAACGGCAGCAGATAGATAAATGATTCATGCTCAAGCGGCTTGTGAGCGTGA
H G T A A I D K L I Y V I G G F D G V E
330 TACTTCAATAGCGTCAGATGTTGATCCCGTCAGCAAGACCTGGTCAGAGGTGGCACCA
Y F N S V R C Y D P V S K T W S E V A P
350 ATGAATGCTAAGAGATGTTATGTTAGCGTGGCGTTCCTGCGGAGTGTTCACGCCATG
M N A K R C Y V S V A V L D G M V Y A M
370 GCGCGCTATGACGGCATAACAGCGCAAGATGTCAGAGAGATACACACATAAAAAGAA
G G V D G H N R Q N T A E R Y T P E K N
390 CAATGGATTTACATCAACCAATGAATTAACAGCGAGTGTGAGGCTCAGCCCTA
Q W S Y I Q P M N Y Q R S D A S S A L
410 CAAGGAAAATTCATCTTTGGAGGCTTCAATGGCAGTGTGCTGAATAACCGCGAA
Q G K I Y I C G G F N G T E C L N N A E
430 ATGTATGATCGGCTATCAACCAATGGCAATGATCGCCCAATCGCAACAGCGCAAGT
M Y D P A I N Q W T M I A P M R N R R S
450 GGCGTGGCGTAAATGGCTACAGAGCACATTTACGCTTGTGAGGTTTAAATGGGATA
G V G Y M A Y R D H I Y A L G G F N G I
470 ACCAGAAATGAACACTGGGGAACGATACAGCCCGTGCAGAAAAGCGTGGCAGACCTCC
T R M N T G E R Y S P V T K A W O T L F
490 GAAATGTACAACCTCGAAGCAATTTTGGATCGAAGTCAATGATGACATGATCTTTC
E M Y N P R S N F A I E V I D D M I F A
510 ATGGTGGATCAATGGAGTCAACCACTATCTTCAACGCTGGAATGCTATGATGGACTACA
I G G F N G V T T I F N V E C Y D G T T
530 GATGAATGGATGATGCCACAGACATGAACCTTATCGAAGTGTCTCAGCGCATGCGGTG
D E W Y D A T A D M N L Y R S A L S A C V
550 GTGACAGGCTGCGCAATGTTCAAGACTACATCCATAAAGATAGAGA CAAGCAAGAGGAC
V T G L P N V Q D Y I H K D R D K Q E D
570 AACAGAAAAGCGCTCTTCAACGCGCGCTGACACGGCTCAGCAAAACCTGACAAA
N K R S N A A V P P P Q Q N *
590 ctatgcaatgttaaatgttctataatattttacctctcgtttccatcctcagta
1921 tegagattgcgcgaatattgaaacggccacatgtaaacctgcaaacctcctatgacattcc
2041 tagctatctgtttcaecagtaaatattgtttttttatgctaaatatttttttttcattt
2101 tcactattctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
2161 tttattgtctcaggctcctaatgttttctctctctctctctctctctctctctctctctct
2221 ctaccttacttggaaaataatcagaaaacttttataaatgaaaactatctacttcttatt
2281 tgaccctgacacaatgattcttctctctctctctctctctctctctctctctctctctct
2341 acaaaaacttaaaaaaa

```

图1 KLHL10 cDNA

完整序列及编码的氨基酸序列

Fig. 1 Full cDNA length and encoded amino acid sequence of KLHL10 gene

2.2 KLHL10 基因系统发育分析

利用 NCBI 数据库将三角帆蚌的 KLHL10 氨基酸序列与其他物种的 KLHL10 氨基酸序列比对显示,三角帆蚌 KLHL10 与智人(Homo sapiens)、小鼠(Mus musculus)的同源性分别为 55.57% 和 55.41%,与美洲牡蛎(Crassostrea virginica)、长牡

蛎(Crassostrea gigas)、虾夷扇贝(Mizuhopecten yessoensis)的同源性分别为 75.00%、75.00% 和 69.98%。通过 BioEdit 进行多序列比对,发现三角帆蚌 KLHL10 基因与其他 9 个物种的结构域相似度较高(图 3),表明 KLHL10 基因在进化过程中相对保守。

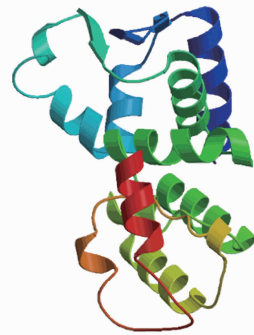
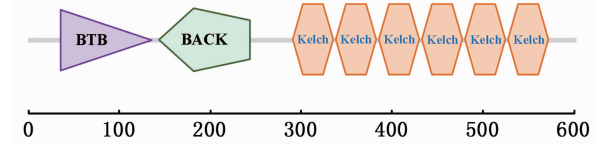


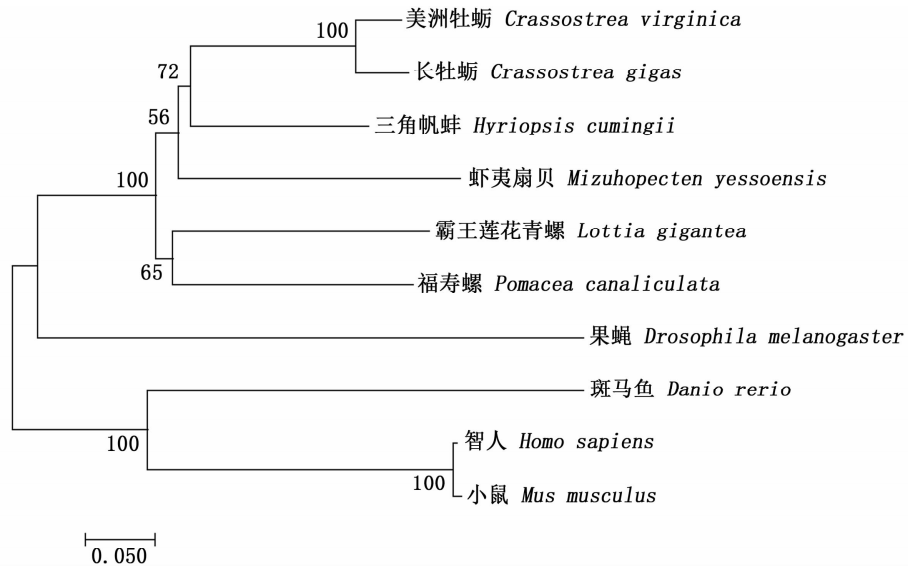
图2 结构预测

Fig. 2 Predicted structures

采用 MEGA 7.0 软件,以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,进化树分为两大支,脊椎动物为一支,无脊椎动物为一支。其中,无脊椎动物中三角帆蚌与其他贝类聚为一支,果蝇单独为一支,三角帆蚌的 KLHL10 基因与美洲牡蛎和长牡蛎亲缘关系较近(图 4)。

2.3 KLHL10 基因在不同时期和不同组织中的表达分析

以 EFl-α 为内参,通过实时荧光定量 PCR 检测 KLHL10 基因在 24 月龄三角帆蚌性腺、鳃、闭壳肌、外套膜、斧足和胰腺 6 个组织,1~8 月龄性腺以及 1、2、3 龄雌雄性腺中的表达情况。结果显示, KLHL10 基因在雌雄 6 个组织中均有表达,在精巢中的表达量最高,且显著高于其他组织(P < 0.01),见图 5;幼龄时期的结果显示, KLHL10 基因在三角帆蚌 6 月龄时表达量最高(图 6);在 12、24、36 月龄雌雄性腺中, KLHL10 基因在精巢中的表达量均高于同龄卵巢中的表达量,且 24 月龄时的表达量最高(图 7)。

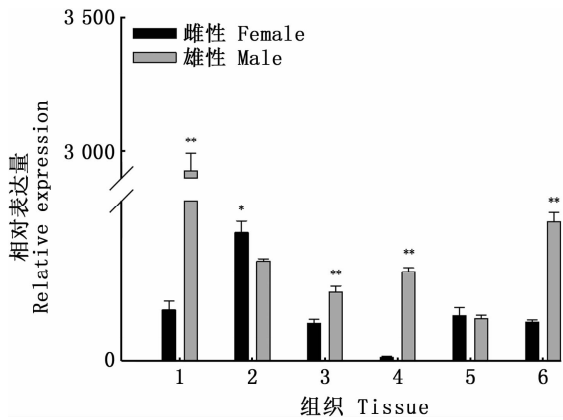


基于 MEGA 7.0 使用 NJ 法构建, 节点上的数字表示重复 1 000 次的 Bootstrap 检验置信值。

The tree was constructed by MEGA 7.0 using the neighbour-joining method with 1 000 Bootstrap repeats.

图 4 三角帆蚌与其他物种 KLHL10 蛋白质进化树

Fig. 4 Phylogenetic analysis of KLHL10 protein between *H. cumingii* and others

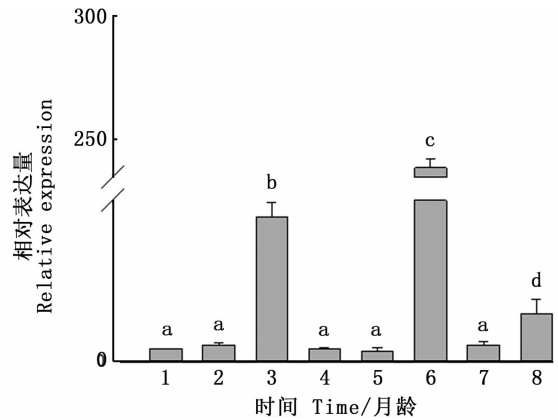


1. 性腺; 2. 鳃; 3. 外套膜; 4. 斧足; 5. 闭壳肌; 6. 肝胰腺; * 表示雌雄间存在显著性差异 (* . $P < 0.05$; * . $P < 0.01$)。

1. Gonad; 2. Gill; 3. Mantle; 4. Foot; 5. Adductor; 6. Hepatopancreas; Significant differences are indicated by asterisks (* . $P < 0.05$; * . $P < 0.01$).

图 5 KLHL10 基因在雌雄各组织中的表达

Fig. 5 Expression of KLHL10 in various tissues of female and male adults

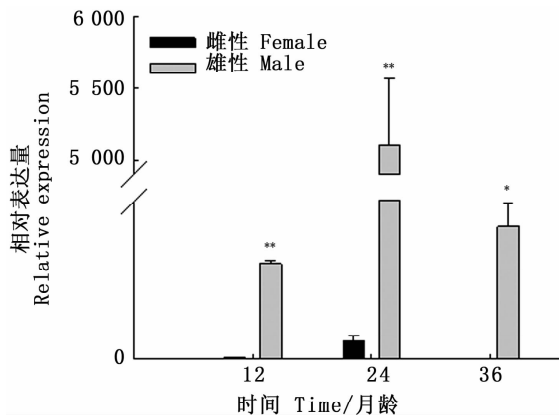


不同字母(a, b, c, d)表示性腺不同发育时期表达存在显著性差异($P < 0.05$), 标有相同字母表示组间无显著性差异。

Different letters (a, b, c, d) indicate significant difference in expression of gonads at different developmental stages($P < 0.05$), identical letters indicate no significant difference between groups.

图 6 KLHL10 基因在早期(1~8 月龄)性腺组织中的表达

Fig. 6 Expression of KLHL10 in gonads at early stage



* 表示雌雄间存在显著性差异 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

Significant differences are indicated by asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

图7 *KLHL10* 基因在 12、24、36 月龄雌雄性腺中的相对表达

Fig. 7 Relative expression of *KLHL10* in female and male gonads at 12-, 24-, and 36-month-old

2.4 三条 dsRNA 的干扰结果

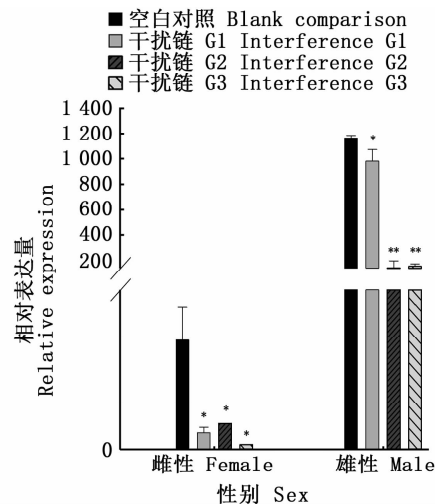
qRT-PCR 检测干扰后三角帆蚌性腺组织中 *KLHL10* 基因 mRNA 的表达量,结果(图 8)显示本实验合成的 3 条干扰链均起到了一定的干扰作用。SPSS 分析结果显示:在雌性三角帆蚌中,G1、G2 和 G3 干扰后 *KLHL10* 基因 mRNA 的表达量与空白组差异显著($P < 0.05$);在雄性三角帆蚌中,G1 干扰后 *KLHL10* 基因的表达量与空白组差异显著($P < 0.05$),G2 和 G3 与空白组的比较结果为差异极显著($P < 0.01$);3 条干扰链对雌性三角帆蚌的干扰率分别为 84.6%、76.2% 和 95.8%,对雄性三角帆蚌的干扰率分别为 15.7%、87.7% 和 86.7%。

3 讨论

本实验首次克隆了三角帆蚌 *KLHL10* 基因的 cDNA 全长序列,包含 1 个长为 606 个氨基酸的 ORF 区。蛋白质结构预测显示其含有 BTB 蛋白家族特有的 BTB/POZ 结构域和 kelch 重复序列,多序列比对结果表明三角帆蚌 *KLHL10* 基因的氨基酸序列与其他物种相似度较高,特别是与美洲牡蛎等软体动物相似度更高,证明 *KLHL10* 基因在进化过程中高度保守,也暗示 *KLHL10* 基因在软体动物中的功能可能与脊椎动物相似。

BBK 蛋白家族是 BTB 蛋白家族的一大成员,

首先在果蝇中发现,含有 BTB/POZ 结构域,参与多种生物学过程,例如迁移,细胞骨架排列,细胞形态调节,蛋白质泛素化和基因表达^[18-21]。目前关于 *KLHL10* 基因的研究并不多,大多数是关于其 BTB/POZ 结构域的研究,功能性研究较少^[22-25]。文献[26]表明,*KLHL10* 基因与精子息息相关,在人类中,*KLHL10* 基因是生殖细胞特异性基因,男性不育往往伴随着 *KLHL10* 基因的错误和剪切突变。同时,*KLHL10* 基因在小鼠的精子延长分化过程中也具有重要作用^[27]。在斑点乌鳢中也已证明 *KLHL10* 基因是精子发育相关基因^[28]。在果蝇中也发现 *KLHL10* 蛋白通过与 Cullin3 泛素化作用激活精子发育所需的半胱天冬酶^[29]。



* 表示与对照组存在显著性差异 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

Significant differences are indicated by asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

图8 RNA 干扰后 *KLHL10* 基因在雌雄性腺组织中的相对表达

Fig. 8 Relative expression of *KLHL10* in female and male gonad tissues after RNA interference

本实验利用 qRT-PCR 检测 *KLHL10* 基因在三角帆蚌成熟个体中的表达情况,结果显示其在性腺、鳃、闭壳肌、斧足、外套膜和肝胰腺中均有表达,除了在精巢中特异性高表达外,在其他组织中均是微量表达。而 12、24、36 月龄时期,*KLHL10* 基因在精巢中的表达量先升后降,其中 12 月龄三角帆蚌性腺处于增殖期,24 月龄时期性腺处于成熟生长阶段,此时期性腺组织由原始性腺细胞开始转化为原始生殖细胞,36 月龄时期

性腺发育完全成熟,具有大量成熟可排放的生殖细胞^[30]。*KLHL10* 基因在 12 月龄到 24 月龄精巢中表达量升高,表明 *KLHL10* 基因可能参与三角帆蚌性腺的增殖发育,同时 *KLHL10* 基因在 12、24、36 月龄精巢中高表达,推测 *KLHL10* 基因是雄性相关基因,并参与精巢和生殖细胞发育。同时,幼龄阶段 *KLHL10* 基因的表达结果显示,其在 6 月龄时期高表达,而三角帆蚌在 5 月龄开始性别分化^[31],由此猜测 *KLHL10* 基因除了参与精巢发育外,还参与三角帆蚌性别分化。由于 *KLHL10* 基因相关功能研究文献较少,此次实验主要基于基因表达分析,其在三角帆蚌中的功能值得进一步深究。

通过 RNA 干扰发现不同的干扰链对同 1 个基因的干扰效果有所不同。本实验中,3 条干扰链 G1、G2 和 G3 对雌性三角帆蚌的干扰率分别为 84.6%、76.2% 和 95.8%,对雄性三角帆蚌的干扰率分别为 15.7%、87.7% 和 86.7%。其中,干扰链 G3 在雌雄性腺中的干扰率均在 80% 以上,表明干扰链 G3 对三角帆蚌 *KLHL10* 基因具有明显的干扰效果,此链将用于后续研究 *KLHL10* 基因在三角帆蚌性腺发育中的作用。本实验为进一步研究三角帆蚌的性别分化和性别决定相关基因及机制提供一定参考价值。

参考文献:

- [1] 汪桂玲,白志毅,刘晓军,等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.
WANG G L, BAI Z Y, LIU X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627.
- [2] 姜琦,白志毅,孙朝虎. 三角帆蚌所育不同颜色珍珠及其相关组织金属元素种类和含量差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(6): 882-889.
JIANG Q, BAI Z Y, SUN C H. Analysis of metallic element types and contents in pearls of different colors and their related tissues in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2019, 28(6): 882-889.
- [3] ZHAO Y C, BAI Z Y, FU L L, et al. Comparison of growth and pearl production in males and females of the freshwater mussel, *Hyriopsis cumingii*, in China [J]. Aquaculture International, 2013, 21(6): 1301-1310.
- [4] 李西雷,李卿青,朱庭耀,等. 添加类胡萝卜素对三角帆蚌总类胡萝卜素含量及贝壳珍珠质颜色的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(4): 477-486.
LI X L, LI Q Q, ZHU T Y, et al. Effect of dietary carotenoid on total carotenoids content and shell color in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2018, 27(4): 477-486.
- [5] YANG Z F, LI Q, MA X, et al. Mutation analysis in Chinese families with autosomal dominant hereditary cataracts [J]. Current Eye Research, 2015, 40(12): 1225-1231.
- [6] ADAMS J, KELSO R, COOLEY L. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function [J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(1): 17-24.
- [7] STOGIOS P J, DOWNS G S, JAUHAL J J S, et al. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins [J]. Genome Biology, 2005, 6(10): R82.
- [8] ROBINSON D N, COOLEY L. *Drosophila* kelch is an oligomeric ring canal actin organizer [J]. Journal of Cell Biology, 1997, 138(4): 799-810.
- [9] 赵丽. MIJ 大鼠 *Klhl10*、*Insl3*、*Acr*、*Zmynd15* 基因的克隆与序列分析[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
ZHAO L. Cloning and analysis of *Klhl10*, *Insl3*, *Acr* and *Zmynd15* genes in MIJ rats [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.
- [10] YAN W, MA L, BURNS K H, et al. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(20): 7793-7798.
- [11] LÓPEZ-GALINDO L, JUÁREZ O E, LARIOS-SORIANO E, et al. Transcriptomic analysis reveals insights on male infertility in *Octopus maya* under chronic thermal stress [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 9: 1920.
- [12] BOSHER J M, LABOUESSE M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog [J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(2): E31-E36.
- [13] 谢东昌. 斑节对虾 *Akirin* 基因的分子克隆及免疫功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
XIE D C. Molecular cloning and immunological characterization of *Akirin* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [14] FABIoux C, CORPOREAU C, QUILLIEN V, et al. *In vivo* RNA interference in oyster-vasa silencing inhibits germ cell development [J]. The FEBS Journal, 2009, 276(9): 2566-2573.
- [15] 王芹,汪桂玲,陈亚,等. RNA 干扰沉默三角帆蚌 *HcCa3* 基因对贝类矿化作用的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 741-747.
WANG Q, WANG G L, CHEN Y, et al. Effect of silencing *HcCa3* gene in *Hyriopsis cumingii* by RNA interference on mineralization of shellfish [J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(2): 741-747.
- [16] JIN C, REN H Y, PU J W, et al. Identification of naere matrix protein genes *hic14* and *hic19* and their roles in crystal growth and pearl formation in the mussel *Hyriopsis cumingii* [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2019, 66(4): 545-554.

- [17] BARRETO F S, SCHOVILLE S D, BURTON R S. Reverse genetics in the tide pool: knock-down of target gene expression via RNA interference in the copepod *Tigriopus californicus* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15 (4): 868-879.
- [18] HARRISON S D, TRAVERS A A. The tramtrack gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the ftz transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern [J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9 (1): 207-216.
- [19] GODT D, COUDERC J L, CRAMTON S E, et al. Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: *bric à brac* is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of the tarsus [J]. *Development*, 1993, 119 (3): 799-812.
- [20] COUDERC J L, GODT D, ZOLLMAN S, et al. The *bric à brac* locus consists of two paralogous genes encoding BTB/POZ domain proteins and acts as a homeotic and morphogenetic regulator of imaginal development in *Drosophila* [J]. *Development*, 2002, 129 (10): 2419-2433.
- [21] LÜHRIG S, KOLB S, MELLIES N, et al. The novel BTB-kelch protein, KBTBD8, is located in the Golgi apparatus and translocates to the spindle apparatus during mitosis [J]. *Cell Division*, 2013, 8 (1): 3.
- [22] WANG S H, ZHENG H L, ESAKI Y, et al. Cullin3 is a KLHL10-interacting protein preferentially expressed during late spermiogenesis [J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74 (1): 102-108.
- [23] PINTARD L, WILLEMS A, PETER M. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family [J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23 (8): 1681-1687.
- [24] PALLETT M A, REN H W, ZHANG R Y, et al. Vaccinia virus BBK E3 ligase adaptor A55 targets importin-dependent NF- κ B activation and inhibits CD8 + T-Cell memory [J]. *Journal of Virology*, 2019, 93 (10): e00051-19.
- [25] STOGIOS P J, PRIVE G G. The BACK domain in BTB-kelch proteins [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29 (12): 634-637.
- [26] YATSENKO A N, ROY A, CHEN R H, et al. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: *KLHL10* mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization [J]. *Human Molecular Genetics*, 2006, 15 (23): 3411-3419.
- [27] HONDA S, MIKI Y, MIYAMOTO Y, et al. Oocyte-specific gene *Oog1* suppresses the expression of spermatogenesis-specific genes in oocytes [J]. *The Journal of Reproduction and Development*, 2018, 64 (4): 297-301.
- [28] ROY A, BASAK R, RAI U. *De novo* sequencing and comparative analysis of testicular transcriptome from different reproductive phases in freshwater spotted snakehead *Channa punctatus* [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (3): e0173178.
- [29] ARAMA E, BADER M, RIECKHOF E G, et al. A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in *Drosophila* [J]. *PLoS Biology*, 2007, 5 (10): e251.
- [30] 潘彬斌. 池养三角帆蚌性腺发育组织学研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- PAN B B. Histological study on the gonad development of *Hyriopsis cumingii* cultured in the pond [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2010.
- [31] 薛婷. 淡水珍珠蚌 DUI 发生及性腺发育研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- XUE T. Study on DUI occurring and gonad development of freshwater pearl mussels [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

Characterization and expression analysis of *KLHL10* gene in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*

DONG Saisai¹, CUI Xiaoyu¹, DUAN Shenghua¹, XIA Siyu¹, LIU Feifei¹, GE Jingyuan¹, WANG Guiling^{1,2,3}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to investigate the role of the *KLHL10* gene in the sex development of *Hyriopsis cumingii*, the full length of its cDNA was cloned using RACE, and *KLHL10* expression levels in six tissues (gonad, gill, adductor muscle, foot, mantle, and hepatopancreas) were determined. Further, the quantitative real-time PCR was performed to compare expressions levels between 1-8 months of age and 12-, 24-, and 36-month-old *H. cumingii*, and its function was explored using RNA interference. The results showed that the full length of the *KLHL10* gene was 2 361 bp, and the 5' non-coding region was 93 bp, the 3' non-coding region was 447 bp, and the open reading frame was 1 821 bp which encoded 606 amino acids. qRT-PCR results showed that the gene was highly expressed in the testis, and was expressed at the highest level at 6 months of age in early stage. Moreover, in 12-, 24-, and 36-month-old individuals, *KLHL10* gene expression levels in the testis were higher than those in the ovaries ($P < 0.05$). At the same time, the double-stranded RNA (dsRNA) interference experiments were also performed using three dsRNA strands. The results showed that the expression of *KLHL10* in gonad was effectively reduced. According to the above results, it is speculated that the *KLHL10* gene is a male-related gene in *H. cumingii*, which may participate in sex differentiation and testis development of *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *KLHL10* gene; sex differentiation; qRT-PCR; RNAi