第34卷第6期　　上 海 海 洋 大 学 学 报　　Vol.34, No.6
2025年11月　　JOURNAL OF SHANGHAI OCEAN UNIVERSITY　　Nov., 2025

文章编号：1674-5566(2025)06-1203-11　　DOI：10. 12024/jsou. 20241004669

梨形环棱螺*Map2k*1基因的分子特征和功能分析

金　鑫[1]，缪煜琳[1]，王　萍[1]，顾　洋[1]，吕伙红[1]，汪桂玲[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 上海水产养殖工程技术研究中心，上海　201306；3. 上海海洋大学 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心，上海　201306）

摘　要：为了探究*Map2k*1基因在梨形环棱螺性腺发育及性别分化中的作用，采用基因克隆、实时荧光定量、原位杂交以及RNA干扰技术来研究*Map2k*1在梨形环棱螺中的表达和功能。结果显示，*Map2k*1 cDNA ORF区全长1 191 bp，编码396个氨基酸，MAP2K1蛋白中含有S_TKc结构域，其氨基酸序列与软体动物同源性较高。*Map2k*1在雄性和雌性多种组织中均有表达，尤其是在雌性性腺中的表达量最高，且雌雄性腺的表达水平存在极显著差异（$P<0.01$）。原位杂交的结果表明，在雌性梨形环棱螺卵母细胞和卵巢囊泡中，*Map2k*1存在明显的杂交信号。RNA干扰的结果显示，在雌性梨形环棱螺中，*Map2k*1的干扰链G1在注射后12 h达到最高干扰率，为73.1%，并导致其他性别相关基因*β-catenin*、*Cyp*17*a*1和*Sox*9表达量显著降低。研究表明，*Map2k*1可能参与了雌性梨形环棱螺性腺发育和性别分化过程。本研究可为梨形环棱螺性腺发育和单性化育种研究提供理论参考。

关键词：梨形环棱螺；*Map2k*1基因；性腺发育；RNA干扰

中图分类号：S 917.4　　**文献标志码：**A

丝裂原活化蛋白激酶激酶1（*Map2k*1），又称*MEK*1或*MAPKK*1，是双特异性蛋白激酶，既是酪氨酸蛋白激酶，又是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，是细胞分裂时进入S期的关键，可以使ERK1/2的酪氨酸和苏氨酸位点磷酸化进而激活ERK1/2，激活的ERK1/2进入细胞核，可以调节细胞的减数分裂、有丝分裂等细胞过程[1-2]，是MAPK信号通路中的重要基因。*Map2k*1对小鼠睾丸细胞的更新、增殖具有重要作用[3-5]，敲除小鼠*Map2k*1导致小鼠睾丸支持细胞发育不良、低雄激素血症和生育力降低[6]，在牛睾丸支持细胞中也出现了类似的结果[7]。在鲤卵巢中，*Map2k*1拮抗剂会减弱其类固醇的生成[8]。此外*Map2k*1可以调节鸡[9]和斑马鱼[10]原始生殖细胞的增殖。这表明*Map2k*1可能参与性腺发育和性别分化过程。

梨形环棱螺（*Bellamya purificata*），通常被称作螺蛳，是我国特有的重要经济物种[11]。梨形环棱螺肉味美，养分多，食用、营养价值较高，在我国年消费量超过百万t[12]。近年来，柳州螺蛳粉迅速走红，其年经济产值已超百亿，作为柳州螺蛳粉重要原料的梨形环棱螺，其需求量也越来越大[13]。目前，梨形环棱螺的养殖量远远小于其需求量，其之间的缺口超百万t[11]。雌性梨形环棱螺比雄性具有更快的生长速度，可以带来更高的年产量，更具经济价值。研究其性腺发育和性别分化是实现梨形环棱螺的单性化育种的基础，具有重要的科学意义和生产价值。目前在香螺（*Neptunea cumingii*）[14]、福寿螺（*Pomacea canaliculata*）[15]、皮氏蛾螺（*Volutharpa ampullacea perryi*）[16]和管角螺（*Hemifusus tuba*）[17]中有性腺发育相关报道，在福寿螺[15]和纵肋织纹螺（*Nassarius variciferus*）[18]中有通过转录组测序筛选性别相关基因的报道。而关于梨形环棱螺的性腺发育和性别分化相关研究鲜有报道。

本研究克隆了梨形环棱螺MAPK通路中的*Map2k*1基因，用实时荧光定量PCR探究其表达

收稿日期：2024-10-23　　**修回日期：**2024-12-27

基金项目：国家重点研发计划（2022YFD2400700）；国家自然科学基金（32573497）

作者简介：金　鑫（2001—），男，硕士研究生，研究方向为水产动物遗传育种。E-mail：xjinvenus@163.com

通信作者：汪桂玲，E-mail：glwang@shou.edu.cn

特征，用原位杂交定位其mRNA在性腺中的位置，同时通过RNA干扰技术初步探讨*Map2k*1在梨形环棱螺性腺发育和性别分化中的作用，为梨形环棱螺性腺发育、性别分化以及单性化育种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用梨形环棱螺采自上海海洋大学河道，在实验室暂养3 d，水温(24±1)℃，投喂小球藻。选取大小一致的健康性成熟的雌、雄梨形环棱螺各3只，分别取性腺、肝脏、足、肠、外套膜和鳃组织，用于RNA提取，保存在−80 ℃下。另取1份性腺组织，用含DEPC的4%多聚甲醛4 ℃固定2 h，并保存在70%乙醇中，用于原位杂交。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

RNA的提取采用Trizol(Invitrogen，美国)试剂。分别用1.0%琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific，美国)检测RNA质量和测定RNA浓度。cDNA的合成过程使用PrimerScript^{TM} RT reagent kit with gDNA Eraser kit(TaKaRa，日本)，稀释5倍并于−20 ℃下保存。

1.3 基因克隆和序列分析

从梨形环棱螺基因组数据库中筛选出*Map2k*1序列，使用Primer Premier 5.0设计引物用于序列验证(表1)。将PCR产物连接到pMD19-T载体(TaKaRa，日本)，再将pMD19-T载体转化到DH5α(Tiangen，中国)中，随后扩增，涂平板，挑选白斑并测序。NCBI中的Blast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)用于确认*Map2k*1序列。ORFfinder(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)被用于识别和确定氨基酸序列。ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)则用于分析蛋白理化性质。蛋白二级结构预测使用SMART(https://smart.embl.de/)；蛋白三级结构预测通过SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)完成；跨膜结构则通过TMHMM(https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)预测。系统发育树duozh构建使用Mega 11.0中的邻接法(NJ)，并将bootstrap的值设置为1 000。MAP2K1蛋白的多序列比对使用BioEdit软件进行。所用的其他物种MAP2K1蛋白序列从NCBI数据库中获取(表2)。

1.4 荧光定量

根据ORF区域设计引物，内参基因为*RPL*5(表1)。实验仪器采用CFX96仪(Bio-Rad，美国)。反应体系包括0.8 μL正向引物，0.8 μL反向引物，1.6 μL cDNA，6.8 μL RNase-free water，10 μL 2×TB Green Premix Ex *Taq*，反应程序：95 ℃ 3 min，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，共40个循环。表达量的计算方法采用$2^{-\Delta\Delta C_t}$法。

1.5 原位杂交

在qRT-PCR正向和反向引物的5'端加上T7启动子序列(表1)，转录PCR产物采用T7 High Efficiency Transcription Kit(TransGen Biotech，中国)。使用DIG RNA标记混合物(Roche，德国)合成正义和反义探针，并在−80 ℃下保存。将保存在70%乙醇中的组织进行脱水、透明、包埋和切片，切片厚度设定为6 μm。在进行原位杂交实验前，对切片进行脱蜡处理。原位杂交采用Enhanced Sensitive ISH Detection Kit Ⅱ，AP kit(Boster，美国)。使用Leica DM2500显微镜(Leica，德国)观察并拍照。

1.6 RNA干扰

基于梨形环棱螺的*Map2k*1 ORF序列设计两对引物，扩增片段长度为300~500 bp。正向和反向引物的5'端被添加了T7启动子序列(表1)。dsRNA的合成遵循WANG等[19]的方法。两条干扰链分别命名为G1和G2。使用相同的方法获得对照组绿荧光蛋白(*GFP*)的干扰链。

在干扰实验中，健康性成熟的雌性梨形环棱螺在实验室中暂养3 d后注射干扰链。将雌性梨形环棱螺随机分为3组：对照组、干扰组1(G1)和干扰组2(G2)，每组9只。稀释后的干扰链浓度为500 ng/μL，取10 μL干扰链注射进梨形环棱螺的足下部肌肉。在注射6、12和24 h后，对性腺组织进行取样，提取RNA。

1.7 数据分析

采用SPSS 23.0软件对qRT-PCR结果进行数据分析，方法包括单因素方差分析和独立样本*t*检验。事后检验采用LSD和Tukey检验。当$P<0.05$时，差异被视为显著，当$P<0.01$时，差异被视为极显著。使用Prism 8.0软件绘图。

表1　引物名称和序列
Tab. 1　Primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequences (5'-3')	目的 Application
*Map*2*k*1-F	TTTTGGAAGTGTCCGAGTA	序列验证
*Map*2*k*1-R	GGTAATGACCAGGTAAAGC	
*Map*2*k*1-qPCR-F	TGGAAATGGCGGTGTGGTCA	荧光定量
*Map*2*k*1-qPCR-R	CGCTGTAAAAGGCACCATAGTA	
β-catenin-qPCR-F	ATGGTAGCAGCCCTTATCCG	
β-catenin-qPCR-R	GCAGTGTAGTGATGGCATAGAA	
*Cyp*17*a*1-qPCR-F	TGAGTTCGGCAAGATAGTGG	
*Cyp*17*a*1-qPCR-R	TGCCATGTCACGGATGT	
*Sox*9-qPCR-F	TGGCAACAGTGTCAACGGA	
*Sox*9-qPCR-R	TGGGATTTAGGAAAGACGG	
*RPL*5-F	CAACTATGCGGCTGCTTACT	
*RPL*5-R	CCAGGCTGTCCCTCTTCAT	
Antisense-*Map*2*k*1-ISH-F	TGGAAATGGCGGTGTGGTCA	原位杂交
Antisense-*Map*2*k*1-ISH-R	TAATACGACTCACTATAGGGCGCTGTAAAAGGCACCATAGTA	
Sense-*Map*2*k*1-ISH-F	TAATACGACTCACTATAGGGTGGAAATGGCGGTGTGGTCA	
Sense-*Map*2*k*1-ISH-R	CGCTGTAAAAGGCACCATAGTA	
*Map*2*k*1-RNAi-F1	TCTGATCCTTAAAAGGGCTGG	RNA干扰
*Map*2*k*1- RNAi R1	TGCTCCTCCATCACATTCTCAC	
T7-*Map*2*k*1-RNAi-F1	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGATCCTTAAAAGGGCTGG	
T7-*Map*2*k*1-RNAi-R1	TAATACGACTCACTATAGGGTGCTCCTCCATCACATTCTCAC	
*Map*2*k*1-RNAi-F2	GGATGGTGGCTCCTTAGAT	
*Map*2*k*1-RNAi-R2	CTCCTCCATCACATTCTCAC	
T7-*Map*2*k*1-RNAi-F2	TAATACGACTCACTATAGGGGGATGGTGGCTCCTTAGAT	
T7-*Map*2*k*1-RNAi-R2	TAATACGACTCACTATAGGGCTCCTCCATCACATTCTCAC	
GFP-F	AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG	
GFP-R	CAGCAGGACCATGTGATCGCGC	
T7-*GFP*-F	TAATACGACTCACTATAGGAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG	
T7-*GFP*-R	TAATACGACTCACTATAGGCAGCAGGACCATGTGATCGCGC	

表2　其他物种中MAP2K1序列登录号
Tab. 2　Accession numbers of MAP2K1 in different species

物种名 Species	登录号 Accession number
福寿螺 *Pomacea canaliculata*	XP_025078135.1
虾夷扇贝 *Mizuhopecten yessoensis*	XP_021372355.1
中华蛸 *Octopus sinensis*	XP_029646579.1
小鼠 *Mus musculus domesticus*	AAA97500.1
智人 *Homo sapiens*	NP_001397994.1
加州海兔 *Aplysia californica*	XP_005089385.1
红鲍 *Haliotis rufescens*	XP_046370634.1
文昌鱼 *Branchiostoma balcheri*	CAH1254160.1
斑马鱼 *Danio rerio*	NP_998584.2
美洲牡蛎 *Crassostrea virginica*	XP_022330167.1

2　结果

2.1　梨形环棱螺*Map*2*k*1的序列分析

*Map*2*k*1基因cDNA ORF区全长1 191 bp(登录号:PQ479527),编码396个氨基酸(图1)。MAP2K1蛋白的理论等电点(pI)为5.52,其分子量为44.04 ku。蛋白结构域分析表明,MAP2K1含有1个S_TKc结构域。在蛋白二级结构中,MAP2K1中α螺旋占41.92%,延伸链占11.87%,β折叠占3.79%,不规则卷曲占42.42%。MAP2K1蛋白的氨基酸序列在序列比对中显示出较高的保守性(图2)。梨形环棱螺的MAP2K1与福寿螺的同源性最高,为95.15%。系统发育树显示,梨形环棱螺的MAP2K1与福寿螺进化距离较近,聚为一支,离人和斑马鱼较远(图3)。

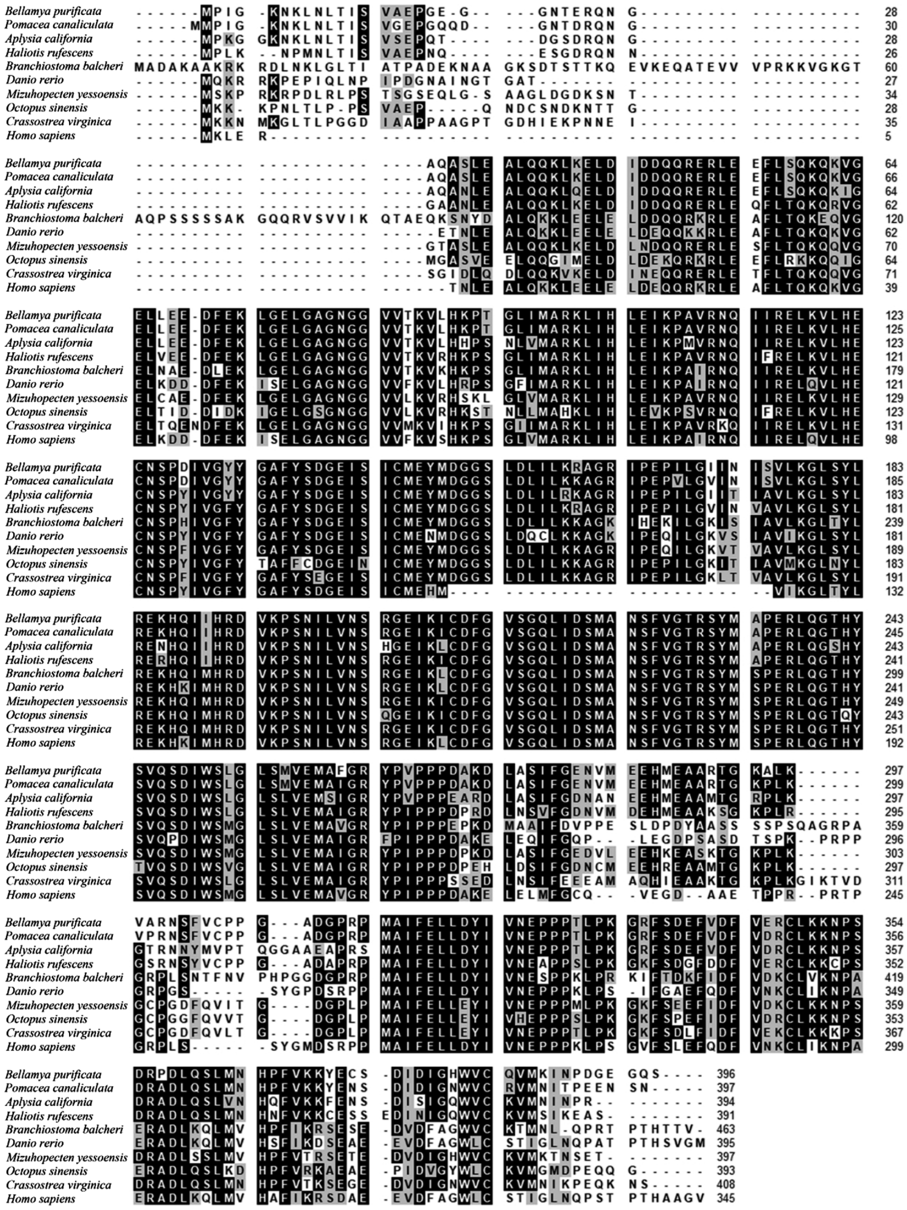
```
1     tccttactattatgggaaatatgtgtatgtaatcgatgtcggtcatgttttggaagtgtccgagtactacattttgcttttagacacgaa
91    gacctcacctacagatgaagtatttgtttcgtcatacgaagtaaattgtgtagaggttttcgacccgaccgtacaATGCCAATCGGCAAA
1                                                                                 M P I G K
181   AATAAACTGAACCTGACAATTTCTGTAGCTGAGCCGGGTGAGGGCGGAAATACAGAACGGCAGAATGGAGCACAGGCAAGTCTTGAGGCG
6      N K L N L T I S V A E P G E G G N T E R Q N G A Q A S L E A
271   TTACAGCAAAAACTTAAAGAATTAGATATTGATGATCAGCAACGAGAGAGATTGGAGGAATTTCTTTCACAAAAGCAAAAGGTTGGAGAG
36     L Q Q K L K E L D I D D Q Q R E R L E E F L S Q K Q K V G E
361   CTTCTTGAAGAAGACTTTGAAAAACTTGGAGAGCTGGGTGCTGGAAATGGCGGTGTGGTCACAAAGGTCTTGCACAAACCTACCGGTCTT
66     L L E E D F E K L G E L G A G N G G V V T K V L H K P T G L
451   ATCATGGCCAGAAAGTTGATTCATCTGGAAATCAAGCCAGCTGTACGCAATCAGATCATACGTGAGTTGAAGGTGTTACACGAATGTAAT
96     I M A R K L I H L E I K P A V R N Q I I R E L K V L H E C N
541   TCCCCAGATATTGTTGGCTACTATGGTGCCTTTTACAGCGATGGTGAAATCAGCATATGCATGGAATATATGGATGGTGGCTCCTTAGAT
126    S P D I V G Y Y G A F Y S D G E I S I C M E Y M D G G S L D
631   CTGATCCTTAAAAGGGCTGGCAGAATTCCAGAGCCAATTCTGGGAATTATCAATATTTCTGTGCTTAAAGGCTTGTCGTACTTAAGAGAG
156    L I L K R A G R I P E P I L G I I N I S V L K G L S Y L R E
721   AAACACCAGATAATACACAGAGATGTCAAGCCATCAAACATTCTTGTTAACTCCAGGGGAGAAATAAAAATCTGTGATTTTGGGGTCAGT
186    K H Q I I H R D V K P S N I L V N S R G E I K I C D F G V S
811   GGCCAGTTAATTGACTCCATGGCAAATTCCTTTGTTGGCACAAGATCATATATGGCTCCCGAACGACTTCAGGGCACTCATTACTCTGTT
216    G Q L I D S M A N S F V G T R S Y M A P E R L Q G T H Y S V
901   CAATCAGATATCTGGAGTTTAGGATTGTCCATGGTTGAGATGGCATTTGGCCGATATCCAGTCCCTCCACCTGATGCCAAAGATTTAGCA
246    Q S D I W S L G L S M V E M A F G R Y P V P P P D A K D L A
991   TCAATTTTTGGTGAGAATGTGATGGAGGAGCACATGGAAGCTGCACGCACAGGCAAAGCACTGAAAGTGGCCCGAAATAGCTTCGTCTGC
276    S I F G E N V M E E H M E A A R T G K A L K V A R N S F V C
1081  CCTCCCGGAGCGGATGGACCGCGACCCATGGCCATTTTTGAGCTTTTAGATTACATTGTGAATGAGCCACCTCCCACGCTTCCTAAAGGC
306    P P G A D G P R P M A I F E L L D Y I V N E P P P T L P K G
1171  CGTTTCTCAGATGAGTTTGTTGACTTTGTTGAGCGATGTCTCAAAAAGAACCCATCAGACAGACCAGATCTACAGTCTCTAATGAATCAT
336    R F S D E F V D F V E R C L K K N P S D R P D L Q S L M N H
1261  CCATTTGTGAAGAAGTACGAGTGCTCTGATATAGATATAGGTCACTGGGTGTGCCAGGTTATGAAAATCAACCCTGATGGTGAAGGGCAG
366    P F V K K Y E C S D I D I G H W V C Q V M K I N P D G E G Q
1351  AGTTGAaagtttctgtggactgtgtttctgtgctgccttgaagttgacatacgtatcagattttattcaacacctgtttcctctctatat
396    S *
1441  ttttattgtatcaccaatttatgtgcaaaaattatgtttgtgtattctgctggttttccccactcccaattgctatcacattgacttctt
1531  tattatttctgttgcgatagatttgatctgttgttgtgttattcttgatccttacacagtcacttcaaaagaggaaacagttatgtttgc
1621  cactgagaagtcatatggggaataagtgaaaactgtggctttacctggtcattaccatgaaacttcttaagcagggacttgtttgctgtg
1711  cacaggaacact
```

大写字母为ORF；起始和终止密码子用方框表示，灰色区域为ORF编码的氨基酸；下划线区域是预测结构域。

Capital letters were ORF region; start codon, and stop codon were marked by box tags; the gray area was amino acid encoded by ORF region; the area underlined was the predicted domain.

图1　*Map*2*k*1基因的cDNA序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 1　The cDNA sequence of *Map*2*k*1 gene and its encoded amino acid sequence



黑色表示相同的氨基酸;灰色表示相似的氨基酸。

Black represents same amino acid; grey represents similar amino acid.

图2　梨形环棱螺和其他物种的MAP2K1氨基酸序列比对

Fig. 2　Multiple alignment analysis of the MAP2K1 amino acid sequences of *B. purificata* with those in other species

2.2　*Map2k*1在梨形环棱螺不同组织中表达分析

荧光定量结果显示,*Map2k*1在雌雄梨形环棱螺的6种组织(性腺、肝、肠、鳃、足和外套膜)中均有表达(图4)。*Map2k*1只在外套膜中雌雄间不具有显著差异,在鳃和足中雌雄间具有显著差异(P<0.05),在性腺、肠和肝中雌雄间具有极显著差异(P<0.01)。此外,*Map2k*1表达量最高的组织是雌性性腺,在肠道中表达量也较高,在鳃和足中表达量较低。

2.3　原位杂交结果

原位杂交结果表明,*Map2k*1在梨形环棱螺卵巢的滤泡壁中存在杂交信号,并在卵巢卵母细胞的细胞核以及卵巢囊泡中存在明显的杂交信号。*Map2k*1在精巢滤泡壁中存在明显的杂交信号(图版)。

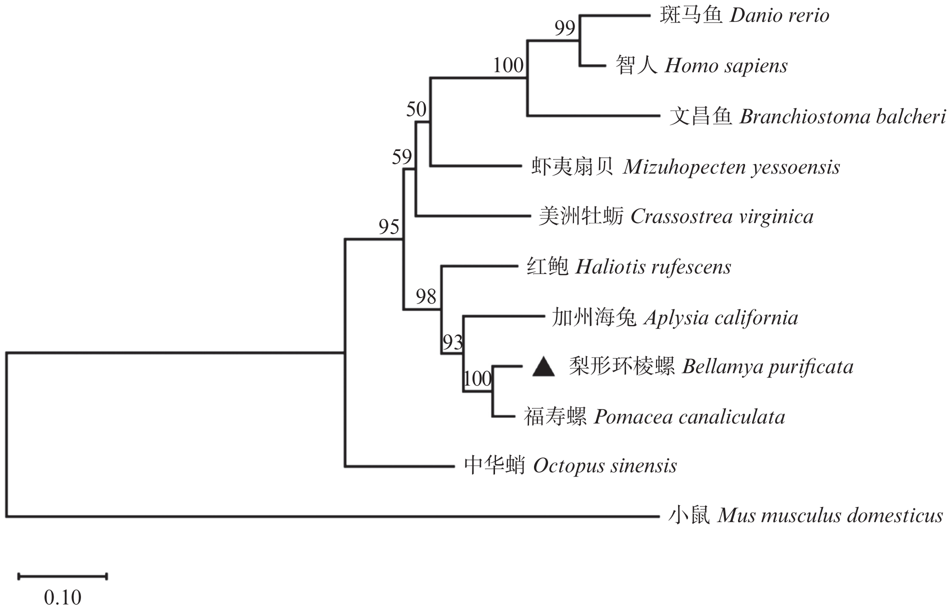
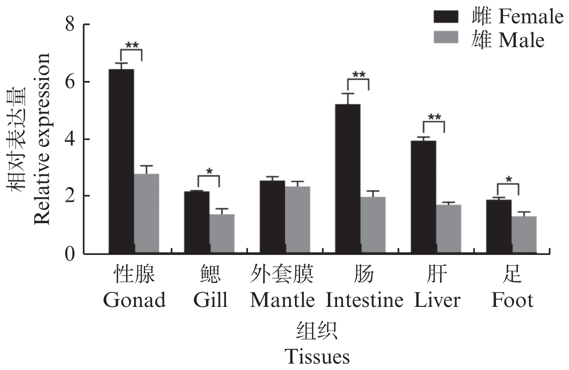


图3 梨形环棱螺和其他物种的MAP2K1进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of MAP2K1 from *B. purificata* and other species



*表示差异具有显著性（$P<0.05$），**表示差异具有极显著性（$P<0.01$）。

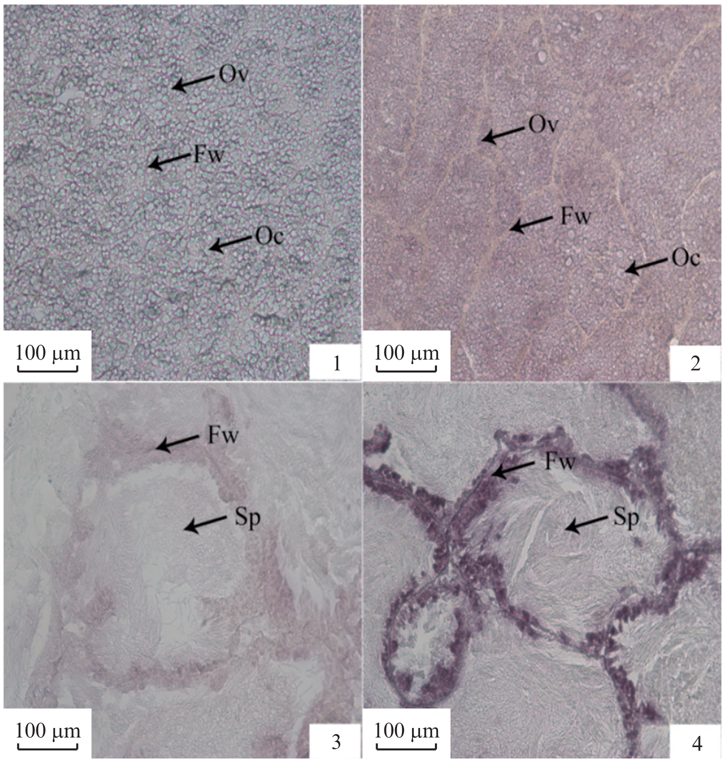
There was a significant difference when marked with one star（$P<0.05$）, and a highly significant difference when marked with two stars（$P<0.01$）.

图4 *Map2k*1在梨形环棱螺不同组织中的相对表达

Fig. 4 Relative expression of *Map2k*1 in different tissues of *B. purificata*

2.4 RNA干扰结果

采用qRT-PCR检测RNA干扰后雌性梨形环棱螺性腺中*Map2k*1的mRNA表达。结果表明，两条干扰链在检测的3个时间点均起到干扰作用，干扰链G1注射后12 h达到最高干扰率，为73.1%（图5）。选择注射G1干扰链，注射后12 h的样品检测其他性别相关基因的表达量，发现其表达量均有极显著下降（$P<0.01$）。*β-catenin*、*Cyp*17*a*1和*Sox*9表达量分别下降57.0%、22.0%和28.5%（图6）。

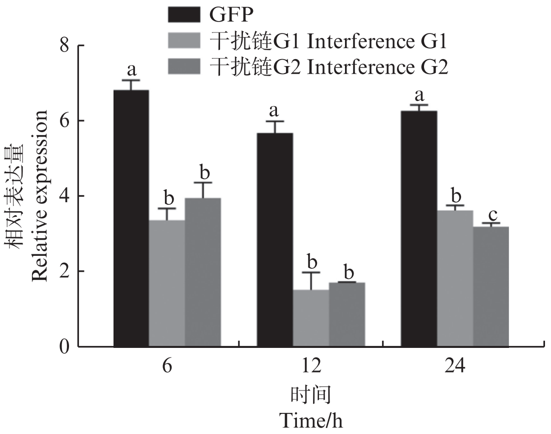


1. 雌性性腺对照组;2. 雌性性腺实验组;3. 雄性性腺对照组;4. 雄性性腺实验组。Ov. 卵巢囊泡;Oc. 卵母细胞;Fw. 滤泡壁;Sp. 精子。

1. Female gonad control group; 2. Female gonad experimental group; 3. Male gonad control group; 4. Male gonad experimental group. Ov. Ovarian vesicle; Oc. Oocyte; Fw. Follicular wall; Sp. Sperm.

图版　*Map2k*1在梨形环棱螺雌性和雄性性腺中的原位杂交

Plate　*In situ* hybridization of *Map2k*1 in female and male gonad of *B. purificata*

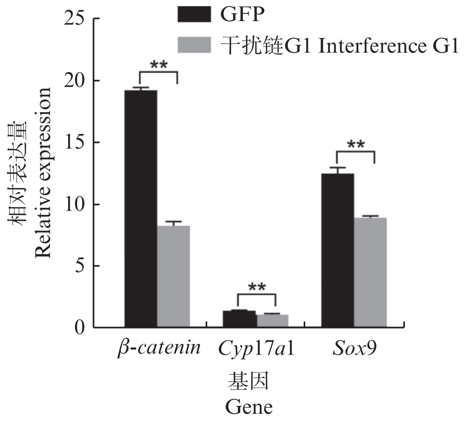


不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Different letters indicated significant differences ($P<0.05$).

图5　RNA干扰后*Map2k*1在雌性性腺中的相对表达量

Fig. 5　Relative expression of *Map2k*1 in female gonad after RNAi



**表示具有极显著差异($P<0.01$)。

There was a highly significant difference when marked with two stars ($P<0.01$).

图6　干扰*Map2k*1基因后*β-catenin*、*Cyp*17*a1*和*Sox*9的相对表达量

Fig. 6　Relative expression of *β-catenin*、*Cyp*17*a*1 and *Sox*9 after RNA interference with *Map2k*1 gene

3　讨论

本实验首次克隆了梨形环棱螺的*Map2k*1基因的ORF区,*Map2k*1基因ORF区全长1 191 bp,编码396个氨基酸。蛋白结构域分析表明,*Map2k*1蛋白中含有S_TKc结构域。S_TKc结构域是蛋白激酶的核心部位,是其重要的催化结构域[20],蛋白激酶将ATP中的γ磷酸酯转移到氨基酸链中的特定氨基酸残基上,导致蛋白质构象变

化，进而影响蛋白质功能。S_TKc的催化结构域包括一段在其N末端的高度保守片段，结构域中心区域也包括保守的天冬氨酸残基，靠近赖氨酸的位置有一段富含甘氨酸的残基，这一区域已经被证明与ATP结合有关。这些保守的结构特征是蛋白激酶功能的基础[20]。S_TKc结构域参与生物的生殖过程，例如在三角帆蚌中，含有S_TKc结构域的*C-Mos*基因可能在其性腺发育中具有重要作用[21]。多序列比对的结果表明，*Map2k*1基因与软体动物表现出较高的同源性，表明该基因在软体动物中可能具有相似的功能。系统发育结果表明，梨形环棱螺中的*Map2k*1与其他软体动物聚集在一起，表明该基因在进化过程中相对保守。

*Map2k*1可以转导多种信号，从而促进性腺细胞的增殖[4-5,22-26]。在狮头鹅中，*Map2k*1与其生殖过程相关[27]，并且*Map2k*1在小鼠MⅡ期卵母细胞[28]以及三角帆蚌雌性性腺[29]中高表达。本研究中，*Map2k*1在梨形环棱螺的性腺、肝脏、足、肠、外套膜和鳃中均有表达，此外*Map2k*1在雌性性腺中表达水平最高，这一模式与三角帆蚌中*Map2k*1的表达情况相似，并且*Map2k*1可能参与三角帆蚌的卵巢发育过程，表明*Map2k*1也可能在雌性梨形环棱螺性腺发育中具有重要的作用。MAPK信号级联是哺乳动物卵母细胞减数分裂的关键调节因子[30]。而原位杂交的结果表明，在梨形环棱螺的卵巢卵母细胞中，*Map2k*1呈现出显著的杂交信号，并且杂交信号集中在细胞核，暗示了该基因可能在梨形环棱螺的卵母细胞减数分裂中具有作用。

为了进一步探究梨形环棱螺中*Map2k*1在性别分化中的作用，我们进行了RNA干扰实验，并检测了RNA干扰后其他性别相关基因的表达情况。*β-catenin*是连环蛋白家族中的一员，在哺乳动物中，*β-catenin*对卵巢的生长发育具有重要作用[31-32]。同时*β-catenin*也是太平洋牡蛎性别决定的潜在调控因子[33]。MAPK信号通路可以介导*β-catenin*的信号转导，其之间的关系又取决于特定的细胞环境[34]。在成牙骨质细胞中，MAPK信号通路的抑制，会导致*β-catenin*表达量降低[35]。*Cyp*17*a*1主要在性类固醇激素合成过程中发挥作用，而性类固醇激素在脊椎动物的性别分化中发挥着重要作用[36-37]。在间质细胞特异性缺失*Map2k*1的小鼠中，*Cyp*17*a*1的表达量减少，同时间质细胞发育不全，性腺功能下降[38]。Mapk的抑制剂会抑制牛中*Cyp*17*a*1的表达以及类固醇激素的合成[39]。*Sox*9对于许多动物的性别决定有着重要的作用，并且高度保守[40-43]。Mapk的抑制剂可抑制小鼠中*Sox*9的表达[44]。在梨形环棱螺中，敲低*Map2k*1的表达量，会导致*β-catenin*、*Cyp*17*a*1和*Sox*9的表达量均出现极显著下降，这与上述其他报道相类似，说明在梨形环棱螺中，*Map2k*1对性别相关基因*β-catenin*、*Cyp*17*a1*和*Sox*9可能存在潜在的正调控，进而参与梨形环棱螺的性腺发育和性别分化过程，然而，它们之间的相互关系以及对性腺发育和性别分化的调控机制仍需深入研究。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献：

［1］ 李娟，何涛. 胞外信号调节激酶（ERK）信号转导途径的研究进展［J］. 四川生理科学杂志，2004，26（2）：87-89.
LI J，HE T. Research progress on extracellular signal regulated kinase（ERK）signal pathway［J］. Sichuan Journal of Physiological Sciences，2004，26（2）：87-89.

［2］ 陈新企，周光现，王慧芳，等. 狮头鹅*MAP*2*K*1基因SNP位点筛查及生物信息学分析［J］. 江苏农业科学，2022，50（11）：43-53.
CHEN X Q，ZHOU G X，WANG H F，et al. SNP screening and bioinformatics analysis of *MAP*2*K*1 gene in Shitou goose［J］. Jiangsu Agricultural Sciences，2022，50（11）：43-53.

［3］ MATZKIN M E，GONZALEZ-CALVAR S I，MAYERHOFER A，et al. Testosterone induction of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression and prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in hamster Leydig cells［J］. Reproduction，2009，138（1）：163-175.

［4］ THUILLIER R，MAZER M，MANKU G，et al. Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation［J］. Biology of Reproduction，2010，82（5）：825-836.

［5］ ISHII K，KANATSU-SHINOHARA M，TOYOKUNI S，et al. FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of *Etv*5 and *Bcl6b* through MAP2K1 activation［J］. Development，2012，139（10）：1734-1743.

［6］ YAMASHITA S，TAI P，CHARRON J，et al. The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig Cells and for fertility［J］. Molecular Endocrinology，2011，25（7）：1211-1222.

［7］　张林林. Bta-miR-34b调控牛睾丸支持细胞增殖与凋亡的机制研究［D］. 咸阳：西北农林科技大学，2021.
ZHANG L L. The mechanism of Bta-miR-34b regulates bovine Sertoli cell proliferation and apoptosis［D］. Xianyang：Northwest A&F University，2021.

［8］　PAUL S，KUNDU S，PRAMANICK K，et al. Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by gonadotropin in common carp *Cyprinus carpio*：interaction between calcium- and adenylate cyclase-dependent pathways and involvement of ERK signaling cascade［J］. Journal of Molecular Endocrinology，2010，45（4）：207-218.

［9］　CHOI J W，KIM S，KIM T M，et al. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells［J］. PLoS One，2010，5（9）：e12968.

［10］　FENG K，CUI X F，SONG Y L，et al. Gnrh3 regulates PGC proliferation and sex differentiation in developing zebrafish［J］. Endocrinology，2020，161（1）：bqz024.

［11］　金武，曹静越，马骋，等. 梨形环棱螺11个地理种群遗传多样性和遗传分化［J］. 淡水渔业，2022，52（2）：16-21.
JIN W，CAO J Y，MA C，et al. Genetic diversity and genetic differentiation analysis of *Bellamya purificata* in eleven populations based on the microsatellite makers［J］. Freshwater Fisheries，2022，52（2）：16-21.

［12］　YUAN C，LI Z，ZHOU K Q，et al. Genetic diversity and population structure of *Bellamya purificata* in Guangxi［J］. PLoS One，2024，19（6）：e0305197.

［13］　JIN W，CAO X J，MA X Y，et al. Chromosome-level genome assembly of the freshwater snail *Bellamya purificata*（Caenogastropoda）［J］. Zoological Research，2022，43（4）：683-686.

［14］　贺加贝，王涵，赵延宁，等. 人工养殖条件下香螺生殖系统组织学观察及生殖细胞特征［J］. 大连海洋大学学报，2024，39（3）：402-409.
HE J B，WANG H，ZHAO Y N，et al. Histological observation of reproductive system and reproductive cell characteristics of limpet（*Neptunea cumingii*）under artificial culture conditions［J］. Journal of Dalian Ocean University，2024，39（3）：402-409.

［15］　张爽. 福寿螺性别相关基因的克隆与表达分析［D］. 绍兴：绍兴文理学院，2023.
ZHANG S. Cloning and expression analysis of sex-related genes of *Pomacea canaliculata*［D］. Shaoxing：Shaoxing University，2023.

［16］　韩森荣. 皮氏蛾螺经济性状与繁殖生物学的初步研究［D］. 大连：大连海洋大学，2022.
HAN S R. Preliminary study on economic characters and reproductive biology of *Volutharpa ampullacea perryi*.［D］. Dalian：Dalian Ocean University，2022.

［17］　区小玲，苏翔驹，何俊锋，等. 广西北部湾管角螺性腺发育与繁殖规律研究［J］. 中国海洋大学学报，2015，45（11）：20-28.
OU X L，SU X J，HE J F，et al. Studies on the gonadal development and reproductive pattern of *Hemifusus tuba*（Gmelin）inhabiting Beibu Gulf，Guangxi，China［J］. Periodical of Ocean University of China，2015，45（11）：20-28.

［18］　梁书东. 纵肋织纹螺（*Nassarius variciferus*）性腺发育相关基因的筛选及胚胎发育研究［D］. 沈阳：沈阳农业大学，2019.
LIANG S D. Comparative transcriptome analysis study relevant gonadal development related genes，embryonic development of *Nassarius variciferus*［D］. Shenyang：Shenyang Agricultural University，2019.

［19］　WANG Y Y，WANG X Q，GE J Y，et al. Identification and functional analysis of the sex-determiner *Transformer-2* homologue in the freshwater pearl mussel，*Hyriopsis cumingii*［J］. Frontiers in Physiology，2021，12：704548.

［20］　陈培蕊. 稻瘟病菌中3个含S_TKC结构域蛋白的功能分析［D］. 福州：福建农林大学，2016.
CHEN P R. Functional analysis of three proteins with S_TKC domain in *Magnaporthe oryzae*［D］. Fuzhou：Fujian Agriculture and Forestry University，2016.

［21］　LIU Z Y，JIN X，MIAO Y L，et al. Identification and characterization of *C-Mos* in pearl mussel *Hyriopsis cumingii* and its role in gonadal development［J］. Biomolecules，2023，13（6）：931.

［22］　MIYAZAKI T，KANATSU-SHINOHARA M，EMA M，et al. Signal regulatory protein alpha is a conserved marker for mouse and rat spermatogonial stem cells［J］. Biology of Reproduction，2023，108（4）：682-693.

［23］　ZHANG L L，MA T T，TAO Q B，et al. Bta-miR-34b inhibits proliferation and promotes apoptosis via the MEK/ERK pathway by targeting *MAP2K1* in bovine primary Sertoli cells［J］. Journal of Animal Science，2020，98（10）：skaa313.

［24］　CHEN S R，LIU Y X. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling［J］. Reproduction，2015，149（4）：R159-R167.

［25］　XU B F，ABDEL-FATTAH R，YANG L，et al. Testicular lumicrine factors regulate ERK，STAT，and NFKB pathways in the initial segment of the rat epididymis to prevent apoptosis［J］. Biology of Reproduction，2011，84（6）：1282-1291.

［26］　KWINTKIEWICZ J，SPACZYNSKI R Z，FOYOUZI N，et al. Insulin and oxidative stress modulate proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells through diverse signal transduction pathways［J］. Biology of Reproduction， 2006, 74(6): 1034-1040.

[27] 陈新企. 狮头鹅*MAP2K*1基因SNP分析及其在就巢与产蛋期卵巢组织表达的比较研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2022.
CHEN X Q. SNP analysis of *MAP2K*1 gene and comparison of its expression on ovarian tissues in the brooding and laying period of Shitou geese [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2022.

[28] CUI X S, LI X Y, YIN X J, et al. Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization [J]. Journal of Reproduction and Development, 2007, 53(2): 405-418.

[29] 刘美玲, 上官宵兆, 王晓强, 等. 三角帆蚌*MAP2K*1基因的分子特征和表达[J]. 南方水产科学, 2022, 18(5): 91-99.
LIU M L, SHANGGUAN X Z, WANG X Q, et al. Molecular characterization and expression of *MAP2K*1 gene in *Hyriopsis cumingii* [J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(5): 91-99.

[30] GAO Y, REN J S, ZHANG L Q, et al. The effects of demecolcine, alone or in combination with sucrose on bovine oocyte protrusion rate, MAPK1 protein level and *C-Mos* gene expression level[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2014, 34(6): 1974-1982.

[31] WANG G L, LIU F F, XU Z C, et al. Identification of *Hc-β-catenin* in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* and its involvement in innate immunity and sex determination [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 91: 99-107.

[32] WANG L M, SONG F B, DONG J J, et al. Characterization of β -*catenin 1* during the gonad development in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(10): 5402-5410.

[33] SANTERRE C, SOURDAINE P, ADELINE B, et al. Cg-SoxE and Cg-β-catenin, two new potential actors of the sex-determining pathway in a hermaphrodite lophotrochozoan, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2014, 167: 68-76.

[34] GUARDAVACCARO D, CLEVERS H. Wnt/β-catenin and MAPK signaling: allies and enemies in different battlefields[J]. Science Signaling, 2012, 5(219): pe15.

[35] YONG J W, VON BREMEN J, RUIZ-HEILAND G, et al. Adiponectin as well as compressive forces regulate *in vitro* β-catenin expression on cementoblasts via mitogen-activated protein kinase signaling activation[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 645005.

[36] YANG L Y, ZHANG X F, LIU S J, et al. Cyp17a1 is required for female sex determination and male fertility by regulating sex steroid biosynthesis in fish [J]. Endocrinology, 2021, 162(12): bqab205.

[37] ZENG Q, HU B J, BLANCO A H, et al. Full-length transcriptome sequences provide insight into hermaphroditism of freshwater pearl mussel *Hyriopsis schlegelii*[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 868742.

[38] MATZKIN M E, YAMASHITA S, ASCOLI M. The ERK1/2 pathway regulates testosterone synthesis by coordinately regulating the expression of steroidogenic genes in Leydig cells [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013, 370(1/2): 130-137.

[39] FUKUDA S, ORISAKA M, TAJIMA K, et al. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells [J]. Journal of Ovarian Research, 2009, 2(1): 17.

[40] DONG X L, CHEN S L, JI X S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl*2 genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossussemilaevis*)[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2011, 30(1): 68-77.

[41] EL JAMIL A, KANHOUSH R, MAGRE S, et al. Sex-specific expression of SOX9 during gonadogenesis in the amphibian *Xenopus tropicalis* [J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(10): 2996-3005.

[42] JØRGENSEN A, MORTHORST J E, ANDERSEN O, et al. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2008, 6(1): 25.

[43] 崔晓羽, 董赛赛, 段胜华, 等. 三角帆蚌*kinase X*基因的克隆及功能初探[J]. 水产学报, 2022, 46(4): 537-545.
CUI X Y, DONG S S, DUAN S H, et al. Preliminary study on cloning and the functions of *kinase X* gene in *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(4): 537-545.

[44] MATSUYAMA M, MIZUSAKI H, SHIMONO A, et al. A novel isoform of Vinexin, Vinexin γ, regulates *Sox*9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad [J]. Genes to Cells, 2005, 10(5): 421-434.

Molecular characteristics and functional analysis of *Map2k*1 in *Bellamya purificata*

JIN Xin[1], MIAO Yulin[1], WANG Ping[1], GU Yang[1], LYU Huohong[1], WANG Guiling[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. *Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: In order to investigate the role of *Map*2*k*1 gene in the gonadal development and sex differentiation of *Bellamya purificata*, gene cloning, quantitative real-time PCR (qRT-PCR), in situ hybridization, and RNA interference were employed. The results revealed that the full-length ORF of *Map*2*k*1 cDNA was 1 191 bp, encoding 396 amino acids. The MAP2K1 protein contained the S-TKc domain, and its amino acid sequence had high homology with mollusks. *Map*2*k*1 was detected in tissues of both sexes, showing the highest expression in the female gonads, where expression significantly differed from that in the male gonads ($P<0.01$). In situ hybridization analysis demonstrated strong hybridization signals of *Map*2*k*1 in the oocytes and ovarian vesicles of female *B. purificata*. The RNA interference results showed that in female *B. purificata*, the interference chain G1 of *Map*2*k*1 reached the highest interference rate of 73.1% 12 hours after injection, and led to a significant decrease in the expression of other sex-related genes *β-catenin*, *Cyp*17*a*1, and *Sox*9. Research had shown that *Map*2*k*1 may be involved in the gonadal development and sex differentiation of female *B. purificata*. This study can provide theoretical reference for the gonadal development and monosex breeding of *B. purificata*.

Key words: *Bellamya purificata*; *Map*2*k*1; gonadal development; RNAi