



三角帆蚌 *kinase X* 基因的克隆及功能初探

崔晓羽¹, 董赛赛¹, 段胜华¹, 汪桂玲^{1,2,3,1*}, 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, 水产科学国家实验教学示范中心, 上海 201306;

3. 上海海洋大学, 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 三角帆蚌是我国特有的淡水育珠蚌, 在养殖业中占有重要地位, 在实际养殖过程中, 雄性个体有着明显的产珠优势, 因此对性别决定的相关研究至关重要。研究发现 *Sox9* 基因在许多物种中起到性别决定的作用, *kinase X* 基因是蛋白激酶 (PKA) 合成中至关重要的基因, 而 *Sox9* 基因很可能受到 PKA 激酶的调控。实验通过 RACE 法克隆 *kinase X* 基因的全长 cDNA 序列, 使用荧光定量 PCR 的方法检测该基因在 2 龄雌雄三角帆蚌各组织中的相对表达量, 利用 RNA 干扰技术研究干扰链对 *kinase X* 基因及下游基因 *Sox9* 基因表达的影响。结果显示, *kinase X* 基因全长 1 652 bp, 编码 430 个氨基酸; 荧光定量 PCR 结果显示, *kinase X* 基因在雄性性腺中表达量最高, 雌雄间差异极显著; RNA 干扰结果显示, 合成的干扰链均对 *kinase X* 基因有着一定的干扰效率, 其中干扰链 1 的干扰率最高, 在雌性中的干扰率为 83.1%, 雄性中为 81.9%, 同时干扰链 1 干扰后 *Sox9* 基因的表达量在雌性中下降了 90.3%, 雄性中下降了 56.6%, 推测这两个基因可能参与性别决定过程。本实验为三角帆蚌性别决定和雄性单性化育种研究提供理论基础。

关键词: 三角帆蚌; *kinase X* 基因; *Sox9* 基因; 基因克隆; 表达分析; RNAi

中图分类号: Q 785; S 966.22⁺¹

文献标志码: A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国特有的淡水育珠蚌, 在珍珠养殖业中, 70% 以上的珍珠都产自三角帆蚌^[1]。而在三角帆蚌的养殖过程中发现, 雄性三角帆蚌产出的珍珠质量更好, 产量也更高, 带来的经济效益也更为可观^[2]。在三角帆蚌的性别相关研究中, 性别决定与性别分化相关基因的研究是性别调控网络的研究热点, 目前, 关于三角帆蚌的性别决定机制以及性别调控基因研究鲜见报道, 因此, 探索三角帆蚌的性别决定机制, 对于三角帆蚌雄性单性化育种, 创造更高的经济效益具有重大意义^[3]。

生物体内存在着广泛的信号系统, 这些系统中包含不同的蛋白质, 其中, 蛋白激酶的作用尤为重要^[4]。例如有研究表明, PKA (protein kinase A) 在哺乳动物生理学中占有重要地位, 在有关小鼠的研究中, PKA 某一位点单倍体功能不全会造成雄性小鼠的生育缺陷且 PKA 激酶可能参与精子获能过程, 缺少 PKA 的精子无法获能; 而卵母细胞成熟的关键在于细胞内 cAMP 水平和 PKA 活性, 在卵泡发育后期细胞内 cAMP 水平不再升高、PKA 活化停止, 这些都说明了 PKA 可能参与性别分化过程^[5-10], 但由于研究受限, PKA 在贝类中

收稿日期: 2020-10-12 修回日期: 2021-03-03

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901406); 国家自然科学基金 (31772835); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49)

第一作者: 崔晓羽 (照片), 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: 1743195541@qq.com

通信作者: 汪桂玲, 从事水产种质资源与遗传育种研究, E-mail: glwang@shou.edu.cn



研究较少,但在一些鱼类的研究中,PKA可以影响卵母细胞成熟过程,推测在贝类中可能也存在相似的机制来影响其性别决定与性别分化过程。同时有研究表明,*Sox9*基因在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)和池蝶蚌(*H. schlegeli*)的雌雄性腺中均表达,并非是单一地在某一性别表达^[11-18]。在cAMP经典信号通路中,PKA激酶位于*Sox9*基因的上游,可能会影响*Sox9*基因的表达^[19]。相较于其他功能性实验,RNA干扰技术更具有特异性和高效性^[20-21]。

本研究首次克隆了三角帆蚌*kinase X*基因的cDNA全长,对其进行序列分析以及蛋白质预测;使用实时定量PCR技术对2龄三角帆蚌各组织的基因表达量进行检测,并对*kinase X*基因进行dsRNA干扰,检测*kinase X*基因及*Sox9*基因的表达,为三角帆蚌性别决定和雄性单性化育种研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所采用的三角帆蚌取自浙江省武义县伟明水产有限公司,选取1~3龄雌雄三角帆蚌带回实验室暂养2~5d后,用干热灭菌后的剪刀、镊子、开壳器以及解剖刀等工具取相同体积的各组织,包括性腺、鳃、闭壳肌、斧足、外套膜、肝脏共6种组织,于液氮中迅速冷冻,置于-80℃保存备用。而幼龄样本是1—8月龄的幼蚌,在实验室暂养1~2d后不分性别进行取样,取幼蚌的性腺组织于液氮中速冻,保存于-80℃备用。

氯仿、异丙醇、固体/液体LB培养基粉末、琼脂糖、无水乙醇均购自生工生物工程上海股份

有限公司。RNaseFree水、IPTG、2×*Taq* PCR Mastermix、X-gal、Loading Buffer、DNA Marker、DH5α感受态细胞、Ampicillin购自天根生化科技有限公司。Trizol试剂购自Thermo Fisher公司。SMARTer TMRACE cDNA Amplification Kit和TB SYBR Green Master Mix购自TaKaRa公司。荧光定量用96孔板及密封膜(Bio-rad)、离心管、镊子、剪刀、Rnase-free枪头、PCR管、一次性1 mL注射器、开壳器等购自上海傲益生物科技有限公司。

1.2 实验方法

kinase X基因的全长克隆 利用Trizol法提取1~3龄性成熟雌雄三角帆蚌性腺的总RNA,2龄性成熟的雌雄三角帆蚌的各组织及1~8月龄的幼蚌性腺的总RNA、cDNA的合成按照Prime Script™ first-strand cDNA synthesis Kit (TaKaRa,大连)说明书来进行,最终cDNA浓度为5 ng/μL,从实验室已有的转录组库中筛选出*kinase X*基因,用Primer Primer 5.0软件设计引物(表1),由生工生物工程上海股份有限公司合成,进行验证。PCR反应体系:12.5 μL 2×*Taq* PCR Mastermix、9.5 μL ddH₂O、1 μL Forward Primer、1 μL Reverser Primer、1 μL cDNA,总反应体系为25 μL。反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,72℃终延伸10 min,4℃保存。其中变性、退火、延伸过程重复35个循环。根据验证后的序列设计3'和5'引物,利用RACE法克隆出*kinase X*基因的3'和5'部分,得到基因序列全长。3'RACE和5'RACE的outer以及inner引物,根据说明书通过PCR反应得到基因的完整ORF区序列。回收PCR产物并将其导入DH5α大肠杆菌中,筛选蓝白斑后将菌液送至生

表1 实验使用的引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in the study on *H. cumingii*

引物 primers	序列(5'-3') sequence (5'-3')	功能 application
<i>EF1α</i> -F (internal)	GGAACCTCCCAGGCAGACTGTGC	qRT-PCR
<i>EF1α</i> -R (internal)	TCAAAACGGGCCGAGAGAAT	qRT-PCR
<i>kinase X</i> -F	GGTGATGACCAAGCGTCTGA	fragment application
<i>kinase X</i> -R	TGCCAATTTGAACCCTGTGC	fragment application
K-3'RACE outer primer	AGCATGCAAGGATTGCGTT	3'RACE
K-3'RACE inner primer	GGGAACCTTTGAGGGGATGC	3'RACE
K-5'RACE outer primer	GCGGTTCAAGCAGTGGCGTCCGTT	5'RACE
K-q-F	CAAGCATGCAAGGATTGCG	qRT-PCR
K-q-R	CCTGTGCTTAGTCTGGGTCA	qRT-PCR

工生物工程上海股份有限公司进行测序。

kinase X 基因的序列分析 使用下列工具及软件对得到的序列进行分析,在 NCBI 上对 *kinase X* 基因进行 ORF 区预测 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 及核苷酸和氨基酸序列相似性分析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); 使用 DNA-MAN 6.0 软件进行氨基酸序列分析; 在线分析蛋白质结构 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 与特性 (<http://www.expasy.org/>); TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 用来预测蛋白质的跨膜结构域和分子量; 使用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法 (NJ) 构建 *kinase X* 基因的系统进化树; 使用 BioEdit 软件进行多序列比对, 使用 SPSS 软件进行显著性分析。

kinase X 基因的组织表达 以不同组织的 cDNA 为 qRT-PCR 的模板, 荧光定量的引物根据 *kinase X* 基因的 ORF 区设计 (表 1), 利用 BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量仪检测 *kinase X* 基因在 2 龄三角帆蚌不同组织中的相对表达量, 以三角帆蚌通用内参引物 EF1 α -F、EF1 α -R 为内参, 实验中反应体系为 10 μ L SYBR Green Mix (TaKaRa)、0.8 μ L q-F、0.8 μ L q-R、1.6 μ L cDNA 和 6.8 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 其中变性、退火、延伸过程重复 39 个循环, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量, 每组 3 个平行, 计算平均值。雌雄间差异使用显著性分析来计算, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

kinase X 基因的 dsRNA 干扰 参考 Wang 等^[2]的方法合成 dsRNA 干扰链, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。用 1 龄的三角帆蚌作为实验材料, 每只使用 1 mL 一次性注射器注射 100 μ L 的干扰链, 即总物质的量为 20 μ g 的干扰链, 注射部位为闭壳肌, 每组 10 只, 以注射 GFP 的 1 龄三角帆蚌作为阴性对照, 7 d 后取样, Trizol 法提取 RNA, 并使用“*kinase X* 基因的全长克隆”中所述方法合成 cDNA。荧光定量检测 *kinase X* 基因以及 *Sox9* 的相对表达量。分别计算 3 组干扰链的干扰率, 并通过比较获得干扰率最高的干扰链。

2 结果

2.1 三角帆蚌 *kinase X* 基因的序列分析

本实验通过 RACE 克隆得到 *kinase X* 基因的

全长 cDNA 为 1 652 bp, 其中 3' UTR 长为 314 bp, 5' UTR 长为 45 bp, 开放阅读框 (ORF 区) 为 1 293 bp, 预测氨基酸 430 个, 该基因的氨基酸序列存在一个 STKYc 结构域, 位于 381~1 179 bp; 根据 TMHMM 及 ProtParam 预测结果: *kinase X* 基因存在一个跨膜结构域, 蛋白质的分子量 (MW) 为 49.00 ku, 理论等电点 (pI) 为 8.22, 其中 Leu(L) 是含量最高的氨基酸, 占 9.8%。根据预测的氨基酸序列, 利用 Bioedit 软件做出与虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*, XP_021341741.1)、栉孔扇贝 (ASE04571.1)、企鵝珍珠贝 (*Pteria penguin*, AYE21114.1)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, NP_001117742.1)、犬 (*Canis lupus familiaris*, sp|Q7YRJ 7.1)、家鼠 (*Mus musculus*, NP_035578.3) 以及美洲短吻鳄 (*Alligator mississippiensis*, KYO30924.1) 等 7 个物种的序列比对图 (图 1), 其中三角帆蚌与虾夷扇贝、栉孔扇贝等贝类的相似度较高; 基于 *kinase X* 基因的氨基酸序列与长牡蛎 (*Crassostrea gigas*, XP_011419205.1)、美洲牡蛎 (*C. virginica*, XP_022326862.1)、虾夷扇贝、斑马鱼 (*Danio rerio*, XP_005171320.1)、光滑双脐螺 (*Biomphalaria glabrata*, XP_013062016.1)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*, NP_724426.3)、家鼠 (*M. musculus*, XP_006528548.1) 以及智人 (*Homo sapiens*, NP_001274274.1) 等 8 个物种使用 NJ 法构建的系统进化树 (图 2), 结果显示, 三角帆蚌与长牡蛎及美洲牡蛎亲缘关系较近, 而与哺乳类遗传距离比较远。*kinase X* 基因的蛋白质三级结构预测图中, α -螺旋和 β -折叠同时存在且结构复杂, 表明该基因的功能较多。

2.2 2 龄三角帆蚌 *kinase X* 基因在各组织中的相对表达量

利用 q-PCR 的方法检测 2 龄三角帆蚌各组织中 *kinase X* 基因的相对表达量, SPSS 软件分析雌雄差异, 其中 *kinase X* 基因在雄性性腺中表达量高而在雌性性腺中表达量较低, 雌雄表达差异极显著 ($P < 0.01$) (图 3)。

在 1~3 龄雌雄三角帆蚌性腺组织中, *kinase X* 基因在雄性性腺中的表达量均高于雌性性腺, 雌雄差异极显著, 其中 2 龄性腺中的表达量高于 1 龄和 3 龄 (图 4)。

2.3 dsRNA 干扰

对 dsRNA 干扰后的三角帆蚌性腺组织的 cDNA

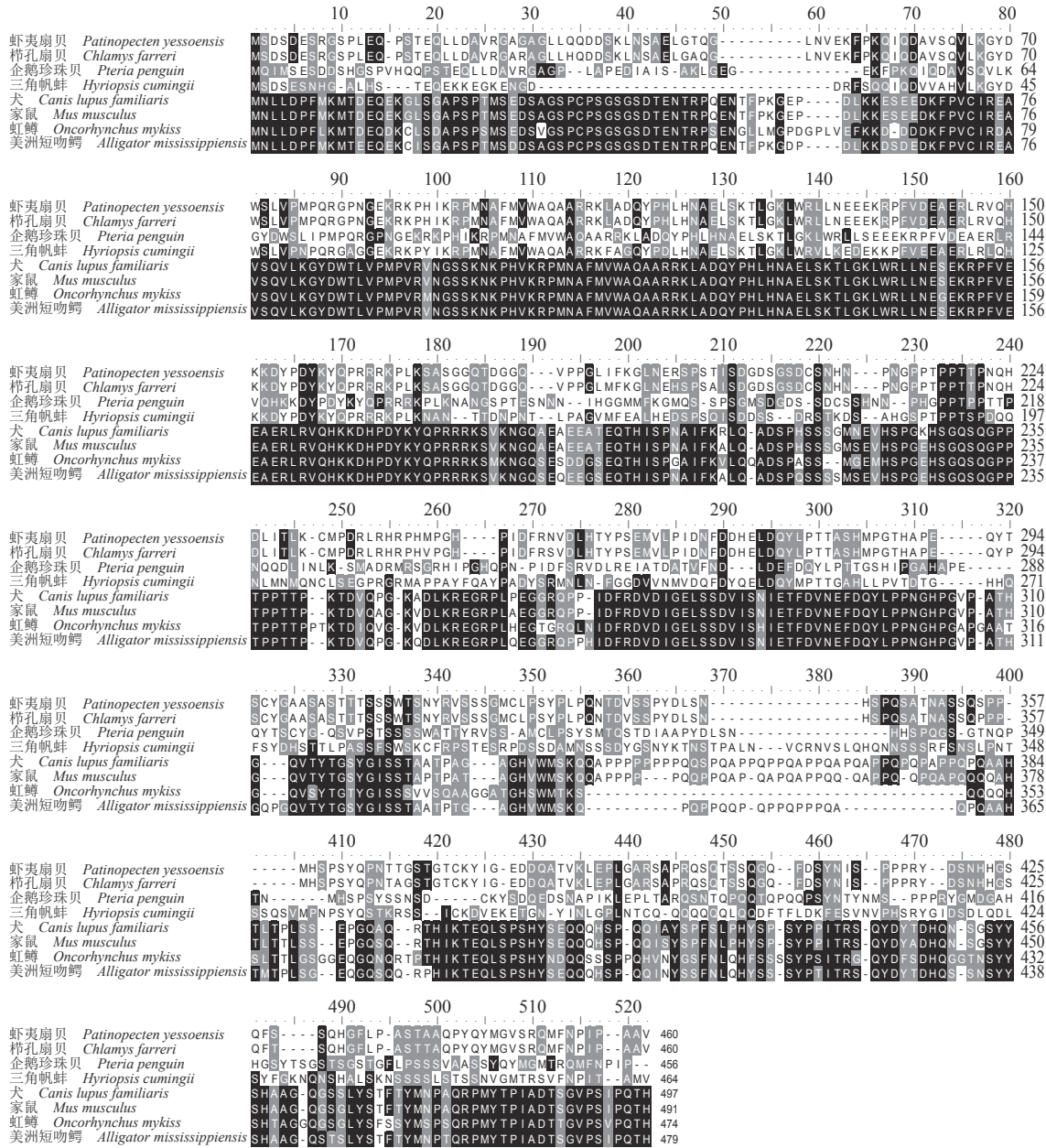


图1 kinase X 基因与其他 7 个物种的氨基酸比较

图片中不同的颜色表示一致的程度，一致的程度越高，颜色越深

Fig. 1 Amino acid comparison of kinase X gene with 7 other species

Different colors in the picture indicate the level of coincidence, the higher the coincidence, the darker the color

使用 q-PCR 的方法检测 *kinase X* 基因和 *Sox9* 基因的相对表达量 (图 5)，结果显示，3 条 dsRNA 中，干扰链 1 *kinase X* 基因在雌性中干扰率达到 83.1%，在雄性中为 81.9%；干扰链 2 在雌性中的干扰率为 76.0%，在雄性中为 25.7%；干扰链 3 在雌性中的干扰率为 24.0%，在雄性中为 67.7%。即在合成的 3 条干扰链中，干扰链 1 的干扰效率最高，而在干扰链 1 干扰后的三角帆蚌性腺中，*Sox9* 基因的表达量在雌性中下降了 90.3%，在雄性中下降

了 56.6%(图 6)。说明在三角帆蚌中，*kinase X* 基因的表达会影响 *Sox9* 基因的表达，二者可能共同作用，影响三角帆蚌性别决定与性别分化过程。

3 讨论

本研究利用 RACE 克隆技术获得了三角帆蚌 *kinase X* 基因的全长 cDNA 序列，并对其氨基酸序列进行了分析。*kinase X* 基因包含 1 个 STKYc 结构域。STKYc 结构域是蛋白激酶的保守结构域，

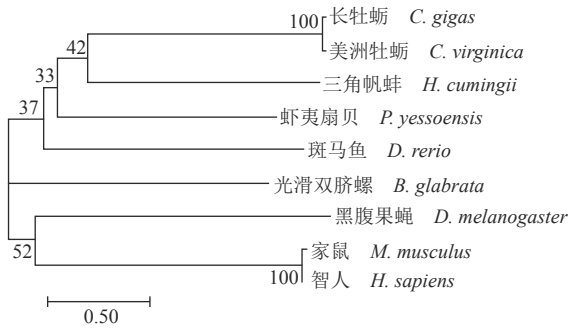


图 2 基于 *kinase X* 基因的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on *kinase X* gene

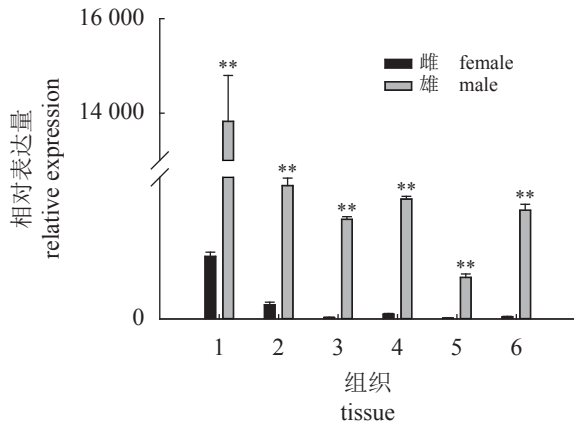


图 3 *kinase X* 基因在 6 个组织中的表达模式

** 代表 $P < 0.01$, 下同; 1. 性腺, 2. 鳃, 3. 闭壳肌, 4. 斧足, 5. 外套膜, 6. 肝脏

Fig. 3 Expression pattern of *kinase X* gene in 6 tissues

** represents $P < 0.01$, the same below; 1. gonads, 2. gill, 3. adductor muscle, 4. foot, 5. mantle, 6. liver

通常是某种蛋白激酶的特征结构域, 拥有该结构域的基因通常参与许多生理生化过程^[22-26], 在生物生殖发育过程中起到至关重要的作用。如果该

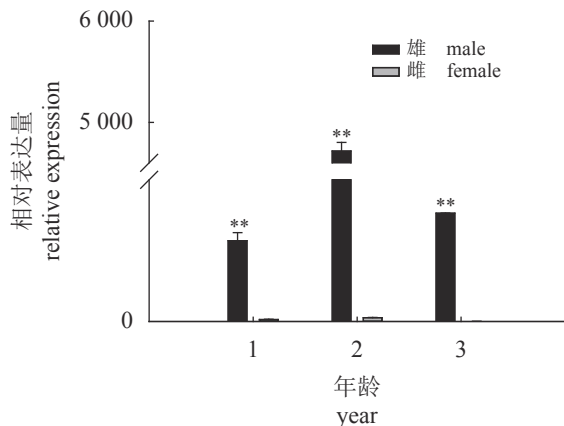


图 4 *kinase X* 基因在 1~3 龄性腺组织中的表达模式

Fig. 4 Expression pattern of *kinase X* gene in gonad of 1-3 years

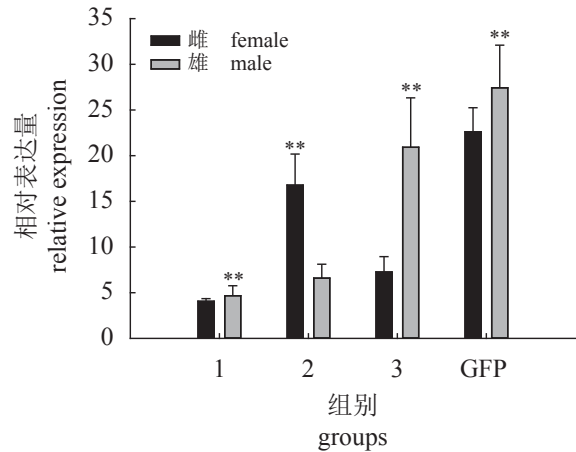


图 5 *kinase X* 基因干扰后表达模式

干扰周期为 7 d, 以 GFP 为参照; 1. 干扰链 1, 2. 干扰链 2, 3. 干扰链 3, 4. 阴性对照

Fig. 5 Expression pattern of *kinase X* gene after interference

Interference period is 7 d, with GFP as reference; 1. interference 1, 2. interference 2, 3. interference 3, 4. GFP

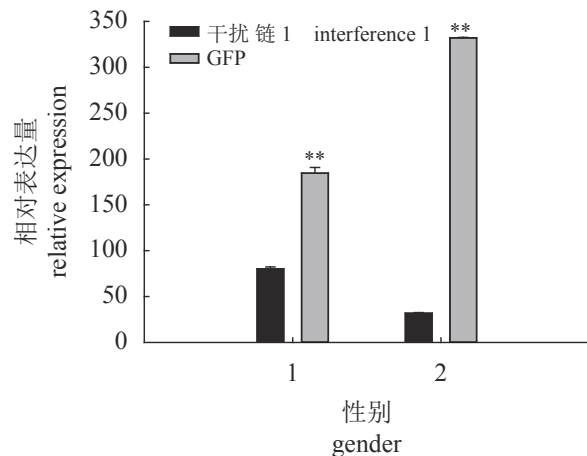


图 6 *kinase X* 基因干扰后 *Sox9* 表达模式

1. 雄性, 2. 雌性

Fig. 6 *Sox9* expression pattern after *kinase X* gene interference

1. male, 2. female

结构域发生折叠或构造发生改变, 会对蛋白激酶的功能产生影响, 细胞生长和应激过程受到影响, 从而对个体的生殖发育过程造成无法挽回的损伤。cAMP 通路不仅在垂体中起着至关重要的作用, 控制细胞分化和存活以及维持内分泌功能, 还可以调节生长激素的转录和释放以及细胞增殖。有研究表明, cAMP-PKA 介导的信号通路负调控卵母细胞成熟过程, 可以终止胰岛素诱导的卵母细胞成熟, 这些均说明经典 cAMP 通路可能参与雌性性别分化过程^[27-29]。同时, PKA 激酶功能不全

会造成生育缺陷, 缺少 PKA 激酶的精子无法获能, 这表明, cAMP-PKA 介导的信号通路对雄性个体的生殖活动有至关重要的影响; 而雌性小鼠中卵母细胞成熟的关键在于细胞内 cAMP 水平和 PKA 活性, 在卵泡发育后期细胞内 cAMP 水平不再升高、PKA 活化停止, 这些都说明了 *kinase X* 基因可能参与早期性别决定与性别分化过程, 而在后期性别分化过程结束时趋于稳定, 同时 *Sox9* 基因作为公认的性别决定基因, 在许多贝类中都参与了性别决定与性别分化过程, 由于 *kinase X* 基因位于 *Sox9* 基因的上游, 推测可能共同通过 cAMP-PKA 介导的信号通路影响性别分化和性别决定过程。

RNA 干扰实验表明, 合成的三条干扰链均对 *kinase X* 基因的表达起到抑制作用且干扰链 1 的干扰效率最高, 同时检测到 *Sox9* 基因的表达也有所下降, 说明在三角帆蚌中, *Sox9* 基因位于 *kinase X* 基因的下游且对 *kinase X* 基因的抑制会使 *Sox9* 基因的表达量下降, 二者是正相关关系; qRT-PCR 的结果表明, *kinase X* 基因在雌雄性腺中的表达水平差异极显著, 其中 2 龄性腺中的表达量远高于 1 龄和 3 龄, 雄性性腺中表达量极高, 结合以往研究, 表明 *kinase X* 基因可能影响精子获能过程^[30-32], 推测 *kinase X* 基因可能参与了与精子发生相关过程, 在 1~3 龄三角帆蚌雌雄性腺的表达中, 雄性性腺的表达量均高于雌性且雌雄差异极显著, 推测 *kinase X* 基因参与雄性性别分化过程, 在三角帆蚌的性别分化和性别决定等过程中, *kinase X* 基因和 *Sox9* 基因可能共同起作用; 对 *kinase X* 基因的干扰可能会影响三角帆蚌的性别分化。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Chen X J, Bai Z Y, Li J L. The mantle exosome and microRNAs of *Hyriopsis cumingii* involved in nacre color formation[J]. *Marine Biotechnology*, 2019, 21(5): 634-642.
- [2] Wang G L, Dong S S, Guo P F, et al. Identification of *Foxl2* in freshwater mussel *Hyriopsis cumingii* and its involvement in sex differentiation[J]. *Gene*, 2020, 754: 144853.
- [3] 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.
- [4] Ke B L, Zhao Z Y, Ye X, et al. Inactivation of NF-κB p65 (RelA) in liver improves insulin sensitivity and inhibits cAMP/PKA pathway[J]. *Diabetes*, 2015, 64(10): 3355-3362.
- [5] Lin P, Cheng T C, Ma S Y, et al. *Bacillus bombysepticus* α-Toxin binding to G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 regulates cAMP/PKA signaling pathway to induce host death[J]. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(3): e1005527.
- [6] Maitra S, Das D, Ghosh P, et al. High cAMP attenuation of insulin-stimulated meiotic G2-M1 transition in zebrafish oocytes: interaction between the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and the MAPK3/1 pathways[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 393(1-2): 109-119.
- [7] Bertoldo M J, Guibert E, Faure M, et al. Specific deletion of amp-activated protein kinase (α1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 423: 96-112.
- [8] Ravnskjaer K, Madiraju A, Montminy M, et al. Role of the cAMP pathway in glucose and lipid metabolism[M]//Herzig S. *Metabolic control*. Cham: Springer, 2015: 29-49, doi: 10.1007/164_2015_32.
- [9] Zhang S, Shi L L, Lü K, et al. Cloning, identification and functional analysis of a β-catenin homologue from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 411-418.
- [10] Burton K A, McKnight G S. PKA, germ cells, and fertility[J]. *Physiology*, 2007, 22: 40-46.
- [11] 刘金磊, 邓思平, 江东能, 等. ERR-dsRNA对罗氏沼虾卵巢中ERR及生殖相关基因表达的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(3): 8-16.
- [12] Liu J L, Deng S P, Jiang D N, et al. Screening of ovarian genes associated with reproduction in *Macrobrachium rosenbergii* and their changes in expression pattern in different development stages after *ERR* interference[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2018, 38(3): 8-16 (in Chinese).
- [12] 陈建华, 何毛贤, 牟幸江, 等. 金钱鱼*Sox9* cDNA克隆及

- 其表达分析[J]. 动物学杂志, 2015, 50(1): 93-102.
- Chen J H, He M X, Mu X J, *et al.* cDNA Cloning and mRNA expression analysis of *Sox9* in *Scatophagus argus*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2015, 50(1): 93-102 (in Chinese).
- [13] 谷伟, 黄天晴, 徐革峰, 等. *Sox9*和*amh*基因在雌、雄虹鳟和伪雄鱼各组织中的表达模式分析[J]. 水产学杂志, 2019, 32(3): 5-8.
- Gu W, Huang T Q, Xu G F, *et al.* Expression profiles of *Sox9* and *amh* genes in different tissues of pseudo-male, female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2019, 32(3): 5-8 (in Chinese).
- [14] 刘淼, 温海深, 何峰, 等. *Sox9*基因在黄颡鱼卵巢发育周期的表达及对热应激的响应[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 34-41.
- Liu M, Wen S H, He F, *et al.* The expression of *Sox9* during ovarian development and heat stress in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(4): 34-41 (in Chinese).
- [15] 贺超, 洪广, 吴静娴, 等. 泰国斗鱼*Sox9*基因的克隆及组织表达研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(8): 151-155,179.
- He C, Hong G, Wu J X, *et al.* Study on cloning and tissue expression of *Sox9* in *Betta splendens*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(8): 151-155,179 (in Chinese).
- [16] Shi J W, Wang D X, Zhou Y, *et al.* Comparative proteomics analysis of spermary and ovary in *Hyriopsis schlegelii*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(3): 491-499.
- [17] 梁清仪, 王心仪, 孙冬捷, 等. 两个*Sox9*基因在斑马鱼胚胎发育和成体性腺中的动态表达特征[J]. 山东农业科学, 2014, 46(7): 20-24.
- Liang Q Y, Wang X Y, Sun D J, *et al.* Dynamic expression patterns of two *Sox9* genes in developing embryo and gonads of zebrafish[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2014, 46(7): 20-24 (in Chinese).
- [18] 梁少帅, 于潇含, 杨丹丹, 等. 栉孔扇贝*sox9*基因的cDNA克隆及其在不同发育时期性腺中的表达特征[J]. 中国水产科学, 2017, 24(6): 1184-1192.
- Liang S S, Yu X H, Yang D D, *et al.* Molecular cloning of *sox9* cDNA and its expression characteristics in gonads at different developmental stages of *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(6): 1184-1192 (in Chinese).
- [19] 王雪庆, 赵遵岭, 孙涛, 等. 白蜡虫*ws*基因RNAi载体构建及原核表达dsRNA[J]. 林业科学研究, 2018, 31(4): 70-74.
- Wang X Q, Zhao Z L, Sun T, *et al.* Construction of RNA interference vector of *Ericerus pela* (Chavannes) *ws* gene and preparation of dsRNA by prokaryotic expression[J]. Forest Research, 2018, 31(4): 70-74 (in Chinese).
- [20] 陈田聪, 吕敏, 卢小花, 等. RNAi技术在虾免疫和生长发育的研究进展[J]. 水产养殖, 2018, 39(10): 28-33.
- Chen T C, Lv M, Lu X H, *et al.* Review on application of RNAi in immunization and growth of shrimp[J]. Journal of Aquaculture, 2018, 39(10): 28-33 (in Chinese).
- [21] Gao Y, Mao Y, Xu R G, *et al.* Defining gene networks controlling the maintenance and function of the differentiation niche by an *in vivo* systematic RNAi screen[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2019, 46(1): 19-30.
- [22] 葛楚天, 孙伟, 桑亚鹏, 等. 中华鳖*Dmrt1*基因的克隆、表达及在性逆转中的变化分析[J]. 中国科学:生命科学, 2014, 44(11): 1173-1182.
- Ge C T, Sun W, Sang Y P, *et al.* Molecular cloning and expression pattern of *Dmrt1* and its expression change in sex reversal in *Pelodiscus sinensis*[J]. Scientia Sinica Vitae, 2014, 44(11): 1173-1182 (in Chinese).
- [23] 徐智诚, 王芹, 汪桂玲, 等. 三角帆蚌*LRR*基因的分子特征及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(1): 254-260.
- Xu Z C, Wang Q, Wang G L, *et al.* Molecular characteristics and expression analysis of Leucine-Rich Repeat (*LRR*) gene from *Hyriopsis cumingii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(1): 254-260 (in Chinese).
- [24] Wang Y, Wang X J, Wang Y W, *et al.* Effect of cadmium on cellular ultrastructure in mouse ovary[J]. Ultrastructural Pathology, 2015, 39(5): 324-328.
- [25] Aizen J, Thomas P. Role of *pgrmc1* in estrogen maintenance of meiotic arrest in zebrafish oocytes through *Gper/Egfr*[J]. Journal of Endocrinology, 2015, 225(1): 59-68.
- [26] Wang Q, Wang J N, Wang G L, *et al.* Molecular cloning, sequencing, and expression profiles of heat shock protein 90 (*HSP90*) in *Hyriopsis cumingii* exposed to differ-

- ent stressors: Temperature, cadmium and *Aeromonas hydrophila*[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2017, 2(2): 59-66.
- [27] Zhao L L, Wang Y Q, Dai Y J, *et al.* A novel C-type lectin with four CRDs is involved in the regulation of antimicrobial peptide gene expression in *Hyriopsis cumingii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 339-347.
- [28] Bento F M M, Marques R N, Campana F B *et al.* Gene silencing by RNAi *via* oral delivery of dsRNA by bacteria in the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*[J]. *Pest Management Science*, 2020, 76(1): 287-295.
- [29] 李清清, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌生长性状和内壳色与所产无核珍珠质量的相关性分析[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1631-1639.
- Li Q Q, Bai Z Y, Liu X J, *et al.* Correlation analysis of non-nucleated pearl quality parameters with growth traits and inner shell color of *Hyriopsis cumingii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1631-1639 (in Chinese).
- [30] Xie S M, Niu D H, Du Y C, *et al.* Expression and characterization of insulin-like growth factor II mRNA binding protein in the razor clam *Sinonovacula constricta*[J]. *Aquaculture and Fisheries*, 2017, 2(6): 247-255.
- [31] Xie L, Tang Q Y, Yang L, *et al.* Insulin-like growth factor I promotes oocyte maturation through increasing the expression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor in the zebrafish ovary[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 419: 198-207.
- [32] Wang G L, Wang Q, Xu Z C, *et al.* Identification, structural characterization and expression analysis of a novel carbonic anhydrase from freshwater mussel *Hyriopsis cumingii*[J]. *Gene*, 2017, 636: 78-86.

Preliminary study on cloning and the functions of *kinase X* gene in *Hyriopsis cumingii*

CUI Xiaoyu¹, DONG Saisai¹, DUAN Shenghua¹, WANG Guiling^{1,2,3,1*}, LI Jiale^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Hyriopsis cumingii* is a unique freshwater pearl mussel in our country. It occupies an important position in the aquaculture industry. In the actual breeding process, male individuals have a more obvious advantage in pearl production than female individuals. Therefore, research on the sex determination of *H. cumingii* is crucial. Previous studies have found that *Sox9* gene plays a role in male sex determination in many species, *kinase X* gene is an important gene in the synthesis of protein kinase (PKA), and PKA plays a vital role in many physiological and biochemical processes, especially in the process of spermatogenesis. In this process, PKA has a very obvious effect on sperm capacitation. The *kinase X* gene and *Sox9* gene are both located in cAMP-PKA pathway. And the relationship of the *kinase X* gene and *Sox9* gene is upstream and downstream. It is speculated that the *Sox9* gene may be regulated by PKA. The results showed that the *kinase X* gene was 1 652 bp in length, the 3' UTR was 314 bp, while the length of the 5' UTR was 45 bp, encoding 430 amino acids, and there was an STKYc structure domain which was located at 381-1 179 bp, *kinase X* gene has a transmembrane domain and the Molecular weight (Mw) of the *kinase X* protein was 49.00 ku and the theoretical Isoelectric point (pI) was 8.22, among which Leu(L) was the most abundant amino acid, accounting for 9.8%; the homology analysis showed that *H. cumingii* had a high similarity with other shellfishes such as *Mizuhopecten yessoensis*, *Chlamys farreri*. The phylogenetic tree showed that *H. cumingii* had a close relationship with *Crassocras gigas* and *Crassostrea virginica*, but had a long genetic distance with mammals. The fluorescence quantitative PCR results showed that the *kinase X* gene was expressed in 6 tissues including gonads, gill, adductor muscle, foot, mantle, liver of the 2-year-old *H. cumingii*, and the *kinase X* gene was expressed the highest in the male gonads while expressed the lowest in the female liver. And in 1-3 years of *H. cumingii*, the expression of *kinase X* gene in male was all higher than that in female, and the difference between male and female was extremely significant. Among them, the expression of *kinase X* gene in 2-year-old *H. cumingii* was highest among 1-3 years. Due to the high expression of the *kinase X* gene of the 2-year-old *H. cumingii* near the sexual maturity stage, the sperm occurrence rate was high; after 7 days of interference, the expression of *kinase X* gene decreased. RNA interference results show that the synthesized 3 interference chains had a certain interference efficiency on the *kinase X* gene, and the interference rate of the interference chain 1 was the highest. The interference rate was 83.1% in females and 81.9% in males, while interference chain 2 had an interference rate of 76.0% in females and 25.7% in males; interference chain 3 had an interference rate of 24.0% in females and 67.7% in males. At the same time, the *Sox9* gene expression decreased by 90.3% in females and 56.6% in males after the interference of interfere chain 1. This improved the synthesis of *kinase X* gene was positively correlated with the synthesis of *Sox9* gene. It was speculated that the two may work together to participate in the sex determination process through the cAMP-PKA-mediated signaling pathway. In this experiment, through preliminary functional exploration of the *kinase X* gene, it was found that there was the upstream and downstream relationship between *kinase X* gene and *Sox9* gene and the two were positively correlated, and it effectively interfered with the *kinase X* gene, which is important in cAMP-PKA of *H. cumingii*. This study provides a theoretical basis for the study of sex determination and male parthenogenesis of *H. cumingii*.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; *kinase X* gene; *Sox9* gene; gene cloning; expression analysis; RNAi

Corresponding author: WANG Guiling. E-mail: glwang@shou.edu.cn

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901406); National Natural Science Foundation of China (31772835); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-49)