三角帆蚌*Tex11*基因的分子特征和表达分析

霍滢朵[1]，曹慕莲[1]，毛颖睿[1],王雅昱[1]，汪桂玲[123]，李家乐[123]
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，201306,
2.上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心，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，201306

一、引言

*Tex11*基因最初被鉴定为小鼠中的 X 连锁、生殖细胞特异性基因。在哺乳动物中，该基因对雄性性腺发育和精子发生至关重要,敲除后导致小鼠精子变形、数量减少。缺乏*Tex11*基因会导致人出现无精症和不育男性减数分裂停滞。但是在贝类中，*Tex11*基因的功能还尚未报道。

三角帆蚌（*Hyriopsis cumingii*）**是我国淡水珍珠行业的主要生产力之一**，在人工养殖的情况下，育珠量能达到80%以上。目前关于三角帆蚌分子调控性腺发育和精子发生未清楚。

本研究通过初次克隆并分析*HC-Tex11*基因，通过荧光定量技术（qRT- PCR）检测了其在多个组织及不同时期雄性性腺中的表达量，以及原位杂交和甲基睾酮浸泡技术对*Hc-Tex11*基因功能进行初探。

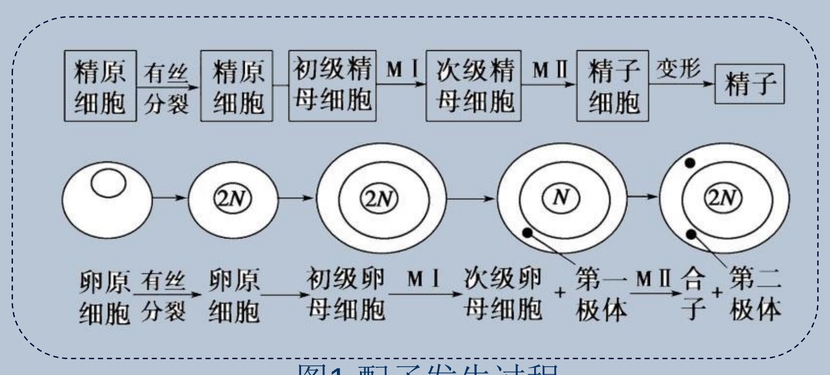
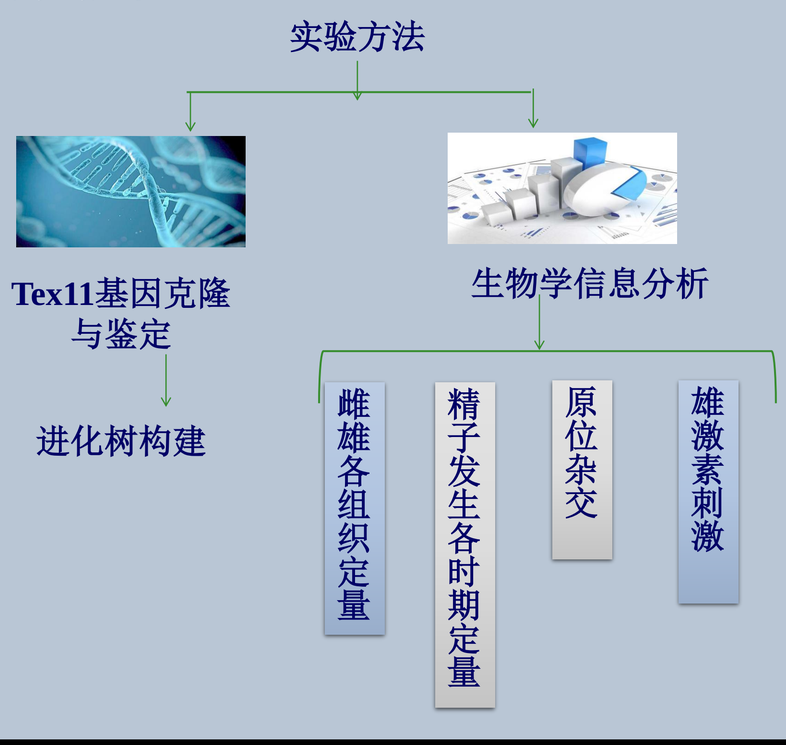


图1.配子发生过程

二、技术路线



三、实验结果

1.进化树比对

分为两大支，脊椎动物和无脊椎动物，其中无脊椎动物中三角帆蚌与其他贝类聚为一支，三角帆蚌的 *Hc-Tex11* 基因与虾夷扇贝和欧洲扇贝亲缘关系较近。

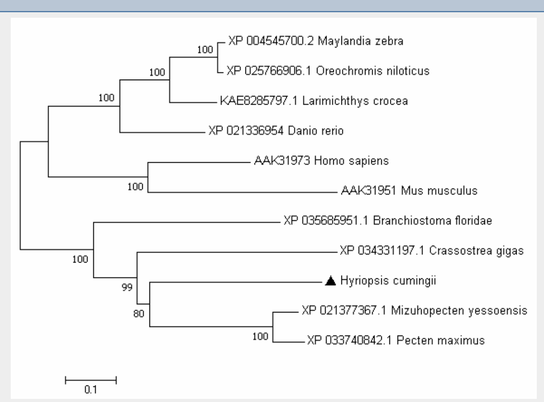


图2 三角帆蚌与其他物种 *Tex11* 蛋白质进化树
注：MEGA7.0 使用 NJ 法构建，节点上的数字表示重复 1000 次的 Bootstrap 检验置信值

2.*Hc-Tex11* 基因在不同组织和不同时期中的表达分析

以 EF1-α 为内参，通过实时荧光定量 PCR 检测 Hc-KLHL10 基因在 2 龄性腺、肾、闭壳肌、外套膜、斧足和肝胰腺 6 个组织。*Hc-Tex11*基因在雄性肝胰腺中表达最高，其次是精巢，且显著高于卵巢。

精子发生包括前、中、后期，随着生殖细胞不断发育，Hc-Tex11基因的表达量逐渐上升，且精子发生后期显著高于前期。

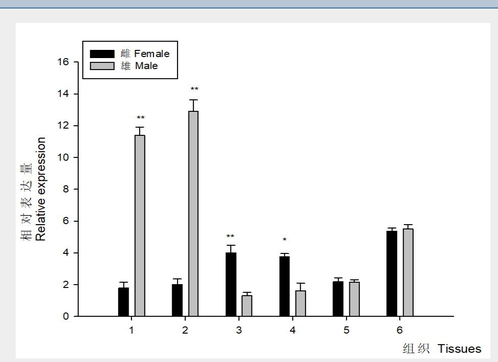


图3 *Hc-Tex11* 基因在雌雄各组织中的表达
1.性腺；2.肝胰腺；3.肾；4.外套膜；5.斧足；6.闭壳肌;*表示雌雄间存在显著性差异（*. 0.01<P<0.05；**. P<0.01）

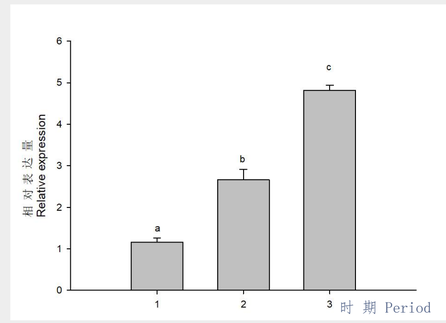


图4 *Hc-Tex11* 基因在各时期中的表达
1.精子发生前期；2.精子发生中期；3.精子发生后期；字母表示各组间存在显著性差异（*. 0.01<P<0.05；**. P<0.01）

3. 原位杂交

对*Hc-Tex11*基因在二龄三角帆蚌雄性和雌性性腺中的表达进行定位分析，结果显示，在雄性滤泡中，在精母细胞观察到信号；在雌性滤泡中无明显信号。

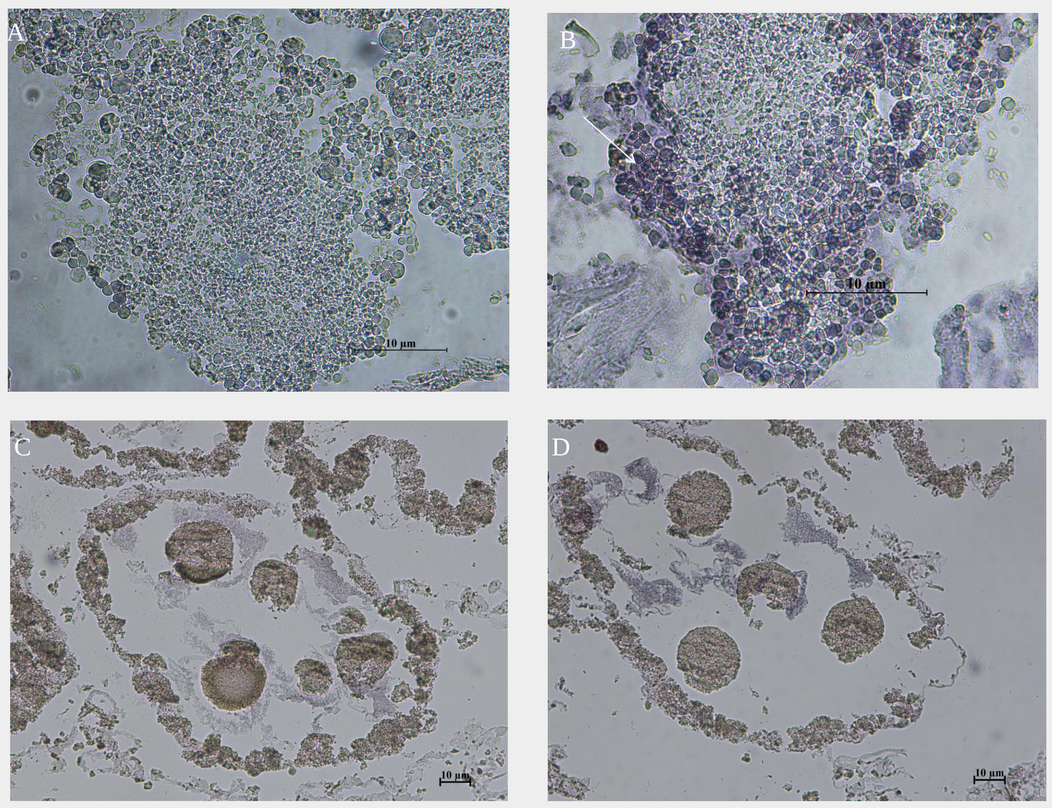


图5 *Hc-Tex11* 基因在雌雄性腺中的原位杂交
A.雄性对照组；B.雄性实验组；C.雌性对照组；D.雌性实验组；箭头所指为信号

4. 甲基睾酮激素刺激

空白组不做任何处理，实验组为2龄雄蚌，并采用200ng/L的甲基睾酮进行刺激，与空白组对比，在第二天Hc-Tex11基因的表达量显著增加。

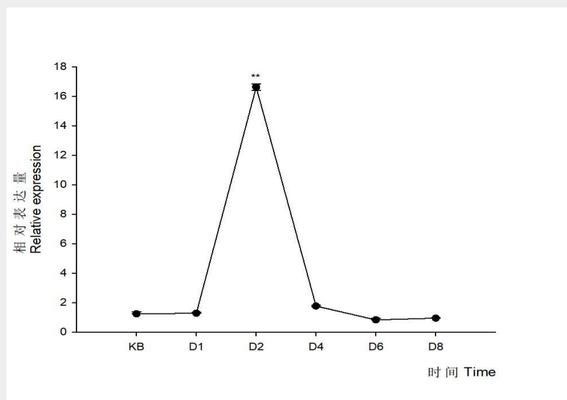


图6 200ng/L甲基睾酮刺激下*Hc-Tex11* 基因表达量
表示与空白组存在显著差异（. 0.01<P<0.05；**. P<0.01）

四、结论

结果显示*Hc-Tex11*基因精巢显著高于卵巢，随着生殖细胞不断发育，*Hc-Tex11*基因在精子发生后期表达最高；原位杂交结果表明，*Hc-Tex11*基因主要在雄性三角帆蚌的精母细胞中检测到表达信号，在雌性三角帆蚌性腺中无明显信号；在200ng/L的甲基睾酮刺激下，雄蚌的*Hc-Tex11*基因在第二天表达显著上升。

由以上实验结果推测，*Tex11*基因可能参与三角帆蚌性腺发育与精子发生。