

文章编号: 1000-0615(2017)07-1096-09

DOI: 10.11964/jfc.20160310313

## SCP3作为栉孔扇贝初级精母细胞标记分子的研究

马晓世, 杨丹丹, 季爱昌, 梁少帅, 马晓茹, 张志峰\*

(中国海洋大学海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 为检验SCP3在无脊椎动物中是否可以标记特定的生殖细胞, 实验利用RACE技术克隆了栉孔扇贝SCP3(*Cf-SCP3*)的全长cDNA序列, 结果显示, 其长度为1 033 bp, 开放阅读框为726 bp, 编码241个氨基酸。推导的氨基酸序列中包含SCP3保守的Cor1结构域和卷曲螺旋结构域。制备了*Cf-SCP3*地高辛标记的RNA探针和*Cf-SCP3*重组蛋白的多克隆抗体, 采用原位杂交和免疫组织化学技术检测其细胞学定位, 结果显示*Cf-SCP3*转录本和*Cf-SCP3*蛋白均特异性地定位在栉孔扇贝的初级精母细胞和未受精卵中, 在精巢的其他类型细胞和卵巢中均未见表达信号。研究表明, *Cf-SCP3*蛋白可能与脊椎动物的SCP3蛋白一样, 作为联会复合体的组成成分参与栉孔扇贝的配子发生, 同时可以作为一个栉孔扇贝初级精母细胞的分子标记应用到体外诱导生殖细胞分化的研究。

**关键词:** 栉孔扇贝; SCP3; 初级精母细胞; 未受精卵; 减数分裂

**中图分类号:** Q 786; S 968.3

**文献标志码:** A

减数分裂是配子成熟过程中特有的分裂方式。在第一次减数分裂前期的偶线期, 同源染色体发生配对, 联会复合体是同源染色体进行配对和联会的结构基础。在哺乳动物中, 已经鉴定了SCP1、SCP2和SCP3这3个联会复合体组成成分, 同时对它们的表达以及相互作用也有了相关的报道<sup>[1]</sup>。SCP3蛋白最早由大鼠初级精母细胞中分离获得, 它含有1个Cor1和2个卷曲螺旋结构域<sup>[2-3]</sup>。随后发现, 小鼠(*Mus musculus*)SCP3的缺失会导致雄性个体生精细胞凋亡, 雌性个体生殖细胞的非整倍体率增加<sup>[4-5]</sup>。Aarabi等<sup>[6]</sup>发现在非梗阻性无精子症的患者(*Homo sapiens*)中, SCP3基因表达量越低, 患者产生的成熟精子数量越少, 生育能力也越低。除哺乳动物以外, SCP3在其他脊椎动物中也有报道。在斑马鱼(*Danio rerio*)精巢中, SCP3只定位在初级精母细胞<sup>[7]</sup>。青鳉(*Oryzias latipes*)的SCP3特异表达在初级精母细胞和卵母细胞中, 有研究认为可以将其作为减数分裂细胞的标记分子用于准确判断青鳉鱼初级性母细胞<sup>[8]</sup>。在雄性虹鳉(*Oncorhynchus*

*mykiss*)中, SCP3转录本也是仅在初级精母细胞中被检测到, 并使用该分子检测初级精母细胞从各时期生精细胞中分离出来的效果<sup>[9]</sup>。

软体动物中有关SCP3的研究仅限几个物种的序列信息<sup>[10-11]</sup>, 该基因是否也像脊椎动物一样, 特异性定位于初级性母细胞中, 目前尚未见报道。本实验克隆了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)SCP3(*Cf-SCP3*)的全长cDNA序列, 采用原位杂交和免疫组化技术, 检测了该基因在精巢和卵巢中的细胞学定位, 旨在揭示*Cf-SCP3*的表达特征, 分析其作为贝类初级性母细胞标记分子的可能性, 为准确判断和筛选贝类初级性母细胞和配子发生分子机制研究提供基础数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

栉孔扇贝由青岛沙子口养殖场采集, 平均壳高为(6.28±0.43)cm。根据组织学特征和性腺指数(GSI), 将栉孔扇贝分为休止期(GSI: 雄贝

收稿日期: 2016-03-17 修回日期: 2016-12-02

资助项目: 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA10A402)

通信作者: 张志峰, E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

3.49%,雌贝3.73%)、增殖期(GSI:雄贝4.38%,雌贝4.32%)、生长期(GSI:雄贝5.42%,雌贝5.39%)和成熟期(GSI:雄贝12.48%,雌贝14.29%)4个发育时期<sup>[12]</sup>。根据公式GSI(%)=性腺重/软体重 $\times 100$ ,计算各时期精巢和卵巢的GSI。

解剖取栉孔扇贝性腺组织,一部分于4%多聚甲醛中固定24 h(4℃),然后置于梯度甲醇(25%,50%,75%和100%)中脱水,并在100%甲醇中保存(-20℃),用于原位杂交和免疫组化实验。另一部分性腺组织立即置于液氮中冷冻,并储存于-80℃用于总RNA和总蛋白提取。

利用阴干流水刺激法诱导成熟期栉孔扇贝排精、产卵。收集未受精卵,再按照成熟精子与成熟卵为10:1的比例进行混合,人工授精后,收集受精卵。按照上述方法固定和保存成熟卵子和受精卵,用于原位杂交和免疫组化实验。

## 1.2 总RNA提取及RACE cDNA第一链合成

按照分子克隆实验指南<sup>[13]</sup>提取生长期精巢组织的总RNA,使用RNase-free的DNase I消除基因组DNA,紫外分光光度仪和1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。使用SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国)并按照操作指南合成RACE cDNA第一链。

## 1.3 全长cDNA克隆及序列分析

从栉孔扇贝转录组数据库中获得SCP3 cDNA片段序列,设计两条RACE引物,5'-RACE: 5'-ATCGTCTGTAGCGACTTTCTCACATTGG-3'和3'-RACE: 5'-ACAGAAGCTTTTCCAGCAAGCCAGAGTG-3'。以生长期精巢cDNA为模板,利用SMART™ RACE cDNA Amplification Kit分别进行5'-和3'-RACE扩增。扩增产物经胶回收、连接pMD18-T载体、转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 后,挑取单菌落,送至华大基因进行测序。

利用DNASTar软件中的SeqMan,将所获得的5'-RACE和3'-RACE片段序列进行拼接以获得全长cDNA序列。BlastX分析目的序列的结构域及相似性高的基因,利用ClustalX进行多序列比对,并将比对结果导入MEGA 5.0软件中,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发生进化树。

## 1.4 原位杂交

根据Cf-SCP3全长cDNA序列设计引物,其中正向引物为5'-GTTGAATTCTCCTTATGGATACTCAACAGC-3',反向引物为5'-CCGAA

GCTTGGATTACCTTTAATTACTTT-3',PCR扩增获得一个316 bp的片段。将扩增产物回收并构建重组质粒,利用DIG RNA Labeling kit (Roche, 瑞士)并按照操作指南进行体外转录,获得Cf-SCP3 DIG标记的RNA探针。

取各发育时期的栉孔扇贝性腺,常规石蜡切片,切片厚度为5  $\mu\text{m}$ 。将切片粘贴到涂有0.1%多聚赖氨酸的载玻片上,37℃烤片10 h后,依次进行二甲苯脱蜡和梯度酒精复水,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K消化15 min(37℃),原位杂交按照Feng等<sup>[14]</sup>所描述的步骤进行。显色结束后利用1%中性红进行复染,封片后使用Nikon E80i显微成像系统进行观察和拍照。

取未受精卵和受精卵,梯度甲醇复水后,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K 37℃作用30 min,其他步骤同上,但无需中性红复染,Nikon E80i显微镜观察并拍照。

## 1.5 抗体制备和免疫印迹

根据Cf-SCP3全长cDNA序列设计一对引物以扩增其全长ORF序列,正向引物为5'-CGCGGATCCATGCCTCCAGCCCGTG-3'(下划线为BamH I酶切位点),反向引物为5'-CCGCTCGAGAAACAACATCGTCTGTAGCGAC-3'(下划线为Xho I酶切位点),以栉孔扇贝生长期精巢cDNA为模板进行PCR扩增。回收和纯化扩增产物并连接pMD-18T载体,再转入DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,送至华大基因测序。将含有目的基因ORF序列的pMD-18T载体与pET-28a表达载体分别用BamH I和Xho I双酶切,回收片段后连接、转化到表达菌BL21中,37℃倒置培养过夜。次日以1:100接种扩大培养,当OD值在600 nm波长下达到0.5时,加入1 mmol/L异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)诱导表达5 h,收集总蛋白。8 mol/L的尿素溶解包涵体蛋白并利用镍柱纯化重组蛋白,将纯化后的蛋白送至上海生工有限公司进行多克隆抗体的制备。

通过western blot检测Cf-SCP3多克隆抗体的有效性和特异性。利用动物组织蛋白提取试剂盒(CoWin, 中国)提取成熟期栉孔扇贝精巢、卵巢、闭壳肌和肝胰腺的总蛋白,SDS-PAGE电泳后,按照正极-5层滤纸-PVDF膜-SDS-PAGE胶-5层滤纸-负极的顺序依次将其放入转膜仪(BIO-RAD, 美国)中15 V电压下转膜30 min。按1:2000

的比例将*Cf*-SCP3多克隆抗体稀释于3% BSA中, 4 °C下孵育过夜, 再用HRP标记的羊抗兔IgG抗体室温孵育3 h, 利用DAB显色试剂盒(Roche, 瑞士)进行显色, 凝胶成像系统中拍照。

## 1.6 免疫组化

取各发育时期的栉孔扇贝性腺, 将制成的切片复水。室温下, 切片于3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(甲醇稀释)中15 min以去除内源性过氧化物酶, EDTA溶液中40 min (85 °C)进行抗原修复。3% BSA室温封闭切片1 h, 按1:2000比例将*Cf*-SCP3多克隆抗体稀释于3% BSA中, 4 °C下孵育过夜。利用HRP标记的羊抗兔IgG抗体室温孵育3 h, 利用DAB显色试剂盒进行显色, 苏木精复染, Nikon E80i显微成像系统进行观察和拍照。

## 2 结果

### 2.1 *Cf*-SCP3全长cDNA的克隆及序列特征分析

通过RACE扩增获得了长为744 bp的5'-RACE片段和长为520 bp的3'-RACE片段。通过拼接, 获得了全长为1033 bp的cDNA序列(GenBank注册号: KT260166), 它由28 bp的5'非翻译区(untranslated region, UTR), 726 bp的开放阅读框(open reading frame, ORF)和279 bp的3'UTR组成。该ORF序列编码241个氨基酸的蛋白, 其预测分子质量为28.26 ku, 等电点为8.86。

Blast分析表明, 该预测蛋白的氨基酸序列包含1个SCP3保守的结构域Cor1和2个卷曲螺旋结构(图1-a)。此外, 它与其他物种的SCP3蛋白具有很高的同源性, 与小狮爪海扇蛤(*Nodipecten subnodosus*)SCP3的一致性高达90%, 与太平洋牡蛎(*C. gigas*)的一致性为71%, 与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的一致性为59%。系统进化分析表明, 该预测蛋白首先与小狮爪海扇蛤SCP3聚为一支, 然后依次与太平洋牡蛎、脊椎动物的非洲爪蟾等聚类(图1-b), 显示该基因的系统进化与物种的系统进化规律基本一致。

### 2.2 *Cf*-SCP3 mRNA在性腺中的细胞学定位

原位杂交结果显示, 在不同发育时期的卵巢内, 无论是卵原细胞还是卵母细胞均未检测到*Cf*-SCP3的表达, 然而在排放后的成熟卵子(未受精卵)中*Cf*-SCP3 mRNA阳性信号明显(图版 I - 1~9)。在精巢中, *Cf*-SCP3特异性地表达在初级

精母细胞中, 其他生精细胞(精原细胞、次级精母细胞、精细胞和精子)中未检测到*Cf*-SCP3的表达(图版 I - 10~15)。此外, 利用正义探针均未在性腺中检测到阳性杂交信号(图版 I - 1、5、7、12和14)。

### 2.3 栉孔扇贝*Cf*-SCP3蛋白在性腺中的细胞学定位

Western blot结果显示, *Cf*-SCP3抗体在栉孔扇贝精巢蛋白提取物中检测出一条特异性条带, 其分子量约为29 ku, 符合预期值。在卵巢、闭壳肌和肝胰腺提取物中均未检测到任何条带(图版 II - 1)。

免疫组化结果显示, *Cf*-SCP3蛋白在卵巢内生殖细胞和受精卵中均未显示阳性信号, 但它特异地表达在成熟卵子(未受精卵)中(图版 II - 2~9)。在精巢中, 阳性杂交信号特异性地出现在初级精母细胞中, 其他类型细胞中未见表达(图版 II - 10~15)。*Cf*-SCP3蛋白在性腺中的细胞学定位与*Cf*-SCP3 mRNA的类似。

## 3 讨论

SCP3蛋白参与调节DNA与染色单体轴的结合、姐妹染色单体的结合以及同源染色体联会和重组<sup>[15-17]</sup>。目前认为SCP3序列中的Cor1结构域在调节姐妹染色单体结合中发挥重要作用, 卷曲螺旋结构域参与纤维合成<sup>[15, 18-19]</sup>。Miyamoto等<sup>[20]</sup>报道, 人SCP3蛋白卷曲螺旋结构域的断裂会导致它在体外与正常联会复合体蛋白间的相互作用下降, 并且干预了其在培养细胞中的纤维形成。本研究显示, 在由克隆的栉孔扇贝全长cDNA序列所推导的氨基酸序列中, 包含SCP3保守的1个Cor1结构域和2个保守的卷曲螺旋结构域, 并且它们与其他物种的SCP3高度保守。因此认为, 本实验获得的cDNA序列为栉孔扇贝SCP3全长cDNA序列, 将其命名为*Cf*-SCP3。

SCP3蛋白在小鼠精巢的初级精母细胞中被首次发现, 随后在人、硬骨鱼类如青鳉、斑马鱼和虹鳟中逐渐被鉴定<sup>[3, 7-9]</sup>。Roig等<sup>[21]</sup>发现, 人SCP3在细线前期的初级卵母细胞细胞核中表达, 并且一直持续到粗线期。在雄性小鼠中, SCP3基因的缺失致使联会复合体无法形成, 并且导致大量的生精细胞凋亡<sup>[4]</sup>。在雌性小鼠减数分裂过程, 卵母细胞SCP3蛋白的缺失引起胚胎



染色体的非整倍体形成而导致死亡<sup>[5]</sup>。尽管 *SCP3* 基因的缺失在雌雄小鼠个体中产生的影响不同, 但该基因都只在性母细胞中表达。由此, 有学者使用 *SCP3* 基因作为性母细胞的标记分子, 以鉴别初级性母细胞, 用于体外诱导生殖细胞分化的研究。Yano 等<sup>[9]</sup>发现, *SCP3* 特异性地表达在虹鳟精巢的初级精母细胞中, 在利用流式细胞术分离出虹鳟精巢各时期生精细胞以后, 将 *SCP3* 用作初级精母细胞的标记分子, 检测其分离效果。Bukovsky 等<sup>[22]</sup>根据 *SCP3* 基因的表达情况, 检测人和猴卵巢中卵细胞的再生。Hübner 等<sup>[23]</sup>使用小鼠 *SCP3* 基因鉴定了由胚胎干细胞体外诱导形成的小鼠卵母细胞是否进入减数分裂。本研究结果显示, *Cf-SCP3* 特异性地表达在栉孔扇贝精巢的初级精母细胞中, 与已报道其他物种 *SCP3* 表达特征一致, 暗示着 *Cf-SCP3* 可能同样作为联会复合体组成成分参与初级精母细胞的减数分裂过程。由此, 提出该基因可以作为作为一个潜在的标记分子, 用于鉴定栉孔扇贝的初级精母细胞。此外, *Cf-SCP3* 在栉孔扇贝卵巢中未见表达信号, 但在排放的成熟卵(未受精卵)中呈现明显的阳性信号, 并在卵子受精后信号消失。任素莲等<sup>[24]</sup>报道, 栉孔扇贝卵子受精后, 其第一极体和第二极体才相继产生, 这说明未受精卵在受精前并未完成第一次减数分裂。因此, 本研究认为, 栉孔扇贝卵母细胞中的联会复合体应该是在卵子排放后的未受精卵中形成的。

#### 参考文献:

- [1] Pelttari J, Hoja M R, Yuan L, *et al.* A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(16): 5667-5677.
- [2] Dobson M J, Pearlman R E, Karaïskakis A, *et al.* Synaptonemal complex proteins: Occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction[J]. *Journal of Cell Science*, 1994, 107(10): 2749-2760.
- [3] Lammers J H, Offenberger H H, Van Aalderen M, *et al.* The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(2): 1137-1146.
- [4] Yuan L, Liu J G, Zhao J, *et al.* The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(1): 73-83.
- [5] Yuan L, Liu J G, Hoja M R, *et al.* Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3[J]. *Science*, 2002, 296(5570): 1115-1118.
- [6] Aarabi M, Modarressi M H, Soltanghorae H, *et al.* Testicular expression of synaptonemal complex protein 3 (*SYCP3*) messenger ribonucleic acid in 110 patients with nonobstructive azoospermia[J]. *Fertility and Sterility*, 2006, 86(2): 325-331.
- [7] Ozaki Y, Saito K, Shinya M, *et al.* Evaluation of *Sycp3*, *Plzf* and *Cyclin B3* expression and suitability as spermatogonia and spermatocyte markers in zebrafish[J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(5-6): 309-315.
- [8] Iwai T, Yoshii A, Yokota T, *et al.* Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*[J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(13): 2528-2537.
- [9] Yano A, Suzuki K, Yoshizaki G. Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout *vasa* regulatory regions[J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(1): 151-158.
- [10] Zhang G F, Fang X D, Guo X M, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [11] Llera-Herrera R, García-Gasca A, Abreu-Goodger C, *et al.* Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e73176.
- [12] Liu X L, Zhang Z F, Shao M Y, *et al.* Sexually dimorphic expression of *foxl2* during gametogenesis in scallop *Chlamys farreri*, conserved with vertebrates[J]. *Development Genes and Evolution*, 2012, 222(5): 279-286.
- [13] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 518-531.

- (in Chinese).
- [14] Feng Z F, Zhang Z F, Shao M Y, *et al.* Developmental expression pattern of the *Fc-vasa-like* gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Aquaculture, 2011, 314(1-4): 202-209.
- [15] Yuan L, Pelttari J, Brundell E, *et al.* The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo[J]. The Journal of Cell Biology, 1998, 142(2): 331-339.
- [16] Liebe B, Alsheimer M, Höög C, *et al.* Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements[J]. Molecular Biology of the Cell, 2004, 15(2): 827-837.
- [17] Parra M T, Viera A, Gómez R, *et al.* Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I[J]. Journal of Cell Science, 2004, 117(7): 1221-1234.
- [18] Moens P B, Spyropoulos B. Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis[J]. Chromosoma, 1995, 104(3): 175-182.
- [19] Baier A, Alsheimer M, Volff J N, *et al.* Synaptonemal complex protein SYCP3 of the rat: Evolutionarily conserved domains and the assembly of higher order structures[J]. Sexual Development, 2007, 1(3): 161-168.
- [20] Miyamoto T, Hasuike S, Yogev L, *et al.* Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in *SYCP3*[J]. The Lancet, 2003, 362(9397): 1714-1719.
- [21] Roig I, Liebe B, Egozcue J, *et al.* Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes[J]. Chromosoma, 2004, 113(1): 22-33.
- [22] Bukovsky A, Caudle M R, Gupta S K, *et al.* Mammalian neo-oogenesis and expression of meiosis-specific protein SCP3 in adult human and monkey ovaries[J]. Cell Cycle, 2008, 7(5): 683-686.
- [23] Hübner K, Fuhrmann G, Christenson L K, *et al.* Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells[J]. Science, 2003, 300(5623): 1251-1256.
- [24] 任素莲, 王德秀, 绳秀珍, 等. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)受精过程的细胞学观察[J]. 海洋湖沼通报, 2000(1): 24-29.
- Ren S, Wang D X, Sheng X Z, *et al.* Cytological observation on fertilization of *Chlamys farreri*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2000(1): 24-29(in Chinese).

## A potential role of SCP3 as a molecular marker of primary spermatocytes in *Chlamys farreri*

MA Xiaoshi, YANG Dandan, JI Aichang, LIANG Shaoshuai, MA Xiaoru, ZHANG Zhifeng\*

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Synaptonemal complex protein 3 (SCP3) is a meiosis-specific component of the synaptonemal complex essential for gametogenesis. In vertebrates, SCP3 protein is specifically localized in primary spermatocytes and many researchers have used it as a molecular marker to identify and separate primary spermatocytes from all types of germ cells. To measure whether SCP3 can mark any specific germ cells in invertebrates, we cloned a 1 033 bp full-length cDNA of *Chlamys farreri* SCP3 (*Cf-SCP3*) that contains a 726 bp open reading frame encoding 241 amino acids with one conserved Cor1 domain and two coiled-coil domains. Then we synthesized the DIG-labeled RNA probe, expressed the *Cf-SCP3* recombinant protein and generated the anti-*Cf-SCP3* polyclonal antibody. *In situ* hybridization and immunohistochemistry observations showed that *Cf-SCP3* transcripts and *Cf-SCP3* protein were specifically expressed in primary spermatocytes and unfertilized eggs, while no expression was detected in any other spermatogenic cells or ovarian cells of *C. farreri*. Thus, it suggested that the *Cf-SCP3* protein might participate in meiosis of gametogenesis as a component of the synaptonemal complex like that in vertebrates and could be used as a candidate molecular marker for identifying the primary spermatocytes in germ cells differentiation study of *C. farreri*.

**Key words:** *Chlamys farreri*; SCP3; primary spermatocyte; unfertilized egg; meiosis

**Corresponding author:** ZHANG Zhifeng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

**Funding projects:** National High Technology Research and Development Program of China (2012AA10A402)

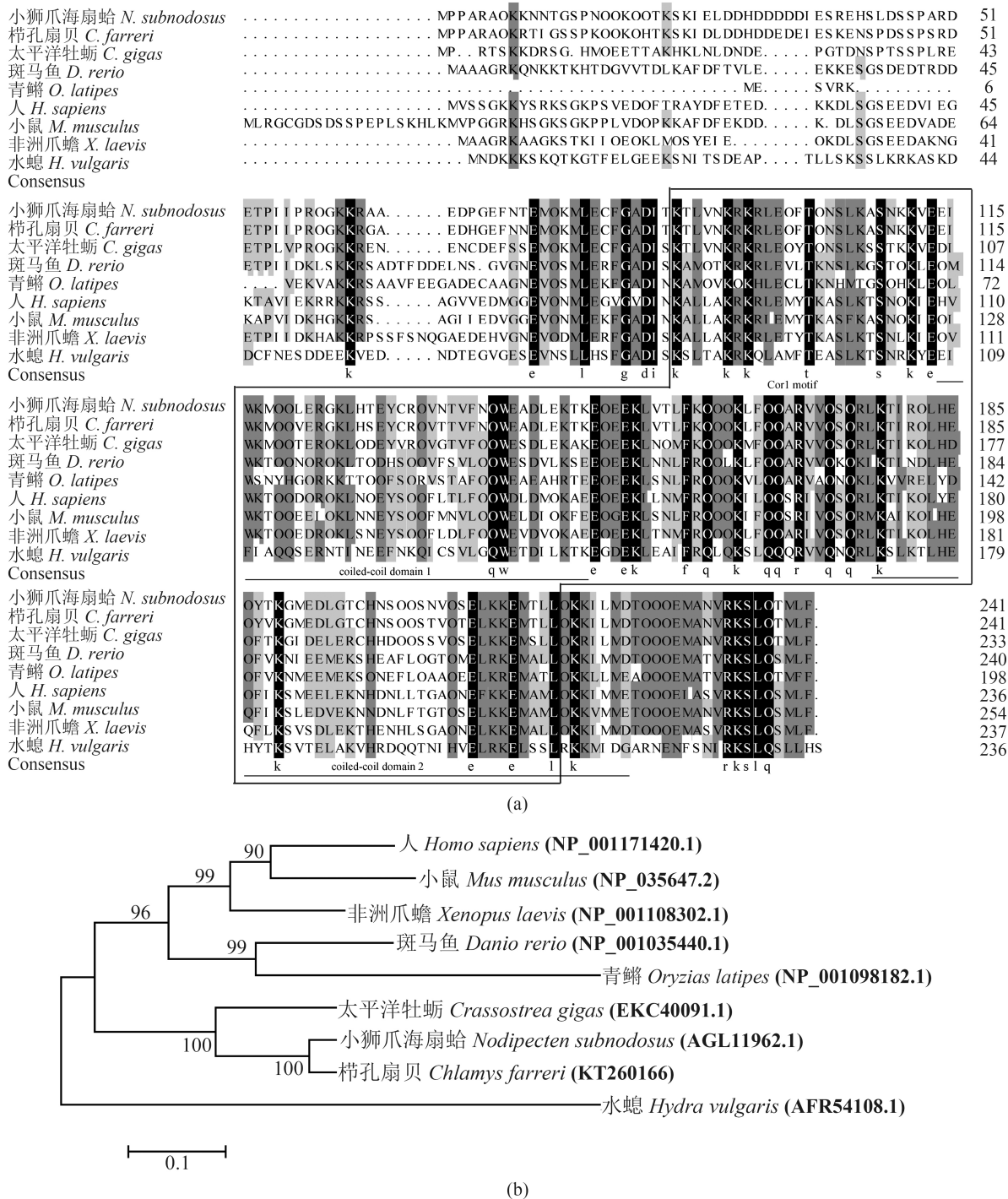
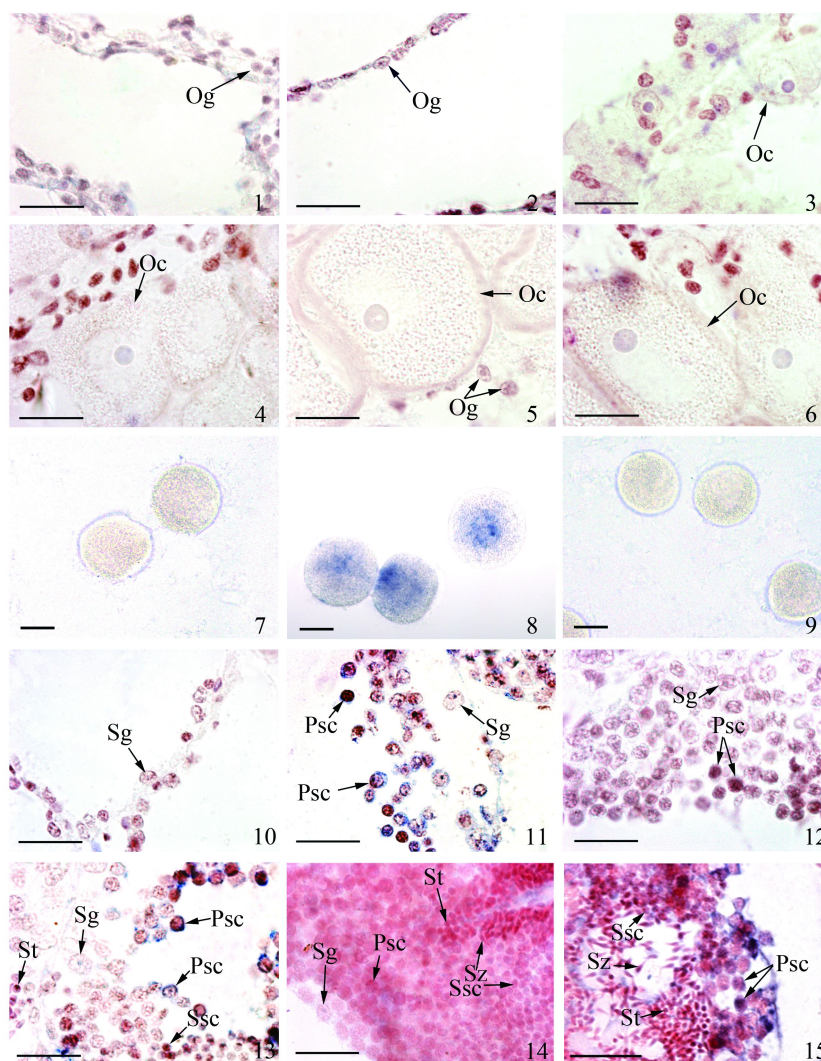


图 1 不同物种SCP3的多序列比对(a)和系统进化分析(b)

Cor1是一个保守的结构域，它代表了染色体轴的组成成分，在图中由方框标出。两个卷曲螺旋结构由下划线标出。其中黑色区代表氨基酸同源性为100%，深灰色区代表氨基酸的同源性为75%以上，浅灰色区代表氨基酸的同源性为50%

Fig. 1 Multiple alignment (a) and phylogenetic analysis (b) of the SCP3 from different species

Cor1, a conserved motif standing for a component of the chromosome core was framed. Two coiled-coil domains were underlined. The black region is 100% homologous sequence among different species, dark gray region is 75%, light gray region is 50%



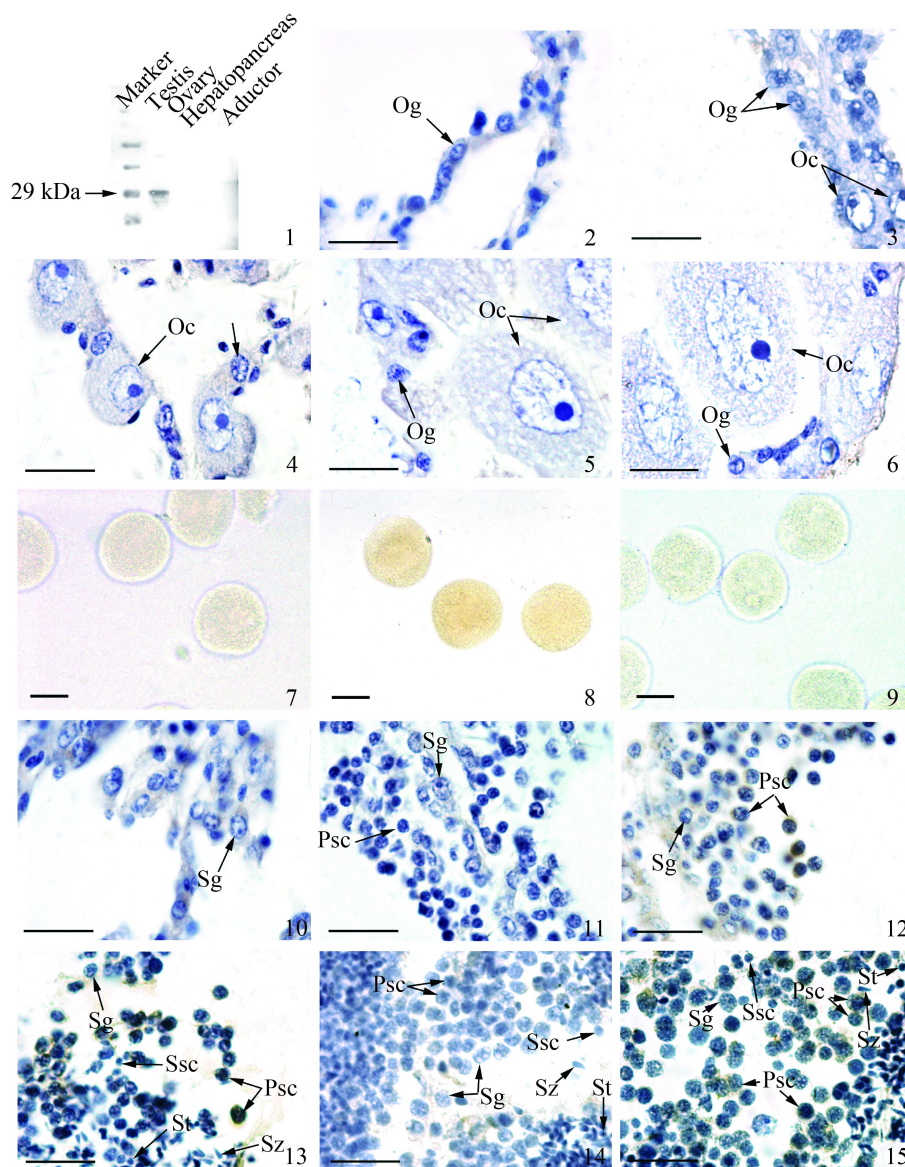
图版 I *Cf-SCP3* mRNA在栉孔扇贝性腺中的细胞学定位

1、5、7、12、14. 以正义探针进行实验的对照, 未见深蓝色显色反应, 其余图为以反义探针进行实验, 阳性信号呈现深蓝色。2, 10. 休止期; 3, 11. 增殖期; 4, 13. 生长期; 6, 15. 成熟期。1~6. 卵巢; 7, 8. 成熟卵子(未受精卵); 9. 受精卵; 10~15. 精巢。Oc. 卵母细胞; Og. 卵原细胞; Psc. 初级精母细胞; Sg. 精原细胞; Ssc. 次级精母细胞; St. 精细胞; Sz. 精子细胞。7~9. 标尺为30  $\mu\text{m}$ , 其余标尺为20  $\mu\text{m}$

#### Plate I Location of the *Cf-SCP3* mRNA in adult *C. farreri* gonads

The negative ISH control conducted with sense probe is not stained in 1, 5, 7, 12 and 14. while the rest conducted with anti-sense probe is stained in dark blue. 2 and 10. resting stage; 3 and 11. proliferative stage; 4 and 13. growing stage; 6 and 15. mature stage. 1~6. ovary; 7, 8. mature oocyte (unfertilized egg); 9. fertilized egg; 10~15. testis. Oc. oocyte; Og. oogonium; Psc. primary spermatocyte; Sg. spermatogonium; Ssc. secondary spermatocyte; St. spermatid; Sz. spermatozoon. Bar for 7~9 is 30  $\mu\text{m}$ , Bar for the rest is 20  $\mu\text{m}$





图版 II *Cf-SCP3*蛋白在栉孔扇贝配子发生过程中的细胞学定位

1. Western blot检测在栉孔扇贝精巢提取物中出现一条特异条带。3、7、11和14.以免疫前血清实验进行的对照,未见棕色显色反应。其余图以以*Cf-SCP3*多克隆抗体进行实验,阳性信号呈现棕色。2, 10.休止期; 4, 12.增殖期; 5, 13.生长期; 6, 15.成熟期。2~6.卵巢; 7, 8.未受精卵; 9.受精卵; 10~15.精巢。Oc.卵母细胞; Og.卵原细胞; Psc.初级精母细胞; Sg.精原细胞; Ssc.次级精母细胞; St.精子细胞; Sz.精子细胞。7~9. 标尺为30  $\mu\text{m}$ , 其余的标尺为20  $\mu\text{m}$

**Plate II Location of the *Cf-SCP3* protein in adult *C. farreri* gonads during gametogenesis**

A specific band was detected in testis extracts by Western blot in 1. The negative control conducted with pre-immune serum is not stained in 3, 7, 11 and 14, while the rest conducted with anti-*Cf-SCP3* antibody was present in brown. 2 and 10. resting stage; 4 and 12. proliferative stage; 5 and 13. growing stage; 6 and 15. mature stage. 2~6. ovary; 7 and 8. unfertilized egg; 9. fertilized egg; 10~15. testis. Oc. oocyte; Og. oogonium; Psc. primary spermatocyte; Sg. Spermatogonium; Ssc. Secondary spermatocyte; St. Spermatid; Sz. Spermatozoon. Bar for 7~9 is 30  $\mu\text{m}$ , Bar for the rest is 20  $\mu\text{m}$