

定量表达和整体原位杂交研究 *Doublesex* 基因 在不同生殖状态蚤状溞的表达

周伟¹, 陈萍¹, 邱成功¹, 周健凯¹, 郭晓鸽¹, 王丹丽^{1*}, 赵云龙^{2*}

(1. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211;

2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 为研究 *doublesex* (*dsx*) 基因在不同生殖状态的蚤状溞的时空表达状况, 提取不同生殖状态的蚤状溞 RNA, 采用 RT-PCR 和 Quantitative real-time PCR 检测了 *dsx* 在不同生殖状态溞体的表达差异, 并通过体外转录制备 DIG 标记的 *Doublesex* 的 RNA 探针; 采用整体原位杂交方法研究 *dsx* 基因在不同生殖状态的蚤状溞的时空表达状况。结果显示, RT-PCR 检测发现 *dsx* 在雌雄溞体没有性别特异性的选择性拼接, 只有一种相同的转录产物。Real-time PCR 显示, *dsx* 在雄溞中表达水平最高, 是孤雌溞的 2.6 倍, 两性雌溞的 4.9 倍, 三者之间有显著性差异, 表现出性别差异性表达。整体原位杂交发现, 在所取样的不同生殖状态溞体中 *dsx* 基因也均有表达, 但其部位与表达量不同, 且在雌雄溞体中表现出性别差异。在雄溞的第一触角和第一胸肢显现得尤为明显, 且在复眼中也有表达。孤雌溞和两性雌溞对应部位表达则相对较弱。结果表明, *dsx* 基因很有可能在调控蚤状溞生殖转换和性别分化上起到很大作用。

关键词: 蚤状溞; *doublesex* 基因; RNA 探针; 整体原位杂交

中图分类号: Q 349.5; S 917.3

文献标志码: A

蚤状溞 (*Daphnia pulex*) 俗称水蚤, 为一种常见的枝角类小型浮游动物, 属节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 鳃足亚纲 (Branchiopoda), 双甲目 (Diplostraca), 枝角亚目 (Cladocera), 溞科 (Daphnia), 溞属 (*Daphnia*)。蚤状溞分布广、易繁殖、适应性强, 易于观察, 个体发育迅速, 发育阶段明显, 是研究动物生殖转化和发育的好材料^[1]。枝角类生殖方式特殊: 当外界条件如光照、食物和种群密度等比较适宜时进行孤雌生殖; 当环境条件恶化时如种群密度、代谢产物及捕食者等^[2-7]的增加时会进行两性生殖, 产生休眠卵度过恶劣的环境。当环境变好时休眠卵又孵化成新的个体, 保证了物种的延续^[8]。两种生殖方式的转换, 是其对外界环境的一种适应, 孤雌生殖有助于其种群的迅速发展, 而两性生殖形成的休眠卵能确保其渡过恶劣环境, 以维持种群

的存在与延续。

枝角类生殖转换受外界环境因子影响很大, 环境恶化时会诱导雄溞的产生和两性雌溞的产生。尽管环境因子对生殖转化有很大的影响, 但有时环境条件的恶化并不会导致枝角类生殖方式的转变或者环境条件良好时仍有雄溞和两性雌溞出现^[9-10]。一些研究还表明用保幼激素类似物 (JHA) 也可以诱导雄性的产生而无需环境因素的诱导, 证明 JHA 是性别决定通路中的一种关键信号分子^[11-12]。因此, 有学者认为枝角类进行两性生殖可能主要是由基因决定, 环境变化在一定程度上仅起诱导作用或者两者协同作用。但是有关枝角类的生殖转换的相关基因及其分子机制尚不明瞭。到目前为止, 有一些研究者^[13-18]已经在家蚕 (*Bombyx mori*)、蜜蜂 (*Apis mellifera*)、蝇蛹金小蜂 (*Nasonia vitripennis*)、大型溞 (*Daphnia*

收稿日期: 2013-07-24 修回日期: 2013-09-19

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31172043); 浙江省自然科学基金项目 (LY12C19003); 上海市科技创新行动计划项目 (12391900700); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903056); 宁波市科技局重大择优项目 (2012C10020)

通信作者: 王丹丽, E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn; 赵云龙, E-mail: ylzhaol@bio.ecnu.edu.cn

<http://www.scxuebao.cn>

magna)等有世代交替生物中发现了一些性别决定基因及它们对两性分化的影响。

doublesex (*dsx*) 基因就是其中研究很多的一个基因。*dsx* 是具有复合基因座的基因,最早在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中发现,是果蝇性别决定基因三级级联通路中的第三级的主要部分,有着雌雄两种转录产物 Dsx-F 和 Dsx-M,它们表达的蛋白质直接决定果蝇的性别发育^[19],而且在很多物种中早期在成年两种性别个体中都有初级转录产物,随后通过选择性拼接在不同性别中产生了不同的 mRNA,进而编码不同的蛋白表现不同的功能^[19-21]。*dsx* 基因编码的蛋白质一般都包含一个叫做 DM 结构域的 DNA 结合模块,该结构域是一个富含半胱氨酸的锌指结构基序,它是 Dsx 蛋白在体内发挥作用的最小的 DNA 结合元件。此外,Dsx 蛋白还控制着卵黄蛋白的表达,以及外周神经系统的感觉通路的形成^[20-21]。可见 *dsx* 基因在性别决定中起着重要的作用。

因此,为了解蚤状蚤的生殖转换和性别分化的分子机制,研究 *dsx* 基因在不同生殖状态下蚤状蚤的表达变化,不仅有利于阐明 *dsx* 基因在蚤状蚤的性别分化与生殖转化中的调控作用,而且为研究枝角类的生殖转换提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蚤状蚤种采自上海闵行区某池塘中,经本实验室鉴定并单克隆培养后保种 3 年以上。体长 (3.2 ± 1.0) μm 。挑选健康活力强的个体暂养于培养箱内,培养温度 (24 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,光周期为 L:D = 14 h:10 h。培养于“Banta 粪土培养液”中(1.5 g 兔子粪 + 2 g 干稻草 + 10 g 土壤 + 950 mL 自来水经煮沸后冷却取上清液),并交叉投喂蛋白小球藻 (*Chlorella pyrenoidosa* Chic),每天投喂 1 次,使其在培养液中的浓度为 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。雄蚤的获得:培养两周后,当蚤密度达到 3 000 只/L 以上时,缸内蚤的生殖方式逐渐转为有性生殖,雄蚤出现。收集发育成熟的孤雌蚤体、两性雌体和雄体各 300 只,不同生殖状态的鉴别采样在 Leica DM500 显微镜下进行。200 只用来进行 RNA 的提取,剩余的用 4% PFA 固定 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,然后换成无水甲醇 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存(原位杂交备用)。

提取总 RNA 的试剂盒和胶回收试剂盒为

Axygen 公司产品;Real-time PCR 采用 TaKaRa 公司的 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒,Nco I 和 Spe I Quick cut 限制性内切酶购自 TaRaKa 公司,反转录试剂盒及其他主要试剂也为 TaKaRa 产品;T7 和 SP6 反转录酶和 PGEM-Teasy 载体购自 Promega 公司;NBT/BCIP Stocking、Dig RNA Labeling Mix 和 Anti-Digoxigenin-AP 购自 Roche 公司;质粒抽提纯化试剂盒为 Omega 公司产品;引物的合成及产物测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2 RT-PCR

提取各生殖状态的蚤状蚤的 RNA,用 PrimeScript[™] RT Master Mix 试剂盒反转录得到第一链 cDNA,以 *dsx* 编码区两端设计引物进行 PCR 扩增,内参选择 GADPH 基因序列内参引物参照 Miyakawa 等^[22]在蚤状蚤中确定的最稳定的引物,产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR)

根据测序验证后所得的蚤状蚤 *dsx* 全长 cDNA 设计实时定量 PCR 引物 DsxF (GCGACGCAGAAGAGTTGTCC)/DsxR (GGC-TGGCAGCAAAATCAACG),内参基因 18S 的特异性引物根据 Miyakawa 等^[22]进行设计。每个生殖状态的样品进行 3 次重复。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环;反应结束后确定 Real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,数据采集和处理在 ABI StepOnePlus[™] Instrument 上进行。试验所得数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示,所测数据以 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,采用 One-Way ANOVA 法进行显著性检验,并用 Duncan 检验法进行多重比较。本实验根据 Lai 等^[23]的方法进行引物的效率检测,PCR 产物的溶解曲线没有杂峰,显示产物特异性好。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析处理 QRT-PCR 结果, ΔC_t 定义为目的基因 (*dsx*) C_t 值与 18S C_t 值的差值,以孤雌蚤组的表达量为 1。

1.4 探针引物设计与合成

首先根据我们已克隆蚤状蚤 *dsx* 序列(登录号:KC470706.1),设计合成探针的引物序列如下,由 Invitrogen 公司合成。以蚤状蚤 cDNA 为模板,将 *dsx* 探针序列克隆至 pGEM-T easy 载体以制备探针,连接转化取阳性克隆测序鉴定。

Dsx-sense CGTCTATCCAACAGTCGCCA

Dsx-antisense TCGATTGATGACCTACGGCG

1.5 线性化的含 *dsx* 探针序列质粒的获得

将含 *dsx* 探针序列质粒的阳性克隆菌扩培养至对数期,收集菌体,用质粒抽提试剂盒提取质粒,步骤参照 Omega 质粒抽提试剂盒。分别选取 pGEM-Teasy 质粒上存在的单一酶切位点对质粒进行线性化,37 °C 酶切 1 h。酶切产物琼脂糖凝胶电泳检测正确后,采用 PCR 纯化试剂盒回收线性化的模板质粒,用 0.1% DEPC 处理的去离子水中重悬于 -20 °C 保存备用。

1.6 合成 RNA 探针

将纯化的线性化的含 *dsx* 探针序列模板质粒作为体外转录的 DNA 模板, DIG RNA Labeling Mix 为底物,参照 Riboprobe® System—SP6 实验程序,体外合成 DIG 标记的正反义 RNA 探针,用无 RNA 酶活性的 DNA 酶处理除去 DNA 模板,然后加入 1/9 体积的 5 mol/L LiCl(DEPC 处理)和 2 倍体积的冰预冷的无水乙醇, -20 °C 下放置过夜。4 °C, 13 000 r/min 离心 30 min,弃上清。用 DEPC 水配制的 70% 酒精洗沉淀,4 °C, 13 000 r/min 离心 5 min,弃上清。超净工作台上放置 10 min,向 RNA 沉淀中加 20 μL DEPC 水,自然溶解,取 1 μL 电泳检测,剩余 -20 °C 冰箱保存。

1.7 整体原位杂交

取“实验材料”中的蚤体甲醇梯度复水至 PBST,每次洗脱 10 min。在含 0.1% Tween-20 的 PBST(下同)中漂洗 30 min 洗脱 2 次。用含 10 μg/mL Proteinase K 的 PBST 37 °C 消化约 15 min。然后 4% PFA, 4 °C 下重新固定 20 min, PBST 漂洗两次。经过 1:1 预杂交液/PBST 震荡漂洗 20 min,预杂交液震荡漂洗 1 h,于 70 °C 预杂交 2 h(预杂交液终浓度:2 × SSC, 50% 去离子甲酰胺, 5 × Denhardt', 0.1 mg/mL 鲑鱼精 DNA, 2% SDS)。预热 100 μL 70 °C 的杂交液(预杂交液里再加入 10% 终浓度硫酸葡聚糖),加入经过变性的正反义 RNA 探针(72 °C 变性 10 min 立刻置于冰上),探针工作浓度为 4 ng/μL。70 °C 过夜杂交(16 h,若信号不够强可以延长至 18 h)。杂交后于 70 °C 下依次经过 50% MABT + 4 × SSC 漂洗 20 min, 50% MABT + 2 × SSC 漂洗 20 min, 2 × SSC 漂洗 20 min, 0.2 × SSC 漂洗 40 min 2 次,然后用 0.5 × PBS 室温下漂洗 20 min 2 次。

用抗体稀释液(1% BSA, 0.4% Triton X-100, 0.5 × PBS, pH 7.4) 37 °C 震荡 1.5 h 封闭非特异

性位点。以 1:5 000 比例稀释 anti-DIG 单抗,于 4 °C 孵育过夜。经过 PBST 漂洗 8 次,每次 20 min。TSM1 漂洗 2 次,每次 20 min, TSM2 漂洗 2 次,每次 20 min。然后用 NBT/BCIP 室温下遮光显色 15 min ~ 24 h。0.5 × PBS 漂洗过夜后,放在 4% PFA 中, 4 °C 下保存。然后用 Leica 显微镜拍照记录,用 Photoshop CS3 编辑图片。

2 结果

2.1 蚤状蚤 *dsx* mRNA 在不同生殖状态下的特异性表达

蚤状蚤的内参基因 GADPH 在雄蚤与两性蚤体内表达相对恒定。*Dsx* 基因条带的大小与 *dsx* 编码区的长度也相符,在 1 000 bp 左右,且仅有单一大小的 cDNA 条带在雌雄蚤体中被检测到,但其表达量有差异,在两性蚤的表达量很少,在雄蚤中表达量则较多。测序结果显示雌雄蚤体中的序列是相同的,可见 *dsx* 在雌雄蚤体没有性别特异性转录产物(图 1)。

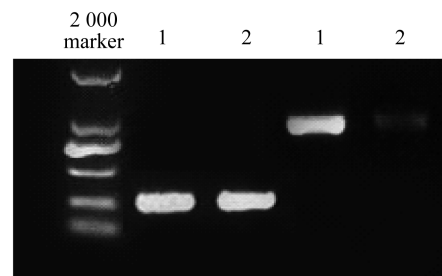


图 1 *dsx* 基因及内参 GADPH 在雄蚤和两性蚤半定量表达电泳图

蓝色 1 为内参 GADPH 在雄蚤的表达带,蓝色 2 为内参 GADPH 在两性蚤的表达带;红色 1 为 *dsx* 基因在雄蚤的表达带,红色 2 为 *dsx* 基因在两性雌蚤的表达带

Fig. 1 *dsx* gene and GADPH gene's semi-quantitative expression electrophoresis in the male and female *D. pulex*

Blue number 1 and 2 showed an internal GADPH expression in male and female *Daphnia*; the red 1 showed expression of *dsx* in the male *Daphnia*; the red 2 indicated *dsx* expression in female *Daphnia*

利用 Real-time PCR 相对定量法分析了蚤状蚤 *dsx* mRNA 在不同生殖状态下的表达,结果显示, *dsx* 在雄蚤中表达水平最高,其次是孤雌蚤、两性蚤(图 2)。在雄蚤中的表达量是孤雌蚤的 2.6 倍,两性雌蚤的 4.9 倍,三者之间有显著性差异($P < 0.05$),表现出性别差异性表达。可见 *dsx*

在不同生殖状态下的表达具有特异性。

2.2 探针合成效果

琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,本实验中设计的引物能够特异性地扩增目标基因片段。图3右的泳道1和2为特异扩增的RNA探针序列,可见条带单一,大小也正好是目的产物片段长度,电泳及测序结果,扩增的RNA探针序列大小约151 bp。其序列如下:

> *Dsx* 探针(151 bp)

CGATTGATGACCTACGGCGGGAGTAGGC-
GGCATGGATTATCGATTTTCACTTTTGGCGCT-
CTTTCTTCCCTGCCCGGCAGTGAGTGTTGCTC-
GGAACGAGGCGGCCTCACTTTCCACAATCT-
GGCGATGGCGACTGTTGGATAGACG

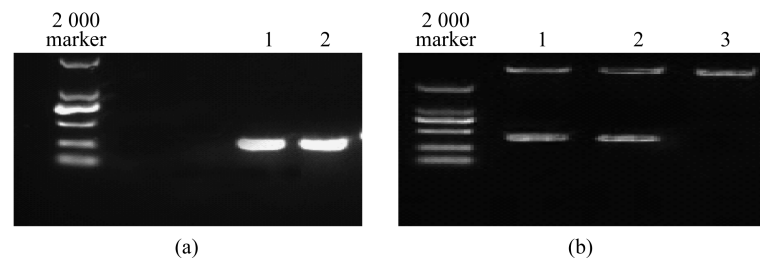


图3 *Dsx* 探针 PCR 电泳图 (a) 和合成探针电泳图 (b)

(a) 1. PCR 产物 (antisense); 2. PCR 产物 (阳性克隆); (b) 1. 上为 SP6 端酶切的线性化质粒, 下为反义 RNA 探针; 2. 上为 T7 端酶切的线性化质粒, 下为正义 RNA 探针; 3. 未酶切质粒

Fig. 3 *Dsx* probe DNA sequence electrophoresis (a) and synthetic probes (RNA) electrophoresis (b)

(a) 1. PCR product (antisense); 2. PCR product (positive clone); (b) 1. SP6' end digested the linearized plasmid (up), the antisense RNA probes (down); 2. the T7' end digested linearized plasmid (up), the sense RNA probes (down); 3. undigested plasmid

2.3 蚤状蚤整体原位杂交

整体原位杂交结果显示, *dsx* mRNA 在所取不同生殖状态的蚤状蚤中都有表达, 但其部位和表达量明显不同。主要在第一触角、复眼和胸肢3个部位表达, 而且在雄蚤和雌蚤的表达量也明显不同, 表现出性别差异。在雄蚤的第一触角和第一胸肢显现尤为明显, 蓝色的阳性信号在复眼, 第一触角和胸肢均清晰可见, 而孤雌蚤和两性雌蚤对应部位表达相对较弱, 为淡淡的紫红色 (图4)。可见 *dsx* mRNA 在两性的表达具有性别差异性。而图5的正义探针对照组则没有蓝色信号。

3 讨论

dsx 基因是一个已知的在昆虫类中重要的性别决定基因。在果蝇性别决定基因三级级联通路中它表达直接决定果蝇的性别发育。*dsx* 基因编

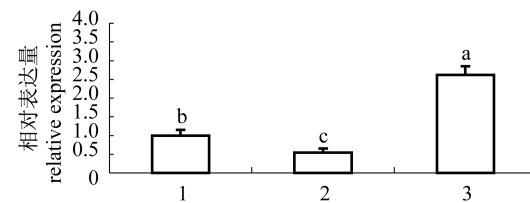


图2 *dsx* mRNA 在蚤状蚤不同生殖状态下的相对表达 (以 18S 为内参)

1. 孤雌蚤; 2. 两性雌蚤; 3. 雄蚤

a, b, c 不同表示 *dsx* 的表达有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Real-time PCR analysis of *dsx* gene expression from different reproductive modes of *D. plux* (18S as reference gene)

1. parthenogenetic female; 2. ehippial female; 3. male

Bars with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

码的蛋白质包含一个叫做 DM 结构域的 DNA 结合模块, 而含 DM 结构域的一些基因, 在性别决定中都起着重要的作用, 如线虫的 *Mab-3* 基因 (一种促雄性个体发育的基因) [20] 含有两个 DM 结构域, 抑制卵黄原蛋白基因的转录 [19]; 高等脊椎动物里的 DMRT 家族基因 [24], 参与雄性的性别决定, 基因的缺失则会导致性反转 [24]。DM 结构域基因是一类在后生动物中很保守的基因, 在性别决定和性别分化中的功能不可或缺, 调控着性别分化并在生殖的一些方面起到很大作用。目前已经发现在很多物种中控制性别发育 [25], 并在性腺发育中促使雄性性腺的发育从而决定性别, 而且控制着雌雄两性在身体组织中的各自表型特征。其中 *dsx* 基因在有世代交替的动物如大型蚤、蜜蜂和家蚕等中已进行相关研究 [14-18]。在大型蚤中, 发现其与昆虫类的 *dsx* 基因性别差异性转录

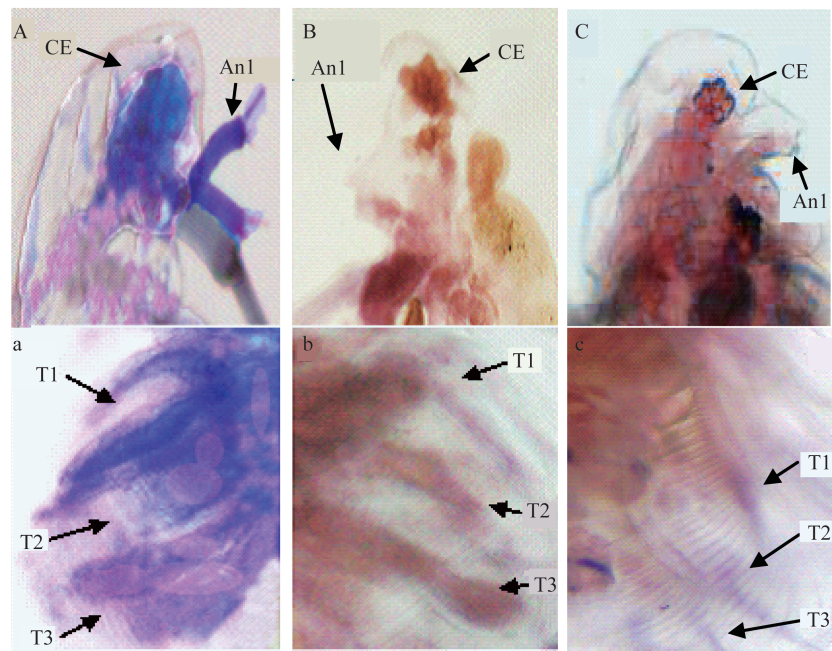


图 4 DIG 标记的 *dsx* (反义探针) 在蚤体中的原位杂交图

A, a. 雄性蚤, 蓝色区域为阳性信号; B, b. 两性蚤; C, c. 孤雌蚤。CE. 复眼; An 1. 第一触角; T1, T2, T3. 胸肢

Fig. 4 Whole mount *in situ* hybridization in the body of the *Daphnia* (DIG labeled *dsx* antisense probe)

A, a figures indicate male *Daphnia*, blue area shows positive signals; B, b figures indicate ephippial female *Daphnia*; C, c figures indicate parthenogenetic female *Daphnia*. CE: compound eye; An 1. The first antenna; T1, T2, T3. thoracic limb

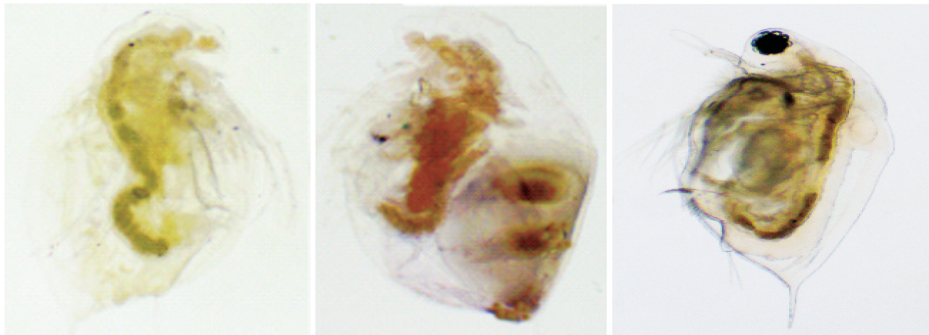


图 5 *dsx* (正义探针) 在蚤体的原位杂交图

从左向右依次为孤雌蚤、两性雌蚤和雄蚤, 可见无蓝色信号

Fig. 5 Whole mount *in situ* hybridization in *Daphnia* (*dsx* sense probe)

From left to right: parthenogenesis, ephippial female and male, which showed no blue signal

不同,没有选择性拼接产生性别不同的 mRNA,而是在雌雄两性中产生不同丰度的同一 mRNA^[18];在蜜蜂中,发现 *Amdsx* 通过不同于果蝇的选择性拼接产生 4 种转录产物:两种雌性的,一种雄性的和一种两性共有的。各自控制着相应的性别发育,但是在雌蜂中也发现了先前雄性特异性的转录产物^[16];在家蚕中, *Bmdsx* 也通过自己独特的性别特异性的选择性拼接产生 3 种雌性转录产物和 1 种雄性转录产物,各自调控着性别特异性的

形态学表型^[14-15]。

本研究先用 RT-PCR 和 Real-time PCR 检测 *dsx* 基因是否存在选择性剪切而产生性别特异性转录产物及在雌雄蚤体中的表达情况。我们对蚤状蚤 *dsx* 编码区进行 RT-PCR 检测只得到单一且大小一致的条带,测序结果也显示雌雄蚤体中的序列是相同的,没有性别特异性差异,可见 *dsx* 在雌雄蚤体不存在性别特异性的选择性拼接,没有性别特异性转录产物。这可能是由于处于性别决

定通路上游的 *Tra* 功能变异导致, Kato 等^[26] 的研究也表明在大型蚤中 *Tra* 没有性别差异性且失去原有的功能。定量表达显示 *dsx* 在蚤状蚤两性之间存在转录量的差异, 即雄蚤中的表达显著高于雌蚤, 这与 Yasuhiko 等^[18] 对大型蚤的 *dsx* 的研究结果一致, 表明 *dsx* 很可能对性别分化调控及在维持雄性的表型上起到作用。而果蝇、家蚕和蜜蜂等的 *dsx* 基因都是性别决定的关键因子^[14-20], 可能在不同物种的体内发挥作用的通路及机理不一样, 但都是调控性别分化的关键因子。

为了确定其在性别分化及在雄性表型的调控作用, 又合成以体外转录 DIG 标记的反义 RNA 探针对蚤状蚤进行整体原位杂交, 研究 *dsx* 在不同生殖状态下的时空表达情况。这也是首次用 *dsx* 基因对蚤状蚤进行的整体原位杂交, 在对蚤体的处理中, 由于蚤状蚤身体由两片几丁质外壳包被增加了探针进去的难度, 因此用超声波对其进行了处理, 发现在 $1 \times \text{PBST}$ 中以 0.5 s , 10% 的超声波功率和 3 s pulses 为一个周期处理 4 次可达到去壳而蚤体组织未碎的效果。另外, 为了增加组织对探针的通透性, 对蛋白酶 K 的浓度及处理时间是实验成败的关键, 发现以 $10 \mu\text{g/mL}$ 的浓度处理 15 min 效果较好。为了验证实验的特异性, 平行做了正义探针实验组, 结果显示在雌雄蚤体中均无特异性表达, 说明 *dsx* 反义探针的特异性。

Dsx 的 mRNA 在雄蚤的第一触角和第一胸肢表达的尤为明显, 而两性蚤对应部位表达相对较弱。Olmstead 等^[27] 和 Duggan 等^[28] 研究表明在大型蚤和蚤状蚤中雄性第一触角具有形态学特异性, Mitchell 等^[29] 研究表明在大型蚤中雄性第一胸肢具有形态学特异性器官交配钩, 这些都表明雄性形态学特异性结构是第一胸肢和第一触角。本研究显示 *dsx* 在雄蚤的第一触角和第一胸肢的表达尤为明显, 说明 *dsx* 可能对雄性表型调控起到关键作用, 与 Yasuhiko 等^[18] 对大型蚤的 *dsx* 的研究和 Tsuguru 等^[14] 在家蚕中过量表达 *dsx* 诱导了家蚕的雄性特异性器官的形成的研究结果一致。可见 *dsx* 的 mRNA 在两性的表达具有性别差异性, 对雄性的表型起到重要作用。而在雄性的复眼中也检测到其大量表达, 这种性别表达差异报道较少, 可能跟有学者认为的光周期影响性别分化有关^[22], 具体的机理还有待研究。

这表明 *dsx* 基因很有可能在调控生殖转化和性别分化上起到很大作用。那么, 究竟 *dsx* 基因在蚤状蚤中的具体作用如何以及其作用的机理等问题, 我们今后通过 RNA 干扰、过量表达以及免疫组化技术等去进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] 蒋燮治, 堵南山. 中国动物志: 节肢动物门甲壳纲淡水枝角类[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 1-297.
- [2] Harris K D M, Bartlett N J, Lloyd V K. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism[J]. *Genetics Research International*, 2012, 2012: 1-5.
- [3] 张明凤, 赵云龙, 曾错, 等. 隆线蚤雄性生殖系统的组织学研究[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2004, 118(4): 111-116.
- [4] Khmeleva N N, Golubev A P, Kidava A. Growth and reproduction of *Daphnia magna* under change in photoperiod and temperature conditions[J]. *Doklady Akademii Nauk Belarusi*, 1995, 39(3): 71-74.
- [5] Vandegehuchte M B, Janssen C R. Epigenetics and its implications for ecotoxicology[J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(3): 607-624.
- [6] 王岩, 何志辉, 蔡云. 温度和盐度对蒙古裸腹发育的影响[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(1): 8-14.
- [7] 陈桃英, 王岩. 连续孤雌生殖对蒙古裸腹繁殖能力的影响[J]. 水产学报, 2002, 26(6): 498-502.
- [8] Grebelnyi S D. Influence of parthenogenetic reproduction on the genotypic constitution and evolutionary success of population and species[J]. *Hydrobiologia*, 1996, 320(1-3): 55-61.
- [9] Innes D J, Singleton D R. Variation in allocation to sexual and asexual reproduction among clones of cyclically parthenogenetic *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera)[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2000, 71(4): 771-787.
- [10] 曹文清, 林元烧, 郭东晖. 若干生态因子对蒙古裸腹蚤生殖方式转变效应的实验[J]. 台湾海峡, 2001, 20(增刊): 190-195.
- [11] Lampert W, Lampert K P, Larsson P. Induction of male production in clone of *Daphnia pulex* by the juvenoid hormone methyl farnesoate under short photoperiod[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2012, 156(2): 130-133.
- [12] Olmstead A W, LeBlanc G A. The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a crustacean[J]. *International Journal of Biological*

- Sciences,2007,3(2):77.
- [13] 罗文,曾文涛,王东方. 镉诱导隆线溞 (*Daphnia carinata*) 生殖转化基因差减 cDNA 文库的构建与分析[J]. 海洋与湖沼,2012,43(7):858 – 862.
- [14] Fujii T, Shimada T. Sex determination in the silkworm *Bombyx mori*; A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade [C]. Seminars in Cell & Developmental Biology,2007,18(3):379 – 388.
- [15] Duan J,Xu H, Wang F, *et al.* Novel female-specific trans-spliced and alternative-splice forms of *dsx* in the silkworm *Bombyx mori* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 431(3):631 – 635.
- [16] Cho S,Huang Z Y,Zhang J. Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway[J]. Genetics,2007,177(3):1733 – 1741.
- [17] Oliveira D C, Werren J H, Verhulst E C, *et al.* Identification and characterization of the *doublesex* gene of *Nasonia* [J]. Insect Molecular Biology, 2009,18(3):315 – 324.
- [18] Yasuhiko K,Kaoru K,Hajime W. Environmental sex determination in the branchiopod Crustacean *Daphnia magna*; Deep conservation of *Doublesex* gene in the sex-determining pathway [J]. PLoS One, 2011, 7(3):e1001345.
- [19] Shukla J N, Nagaraju J. *Doublesex*: A conserved downstream gene controlled by diverse upstream regulators[J]. Journal of Genetics, 2010, 89(3):341 – 356.
- [20] Mercedes A,Maria F R,Lucas S. Effect of the gene *doublesex* of *anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila* [J]. PLoS ONE,2009,4(4):1 – 3.
- [21] Rideout E J,Dornan A J,Neville M C,*et al.* Control of sexual differentiation and behavior by the *doublesex* gene in *Drosophila melanogaster* [J]. Nature Neuroscience,2010,13(4):458 – 466.
- [22] Miyakawa H,Maki I,Naoki S. Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex* [J]. BMC Developmental Biology, 2010,10(1):3 – 10.
- [23] Lai C Y,Cheng W,Kuo C M. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2005,18(5):417 – 430.
- [24] Veith A M,Klattig J,Dettai A,Schmidt C,Englert C,Volff J N. Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less Dmrt8 genes in the mouse [J]. Genomics,2006,88(2):185 – 195.
- [25] Matson C K,Zarkower D. Sex and the singular DM domain; insights into sexual regulation, evolution and plasticity [J]. Nature Reviews Genetics, 2012, 13(3):163 – 174.
- [26] Kato Y, Kobayashi K, Oda S, *et al.* Sequence divergence and expression of a transformer gene in the branchiopod crustacean *Daphnia magna* [J]. Genomics,2010,95(3):160 – 165.
- [27] Olmstead A W,LeBlanc G A. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, 19(8):2107 – 2113.
- [28] Duggan I C, Robinson K V, Burns C W, *et al.* Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses; North American *Daphnia pulex* in New Zealand fresh waters [J]. Aquatic Invasions, 2012, 7(4):585 – 590.
- [29] Mitchell S E. Intersex and male development in *Daphnia magna* [J]. Hydrobiologia,2001,442(1 – 3):145 – 156.

***Doublesex* gene expression of *Daphnia pulex* during different modes of reproduction by using whole mount *in situ* hybridization and quantitative expression**

ZHOU Wei¹, CHEN Ping¹, QIU Chenggong¹, ZHOU Jiankai¹,
GUO Xiaoge¹, WANG Danli^{1*}, ZHAO Yunlong^{2*}

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Life of Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: To analyze the expression pattern of *Doublesex*(*dsx*) of *Daphnia pulex* in different reproductive modes, we extracted total RNA of different reproductive modes' *Daphnia pulex*. Using RT-PCR and Quantitative real-time PCR analyzed *dsx* expression in different reproductive modes' daphnias. In addition, we synthesized DIG labeled RNA probe of *dsx* by *in vitro* transcription and used whole mount *in situ* hybridization researching *dsx* location expression in different reproductive modes' daphnia. Results showed that *dsx* in male and female had no gender specificity of alternative splicing, only a same transcription. Real-time PCR showed *dsx* highest expression level was in male, which was parthenogenetic female's 2.6 times and 4.9 times that of the female. They had significant difference ($P < 0.05$) and gender differences in expression each other. Whole mount *in situ* hybridization found that *dsx* gene was expressed in the somatic tissue in different from reproductive modes' daphnia, but the difference in quantity and parts. The expression also showed the gender differences in male and female. In male the signals were revealed in the first antenna, the first thoracic limb and the compound eye. The parthenogenetic female and sexual female corresponding sites' expressions were relatively weak. These suggested that *Doublesex* gene likely played a significant role in alternation of generation and sexual differentiation.

Key words: *Daphnia pulex*; *doublesex*(*dsx*); RNA antisense probe; whole mount *in situ* hybridization

Corresponding author: WANG Danli. E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn;

ZHAO Yunlong. E-mail: ylzha@bio.ecnu.edu.cn