

文章编号: 1004 - 2490(2021)04 - 0430 - 12

# 栉孔扇贝 *FTZ-F1* 基因的序列特征及表达分析

慕雪娇, 刘晓玲, 俞 晗, 崔龙波

(烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

**摘 要:** 为研究栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) *FTZ-F1* 基因功能, 对其序列特征和表达模式进行了分析。结果显示, 该基因编码序列 (coding sequences, CDS) 长 1 668 bp, 编码 555 个氨基酸, 含 DBD (DNA binding domain) 保守区、*FTZ-F1* 盒 (*FTZ-F1* box)、LBD (ligand binding domain) 保守区, 其保守区与其他物种较为一致。采用半定量 PCR (RT-PCR) 和荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法检测了 *FTZ-F1* 基因在栉孔扇贝中的表达, 发现在雌性栉孔扇贝的闭壳肌、肾、鳃组织和雄性栉孔扇贝的精巢、肝胰腺、闭壳肌、肾中表达较强, 在其他组织中表达较弱; 在性腺发育周期中, *FTZ-F1* 基因主要在成熟期精巢中表达, 表达量显著高于其他时期性腺, 表明 *FTZ-F1* 基因主要在成熟期精巢中发挥重要作用, 推测可能与成熟期精巢睾酮含量升高相关。

**关键词:** 栉孔扇贝; *FTZ-F1*; 序列特征; 表达

**中图分类号:** S 917.4      **文献标志码:** A

*FTZ-F1* 基因最初作为果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 早期胚胎形成阶段分化基因 *fiz* 的同源异形盒被发现<sup>[1]</sup>。在哺乳动物中, 根据其功能和表达模式分为两个亚族, 一个亚族主要在胰腺、肝脏、肠和卵巢中表达, 参与胆固醇和胆汁酸代谢的调控<sup>[2]</sup>, 称为肝脏受体激素/甲胎蛋白转录因子 (*LRH-1/FTF*) 或 *NR5A2*<sup>[3]</sup>, 另一个亚族主要在肾上腺皮质、卵巢、精巢、胎盘、脂肪和脑中表达, 是下丘脑-垂体-性腺轴和肾上腺皮质内分泌功能的重要调节因子, 在性腺分化中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 称为类固醇生成因子-1/肾上腺 4 结合蛋白 (*SF-1/Ad4BP*)<sup>[6]</sup>, *SF-1* 在性腺中的表达呈现二态性, 以小鼠 (*Mus musculus*) 为例, 当两性出现形态学差异时, 在雌性中表达会降低<sup>[7]</sup>, 因此认为其可能与性别决定有关<sup>[8]</sup>。

随着研究深入, 越来越多低等生物的 *FTZ-F1* 基因也逐渐被发现, 但在低等生物中, *FTZ-F1* 基因的亚家族分类、命名和表达并不完全与哺乳动物相同, 相对于高等哺乳动物可明确分为两个

亚族而言 (根据其功能和表达模式), 低等生物 *FTZ-F1* 基因的表达和功能可能更加复杂和多样。例如, YOSHIURA 和 SENTHILKUMARAN<sup>[9]</sup> 对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *FTZ-F1* 基因的表达特征分析发现, 相对于 *NR5A2* 亚家族, *FTZ-F1* 基因表达模式更倾向于和 *SF-1* 聚为一类, 认为该 *FTZ-F1* 基因应归类到尼罗罗非鱼 *SF-1* 亚家族; 但郭变<sup>[10]</sup> 对尼罗罗非鱼的 *FTZ-F1* 基因进行序列比对发现, 该基因与 *SF-1* 亚家族并不能聚为一类, 而应属于 *NR5A4* 亚族。斑马鱼 (*Danio rerio*) 中发现 4 种 *FTZ-F1* 基因, 对其序列进行比对分析后发现, 斑马鱼 *ff1a* 和 *ff1* 基因可被归类于 *NR5A2* 亚家族, 但这两种基因的表达模式和功能却与哺乳动物 *NR5A2* 不相符<sup>[11]</sup>。郭变<sup>[10]</sup> 对泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 和大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) *FTZ-F1* 基因的研究发现, *FTZ-F1* 基因在序列上与 *NR5A2* 亚家族的同源性高于 *SF-1*, 但其表达特征却与高等脊椎动物的 *SF-1* 表达特征更相似, 同时其又在肝脏

收稿日期: 2020 - 10 - 15

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系建设专项资金 (SDAIT-14)

作者简介: 慕雪娇 (1996—), 女, 山东栖霞人, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: mxjj2015@163.com

通信作者: 刘晓玲, 副教授。E-mail: lxl2008i@163.com

中表达,说明也具有 *NR5A2* 的特性。上述研究表明,在低等生物中 *FTZ-F1* 基因的亚家族归类要考虑该基因的序列分析和表达特征等多方面因素。

目前为止, *FTZ-F1* 相关研究大都针对脊椎动物开展,无脊椎动物中研究相对较少。对刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) *FTZ-F1* 在成虾卵巢、睾丸、眼柄、表皮和新孵化的无节幼体中的表达研究发现,其在以上组织中均有表达,认为该基因在对虾早期胚胎和幼体发育中发挥作用,在表皮中的表达表明该基因可能参与了蜕皮过程,但其他组织中的作用未进行深入分析<sup>[12]</sup>。大型溞 (*Daphnia magna*) 中发现了两种 *FTZ-F1* 亚型,收集雌雄胚胎进行表达研究发现,在单细胞和原肠胚期,两种亚型在雄性中的表达量都是雌性的两倍,认为该基因可能是大型溞环境性别决定机制中产生雄性个体所必需的<sup>[13]</sup>。在中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 中发现该基因属于 *NR5A2*,在心脏、肝脏、脾脏、脑、胃、肌肉、精巢、卵巢中均有表达,在肝脏和卵巢中表达量较高,推测其可能在中华鳖生殖功能和肝功能调控中有重要作用,在性腺分化初期表达量最高,随后显著下降,表明该基因可能参与中华鳖的性别分化过程<sup>[14]</sup>。对埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)<sup>[15]</sup> 及三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)<sup>[16]</sup> 中该基因的研究主要集中在蜕皮方面,认为该基因在蜕皮过程中发挥调控作用。软体动物中仅见紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*)、虎斑乌贼 (*Sepia pharaonis*)、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、葡萄牙牡蛎 (*Crassostrea angulata*) 等多数来源于基因组测序获得的 *FTZ-F1* 亚家族基因序列,但尚未见表达相关研究。

栉孔扇贝是一种雌雄异体且性别稳定的双壳贝类,是我国北方沿海重要的经济贝类<sup>[17]</sup>。栉孔扇贝的性别和性腺分化相关基因研究对于掌握其性别形成的机理具有理论意义。本研究通过对栉孔扇贝 *FTZ-F1* 基因序列特征、组织表达特征、性腺发育周期表达特征的检测和分析,一方面为研究 *FTZ-F1* 基因在栉孔扇贝性腺分化和发育中发挥的作用提供基础资料,另一方面为了解 *FTZ-F1* 基因在软体动物中的表达模式研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

栉孔扇贝购自烟台大学附近海鲜市场,于实验室的过滤海水中暂养 1 d,选取活力旺盛的扇贝进行取样。取各发育时期的性腺,一部分用 Bouin's 液固定,后通过组织切片进行发育时期鉴定<sup>[18]</sup>,另一部分存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱,用于 RNA 提取;选取发育同步的雌雄个体各组织(含性腺、鳃、肝脏、肾脏、外套膜、闭壳肌)于液氮中速冻后存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱,以备 RNA 提取。以上样本取样个体数各为 3 个。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 的合成

异硫氰酸胍法提取各组织 RNA<sup>[19]</sup>,相关试剂购自上海生工生物公司。提取的 RNA 经 NanoDrop ND-2000 超微量分光光度计进行浓度与 OD 值检测,琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的完整性。检验合格的 RNA 按 Evo M-MLV 试剂盒说明书反转录成 cDNA,并保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱备用,实验所用反转录试剂盒购自北京宝日医生物技术有限公司。

### 1.3 *FTZ-F1* 基因序列获得与分析

根据实验室已有的转录组数据<sup>①</sup>设计 *FTZ-F1* 基因扩增引物(表 1)。以栉孔扇贝性腺 cDNA 为模板进行 PCR 反应,PCR 程序如下: $94^{\circ}\text{C}$  5 min、( $94^{\circ}\text{C}$  50 s,  $48^{\circ}\text{C}$  45 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min 50 s)  $\times$  38 个循环; $72^{\circ}\text{C}$  10 min,获得的产物送华大基因测序。对测得序列进行分析:利用 Clustal X 和 DNAMAN 软件进行同源序列比对;利用 Clustal X 和 MEGA4 软件,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。利用 Swiss-Model 同源建模服务器,预测 *FTZ-F1* 蛋白三维结构。

### 1.4 各组织的 RT-PCR

每个组织分别取 3 个不同个体的对应 RNA 样,按比例混合后用于后续实验。*FTZ-F1* 的 RT-PCR 引物为 P3/P4,  $\beta$ -actin 作为内参基因,其引物为 A3/A4。不同组织中 cDNA 作为模板,以 A3/A4 为引物进行扩增,扩增程序如下: $94^{\circ}\text{C}$  2 min、( $94^{\circ}\text{C}$  30 s,  $56^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  30 s)  $\times$  23 个循环。PCR 产物经凝胶电泳检测,根据各组织条带亮度重新调整模板量,直到检测出各组织模板扩增出的内参基因 PCR 条带亮度相似,以上确定的模

①本实验室未发表数据

板量进行 *FTZ-F1* 片段扩增, 获得产物后电泳检测拍照。

### 1.5 性腺周期的 qRT-PCR

分别取增殖期、生长期、成熟期的雌雄性腺, 提取 RNA 后分别反转录成 cDNA, qRT-PCR 特异引物为 P3/P4 (表 1), 内参基因  $\beta$ -actin 引物为 A3/A4。每个发育时期性腺设置 3 个样品重复, 每个样本设置 2 个技术重复, 使用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪检测, 程序如下 95 °C 10 min、(95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s) × 40 个循环。设生长期精巢目的基因表达量为 1, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因相对表达量。以 SPSS 软件包中 one-way ANOVA 进行显著性分析, 最小显著差法 (least significant difference, LSD) 多重检验法进行统计分析 ( $P < 0.05$  为显著水平), 用

Origin85 软件进行做图。

## 2 结果与分析

### 2.1 栉孔扇贝的性腺发育周期组织切片

组织切片结果如图 1 所示, 在图 1-a 和图 1-d 中可以观察到精巢和卵巢的滤泡壁上仅形成了一层或者两层生殖细胞, 表明此时扇贝的性腺已进入增殖期; 在图 1-b 和图 1-e 中已经能够观察到明显的滤泡腔, 并且在滤泡壁上已经形成多层生殖细胞, 表明此时扇贝的性腺已经进入生长期; 在图 1-c 和图 1-f 中精巢和卵巢的滤泡腔内已经充满生殖细胞, 精巢出现大量精子, 卵巢中成熟卵被挤压, 呈不规则形状, 表明此时扇贝性腺已经进入成熟期<sup>[18]</sup>。

表 1 本实验所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences used in the study

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Usage
P1	ATGATACAACACATGGAAAAGT	基因扩增
P2	TCATTTTTCTTTGAGTGTAGC	基因扩增
P3	TAGAGGCAGTGTAGACAGGATAGAA	半定量及荧光定量 PCR
P4	GATTGCTGGGTCGGGTTTA	半定量及荧光定量 PCR
A3	TTCTTGGGAATGGAATCTGC	内参基因
A4	GCCAGACTGCTCGTATTCTCCT	内参基因

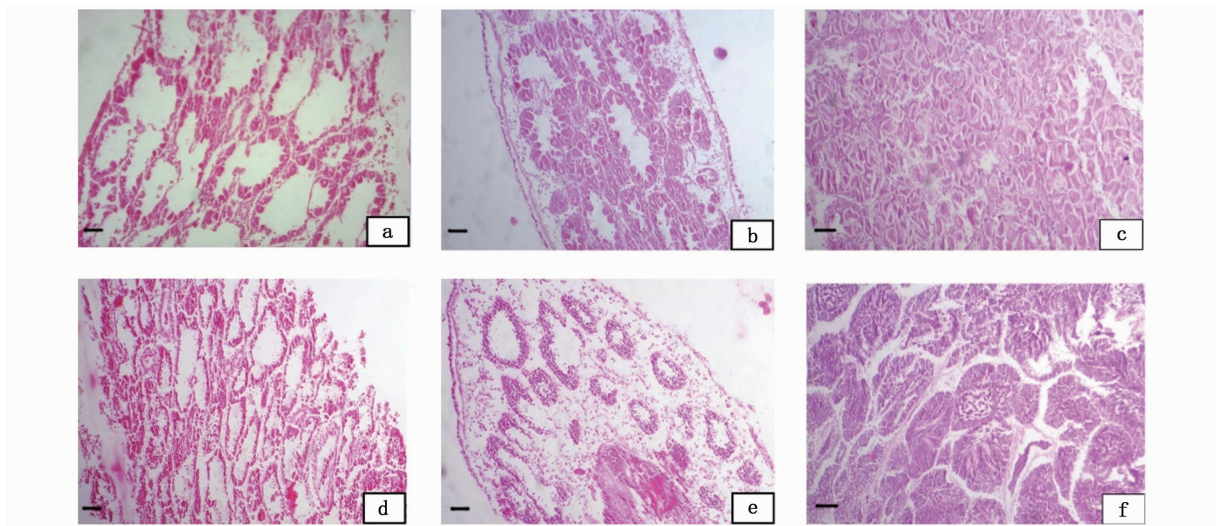


图 1 栉孔扇贝不同发育时期的性腺组织学观察

Fig. 1 Histological observation on gonads of *Chlamys farreri* in different developmental phases

注: a. 卵巢(增殖期); b. 卵巢(生长期); c. 卵巢(成熟期); d. 精巢(增殖期); e. 精巢(生长期); f. 精巢(成熟期)。标尺 = 50 μm

Note: a. ovary (proliferative stage); b. ovary (growing stage); c. ovary (mature stage); d. testis (proliferative stage); e. testis (growing stage); f. testis (mature stage). Bar = 50 μm

### 2.2 系统进化分析

如图 2 所示,无脊椎动物的 FTZ-F1 蛋白聚为一类、脊椎动物的 FTZ-F1 蛋白聚为一类;栉孔扇贝 FTZ-F1 蛋白首先与紫贻贝的 NR5A2 聚类,再与太平洋牡蛎的 SF-1 及葡萄牙牡蛎的 FTZ-F1 聚类,之后与虎斑乌贼 NR5A2 聚类,所显示的系统进化关系与物种的分类地位基本一致。但低等生物中关于 *FTZ-F1* 基因的研究较少,不能通过聚类分析明确栉孔扇贝在同源性上与 *SF-1* 还是 *NR5A2* 更为接近。

### 2.3 目的基因序列特征分析

如图 3 所示,栉孔扇贝 *FTZ-F1* 基因 CDS 长 1 668 bp,编码 555 个氨基酸,含有 DBD 和 LBD

(LBD 区域里含有一个激活功能域 AF-2),*FTZ-F1* 蛋白三维结构预测也显示了这两个保守区(图 4)。不同物种多序列比对结果如图 5 所示,在栉孔扇贝中该蛋白的保守区与其他物种的保守区较为一致,并也含有 *FTZ-F1* 家族特有的 FTZ-F1 盒。

### 2.4 *FTZ-F1* 基因的组织表达结果

RT-PCR 结果显示(图 6,图 7),*FTZ-F1* 基因在栉孔扇贝的多个组织中广泛表达,在雌性个体中,该基因在闭壳肌、肾、鳃中表达比较明显,在外套膜、肝胰腺和卵巢中表达相对较弱;在雄性个体中,该基因在精巢、闭壳肌、肝脏和肾中表达较强,在外套膜和鳃中表达相对较弱。

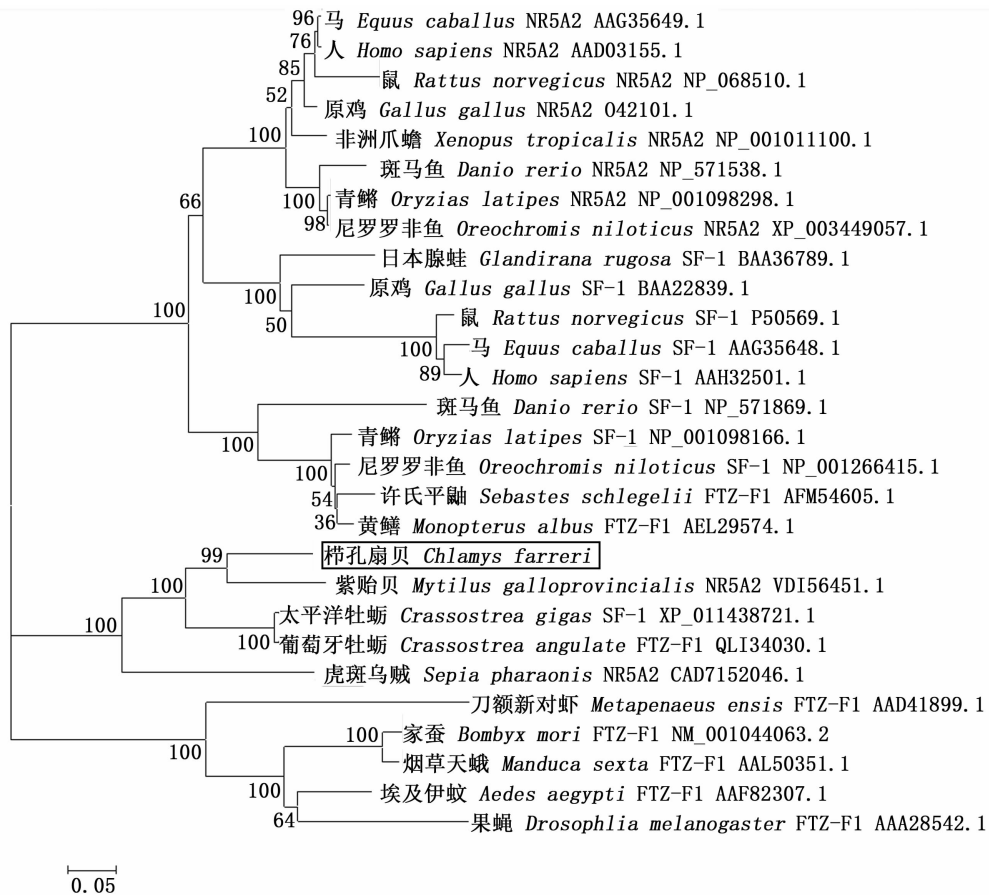


图 2 不同物种 SF-1、NR5A2、FTZ-F1 蛋白系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of SF-1, NR5A2, FTZ-F1 protein from different species

注:方框标出的为本实验克隆所得序列

Note: Sequence shown in the box is cloned in this study

1 M I Q H M E K S E F D A Q L Q N N T S N  
 1 ATGGATACAACACATGGAAAAGTCGGAATTTGACGCTCAATTACAAAATAATACATCTAAC  
 21 S E H G S T S S Q G E G N D E A S T S V  
 61 TCCGAGCATGGCAGCACCTCGAGTCAGGGGGAAGGAATGACGAAGCTTCGACCTCAGTT  
 41 N E M Q Y P P D V K S G F D E L C P V C  
 121 AATGAGATGCAGTACCCTCCAGATGTGAAGTCTGGCTTTGACGAGCTGTGTCCAGTGTGT  
 61 G D K V S G Y H Y G L L T C E S C K G F  
 181 GGGGATAAGGTGTCTGGCTACCCTATGGTCTTCTTACCTGTGAAAGTTGTAAAGGATTC  
 81 F K R T V Q N K K V Y S C V D N R S C H  
 241 TTCAAAAGGACAGTGCAGAACAAAGAAAGTGTACTCGTGCCTGGATAACCGAAGCTGTCCAC  
 101 I D K S Q R K R C P F C R F Q K C L S V  
 301 ATAGACAAAAGTCAGAGGAAACGTTGTCCCTTCTGTAGATTTCAAAAATGTCTGAGTGT  
 121 G M K L E A V R Q D R M R G G R N K F G  
 361 GGAATGAAGCTAGAGGCAGTGAAGCAGGATAGAATGCGGGGAGGAAGGAACAAGTTTGGC  
 141 P M Y K R D R A L K Q Q V A R Q Q H H L  
 421 CCGATGTACAAGCGTGACCGAGCACTCAAACAACAGGTGGCCAGGCAACAGCACCATCTT  
 161 M A S C G M H L M N G M A P L P P S S E  
 481 ATGGCATCTTGTGGCATGCATTTAATGAATGGAATGGCACCTCTCCCTCCCTCCTCTGAG  
 181 D I K P A I L Q Q M A A S I N A N M  
 541 GACATTAACCCGACCCAGCAATCCTCCAACAATGGCTGCCAGTATCAATGCAAACATG  
 201 G G Y G M N H S P L S G M P S P A M P D  
 601 GGTGGTTATGGGATGAACCACTCCCCTCTATCTGGCATGCCCTCCCCTGCAATGCCCGAC  
 221 S P P T D L S R V S G M S Q H S P V S S  
 661 TCGCCCCCTACAGATCTGAGTCGAGTGTGAGGCATGTCCCAGCATTCCCCAGTGTCTCA  
 241 P P G H Y S S L S Q Q T Y P S M M T A L  
 721 CCCCCAGGGCATTACTCCTCCCTGTGCGCAGCAGACCTACCCTTCCATGATGACAGCATT  
 261 R N N Y S P T Q H H P Q H H P H S H H Q  
 781 AGGAACAACCTACAGTCCAACACAGCACCATCCTCAGCACCACCCCCACTCCCATCACCAG  
 281 P I H Q P H H H Q H H H S Q P P H H H H  
 841 CCCATCCACCAGCCCCATCACCATCAACACCACCCTCACAACCGCCCCACCACCACCAC  
 301 H H Q M S P M A A A P P I V P I V P Q L  
 901 CACCACCAGATGTACCGATGGCTGCAGCGCCACCTATCGTGCCAATCGTGCCCTCAGTTG  
 321 I I D M K A N L T D E N E I C Q K L F S  
 961 ATTATAGACATGAAAGCAAATTTGACTGACGAAAACGAAATATGTGAGAACTTTTCTCA  
 341 F V Q T Q Y G H E D V V N Q P L K L L Q  
 1021 TTTGTGCAAACCTCAGTATGGCCATGAGGACGTAGTCAACCAGCCACTCAAACCTATTGCAA  
 361 M I C K L S D Q L L F L M V E W A R T S  
 1081 ATGATATGCAAGCTTTCTGACCAGTTATTATTCCTCATGGTAGAGTGGGCAAGAATCA  
 381 V Y F K E F K V E D Q M K M L Q H S W S  
 1141 GTATATTTCAAGGAATTCAGGTCGAGGATCAGATGAAGATGTTACAACACAGCTGGAGT  
 401 E I L I L D L V H R E L V R E I W S G E V  
 1201 GAGATCCTAATCCTTGACCTGGTTTCATCGCCTAGTCAGGGAAATATGGTCAGGGGAGGTC  
 421 T L E S G Q K L A L E C L D K L G L A D  
 1261 ACTCTAGAGAGTGGACAGAAGCTAGCTCTTGAATGTTTGGATAAGCTTGGCCTGGCAGAT  
 441 A K D R I R E L I R K M R D L K I D T N  
 1321 GCAAAAGATCGTATTAGGGAACCTCATAACGGAAGATGAGAGACTTAAAAATAGACACTAAC  
 461 E Y L C L K Y L I L L N P D V P G L E N  
 1381 GAATATCTATGCCTCAAGTACCTTATCCTTTTGAATCCAGATGTGCCGGGTCTTGAGAA  
 481 R H H V E Q C Q E R V N A A L M E Y C V  
 1441 CGCCACCATGTGGAACAGTGCCAAGAAAGGTTAATGCAGCATTGATGGAGTACTGTGTA  
 501 N F Y P S V K D K F G Q V L L R L P E V  
 1501 AACTTCTACCCAAGTGTCAAGGACAAATTTGGACAGGTGTTGCTTCGGTTACCGGAAGTG  
 521 R L I S I R A E E F L Y F K H L N G E L  
 1561 CGACTTATCAGTATTCGTGCAGAAGAATCCTTGTACTTCAAACATTTAAATGGAGAGCTC  
 541 P E Q T L L I E M L H S K K K \*  
 1621 CCGAACAGACACTTTTAAATAGAAATGCTACACTCAAAAGAAAAAATGA

图3 栉孔扇贝 *FTZ-F1* 基因 CDS 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3 CDS sequence and deduced amino acid sequence of *FTZ-F1* gene of *Chlamys farreri*

注:起始密码子和终止密码子用下划线标出;保守区用方框标出;FTZ-F1 盒用波浪线标出;激活功能域用下标黑点标出

Note: The start codon and the stop codon are underlined; the conserved area is marked with a box; the FTZ-F1 box is marked with wavy lines; the activated function domains are marked with black dot

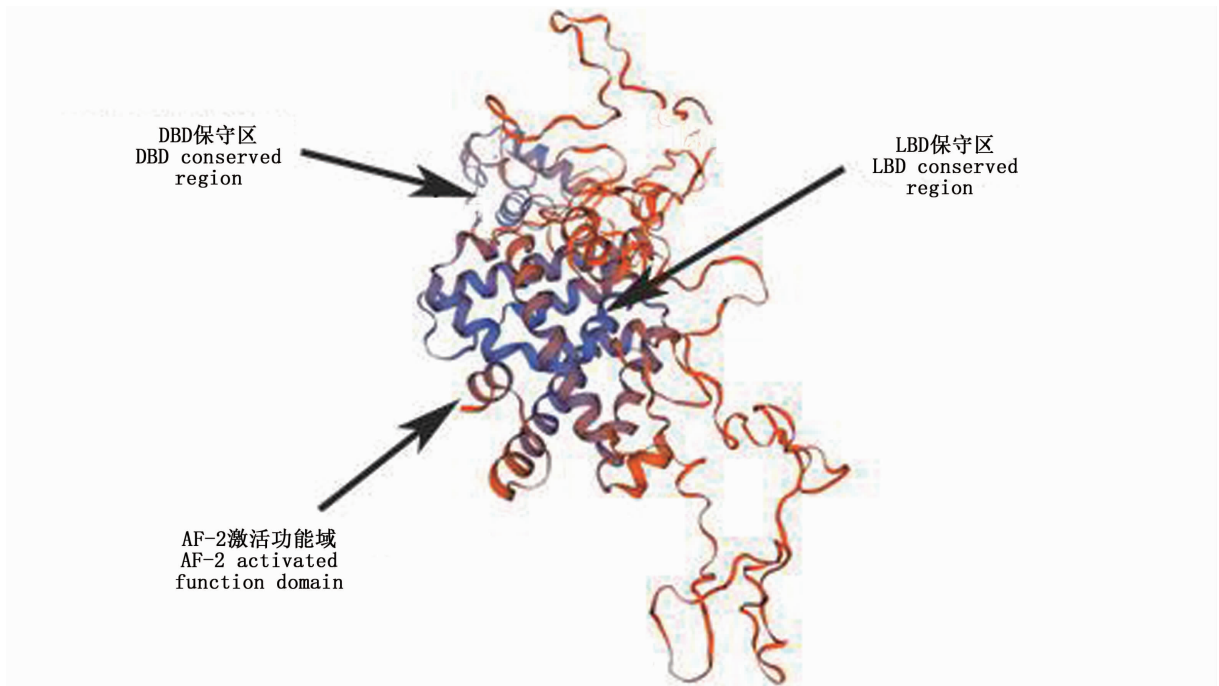


图 4 栉孔扇贝 FTZ-F1 蛋白三维结构预测图

Fig. 4 Schematic structure of *Chlamys farreri* FTZ-F1 protein

注:保守区及功能域如图中箭头所示

Note: Conserved region and function domain are shown by arrows in the figure

		框 I		
<i>Chlamys farreri</i>	MIQHMEKSEFDAQLNNTNSEHGSTSSQGE@NDEASTVNEBQYPPDVKSGFDLCPVCGDKVSGYHYGLLTCESCKGFFKRTVQNRRVYSGDNRSGHLDNSARKRCPICRFQKCLSV			120
<i>Sebastes schlegelii</i>	..... MLGDKAHGVTLKVMVEITYDDDLCPVCGDKVSGYHYGLLTCESCKGFFKRTVQNRRVYSGDNRSGHLDNSARKRCPICRFQKCLSV			89
<i>Monopterus albus</i>	..... MLGDKAHGVTLKVMVEITYDDDLCPVCGDKVSGYHYGLLTCESCKGFFKRTVQNRRVYSGDNRSGHLDNSARKRCPICRFQKCLSV			89
<i>Crassostrea angulata</i>	MIQHSEK...LDTDDNSIVS@NANLNS@EP@C@SSPQDEASGSGCGEMQYPPDVKYAF@DLCPVCGDKVSGYHYGLLTCESCKGFFKRTVQNRRVYSGDNRSGHLDNSARKRCPICRFQKCLSV			118
<i>Metapanaeus ensis</i>	..... MDSGLFP@V@ATTTLDYTSLAELPDTKEGIDLCPVCGDKVSGYHYGLLTCESCKGFFKRTVQNRRVYSGDNRSGHLDNSARKRCPICRFQKCLSV			96
Consensus		lepcvcdkvsyhyglltcescckgffkrtvqn k y c	c idk qrkrcp crfqkcl v	
<b>FTZ-F1 盒</b>				
<i>Chlamys farreri</i>	GMLEAVIQDMRGGRNKFQPMYKRDRAK	QV@RQ@H@M@S@C@M@H@M@M@A@P@L@P@S@S@E@D@K@P@P@A@I@Q@M@A@S@I@N@A@N@M@G@Y@G@H@N@S@L@G@P@P@M@P@S@P@T@L@S@R@S@M@S@Q@H@S@P@V@S@		240
<i>Sebastes schlegelii</i>	GMLEADR.....MRGGRNKFQPMYKRDRAK	QKK...@L@I@R@S@N@G@F@K@E@S@A@P@P@S@P@L@Q@D@Y@G@F@T@L@S@I@P@T@I@S@.....K@S@L@P@T@P@S@I@P@T@D@E@A@N@Y@G@.....		179
<i>Monopterus albus</i>	GMLEAVIQDMRGGRNKFQPMYKRDRAK	QKK...@L@I@R@S@N@G@F@K@E@S@A@P@P@S@P@L@Q@D@Y@G@F@T@L@S@I@P@T@I@S@.....K@S@L@P@T@P@S@I@P@T@D@E@A@N@Y@G@.....		183
<i>Crassostrea angulata</i>	GMLEAVIQDMRGGRNKFQPMYKRDRAK	QALRQ@Q@L@T@H@R@S@G@M@M@G@..@D@D@I@K@P@P@M@I@Q@L@S@E@G@...@N@V@G@A@H@S@P@L@G@M@P@P@M@S@P@P@D@L@S@R@S@.....		223
<i>Metapanaeus ensis</i>	GMLEAVIQDMRGGRNKFQPMYKRDRAK	QLLRQR.Q@S@Q@G@I@S@G@A@R@H@T@S@S@V@S@R@T@P@P@G@P@R@R@P@H@T@S@T@S@.....R@K@S@R@V@P@S@P@R@H@R@T@P@R@P@P@Q@L@G@.....		198
Consensus	gm le	mrggrnkgfpmkyrdra k	q	l
<i>Chlamys farreri</i>	PPGHV@S@SQ@TY@S@M@T@I@R@N@Y@S@P@Q@H@P@H@P@H@S@H@Q@P@H@P@H@H@H@S@O@P@H@H@H@H@H@M@Q@M@P@A@P@P@I@V@P@I@V@P@Q@I@T@D@M@K@N@L@D@N@E@T@C@Q@L@E@S@E@V@T@Q@Y@G@H@E@V@N@Q@P@L@K@L@I@Q			360
<i>Sebastes schlegelii</i>	.....P@S@L@G@M@Q@S@H@V@L@A@Q@Y@T@A@F@P@G@R@I@K@A@E@C@P@D@Y@T@S@P@E@S@.....L@T@G@Y@P@D@M@Y@P@S@S@Q@P@S@L@P@V@L@L@R@C@D@D@L@V@Q@N@I@V@H@L@Q@P@Q@N@G@R@L@D@K@P@S@T@F@S			282
<i>Monopterus albus</i>	.....P@S@L@G@M@Q@S@H@M@P@L@T@Q@Y@T@A@F@P@G@R@I@K@A@E@C@P@D@Y@T@S@P@E@S@.....L@T@G@Y@P@D@M@Y@P@S@S@Q@P@S@L@P@V@L@L@R@C@D@D@L@V@Q@N@I@V@H@L@Q@P@Q@N@G@R@L@D@K@P@S@T@F@S			286
<i>Crassostrea angulata</i>	.....N@S@G@A@S@Q@A@L@T@S@T@N@S@P@S@Q@Y@T@P@P@N@H@H@S@V@S@M@R@N@Q@Y@S@S@S@H@N@H@Y@N@.....H@H@S@P@T@Q@M@S@P@V@P@P@I@V@P@Q@I@L@D@V@K@M@S@D@N@E@I@K@Q@L@T@S@V@N@E@F@G@H@E@L@L@Q@P@S@V@L@I@N			335
<i>Metapanaeus ensis</i>	.....L@V@S@G@G@R@P@R@S@P@P@I@L@G@D@P@L@W@T@N@A@S@T@A@G@Y@T@G@T@P@T@G@R@T@R@R@R@R@R@R@R@T@H@S@T@P@Y@E@F@T@I@R@E@L@E@V@T@D@I@Q@E@W@A@L@F@S@L@L@Q@N@Y@N@Q@E@V@...@D@L@E			307
Consensus			p p	
<b>框 II</b>				
<i>Chlamys farreri</i>	M@CK@L@S@Q@L@F@L@M@V@W@R@T@S@F@K@D@K@V@D@Q@M@L@H@S@D@S@L@L@D@L@V@H@L@R@E@I@W@S@E@V@T@L@E@S@K@L@A@E@C@L@D@...@K@G@A@D@A@K@D@I@R@E@I@R@K@W@D@L@Q@I@D@N@Y@L@C@K@Y@L@L@N@P@...@			473
<i>Sebastes schlegelii</i>	LV@C@R@I@Q@L@F@S@I@V@W@R@S@C@I@F@K@E@R@V@D@Q@M@L@I@N@C@F@E@L@L@D@H@I@F@Q@Q@H@G@E@S@I@L@V@T@G@E@V@E@L@S@I@S@Q@A@E@T@S@S@L@Q@G@Q@E@A@A@R@L@A@L@Q@D@R@R@E@I@A@C@K@P@L@L@N@P@...@			398
<i>Monopterus albus</i>	LV@C@R@M@Q@L@F@S@I@V@W@R@S@C@I@F@K@E@R@V@D@Q@M@L@I@N@C@S@E@L@L@D@H@I@F@Q@Q@H@G@E@S@I@L@V@T@G@E@V@E@L@S@I@S@Q@A@E@V@T@S@S@L@Q@G@Q@E@A@A@R@L@A@L@Q@D@R@R@E@I@A@C@K@P@L@L@N@P@...@			402
<i>Crassostrea angulata</i>	M@CK@L@S@Q@L@F@L@M@V@W@R@T@S@F@K@D@K@V@D@Q@M@L@H@S@D@S@L@L@D@L@V@H@L@R@D@T@W@S@E@V@T@L@E@S@K@L@A@E@C@L@D@...@K@G@S@A@A@K@E@S@I@F@D@V@R@K@E@L@Q@I@D@V@N@Y@L@C@K@P@L@L@N@P@...@			448
<i>Metapanaeus ensis</i>	L@M@C@K@V@L@Q@N@F@A@Q@D@W@R@N@S@C@F@K@D@K@V@D@Q@M@L@H@S@D@S@L@L@D@L@H@L@H@R@H@N@R@Q@E@T@L@P@N@K@F@D@L@S@I@A@...@L@L@G@T@Q@F@A@D@F@H@L@N@K@L@Q@I@D@V@N@Y@L@C@K@P@L@L@N@P@S@I@A			424
Consensus	c	q l f v w r	f k v dqm l w l l d	l g l
<i>Chlamys farreri</i>	D@V@P@G@L@N@R@H@H@V@Q@C@E@R@N@A@L@M@D@Y@C@V@N@F@Y@S@K@D@N@Q@V@L@L@P@E@V@L@I@S@I@R@N@E@B@P@L@Y@H@N@G@D@I@E@Q@L@L@E@M@L@S@K@K@...@			555
<i>Sebastes schlegelii</i>	N@V@K@L@L@D@Q@A@F@V@G@V@D@Y@N@G@L@L@Y@P@L@S@P@Q@F@Q@E@F@S@Q@L@V@L@P@E@L@R@S@L@S@T@Q@E@D@Y@L@C@M@H@S@G@P@N@N@L@E@M@L@A@R@A@C@V@...@			482
<i>Monopterus albus</i>	N@V@K@L@L@N@Q@A@F@V@G@V@D@Y@N@G@L@L@Y@T@L@S@T@P@O@F@Q@E@F@S@Q@L@V@L@P@E@L@R@S@L@S@T@Q@E@D@Y@L@C@M@H@S@G@P@N@N@L@E@M@L@A@R@A@C@V@...@			486
<i>Crassostrea angulata</i>	D@V@P@G@L@N@Q@A@F@V@S@E@K@Y@S@P@M@E@Y@C@Y@N@F@P@H@L@A@D@K@F@G@V@L@L@P@E@V@L@I@S@I@R@N@E@B@P@L@Y@H@N@G@D@I@E@Q@L@L@E@M@L@S@K@K@...@			530
<i>Metapanaeus ensis</i>	D@V@P@G@L@S@D@R@R@V@I@A@R@P@G@T@I@D@G@I@Y@S@Q@L@P@R@V@S@S@E@L@Q@K@M@D@L@P@E@L@A@E@N@E@R@Y@L@H@N@G@A@A@P@T@Q@L@L@E@M@L@N@Q@E@I@E@E@V@V@T@P@C@F@Q@P@S@A@P@H@Y@I@K@G@S@V@R@V@S@H@H@V@P@E@G@S@P			544
Consensus	y l	v l	l p c	e l h g p l l e m l

图 5 不同物种的 FTZ-F1 同源蛋白序列对比

Fig. 5 Sequence comparison of FTZ-F1 homologous proteins from different species

注:保守区在图中用方框标出,框 I 为 DBD 保守区,框 II 为 LBD 保守区; *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝 (本实验克隆所得序列); *Sebastes schlegelii*: 许氏平鲷 (AFM54605. 1); *Monopterus albus*: 黄鳝 (AEL29574. 1); *Crassostrea angulata*: 葡萄牙牡蛎 (QLI34030. 1); *Metapanaeus ensis*: 刀额新对虾 (AAD41899. 1)

Note: The conserved regions are shown in boxes, box I is DBD conserved region, box II is LBD conserved region; *Chlamys farreri*: (sequence cloned in this study); *Sebastes schlegelii*: (AFM54605. 1); *Monopterus albus*: (AEL29574. 1); *Crassostrea angulata*: (QLI34030. 1); *Metapanaeus ensis*: (AAD41899. 1)

### 2.5 *FTZ-F1* 基因性腺周期 qRT-PCR 结果

如图8所示,*FTZ-F1* 基因在卵巢的整个性腺发育时期表达量并没有显著变化,维持在一个相对稳定的水平;而在精巢的性腺发育时期,*FTZ-F1* 基因在增殖期和生长期的表达量没有显著差异 ( $P > 0.05$ ),但成熟期的表达量显著增高 ( $P < 0.05$ ),不仅明显高于其他时期的精巢,也高于整个性腺发育时期的卵巢。

## 3 讨论

系统进化分析结果表明,栉孔扇贝 *FTZ-F1* 蛋白先与紫贻贝的 *NR5A2* 聚类,再与太平洋牡蛎的 *SF-1* 蛋白及葡萄牙牡蛎的 *FTZ-F1* 蛋白聚

类,之后与虎斑乌贼的 *NR5A2* 聚类。在物种分类中,栉孔扇贝和紫贻贝、牡蛎都属于双壳纲,而与虎斑乌贼同属于软体动物门,这一结果与其分类地位吻合。但进化树中几种软体动物的 *FTZ-F1* 基因亚家族归类并不统一,紫贻贝 *NR5A2* (其基因组序列号为:PRJEB24883)、太平洋牡蛎 *SF-1* (其基因组序列号为:NC\_047565.1)、虎斑乌贼的 *NR5A2* (其基因组序列号为:PRJEB33343) 均是通过基因组测序获得,对应的基因从功能和表达上究竟接近于 *SF1* 还是 *NR5A2* 尚无报道,葡萄牙牡蛎 *FTZ-F1* 也仅见基因序列,无相关深入研究,无法结合功能及表达特征进行准确归类。

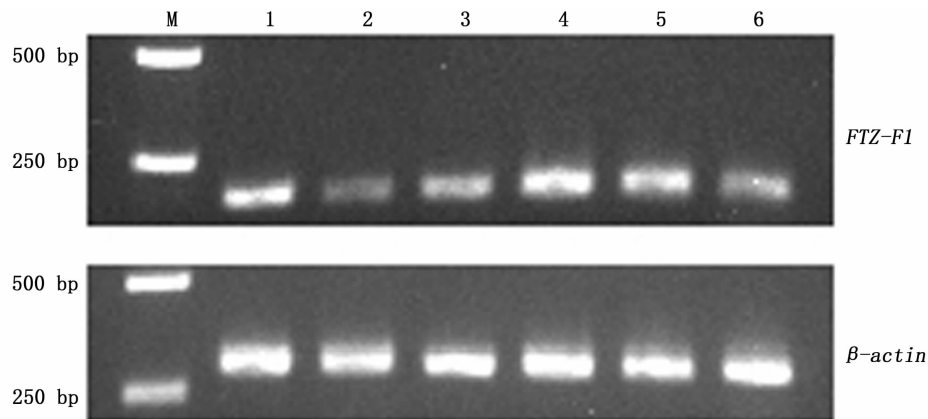


图6 *FTZ-F1* 的 mRNA 在雌性栉孔扇贝组织中的半定量表达

Fig. 6 Semi-quantitative expression of *FTZ-F1* mRNA in the tissues of female *Chlamys farreri*

注: M: DL2000 分子量标准; 1: 闭壳肌; 2: 外套膜; 3: 肝胰腺; 4: 肾脏; 5: 鳃; 6: 卵巢

Note: M: DL 2000 marker; 1: adductor muscle; 2: mantle; 3: hepatopancreas; 4: kidney; 5: gill; 6: ovary

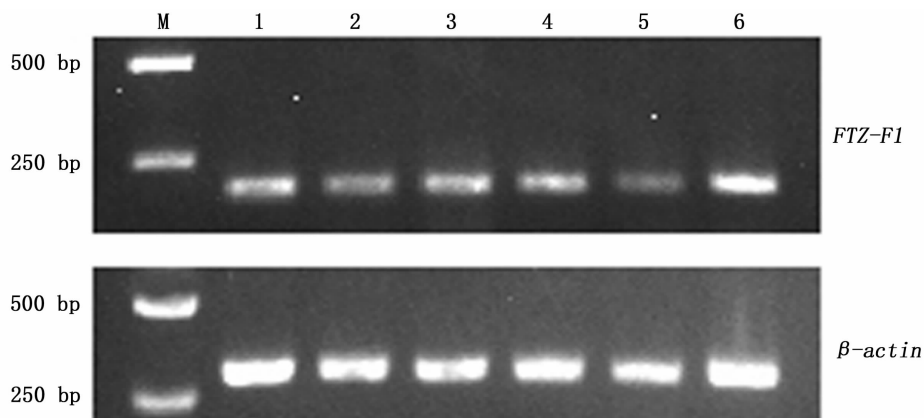


图7 *FTZ-F1* 的 mRNA 在雄性栉孔扇贝组织中的半定量表达

Fig. 7 Semi-quantitative expression of *FTZ-F1* mRNA in the tissues of male *Chlamys farreri*

注: M: DL2000 分子量标准; 1: 闭壳肌; 2: 外套膜; 3: 肝胰腺; 4: 肾脏; 5: 鳃; 6: 精巢

Note: M: DL 2000 marker; 1: adductor muscle; 2: mantle; 3: hepatopancreas; 4: kidney; 5: gill; 6: testis

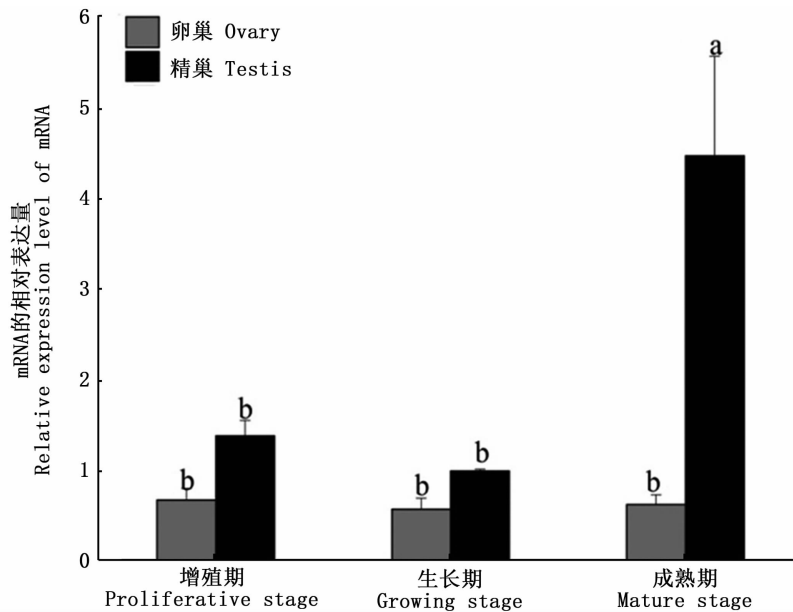


图8 *FTZ-F1* 基因在栉孔扇贝不同性腺发育周期中的定量表达

Fig. 8 Expression of *FTZ-F1* mRNA detected by qRT-PCR in *Chlamys farreri* gonads during reproductive cycle

注:生长期精巢的表达量设置为1.0,不同的字母(a,b)表示有显著性差异( $P < 0.05$ )

Note: Set the expression level of the growth stage testis to 1.0, and different letters (a,b) indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

较之于高等哺乳动物而言,低等动物 *FTZ-F1* 基因的归类可能更具有多样性,斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) *FTZ-F1* 基因的研究发现,其同时具有 *NR5A2* 亚族和 *SF-1* 亚族的组织表达特征,但氨基酸比对结果却不能归类于两个亚族中的任何一个<sup>[20]</sup>,郭变<sup>[10]</sup>对两种不同泥鳅 *FTZ-F1* 基因的研究发现,其序列分析与 *NR5A2* 同源性较近,但表达上却同时具有 *NR5A2* 和 *SF-1* 两个亚族的特征,无法简单将其归类为 *NR5A2* 或 *SF-1* 亚家族,印证了对于这类家族基因的亚家族归类不能仅简单地通过序列分析进行,需要结合表达特征进行。本研究认同上述研究结论,对栉孔扇贝中该基因的命名结合序列分析及表达特征发现,不能将其简单地归为 *SF-1* 或 *NR5A2*,而应统称为 *FTZ-F1* 基因。

分析栉孔扇贝 *FTZ-F1* 基因序列,发现其长 1 668 bp,含 DBD 和 LBD 保守区(LBD 保守区内存在激活功能域 AF-2,主要作用为维持 LBD 的激活状态)。这些保守区是典型的核受体功能结构域,与脊椎动物中该基因的保守结构域是一致的<sup>[21]</sup>,其中 DBD 保守区是整个蛋白结构中保守性最强的,具有调节核受体与激素应答元件之间相互作用的功能;而 LBD 保守区是一个参与配体

结合、介导二聚化作用、结合热击蛋白、核定位以及反式激活的多功能结构域<sup>[8,22]</sup>。

*FTZ-F1* 中,*NR5A2* 最初从小鼠肝脏中被鉴定出来,称为肝受体类似物<sup>[10]</sup>,在哺乳动物成体中主要在肝脏、肠道及卵巢等组织中表达,特别是在卵巢中高表达<sup>[23]</sup>,*NR5A2* 在低等生物中的表达研究较少,已有的文献显示,其在鱼类、中华鳖等物种的各组织中广泛表达<sup>[5,14]</sup>; *SF-1* 最初来源于鼠肾上腺皮质瘤 Y1 细胞 cDNA 文库和牛肾上腺蛋白提取物<sup>[24-25]</sup>,小鼠中,主要在肾上腺和性腺表达<sup>[26]</sup>。*SF-1* 可调节小鼠雄性表型发育所需的睾酮分泌量<sup>[27]</sup>,雌雄胚胎分化后呈性别二态性表达,在睾丸中表达相对较高<sup>[26]</sup>;低等生物如红点鲑 (*Salvelinus alpinus*)、斑马鱼中,*SF-1* 在脑、下丘脑、头肾、肝脏和精卵巢等组织中广泛表达<sup>[28-29]</sup>;尼罗罗非鱼中,该基因在 XY 个体中的表达高于 XX<sup>[30]</sup>。本研究发现,*FTZ-F1* 在栉孔扇贝的性腺和肝脏中都有表达,表明该基因组织表达既有 *SF-1* 亚族特征也有 *NR5A2* 亚族特征,该基因在栉孔扇贝的精巢中表达较强,认为其表达特征更偏向于 *SF-1* 亚族,除了性腺和肝脏组织,其他组织中也存在该基因的表达,推测其在栉孔扇贝中的作用较为广泛。本研究发现,雌雄个体



的组织表达特征存在差异,*FTZ-F1* 在雌性扇贝的闭壳肌、肾、鳃组织中表达量较高;在雄性的精巢、闭壳肌、肝脏和肾组织中表达较为明显。赵若男<sup>[31]</sup> 利用荧光定量 PCR 检测了多疣壁虎 (*Gekko japonicus*) *SF-1* 在雌雄成体不同组织的表达情况,发现在雌雄个体组织中表达也存在差异,且精巢中表达量显著高于卵巢;雄性个体中,*SF-1* 精巢中表达量最高,其次是心肌、骨骼肌和脑,肝脏和肾脏中的表达量较低,雌性个体中,*SF-1* 在心肌中的表达量最高,其他各组织中有一定表达。黄河鲤 (*Cyprinus carpio*) *SF-1* 的表达研究也发现,该基因在雌雄个体的组织表达特征不同<sup>[32]</sup>。郭变对于两种泥鳅中 *FTZ-F1* 的研究也发现,各组织中的表达有雌雄差异<sup>[10]</sup>。本研究中,*FTZ-F1* 的组织表达也存在着雌雄差异,但目前为止造成雌雄组织差别表达的原因尚不明确,还有待于进一步探究。

栉孔扇贝的性腺发育周期主要包括增殖期、生长期和成熟期(图 1),通过对性腺发育周期中 *FTZ-F1* 表达分析发现,该基因在成熟期精巢中的表达量最高,显著高于其他时期的性腺,这种在雄性性腺中的表达特征偏向于 *SF-1* 亚族。对雄性金鱼 (*Carassius auratus*) 中 *SF-1* 的表达研究发现<sup>[33]</sup>,该基因在成熟雄性金鱼睾丸中的表达水平高于未成熟金鱼的。有研究者通过共转染方法研究发现,人 *FTZ-F1* 中的 *SF-1* 亚族能与佛波酯协同激活 *3 $\beta$ -HSD* 的表达,进而影响睾酮合成<sup>[34]</sup>,提示 *SF-1* 与睾丸的内分泌功能间接相关<sup>[27]</sup>,可能在睾丸发育过程中发挥作用<sup>[35]</sup>。祝辉等<sup>[27]</sup> 利用反义转染的方法,体外抑制了 *SF-1* 蛋白在小鼠睾丸支持细胞中的表达,发现睾酮合成关键酶 P450 胆固醇侧链裂解酶 (P450<sub>scc</sub>) 的 mRNA 水平及睾酮的分泌量显著下降,认为 *SF-1* 可以调节睾酮的分泌。有研究显示<sup>[17]</sup>,在栉孔扇贝性腺发育周期中,睾酮的含量随着配子发生而升高,在成熟期达到高峰。*FTZ-F1* 在栉孔扇贝成熟期精巢的较高表达,或许与成熟期精巢中睾酮含量显著升高有一定的关系,推测 *FTZ-F1* 或通过参与睾酮生成影响了栉孔扇贝的精巢发育,其具体的作用机制还需要深入研究。

#### 参考文献:

[1] KUROIWA A, HAFEN E, GEHRING W J. Cloning

and transcriptional analysis of the segmentation gene fushi tarazu of *Drosophila* [J]. *Cell*, 1984, 37 (3): 825 - 831.

- [2] LU T T, REPA J J, MANGELSDORF D J. Orphan nuclear receptors as LXRs and FXRs of sterol metabolism [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(41): 37735 - 37738.
- [3] FAYARD E, AUWERX J, SCHOONJANS K. *LRH-1*: An orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis [J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14 (5): 250 - 260.
- [4] RARKER K L, SCHIMMER B P. Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function [J]. *Endocrine Reviews*, 1997, 18 (3): 361 - 377.
- [5] HAMMER G D, IHGRAHAM H A. Steroidogenic factor-1: Its role in endocrine organ development and differentiation [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1999, 20 (3): 199 - 223.
- [6] HONDA S, MOROHASHI K, NOMURA M, et al. *Ad4BP* regulating steroidogenic *P450* gene is a member of steroid hormone receptor superfamily [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (10): 7494 - 7502.
- [7] LUO X, IKEDA Y, PARKER K L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation [J]. *Cell*, 1994, 77 (4): 481 - 490.
- [8] 曾溢滔, 陈云弟. 哺乳动物性别分化的调控 [J]. *生物工程进展*, 1996 (5): 11 - 16.  
ZENG Y T, CHEN Y D. The regulation of sex differentiation in mammals [J]. *Progress in Bioengineering*, 1996 (5): 11 - 16.
- [9] YOSHIURA Y, SENTHILKUMARAN B. Synergistic expression of *Ad4BP/SF-1* and cytochrome P-450<sub>romatase</sub> (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68 (5): 1545 - 1553.
- [10] 郭 变. 两种泥鳅中 *FTZ-F1* 基因的克隆、表达和选择性剪切分析 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2013.  
GUO B. Cloning, expression and alternative splicing of *FTZ-F1* in two loaches [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2013.
- [11] HOFSTEN J, OLSSON P E. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of *FTZ-F1* genes [J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005, 3 (1): 1477 - 7827.

- [12] CHAN S M, CHAN K M. Characterization of the shrimp eyestalk cDNA encoding a novel fushi tarazu-factor 1 (*FTZ-FI*) [J]. FEBS Letters, 1999, 454 (1-2): 109-114.
- [13] MOHAMAD I NS, KATO Y, MATSUURA T, *et al.* Sequence conservation and sexually dimorphic expression of the *Ftz-FI* gene in the crustacean *Daphnia magna* [J]. PLoS ONE, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0154636.
- [14] 张超, 马晓, 刘倩, 等. 中华鳖 *NR5a2* 基因的克隆与表达分析 [J]. 淡水渔业, 2019, 49(4): 29-34.
- ZHANG C, MA X, LIU Q, *et al.* Cloning and expression analysis of *NR5a2* in *Pelodiscus sinensis* [J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(4): 29-34.
- [15] CHAO L, MARIANNA Z K, JIN S Z, *et al.* Conserved molecular mechanism for the stage specificity of the mosquito vitellogenic response to ecdysone [J]. Developmental Biology, 2000, 224 (1): 96-110.
- [16] 张龙涛, 吕建建, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 *ftz-fl* 基因的克隆及相关核受体基因在蜕皮中的功能分析 [J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1390-1397.
- ZHANG L T, LYU J J, GAO B Q, *et al.* Cloning of *portunus trituberculatus ftz-fl* cDNA and expression analysis of related nuclear receptors during molting cycle [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(6): 1390-1397.
- [17] 刘建国. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 性类固醇激素和 17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 8 在性腺发育过程中的潜在作用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- LIU J G. Potential roles of *Chlamys farreri* sex steroid hormones and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 8 in gonadal development [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [18] 廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期 [J]. 水产学报, 1983, 7(1): 1-13.
- LIAO C Y, XU Y F, WANG Y L. The reproductive cycle of *Chlamys farreri* [J]. Journal of Fisheries, 1983, 7(1): 1-13.
- [19] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 518-531.
- SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning experiment guide [M]. Beijing: Science Press, 2002: 518-531.
- [20] ZHANG W M, LI X, ZHANG Y, *et al.* Rapid communication cDNA cloning and mRNA expression of a *FTZ-FI* homologue from the pituitary of the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2004, 301(8): 691-699.
- [21] NELSON E R, HABIBI H R. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 253(1-2): 83-95.
- [22] CHAI C, CHAN W K. Developmental expression of a novel *Ftz-FI* homologue, *ff1b* (*NR5A4*), in the zebrafish *Danio rerio* [J]. Mechanisms of Development, 2000, 91(1-2): 421-426.
- [23] 杨跃奎, 杨雪梅, 陶璇, 等. 川藏黑猪 *NR5A2* 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(3): 83-85.
- YANG Y K, YANG X M, TAO X, *et al.* Cloning and bioinformatics analysis of *NR5A2* gene from Sichuan Tibetan black pig [J]. Abstracts of Animal Husbandry and Veterinary Medicine in China, 2018, 34(3): 83-85.
- [24] LALA D S, RICE D A, PARKER K L. Steroidogenic factor-1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor1 [J]. Molecular Endocrinology, 1992, 6(8): 1249-1258.
- [25] MOROHASHI K, HONDA S, INOMATA Y, *et al.* A common ransacting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P450s [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(25): 17913-17919.
- [26] IKEDA Y, SHEN W H, INGRAHAM H A, *et al.* Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases [J]. Molecular Endocrinology, 1994, 8(5): 654-662.
- [27] 祝辉, 周作民, 沙家豪, 等. 类固醇生成因子-1 对青春期小鼠睾丸中睾酮生成及精子发生的调节 [J]. 解剖学报, 2004, 35(1): 43-48.
- ZHU H, ZHOU Z M, SHA J H, *et al.* The regulation of steroidogenic factor-1 on the production of testosterone and spermatogenesis in adolescent mouse testes [J]. Acta Anatomica Sinica, 2004, 35(1): 43-48.
- [28] VON H J, KARLSSON J, JONES I, *et al.* Expression and regulation of fushi tarazu factor-1 and steroidogenic genes during reproduction in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) [J]. Biology of

- Reproduction, 2002, 67 (4): 1297 - 1304.
- [29] VON H J, LARSSON A, OLSSON P E. Novel steroidogenic factor-1 homolog (ffld) is coexpressed with anti-Mullerian hormone (AMH) in zebrafish [J]. Development Dynamics, 2005, 233 (2): 595 - 604.
- [30] 谢庆平. *SF-1* 是尼罗罗非鱼性类固醇激素生成、性腺发育及性别分化所必需的关键因子[D]. 重庆:西南大学, 2016.
- XIE Q P. Steroidogenic factor 1 (*SF-1*) is essential for steroidogenesis, gonadal development and sex differentiation in Nile tilapia [D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [31] 赵若男. 多疣壁虎 *Aromatase*、*Sox9* 和 *Sfl* 基因的克隆与表达分析[D]. 温州:温州大学, 2018.
- ZHAO R N. Cloning and expression analysis of *Aromatase*, *Sox9* and *Sfl* genes of *Gekko japonicus* [D]. Wenzhou: Wenzhou University, 2018.
- [32] 赵文杰. 黄河鲤 *sf-1* 基因结构、表达模式及其与 miRNA 靶标关系的分析[D]. 新乡:河南师范大
- 学, 2019.
- ZHAO W J. Analysis of the structure and expression pattern of Yellow River carp *sf-1* gene and its relationship with miRNA targets [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2019.
- [33] CHOI C Y. Time-related effects of gonadotropin-releasing hormone and testosterone on steroidogenic factor-1 gene expression in goldfish pituitary [J]. Korean Journal of Ichthyology, 2003 (15): 150 - 156.
- [34] LEERS-SUCHETA S, MOROHASHI K, MASON J, *et al.* Synergistic activation of the human type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 5-delta 4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor 1 adrenal 4-binding protein and phorbol ester [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272 (12): 7960 - 7967.
- [35] PARKER K L, SCHEDL A, SCHIMMER B P. Gene interactions in gonadal development [J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61 (1): 417 - 433.

## Sequence characteristics and expression analysis of *FTZ-F1* gene in *Chlamys farreri*

MU Xuejiao, LIU Xiaoling, YUN Han, CUI Longbo  
(College of Life Sciences, Yantai University, Shandong Yantai 264005, China)

**Abstract:** Through sequence characteristics and expression pattern analysis of *FTZ-F1* gene in *Chlamys farreri*, this study speculated *FTZ-F1* function in *Chlamys farreri*. The gene could not be exactly classified only by systematic evolution analysis, so sequence and expression characteristics analysis were combined, finally it was named *FTZ-F1*. The *FTZ-F1* sequence analysis showed that the CDS (coding sequences) was 1 668 bp long, encoding 555 amino acids, including DBD (DNA binding domain) conserved region, FTZ-F1 box (FTZ-F1 box), LBD (ligand binding domain) conserved region. Multiple sequence alignment results of different species showed that conserved region of the gene was consistent with other species. The expression of *FTZ-F1* in *Chlamys farreri* was studied by semi quantitative PCR (RT-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR). It showed that *FTZ-F1* expression was stronger in female adductor muscle, kidney, and gill tissue, as well as the male testis, hepatopancreas, adductor muscle and kidney, the expression also existed weakly in female mantle, hepatopancreas, ovarian tissues and the male gill, mantle, the wide range of tissue expression indicated that the gene function in *Chlamys farreri* may be more extensive. And because the gene was expressed in gonads and liver of *Chlamys farreri*, we speculated that the *FTZ-F1* tissue expression pattern in *Chlamys farreri* had the expression characteristics of *NR5A2* (*LRH-1/FTF*) and *SF-1/Ad4BP* subgroup at the same time. Further study found that *FTZ-F1* expressed strongly in the testis of *Chlamys farreri*, so its expression characteristics were believed to be more biased towards the *SF-1* subgroup. The reproductive cycle of *Chlamys farreri* mainly included proliferation stage, growing stage and mature stage, using quantitative real-time PCR, the *FTZ-F1* expression was detected in ovary and testis during the reproductive cycle. The result showed that the expression of *FTZ-F1* had no significant change during the entire gonadal developmental period in ovary, but had changed during gonadal developmental in testis. At the proliferation and growth stages, there was no significant difference of *FTZ-F1* expression in testis ( $P > 0.05$ ), while there was a significant increase ( $P < 0.05$ ) at the mature stage in testis, the expression in mature testis was not only significantly higher than that of the other stages, but also higher than expression in ovaries during the whole gonadal development. This study suggests that *FTZ-F1* plays an important role in testis at mature stage, it is speculated that *FTZ-F1* may be related to the increase of testosterone content.

**Keywords:** *Chlamys farreri*; *FTZ-F1*; sequence characteristics; expression