RNA 干扰蚤状溞(*Daphnia pulex*)*doublesex1* 基因的表达研究*

童巧琼[1] 林重远[1] 朱晓静[1] 周 伟[1] 徐善良[1] 王丹丽[1①] 赵云龙[2①]

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

摘要 为了探索 *doublesex1*(*dsx1*)基因是否在蚤状溞的生殖转换过程中发挥作用, 利用蚤状溞滤食摄食的特点将体外合成的 *dsx1* 双链 RNA(dsRNA)通过浸泡得方法分别摄入不同生殖状态的溞体中, 实现 *dsx1* 基因的表达沉默。随后采用荧光定量 PCR (qPCR)以及整体原位杂交分别检测不同生殖状态下蚤状溞在 RNAi 前后体内 *dsx1* 的表达水平变化, 进而研究 *dsx1* 在蚤状溞生殖转换过程中的作用。结果表明: 雄性溞、两性溞、孤雌溞在 RNAi 后均出现了 *dsx1* mRNA 表达水平的显著下调, 且下调量具有显著性差异(P<0.05)其中在孤雌溞中下调 68%, 在三种生殖状态中最为显著, 其次是雄性溞(56%)和两性溞(20%)。同时发现, 干扰前能够在溞的第一触角、第一胸肢和复眼上检测到明显的信号位点, 而在RNAi后, 仅在溞体的第一触角上发现少量 *dsx1* 基因表达位点, 且第一胸肢及复眼上未检测到相关信号。结合未干扰前 *dsx1* 在不同生殖状态溞的表达定量以及定位结果, 我们推测 *dsx1* 可能在蚤状溞的生殖转化基因调控过程中扮演关键角色, 并且在维持雄性蚤状溞性别特征的机制中发挥重要作用。

关键词 蚤状溞; *doublesex1*; RNA 干扰; qPCR; 整体原位杂交; 生殖转化

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20170200041

蚤状溞(*Daphnia pulex*)是一种常见的淡水枝角类, 其个体较小, 繁殖周期短, 是第一个获得全基因组序列的枝角类(Cladocera) (Colbourne *et al*, 2011)。枝角类有其特殊的生殖方式: 当温度、食物、种群密度等外界环境条件适宜时, 枝角类进行孤雌生殖(无性生殖), 由雌性个体直接繁殖后代; 而当环境条件发生变化, 对其生存造成胁迫时, 会诱导雄溞和两性溞的产生, 继而发生交配行为, 进行两性生殖(有性生殖)。孤雌生殖有利于缩短枝角类繁殖周期, 使其能够以最快的速度在适宜环境下扩增种群大小, 同时又通过不利环境诱导发生有性生殖来保障其能够以休眠卵的形式来维持种群的延续。虽然枝角类生殖转化在很大程度上是受到外界环境因子的影响, 但生殖方式的转变并不是由环境条件直接决定的, 即在适宜的环境条件下仍存在雄溞和两性溞的发生(王金秋等, 2000; 曹文清等, 2001)。因此我们推测内部基因和蛋白的级联调控是枝角类发生生殖转化的关键内因, 外界环境的变化仅仅只是诱导内部调控发生的一个外在因素。目前, 蚤状溞已在枝角类研究中被作为一种全新的模式生物。

随着分子水平各类组学的高速发展, 结合高通量测序技术的广泛应用, 近年来已有众多国内外学者尝试从基因水平对枝角类生殖转化调控机制的进一步深入探索。研究表明, 雄性个体可以通过某些化学物质如保幼激素(Juvenile hormone, JH)及其类似物(JHA)直接诱导产生(Olmstead *et al*, 2002; Tatarazako *et al*, 2003; Lamper *et al*, 2012); Leblanc(2007)同样发现甲基法尼酯(Methyl farnesoate, MF)在枝角类的性

* 国家自然科学基金项目, 31572221 号; 宁波市农业重大项目资助, 2017C110007 号; 宁波大学研究生创新科研基金项目, G17108 号。童巧琼, E-mail: 1511074753@nbu.edu.com

① 通讯作者: 王丹丽, E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn; 赵云龙, E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期: 2017-02-28, 收修改稿日期: 2017-11-10

别决定过程中起关键作用。这些都证明保幼激素及其类似物可能在枝角类性别决定通路中扮演着重要的角色。Kato 等(2008)得到大型溞(*Daphnia magna*)的性别分化相关基因 *Dmrt*, 并成功克隆该基因的三个亚型; 日本学者(Kato *et al*, 2011b)通过沉默 *Distal-less* (*Dll*)基因观察雌、雄大型溞附肢的变化。我国学者于 2009 年构建了隆线溞(*Daphnia carinata*)两种生殖状态(孤雌、两性)的 cDNA 文库(秦芬, 2009; Xu *et al*, 2009), 并通过分析文库中的大量 EST 序列, 拼接筛选出一些与生殖转化相关的功能基因, 其中便有 *doublesex* 基因。

性别决定基因及其对性别分化的影响已在黑腹果蝇、线虫、家蚕、蜜蜂、大型溞、家鼠等不同物种中有所研究(Baker *et al*, 1988; Cline *et al*, 1996; De Grandi *et al*, 2000; Ohbayashi *et al*, 2001; Cho *et al*, 2007; Kato *et al*, 2011a)。*Doublesex* 基因是性别决定级联反应的下游基因, 具有同时控制雄性和雌性性别分化的双重功能(Alvarez *et al*, 2009; Shukla *et al*, 2010)。大型溞的 *doublesex* 基因是溞属中第一个受到关注的, 结果表明该基因在雄溞发育中起重要作用(Kato *et al*, 2011a)。在胚胎发育时期, *DapmaDsx1* 的表达量只在雄溞中有所上升, 并能够在雄性特有的生理结构中检测到(Kato *et al*, 2011a)。Dsx 蛋白主要有两个结构域: N 端 DNA 结合域(DM 结构域)和 C 端的二聚化结构域(Dsx dimer) (Oliveira *et al*, 2009; Matson *et al*, 2012), 这个结构域控制着大部分性别特异性性状, 包括卵黄蛋白表达、分泌以及周围神经系统的刚毛形成(Chen *et al*, 2008; Alvarez *et al*, 2009)。这些研究表明, *Dsx* 及其同源物在不同生物体的性别决定及在性别转化起重要作用。

RNA 干扰(RNAi)是指将双链 RNA(dsRNA)导入细胞, 通过目的基因沉默机制引起目标 mRNA 的降解进而产生功能表型缺失的技术(Zamore, 2001; Bellés, 2010)。这一技术作为逆遗传学技术被广泛应用于非模式生物中, 例如, 昆虫赤拟谷盗(Brown *et al*, 1999)、蜜蜂(Beye *et al*, 2002)、家衣鱼(Ohde *et al*, 2009)、六点黄蜘蛛(Khila *et al*, 2007)、原生动物(LaCount *et al*, 2000)、水螅(Lohmann *et al*, 1999)。这项技术也被应用于两种甲壳动物, 分别是卤虫(Copf *et al*, 2004)和钩虾(Liubicich *et al*, 2009)。为了检测 RNA 干扰的效果, 我们采用浸泡法, 利用蚤状溞的滤食作用将 dsRNA 摄入不同生殖状态的蚤状溞体内, 同时发现 dsRNA 干扰后 *dsx1* 基因的表达位点也大幅减少。因此我们推测这种方法在蚤状溞中是可行的, 且本实验为研究枝角类的生殖转化提供了可靠的分子基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蚤状溞(*Daphnia pulex*)原始活体样品采自上海闵行区某水池, 经专业物种鉴定后培养单克隆, 命名为 Dp220, 在本实验室保种多年。本实验随机挑选大小均一, 健康活力强的个体暂养于 25ºC 恒温培养箱内, “Banta 粪土培养液”(兔粪 1.5g, 干稻草 2g, 土壤 10g, 自来水 1L, 经煮沸后取上清液)培养, 光周期 14L:10D, pH 7—7.5。用浓度为 4.0×10^6 cells/mL 蛋白小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)隔天投喂。在上述适宜条件下培养两周后, 蚤状溞种群密度快速增大至 3000 只/L, 其主要生殖方式逐渐转变为有性生殖, 两性溞和雄溞大量出现, 利用显微镜观察蚤状溞第一触角鉴定其性别, 收集不同性别实验样品。

总 RNA 提取试剂盒(RNA Extraction Kit)购自 Axygen 公司; 胶回收试剂盒为上海捷瑞生物工程有限公司; *Nco* I 和 *Spe* I 快速限制性内切酶, PrimeScript RT Master Mix Kit 等主要试剂均购自 TaKaRa 公司; T7 RNA Polymerase、SP6 reverse transcripatse 和 PGEM-T 载体购自 Promega 公司; NBT/BCIP Stocking、地高辛 RNA 标记试剂盒和 Anti-Digoxingenin-AP 购自 Roche 公司; 引物合成及产物测序由上海 Invitrogen 生物公司完成。

1.2 RNA 干扰

1.2.1 dsRNA 的制备 pET-T7 表达载体由浙江大学杨卫军老师实验室赠送, dsRNA 制备方法参照刘玉磊(2009), 合成 dsRNA 经琼脂糖凝胶电泳检测后保存于–20ºC, 实验所用到的引物见表 1。

表 1 dsRNA 制备特异性引物

Tab.1 Oligonucleotide primers used in the experiments

引物名称	序列(5′—3′)
Dsx1-iF	GCTCTAGA ACACGATAACCGACAGCAACG
Dsx1-iR	CGGGATCCCAATGAAACATTCTGGCCCATG
T7 terminator	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.2.2 dsRNA 浸泡蚤状溞 取成体孤雌、两性和雄性溞各 200 只, 在纯水中暂养半天后浸泡在 RNAi 溶液(dsRNA, 0.1%溴百里酚蓝, 1×PBS, 4%的蔗糖)中作为干扰组。以浸泡在等体积无 dsRNA 溶

液中作为实验对照组。根据 Eaton 等(2002)浸泡果蝇胚胎方法, 将 dsRNA 浓度设 4 个梯度: 0.1、0.5、1、2mg/mL 为定量参考, 选出最优干扰效果的浓度。在 25°C 恒温条件下对不同生殖状态的蚤状溞进行独立浸泡实验。在不同的浸泡时间点(12h, 14h, 16h, 18h)观察蚤状溞活力并分别取出实验样品, 显微镜下检查溞对 dsRNA 的摄入程度。

1.3　荧光定量 PCR

据已获得 *dsx1* cDNA 序列设计特异性荧光定量引物 DsxF (GCGACGCAGAAGAG TTGTCC)/DsxR (GGCTGGCAGCAAAATCAACG)。根据 Miyakawa 等(2010)设计本实验所需的 18S(内参基因)特异性引物。收集实验组和对照组浸泡的孤雌溞、两性溞和雄溞各 150 只, 分别提取总 RNA, 反转录获得 cDNA。每个样品进行 3 次独立重复实验。qPCR 反应条件如下(20μL 体系): 95°C 预变性 15s; 95°C 变性 5s, 57°C 退火 30s, 40 个循环。数据采集和处理在 ABI StepOnePlus^{TM} Instrument 上进行, 所测数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$法(Livak *et al*, 2001), 利用 SPSS 17.0 软件, 显著性检验 One-Way ANOVA 法进行数据分析。qPCR 产物的溶解曲线均为单峰, 表明其特异性好。

1.4　整体原位杂交

收集实验组和对照组中的三种生殖状态蚤状溞各 50 只, 用 4%多聚甲醛固定 2h 后, 转移到无水甲醇中, –20ºC 保存。

根据已知 *Dpdsx* 序列设计探针模板引物 Dsx-S、Dsx-A, 经 PCR 扩增后, 于 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。将正确的目的片段连接 pGEM-T 载体, 并转化, 挑取阳性克隆送测。将含有目的条带的阳性克隆进行菌液扩增, 抽提质粒。分别使用 *Nco* I 和 *Spe* I 限制性内切酶分别对重组 pGEM-T 质粒进行线性化酶切, 纯化后回收线性化的模板质粒, 溶于 0.1% DEPC 处理水。以 DIG RNA Labeling Mix 做作为物, 纯化质粒作为体外转录 DNA 模板, 利用 T7 RNA Polymerase、SP6 reverse transcripatse 进行体外转录, 合成有 DIG 标记的正、反义 RNA 探针。避免合成探针中的残余 DNA 模板影响实验结果, 用无 RNA 酶活性的 DNA 酶将其除去, 加入一定量的 5mol/L LiCl(经 DEPC 处理)和无水乙醇(冰预冷), –20ºC 过夜。RNA 沉淀经 70%酒精(DEPC 水配制)洗涤后溶于 20μL DEPC 水, –20ºC 保存。整体原位杂交实验步骤主要参考 Sagawa 等(2005)和 Thisse 等(2008)。在 37ºC 用 Proteinase K 处理两性溞和孤雌溞 15min 以增强细胞通透性, 同时调节杂交温度, 如果杂交温度太低, 可能会发生非特异性杂交, 导致背景颜色过深; 如果反应温度太高, 则可能会导致杂交不完整或不发生杂交。因此, 以 1∶100 比例稀释 RNA 探针进行杂交温度梯度预实验, 并确立 68ºC、4h 为最佳杂交条件。anti-DIG 单抗以 1:5000 比例稀释, 于 4ºC 孵育过夜。

2　结果

2.1　蚤状溞 *Dpdsx1* RNAi

通过特异性引物获得 *dsx1* dsRNA 的模板片段, 经序列比对验证后连接两端含有 T7 启动子的表达载体, 利用 *E. coli* HT115 菌株(RNA 酶缺陷)获得表达的目的 RNA。通过退火复性得到 dsRNA, 并用 RNaseA 去除细菌 RNA 以及未结合成双链的单链 RNA。纯化后的 *dsx1* dsRNA 回收后经琼脂糖电泳检测, 结果如图 1 所示。可见目的条带 *dsx1* dsRNA 片段长度位于 500bp, 且条带单一, 无杂带, 这表明了细菌自身 RNA 以及未结合成双链的 RNA 已被消化酶处理完全。

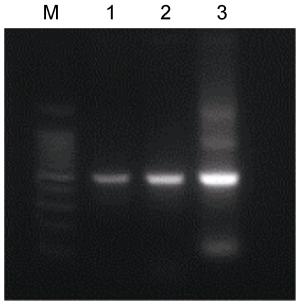


图 1　*dsx1* dsRNA 制备电泳图

Fig.1　Preparation of *dsx1* dsRNA on gel electrophoresis

注: M: 1500bp Marker; 1: 纯化后 dsRNA; 2: 酶切后 dsRNA; 3: 未酶切 dsRNA

取浸泡不同时间(12h、14h、16h、18h)的三种生殖状态的蚤状溞样品, 在纯水中暂养洗净后置于莱卡显微镜下观察。结果发现, 用处理 12h 的蚤状溞活力较好, 与对照组相似, 且体腔中均有明显的 RNAi 溶液的指示淡蓝色位点(图 2)。在溶液处理 12h 后, 蚤状溞个体活力开始下降, 至 14—18h 时各生殖状态溞均开始出现活力下降甚至死亡的现象, 表明用 RNAi 溶液处理蚤状溞 12h 即能保证 dsRNA 充分进入体腔并发生作用, 又不对实验个体活力造成影响, 因此可以在此时收集样品进行后续实验。

2.2　干扰后表达检测

2.2.1　*dsx1* mRNA 在不同生殖状态蚤状溞中表

达水平差异　　我们尝试以不同浓度梯度的dsRNA (0.1, 0.5, 1, 2mg/mL)处理蚤状溞, 通过荧光定量分析干扰效率, 选出最优 dsRNA 干扰浓度, 结果如图 3 所示。结果所示, dsRNA 浓度为0.5mg/mL 时, RNAi 效率基本达到饱和, 因此我们选择该浓度作为干扰实验的最优设置。

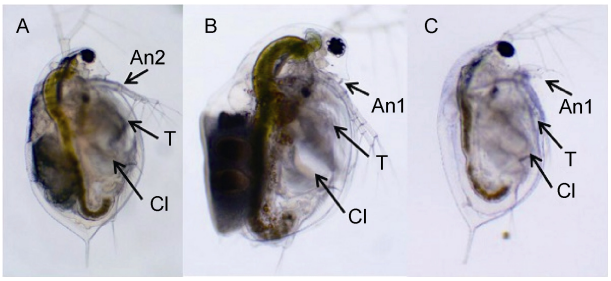


图 2　蚤状溞在 RNAi 溶液浸泡 12h 后浸染效率图

Fig.2　Infiltration effects in different sexual reproductive stages of *D. pulex* after 12h soaking in dsRNA solution

注: 蓝色信号为 dsRNA 浸入位点。An1: 第一触角; T: 胸肢; Cl: 体腔。A: 孤雌溞; B: 两性溞; C: 雄性溞

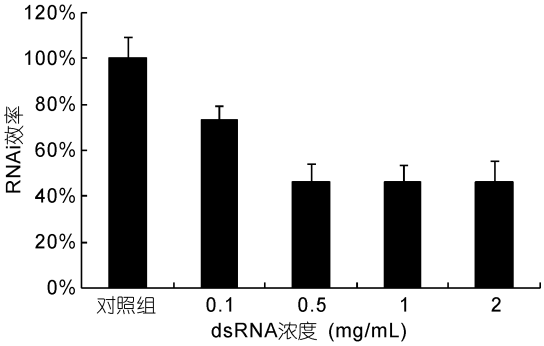


图 3　qPCR 检测不同浓度 dsRNA 的干扰效率

Fig.3　The interference efficiency of dsRNA in different concentrations

用 dsRNA 浓度为 0.5mg/mL 的 RNAi 溶液处理不同生殖状态蚤状溞 12h 后收集样品, 分别提取总 RNA 并反转录获得 cDNA。qPCR 以 18S 作为内参, 检测 *dsx1* mRNA 在干扰组和对照组的蚤状溞的表达水平差异(图 4)。结果表明浸泡法活体干扰蚤状溞使其 *dsx1*mRNA 的表达水平下调是有效的, 雄性溞、两性溞、孤雌溞在 RNAi 后均出现了 *dsx1* mRNA 表达水平的显著下调, 且下调量具有显著性差异(P<0.05), 其中在孤雌溞中下调 68%, 在三种生殖状态中最为显著, 其次是雄性溞(56%)和两性溞(20%)。

2.2.2　*dsx1* mRNA 在不同生殖状态溞中表达位点变化　　整体原位杂交结果显示, RNAi 前, 在三种生殖状态蚤状溞中均能够检测到 *dsx1* mRNA 的表达, 主要表达位点均在第一触角、复眼和胸肢。雄性溞与孤雌溞、两性溞中的 *dsx1* 的表达量差异存在显著性别差异。如图 5 可见, 蓝色的阳性信号在雄溞的复眼, 第一触角和胸肢均清晰可见(图 5C), 而两性溞(图 5B)和孤雌溞(图 5A)对应部位表达相对较弱, 为淡紫红色。因此 *dsx1* mRNA 在溞体内表达存在与性别相关的表达差异, 同时也表明该基因在调控蚤状溞雄性性状中发挥重要作用。正义探针对照组未检测到信号。

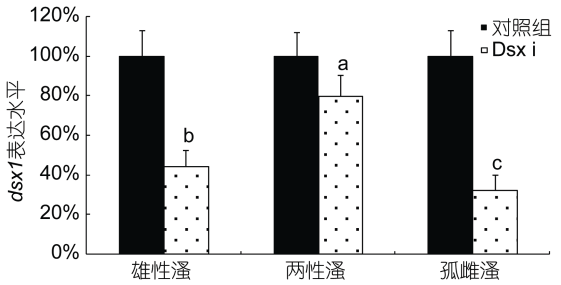


图 4　RNA 干扰后 *dsx1* mRNA 在不同蚤状溞中的表达

Fig.4　qPCR results of *dsx1* mRNA expression level from three reproductive modes of *D. pluex* after RNAi

注: a、b、c 表示三者之间的下降量有显著性差异(P<0.05)

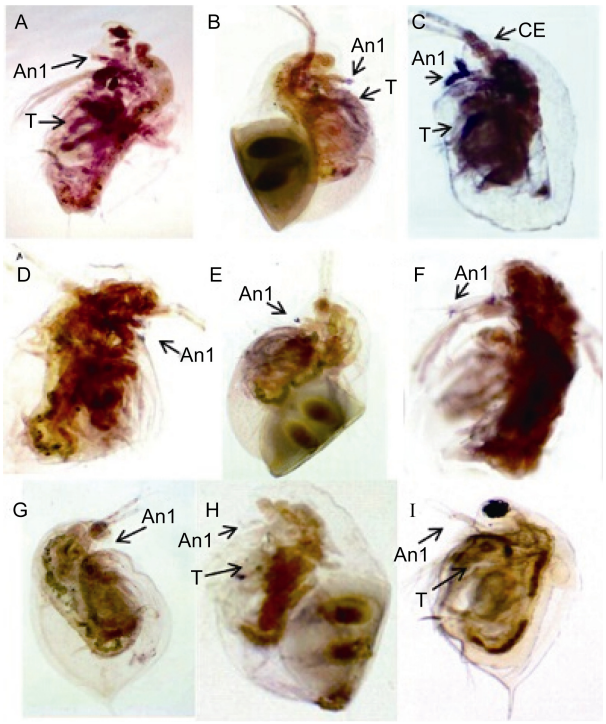


图 5　原位杂交检测 RNAi 后 *dsx1* mRNA 在三种生殖状态蚤状溞中表达位点

Fig.5　Expression of *dsx1* mRNA in *D. pulex* was determined by whole-mount in situ hybridization after RNAi

注: 蓝色区域为阳性信号, A: 孤雌溞, B: 两性溞, C: 雄性溞; An1: 第一触角, CE: 复眼, T: 胸肢

dsRNA 干扰后 *dsx1* mRNA 在不同生殖状态蚤状溞中的表达位点和表达量发生显著变化，表达位点和表达量明显减少和变弱。从图 5 可见, RNAi 后仅在样品溞的第一触角部位存在 *dsx1* 基因的少量表达，干扰前有明显信号的第一胸肢和复眼在干扰后均未检测到 *dsx1* 基因信号位点。孤雌溞中无表达位点(图 5D)；两性溞和雄性溞的第一触角存在局部蓝色信号(图 5E，图 5F)。另外，不同生殖状态蚤状溞的阴性对照组均未检测到表达位点(图 5G，图 5H，图 5I)。

3　讨论

随着 RNAi 技术的快速发展与成熟，该技术已成功应用于众多高等、低等生物的基因功能研究中。Dunn 等(2007)针对海葵 Actin 蛋白编码基因和 Cys 蛋白酶编码基因采用 RNAi 技术，用特异性 dsRNA 对两个基因进行干扰，抑制蛋白表达，并结合原位杂交检测干扰成功；刘玉磊(2009)采用 RNAi 技术对卤虫休眠卵壳相关基因 *SGEG* 进行了研究，通过将特异性 dsRNA 注射进卤虫胚胎对 *SGEG* 进行表达沉默，结果处理后卤虫的卵壳由褐色坚硬变为了淡黄色柔软，干扰后的卵壳表面呈片层状，且较为粗糙，其皮质层厚度也仅为干扰前 1/2；陈宏健等(2014)通过投喂 dsRNA 有效抑制了方形网纹溞 (*Ceriodaphnia quadrangula*)体内 *actin* 基因的表达，并导致方形网纹溞死亡率明显提高；Kato 等(2011b)在探究大型溞附肢末端基因 *Dll* 时首次在溞科实现了 RNAi 技术的使用，通过显微注射法将体外合成的 Dll 特异性 dsRNA 注射到大型溞卵中，经过 72h 的适宜环境培养获得孵化的新生干扰后大型溞，结果发现干扰后孵化的大型溞不仅缺失部分附肢末端，而存在表型的改变，同时通过注射不同计量 dsRNA 的梯度实验，根据抑制效果确定以 300pg/egg 为最佳计量；Kato 等(2011a)将特异性 dsRNA 显微注射进大型溞的胚胎中，成功沉默 *DapmaDsx1* 基因表达，另设置该基因过量表达对照组，发现 *DapmaDsx1* 是大型溞维持雄性表型特征的直接相关基因。

在本研究中，我们主要通过 RNAi 技术对 *dsx1* 是否在蚤状溞生殖转化调控过程中存在重要的作用进行了初步的探究：利用蚤状溞滤食摄食的特点将体外合成的 *dsx1* 双链 RNA(dsRNA)通过浸泡得方法分别摄入不同生殖状态的溞体中，实现 *dsx1* 基因的表达沉默，将荧光定量及整体原位杂交应用于干扰后蚤状溞基因表达水平的检测检测，研究 *dsx1* 在蚤状溞生殖转换过程中的功能。结果表明，虽然由于浸泡法处理的是蚤状溞成体，没有直接影响个体发育导致形状的明显改变，但干扰后的三种生殖状态蚤状溞体内 *dsx1* mRNA 表达水平均显著下调(P<0.05)，其中在孤雌溞中下调 68%，在三种生殖状态中最为显著，其次是雄性溞(56%)和有性雌两性溞(20%)。对比干扰前后, *dsx1* mRNA 表达水平变化差异在孤雌溞中最为显著。另有研究表明，整体原位杂交信号缺失与溞体表皮通透性有关，因此会延长 mRNA 的干扰效应(Dunn *et al*, 2007)。原位杂交对目的基因 mRNA 的检测灵敏度并没有 PCR 检测的灵敏度高。Li 等(2000)在斑马鱼中用 qPCR 和原位杂交分别对 *Zf-T* 基因 mRNA 进行干扰检测，结果显示原位杂交无信号，而 qPCR 则表明基因表达下调 75%，这也符合原位杂交中干扰后孤雌溞无法检测到表达位点的结果相符。在两性溞中干扰前后表达量下降差异最小的原因可能在于卵鞍，下降的新陈代谢速率可能会导致对溶液中 dsRNA 摄入量的减少。雄溞在干扰前后存在 *dsx1* mRNA 表达水平的显著差异，第一触角作为雄性蚤状溞的特征性器官上有原位杂交信号位点，但是干扰后阳性信号位点比干扰前位点数减少，信号强度减弱，表明 *dsx1* 基因可能在维持雄性蚤状溞表型特征的过程中起到关键作用。Kato 等(2011a)对大型溞胚胎进行干扰实现 *dsx1* 表达沉默，发现孵化后幼体缺失第一触角前端；Kijimoto 等(2012)对食粪金龟(*Onthophagus taurus*)幼体进行 *dsx* 基因干扰，培养后观察发现该昆虫的雄性特异性角变短，均证明了在雄性的表型维持中 *dsx1* 扮演着至关重要的角色。本实验也发现雄溞的特征性器官第一触角在干扰前后其表达有明显差异，因此我们推测 *dsx1* 可能参与调控了蚤状溞的生殖转换化过程，并且在维持蚤状溞雄性性别特征的机制中发挥重要作用。

对三种生殖状态的蚤状溞进行 RNA 干扰前，我们均能够在样品中检测到明显的 *dsx1* 表达位点，且雄性溞中的信号强度明显高于两性溞以及孤雌溞。对比干扰前原位杂交结果，干扰后的三种生殖状态蚤状溞个体上的表达位点数量显著减少，且信号强度也明显低于干扰前。对比 3 种生殖状态蚤状溞中的荧光定量结果可知, *dsx1* mRNA 的表达水平以及表达定位存在生殖状态的特异性差异，表明 *dsx1* 基因可能在蚤状溞机体在生殖转换调控过程中起到一定作用。由于研究条件的限制，本研究没有能够直接对蚤状溞胚胎进行显微注射 RNAi，因此无法获得在胚胎发

育期受到 *dsx1* 表达抑制的蚤状溞个体来更直观地观察该基因对蚤状溞性别相关性状发育的影响, 只是初步探究了 *dsx1* 是否参与了性别调控过程, 但本实验可以作为今后对该基因具体作用机理探究的研究基础, 进一步利用过量表达、免疫组化技术和形态特征比较等进行研究。

4 结论

本研究利用体外合成的 *dsx1* 基因双链 RNA (dsRNA)浸泡不同生殖状态的蚤状溞, 通过实时荧光定量 PCR(qPCR)和以及整体原位杂交方法分别检测干扰不同生殖状态下蚤状溞在 RNAi 前后体内 *dsx1* 的表达水平变化, 进而研究 *dsx1* 在蚤状溞生殖转换过程中的作用。结果发现, *dsx1* 可能参与了蚤状溞的生殖转换和维持雄性性征的过程, 并在雄性的表型维持中起到关键作用。本研究有助于确定 *dsx1* 是否参与蚤状溞生殖转换的基因调控, 且为探索枝角类生殖转化规律的分子机理提供理论基础。

参 考 文 献

王金秋, 张佳忆, 黄 博, 2000. 生态因子的波动对多刺裸腹溞雄体发生的影响. 应用生态学报, 11(1): 135—137

刘玉磊, 2009. 卤虫休眠卵壳形成的分子机制及其抗逆功能的研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文

陈宏健, 谢 松, 李理想等, 2014. 一种基于干扰肌动蛋白基因导致方形网纹溞(*Ceriodaphnia quadrangula*)死亡的 RNA 干扰(RNAi)模型构建. 海洋与湖沼, 45(2): 322－327

秦 芬, 2009. 隆线溞孤雌卵胚胎发育及其两性溞 EST 的初步研究. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 43—50

曹文清, 林元烧, 郭东晖, 2001. 若干生态因子对蒙古裸腹溞生殖方式转变效应的实验. 台湾海峡, 20(增刊): 190—195

Alvarez M, Ruiz M F, Sánchez L, 2009. Effect of the gene *doublesex* of *Anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila*. PLoS One, 4(4): e5141

Baker B S, Wolfner M F, 1988. A molecular analysis of *doublesex*, a bifunctional gene that controls both male and female sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*. Genes & Development, 2(4): 477—489

Bellés X, 2010. Beyond *drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. Annual Review of Entomology, 55: 111—128

Beye M, Härtel S, Hagen A *et al*, 2002. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. Insect Molecular Biology, 11(6): 527—532

Brown S J, Mahaffey J P, Lorenzen M D *et al*, 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. Evolution & Development, 1(1): 11—15

Chen S L, Dai S M, Lu K H *et al*, 2008. Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 38(2): 155—165

Cho S, Huang Z Y, Zhang J Z, 2007. Sex-specific splicing of the honeybee *doublesex* gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. Genetics, 177(3): 1733—1741

Cline T W, Meyer B J, 1996. Vive la différence: males vs females in flies vs worms. Annual Review of Genetics, 30: 637—702

Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D *et al*, 2011. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. Science, 331(6017): 555—561

Copf T, Rabet N, Celniker S E *et al*, 2004. Posterior patterning genes and the identification of a unique body region in the brine shrimp *Artemia franciscana*. Development, 130(24): 5915—5927

De Grandi A, Calvari V, Bertini V *et al*, 2000. The expression pattern of a mouse *doublesex*-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. Mechanisms of Development, 90(2): 323—326

Dunn S R, Phillips W S, Green D R *et al*, 2007. Knockdown of actin and caspase gene expression by RNA interference in the symbiotic anemone *Aiptasia pallida*. The Biological Bulletin, 212(3): 250－258

Eaton B A, Fetter R D, Davis G W, 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. Neuron, 34(5): 729—741

Kato Y, Kobayashi K, Oda S *et al*, 2008. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. Genomics, 91(1): 94—101

Kato Y, Kobayashi K, Watanabe H *et al*, 2011a. Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a *doublesex* gene in the sex-determining pathway. PLoS Genetics, 7(3): e1001345

Kato Y, Shiga Y, Kobayashi K *et al*, 2011b. Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna*. Development Genes and Evolution, 220(11—12): 337—345

Khila A, Grbić M, 2007. Gene silencing in the spider mite *Tetranychus urticae*: dsRNA and siRNA parental silencing of the *Distal-less* gene. Development Genes and Evolution, 217(3): 241—251

Kijimoto T, Moczek A P, Andrews J 2012. Diversification of doublesex function underlies morph-, sex-, and species-specific development of beetle horns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(50): 20526

LaCount D J, Bruse S, Hill K L *et al*, 2000. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. Molecular and Biochemical Parasitology, 111(1): 67—76

Lampert W, Lampert K P, Larsson P, 2012. Induction of male production in clones of *Daphnia pulex* by the juvenoid hormone methyl farnesoate under short photoperiod. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 156(2): 130—133

LeBlanc G A, 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review.

Ecotoxicology, 16(1): 61—81
Li Y X, Farrell M J, Liu R *et al*, 2000. Double-stranded rna injection produces null phenotypes in zebrafish. Developmental Biology, 217(2): 394
Liubicich D M, Serano J M, Pavlopoulos A *et al*, 2009. Knockdown of *Parhyale ultrabithorax* recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(33): 13892—13896
Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402—408
Lohmann J U, Endl I, Bosch T C G, 1999. Silencing of developmental genes in *Hydra*. Developmental Biology, 214(1): 211—214
Matson C K, Zarkower D, 2012. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. Nature Reviews Genetics, 13(3): 163—174
Miyakawa H, Imai M, Sugimoto N *et al*, 2010. Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. BMC Developmental Biology, 10: 45
Ohbayashi F, Suzuki M G, Mita K *et al*, 2001. A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 128(1): 145—158
Ohde T, Masumoto M, Yaginuma T *et al*, 2009. Embryonic RNAi analysis in the firebrat, *Thermobia domestica*: distal-less is required to form caudal filament. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 78(2): 99—105
Oliveira D C S G, Werren J H, Verhulst E C *et al*, 2009. Identification and characterization of the *doublesex* gene of *Nasonia*. Insect Molecular Biology, 18(3): 315—324
Olmstead A W, Leblanc G A, 2002. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. Journal of Experimental Zoology, 293(7): 736—739
Sagawa K, Yamagata H, Shiga Y, 2005. Exploring embryonic germ line development in the water flea, *Daphnia magna*, by zinc-finger-containing VASA as a marker. Gene Expression Patterns, 5(5): 669—678
Shukla J N, Nagaraju J, 2010. Two female-specific DSX proteins are encoded by the sex-specific transcripts of *dsx*, and are required for female sexual differentiation in two wild silkmoth species, *Antheraea assama* and *Antheraea mylitta* (Lepidoptera, Saturniidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40(9): 672—682
Tatarazako N, Oda S, Watanabe H *et al*, 2003. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. Chemosphere, 53(8): 827—833
Thisse C, Thisse B, 2008. High-resolution *in situ* hybridization to whole-mount zebrafish embryos. Nature Protocols, 3(1): 59—69
Xu X Q, Song S H, Wang Q *et al*, 2009. Analysis and comparison of a set of expressed sequence tags of the parthenogenetic water flea *Daphnia carinata*. Molecular Genetics and Genomic, 282(2): 197—203
Zamore P D, 2001. RNA interference: listening to the sound of silence. Nature Structural Biology, 8(9): 746—750

ANALYSIS OF *DOUBLESEX1* GENE EXPRESSION AFTER RNA INTERFERENCE IN *DAPHNIA PULEX*

TONG Qiao-Qiong[1], LIN Chong-Yuan[1], ZHU Xiao-Jing[1], ZHOU Wei[1], XU Shan-Liang[1], WANG Dan-Li[1], ZHAO Yun-Long[2]

(1. *School of Marine Science*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315211, *China*;
2. *School of Life Science*, *East China Normal University*, *Shanghai* 200062, *China*)

Abstract To explore the role of *doublesesx1* (*dsx1*) of *Daphnia pulex* in reproductive conversion, *D. pulex* of different reproductive stages were soaked in double-strand RNA (dsRNA) of *dsx1* that had been synthesized *in vitro*. We adopted a *dsx1* gene silencing method for *D. pulex* according to the characters of cuticula. Real-time PCR and whole-mount *in situ* hybridization were applied to detect the overall variation in *dsx1* mRNA expression level in different individuals after interference. Real-time PCR result shows that *dsx1* expression decreased significantly ($P<0.05$) in different reproductive stages in descending order of parthenogenetic females (68%), males (56%), and ephippial females (20%). Whole-mount *in situ* hybridization revealed that *dsx1* expressed in the first antennae in males and ephippial females, whereas in the corresponding sites of parthenogenetic females, no expression was detected. Moreover, the expression was not detected in the first thoracic limb and compound eyes in all individuals, which is different from the situation before interference. Therefore, considering the expression patterns of different reproductive states, we believe that *dsx1* is involved in the reproductive transformation and the maintenance of male sexual characteristics of *D. pulex*.

Key words *Daphnia pulex*; *doublesex1*; RNAi; qPCR; whole-mount *in situ* hybridization; reproductive conversion