

黄颡鱼 *DMRT1* 基因 cDNA 全长克隆及其表达分析

李林^{1,2} 梁宏伟^{1,3} 李忠^{1,3} 罗相忠^{1,3}
张志伟^{1,2} 朱媛媛^{1,2} 邹桂伟^{1,2,3}

1. 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室/中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223;
2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081

摘要 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆了黄颡鱼 *DMRT1* 基因 cDNA 全长序列, 并利用实时荧光定量 RT-PCR 技术对该基因在黄颡鱼成体不同组织及不同发育阶段的表达情况进行研究。结果表明, 黄颡鱼 *DMRT1* 基因 cDNA 序列全长 1 381 bp, 其中 5' 端非翻译区 30 bp, 3' 端非翻译区 454 bp [不包括 poly(A)], 开放阅读框 885 bp, 编码 295 个氨基酸。氨基酸序列同源性分析表明, 黄颡鱼 *DMRT1* 基因与革胡子鲶同源性最高 (为 81%), 与黑鲟、虹鳟、斑马鱼、青鳉的同源性分别为 60%、59%、64% 和 52%, 与小鼠、人的同源性较低, 分别为 42% 和 44%。实时荧光定量 RT-PCR 分析表明: *DMRT1* 基因在黄颡鱼胚胎发育阶段及胚后发育的 1~51 d 仔鱼均有表达, 且在胚后发育的第 31 天表达量最高; 在成体, 只在雄性精巢中特异性表达, 其他组织均无表达, 且性腺发育阶段的 IV 期精巢表达量最高, 表明该基因可能在黄颡鱼雄性性腺的形成或功能维持上具有重要作用。

关键词 黄颡鱼; *DMRT1* 基因; cDNA 末端快速扩增 (RACE); 基因克隆; 荧光定量; 表达分析

中图分类号 Q 781; Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0220-07

DMRT (doublesex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是一个与性别决定和分化相关的基因家族, 广泛参与生物的性别发育过程, 其编码产物与果蝇的 *doublesex* 基因和线虫的 *mab-3* 基因一样, 都含有一个 DM 结构域 (DM-domain), 以锌指结构与特异的 DNA 序列结合, 调节目的基因转录, 从而调控性别的决定与分化^[1]。*DMRT1* 是 *DMRT* 基因家族成员之一, 相继发现于哺乳类^[2]、鱼类^[3]、鸟类^[4]、爬行类^[5] 及两栖类^[6] 动物中, 被认为是目前已知最为保守的一个与性别分化相关的基因, 该基因在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的精巢中特异性表达, 对于雄性性腺的形成和功能维持具有重要作用。

黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*), 属于鲶形目 (Siluriformes) 鲶科 (Bagridae) 黄颡鱼属 (*Pelteobagrus* Bleeker)。因其具有食性杂、易驯养、无肌间刺、肉味鲜美、营养价值高等优点, 而成为我国

江河湖泊中一种较为名贵的小型经济鱼类。但在自然水域中, 黄颡鱼生长速度较慢, 且同龄性成熟的个体雌雄差异显著, 雄性个体明显大于雌性个体, 生长速度雄性比雌性个体快 30% 以上^[7], 往往造成养殖上市规格小、不整齐, 在一定程度上影响了其市场发展前景。本研究采用 RT-PCR 及 RACE 技术, 在黄颡鱼中分离出了 *DMRT1* 基因, 并利用实时荧光定量 PCR 技术对其在胚胎发育阶段、胚后发育阶段、雌雄成体阶段及性腺发育阶段的表达进行了研究, 以期对黄颡鱼早期性别鉴定、单性育种及其性别决定机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用材料取自中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场。在胚胎发育阶段对受精卵进行连续取样, 每期各取 20 粒; 胚后发育 1~51 d 连

收稿日期: 2011-05-17

基金项目: 国家“863”计划 (2011AA100401) 和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目

李林, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: lilin-zyfz@163.com

通讯作者: 邹桂伟, 研究员。研究方向: 鱼类遗传育种。E-mail: zougw@yfi.ac.cn

续取样;成体阶段分别取 1 龄雌雄成鱼的脑、鳃、心脏、肝脏、肾脏、胃、肠道、肌肉及性腺组织;以及雌雄性腺发育的 III-VI 期,样品取后迅速冻于液氮,带回实验室 -80 °C 保存。

1.2 引物设计

根据已发表的 *DMRT1* 基因保守区序列设计引物 P1、P2 和 P3,用于克隆黄颡鱼 *DMRT1* 基因保守区,引物 P4 和 P5、P6 分别用于克隆 *DMRT1* 基因的 5'RACE 和 3'RACE,P7 为半定量表达的基因特异性引物, β -actin1 为半定量表达的内参引物,P8 为定量表达的基因特异性引物, β -actin2 为定量表达的内参引物,以上引物均采用 Primer 5.0 设计,由上海生工生物技术有限公司合成。

P1:5'-TTCTGTAAGTGGCGGGACT-3'
 P2:5'-CCACTGCAAAGCCGTAATC-3'
 P3:5'-TCCTGGCTCATCCTTCACC-3'
 P4:5'-TCACCACAATGTCCGGATCTGACAGG-3'
 P5:5'-GTCAGCAGGCTCAGGAGGAGGAGATG-3'
 P6:5'-GAGATGGGCATCTGCACTCCAGTCA-3'
 P7:F 5'-ACAACATGTCCCAGCAATACCG-3'
 R 5'-TGTTCTCAGCACTCACCATAGG-3'
 P8:F 5'-TGGTGAGTGCTGAGAACAAGG3'
 R 5'-TGGGCAAAATCGAACTGAAAC-3'
 β -actin1:F 5'-CCCTGTATGCCTCTGGTGC-3'
 R 5'-GCTGTAGCCTCTCTCGGTC-3'
 β -actin2:F 5'-TCCCTGTATGCCTCTGGTCTG-3'
 R 5'-AAGCTGTAGCCTCTCTCGGTC-3'

1.3 总 RNA 抽提

将上述所取雌雄成体各组织及不同发育阶段性腺组织 100 mg,胚胎发育期各 20 粒及胚后发育的整条仔鱼,用 Trizol Reagent(Invitrogen),根据使用说明抽提总 RNA。1% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色显示 28S rRNA 和 18S rRNA,检测 RNA 完整性。

1.4 cDNA 全长扩增

取 2 μ g 精巢总 RNA,以 Random 9 mers [5'-(P)NNNNNNNNN-3']为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应。以 P1 和 P2 为引物进行扩增,取 1 μ L 产物以 P1 和 P3 为引物进行 2 次扩增,回收、纯化所得片段,连接到 pMD18-T Vector,转化到大肠杆菌克隆,挑菌送上海生工生物技术有限公司测序。

根据黄颡鱼 *DMRT1* 基因保守区序列,设计 5'RACE 和 3'RACE 基因特异性引物 P4 和 P5、P6,

利用 SMART er™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 及 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 (TaKaRa)采用 SMART RACE 技术分别进行 5'区及 3'区扩增。将所得片段回收、纯化,连接到 pMD18-T Vector,转化到大肠杆菌克隆,挑菌送上海生工生物技术有限公司测序。利用 DNASTAR 软件包对所得序列进行序列拼接及分析,并在 GenBank 上进行同源性检索。

1.5 标准曲线制备

取 1 管精巢总 RNA 反转录液进行 5 倍梯度稀释(100、100 \times 5⁻¹、100 \times 5⁻²、100 \times 5⁻³、100 \times 5⁻⁴ ng/ μ L)用作荧光定量 RT-PCR 扩增模板,进行 *DMRT1* 基因定量表达引物 P8 和内参引物 β -actin2 的标准曲线制备,检测扩增效率。每个标准各做 3 个重复,另做 3 个无模板的阴性对照。

1.6 荧光定量 RT-PCR

利用紫外分光光度计检测总 RNA 纯度及浓度,调整样品总 RNA 质量浓度至 100 ng/ μ L。取 2 μ L 总 RNA,以 Random 9 mers [5'-(P)NNNNNNNNN-3']为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,获得相应的 cDNA。利用定量表达引物 P8 及内参引物 β -actin2 来检测 *DMRT1* 基因在黄颡鱼不同组织及不同发育时期的表达情况。

反应体系:10 μ L 2 \times SYBR Real-time PCR Premixture,P8/ β -actin2 上下游引物各 0.8 μ L(10 μ mol/L),1 μ L cDNA 模板,加水至 20 μ L。反应条件:95 °C 10 min;95 °C 15 s,63 °C 15 s,72 °C 20 s,40 个循环。所有检测样品均做 3 个重复。

1.7 相对表达量计算

试验数据以 mean \pm S 表示,以受精卵的表达量作为对照(即为 1),确定 *DMRT1* 基因在不同组织及不同阶段的表达量,相对定量采用 Livak 等的 2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法进行^[8],结果采用 Statistica 6.0 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)及 *t* 检验(*t*-test)。

2 结果与分析

2.1 cDNA 结构

利用同源克隆的方法得到黄颡鱼 *DMRT1* 基因保守区片段,通过 RACE SMART 技术获得其 cDNA 全长(GenBank 登录号为 HM245921),共 1 381 bp,其中 5'端非翻译区 30 bp,3'端非翻译区 454 bp(不包括 poly(A)),开放阅读框 885 bp,编码 295 个氨基酸,A+T 含量 53%,G+C 含量 47%。

2.2 氨基酸结构

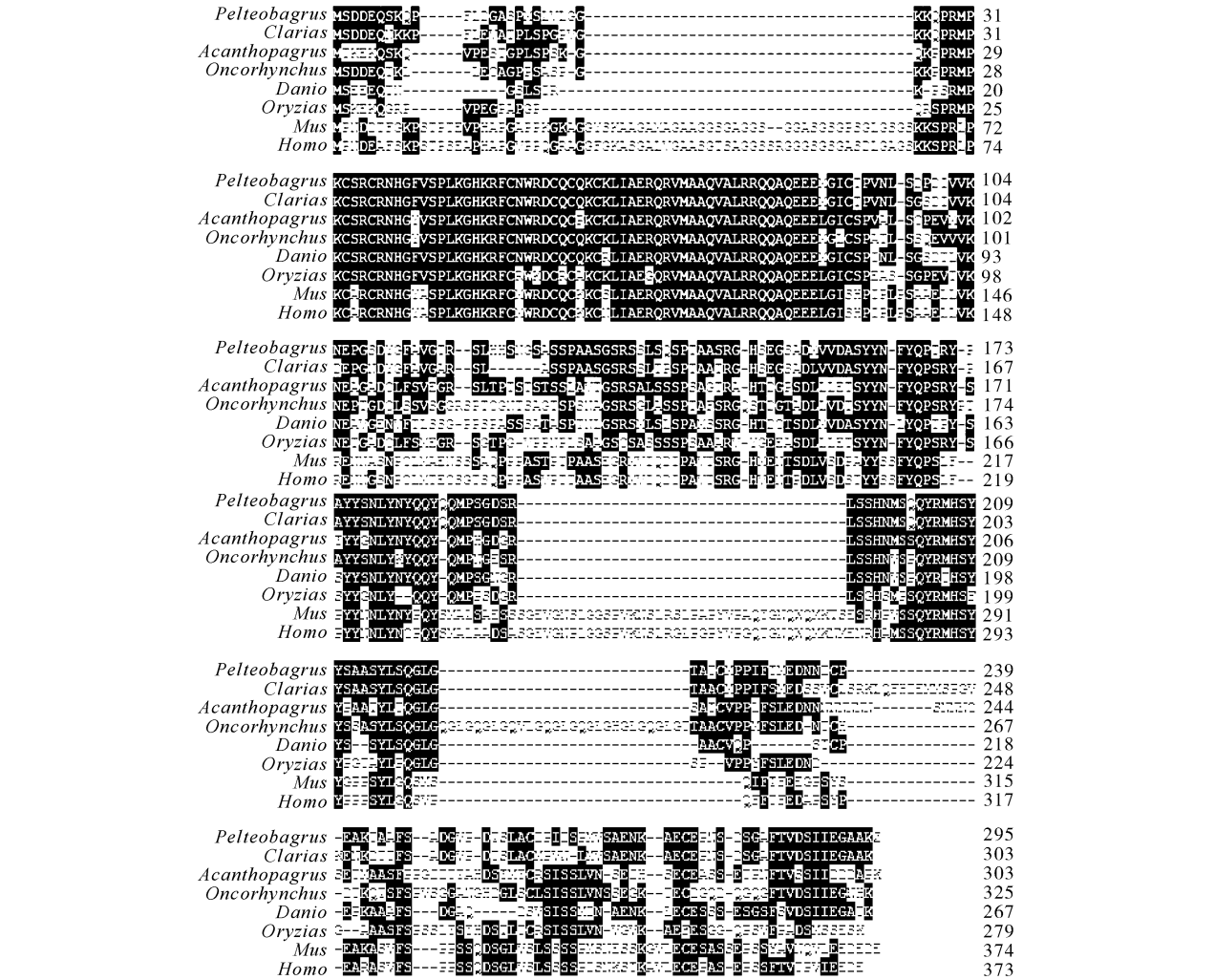
采用 DNASTAR 软件对黄颡鱼 DMRT1 基因编码的蛋白质结构进行分析,结果显示其编码的蛋白质由 295 个氨基酸组成,分子质量为 32.18 ku,理论等电点 pI 为 6.93,酸性氨基酸占 9.49%,碱性氨基酸占 9.15%,极性氨基酸占 36.27%,疏水性氨基酸占 25.08%。

2.3 同源性比较

Blast 分析发现,黄颡鱼 DMRT1 基因氨基酸序列与其他物种的同源性较高,其中,与革胡子鲶 (Clarias gariepinus, AF439561)DMRT1 基因的氨基酸序列同源性最高,为 81%;与黑鲷 (Acan-

thopagrus schlegelii, AY323953)、虹鳟 (Oncorhynchus mykiss, AF209095)、斑马鱼 (Danio rerio, AF439562)、青鳉 (Oryzias latipes, AB091696) 的同源性分别为 60%、59%、64% 和 52%;与小鼠 (Mus musculus, AF202778) 和人 (Homo sapiens, AF130728) 的同源性最低,分别为 42% 和 44%,氨基酸序列比较结果见图 1。

根据以上物种 DMRT1 基因氨基酸序列运用 MEGA4.0 软件构建 NJ 系统进化树(图 2),可以看出,黄颡鱼与革胡子鲶聚为一支,亲缘关系最近,与小鼠、人的亲缘关系最远,与其他鱼类的亲缘关系介于两者之间。



阴影表示氨基酸相同;“---”表示氨基酸缺失。Shadow region indicates identical amino acid; “---” indicates amino acid deletion. Pelteobagru;Pelteobagrus fulvidraco DMRT1; Clarias;Clarias gariepinus DMRT1; Acanthopagrus;Acanthopagrus schlegelii DMRT1; Oncorhynchus;Oncorhynchus mykiss DMRT1; Danio;Danio rerio DMRT1; Oryzias;Oryzias latipes DMRT1; Mus;Mus musculus DMRT1; Homo;Homo sapiens DMRT1.

图 1 黄颡鱼与其他物种 DMRT1 氨基酸序列比较 Fig.1 Alignment of the amino acid sequences of DMRT1 gene in Pelteobagrus fulvidraco with other species

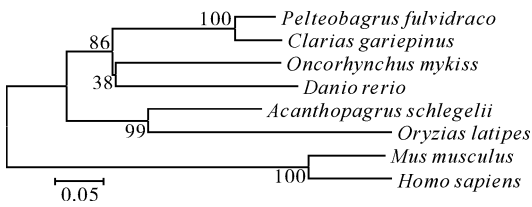


图 2 *DMRT1* 基因氨基酸序列的 NJ 系统树

Fig. 2 The NJ phylogenetic tree by amino acid sequences of *DMRT1* gene

2.4 引物扩增效率检测

精巢总 RNA 反转录液 5 倍梯度稀释后, 每个梯度标准各做 3 个重复, 同时做 3 个无模板的阴性对照, 标准曲线绘制采用 3 个重复的平均循环数(C_t 值)。基因特异性引物 P8 及内参引物 β -actin2 两条标准曲线的斜率差值 < 0.1 , 表明 2 对引物扩增效率基本一致, 可以用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来进行 *DMRT1* 基因的相对定量。

2.5 成体阶段组织表达分析

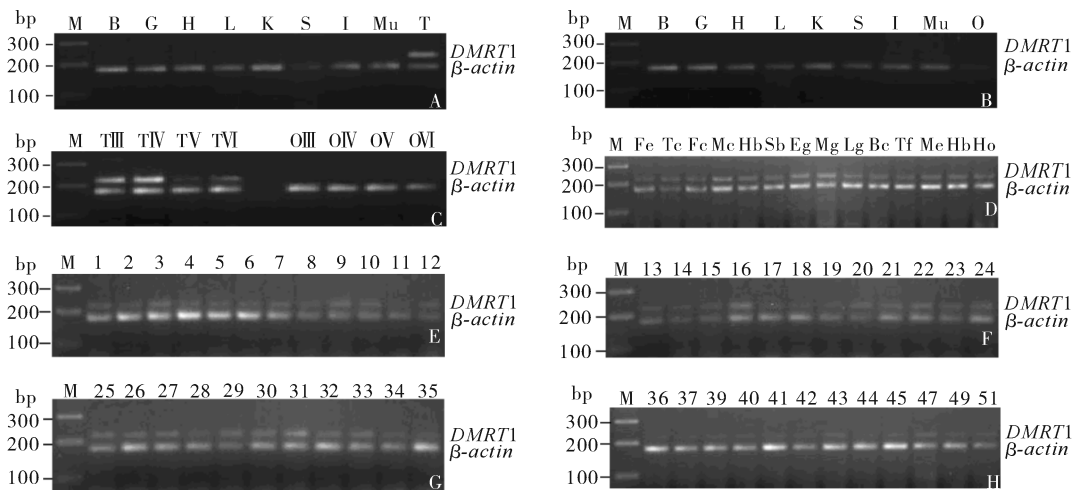
以 *DMRT1* 基因 cDNA 序列设计的特异性引物 P7, 采用 RT-PCR 技术对黄颡鱼雌雄成体各组织的表达进行分析, 结果显示, *DMRT1* 基因只在雄鱼精巢特异表达, 其他组织均无表达 (图 3-A、B)。RT-PCR 相对定量结果见图 4-A。

2.6 性腺发育阶段表达分析

DMRT1 基因在黄颡鱼精巢及卵巢的 III 期、IV 期、V 期、VI 期发育阶段的 RT-PCR 结果显示, 精巢各期都有表达, 但不同时期表达强度有差异, 而卵巢各期均无表达 (图 3-C)。RT-PCR 相对定量结果显示, 精巢 IV 期表达量最高, V 期最低, 分别为对照受精卵表达量的 4.46 和 1.30 倍 (图 4-B)。

2.7 胚胎发育阶段表达分析

RT-PCR 分析显示, *DMRT1* 基因在胚胎期从受精卵一直到出膜, 都可以检测到其转录本的存在



A: 雄性成体各组织; B: 雌性成体各组织; C: 精巢及卵巢不同发育阶段; D: 胚胎期; E: 胚后 1~12 d; F: 胚后 13~24 d; G: 胚后 25~35 d; H: 胚后 36~51 d; [M, Marker; B. 脑; G. 鳃; H. 心脏; L. 肝脏; K. 肾脏; S. 胃; I. 肠; Mu. 肌肉; T. 精巢; O. 卵巢; T III: III 期精巢; T IV: IV 期精巢; T V: V 期精巢; T VI: VI 期精巢; O III: III 期卵巢; O IV: IV 期卵巢; O V: V 期卵巢; O VI: VI 期卵巢; Fe. 受精卵; Tc. 二细胞期; Fc. 四细胞期; Mc. 多细胞期; Hb. 高囊胚期; Sb. 低囊胚期; Eg. 原肠早期; Mg. 原肠中期; Lg. 原肠晚期; Bc. 胚孔封闭期; Tf. 尾节形成期; Me. 肌肉效应期; Hb. 心跳期; Ho. 出膜; 1~51: 胚后发育天数]。

A: Male adult tissues; B: Female adult tissues; C: Testis and ovary development stage; D: Embryonic development; E: 1 to 12 days after hatching; F: 13 to 24 days after hatching; G: 25 to 35 days after hatching; G: 36 to 51 days after hatching; [M: Marker; B: Brain; G: Gill; H: Heart; L: Liver; K: Kidney; S: Stomach; I: Intestines; Mu: Muscle; T: Testis; O: Ovary; T III: III stage of testis development; T IV: IV stage of testis development; T V: V stage of testis development; T VI: VI stage of testis development; O III: III stage of ovary development; O IV: IV stage of ovary development; O V: V stage of ovary development; O VI: VI stage of ovary development; Fe: Fertilized egg; Tc: Two cell stage; Fc: Four cell stage; Mc: Multicellular stage; Hb: High blastula stage; Sb: Short blastula stage; Eg: Early stage of gastrula; Mg: Eiddle stage gastrula; Lg: Late stage gastrula; Bc: Blastopore closing stage; Tf: Tail bud formation stage; Me: Muscle effect stage; Hb: Heart beat stage; Ho: Hatch out stage; 1-51: Days after hatching]。

图 3 *DMRT1* 基因 RT-PCR 电泳结果

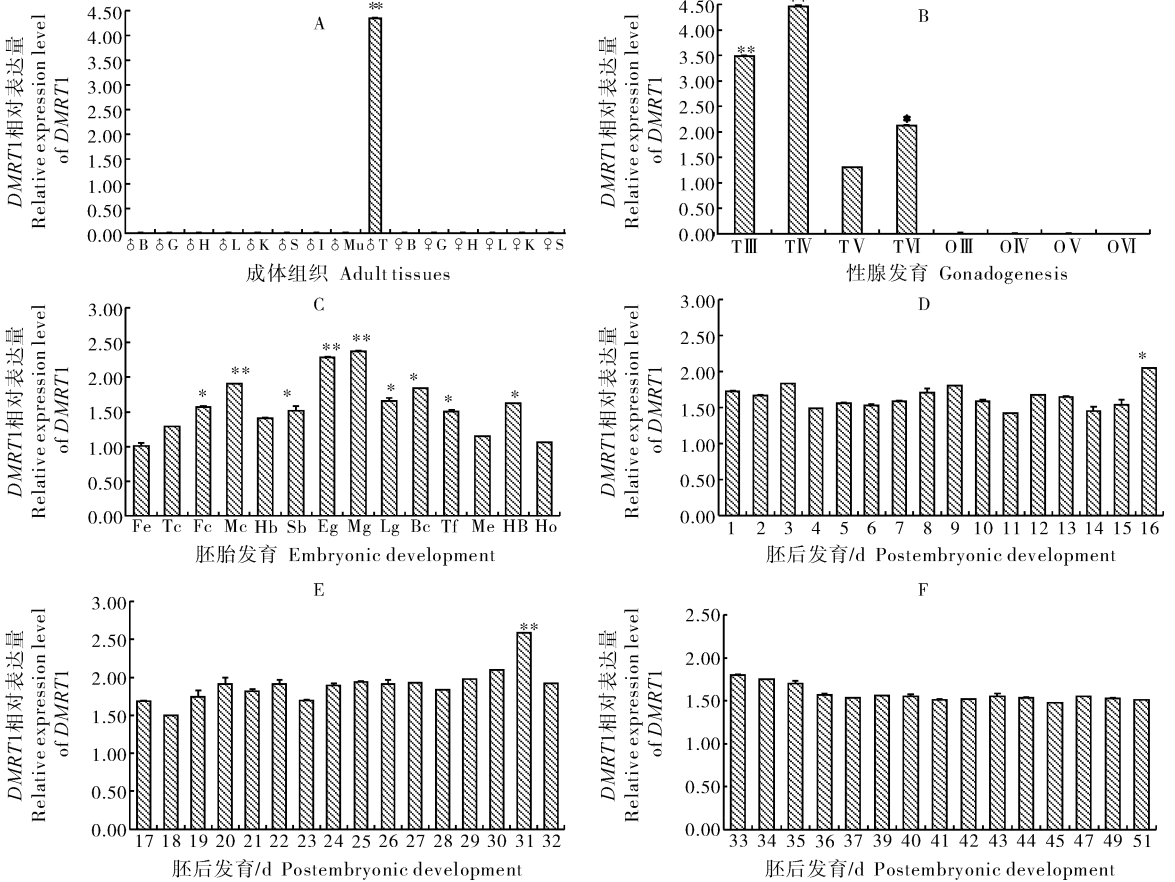
Fig. 3 RT-PCR electro phoresis results of *DMRT1*

(图 3-D)。RT-PCR 相对定量结果显示, *DMRT1* 基因在原肠中期表达量最高, 原肠早期次之, 分别为对照受精卵表达量的 2.37 和 2.29 倍(图 4-C)。

2.8 胚后发育阶段表达分析

黄颡鱼 *DMRT1* 基因在胚后发育的 1~51 d 里, RT-PCR 结果同样显示其一直有表达(图 3-E、

F、G、H)。RT-PCR 相对定量结果显示, *DMRT1* 基因在胚后发育的前期阶段(1~35 d)表达量要高一些, 且在第 31 天的表达量最高, 为对照受精卵表达量的 2.59 倍, 后期阶段其表达量维持在一个较低水平(图 4-D、E、F)。



A: 雄性及雌性成体各组织; B: 精巢及卵巢不同发育阶段; C: 胚胎期; D: 胚后 1~16 d; E: 胚后 17~32 d; F: 胚后 33~51 d; [B. 脑; G. 鳃; H. 心脏; L. 肝脏; K. 肾脏; S. 胃; I. 肠; Mu. 肌肉; T. 精巢; O. 卵巢; TIII: III 期精巢; TIV: IV 期精巢; TV: V 期精巢; TVI: VI 期精巢; OIII: III 期卵巢; OIV: IV 期卵巢; OV: V 期卵巢; OVI: VI 期卵巢; Fe. 受精卵; Tc. 二细胞期; Fc. 四细胞期; Mc. 多细胞期; Hb. 高囊胚期; Sb. 低囊胚期; Eg. 原肠早期; Mg. 原肠中期; Lg. 原肠晚期; Bc. 胚孔封闭期; Tf. 尾节形成期; Me. 肌肉效应期; Hb. 心跳期; Ho. 出膜; * : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$].

A: Male and female tissues; B: Testis and ovary development stage; C: Embryonic development stage; D: 1 to 16 days after hatching; E: 17 to 32 days after hatching; F: 33 to 51 days after hatching; [B: Brain; G: Gill; H: Heart; L: Liver; K: Kidney; S: Stomach; I: Intestines; Mu: Muscle; T: Testis; O: Ovary; TIII: III stage of testis development; TIV: IV stage of testis development; TV: V stage of testis development; TVI: VI stage of testis development; OIII: III stage of ovary development; OIV: IV stage of ovary development; OV: V stage of ovary development; OVI: VI stage of ovary development; Fe: Fertilized egg; Tc: Two cell stage; Fc: Four cell stage; Mc: Multicellular stage; Hb: High blastula stage; Sb: Short blastula stage; Eg: Early stage of gastrula; Mg: Middle stage gastrula; Lg: Late stage gastrula; Bc: Blastopore closing stage; Tf: Tail bud formation stage; Me: Tuscle effect stage; Hb: Heart beat stage; Ho: Hatch out stage; * : $P < 0.05$; * * : $P < 0.01$].

图 4 *DMRT1* 基因 real-time RT-PCR 相对定量结果

Fig. 4 The real-time fluorescence quantification RT-PCR results of *DMRT1*

3 讨论

DMRT1 基因作为目前已知最为保守的一个与性别决定及分化相关的基因,广泛参与诸多物种的性别发育过程,在性别决定、分化以及器官的功能维持上具有重要作用^[9],但其在进化地位不同、性别发育机制不同的物种性别发育过程中所起的作用及表达特性不尽相同。

Raymond 等^[10]发现,人类 *DMRT1* 基因位于与性别反转密切相关的常染色体区域 9p24.3,该区域若发生 *DMRT1* 片段缺失会导致精巢发育障碍。Raymond 等^[11]研究表明,XY 雄性小鼠如果 *DMRT1* 基因被敲除会导致睾丸分化受阻及生殖细胞死亡,说明 *DMRT1* 基因对于小鼠的精巢分化和精子形成具有重要作用。Smith 等^[12]将鸡的 *DMRT1* 基因定位于 Z 染色体上,通过胚胎原位杂交发现早期表达于生殖嵴,雄性表达高于雌性,但在性分化开始时 *DMRT1* 基因表现为雄性精巢特异表达,表明 *DMRT1* 在诱导鸡的精巢分化时起重要作用。在鱼类中,Kobayashi 等^[13]在研究 *DMRT1* 基因在青鳉性腺分化中的表达位点和表达形式时,发现 *DMRT1* 调控精原细胞的分化。孙业盈等^[14]对半滑舌鳎 *DMRT1* 基因进行研究时,发现成鱼中只在雄性精巢中有特异表达,其他组织均无表达。Guan 等^[15]在尼罗罗非鱼的精巢中分离出了 *DMRT1* 基因,组织特异性表达检测 *DMRT1* 基因只在成体精巢中表达,用雄激素处理遗传上 XX 型幼鱼使其发生性逆转,发现性腺中也有 *DMRT1* 表达。本文利用 RT-PCR 技术及 real-time RT-PCR 技术对黄颡鱼 *DMRT1* 基因在雌雄不同组织和不同发育阶段的表达进行了研究,结果显示雌雄成体阶段,*DMRT1* 基因只在黄颡鱼雄性精巢特异性表达,这与上述研究结果基本一致,表明其在黄颡鱼的精巢形成或功能维持上可能具有一定的作用。性腺发育阶段,*DMRT1* 基因在黄颡鱼精巢的Ⅲ期、Ⅳ期的表达水平明显高于Ⅴ期及Ⅵ期,卵巢各期均无表达。而 Shibata 等^[6]运用 RT-PCR 技术,也发现 *DMRT1* 基因在日本粗皮蛙性腺中的表达是雄性特异的,而在雌性卵巢无表达;Klinbunga 等^[16]发现热带鲍鱼 *DMRT1* 基因在精巢发育Ⅱ期、Ⅲ期、Ⅳ期的表达水平显著高于未发育Ⅰ期精巢;而本研究结果显示 *DMRT1* 基因在黄颡鱼精巢发育的Ⅳ期表达量最高,在精子成熟的Ⅴ期及退化的Ⅵ期其表达量下降,

表明 *DMRT1* 基因可能跟精巢的功能维持有关。胚胎发育阶段,整个过程都能检测到 *DMRT1* 基因的表达,但在原肠前期的表达量显著高于其他时期,Yuki 等^[17]曾用 RT-PCR 技术检测出 *DMRT1* 在青鳉胚胎发育的早期有表达。胚后发育阶段,*DMRT1* 基因在黄颡鱼 1~51 d 的仔鱼都能检测到其转录本的存在,且前期 1~35 d 的表达量较高,后期 36~51 d 其表达量维持在一个较低的水平,同时我们还发现,在胚后发育的第 31 天表达量最高,这与孙业盈等^[14]在半滑舌鳎胚后发育的第 22 天 *DMRT1* 基因表达量明显高于其他各期的研究结果较为相似,表明黄颡鱼在这一时期其性腺在细胞及分子水平可能已经开始分化,但 *DMRT1* 基因在这一时期的高表达与性腺分化是否有关,还有待进一步的研究证明。

参 考 文 献

- [1] RAYMOND C S, SHAMU C E, SHEN M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes[J]. Nature, 1998, 391: 691-695.
- [2] GRANDI A D, CALVAN V, BERTINI V, et al. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation[J]. Mech Dev, 2000, 90: 323-326.
- [3] KONDO M, FROSCHAUER A, KITANO A, et al. A molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. Genes Dev, 2002, 16(18): 2390-2392.
- [4] NANDA I, SHAN Z, SCHARD M, et al. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9[J]. Nat Genet, 1999, 21: 258-259.
- [5] KETTLEWELL J R, RAYMOND C S, ZARKOWER D. Temperature dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation[J]. Genesis, 2000, 26: 174-178.
- [6] SHIBATA K, TAKASE M, NAKAMURA M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 127: 232-241.
- [7] 李秀启, 陈毅峰, 李玺. 抚仙湖外来黄颡鱼种群的年龄和生长特征[J]. 动物学报, 2006, 52(2): 263-271.
- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Method, 2001, 25: 402-408.
- [9] BRUNNER B, HORNING U, SHAN Z, et al. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*[J]. Genomics, 2001, 77: 8-17.
- [10] RAYMOND C S, PARKER E D, KETTLEWELL J R, et al. A

- region of human chromosome 9P required for testis development contain two genes related to known sexual regulators [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8(6): 989-996.
- [11] RAYMOND C S, KETTLWELL J R, HIRSCH B, et al. Expression of *DMRT1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development[J]. *Dev Biol*, 1999, 215(2): 208-220.
- [12] SMITH C A, ROESZLER K N, OHNESORG T, et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken[J]. *Nature*, 2009, 461: 267-271.
- [13] KOBAYASHI T, MATSUDA M, KOBAYASHI H K, et al. Two DM domain genes, *DMY* and *DMRT1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(3): 518-526.
- [14] 孙业盈, 张全启, 齐洁. 半滑舌鳎 *DMRT1* 基因的克隆与表达分析[J]. *武汉大学学报: 理学版*, 2008, 54(2): 221-226.
- [15] GUAN J G, KOBAYASHI T, NAGAHAMA Y. Sexually dimorphic expression of types of *DM* (doublesex mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(3): 662-666.
- [16] KLINBUNGA S, AMPARYUP P, KHAMNAMTONG B, et al. Isolation and characterization of testis-specific *DMRT1* in the tropical abalone (*Haliotis asinina*) [J]. *Biochem Genet*, 2009, 47: 66-79.
- [17] MATSUYAMA Y O, MATSUDA M, KOBAYASHI T, et al. Expression of *DMY* and *DMTR1* in various tissues of the medaka, *Oryzias latipes*[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2003, 28: 171.

Cloning and expression analysis of *DMRT1* gene in *Pelteobagrus fulvidraco*

LI Lin^{1,2} LIANG Hong-wei^{1,3} LI Zhong^{1,3} LUO Xiang-zhong^{1,3}
ZHANG Zhi-wei^{1,2} ZHU Yuan-yuan^{1,2} ZOU Gui-wei^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization,
Certificated by Ministry of Agriculture /

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of
Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract The *DMRT1* gene was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). The expression of the gene was analyzed in adult tissues and different developmental stages by real-time quantitative RT-PCR. Sequence analysis revealed that the full-length of cDNA was 1 381 bp, containing 30 bp 5'-untranslated region, 454 bp 3'-untranslated region [excluding poly(A)] and 885 bp open reading frame (ORF), which encode 295 amino acids. Alignment analysis showed that the amino acid sequences of *DMRT1* gene in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) were 81%, 60%, 59%, 64%, 52%, 42% and 44% identical to that from clarias lazera (*Clarias gariepinus*), black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), zebrafish (*Danio rerio*), medaka (*Oryzias latipes*), mouse (*Mus musculus*) and human (*Homo sapiens*), respectively. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the *DMRT1* gene expressed in the whole embryonic development stages and 51-day juveniles of postembryonic development, but the expression reached the highest level in juveniles at 31-day after hatching. During the gonad development stages, it was expressed in the male testis specifically. In the adult fish, the expression was detected only in the male testis, but not in other tissues. These results indicated that the *DMRT1* gene may play an important role in the gonad formation or function maintaining of male yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*).

Key words *Pelteobagrus fulvidraco*; *DMRT1* gene; rapid amplification of cDNA ends; gene clone; real-time RT-PCR; expression analysis