

团头鲂 *Dmrt4* 基因的克隆与表达分析

苏利娜^{1,2} 丁祝进^{1,2} 李 鸿^{1,3} 周凤娟² 王卫民^{1,2} 刘 红^{1,2}

1. 华中农业大学水产学院/农业部淡水生物繁育重点实验室, 武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;

3. 湖南省水产科学研究所, 长沙 410153

摘要 为研究团头鲂 *Dmrt4* 基因的可能作用, 采用 RACE-PCR 技术克隆了团头鲂卵巢 *Dmrt4* 基因的 cDNA 全长序列, 采用实时荧光定量 PCR 技术对其胚胎及出膜后 30 d 内各期、成鱼不同组织、雌雄性腺各分期的表达进行研究。结果表明, 团头鲂 *Dmrt4* 基因至少存在 2 种不同的剪接形式, 分别命名为 *Dmrt4a* 和 *Dmrt4b*。其中, *Dmrt4a* cDNA 全长 1 265 bp, 编码 352 个氨基酸, 含 DM 和 DMA 2 个结构域; *Dmrt4b* cDNA 全长 1 081 bp, 编码 281 个氨基酸, 仅含 DMA 结构域。氨基酸序列同源性分析显示, 团头鲂 *Dmrt4* 与牙鲆、奥利亚罗非鱼的同源性最高。实时荧光定量 PCR 结果表明, *Dmrt4* 基因在团头鲂胚胎期至出膜后 30 d 内均有表达, 且在受精后 32 h 的表达量最高; 成鱼卵巢的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.01$); II 期卵巢的表达量显著高于其他时期, 也显著高于精巢各分期 ($P < 0.01$)。上述结果表明, *Dmrt4* 基因可能对团头鲂卵母细胞初期的生长起到重要作用, 在雌鱼性腺发育过程中亦发挥一定的作用。

关键词 团头鲂; *Dmrt4* 基因; 分子克隆; 基因差异表达; 胚胎发育; 性别决定与分化

中图分类号 S 965.119 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0110-07

果蝇的性别决定基因 *Double-sex* 与线虫的性别决定基因 *Mab-3* 具有一个高度同源的区域, 称为 DM(double-sex and mab-3 related) 结构域, 进一步的研究发现在哺乳类、鸟类、爬行类以及鱼类等脊椎动物中也存在具有 DM 结构域的基因, 统称为 *Dmrt*(double-sex and mab-3 related transcription factor) 基因家族。*Dmrt* 基因被认为是一类对性别决定与分化起重要作用的转录调控因子^[1-2], 近年的研究发现, 它在器官发育和功能维持等方面也发挥着一定的作用^[3-4]。*Dmrt4* 基因是 *Dmrt* 基因家族成员之一, 因其在生物体存在普遍的选择性剪接现象及对雌性的发育起到重要作用^[5]而备受关注, 目前, 已在奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)^[5]、稀有鮎鲫(*Grobioocypris rarus*)^[6]、赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)^[7]和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)^[8]等生物中发现了其不同剪接体的存在。*Dmrt4* 基因在雌雄两性性腺中表达, 或仅在一个性腺中表达^[9], 对生物的性别决定和分化起到一定的作用; 在非性腺组

织中也有表达, 较其他 *Dmrt* 基因的表达更普遍一些。也有研究表明, *Dmrt4* 基因在神经系统形成^[10]、免疫活动^[11]等方面发挥一定的作用。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) 系鲤科鲂属的一类草食性鱼类, 又名武昌鱼, 因其具有病害少、食物链短、味道鲜美等优点, 被推广至全国养殖, 目前年产量达 60 万~70 万 t^[12]。但对其 *Dmrt* 基因的研究尚未见任何报道。笔者拟对团头鲂 *Dmrt4* 基因进行克隆和系统进化分析, 并通过实时荧光定量 PCR 技术研究该基因在成鱼各组织的表达特征、在胚胎及胚后发育早期以及雌雄性腺不同发育时期的时空表达模式, 从而发现其表达规律, 推测其可能功能, 为研究团头鲂性别决定与分化机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用团头鲂均采自湖北鄂州国家级团头鲂

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD26B00)、中央高校基本科研业务费专项(2011PY120)和湖北省自然科学基金项目(2012FFB02903)

苏利娜, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: sulinaliyang@163.com

通讯作者: 刘 红, 博士, 教授, 研究方向: 鱼类遗传育种. E-mail: liuhong59@mail.hzau.edu.cn

原种场,每次均是将鱼充氧打包带回华中农业大学水产学院暂养后进行取样。平均水温 27.6 °C 条件下,对团头鲂进行人工繁殖,分别取受精后 0、2、6、11、32 h 及出膜后 1、4、10、20、30 d 的样品。分别取 2⁺ 龄雌雄团头鲂成鱼的卵巢、精巢、鳃、脑、心脏、肝、脾、肾、肌肉 9 个组织。于 1 周年内,通过组织切片的方法确定并采集雌雄鱼性腺各 I ~ VI 期的样品。所有样品均取 3 个重复,取后立即置于液氮快速冷冻,之后移到 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 模板的合成

将上述采集得到的组织样品用研钵在液氮中充分研磨,取 100 mg 左右的研磨干粉,根据 Trizol Reagent (TaKaRa, Dalian, China) 试剂盒说明书分

别提取各样品总 RNA。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,检测 RNA 的完整性。将所有样品的总 RNA 用紫外分光光度法检测纯度和浓度。根据 PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒说明,每 20 μL 反应体系中加入 1 μg RNA,进行反转录,得到的 cDNA 用于之后的荧光定量 PCR。

1.3 引物设计

本试验所涉及的引物及用途详见表 1。所有需要合成的引物均用 Primer 5.0 设计,并用 Oligo 7 评价,送上海 Invitrogen 公司合成。引物均稀释成 10 μmol/L 后备用。

表 1 试验涉及引物的名称、序列及用途

Table 1 The name, sequence and purposes of the primers related to this experiment

引物名称 Primer	引物序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Purpose
Dmrt4-Y-F	CCGAACACACGAGTCCACAG	EST 序列验证 EST verification
Dmrt4-Y-R	TGAAGGGCTCTTTGGGGTAG	
Dmrt4-5-outer	TTCAGAGCCGAATCCAGAGCGTC	5' 端扩增 5' amplification
Dmrt4-5-inner	GAGACTGTGGACTCGTGTGTTCG	
Dmrt4-3-outer	CAGGAATCACGGGGTGGTGTCCGGC	3' 端扩增 3' amplification
Dmrt4-3-inner	TCTCCGAACACACGAGTCCACAGTC	
Dmrt4-Q-F	GAACCTGCTGGTCTCACGAT	定量分析 qRT-PCR
Dmrt4-Q-R	GGTGAATGAAGTTGGGTGT	
18S rRNA-Q-F	CGGAGGTTCTGAAGACGATCA	实时荧光定量 PCR 内参 Reference for qRT-PCR
18S rRNA-Q-R	GGGTCGGCATCGTTTACG	
ACTB-Q-F	CGGACAGGTCATCACCATTG	
ACTB-Q-R	CGCAAGACTCCATACCCAAGA	
SMART II A Oligonucleotide	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	RACE PCR 中的 UPM UPM for RACE PCR
5'-CDS	(T) ₂₅ N ₋₁ N (N=A, C, G, or T; N ₋₁ =A, G, or C)	
3'-CDS	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ N ₋₁ N (N=A, C, G, or T; N ₋₁ =A, G, C)	
Long (0.4 mmol/L)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE PCR 中的 UPM UPM for RACE PCR
Short (2 mmol/L)	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	巢式 PCR Nested PCR
	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

1.4 *Dmrt4* 基因的 cDNA 全长克隆

以实验室前期获得的团头鲂转录组测序结果为基础 (NCBI 登录号: SRA045792), 获得了 *Dmrt4* 基因的部分序列。根据得到的 *Dmrt4* 基因部分序列设计引物 *Dmrt4*-Y 对其进行验证。根据基因已知序列设计 RACE 引物 *Dmrt4*-5 扩增其 5' 端序列, 引物 *Dmrt4*-3 扩增其 3' 端序列。用 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Dalian, China) 试剂盒进行团头鲂 *Dmrt4* 基因的 cDNA 全长序列扩增。首先将提取的单条团头鲂卵巢的总

RNA 按试剂盒说明合成 5' 和 3'-RACE-Ready cDNA, 然后以 outer primer 和 UPM 为引物进行第 1 次 PCR 反应, 再以稀释 10 倍的第 1 次 PCR 产物为模板, 以 inner primer 和 NUP 为引物进行巢式 PCR, 最后将得到的 PCR 产物用 PCR Clean Kit (AXYGEN USA) 回收, 连接至载体 pGEM-T Vector (Promega, Beijing, China), 转到感受态细胞 (鼎国 DH5α, Beijing, China) 中进行克隆, 挑取单克隆后摇菌培养, 对菌液进行 PCR 检测后, 挑取合适片段大小的单克隆送上海华大公司测序。

1.5 序列分析

RACE 测序结果用 DNASTAR 软件包里的 SeqMan 进行拼接后得到完整的 cDNA 全长。在 NCBI 的 ORF Finder 网站预测开放阅读框, CDD 网站分析蛋白质序列的保守结构域, 在 EXPASY (<http://expasy.org/tools/>) 的 ProtParam 主页预测其氨基酸的组成、理化性质等。在 NCBI 的 CO-BALT 网站进行多个物种同一基因的比对分析, BLASTP 进行同源比对, 搜索同源基因, 用 MEGA5.05 软件构建系统进化树, 分析该基因在不同物种间的亲缘关系。

1.6 实时荧光定量 PCR 技术检测 *Dmrt4* 基因的相对表达量

根据团头鲂已知序列设计 *Dmrt4* 基因及内参基因 18S rRNA 和 ACTB 的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物(表 1), 采用双标准曲线相对定量方法对团头鲂 *Dmrt4* 基因在成鱼各组织、胚胎至出膜 30 d 发育各时期及性腺发育各时期的表达进行测定。通过对 2 个内参基因表达量的分析发现 18S rRNA 的稳定性明显高于 ACTB, 因此本试验即以

18S rRNA 作内参基因进行相对定量的分析。标准曲线以 10 倍倍比稀释质粒为模板, 样品和标准曲线用相同的反应体系和反应条件, 每个标准及所有样品均做 3 个重复, 另做 3 个无模板的阴性对照。实时荧光定量 PCR 反应体系: ddH₂O 6.45 μ L, Ex Taq Buffer 1.25 μ L, Eva Green 1 μ L, GSP Primer (10 μ mol/L) 0.25 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 0.2 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.1 μ L, 模板 1 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 57 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 团头鲂 *Dmrt4* 基因 cDNA 序列分析

通过 RACE-PCR 技术, 得到 *Dmrt4* 基因的 cDNA 全长序列, 分析发现在团头鲂中至少存在 *Dmrt4* 的 2 种剪接形式(图 1), 该基因的选择性剪接现象发生在 5' 端。其中 *Dmrt4a* cDNA 长 1 265 bp, 5' 端非翻译区长 31 bp, 编码 352 个氨基酸, 含 DM 和 DMA 2 个结构域; *Dmrt4b* cDNA 长 1 081 bp, 5' 端非翻译区长 60 bp, 编码 281 个氨基酸, 仅含 DMA 1 个结构域, 3' 端非翻译区均为 175 bp。

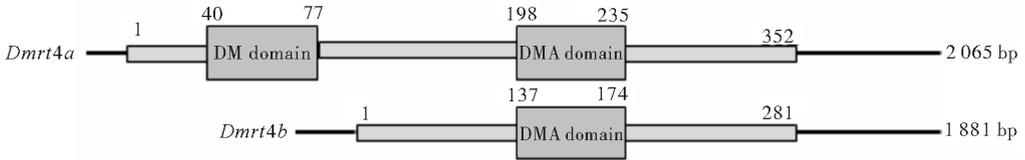


图 1 团头鲂 *Dmrt4* 基因的 2 个选择性剪接体

Fig.1 The two isoforms of *Dmrt4* gene in *Megalobrama amblycephala*

2.2 团头鲂 *Dmrt4* 基因推测氨基酸序列的分析

Dmrt4 基因编码的氨基酸包含 2 个结构域(图 2)。团头鲂 *Dmrt4a* 基因编码的氨基酸序列含 DM 和 DMA 2 个结构域, 分子质量为 38 ku, 理论等电点 pI 为 9.07, 酸性氨基酸占 9.66%, 碱性氨基酸占 14.20%, 极性不带电荷氨基酸占 33.24%; *Dmrt4b* 基因编码的氨基酸序列仅含 DM 结构域, 分子质量为 30 ku, 理论等电点 pI 为 6.31, 酸性氨基酸占 10.32%, 碱性氨基酸占 11.74%, 极性不带电荷氨基酸占 36.30%。团头鲂 *Dmrt4* 基因的 2 种剪接体编码的氨基酸相差 71 个氨基酸, 其余部分都相同。

2.3 团头鲂 *Dmrt4* 基因同源性比较和系统进化分析

BLAST 分析发现, 团头鲂 *Dmrt4* 氨基酸序列与其他物种的同源性不高, 这可能和已有该基因序

列的物种与团头鲂的亲缘关系较远有关。团头鲂 *Dmrt4a* 氨基酸序列与半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、奥利亚罗非鱼、剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)、东方暗鳍鲃(*Takifugu rubripes*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) 的同源性分别为 46%、47%、46%、47%、45%、42%、43%, 与人(*Homo sapiens*)、牦牛(*Bos mutus*)、小鼠(*Mus musculus*) 的同源性均为 40%; *Dmrt4b* 氨基酸序列同源性分析与 *Dmrt4a* 的结果基本相同, 但同源性稍低。根据以上物种, 综合该基因 2 个亚型的氨基酸比对结果, 运用 MEGA5.05 软件构建 NJ (bootstrap = 1 000) 系统进化树(图 3), 可以看出团头鲂与鱼类聚在一个大支上, 与牦牛、人的亲缘关系最远, 与非洲爪蟾的亲缘关系介于两者之间。

Meg	MMESSS	GRF	SLIAPHPTLFLR	PD	23												
Cyn	MDSNRI	RPLGLTGHSSSSLC	GLQVPPSLLR	SSLFLRACNPA	42												
Ory	ME-SRI	RPLBLSAHVSFLG	GLQVPPSLLR	PSLFLRACNPA	41												
Ore	ME-NRI	RPLGLTGHSTGFLG	SLPVPPSLLR	PPLFLQACNPT	41												
Xip	ME-SRI	RQLSMAGHTPSGLG	GLPMPASLLRH	PPLFLRACNPA	41												
Bos	MEQSQCGSRDRSGRSGFLHAFGLVWAAPPPSPALPVFPFGIPVPTFLRP	SSLFLRAASSA		GSGGCPFPFAE	71												
Hom	MERSQCGSRDRGVSGRPHLAFGLVWAAPPPSPALPVFSGMQVFPFAFLRP	PSLFLRAAAAAAATAATSGSGGCPFPFG			79												
Meg	-DRS	YPRSFKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCAVCKALI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEE	-L-QM	89										
Cyn	LERG	YPRTPKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEAREL	RL	114										
Ory	LERG	YPRTPKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEARDL	RL	113										
Ore	LERG	YPRTPKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEARDL	RL	113										
Xip	LERG	YPRTPKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEAREL	RL	113										
Bos	LERGVGAVAGCYPRTPFKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEARGLQR			151										
Hom	LESVGVAVGCCYPRTPFKCARCRNHGVV	SALKGHKRF	CRWRDCVCAKCTI	IAERQRVMAAQVALRRQQAQEESEARGLQR			159										
DM 结构域																	
Meg	IYPAP	GATEGC	VSVSRTPLSS	FDAFSPDAFKE	EKSLNKC	SMFSGFVS	136										
Cyn	LYSGS	GIGCEAVVPH	GSPFGS	GLAAPASSTPSAVGASFDVYRAENQKD	DDKINKFNLYNGFMG		177										
Ory	LYPAS	GICVFAQSPQ	GSPVGA	EVFASSSNPSTV	PCFDVFGAQNPK	DDKVKYFNLYNGYMG	174										
Ore	LYPCT	GICGAGIPIQ	GSSISA	GVPVSASTPAA	ACFDVFGSENQKDVSEDKL	SKYNLYNGYMG	176										
Xip	MYPGT	GICGQAGISQ	GPAVCR	GVAASNTPPA	PCFDVFWRSCTIKRVDKDYKSYICSGFLC		176										
Bos	LYPGSGP	GGRSSGSSRTTST	SSGPAVTAL	GLSASRQASGLAT	PVFEIIFQFDY	IEBKQKQKESKDCSCSQSQE	229										
Hom	LCSGLSWPFGGRASGGGGAENPQSTG	GPAAGAAL	GLGALRQASGSAT	PAFEVFAQDY	PPEKQKQKESKDCSCSQSQE		237										
Meg	QALFA	SEKSDPSNG	SA	SPGPDRLSEHT	SPQ	SLTSSDLE	SGSESEKFPSEAPG	187									
Cyn	RSLFAPHGTRLPSPSEKTECS	SPK-DSNAPLVDDSVSP		SPVFDLSSDHTD	SPQR	SPSSDPE	SGSETEKSTDSF	249									
Ory	RPLFAPHGARLPSPDGRFP	SPRRDSAAASPSADSKSP		SPARDRLSNHTP	SPQRPAS	SSSDPE	SGSNESEKAKY	246									
Ore	RPLFAPHGARLPSPDCKEL	SPS-K	DSGCSQ	SPAMDHRSDHTE	SPQRL	SSSDPE	SGSESEKFPNYL	242									
Xip	QLFTLSLNAVFPSPDKDPL	SPKDNWSSLASDSCSP		SPPSDQLSDNT	SPQRL	SSSDPE	SGSESEKFPKDF	249									
Bos	ELGSKSHQFTLRS	SPKDNWSSLASDSCSP		SPPSDQLSDNT	SPQRL	SSSDPE	SGSESEKFPKDF	249									
Hom	ELTSEKSHQFTLRS	SPKDNWSSLASDSCSP		SPPSDQLSDNT	SPQRL	SSSDPE	SGSESEKFPKDF	249									
								308									
								316									
DMA 结构域																	
Meg		RNPATAVLTK	IFPHVKRDALD	SALKASSGDDVVKAI	IELVLSRE	QSSNGD	VVPQ	SENL	LVSR	SAAVRL	254						
Cyn		SLERDPTD	IMAKIFPHKQRD	ILESMVRTCKGDI	VKSIELVLS	SKENTSD	TKTL	PVS	NYPNA	FRASAVL	317						
Ory		HFERDPTD	IMAKIFPHKQRD	ILESMVRTCKGDI	VKSIELVLS	SKDSS			GAS	PSFGL	302						
Ore		SPDRDPTD	IMAKIFPHKQRD	ILESMVRTCKGDI	VKSIELVLS	SKENKID	ADS		ARR	PSAGL	302						
Xip		NLDRDPTD	IMAKIFPHKQRD	ILESMVRTCKGDI	VKSIELVLS	SKKKT	DTGSL	SFS	CLQSSV	FKPAAGL	318						
Bos		ASHFTV	SSRPDLDLTK	IFPHYRRL	EGILQFC	RGD	VQAIEE	ILN	KEHFP	TRDLANS	GALENTAF	FRVSNFS	387				
Hom		ASLPTV	SSRPDLDLTK	IFPHYRRL	EGILQFC	RGD	VQAIEE	ILN	KEHFP	TRDLANS	GALENTAF	FRVSNFS	395				
Meg		SDTPLRHF	SSRSFA	SPLHASATN	SFGADGL	LGLN	FRFAIG	PLRL	LAYS	TPN	FIPPY	LTSG	FVPM	SLRPP	323		
Cyn		PGAL	CALGSK	SFAPLH	SPTAAC	GENMFL	GLSPRL	GVSP	LRAYS	SSTNG	GLTGM	SPYMT	SGLMP	VFLRPP	389		
Ory		QCALRSP	WGPCA	FGKSAF	SPLHS	PSIPAA	EGLY	GLSPRL	GVSP	LRAYS	SSAGG	VACGM	SPYMT	SGLMP	VFLRPP	380	
Ore		PGCL	CALGAK	SFAF	SPLHI	PASPC	GDSLY	GLSPRL	GVSP	LRAYS	PANG	GACGM	SPYMT	SGLMP	VFLRPP	373	
Xip		PGAL	CSSGL	SFAF	SPLHV	HPAP	CGDSSLY	GLSPRL	GVSP	LRAYS	SSAGG	VACGM	SPYMT	SGLMP	VFLRPP	389	
Bos		AGIGF	CTLGNK	SFAF	SPLHT	SSASY	CGDSSLY	GLSPRL	GVSP	LRAYS	SSP	GRGL	SGRMS	PYLTF	GLVPS	LCRPA	461
Hom		AGIGF	CTLGNK	SFAF	SPLHT	SAST	CGDSSLY	GLSPRL	GVSP	LRAYS	SSA	GRGL	SGRMS	PYLTF	GLVPS	LCRPA	469
Meg		AD	HPLL	RDL	PYP	KEP	FST	VFV	SSL	GHDK							352
Cyn		LD	SYSP	FGM	IRD	LSY	QSKE	ALCNTG	SLY	SRL	NSEK						425
Ory		LD	PHAF	PGM	IRD	LSY	QSKE	FLCNAC	FYAR	F	SNDK						415
Ore		LD	SYSP	FGM	IRD	LSY	QSKE	SLCNAC	LYTR	L	NETK						409
Xip		LD	SHSF	PGM	IRD	LSY	QSKE	SLCSTT	GLY	TR	L	NNDK					425
Bos		LD	YAF	SGM	IRD	SSYL	PKD	SVT	GCR	LY	SRP	QSNL					496
Hom		LD	YAF	SGM	IRD	SSYL	SKD	SIT	TCGR	LY	FRP	QDNF					504

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. Meg: 团头鲂 *Dmrt4* 基因 *Megalobrama amblycephala* (*Dmrt4*); Cyn: 半滑舌鲷 *Dmrt4* 基因 *Cynoglossus semilaevis* (*Dmrt4*); Ory: 青鳉 *Dmrt4* 基因 *Oryzias latipes* (*Dmrt4*); Ore: 奥利亚罗非鱼 *Dmrt4* 基因 *Oreochromis aureus* (*Dmrt4*); Xip: 剑尾鱼 *Dmrt4* 基因 *Xiphophorus maculatus* (*Dmrt4*); Bos: 牦牛 *DMRT*-like family A1 *Bos grunniens mutus* (*DMRT*-like family A1); Hom: 人 *DMRT*-like family A1 *Homo sapiens* (*DMRT*-like family A1)。

图 2 团头鲂和其他物种 *Dmrt4* 氨基酸序列的比对

Fig. 2 The alignment of *Dmrt4* amino acid sequences in *Megalobrama amblycephala* and other species

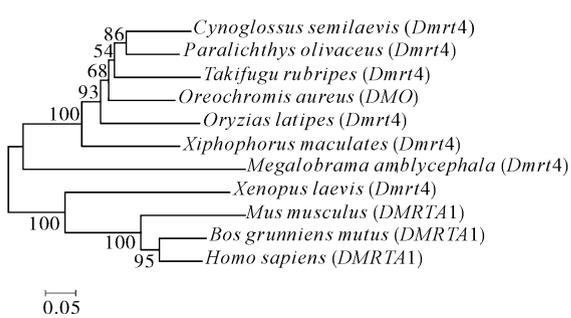


图 3 *Dmrt4* 基因编码氨基酸序列的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of the amino acid sequences encoded by *Dmrt4* genes

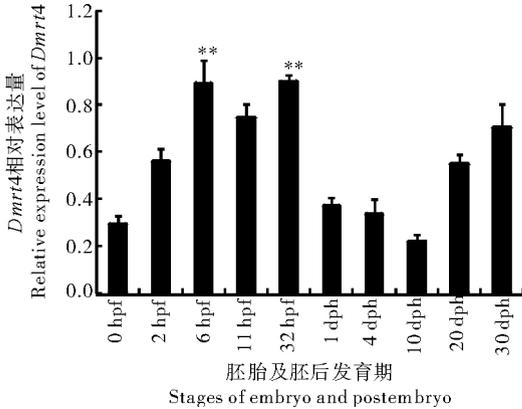
2.4 团头鲂 *Dmrt4* 基因在胚胎至出膜后 30 d 发育期表达分析

Dmrt4 基因在团头鲂胚胎发育及胚后 30 d 均有表达,其中,在受精后 32 h(即出膜前后)表达量最高,受精后 6 h(即原肠胚期)仅次之,分别是受精卵表达量的 3.06 倍和 3.04 倍。出膜至出膜后 30 d, *Dmrt4* 基因的表达量呈现先降低后升高的趋势,在出膜后 10 d 表达量最低,出膜后 30 d 表达量最高(图 4)。

2.5 团头鲂 *Dmrt4* 基因在成鱼不同组织表达分析

试验所取团头鲂成鱼不同组织中的雌雄性腺处

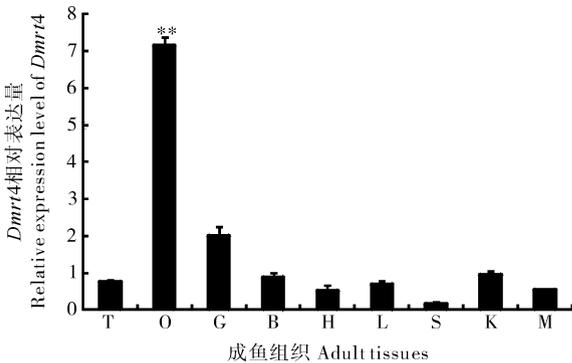
在 II 期和 III 期之间。qRT-PCR 分析显示, *Dmrt4* 基因在 2⁺ 龄团头鲂各个组织中均表达, 但是 *Dmrt4* 基因在团头鲂卵巢中表达量显著 ($P < 0.01$) 高于其他组织, 是精巢表达量的 9.3 倍, 是脾脏表达量的 38 倍, 在除卵巢外的其他各组织间表达量无显著性差异 (图 5)。



数据为平均值 ± 标准误, ** 表示胚胎及胚后发育期具有显著性差异 ($P < 0.01$), 下图同。hpf: 受精后时间/h; dph: 出膜后时间/d。Data was means ± SE; ** indicates significant difference among stages of embryo and postembryo ($P < 0.01$), the same as below. hpf: Hours post fertilizing; dph: Days post hatching.

图 4 *Dmrt4* 基因在团头鲂胚胎及胚后发育期的表达

Fig. 4 Expression of *Dmrt4* gene in *Megalobrama amblycephala* during embryo and post embryo development



T: 精巢 Testis; O: 卵巢 Ovary; G: 鳃 Gill; B: 脑 Brain; H: 心脏 Heart; L: 肝 Liver; S: 脾脏 Spleen; K: 肾脏 Kidney; M: 肌肉 Muscle.

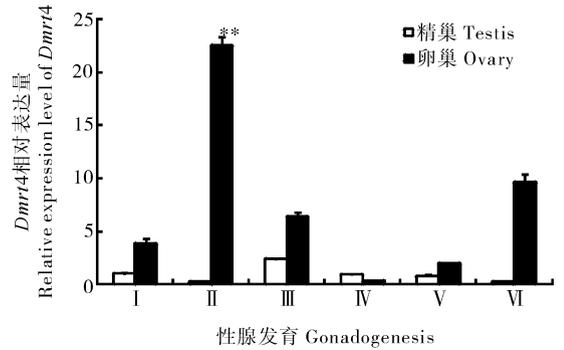
图 5 *Dmrt4* 基因在团头鲂成鱼组织的表达

Fig. 5 Expression of *Dmrt4* gene in different adult tissues of *Megalobrama amblycephala*

2.6 团头鲂 *Dmrt4* 基因在性腺不同分期表达分析

从图 6 可知, *Dmrt4* 基因在团头鲂卵巢各期的表达量明显高于精巢, 这与团头鲂不同组织表达量的分析结果是一致的。雌鱼 II 期卵巢 *Dmrt4* 基因的表达量最高, VI 期表达量次之, 这可能与 VI 期卵巢

退化到 II 期有关, IV 期表达量最低; 雄鱼 III 期精巢的表达量最高, VI 期表达量最低, II 期表达量稍高于 VI 期。



I ~ VI 指雌雄性腺的分期 I - VI represents female or male gonadogenesis.

图 6 *Dmrt4* 基因在团头鲂雌雄性腺不同分期的表达

Fig. 6 Expression of *Dmrt4* gene in *Megalobrama amblycephala*'s gonadogenesis

3 讨论

Dmrt 基因家族共同的特点是都含有一个 DM 保守结构域 (除 *Dmrt8* 外^[13]), 根据 DM 结构域的氨基酸组成及结构特点推测其可形成一种特殊的 C2/H2 锌指结构与 DNA 进行结合, 在性别决定与分化发育中起到调控作用^[14]。另外, *Dmrt3* (*DmrtA3*)、*Dmrt4* (*DmrtA1*)、*Dmrt5* (*DmrtA2*) 3 个基因特有一个 DMA 结构域, 组成 *Dmrt* 基因家族的一个亚族 (subfamily), 该亚族基因都含有 2 个外显子, 第 1 个外显子编码 DM 结构域, 第 2 个外显子编码 DMA 结构域^[15]。本文对团头鲂 *Dmrt4* 基因的研究发现, *Dmrt4a* 编码的氨基酸含有 DM 和 DMA 2 个结构域, *Dmrt4b* 编码的氨基酸仅含有 DMA 结构域。由此我们推测, 团头鲂 *Dmrt4b* 基因在转录时选择性地剪切掉了第 1 个外显子。DMA 结构域被证明在神经形成和神经系统发育类型方面起到一定的作用。团头鲂 *Dmrt4b* 基因仅含有 DMA 结构域, 是否对神经系统形成起作用还有待于进一步的研究。对脊椎动物 *Dmrt4* 基因编码的氨基酸进行同源性比对, 发现团头鲂该基因与其他物种的同源性较低, 最高为 47%, 但 DM 和 DMA 2 个结构域的同源性较高, 结构域之外序列的同源性较低。

Dmrt 基因被认为是一类整合性别、时空信息, 从而使一小部分细胞群发育成雌性或雄性性腺组织

的特异性的发育调控因子^[16]。Balciuniene 等^[17]通过对小鼠 *Dmrt1*、*Dmrt4*、*Dmrt7* 的定量结果研究认为 *Dmrt* 基因在性腺发育过程中能独立地发挥作用。小鼠中, *Dmrt4* 基因在两性性腺中同等水平表达^[18], 该基因的突变不会影响其正常的生存及繁殖, 但会对性腺组织发育及繁殖行为产生一定的影响^[17]。奥利亚罗非鱼中, *Dmrt4* 基因仅在成鱼的脑、垂体、卵巢中表达, 用 17 β -雌二醇处理其鱼苗后, *Dmrt4* 基因的表达量显著升高^[5]。Huang 等^[10]对非洲爪蟾的研究发现, *Dmrt4* 基因在脑组织中有表达, 且可以激活神经原质蛋白, 对其嗅觉系统的神经发生起重要作用。而 Winkler 等^[11]对青鳉的研究发现, *Dmrt4* 基因在两性性腺及成鱼的脑、眼、鳃、肾表达。此外, 剑尾鱼的原位杂交试验表明, *Dmrt4* 基因在嗅觉系统、前脑、鳃弓上可以检测, 对其嗅觉系统的发育起到一定作用^[19]。对团头鲂成鱼不同组织表达的研究发现, *Dmrt4* 基因在两性性腺中都有表达, 且卵巢的表达量显著高于精巢和其他组织, 在鳃中的表达量也较高, 这与 *Dmrt4* 基因在红旗东方鲀^[9]、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[20] 的组织表达情况相同。团头鲂中 *Dmrt4* 基因虽然在其他组织中也有一定的表达, 但表达量都较低。性腺不同分期的定量结果显示其在团头鲂 II 期卵巢中表达最高, 显著高于卵巢其他分期及精巢各分期的表达量, 表明 *Dmrt4* 基因可能对团头鲂卵母细胞初期的生长起到重要作用, 在雌鱼性腺发育过程发挥一定的作用, 此结果与奥利亚罗非鱼的研究结果^[5] 基本一致。团头鲂胚胎及出膜后样品的实时荧光定量分析表明, *Dmrt4* 基因在胚胎期呈现上升趋势的表达, 并在出膜前后达到最高水平, 这一结果与奥利亚罗非鱼在胚胎至出膜后 1 d 持续高表达的研究结果^[5] 一致; 但与青鳉直到幼鱼期才开始表达的结果^[11] 不同。这些结果表明, *Dmrt4* 基因在不同的物种中功能有所差异, 该基因为多功能的基因。根据 *Dmrt4* 基因在团头鲂成鱼各组织、性腺各分期及发育早期的表达特点, 认为 *Dmrt4* 基因可能对团头鲂卵母细胞初期的生长起到重要作用, 在雌鱼性腺发育过程中发挥重要的作用。

参 考 文 献

[1] XIA W, ZHOU L, YAO B, et al. Differential and spermatogen-

ic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 263: 156-172.

- [2] 夏伟, 周莉, 桂建芳. 真骨鱼类 DMRT 基因家族的连锁结构及其系统发生[J]. *水生生物学报*, 2009, 33 (2): 254-263.
- [3] HONG C S, PARK B Y, SAINT-JEANNET J P. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: it is not just about sex [J]. *Dev Biol*, 2007, 310(1): 1-9.
- [4] XU S, XIA W, ZOHAR Y, et al. Zebrafish *Dmrt2a* regulates the expression of *cdkn2c* in spermatogenesis in the adult testis [J]. *Biol Reprod*, 88(1): 14, 1-12.
- [5] CAO J L, CHEN J J, WU T T, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of *DMRT4* gene in *Oreochromis aureus* [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6): 2781-2788.
- [6] 张小艳, 孙立伟, 查金苗, 等. 稀有鮡鲫 *Dmrt* 基因家族 13 个成员的克隆与序列分析[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(1): 88-93.
- [7] 彭巧玲, 程子华, 蒲友光, 等. 赤子爱胜蛭 5 个 *Dmrt* 基因的序列分析[J]. *激光生物学报*, 2005, 14(5): 343-347.
- [8] 冯政夫. 栉孔扇贝 *Cf-Dmrt4-like* 基因的克隆、表达及功能分析[D]. 青岛: 中国海洋大学图书馆, 2010.
- [9] YAMAGUCHI A, LEE K H, FUJIMOTO H, et al. Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 2006, 1(1): 59-68.
- [10] HUANG X, HONG C S, O'DONNELL M, et al. The double sex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (32): 11349-11354.
- [11] WINKLER C, HORNUNG U, KONDO M, et al. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. *Mech Dev*, 2004, 121(7/8): 997-1005.
- [12] 曾聪, 阎里清, 高泽霞, 等. 梁子湖、鄱阳湖和淤泥湖团头鲂的形态学比较[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(1): 88-94.
- [13] VEITH A M, KLATTIG J, DETTAI A, et al. Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less *Dmrt8* genes in the mouse [J]. *Genomics*, 2006, 88: 185-195.
- [14] 杨歧生. 分子生物学基础[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001.
- [15] OTTOLENGHI C, FELLOUS M, BARBIERI M, et al. Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of double sex-related genes and the evolution of sex determination [J]. *Genomics*, 2002, 79(3): 333-343.
- [16] KOPP A. *Dmrt* genes in the development and evolution of sexual dimorphism [J]. *Trends Genet*, 2012, 28(4): 175-184.
- [17] BALCIUNIENE J, BARDWELL V J, ZARKOWER D, et al. Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26 (23): 8984-8991.

- [18] KIM S, KETTLEWELL J R, ANDERSON R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad[J]. *Gene Expr Patterns*, 2003, 3(1): 77-82.
- [19] VEITH A M, SCHÄFER M, KLÜVER N, et al. Tissue-specific expression of *Dmrt* genes in embryos and adults of the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Zebrafish*, 2006, 3(3): 325-337.
- [20] JOHNSEN H, ANDERSEN Ø. Sex dimorphic expression of five *dmrt* genes identified in the Atlantic cod genome. The fish-specific *dmrt2b* diverged from *dmrt2a* before the fish whole-genome duplication [J]. *Gene*, 2012, 505(2): 221-232.

Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt4* gene in *Megalobrama amblycephala*

SU Li-na^{1,2} DING Zhu-jin^{1,2} LI Hong^{1,3} ZHOU Feng-juan² WANG Wei-min^{1,2} LIU Hong^{1,2}

1. College of Fisheries/Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaboration Innovation

Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. Hunan Province Academy of Fishery Sciences, Changsha 410153, China

Abstract The *Dmrt4* gene was cloned from the ovary of *Megalobrama amblycephala* via using rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR. The relative expression of *Dmrt4* gene at different stages of embryonic and post-embryonic development, in different adult tissues, and at different stages of gonad in *M. amblycephala* were analyzed by quantitative real-time PCR. The results showed that the *Dmrt4* gene in *M. amblycephala* contains at least two isoforms named *Dmrt4a* and *Dmrt4b*, respectively. The cDNA of *Dmrt4a* was 1 265 bp encoding 352 amino acids containing DM and DMA domains, and the cDNA of *Dmrt4b* was 1 081 bp encoding 281 amino acids containing DMA domain. The amino acids sequences of *Dmrt4* genes in *M. amblycephala* had high identities with that of *Paralichthys olivaceus* and *Oreochromis aureus*. The *Dmrt4* gene was expressed from embryo to 30 dph (day post hatching) continuously and reached the peak at 32 hpf (hour post fertilization), the gene expression in ovary was significantly ($P < 0.01$) higher than in other adult tissues, and the gene expression at Stage II of the ovary was significantly ($P < 0.01$) higher than that of other ovary stages and the testis stages, suggesting that the *Dmrt4* gene may play a vital role in primary oocytes and female gonad development in *M. amblycephala*.

Key words *Megalobrama amblycephala*; *Dmrt4* gene; molecular cloning; gene differential expression; embryonic development; sex determination and differentiation

(责任编辑:边书京)