

尼罗罗非鱼性别相关基因 Dmrt1 的 RACE 扩增和序列分析

杨东 刘红艳 张繁荣 余来宁* (江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056)

摘要 [目的] 为研究 Dmrt 基因的进化、尼罗罗非鱼性别决定机制和功能提供资料。[方法] 以尼罗罗非鱼精巢 cDNA 为模板, 采用简并 PCR 扩增和克隆其 Dmrt 保守区域, 并采用 3 RACE 反应获得 Dmrt1 基因全序列。[结果] 尼罗罗非鱼中 Dmrt 保守区域长度为 158 bp。尼罗罗非鱼 Dmrt1 基因的 DM domain 与奥利亚罗非鱼、虹鳟、青鳉、新月鱼、人、小鼠中 Dmrt1 基因的 DM domain 和尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼中 DM domain 的核苷酸同源性分别为 98.6%、87.9%、81.4%、82.1%、77.9%、77.1%、72.1%、72.1%, 氨基酸同源性为 100.0%、97.8%、87.0%、87.0%、89.1%、89.1%、84.8% 和 84.8%。通过 3 RACE 反应, 获得 1 108 bp Dmrt1 的 3' 端序列。尼罗罗非鱼 Dmrt1 与奥利亚罗非鱼、虹鳟、青鳉、新月鱼的氨基酸序列同源性分别为 99.0%、62.0%、41.0% 和 73.0%。[结论] Dmrt1 基因具有高度保守性。

关键词 尼罗罗非鱼; Dmrt1; RACE

中图分类号 S965.125 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06194-02

RACE Amplification and Sequence Analysis of Sex-related Gene Dmrt1 in *Tilapia nilotica*

YANG Dong et al (College of Life Science, Jianghan University, Wuhan, Hubei 430056)

Abstract [Objective] The research aimed to provide data for studying the evolution of Dmrt gene, the sexual determination mechanism and functions in *Tilapia nilotica*. [Method] With cDNA sequence from spermary of *T. nilotica* as template, the conservative region of its Dmrt was amplified and cloned by using degenerate PCR. And the whole sequence of Dmrt1 gene was obtained by using 3 RACE reaction. [Result] The length of Dmrt conservative region in *T. nilotica* was 158 bp. The nucleotide homology of DM domain in Dmrt1 gene of *T. nilotica* with DM domain in Dmrt1 gene of *Oreochromis aurea*, *Salmo gairdneri*, *Oryzias latipes*, *Xiphophorus maculatus*, human and mouse and that in DM domain in *T. nilotica* and *O. aurea* were 98.6%, 87.9%, 81.4%, 82.1%, 77.9%, 77.1%, 72.1% and 72.1% resp., and the amino acid homology were 100.0%, 97.8%, 87.0%, 87.0%, 89.1%, 89.1%, 84.8% and 84.8% resp. Through 3 RACE reaction, 3' end sequence of 1 108 bp Dmrt1 gene was obtained. The sequence homology of amino acids in Dmrt1 between *T. nilotica* and *O. aurea*, *S. gairdneri*, *O. latipes*, *X. maculatus* were 99.0%, 62.0%, 41.0% and 73.0% resp. [Conclusion] Dmrt1 gene was highly conservative.

Key words *Tilapia nilotica*; Dmrt1; RACE

Dmrt1 是目前已知最保守的一种性别分化相关基因。该基因家族与果蝇的性别决定基因 Doublesex 及线虫的性别决定基因 Mab-3 有一个共同的结构特征: 所编码的蛋白质都含有一个具有 DNA 结合能力的保守基序——DM 结构域^[1-2], 在功能上, 该基因在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的性腺中表达, 与雄性性腺的形成和功能维持有关^[3-4]。目前已在鱼类、爬行类、鸟类及哺乳类动物中检测到 DM 盒基因的存在, 充分表明该基因在脊椎动物进化过程中的高度保守性^[5]。

在脊椎动物系统进化中, 鱼类处于承先启后的地位, 研究其 Dmrt 基因将有助于阐明从低等无脊椎动物到脊椎动物乃至人类的性别决定机制的进化。尼罗罗非鱼是世界性的主要养殖对象之一, 也是分析性染色体进化的一个重要模型。为了探讨 Dmrt 基因家族在鱼类中的保守性, 笔者以尼罗罗非鱼为材料, 采用简并 PCR, 扩增并克隆了尼罗罗非鱼基因组中的 DM 结构域, 并采用 3 RACE 方法获得 Dmrt1 基因全长, 以期研究 Dmrt 基因的进化及尼罗罗非鱼性别决定机制和功能分析提供分子资料。

1 材料与方 法

1.1 材料 尼罗罗非鱼采自中国水产科学研究院长江水产研究所尼罗罗非鱼原种鱼场(湖北荆州, 1978 年长江水产研究所从苏丹引进), 经活体解剖鉴定为性成熟个体。

1.2 总 RNA 的提取 用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司产品)提取精巢总 RNA。将样品置于研钵中, 用液氮碾碎, 加入适量

Trizol 试剂, 研磨混匀, 待冻融后转入 1.5 ml Eppendorf 管中, 用氯仿抽提, 异丙醇沉淀, 75% (V/V) 乙醇洗涤, 最后溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理过的无菌水中, -70℃ 保存。

1.3 反转录合成 cDNA 吸取 RNA 1~5 μg, 引物 digo (dT) 1 μl, 补水到 11 μl, 在 70℃ 下放置 10 min。加 5×buffer 4 μl, dNTP 2 μl, DTT 2 μl, 混匀, 加入 1 μl 反转录酶, 再混匀。42℃ 保温 1.0~1.5 h, 70℃ 15 min 终止反应。

1.4 简并 PCR 设计以下简并 PCR 引物用于扩增 Dmrt 保守区域: 上游引物 Primer1, 5'-TGCCCAAGTGCTC(TC)CG(CG)TQ(TC)(AC)GGA-3'; 下游引物 Primer2, 5'-CCTG(GAC)GC-CGCCAT(GA)ACTCT-3'。该引物曾成功扩增出小鼠的 Dmrt1 基因, 50 μl 的反应体系中含有: 2 μl 的 DNA 产物, 5 μl 10×PCR 缓冲液, 1.5 mol/L MgCl₂ 溶液, 0.2 mol/L dNTPs 溶液, 上下游引物各 0.8 mmol/L, 2.5 U TaqDNA 聚合酶(大连 TaKaRa 公司产品)。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。

1.5 3 RACE 按照 BD SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明书操作步骤进行。先合成 3 RACE Ready cDNA, 根据所获得的 Dmrt1 基因部分 cDNA 序列信息, 利用 DNASTAR 软件设计特异性引物 Primer3: 5'-CGCTGTAGGAATCACG GATAC-3'; 再设计 1 个 5' 端巢式 PCR 的引物 Primer4: 5'-CTCCACT-GAAGGGACACAAGCG-3'。通过 2 次 PCR 获得 3 RACE 扩增产物, 再通过琼脂糖凝胶电泳分离该 PCR 产物, 切下条带提取纯化后, 用于随后的连接反应。

1.6 序列测定 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 将目的 cDNA 片段切下, 用胶回收试剂盒纯化, 与 pGEMT 载体进行连接反应, 连接产物转化到大肠杆菌 JM101 的感受态细胞后, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基 (AMP+) 上。挑白斑, 抽提质粒。以质粒为模板, 进行 PCR 产物扩增鉴定, 并对质粒

基金项目 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室资助项目。

作者简介 杨东(1974-), 男, 湖北武汉人, 博士, 讲师, 从事遗传学研究。* 通讯作者, 博士生导师。

收稿日期 2008-03-10

进行测序。

2 结果与分析

2.1 DM domain 区的扩增 以精巢cDNA 为模板,采用简并引物 *Ri ner1*、*Pri ner2* 进行PCR 扩增,获得长约140 bp 的PCR 产物(图1)。将其克隆到pGEMT 载体中,对质粒进行测序,序列长140 bp(图2),在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 网站上进行 Blast 分析,将尼罗罗非鱼 Dmt1 基因的 DM domain 与奥利亚罗非鱼 (*O. aurea*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、青鱼等 (*Qyzius latipes*)、新月鱼 (*Xiphophorus maculatus*)、人、小鼠等动物的 Dmt1 基因的 DM domain 序列和尼罗罗非鱼、奥利亚罗非鱼的 DMO 基因的 DM domain 序列进行比较,核苷酸同源性分别为98.6%、87.9%、81.4%、82.1%、77.9%、77.1%、72.1%、72.1%,氨基酸同源性分别为100.0%、97.8%、87.0%、87.0%、89.1%、89.1%、84.8%、84.8%。

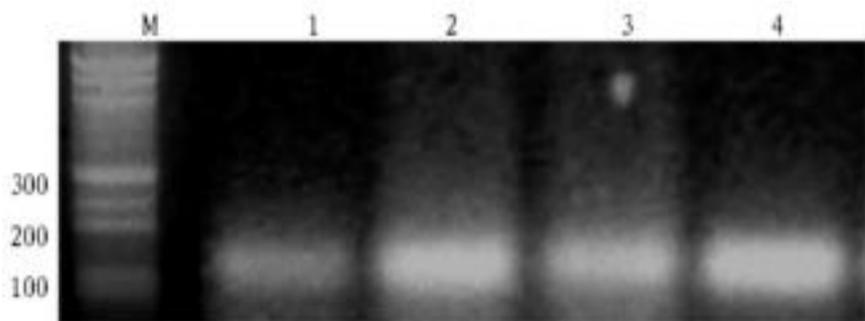


图1 尼罗罗非鱼cDNA 中 Dmt 的扩增结果

Fig.1 Amplification result of Dmt from cDNA in *Oreochromis niloticus*

```

1 TGCTCTCGCTGTAGGAATCACGGATACGTGTCTCCACTGAAGGGACACAAGCGCTTTTGC
61 AACTGGAGGACTGCCAGTGTCCCAAATGCAAATTGATCGCGGAGAGGCAGAGATCATG
121 GCGGCCAGGTTGCTCTGAG

```

图2 Dmt 基因 DM 区的 DNA 序列

Fig.2 DNA sequence of Dmt gene DM in DM region

2.2 Dmt 1 基因的3 RACE 反应及 RACE 产物克隆 根据 Dmt1 基因的部分 DM 保守区的序列信息,设计了用于3-RACE 反应的各自特异引物,同时为了确保以后克隆产物的正确性,又设计巢式引物。RACE 反应扩增得到1 条很亮的条带,约1 100 bp(图3),将其转化质粒,将质粒送往生工测序,得到1 108 bp 片段(图4),经 BLAST 分析,确定为 Dmt 1 的3 端序列。使用软件对尼罗罗非鱼 Dmt 1 基因的氨基酸序列与奥利亚罗非鱼 (*O. aurea*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、青鱼等 (*Qyzius latipes*)、新月鱼 (*Xiphophorus maculatus*) 等动物的 Dmt1 基因的氨基酸序列进行比较,同源性分别为99.0%、62.0%、41.0%、73.0%。

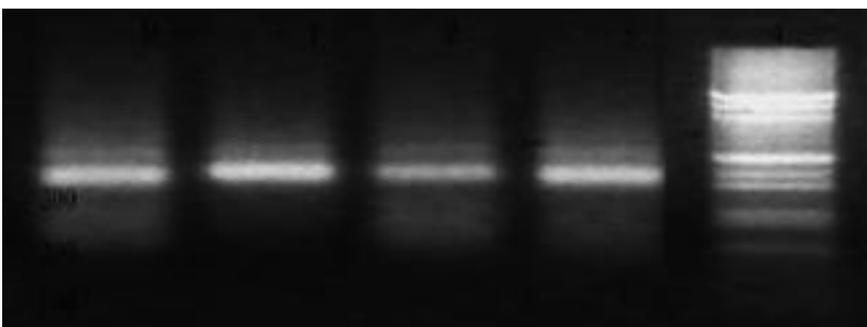


图3 3 RACE 的 PCR 产物

Fig.3 PCR products of 3 RACE

3 讨论

Dmt 是新近发现的以 Dmt1 基因为代表的一个基因家族,Dmt 基因是目前为止的参与各个进化地位的物种性别

决定与分化发育的唯一一个共同的例子^[4,6]。在脊椎动物中已发现了多种DM 相关基因:人类共有8 种 Dmt 基因,分别命名为 Dmt1 ~8。尽管 Dmt1 是目前为止已知的在各个进化地位的物种中都参与了性别发育过程的基因,但是它在不同进化地位、具有不同性别发育机制的不同物种中所发挥的功能不尽相同^[7-9]。

人类 Dmt 1 基因位于与性别反转密切相关的常染色体区域9p24.3^[1],Dmt 1 的表达模式类似于SRY,它在性别分化前只在生殖嵴中特异表达,以后也只在睾丸中表达。

在鸟类中有与哺乳动物不同的染色体性别决定机制(ZZ/ZW),而鸡的 Dmt1 基因位于Z 染色体上^[10]。mRNA 原位杂交表明,在胚胎时期从生殖嵴形成到性别开始分化,生殖嵴中有 Dmt1 的表达。另外 Dmt1 还在形成雄性特异的内部生殖结构的前体—— 吴尔夫氏管中表达,这表明它可能在性腺外调控性别的分化。

```

1 TGCTCTCGCTGTAGGAATCACGGATACGTGTCTCCACTGAAGGGACACAAGCGCTTTTGC
1 C S R C R N H G Y V S P L K G H K R F C
61 AACTGGAGGACTGCCAGTGTCCCAAATGCAAATTGATCGCGGAGAGGCAGAGATCATG
21 N W R D C Q C P K C K L I A E R Q R V M
121 GCGGCCAGGTTGCTCTGAGGAGGCAGCAGGCCAAGAAGAAGACTGGGATTTGTAGT
41 A A Q V A L R R Q Q A Q E E E L G I C S
181 CCTGTGTCTGTCTCCGGTCCGAGATGATGGTCAAGAATGAAGTTGGAGCAGACTGCCTG
61 P V S L S G S E M M V K N E V G A D C L
241 TTCTCTGTGGAGGGACGGTCCCGACACCTACCAGCCAGCCACCTCTGCTGTACAGGG
81 F S V E G R S P T P T S H A T S A V T G
301 ACCCGCTCGCATCGTCCCGCAGCCCATCTGCTGCTGCCAGGGCTCATACCGAGGGACCG
101 T R S A S S P S P S A A A R A H T E G P
361 TCTGACCTCCTGCTGGAAACCCCTATTACAATTTCTACCAGCCTTCGGCTACCCACC
121 S D L L L E T P Y Y N F Y Q P S R Y P T
421 TACTATGAAAACCTTTACA ACTACTCGCAGTACCAGATGCCCTCATG GTGATGGCCCGCTG
181 Y Y G N L Y N Y S Q Y Q M P H G D G R L
481 CCCAGCCACAGCGTGTCTCAGTACCCGATGCACTCCTACTACCCAGCAGCCACCTAC
201 P S H S V S S Q Y R M H S Y Y P A A T Y
541 CTGACTCAGGGCCTGGGCTCCACCAGCTGTGTGCCACCCCTCTTTAGCCTGGATGACAAC
221 L T Q G L G S T S C V P P F F S L D D N
601 AATAACAGCTGCTCTGAGACCATGGCGCCTCCTTCTCACCCGGCAGCATCTCCGCTGGT
241 N N S C S E T M A A S F S P G S I S A G
661 CAGACTCCACCATGGTCTGCCGCTCCATCAGCTCCCTGGTTAACGGCCAGCCAAAGGCT
261 H D S T M V C R S I S S L V N G D A K A
721 GAATGCGAGGCCAGCAGCCAGGCAGCCGGCTTCCCGTCCGACCCATCGAAGCGCGGCC
281 E C E A S S Q A A G F T V D A I E G G A
781 ACCAAATAAAGAAGAAAGGATAAGATCACACGACAGAAGCTTTACGGGCTCGGACGAGC
301 T K
841 TGAAACTTGATGTTCTTTAAAAACCGTTTAAATCGTTCACTCAGCCTTACGCTGTCTTCA
901 CGCTGTCTTACGTTTCCCTTCTAAAGCTCCACAGACTGTTCTTGTATTTGTAGCTCATT
961 TTTAGTTTTTAAATCCAGTTCAGGGTTACGAATCACAATGTACATTAACGGTAATTGA
1021 TTAGCTTTAATCAAGATCAGATGATTGAGTGTGAAGCAACTTTTCAAACAGAAAAAGT
1081 GGTTTTTAAATGCAAAAAA

```

图4 尼罗罗非鱼 Dmt 1 cDNA 及其氨基酸序列

Fig.4 Dmt 1 cDNA of *O. niloticus* and its amino acid sequence

鱼类的性别决定形式更为原始,性别决定的机制也更为多样。对虹鳟的 Dmt 1 基因的表达研究发现^[11]:其在精巢的分化过程中高表达,而卵巢的分化过程中则没有,用激素诱导其产生单性的全雌或全雄的个体中,遗传雄性的个体转变为生理雌性的个体时,Dmt1 基因的表达量下调,而遗传雌性的个体转变为生理雄性的个体时,可能由于激素诱导的时效性,Dmt 1 基因的表达量并没有上调。在青鱼等的性别决定期的性腺中未检测到 Dmt 1 的表达,在成体组织中,Dmt 1 也只在精巢中表达^[4]。上述结果表明,与在其他脊椎动物中的功能一样,在鱼类中,Dmt 1 是一个性别分化基因,与精巢的形成和功能维持有关^[4]。

(上接第6195 页)

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] SMITH C A, MCCLIVE P J, WESTEMP S, et al . Conservation of a sex-determining gene [J] . *Nature* , 1999 , 402 : 601 - 602 .
- [3] GRANDI A D, CALVARI V, BERIINI V, et al . The expression pattern of a mouse Doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation [J] . *Mechanisms of Development* , 2000 , 90 (2) : 323 - 326 .
- [4] BRUNNER B, HORNUNG U, SHANZ, 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 (1/ 2) : 8 - 17 .
- [5] REN L L, CHENG H H, GUO Y Q, et al . Evolutionary conservation of Dmrt gene family in amphibians reptiles and birds [J] . *Chin Sci Bull* , 2001 , 46 (23) : 1992 - 1996 .
- [6] MONIOT B, BETA P, SCHER G, et al . Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination [J] . *Mechanisms of Development* , 2000 , 91 : 323 - 325 .
- [7] KIMS, KETILEWELL J R, ERSON R C, et al . Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad [J] . *Gene Expression Patterns* , 2003 , 3 (1) : 77 - 82 .
- [8] SMITH C A, SINCLAR A H . Sex determination : insights from the chicken [J] . *BioEssays* , 2004 , 26 (2) : 120 - 132 .
- [9] KONDO M, FROSCHAUER A, KITANO A, et al . Molecular cloning and characterization of Dmrt genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platfish *Xiphophorus maculatus* [J] . *Gene* , 2002 , 295 : 213 - 222 .
- [10] RAYMOND C S, KETILEWELL J R, HRSCH B, et al . Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development [J] . *Developmental Biology* , 1999 , 215 : 208 - 220 .
- [11] MARCHAND O, GOROROUN M, DCOTTA H, et al . DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout , *Oncorhynchus mykiss* [J] . *Biochim Biophys Acta* , 2000 , 1493 : 180 - 187 .