

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01448

大鳞副泥鳅 3 个 *Dmrt* 基因 DM 保守区的序列分析

徐玲花¹, 严镇钧², 曾庆韬³

1. 黄石理工学院化学与材料工程学院, 湖北黄石 435003;
2. 湖北师范学院生命科学学院, 湖北黄石 435003;
3. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062

摘要: 利用简并 PCR 克隆技术, 扩增和克隆了大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)*Dmrt* 基因的 DM 结构域, 获得了 3 个具有不同 DM 序列的克隆。结果表明, 在大鳞副泥鳅基因组中存在 *Dmrt* 基因家族的多个成员。同源性比较和系统进化分析显示不同进化地位脊椎动物的 *Dmrt* 基因存在高度的进化保守性。

关键词: 大鳞副泥鳅; DM 结构域; *Dmrt* 基因

Sequence analysis of the DM domain of three *Dmrt* genes in loach, *Paramisgurnus dabryanus*

XU Ling-Hua¹, YAN Zhen-Jun², ZENG Qing-Tao³

1. School of Chemical and Material Engineering, Huangshi Institute of Technology, Huangshi Hubei Province, 435003, China;
2. College of Life Science, Hubei Normal University, Huangshi Hubei Province, 435003, China;
3. College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: We amplified genomic DNA of the *Paramisgurnus dabryanus* using the DM degenerate primers and detected a band, approximately 150 bp. After cloned into pMD18-T vector and sequenced, three sequences showed high homology with the DM domain. They were named as *PdDmrt1*, *PdDmrt3*, and *PdDmrt5*. Based on similarities of amino acid sequences of the DM domain, *Dmrt* gene protein sequences from six vertebrates species were included in a phylogenetic tree. It confirmed the identity of the three PCR products. Our results reveal that *Dmrt* gene is highly conservative in phylogeny.

Keywords: *Paramisgurnus dabryanus*; DM domain; *Dmrt* gene

Dmrt(Double-sex and Mab-3 related transcription factor)基因家族是一个与性别决定相关的基因家族, 该家族成员所编码的蛋白质都含有一个具有 DNA 结合能力的 DM 保守基序^[1-3], 通过染色体定位和胚胎表达分析, 这些基因被推测与脊椎动物的性别分化发育以及早期胚胎发育及器官形成等功能有关^[4-7]。在人类中已发现 8 个 *Dmrt* 基因家族成员^[8], 硬骨鱼中也至少存在 6 个 *Dmrt* 基因^[9]。它们中的许

多是未知功能的, 但研究发现其中至少有 3 个成员即 *Dmrt1*、*Dmrt2*、*Dmrt5* 是性别决定中的候选基因^[10-12]。

与高等脊椎动物相比, 鱼类的性别决定具有原始性和可塑性, 易受环境条件如温度等的影响, 目前人们对在鱼类性别决定与分化中起关键作用的基因或染色体区域还知之甚少。大鳞副泥鳅是我国常见的鲤形目鳅科鱼类。常重杰等^[13]在对其染色体进行银染和 C 带研究时发现它为 ZZ/ZW 性别决定。

收稿日期: 2007-12-20; 修回日期: 2008-03-08

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 30470970)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470970)]

作者简介: 徐玲花(1981-), 女, 湖北通城人, 硕士, 专业方向: 分子生物学。Tel: 15871161203; E-mail: linghua0317@126.com

通讯作者: 曾庆韬(1954-), 男, 湖北咸宁人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传学。Tel: 027-50865599; E-mail: zengqitao@sohu.com

对大鳞副泥鳅 *Dmrt* 基因家族成员进行克隆分析, 将有助于阐明大鳞副泥鳅乃至鱼类的性别决定机制, 从而进行性别的有效控制, 同时也为与之相关的发育生物学和系统进化研究提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

大鳞副泥鳅购自武汉市集贸市场, 为性成熟雌雄健壮个体。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

将尾鳍组织(约 50 mg)剪碎后加入 500 μ L 组织裂解液, 然后加入蛋白酶 K 至终浓度 200 μ g/mL, 转入 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜(12~15 h), 间歇振荡离心管几次。加 800 μ L 苯酚/苯酚/氯仿(3:1)、氯仿各抽提 1 次, 12 000 r/min 于 4 $^{\circ}$ C 条件离心 10 min, 取上清转入另一 1.5 mL 的离心管, 加入 1/6 倍体积 3 mol/L 的 CH_3COONa 和两倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min~1 h, 12 000 r/min 于 4 $^{\circ}$ C 条件离心 10 min, 倒去上清, 加入 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀后离心, 去上清, 将沉淀放于 37 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥, 加入 30~50 μ L 的 TE 溶解 DNA。

1.2.2 PCR 扩增和 DM 序列的克隆

参照文献^[14-17]并结合下载的 *Dmrt* 基因序列设计简并引物用于扩增 DM 保守区, 上游引物: 5'-TGCGC(ACG)(AC)G(AG)TGC(AC)G(AG)AACCA CGG-3'; 下游引物: 5'-C(GT)(GC)AG(GC)GC(GC)ACCTG(GC)GCAGCCAT-3', 由 Inventrigen 公司合成纯化。PCR 反应体系 20 μ L, 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 40 s 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。1.2% 的琼脂糖胶电泳。

PCR 扩增产物经纯化试剂盒(AXGEN 公司)纯化, 与 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司)连接后, 转化大肠杆菌 Gold 菌株。

1.2.3 DM 序列的筛选与测序

通过蓝白斑筛选、菌落 PCR、质粒酶切和 SSCP^[18]方法筛选阳性克隆。阳性质粒快转后送 Inventrigen 公司测序。

1.2.4 DM 序列的分析

将筛选得到的 3 条 DM 核苷酸序列通过 Blastn 在线检索, 根据与其他物种的相似性确定相应的 *Dmrt* 基因并命名; 利用 Clustal X 软件对 *Dmrt* 基因的核苷酸和氨基酸序列进行比对, 系统进化树通过

PAUP4.0 软件 MP 法构建, 用 Bootstrap 方法对构建的 MP 树进行评估, 参数设置如下: random number seed 为 3, number of bootstrap trials 为 1 000。生成的系统发生树经过 Treeview 软件处理。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果

以大鳞副泥鳅基因组 DNA 为模板, 利用简并引物扩增获得长为 150 bp 左右的片段, 此结果初步说明大鳞副泥鳅中存在 *Dmrt* 基因, 且雌雄个体中均存在, 没有明显的性别差异。

2.2 筛选结果

挑取白色菌落做菌落 PCR, 然后摇菌抽提质粒, 酶切和质粒 PCR 得到阳性克隆。经 SSCP 电泳后筛选得到最后含有不同 DM 序列的 3 个 DNA 片段(图 1)。

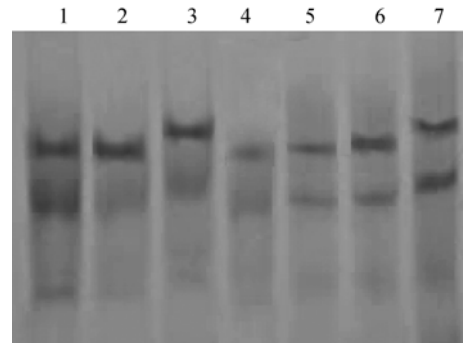


图 1 大鳞副泥鳅 SSCP 分析结果

3 个阳性克隆: (1、2、6); (3、7); (4、5)。

Fig. 1 SSCP analysis in *Paramisgurnus dabryanus*
Three different positive clones: (1、2、6); (3、7); (4、5)

2.3 *PdDmrt* 基因

对筛选出的阳性克隆进行测序得到 3 个 *Dmrt* 基因的 DM 保守区序列, 根据大鳞副泥鳅的拉丁名 *Paramisgurnus dabryanus*, 分别暂命名为 *PdDmrt1*、*PdDmrt3* 和 *PdDmrt5*。经 Blastn 同源性检索, *PdDmrt1* 与斑马鱼、刺鱼、鲤鱼、虹鳟及小鼠 *Dmrt1* 基因保守区编码序列的相似性分别为 89%、87%、86%、85%和 82%; *PdDmrt5* 与人类、小鼠、斑马鱼、青鳉基因保守区编码序列的最高相似性分别为 85%、84%、90%、82%; *PdDmrt3* 与斑马鱼、虹鳟、青鳉、人类及小鼠 *Dmrt3* 基因保守区编码序列的最高相似性分别为 89%、88%、83%、84%和 83%(图 2)。

2.4 *Dmrt* 基因家族成员的系统进化关系

利用 PAUP4.0 软件构建的不同物种 *Dmrt* 基因 DM 域核苷酸序列的进化树为一根树(图 3)。其中

大鳞副泥鳅的 *PdDmrt1* 与斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*) 及鲤鱼(*Cyprinus carpio*) 的 *Dmrt1* 聚为一支, 同时 *PdDmrt3* 和 *PdDmrt5* 分别与斑马鱼、青鳉、小鼠(*Mus musculus*)的 *Dmrt3* 和 *Dmrt5*

聚为一支, 斑马鱼、青鳉和罗飞鱼(*Oreochromis niloticus*)的 *Dmrt2* 也聚为一支。且各个基因的聚类均能体现出斑马鱼、大鳞副泥鳅和青鳉之间的进化亲缘关系。

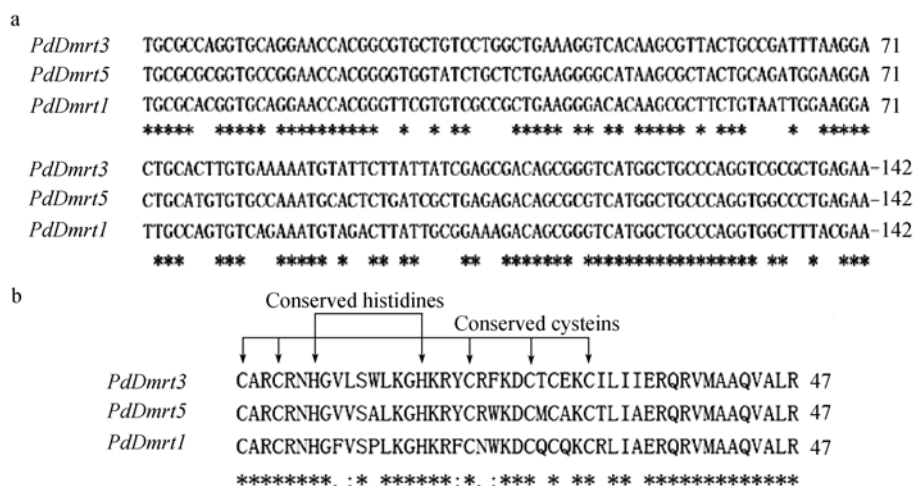


图 2 *PdDmrt1*、*PdDmrt3*、*PdDmrt5* DM 域的 DNA 序列(a)和氨基酸序列(b)

b 图中箭头所示为保守的半胱氨酸和组氨酸。

Fig. 2 DNA and amino acid sequences of the DM domain of *PdDmrt1*, *PdDmrt3*, *PdDmrt5*

Conserved cysteine and histidine residues are shown by vertical arrows.

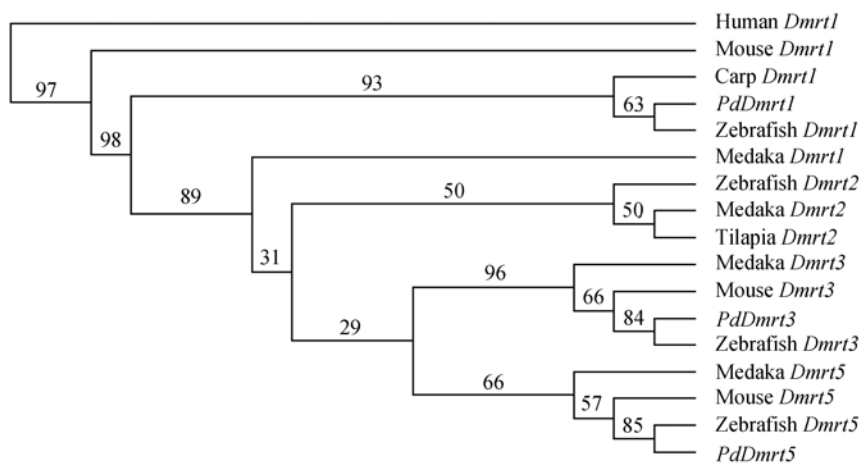


图 3 *Dmrt* 基因家族的系统进化树

PdDmrt1、*PdDmrt3* 和 *PdDmrt5* 的 DM 域氨基酸序列为本文所得结果, 其他序列来自 GenBank 数据库, 它们是斑马鱼的 NM_205628、NM_001007064、AY621084 和 AF080622 序列, 人的 AF130728、NM_021951 序列, 青鳉的 AF319994、AB071534、AB083691、AF319993 和 AF319992 序列, 小鼠的 AF202778、AY145837 和 AF541936 序列及鲤鱼的 DQ241767 序列。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Dmrt* gene family

The amino acid sequences of the DM domain of *PdDmrt1*, *PdDmrt3* and *PdDmrt5* were the results of this paper, while the others were searched from GenBank. The accession numbers are *Danio rerio* (NM_205628, NM_001007064, AY621084, AF080622), *Homo sapiens* (AF130728, NM_021951), *Oryzias latipes* (AF319994, AB071534, AB083691, AF319993, AF319992), *Mus musculus* (AF202778, AY145837, AF541936), *Cyprinus carpio* (DQ241767).

3 讨论

Dmrt 基因是一类转录调控因子, 它们编码的产物以锌指方式与特异的 DNA 序列相结合, 通过调节目的基因转录参与发育调节过程。目前已在鱼类、爬行类、鸟类和哺乳类等各个进化阶层动物中检测到 *Dmrt* 基因的存在。本研究从大鳞副泥鳅的基因组中扩增并克隆出了 *Dmrt* 基因家族 3 个成员 *PdDmrt1*、*PdDmrt3* 和 *PdDmrt5* 的 DM 结构域序列, 序列比对与聚类结果显示这些序列与其他脊椎动物的 *Dmrt* 基因 DM 序列存在高度的同源性, 它们都具有保守的 CCHC 和 HCCC 锌离子结合位点。值得注意的是, 以各物种 DM 序列构建的系统进化树中 *Dmrt1*、*Dmrt2*、*Dmrt3* 和 *Dmrt5* 四个基因的聚类均体现出斑马鱼、青鳉、鲤鱼和大鳞副泥鳅四种鱼类在进化上的亲缘关系, 表明 DM 结构域中非保守序列在进化中同样起着重要的作用, *Dmrt* 基因是随着物种的进化而不断进化的, 这也许与青鳉中 *DMY* 这一雄性性别决定基因的唯一出现有一致的地方。另外, 本研究没有克隆出大鳞副泥鳅的其他 *Dmrt* 基因家族成员, 这可能是简并引物的偏差和 SSCP 筛选过程中的遗漏导致的。

已有研究表明, *Dmrt* 基因家族成员在脊椎动物的发育过程中有许多功能, *Dmrt1* 基因是目前为止已知的参与各个进化地位物种的性别决定与分化发育的一个基因, 主要在脊椎动物成体的睾丸中表达, 对诱导睾丸的正常发育起着至关重要的作用^[1, 8]; 在人类、小鼠和斑马鱼中, *Dmrt3* 基因定位于 *Dmrt1* 基因的 3 端, 可能参与了 *Dmrt1* 基因的性别调控作用^[4, 7], *Dmrt5* 基因的表达主要集中于脑中, 同时在其他几种组织如睾丸、卵巢、肾、肺、心中也有较低的表达量, 但其在卵巢中的表达量则明显高于它在睾丸中的表达量^[12]。*PdDmrt1*、*PdDmrt3* 和 *PdDmrt5* 基因在大鳞副泥鳅中的发现和克隆表明 *Dmrt* 基因有可能参与了该物种个体发育乃至性别的分化与决定过程, 对这些问题的探究, 有待于我们对其全基因的克隆、时空表达分析及基因在基因组中的准确定位等后续工作的进行。

参考文献(References):

- [1] Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, 1999, 215(2): 208–220.[\[DOI\]](#)
- [2] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 2000, 417: 559–563.[\[DOI\]](#)
- [3] Guo Y, Cheng H, Huang X, Gao S, Yu H, Zhou R. Gene structure, multiple alternative splicing and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(3): 950–957.[\[DOI\]](#)
- [4] Pask AJ, Behringer RR, Renfree MB. Expression of *Dmrt1* in the mammalian ovary and testis from marsupials to mice. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101(3–4): 229–236.[\[DOI\]](#)
- [5] Shetty S, Kirby P, Zarkower D, Graves JA. *Dmrt1* in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 99(1–4): 245–251.[\[DOI\]](#)
- [6] Raymond CS, Murphy MW, O'Sullivan MG, Bardwell VJ, Zarkower D. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*, 2000, 14(20): 2587–2595.[\[DOI\]](#)
- [7] Brunner B, Hornung U, Shan Z, Nanda I, Kondo M, Zend-Ajus E, Haaf T, Ropers HH, Shima A, Schmid M, Kalscheuer VM, Scharl M. Genomic organization and expression of the *doublesex*-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *Dmrt1*. *Genomics*, 2001, 77(1–2): 8–17.[\[DOI\]](#)
- [8] Ottolenghi C, Veitia R, Quintana-Murci L, Torchard D, Scapoli L, Souleyreau-Therville N, Beckmann J, Fellous M, McElreavey K. The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel *doublesex*-related domain. *Genomics*, 2000, 64(2): 170–178.[\[DOI\]](#)
- [9] Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y. Sexually dimorphic expression of two types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(3): 662–666.[\[DOI\]](#)
- [10] El-Mogharbel N, Wakefield M, Deakin JE, Tsend-Ayush E, Grutzner F, Alsop A, Ezaz T, Marshall Graves JA. *DMRT* gene cluster analysis in the platypus: new insights into genomic organization and regulatory regions. *Genomics*, 2007, 89(1): 10–21.[\[DOI\]](#)

[1] Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate

- [11] Huang X, Guo Y, Shui Y, Gao S, Yu H, Cheng H, Zhou R. Multiple alternative splicing and differential expression of *Dmrt1* during gonad transformation of the rice field eel. *Biol Reprod*, 2005, 73(5): 1017–1024. [DOI](#)
- [12] Yiqing Guo, Qin Li, Shang Gao, Xiang Zhou, Yan He, Xuan Shang, Hanhua Cheng, Rongjia Zhou. Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of *Dmrt5* of zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 569–575.
- [13] CHANG Zhong-Jie, YU Qi-Xing. The cytogenetic evidences of ZZ/ZW sex determination in *Paramisgurnus dabryanu*. *Hereditas(Beijing)*, 1997, 19(3): 17–19.
常重杰, 余其兴. 大鳞副泥鳅 ZZ/ZW 型性别决定的细胞遗传学证据. *遗传*, 1997, 19(3): 17–19.
- [14] SHUI Yi, YU Hong-Shi, XIA Lai-Xin, GUO Yi-Qing, CHENG Han-Hua, ZHOU Rong-Jia. Cloning of four members of giant Panda *Dmrt* gene. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(5): 468–473.
水怡, 余红仕, 夏来新, 郭一清, 程汉华, 周荣家. 大熊猫 *Dmrt* 基因家族 4 个成员基因的克隆. *遗传学报*, 2004, 31(5): 468–473.
- [15] GUO Yi-Qing, CHENG Han-Hua, ZHOU Rong-Jia. Phylogenetic tree and syntenic of *DMRT* genes family of vertebrates. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(10): 1103–1108.
郭一清, 程汉华, 周荣家. 脊椎动物 *DMRT* 基因家族的系统发生及同线性分析. *遗传学报*, 2004, 31(10): 1103–1108.
- [16] PENG Qiao-Ling, PU You-Guang, CHENG Zi-Hua, NIE Liu-Wan. Sequence analysis of three *Dmrt* genes in *Macrorhynchium rosenbergi*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(1): 5–9.
彭巧玲, 蒲友光, 程子华, 聂刘旺. 罗氏沼虾 3 个 *Dmrt* 基因的序列分析. *中国水产科学*, 2005, 12(1): 5–9.
- [17] REN Li-Li, CHENG Han-Hua, GUO Yi-Qing, HUANG Xiao, LIU Li, ZHOU Rong-Jia. Evolutionary conservation of *Dmrt* gene family in amphibians, reptiles and birds. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 14(46): 1187–1189.
任莉莉, 程汉华, 郭一清, 黄晓, 刘利, 周荣家. 两栖类、爬行类和鸟类存在一个新的 *Dmrt* 基因家族. *科学通报*, 2001, 14(46): 1187–1189.
- [18] GE Ya-Dong, PU You-Guang, PENG Qiao-Ling, ZHANG Ji-Feng, NIE Liu-Wang, TANG Xin-Sheng, XU Jing-Cheng. Sequence analysis of four *Dmrt* genes DM domain in *limnonectes fujianensis*. *Acta Laser Biology Sinica*, 2006, 15(6): 628–632.
葛亚东, 蒲有光, 彭巧玲, 张际峰, 聂刘旺, 唐鑫生, 许竞成. 大头蛙 4 个 *Dmrt* 基因 DM 保守区的序列分析. *激光生物学报*, 2006, 15(6): 628–632.

• 综合信息 •

第十一次全国畜禽遗传标记学术研讨会在青岛召开

中国畜牧兽医学学会畜禽遗传标记分会第十一次全国学术研讨会于 2008 年 10 月 17 日 - 19 日在青岛农业大学隆重召开。来自全国各地高等院校、科研机构、基层畜牧兽医站、企业及政府部门的代表共 240 余人参加了会议。

18 日上午, 在青岛农业大学信息中心召开了隆重的大会开幕式。中国畜牧兽医学学会副理事长、中国农业大学张沅教授, 青岛农业大学宋希云副校长, 中国畜牧兽医学学会办公室李传业主任, 《遗传学报》、《遗传》编辑部李绍武主任, 青岛农业大学动物科技学院单虎院长, 分会理事长、华南农业大学杨关福教授及分会副理事长等出席了开幕式。青岛农业大学宋希云副校长首先致欢迎词, 李传业主任、李绍武主任等分别在开幕式上致辞, 分会理事长杨关福教授致开幕词。开幕式后, 张沅教授、赵要风教授、沈伟教授分别做了“从表型选择到全基因组选择”、“脊椎动物免疫球蛋白基因的进化”、“生殖细胞发生弱遗传调控”的特邀报告; 李绍武主任作了“如何向《遗传学报》、《遗传》投稿”的报告。在两天的学术研讨会上, 来自全国各地 50 多位代表分别做了精彩发言。

本次会议学术气氛浓厚, 论文涉及领域广泛, 质量较高。本次研讨会还专门成立了论文评审委员会, 经评审的 160 余篇论文继续发表在联合国粮农组织《Animal Biotechnology Bulletin》刊物上, 主要内容包括畜禽遗传标记的新方法、新技术及在畜禽遗传育种中的应用等, 反映了国内畜禽遗传标记最前沿的研究进展和发展动态。大会论文评审委员会推荐的 9 篇优秀论文将推荐到《遗传学报》、《遗传》两个刊物上投稿送审。

会议期间, 还召开了畜禽遗传标记分会理事会, 会议讨论增补刘娣、张廷荣、刘文忠、赵淑娟、王启贵等 5 人为理事。会议决定: 第十二次全国畜禽遗传标记学术研讨会将于 2010 年在江苏省南京市召开, 由南京农业大学动物科技学院承办。

最后, 大会对青岛农业大学动物科技学院以及孙金海教授为承办此次大会所付出的辛勤劳动表示诚挚的感谢!

(马月辉)