

罗氏沼虾3个Dmrt基因的序列分析

彭巧玲,蒲友光,程子华,聂刘旺
(安徽师范大学生命科学学院,安徽芜湖241000)

摘要:Dmrt基因家族是一个与性别决定相关的基因家族。迄今,已在鱼类、爬行类、鸟类、哺乳类等高等动物中检测到了Dmrt基因的存在。为了进一步探讨该家族在系统进化中的保守性,本研究采用简并PCR技术,扩增了罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)Dmrt基因的DM结构域。经序列分析,获得了Dmrt基因家族的3个成员,其编码序列分别与人DMRT2、DMRT3、DMRT4基因DM结构域编码序列的相似性分别为93%、80%和95%,根据罗氏沼虾的拉丁名分别命名为MrDmrt2、MrDmrt3、MrDmrt4。与其他动物相关的Dmrt基因进行聚类分析,结果表明,不同进化地位动物的Dmrt基因DM域编码序列存在高度的同源性,显示Dmrt基因在系统进化上高度保守,序列上的相似性可能暗示着它们在功能上的保守性。

关键词:罗氏沼虾;Dmrt基因;DM结构域;简并PCR;SSCP

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0005-05

Dmrt(Double-sex and Mab-3 related transcription factor)基因家族的主要特征是其成员与果蝇和线虫的性别决定基因Dsx和Mab-3相似,所编码的蛋白质都包含一个具有DNA结合能力的保守基序——DM(Double-sex 和 Mab-3)结构域^[1]。Dmrt基因是一类转录调控因子,通过锌指方式与特异DNA序列结合,在性别决定和分化发育中起调控作用^[2]。迄今,已在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类等脊椎动物中检测到了Dmrt基因的存在,并获得了多个成员基因^[1-5],充分显示该基因家族在进化上具有高度的保守性,但较低等的甲壳类动物中的相关研究则尚未见报道。

甲壳类是生物系统进化上的一个重要类群。罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)隶属节肢动物门甲壳纲长臂虾科沼虾属,是我国重要的淡水食用虾,具有重要的经济价值。在甲壳类中,性别是一个重要的经济性状,如中国对虾雌性的个体较大;罗氏沼虾和日本沼虾雄性的个体较大;雌性河蟹蟹黄丰富等等。因此,若能在虾、蟹养殖上获得全雄或全雌的群体,将会大大提高经济效益。所以,研究甲壳动物性别决定的机制在理论和应用上都具有重要的意义。罗氏沼虾为ZW型性别决定^[6],其性别决定的分子机制尚未得到阐明。本实验采用简并PCR技术首次对

罗氏沼虾Dmrt基因的DM保守序列进行了研究,以期进一步研究Dmrt基因的功能、阐明甲壳动物性别决定的分子机制,从而达到人工控制性别的目的。

1 材料与方法

1.1 实验材料

罗氏沼虾(1♀,2♂♂)标本购于安徽芜湖吉和水产市场,均为活体解剖确定性别。

1.2 基因组DNA提取

采用Sambrook的方法^[7],从罗氏沼虾的肌肉组织中提取基因组DNA。

1.3 PCR扩增和DM的克隆

参照文献[2]设计以下简并PCR引物用于扩增Dmrt基因保守区:D1:5'-TGCG(AGC)(AC)G(AG)TGC(AC)G(AG)AA(CT)CACGG-3';D2:5'-C(GT)(GC)AG(GC)GC(GC)ACC TG(GC)GC(AGCT)GCCAT-3',由上海生工生物工程公司合成,PAGE纯化。PCR反应体系为25 μL,循环参数为:97℃预变性7 min;94℃变性45 s,64℃退火45 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃再延伸10 min。PCR扩增产物经1.7%琼脂糖凝胶检测后拍照。

PCR扩增产物经纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)纯化,与pGEM-T载体(TaKaRa公司)

收稿日期:2004-05-08;修定日期:2004-06-29。

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金重点项目(2002kj128);安徽省自然科学基金(01043202)。

作者简介:彭巧玲(1981-),女,研究生;研究方向:动物分子细胞遗传。E-mail:pq18988@etang.com

通讯作者:聂刘旺,E-mail:wnie@mail.ahnu.edu.cn

连接后,转化大肠杆菌 DH 5 α 。

1.4 DMRT 基因片段的筛选和测序

采用菌落PCR(引物同上)和SSCP^[8]方法筛选出不同的阳性克隆。委托上海博亚生物公司进行测序。

1.5 Dmrt 基因的分析

将获得的 3 条 Dmrt 基因序列输入 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站,通过 BLAST, 联机 GenBank 进行 DNA 及氨基酸序列相似性检索并命名。通过 Clustal X 软件对相应的氨基酸序列进行分析, 系统进化树通过 MEGA V2.1 软件 UPGMA 法构建。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

以罗氏沼虾基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增获得长约 150 bp 的产物片段(图 1), 阳性对照为黑斑蛙 Dmrt1 基因。此结果初步说明了罗氏沼虾的基因组中存在有 Dmrt 基因, 且雌雄无差异。

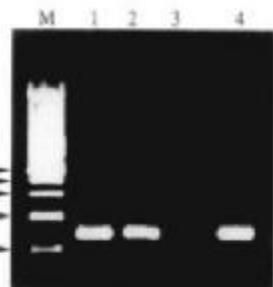


图 1 PCR 扩增结果

M: 100 bp DNA ladder; 1. 雌; 2. 雄; 3. 阴性对照; 4. 阳性对照: 黑斑蛙 Dmrt1 基因

Fig. 1 The result of PCR amplification

M: 100 bp DNA ladder; 1. Female; 2. Male; 3. Negative control; 4. Positive control: Dmrt1 gene of *Rana nigromaculata*

2.2 菌落 PCR 扩增结果

菌落 PCR 扩增结果表明, 克隆后的白色菌落中 80% 以上都是阳性克隆(图 2)。



图 2 部分菌落 PCR 结果

M: 100 bp DNA ladder; 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11: 阳性克隆; 2, 6: 负性克隆; 12: 基因组 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification result of clones

M: 100 bp DNA ladder; 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: Positive clones; 2, 6: Negative clones; 12: PCR Amplification result of genome DNA

2.3 SSCP 分析筛选结果

通过 SSCP 技术筛选到 3 种有差异的阳性克隆(图 3), 且为雌雄个体所共有。

2.4 罗氏沼虾的 Dmrt 基因

对筛选出的 3 个有差异的阳性克隆进行测序, 结果见图 4。其编码的氨基酸序列见图 5。经 GenBank 中同源性检索, 得到这 3 个 Dmrt 基因 DM 保守区与人相应的 DMRT 基因保守区编码序列的最高相似性分别为 93%、80% 和 95%, 按通用的命名法, 根据罗氏沼虾的拉丁名 *Macrobrachium rosenbergii*, 分别命名为 MrDmrt2、MrDmrt3 和 MrDmrt4。

2.5 不同物种 Dmrt 基因的聚类结果

不同物种 Dmrt 基因编码的氨基酸序列的聚类结果见图 6。结果表明, 罗氏沼虾的 MrDmrt2 与人

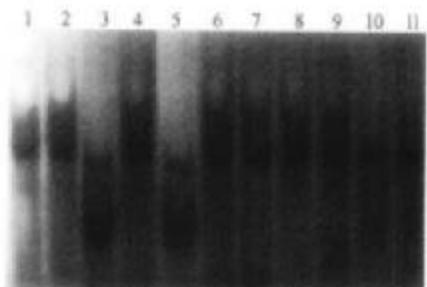


图 3 SSCP 分析结果

3 种有差异的阳性克隆: 1 ♀ (2 ♀, 4 ♂, 6 ♀, 7 ♂, 8 ♂, 9 ♀); 3 ♂ (5 ♀); 10 ♀ (11 ♂)

Fig. 3 Result of SSCP analysis

Three different positive clones: 1 ♀ (2 ♀, 4 ♂, 6 ♀, 7 ♂, 8 ♂, 9 ♀); 3 ♂ (5 ♀); 10 ♀ (11 ♂)

	20	40	60	
MrDmrt2	TGGGCCCCGGTGCAGAAACACGGCGTGTGTCTGCTGAAGGGGACAAGAAGCTCTGT			
MrDmrt3	TGGGUCAGATGCAGGAACCACGGCATGATCAGCTGGCTCAAGGGGACAAGAGACACTGC			
MrDmrt4	TGGGCCCCGGTGCAGAAACACGGCGTGTGTCTGCTGAAGGGGACAAGAAGCTCTGT	80	100	120
MrDmrt2	CGGTGGAGGGACTGCGCTGCGCCAACTGCGCTCTGGTGGTGGAGAGGGAGGGTCATG			
MrDmrt3	AAATTCAAGGACTGCACTGCGCCAGGTGTAATCTCATCGGGGGAGGGAGGGTGATG			
MrDmrt4	AGATGGAGAGATTGTGTTGGCTAAATGCAOGCTGATTGCTGAGGGCAGGGGTGATG	140		
MrDmrt2	GCGGCCAGGTGGGUCTAAT			
MrDmrt3	GCGGCCAGGTUGCGCTCAG			
MrDmrt4	GCGGCCAGGTUGCGCTCAG			

图4 罗氏沼虾3条Dmrt基因DM盒区的DNA序列

Fig.4 DNA sequence of 3 Dmrt gene DM domain in *Macrobrachium rosenbergii*

	1	10	20	30	40	46
MrDmrt2	CARCRNHGVVSCLKGHKKLWRIDCRCANLLVVERQRVMAAQVAL					
MrDmrt3	CARCRNHGMISWLKGHKRHKFKDCTCARCNLIAGRQRVMAAQVAL					
MrDmrt4	CARCRNHGVVSALKGHKRYCRWRDCVCAKCTLIAERQRVMAAQVAL					

图5 罗氏沼虾3条Dmrt基因DM盒区编码的氨基酸序列

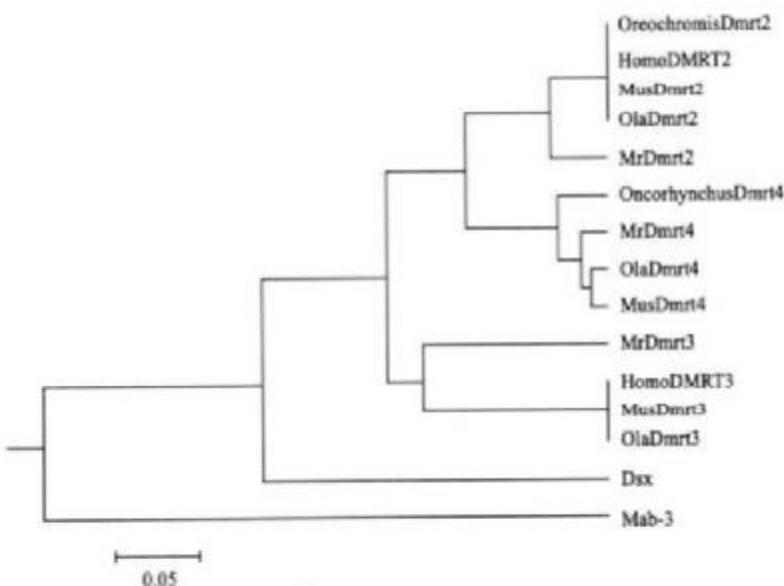
Fig.5 Amino acid sequence of 3 Dmrt gene DM domain in *Macrobrachium rosenbergii*

图6 Dmrt基因家族的聚类分析结果

MrDmrt2, MrDmrt3, MrDmrt4 的氨基酸序列为本研究结果; 其他序列为从 GenBank 中检索得到, 登录号分别为: HomeDMRT2 (NP_870987.1), MusDmrt2 (AAN77205.1), OreochromisDmrt2 (AAN78446.1), OlaDmrt2 (AAL02163.1); HomeDMRT3 (NP_067063.1), MusDmrt3 (AAH52041.2), OlaDmrt3 (AAL02164.1); MusDmrt4 (AAN77234.1), OlaDmrt4 (BAB63259.1), OncorhynchusDmrt4 (AAG17546.1); Drosophila Dsx (P23023); Caenorhabditis Mab-3 (018214)。

Fig.6 Phylogenetic analysis of Dmrt gene family

The amino acid sequences of MrDmrt2, MrDmrt3, MrDmrt4 were the result of this paper, while the others were searched from GenBank. The accession numbers are HomeDMRT2(NP_870987.1), MusDmrt2(AAN77205.1), OreochromisDmrt2 (AAN78446.1), OlaDmrt2 (AAL02163.1); HomeDMRT3 (NP_067063.1), MusDmrt3 (AAH52041.2), OlaDmrt3 (AAL02164.1); MusDmrt4 (AAN77234.1), OlaDmrt4 (BAB63259.1), OncorhynchusDmrt4 (AAG17546.1); Drosophila Dsx (P23023); Caenorhabditis Mab-3 (018214).

(*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 Dmrt2 聚在一起; 其 MrDmrt3 与人、小鼠、青鳉的 Dmrt3 聚在一起; 罗氏沼虾的 MrDmrt4 与小鼠、青鳉、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的 Dmrt4 聚在一起。果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 Dsx 和线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 Mab-3 基因位于系统树的最下方。

3 讨论

本研究采用简并 PCR 方法, 对较低等的动物——甲壳类的罗氏沼虾基因组进行扩增, 获得了 MrDmrt2、MrDmrt3 和 MrDmrt4 这 3 个不同的 Dmrt 基因。图 6 的聚类分析结果表明, 罗氏沼虾 Dmrt 基因与进化位置不同的其他各类动物的 Dmrt

基因编码的氨基酸序列存在高度的同源性。图 7 是罗氏沼虾与不同进化地位的动物的 Dmrt2、Dmrt3、Dmrt4 基因 DM 结构域氨基酸序列的比对结果, 有 31 个氨基酸在不同进化地位的动物中是完全相同的, 约占整个序列(46 个氨基酸)的 67%。由此可见, Dmrt 基因在进化上是高度保守的, 保守位点的存在对于其功能的维持可能起着至关重要的作用。

进一步分析发现, 这些保守位点中包含 2 个(第 7 位和第 16 位)His 位点, 它们之间有 8 个氨基酸, 其前后分别存在 2 个(第 1 位和第 4 位)和 4 个(第 20、25、27 和 30 位)Cys 保守位点(图 5), 并且这个区段富含碱性氨基酸 R、K 以及多种极性氨基酸, 这与 C2/H2 型锌指结构的特点^[9]基本相符, 因此可以推测这个区段可形成 C2/H2 型锌指结构与 DNA 进行结合, 在性别决定和分化发育中起调控作用。

	1	10	20	30	40	46
HomDMRT2	C	A	R	C	R	N
MusDmrt2	C	A	R	C	R	N
OlaDmrt2	C	A	R	C	R	N
OreochromisDmrt2	C	A	R	C	R	N
MrDmrt2	C	A	R	C	R	N
HorroDMRT3	C	A	R	C	R	N
MusDmrt3	C	A	R	C	R	N
OlaDmrt3	C	A	R	C	R	N
MrDmrt3	C	A	R	C	R	N
MusDmrt4	C	A	R	C	R	N
OncorhynchusDmrt4	C	A	R	C	R	N
OlaDmrt4	C	A	R	C	R	N
MrDmrt4	C	A	R	C	R	N
	*****	*****	*****	*****	*****	*****

图 7 不同物种 Dmrt2、Dmrt3、Dmrt4 基因 DM 结构域的氨基酸序列比较分析

Fig. 7 Comparative analysis of DM domains of Dmrt2, Dmrt3 and Dmrt4 in different species

在本研究中, 没有得到与 Dmrt1 基因相对应的同源基因, 这可能与简并引物的扩增偏差有关, 也可能是因为 SSCP 分析的筛选误差, 有关研究将进一步进行。

参考文献:

- Kim S, Kettlesell J R, Anderson 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.
- Ren L L, Cheng H H, Guo Y Q, et al. Evolutionary conservation of Dmrt gene family in amphibians, reptiles and birds[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(23): 1992–1996.
- Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex determination genes[J]. Nature, 1998, 391: 691–695.
- Smith C A, Sinclair A H. Sex determination: insights from the chicken[J]. Bio Essays, 2004, 26(2): 120–132.
- 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.
- 康现江, 王所安. 高等甲壳动物性别决定机制及其性连锁[J]. 动物学杂志, 1998, 33(3): 43–45.
- Sambrook J, David W Russell. Molecular cloning: a laboratory manual[M], 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 董利旺, 单祥年, 郭超文, 等. 两种龟类 Sex 基因的 PCR 扩增及 SSCP 分析研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(4): 378–381.
- 杨廷生. 分子生物学基础[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 92–93.

Sequence analysis of three Dmrt genes in *Macrobrachium rosenbergii*

PENG Qiao-ling, PU You-guang, CHENG Zi-hua, NIE Liu-wang
(Life Science College of Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: The Dmrt genes constitute a new gene family related to sex-determination. Like the double-sex gene of *Drosophila melanogaster* and the Mab-3 gene of *Caenorhabditis elegans*, they encode transcription factors characterized by a conserved zinc-finger like DNA-binding motif, the DM domain, which is thought to bind DNA in the process of sex differentiation and development. In 1998, Dmrt1 genes were first identified and found containing DM domains in *Homo sapiens* and *Mus musculus*. And Dmrt1 was found to regulate sex determination and differentiation in vertebrates extensively. So far, the Dmrt genes have been discovered in a wide range of animal species, such as fish, amphibian, reptiles, birds, and mammals. These evidently reveal the evolutionary conservation of Dmrt gene family. But the research of Dmrt genes in crustacean, which was a very important group in phylogenetic evolution, has not been reported. *Macrobrachium rosenbergii*, which is subjected to *Macrobrachium*, Palaemonidae, Crustacea, is a very important kind of freshwater edible shrimps in China and the economic value is prominent. As to *Macrobrachium rosenbergii*, sex was an important economic character, for the male are bigger than the female. So to clarify the mechanism of *Macrobrachium rosenbergii* sex determination will be of great importance in both theory and application. With the hope of doing further research on the functions of Dmrt genes and clarify the molecular mechanism of *Macrobrachium rosenbergii*, degenerate PCR was used in this research to amplify the conserved DM domains of Dmrt genes in *Macrobrachium rosenbergii*. The PCR products were approximately 150 bp. After DNA cloning SSCP analysis and sequencing, three different DM sequences were identified. The amino acid sequence of one clone is 93% identical with human DMRT2, named MrDmrt2, according to its name *Macrobrachium rosenbergii*. Another sequence encodes an amino acid sequence with 80% identical with human DMRT3, named MrDmrt3. The other sequence encodes an amino acid sequence with 95% identical with human DMRT4, named MrDmrt4. The amino acid sequences encoded by Dmrt genes from different species showed a high degree of sequence homology as revealed in phylogenetic tree constructed. In Fig. 7, the comparative analysis of DM domains of Dmrt2, 3, 4 in different species showed that 67% amino acid site of all sequences were the same. These conservative site may form a C2/H2 model zinc-finger structure to bind specific DNA sequences and regulate sex differentiation and development. The results further indicated that Dmrt genes were highly conserved in phylogeny and the strong evolutionary conservation of this gene family suggests that Dmrt genes may be of importance in developmental process.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; Dmrt gene; DM domain; degenerate PCR; SSCP

Corresponding author: NIE Liu-wang. E-mail: lwnie@mail.ahnu.edu.cn