

半滑舌鳎 *Dmrt1 α* 基因的 cDNA 克隆及其表达

邓思平^{1,2}, 陈松林¹

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 在脊椎动物中, 许多基因参与了性腺的分化和性别的决定过程, Doublesex and mab-3-related transcription factor 1 (*Dmrt1*) 编码了一个具有 DM 框的转录因子, 在哺乳类、鸟类、两栖类、爬行类和鱼类中与雄性性腺的分化和形成有关, 是一种目前已知从无脊椎动物到人最保守的性别分化相关基因。半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 是近年来新开发的一种理想的增养殖对象, 雌性个体生长速度比雄性快 2~3 倍, 为了探索半滑舌鳎的性别决定机理, 培育全雌苗种, 实现单性养殖, 本研究采用同源克隆策略, 从半滑舌鳎精巢中获得 *Dmrt1 α* cDNA 全长 1 149 bp, 其中包含 777 bp 的开放阅读框 (ORF), 45 bp 长的 5' 末端非编码区 (UTR), 327 bp 长的 3' 末端 UTR。氨基酸序列分析表明半滑舌鳎与其他鱼类 *Dmrt1* 基因的氨基酸序列同源性为 41.9%~58.1%, 与鼠和人的 *Dmrt1* 氨基酸序列同源性较低, 只有 32.6% 和 33.7%。RT-PCR 分析表明, *Dmrt1 α* 只在半滑舌鳎的精巢中表达, 而在雌、雄鱼的脑、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠、眼以及雌鱼的卵巢中都不表达。与对照组雄鱼和经过甲基睾酮 (Methyltestosterone, MT) 浸浴处理和高温处理的雄鱼一样, *Dmrt1 α* 也在甲基睾酮 (MT) 处理和高温诱导的由雌性性反转为雄性的精巢中表达, 而未经诱导或诱导不成功的雌鱼中仍没有 *Dmrt1 α* 表达, 这些结果表明 *Dmrt1 α* 可能参与了半滑舌鳎的雄性性别决定过程。[中国水产科学, 2008, 15 (4): 577-584]

关键词: 半滑舌鳎; *Dmrt1 α* ; cDNA; 克隆

中图分类号: Q959.486

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)04-0577-08

Dmrt (Doublesex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是新发现的一个与性别决定相关的基因家族。该家族成员与果蝇的性别决定基因 *doublesex (dsx)* 和线虫性别决定基因 (*Mab-3*) 一样, 所编码的蛋白质都包含一个具有 DNA 结合能力的保守基序, 即 DM (Doublesex 和 Mab-3) 结构域, 并以锌指结构与特异 DNA 序列相结合, 在性别分化期的雄性性腺及雄性成体的性腺中表达, 与雄性性腺的分化和形成有关。在已所发现的 DMRT 成员中, *Dmrt1* 研究得最清楚。*Dmrt1* 是一种目前已知从无脊椎动物到人最保守的性别分化相关基因。*Dmrt1* 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、龟、鸡及小鼠等胚胎未分化的性腺中特异表达^[1-9], 当性腺分化方向确定后, 表达特征呈现为性别二态型 (Sexual dimorphic expression profile), 即 *Dmrt1* 在雌、雄性的表达具有明显不同的形式, 只在精巢中表达而不在卵巢中表达, 证实了 *Dmrt1* 基因直接参与性别决定过程。外

源激素和温度可以诱导鱼类性别逆转^[10-11], 而目前对性别逆转的作用机制了解甚少, 因此研究性逆转后性别相关基因的表达情况有助于了解其在性别决定中的作用。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis* Günther) 是近年来新开发的一种优良的增养殖对象^[12], 该物种雌性个体生长速度比雄性个体快 2~3 倍, 目前已成功进行了工厂化养殖与全人工繁殖^[13]。本研究室已建立了其遗传性别鉴定技术^[14], 探讨了温度对其性腺分化方向的影响, 获得了由雌性逆转为雄性的性反转个体^[15], 但有关性别逆转的作用机制仍不清楚。本研究通过分离半滑舌鳎的 *Dmrt1 α* cDNA 序列, 分析其不同组织的表达及性反转个体中的表达变化情况, 以进一步了解 *Dmrt1 α* 在半滑舌鳎性别决定中的作用机制, 旨在为培育半滑舌鳎全雌苗种, 实现单性养殖提供理论依据。

收稿日期: 2007-12-17; 修订日期: 2008-02-27.

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A403); 山东省泰山学者工程专项经费; 山东省农业良种工程重大项目.

作者简介: 邓思平 (1974-), 男, 博士研究生, 从事海洋生物技术研究.

通讯作者: 陈松林. Tel: 0532-85844606; E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

1 材料与方法

1.1 半滑舌鳎各种组织制备、DNA提取

半滑舌鳎取自山东海阳国家 863 计划海水养殖种子资源北方基地,二龄鱼取脑、性腺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠、眼后立即投入液氮保存,后转于 -80°C 低温冰箱保存用于组织 RNA 提取。并在孵化后 25~100 d 采用 20~100 $\mu\text{g/L}$ (水) 的甲基睾酮 (Methyltestosterone, MT) 进行浸浴处理和高温诱导半滑舌鳎性逆转,处理方法参照文献 [15],并在 7 月龄时取其性腺用液氮保存后转入超低温冰箱保存,并取部分性腺用 Bouin's S 固定液固定,同时取肝脏采用酚:氯仿法提取基因组 DNA。

1.2 表型性别和遗传性别鉴定

对 Bouin's 固定液固定的性腺作石蜡切片,经各级乙醇脱水、二甲苯透明和石蜡包埋,作连续横切切片,HE 染色, Olympus 光学显微镜观察性腺显

微结构鉴定其表型性别。用提取的肝脏 DNA 作为模板,根据已分离得到的雌性特异片断所设计的一对特异引物进行 PCR 遗传性别鉴定 [14]。

1.3 引物

克隆半滑舌鳎 Dmrt1 基因序列及检测组织表达所用引物见表 1。Dmrt1-fw1 和 Dmrt1-rv1 是根据已经发表的其他鱼类的 Dmrt1 的保守序列合成的一对简并引物,以精巢总 RNA (2 μg) 为模板,扩增半滑舌鳎 Dmrt1 α 中间保守片段; Dmrt1-fw2 和 Dmrt1-rv2 是根据简并引物得到的序列合成的两条特异引物,分别用来扩增 Dmrt1 cDNA 3'末端和 5'末端。Dmrt1-fw3、Dmrt1-rv3 是根据本研究克隆的全长 cDNA 序列合成的一对特异引物,用于检测各组织的 Dmrt1 表达水平,扩增长度为 352 bp。 β -actin 引物对的扩增长度为 204 bp,所有引物均由北京 Invitrogen 生物有限公司合成。

表 1 克隆和组织表达半滑舌鳎 Dmrt1 α 基因序列所用引物

Tab. 1 Primers used for cloning and tissue expression of *C. semilaevis* Dmrt1 α

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 /bp Position of bases
Dmrt1-fw1	5' - AARGGMCACAARCGCTTCTG -3'	165-184
Dmrt1-rv1	5'- WAGGARTGCATVCGGTACTG -3'	588-607
Dmrt1-fw2	5'-GCCCTCTTCCATCAGCACCTCCACTT-3'	390-415
Dmrt1-rv2	5'-ACAGCGACACTCCCTCCAGTCACAGAAG -3'	180-207
Dmrt1-fw3	5'- GTCGCTGTGACAAGTGTAACCTC -3'	200-222
Dmrt1-fw4	5'- TGAGACATCTGCTGGTATTGCTG -3'	529-551
β -actin-fw	5'-GTAGGTGATGAAGCCCAGAGCA-3'	
β -actin-rv	5'-CTGGGTCATCTTCTCCCTGT-3'	

1.4 RNA的提取和cDNA的合成

分别称取 0.1 g 半滑舌鳎的脑、性腺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠、眼组织,利用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 一步法提取总 RNA。cDNA 利用 M-MLV 反转录酶 (Promega) 合成; RACE-Ready-cDNA 利用 BD SmartTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 合成,严格按说明操作。3' Race ready-cDNA: RNA 3 μL 、3' -CDS 引物 1 μL 、ddH₂O 1 μL , 终体积 5 μL ; 5' Race ready-cDNA: RNA 3 μL 、5' -CDS 引物 1 μL 、BD SMART IITM A Oligonucleotide、ddH₂O 1 μL , 终体积 5 μL 。然后再在 PCR 仪 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min, 冰上冷却 2 min, 之后加入: 5 $\times$ First -strand buffer 2 μL 、DTT 1 μL (20 mmol/L)、dNTP mix 1 μL (10 mmol/L)、

Powerscript reverse transcriptase 1 μL , PCR 仪 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h, Tricine-EDTA buffer 稀释反应产物至 100 μL , PCR 仪 72 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 7 min。 -20°C 冰箱保存备用。

1.5 SMART-RACE扩增和RT-PCR扩增

SMART-RACE-PCR 扩增按照 SmartTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 的说明书进行。以 3'和 5' Race ready-cDNA 为模板,以试剂盒提供的通用引物和合成的 Dmrt1-fw2 和 Dmrt1-rv2 引物,PCR 法分别扩增 3'和 5' RACE 的末端。RACE-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 共 27 个循环。RT-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

72 °C 60 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

1.6 中间保守序列和 RACE 产物的纯化、克隆及测序

简并引物 *Dmrt1-fw1* 和 *Dmrt1-rv1* 的扩增产物和 50 μ L 的 3'-RACE 和 5'-RACE 产物, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 切下目的片段, 用 QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) 回收试剂盒, 按说明书提供的方法进行纯化。将回收产物按体积比 3:1 与 pMD18-T (Takara) 载体进行连接反应。连接产物 5 μ L 用于转化 *E.coli* DH5 α , 根据蓝白斑原理, 筛选白色菌斑, 提取质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定插入片段大小后, 在上海 Invitrogen 生物有限公司测序。

1.7 序列分析

登录 NCBI 用 BLAST 对测序结果进行同源性检索。用 DNAMAN (version 5.1) 分析所得半滑舌鳎 *Dmrt1 α* cDNA 序列以及开放阅读框。用 DNASTAR 进行多序列比较, 用 MEGA 3.1 中的邻位相联法 (Neighbor-joining, NJ) 方法构建进化树。

2 结果与分析

2.1 半滑舌鳎 *Dmrt1 α* 基因 cDNA 克隆、同源性分析及系统发生比较

根据其他已发表的鱼类 *Dmrt1* 保守区设计的兼并引物 *Dmrt1-fw1* 和 *Dmrt1-rv1* 得到 443 bp 中间片段, 经 BLAST 分析为 *Dmrt1* 基因。根据所得的片段设计基因特异引物 *Dmrt1-fw2*、*Dmrt1-rv2* 进行 3'-RACE 和 5'-RACE。扩增产物克隆、测序后, 经 DNAMAN 分析去除重叠序列和接头序列后得到 1 149 bp 的全长 cDNA 序列 (图 1), 含有 45 bp 的 5'-UTR 和 327 bp 长的 3'末端 UTR, 该基因编码了 258 个氨基酸, 含有保守的 DM 框 (DM domain)。用 DNASTAR 比较该氨基酸序列与其他鱼类、鼠和人的 *Dmrt1* 氨基酸序列, 其 DM 框与其他物种的同源性在 79%~88.9% (图 2)。所获得的序列与黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) (AAP84972)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (ABK15558)、细棘海猪鱼 (*Halichoeres tenuispinis*) (AAO18650)、欧洲尖嘴鲈 (*Odontesthes bonariensis*) (AAP84606)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) (BAE16952) 55.4%、日本拟隆头鱼 (*Pseudolabrus japonicus*) (AAY64468)、

青 鳉 (*Oryzias latipes*) (AAL02165)、非 洲 鲶 (*Clarias gariepinus*) (AAQ04554)、青 鳉 DMY (DM domain gene on Y-chromosome) (BAB92012)、虹 鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) (AAG17544)、斑 马 鱼 (*Danio rerio*) (AAQ04555) 的同源性分别为 58.1%、58.1%、57%、56.6%、55.4%、53.1%、48.1%、46.9%、46.1%、45.3% 和 41.9%。与小家鼠 (*Mus musculus*) (NP 056641) 和人类 (*Homo sapiens*) (NP 068770.2) 同源性只有 32.6% 和 33.7%, 而与奥尼亚罗非鱼 (*Oreochromis aureus*) DMO (DM-region gene in ovary) (AAR34460) 同源性最低, 只有 25.6%。用 MEGA3.1 的 Neighbor-joining 法分析, 重复 1 000 次, 物种间的缺失处理为缺失, 构建了系统发生树可以直观地看出这些蛋白之间的相似性程度 (图 3)。

2.2 *Dmrt1 α* 的组织表达

以获得的 *Dmrt1* cDNA 序列设计的特异引物 *Dmrt1-fw3* 和 *Dmrt1-rv3*, 分析其雌、雄鱼的脑、性腺、肝脏、脾脏、肾脏、肌肉、皮肤、心肌、肠、头肾、鳃、皮肤、小肠、眼组织中的 *Dmrt1 α* 的表达量。结果表明, *Dmrt1 α* 基因只在精巢中特异表达, 其他组织中都没有检测到 *Dmrt1 α* 的表达 (图 4)。

2.3 性逆转后性腺中 *Dmrt1 α* 的表达

在 7 月龄时, RT-PCR 检测甲基睾酮诱导的半滑舌鳎性逆转个体性腺中 *Dmrt1 α* mRNA 的表达水平发现: 与对照组 24 °C 雄性一样, 在经 MT (图 5) 和温度 (图 6) 诱导的由雌性转变为雄性的个体中出现有 *Dmrt1 α* 表达, 对照雌性和 MT 处理未逆转为雄性的个体中 MT 不表达。

3 讨论

目前已在鱼类、爬行类、鸟类及哺乳类动物中分离到 *Dmrt1* 基因的存在^[1-9, 16]。本研究中克隆的 *Dmrt1* 通过同源分析比较发现, 半滑舌鳎 *Dmrt1 α* 也具有保守的 DM 框, 其 DM 框与鱼类、两栖类爬行类、鸟类和哺乳类的同源性较高 79%~88.9%。氨基酸序列与黑鲷、斜带石斑鱼、细棘海猪鱼、欧洲尖嘴鲈同源性较高, 与小家鼠和人类同源性较低。这与传统分类一致, 保守的结构表明其功能也可能与其他物种类似。

```

1      acgaactccgtggctgaagtcccgagactccacagacaaggaccATGAACAAGAACAAGCAGCGCCCTGACTAC
1      M N K N K Q R P D Y
76     ACTGGACCACAGTCCCCATCCAAAGGCCGAAGACCACCCAGGAGCCCAAGTGCTCCCGCTGCAGGAACACGGC
26     T G P Q S P S K G R R P P R T P K C S R C R N H G
151    TTCGTGTCTCCGTTGAAGGGCCACAAACGCTTCTGTGACTGGAGGGAGTGTGCTGTGACAAGTGTAACCTCATA
51     F V S P L K G H K R F C D W R E C R C D K C N L I
226    GCGGAGAGACAGCGAATCATGGCGGCGCAGGTTGCCCTGAGGAGGAGCAGCAGGCCAGGAGGAAGAACTTGGGATT
76     A E R Q R I M A A Q V A L R R Q Q A Q E E E L G I
301    TGTACTCCAGTTTCTGTCAATGGGCCTGAAGTGATGATCAAGAGTGAGTCTGGAGCGGACTGCCTGCTCCCTGTG
101    C T P V S V N G P E V M I K S E S G A D C L L P V
376    GAAGGGAGATCCATGCCCTCTCCATCAGCACCTCCACTTATGTGCATGCTGGCCAAAGGAGCAGCAGGGCTCAT
126    E G R S M P S S I S T S T Y V H A G Q G S S R A H
451    CATGAGGGATCGTCTGACCTTCAGATGGAAACCCCTATTACAACATCTACCAACCATCTCGTTACCTGTACAA
151    H E G S S D L Q M E T P Y Y N I Y Q P S R Y L Y N
526    TATCAGCAATACCAGCAGATGTCTCATGGTGATGGCTGCCGAGCCACAACATGCCCTCTCAGTACTGCATG
176    Y Q Q Y Q Q M S H G D G C L P S H N M P S Q Y C M
601    CATTCCTTACTACCCAGCAACCTCCTACCTGACCCAAGGCCGAGCTCTGCCACCTACGTTCTTCCATCTGCAAC
201    H S Y Y P A T S Y L T Q G R S S A T Y V P S I C N
676    CTGGAGGACGGCAACTACGGCAGTAACAACAACCTACGCCGAGACCACGGCAGCCTCCGCCTCGTCCAGCGTCCGC
226    L E D G N Y G S N N N Y A E T T A A S A S S S V G
751    CTCACCGCCGCTCCTGACTTTGCCCTGAACCTACACCGTCACCTCCATCGTTACGGTGAAACAAACAAATAAaga
251    L T A A P D F A L N Y T V T S I V Y G E T N K *
826    aacctcacatatagtcggattaaaaaatatatatatattagagagttatgcactaaattgttcactacaaatgtt
901    ttagttaactgacgtttccgattacactcttcttttgacettgttgctacttcactagctcgtgatgtgttcacat
976    agtcaatattctcaccacagccatatttagaagggtttttgtgcaccattttgactcgacagatttacagagtaa
1051    gggattgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
1126    aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图1 半滑舌鲷 *Dmrt1a* cDNA 序列 (EU070761) 和推导的氨基酸序列 (ABW87296)

阴影部分示 Poly (A) 尾巴; 下划线示起始密码子 ATG; * 示终止密码子; 小写字母示 5' - 和 3' -UTR.

Fig. 1 cDNA nucleotide (EU070761) and predicted amino-acid sequences (ABW87296) of *Cynoglossus semilaevis* *Dmrt1a*

The polyA signal is shaded in gray; the initiation codon ATG is underlined; the termination codon is indicated by an asterisk; the lowercases indicate 5' and 3' UTR.

<i>Cynoglossus semilaevis</i>	MXKNKQ-R---PDYTGPKSP-----S-----KG-RRPRT	25
<i>Danio rerio</i>	MSFEETN-----GSLST-----R-----K-PSRM	19
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	MTKEKQSKQ-VPESTGPLSP-----S-----KG-QKPPRM	28
<i>Clarias gariepinus</i>	MSDDEQKKPFLEVATPLSP-----G-----PVGKKQPRM	30
<i>Oryzias latipes</i>	MSKEKQGRP-VPEGPAPGP-----R-----QRSRM	24
<i>Epinephelus coioides</i>	MSKDKQSKQ-VPECPGPLSP-----S-----KG-HKSPRM	28
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	MSDDEQTKL---LECAGPPSA-----S-----PG-KKPPRM	27
<i>Mus musculus</i>	MPNDDTFGKPSPTTEVPHPAGAPPQKAGGYSKAAGAMAGAAGSGAGGS---GGASGSGPSGLGSGSKSPRI	71
<i>Homo sapiens</i>	MPNDEAFSKPSTPSEAPHPGVPVPPQGRAGGFGKASGALVGAASGTSAGGSSRGSGSGASDLGAGSKSPRL	73
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICTPVAV-NGPEVM	97
<i>Danio rerio</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICSPINL-SGSDTL	91
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICSPVAL-SCPEVM	100
<i>Clarias gariepinus</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICTPVNL-SGSDIV	102
<i>Oryzias latipes</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICSPVAS-SGPEVT	96
<i>Epinephelus coioides</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICSPVAL-PCPEVM	100
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	PKCSRNRNHGFVSPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGICSPVAL-SSQEVV	99
<i>Mus musculus</i>	PKCARCRNHGYASPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAAELL	144
<i>Homo sapiens</i>	PKCARCRNHGYASPLKGHKRVCNWRDCQCKKCLIAERQRVMAAQVALRRQQAQEEELGISHPIPLPSAAELL	146
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	VKSESAD---CLLPVEGR-S-MPSS-ISTSTYVHAGQ---GSS---RA-HHEGSSDLQMETPYYN-IYQP	154
<i>Danio rerio</i>	VKNEAVGF---NVFTLSG-PPSPASSATASPTNLSGSMLSLSPAMSSRG-HTDCTSDMLMVDASYN-IYQP	159
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	VKNEAGAD---CLFSVEGR-SLTPTS-TSTSSIAVTSRSALSSSPSAGTRA-HTDGPSPDLILETSYNN-FYQP	167
<i>Clarias gariepinus</i>	VKDEPGND---YGFVAGAR---SLASSPAASGSRSSLTPSPATAATRG-HSEGSADLVVDASYN-FYQP	163
<i>Oryzias latipes</i>	VKNETGAD---CLFSMEGR-SGTPG---VPPNPLSAAGSCASSSSPSAAARV-YGEEASDLLETSYNN-FYQP	162
<i>Epinephelus coioides</i>	VKNEAGVD---CLFTVERR-SIPTTS-TSTSSIAVTSRSALSPSPSAGARA-HTDAQSDLLLETSYNN-FYQP	167
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	VKNEPTGD---CLSSVSGRSPTCGNTSAGTSPSNAGSRGLASSPTAFSRGQSTDGTADLLVDTSYNN-FYQP	169
<i>Mus musculus</i>	VKRENNASVPCMAFNSSSAQPPP---ASTPTAASEGRMVTQDIPAVTSRG-HMNTSDI.VSDPAYSSFYQP	214
<i>Homo sapiens</i>	VKRENNASVPCMAFNSSSAQPPP---ASVPTAASEGRMVTQDIPAVTSRG-HVENTPDI.VSDTYSSFYQP	216
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	SRV---LYN---Y---QQY-QMSHGDGC-----LPS-----HNMPSSQ	181
<i>Danio rerio</i>	TPY---SSYYSNLYNQY---QMPSGNGR-----LSS-----HNVPSPQ	192
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	SRV---STYYGNLYNQY---QMHPGDGR-----LSS-----HNMPSSQ	200
<i>Clarias gariepinus</i>	SRV---PAYYSNLYNQY---QMPSGDSR-----LSS-----HNMPSSQ	197
<i>Oryzias latipes</i>	SRV---SSYYGNIY---QQY-QMPPSDGR-----LSG-----HMPSPQ	193
<i>Epinephelus coioides</i>	SRV---PTYYGNLYNQY---QMPHPGDGR-----LSN-----HNMPSSQ	200
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	SRVPTAYYSNLYNQY---QMPNGESR-----LSS-----HNVPSPQ	203
<i>Mus musculus</i>	SLF---PYYNLYNYPQYSMALSAESSSGEVGNSLGGSPVKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQMKTESRIIPVSSQ	285
<i>Homo sapiens</i>	SLF---PYYNLYNCPQYSMALAASASGEVGNPLGGSPVKNSLRGLPGYVPGQITGNQWQMKMENRHAMSSQ	287
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	YCMHSYYPATSYLTQGRS-----SATYVPSICNLEDGNYG-----	216
<i>Danio rerio</i>	YRTHSYYS---SYLSQGLG-----AACVQP-----STCPE-----	219
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	YRMHSYYPATYLTQGLG-----SATCVPLPSLEDNNNNNNNSNN-----	243
<i>Clarias gariepinus</i>	YRMHSYYSASYSLSQGLG-----TAACMPPIFSMEDSSVCLSRKLQFHI-----	241
<i>Oryzias latipes</i>	YRMHSYYPATYLTQGLG-----SP---VPPYFSLDNDG-----	225
<i>Epinephelus coioides</i>	YRVHSYYPATYLTQGLG-----ATTCPVPLYGLDNNN-----	234
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	YRMHSYYSASYSLSQGLGQGLGQGLGQVLGQGLGQGLGHLGQGLGTTAACVPPMFSLD-NTCHD-----	268
<i>Mus musculus</i>	YRMHSYYPSPSYLGQS-----MSQITFTFEGGS-----	313
<i>Homo sapiens</i>	YRMHSYYPSPSYLGQS-----VPQFFTFEDAPS-----	315
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	-----SNNYAETTAASASSVG---LTAAPDFALN-----YTTSIVYG-ETNK	257
<i>Danio rerio</i>	-----PKAA---AAFSDGA-Q---DS-VSISMIN---AENKLECESS-ESGSFVDSIEG-ATKK	269
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	-----CSETMAASFPIPIITTAHDSTMTCRSISLVN---SEIHSECEASS-ETPNFTVSSIIDDAPKK	304
<i>Clarias gariepinus</i>	EMMSPGVKENKDTTFSADGVPDTSLACMPVNLMSV---AENKAECEPXS-DSGAFVDSIEG-AAKK	304
<i>Oryzias latipes</i>	-----AAASFPSLSLTSTHDLTLCRSISLVN---VGKAEFESGG-QPSVFPADSMSS-ESKK	280
<i>Epinephelus coioides</i>	-----CSVMTAASFSPSITPTGHDPITLCRSISLVN---SDVNGQCEAAS-ETPNFTVSSIIEGDATKK	295
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-----TKQTSFSPVSGGANGHGLSCLISLVN---SEGKTECDGQD-QGQGFVDSIEG-NHKK	326
<i>Mus musculus</i>	-----YSEAKASVTFSPSSQDGLVLSLSSSPMSXESSKGVLECEASSEPSSYAVNQVLEDEDEE	375
<i>Homo sapiens</i>	-----YPEARASVTFSPSSQDGLVLSLSSSPISXKSTKAVLECEPAS-EPSSFVTPVIEDEE	374

图2 半滑舌鳎 *Dmrt1a* 氨基酸序列 (ABW87296) 与其他脊椎动物 *Dmrt* 氨基酸序列的比较

序列中 DM 框 (DM domain) 用灰色表示。—表示此位点为空格。所用基因的 GenBank 序列号分别为斑马鱼 (AAQ04555), 黑鲷 (AAP84972); 非洲鲶 (AAQ04554); 青鳉 (AAL02165); 斜带石斑鱼 (ABK15558)、虹鳟 (AAG17544); 小家鼠 (NP 056641) 和人类 (NP 068770.2)。

Fig. 2 Alignment of amino acid *Cynoglossus semilaevis* *Dmrt1a* (ABW87296) with other vertebrate

The DM domain are shown in gray. Gaps are shown by dashes. The GenBank accession numbers of the sequences used are: *Danio rerio* (AAQ04555), *Acanthopagrus schlegelii* (AAP84972); *Clarias gariepinus* (AAQ04554); *Oryzias latipes* (AAL02165); *Epinephelus coioides* (ABK15558); *Oncorhynchus mykiss* (AAG17544); *Mus musculus* (NP 056641) and *Homo sapiens* (NP 068770.2)。

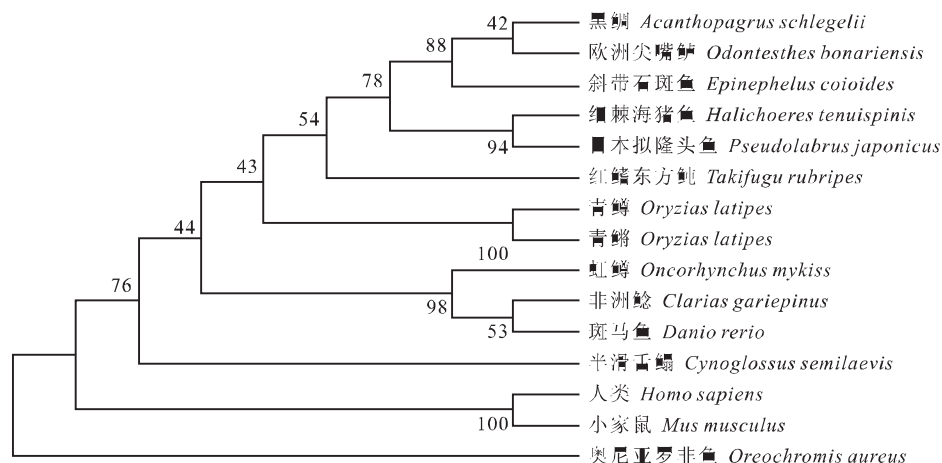


图3 基于NJ法构建的半滑舌鲷Dmrt1 α 和其他物种的Dmrt1系统树

注: 置信度 (bootstraps) 1 000 检验各分支的置信度。

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Cynoglossus semilaevis* and other species Dmrt1 amino acid sequence based on NJ method

Note: Distances are used to construct the phylogenetic tree and bootstrap values based on 1 000 re-sampling replicates.

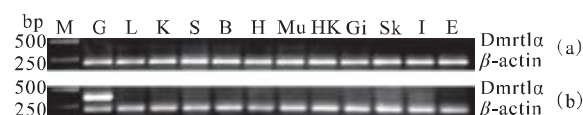


图4 二龄半滑舌鲷雌鱼(a)和雄鱼(b)Dmrt1 α 基因的组织表达

M: DL2 000 DNA marker; G: 性腺; L: 肝脏; K: 肾脏; S: 脾脏; B: 脑; H: 心肌; Mu: 肌肉; HK: 头肾; Gi: 鳃; Sk: 皮肤; I: 小肠; E: 眼球。

Fig. 4 RT-PCR analysis of Dmrt1 α expression from various tissues of two year old female (a) and male (b) *Cynoglossus semilaevis*

M, DL2 000 DNA marker; G, gonad; L, liver; K, kidney; S, spleen; B, brain; H, heart; Mu, muscle; HK, head kidney; Gi, gill; Sk, skin; I, intestine; E, eye.

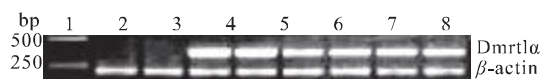


图5 甲基睾酮诱导半滑舌鲷性逆转后性腺中Dmrt1 α 的表达
1: 雌性对照; 2: 甲基睾酮处理正常雌性; 3: 雄性对照; 4: 甲基睾酮处理正常雄性; 5~8: 甲基睾酮处理性逆转雄性。

Fig. 5 RT-PCR analysis of Dmrt1 α expression in the gonads of sex-reversed *Cynoglossus semilaevis* by Methyltestosterone exposure

1: Female of control; 2: Female of Methyltestosterone exposure; 3: Male of control; 4: Male of Methyltestosterone exposure; 5-8: Male of sex reverse by Methyltestosterone.

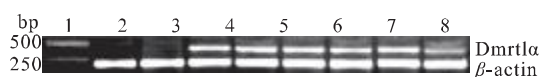


图6 温度诱导半滑舌鲷性逆转后性腺中Dmrt1 α 的表达

1: 雌性对照; 2: 高温处理正常雌性; 3: 雄性对照; 4: 高温处理正常雄性; 5~8: 高温处理性逆转雄性。

Fig. 6 RT-PCR analysis of Dmrt1 α expression in the gonads of sex-reversed *Cynoglossus semilaevis* treatment by temperature

1: Female of control; 2: Female of high temperature treatment; 3: Male of control; 4: Male of high temperature treatment; 5-8: Male of sex reverse by high temperature treatment.

已有的研究发现,Dmrt1基因广泛参与哺乳类、两栖类、爬行类和鱼类的性别决定和性别分化过程,在哺乳类,Dmrt1基因在人男性胚胎生殖嵴中有专一性表达,雌性中无表达,其缺失会导致性反转。在两栖类的黑斑蛙、虎纹蛙成蛙中也存在精巢专一表达。在鱼类,Dmrt1在虹鲢发育的精巢中特异表达,卵巢中无表达^[2]。在罗非鱼中,组织特异性表达检测表明,Dmrt1基因只在精巢中表达^[1]。在青鲢中,性别决定期的性腺中未检测到Dmrt1的表达;在成体组织中,Dmrt1也只在精巢中表达^[17]。黑鲷^[18]Dmrt1也只在精巢表达,与本研究中华滑舌鲷表达相同,都只在精巢中表达。

青鲢中,采用雌二醇诱导性逆转后,雄性逆转为

雌性的卵巢中检测不到 *Dmrt1* 的表达^[19]。在虹鳟, 用雌二醇短期处理使得 *Dmrt1* 表达降低。表明雌激素对 *Dmrt1* 的表达具负调节^[2]。在由雌性逆转为雄性过程中, 在粗皮蛙^[5]、鸡^[20]中都发现 *Dmrt1* 表达升高; 在成体青鳉, *Dmrt1* 仅在精巢中表达, 但在 XX 性反转的青鳉中, *Dmrt1* 也在 Sertoli cell 细胞中表达^[21]。在虹鳟, 用雌二醇短期处理使得 *Dmrt1* 表达降低, 然而在虹鳟用雄激素短期诱导遗传雌性时并不能刺激 *Dmrt1* 的表达, 这可能与刺激时间太短和 *Dmrt1* 不是激素控制的直接下游基因, 可能在性别分化级联控制系统中类固醇激素有更上的位置来控制^[2]。本研究发现, 经过 MT 浸浴处理后, 由雌性逆转为雄性的个体精巢中也检测到 *Dmrt1* 的表达。在温度敏感的鳗^[22]、龟类^[3-4, 23]中发现, 在性腺发育早期, *Dmrt1* 在两种性别中都表达, 但在产生雄性温度的情况下表达量高于产生雌性的温度。而在鱼类目前尚未见有关温度对 *Dmrt1* 表达的报道, 在温度诱导半滑舌鳎由雌性性别逆转为雄性后, 精巢中出现 *Dmrt1 α* 的表达, 而经过相同温度处理未发生性反转的卵巢中没检测到 *Dmrt1 α* 的表达。以上结果表明, 与其他物种中 *Dmrt1* 的作用机制相同, 半滑舌鳎 *Dmrt1 α* 可能参与了其雄性性别决定。

参考文献:

- [1] 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*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 72: 662-666.
- [2] Marchand O, Govoroun M, D' Cotta H, et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1493: 180-187.
- [3] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation [J]. *Genesis*, 2000, 26: 174-178.
- [4] Murdock C, Wibbels T. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination [J]. *Cytogenet, Genome Res*, 2003, 101: 302-308.
- [5] Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127: 232-241.
- [6] Aoyama S, Shibata K, Tokunaga S, et al. Expression of *Dmrt1* protein in developing and in sex reversed gonads of amphibians [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101: 295-301.
- [7] Nanda I, Shan Z, Schartl M, et al. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9 [J]. *Nat Genet*, 1999, 21: 258-259.
- [8] Shan Z, Nanda I, Wang Y, et al. Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, DMRT1, in birds [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 89: 252-257.
- [9] Raymond C S, Kettlewell 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: 208-220.
- [10] Luckenbach J A, Godwin J, Daniels H V, et al. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 216: 315-327.
- [11] Arslan Tulin, Phelps R P. Production of monosex male black crappie, *Pomoxis nigromaculatus*, populations by multiple androgen immersion [J]. *Aquaculture*, 2004, 234: 561-573.
- [12] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布 [J]. *海洋水产研究*, 1988, 13(9): 37-38.
- [13] 孙中之, 柳学周, 徐永江, 等. 半滑舌鳎工厂化人工育苗工艺技术研究 [J], *中国水产科学*, 2007, 14(2): 244-248.
- [14] Chen Songlin, Li Jing, Deng Siping, et al. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(2): 273-280.
- [15] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎性腺分化和温度对性别决定的影响 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(5): 714-719.
- [16] Raymond C S, Parker E D, Kettlewell J R, et al. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators [J]. *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 989-996.
- [17] Nanda I, Kondo M, Hornung U, et al. A duplicated copy of DMRT1 in the sex determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 11778-11783.
- [18] 刘绪生, 梁冰, 张树义. 黑鲷 DMRT1 基因 cDNA 的克隆、组织表达谱及在性别逆转前后性腺中的表达 [J]. *动物学研究*, 2004, 25(2): 158-161.
- [19] Suzuki A, Nakamoto M, Kato Y, Shibata N. Effects of estradiol-17 β on germ cell proliferation and DMY expression during early sexual differentiation of the medaka *Oryzias*

- latipes*[J]. Zool Sci, 2005 Jul; 22 (7): 791–796.
- [20] Smith C A, Melissa K, Andrew S H. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos[J]. Bio Reprod, 2003, 68: 560–570.
- [21] Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-K H, 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.
- [22] Smith C A, McClive P J, Western P S, et al. Conservation of a sex-determining gene[J]. Nature, 1999, 402: 601–602.
- [23] Torres M L, Landa P A, Moreno M N, et al. Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*[J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 129: 20–26.

Molecular cloning, characterization and RT-PCR expression analysis of Dmrt1 α from half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*

DENG Si-ping^{1,2}, CHEN Song-lin¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China; 2. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Many genes are known to be involved in gonadal differentiation in vertebrates. Doublesex and mab-3-related transcription factor 1 (Dmrt1), a gene that encodes a transcription factor with a DM-domain, is considered to be one of the essential genes controlling testicular differentiation in mammals, birds, reptiles, amphibians and fish. Dmrt1 has been suggested to be the first conserved gene involved in sex differentiation found from invertebrates to human. Half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) is a newly exploited and commercially important cultured marine flatfish. Females grow 2–3 times faster than males. To clarify the mechanism of sex reversal and gain all-female tongue sole stock would be significantly beneficial for aquaculture. The full-length cDNA of the half-smooth tongue-sole Dmrt1 α was isolated from testis of tongue sole by using homologous cloning method, which was 1 149 bp in length, including 45 bp of 5' terminal UTR, 777 bp encoding region and 327 bp of 3' terminal UTR. The putative Dmrt1 α amino acid of tongue sole shared 41.9%–58.1% sequence identity with other fish Dmrt1. However there was only 32.6% and 33.7% sequence identify with that of mouse and human. The RT-PCR analysis reveals that Dmrt1 α mRNA was only expressed in the testis, but not in ovary, brain, liver, spleen, kidney, muscle, skin, heart, head kidney, gill, intestine, and eyes. However, it also expressed in the testis of sex-reversed male treatment by Methyltestosterone or high temperature. These results suggested that Dmrt1 α may be involved in the male sex determination of tongue sole. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (4): 577–584]

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; Dmrt1 α ; cDNA cloning

Corresponding author: Chen Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn