

栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、序列特征及表达分析

冯政夫^{1,2}, 邵明瑜¹, 孙大鹏³, 张志峰¹

(1. 中国海洋大学 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 青岛农业大学, 山东 青岛 266103; 3. 辽宁省水产研究所 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: DMRT家族是一类转录因子, 在性别决定与分化、器官形成等早期胚胎发育中起重要的作用。本研究采用简并PCR扩增和cDNA末端快速扩增技术(RACE), 从栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)精巢中克隆得到1个全长为2 312 bp的*dmrt* cDNA序列, 其开放阅读框(Open reading frame, ORF)1 110 bp, 编码369个氨基酸, 具有*dmrt*基因家族共有的DM保守结构域。同源比对和系统进化分析结果显示, 其为*Cf-dmrt4-like*基因。半定量RT-PCR结果显示, 该基因从受精卵至匍匐幼虫各发育时期均有表达, 卵裂期表达量较高; 在雄性成体的鳃和精巢以及雌性成体的外套膜、鳃、肾和闭壳肌中表达, 但卵巢中未见表达。qRT-PCR检测不同发育时期的精卵巢, 以成熟期精巢表达量最高。由此推测, 栉孔扇贝*Cf-dmrt4-like*基因参与个体的早期发育, 并在两性成体中发挥着不同的作用。[中国水产科学, 2010, 17(5): 930-940]

关键词: 栉孔扇贝; *dmrt*基因; 全长cDNA; 序列特征; 组织表达

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)05-0930-11

Dmrt (Doublesex and mab-3 related transcription factor) 家族是近年来发现的一个与发育相关的基因家族。该基因家族的一些成员在多细胞动物的性别分化以及早期发育中发挥着重要的作用^[1-2]。该家族基因最早是在线虫的*mab-3*基因^[3]和果蝇的*dsx*基因^[4]中发现, 其共有1个具有DNA结合能力的DM保守结构域。随后在人^[5]、小鼠^[6]、鱼类^[7-11]、沼泽鳄(*Crocodylus palustris*)^[12]、皱皮蛙(*Rana rugosa*)^[13]、赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)^[14]、马氏珠母贝(*Pinctada matensii*)^[15]中获得*dmrt*基因。目前已报道了10多个*dmrt*家族基因, 但其功能方面的研究报道较少, 其中有些基因与性腺发育或性别分化有关^[1]。如青鳉(*Oryzias latipes*)的*DMY (dmrt1bY)*基因位于Y染色体的雄性性别决定区, 具有性别决定基因的所有特征, 认为是青鳉性别决定基因的候选者, 迄今为止在其他鱼类中还没有克隆到类似的基因^[16]; *dmrt1*和*dmrt2*基

因在人、小鼠和沼泽鳄的生殖嵴形成过程和成体精巢中表达, 人的*dmrt1*基因位于9号染色体上, 它的缺失与XY性反转密切相关^[5-6, 12]; *dmrt3*在日本红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的精巢^[17]、小鼠胚胎期性腺和成体精巢中^[6]高表达。*dmrt4*是一个广泛参与性腺和其他组织器官发育的基因, 在小鼠胚胎期的组织和器官^[6]、奥尼罗非鱼(*Oreochromis aurea*)的脑^[7]、青鳉的眼、鳃、肾、嗅觉系统和性腺^[18]、日本红鳍东方鲀的脾、性腺^[17]以及非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)的嗅觉和神经系统^[19]的发育中广泛表达。其中在日本红鳍东方鲀、青鳉精巢中的表达量高于卵巢^[17-18], 但在小鼠胚胎期的精卵巢中同等水平表达^[6], 奥尼罗非鱼和尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)的*dmrt4*只在卵巢中表达^[7, 9]。*dmrt5*在日本红鳍东方鲀的脾、小鼠的脑以及两性性腺中表达, 且在卵巢中的表达高于精巢^[6, 17]; *dmrt7*在小鼠雌性胚胎期性腺、成体卵巢中高表达^[6]。

收稿日期: 2009-11-02; 修订日期: 2010-01-06.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金面上项目(30901097); 山东省自然科学基金重点基金(Z2008D02).

作者简介: 冯政夫(1965-), 女, 高级工程师, 博士研究生. E-mail: zhffeng@163.com

通讯作者: 张志峰, 教授, 博士生导师. Tel: 0532-82031647; E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

贝类 *dmrt* 家族基因的研究目前仅有少量报道, 如于非非等^[15]克隆了马氏珠母贝的 *dmrt* 基因; Naimi 等^[2]报道了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的 *DML* (*DMRT-like*) 基因在幼贝、成体性腺和组织中的表达, 发现在精巢中的表达明显高于卵巢; 目前还未见关于栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 性别分化与性腺发育相关 *dmrt* 基因的研究报道。栉孔扇贝隶属软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia), 其肉鲜味美、营养丰富, 是中国山东半岛、辽宁大连北部沿海地区贝类养殖的主要品种之一, 具有较高的经济价值^[20]。本研究克隆了栉孔扇贝的 *Cf-dmrt4-like* 基因的全长 cDNA 序列, 并进一步对其时空表达特征以及两性性腺发育周期中的表达水平差异进行了分析, 为贝类性别分化和性腺发育机制的研究提供学术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用栉孔扇贝购自青岛水产批发市场。选择健康的雌雄个体, 解剖并获取性腺、闭壳肌、外套膜、鳃、肾、肝胰腺等组织。分别剪成约 0.2 cm³ 的组织块, 液氮中速冻后, 存于 -80 °C 冰箱备用。

栉孔扇贝各期胚胎和幼虫为本实验室培养。亲贝取自海阳育苗场, 采用阴干 (15 °C, 1 h) 升温 (18 °C) 充气的方法诱导生殖细胞排放。按照精卵数量 8 : 1 的比例进行人工授精。受精 30 min 后洗卵 2 次, 20 °C 培养, 48 h 后适量充气和投喂等鞭金藻。定期收集各期胚胎、幼虫, 于液氮速冻后, -80 °C 冰箱保存备用。

实验所用 *Hae* III 内切酶、*r-Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物公司、SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒购自 Clontech 公司。M-MLV 反转录酶、dNTP 购自 Promega 公司。SYBR Green Master 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

取上述栉孔扇贝性腺等组织, 按照分子克隆实验指南^[21]的方法提取总 RNA, 所有的 RNA 样本均用 RNA-free DNase I 消化, 纯化后的 RNA 经琼脂

糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测其质量后, 参考 M-MLV 反转录试剂盒说明将总 RNA 反转录为 cDNA, -20 °C 保存。

1.3 基因全长 cDNA 序列的获得

根据斑马鱼、青鳉、奥尼罗非鱼、小鼠、人的 *dmrt1* 基因的 cDNA 序列及氨基酸序列, 在 DM 保守结构域内设计 1 对简并引物 P1 和 P2 (表 1), 以栉孔扇贝成熟期精巢的 cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因片段。PCR 反应体系为 20 μL, 循环参数为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶检测、回收后, 与 pMD18-T 载体连接, 并转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。阳性克隆的 PCR 产物经 *Hae* III 酶切鉴定后送上海生工生物工程技术有限公司测序, 所得 cDNA 片段序列与 GenBank 核酸数据库中的已知序列进行 Blastx 同源性分析。

根据已获得的栉孔扇贝 cDNA 序列设计 3' RACE 引物 P3 以及 5' RACE 引物 P4 和 P5 (表 1)。按照 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒的方法, 从栉孔扇贝成熟期精巢中分别扩增目的基因 cDNA 的 3' 和 5' 端序列。循环参数为: 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 其他程序同上。

1.4 目的基因核酸序列特征及氨基酸序列相似性分析

用 NCBI 中的 BLAST2 软件将获得的 3' 和 5' cDNA 序列进行拼接, 得到目的基因的全长 cDNA 序列; 用 DNASTAR 程序搜索开放阅读框并预测氨基酸序列。采用 Clustalx 1.83 和 MEGA 3.1 软件, 以 Bootstrap 法根据不同物种的 DMRT 蛋白的氨基酸序列进行进化树构建。

1.5 半定量 RT-PCR 分析

用 1.2 中的方法得到实验用 cDNA 模板, 根据目的基因的全长 cDNA 序列, 设计 1 对 RT-PCR 特异引物 P6 和 P7 (表 1), 以栉孔扇贝 β -actin 基因序列 (GenBank 注册号 AY335441) 设计内参引物 P8 和 P9 (表 1)。PCR 反应体系为 20 μL, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环; β -actin 的 cDNA 扩增为 23 个

循环,其他参数同1.3。实验重复2次。

1.6 相对定量qRT-PCR分析

依据组织学切片观察(图版1),分别取增殖期(滤泡壁由单层生殖细胞组成)、生长期(精巢中滤泡壁由多层细胞组成,滤泡腔明显;卵巢中卵母细胞多附着于滤泡壁上,胞体大,呈倒梨型,滤泡腔明显)和成熟期(滤泡腔内充满生殖细胞)的栉孔扇贝精巢和卵巢组织各3个个体的样本,用1.2中的方法分别获得它们的cDNA模板,依据1.4获得的cDNA全长序列,设计1对qRT-PCR特异引物P10和P11(表1),依据1.5中的栉孔扇贝 β -actin基因序列设计1对内参

引物P12和P13(表1)。20 μ L的PCR反应体系中含有模板cDNA 1 μ L, PCR Master mix 10 μ L, RNAase-free H₂O 7 μ L, 上游和下游引物(2 μ mol/L)各1 μ L。循环参数为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,40个循环,扩增反应在ABI 7500 Real-time PCR仪中进行。每个cDNA样品重复1次。

用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量,计算中将雌性增殖期目的基因mRNA的表达量设定为1,以SPSS 13.0软件包中One-way ANOVA进行显著性分析,Turkey法进行多重比较($P < 0.05$ 为显著水平),用Microsoft Office Excel作图。

表1 本实验所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in the study

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
P1	AA(GA)GG(CATG)CA(CT)AA(GA)(AC)G(ACG)T(AT)CTG
P2	T(TC)(TC)TC(TC)TC(TC)TG(TGA)GC(TC)TG(TC)TG
P3	AACGCGTGATGGCGGCACAAGTAGCG
P4	GCCGCCATCACGCGTTGTCTTTCTGC
P5	GTCGTCCGGAGCCTCTCTGACCTTGC
P6	GCTGATTCTTCAAGGCTGTG
P7	TGAATGCCATGAAAGAGTCT
P8	ATGCCCTCCCTCACGCTAT
P9	GCCAGACTCGTGGTATTCTT
P10	GCTGATTCTTCAAGGCTGTGGC
P11	CCCAGTGTATACCAGGGAATGC
P12	TTCTTGGGAATGGAATCTGC
P13	ATTGTGCTACCACCGAAAG

2 结果与分析

2.1 目的基因全长cDNA序列特征

RACE扩增产物经纯化、克隆、测序和片段拼接,得到目的基因的全长cDNA为2 312 bp(GenBank注册号为GQ995585),包括5'非编码区(Untranslated region, UTR)179 bp,3' UTR 1 023 bp且含32 bp的poly(A)尾,开放阅读框(Open reading frame, ORF)1 110 bp,含1个ATG启动子和1个TGA终止子,编码369个氨基酸(图1)。推导的氨基酸序列含有DMRT家族共有的DM保守结构域(由54个氨基酸组成)、锌指结构(CCHC的Site I和HCCC的Site II)和1个位于Site I锌指结构

内的核定位信号序列(Nuclear localization signal, NLS)KGHKR(图2A)。在C端还有1个DMRT4和DMRT5蛋白特有的DMA保守基序(由29个氨基酸组成)和7个氨基酸(KSAFSP/L)组成的短保守序列(图2B)。

2.2 序列比对及系统进化分析

选择哺乳类、两栖类、爬行类、鱼类和双壳贝类等物种的DM保守结构域的氨基酸序列进行比对(图2A),结果显示,DM保守结构域中LKGHKR、RQRVMAAQVALRRQQ,Site I中的CCHC和Site II中HCCC、第3位和5位的R、第6位的N和第8位的G以及第32位的L,共33个氨基酸在不同进化地位的物种中是相同的。

```

1  acgcggggagtctataacaagaaaaaggtatagagcggaggtggtcctcgtcacaactga
61  aataatcttaacaggaatagtagttgattatgacaaaactcttttagcattgcccacta
1  cctattatagtagtatattttttgacattcttataagttaatactctacacacacacaA
121 S S D D E K S D G A N G M F M R A A D R
2  TGAGTTCGGATGATGAGAAAAGTGATGGAGCAAATGGGATGTTTCATGCGAGCAGCAGATA
181 Y P R T P K [C] A R [C] R N [H] G V V S A L K —DM
22  GATATCCTAGGACACCAAATGTGCCGATGTCCGAACCATGGAGTGGTATCAGCACTCA
241 G [H] K R Y [C] R W R D [C] V [C] A K [C] T L I A
42  AAGGCCACAAGCGTACTGTCCGGTGGAGAGACTGTGTGTGCCCAAATGCACCCTTATTG
301 E R Q R V M A A Q V A L R R Q Q A Q E E
62  CAGAAAGACAACGCGTGTGGCGGCACAAGTAGCGCTTCGGCGTCAACAAGCGCAAGAGG
361 N E A R E L G M L Y G Q S G L L Q I N P
82  AGAATGAAGCTCGGAAC TAGGAATGCTGTATGGACAAAGTGGACTGCTTCAGATCAACC
421 E T V N M F P E A K Q Y L D T S K V R E
102 CCGAAACCGTCAACATGTTTCTGAGGCCAAACAATACTTAGATACTAGCAAGGTCAGAG
481 A P D D Y P A S K K Q K L D D P R E E F
122 AGGCTCCGACGACTATCCTGCATCTAAAAGCAGAAGCTAGATGATCCCAGGGAAGAGT
541 Q L D A A R P D S R P S T P E G V E R P
142 TCCAAC TGACGCTGCTCGCCGACTCAGACCCTCGACACCAGAGGAGTGGAACGCT
601 R S P A D S A G S P E P S P R S C D P P
162 CTAGATCCCGGCTGACTCTGCCGATCTCCAGAACCATCGCCAAGGTCATGTGCCCGC
661 S P R S P A S K S D S K S P F D E S A L
182 CAAGCCCAAGAAGTCCCGCTCCAAATCTGACTCTAAATCTCCGTTTGACGAAAGCGCC
721 A H Y G G N K R Q P I E M L S R I F P H —DMA
202 TCGCCCACTACGGCGGAAACAACGACAACCGATTGAGATGTTGTCCGCGCATCTCCCTC
781 M K R S V L Q L I L Q G C G G D V V Q C
222 ATATGAAGCGCAGCGTCTCAGCTGATTCTCAAGGCTGTGGCGGTGACGTAGTACAAT
841 I E Q I L N S R G D V N G M S S S F A G
242 GTATAGAGCAAATCTCAACAGCCGTGGCGATGTTAACGGTATGCTCTAGTTTCGCCG
901 S P L I T P H G I S N P L G A P S L K S
262 GGAGTCCTTTAATTACGCTCATGGTATATCCAATCCGCTTGGTCTCCATCTCTGAAGT
961 A F S P I A S S I A N A H S L N P I R N
282 CAGATTCTCTCTATAGCATCTCCATTGCTAACGCCATTGCTGAACCCATTGCTA
1021 A W G S M S R G L L A M P Y P P A F P G
302 ACGCCTGGGGTAGCATGAGCCGAGGACTGCTAGCTATGCCGTATCCACCAGCATTCCCTG
1081 I T L G S N Y S A Y S G L T T D S A S K
322 GTATAACACTGGGTAGTAATTATTCTGCTTACAGTGGACTCACAACAGACAGTGCATCTA
1141 P F P Y T M Y P C C P T K P F T A S A S
342 AACCATCCCATACAATGTACCCGTGCTGCCGACAAAGCCTTCACTGCTTACGCCA
1201 D K S G C L G E *
362 GGCACAAGTCAGGTTGCCTTGGTGAATGAgtgggatgacttggatgatacattcttaa
1261 aagaggtgcgattcaaatggcgcgtgatggaagggcctgagaaataggtcccttaact
1321 ttattttgtctaaaagataaaggaacattgcttatgctctttgctgtagacattaaactg
1381 gcttgtctattgtaccagaagtgtcagctctttccgaagatacagactctttcatggca
1441 ttcattaggaagaggtctaccgtaacacctttgaaagtcatatgaacgttttattatta
1501 tttcgtataccgaaatcacatgTTTTTTTtacgtgtaaaaaaaaaaac taaaagctgaca
1561 cgaaaaacagttaaaagaagctaccgataactcacagacaaccataaacaatttacca
1621 ctatcatagaactgaatggaaaatgtcaagtaatagataagaaagttaacggcggagag
1681 atatTTTgtgatgtattgaaataagtgtaacgggctgtcctttactcactgaagtaa
1741 aataggactaaaactaatggcaacaaaaatggctcacat taagacaatgatacatatat
1801 gttttatataactatTTTtcttactattttgaaaaatgtaatatgaaatgatgaatggg
1861 aggcaaaatgtatcatatctgcataatgtggtcctttattataaatgtttgtgaaactgaaa
1921 ctagaaaaaaaaacatacatataatccacttgatggttatctaacacatgtacatctagaac
1981 acagattgattgacagctgtgcaataaccagtggtgctgattggactggcatataagtat
2041 ttattatagattgaaacattaagtcaatcaagatcaaaagtcattggctcacaaggaattgt
2101 tgagggtgttattattgtattgttttcttcacgtatatcattgttacaagtcacattaa
2161 tttgttcagttgtaaaaaaatgacttataatttcttgattaaattaccgaagaaatgt
2221 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
2281

```

图1 栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
 阴影部分分别为 DM 保守结构域和 DMA 保守基序, DM 保守结构域中的锌指结构成员用黑框标出, 单下划线为短保守序列, 双下划线示起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA.

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of full-length *Cf-dmrt4-like* cDNA in *Chlamys farreri*
 Conservative domain DM and conservative motif DMA are shaded. Members of zinc finger motif are boxed. A short conservative motif is underlined. Start codon ATG and stop codon TGA are double underlined.

氨基酸序列分析显示,该基因DM保守结构域与太平洋牡蛎DMI的相似性为100%,与小鼠、山地麻蜥(*Eremias brenchley*)、月光鱼(*Xiphophorus maculatus*)和红鳍东方鲀DMRT4的相似性分别为96%、96%、96%和98%;与小鼠、月光鱼和红鳍东方鲀DMRT5的相似性均为96%,与小鼠其他DMRT的相似性为70%~85%(图2A)。DMA氨基酸序列与

太平洋牡蛎DMI的相似性为82%,与小鼠DMRT4和DMRT5的相似性均为72%(图2B)。

核苷酸序列分析显示,该基因DM结构域与太平洋牡蛎DMI的相似性为80%,与小鼠、月光鱼和红鳍东方鲀DMRT4的相似性分别为78%、79%和80%;与小鼠、月光鱼和红鳍东方鲀DMRT5的相似性分别为74%、78%和80%(图2C)。



图2 DM结构域和DMA基序的序列比对

A 图为DM结构域的氨基酸序列; B 图为DMA结构域的氨基酸序列; C 图为DM结构域的核苷酸序列; 方框为栉孔扇贝 *dmr4-like* 基因序列。

Fig. 2 Sequence alignment of DM domain and DMA motif

A shows deduced amino acid sequences of DM domain. B shows deduced amino acid sequences of DMA motif. C shows nucleotide sequences of DM domain. Sequences of *Chlamys farreri*'s *dmr4-like* are boxed.

Takifugu rubripes: 红鳍东方鲀; *Rana rugosa*: 皱皮蛙; human: 人; mouse: 小鼠; *Eremias brenchley*: 山地麻蜥; *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎; *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝; *Xiphophorus maculatus*: 月光鱼; *Lepidochelys olivacea*: 太平洋丽龟; *Monopterus albus*: 黄鳝。

DMRT家族系统进化分析显示,根据本实验所获栉孔扇贝目的基因推导的氨基酸序列与小鼠、山地麻蜥、人、非洲爪蟾、鱼类的DMRT4、太平洋牡蛎的DMI蛋白的氨基酸序列相似性最高,聚为一类;人、小鼠、非洲爪蟾、鱼类的DMRT5聚为一类;欧非肋突螈(*Pleurodeles waltl*)、小鼠、非洲爪蟾、沼泽鳄、人、鱼类的DMRT1蛋白聚在一起;果蝇DSX和线虫的MAB-3位于进化树的最下方(图3)。综合分析并依据目前 *dmrt* 家族基因的分类原则,即与小鼠 *dmrt* 基因DM结构域的相似性最高者而定名^[14,22-23],本研究把获得的目的基因初步定名为 *Cf-dmrt4-like*。

2.3 *Cf-dmrt4-like* 基因的时空表达

半定量RT-PCR结果显示, *Cf-dmrt4-like* mRNA在胚胎发育各期和幼虫期均有表达,卵裂至囊胚期的表达量较高,原肠胚期最低,之后在壳顶幼虫和匍匐幼虫逐渐增高(图4);在成体雌性各组织中较广泛表达,以外套膜中的表达量最高,但肝胰腺和成熟期的卵巢中未见表达(图5);在雄性成体的鳃和成熟期的精巢中表达,前者表达量较高(图6);qRT-PCR结果显示, *Cf-dmrt4-like* mRNA在不同发育时期的精卵巢中均有表达;在卵巢各发育时期的表达量均无显著性差异($P>0.05$);增殖期和生长期精巢的表达量亦无显著性

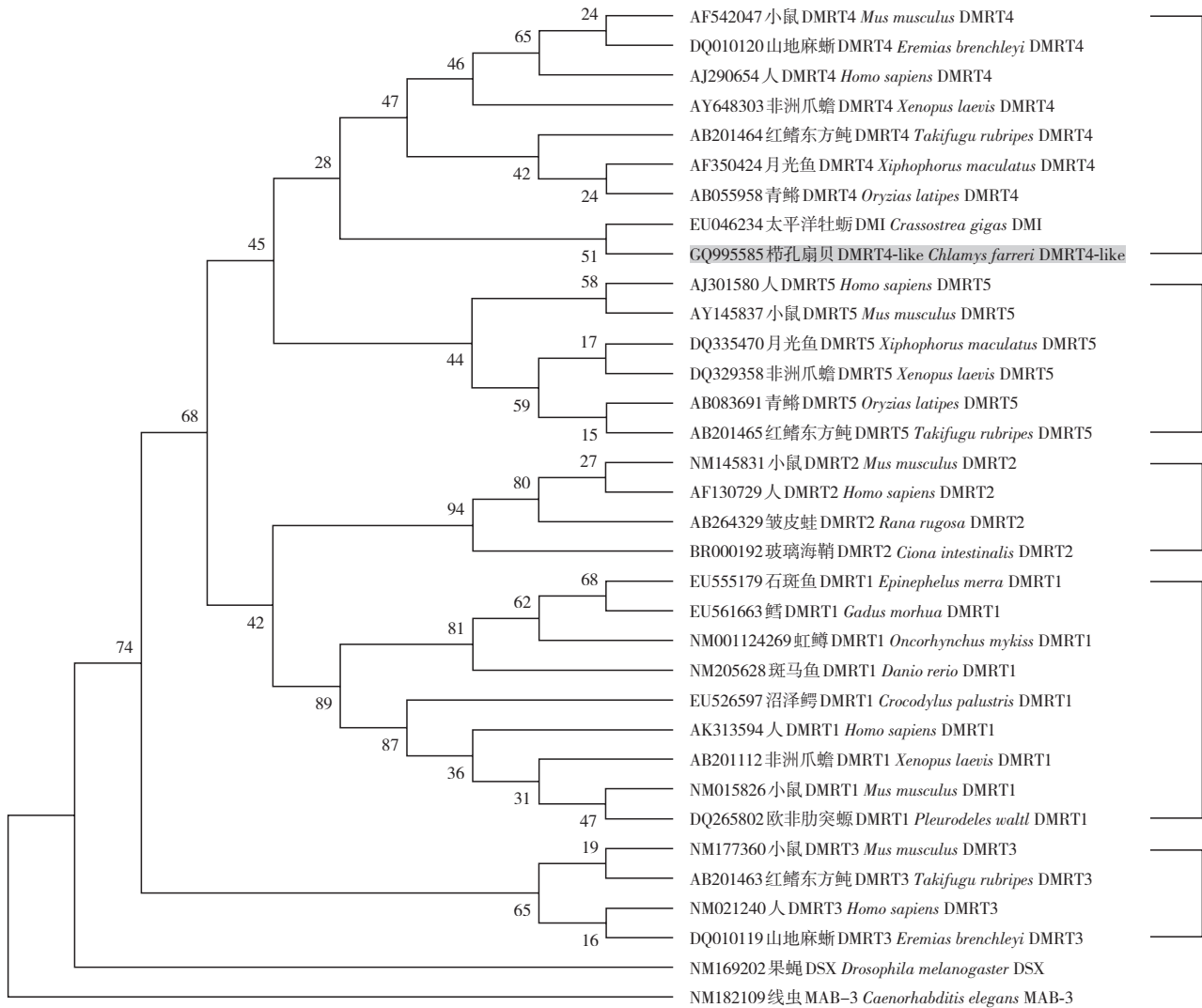


图3 DMRT家族蛋白的系统进化分析
阴影示栉孔扇贝DMRT4-like.

Fig. 3 Phylogenetic analysis of DMRT family proteins
DMRT4-like of *Chlamys farreri* was shaded.

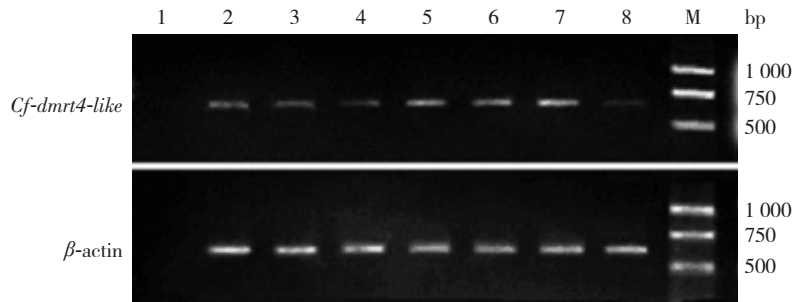


图4 *Cf-dmrt4-like* mRNA在栉孔扇贝胚胎和幼虫中的表达

M: DL 2000 分子量标准; 1: 水; 2: 匍匐幼虫; 3: 壳顶幼虫; 4: 原肠胚; 5: 囊胚; 6: 桑椹胚; 7: 8-16细胞; 8: 受精卵

Fig. 4 Expression of *Cf-dmrt4-like* mRNA in embryos and larvae of *Chlamys farreri* analyzed by RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: water; 2: creeping larva; 3: umbo larva; 4: gastrula; 5: blastula; 6: morula; 7: 8-16 cells; 8: fertilized egg.

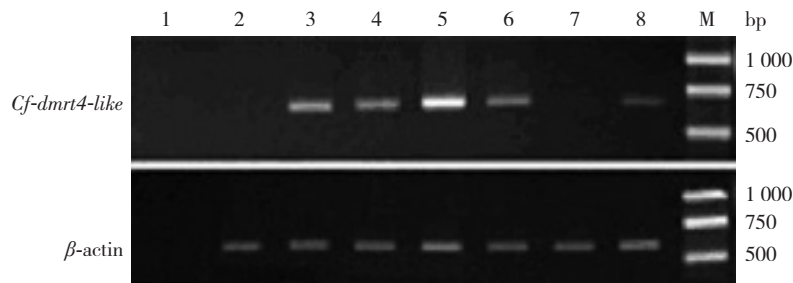


图5 *Cf-dmrt4-like* mRNA在雌性栉孔扇贝组织中的表达

M: DL 2000 分子量标准; 1: 水; 2: 肝胰腺; 3: 肾; 4: 鳃; 5: 外套膜; 6: 闭壳肌; 7: 成熟期卵巢; 8: 成熟期精巢(对照).

Fig. 5 Expression of *Cf-dmrt4-like* mRNA in tissues of female *Chlamys farreri* analyzed by RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: water; 2: hepatopancreas; 3: kidney; 4: gill; 5: mantle; 6: adductor muscle; 7: ovary at mature stage; 8: testis at mature stage (control).

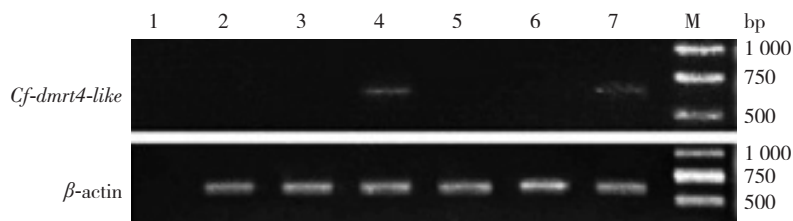


图6 *Cf-dmrt4-like* mRNA在雄性栉孔扇贝组织中的表达

M: DL 2000 分子量标准; 1: 水; 2: 肝胰腺; 3: 肾; 4: 鳃; 5: 外套膜; 6: 闭壳肌; 7: 成熟期精巢.

Fig. 6 Expression of *Cf-dmrt4-like* mRNA in tissues of male *Chlamys farreri* analyzed by RT-PCR

M: DL 2000 marker; 1: water; 2: hepatopancreas; 3: kidney; 4: gill; 5: mantle; 6: adductor muscle; 7: testis at mature stage.

差异 ($P > 0.05$), 但成熟期精巢的表达量显著高于增殖期和生长期的精巢和各期的卵巢 ($P < 0.05$, 图7)。

3 讨论

Dmrt 家族是一类在无脊椎和脊椎动物间皆保守存在的性别决定和分化相关基因, 其DM保守结构域是DMRT家族基因的唯一共有特征, 不同物种

的 *dmrt* 基因以及同一物种的不同 *dmrt* 基因在此结构域以外的相似性一般很低, 因此, 大多数学者依据该结构域序列与小鼠或人 *dmrt* 基因的相似性最高者来划分其所属^[14, 22-23]。目前, 在线虫中已获得具有DM结构域的基因11个, 脊椎动物也获得许多 *dmrt* 基因, 明显的聚为7类^[1, 22], 然而有关其功能方面的研究报道较少, 线虫的 *mab-3* 是1个性别调控基

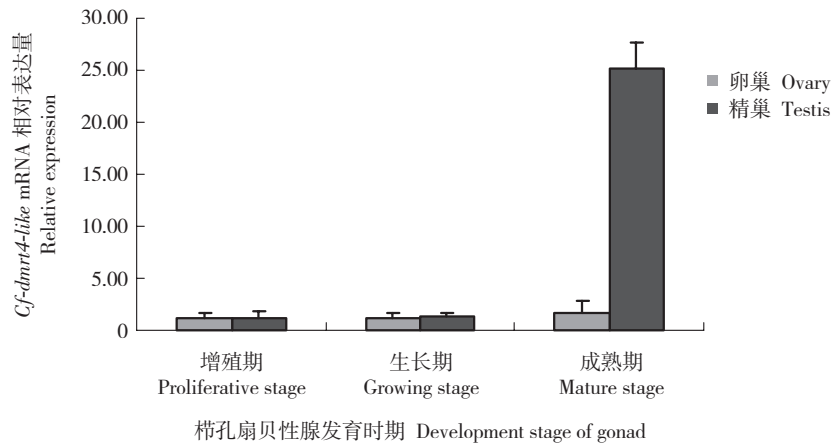


图7 qRT-PCR分析 *Cf-dmrt4-like* 在栉孔扇贝不同发育周期性腺中的表达

Fig. 7 Expression of *Cf-dmrt4-like* mRNA in *Chlamys farreri*'s gonad during developmental cycles analyzed by qRT-PCR

因,而其下游的 *mab-23* 是第2个性别发育调控基因;而脊椎动物的 *dmrt1*、*dmrt2*、*dmrt4*、*dmrt5* 参与胚胎期性腺发育、成体性腺的功能维持以及在组织、器官发育中发挥作用^[1,22]。

本实验从栉孔扇贝的精巢中获得1个全长为2 312 bp的cDNA序列,氨基酸序列分析显示,其具有DMRT家族共有的DM保守结构域,且在C端含有 *dmrt4*、*dmrt5* 基因特有的DMA保守基序。其DM结构域的核苷酸序列与小鼠 *dmrt4* 和 *dmrt5* 的相似性分别为78%和74%;氨基酸序列与小鼠DMRT4和DMRT5的相似性均为96%,而与小鼠其他DMRT的相似性低于86%。系统进化分析表明,其氨基酸序列与人、小鼠和鱼类等物种的DMRT4的同源性最高,聚为一类。此外,该基因的表达特征与已报道的 *dmrt4* 类似^[17-18],由此推断其为 *dmrt4* 基因。进一步分析还发现它的NLS位于DM保守结构域的Site I 锌指结合位点内,类似于人、斑马鱼DM结构域中的NLS序列,推测其DM结构域可能具有调控DNA转录和蛋白质向细胞核转运的功能^[24-25]。

本文首次报道了贝类 *dmrt* 基因的发育表达图式。RT-PCR和原位杂交结果(另文发表)显示,栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* mRNA 在未受精卵、胚胎和幼虫发育各期均有表达,其中8~16细胞期的表达量最高,之后开始下降,原肠胚期达到最低,随后又逐渐升高。这可能是8~16细胞期合子基因转录启动的

结果,但随着发育的进行,储存的母源mRNA已消耗殆尽,而此时进行 *Cf-dmrt4-like* mRNA合成的细胞数量相对细胞总数的比例下降,故原肠胚期表现为 *Cf-dmrt4-like* mRNA降低。类似的表达方式也出现在青鳉中^[18]。说明 *dmrt4* 参与早期胚胎发育并在幼贝发育中发挥着一定的作用。

栉孔扇贝的 *Cf-dmrt4-like* mRNA 也在成体性腺中表达,且精巢中的表达量高于卵巢,以成熟期精巢的表达量最高,几乎是卵巢成熟期的20倍,相似的表达方式还有青鳉、日本红鳍东方鲀的 *dmrt4* 和太平洋牡蛎的 *Dml* 基因,它们在成体精巢的表达高于卵巢^[2,17-18];而小鼠 *dmrt4* mRNA 在胚胎期的两性性腺中同等水平表达^[6];相反,奥尼罗非鱼和尼罗罗非鱼的 *dmrt4* 仅在卵巢中检测到^[7,9]。这些结果表明 *dmrt4* 基因还参与动物已分化性腺的正常发育和功能维持,但在不同的物种中表现不同。

据报道 *dmrt4* 基因也在成体组织中广泛表达。栉孔扇贝的 *Cf-dmrt4-like* 基因与太平洋牡蛎的 *Dml* 基因均在两性个体的鳃和雌性外套膜、闭壳肌中表达,且在鳃和外套膜中的表达量明显高于性腺的表达量^[2]。*Dmrt4* 所体现的组织表达广泛性和性别中的差异表达现象也出现在其他物种中,奥尼罗非鱼的 *dmrt4* 在脑中表达,且雌性个体脑中的表达高于雄性^[7],青鳉 *dmrt4* 在成体脑、嗅觉系统中表达^[18],日本红鳍东方鲀的 *dmrt4* 基因在成体脾中表达^[17]。这

暗示 *dmrt4* 还参与成体组织的功能维持, 可能在鱼类的神经系统、嗅觉系统和免疫系统以及贝类的呼吸器官中发挥作用。有关 *Cf-dmrt4vlike* 在栉孔扇贝性腺、组织发育等方面的作用将在 RNAi 干扰实验中进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 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: 1-9.
- [2] Naimi A, Martinez A S, Specq M L, et al. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2009, 152: 189-196.
- [3] Shen M, Hodgkin M J. *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans* [J]. *Cell*, 1988, 54: 1019-1031.
- [4] Burtis K C, Baker B S. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNA encoding related sex-specific polypeptides [J]. *Cell*, 1989, 56: 997-1010.
- [5] Moniot B, Berta P, Scherer G, et al. Male specific expression suggests role of *dmrt1* in human sex determination [J]. *Mech Dev*, 2000, 91: 323-325.
- [6] Kim S J, Kettlewell R, Anderson R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple *doublesex*-related genes in the embryonic mouse gonad [J]. *Gene Expr Patt*, 2003, 3: 77-82.
- [7] Cao J L, Cao Z M, Wu T T. Generation of antibodies against DMRT1 and DMRT4 of *Oreochromis aurea* and analysis of their expression profile in *Oreochromis aurea* tissues [J]. *J Gen Genom*, 2007, 34 (6): 497-509.
- [8] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, et al. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330: 950-957.
- [9] Guan G J, 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*, 2000, 272: 662-666.
- [10] Kondo M, Froschaue A, Kitano A, et al. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Gene*, 2002, 295: 213-222.
- [11] Veith A M, Froschauer A, Korting C, et al. Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dmY/dmrt1Y* is not the master sex-determining gene in the platyfish [J]. *Gene*, 2003, 317: 59-66.
- [12] Anand A, Patel M, Lalremruata A, et al. Multiple alternative splicing of *Dmrt1* during gonadogenesis in Indian mugger, a species exhibiting temperature-dependent sex determination [J]. *Gene*, 2008, 425: 56-63.
- [13] Shibata K K, Takase M, Nakamura M. The *Dmrt1* expression in sex-reversed gonads of amphibians [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 127: 232-241.
- [14] 彭巧玲, 程子华, 蒲友光, 等. 赤子爱胜蚓 5 个 *Dmrt* 基因的序列分析 [J]. *激光生物学报*, 2005, 14 (5): 343-347.
- [15] 于非非, 周莉, 王梅芳, 等. 马氏珠母贝 (*Pinctada matensii*) 3 个 DM 结构域的克隆及序列分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (5): 905-906.
- [16] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, 417: 559-563.
- [17] Yamaguchi A, Fujimoto H, Lee K 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*, 2006, 140: 59-68.
- [18] 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: 997-1005.
- [19] Huang X, Hong C S, O' Donnell M, et al. The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 11349-11354.
- [20] 杨凤影, 张弼. 不同地理种群栉孔扇贝营养成分的比较分析 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37 (9): 4073-4075.
- [21] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 518-531.
- [22] Volf J N, Zarkower D, Bardwell V J, et al. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans [J]. *J Mol Evol*, 2003, 57 (Suppl 1): 241-249.
- [23] 季代丽, 李洁, 刘先英, 等. 黑斑蛙 *Dmrt4* 基因的克隆测序

- [J]. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2004 (3): 322–325.
- [24] Ying M, Chen B, Tian Y H, et al. Nuclear import of human sexual regulator *DMRT1* is mediated by importin- β [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2007, 1773: 804–813.
- [25] Zhang L, Hua Z C, Ren J G, et al. The nuclear localization signal of zebra fish terra is located within the DM domain [J]. *FEBS Lett*, 2001, 503: 25–29.

Cloning, characterization and expression analysis of *Cf-dmrt4-like* gene in *Chlamys farreri*

FENG Zhengfu^{1,2}, SHAO Mingyu¹, SUN Dapeng³, ZHANG Zhifeng¹

(1. Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266103, China; 3. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China)

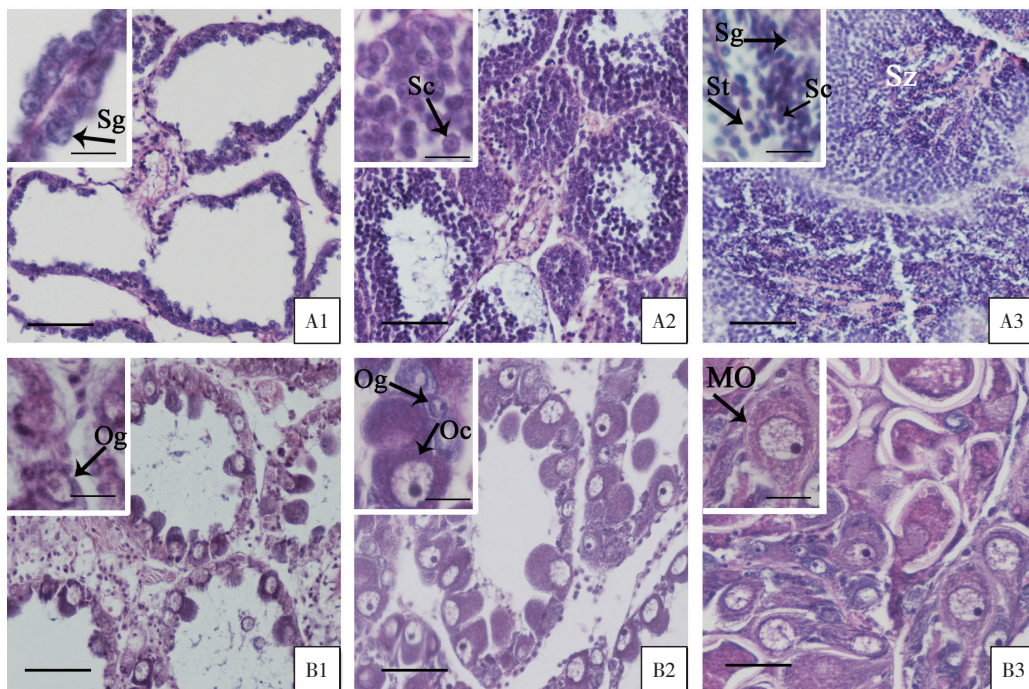
Abstract: The *dmrt* genes encode a large family of transcription factors involved in sex determination, gonad differentiation, and organ formation during early development. The genes were first found in *dsx* of *Drosophila melanogaster* and *mab-3* of *Caenorhabditis elegans*, and contain DM domain, a conservative DNA binding motif. In the present study, a complete cDNA of *dmrt* gene was cloned from testis of *Chlamys farreri* by using degenerate PCR and Rapid Amplification of cDNA End(RACE) methods. The full-length of *dmrt* cDNA is 2 312 bp, containing a 3' untranslated region (UTR) of 1 023 bp, a 5' UTR of 179 bp, and an open reading frame (ORF) of 1 110 bp which encodes a peptide of 369 amino acids. The putative amino acid sequence shares the DM domain which is common to DMRT family. Phylogenetic tree revealed that the DMRT was clustered with DMRT4, and was most closely related to DMRT4. Therefore, it was named *Cf-dmrt4-like* gene. *Cf-dmrt4-like* mRNA was detected by RT-PCR in the developmental stages from fertilized eggs to creeping larva, during which high level expression occurred at cleavage embryo stage. The *Cf-dmrt4-like* gene was also expressed in gill and testis of adult male, as well as in mantle, gill, kidney and adductor muscle of adult female, but not in ovary. The result of qRT-PCR during developmental cycles of both sexual gonads showed high expression of *Cf-dmrt4-like* gene in testis of mature stage. It could be concluded that *Cf-dmrt4-like* gene might be involved in early development of *C. farreri*, and takes on different functions in tissues and gonad development of both male and female. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17 (5): 930–940]

Key words: *Chlamys farreri*; *dmrt* gene; full-length cDNA; sequence characterization; tissue expression

Corresponding author: ZHANG Zhifeng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

冯政夫等：栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、序列特征及表达分析

FENG Zhengfu et al: Cloning, characterization and expression analysis of *Cf-dmrt4-like* gene in *Chlamys farreri*



图版 I 栉孔扇贝不同发育时期性腺的组织学观察

A: 精巢; B: 卵巢; A1、B1: 增殖期; A2、B2: 生长期; A3、B3: 成熟期; MO: 成熟卵; Oc: 卵母细胞; Og: 卵原细胞; Sc: 精母细胞; Sg: 精原细胞; St: 精细胞; Sz: 精子; 标尺=25 μm .

Plate I Histological observation on gonads of *Chlamys farreri* in different developmental phases

A: testis; B: ovary; A1, B1: proliferative stage; A2, B2: growing stage; A3, B3: mature stage; MO: mature ovum; Oc: oocyte; Og: oogonium; Sc: spermatocyte; Sg: spermatogonium; St: spermatid; Sz: sperm; scale bar=25 μm .