

DOI: 10.12264/JFSC2021-0110

大口黑鲈 *MsDmrt3* 的基因结构、系统进化及时空表达

生锡绘^{1,2}, 董浚键², 孙成飞², 李武辉², 胡婕², 田园园², 高风英^{2,3}, 闫宁宁², 杨超^{2,3}, 卢迈新^{1,2,3}, 陈刚¹, 叶星^{1,2,3}

1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;
2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 基于大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)全长转录组数据, 克隆测序获得大口黑鲈 *MsDmrt3*cDNA 序列, 其开放阅读框为 1245 bp, 共编码 474 个氨基酸, 含有高保守的 DM 结构域和 DMA 结构域, 且 DM 结构域有 2 个保守的锌指样结合位点。蛋白三维预测结构与人类(*Homo sapiens*)和青鳉(*Oryzias latipes*)的 DMRT3 相似。结合大口黑鲈基因组数据分析显示, *MsDmrt3* 位于基因组 7 号染色体上, 基因序列长 3353 bp, 由 2 个外显子与 1 个内含子组成。进化树聚类分析显示, *MsDMRT3* 属于 DMRT3 家族, 且可能与低等节肢动物 *Dmrt93B* 起源于共同的原始 DMRT。对大口黑鲈 14 种组织以及 8 个发育时期的 *MsDmrt3* 基因的表达情况进行定量分析, 结果显示 *MsDmrt3* 基因在成熟个体的脊髓中高表达, 精巢和眼次之, 但在卵巢和肝脏几乎不表达; *MsDmrt3* 在各发育时期均有表达, 在 6 dpf 前呈逐渐上调趋势, 之后逐渐下调至最低水平。本研究表明, *MsDmrt3* 基因序列与结构具有高保守性, 且具有显著的性别表达二态性, 推测其与性别决定和分化有关。同时, 根据 *MsDmrt3* 基因在脊椎和胚胎发育早期的高表达, 推测其可能在神经系统和胚胎早期生长发育中发挥作用。本研究旨在为大口黑鲈性别决定与性别分化分子机制的深入研究奠定基础。

关键词: 大口黑鲈; *MsDmrt3* 基因; 基因结构; 系统进化分析; 时空表达

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1406-11

DMRT (doublesex and Mab-3 related transcription factor)是指与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的性别决定基因 *Dsx* (doublesex)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的性别决定基因 *Mab-3* (maleabnormal-3)同源的基因^[1-3]。近年来, 从无脊椎动物到脊椎动物, 包括珊瑚、线虫、果蝇、青蛙、鱼类、鸟类和哺乳类等, 鉴定了大量 DMRT 家族基因, 并部分证实其与性别分化有关^[4]。该家族成员与 *Dsx*、*Mab-3* 具有共同的特征, 它们所编码的氨基酸多肽链几乎都包含一个具有

DNA 结合能力的保守基序, 称为 DM 结构域 (doublesex and mab-3 domain)^[5]。该结构域由 6 个保守的半胱氨酸和 2 个组氨酸(位点 1, CCHC 和位点 2, HCCC)组成, 这 2 个位点形成了 2 个高度缠绕的锌指样的 DNA 结合区, 能与 DNA 的小凹槽互相结合, 该结构域在不同进化类型的生物中具有高保守性^[3,6]。

目前 DMRT 家族成员除了来自果蝇的 *Dsx* 基因和来自秀丽隐杆线虫的 *Mab* 基因外, 还有 9 个 *Dmrt* 基因(*Dmrt1*~8, *Dmrt2b*)^[7]。*Dmrt* 基因家族广

收稿日期: 2021-03-22; 修订日期: 2021-05-07.

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 广东省重点领域研发计划项目(2021B020202000); 中国水产科学研究院鳊鲈基因组学与选择技术创新团队专项(2020TD23); 中国水产科学研究院珠江水产研究所鳊鲈基因组学与选择技术创新团队专项(2020ZJTD-02).

作者简介: 生锡绘(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖学. E-mail: 17817899107@163.com

通信作者: 叶星, 研究员, 研究方向为水产遗传育种. E-mail: gzyexing@163.com

陈刚, 教授, 研究方向为鱼类种子工程与健康养殖. E-mail: cheng@gdou.edu.cn

泛参与动物的性别发育过程, 另外该家族成员也参与体节分化等过程^[8-10]。*Dmrt1* 基因在脊椎动物的性别分化和精巢发育中起着重要的作用^[11]。*Dmrt3* 基因属于 DMRTA 亚族, 哺乳动物 *Dmrt3* 在睾丸中高表达, 卵巢中无表达, 可能和睾丸分化和发育相关^[12]。DMRT3 还在小鼠(*Mus musculus*)的许多非性腺组织包括胚胎期的前脑和嗅觉基板及脊髓神经元中表达, 可能参与神经元的特化^[13-15]。鱼类 DMRT3 在精巢与神经系统均有较高表达, 推测其在神经和生殖细胞等的发育过程发挥作用^[16-18]。

鱼类 *Dmrt* 基因最早在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) 2 种鱼类中发现^[19-22], 现已在超过 30 种鱼类中鉴定出 *Dmrt* 家族基因。在鱼类中已发现 7 个 *Dmrt* 基因, 包括 *Dmrt1-6*, *Dmrt2b*。相对于 *Dmrt1* 基因, 鱼类 *Dmrt3* 基因的研究相对较少。但已有的研究显示, 鱼类 *Dmrt3* 基因的表达不仅与性别发育有关还与神经系统和感官发育有关。在青鳉(*Oryzias latipes*)背侧神经元中发现有 *Dmrt3* 的表达^[9], 在斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎发育时期的嗅基板和神经管中也发现有 *Dmrt3* 的高表达, 推测 *Dmrt3* 与鱼类脊髓发生与嗅神经发育有关^[17]; 孵化后 40 d 的红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)的精巢 *Dmrt3* 的表达量高于卵巢^[23]; 半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Dmrt3* 基因在精巢、卵巢、脑与垂体等 7 个组织中都有表达, 但精巢的相对表达量远高于卵巢等其他组织^[18]; 青鳉成体精巢中也有 *Dmrt3* 的高表达^[9]; 鲫(*Carassius auratus*)成鱼组织中, *Dmrt3* 基因只在精巢表达^[22]。上述研究结果提示 *Dmrt3* 基因在鱼类早期性别分化、雄性性腺发育与精子发生过程中也具有重要作用。

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈, 隶属于鲈形目(Perciformes)、太阳鱼科(Centrarchidae)、黑鲈属(*Micropterus*)。它自然分布于美国中部、东部至墨西哥北部的淡水流域, 是北美最重要的游钓鱼类之一^[24-25]。中国于 20 世纪 80 年代引进, 由于其肉质鲜嫩、无肌间刺、广温性、生长快及易捕捞等优点, 已成为中国重要的淡水养殖种之一。关于大口黑鲈的性别控制与性别决定的

相关研究较少, 也未见有大口黑鲈 *Dmrt3* 基因的相关研究报道。本研究团队前期开展大口黑鲈 *Dmrt1* 基因的研究, 证实了该基因在大口黑鲈中的性别二态性表达^[26]; 同时本团队完成了大口黑鲈基因组图谱构建, 开展了大口黑鲈等鱼类 *Dmrt* 家族的比较基因组学分析^[24,27]; 并且在大口黑鲈性腺转录组数据中发现 *MsDmrt3* 基因在雌雄个体中的表达具有显著差异。本研究进一步克隆了 *MsDmrt3* 基因的 cDNA 与基因组 DNA 序列结构, 分析 *MsDMRT3* 蛋白的二级和三维结构、结构保守性及与其他 DMRT 家族成员的系统进化关系。通过荧光定量分析其在性成熟雌雄鱼不同组织的分布及不同发育时期的表达情况, 为大口黑鲈性别决定与性别分化分子机制的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用鱼取自广东佛山市南海养殖场。实验鱼从鱼塘捕获后直接用活水车(持续供给纯氧)运回实验室, 在室内水泥池中暂养 30 d, 持续充气, 水温 26 °C。

解剖取样前使用 MS-222 将鱼麻醉。分别采集性成熟的个体肌肉、肝、脾、肾、鳃、肠、心脏、眼、精巢、卵巢、大脑、小脑、脊髓与延脑共 14 个不同组织, 保存于 RNA later 中, 用于检测基因的组织表达。根据胚胎发育不同时期, 取 4 细胞期、4 hpf (受精后小时数, hour-postfertilization)、11 hpf、20 hpf、37 hpf、6 dpf (受精后天数, day-postfertilization)、18 dpf、27 dpf 的鱼卵或仔鱼, 保存于 RNA later 中, 样品在 RNA later 中 4 °C 保存 24 h 后, 转入 -20 °C 保存, 用于 RNA 提取。同时取鳍条样品保存于无水乙醇中, 用于基因组 DNA 的提取。

1.2 基因组 DNA、总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

将上述保存在无水乙醇中的鳍条使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根), 按照说明进行基因组 DNA 的提取。

取上述成鱼不同组织及不同时期胚胎和幼鱼各 50 mg, 按照 TRIzol (Invitrogen, 美国)的

操作指南抽提总 RNA。简要步骤如下: 在 TRIzol 液中研磨后, 加入氯仿充分摇匀萃取离心, 取上层水相加入异丙醇离心沉淀 RNA。经过 75%乙醇洗涤沉淀, 最后将 RNA 沉淀溶解于 30~60 μL 的 DEPC 处理水中, 溶解后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测所提取 RNA 的质量。多功能酶标仪 Biotek Cytation5 (BioTek, 美国)检测所提取的 RNA 浓度和纯度。

cDNA 合成使用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(Roche, 瑞士)。具体步骤参考说明书。反应体系与反应条件如下: 20 μL 体系中, 组织总 RNA 1 μg , Oligo dT 1 μL , 加入 RNase Free H_2O 至 13 μL , 65 $^\circ\text{C}$ 10 min; 加入 5 \times Reaction buffer 4 μL , RNase Inhibitor 0.5 μL , dNTP Mix (10 mmol/L) 2 μL , Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/ μL) 0.5 μL , 25 $^\circ\text{C}$ 10 min, 55 $^\circ\text{C}$ 30 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 min。cDNA 于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存。cDNA 合成后, 以 β -actin 为内参对照基因, 使用引物为 q β -actin F/R^[28](表 1), 对上述反转录获得的 cDNA 进行扩增检测。

1.3 *MsDmrt3* 基因克隆、结构分析及系统进化分析

根据本团队前期通过 PacBio 单分子实时测序与 Hi-C 技术获得的大口黑鲈基因组和全长转录组数据, 设计引物 gD3 F/R 和 cD3 F/R (表 1)。以上述大口黑鲈基因组 DNA、精巢 cDNA 为模板, PCR 扩增获得候选目的片段并测序。

采用综合分析软件 InterPro 和 DNAMAN 分析 *MsDmrt3* 氨基酸保守结构域及二级结构。由于 *MsDMRT3* 蛋白采用 SWISS-MODEL 同源建模的一致度较低, 因此选用 I-TASSER 软件穿线法预

测 *MsDMRT3*、*O/DMRT3* 和 *HsDMRT3* 的蛋白三维结构。 C 为质量评估系数($C=-5\sim 2$), 值越高则模型可信度越高。采用 Swiss-PdbViewer 4.1.0 软件对预测 3D 模型进行编辑。

通过 NCBI 和 Ensembl 数据库检索不同物种 DMRT3 蛋白序列, 数据库中没有基因组的物种, 以青鳉和小鼠 DMRT3 氨基酸序列为参考序列, 通过本地 tBLASTn ($E<1\times 10^{-5}$, alignment rate >0.6) 检索相关基因组数据库, 共获得包括高等脊椎动物(哺乳类、鸟类、爬行类和两栖类)在内的 6 个物种的 DMRT3 蛋白序列, 以及鱼类 9 个总目[鲈形总目(Percomorpha)、银汉鱼总目(Atherinomorpha)、副棘鳍总目(Paracanthopterygii)、原棘鳍总目(Protacanthopterygii)、骨鳔总目(Ostariophysi)、海鲢总目(Elopomorpha)、骨舌总目(Osteoglossomorpha)、全骨总目(Holostei)和腔棘鱼总目(Coelacanthiformes)]共 17 种鱼的 DMRT3 蛋白序列。MEGA7.0 软件构建系统进化树, 采用邻接法计算, 1000 次重复计算自展分析值。

将高等脊椎动物 DMRTs 家族序列(DMRT1~8)、低等节肢动物[果蝇(*Drosophila melanogaster*)、大型蚤(*Daphnia magna*)、天鹅绒虫(*Euperipatoides kanangrensis*)]的 DMRTs 家族序列(Dsx、Dmrt12E、Dmrt93B 和 Dmrt99B), 与大口黑鲈 *MsDMRT3* 序列构建系统进化树, 分析 *MsDMRT3* 的起源和进化。各物种氨基酸序列用 MAFFT v7.273 软件比对和对齐后; 采用 Gblocks 软件获取保守序列片段; 采用 ModelFinder 软件进行 AIC 算法蛋白质替代模型选择分析, 确定“JTT-G4”为最佳模型; 用

表 1 本研究中使用的引物
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名 primer name	序列(5'-3') sequences 5'-3'	用途 purpose	片段/bp size
cD3 F	CACCTCTTATCCTCATCCTGTC	<i>MsDmrt3</i> cDNA 扩增	1594
cD3 R	CAGTCCATCACCAGCATCTAT	<i>MsDmrt3</i> cDNA amplification	
gD3 F	GGATCCTCCAACACCTCTTATC	<i>MsDmrt3</i> gDNA 扩增	3353
gD3 R	CAGTCCATCACCAGCATCTAT	<i>MsDmrt3</i> gDNA amplification	
qD3 F	GCCGAGAGTCCCTCAGAAGTA	<i>MsDmrt3</i> qRT-PCR	92
qD3 R	AGGCTAAAGGGCAGATTGATG		
q β -actin F	GTATTGTCATGGACTCTGGTG	qRT-PCR 内参	182
q β -actin R	ACGTACGATTCACGCTCAGC		

MrBayes v3.2.6 软件构建系统进化树(Ngen: 1000000 generations; Samplefreq: 100)。

1.4 大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因的表达分析

使用 PrimerPremier5 软件设计 qRT-PCR 定量扩增 *MsDmrt3* 基因的引物 qD3 F/R(表 1)。*β-actin* 作为内参对照基因, 使用引物为 q β -actin F/R(表 1)^[28]。以上述提取的 RNA 反转录制备的 cDNA 为模板, 包括大口黑鲈成鱼 14 个不同组织(即肌肉、肝、脾、肾、鳃、肠、心脏、眼、精巢、卵巢、大脑、小脑、脊髓、延脑)以及胚胎 8 个不同发育时期(4 细胞期、14 hpf、11 hpf、20 hpf、37 hpf、6 dpf、18 dpf、27 dpf), 样品重复数为每组 4 个, 使用 LightCycler96 qPCR 荧光定量仪(Roche, 瑞士)进行荧光定量 PCR。操作时尽量避免光并在冰上进行。反应体系为: 模板 1 μ L, 2 \times RealStar Green Fast Mixture 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L, RNase H₂O 7.4 μ L, 共 20 μ L。反应条件为: 预变性: 50 $^{\circ}$ C 120 s, 95 $^{\circ}$ C 120 s; 3 步法扩增: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次; 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。熔解曲线分析使用 LC96 软件进行, 目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法。所有数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 采用 SPSS 软件的单因素方差分析进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 大口黑鲈 *MsDmrt3* 序列结构分析

以大口黑鲈肝脏 cDNA 为模板, PCR 扩增得到 *MsDmrt3* cDNA 序列(GenBank 登录号: MW559076), 其 ORF 为 1425 bp。以大口黑鲈基因组 DNA 为模板, 扩增获得长为 3173 bp 的 *MsDmrt3* 的基因组序列(MW559068)。通过 *MsDmrt3* 的 ORF 与基因组序列比对发现, *MsDmrt3* 由 2 个外显子和 1 个内含子组成(图 1A)。对包括大口黑鲈在内的 23 个物种进行分析, 发现除了大西洋鲑(*Salmo salar*)和日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)具有 2 个 *Dmrt3* 外, 其他脊椎动物均只有 1 个 *Dmrt3* 基因; 大部分物种 *Dmrt3* 有 2 个外显子, 只有三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)和大西洋鲑的其中 1 个亚型分别为 5 个和 1 个外显子(表 2)。

BioEdit 和 InterPro 序列结构分析显示,

MsDMRT3 具有 1 个保守的 DM 结构域(DM DNA-binding domain)和 1 个保守的 DMA 结构域(DMRTA motif), 其中 DM 结构域由 2 个保守的锌结合位点组成(Site I: CCHC; Site II: HCCC), 且每一个锌结合位点都由 3 个保守的半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基构成(图 1B); 此外, 位于 *MsDMRT3* 蛋白 C 端的 DMA 结构域, 是大部分物种的 DMRT3 和 DMRT4 蛋白特有的保守结构域。采用 I-TASSER 软件对人(*Homo sapiens*) *HsDMRT3*、青鳉 *Oidmrt3* 和 *MsDMRT3* 进行 3D 结构预测, *MsDMRT3* 的蛋白 3D 结构与 *HsDMRT3* 和 *Oidmrt3* 很相似, 模型预测的质量系数 *C* 达 -0.49, 也与 *HsDMRT3* 和 *Oidmrt3* 的 *C* 值接近(图 1C)。

2.2 大口黑鲈 *MsDMRT3* 系统进化分析

脊椎动物 DMRT3 的系统进化树结果显示, 进化树聚类为 2 大分支, 以大西洋鲑 DMRT3 为分界, 较高等的鱼类, 包括骨鳔总目、原棘鳍总目、银汉鱼总目和鲈形总目的鱼类 DMRT3 聚为一大支; 而较低等的鱼类, 包括海鲢总目、骨舌总目、全骨总目和腔棘鱼总目的鱼类 DMRT3 和高等脊椎动物(哺乳类、鸟类、爬行类和两栖类)DMRT3 聚为一大支(图 2)。

研究发现, 两侧对称动物的原始祖先只有 3 种 *Dmrt* 基因, 包括 *Dmrt2a/2b*、*Dmrt4/5* 和 *Dmrt93B*, 没有 *Dmrt3*。直到进化到先后口动物(deuterostomia, 脊椎动物的共同祖先)才开始出现 *Dmrt3*, 而另一进化分支原口动物(protostomia, 节肢动物的祖先)则没有出现 *Dmrt3*^[29]。因此, 为进一步了解 DMRT3 与 DMRT 其他家族成员的进化起源关系, 以海葵(*Nematostella vectensis*)的 DMRTA 作为外群, 构建大口黑鲈 *MsDMRT3* 与脊椎动物和节肢动物 DMRT 家族系统进化树, 结果显示, 进化树聚类为 5 大分支, 分别为: (1)大口黑鲈 *MsDMRT3* 和脊椎动物的 DMRT3 与节肢动物的 *Dmrt93B* 聚为一大支; (2)脊椎动物的 DMRT1、DMRT6~8 与节肢动物的 *Dsx* 聚为一大支; (3)脊椎动物的 DMRT4 独立一大支; (4)脊椎动物的 DMRT5 与节肢动物的 *Dmrt99B* 聚为一大支; (5)脊椎动物的 DMRT2 与节肢动物的 *Dmrt11E* 聚为一大支(图 3)。

2.3 大口黑鲈 *MsDmrt3* 组织和胚胎发育表达分析

Q-PCR 分析结果显示, 在所检测的大口黑鲈 14 种组织中, *MsDmrt3* 在脊髓中表达水平最高, 是精巢表达量的 1.89 倍; 精巢和眼的表达水平也较高, 其他组织(肾>心脏>小脑>脾>肌肉>鳃>延脑>肠>大脑)也有一定表达, 以卵巢和肝中的表达量最低(图 4B)。其中, 雌雄性腺的表达具有显著的性别二态性表达, 精巢表达量是卵巢的 45.72 倍; *MsDmrt3* 在雌雄性腺中的差异表达在性

腺转录组数据中也有相同的结果(图 4A)。*MsDmrt3* 在神经系统的 4 个组织中均有表达, 以脊髓的表达量最高, 而其他 3 个神经组织(大脑、小脑和延脑)则均为中低水平表达(图 4B)。

胚胎发育不同时期的 Q-PCR 分析显示, 在胚胎发育 4 细胞期开始检测到 *MsDmrt3* 的表达, 在之后 8 个时期均有表达。随着发育的进行, *MsDmrt3* 表达量逐渐升高, 于 6 dpf 达到最高值, 后逐渐下降, 在 27 dpf 回调到 4 细胞期时的表达水平。

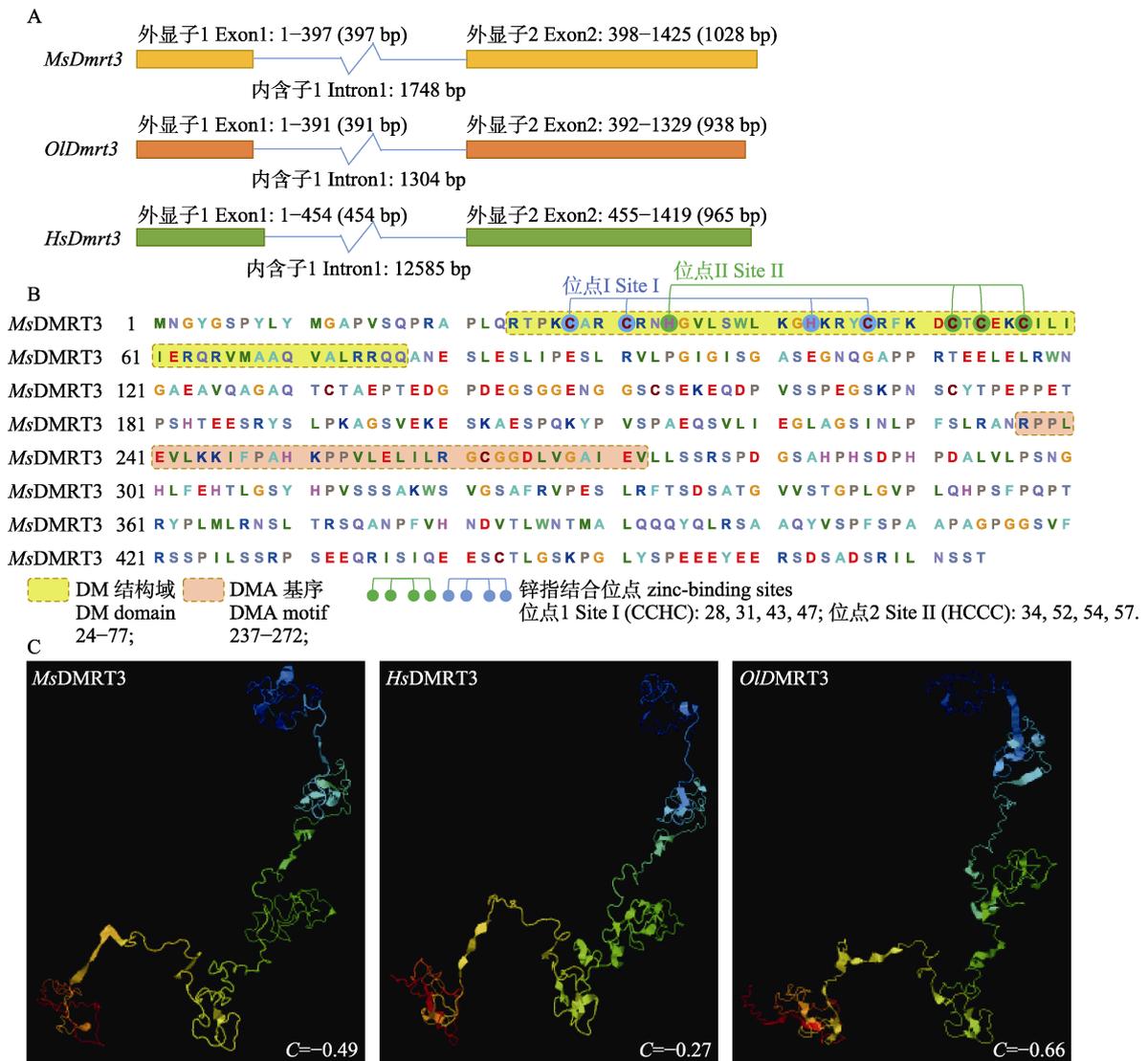


图 1 大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因和蛋白结构分析

A. 大口黑鲈与青鲈和人的 *Dmrt3* 基因结构比较; B. *MsDMRT3* 保守结构域和位点分析.

C. *MsDMRT3*、人 *HsDMRT3* 和青鲈 *OIdMRT3* 蛋白三级结构预测模型, *C* 为质量评估系数($-5 < C < 2$).

Fig. 1 Schematic representation of the *Micropterus salmoides Dmrt3* gene and protein structure

A. Genomic organizations of *MsDmrt3* along with *OIdmrt3* and *HsDmrt3* gene. B. Analysis of conserved domains and sites in *MsDMRT3*.

C. The predicted 3D structures of *MsDMRT3*, *HsDMRT3* and *OIdMRT3*. *C* means quality assessment factor ($-5 < C < 2$).

表 2 鱼类和高等脊椎动物 *Dmrt3* 基因的结构特征比较
 Tab. 2 Comparisons of the *Dmrt3* gene structures in fish and higher vertebrates

总目 superorder	种 species	基因数 gene number	外显子数量 Exon number	基因号 accession No.
哺乳类 mammal	人 <i>Homo sapiens</i>	1	2	NM_021240.4
	小鼠 <i>Mus musculus</i>	1	2	NM_177360.3
鸟类 bird	鸡 <i>Gallus gallus</i>	1	2	ENSGALG00000010161
爬行类 reptilia	蜥蜴 <i>Anolis carolinensis</i>	1	2	XM_003216487.2
两栖类 amphibia	爪蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	1	2	NM_001256220.2
鲈形总目 Percomorpha	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	1	2	MW559067
	尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	1	2	XM_018668307.1
	欧洲鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	1	2	-
	红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	1	2	ENSTRUG00000015692
	半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	1	2	ENSCSEG00000019346
	三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	1	5	ENSGACG00000014511
	青鳞 <i>Oryzias latipes</i>	1	2	XM_023958132.1
银汉鱼总目 Atherinomorpha	剑尾鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	1	2	ENSXMAG00000015600
	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	2	2/1	XM_014143609.1/XM_014172770.1
原棘鳍总目 Protacanthopterygii	大西洋鳕 <i>Gadus morhua</i>	1	2	XM_030359568.1
副棘鳍总目 Paracanthopterygii	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	1	2	XM_017452551.1
	电鳗 <i>Electrophorus electricus</i>	1	2	XM_027029072.1
骨鳔总目 Ostariophysi	大西洋鲱 <i>Clupea harengus</i>	1	2	XM_012828602.1
鲱形总目 Clupeomorpha	日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	2	2/2	-/-
海鲢总目 Elopomorpha	亚洲龙鱼 <i>Scleropages formosus</i>	1	2	XM_029259610.1
骨舌总目 Osteoglossomorpha	斑点雀鲷 <i>Lepisosteus oculatus</i>	1	2	ENSLOCG00000011480
全骨总目 Holostei	腔棘鱼 <i>Latimeria chalumnae</i>	1	2	XM_006001196.1
腔棘总目 Coelacanthiformes				

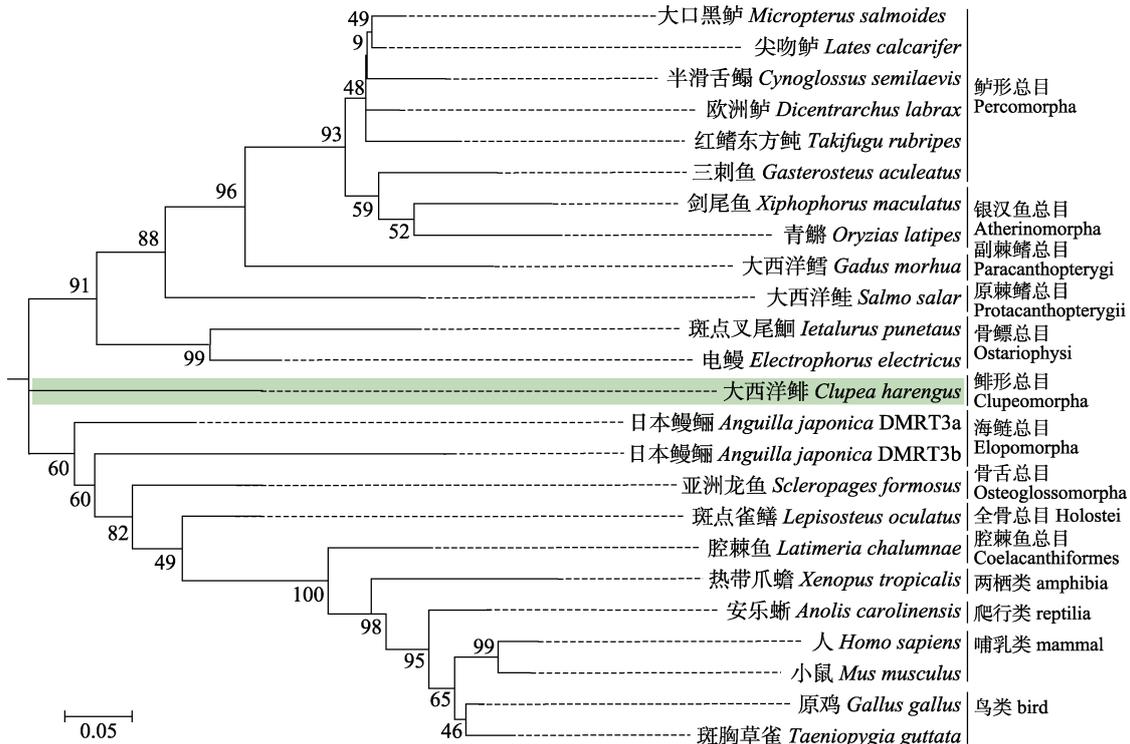


图 2 脊椎动物 DMRT3 的系统进化树分析

图示为 *MsDMRT3* 与各物种对应的 *DMRT3* 氨基酸序列系统进化树分析, GenBank 登录号详见表 1.

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the *DMRT3* in vertebrates

The figure summarizes the phylogenetic analysis of *MsDMRT3* and the amino acid sequences of other species *Dmrt3*. GenBank accession Nos. are shown in Tab. 1.

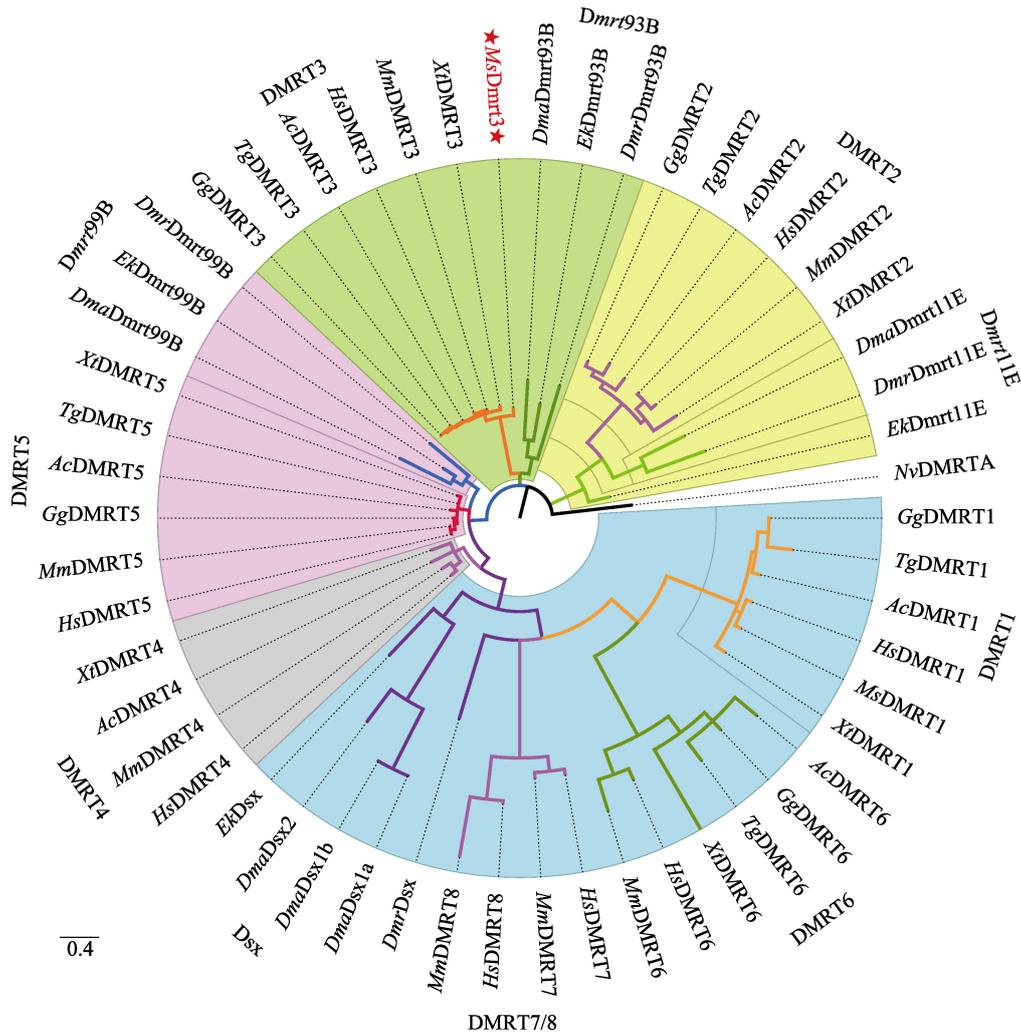


图 3 大口黑鲈 *MsDMRT3*(★)与脊椎动物和节肢动物 DMRT 家族系统进化树分析
Hs 为人, *Mm* 为小鼠, *Gg* 为鸡, *Tg* 为斑胸草雀, *Ac* 为蜥蜴, *Xt* 为非洲爪蟾, *Ms* 为大口黑鲈, *Dmr* 为果蝇,
Dma 为大型蚤, *Ek* 为天鹅绒虫, *Nv* 为海葵.

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *MsDMRT3* (★) and the DMRT family in vertebrates and arthropods
Hs: *Homo sapiens*; *Mm*: *Mus musculus*; *Gg*: *Gallus gallus*; *Tg*: *T. guttata*; *Ac*: *Anolis carolinensis*; *Xt*: *Xenopus tropicalis*; *Ms*: *Micropterus salmoides*; *Dmr*: *Drosophila melanogaster*; *Dma*: *Daphnia magna*;
Ek: *Euperipatoides kanangrensis*; *Nv*: *Nematostella vectensis*.

MsDmrt3 在 6 dpf 最高峰时的表达量是最低表达量时期(27 dpf)的 12.63 倍(图 4C)。

3 讨论

3.1 大口黑鲈 *MsDMRT3* 的序列、蛋白结构及系统进化分析

本研究克隆获得了大口黑鲈 *MsDmrt3* cDNA 序列和基因组序列。*MsDMRT3* 具有 DMRT3 家族蛋白的典型结构: 一个保守的 DM 结构域以及一个位于 C 端的保守的 DMA 结构域。其中 DM 结构域由 2 个保守的锌结合位点组成(Site I: CCHC;

Site II: HCCC), 且每一个锌结合位点都由 3 个半胱氨酸残基和 1 个组氨酸残基构成。DM 结构域是 DMRT 家族共有的结构, DMA 结构域是 DMRT3 和 DMRT4 的共有结构, 同属于 DMA 亚族, 在功能上存在一定的相似性。DM 结构域在不同进化类型的生物中具有相当高的保守性, 这两个锌结合位点可形成两个高度缠绕的指型结构, 分别整合一个锌离子, 并能够与 DNA 的小凹槽互相结合, 通过调节目的基因转录参与发育调节过程^[3,30]。

根据 DMRT3 序列构建的系统进化树上, 较

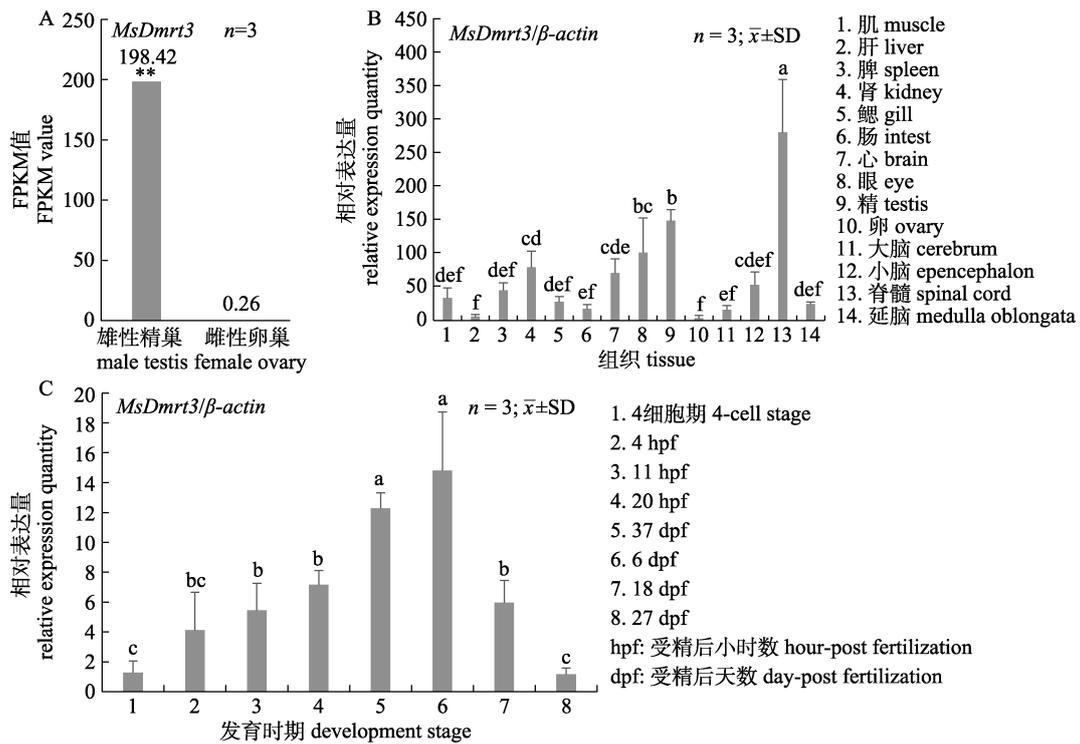


图 4 不同组织和胚胎发育不同时期大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因的表达

A. 大口黑鲈 *MsDmrt3* 在雌雄性腺转录组中的表达; FPKM 值表示转录组数据中每万个碱基的转录每百万映射读取的片段数, 用于衡量基因在转录组中相对表达量; **表示 $P < 0.01$; B. 大口黑鲈 *MsDmrt3* 在 14 种组织中的相对表达量; C. 大口黑鲈 *MsDmrt3* 在胚胎发育过程中的相对表达量; B 和 C 中相同字母间表示无显著性差异, 不同字母间表示有显著性差异, $P < 0.05$.

Fig. 4 Temporal-spatial expression of *Micropterus salmoides Dmrt3*

A. The expression of *MsDmrt3* in testis and ovary; FPKM means fragments per kilobase per million. ** means $P < 0.01$. B. Tissue specific expression of *MsDmrt3* in 14 tissues. C. Relative expression of *MsDmrt3* during embryonic development.

高等的鱼类 DMRT3 聚为一大支; 而较低等的鱼类 DMRT3 和高等脊椎动物 DMRT3 聚为另一大支 (图 2)。海鲢总目、骨舌总目、全骨总目和腔棘鱼总目是相对原始鱼类, 如亚洲龙鱼所属的骨舌总目鱼类, 有“活化石”之称, 是世界上最古老而又名贵的鱼类之一^[31]; 斑点雀鳝所属的全骨总目是在硬骨鱼特异的基因组倍化 TGD 事件 (teleost genome duplication) 之前与硬骨鱼类分歧进化的, 未受到 TGD 事件的影响。全骨总目鱼类进化比较缓慢, 其染色体和 450 万年前的四足动物仍保持着保守性^[32]。腔棘鱼所属的腔棘鱼总目属于肉鳍鱼类 (Sarcopterygii), 肉鳍鱼类与辐鳍鱼类 (Actinopterygii) 是鱼类中两个相对独立的进化分支, 肉鳍鱼类是鱼类自身进化的一个旁支, 从肉鳍鱼类进化出更高等的四足类脊椎动物 (Tetrapods)^[33]。因此这 5 个总目鱼类 DMRT3 可能保留了原始脊椎动物 DMRT3 的保守性。而鲈形总目、银汉鱼总目、原

棘鳍总目和骨鳔总目较高等的鱼类 DMRT3 则独立地聚为一大支, 说明在鱼类进化过程中, DMRT3 可能在保留原始 DMRT3 结构功能的前提下, 独立进化出鱼类 DMRT3 特有的部分序列保守结构。

大口黑鲈 *MsDMRT3* 与脊椎动物和节肢动物 DMRT 家族系统进化树聚类为 5 大分支, 大口黑鲈 *MsDMRT3* 和脊椎动物的 DMRT3 与节肢动物的 *Dmrt93B* 聚为一大支 (图 3)。Kondo 等^[34]对 4 种鱼类和人之间的 *Dmrt1-4* 基因进行共线性分析, 证实 *Dmrt1*、*Dmrt2* 和 *Dmrt3* 及周围的基因形成的基因簇在人和鱼之间在进化上有保守共线性。Mawaribuchi 等^[29]开展动物 DMRT 家族分化和独立进化分析, 通过进化树和共线性分析, 推测两侧对称动物 (bilateria) 的共同祖先只有 3 种 *dmrt* 基因 (*Dmrt2/2b*、*Dmrt4/5* 和 *Dmrt93B*), 而在进化到脊椎动物的共同祖先后口动物 (deuterostomia) 才开始出现 *Dmrt3*, 而节肢动物的祖先原口动物

(protostomia)则没有出现 *Dmrt3*; 后口动物在不断的进化过程中经历了 3 轮 WGD 事件(whole genome duplications), *Dmrt93B* 则在这个进化过程中丢失。因此, 结合 *MsDMRT3* 与 DMRT 家族系统进化树结果, 本研究推测包括大口黑鲈 *MsDmrt3* 的脊椎动物 *DMRT3* 与节肢动物的 *Dmrt93B* 可能起源于共同的原始 *Dmrt* 基因。

3.2 大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因的时空表达分析

在脊椎动物小鼠和鸡的胚胎发育过程中, *Dmrt3* 基因主要在前脑、神经管和嗅基板中表达, *Dmrt3* 还在鸡的尾部体节中表达, 随后在泌尿生殖道的穆勒管中表达^[13]。Winkler 等^[9]发现 *OIDmrt3* 基因在青鳉幼鱼的背侧神经元中表达。Li 等^[17]发现 *DMRT3* 在斑马鱼的嗅基板和神经管特异性表达, 推测斑马鱼 *DMRT3* 可能作为一个潜在的转录因子在细胞核中发挥作用, 并在嗅基板、神经管和生殖细胞的发育中发挥潜在的作用。本研究中, 大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因的组织表达分析发现, *MsDmrt3* 在脊髓中的表达量最高, 但在其他 3 个神经组织(大脑、小脑和延脑)的表达量则较低, 推测 *MsDMRT3* 可能在大口黑鲈神经系统的部分组织的功能发挥潜在的作用。

Kim 等^[14]对小鼠胚胎发育时期精巢、卵巢 *Dmrt3* 基因的表达研究显示, *DMRT3* 在精巢中表达量显著高于卵巢中的表达量($P < 0.05$), 存在性别二态性。在鱼类中, 斑马鱼^[17]、青鳉^[9]、团头鲂^[35]、半滑舌鲷^[18]和红鳍东方鲀^[23]等鱼类 *Dmrt3* 基因在性腺中的表达也存在性别二态性, 精巢中的表达量显著高于卵巢。本研究中大口黑鲈 *MsDmrt3* 在精巢中的相对表达量显著高于卵巢中的表达量, 推测 *MsDMRT3* 可能在雄性性腺发育过程中起着重要的作用。

本研究中, 大口黑鲈 *MsDmrt3* 随着胚胎发育的进行其表达水平逐渐升高, 在 6 dpf 达到最高峰, 后逐渐下调(图 4C)。Winkler 等^[9]的研究发现, 青鳉 *OIDmrt3* 在 4 dpf 表达量达到最高峰, 后逐渐下降, 但此期间雌雄胚胎及幼鱼 *OIDmrt3* 的表达无显著性差异。同样, 在其他鱼类如斑马鱼(咽胚期)^[17]、鲫(体节期)^[22]和团头鲂(6 hpf 和 40 dpf)^[35]等在胚胎发育均有一个表达高峰后逐渐降低的趋

势。因此, 推测 *Dmrt3* 基因可能在胚胎发育及幼鱼生长过程某个时期的细胞分化或组织发育起作用。

4 结论

本研究获得大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因全长 cDNA 和 gDNA 序列, 定量 PCR 显示 *Dmrt3* 基因在大口黑鲈雄性性腺中高表达, 在雌性性腺极微弱表达, 雌雄个体的表达具有显著的性别二态性表达, 同时也在神经组织脊椎中的高表达量, 推测大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因可能在神经系统中发挥作用。本研究为下一步深入开展大口黑鲈 *MsDmrt3* 基因的功能及表达调控研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Zarkower D. Establishing sexual dimorphism: Conservation amidst diversity?[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(3): 175-185.
- [2] Burtis K C, Baker B S. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides[J]. *Cell*, 1989, 56(6): 997-1010.
- [3] Zhu L, Wilken J, Phillips N B, et al. Sexual dimorphism in diverse metazoans is regulated by a novel class of intertwined zinc fingers[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(14): 1750-1764.
- [4] Hodgkin J. The remarkable ubiquity of DM domain factors as regulators of sexual phenotype: Ancestry or aptitude?[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(18): 2322-2326.
- [5] Li X X, Qin Z K, Wei M K, et al. Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(11): 1277-1284. [李茜茜, 秦贞奎, 魏茂凯, 等. 栉孔扇贝 *Dmrt1* 的分子鉴定及表达模式分析[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(11): 1277-1284.]
- [6] Erdman S E, Burtis K C. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain[J]. *The EMBO Journal*, 1993, 12(2): 527-535.
- [7] Wexler J R, Plachetzki D C, Kopp A. Pan-metazoan phylogeny of the *DMRT* gene family: A framework for functional studies[J]. *Development Genes and Evolution*, 2014, 224(3): 175-181.
- [8] De Grandi A, Calvari V, Bertini 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.
- [9] 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]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121(7-8): 997-1005.
- [10] Seo K W, Wang Y D, Kokubo H, et al. Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor *Dmrt2* reveals an essential role in somite patterning[J]. *Developmental Biology*, 2006, 290(1): 200-210.
- [11] Matson C K, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: Insights into sexual regulation, evolution and plasticity[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13(3): 163-174.
- [12] 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]. *Developmental Biology*, 2007, 310(1): 1-9.
- [13] Smith C A, Hurley T M, McClive P J, et al. Restricted expression of *DMRT3* in chicken and mouse embryos[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 119: S73-S76.
- [14] Kim S, Kettlewell 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.
- [15] Andersson L S, Larhammar M, Memic F, et al. Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice[J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 642-646.
- [16] Yamaguchi A, Lee K H, Fujimoto H, et al. Expression of the *DMRT* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1(1): 59-68.
- [17] Li Q, Zhou X, Guo Y Q, et al. Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish *Dmrt3*[J]. *Biology of the Cell*, 2008, 100(8): 453-463.
- [18] Dong X L, Chen S L, Ji X S. Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt3* gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(6): 829-835. [董晓丽, 陈松林, 季相山. 半滑舌鲷 *Dmrt3* 基因 cDNA 片段的克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 829-835.]
- [19] 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]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 272(3): 662-666.
- [20] Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, et al. *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2000, 1493(1-2): 180-187.
- [21] Song Y, Bing X W, Cao Z M, et al. *Dmrt3* methylation differences of sex gland in *Monopterus albus* gene[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(35): 126-131. [宋颖, 邴旭文, 曹哲明, 等. 黄鳝 *Dmrt3* 基因在性腺中的甲基化差异[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(35): 126-131.]
- [22] Wang J, Luo C. Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt3* in goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(3): 548-555. [王佳, 罗琛. 鲫 *Dmrt3* 基因的克隆和表达分析[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(3): 548-555.]
- [23] Yan H W, Shen X F, Cui X, et al. Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic expression pattern in *Takifugu rubripes* gonad at the early stage of sex differentiation[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, 44(5): 1275-1290.
- [24] Xie S M, Xu G C, Wang Y Y, et al. Effects of feeding frequency on digestive enzymes, histomorphology, and gene expression of lipid metabolic enzymes of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) reared in in-pond raceway culture systems[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(2): 157-166. [谢苏明, 徐钢春, 王裕玉, 等. 投喂频率对池塘循环水养殖大口黑鲈消化酶、组织结构及脂代谢酶基因表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(2): 157-166.]
- [25] Sun C F, Li J, Dong J J, et al. Chromosome-level genome assembly for the largemouth bass *Micropterus salmoides* provides insights into adaptation to fresh and brackish water[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 21(1): 301-315.
- [26] Yan N N, Hu J, Li J, et al. Genomic organization and sexually dimorphic expression of the *Dmrt1* gene in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 234: 68-77.
- [27] Dong J J, Li J, Hu J, et al. Comparative genomics studies on the *dmrt* gene family in fish[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 563947.
- [28] Ma D M, Fan J J, Tian Y Y, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in largemouth bass *Micropterus salmoides* fed on alternative diets[J]. *Journal of Fish Biology*, 2019, 95(2): 393-400.
- [29] Mawaribuchi S, Ito Y, Ito M. Independent evolution for sex determination and differentiation in the *DMRT* family in animals[J]. *Biology Open*, 2019, 8(8): bio.041962.
- [30] Erdman S E, Burtis K C. The *Drosophila* doublesex proteins share a novel zinc finger related DNA binding domain[J]. *The EMBO Journal*, 1993, 12(2): 527-535.
- [31] Bian C, Hu Y C, Ravi V, et al. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts[J]. *Scientific*

- Reports, 2016, 6: 24501.
- [32] Braasch I, Gehrke A R, Smith J J, et al. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(4): 427-437.
- [33] Nelson J S. *Fishes of the World*[M]. 3rd edition. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 1994: 600.
- [34] Kondo M, Froschauer 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(2): 213-222.
- [35] Su L N, Zhou F J, Ding Z J, et al. Transcriptional variants of *Dmrt1* and expression of four *Dmrt* genes in the blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Gene*, 2015, 573(2): 205-215.

Genomic organization and phylogenetic and temporal-spatial expression analysis of *MsDmrt3* in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

SHENG Xihui^{1,2}, DONG Junjian², SUN Chengfei², LI Wuhui², TIAN Yuanyuan², GAO Fengying^{2,3}, YAN Ningning², YANG Chao^{2,3}, LU Maixin^{1,2,3}, CHEN Gang¹, YE Xing^{1,2,3}

1. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;
2. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fisheries Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The *Dmrt3* gene is one of the most conservative genes related to sex determination, playing an important role in the process of sex determination and differentiation. In this study, the *MsDmrt3* cDNA sequence was obtained from the full-length transcriptome data of largemouth bass (*Micropterus salmoides*), identified by cloning and sequencing. The open reading frame of *MsDmrt3* is 1245 bp, encodes 474 amino acids, and contains a DM domain and DMA region, which are highly conservative. The DM domain has two conserved zinc finger DNA binding sites. The predicted 3D structures of *MsDmrt3* are similar to human and medaka DMRT3. Genomic data analysis revealed that *MsDmrt3* is located on chromosome 7. Sequencing results showed that the 3353 bp *MsDmrt3* gene sequence comprising two exons and one intron. Phylogenetic analysis showed that *MsDmrt3* belonged to the DMRT3 family and might originate from the same primitive DMRT as arthropod *Dmrt93B*. Quantitative polymerase chain reaction analysis of the *MsDmrt3* gene was conducted in 14 different tissues and at eight different developmental stages. Results showed that the *MsDmrt3* gene was most highly expressed in the spinal cord, followed by the testis and eyes, and minimally expressed in the ovary and liver; *MsDmrt3* was expressed in all eight stages of embryonic development, was gradually upregulated before 6 dpf, and then downregulated to a low level of 37 dpf. The study showed that the sequence and structure of the *MsDmrt3* gene were highly conserved and caused significant gender dimorphism in largemouth bass as in other fish species. It is suggested that *MsDmrt3* is related to sex and may play a role in the nervous system. The high expression of the *MsDmrt3* gene in early embryonic development may play an important role in early embryo growth and development. This study lays a robust foundation for the molecular mechanisms of gender determination and sexual differentiation in largemouth bass.

Key words: *Micropterus salmoides*; *MsDmrt3* gene; genetic structure; phylogenetic analysis; temporal-spatial expression

Corresponding author: YE Xing. E-mail: zyxing@163.com
CHEN Gang. E-mail: cheng@gdou.edu.cn