

奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因克隆与序列分析

曹谨玲¹, 俞菊华², 李建林², 王光花³, 吴婷婷²

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 3. 莱阳农学院 水产学院, 山东 青岛 266109)

摘要:利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法(RACE)分离、克隆奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aurea*)睾丸 *DMT*(DM-domain gene in testis)基因, 并进行序列测定与分析。结果表明, 该基因 cDNA 序列全长 1 260 bp, 包括 74 bp 5'非翻译区, 879 bp 阅读框以及含 poly(A)信号 AATAAA 的 307 bp 3'非翻译区, 阅读框共编码 292 个氨基酸。序列同源性分析表明, 不同进化地位动物的 *DMRT1* 基因 DM 域编码序列存在高度同源性, 显示 *DMRT1* 基因在系统进化上高度保守。生物信息学分析表明, *DMT* 基因编码蛋白无信号肽, 无跨膜区域, 有多个蛋白激酶 C、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 N-糖基化位点, 推测其可能在细胞信号传导中发挥作用, 且其生物活性可能接受信号途中多种信号的调控。该基因的成功克隆及生物信息学分析不仅为 *DMRT1* 基因的分子进化和相似性比较研究提供了新的材料, 而且对进一步研究其编码蛋白的结构与功能以及其在鱼类性别调控中的作用具有重要意义。[中国水产科学, 2007, 14(1): 23-31]

关键词:奥利亚罗非鱼; *DMT*; 克隆; 序列分析

中图分类号: S917

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)01-0023-09

DMRT (doublesex and mab-3 related transcription factor) 是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 *dsx* (doublesex) 和线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 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^[1], 并以锌指结构与特异 DNA 序列相结合, 在性别决定和分化发育中起调控作用^[2]。目前已在鱼类、爬行类、鸟类及哺乳动物中检测到 DM domain 基因的存在, 这充分表明该基因在脊椎动物进化过程中的高度保守性^[1-6]。

近年来从分子、发育及进化等水平对性别决定机制的研究发现, 仅 *DMRT1* 参与整个脊椎和非脊椎动物的性别决定过程, 并具有进化保守性。*DMRT1* (DM-related transcription factor 1) 基因被认为是一种性别决定和性别分化基因, 存在于鸡的 Z 染色体^[7], 人的常染色体 9p24. 7^[8] 以及鱼类的常染色体上^[9], 且在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、鸡 (*G. gallus*)、龟 (*Lepidochelys olivacea*) 及小鼠 (*M.*

musculus) 等胚胎未分化的性腺中特异表达^[7, 10-15], 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), 证实 *DMRT1* 基因直接参与了性别决定过程^[10]。

鱼类在生物系统进化上是从水生向陆生进化的一个关键环节, 对其 *DMRT* 基因的研究, 将有助于阐明从低等无脊椎动物到脊椎动物乃至人类的性别决定机制的进化。国外有关鱼类 *DMRT* 基因研究工作主要集中在青鳉 (*Oryzias latipes*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、虹鳟以及河豚 (*Taki fugu rubripes*) 上^[13, 16-19]。

由于罗非鱼 (*Tilapia*) 至今未发现存在异型性染色体, 给罗非鱼性别调控带来一定的困难。因而只有通过分子遗传学的方法从基因水平研究, 才能揭示罗非鱼的性别控制机理。Guan 等^[16] 在尼罗罗非鱼的卵巢和精巢中分别分离出 *DMO* (DM-domain gene in ovary) 和 *DMT* (DM-domain gene in testis) 基因。但有关奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*) *DMT* 基因序列尚未见报道。鉴于尼罗罗非鱼

收稿日期: 2006-01-16; 修订日期: 2006-05-22。

基金项目: 国家“863”高技术研发项目 (2004AA243060); 国家“973”基础研究项目 (2004CB117401); 国家“十五”攻关计划 (2004BA526B0110)。

作者简介: 曹谨玲 (1979-), 女, 博士研究生, 主要从事鱼类生物技术研究。E-mail: caojinling7928@163.com; 电话: 0510-85554198, 手机: 13861704252。

通讯作者: 吴婷婷。Tel: 0510-85554552; E-mail: wutt@ffrc.cn

(XX/XY)和奥利亚罗非鱼(ZZ/ZW)的染色体组型不同,性别调控机制可能不同,本研究根据 DM domain 的保守性,采用 RT-PCR 和 RACE(rapid amplification of cDNA ends)法从奥利亚罗非鱼精巢中分离、克隆出 DMT 基因,并借助生物信息学手段,对由 DMT 基因推测的蛋白进行蛋白理化特性、氨基酸序列(Motif)以及二级结构预测,将有助于了解奥利亚罗非鱼的性别决定机制,从而为进行性别的人为控制,以及促进其他相关分子发育和系统进化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 奥利亚罗非鱼取自淡水渔业研究中心实验场,取精巢组织。

1.1.2 主要试剂 抽提 RNA 用 Trizol Reagent 购自 Promega;反转录酶 AMV、*TdT* 酶、*Taq* 酶、3' RACE 试剂盒、胶回收试剂盒、连接酶等均购自 TaKaRa。

1.1.3 菌种和质粒 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存,PGEM-T vector 购自 Promega。

1.1.4 引物设计与合成 根据尼罗罗非鱼、青鳉、虹鳉等已知鱼类 DM-domain 保守序列合成了如下引物,各引物在全序列上的位置如下:

P1:5'-AGT GCT CCC GGT GYA GGA AYC AC-3'(162~185 bp)

P2:5'-CTS AAR GGM CAC AAG CGC TTT TG-3'(200~223 bp)

P3:5'-TTG AGC CTG CTG CCK YCK CAR AG-3'(297~320 bp)

P4:5'-GAC ACA AGC GCT TTT GCA ACT G-3'(208~228 bp)

P5:5'-TGA TCG CGG AGA GGC AGA GA-3'(259~278 bp)

gene specific primer1:5'-GAG CCC GTA AAG CTT CTG TCG TGT-3'(974~997 bp)

gene specific primer2:5'-AGTGCATGCGG-TACTGAGACGAC-3'(659~681 bp)

gene specific primer3:5'-TCGGTATGAGC-CCTGGCAGC-3'(498~517 bp)

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 取奥利亚罗非鱼精巢称取质量,用 Trizol Reagent 根据使用说明抽提总

RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳溴化乙锭染色显示 28S rRNA 和 18S rRNA,检测 RNA 的完整性。

1.2.2 DM-domain 区的扩增 取 5 μ g 总 RNA 以 OligodT-AP [5'-CTGATCTAGAGGTACCG-GATCC(T)₁₆-3']为引物,用 AMV 根据使用说明书进行 RT 反应,然后用 10%的 RT 液,引物 P1 和 P3 进行 PCR 反应,PCR 反应体系为 25 μ L,其中含 2.5 μ L 10 $\times$ buffer,2 μ mol/L MgCl₂,200 μ mol/L dNTP,引物各 0.1 μ mol/L,0.125 U *Taq* 酶。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,58 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,切下目的条带,用胶回收试剂盒回收。用 P2 和 P3 引物扩增回收液,验证扩增产物为 DM-domain 基因,将扩增产物连接到 pGEM-T vector,转化 DH 5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆进行测序。

1.2.3 3'RACE 根据试剂盒的操作流程进行,用 5 μ g 总 RNA 以 dT-AP[5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG TAC C(T)₁₆-3']为引物,用 AMV 根据其使用说明进行 RT 反应,然后用 RT 反应体系的 10%(V/V),以 AP[5'-CTG ATC TAG AGG TAC CGG ATC C-3']和 P4 为引物进行 PCR,退火温度为 55 $^{\circ}$ C,其他 PCR 反应条件同上。扩增液稀释 5 倍,取 2 μ L 作为模板,AP 和 P5 作为引物进行 PCR 反应,退火温度为 58 $^{\circ}$ C,其他同上。扩增产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,测序。

1.2.4 5'RACE 原理参照文献[21-22],用 5 μ g 总 RNA,以 gene specific primer1 为引物,用 AMV 根据使用说明进行 RT 反应,然后加 RNaseH,分解 mRNA;用试剂盒回收 cDNA,去除多余的 dNTP、引物等;再用 *TdT* 酶在 cDNA3'端加 poly(A),用试剂盒回收加了 poly(A)尾的 cDNA。以此为模板,用 gene specific primer2 及 dT-AP(同 3'RACE)为引物,进行 PCR,退火温度为 55 $^{\circ}$ C,反应体系组成、条件同 3'RACE;PCR 扩增液用胶回收试剂盒回收,再以此回收液为模板,用 gene specific primer3 及 AP 为引物,进行 PCR 反应,退火温度为 58 $^{\circ}$ C,反应体系组成及条件同上。产物用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,测序。

1.2.5 PCR 产物的克隆和鉴定 在 T4 DNA 连接酶的作用下,将纯化的 DNA 片段按 3:1 物质的量比值与 PGEM-T vector 进行连接反应。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL

的氨苄青霉素以及 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上筛选重组子^[23], 筛选出的阳性克隆进行双酶切和 PCR 鉴定, 以确定质粒是否插入了目的片段。

1.2.6 序列测定及分析 序列测定由上海申能博彩生物技术有限公司完成。所得序列拼接、校正后用 DNASTar, BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), ClustalW, PAUP4.0 等软件分析。

1.2.7 克隆片段的生物信息学分析 以克隆并测序得到的基因编码的氨基酸序列作为原始数据, 选择生物学软件或网络服务器, 有针对性地进行分析。对该基因编码的蛋白质结构特点、理化性质等按照 <http://www.us.expasy.org>、<http://www.ch.em-bnet.org>、DNASTar 及 NCBI 上提供的核酸、蛋白质在线分析工具进行。氨基酸组成分析利用 DNASTar 的 EDITSEQ 工具; 信号肽预测利用 signalP 分析工具; 跨膜结构分析利用 TMPRED; 蛋白质的亲/疏水性分析利用 DNASTar 的 Protean 工具; 基序分析利用 PROSITE 工具; 功能结构域分析利用 NCBI CD—Search service 工具; 二级结构预测利用 SOPMA 分析工具。

2 结果与分析

2.1 奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因的分离

取奥利亚罗非鱼精巢的总 RNA, 进行 RT-PCR, 用引物 P1 和 P3 扩增出 150 bp 左右的条带, 再以 P1 和 P3 扩增产物为模板, 用 P2 和 P3 进行扩增, 得到 130 bp 左右的一条带, 将其插入质粒, 双酶切鉴定, 测序结果表明序列长 120 bp, 经 BLAST 软件分析, 确定为 DM-domain 编码基因。根据所得序列设计合成引物 P5, 用精巢总 RNA 进行 3'RACE, 获得 1 000 bp 左右的 DNA 条带, 经插入质粒, 酶切鉴定, 送测序, 结果得到 1 013 bp 的序列。根据得到的序列设计 gene specific primer 1, 2, 3。按照 5'RACE 实验程序, 结果获得 500 bp 左右的特异条带, 克隆后酶切鉴定, 送测序, 序列为 517 bp。把上述序列拼接得到奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因全序列(图 1), 该 cDNA 总长 1 271 bp, 其中阅读框 879 bp, 编码 292 个氨基酸, 估算的蛋白质分子量为 31.63 kD; 5'非翻译区 74 bp; 3'非翻译区 307 bp[不包括 poly(A)]。

2.2 同源性比较

奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因的氨基酸序列经

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 发现与其他生物的 *DMRT1* 基因具有较高的同源性。再利用在线分析软件 ClustalW, 将奥利亚罗非鱼 *DMT* 的氨基酸序列与尼罗罗非鱼的 *DMT*, *DMO*, 奥利亚罗非鱼 *DMO* 以及河豚, 虹鳟, 青鳉, 鼠及人等动物的 *DMRT1* 氨基酸序列进行同源性比较。结果如图 2 所示, 奥利亚罗非鱼 *DMT* 与尼罗罗非鱼 *DMT* 同源性最高, 达 99%; 与其他鱼类 *DMRT1* 的同源性都较高, 大于 60%; 与人和小鼠的 *DMRT1* 同源性略低, 均为 41%; 而与 *DMO* 的同源性最低, 只有 27%。

2.3 系统发育

利用 PAUP4.0 软件, 构建图 2 中几种动物的 *DMO*, *DMT* 和 *DMRT1* 蛋白的系统发育进化树(图 3), 直观地显示了奥利亚罗非鱼 *DMT* 与其他各种动物 *DMO*, *DMT* 和 *DMRT1* 的相互关系。由进化树可以看出, 奥利亚罗非鱼 *DMT* 与尼罗罗非鱼 *DMT* 的亲缘关系最近, 与 *DMRT1* 的亲缘关系次之, 而与 *DMO* 的亲缘关系最远, 提示 *DMO* 和 *DMT* 是两个不同的基因。

2.4 生物信息学分析

以 DNASTar 软件对奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因编码氨基酸序列的基本特征进行分析, 结果显示, 其编码蛋白分子量为 31.64 kD, 等电点(PI)为 8.04, 氨基酸组成中带正电荷氨基酸(K, R) 28 个, 占 9.59%, 带负电荷氨基酸(D, E) 24 个, 占 8.21%, 整个蛋白带正电荷, 疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V) 67 个, 占 23.28%, 极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y) 113 个, 占 38.36%。亲/疏水性分析结果(图 4)显示: *DMT* 蛋白在第 1~58、75~87、114~123、129~150、156~206、226~236 区域和 265~277 区域为亲水性区域, 余下的少数氨基酸为疏水性的。可见, 亲水性残基所占比例远远大于疏水性残基, 因此推测该蛋白是亲水性的。

用 signalP 对奥利亚罗非鱼 *DMT* 氨基酸序列进行信号肽分析可知(图 5), 奥利亚罗非鱼 *DMT* 在第 23、30 和 35 氨基酸残基处存在信号肽酶切位点的几率仅仅分别为 0.585、0.055 和 0.040, 说明该蛋白不存在信号肽酶切位点, 无信号肽, 是一种非分泌蛋白。从而可以推测 *DMT* 在细胞质中合成并以可溶性状态保留在原处, 直接作用于胞液中可溶性的代谢物。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

奥利亚 DMT	MSQD---KQSKQVPDCSGPMSPTKA-----	22
尼罗 DMT	MSQD---KQSKQVPDCSGPMSPTKA-----	22
河豚 DMRT1	MTKE---KQSK---ASAGTVIPSKG-----	19
虹鳟 DMRT1	MSDD---EQTK--LLEGAGPPSASPG-----	21
青鳉 DMRT1	MSKE---KQGR--PVPEGPVPPG-----	18
鼠 DMRT1	MPNDTTFGKPTSTPEVHAPGAPPKKGAGGYSKAAGAMAGAAGGSGAGGS--GGASGSGP	58
人 DMRT1	MPNDEAFSKPSTPSEAPIHAPGVPPQGRAGGFGKASGALVGAASGTSAGGSSRGGGSGGA	60
奥利亚 DMO	MENRIPLGLTDHTSGPLGSLPVPPSLRPPPLFLQACN-----	39
尼罗 DMO	MENRIPLGLTDHTSGPLGSLPVPPSLRPPPLFLQACN-----	39
奥利亚 DMT	* .	
尼罗 DMT	-----QKSPRMPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	75
河豚 DMRT1	-----QKSPRMPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	75
虹鳟 DMRT1	-----PKPPRMPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	72
青鳉 DMRT1	-----KKPPRMPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	74
鼠 DMRT1	-----QKSPRMPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	71
人 DMRT1	SGLGSGSKSPRLPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	118
奥利亚 DMO	SDLGAGSKSPRLPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	120
尼罗 DMO	---PTLERYPTPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	96
	---PTLERYPTPKQSRRCRNHGYVSPLKGHKRF CNWRDCGCPKCKLI AERQRVMAAQVA	96
	***** .***** :***** :*****	
奥利亚 DMT	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
尼罗 DMT	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
河豚 DMRT1	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	113
虹鳟 DMRT1	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
青鳉 DMRT1	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
鼠 DMRT1	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
人 DMRT1	LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMMVK---NEVGADCLFSVEG-R	116
奥利亚 DMO	LRRQQAQEESEADRLRLYPCTGIGGEAGIPQSSISAGVPVSASSTPAAACDFVFGSEN	156
尼罗 DMO	LRRQQAQEESEADRLRLYPCTGIGGEAGIPQSSISAGVPVSASSTPAAACDFVFGSEN	156
	***** : : : : : *	
奥利亚 DMT	SPTP-----TSHPTSAVT--GTRSASSPSPSAAAR-AH	146
尼罗 DMT	SPTP-----TSHPTSAVT--GTRSASSPSPSAAAR-AH	146
河豚 DMRT1	NQAA-----TSTSSSVVPSASRVTSSRPLAGAR-AA	144
虹鳟 DMRT1	SPTCGN-----TSAGTSPSNAGSRSGLASSPTAFSRGQS	150
青鳉 DMRT1	SGAPAA-----PPNPILSAAGSCPASSSSPSAAAR-VY	141
鼠 DMRT1	AQPP-----PASTPTPAASEGRMVIGDI PAVTSR-GH	194
人 DMRT1	SQPP-----PASVPTTAASEGRMVIGDI PAVTSR-GH	196
奥利亚 DMO	QKDVSEDKLSKYNFYNGFMGRPLFAPHSPRLSPSPDKKELSPSKDSGGGQSPAMDHRSDH	216
尼罗 DMO	QKDVSEDKLSKYNFYNGFMGRPLFAPHSPRLSPSPDKKELSPSKDSGGGQSPAMDHRSDH	216

奥利亚 DMT	TEGP-----SDLLLETYYN-FYQPSRY-PYYGNLYNYSQY-QMPHGDGR-----	189
尼罗 DMT	TEGP-----SDLLLETYYN-FYQPSRY-PYYGNLYNYSQY-QMPHGDGR-----	189
河豚 DMRT1	NDGQ-----SDLLLESSFYN-LYQPSRYP-AYYGNLYNYSQY-QMPHGDGR-----	187
虹鳟 DMRT1	TDGT-----ADLLVDTSYN-FYQPSRYPTAYYGNLYNYSQY-QMPNGESR-----	194
青鳉 DMRT1	GEEA-----SDLLLETYYN-FYQPSRY-PYYGNLYNYSQY-QMPHGDGR-----	185
鼠 DMRT1	MENT-----SDLVSDPAYYSFYQPSLFP--YYNNLYNYPQYSMALAESSSGEVGN	244
人 DMRT1	VENT-----PDLVSDTYYSFYQPSLFP--YYNNLYNYPQYSMALAESSSGEVGN	246
奥利亚 DMO	TESPORSLTSSDPESSGESEKPNELSPDRDPTDI MAKIFPHQERDLESMTVRTCKG--	273
尼罗 DMO	TESPORSLTSSDPESSGESEKPNELSPDRDPTDI MAKIFPHQERDLESMTVRTCKG--	273
	: : : : : *	
奥利亚 DMT	-----LPS-----HSVSSQYRMHSYYPATYLTQGLGS	217
尼罗 DMT	-----LPS-----HSVSSQYRMHSYYPATYLTQGLGS	217
河豚 DMRT1	-----LQN-----HNVSPQYCVHSYCSGGPYLSQGLSS	215
虹鳟 DMRT1	-----LSS-----HNVSPQYRMHSYYSASYSLSQGLGQ	222
青鳉 DMRT1	-----LSS-----HNVSPQYRMHSYYSASYSLSQGLGQ	222
鼠 DMRT1	SLGGSVPKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQMKTSERHPVSSQYRMHSYYPATYLTQGLGS	213
人 DMRT1	PLGGSVPKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQMKTNENRHMSSQYRMHSYYPATYLTQGLGS	300
奥利亚 DMO	-----DIVKS-----IELALNSKENKIDADSARRPSAGLPGGLGA	308
尼罗 DMO	-----DIVKS-----IELALNSKENKIDADSARRPSAGLPGGLGA	308
	: : : : : *	
奥利亚 DMT	-----TSCVPPFFSLDDNN--NSCSETMAASFSPS	245
尼罗 DMT	-----TSCVPPFFSLDDNN--NSCSETMAASFSPS	245
河豚 DMRT1	-----TSCVPPFFSLDDNN--NSCSETMAASFSPS	245
虹鳟 DMRT1	GLGGGLGQVGLGGGLGQGLGHGLGGGLGTTAAACVPMPFSLDNT---CHDTKQTSFSPV	277
青鳉 DMRT1	-----PVPPVPSLDDNN--AFPPS	230
鼠 DMRT1	-----SMSQITFFEEGP---SYSEAKASVFSP	325
人 DMRT1	-----SVPPQFFTFEDAP---SYPEAKASVFSP	327
奥利亚 DMO	LG-----AKSAFSPHLIPASPGGDSLYGLSSRLGVSPRLR	342
尼罗 DMO	LG-----AKSAFSPHLIPASPGGDSLYGLSSRLGVSPRLR	342
	: : : : : *	
奥利亚 DMT	SISAGHSDTMVGRSISSSLVNG---DAKAEECEASS-QAAGFTVDAIEGGATK-----	292
尼罗 DMT	SISAGHSDTMVGRSISSSLVNG---DAKAEECEASS-QAAGFTVDAIEGGATK-----	292
河豚 DMRT1	SPSTGDSMTCTPISSTMVTS---DLHPECEATG-ETANFTISSIDGDAGN-----	294
虹鳟 DMRT1	SGGANGHDLGSLCLISSSLVNS---EGTECDGQD-QGGFTVDSTIIEGNK-----	325
青鳉 DMRT1	SLTSTHDSLTGRLISSPVNV---GVKAEFESGG-QPPVFPADSMSETK-----	276
鼠 DMRT1	S---SODSGVLSSSSSPMSNESSKGVLECEASSEPSSYAVNQVLEDEDE-----	374
人 DMRT1	S---SODSGVLSSSSSPISNKSSTKAVLECEPAS-EPSSFTVTPVIEFEDE-----	373
奥利亚 DMO	LAYPSANGGMAGFMSPYMTSGTASVPTASTLDSYSLPGMIRDSYIQSKESLCNAGLYT	402
尼罗 DMO	LAYPSANGGMAGFMSPYMTSGTASVPTASTLDSYSLPGMIRDSYIQSKESLCNAGLYT	402
奥利亚 DMT	-----	
尼罗 DMT	-----	
河豚 DMRT1	-----	
虹鳟 DMRT1	-----	
青鳉 DMRT1	-----	
鼠 DMRT1	-----	
人 DMRT1	-----	
奥利亚 DMO	RLNSETK 409	
尼罗 DMO	RLNSETK 409	

图 2 奥利亚罗非鱼 DMT 与其他动物的 DMO、DMT、DMRT1 氨基酸序列比较

注:“*”表示相同氨基酸,“.”表示相似氨基酸,“-”表示此位置缺失氨基酸。各种动物 DMO、DMT 和 DMRT1 的 GenBank 登录号分别为:尼罗罗非鱼 DMT(AF203489)、奥利亚罗非鱼 DMO(AY487938)、尼罗罗非鱼 DMO(AF203489)、河豚 DMRT1(AB201461)、虹鳟 DMRT1(AF209095)、青鳉 DMRT1(AB091696)、鼠 DMRT1(AF202778)、人 DMRT1(AF130728)。

Fig. 2 Alignment of DMT and DMO, DMRT1 amino acid sequence

Note: Identical and similar amino acid residues are marked by asterisks and dots, respectively. The GenBank accession numbers of the sequences used in the figure were as follows: AF203489(*Oreochromis niloticus* DMT), AY487938(*Oreochromis aurea* DMO), AF203489(*Oreochromis niloticus* DMO), AB201461(*Takifugu* DMRT1), AF209095(*rainbow trout* DMRT1), AB091696(*medaka* DMRT1), AF202778(*rat* DMRT1), AF130728(*human* DMRT1).

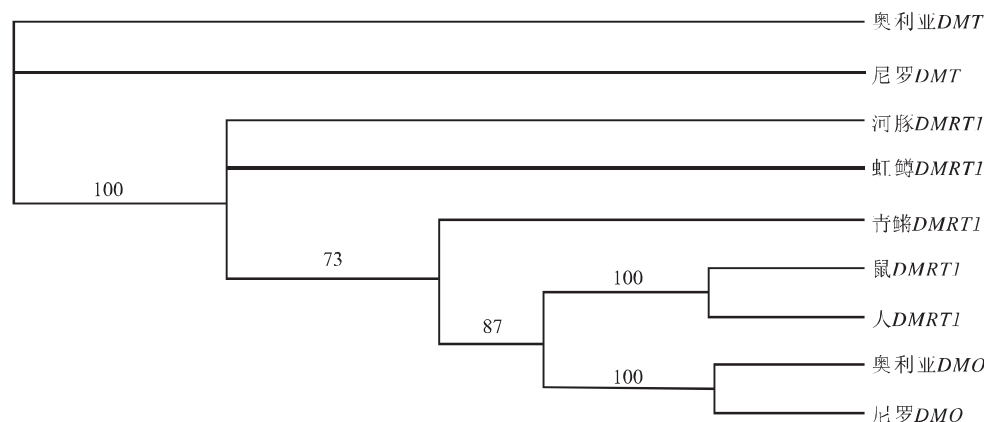


图 3 DMO、DMT 与 DMRT1 蛋白质的系统进化树

用 PAUP4.0 软件 Njbootstrap 方法构建,分支上的数字代表 bootstrap 值。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the DMO, DMT and DMRT1 proteins

The consensus tree was constructed by neighbor-joining bootstrap using PAUP4.0. The number is the bootstrap value.

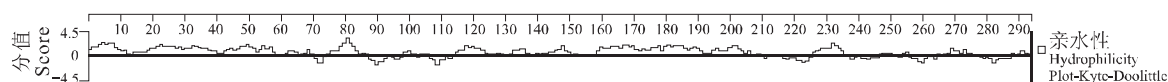


图 4 DMT 蛋白亲/疏水特性

Fig. 4 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of DMT protein

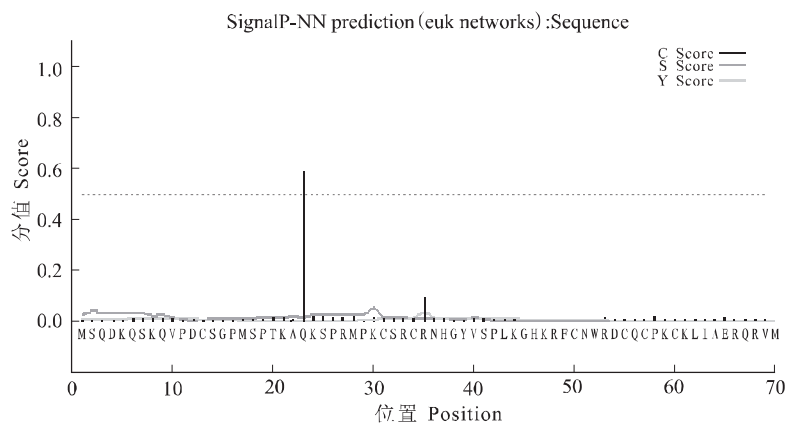


图 5 DMT 信号肽预测

C score;原始剪切位点的分值;S score;信号肽的分值;Y score;综合剪切点的分值

Fig. 5 Prediction of the signal peptide of DMT

C score;Original cut score. S score;Signal score. Y score;General cut score

蛋白位点和序列模式分析表明,奥利亚罗非鱼 DMT 编码蛋白可能含 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (25~27), 5 个肉豆蔻酰化位点 (130~135、173~178、214~219、216~221、245~250), 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (95~98、226~229、233~236), 2 个 N-糖基化位点 (177~180、231~234) 和 2 个功能域,即 DM-domain 区域 (46~84) 和雄性特异性基

序 (male specific motif) (193~213)。DM-domain 区域附近各有一个蛋白激酶 C 磷酸化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,这 2 个位点的磷酸化可能对 DM-domain 区域行使性别调控功能具有重要作用;雄性特异性基序附近也含有 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,该位点的磷酸化可能对雄性特异性基序行使雄性性别调控功能发挥作用。从对该蛋白质的功能基

序分析来看,提示它不仅参与雄性性别调控,而且可能在细胞信号传导中发挥作用,其生物活性还可能受信号传导途径中多种信号的调控;含有酪蛋白激酶Ⅱ

磷酸化位点,这个位点的磷酸化/去磷酸化可能是调节其活性的方式。跨膜性分析表明(图 6),奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因编码蛋白无明显跨膜区域。

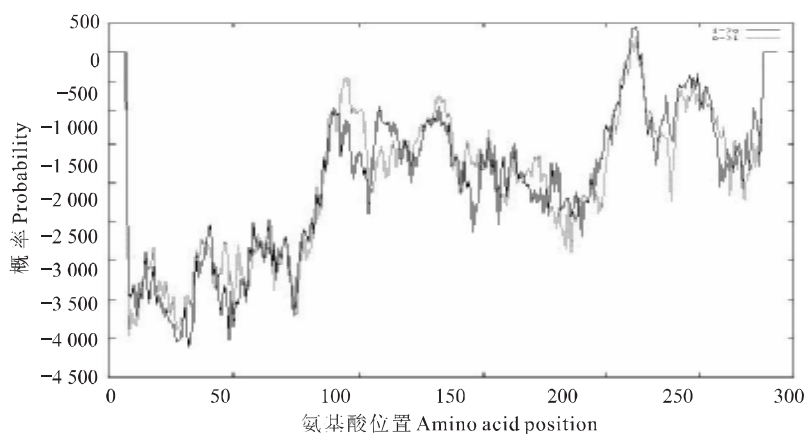
图 6 奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因氨基酸跨膜区段的预测

Fig. 6 Prediction of the transmembrane amino acid segment of *O. aurea* DMT

用 SOPMA 对 DMT 蛋白二级结构预测结果如图 7 所示, α 螺旋(Alpha helix, 56 个 AA) 19.18%, 延伸主链(Extended strand, 42 个 AA) 14.38%, β 转角(Beta turn, 12 个 AA) 4.11%, 随即卷曲(Ran-

dom coil, 182 个 AA) 62.33%, 提示奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因编码的蛋白主要以无规卷曲为主, 含少量的 α 螺旋, 间或有 β 转角。

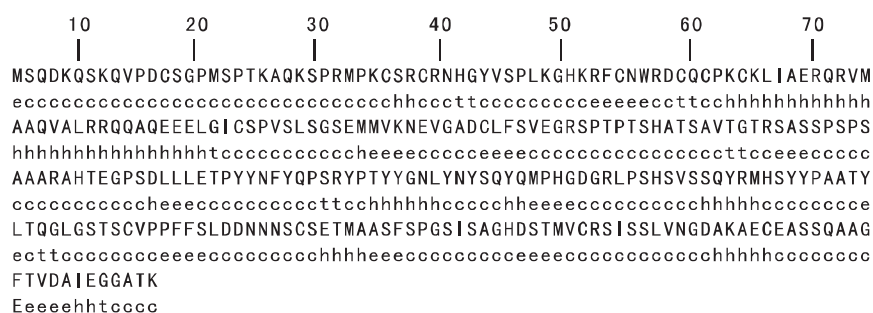


图 7 DMT 蛋白二级结构预测

α 螺旋:56(19.18%);延伸主链:42(14.38%); β 转角:12(4.11%);随机卷曲:182(62.33%). 数字代表氨基酸的数量.

Fig. 7 Prediction on secondary structure of DMT

Alpha helix(h) ;56(19.18%). Extended strand(e);42(14.38%). Beta turn(t);12(4.11%). Random coil(c);182(62.33%). Numbers of amino acids are represented by number.

3 讨论

DM-domain 基因在果蝇、线虫、脊椎动物以及鱼类上是高度保守的。本研究以奥利亚罗非鱼为研究对象,采用 **RACE** 法及嵌套 **PCR** 法,首次对奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因进行分离与克隆,获得了奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因的 **cDNA** 全序列,并对该基因

编码的氨基酸序列进行同源性和系统进化分析。基于进化学说理论基础上的序列比对,认为如果两个序列间有足够的相似性,则它们可能来源于共同的进化祖先,也可能是同源的。通常认为,蛋白质的空间结构及其功能较核酸一级序列具有更大的保守性,因此一般来讲,如果蛋白质序列间的相似性大于30%,它们很可能是同源的^[24]。通过蛋白质同源性

检索发现, 奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因除与相同种属的 *DMO* 基因的同源性较低外, 与进化地位不同的其他各类动物的 *DMRT1* 基因编码的氨基酸序列存在高度的同源性, 表明虽然在染色体水平上不同进化地位的物种具有不同的性别决定机制, 但在分子水平上却有共同的性别决定基因, 即 *DMRT* 基因, 该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, 并且这个区段富含碱性氨基酸 *R*、*K* 以及多种极性氨基酸, 基本符合 *C2/H2* 型锌指结构特点^[25]。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。

此外, 在绝大多数 *DMRT1* 基因序列的 C-末端(包括奥利亚罗非鱼 *DMT*) 附近均存在一个雄性特异性基序, 该基序在雄性中是高度保守的, 而在雌性特异性基因 *DMO* 中则缺失。进一步证明 *DMT* 是雄性特异性基因, 在雄性性别调控中发挥重要作用。此方面的功能验证有待进一步深入研究。

利用生物信息学分析基因和蛋白质的序列模式对鉴别蛋白的功能具有重要的意义。本研究以 *DNASTAR* 等生物软件对克隆得到的奥利亚罗非鱼 *DMT* 基因进行分析, 结果表明, 该基因编码蛋白质的亲水性区域占优势, 没有信号肽, 是一个非跨膜的亲水性蛋白质。利用 *SCANPROSITE* 软件对该蛋白质可能的修饰位点进行分析, 发现该蛋白有多个位点可以发生磷酸化修饰, 个别位点可以发生糖基化修饰。蛋白质的磷酸化和脱磷酸化在细胞信号传导中起重要作用, 磷酸化、糖基化位点可能是 *DMT* 蛋白完成其生理功能的结构基础。特别是该蛋白序列中酪蛋白激酶 II 磷酸化位点有 3 个, 表明酪蛋白激酶 II (*CKII*) 对该蛋白生物功能的发挥具有重要的调节作用。以上研究结果为进一步研究 *DMT* 的结构与功能以及其在鱼类性别调控中的作用提供参考。

参考文献:

- [1] Koopman P, Loffler K A. Sex determination: The fishy tale of *DMRT1*[J]. *Curr Biol*, 2003, 13(5): 177.
- [2] Ren I I, Cheng H H, Guo Y Q, et al. Evolutionary conservation of *Dmrt* gene family in amphibians reptiles and birds[J]. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(23): 1992—1996.
- [3] Smith C A, McCLive P J, Westem P S, et al. Conservation of a sex-determining gene[J]. *Nature*, 1999, 6762(402): 601—602.
- [4] 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 Expres Patte*, 2003, 3(1): 77—82.
- [5] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes[J]. *Nature*, 1998, 6668(391): 691—695.
- [6] Kondo M, Froschauer A, Kitano A, et al. A molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*[J]. *Gene*, 2002, 295(2): 213—222.
- [7] Ellegren H. Hens, cocks and avian sex determination: A quest for genes on Z or W[J]. *EMBO Reports*, 2001, 2(3): 192—196.
- [8] Flejter W L, Fergastad J, Gorski I, et al. A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9 distal to marker D9S1779[J]. *Hum Genet*, 1998, 63(3): 794—802.
- [9] Nanda L, 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(18): 11778—11783.
- [10] Raymond C S, Murphy M W, O'Sullivan M G, et al. *DMRT1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(20): 2587—2595.
- [11] 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(2): 208—220.
- [12] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *DMRT1* prior to sexual differentiation[J]. *Genetics*, 2000, 26(3): 174—178.
- [13] Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, et al. *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oreochromis mykiss* [J]. *Biochi et Biophys Acta*, 2000, 1493(1—2): 180—187.
- [14] Grandi A D, Calvari V, Bertini V, et al. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation[J]. *Mech of Dev*, 2000, 90(2): 323—326.
- [15] Moniot B, Berta P, Scherer G, et al. Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination[J]. *Mech of Dev*, 2000, 91(1—2): 323—325.
- [16] Guan G J, Tohru Kobayashi, Yoshitaka Nagahama. Sexually dimorphic expression of types of *DM(Doublesex-Mab-3)*-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(3): 662—666.
- [17] Brunner B, Hornung U, Shan Z, et al. Genomic organization and expression of the Doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*[J]. *Genomics*, 2001, 77(1—2): 8—17.

- [18] Nanda L, 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(18): 11 778—11 783.
- [19] Ohmuro-Matsuyama Y, Matsuda M, Kobayashi T, et al. Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the Medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Zool Sci*, 2003, 20(12): 1 395—1 398.
- [20] Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi 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.
- [21] Frohman M A, Dush M K, Martin G R. Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligo-nucleotide primer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(23): 8 998—9 002.
- [22] Yu Juhua, Xia Dequan, Yang Hong, et al. Isolation and sequence somatostatin cDNA of *Megalobrama pellegrini* [J]. *China J Fisheries*, 2003, 27(6): 533—539.
- [23] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* [M]. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.
- [24] 郝柏林, 张淑誉. 生物信息学手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 10.
- [25] 杨歧生. 分子生物学基础 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 92—93.

Cloning and sequence analysis of *DMT* gene in *Oreochromis aurea*

CAO Jin-ling¹, YU Ju-hua², LI Jian-lin², WANG Guang-hua³, WU Ting-ting²

(1. Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. College of Aquaculture, Laiyang Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: *DMRT* gene constitutes a new gene family related to sex-determination. They were isolated by virtue of its homology to doublesex gene from *Drosophila*, *Mab-3* from *Caenorhabditis elegans* and human *DMRT1* gene. *DMRT1* can encode putative transcription factors characterized by a conserved zinc finger-like DNA-binding motif, the DM domain. In this study, RT-PCR and RACE were used for the cloning of full length *DMT* (DM-domain gene in testis) cDNA from testis of *Oreochromis aurea*. Two pairs of primers P1, P3 and P2, P3 were designed according to the sequence of fish DM domain. A 120 bp conserved sequence of *DMT* cDNA was cloned. The other pair of primers P4 and P5 were designed according to the conserved sequence for 3' RACE. And other three gene specific primers 1, 2 and 3 were designed according to the sequence of 3' end cDNA. Sequence analysis revealed a 1 260 bp full-length cDNA sequence containing 74 bp 5'-untranslated region, 307 bp 3'-untranslated region and 879 bp open reading frame (ORF) and this sequence was encoded by 292 amino acids. The deduced amino acid sequence aligned with those of *DMRT1* genes from different species showed high degree of sequence homology as phylogenetic tree revealed. The amino acid sites of DM domains may form C2/H2 model zinc-finger structure to bind specific DNA sequences and regulate sex differentiation and development. It contained a male specific motif, which was well conserved among numerous *DMRT1* genes but absent in *DMO*, indicating that *DMT* represented a male-type DM-domain gene and played an important role in sex differentiation and sex development. The bioinformatics analysis revealed that the predicted protein had no signal peptide and notable transmembrane region. It contained much PKC-PHOSPHO-SITE, CK2-PHOSPHO-SITE and ASN-GLYCOSYLATION-SITE, implicating that they could play some roles during cellular signal conduct and their activities might be related to the regulation of many signals during signal conducting route. The successful cloning of this gene not only provides new material for researches on *DMRT1* molecular evolution and similarity comparison of *DMRT1* gene, but also is very important for further study of structure and function of *DMT* in *Oreochromis aureus* and the mechanism of sex control of fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 23—31]

Key words: *Oreochromis aurea*; *DMT*; cloning; sequence analysis

Corresponding author: WU Ting-ting. E-mail: wutt@ffrc.cn