

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00379

银鲫 *dmrt2b* 基因的分子特征及功能分析

刘 沙^{1,2} 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 实验克隆了银鲫 *dmrt2b* 基因的全长 cDNA 序列, 并对其表达图式和在胚胎发育过程中的功能做了初步研究。银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 有相似的基因组结构。在胚胎发育过程中, 银鲫 *dmrt2b* 主要在体节中表达。在成体中主要分布于肌肉中。注射银鲫的 *dmrt2b* 可以挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降胚胎的表型。上述结果表明银鲫 *dmrt2b* 基因同斑马鱼 *dmrt2b* 基因有相同的功能。

关键词: 银鲫; *dmrt2b*; 表达模式; 基因结构; 胚胎发育

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)03-0379-05

与鲫 (*Carassius auratus*) 相比, 银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 为进化的六倍体^[1]。由于多倍化可以获得额外的重复基因, 且重复基因为基因功能歧化和新功能产生提供了原始材料^[2-5], 因而银鲫是研究重复基因功能歧化和功能改变等相关事件的良好材料^[1]。

DMRT (*dsx* and *mab-3* related transcription) 转录因子是一个被认为与性别决定相关的转录因子家族^[6]。该家族成员都含有一个高度保守的锌指结构的 DNA 结合功能域^[6-8]。近期研究表明, DMRT 转录因子不仅仅和性别决定相关, 在胚胎发育过程中也有很多其他的功能^[9]。其中, 该家族在斑马鱼 (*Danio rerio*) 中的一个成员 *dmrt2a* 被认为是和躯体左右不对称的建立相关^[10]。最近, 本实验室从银鲫中鉴定了一个鱼类特异的重复基因 *dmrt2b*^[11]。通过 morpholino 敲降策略在斑马鱼中研究该基因的功能及其作用机制, 我们发现斑马鱼 *dmrt2b* 在体节发生时期表达, 在 *dmrt2b* 敲降的胚胎中, 体节发生出现明显畸形, 且 *dmrt2b* 敲降胚胎中慢肌 (Slow muscle) 发育受到严重影响。进一步研究发现, Hedgehog 信号通路成员 (*ptc1*, *nkx2.2a* 等) 在 *dmrt2b* 敲降的胚胎中表达下调,

提示 *dmrt2b* 是通过 Hedgehog 信号通路参与以上体节发生过程。以上影响在 *dmrt2a* 敲降的胚胎中没有发现。同时, *dmrt2b* 和 *dmrt2a* 敲降的胚胎都表现出躯体左右轴建立上的缺陷: 内脏位置失去偏向性以及身体左侧特异表达的基因在右侧或两侧同时表达等^[12]。这说明斑马鱼的 *dmrt2b* 和 *dmrt2a* 基因虽都参与了躯体左右不对称建立的过程, 但 *dmrt2b* 获得了一个新的歧异功能, 通过 Hedgehog 信号通路参与体节发生过程, 而 *dmrt2a* 则没有涉及 Hedgehog 信号通路^[12]。

但是, 我们还没有确切的证据说明银鲫的 *dmrt2b* 基因和斑马鱼 *dmrt2b* 基因有相似甚至相同的功能。也不清楚银鲫的 *dmrt2b* 基因是否和斑马鱼 *dmrt2b* 基因一样也发生了功能歧化。因此, 本实验克隆了银鲫的 *dmrt2b* 基因全长, 分析了该基因的表达特征, 并且初步研究了其在胚胎发育过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 实验材料

银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 取自于水生生物研究所关桥实验鱼养殖基地, 人工催产、授精和孵

收稿日期: 2010-04-14; 修订日期: 2010-11-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (NYCYTX-49); 国家自然科学基金 (30630050); 淡水生态与生物技术国家重点实验室创新项目 (2008FBZ15); 中国科学院水生生物研究所领域项目 (075A011301) 资助

作者简介: 刘沙 (1983—), 男, 湖北武汉人; 博士研究生; 主要从事鱼类发育遗传学方面的研究。E-mail: liusha@ihb.ac.cn

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

化等操作均照本实验以往方法^[13, 14]。银鲫同源受精行两性生殖, 而异源受精则行雌核发育^[1]。本研究实验材料均取自异源受精样本。AB 野生型斑马鱼 (*Danio rerio*), 饲养于本实验室的室内养鱼房。

1.2 银鲫 *dmrt2b* 的分离和克隆

RNA 提取依照试剂说明书 (SV Total RNA Isolation System, Promega), 加适量匀浆缓冲液 (1 mL/300 颗胚胎), 冰上匀浆提取银鲫受精后 36h 时期胚胎总 RNA。用购自 Clontech 的 SMART cDNA 合成试剂盒合成 cDNA 文库。在本实验室已获得的银鲫 *dmrt2b* 片段基础上, 设计一对基因特异引物 *RDMRT2F* (5'-GGTGCCGGAATCACGGCGTCGTGT-3') 和 *RDMRT2R* (5'-CTAAGAGCGACTTGGGCGGCCAT-3') 分别进行 5' 和 3'RACE, 拼接得到银鲫 *dmrt2b* cDNA 全序列。

1.3 银鲫基因组 DNA 的提取以及银鲫 *dmrt2b* 基因结构的确定

以银鲫尾鳍为材料进行基因组 DNA 的提取, 采用 E.Z.N.A.[®] DNA Midiprep Kit (Omega, USA), 具体方法参见试剂盒说明书。根据斑马鱼该基因基因组的结构设计一对银鲫引物对 *CagInt1F* (5'-GATGGCAGCGCAAGTCGCCCTCCGGAG-3') 和 *CagInt2R* (5'-GGAGGAGGAGCGCAGGCAACTCTTCCA-3') 来 PCR 扩增 *CagDMRT2b* 的基因组序列, PCR 产物按以前的报道^[15]克隆于 PMD18-T 载体并测序。

1.4 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 分析

用购自 Promega 的 SV total RNA 分离试剂盒按以前的报道^[16, 17]提取银鲫成体组织 (心脏、精巢、肝脏、肾脏、脾脏、脑、卵巢和肌肉) 以及银鲫发育时持续胚胎的总 RNA。M-MLV 逆转录酶系统购自 Promega, 用寡聚引物 (dT)₈₋₁₂ 合成一链 cDNA。同时设计跨内含子的引物对 *RTCagDMRT2bF1* (5'-ACCTCTGTTCTCAGACAC-3') 和 *RTCagDMRT2bR1* (5'-AGTCTGCCATATTCGATGA-3') 通过 RT-PCR 分析 *CagDMRT2b* 的组织表达特异性。同时用保守的 α -tubulin 引物 (*tubulin-F*: GTGCACTGGTCTTCAGGGGTT 和 *tubulin-R*: GGGAAGTGGATGCGTGGGTAT) 作对照。反应条件为: 95℃ 变性 40s; 55℃ 退火 50s; 72℃ 延伸 50s。

1.5 整体胚胎原位杂交

探针用已合成的斑马鱼 *dmrt2b* 基因探针^[12]。整体胚胎原位杂交方法参照本实验室方法^[13, 14]。

1.6 体外转录

分别设计银鲫引物对 *OECD2bF* (5'-GGATCCATGAGGACCGACGAAGCTCCAGCG-3') 和 *OECD2bR* (5'-CTCGAGATCACGGAGAGGGAGCGGACGGC-3'), PCR 扩增得到涵盖全部编码区的 cDNA 片段, 再亚克隆到体外表达载体 pCS2+ 的多克隆位点后, 经 *Not* 限制性内切酶线性化后作为合成加帽 mRNA 的模版, 使用的试剂盒是 Roche 的 SP6 Cap Scribe (Boehringer-Mannheim), 加帽产物经乙酸铵室温沉淀 30min 后乙醇洗涤, 空气干燥后溶于无 RNA 酶的水至 300 μ g/mL 并分装置 -80℃ 保存。

1.7 显微注射

Morpholino 和体外合成 mRNA 显微注射参照先前方法。Morpholino 大约 5 ng/卵, 体外合成 mRNA 大约 200 pg/卵^[18]。

2 结果

2.1 银鲫 *dmrt2b* 全长 cDNA 的克隆及其特征

如前所述, 从银鲫受精后 36h 时期胚胎构建的 SMART cDNA 文库中进行 5'-RACE 和 3'-RACE PCR, 分离获得银鲫 *dmrt2b* cDNA 的全长序列。序列提交至 GenBank (序列号: EF029082)。该序列全长为 1938 bp, 开放阅读框有 1014 个核苷酸, 编码 337 个氨基酸。5' 非编码区有 71 bp, 在 3' 非编码区有一段多聚腺苷酸 poly(A) 尾的加尾信号序列 AATAAA, 位于 poly(A) 序列上游 14 核苷酸处。

2.2 银鲫 *dmrt2b* 的基因组结构特征

参照斑马鱼全基因组序列所获得的斑马鱼 *dmrt2b* 基因内含子的位置设计相应的用来扩增银鲫 *dmrt2b* 内含子的引物, 以 1.3 所述方法提取银鲫基因组 DNA 作为模版 PCR 得到银鲫 *dmrt2b* 的基因组序列。通过比较我们发现银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 以及斑马鱼 *dmrt2a* 基因的开放阅读框具有类似的基因结构 (图 1A), 其中开放阅读框中外显子和内含子的位置 (图 1A) 以及外显子的相位 (图 1B) 完全一致。并且 DM 结构域都在开放阅读框的第一个外显子上。这说明这三个基因有很高的同源性。但是我们比较内含子的序列后发现, 银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 基因的内含子较为接近, 其中银鲫 *dmrt2b* 的第一个内含子和第二个内含子上游 200 个左右碱基与斑马鱼 *dmrt2b* 的两个外显子上游 200 个左右碱基有很高的同源性, 而斑马鱼 *dmrt2b* 和

dmrt2a 的内含子之间没有明显同源性。这提示我们斑马鱼 *dmrt2b* 和银鲫 *dmrt2b* 是直系同源基因, 而它们和 *dmrt2a* 则是并系同源关系。

2.3 银鲫 *dmrt2b* 的表达图式

为了进一步分析银鲫 *dmrt2b* 的特征, 我们研究了这个基因的表达图式。银鲫成体个体较大, 方便组织分离, 因此我们首先用 RT-PCR 的方法分析了银鲫 *dmrt2b* 在成熟雄性银鲫包括心脏、肝脏、肾脏、脾脏、脑、肌肉和精巢的各个组织以及成熟雌性银鲫的卵巢的表达情况, 结果表明银鲫 *dmrt2b* 在不同组织的表达水平存在明显差异。银鲫 *dmrt2b* 在精巢、肾脏、脾脏、卵巢以及肌肉中都有表达, 尤以肌肉

表达量最高, 脾脏中则非常低(图 2A)。这与先前斑马鱼 *dmrt2b* 在斑马鱼肌肉中高表达的结果一致^[19]。

接下来我们通过胚胎整体原位杂交研究银鲫 *dmrt2b* 在胚胎发育中的时空表达图式。由于银鲫鱼 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 序列有很高的同源性, 所以我们可以用斑马鱼的 *dmrt2b* 探针作为银鲫 *dmrt2b* 的探针。如图 2B 所示, 在体节发生过程中, 银鲫 *dmrt2b* 的转录本主要集中在体节中。这个结果也与先前在斑马鱼中的结果一致^[12]。这些银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 在表达图式上的一致, 进一步提示我们, 银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 在发育过程中有相似的功能。

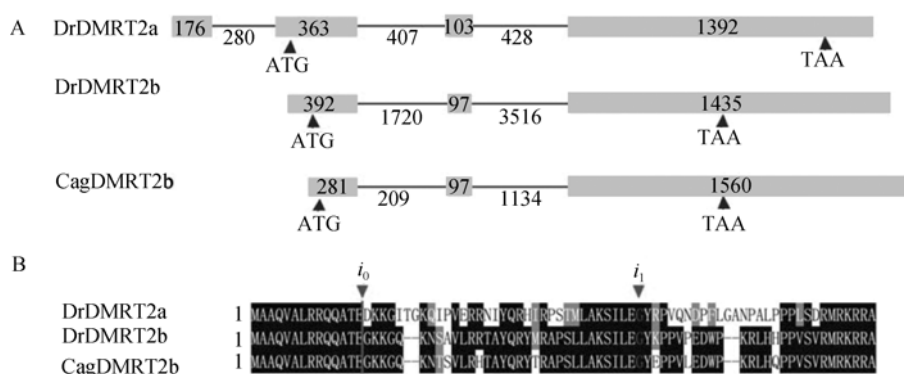


图 1 斑马鱼 *dmrt2a* 和 *dmrt2b* 同银鲫 *dmrt2b* 基因组结构的比较

Fig. 1 Genomic organization comparison of zebrafish *dmrt2a*, *dmrt2b* and gibel carp *dmrt2b*

A. 内含子外显子的结构示意图; B. 内含子位置和相位的比较

A. The schematic presentation of zebrafish *dmrt2a*, *dmrt2b* and gibel carp *dmrt2b*; B. Comparison of intron positions and intron phases. Intron positions are highlighted by the inverted triangles, and i_n ($n=0, 1, 2$) indicates the phase of this intron is n

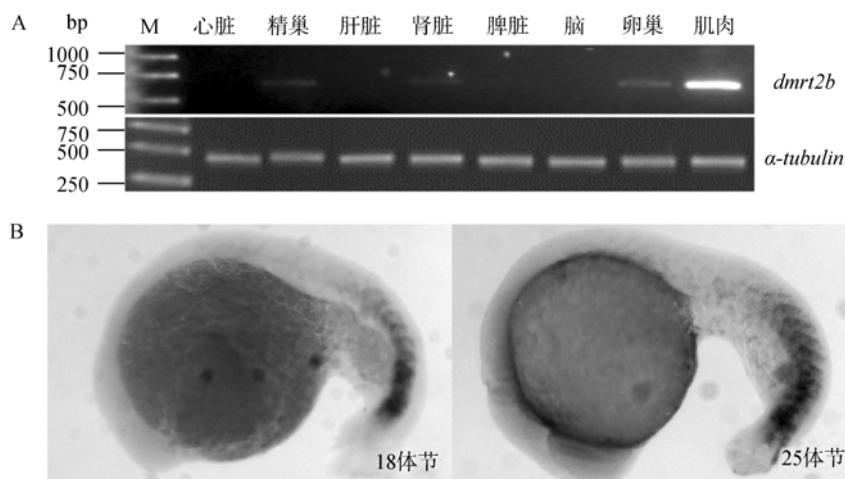


图 2 银鲫 *dmrt2b* 基因的表达图式

Fig. 2 Expression pattern of gibel carp *dmrt2b*

A. 银鲫 *dmrt2b* 在不同组织中的 RT-PCR 检测(α -Tubulin 作为内参对照); B. 银鲫 *dmrt2b* 在胚胎发育过程中的原位杂交图

A. RT-PCR detection of *CagDmrt2b* expression in gibel carp tissues (α -Tubulin was used as control. M is marker); B. Whole mount *in situ* hybridization of gibel carp *dmrt2b* during the embryogenesis

2.4 银鲫 *dmrt2b* mRNA 可以挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降胚的表型

在以前的研究中^[12], 我们已经通过 morpholino 敲降技术获得了斑马鱼 *dmrt2b* 的敲降胚胎。为了确定银鲫 *dmrt2b* 是否和斑马鱼 *dmrt2b* 有一样的功能, 最直接的证据就是银鲫 *dmrt2b* 是否能够挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降胚的表型。我们用斑马鱼 *dmrt2b* 的特异 morpholino 和体外转录合成的银鲫 *dmrt2b* mRNA 对斑马鱼胚胎共注射。同时用注射斑马鱼 *dmrt2b* 的特异 morpholino (*Dmrt2b*-MO)的斑马鱼胚胎和注射对照 morpholino(Cont-MO)的斑马鱼胚胎作为对照组。实验结果表明(图 3), 向斑马鱼 *Dmrt2b*-MO 敲降胚中注射银鲫 *dmrt2b* 可以使畸形的比例从 73.3% 降到 26.7%, 说明银鲫 *dmrt2b* mRNA 可以挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降胚的表型。同时也表明银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 有相同的功能。

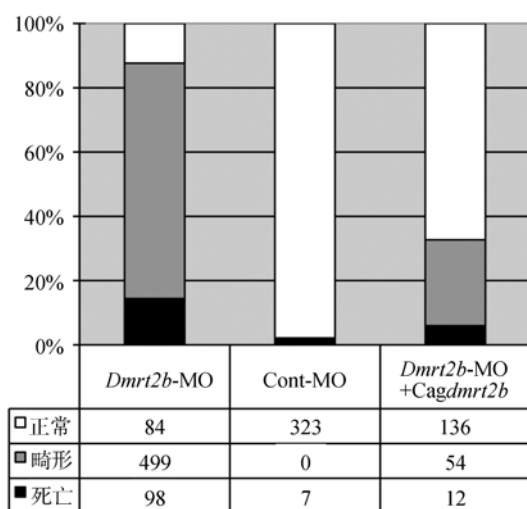


图 3 银鲫 *dmrt2b* mRNA 挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降胚试验的数据统计

Fig. 3 The statistical data of experiments on *dmrt2b* knockdown, control, and gibel carp *dmrt2b* mRNA rescue

3 讨论

本实验克隆了银鲫 *dmrt2b* 基因。通过分析比较银鲫 *dmrt2b* 和斑马鱼 *dmrt2b* 内含子外显子结构, 我们发现银鲫的 *dmrt2b* 同斑马鱼 *dmrt2b* 有很高的同源性, 并且是直系同源关系, 因此推测其功能应该相似。为了证明这点, 我们首先分析了银鲫 *dmrt2b* 的表达图式, 发现其拥有和斑马鱼 *dmrt2b* 类似的表达图式, 都是在体节发生过程中在体节中表达, 然后在肌肉中有表达。这进一步提示我们银鲫和斑

鱼的 *dmrt2b* 同样也拥有类似的功能。

如果银鲫和斑马鱼的 *dmrt2b* 基因有一样的生化功能, 那么银鲫的 *dmrt2b* 基因应该能替代斑马鱼的 *dmrt2b* 基因在胚胎发育过程中发挥作用。确实, 在挽救试验中, 我们发现, 向斑马鱼 *dmrt2b* 基因敲降的胚胎中注射外源的银鲫的 *dmrt2b* 基因能够挽救斑马鱼 *dmrt2b* 敲降后的畸形比率。这是最直接证明这两个 *dmrt2b* 基因有相同功能的证据。所以根据本实验室之前在斑马鱼中的工作, 我们有理由相信, 银鲫 *dmrt2b* 基因同斑马鱼一样, 是通过 Hedgehog 信号通路参与体节发生过程, 并且同时参与了维持躯体左右不对称的建立。当然, 这些具体功能的证明还需要更多的在银鲫中直接敲降 *dmrt2b* 后观测到其他标记基因的变化来作为证据。

由于银鲫 *dmrt2b* 基因和斑马鱼 *dmrt2b* 基因是直系同源基因, 而且它们的功能是一致的, 也就是说它们都相对于各自的 *dmrt2a* 基因发生了功能歧化, 产生了新的功能。这说明银鲫重复基因 *dmrt2b* 和斑马鱼重复基因 *dmrt2b* 都产生于一个相同的多倍化事件。并且, 重复基因 *dmrt2b* 歧化产生新功能是在银鲫和斑马鱼分化之前。

参考文献:

- [1] Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(4): 409—415 [桂建芳, 周莉. 多倍体银鲫克隆多样性和双重生殖方式的遗传基础和育种应用. 中国科学生命科学, 2010, 40(2): 97—103]
- [2] Conant G C, Wolfe K H. Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(12): 938—950
- [3] Otto S P. The evolutionary consequences of polyploidy [J]. *Cell*, 2007, 131(3): 452—462
- [4] He X, Zhang J. Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution [J]. *Genetics*, 2005, 169(2): 1157—1164
- [5] Comai L. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(11): 836—846
- [6] 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
- [7] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes [J]. *Nature*, 1998, 391(6668): 691—695

- [8] Xia W, Zhou L, Gui J F. The linkage structure and phylogeny of *DMRT* gene family in the teleost fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, **33**(2): 254—263 [夏伟, 周莉, 桂建芳. 真骨鱼类 *DMRT* 基因家族的连锁结构及其系统发生. 水生生物学报, 2009, **33**(2): 254—263]
- [9] Hong C, Park B, Saint-Jeannet J. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: it is not just about sex [J]. *Dev Biol*, 2007, **310**(1): 1—9
- [10] Saúde L, Lourenço R, Gonçalves A, *et al.* Terra is a left-right asymmetry gene required for left-right synchronization of the segmentation clock [J]. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(9): 918—920
- [11] Liu J, Shi Y H, Yin J, *et al.* Screen of differentially expressed genes between gastrula embryos and tail bud embryos in gynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *J Genet Genomics*, 2005, **32**(3): 253—263
- [12] Liu S, Li Z, Gui J F. Fish-specific duplicated *dmrt2b* contributes to a divergent function through Hedgehog pathway and maintains left-right asymmetry establishment function [J]. *PLoS ONE*, 2009, **4**(9): e7261
- [13] Xia J H, Liu J X, Zhou L, *et al.* Apo-14 is required for digestive system organogenesis during fish embryogenesis and larval development [J]. *Int J Dev Biol*, 2008, **52**(8): 1089—1098
- [14] Yin J, Xia J H, Du X Z, *et al.* Developmental expression of *CagMdkb* during gibel carp embryogenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 2007, **51**(8): 761—769
- [15] Li C Y, Wang Y, Zhou L, *et al.* Cloning of red-spotted grouper TSHb promoter and its localization expression in primitive gonad and pituitary of zebrafish embryos [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 822—827 [李辰昱, 汪洋, 周莉, 等. 赤点石斑鱼促甲状腺激素 TSHb 启动子的克隆及其在斑马鱼胚胎原始性腺和垂体中定位表达. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 822—827]
- [16] Wang R, Xiao Q, Gui J F. Molecular cloning and expression analysis of fructose-1, 6-bisphosphatase in gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(6): 1130—1135 [王锐, 肖青, 桂建芳. 银鲫果糖-1,6-二磷酸酶的分子克隆与表达分析. 水生生物学报, 2010, **34**(6): 1130—1135]
- [17] Huang W, Zhou L, Liu J X, *et al.* The *EaCyp19A1A* promoter of red-spotted grouper directs the expression of GFP in early primary gonad cells of zebrafish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(3): 502—508 [黄伟, 周莉, 刘静霞, 等. 赤点石斑鱼卵型芳香化酶基因启动子调控绿色荧光蛋白在斑马鱼早期生殖腺中的表达. 水生生物学报, 2010, **34**(3): 502—508]
- [18] Mei J, Zhang Q, Li Z, *et al.* C1q-like inhibits p53-mediated apoptosis and controls normal hematopoiesis during zebrafish embryogenesis [J]. *Dev Biol*, 2008, **319**(2): 273—284
- [19] Zhou X, Li Q, Lu H, *et al.* Fish specific duplication of *dmrt2*: characterization of zebrafish *dmrt2b* [J]. *Biochimie*, 2008, **90**(6): 878—887

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GIBEL CARP *DMRT2b*

LIU Sha^{1,2} and GUI Jian-Fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract: Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) is a good model animal for evolutionary developmental biology. Our previous studies have already identified a novel fish-specific duplicated gene *dmrt2b* from gibel carp. Then we found that, in zebrafish, duplicated genes *dmrt2b* and *dmrt2a* played common overlapping functions in the establishment of left-right asymmetry of the body plan, and *dmrt2b* contributed to a divergent function in somitogenesis through Hedgehog pathway, but *dmrt2a* did not contribute to Hedgehog pathway. In this study, we cloned the full-length cDNA of gibel carp *dmrt2b*. The entire *dmrt2b* cDNA sequence was 1938 bp long and the open read frame was 1014 long, which encoded a protein with 337 amino acids. Gibel carp *dmrt2b* had a genomic organization similar to zebrafish *dmrt2b*, which had same numbers and positions of exons and introns. Therefore, gibel carp *dmrt2b* and zebrafish *dmrt2b* were orthologs. Then we analyzed expression pattern and functions involved of gibel carp *dmrt2b* during embryogenesis. By whole mount *in situ* hybridization, we found gibel carp *dmrt2b* mainly localized in the somites during embryogenesis. Then it mainly expressed in muscle of adult fish. This expression pattern was also similar to that of zebrafish *dmrt2b*. Microinjection of gibel carp *dmrt2b* mRNA into zebrafish *dmrt2b* morphants could rescue the phenotype. Above results suggested that gibel carp *dmrt2b* might have the same function with zebrafish *dmrt2b* during the embryogenesis.

Key words: Gibel carp; *dmrt2b*; Expression pattern; Genomic organization; Embryogenesis