

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00610

胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析

邓思平^{1,2} 王静杰^{1,2} 吴天利^{1,2} 朱春华^{1,2} 李广丽^{1,2}

(1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025; 2. 广东海洋大学, 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室, 湛江 524025)

摘要: 以胡子鲇(*Clarias fuscus*)为研究对象, 利用 RT-PCR 技术和 SMART RACE 技术克隆获得 *Dmrt1* 基因 cDNA 全长, 并利用生物信息学分析其结构及功能; 利用半定量 RT-PCR 技术检测胡子鲇性腺(精巢/卵巢)、肌肉、肠、肝脏、心脏、头肾、鳃丝、脑和眼等 10 种组织以及 II—V 期精巢中 *Dmrt1* 基因表达。结果表明: 胡子鲇 *Dmrt1* 基因 cDNA 全长为 1417 bp, 其中 5'非编码区(5'-UTR)为 35 bp, 3'非编码区(3'-UTR)为 516 bp, 开放阅读框(ORF)包含 864 bp, 编码 287 个氨基酸(aa), 预测所编码 DMRT1 为主要位于细胞核内的不稳定性亲水蛋白。氨基酸序列比对显示, 胡子鲇 DMRT1 与已公布的非洲胡子鲇、蟾胡子鲇、黄颡鱼等鲇形目鱼类的相似性为 83.3%—96.1%。胡子鲇 DMRT1 中具有 DMRT 基因家族共有的、保守性很高的 DM 结构域, 此结构域具有典型的“C2H2C4”锌指结构, 与上述鲇形目鱼类的相似性达 100%, 与斑马鱼、青鳉、虹鳟等鱼类的相似性为 91.9%—97.3%, 而与鸡、鼠、猪人等的相似性达 80%以上。组织表达显示, 胡子鲇 *Dmrt1* 基因仅在精巢中表达, 且 II 期精巢(即精子发生期)中 *Dmrt1* 基因表达量显著高于 III、IV 和 V 期精巢($P < 0.05$), 而卵巢及其他 8 种组织中均无表达, 表明 *Dmrt1* 是胡子鲇精巢特异性表达基因, 可能与胡子鲇的雄性性别决定、精子发生及精巢发育密切相关。

关键词: 胡子鲇; *Dmrt1*; DM 结构域; 精子发生; 表达分析

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)04-0610-08

一般认为, 动物的性别决定取决于一种开关机制, 这个“开关”可能是染色体因子, 如在哺乳动物中, Y 染色体上的性别决定因子决定了个体的雄性性别; 也可能是温度、激素、营养条件和社会关系等环境因子, 如龟和鳄鱼胚胎孵化的温度决定了个体的雌雄性别。鱼类是性别决定方式最为多样的一个类群, 由于进化上的原始性, 某些外部环境因素可影响其性别及其分化, 甚至在性别分化完成后发生性逆转, 但其性别决定的基础仍然是遗传基因。

Dmrt1 是第一个在小鼠及人类中克隆得到的包含 DM 结构域的基因, 在不同物种的性腺中均有表达, 已证实 *Dmrt1* 可参与性别分化及精巢发育^[1]。Aoyama, *et al.*^[2]发现皱皮蛙(*Hoplobatrachus rugulosus*)在蝌蚪期和变态发育为成蛙的精巢中均有

DMRT1 蛋白表达, 而在卵巢发育时未发现, 但在雌性向雄性逆转时的性腺中有表达。Craig, *et al.*^[3]发现鸡胚中的 *Dmrt1* 是精巢形态发生时的必需基因。而人类在性别决定时, *Dmrt1* 只在雄性胚胎生殖嵴中特异性表达^[4], 缺失该基因的 XY 型配子在睾丸发育时会产生雌性化。

近年来, 采用半定量 RT-PCR 和 DNA-walking 等方法, 已从尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[5]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[6]、非洲胡子鲇(*Clarias gariepinus*)^[7]和黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)^[8]等鱼类中克隆得到了 *Dmrt1* 基因。定量 PCR 和 FISH 法研究显示, 性别未分化的尼罗罗非鱼, *Dmrt1* 只在未来发育成雄鱼的原始生殖细胞周围的细胞中表达。在成熟雄鱼中, *Dmrt1* 特异地表达于足细胞中; 而在雌鱼

收稿日期: 2011-07-12; 修订日期: 2012-04-11

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划重点项目(桂科合 1140009-4)资助

作者简介: 邓思平(1974—), 男, 重庆合川人; 博士; 研究方向为水产经济动物繁殖生理与性别控制。E-mail: sipingdeng@gmail.com

通讯作者: 李广丽, 教授; E-mail: ligl@gdou.edu.cn

的发育过程中, 几乎检测不到 *Dmrt1* 的表达^[5]。非洲胡子鲇的 *Dmrt1s*(*Dmrt1a/b/c*)基因只在精巢中特异表达, 且生殖前期表达量较高, 并从精巢发育开始出现表达^[7]。而斑马鱼, *Dmrt1* 在 30%外包期表达量最高, 并成为雄鱼胚胎期的标志基因^[6]。

胡子鲇(*Clarias fuscus*)又称塘虱鱼, 属鲇形目(Siluriformes)、胡子鲇科(Clariidae)、胡子鲇属, 是我国南方大面积养殖的淡水经济鱼类之一。其适应性强, 营养价值高, 肉质细嫩, 具有重要的经济和药用价值。胡子鲇雌、雄个体生长速度存在显著差异, 雄鱼生长速度远远高于雌鱼, 且雄鱼市场售价普遍高于雌鱼。鉴于以上原因, 开展胡子鲇性别控制研究, 可有效节约养殖成本、提高经济效益。目前国内外对胡子鲇的研究多集中于养殖等方面, 而对其性别决定相关基因方面的研究尚未见报道。本研究以胡子鲇为实验对象, 利用 RT-PCR 技术和 SMART RACE 技术克隆 *Dmrt1* 基因 cDNA 全长, 并利用半定量 RT-PCR 技术检测胡子鲇性腺(精巢/卵巢)、肌肉、小肠、肝脏、心脏、头肾、鳃丝、脑和眼等 10 种组织以及 II—V 期精巢中 *Dmrt1* 基因表达, 旨在探索雌、雄胡子鲇性别决定相关基因的表达变化及其生理功能, 为后续胡子鲇单性育种及性别决定和性腺发育分子机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用胡子鲇购自广西玉林市牧源渔牧有限公司。1 龄性成熟胡子鲇体长 20—30 cm, 体重 250—380 g, 雌、雄胡子鲇各 3 尾, 取性腺(精巢/卵巢)、肌肉、小肠、肝脏、心脏、头肾、鳃丝、脑和眼等 10 种组织, 存于-80℃冰箱用于 *Dmrt1* 基因克隆及

组织分布检测。3—12 月龄胡子鲇雄鱼, 体长 5—30 cm, 体重 18—200 g, 实验室循环水系统内饲养, 实验期间水温(25±1)℃。每 10 天随机取 3 尾鱼, 迅速取精巢组织, 一部分用 Bouin's 液固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色, 用于性腺组织学鉴定; 另一部分保存于-80℃冰箱, 用于各发育时期精巢 *Dmrt1* 基因 mRNA 表达的检测。

1.2 试剂

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen, Ex Taq™ 和 pMD18-T 载体购自 Takara, M-MLV Reverse Transcriptase 购自 Promega, SMART RACE 试剂盒购自 Clontech。其余均为国产分析纯试剂, 购自上海生工生物有限公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 由广东海洋大学水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存。

1.3 方法

引物 聚合酶链式反应(PCR)反应引物(表 1)。根据基因库(GenBank)中鱼类 *Dmrt1* 基因保守序列设计简并引物 P1 和 P2, 根据获得的 *Dmrt1* 基因保守区片段设计特异性引物 P3 和 P4 以检测各组织 *Dmrt1* 的表达变化, GSP1 和 GSP2 引物分别用来扩增 *Dmrt1* cDNA 的 3'末端和 5'末端。β-actinF 和 β-actinR 作为内参引物扩增胡子鲇的 β-actin 基因。所有引物由上海生工生物工程公司合成。

Dmrt1 基因克隆 利用 SMART RACE 试剂盒克隆胡子鲇 *Dmrt1* cDNA。以胡子鲇精巢为材料, 提取总 RNA 后, 进行反转录, 用简并引物(P1 和 P2)扩增胡子鲇 *Dmrt1* 部分编码区域, PCR 反应体系为 25μL, 反应条件为预变性 94℃ 5min, 变性 94℃ 30s, 退火 54℃ 30s, 延伸 72℃ 30s, 35 个循环后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶上电泳, 进

表 1 克隆胡子鲇 *Dmrt1* cDNA 序列及检测表达所用引物
Tab. 1 Primers used for cloning and expression analysis of *C. fuscus Dmrt1*

引物 Primer	序列 Sequence	碱基位置 Position of base
P1	5'-AARGGMCACAARCGCTTCTG-3'	Nt(169-189)
P2	5'-WAGGARTGCATVCGGTACTG-3'	Nt(623-641)
P3	5'-GTGAAGAATGAGCCGGGAAATG-3'	Nt(341-362)
P4	5'-ATACGGTACTGCTGGGACATG-3'	Nt(613-633)
GSP2	5'-TCGCTCCCACTGCAAAGCCGTAATCAT-3'	Nt(360-386)
GSP1	5'-CTGGGACCCGCTCCTCTTTGACGCA-3'	Nt(414-438)
β-actinF	5'-GACATCAAGGAGAAGCTGTGCT-3'	
β-actinR	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTG-3'	

行割胶回收、载体连接、转化、提取质粒、酶切鉴定后测序。3'末端和 5'末端序列的扩增采用 SMART RACE, 实验流程参照 SMART RACE 试剂盒操作说明进行。

生物信息学分析 所得 *Dmrt1* 保守区片段、3'端序列及 5'端序列经 DNAMAN 5.0 及 DNASTAR 拼接, 并推导氨基酸序列。NCBI 在线序列比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 在线查找开放阅读框。利用 DNASTAR NCBI 和 SMART 分析开放阅读框编码氨基酸所组成的蛋白质结构特点、理化性质及所含结构域等。应用蛋白分析专家系统服务器 ExPASy 在线分析工具 ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>), 预测氨基酸序列的相对分子质量、等电点、稳定性指数等, 利用 SWISS-MODEL (<http://swiss-model.expasy.org/>) 进行蛋白质高级结构预测。根据 GenBank 中一些已有鱼类的 DMRT1 蛋白序列, 用 MEGA 4.0 邻位相联法 neighbor-joining, 构建各物种 DMRT1 氨基酸系统进化树。

***Dmrt1* mRNA 组织及精巢发育中的表达** 首先根据性腺组织学特征确定胡子鲶精巢发育时期。取 II—V 期精巢及上述 10 种组织, 提取 RNA 样品, 经 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一链。以反转录产物为模板, 以 P3、P4 为引物进行 PCR 扩增, β -actinF/R 作引物扩增内参基因, 反应体系为 25 μ L。PCR 程序为 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 35 个循环后 72℃延伸 10min。取 RT-PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳, 利用 Quantity One 4.2 凝胶分析软件对电泳图像进行分析。使用 SPSS 17.0 数据统计软件中 ANOVA 和 Duncan's 比较 *Dmrt1* mRNA 表达量差异, 结果以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示, 当 $P<0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 胡子鲶 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 全长及生物信息学分析

以胡子鲶精巢 RNA 反转录 cDNA 为模板, 以简并引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 获得 473 bp 的预期片段; 利用引物 GSP1 和 GSP2, 分别进行 SMART-RACE-PCR, 分别获得 3'末端 1003 bp 及 5'末端 432 bp 的条带, 拼接后获得胡子鲶 *Dmrt1* cDNA 全长(登

录号: JN033791)。胡子鲶 *Dmrt1* cDNA 序列由 1417 个核苷酸组成, 含完整编码序列, 其开放阅读框 (ORF) 为 864 bp, 编码 287 个氨基酸; 5'非编码区 (5'-UTR) 为 35 bp, 3'-UTR 含 516 bp。

所得序列与 Genbank 上 *Dmrt1* 已知序列进行相似性检索比对, 核苷酸序列与非洲胡子鲶 (*Clarias gariepinus*)、蟾胡子鲶 (*Clarias batrachus*)、黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)、南方鲇 (*Silurus meridionalis*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和花溪鲮 (*Mangrove Rivulus*) 分别有 77%、62%、66%、62%、13% 和 13% 的相似性。氨基酸序列同源性分析表明, 胡子鲶 DMRT1 与同属鲇形目鱼类的蟾胡子鲶、非洲胡子鲶、黄颡鱼、南方鲇 DMRT1 的同源性最高, 其相似性分别为 96.1% 和 93%、88.9% 和 83.3%。与鸡、鼠和人的相似度最低, 分别为 42.5%、43.6% 和 45.6%。胡子鲶的 DM 结构域与非洲胡子鲶、蟾胡子鲶、黄颡鱼等鲇形目的相似性高达 100%, 与斑马鱼、青鳉 (*Oryzias latipes*)、虹鳟等鱼类的相似性分别为 91.9%—97.3%, 而与鸡、鼠、猪人等的相似性为 80% 以上。摘录 Genbank 中青鳉 (Japanese medaka, AAL02165)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*, Grouper, EF017802)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*, Bream, AAP84972)、牙汉鱼 (*Odontesthes bonariensis*, Pejerrey, AAP84606)、罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, Tilapia, AAF79931)、黄鳝 (*Monopterus albus*, Rice field eel, AAP80398)、细棘海猪鱼 (*Halichoeres tenuispinis*, wrasse, AAO18650)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, Pufferfish, CAC42778)、三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*, Stickleback, AAW62304)、花斑剑尾鱼 (*Xiphophorus maculatus*, Platyfish, AAN65377)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*, Trout, AAG17544)、斑马鱼 (*Danio rerio*, Zebrafish, AAU04562)、蟾胡子鲶 (walking catfish, ACR77514)、非洲胡子鲶 (African catfish, AAQ04554)、黄颡鱼 (yellow catfish, ADM07317)、大鳞副泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*, ABK88911)、人 (human, NP068770)、南方鲇 (southern catfish, ABM54574) 及鼠 (mouse, NP056641) 的 DMRT1 氨基酸序列, 利用 MEGA 4.0 的 Neighbor-joining 法构建的氨基酸进化树显示 (图 1), 所有鱼类聚为同一亚族, 而脊椎动物中的人与鼠和鸡聚为另一大支。其中胡子鲶、蟾胡子鲶、非洲胡子鲶、南方鲇、黄颡鱼聚为一支, 胡子鲶与蟾胡子鲶亲缘关系最近, 这与其分类地位一致。

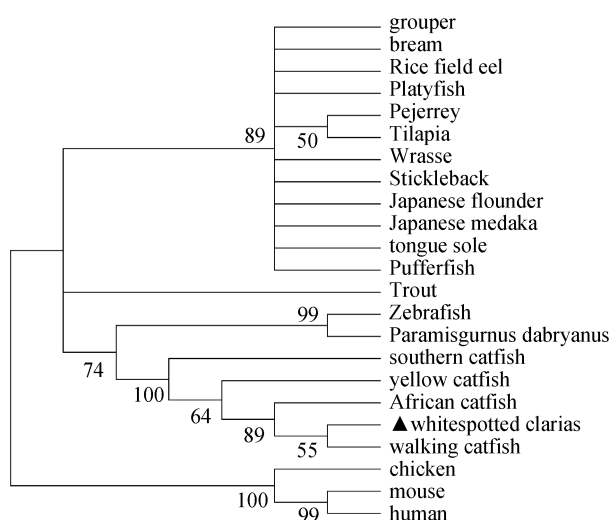


图 1 基于 NJ 法构建的胡子鲇 DMRT1 和其他鱼类的 DMRT1 氨基酸系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *C. fuscus* and other species DMRT1 amino acid sequence based on NJ method

置信度(Bootstraps)1000 次检验各分支置信度

Distances are used to construct the phylogenetic tree and bootstrap values based on 1000 re-sampling replicates

SMART 和 NCBI 在线预测, *Dmrt1* 基因 N 端 29—82 位具有一个与果蝇 *dxs* 和 *mab-3* 和线虫 *Doublesex* 相似的 DM 结构域, 该结构域包含一个锌螯合残基“C2H2C4”, 可使 DMA 二聚化并形成可与其结合的回文结构。预测蛋白结构分析表明, 胡子鲇 *Dmrt1* 编码 287 个氨基酸, 分子式为 $C_{1332}H_{2069}N_{387}O_{433}S_{21}$, 理论分子量为 31.2 kD, 等电点为 7.158, 蛋白不稳定系数为 69, 总平均亲水性 (GRAVY)-0.611。DMRT1 蛋白三级结构中, DM 结构域范围 31—75 aa, 与其他蛋白的最高一致性达

64.444%。DMRT1 与果蝇性别决定基因 *Dsx* 的 DM 结构域有相同构型, 即具有一个与 DNA 结合的锌指结构蛋白(图 2)。DMRT1 无明显信号肽切割位点, 无信号肽, 位于细胞核中可能性最大, 为 47.8%, 其次为细胞质, 可能性为 34.8%, 而位于线粒体、质膜或细胞骨架中的可能性分别为 4.3%、4.3%和 8.7%。

2.2 胡子鲇 *Dmrt1* 基因在不同组织及精巢发育时期的 mRNA 表达

以获得的 *Dmrt1* cDNA 序列设计特异引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增, 在所检测的肌肉、肠、肝脏、心脏、头肾、鳃丝、脑、精巢和卵巢等 10 种组织中, 仅精巢中扩增出一条 473 bp 的预期条带, 其他组织中均未检测到 *Dmrt1* 基因表达(图 3)。

性腺组织切片显示(图 4), II 期精巢以精原细胞或分裂中的精原细胞为主; III 期精巢内可见生精小管管腔, 其中充满初级精母细胞, 精母细胞圆形或椭圆形; IV 期精巢精细小管内具有大量次级精母细胞; V 期精巢中可观察到大量精子细胞和变态成熟的精子。选取经组织切片鉴定的 II、III、IV 和 V 期精巢, 半定量 PCR 显示(图 5), II 期精巢 *Dmrt1* 相对表达量最高, 为 0.8360 ± 0.0323 , III 期精巢为 0.5940 ± 0.0509 , IV 期精巢为 0.6609 ± 0.0458 , V 期精巢为 0.6053 ± 0.0536 。II 期精巢 *Dmrt1* mRNA 表达显著高于 III、IV 和 V 期($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 胡子鲇 *Dmrt1* 保守性及系统进化分析

Dmrt1 基因是 DMRT 超基因家族中的一员, 该基因是目前发现的唯一一个从无脊椎动物到脊椎动

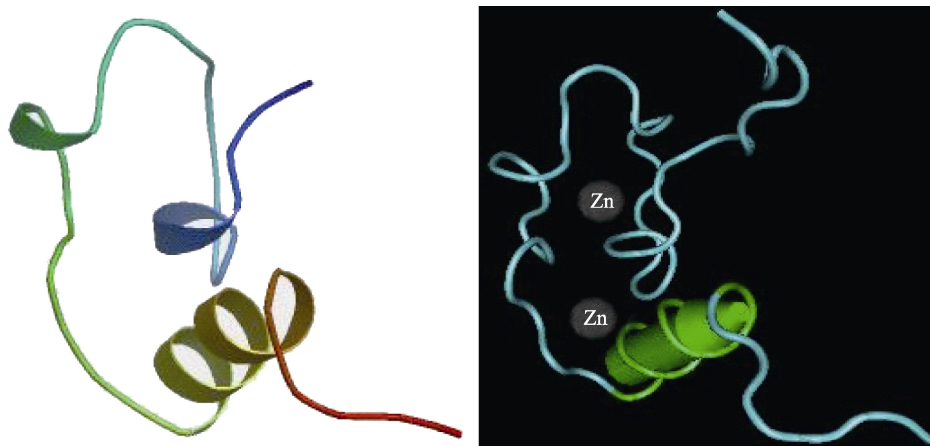


图 2 胡子鲇(左)DMRT1 DM 结构域与果蝇(右)dsx DM domain 模拟三级结构比较

Fig. 2 Prediction tertiary structure of DMRT1 in *C. fuscus* (left) and *Drosophila* (right)

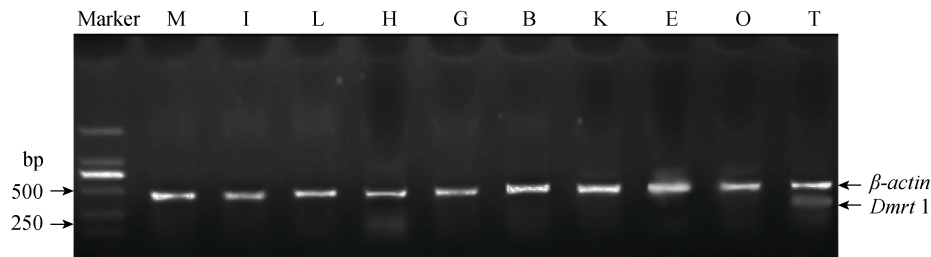
图3 胡子鲇组织中 *Dmrt1* 的表达

Fig. 3 RT-PCR analysis of *Dmrt1* expression from the tissues of *C. fuscus* (35 cycles)
M. 肌肉; I. 肠; L. 肝脏; H. 心脏; G. 鳃丝; B. 脑; K. 头肾; E. 眼; O. 卵巢; T. 精巢
M. muscle; I. intestine; L. liver; H. heart; G. gill; B. brain; K. kidney; E. eye; O. ovary; T. testis

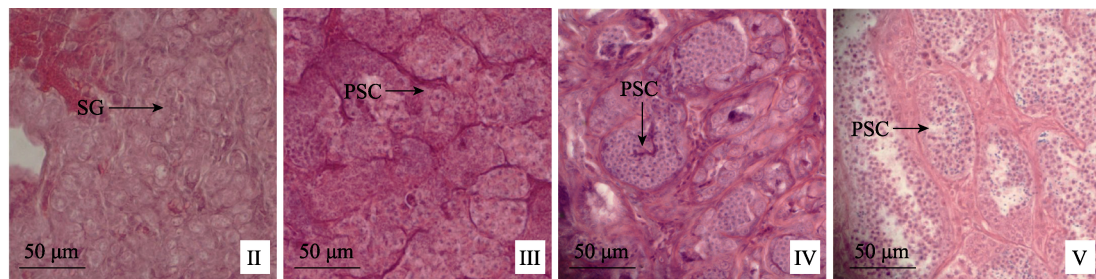


图4 胡子鲇不同时期精巢性腺组织学特征

Fig. 4 Gonadal histology of different phase testis of *C. fuscus*

SG. 精原细胞; PSC. 初级精母细胞; SSC. 次级精母细胞; SZ. 精子; II. II期精巢; III. III期精巢; IV. IV期精巢; V. V期精巢
SG. spermatogonia; PSC. primary spermatocyte; SSC. secondary spermatocyte; SZ. spermatozoa; II. testis on stage II; III. testis on stage III; IV. testis on stage IV; V. testis on stage V

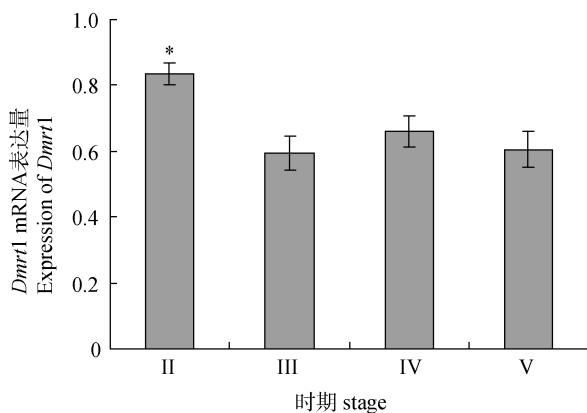
图5 胡子鲇各期精巢 *Dmrt1* 基因表达差异

Fig. 5 Expression of *Dmrt1* in testis from stage II to V in *C. fuscus*
数据表示为平均值±标准误, *表示精巢不同发育时期具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Data as means±SE; *indicates significant difference among testis ($P < 0.05$)

物均存在、与性别决定相关的保守性基因。*Dmrt1* 基因在鱼类、爬行类、鸟类和哺乳动物的性腺中都有表达, 在雄性中表达量高于雌性^[9], 并被认为是尼罗罗非鱼精巢分化的分子标记^[5]。*Dmrt1* 基因控制精巢发育的多个方面, 包括分化和细胞增殖、细胞迁移及生殖细胞的全能性, 并且控制足细胞的增殖

和分化^[10]。

在本实验中, 胡子鲇 *Dmrt1* 具有一个保守区, 该保守区编码一段 53 个氨基酸的 DM 结构域, 可与下游目的 DNA 以锌指形式相结合, 以调控下游目的基因的表达。此基因与其他鱼类的 *Dmrt1* 基因同源性最高, 因此是 DMRT 家族中的 *Dmrt1* 基因。胡子鲇 *Dmrt1* 基因 DM 结构域与人同源性为 83.78%, 与斑马鱼同源性是 97.3%, 与非洲胡子鲇同源性达 100%。在线预测该基因开放阅读(ORF)框编码 287 个氨基酸, 与非洲胡子鲇^[7]DMRT1a 预测蛋白长度相同。胡子鲇 DM 结构域在氨基酸组成上与多个不同分类地位的物种具有高度同源性, 即 29 个氨基酸完全相同, 约占整个 DM 区(37 个氨基酸)的 78%。胡子鲇 *Dmrt1* 基因序列比对结果显示, 在 DM 结构域外, 胡子鲇 *Dmrt1* 与人、鼠相似度较低, 但与蟾胡子鲇和非洲胡子鲇的相似度较高, 表明 *Dmrt1* 基因在不同进化地位的物种间仍然具有一定差异。

Xia, et al.对多种鱼类 *Dmrt1* 的系统树表明, *Dmrt1* 与性别分化方式有关^[11]。我们在其原有种类的基础上加入半滑舌鳎^[12]、牙鲆^[13]、大鳞副泥鳅^[14]等温度敏感性鱼类的 *Dmrt1* 后, 其聚类结果显示,

Dmrt1 系统树并不完全符合进化地位。脊椎动物中的鸡、鼠、人, 鲇形目中的南方鲇、黄颡鱼、非洲胡子鲇、蟾胡子鲇和胡子鲇, 鲤形目中的斑马鱼和大鳞副泥鳅, 鲱形目的虹鳟分别各聚为一类。其中蟾胡子鲇、非洲胡子鲇和胡子鲇亲缘关系最近, 聚类结果与形态学分类结果相一致, 而具备自发性逆转或温度敏感的鲑形目的红鳍东方鲀, 鲈形目的半滑舌鳎、牙鲆, 鲹形目的青鲈、剑尾鱼、刺形目的三刺鱼, 鲈形目的细棘海猪鱼、罗非鱼、斜带石斑鱼、黑鲷, 银汉鱼目的牙汉鱼, 合鳃目的黄鳝等聚为一大类, 呈现出与性别分化密切相关的趋势。但例外的是大鳞副泥鳅, 其性别分化虽具有明显的温度敏感性, 却并不与之聚为一类, 表明 *Dmrt1* 在鱼类性别分化中的作用机制和普遍特征还有待更多的研究来证实。

3.2 胡子鲇 DMRT1 蛋白结构功能预测

利用生物信息学方法分析胡子鲇 DMRT1 蛋白结构, 发现 DMRT1 无 N 端信号肽结构, 表明 DMRT1 蛋白为细胞内蛋白。不稳定系数为 69, 大于 40, 因此推测该蛋白不稳定。ExPASy 预测显示胡子鲇 DMRT1 的 GRAVY 为 -0.611, 为负值, 表明该蛋白为亲水性蛋白。经蛋白亚细胞定位分析, 推测胡子鲇 DMRT1 蛋白主要位于细胞核内, 与其基因转录调控作用的特性相符。胡子鲇 DMRT1 多数预测指标结果与奥利亚罗非鱼 DMRT1 相同^[15]。

胡子鲇 DMRT1 的 DM 结构域内包含一个典型的“C2H2C4”锌指结构以螯合锌离子。一般锌指蛋白可与受控基因的启动子结合来调控下游目的基因的表达, 作用足细胞(Sertoli cell)从而影响精巢发育^[16]。在三维构型上, 胡子鲇 DMRT1 的 DM 结构域与果蝇性别决定基因 *dsx* 的 DM 结构域构型极为相似, 推测可能与胡子鲇的雄性性别决定有关。

3.3 胡子鲇 *Dmrt1* 的时空表达

Dmrt1 在鱼类^[17]胚胎生殖嵴中特异性表达。对小鼠的研究发现, *Dmrt1* 基因通过控制哺乳动物精子细胞有丝分裂向减数分裂转化来调控精原细胞的发育及分化^[18]。在本实验中, *Dmrt1* 仅在胡子鲇雄性成体精巢中表达, 卵巢和脑等其他组织中均不表达, 此结果与黑鲷^[8]、非洲胡子鲇^[7] 和尼罗罗非鱼^[5]等研究结果一致, 表明 *Dmrt1* 是上述鱼类的雄性特异表达基因, 推测与精巢发育有关, 而对器官发育功能的维持不具有直接作用。但在斑马鱼^[19]、银汉鱼^[20]

和虹鳟^[21], *Dmrt1* 除在雄鱼精巢中大量表达, 卵巢中也有微量的表达, 推测其可能也与卵子发生相关。

免疫荧光技术发现, 非洲胡子鲇 *Dmrt1* 蛋白位于精母细胞和精原细胞中, 暗示该基因可能在精子发生过程中发挥作用。外源激素甲基睾酮(MT)处理后, 从精巢发育开始 *Dmrt1* 基因就开始表达, 间性性腺(Ova-testis gonad)中也有分布^[7]。斑马鱼精原细胞、精母细胞和精子细胞中均检测到 *Dmrt1*^[19]。一年繁殖两次的银汉鱼(*O.bonariensis*), *Dmrt1* 在第二次繁殖开始即精子再次发生时表达量增高^[20]。而虹鳟的 *Dmrt1* 从精子发生期开始到精子发生期结束均稳定表达, 但在精子释出后表达量下降^[21]。在本实验中, 胡子鲇 III、IV 和 V 期精巢中 *Dmrt1* 基因恒定表达, II 期表达量显著性高于其他时期, 这种表达模式与斑马鱼^[19]、黑鲷^[8]、银汉鱼^[20]及非洲胡子鲇^[7] 相类似, 即在精原细胞和精母细胞大量存在时(活跃的精子发生期)大量表达。显然, 胡子鲇 *Dmrt1* 基因表达情况与其性腺组织学特征相符。据此推测, *Dmrt1* 在雄鱼中具有普遍的表达模式: 繁殖前、准备繁殖及精子发生时期大量表达, 繁殖期表达量反而逐渐降低。

综上所述, 胡子鲇 *Dmrt1* 基因系精巢特异性表达基因, 具有保守的 DM 结构域, 所编码 DMRT1 主要位于细胞核内, 为不稳定性亲水蛋白; *Dmrt1* 基因在各期精巢均有表达, 但以 II 期精巢表达量最高, 表明其与精子发生及精巢发育密切相关, 并可能与精巢功能的维持有关。

参考文献:

- [1] Villella A, Hall J C. Courtship anomalies caused by double sex mutations in *Drosophila melanogaster* [J]. *Genetics*, 1996, **143**(1): 331—344
- [2] Aoyama S, Shibata K, Tokunaga S, et al. Expression of *Dmrt1* protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians [J]. *Cytogenetic Genome Research*, 2003, **101** (3—4): 295—301
- [3] Craig A. Smith, Kelly N. Rosezler, Thomas Ohnesorg, et al. The conserved Z-linked gene, *DMRT1*, is required for testicular morphogenesis in the chicken embryo [J]. *Developmental Biology*, 2010, **344**(1): 485—486
- [4] 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
- [5] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G. Sexual dimor-

- phic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Developmental Dynamics*, 2008, **237**(1): 297—306
- [6] Chen Y, Wang Y L, Tian J, *et al.* Expression analysis of genes which related to sex determination of zebrafish [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, **3**(5): 10—16 [陈芸, 王艺磊, 田佳, 等. 斑马鱼性别决定相关基因的表达分析. 水生态学杂志, 2010, **3**(5): 10—16]
- [7] Raghuveer K, Senthilkumaran B. Identification of multiple *dmrt1*s in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyl testosterone treatment [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2009, **42**(5): 437—448
- [8] Liu X S, Liang B, Zhang S Y. cDNA cloning, tissue distribution and mrna transcription of *dmrt1* gene in the Protandrous black porgy *Acanthopagrus schlegeli* [J]. *Zoological Research*, 2004, **25**(2): 158—161 [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. 动物学研究, 2004, **25**(2): 158—161]
- [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]. *Developmental Biology*, 1999, **215**(2): 208—220
- [10] Kim S, Bardwell V J, Zarkower D. Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation [J]. *Developmental Biology*, 2007, **307**(2): 314—327
- [11] Xia W, Zhou L, Yao B, *et al.* Differential and spermatogenic cell-specific expression of *DMRT1* during sex reversal in protogynous hermaphroditic groupers [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, **263**(1—2): 156—172
- [12] Deng S P, Chen S L, Tian Y S, *et al.* Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, **14**(5): 714—719 [邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响. 中国水产科学, 2007, **14**(5): 714—719]
- [13] Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, *et al.* Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1999, **23**(2): 167—176
- [14] Nan P, Du Q Y, Yan S G, *et al.* Effects of temperature on sex differentiation of gonads and the cloning and expression of CYP19a in two species of loaches [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(5): 407—413 [南平, 杜启艳, 燕帅国, 等. 温度对泥鳅和大鳞副泥鳅性腺分化的影响和 CYP19a 基因的克隆与时空表达. 中国水产科学, 2005, **12**(5): 407—413]
- [15] Cao J L, Chen J J, Wu T T. Structural and functional prediction of *Dmet1* deduced protein in *Oreochromis aureus* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, **18**(4): 403—408 [曹谨玲, 陈剑杰, 吴婷婷. 奥利亚罗非鱼 *Dmet1* 基因推导蛋白的结构和功能预测. 上海海洋大学学报, 2009, **18**(4): 403—408]
- [16] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, **346**(6281): 240—244
- [17] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *Sox9a* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Developmental Dynamics*, 2008, **237**: 297—306
- [18] Matson C, Murphy M, Griswol M. The mammalian double-sex homolog *DMRT1* is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells [J]. *Developmental Cell*, 2010, **19**(4): 612—624
- [19] Guo Y Q, Cheng H H, Huang X, *et al.* Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish *Dmrt1* [J]. *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 2005, **330**(3): 950—957
- [20] Fernandino J I, Guilgur L G, Somoza G M. *Dmrt1* expression analysis during spermatogenesis in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 2006, **32**(3): 231—240
- [21] Marchand O, Govoroun M, Cotta H D, *et al.* *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, **1493**(1—2): 180—187

cDNA CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *Dmrt1* IN *CLARIAS FUSCUS*

DENG Si-Ping^{1,2}, WANG Jing-Jie^{1,2}, WU Tian-Li^{1,2}, ZHU Chun-Hua^{1,2} and LI Guang-Li^{1,2}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Sex of fish is determined by both genetic substance and environment. The studies on the relationship between the sex and sex-related genes expression can not only reveal the mechanisms of sex determination, but also provide the theoretical basis to control the sex differentiation in artificial propagation in the fish. Catfish (*Clarias fuscus*) is a common freshwater fish in China. The *Dmrt1* cDNA sequences were isolated from the testes of *C. fuscus* by RT-PCR and SMART RACE. Structure and function of the predicted DMRT1 protein were analyzed by bioinformatics. Expressions of *Dmrt1* were examined using semi-quantitative RT-PCR in ten tissues (testes, ovaries, muscles, intestine, livers, heart, head kidney, gills, brains and eyes) and the testes from stage II to stage V. Results showed that the *Dmrt1* complete cDNA was 1417 bp in length, and the 5' un-translated region (5'-UTR) and the 3' un-translated region (3'-UTR) were 35 bp and 516 bp, respectively. The open reading frame (ORF) was 864 bp, and a sequence of predicted 287 amino acids residues was encoded. The *C. fuscus* DMRT1 shared a higher amino acid identity of 83.3% to 96.1% with three Siluriformes fishes such as *C. gariepinus*, *C. batrachus* and *Pelteobagrus fulvidraco*. DMRT1 protein coded by *Dmrt1* gene located mainly in nucleus, and worked as an unstable hydrophobic protein. A highly conserved DM domain was found in the DMRT1 protein, which was a common characteristic in DMRT clusters. The *C. fuscus* shared a higher DM domain identity of 100% with the above-mentioned Siluriformes fishes, 91.9% to 97.3% with *Danio rerio*, *Oryzias latipes* and *Oncorhynchus mykiss*, and over 80% with chicken, rat, pig and human. In addition, the DM domain of *C. fuscus* had a typical "C2H2C4" zinc finger structure, which bound with the downstream DNA and control the gene transcription. Expression of *Dmrt1* was found only in the testes, but not in ovaries, muscles, intestine, liver, heart, head kidney, gills, brain and eyes, which suggested that *Dmrt1* was a testis-specific gene in *C. fuscus*. The expression of *Dmrt1* in testes stage II (spermatogenesis) was significantly higher compared with the testes from stage III to stage V ($P < 0.05$), which indicated that *Dmrt1* was related to sex determination, spermatogenesis and testes development in male *C. fuscus*.

Key words: *Clarias fuscus*; *Dmrt1*; DM domain; Spermatogenesis; Expression analysis