

马氏珠母贝 *Dm rt5* 基因的克隆及时序表达模式分析

于非非¹ 桂建芳² 周 莉² 王梅芳¹ 余祥勇¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025; 2. 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)

摘要: *Dm rt* (Double sex and Mab-3 related transcription factor) 基因是一类含有高度保守的 DM (Double sex and Mab-3) 结构域的基因家族, 该基因家族的很多成员都参与了性别决定和分化过程的调控。目前已研究了很多物种的 *Dm rt* 基因, 但对于具有重要进化地位和经济价值的贝类, 却鲜见相关报道。*Dm rt5* 作为 *Dm rt* 基因家族的重要成员, 是否也参与了动物的性别决定与分化的调控, 至今为止没有定论。采用 RACE-PCR 技术, 从马氏珠母贝 (*Pinctada matensii*, Dunker) 精巢的 SMART cDNA 中克隆了 *Dm rt5* 基因的全长 cDNA 序列。同源性比对显示, *pnDm rt5* 编码的氨基酸序列与海胆、线虫、青鳉、斑马鱼、爪蟾和小鼠的 *Dm rt5* 基因的一致性分别为 17.2%、26.7%、24.8%、18.7%、20.8% 和 15.8%。虽然各个物种间同源性并不高, 但他们的 DM 结构域是高度保守的。RT-PCR 结果表明, *pnDm rt5* 基因在雄性性腺中的表达量显著高于鳃、外套膜、闭壳肌、消化盲囊和雌性性腺; 在早期雄性性腺、成熟期雄性性腺中的表达量显著高于性腺发育其他时期。这意味着 *pnDm rt5* 基因可能参与了马氏珠母贝性别发育的调控。

关键词: 马氏珠母贝; *Dm rt5*; 性别发育; 时序表达模式

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)05-0844-07

贝类属于无脊椎动物软体动物门, 是动物界的第二大门, 在生物进化中地位十分重要, 也是世界上最重要经济类群之一。贝类的性别表现形式多种多样, 大多数物种为雌雄异体, 如马氏珠母贝、栉江珧、企鹅珍珠贝、巴非蛤等; 少数为雌雄同体, 如海湾扇贝、光滑蓝蛤等。在雌雄异体种类的群体中, 常常发现雌雄同体个体和性别转化现象^[1,2]。参与贝类性别发育的因素可能较复杂, 很多报道表明, 营养条件、水温、群体性别比例等环境因素起一定作用^[1,3,4]。贝类的性别决定与分化是否受遗传因素的影响, 有哪些相关基因参与了此过程的调控, 至今为止鲜见报道。

Dm rt (Double sex and Mab-3 related transcription factor) 是新近发现的一个基因家族, 是目前研究较多的与性别决定与分化相关的一类基因。该家族成员与果蝇的性别决定基因 Double sex (*dsx*) 和线虫的性别决定基因 (*Mab-3*) 一样, 其编码的蛋白质都包含一个高度保守的 DM (Double sex 和 Mab-3) 结构域^[5]。*Dm rt* 基因家族的很多成员被推测在动物的性别决定与分化中起到重要作用^[5,6], 尤其

是 *Dm rt1* 和 *Dm rt2*^[7-11]。*Dm rt5* 作为 *Dm rt* 基因家族的重要成员之一, 也具有高度保守的 DM 结构域。但目前对 *Dm rt5* 的研究并不深入, 该基因是否在动物的性别发育中具有重要作用, 也没有定论。

目前关于 *Dm rt* 基因家族的研究主要集中在脊椎动物^[10,12-16], 在无脊椎动物中报道较少。贝类中, 除牡蛎的 *Dm rt5* 基因已被克隆外 (ABS88697), 没有其他相关报道。马氏珠母贝 *Pinctada matensii* (Dunker), 属软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lame-llibranchia), 珍珠贝科 (Pteriidae), 是我国人工培育海水珍珠的最主要母贝, 其所产珍珠量占整个海水珍珠产量的 95% 以上, 具有重要的生产价值。马氏珠母贝多为雌雄异体, 但在养殖群体中可以发现性别转化现象和少量雌雄同体个体。在贝类人工育种中, 利用自体受精可以培育自交系^[4,17], 但由于马氏珠母贝自然性转化的比例较低, 很大程度制约了自交系培育和良种选育的效率。所以, 对马氏珠母贝性别决定与分化相关基因的研究, 可以使我们更好地理解贝类性别转换机制, 从而为控制性别发育、提高自交系培育效率等工作打好基础。

收稿日期: 2008-03-25; 修订日期: 2008-11-16

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金 (06FB02) 资助

作者简介: 于非非 (1980—), 女, 山东威海人; 博士研究生; 主要从事贝类、鱼类分子生物学和发育生物学研究。E-mail: yufeifei2004@163.com

通讯作者: 余祥勇, Tel: 0759-2382184; E-mail: yuxyong@tom.com

在前一阶段的工作中,我们在马氏珠母贝的基因组中克隆到了 3 个具有不同序列的 DM 结构域,与青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 *Dm rt2*、*Dm rt3* 和 *Dm rt4* 分别具有 95%、93% 和 85% 的同源性^[18]。本研究从 SMART cDNA 文库中克隆了 *Dm rt5* 基因的全长 cDNA 序列,探讨 *Dm rt5* 基因的组织表达特异性及在不同时期性腺中的表达差异。结果显示,马氏珠母贝 *Dm rt5* 基因很可能参与了贝类的性别决定与分化过程的调控。

1 材料与方法

1.1 材料 取自广东省湛江市流沙湾马氏珠母贝养殖群体。

1.2 方法

1.2.1 SMART cDNA 的合成和全长 cDNA 的克隆 选择发育早期的雄性马氏珠母贝,摘取其新鲜的精巢组织,利用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒 (Promega 公司),提取其总 RNA。以浓缩后 RNA 为模板,按照 SMART cDNA library construction Kit (Clontech 公司)操作手册改进的方法,合成马氏珠母贝发育早期精巢组织的 SMART cDNA。

根据其他物种 *Dm rt5* 基因的保守序列,设计了马氏珠母贝 *Dm rt5* 基因特异的 3 RACE 引物: 5'-GAAATGTGCAAGGTGCAGG-3', 并与 SMART cDNA 文库的 3' 锚定引物 5'-GTA TCAACGCAGAG-TACTTTTTTTT-3', 以稀释 20 倍的 SMART cDNA 为模板进行扩增,获得 *Dm rt5* cDNA 的 3 端。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 进行 38 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 40 s, 51℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化、连接、克隆并测序。

在马氏珠母贝 *Dm rt5* 基因的 3 非保守序列内, 设计了 *Dm rt5* 基因特异的 5 RACE 引物: 5'-TTT-GTGCCCTTCAGTGC-3', 并与 SMART cDNA 文库的 5' 锚定引物 5'-AACGCAGAGTACGCGGG-3' 进行扩增, 获得 *Dm rt5* cDNA 的 5 端。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 进行 38 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 40 s, 53℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化、连接、克隆并测序。

将获得的 3 端序列与 5 端序列进行拼接, 获得 *Dm rt5* cDNA 全长序列。在 NCBI 进行开放阅读框

的查询、氨基酸序列推测及其同源基因的搜寻。将所获得 *Dm rt5* 基因全长的氨基酸序列用 Clustal X (1.8) 软件进行排序, 用 MEGA3 软件构建 MP 树, 分析系统进化关系。

1.2.2 RNA 的提取和 RT-PCR 检测 分别取马氏珠母贝发育三月龄幼贝性腺、早期精巢、成熟期精巢、雄性向雌性转化期性腺、发育早期卵巢、成熟期卵巢各 3 个, 再分别取马氏珠母贝雄性个体的鳃、外套膜、闭壳肌、消化盲囊、精巢和卵巢各 2 个, 利用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒 (Promega 公司), 提取其总 RNA。分别取各种总 RNA 各 0.2 μg, 用 M-MLV 逆转录酶 (Gibco BRL) (Promega 公司) 和寡聚 (dT) 15 反转录合成第一链 cDNA。

第一链 cDNA 稀释 10 倍后, 取 1 μL 作模板, 用 β -actin 基因 (上游引物序列: 5'-GTGCACTGGTCT-TCAGGGGTT-3', 下游引物序列: 5'-GGGAAGTGGATGCGTGGGTAT-3') 进行 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 32 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 40 s, 56℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min, 反应体系上覆 10 μL 矿物油。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 调整各个组织逆转录的效率都符合要求而且 cDNA 的量都相差不多。

取调试后各种 cDNA 模板 1 μL, 用正向引物: 5'-ATGAGTTCAGATGACGAGAAAGG-3' 和反向引物 5'-GTAAGAGGCCATTCGGTCCG-3' 进行 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 35 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 40 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min, 反应体系上覆 10 μL 矿物油。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。

2 结果

2.1 *Dm rt5* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

我们克隆了马氏珠母贝 *Dm rt* 基因家族中一个成员的全长 cDNA 序列为 873 bp (登录号为 FG396011), 有一个 621 bp (127—747) 的开放阅读框, 编码 206 个氨基酸, 5 非编码区长 126 bp; 3 非编码区长 126 bp。与不同物种的 *Dm rt* 基因的同源性分析发现 (图 1), 该 *Dm rt* 基因编码的氨基酸序列与海胆、线虫、青鳉、斑马鱼、爪蟾和小鼠的 *Dm rt5* 基因的一致性分别为 17.2%、26.7%、24.8%、18.7%、20.8% 和 15.8%, 且同源性最高的序列位于 DM 结构域内, 故命名为 *pmDm rt5*。

<i>Strongylocentrotus</i>	1	NNLGGPGDPPANTHPPTS-----TSPNDMPVVPFQLQPGHHHRAHHHLHQ
<i>pinctada martensii</i>	1	-----MSSDDE-----KGDSEF-----
<i>Oryzias latipes</i>	1	-----MAGNLLRGP-----
<i>Danio rerio</i>	1	MDLRPEIPFASQAGSQVHPGA-----AAAAAASLPVSVAGSLLRAP-----
<i>Mus musculus</i>	1	MELRSELPSVPGAATAAATATGPPVASVASVAAAAAASLPVSVAGSLLRAP-----
<i>Xenopus laevis</i>	1	MELN--GPPSSQVP-----HTPTCAPSLPITVAGTLLRGP-----
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	-----MPVSPSSVSVPPTSLSQLRIR-----
<i>Strongylocentrotus</i>	49	SGMPPPPGGPTGILLRAEKYPRTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCICAKCTLIA
<i>pinctada martensii</i>	13	-----SSFMRAADRYPTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCVCAKCTLIA
<i>Oryzias latipes</i>	10	-----PILLRAADKYPTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCMCAKCTLIA
<i>Danio rerio</i>	44	-----PILLRAATEKYPTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCMCAKCTLIA
<i>Mus musculus</i>	54	-----PILLRAAEKYPTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCICAKCTLIA
<i>Xenopus laevis</i>	34	-----CLLLRAAEKYPTPKCARCRNHGVVSALKGHKRYCRWDCMCAKCTLIA
<i>Caenorhabditis elegans</i>	24	-----AENCRTPKCARCRNHGTTALKGHKRYCRWDCMCAKCTLIA
<i>Strongylocentrotus</i>	109	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELGLYGETSAGAIYMMNGIAQTHKYYDPNRNQSE
<i>pinctada martensii</i>	62	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELGLYGPNG--LLQINPEHTIFPNKKHIEPSSA
<i>Oryzias latipes</i>	59	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELQLLYGTAEGLALAAANGIIPPRPMYEVFGSISSE
<i>Danio rerio</i>	93	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELQLLYGTAEGLALAAANGIIPPRPMYEVFGPSNE
<i>Mus musculus</i>	103	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELQLLYGTAEGLALAAANGIIPPRPMYEVFGSCAT
<i>Xenopus laevis</i>	83	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELQLLYGTAEGLALAAANGIIPPRPMYEVFGSCGE
<i>Caenorhabditis elegans</i>	67	ERQRMVMAAQVALRRQQAQEEENARELGLYGETSAGAIYMMNGIAQTHKYYDPNRNQSE
<i>Strongylocentrotus</i>	169	QGQGG-----QGQAGGGGADQKRARLEIRAPASP-PSANP-PPHSPTS
<i>pinctada martensii</i>	120	LDDRED-----DAPARR-----LKTDDN-DKRN-PPSHSCTS
<i>Oryzias latipes</i>	119	SNS-----ESSIPKTELFPKS-----QLSSSTP-PQSGGKPVSAE-
<i>Danio rerio</i>	153	SNSG-----ESNIQKTELFPKT-----PLPGTVI-PHQAGKSVTD-
<i>Mus musculus</i>	163	DGGGPGAGAPAGSAGGAGGAEAKLQKTFDLFPKT-----LLQAGRDPSPQPPGKPLSPDG
<i>Xenopus laevis</i>	143	GGT-----LSKIQKTFDLFPKS-----LPRSMTP-QLPSGGKPGSPDS
<i>Caenorhabditis elegans</i>	127	NNNN-----NTEEKYEDSQGRSPSPSPTG
<i>Strongylocentrotus</i>	214	--LPNQDERVSSPTSPSPRSVAGTMSPTKSLSPVASPRIESAQSEIRTPFGFHHQPG
<i>pinctada martensii</i>	152	--SPDLERAHSPN-----RLDRT-TSQDIRIF-----
<i>Oryzias latipes</i>	154	--SDSAPGISSPDAHE-----GGSGSENGDSSEFMSPPSPKPKDG
<i>Danio rerio</i>	189	--TESVPGMSSPDMRH-----GGSGSENGDRESIVSSPAPKPKDG
<i>Mus musculus</i>	218	--ADSGERTSSPVRP-----GGSGSENGDGESFSGSPAPASKEA
<i>Xenopus laevis</i>	180	EPVSGSPGAGSSPEAQP-----GGSGSENGDGESLSSPSKELKEG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	152	--SEIVVSTSSPPELS-----SESIPNTSGSVIPTSPVFK-----
<i>Strongylocentrotus</i>	272	SGLDFEHS-----EARRLGFQQQFSTTASAAAAALASSLSFAGQSGLGGEKGRPPHEV
<i>pinctada martensii</i>	177	-----
<i>Oryzias latipes</i>	194	-----EETPGSISPGSGSDGSDTKDEQEPSPSS-----VASRHNNNAIDY
<i>Danio rerio</i>	227	-----EETPGSISPGSGSDGSDTKDEQEPSPSS-----AASRCINNAIDY
<i>Mus musculus</i>	256	GGSCPGSAGAGGGGEEDSPGSSSPGSGSGSDTKDEQEPSPSS-----LARQRTPIINTI
<i>Xenopus laevis</i>	221	-----EESPSLISPLSSESGSDTKDEQEPSPSS-----LARQRTPIINTI
<i>Caenorhabditis elegans</i>	185	-----
<i>Strongylocentrotus</i>	326	LCRLFPQKRAVLELVLQGGCGDVVQAIEQILNCR-----EVSASSSTST
<i>pinctada martensii</i>	177	-----PQIL-----TSVARTVQNL
<i>Oryzias latipes</i>	234	LTRVFPNHRVLELVLQGGCGDVVQAIEQILNNGG-----AQAPKAGAE
<i>Danio rerio</i>	267	LTRVFPNHRVLELVLQGGCGDVVQAIEQILNNGG-----QAK---GPEE
<i>Mus musculus</i>	316	LTRVFPNHRVLELVLQGGCGDVVQAIEQILNHRGGLAAGLGAAPLEKAAVSAAVED
<i>Xenopus laevis</i>	260	LTRVFPNHRVLELVLQGGCGDVVQAIEQILNRS-----QDK---GEG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	185	-----PN

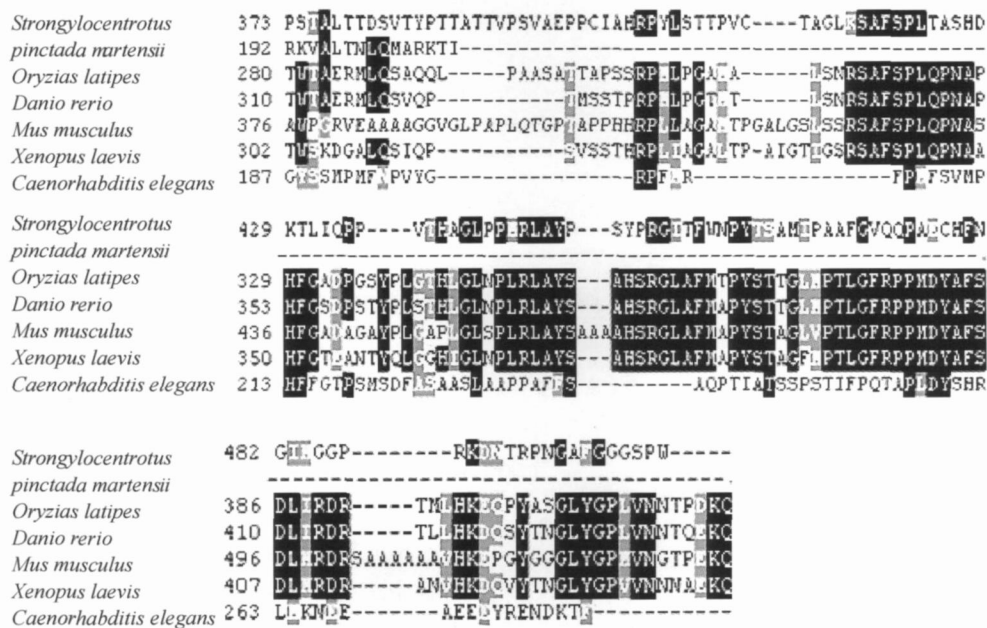


图 1 马氏珠母贝 *Dm r5* 基因与其他物种 *Dm r5* 基因氨基酸序列比较

Fig. 1 Amino acid alignment of *Dm r5* of *Pinctada martensii* and other homologues

用 Clustal X (1.8) 软件对马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)、海胆 (*Strongylocentrotus urchins*, XP_786938. 2)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*, NP_495183. 2)、斑马鱼 (*Danio rerio*, AAU85258. 1)、青鳉 (*Oryzias latipes*, BAD00703. 1)、爪蟾 (*Xenopus laevis*, ABC55871. 1) 和小鼠 (*Mus musculus*, AAN10254. 1) 的 *Dm r5* 基因氨基酸序列进行排序; 相同的氨基酸以涂黑表示

The alignment of DMRT5 protein are compared among *pinctada martensii*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* and *Mus musculus* with Clustal X (1.8) program. Those amino acids showing identity are marked in black

分别选取海胆、线虫、斑马鱼、青鳉、爪蟾和小鼠的 *Dm r5* 基因与马氏珠母贝的 *Dm r5* 基因编码的氨基酸进行聚类分析。如图 2, Neighbor-joining (NJ) 树所示结果与传统的进化分类学相吻合。马氏珠母贝和海胆的 *Dm r5* 基因的同源性较高, 暗示着软体动物可能和棘皮动物间存在较近的亲缘关系。马氏珠母贝与斑马鱼、青鳉、爪蟾和小鼠的 *Dm r5* 基因间的同源性都较低, 可能是脊椎动物在演化过程中分化较晚, 是较进化的类群, 马氏珠母贝相对于哺乳动物可能有更远的进化历史。

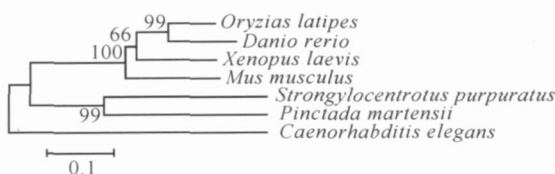


图 2 马氏珠母贝 *Dm r5* 与其他动物同源蛋白的系统发育 NJ 树

Fig. 2 The neighbor-joining phylogenetic tree of *pinctada martensii Dm r5*

该图用 Clustal X (1.8) 和 Mega3.0 软件生成

The figure is made by Clustal X (1.8) and Mega (3.0) programs

2.2 *Dm r5* 基因的时序表达模式分析

RT-PCR 分析 *pmDm r5* 基因在不同组织中的表

达。结果发现, 在鳃、外套膜、闭壳肌、消化盲囊、雄性性腺和雌性性腺都可检测到 *pmDm r5* 基因转录本的存在, 但在雄性性腺中的表达量显著高于其他组织, 鳃中表达量相对较少, 外套膜、闭壳肌、消化盲囊和雌性性腺仅可检测到微弱的转录本 (图 3、4)。

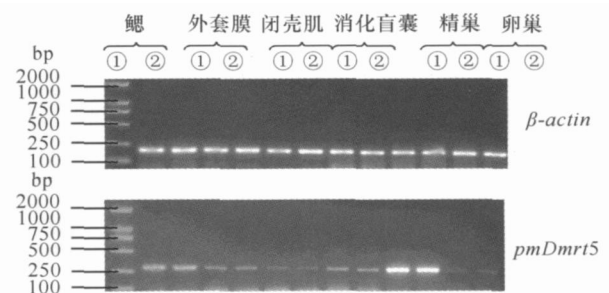


图 3 *pmDm r5* 基因在各种组织中的表达 (β -actin 做内参)

Fig. 3 Expression pattern of *pmDm r5* gene in different tissues (β -actin was used as control)

不同发育时期性腺的 RT-PCR 分析发现, 在三月龄幼贝性腺、发育早期雄性性腺、成熟期雄性性腺、雄性向雌性转化期性腺、发育早期雌性性腺、成熟期雌性性腺都可检测到 *pmDm r5* 基因转录本的存在, 但在早期雄性性腺、成熟期雄性性腺中表达量

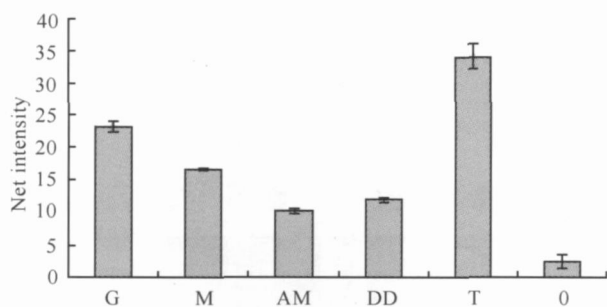


图4 *pmDmrt5* 基因在各种组织中的相对表达丰度 (该图用 Bandleader 3.0 软件生成)

Fig. 4 The relative expression intensity of *pmDmrt5* mRNA in several tissues (The figure is made by Bandleader 3.0 programs)

G, 鳃; M, 外套膜; AM, 闭壳肌; DD, 消化盲囊; T, 精巢; O, 卵巢
G, gill; M, mantle; AM, adductor muscle; DD, digestive diverticulum; T, testis; O, ovary

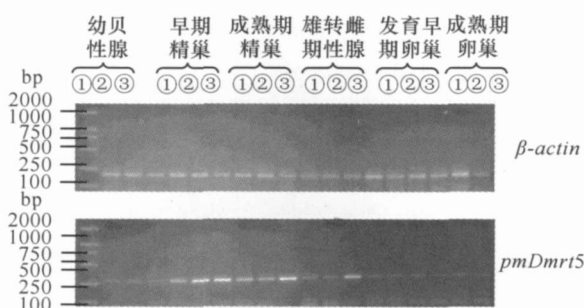


图5 *pmDmrt5* 基因在性腺发育不同时期的表达 (β -actin 做内参)

Fig. 5 Expression pattern of *pmDmrt5* gene in different period's gonads (β -actin was used as control)

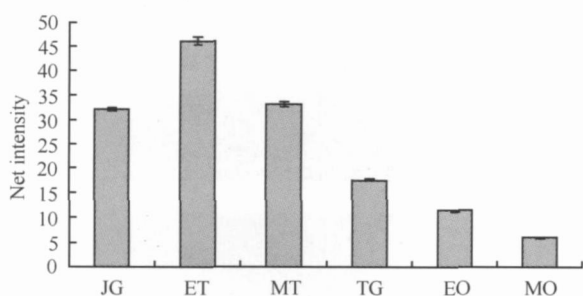


图6 *pmDmrt5* 基因在性腺发育不同时期的相对表达丰度 (该图用 Bandleader 3.0 软件生成)

Fig. 6 The relative expression intensity of *pmDmrt5* mRNA in different period's gonads

(The figure is made by Bandleader 3.0 programs)

JG, 幼贝性腺; ET, 早期精巢; MT, 成熟期精巢; TG, 雄转雌期性腺; EO, 早期卵巢; MO, 成熟期卵巢

JG, gonad of juveniles; ET, early testis; MT, mature testis; TG, transitional gonad; EO, early ovary; MO, mature ovary

较多,其他时期表达量较少 (图 5、6)。

通过时序表达模式分析, *pmDmrt5* 基因在雄性性腺中表达量最高,这暗示着 *pmDmrt5* 基因可能参与了马氏珠母贝的性别发育过程。

3 讨论

Dmrt 基因家族是新近发现的一个基因家族,该家族成员都具有高度保守的 DM 结构域,且很多成员参与了动物的性别决定与分化过程的调控^[19,20]。*Dmrt* 基因家族成员在结构上的高度保守性决定了它们在功能上可能也是保守的。那么,作为 *Dmrt* 基因家族的重要成员之一的 *Dmrt5*,是否也参与了动物性别发育的调控,到目前为止并没有定论。

Kim, *et al.* 研究发现, *Dmrt5* 主要在小鼠胚胎的脑中表达,在性腺中表达量其次,在其他组织中的表达量较低,其中在卵巢中表达量高于精巢^[9]。但 Guo, *et al.* 研究发现,在斑马鱼的胚胎中, *Dmrt5* 主要表达于中枢神经系统;在成体中, *Dmrt5* 主要表达于脑和生殖细胞,包括精原细胞、精母细胞、精子细胞、精子和未成熟的卵母细胞,且在精巢中表达量高于卵巢^[21]。Kim 和 Guo 对小鼠和斑马鱼的研究发现的共同点是, *Dmrt5* 基因在脑和中枢神经系统中表达量最高。但是由于脑是调控各系统的中枢,因此 *Dmrt5* 基因在脑中的高度表达并不能作为该基因参与性别调控的直接证据。而对于 *Dmrt5* 基因在精巢和卵巢两者之中何者的表达量居高,对小鼠和斑马鱼的研究却得到了不同的结论。

为了专一性地探讨 *Dmrt5* 基因在贝类性别调控方面的作用,我们选用了还没有分化出明显脑组织的贝类作为研究材料。令人感兴趣的是,我们发现虽然在鳃、外套膜、闭壳肌、消化盲囊、雄性性腺和雌性性腺中都能检测到 *pmDmrt5* 转录本的存在,但在雄性性腺中表达量明显高于雌性性腺和其他组织,尤其是在发育早期的雄性性腺中, *pmDmrt5* 表达量最高。这意味着 *pmDmrt5* 基因很可能在马氏珠母贝的性别决定与分化中起到了一定的作用。

参考文献:

- [1] Pouvreau S, Gangnery A, *et al* Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia) [J]. *Aquat Living Resour*, 2000, 13(1): 37—48
- [2] Wang M F, Yu X Y, Ye F L. The gonad development of *Pinna* (*Arina*) *pectinata* in Beibu gulf and adjoining coast [J]. *Guan-*

- gxi Sciences*, 2000, 7(2): 140—143, 157 [王梅芳, 余祥勇, 叶富良. 北部湾及附近海域栉江珧性腺发育的研究. 广西科学, 2000, 7(2): 140—143, 157]
- [3] Yu F L, Yu X Y, Wang M F. Sex reversal phenomena in bivalves and its mechanism [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31: 576—580 [于非非, 余祥勇, 王梅芳. 双壳类的性转换现象及其机理探讨. 水生生物学报, 2007, 31: 576—580]
- [4] Wang M F, Yu X Y, Liu Y, *et al*. Study on cryopreservation of spermatozoa in *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(2): 170—174 [王梅芳, 余祥勇, 刘永, 等. 马氏珠母贝精子的超低温保存. 水产学报, 2006, 30(2): 170—174]
- [5] Mariko Kondo, Alexander Froschauer, Akiko Kitano. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Gene*, 2002, 295: 213—222
- [6] Shui Y, Yu H S, Xia L X, *et al*. Cloning of four members of giant panda *Dm rt* genes [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(5): 468—473 [水怡, 余红仕, 夏来新, 等. 大熊猫 *Dm rt* 基因家族 4 个成员基因的克隆. 遗传学报, 2004, 31(5): 468—473]
- [7] Osawa N, Oshima Y, Nakamura M. Molecular cloning of *Dm rt1* and its expression in the gonad of *Xenopus* [J]. *Zoological Science*, 2005, 22: 681—687
- [8] Veith A. M., Froschauer A., Körting C., *et al*. Cloning of the *dm-rt1* gene of *Xiphophorus maculatus*: *dm Y/dm rt Y* is not the master sex-determining gene in the platyfish [J]. *Gene*, 2003, 317: 59—66
- [9] 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: 77—82
- [10] Brunner B, Homung 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: 8—17
- [11] Raymond C, Parker E, Kettlewell J, *et al*. A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators [J]. *Human Molecular Genetics*, 1999, 8: 989—996
- [12] Pask A J, Behringer R R, Renfree M B. Expression of *DMRT1* in the mammalian ovary and testis—from marsupials to mice [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101: 229—236
- [13] Shetty S, Kirby P, Zarkower D, *et al*. *DMRT1* in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 99: 245—251
- [14] Smith C A, Hurley T M, McClive P J, *et al*. Restricted expression of *DMRT3* in chicken and mouse embryos [J]. *Gene Expression Patterns*, 2003, 2: 69—72
- [15] Winkler C, Homung U, Kondo M, *et al*. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *Dm rt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121: 997—1005
- [16] Ottolenghi C, Veitia R, Barbieri M, *et al*. The human doublesex-related gene, *DMRT2*, is homologous to a gene involved in somitogenesis and encodes a potential bicistronic transcript [J]. *Genomics*, 2000, 64: 179—86
- [17] Zhang G F, Liu S X, Liu X, *et al*. Self-fertilization family establishment and its depression in bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(6): 441—445 [张国范, 刘述锡, 刘晓, 等. 海湾扇贝自交家系的建立和自交效应. 中国水产科学, 2003, 10(6): 441—445]
- [18] Yu F F, Yu X Y, Wang M F, *et al*. Cloning and phylogenetic analysis of three *DM* domain in *Pinctada martensii* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(5): 905—906 [于非非, 余祥勇, 王梅芳, 等. 马氏珠母贝 3 个 *DM* 结构域的克隆及系统进化分析. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 905—906]
- [19] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dm rt1* prior to sexual differentiation [J]. *Genesis*, 2000, 26: 174—178
- [20] Sreenivasulu K, Ganesh S, Raman R. Evolutionarily conserved *DMRT1* encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor* [J]. *Gene Expression Patterns*, 2002, 2: 51—60
- [21] Guo Y, Li Q, Gao S, *et al*. Molecular cloning, characterization and expression in brain and gonad of *Dm rt5* of zebrafish [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 569—575

CLONING AND EXPRESSION CHARACTERIZATION OF DMRT5 IN PINCTADA MARTENSII

YU Fei-Fei¹, GU I Jian-Fang², ZHOU Li², WANG Mei-Fang¹ and YU Xiang-Yong¹

(1. Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

(2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The *Dm rt* genes are a new gene family which make a high focus in recent years. The *Dm rt* genes family comprises several transcription factors that share a highly conserved DM (Double sex and Mab-3) domain and has been studied

in many species, including a variety of vertebrates and several of invertebrates such as fruit fly, nematode, freshwater prawn and sea squirt. But there are only few reports on *Dm rt* gene family of bivalve so far, which have important value in evolution and production. *Pinctada martensii* is the most important aquaculture marine bivalve for producing pearl in China and holds very high value in production. A majority of *Pinctada martensii* are male in juveniles of 1 year and convert gradually into female during the second or the third year. The hermaphroditic individuals can be found in this period. This implies that sex reversal has happened in the development of *P. martensii*. But as an important aquaculture marine bivalve, there is not any report about its *Dm rt* gene family. *Dm rt5*, which also has highly conserved DM domain, is conceived as an important member of *Dm rt* gene family. But it is controversial whether *Dm rt5* involves in sex determination and differentiation. In this study, *pmDm rt5* has been screened from testis cDNA library of dunker (*Pinctada martensii*) by RACE-PCR and DNA sequences were analyzed by BLAST and CLUSTAL W programs. The full-length of *pmDm rt5* cDNA is 873bp and has a ORF of 621bp encoding a peptide of 206 amino acids. It has a 126 bp of 5'-untranslated region (UTR) and a 126 bp 3'-untranslated region (UTR). Amino acid alignments and their identities of *pmDm rt5* were compared between *Pinctada martensii* and other species. The deduced amino acid sequence shows 17.2%, 26.7%, 24.8%, 18.7%, 20.8% and 15.8% identity to *Dm rt5* of sea urchin, elegans, medaka, zebrafish, clawed frog and mouse respectively. The homology of N-terminal among different species is higher obviously than C-terminal. Although the sequence identity is not high, the highly conserved DM domain was predicted to exist in the *pmDm rt5*. Phylogenetic tree of *Dm rt5* in vertebrates and invertebrates is determined to clarify *pmDm rt5* status in the evolutionary history. Phylogenetic tree is constructed with MEGA 3 software. The result indicates phylogenetic tree is basically agreed with the known taxonomic relationships among these species. The *pmDm rt5* has higher identity with *Dm rt5* of sea urchin and *Dm rt5* of invertebrates may have more far evolution history than vertebrates. The temporal and spatial expression patterns of *pmDm rt5* among different tissues are analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The result reveals that *pmDm rt5* mRNA is transcribed mainly in male gonad, less in gill, whereas, only very slightly *pmDm rt5* transcript is detected in mantle, digestive diverticulum, adductor muscle and female gonad. The analysis on expression patterns of *pmDm rt5* among gonads of different phases indicates that the expression of *pmDm rt5* in early male gonad and mature male gonad is higher obviously than gonad of juveniles, gonad during transition from male to female, early female gonad and mature female gonad. The results indicated that *pmDm rt5* might involve in sex development regulation of *Pinctada martensii*.

Key words: Dunker; *Dm rt5*; Sex development; Temporal expression