

doi: 10.7541/2014.77

## 鲫 *Dmrt3* 基因的克隆和表达分析

王佳罗琛

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

**摘要:** DMRT 家族是一个与性别决定相关的转录因子家族。为了研究家族成员之一的 *Dmrt3* 在我国重要养殖鱼类鲫鱼胚胎发育、性别分化中的功能以及在育种中的作用, 我们克隆了鲫 *Dmrt3* 基因的 cDNA 全长, 并对 *Dmrt3* 基因在发育早期和不同组织中的表达进行了分析。结果显示: 鲫 *Dmrt3* 基因 cDNA 全长为 2182 bp, 其中 5'端非编码区 408 bp, 3'端非编码区 427 bp, 开放阅读框 1347 bp, 编码 448 个氨基酸。蛋白结构预测显示 DMRT3 除了正常的 DM 结构域外, 还有 DMA 结构域, 在进化上与 DMRT4 和 DMRT5 的亲缘关系更近。巢式 RT-PCR 分析结果表明 *Dmrt3* 直到尾芽期才开始有微量表达, 表达量在 15 体节期有明显增加但仍然处在一个较低的水平; 在成体组织中只在精巢中检测到表达。这种表达时空模式提示 *Dmrt3* 可能在早期器官发生和雄性性腺发育调控中起作用。对 *Dmrt3* 启动子 CpG 岛的甲基化分析表明所检测的组织 and 配子中并不发生甲基化, 说明这种雌雄特异性和组织特异性差异表达并不是通过对该基因启动子的差异甲基化修饰来调控的。此外, 我们还发现了鲫 *Dmrt3* 的一个由逆转录产物形成的假基因 *pDmrt3*。这些结果为进一步研究鲫 *Dmrt3* 在性别分化中的作用和评估其在鲫性别控制育种中的价值, 以及分析 DMRT 家族的进化关系提供了基础资料。

**关键词:** 鲫; *Dmrt3*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2014)03-0548-08

DMRT(*Doublesex* and *Mab-3* related transcription factor)家族是一个与性别决定相关的转录因子家族。该家族成员编码的蛋白质都具有一个富含半胱氨酸的 DNA 结合结构域(DNA-binding motif, DM)<sup>[1]</sup>。该结构域为螯合两个 Zn 原子的锌指结构<sup>[2, 3]</sup>, 在不同的脊椎动物之间存在着高度的保守性<sup>[4]</sup>。但不同的 *Dmrt* 家族基因在表达上存在差异并在功能上出现了明显的分化。在鼠中, *Dmrt1* 于性别决定早期在生殖嵴中表达, *Dmrt1* 缺失的小鼠精巢分化受到严重的影响<sup>[5]</sup>。在已检测过的鱼类中 *Dmrt1* 也只在性腺中表达, 在其他组织中几乎不表达, 而且在雄性性腺中表达量显著高于雌性, 表明该基因在性别决定和性腺发育中具有重要作用<sup>[6-10]</sup>。在斜带石斑鱼中的研究表明 *Dmrt1* 只在精巢的生精细胞中表达而不在支持细胞中表达, 提示其可能的功能是

调控精原细胞向精母细胞发育<sup>[11]</sup>。在青鳉胚胎发育期, *Dmrt2* 主要在体节中胚层中表达<sup>[12]</sup>。在斑马鱼中, *Dmrt2* 有两个在基因加倍后形成的不同拷贝 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b*<sup>[13]</sup>, 二者也主要在前体节中胚层和发育中的体节中表达, 但通过不同方式调节体节形成<sup>[14, 15]</sup>。*Dmrt3* 在日本河豚<sup>[16]</sup>和斑马鱼<sup>[17]</sup>性腺中的表达情况与 *Dmrt1* 类似, 提示其可能参与了性别分化调控和雄性性腺的发育调控, 但 *Dmrt3* 也还在器官发育阶段的河豚<sup>[16]</sup>和斑马鱼神经系统中<sup>[17]</sup>, 以及在热带爪蟾的神经系统中表达<sup>[18]</sup>。在鼠中, *Dmrt3* 在脊髓的 DI6 区神经元中表达, 参与神经元在该区特化<sup>[19]</sup>。*Dmrt4* 在鼠胚胎期和出生后的发育时期都广泛性表达, 在精巢和卵巢中表达水平相当<sup>[20]</sup>, 并参与调控嗅觉系统的神经形成<sup>[21]</sup>。在鼠中, *Dmrt5/Dmrt2a* 主要在脑中表达, 在其他组织中也有微量表达, 但

收稿日期: 2013-05-09; 修订日期: 2013-12-20

基金项目: 国家 973 项目(编号: 2010CB126301); 浙江省科技重大专项(2012C12907-9)资助

作者简介: 王佳(1989—), 男, 陕西渭南人; 硕士; 主要从事发育生物学研究。E-mail: wangjia1019@163.com

通信作者: 罗琛; E-mail: luoc@zju.edu.cn

在卵巢中的表达水平高于在精巢中的表达水平。最近的研究表明斑马鱼 *Dmrt5/Dmrt2* 基因除了在发育中的胚胎脑中表达外, 还在成体斑马鱼精巢中表达和调控精子发生<sup>[22]</sup>。*Dmrt6* 只在脑中检测到表达<sup>[23]</sup>。*Dmrt7* 只在性腺中检测到表达, 但在卵巢中的表达量大于在精巢中的表达量, 可能在雌性生育中起重要作用<sup>[24]</sup>。

已有的研究表明, 在人类以及小鼠、斑马鱼、青鳉等模式动物中, *Dmrt1*、*Dmrt2* 和 *Dmrt3* 都具有保守的同线性关系<sup>[25]</sup>, 说明这三个基因可能是通过基因扩增后进化而来的紧密同源基因。*Dmrt3* 既在精巢中表达又在脊髓的神经元中表达, 与 *Dmrt4*、*Dmrt5* 在神经系统中表达类似, 提示其与这些基因在进化上也有密切的关系。因此, 克隆不同脊椎动物的 *Dmrt3* 基因, 并分析其表达时空模式, 以确定不同脊椎动物 *Dmrt3* 基因在基因序列、表达时空模式方面有无共同特征, 进而比较其与脊椎动物其他 *Dmrt* 基因在序列上的异同, 对揭示 *Dmrt* 基因家族成员间的进化关系具有关键的作用, 对深入研究基因扩增后同源基因的功能分化也具有重要意义。

鲫是我国广泛养殖的重要食用和观赏鱼类, 并且具有两性生殖的二倍体亚种和天然雌核发育的多倍体亚种, 是研究鱼类生殖控制和基因组进化的独特材料<sup>[26, 27]</sup>。因此, 克隆鲫的 *Dmrt3* 基因, 并对其在早期发育过程中和不同组织中的表达进行分析, 既可为研究其进化提供新的资料, 又可为研究 *Dmrt3* 基因在鲫这一我国重要经济鱼类中的功能和在性别控制育种中的价值提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验所用鲫(*Carassius auratus*)为两性生殖的二倍体鲫。雌、雄鲫均于繁殖季节购自杭州市鱼类养殖场。雌、雄亲本在本实验室水族箱中分别养殖。在繁殖季节采用人工授精的方法获取鲫的胚胎, 置于  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  的环境发育。卵巢、精巢、心脏、肝脏、脾、肾、脑这些成体组织取自活体解剖的鲫。取得这些材料后, 迅速投入液氮冷冻, 并存于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱备用。

### 1.2 试剂

*ExTaq* 酶、逆转录试剂盒和 pMD18-T 克隆载体试剂盒购自 Takara 公司, SMARTer™ RACE 试剂盒、Genome Walker 试剂盒购自 Clontech 公司, CpGe-

nome DNA 修饰试剂盒购自 Chemicon 公司, 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, 其余试剂均为国产分析纯, PCR 引物的合成及核苷酸序列的测定均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

### 1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的获得

使用总 RNA 提取试剂盒 SV Total RNA Isolation System(Promega)提取鲫发育早期和成体不同组织的总 RNA。将溶于无核酸酶水中的 RNA 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。以提取的总 RNA 为模板, 使用 Clontech 公司的 SMARTer RACE 试剂盒分别合成 5'和 3' RACE-Ready cDNA, 构建 cDNA 文库。具体操作按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 鲫 *Dmrt3* cDNA 的克隆

从 GeneBank 中比较多种鱼类和其他脊椎类的 *Dmrt3* cDNA 的序列, 从中得到一段 140 bp 左右的比较保守的区域, 根据保守区域序列设计简并引物 A1 和 A2(表 1)扩增。PCR 的反应体系为 10  $\mu\text{L}$ , 反应条件为: 预变性  $94^{\circ}\text{C}$ , 5min, 变性  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s, 退火  $63.5^{\circ}\text{C}$ , 30s, 延伸  $72^{\circ}\text{C}$ , 30s, 32 个循环, 然后延伸 7min 结束反应。于 1.2% 琼脂糖胶上电泳, 确认目的片段之后大体系胶回收, 并克隆到 pMD18-T 载体上测序。测序结果经过比对确认其的确为 *Dmrt3* 的同源片段。然后在得到的测序结果的基础上设计 RGSP1 和 RGSP2(表 1), 按照 SMARTer RACE 试剂盒的说明进行 5'和 3'RACE 扩增。对所得到的 5'端和 3'端的片段进行拼接, 获得鲫的 *Dmrt3* 基因 cDNA 全长, 设计 5'端上游正向引物和 3'端下游反向引物 DS 和 DAS(表 1), 进行连锁分析确保片段的正确性。

### 1.5 氨基酸序列分析和多重比对

根据 *Dmrt3* 核苷酸的序列推测出其氨基酸序列。利用 ClustalX 软件, 并结合 NCBI 的在线蛋白多序列比对工具 COBALT 进行序列的比对和分析。所需的不同物种 DMRT 序列在 GeneBank 上的登录号见表 2。

### 1.6 半定量和嵌套式 RT-PCR 分析

反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 测定所得 RNA 的浓度, 定量所有的 RNA 为 1000 ng。以鲫 18S rRNA 为内参。取逆转录 cDNA 各 1  $\mu\text{L}$ , 以引物 18S rRNA-F 和 18S rRNA-R(表 1)进行 PCR 扩增。反应体系为 10  $\mu\text{L}$ :  $10\times$  *ExTaq* buffer 1  $\mu\text{L}$ , dNTP 0.8  $\mu\text{L}$ , 18S rRNA-R 0.5  $\mu\text{L}$ , 18S rRNA-F 0.5  $\mu\text{L}$ , *ExTaq* 0.1  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 水 6.1  $\mu\text{L}$ 。预变性  $94^{\circ}\text{C}$ , 5min, 接着  $94^{\circ}\text{C}$ , 30s,  $61^{\circ}\text{C}$ ,

表 1 克隆鲫 *Dmrt3* cDNA 全长、表达分析和甲基化分析所用的引物

Tab. 1 Primers used for cloning, expression and methylation analysis of goldfish *Dmrt3*

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
A1	TGCGCVMGRTGCMGRAACCACGG
A2	CKSAGSGCSACCTGSGCCGCAT
RGSP1	TAATCGAGCGACAGCGGGTCAT
RGSP2	TTATGCCCTTCAGCCAGGAGACACCCC
18S rRNA-F	CGCCACTGTCCCTCTAAGAA
18S rRNA-R	GTAGTTCGACCGTAAACGAT
B1	GAATGGCTACGGATCGCCCTAC
B2	GCTCTGTTTGGCAATGACTGGGC
C1	GAACCACGGGGTGCTCTCCTG
C2	TCAGCATGAGGGGGTATCGAGG
DS	GGTACCGGATCGCCCTACCTCTACA
DAS	CTCCTCATCTGCAGCAAACATGCTC
GSP1AS	AGAGCACCCGTGGTTTCTGCATCTCG
GSP3AS	TTATGCCCTTCAGCCAGGAGACACCCC
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
Meth-S	TTAGTGTTAGGGGGATGTAATTGT
Meth-AS	CAAATACAATCTAAAAATCAAACCC

30s, 72°C, 30s, 28 个循环, 然后延伸 7min 结束反应。反应结束各取 5 μL 产物经过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, UVP 凝胶成像系统拍照, 以产物含量最多的模板为参照, 均一化各个模板的量, 重新确定 cDNA 的量。确定好内参之后, 以 *Dmrt3* 特异性引物 B1 和 B2(表 1) 确定鲫 *Dmrt3* 在成体组织中的表达情况。使用嵌套引物 C1 和 C2(表 1), 其位于引物 B1 和 B2 引物的内侧, 来确定基因在早期胚胎中的表达情况。

### 1.7 *Dmrt3* 上游启动子区的获得和甲基化分析

按照 Genome Walker 试剂盒的要求将鲫的基因

组 DNA 进行酶切消化, 每个样品和阳性对照各取 5 μL 进行电泳检测酶切是否完全。对酶切产物进行纯化后连接 Genome Walker 接头, 得到鲫的基因组酶切文库。根据已经得到的 *Dmrt3* 的 mRNA 序列设计三条反向的引物, AP 为接头序列。最后选用 GSP3AS 和 AP1 进行首轮 PCR: 94 °C 预变性 5min; 94 °C, 25s, 72 °C, 3min, 7 个循环; 94 °C, 25s, 67 °C, 3min, 32 个循环; 67 °C, 最后延伸 7min, 所得到的 PCR 产物稀释 20 倍, 然后以 GSP1AS 和 AP2 进行第二轮的巢式 PCR: 94 °C 预变性 5min; 94 °C, 25s, 72 °C, 3min, 5 个循环; 94 °C, 25s, 67 °C, 3min, 20 个循环; 67 °C, 延伸 7min, 扩增得到 *Dmrt3* 的上游启动子序列。

利用网上公开的 CpG 岛预测和甲基化 PCR 引物设计软件 MethPrimer, 通过该软件对启动子区 CpG 岛设计亚硫酸氢盐 PCR 引物 Meth-S 和 Meth-AS(表 1)。根据常规的苯酚氯仿有机溶剂抽提 DNA 的方法提取鲫 DNA, 并根据 CpGenome DNA 修饰试剂盒说明书对基因组 DNA 进行亚硫酸氢钠修饰处理, 之后进行甲基化特异性扩增。

## 2 结果

### 2.1 鲫 *Dmrt3* cDNA 的克隆

用 SMARTer RACE 试剂盒进行 3'RACE 和 5'RACE 获得了鲫 *Dmrt3* 的 cDNA 的完整序列。该序列全长为 2182 bp, 其中 5'端非编码区(5'-UTR) 408 bp, 3'端非编码区(3'-UTR)427 bp, 开放阅读框(ORF)1347 bp, 编码 448 个氨基酸。序列已提交至 GenBank(登录号: KC733765)。

此外, 我们在进行 *Dmrt3* 基因组分析时还在鲫

表 2 本文所引用的不同物种 *Dmrt* 在 GeneBank 中的登录号

Tab. 2 Cited GeneBank accession numbers of various *Dmrt*s

物种 Species	登录号 Accession number						
	DMRT1	DMRT 2	DMRT 3	DMRT 4	DMRT 5	DMRT 7	
<i>Danio rerio</i>	AAQ04555.1	NP_571027.1	NP_001005779.2		AAU85258.1		
<i>Xenopus laevis</i>	NP_001089969.1	AAI35448.1	AEM44779.1	AAV66322.1	AAI70170.1		
<i>Mus musculus</i>	NP_056641.2	NP_665830.1	NP_796334.2	AAN77234.1	AAN10254.1	AAN77233.1	
<i>Takifugu rubripes</i>	CAC42778.1	CAC42780.1	CAC42779.1	BAE16955.1	BAE16956.1		
<i>Oryzias latipes</i>	AAL02165.1	AAL02163.1		AAL83919.1	ABC60024.1		
<i>Cynoglossus semilaevis</i>	ABS31368.1			ACY74335.1			
<i>Monopterus albus</i>			ADI24451.1				
<i>Bubalus bubalis</i>						AFV46337.1	
<i>Bos taurus</i>						ABQ14481.1	

基因组中发现了一个只有部分编码序列的 *Dmrt3* 基因拷贝。该拷贝全长 625 bp, 包含起始密码 ATG 和 polyA 加尾信号序列, 在编码区域有多个终止的密码。这些特征说明其是一个从 mRNA 经逆转录而来, 并已缺失了大部分编码序列的加工假基因。该假基因已经命名为 *pDmrt3* 并已提交至 GenBank(登录号: KC733764)。

## 2.2 鲫 DMRT3 蛋白结构的预测及进化分析 *Dmrt* 基因家族进化树的构建

使用 Jellyfish 软件, 利用所获得的 *Dmrt3* 核苷酸序列推测出 *Dmrt3* 的氨基酸序列如图 1a 所示。氨基酸序列同源性分析表明, 鲫 *Dmrt3* 编码的氨基酸序列和斑马鱼(*Danio rerio*)的序列同源性为 90.8%, 和爪蟾(*Xenopus laevis*)序列同源性为 64.9%, 和小鼠(*Mus musculus*)序列同源性为 62.3%。利用 SMART 在线分子结构预测工具(<http://smart.embl.de/>)对鲫 DMRT3 的蛋白结构进行预测分析, 结果发现除了 DM 结构域外, 还有 DMA 结构域(图 1b)。

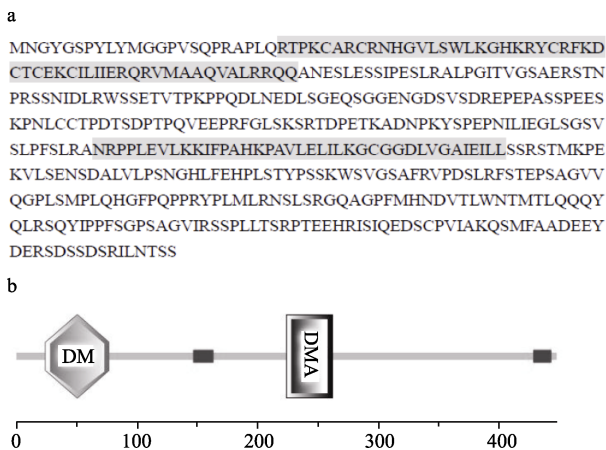


图 1 推测的鲫 DMRT3 氨基酸序列及蛋白质结构示意图

Fig. 1 The putative amino acid sequence and the diagram of the putative conserved domains of goldfish DMRT3

a. 推测的鲫 DMRT3 氨基酸序列。阴影序列为 DM 和 DMA 结构域; b. 推测的鲫 DMRT3 蛋白结构示意图

a. The putative amino acid sequence of goldfish DMRT3. The sequences with shadow are DM domain and DMA domain; b. The putative diagram of the conserved domains of goldfish DMRT3

对 GenBank 数据库上能搜索到的不同脊椎动物 *Dmrt* 家族成员氨基酸序列及得到的鲫 *Dmrt3* 推测出来的氨基酸序列进行比对, 将比对的结果导入 NCBI, 采用 Neighbor Joining 方法并利用 COBALT 工具辅助构了 *Dmrt* 基因家族进化树(图 2)。因 DMRT6 只有小鼠一个物种的序列信息, 并且其 DMRT8 序列(ABC48237.1)与 *Dmrt* 家族的其他序列

存在大于 85% 的差异, 在建立进化树时将它们排除。从构建的进化树中可以看到鲫的 DMRT3 与斑马鱼 DMRT3 最为接近, 红鳍东方鲀和黄鳍聚为同一亚族, 再和斑马鱼-鲫这一支聚为一个支, 爪蟾和小鼠聚为一支, 再和上述大支聚合, 这与其分类地位是一致的。还可以看出 DMRT3、DMRT4、DMRT5 在进化上是很接近的, 分为一个大支, DMRT2 和 DMRT7 在进化上亲缘关系比较近, DMRT1 形成单独的一支。

## 2.3 鲫 *Dmrt3* 在早期各个发育时期和各个组织中的表达情况

半定量 RT-PCR 分析表明在鲫早期胚胎发育过程中, *Dmrt3* 在尾芽期以前检测不到表达, 在尾芽期经嵌套式 PCR 才检测到微量表达, 到 15 体节期其表达量明显增加但仍然难以经一轮 RT-PCR 检测到(图 3)。在鲫成体组织中, 半定量 RT-PCR 只在精巢中检测到 *Dmrt3* 表达, 在卵巢、心脏、肝脏、脾、肾和脑等组织中都未检测出表达(图 4)。其中, +RT 表示 cDNA 合成时加入了逆转录酶, -RT 表示 cDNA 合成时没有加入逆转录酶。

## 2.4 鲫 *Dmrt3* 启动区的甲基化分析

鲫 *Dmrt3* 只在成体精巢中被检测到表达, 在卵巢和其他成体组织中都没有检测到表达。为了解这种两性特异性和组织特异性差异表达是否与差异甲基化有关, 我们在线工具 MethPrimer 对鲫的 *Dmrt3* 启动区 1207 bp 进行分析。分析结果表明在该基因起始密码子上游启动子的 -215 至 -71 bp 区域内的 GC 含量大于 50%, 符合 CpG 岛的标准。为此, 我们对该 CpG 岛在鲫的不同组织和配子中的甲基化状况进行了亚硫酸氢盐转换测序分析。结果表明在所有被检测的鲫组织和配子中, 除极少数克隆中的部分位点发生不稳定的甲基化外, 总体上 *Dmrt3* 启动子区的 CpG 岛不发生甲基化(图 5)。这一结果说明 *Dmrt3* 的性别特异性和组织特异性表达并不是通过对该基因启动子 CpG 岛的差异甲基化修饰来调控的。

## 3 讨论

### 3.1 DMRT3 与其他 DMRT 家族成员的进化关系

氨基酸序列的保守性分析表明鲫 DMRT3 与其他脊椎动物的 DMRT3 一样, 除了具有 DMRT 家族蛋白所都具有的 DM 结构域外, 还有 DMA 结构域。

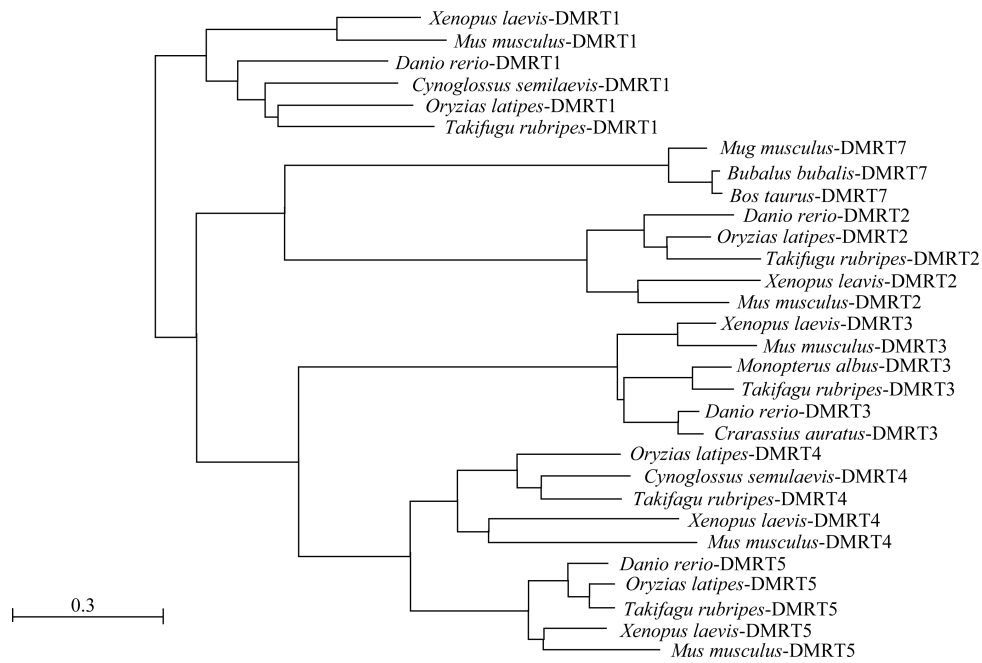


图 2 采用 Neighbor Joining 方法构建的不同物种 DMRT 家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of DMRT family generated with Neighbor Joining method

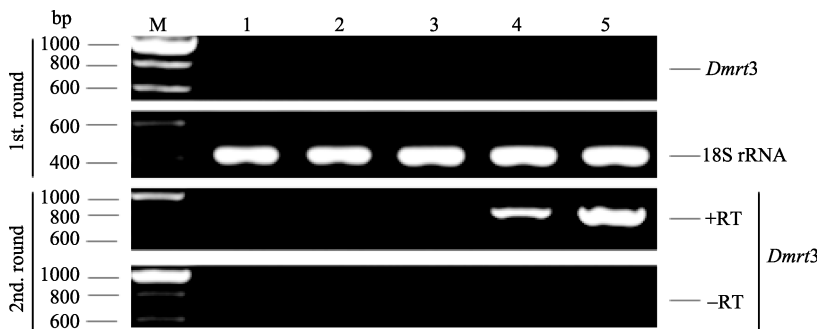


图 3 鲫胚胎发育早期 *Dmrt3* 的表达

Fig. 3 *Dmrt3* expression during early embryogenesis in goldfish

M. 200 bp 分子量标记; 1. 256 细胞期; 2. 30% 下包期; 3. 原肠期; 4. 尾芽期; 5. 15 体节期  
 第一轮和第二轮分别为半定量 RT-PCR 和嵌套式 PCR 检测结果. -RT 对照组在两轮 PCR 中都没有检测到产物, 因此, 只显示了第二轮 -RT 检测结果.

M. 200 bp Marker; 1. 256-cell stage; 2. 30% epiboly stage; 3. Gastrula stage; 4. Bud stage; 5. 15-somite stage

The first and second rounds are RT-PCR and Nested-PCR examinations, respectively. No PCR products were detected in -RT control in the two rounds of PCR, so that only the second round was shown

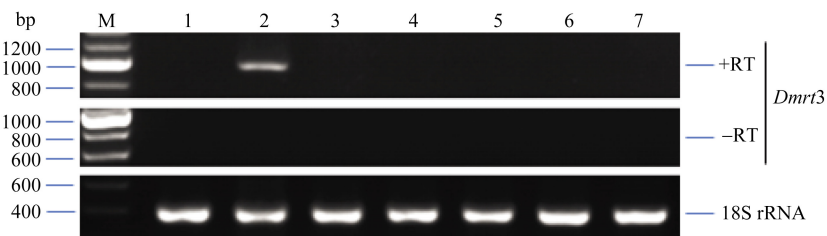


图 4 鲫成体组织中 *Dmrt3* 的表达 RT-PCR 检测

Fig. 4 RT-PCR examination of *Dmrt3* expression in various adult tissues of goldfish

M. 200 bp 分子量标记; 1. 卵巢; 2. 精巢; 3. 心脏; 4. 肝脏; 5. 脾; 6. 肾; 7. 脑

M. 200 bp Marker; 1. Ovary; 2. Testis; 3. Heart; 4. Liver; 5. Spleen; 6. Kidney; 7. Brain

根据序列保守性所进行的不同脊椎动物 DMRT3 的进化分析表明鲫的 DMRT3 与斑马鱼 DMRT3 最为接近, 红鳍东方鲀和黄鳍聚为同一亚族, 再和斑马鱼-鲫这一支聚为一个大支, 爪蟾和小鼠聚为一支, 再和上述大支聚合。这与用传统方法所进行的物种亲缘关系分类结果一致。

在 *Dmrt* 基因家族中, *Dmrt1*、*Dmrt2*、*Dmrt3* 位于同一个连锁群上, 提示我们这三个基因很可能是通过基因扩增进化而来的紧密同源的基因。但 DMRT1、DMRT2 中只有 DM 结构域, 而 DMRT3 与 DMRT4、DMRT5 一样既有 DM 又有 DMA 结构域, 而且都在神经系统中检测到了表达<sup>[17, 20, 23]</sup>, 提示其与 DMRT4、DMRT5 在进化上可能存在更为直接的关系。进化树表明 DMRT3、DMRT4 与 DMRT5 在进化上的亲缘关系的确更近(图 2)。由于 DMA 结构域被认为是更古老的结构域<sup>[28]</sup>, 因此 DMRT3 可能是比 DMRT1 和 DMRT2 更原始的基因。在脊椎动物

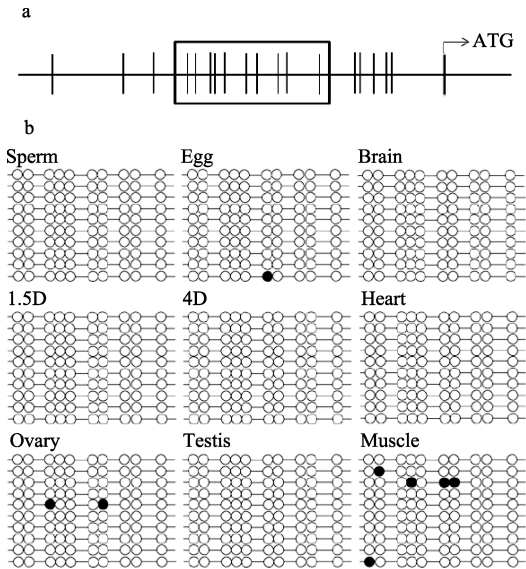


图 5 *Dmrt3* 启动子 CpG 岛在胚胎和不同成体组织中的甲基化状态

Fig. 5 Methylation state of *Dmrt3* promoter CpG island in embryo and various adult tissues

a. *Dmrt3* CpG 岛在启动子上的位置. 每个竖线代表 CpG 位点, 框代表所分析的 CpG 岛区域; b. 亚硫酸氢盐的测序分析结果. 每一横行代表一个克隆, 空心的圆圈代表未甲基化 CpG 位点, 实心的圆圈代表甲基化 CpG 位点

a. The position of *Dmrt3* promoter CpG island, each vertical bar means a CpG site, and the box indicates the CpG island. b. Bisulfite sequencing results of the *Dmrt3* promoter CpG island in the genomes of goldfish, each line represents an examined clone. The methylated and unmethylated CpG sites are represented by filled and open circles, respectively

基因扩增和整个基因组加倍后冗余基因的进化过程中, 一般只有原始的多功能基因通过冗余基因拷贝以互补的方式分享其原始基因的功能而产生新的基因<sup>[29, 30]</sup>。因而 *Dmrt3* 可能是 *Dmrt* 基因家族中原始的多功能基因。*Dmrt1* 和 *Dmrt2*、*Dmrt3* 的连锁关系提示 *Dmrt1* 和 *Dmrt2* 可能是 *Dmrt3* 基因扩增后功能分化产生的新基因。位于不同染色体上的 *Dmrt3*、*Dmrt4* 和 *Dmrt5* 基因所编码的蛋白都具有 DM 和 DMA 两个结构域, 提示这些基因是经历基因组加倍后分化而产生的新基因。

### 3.2 鲫 *Dmrt3* 的表达与在发育过程中的可能功能

鲫 *Dmrt3* 在早期胚胎发育阶段没有检测到表达, 尾芽期开始检测到微量表达, 在此之后其表达水平逐步提高, 到 15 体节期可以检测到较高水平的表达。这种表达时间模式与斑马鱼中类似, 但在鲫中该基因在胚胎发育阶段的表达水平显然比在同期斑马鱼胚胎中要低, 即使到 15 体节期也需要用嵌套式 PCR 才能检测到。因此, 我们没有做进一步的组织

特异性表达原位杂交分析。由于已有的研究表明在 DMRT 家族中, 具有 DMA 结构域的 DMRT3、DMRT4、DMRT5 能在神经系统的相关器官中表达<sup>[16, 17]</sup>, 提示鲫的 DMRT3 也可能在器官发生阶段在神经系统的发育调控中起作用。

在鲫成体组织中, 所检测 7 种组织中 *Dmrt3* 只在精巢中表达(图 4)。这与日本河豚鱼 *Dmrt3* 在精巢中表达<sup>[16]</sup>相同, 但与斑马鱼 *Dmrt3* 在精巢和卵巢中都有表达<sup>[17]</sup>存在差异。这些观察结果提示 *Dmrt3* 的功能在鲫和日本河豚中可能比在斑马鱼中有了进一步的限定, 在成体阶段只保留了调控雄性性腺发育的功能。因此, 在深入了解鲫 *Dmrt3* 基因在雄性性腺发育调控中的功能和机制后, 可用于鲫雄性控制育种。

对 *Dmrt3* 启动子 CpG 岛的甲基化分析表明所检测的组织 and 配子中并不发生甲基化, 说明鲫中 *Dmrt3* 雌雄特异性和组织特异性差异表达并不是通过对该基因启动子的差异甲基化修饰来调控的。由于 *Dmrt1*、*Dmrt2*、*Dmrt3* 位于同一个连锁群上, 这些基因的表达是否有共同的调控元件和调控机制还不清楚, 因此, 不能排除其他 *Dmrt* 基因如果发生差异甲基化对 *Dmrt3* 雌雄特异性差异表达的可能影响。

### 参考文献:

- [1] 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
- [2] Burtis K C, Baker B S. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific poly-peptides [J]. *Cell*, 1989, **56**(6): 997—1010
- [3] 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
- [4] Smith C A, McClive P J, Western P S, *et al.* Evolution: Conservation of a sex-determining gene [J]. *Nature*, 1999, **402**(6762): 601—602
- [5] 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
- [6] Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R, *et al.* Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus merra* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2008, **157**(1): 75—85



- [7] Wen A Y, You F, Sun P, *et al.* Cloning of *dmrt1* gene and its tissue expression analyses compared with that of *P450arom* gene in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Marine Sciences*, 2010, **34**(11): 97—102 [文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆 *dmrt1* 基因的克隆及其与 *P450arom* 基因的组织表达分析. 海洋科学, 2010, **34**(11): 97—102]
- [8] Deng S P, Chen S L. Molecular cloning, characterization and RT-PCR expression analysis of *Dmrt1a* from half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, **15**(4): 577—584 [邓思平, 陈松林. 半滑舌鲷 *Dmrt1a* 基因的 cDNA 克隆及其表达. 中国水产科学, 2008, **15**(4): 577—584]
- [9] Deng S P, Wang J J, Wu T L, *et al.* cDNA cloning and expression analysis of *Dmrt1* in *Clarias fuscus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(4): 610—617 [邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析. 水生生物学报, 2012, **36**(4): 610—617]
- [10] Cao M, Duan J, Cheng N, *et al.* Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobiocypris rarus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, **162**(4): 303—309
- [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): 156—172
- [12] 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): 997—1005
- [13] Zhou X, Li Q, Lu H, *et al.* Fish specific duplication of *Dmrt2*: Characterization of zebrafish *Dmrt2b* [J]. *Biochimie*, 2008, **90**(6): 878—887
- [14] Meng A, Moore B, Tang H, *et al.* A Drosophila doublesex-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates [J]. *Development*, 1999, **126**(6): 1259—1268
- [15] 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
- [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, *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] Lu Y, Li Z, Zhu X L, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Dmrt3* during xenopus tropicalis embryogenesis [J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2012, **39**(5): 564—570 [陆怡, 李政, 朱晓龙, 等. 热带爪蟾 *Dmrt3* 基因的克隆及在早期胚胎发育中的表达. 浙江大学学报 (理学版), 2012, **39**(5): 564—570]
- [19] 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
- [20] Balciuniene J, Bardwell V J, Zarkower D. Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, **26**(23): 8984—8991
- [21] Huang X, Hong C S, O'Donnell M, *et al.* The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(32): 11349—11354
- [22] Xu S, Xia W, Zohar Y, *et al.* Zebrafish *dmrt2* regulates the expression of *cdkn2c* in spermatogenesis in the adult testis [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, **88**(1): 1—12
- [23] 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
- [24] Matsushita Y, Oshima Y, Nakamura M. Expression of *DMRT* genes in the gonads of *Rana rugosa* during sex determination [J]. *Zoological Science*, 2007, **24**(1): 95—99
- [25] 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): 8—17
- [26] Gui J F, Zhou L. Genetic basis and breeding application of clonal diversity and dual reproduction modes in polyploid *Carassius auratus gibelio* [J]. *Science China Life Sciences*, 2010, **53**(4): 409—415
- [27] Ge W, Jiang Y G. The natural gynogenesis of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1989, **13**(3): 274—286 [葛伟, 蒋一珪. 鱼类的天然雌核发育. 水生生物学报, 1989, **13**(3): 274—286]
- [28] Volff J N, Zarkower D, Bardwell V J, *et al.* Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, **57**(1): S241—S249
- [29] Force A, Lynch M, Pickett F B, *et al.* Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations [J]. *Genetics*, 1999, **151**(4): 1531—1545
- [30] Kleinjan D A, Bancewicz R M, Gautier P, *et al.* Subfunctionalization of duplicated zebrafish *pax6* genes by cis-regulatory divergence [J]. *PLoS Genetics*, 2008, **4**(2): e29

## MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF *DMRT3* IN GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS*

WANG Jia and LUO Chen

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** The DMRT family of transcription factors play a pivotal role in sex determination. In order to investigate the function of *Dmrt3*, a member of the DMRT family, in the embryogenesis and sex differentiation, as well as its potential implication in breeding of goldfish, we cloned the full length cDNA of *Dmrt3* and analyzed its expression during the early embryogenesis and in various adult tissues in goldfish, *Carassius auratus*. The entire goldfish *Dmrt3* cDNA is 2182 bp long, including a 408 bp 5'-UTR, a 427 bp 3'-UTR and a 1347 bp open reading frame (ORF); the latter encoded a protein with 448 amino acids. Protein structural prediction based on the putative amino acid sequence of DMRT3 revealed that goldfish DMRT3 contained a common DM domain and a DMA domain, suggesting that it was more phylogenetically related to DMRT4 and DMRT5. Nested PCR examination indicated that the expression of *Dmrt3* was undetectable until bud stage, and its expression obviously increased but still at a low level at 15-somite stage. In adult tissues, *DMRT3* was expressed exclusively in the testes. This expression pattern suggested that *Dmrt3* might regulate organogenesis and gonad development of male. No methylation of the *Dmrt3* promoter CpG-island in gametes and in various tissues was observed using bisulfite sequencing analysis, suggesting that DNA methylation did not regulate the sex-specific and tissue-specific expression of *Dmrt3*. Moreover, we identified a pseudogene, named *pDmrt3*, from the reverse transcript of *Dmrt3*. These results provide essential materials for studying the function of *Dmrt3* in the sex differentiation and potential application in breeding of goldfish, as well as the evolutionary relationship of *Dmrt* genes.

**Key words:** Goldfish; *Dmrt3*; Gene cloning; Gene expression