

中国大鲵 *Dmrt* 基因 DM 结构域的克隆及序列分析

肖调义¹ 吴宝林¹ 葛熹凯¹ 苏建明¹ 陈开健¹ 许宝红¹ 崔树良¹ 章怀云^{1,2}

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128; 2. 中南林业科技大学, 长沙 410000)

摘要: *Dmrt* 基因家族是一个与性别决定相关的基因家族, 该家族成员共有一个具有 DNA 结合能力的保守基序 -DM 结构域。为了进一步探讨该家族在系统进化中的保守性, 本研究通过简并 PCR 技术, 扩增并克隆了中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 基因组中的 DM 结构域。序列分析显示, 中国大鲵基因组中存在 *Dmrt* 基因的 DM 结构域。其核苷酸序列与猕猴、青鳉、人、小鼠、牛、热带爪蟾相应 *Dmrt* 基因 DM 结构域的相似性分别为 91%、92%、92%、89%、91%、84%。其蛋白序列与上述物种的相似性均为 91%, 表现为 4 个氨基酸的变异, 即第 19、34、36 和 45 位的精氨酸分别由半胱氨酸、谷胱氨酸、色氨酸和谷胱氨酸所取代。这些氨基酸的变化对其蛋白总体的三维构型没有显著影响。聚类分析结果表明, 不同进化地位物种的 *Dmrt* 基因 DM 结构域编码序列存在高度的同源性, 显示 *Dmrt* 基因在系统进化上的高度保守。

关键词: 中国大鲵; RT-PCR; *Dmrt*; DM 结构域

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)01-0089-05

Dmrt (Doublesex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是新发现的一个与性别决定相关的基因家族。该家族成员所编码的蛋白质与果蝇的性别决定基因 *Doublesex* 和线虫性别决定基因 *Mab-3* 所编码的蛋白质一样, 均包含一个具有 DNA 结合能力的保守基序, 即 DM (*Doublesex* 和 *Mab-3*) 结构域^[1,2]。并以锌指结构与特异 DNA 序列结合, 调控性别的分化和发育。

在小鼠中 *Dmrt* 1 通过其 DM 结构域来指导雄性分化形成睾丸^[3]。人类第九号染色体 (9p24.3) 上含有的 *Dmrt* 1、*Dmrt* 2 和 *Dmrt* 3 区域被证明与睾丸生殖障碍 (DYS) 及其 XY 雌性反转相关^[4-6]。另有研究表明, *Dmrt* 基因家族 DM 结构域的功能除与性别决定和分化发育有关外, 还与人类的肿瘤发育相关^[7]。迄今, *Dmrt* 基因的高度保守性已在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、鱼类、果蝇和线虫中均有报道^[8,9], 但有关中国大鲵 *Dmrt* 基因的情况仍未见报道。

中国大鲵俗名“娃娃鱼”, 属于两栖纲 (Amphibia)、有尾目 (Rodentia)、隐鳃鲵科 (Cryptobranchidae)、大鲵属 (*Andrias*), 是现存个体最大的两栖动物, 也

是我国特有的珍稀有尾两栖动物, 属于国家二级保护动物^[10-12]。为了探讨 *Dmrt* 基因家族在两栖类中的保守性, 本文首次以中国大鲵为材料, 采用简并 PCR 技术, 扩增并克隆了中国大鲵基因组中 *Dmrt* 基因的 DM 结构域, 并将其与猕猴、青鳉、人、小鼠、牛、热带爪蟾相应 *Dmrt* 基因 DM 结构域的同源性及其系统进化关系进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料 成熟的中国大鲵 (雌、雄各一尾), 采自湖南省张家界大鲵保护中心。雄性个体体重 10.5 kg, 体长 80 cm。雌性个体体重 6 kg, 体长 45 cm。

1.2 基因组 DNA 的提取 取中国大鲵的肌肉组织, 采用 Sambrook 的方法^[13], SDS/蛋白酶 K 裂解, 酚氯仿提取总 DNA, 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 质量, -20℃ 保存备用。

1.3 简并 PCR 参考文献 [14-17], 设计如下简并 PCR 引物用于扩增 *Dmrt* 基因 DM 保守区域:

D1: 5' TGCG (AGC) (AC) G (AG) TGC (AC) G (AG) AA (CT) CACGG3'

收稿日期: 2007-11-27; 修订日期: 2008-10-21

基金项目: 科技部攻关计划 (2004BA543C); 湖南省教育厅重点项目 (07A012) 资助

作者简介: 肖调义 (1964—), 男, 湖南邵阳人; 教授, 博士; 主要从事水产动物育种研究。E-mail: tyx1128@yahoo.com.cn

通讯作者: 崔树良, E-mail: s.cui@unimelb.edu.au; 章怀云, E-mail: hyzhang@cs.hn.cn

氨基酸序列比对分析发现,猕猴、青鳉、人、小鼠、牛、热带爪蟾 *Dm rt*基因 DM 结构域之间的相似性为 100%,而中国大鲵 *Dm rt*基因的 DM 结构域与其他物种的相似性仅为 91%。这主要是由于中国大鲵 *Dm rt*基因 DM 结构域的编码区较其他物种在 4 个位置发生了氨基酸的变异。即第 19、34、36 和 45 位的精氨酸 (R) 分别由半胱氨酸 (C)、谷胱酰氨 (Q)、色氨酸 (W) 和谷胱酰氨 (Q) 所取代 (图 3)。

<i>Mus Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Oryzias Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Homo Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Macaca Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Bos Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Xenopus Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVERQVRMAAQVALR
<i>Andrias Dmrt</i>	1	RCRNHGVVSCSLKGHKRFCRWDCQCANCLLVVEQVRMAAQVALQ
consensus	1	*****_******_******_******_*

图 3 不同物种 *Dm rt*基因 DM 结构域氨基酸序列比较分析

Fig.3 Comparative analysis of the amino acid sequences of DM domain of *Dm rt* in different species

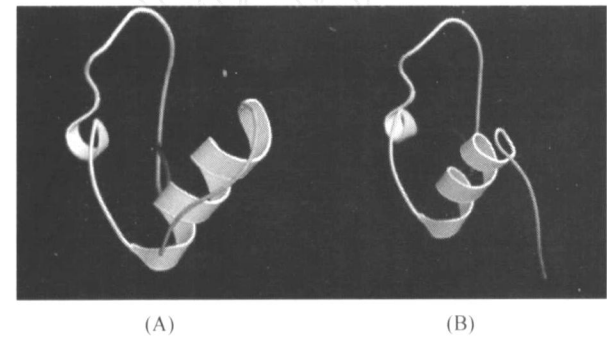


图 4 中国大鲵 (A)和小鼠 (B) *Dm rt*基因 DM 结构域氨基酸序列模拟三维构型比较

Fig.4 Three dimensional structure modeling of *Dm rt* DM domain from *Andrias davidianus* (A) and *Mus musculus* (B)

2.3 *Dm rt*基因 DM 结构域分子进化树构建

不同物种 *Dm rt*基因编码的氨基酸序列的分子进化树结果 (图 5)。结果表明,猕猴和人类最相近,然后是牛和小鼠先后加入,在青鳉之后是中国大鲵,最后是热带爪蟾。以 *Dm rt*基因所得到的系统进化树原则上反映了各物种在系统进化中的位置,比较直观地显示出该基因的 DM 结构域在分子水平上的差异大小。

3 讨 论

3.1 大鲵 *Dm rt*基因 DM 结构域

迄今为止,控制发育的基因家族主要有 *Hox*基

除色氨酸外,其他位置的变异均属于脂肪族极性 α -氨基酸的更替。这些氨基酸的更替造成了分子极性的变化,使其等电点 (pHi) 由 10.757 下降为 8.435,从而使得该分子的理化特性发生了些许变化。SPL II 程序分析发现^[18],这些氨基酸变化使得其膜蛋白羟基端的透膜螺旋性增加,氨基端的亲水性增加。但这些更替对蛋白总体三维构型没有大的影响 (图 4),以维持分子生物学特性不变。

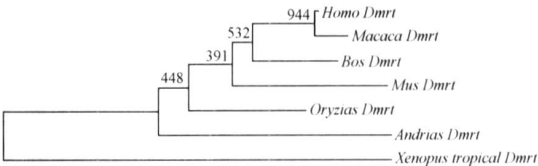


图 5 不同物种 *Dm rt*基因 DM 结构域分子进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of DM domain of *Dm rt* genes in different species

因家族、*Sox*基因家族以及近些年发现的 *Dm rt*基因家族^[19]。其中, *Sox*基因和 *Dm rt*基因近几年已成为研究的热点。这是因为,它们一方面在性别决定中起重要的作用;另一方面也参与了许多组织、器官的形成及相关功能的维持。大鲵作为我国珍稀名贵特产,属于国家二级保护动物,是由水生脊椎动物向陆生脊椎动物过渡的类群,是研究动物进化的一个好材料。本研究利用 *Dm rt*基因 DM 结构域在物种间高度保守的特征,设计兼并引物,以大鲵基因组 DNA 为模板,PCR 扩增该基因片段,将所得到的 DNA 产物做克隆和序列分析。序列比对证明克隆所获得的 140bp 的片段为大鲵 *Dm rt*基因的 DM 结构域序列。本研究首次证实在大鲵的雌雄个体中均存在 *Dm rt*基因 DM 结构域。该结果将为探讨大鲵 *Dm rt*基因的功能打下坚实的理论基础,同时也将为今后研究这一古老物种的分子遗传学、发育生物学与胚胎学奠定基础。

3.2 Dm rt基因 DM 结构域的保守性

在果蝇的性别决定基因 *Doubsex* 和线虫的性别决定基因 *Mab-3* 中首先发现了一个共有的 DM 结构域^[20], 同时在人类 9 号染色体 P24 性反转区段也鉴定了一个具有 DM 结构域的基因即 *Dm rt 1*, 随后在人类 9 号染色体 P24 性反转区段又克隆了第 2 个具有 DM 结构域的基因, 命名为 *Dm rt 2*。之后又分别在鱼类、爬行类、鸟类中发现了 *Dm rt* 的同源基因。这一系列的同源基因被统一归类为 *Dm rt* 基因家族。

本研究将中国大鲵 *Dm rt* 基因 DM 结构域的核酸和氨基酸序列在不同数据库进行同源性搜索, 证实得到的克隆片段为 *Dm rt* 基因的 DM 结构域序列。同源性比对发现, 大鲵 *Dm rt* 基因 DM 区的核酸序列与猕猴、青鳉、人、小鼠、牛、热带爪蟾相应 *Dm rt* 基因的同源性分别为 91%、92%、92%、89%、91%、84%, 氨基酸序列的相似性均为 91%, 显示出高度的相似性。以上研究结果证实, *Dm rt* 基因在进化上的高度保守性, 也再一次验证了 *Dm rt* 基因家族是性别决定相关基因中较为保守的一个基因家族。需要指出的是, 就 *Dm rt* 基因 DM 结构域的核苷酸序列而言, 中国大鲵与同为两栖类的热带爪蟾的同源性最低, 只有 84%, 但它的氨基酸却高度保守, 没有因为同位置上碱基的突变而引起氨基酸突变, 属于无意义的点突变。与此同时, 不同物种 *Dm rt* 基因 DM 结构域核酸序列及氨基酸序列的同源性变异还反映在系统进化上。*Dm rt* 基因的 DM 保守区氨基酸序列的变异体现了不同物种的进化地位的不同。在系统进化树中, 两栖类的中国大鲵和热带爪蟾与其他物种的亲缘关系最远。这或许也进一步体现了两栖动物在进化上由水生向陆生过渡的特殊地位。

尽管如此, 就 *Dm rt* 基因在中国大鲵组织器官中的表达情况、表达调控机制及其与生殖激素协调作用关系等方面的情况还有待于进一步的研究。这些后续研究的开展将为中国大鲵的资源保护和繁殖育种提供更为充足的理论依据, 同时也将对现代繁殖生物学及物种的性别决定机制理论的丰富起到十分重要的意义。

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**: 691—695
- [2] Smith C A, McClive P J, Western P S, *et al* Conservation of a sex determining gene [J]. *Nature*, 1999, **402**: 601—602
- [3] Raymond C S, Murphy M W, O Sullivan M G, *et al* *Dm rt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation [J]. *Genes Dev*, 2000, **14** (20): 2587—2595
- [4] Raymond C S, Parker E D, Kettlewell J R, *et al* A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulations [J]. *Human Mol Genetics*, 1999, **8**: 989—996
- [5] Veitia R, Nunes M, Brauner R, *et al* Deletions of distal 9p associated with 46, XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3—p24.1 [J]. *Genomics*, 1997, **41** (2): 271—274
- [6] Guoli S, Schmitt K, Critcher R, *et al* Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome [J]. *Am J. Hum Genet*, 1998, **63** (3): 905—908
- [7] Looijenga L H, Hermus R, Gillis A J, *et al* Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene [J]. *Cancer Res*, 2006, **66** (1): 290—302
- [8] Peng Q L, Pu Y G, Cheng Z H, *et al* Sequence analysis of three *Dm rt* genes in *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, **12** (1): 5—9 [彭巧玲, 蒲友光, 程子华, 等. 罗氏沼虾 3 个 *Dm rt* 基因的序列分析. 中国水产科学, 2005, **12** (1): 5—9]
- [9] 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]
- [10] Xiao H B, Liu J Y, Yang Y Q, *et al* Artificial propagation of tank-cultured Chinese giant salamander (*Andrias Davidianus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**: 530—534 [肖汉兵, 刘鉴毅, 杨焱清, 等. 池养大鲵的人工催产研究. 水生生物学报, 2006, **30**: 530—534]
- [11] Hou J H, Zhu B C, Dong Y W, *et al* Research Advances of Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2004, **23** (3): 262—267 [侯进慧, 朱必才, 童玉玮, 等. 中国大鲵研究进展. 四川动物, 2004, **23** (3): 262—267]
- [12] Tao F Y, Wang X M, Zheng H X. Analysis of complete cytochrome b sequences and genetic relationship among Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) from different areas [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (5): 625—628 [陶峰勇, 王小明, 郑合勋. 中国大鲵五地理种群 *Cytb* 基因全序列及其遗传关系分析. 水生生物学报, 2006, **30** (5): 625—628]
- [13] Sambrook J, David W Russell. Molecular cloning [M]. M. A Laboratory Manual 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [14] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature dependent expression of turtle *Dm rt1* prior to sexual differentiation [J]. *Genetics*, 2000, **263**: 174—178
- [15] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, *et al* Expression of

- Dm rt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development [J]. *Developmental Biology*, 1999, **215**: 208—220
- [16] Ji D L, Li J, Liu X Y, *et al* Cloning of *Dm rt1* gene and its expression in different tissues of *Rana nigromaculata* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11** (2): 198—201 [季代丽, 李洁, 刘先英, 等. 黑斑蛙 *Dm rt1* 基因的克隆及在不同组织中的表达. 应用与环境生物学报, 2005, **11** (2): 198—201]
- [17] Guo Y Q, Chen H H, Gao S, *et al* Phylogenetic tree and synteny of *DMRT* genes family of vertebrates [J]. *Heredities*, 2004, **31** (10): 1103—1108 [郭一清, 程汉华, 高尚, 等. 脊椎动物 *DMRT* 基因家族的系统发生及同线性分析. 遗传学报, 2004, **31** (10): 1103—1108]
- [18] Juretic D, Jeroncic A, Zucic D. Sequence analysis of membrane proteins with the web server SPL IT [M]. *Croatica Chemica Acta*, 1999, **72** (4): 975—997
- [19] Zhang Y, Lu X X, Shan X X. Progress in research on sex determination genes [J]. *Heredities*, 2000, **22** (5): 328—330 [张悦, 鲁晓萱, 单祥年. 性别决定基因的研究进展. 遗传, 2000, **22** (5): 328—330]
- [20] Shen M M, Hodgkin J. *Mab-3*, a gene required for sex specific yolk protein expression and a male specific lineage in *C. elegans* [J]. *J. Cell*, 1988, **54**: 1019—1031

CLO N I N G A N D S E Q U E N C I N G D M D O M A I N O F T H E D M R T G E N E F R O M T H E C H I N E S E G I A N T S A L A M A N D E R, A N D R I A S D A V I D I A N U S

XIAO Tiao-Yi¹, WU Bao-Lin¹, GE Xi-Kai¹, SU Jian-Ming¹, CHEN Kai-Jian¹, XU Bao-Hong¹,
CUI Shu-Liang¹ and ZHANG Huai-Yun^{1,2}

(1. College of Animal Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; 2. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410000)

Abstract: The *Dm rt* genes constitute a new gene family related to sex-determination, which encoded putative transcription factors with a conserved DM domain that initiates genetic process in early development through its DNA binding ability. So far, the *Dm rt* genes have been discovered in a wide range of animal species, such as fish, amphibian, reptiles, birds, and mammals, which evidently revealed the evolutionary conservation of *Dm rt* gene family. Amphibians is a key in the evolution during the aquatic and the terrestrial, the research of *Dm rt* genes in *Andrias davidianus*, which was a very important group in phylogenetic evolution, has not been reported. In order to confirm the evolutionary conservation of *Dm rt* gene family in *Andrias davidianus*, degenerate PCR primers, designed from a highly conserved region of aligned multiple sequences, was successfully used for the amplification of the DM domain of the *Dm rt* gene from the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). A DNA fragment with about 140 bp in length was obtained by PCR using *A. davidianus* genomic DNA as template. The DNA was cloned and its nucleotides were determined by sequencing. Homology searching against databases confirmed its identity as *Dm rt* gene fragment from the *A. davidianus*. The sequence comparison analysis showed that the *Andrias Dm rt* shared high sequence similarity with *Dm rt* genes from *Macaca mulatta* (91%), *Oryzias latipes* (92%), *Homo sapiens* (92%), *Mus musculus* (89%), *Bos taurus* (91%) and *Xenopus tropicalis* (84%), but its amino acid sequence remained at a similar level with other *Dm rts* (91%). The Arginine of location 19, 34, 36 and 45 was replaced with cysteine, Glutamine, Tryptophane and Glutamine respectively. The results further indicated that *Dm rt* genes were highly conserved in phylogeny and the strong evolutionary conservation of this gene family suggested that *Dm rt* genes might be importance in developmental process.

Key words: *Andrias davidianus*; RT-PCR; *Dm rt*; DM domain