

牙鲆 *dmrt1* 基因的克隆及其与 *P450arom* 基因的组织表达分析

文爱韵^{1,2}, 尤 锋¹, 孙 鹏¹, 徐冬冬¹, 吴志昊¹, 马得友¹, 李 军¹,
张培军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 通过基因组步移和 3'RACE 获得了牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) *dmrt1* 的 cDNA 全序列, 该基因开放阅读框全长 909bp, 其编码的蛋白具有高度保守的 DM 结构域, 5'UTR 区含有性别相关转录因子 Sox9 和 Sox5 的结合位点。牙鲆 *dmrt1* 基因只在牙鲆的性腺中表达, 且在精巢中的表达明显高于卵巢, 表明牙鲆的 *dmrt1* 可能是一种性别相关基因。同时, 对牙鲆的另一性别相关基因 *P450arom* 在成体各组织的表达分析结果表明, 该基因除在牙鲆的性腺中有表达外, 在肾脏、脾脏、鳃和脑等其他组织中也有不同程度的表达。牙鲆 *P450arom* 基因在性腺中的表达也存在两性差异, 其表达模式与 *dmrt1* 的正好相反, 在卵巢中的表达量明显高于精巢。

关键词: 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); *dmrt1*; *P450arom*; 两性差异表达

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)11-0097-06

dmrt (doublesex and *mab-3*-related transcription factor) 基因家族含有一个高度保守的锌指样 DNA 结合基序 DM 结构域, 一些成员在脊椎动物和非脊椎动物的许多物种中都参与了性别决定^[1]。其中, *dmrt1* 是目前发现从果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 到小鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 唯一保守的性别相关基因, 可能是动物性别决定与性腺发育的主效基因之一^[2]。*dmrt1* 基因已经在很多鱼类如斑马鱼 (*Danio rerio*) 和罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 等中进行了克隆和表达研究, 发现其位于常染色体上, 仅在性腺中表达, 且大多数都呈两性差异表达, 在精巢中的表达量高于卵巢, 表明该基因可能与精巢发育相关^[3, 4]。但在海水鱼类中, 有关 *dmrt1* 基因的报道比较少, 仅见到在石斑鱼 (*Epinephelus merra*) 和黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*) 等中的相关研究, 结果也显示出精巢表达强于卵巢的两性差异^[5-7]。*P450arom* 基因属于细胞色素氧化酶基因的一种, 其编码产物芳香化酶是催化雄激素向雌激素转化的一个关键酶, 能够催化某些雄激素(如睾酮和雄烯二酮)转化为雌激素。鱼类中有关 *P450arom* 基因的克隆和表达研究也已在青鳉 (*Oryzias latipes*)、罗非鱼和石斑鱼等中进行了报道, 其表达谱显示出与雌性性腺的相关性, 即在卵巢强表达, 而在精巢中的表达较弱^[8-10]。

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是中国主要的海水鱼类养殖品种, 雌鱼比相应的雄鱼大^[11], 培育单一

雌性群体, 可以大大提高单位面积的产量, 因而相关的性别决定及性腺发育分子机制的研究也备受重视。有关牙鲆性别相关基因的克隆和表达只见于日本学者的有关 *P450arom*^[12]、*foxl2*^[13] 和 *amh*^[14] 这 3 个基因的报道。其他鲆鲷鱼性别相关基因的报道则主要有半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *dmrt1*^[15] 和 *P450arom*^[16] 基因以及南方牙鲆 (*Paralichthys lethostigma*)^[17] 和大西洋鲷 (*Hippoglossus hippoglossus*)^[18] 的 *P450arom* 基因的克隆和初步表达研究。而作为唯一在不同物种间保守的雄性性别相关基因, *dmrt1* 基因在牙鲆中还没有见到研究报道。本研究在克隆得到牙鲆 *dmrt1* 基因的基础上, 对该基因和 *P450arom* 基因在牙鲆成鱼各组织的差异表达进行研究, 并比较它们在性腺中的两性表达差异, 明确其与牙鲆雌雄性别的相关性, 为牙鲆等鲆鲷鱼类的性别决定机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 牙鲆组织样品的获得

成熟牙鲆雌雄各 3 尾(全长 30 cm ± 5 cm)购于山

收稿日期: 2010-04-06; 修回日期: 2010-07-16

基金项目: 国家 973 项目(2010CB126304); 国家 863 计划资助项目(2006AA10A404)

作者简介: 文爱韵(1984-), 女, 四川成都人, 博士, 研究方向为海水鱼类的分子遗传学研究, E-mail: waybio@yahoo.cn

东省青岛市南山水产市场,在中科院海洋所水族培育楼暂养,然后解剖成鱼腹部,取出各组织,立即储存于液氮用于 RNA 的提取。

1.2 基因的克隆与分析

运用基因组步移和 3'RACE 的方法进行牙鲆 *dmrt1* 基因的克隆。第一次基因组步移用接头引物(1,2 见表 1)和兼并引物(3,4 见表 1)通过巢式 PCR 的方法从基因组文库中得到的基因片段,将其连接到 PGM-T 载体上进行测序,序列经 NCBI 序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tblastx>),确定为 *dmrt1* 基因片段;再根据得到的基因片段设计基因特异性引物(5~10 见表 1),通过多次基因组步移和一次 3'RACE 的巢式 PCR 扩增,得到的基因片段拼接起来,经序列比对分析,最终获得牙鲆 *dmrt1* 基因的 cDNA 全序列。巢式 PCR 条件: (1)94 25 s, 72 3 min; 94 25 s, 67 3 min, 32 个循环; 67 7 min; (2) 94 25 s, 72 3 min, 5 个循环; 94 25 s, 67 3 min, 20 个循环; 67 7 min。基因启动子区转录因子结合位点通过网上的预测工具 MATCH PROGRAM(www.gene-regulation.com/pub/programs.html#match) 中的 TRANSFAC 6.0 数据库进行预测。

根据得到的牙鲆 *dmrt1* 基因 cDNA 序列,运用网上翻译工具获得了牙鲆 Dmrt1 蛋白序列(www.expasy.ch)。用 CLUSTALW(www.ebi.ac.uk)进行蛋白比对,

进化树的构建是采用软件 CLUSTAL X 和 MEGA3 对发表在 GenBank 上的各个物种的 Dmrt1 蛋白序列和牙鲆 Dmrt1 蛋白序列进行比对聚类分析而完成的。分子系统进化分析和进化树构建所用的均为全长蛋白序列,并应用泊松分布进行进化距离验证。

1.3 RT-PCR 表达研究

RNA 的提取:取 100 mg 组织样品,加 1 mL Trizol(购自美国 Invitrogen 公司),用研磨棒研碎后再用加样枪反复吹打,充分破碎样品;加 200 μ L 氯仿,用力混匀,室温放置 3 min, 12 000 相对离心力, 4 离心 15 min;取上清,缓慢加等体积异丙醇,室温放置 10 min, 12 000 相对离心力, 4 离心 10 min;除去上清,加 1 mL 70%的乙醇洗涤沉淀, 7 500 相对离心力, 4 离心 5 min;除去上清,室温干燥,加 DEPC 水溶解 RNA;用 RNase free DNase(购自大连 Takara 公司)消化总 RNA 中的 DNA, 37 水浴 30 min, 然后 65 水浴 10 min, 终止反应;电泳检测 RNA 的纯度。

cDNA 第一链的合成:在 1.5 mL 的 PCR 管中依次加入 1 μ L Oligo dT(10 mmol/L), 4 μ L DNase 处理的 RNA(1 μ g/ μ L), 用 Nuclease-free water(购自上海生工公司)补至 13 μ L; 70 热变性 5 min, 冰浴 2 min 后,稍离心;再加入 5 μ L 5 $\times$ M-MLV 反应缓冲液, 5.0 μ L 无 RNase 的 dNTP(dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP

表 1 Genome walking、3'RACE 和 RT-PCR 所用引物
Tab. 1 Primers used in genome walking, 3'RACE, and RT-PCR

序号	引物名称	引物序列
1	Ge-AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
2	Ge-AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
3	Dm5'	CAGMGRGTCATGGCSGCKCAGGTBGCY
4	Dm3'	MGRMGRCAGCAGGCYCARGARGAGGAR
5	Dm1A15'	AGGCAGTCGGCTCCAGCTTCATTCTTC
6	Dm1A13'	ACCTGTGAAAGCCAGAGAGGAAGCGGA
7	Dm1A25'	TTAAATGTCCACAAACACACGTGAGGT
8	Dm1A23'	GAGGTTGTGTTAAAGTTAAGCTAGCTG
9	Dm13'R5'	TCCGAGTCACCTCCATCATG
10	Dm13'R3'	ACAAGGACAAGCAGAGCAGGCAGG
11	Dm1rtF	ACAAGGACAAGCAGAGCAGGCAGG
12	Dm1rtR	TAATAGGAGGCTTCCATCAGCAGGTC
13	P45rtF	ATGTGTCTCTCTGGAAGAAAGATAACG
14	P45rtR	GTTGTCCAGTTTATCTGCCTGCTCC
15	ActrtF	AGAGCAAGAGAGGCATCCTGAC
16	ActrtR	CGATGGGTGATGACCTGTCC

注:所有引物均为上海生工合成;K (G, T), R (A, G), S (G, C), Y (C, T), B (G, T, C), M (A, C)

各 2.5 mmol/L), 1 μ L RNase 抑制剂(40 U/ μ L, 购自大连 Takara 公司), 1 μ L M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L, 购自美国 Promega 公司); 轻弹管壁, 稍离心; 42 反转录 1 h。

RT-PCR: 根据作者得到的 *dmrt1* 和已发表的 *P450arom*(GenBank accession No. AB017182) 的 cDNA 序列设计了两对基因特异性引物 Dm1rtF 和 Dm1rtR, 以及 P45rtF 和 P45rtR(11~14 见表 1), 以反转录得到的成鱼组织 cDNA 为模板, 检测了 *dmrt1* 和 *P450arom* 在牙鲆成鱼不同组织的表达。 β -actin 作为内参对照(15,16 见表 1)。PCR 反应条件是: 94 5

min; 94 30 s, 58 30 s, 72 3 min, 35 个循环; 72 10 min。

2 实验结果

2.1 牙鲆 *dmrt1* 基因的结构

牙鲆 *dmrt1* 基因 cDNA 全序列 3373bp(GenBank accession No. EU490514), 其 5'UTR 中含有与性别相关的转录因子 Sox9 和 Sox5 的结合位点, 开放阅读框为 909bp(图 1)。编码的 Dmrt1 蛋白序列(GenBank accession No. ACD62474)全长 303aa, 其中 28-87aa 为高度保守的 DM 结构域。

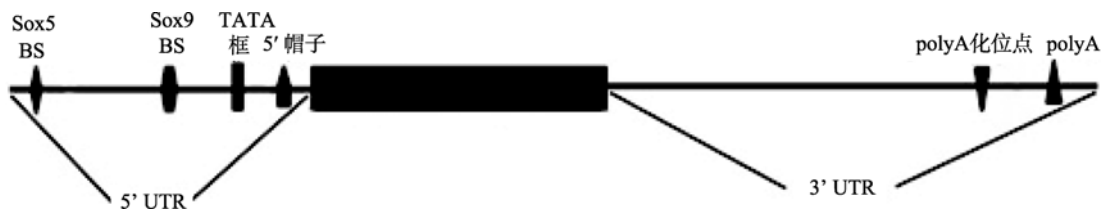


图 1 牙鲆 *dmrt1* 基因 cDNA 的结构

Fig. 1 cDNA structure of flounder *dmrt1* gene

UTR. 非翻译区; BS. 结合位点

UTR. un-translated region; BS. binding site

2.2 Dmrt1 蛋白分子系统进化树

根据 GenBank 上发表的脊椎动物 Dmrt1 蛋白序列, 构建了邻接分子系统进化树, 箭头所示牙鲆 Dmrt1 与半滑舌鲷等其他硬骨鱼类的 Dmrt1s 聚在了一起(图 2)。

所用 Dmrt1 蛋白序列包括: 人(NP_068770.2), 小鼠(NP_056641.2), 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*, NM_001096500.1), 四线鼠蛇(*Elaphe quadrivirgata*, BAD99161.1), 泽鳄(*Crocodylus palustris*, ACD749-14.1), 中国软甲龟(*Pelodiscus sinensis*, BAD99160.1), 鸡(*Gallus gallus*, XP_001232983.1), 河豚(NP_001-089969.1), 虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*, NP_0011177-41.1), 三刺棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*, AAW6230-4.1), 斑马鱼(NP_991191.1), 青鳉(Dmy, NP_001098-150.1; Dmrt1, AAL02165.1), 沼泽鳗(*Monopterus albus*, AAP80398.1), 北非鲶鱼(*Clarias gariepinus*, AAQ04554.1), 半滑舌鲷(ABS31368.1), 吕宋青鳉(*Oryzias luzonensis*, BAH05021.1), 曼谷青鳉(*Oryzias mekongensis*, AAS91464.1), 绿鳍豚(*Tetraodon nigroviridis*, AAN74844.1), 白鲟(*Acipenser transmontanus*, AAL18252.1), 蜂巢石斑鱼(*Epinephelus merra*, ACD62372.1), 银汉鱼(*Odontesthes hatcheri*, ACG69-

835.1), 大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*, ACB97630.1), 南方大口鲶(*Silurus meridionalis*, ABM54575.1), 橙点石斑鱼(*Epinephelus coioides*, ABK15558.1), 大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*, ABK88911.1), 红树林溪鳉(*Kryptolebias marmoratus*, ABG89135.1), 弓背青鳉(*Oryzias curvinotus*, BAC65996.1), 斑剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*, AAN65377.1)。

2.3 *dmrt1* 和 *P450arom* 基因在牙鲆组织的表达

RT-PCR 表达研究结果显示, 牙鲆 *dmrt1* 基因仅在性腺中表达, 并且在精巢中的表达明显强于卵巢中的表达。牙鲆 *P450arom* 基因在性腺中的表达与 *dmrt1* 基因的表达图式正好相反, 在卵巢中表达很强, 在精巢中的表达极弱。但是, 牙鲆 *P450arom* 基因的表达不仅限于性腺, 在肾脏、脾脏、鳃和脑等其他组织中也有不同程度的表达, 具有较广的表达谱(图 3)。

3 讨论

dmrt 基因家族作为一个保守的性别相关基因家族, 先后在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类等脊椎动物中发现。在小鼠、鸡和海龟中的相关研究

表明, 该基因家族成员之一 *dmrt1* 基因, 是继 *sry*、*sox9* 之后发现的又一重要的雄性性别和精巢发育相关基因^[1]。Matsuda 等^[19]发现了一个只限于在青鳉精巢中表达的位于 Y 染色体上的雄性性别决定基因 *dmy*(double sex/*mab-3* Domain of Y Chromosome), 它也属于 *dmrt* 基因家族, 是 *dmrt1* 基因的一个拷贝, 是青鳉中调控雄性发育的主效基因。在其他鱼类中的初步研究表明, *dmrt1* 基因也参与了雄性性腺的发育。

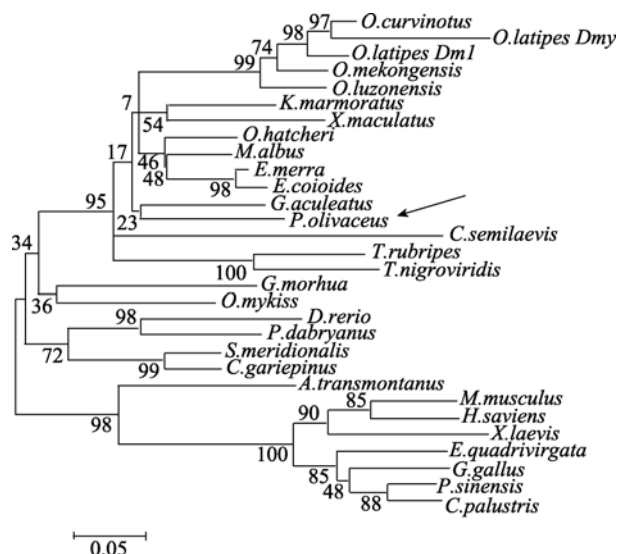


图 2 牙鲆 *Dmrt1* 蛋白的分子系统进化分析
Fig. 2 Phylogenetic analysis of flounder *Dmrt1* protein

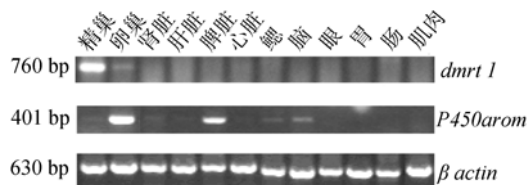


图 3 牙鲆 *dmrt1* 和 *P450arom* 基因在成鱼各组织的差异表达
Fig. 3 Gene expression patterns of flounder *dmrt1* and *P450arom* in tissues

作者克隆得到的牙鲆 *dmrt1* 基因 cDNA 全长为 3373bp, 分析发现, 其 5'UTR 中含有转录因子 *Sox9* 和 *Sox5* 的结合位点, 这些转录因子由性别相关基因编码, 参与了性腺特别是精巢的发育, 因此, 牙鲆 *dmrt1* 基因也可能与雄性性别相关。由该基因编码的蛋白也含有 *dmrt* 基因家族共有的高度保守的结构域 DM 域, 该保守结构域与半滑舌鳎、河豚和三刺棘鱼等其他几种硬骨鱼类 *Dmrt1* 蛋白的 DM 结构域的同源性均在 95% 以上^[5, 15]。根据包括牙鲆在内的多种脊

椎动物 *Dmrt1* 蛋白序列构建的邻接分子系统进化树看出, 牙鲆 *Dmrt1* 蛋白与半滑舌鳎等硬骨鱼类的 *Dmrt1* 蛋白聚在了一簇。这些结果说明性别相关转录因子 *Dmrt1* 含有的与所调控的基因启动子区结合的 DM 结构域, 在鱼类中是高度保守的, 这是该转录因子蛋白发挥其生物学功能所必需的。

在一些鱼类中已经克隆得到了 *dmrt1* 基因, 并对该基因在性腺组织中的表达进行了研究。在斑马鱼^[3]、罗非鱼^[4]、河豚^[5]、青鳉^[20]、虹鳉^[21]等鱼中的研究发现, *dmrt1* 基因均呈现两性差异表达, 在精巢中的表达较强。在海水鱼类中, 也开展了有关 *dmrt1* 基因的两性差异表达研究, 蜂斑石斑鱼^[6]、黑鲷^[7]和半滑舌鳎^[15]中的研究表明, *dmrt1* 基因也都局限于性腺中表达, 且精巢中表达强于卵巢。本研究结果显示, 牙鲆 *dmrt1* 基因也是性腺特异表达的, 并且在两性性腺中的表达程度不同, 其在精巢中的表达远远强于卵巢中的表达。这与其他鱼类中有关 *dmrt1* 基因的两性差异表达的研究结果是相似的。说明在鱼类中, *dmrt1* 基因的功能是比较保守的, 参与了性腺特别是精巢的发育过程。

牙鲆 *P450arom* 基因也存在两性差异表达, 与 *dmrt1* 基因表达的图式正好相反, 卵巢中的表达很强, 而精巢中的表达极弱。这一结果与日本学者^[13]的报道是一致的, 他们的研究也发现牙鲆 *P450arom* 基因在卵巢中强表达, 在精巢中弱表达, 并且在由高温诱导雌核发育群体获得的性反转雄性牙鲆性腺中, 该基因的表达也比较弱。其他鱼类如青鳉^[8]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[9]、赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*)^[10]、欧洲海鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[22]和黑鲷^[23]等的 *P450arom* 基因的表达也是类似的, 均存在两性差异表达, 即在卵巢的表达显著强于精巢的表达。在其他鲆鲽鱼类中, 有关 *P450arom* 基因的研究也显示了该基因的两性差异表达模式, 在半滑舌鳎^[18]、南方牙鲆^[19]和大西洋鲽^[20]中, 该基因在卵巢的表达明显强于精巢的表达。另外, 牙鲆 *P450arom* 基因, 与有些鱼如半滑舌鳎和石斑鱼等类似, 是广谱表达的, 也就是其表达不仅限于性腺, 在脾脏和脑等其他组织中也有不同程度的表达^[12, 18]。这些研究结果说明, 芳香化酶 *P450arom* 基因作为一种细胞色素氧化酶基因, 不仅参与了性腺特别是卵巢的发育, 而且在其他一些组织的发育过程中也发挥了作用^[8]。

参考文献:

- [1] Koopman P. The genetics and biology of vertebrate sex determination [J]. **Cell**, 2001, 105: 843-847.
- [2] Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination [J]. **Recent Progress in Hormone Research**, 2002, 57: 1-18.
- [3] Jorgensen A, Morthorst J E, Andersen O, *et al.* Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation[J]. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2008, 6: 25.
- [4] Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, *et al.* 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.
- [5] Yamaguchi A, Lee K H, Fujimoto H, *et al.* Expression of the *dmrt* gene and its roles in early gonadal development of the Japanese puffer fish *Takifugu rubripes* [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics**, 2006, 1: 59-68.
- [6] Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R. 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: 75-85.
- [7] Shin H S, An K W, Park M S, *et al.* Quantitative mRNA expression of *sox3* and *DMRT1* during sex reversal, and expression profiles after GnRH α administration in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 2009, 154: 150-156.
- [8] Zhou L Y, Wang D S, Shibata Y, *et al.* Characterization, expression and transcriptional regulation of *P450c17-I* and *-II* in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007, 362: 619-625.
- [9] Sudhakumari C C, Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, *et al.* Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation[J]. **Fish Physiology and Biochemistry**, 2005, 31: 129-135.
- [10] Huang W, Zhou L, Li Z, *et al.* Expression pattern, cellular localization and promoter activity analysis of ovarian aromatase (*Cyp19a1a*) in protogynous hermaphrodite red-spotted grouper[J]. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2009, 307: 224-236.
- [11] Xu JH, You F, Sun W, *et al.* Induction of diploid gynogenesis in turbot *Scophthalmus maximus* with left-eyed flounder *Paralichthys olivaceus* sperm[J]. **Aquaculture International**, 2008, 16: 6.
- [12] Kitano T, Takamune K, Obayashi T K, *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: 167-176.
- [13] Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, *et al.* Follicle-stimulating hormone signaling and *foxl2* are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2007, 359: 935-940.
- [14] Yoshinaga N, Shiraishi E, Yamamoto T, *et al.* Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2004, 322: 508-513.
- [15] 邓思平, 陈松林. 半滑舌鲷 *Dmrt1* α 基因的 cDNA 克隆及其表达[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 577-584.
- [16] Deng S P, Chen S L, Xu J Y, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of gonadal P450 aromatase in the half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. **Aquaculture**, 2009, 287: 211-218.
- [17] Luckenbach J A, Early L W, Rowe A H, *et al.* Aromatase cytochrome P450: cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) [J]. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, 2005, 303: 643-656.
- [18] Matsuoka M P, Van Nes S, Andersen O, *et al.* Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 2006, 144: 128-135.
- [19] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, *et al.* *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. **Nature**, 2002, 417: 559-563.

- [20] Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, *et al.* Two DM domain genes, *dmy* and *dmrt1*, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes* [J]. **Developmental Dynamics**, 2004, 231: 518-526.
- [21] Marchand O, Gororoun M, D'Cotta H, *et al.* *DMRTI* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2000, 1493: 180-187.
- [22] Blazquez M, Gonzalez A, Papadaki M, *et al.* Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. **General and Comparative Endocrinology**, 2008, 158: 95-101.
- [23] Wu G C, Tomy S, Nakamura M, *et al.* Dual roles of *cyp19a1a* in gonadal sex differentiation and development in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* [J]. **Biology of Reproduction**, 2008, 79: 1 111-1 120.

Cloning of *dmrt1* gene and its tissue expression analyses compared with that of *P450arom* gene in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)

WEN Ai-yun^{1, 2}, YOU Feng¹, SUN Peng¹, XU Dong-dong¹, WU Zhi-hao¹, MA De-you¹, LI Jun¹, ZHANG Pei-jun¹

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Apr., 6, 2010

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *dmrt1*; *P450arom*; sexual dimorphic expression

Abstract: Whole cDNA sequence of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *dmrt1* gene was obtained using genome walking and 3'RACE methods. The open reading frame of flounder *dmrt1* was found to span 909 bp. Sex-related transcriptional factors Sox9 and Sox5 binding sites were identified in its 5'UTR. Flounder Dmrt1 protein had a high conserved DM domain. Expressions of *dmrt1* and *P450arom* genes in flounder tissues were also studied by RT-PCR. The results showed that both genes were sex-related genes. The *dmrt1* gene was gonad-specific, and was sexual dimorphic with much higher expression in testis and much lower expression in ovary. The expression of *P450arom* in gonads was totally opposite to that of *dmrt1*. It was higher expressed in ovary and lower expressed in testis. Moreover, flounder *P450arom* had a broad-spectrum expression pattern, being differentially expressed in some other tissues, such as kidney, spleen, gill and brain.

(本文编辑: 谭雪静)