

企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因的克隆及表达分析

潘珍妮¹, 余祥勇², 王梅芳², 曲炳良¹, 陈耀辉¹, 唐小玉¹, 于非非¹

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088; 2. 华南农业大学海洋学院, 广东 广州 510642)

摘要: 本研究利用 RACE-PCR 技术获得企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*)一个 *Dmrt2* 基因 cDNA 的全长序列, 通过荧光定量 PCR 分析 *Dmrt2* 基因在各组织中的表达特征, 以及在早期卵巢、成熟期卵巢、早期精巢、成熟期精巢和排放期精巢中的表达变化。结果表明, *Dmrt2* 基因全长 1 257bp, 其中开放阅读框(open reading frame, ORF)为 951 bp, 编码 316 个氨基酸, 5'非编码区(untranslated region, UTR)为 52 bp, 3'UTR 为 254 bp, 第 20 位到第 73 位氨基酸为 DM 结构域。预测其分子质量为 36.61ku, 等电点为 9.80。氨基酸序列比对显示该企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因与黑蝶真珠蛤(*Pinctada margaritifera*)和马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)的 *Dmrt2* 基因同源性(identity)最高, 分别为 46.0%和 45.7%。其中在 DM 结构域高度同源。荧光定量 PCR 分析组织表达特征显示, *Dmrt2* 在企鹅珍珠贝的外套膜、鳃、消化盲囊、足、精巢和卵巢均有表达, 其中在精巢中表达量最高($P<0.05$), 足为其次, 在闭壳肌中没有检测到 *Dmrt2* 表达。对性腺发育不同时期的表达量分析发现, *Dmrt2* 在发育早期和成熟期卵巢中表达量都很低, 在发育早期精巢中表达量较高, 在成熟期精巢检测到最大表达量($P<0.05$), 到精巢排放期表达显著下降, 推测 *Dmrt2* 可能与企鹅珍珠贝精巢的发育有关, 可能参与了企鹅珍珠贝雄性性别分化和性腺发育这一生理过程。

关键词: 企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*); *ppDmrt2*; 基因克隆; 表达分析; 性别决定和性腺发育

中图分类号: Q341 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)10-0117-08

DOI: 10.11759/hyxx20170417002

Dmrt(doublesex and mab-3-related transcription factor)基因家族是指与果蝇(*Drosophila melanogaster*)性别决定基因 *Doublesex* (*Dsx*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)性别决定基因 *Maleabnormal-3* (*Mab-3*)同源的一类基因^[1], 是一个古老的与性别决定有关的基因家族^[2]。该家族基因编码的蛋白质含有一个高度保守的 DM 结构域, 通过锌指结构识别并结合特定 DNA 来调控目的基因的转录, 从而参与性别决定与发育^[3-4]。迄今为止已发现了 *Dmrt* 基因家族多个成员, 其生理作用涉及性别决定、胚胎发育和调控肌肉发育等多个方面^[5-6]。*Dmrt2* 基因是 *Dmrt* 基因家族的重要组成成员之一, 被认为对胚胎中期体节形成以及胚胎后期器官形成起到重要作用^[7-8], 但是否参与了性别决定和分化则没有定论。在人类基因图谱中, 基因 *Dmrt1*、*Dmrt2* 和 *Dmrt3* 位于 9 号染色体短臂 2 区 4 带 3 亚带(9p24.3), 该片段缺失会引起精巢发育不全, 甚至引起雄性胚胎向雌性逆转; 但在该片段缺失的性逆转患者中, *Dmrt1* 和 *Dmrt2* 均缺失, 由于 *Dmrt1* 是性别决定与分化的关键基因, 因此无法确定性逆转中 *Dmrt2* 是否起到关键作用^[9]。随着研究的深入, Matsushita 等^[10]研究发现 *Dmrt2* 在粗

皮蛙(*Rana rugosa*)精巢中表达, 可能参与精子的形成以及性别的分化。Yu 等^[11]通过免疫组化分析发现 *Dmrt2* 基因主要在马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)的精巢中表达, 在卵巢中未检测到表达, 暗示 *Dmrt2* 基因参与马氏珠母贝精子形成过程。

企鹅珍珠贝(*Pteria penguin*), 属软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 珍珠贝科(Pteriidae), 珍珠贝属(*Pteria*)^[12]。企鹅珍珠贝具有生长速度快、珍珠质分泌速度快的特点, 是培育优质海水珍珠的

收稿日期: 2017-02-17; 修回日期: 2017-04-12

基金项目: 广东省科技发展专项(2016A020210115); 广东省渔港建设和渔业发展专项(B201601-Z08, Z2014005); 广东海洋大学优秀青年教师项目(2014004); 广东海洋大学博士科研启动项目(E15041); 广东海洋大学创新强校重大科研项目(GDOU2016050248)

[Foundation: Guangdong Provincial Science and Technology Program, No. 2016A020210115; Guangdong Marine Fishery Development Foundation No. B201601-Z08, No.Z2014005; Outstanding Young Teacher Foundation, No.2014004; Doctoral Scientific Research Foundation of Guangdong Ocean University, No.E15041; Guangdong Major Project of Innovation School, No.GDOU2016050248]

作者简介: 潘珍妮(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋经济动物发育生物学, E-mail: pzn52020@163.com; 于非非, 通信作者, 副教授, E-mail: yufeifei2000@163.com

大型珍珠贝^[13]。本研究建立了企鹅珍珠贝转录组数据库,利用 RACE-PCR 技术克隆到企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因的 cDNA 全长序列,利用荧光定量 PCR 技术分析 *Dmrt2* 基因在企鹅珍珠贝各组织中的表达差异以及性腺发育不同时期中的表达差异,以阐述 *Dmrt2* 在企鹅珍珠贝性腺发育中的重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用企鹅珍珠贝采自广西北海涠洲岛野生群体,300~350 g。

1.2 企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因 cDNA 全长克隆

使用上海生工 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒分别提取企鹅珍珠贝各组织(外套膜、鳃、闭壳肌、消化盲囊、足、性腺)的总 RNA,按照 SMARTer[®] RACE 5'/3'Kit 说明书合成企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 的 3'RACE 模板和 5'RACE 模板。根据企鹅珍珠贝转录组测序结果,设计企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因 5'RACE 的特异性引物和 3'RACE 的特异性引物(表 1)。采用巢式 PCR 扩增法进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增,5'RACE 和 3'RACE PCR 反应体系为 2×SeqAmp Buffer 10 μL, SeqAmp DNA Polymerase 0.5 μL, 5'RACE 或 3'RACE cDNA 模板(100 ng/μL) 1 μL, 10×UPM (10×Universal Primer Mix) 2 μL, 5'RACE 或 3'RACE outer 引物(见表 1)(10 μmol/L) 0.5 μL, PCR-Grade H₂O 6 μL。使用 touch-down PCR 程序扩增: 94℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 2 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 25 个循环。第二轮巢式 PCR 扩增反应体系为 50 μL: 第一轮 PCR 扩增产物 2 μL, 5'RACE 或 3'RACE inner 引物(10 μmol/L) 2 μL,

NUP 引物(10 μmol/L) 2 μL, 2×EasyTaq[®] PCR Super-Mix 25 μL, PCR-Grade H₂O 19 μL。得到的 PCR 产物经电泳分离、纯化后与 pEASY[®]-T1 Cloning Vector 连接,转化,过夜培养。筛选阳性克隆测序,将获得的 3'端序列与 5'端序列进行拼接。根据拼接序列设计 3'和 5'验证引物,PCR 验证拼接序列的正确性,从而获得 *Dmrt2* cDNA 全长序列。利用 VecScreen 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)去除载体序列,获得企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因的 cDNA 全长序列。

1.3 *Dmrt2* 基因的生物信息学分析

通过 ORF Finder 工具,推导企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因编码的氨基酸序列;通过 ExPASy 网站(http://web.expasy.org/compute_pi/)分析其相对分子质量和等电点;经 ProtScale 软件分析氨基酸序列的疏水性;经 SignalP 4.1、TMHMM 和 SoftBerry-Psite 分别预测其信号肽、跨膜结构及氨基酸基本功能位点;经 SMART 对其进行功能结构域分析;利用 Clustal X (1.8)软件进行氨基酸同源比对,用 MEGA6 软件构建系统进化树。

1.4 荧光定量 PCR 检测目的基因的表达特征

分别提取企鹅珍珠贝外套膜、鳃、闭壳肌、消化盲囊、足、精巢和卵巢的 RNA,反转录合成第一链 cDNA,进行荧光定量 PCR 检测。以 18S rRNA 基因作为内参,以企鹅珍珠贝的外套膜为对照,采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 *Dmrt2* 基因在不同组织中的表达水平,每组设 3 个重复,组间重复性和差异显著性用 SPSS16.0 分析。分别提取企鹅珍珠贝发育早期卵巢、成熟期卵巢、发育早期精巢、成熟期精巢和排放期精巢的 RNA,反转录合成第一链 cDNA,进行荧光定量 PCR。方法同上。

表 1 企鹅珍珠贝 *Dmrt2* 基因克隆及表达分析引物

Tab. 1 Primers used for cloning and expression analysis of *Dmrt2* in *Pteria penguin*

引物	序列(5'-3')	用途
<i>Dmrt2</i> -5'-outer	GCAATATCTAGCTCTCGGTCAG	5'RACE 基因特异引物
<i>Dmrt2</i> -5'-inner	GATTACGCCAAGCTTGGGATTCTGCTGACTGGTG	5'RACE 基因特异引物
<i>Dmrt2</i> -3'-outer	CAACGTGTGATGGCAGCTC	3'RACE 基因特异引物
<i>Dmrt2</i> -3'-inner	CACCAGTCAGCAGAATCCC	3'RACE 基因特异引物
<i>Dmrt2</i> -cDNA-F	CAGAAGGTGATAAGTATCAGAGACG	cDNA 全长验证引物
<i>Dmrt2</i> -cDNA-R	GCAGACGAGCCTGTCTGTATTGTATCCA	cDNA 全长验证引物
<i>Dmrt2</i> -F	GGGACAGAATTTACAGCGCAG	荧光定量目的基因特异引物
<i>Dmrt2</i> -R	CATTGGCAATCAGCCATCT	荧光定量目的基因特异引物
18S rRNA-F	ATGTCTGCCCTATCAACTTTC	荧光定量内参基因引物
18S rRNA-R	TGCTGCCTTCCTTGATGT	荧光定量内参基因引物

2 结果与分析

2.1 企鵝珍珠貝 *Dmrt2* 基因的克隆和序列分析

运用 RACE-PCR 快速扩增技术得到 *Dmrt2* 基因的 cDNA 全长序列并分析。企鵝珍珠貝的 *Dmrt2* 基因 cDNA 全长 1257bp, 其中开放阅读框(ORF)为 951 bp, 编码 316 个氨基酸, 5'非编码区(UTR)为 52 bp, 3'UTR 为 254 bp, 包含 30 bp 的 polyA 尾巴, 如图 1 所示。登录号为: KY670720.1。

2.2 *Dmrt2* 基因蛋白理化性质预测和分析

经 ExPASy 预测企鵝珍珠貝 *Dmrt2* 蛋白分子质量为 36.61ku, 等电点为 9.80。疏水性分析得知 *Dmrt2* 氨基酸序列总平均亲水系数为 -0.843, 预测该蛋白属于亲水性蛋白。经 TMHMM 2.0 进行跨膜结构域预测, 显示没有跨膜区。SignalP4.1 预测其不存在信

号肽, 属于非分泌型蛋白质。SoftBerry-Psite 在线预测该序列功能位点, 发现酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 6 个, N-糖基化位点和 N-豆蔻酰化位点各一个, 蛋白激酶 C 磷酸化位点 9 个, CAAX box 1 个, C-末端定位信号序列微体 6 个。同时使用 SMART 软件分析得出第 20 位到第 73 位氨基酸为 DM 结构域(图 1)。

2.3 *Dmrt2* 氨基酸序列同源性分析

采用 Clustal X 软件将企鵝珍珠貝的 *Dmrt2* 基因与其他物种的 *Dmrt2* 基因编码氨基酸进行多序列比对, 结果显示, 该基因与黑蝶真珠蛤(*Pinctada margaritifera*, AIE16095.1)和马氏珠母贝(*Pinctada martensii*, ADD97887.1)的 *Dmrt2* 基因同源性(identity)最高, 分别为 46.0%和 45.7%; 与人(*Homo sapiens*, AAF86295.1)和小鼠(*Mus musculus*, EDL41636.1)的 *Dmrt2* 基因同源性最低, 都为 27.5%。其中, 保守位点主要集中在 DM 结构域(图 2)。将该企鵝珍珠貝 *Dmrt2* 基因命名为 *ppDmrt2*。

```

gattcaattaggtttacatcaaagaaatgaaagtcagaaaaagaatgtaaccATGGAGACTAACATTGTTTCA 73
                                     M E T N I V S 7
AAACAGAAAGGTGATAAGTATCAGAGACGTTTGTAAAGAACACCAAAATGCGCGAGATGTCGTAACCATGGTGTT 148
K T E G D K Y Q R R L L R T P K C A R C R N H G V 32
GTGTCTGTCTAAAAGGTCACAAAAGTACTGTAGATGGCGTGATTGCCAATGTCGAACTGTCTTCTAGTTGTG 223
V S C L K G H K K Y C R W R D C Q C P N C L L V V 57
GAGAGACAAGCTGTGATGGCAGCTCAAGTTGCACTTAGACGACACAGTCAGCAGAATCCCAAAGTGCACCTAGA 298
E R Q R V M A A Q V A L R R H Q S A E S Q S A L R 82
CGACATCAGTCAGCAGAATCCGTGAAAAAGGCAATAATAAAGTGGACTTGTCTCATCGGGACAGAATTACAG 373
R H Q S A E S V K K G N N K V D L S H R G Q N L Q 107
CGCAGTCTCAAAGACCTGCATCGAACTCTCTGTCACGTGACGCAATAGCCAGTCTTAAAGTAAACTGAAAGCA 448
R S L K D L H R N S L S R D A I A S L K S K L K A 132
GAATTAATACGACCTATGGTCCCTATTCTGAATGAACGCATGCGTAAACGTCGGTGTTTGTGACCCGAGAGCTA 523
E L I R P M V P I L N E R M R K R R C F A D R E L 157
GATATTGCCATGTTCAAACAAGAGGTTTGACGAACGAAAAAATTCTGTCAACGTAATGTATCAGACACAGAC 598
D I A M F K Q E G L T N E K N S V N V N V S R P D 182
ATGGAACCTGAATACAATGAAAAACAACTTACTGGGATTGGTGAAATCTGTCCGAAAAATAACCAACCAACAATGT 673
M E L N T M K N K L T G I G E I C P K I T N Q Q C 207
TATTATGACCTTGTCTTCTGGAACGGAATGATTTTACCATATCCATTACAGGAAGGATGGCTGATATCATG 748
Y Y D L V P S W N G M I L P Y P F T G R M A D I M 232
AACCTACCGGAATGACACCTCATAACGTACGGAATACATTATCAGAACATAACAGAATACAACAGAAGTATCCA 823
N L P A E M T P H N V R N T L S E H N R I Q Q K Y P 257
GAACAAATGATATATAAATGCAACACAATTATCATGGTCAGTTGTAGAAAAAGAAAGACAAAGGTGAA 898
E Q N D I Y K M Q H N Y H G Q F V E K E R R Q G E 282
AGTATTGACAGGAATACAGACAAAGACCAATCAATGGATACAATACAGACAGGCTCGTCTGCAAGTTAAATTT 973
S I D R N T D K D Q S M D T I Q T G S S A K L K F 307
TCTGTAGCTTCCATTTTAGCTATGAAATGtggtatataatcataccatgtgtttttaaaacaatgtcagtagtt 1048
S V A S I L A M K * 317
Ttaagataatgttcaacaacaataataaaaaatacaattaccataaatggaatgtaaaatgttttaaaaaata 1123
Aactttctgttttgcataattacattattgaatataaatgtatatgaattgttgcggactgtttattttgaaca 1198
Atctttattaaatgaagctgtcccagaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1257
    
```

图 1 企鵝珍珠貝 *Dmrt2* 基因序列分析

Fig. 1 The *Dmrt2* cDNA and the deduced amino acid sequence of *Pteria penguin*

小写字母代表非编码序列(UTR); 大写字母代表开放阅读框(ORF); 方框代表起始密码子和终止密码子; 灰色框代表 DM 结构域
5'UTR 和 3'UTR regions are shown in small letters; open reading frame is shown in capital letters; initiation codon and termination codon are shown in boxes; DM domain is shown in gray boxes

分别选取马氏珠母贝、黑蝶真珠蛤、光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*, XP_013083870)creb、鸭嘴

海豆芽(*Lingula anatina*, XP_013397304.1)、尾曳鳃虫(*Priapulius caudatus*, XP_014675559.1)和热带爪螯

(*Astyanax mexicanus*, AAI35448.1)等物种的 *Dmrt2* 基因编码的氨基酸进行聚类分析, Neighbor-joining(NJ)

树如图 3 所示: 企鹅珍珠贝、马氏珠母贝和黑蝶真珠蛤都属于软体动物瓣鳃纲, 其 *Dmrt2* 编码的氨基酸

<i>D. rerio</i>	---MTDLSGTEFEIDVEGLETESDDQAV-----	25
<i>H. sapiens</i>	MADPQAGSAAGDWEIDVESLEEDVCGAPRSTPPGSPPPADGDCEDDDGVDDEAE	60
<i>M. musculus</i>	MTEGQAVPGVGWWEIDVESLDLEEDSCGTPLRATPPQEPSPAAADGEDEDEDEDEDE	60
<i>P. penguin</i>	-----	0
<i>P. martensii</i>	-----	0
<i>P. margaritifera</i>	-----	0
<i>D. rerio</i>	FTGPGED-----DTGS-----KDDDKSDRLNLGSGDQPKLSRT	58
<i>H. sapiens</i>	EEGDGEEAGASPGMPGQPEQGGPQPRPPLAPQASPAGTGPRERCTPAGGGAEPKLSRT	120
<i>M. musculus</i>	DEGDGEEPVSSEVPGRPEQPGGLAPRPPPAQAALAAAAAPERGATAGGGAEPKLSRT	120
<i>P. penguin</i>	-----METNIVSKTEGDKYQRRLRT	21
<i>P. martensii</i>	-----MEDRRMPRLRLRT	13
<i>P. margaritifera</i>	-----MDGRMPRLRLRT	13
<i>D. rerio</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKRFCRWRDCQCANCLLVVERQVMAAQVALRRQQAETDKKGI	118
<i>H. sapiens</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKRFCRWRDCQCANCLLVVERQVMAAQVALRRQQAETDKKGL	180
<i>M. musculus</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKRFCRWRDCQCANCLLVVERQVMAAQVALRRQQAETDKKGL	180
<i>P. penguin</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKYCRWRDCQCPNCLLVVERQVMAAQVALRRHQSAESQSAL	81
<i>P. martensii</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKKFCRWRDCQCPNCLLVVERQVMAAQVALRRHQASSETSS	71
<i>P. margaritifera</i>	PKCARCRNHGVVSLKGHKKFCRWRDCQCPNCLLVVERQVMAAQVALRRHQASSETCM	71
<i>D. rerio</i>	TGKQI-----PVERRNIYQRHIRPS---TMAKSLILEGYRPVQNDPFLGANPAL	164
<i>H. sapiens</i>	SGKQN-----NFERKAVYQRQVRAP---SLAKSLILEGYRPIPAETVYGGTFPL	226
<i>M. musculus</i>	SGKQN-----NFDKAVYQRQVRAP---SLAKSLILEGYRPMIAETVYGGTLPL	226
<i>P. penguin</i>	RRHQSAESVKKGNKVDLSHRGQNLQRSLKDLHRNSLSRDATAISL---KSKLKAELIRPM	138
<i>P. martensii</i>	-----KGGKPAASDEHKILQRSLKDLQKHSLSRDVISGL---RTKL RVGSSKSV	118
<i>P. margaritifera</i>	-----KDR-KADREEHKLLQRSLKDLQKHSLSREVIAGL---RTKL RVGSAKSV	117
<i>D. rerio</i>	PPPLSDMRKRRAFADKELETTMLEREYKERELLESTQNSASLFMPGSMVHAAEYN--S	222
<i>H. sapiens</i>	PPPVSDMRKRRAFADKELENTMLEREYKEREMLETSQ---AAALFLPNRMVPGPDYN--S	282
<i>M. musculus</i>	PPPVSDMRKRRAFADKELENTMLEREYKEREMLETSQ---AAALFLPNRMVPGPEYS--S	282
<i>P. penguin</i>	VPILNEMRKRRCFADRELDIAMFKQEGLTNEKN-----SVNNVSRPDMELNTM-	188
<i>P. martensii</i>	VPILNEMRKRRCFADRDLDIAMFEREETLFTDHRDE---A-LIRTNVTRPIVNRVCTS	173
<i>P. margaritifera</i>	VPILNEMRKRRCFADRDLEIAMYEREETLSTDLRDE---A-LIYSNANMPSVNRASC	172
<i>D. rerio</i>	YKTAFFSSASAPSTVEPSPKDLGFLPGCLDSLQYATGGTTANVELISSNVSVATTYRQ	282
<i>H. sapiens</i>	YKSAYS---PSPVEPPSKDFCNFLPTCLDLTMQYSGSG---NMELISSNVSVGTTYRQ	334
<i>M. musculus</i>	YKGTYS---PTAGELPSKDFCNFLPTCLDLTMQYSGSG---NMELISSNVSVATTYRQ	334
<i>P. penguin</i>	-----KNKLTGIGEIC-P-----	200
<i>P. martensii</i>	YDKDYQR---FRPYNDRFVGFTNYNS-----	197
<i>P. margaritifera</i>	DDNGFF-----SKSHDRPVGYMTCSS-----	195
<i>D. rerio</i>	YPLSPRFVWPRGSSISDALLYQQCLLNAT-AVQNLKPGAVWPKMMSSTESHPEQDA	341
<i>H. sapiens</i>	YPLSSRFLVWPKC-GPISDTLLYQQCLLNATTSVQALKHGASWDLKGARVQDGLSAEQDM	393
<i>M. musculus</i>	YPLSSRFLVWPKC-GPISDTLLYQYLLNATTSVQALKPGTGWDLKGRVQDGLSAEQDM	393
<i>P. penguin</i>	-----KITNQCCYYDLVPSWNGMILPYPTFGRMAD-----	230
<i>P. martensii</i>	-----HFYNQGCVPFLFPR---VPSSYPP-----	219
<i>P. margaritifera</i>	-----HFYN-GCMLPLLLPS---VNPYPYPH-----	216
<i>D. rerio</i>	PASRLEGSRAPESSDLQPGPREAQTLGHNGGARSFSPPKRTYGVQVFSQ-AGSHEHV	400
<i>H. sapiens</i>	MPKLEGLSLVLPHTPEIQTTRSLDQG-HQAVPERSAFSPPRNFSPIVDTSLSAAQGHV	451
<i>M. musculus</i>	MPPKLEGLSLVLPHTPEVPSRTDLQV-HQVVPERSAFSPPGRNFSPIVDMCLAAQGHV	451
<i>P. penguin</i>	---IMNLPMTPHNVRNTLS---EHNRIQQYPEQNDIYKMQHNYHGQ-----	272
<i>P. martensii</i>	-----LHFQHSY-----NISEINTANTGT-----	238
<i>P. margaritifera</i>	-----PVLPHSY-----RS-EINTEYITI-----	234
<i>D. rerio</i>	INNMSKDTAKHTLSMKLNSFHSLIQTLNDK-NPDTNRPYCKELLLEAAKKFREGTAKDT	459
<i>H. sapiens</i>	LTKISKENTRIHPLRHNPFHSLFQQLTDKSGPELKTFFVKEAFETPKKHRECLVKDN	511
<i>M. musculus</i>	LTKLSKENTRPLPLKTNPFHSLVQQLTDKSGPELNAPFVKEAFETPKKHRECLVKES	511
<i>P. penguin</i>	-----FVEKERRQ---GES---	283
<i>P. martensii</i>	-----N-EENTSI---G---	246
<i>P. margaritifera</i>	-----K-EKESAK---S-----	242
<i>D. rerio</i>	VGLK---SSERAAKDFVAKPRCSKVTAGESLSFSVEAILKRPALSNRKSQ	507
<i>H. sapiens</i>	QKYTFTIDRCAKDLFAKQVGTGLSVNEPLSFSVESILKRPSSAITRVSQ	561
<i>M. musculus</i>	QKYTFTIDRCAKDLFAKQVGTGLSANEPFSFSVESILKRPSSAVTHVSQ	561
<i>P. penguin</i>	-----IDRNTDKDQSM---DTIQTGSSAKLKFVSASTLAMK*-----	316
<i>P. martensii</i>	-----TSPKSATSSPP---KTAGNGGTHLKFVSVESTLAM-----	278
<i>P. margaritifera</i>	-----KTKSVNSSES---KTEENGTTKHLKFVSVESTLAM-----	274

图 2 企鹅珍珠贝与其他物种 *Dmrt2* 基因编码氨基酸比对

Fig. 2 Amino acid alignment of *Dmrt2* among *Pteria penguin* and other species

采用 Clustal W 软件对企鹅珍珠贝(*P. penguin*)、斑马鱼(*D. rerio*, NP_571027.1)、人(*H. sapiens*, AAF86295.1)、小鼠(*M. musculus*, EDL41636.1)、马氏珠母贝(*P. martensii*, ADD97887.1)和黑蝶真珠蛤(*P. margaritifera*, AIE16095.1)的 *Dmrt2* 基因氨基酸序列进行排序, 相同的氨基酸涂灰色表示

The alignment of *Dmrt2* among *Pteria penguin*, *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Pinctada martensii*, and *Pinctada margaritifera* by ClustalW. Those amino acids with 100% identity are marked in gray

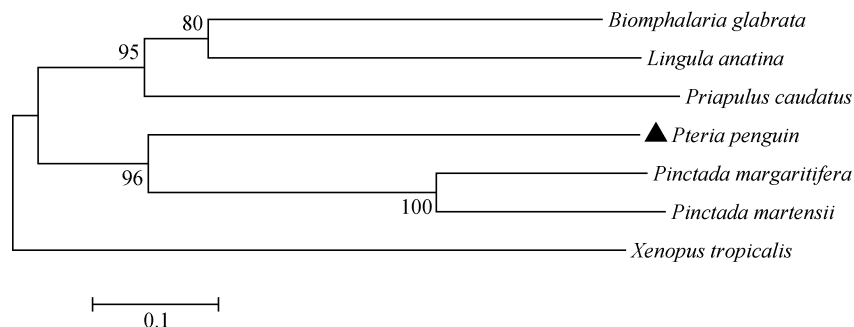


图 3 企鹅珍珠贝与其他物种 *Dmrt2* 氨基酸序列的系统进化树(NJ)
Fig. 3 Phylogenetic tree of *Dmrt2* from *Pteria penguin* and other species

聚为一个小的进化分支；光滑双脐螺、鸭嘴海豆芽和尾曳鳃虫聚为一个小的进化分支；以上所有的动物聚为一个大的进化分支，而热带爪蟾这一脊椎动物作为外群物种单独列为一个进化分支。

2.4 基因的组织定量分析

采用 qRT-PCR 技术分析 *Dmrt2* 基因在企鹅珍珠贝外套膜、鳃、闭壳肌、消化盲囊、足、精巢和卵巢中的组织表达差异，结果显示(图 4)，除在闭壳肌未检测到 *Dmrt2* 基因的表达外，在企鹅珍珠贝各个组织中均检测到 *Dmrt2* 基因表达。其中，在精巢中表达量最高($P<0.05$)，其次是足和消化盲囊，在外套膜、鳃和卵巢中的表达量较低。

不同发育时期性腺的 qRT-PCR 分析发现，在发育早期雌性性腺、成熟期雌性性腺、发育早期雄性性腺、成熟期雄性性腺、排放期雄性性腺中都可检

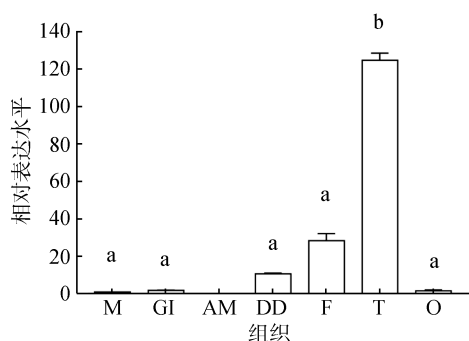


图 4 *Dmrt2* 基因在企鹅珍珠贝各组织的表达水平
Fig. 4 The expression of *Dmrt2* in different tissues of *Pteria penguin*

M. 外套膜, G. 鳃, AM. 闭壳肌, DD. 消化盲囊, F. 足, T. 精巢, O. 卵巢

相同字母表示差异不显著($P>0.05$)，不同字母表示差异显著($P<0.05$)
M. mantle; G. gill; AM. adductor muscle; DD. digestive diverticulum; F. foot; T. testis; O. ovary
The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$); different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

测到 *pmDmrt2* 基因转录本的存在，但在雄性性腺中表达水平显著高于各期雌性性腺，其中成熟期雄性性腺中表达量最高，显著高于发育早期和排放期雄性性腺($P<0.05$ ，图 5)。这暗示着 *pmDmrt2* 基因可能参与了企鹅珍珠贝的雄性分化和性腺发育。

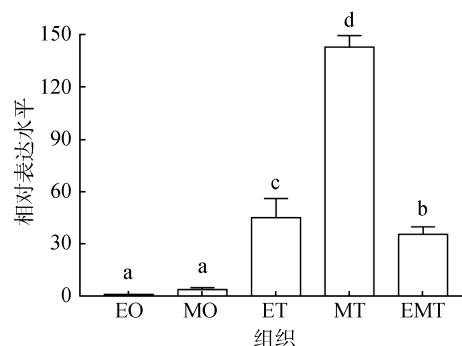


图 5 *Dmrt2* 基因在企鹅珍珠贝不同时期性腺的表达水平
Fig. 5 The expression of *Dmrt2* in different growth periods of gonads of *Pteria penguin*

EO. 发育早期卵巢, MO. 成熟期卵巢, ET. 发育早期精巢, MT. 成熟期精巢, EMT. 排放期精巢

相同字母表示差异不显著($P>0.05$)，不同字母表示差异显著($P<0.05$)
EO. early ovary; MO. mature ovary; ET. early testis; MT. mature testis; EMT. emission testis.
The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$); different letters indicate significant difference ($P<0.05$)

3 讨论

目前已在不同物种中发现了多个 *Dmrt* 家族成员^[14]，其中哺乳动物发现了 8 个 *Dmrt* 基因，分别命名为 *Dmrt1*~*8*^[15]，鸟类中发现了 *Dmrt1*~*4* 共 4 个基因^[16]，爬行类发现了 *Dmrt1*~*6* 共 6 个基因^[17]，两栖类发现了 *Dmrt1*~*5* 共 5 个基因^[18]，鱼类中发现了 *Dmrt1*~*5* 共 5 种^[19]。软体动物主要发现了 *Dmrt1*~*5* 共 5 个基因^[20]。在已发现的 *Dmrt* 基因家族中，除了人类与小鼠的 *Dmrt8* 基因编码蛋白质的 DM 结构域不完整外，

其他 *Dmrt* 基因均含有保守的 DM 结构域, 且 DM 结构域的序列成为 *Dmrt* 家族成员命名的有力佐证。Wang 等^[21]发现 *Dmrt1* 和 *Dmrt2* 基因只含有 DM 结构域, 而 *Dmrt3*~5 同时含有 DM 结构域和 DMA 结构域。本研究获得的企鹅珍珠贝 *Dmrt* 基因编码的蛋白质序列只含有 DM 结构域; 同源性分析显示, 该企鹅珍珠贝 *Dmrt* 基因与马氏珠母贝 *Dmrt2* 基因具有最高的同源性, 两者相互印证, 故确定了该企鹅珍珠贝 *Dmrt* 基因为 *ppDmrt2*。

近年来对多个物种 *Dmrt2* 基因的组织表达特征进行了分析, 许宝红等^[22]研究发现 *Dmrt2* 在中国大鲵(*Andrias davidianus*)的精巢和肌肉中高表达, Yamaguchi 等^[23]报道在成年的红鳍东方鲀中(*Takifugu rubripes*)的眼、鳃、心脏、肠、头肾、肝脏、肌肉和脾都有表达, 但在性腺中表达最高。*Dmrt2* 在斑马鱼中的精巢、卵巢、脑、肌肉和肝中都有表达, 其中在肌肉中表达量最高, 其次是精巢, 且 *Dmrt2* 在精巢中的表达量高于卵巢中的表达^[24]。成鱼青鳞(*Oryzias latipes*)*Dmrt2* 基因在精巢和卵巢中表达^[25]。*pamrg-Dmrt* 基因在黑蝶真珠蛤中的精巢中的高表达, 而在卵巢中只有微弱表达^[26]。本文利用 qRT-PCR 技术检测 *Dmrt2* 基因在不同组织中以及在雄性和雌性性腺中的表达情况, 结果显示, *Dmrt2* 基因在精巢中的表达量最高, 尤其在成熟精巢中表达量显著高于发育期精巢和排放期精巢, 而在卵巢及其他组织中的表达量低, 这与已有报道相吻合。

因 *Dmrt2* 和 *Dmrt1* 在染色体上的位置较近, 而已确定 *Dmrt1* 是鱼类^[27]、两栖类^[28]、爬行类^[29]、鸟类^[30]、哺乳类^[31]的重要性别决定和分化基因, 因此 *Dmrt2* 的功能曾经是有争议的, 有的学者认为是因为 *Dmrt1* 的突变或缺失影响了 *Dmrt2* 的功能才导致动物由雄性转为雌性, *Dmrt2* 本身并不是性别分化和性腺发育的关键基因。但是, 越来越多的研究表明 *Dmrt2* 参与了性别分化和性腺发育, 如 Yu 等^[11]对马氏珠母贝中雌雄性腺发育不同阶段的原位杂交实验显示, *Dmrt2* 在马氏珠母贝雄性性腺成熟和性别分化过程中起了重要作用。结合我们的实验结果和已有报道, 我们推测在与马氏珠母贝亲缘关系很近的企鹅珍珠贝的雄性性别分化和性腺发育过程中, *Dmrt2* 可能与起到了重要作用。

此外, *Dmrt2* 基因在企鹅珍珠贝的足中也有较高的表达, 足是贝类的运动器官, 足中通常有 4 对收缩肌, 即前后收足肌, 前伸足肌和和中举足肌各一

对^[32]。这可能与 *Dmrt2* 在肌肉中的高表达相一致^[22, 24]。

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] Picard M A, Cosseau C, Mouahid G, et al. The roles of *Dmrt* (Double sex/Male-abnormal-3 Related Transcription factor) genes in sex determination and differentiation mechanisms: Ubiquity and diversity across the animal kingdom[J]. Comptes Rendus Biologies, 2015, 338(7): 451-462.
 - [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] Matson C K, Zarkower D. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity[J]. Nature reviews. Genetics, 2012, 13(3): 163-174.
 - [5] 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(2): 179-186.
 - [6] Sato T, Rocancourt D, Marques L, et al. A Pax3/*Dmrt2*/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis[J]. PLOS Genetics, 2010, 6(4): e1000897.
 - [7] 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.
 - [8] Matsui T, Sasaki A, Akazawa N, et al. Celf1 regulation of *dmrt2a* is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development[J]. Development, 2012, 139(19): 3553-3560.
 - [9] Quinonez S C, Park J M, Rabah R, et al. 9p partial monosomy and disorders of sex development: Review and postulation of a pathogenetic[J]. American Journal of Medical Genetics Part A, 2013, 161(8): 1882-1896.
 - [10] 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.
 - [11] Yu F F, Wang M F, Zhou L, et al. Molecular Cloning and Expression Characterization of *Dmrt2* in Akoya Pearl Oysters, *Pinctada martensii*[J]. Journal of Shellfish Research, 2011, 30(2): 247-254.
 - [12] 蒙钊美, 李有宁, 邢孔武. 珍珠养殖理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 39-41.
- Meng Zhaomei, Li Youning, Xing Kongwu. The theory and technology of the pearl cultivation[M]. Beijing:

- Science Press, 1996: 39-41.
- [13] 冯永勤, 梁盛, 梁晓春, 等. 企鹅珍珠贝游离有核珍珠培育技术[J]. 水产科技情报, 2016, 43(1): 10-14.
Feng Yongqin, Liang Sheng, Liang Xiaochun, et al. The cultivation technology of round pearl in *Pteria penguin*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2016, 43(1): 10-14.
- [14] Wexler J R, Plachetzki D C, Kopp A. Pan-metazoan phylogeny of the DMRT gene family: a framework for functional studies[J]. Development Genes and Evolution, 2014, 224(3): 175-181.
- [15] Hong C S, Park B Y, Saint J P. The function of Dmrt genes in vertebrate development it is not just about sex[J]. Developmental Biology, 2007, 10(1): 1-9.
- [16] 汪海, 王婷茹, 袁静, 等. 脊椎动物 Dmrt 基因的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(5): 148-152.
Wang Hai, Wang Tingru, Yuan Jing, et al. Advances in Dmrt gene family of vertebrate[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(5): 148-152.
- [17] Wang Z, Miyake T, Edwards S V, et al. Tuatara (*Sphenodon*) genomics BAC library construction, sequence survey, and application to the DMRT gene family[J]. Journal of Heredity, 2006, 97(6): 541-548.
- [18] Bewick A J, Anderson D W, Evans B J. Evolution of the closely related, sex-related genes DM-W and DMRT1 in African clawed frogs (*Xenopus*)[J]. Evolution, 2011, 65(3): 698-712.
- [19] 曹谨玲, 陈剑杰, 甘西. 鱼类 DMRT 基因的研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(01): 94-98.
Cao Jinling, Chen Jianjie, Gan Xi. Advances in the DMRT genes research of fishes[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2011, 31(1): 94-98.
- [20] 李法君, 付春鹏, 罗永巨. Dmrt 基因在水生生物中的研究进展[J]. 水生生物学报, 2016, 40(5): 1068-1077.
Li Fajun, Fu Chunpeng, Luo Yongju. Research progress of Dmrt genes in hydrobiontes[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(5): 1068-1077.
- [21] Wang F, Yu Y, Ji D, et al. The DMRT gene family in amphioxus[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2012, 30(2): 191-200.
- [22] 许宝红, 肖真明, 肖调义, 等. 大鲵 *Dmrt2* 基因 cDNA 的克隆与表达分析[J]. 水产学报, 2012, 36(8): 1179-1184.
Xu Baohong, Xiao Zhenming, Xiao Diaoyi, et al. Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt2* gene in *Andrias davidianus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(8): 1179-1184.
- [23] 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 Proteomics, 2006, 1(1): 59-68.
- [24] Zhou X, Li Q, Lu H, et al. Fish specific duplication of *Dmrt2*: Characterization of zebrafish *Dmrt2b*[J]. Biochimie, 2009, 90(6): 878-887.
- [25] 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(7-8): 997-1005.
- [26] Teaniniraitemoana V, Huvet A, Levy P, et al. Gonad transcriptome analysis of pearl oyster *Pinctada margaritifera* identification of potential sex differentiation and sex determining genes[J]. BioMed Central Genomics, 2014, 15(1): 1-20.
- [27] 杨东, 余来宁. 鱼类性别与性别鉴定[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2): 221-226.
Yang Dong, Yu Laining. Sex and sex identification of fish[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2006, 30(2): 221-226.
- [28] Osawa N, Oshima Y, Nakamura M. Molecular cloning of Dmrt1 and its expression in the gonad of *Xenopus*[J]. Zoological Science, 2005, 22(6): 681-687.
- [29] 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]. Mechanisms of Development, 2002, 119 Suppl 1(7574): S55.
- [30] 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]. Cytogenetic & Genome Research, 2002, 99(1-4): 245-251.
- [31] Pask A J, Behringer R R, Renfree M B. Expression of DMRT1 in the mammalian ovary and testis--from marsupials to mice[J]. Cytogenetic & Genome Research, 2003, 101(3-4): 229-236.
- [32] 梁象秋, 方纪祖, 杨和荃. 水生生物学(形态和分类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 250-251.
Liang Xiangqiu, Fang Jizu, Yang Hequan. Aquatic biology (morphology and classification)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 250-251.

Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt2* gene from *Pteria penguin*

PAN Zhen-ni¹, YU Xiang-yong², WANG Mei-fang², QU Bing-liang¹, CHEN Yao-hui¹, TANG Xiao-yu¹, YU Fei-fei¹

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. School of Marine Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Received: Feb. 17, 2017

Key words: *Pteria penguin*; *ppDmrt2*; gene cloning; sex determination and gonadal development

Abstract: *Dmrt2* (doublesex and mab-3-related transcription factor 2) is an important member of the *Dmrt* gene family with a highly conserved zinc finger-like DM domain and plays an important role in somite formation, organ formation, and skeletal patterning. This study was conducted to investigate the role of *Dmrt2* in sex determination and gonadal development in *Pteria penguin*. The full-length cDNA of *Dmrt2* gene was characterized from *P. penguin* by RACE-PCR, and real-time PCR was performed to assess the expression of *Dmrt2* in different tissues and gonads of different growth periods. The results showed that the full-length cDNA of *Dmrt2* was 1257 bp, including a 5'UTR of 52 bp, a 3'UTR of 254 bp, and an open reading frame of 951 bp, which encoded a deduced protein of 317 amino acids. The DM domain was from 20 to 73 amino acids. The predicted molecular weight was 36.61 ku, and the isoelectric point was 9.80. The amino acid sequence alignment showed that *Dmrt2* of *P. penguin* shared 46.0% and 45.7% sequence identity with *Dmrt2* of *Pinctada margaritifera* and *Pinctada martensii*, respectively. The real-time PCR results showed that *Dmrt2* was constitutively expressed in the mantle, gill, digestive diverticulum, foot, testis, and ovary, except in the adductor muscle. The expression level was highest in the testis ($P < 0.05$), followed by the foot. The expression analysis in gonads of different growth periods revealed that *Dmrt2* had lower expression in early ovary and mature ovary, higher expression in early testis and emission testis, and the highest expression in mature testis ($P < 0.05$). This study showed that *ppDmrt2* might play a role in sex determination and gonadal development in *P. penguin*.

(本文编辑: 梁德海)