

马氏珠母贝(*Pinctada matensii*) 3 个 DM 结构域的克隆及序列分析 *于非非¹, 周 莉², 王梅芳¹, 余祥勇^{1**}, 桂建芳²

(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)

关键词: 马氏珠母贝; DM 结构域; double sex and Mab-3 related transcription factor

中图分类号: S188 文献标识码: A 文章编号: 10061304(2007)-05-0905-02

Cloning and Sequence Analysis of Three DM Domain in *Pinctada martensii*YU Fei-fei¹, ZHOU Li², WANG Mei-fang¹, YU Xiang-yong^{1**}, GUI Jian-fang²

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China; 2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Key words: *Pinctada matensii*; DM domain; double sex and Mab-3 related transcription factor

Dmrt (double sex and Mab-3 related transcription factor) 是新发现的与动物性别决定和分化相关的基因家族 (Kondo et al., 2002), 在多种进化地位的物种中都具有高度保守性。然而在作为动物界第二大门的贝类中, 是否也存在高度保守的 Dmrt 基因家族, 是否具有丰富的多样性? 到目前为止未见任何相关报道。马氏珠母贝是我国人工培育海水珍珠的最主要母贝, 在其养殖群体中有少数雌雄同体个体, 并在一定条件下出现性转化。因此, 克隆鉴定马氏珠母贝的 Dmrt 基因既可丰富 Dmrt 基因家族的成员, 探讨 Dmrt 基因在贝类中的保守性; 也为进一步克隆贝类的性别决定和分化的候选基因, 为探讨贝类性别决定和分化机制提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

马氏珠母贝(*Pinctada matensii* (Dunker)) 的一个雄性个体, 取自广东省湛江市流沙湾养殖群体。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取马氏珠母贝的消化盲囊, 利用 E.Z.N.A Tissue DNA Kit 试剂盒(Clontech 公司)提取其基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 DM 结构域 根据 Dmrt 基因家族保守的 DM box 的氨基酸序列, 设计 1 对简并引物, 引物序列分别为:

Sense primer: 5'-TG(TC)GCX(CA)GXTG(TC)(CA)GXAA(TC)CA(TC)GG-3';

Antisense primer: 5'-(CT)(TG)G C(A)(AG)XG CXAC (CT)TGXGCGGCCA-3'。

以马氏珠母贝的基因组 DNA 为模板扩增 DM 结构域, PCR 反应条件为: 97 预变性 5 min, 进行 35 个循环, 每个循环包括 94 变性 40 s, 54 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, 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 感受态细胞, 筛选克隆测序 (联合基因公司)。

1.2.3 序列分析 在 NCBI 进行氨基酸序列推测及其同源基因的搜寻。将所获得的 DM 结构域编码的氨基酸序列用 Clustal X (1.8) 软件进行测序。用 MEGA3 软件构建 MP 树。

2 结果和讨论

2.1 DM 结构域的克隆及序列分析

利用简并引物, 克隆 1 条预定大小的片段。筛选了其中 48 个阳性克隆进行测序分析, 共获得了 3 个不同的 DM 序列 (图 1), 它们大小均为 141 bp, 编码 47 个氨基酸, 它们分别与其它物种的 Dmrt2、Dmrt3 和 Dmrt4 的同源性最高, 因此分别被命名为 pmDmrt2、pmDmrt3 和 pmDmrt4。其中 pmDmrt2 编码的氨基酸序列与斑马鱼 (*Danio rerio*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、爪蟾 (*Xenopus Laevis*)、红原鸡 (*Gallus gallus*)、家鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 的 Dmrt2 的一致性最高, 为 95%; pmDmrt3 编码的氨基酸序列与斑马鱼、青鳉、红原鸡、家鼠、人的 Dmrt3 的一致性均高达 85%; pmDmrt4 编码的氨基酸序列与青鳉、红鳍多纪鲃 (*Takifugu rubripes*) 的 Dmrt4 一致性高

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

** 通讯作者。Author for correspondence. 博士, 教授, 主要从事贝类遗传育种与养殖技术研究。Tel: 0759-2382184, E-mail: <yuxyong@tom.com>.

收稿日期: 2006-12-27 接受日期: 2007-06-13

达 97%。这表明在马氏珠母贝的基因组中不但存在 Dmrt 基因家族,而且存在多个 Dmrt 基因家族的成员。



图 1. 马氏珠母贝 3 个 DM 结构域的核苷酸序列比对

Fig.1. Nucleotide sequence alignment of 3 DM domains in *Pinctada martensii*

2.2 Dmrt 基因家族成员与同源蛋白的比较及其系统发育关系

马氏珠母贝与处于不同进化地位的物种的 Dmrt 2、Dmrt 3 和 Dmrt 4 基因 DM 结构域氨基酸序列的比对结果表明,在所分析的 47 个氨基酸中,共有 32 个氨基酸 (约占 68%) 在所有物种中是完全相同 (图 2)。

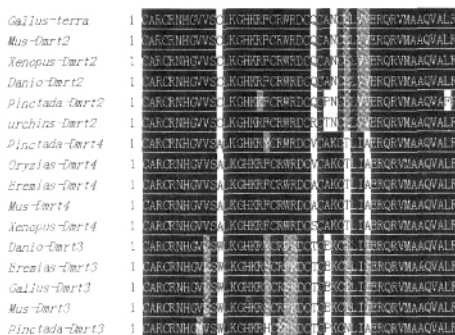


图 2. 马氏珠母贝 DM 结构域与其它物种 DM 结构域的氨基酸序列比较

Fig.2. Amino acid alignment of DM domains in *Pinctada martensii*, *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Xenopus Laevis*, *Eremias brencleyi*, *Gallus gallus*, *Mus musculus* and *Strongylocentrotus* with Clustal X (1.8) program

白色部位表示相似性最低,灰色部位的相似性较高,黑色部位表示序列完全相同。

Those amino acids showing identity are are lowest in white,more higher in gray and completely in black, respectively.

参 考 文 献

Guo Y, Cheng H, Huang X, et al. Gene structure multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1 [J], *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005,330:950-957

Kondo M, Froschauer A and Kitano A. Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*(J).*Gene*, 2002,295:213-222

Randy L, Wang K and Wang Y. Targeted disruption of the DM domain

采用 Mega V3.1 软件分析了 16 个不同物种的 Dmrt 成员,聚类分析显示,所有动物的 Dmrt2、Dmrt3 和 Dmrt4 分别聚为一个自然进化分枝,从而清楚地将 Dmrt 家族分为 Dmrt2、Dmrt3 和 Dmrt4 三个亚家族 (图 3)。从任一个亚家族看,鱼类、两栖动物、爬行动物、鸟类、哺乳动物构成一个独立的进化分枝,马氏珠母贝和海胆另外分别成为一个独立的自然分枝,表明软体动物的 Dmrt 基因较脊椎动物的 Dmrt 基因有更早的进化分歧历史。

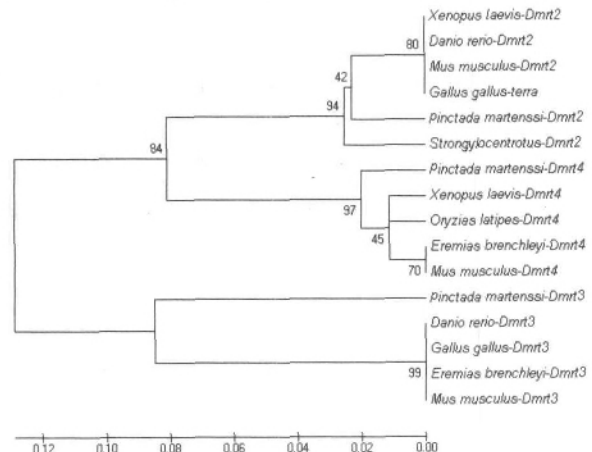


图 3. 马氏珠母贝 DM 结构域与其它动物的系统发育树

Fig.3. Phylogenetic tree of *Pinctada martensii* DM *martensii* and other homologues

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

2.3 马氏珠母贝 Dmrt 基因家族成员功能的探讨

到目前为止,很多研究证明 Dmrt1 在脊椎动物的性别分化中起着重要作用 (Guo et al., 2005)。Dmrt2 被认为是脊椎动物形成正常的体节必不可少的关键因子 (Saude et al., 2005), Randy et al. (2006) 还认为, Dmrt2 可能在性别分化中起着重要作用。Dmrt3 和 Dmrt4 在脊椎动物的性腺中都有表达 (Smith et al., 2003)。因此,进一步克隆马氏珠母贝 Dmrt 基因家族成员全长,研究各个成员在雌雄性腺中的时空表达差异以及它们在马氏珠母贝性腺发育过程中的具体功能具有重要意义。

containing transcription factor Dmrt2 reveals an essential role in somite patterning(J). *Developmental Biology*, 2006,290:200-210

Saude L, Lourenco R and Goncalves A. terra is a left-right asymmetry gene required for left-right synchronization of the segmentation clock(J). *Natural Cell Biology*, 2005,7: 918-920

Smith C A, Hurlley T M and Sinclair A H. Restricted expression of DM-RT3 in chicken and mouse embryos (J).*Gene Expression Patterns*, 2003,2: 69-72