

虾夷扇贝不同性别类型 2 个 *Dmrt* 基因 DM 结构域分析

周丽青¹, 杨爱国¹, 王清印¹, 郑利兵², 刘志鸿¹, 侯 丫², 郑言鑫²

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛, 266071;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为探讨虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)性别决定和雌雄同体形成的分子机制, 利用兼并引物, 以闭壳肌基因组 DNA 为实验材料, 扩增和克隆了虾夷扇贝 *Dmrt* 基因的 DM 结构域, 雌性、雄性和雌雄同体 3 种性别共获得 2 个具有不同 DM 序列的克隆, 序列长度均为 141bp, 分别命名为 *PyDmrt3* 和 *PyDmrt4*。*PyDmrt3* 在 3 种性别类型中均有克隆, 而雄性中还克隆出 *PyDmrt4*。结果表明, 在虾夷扇贝不同性别中, *Dmrt* 基因家族的成员可能会有不同; 雄性 *pyDmrt3* 的 DM 结构域核苷酸和氨基酸变异频率高, 其次是雌雄同体, 雌性的较保守, 与其他软体动物 DM 结构域比对, 该基因家族在进化上仍然高度保守, 由此推测, 部分雄性可能是发生了性逆转的雌雄同体, 这种较高的变异性可能也是雌雄同体的一个特点, *PyDmrt4* 可能参与调控雄性性别的形成。

关键词: 虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*); 性别; DM 结构域; *Dmrt* 基因; 性逆转
中图分类号: Q751 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2015)03-0019-07
doi: 10.11759/hyxx20140125001

虾夷扇贝(*Patinopecten(Mizuhopecten) yessoensis* (Jay)), 属瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pterioidea)、扇贝科(Pectinidae), 是我国北方海区重要养殖经济物种, 每年 2~5 月份是虾夷扇贝的繁殖季节, 绝大多数表现为雌雄异体形, 但养殖群体中常见有较高比例的雌雄同体, 且该比例呈现逐年上升趋势^[1]。课题组历时 3 年(2011~2013 年)开展了成熟期虾夷扇贝生殖腺观察及组织切片分析, 也发现雌雄同体生殖腺随着水温的升高呈现雌性向雄性逆转的趋势。然而, 关于产生该现象的遗传原因尚未见有报道, 课题组基于他人已构建的遗传连锁图谱筛选出雌性和雌雄同体特异性 AFLP 分子标记, 证明雌雄同体的基因组 DNA 与雌性和雄性的存在明显差异, 推测雌雄同体可能是一个单独的群体。为进一步证明这个推论, 并探讨虾夷扇贝性别决定和雌雄同体形成的分子机制, 本研究拟利用兼并引物, 以闭壳肌基因组 DNA 为实验材料, 扩增和克隆不同性别类型虾夷扇贝 *Dmrt* 基因的 DM 结构域, 且进一步了解贝类 *Dmrt* 基因的进化。

Dmrt(Doublesex and Mab-3 related transcription factor)基因家族与果蝇的性别决定基因 *Dsx* 及线虫的性别决定基因 *Mab-3* 有一个共同的结构特征, 所编码的蛋白质都含有一个具有 DNA 结合能力的保守序列——DM 结构域, 该结构域能以锌指方式与特定

的 DNA 序列相结合, 并调控下游基因的表达, 从而控制性别的分化及早期发育^[2-4]。张月圆等^[5]认为, *Dmrt* 基因家族对胚胎性别分化、性器官发育、配子的形成具有重要作用, 且对雄性的作用大于雌性。在虾蟹类、鱼类、两栖类等水产动物中都检测到了 *Dmrt* 基因的存在, 该基因家族 DM 结构域的碱基序列在进化上具有高度的保守性, 但功能上存在物种的差异性^[6-8]。*Dmrt1* 已被证实鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类动物等脊椎动物的性腺分化中起着极其重要的作用, 一个很重要的发现是 *Dmrt1* 不仅仅在不同发育阶段的生殖腺中表达有差异, 而且仅在特定的发育阶段及特定的雄性配子中有表达, 因此, Xia 等^[9]认为开展其他种类尤其是存在有雌雄同体或性逆转的 *Dmrt* 基因的研究将会打开一个新的视角。软体动物中有关 *Dmrt* 基因家族的研究较少, 仅牡蛎、扇贝、马氏珠母贝和海兔见有报道。于菲菲等就双壳类性转化现象及其机理进行了探讨^[10], 克隆了马氏

收稿日期: 2014-05-28; 修回日期: 2014-10-05

基金项目: 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022012003); 山东省自主创新专项(2013CX80202)

作者简介: 周丽青(1974-), 女, 湖南祁东人, 硕士, 副研究员, 从事贝类遗传育种和种质资源研究, E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn; 杨爱国, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-85811982, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

珠母贝 *Dmrt5* 基因, 并进行了时序表达模式分析^[11]。冯政夫等^[12]从栉孔扇贝精巢中克隆得到 *Cf-dmrt4-like* 基因, 并认为该基因在两性感体中发挥着不同的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

2011年3月~5月和2012年1~5月, 从青岛市南山水产品市场多批次购买虾夷扇贝, 据调查样品来源分属山东威海、长岛、荣成、烟台和辽宁大连等海区, 均为人工养殖2~3龄扇贝。依据生殖腺外观区分性别: 橘红色生殖腺为雌性, 乳白色为雄性, 橘红色与乳白色镶嵌者为雌雄同体, 组织切片观察进一步确定性别类型, 雌性、雄性、雌雄同体各30只。壳高范围7.5~9.5cm。

1.2 DNA提取、PCR扩增和DM克隆

采用《分子克隆》(第三版)Sambrook(1989)的经典方法, 从闭壳肌中提取基因组DNA。将同种性别的基因组DNA等量混合用作PCR模板DNA。参照文献[6], 设计简并引物如下: D5: 5'-TGCG(AGC)(AC)G(AG)TGC(AC)G(AG)AA(CT)CACGG-3'; D6: 5'-C(GT)(GC)AG(GC)GC(GC)ACCTG(GC)(AGCT)GGCCAT-3', 交由上海生工生物工程有限公司合成。预实验反应体系设为25 μ L; 退火温度摸索成功后, 反应体系为50 μ L。循环参数为95 $^{\circ}$ C预变性5min, 94 $^{\circ}$ C变性30s, 58 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸1min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C在延伸10min。PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后拍照。

PCR扩增产物送华大基因公司进行TA克隆, 该公司通过蓝白斑筛选、菌落PCR和质粒酶切方法筛选阳性克隆, 并测序。

1.3 DM序列的分析

将获得的阳性克隆测序的碱基序列输入www.ncbi.nlm.nih.gov网站, 通过blastn在线检索, 依据与其他贝类已获得*Dmrt*基因DM结构域的DNA及氨基酸序列相似性确定名称, 并进行同源性比对。通过Clustal X软件对相应的氨基酸序列进行分析, 系统进化树通过MEGA 5.2软件UPGMA法构建。由于所测DM结构域的DNA序列高度一致, 后续分类、系统分化及同源性比对均简化为典型序列的分析。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

简并引物在3种性别类型基因组DNA中扩增均获得长为141bp的片段, 琼脂糖凝胶电泳并没有明显性别差异(图1)。

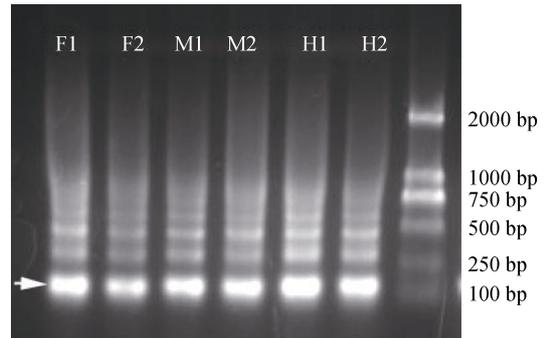


图1 虾夷扇贝雌性(F)、雄性(M)和雌雄同体(H)3种性别DM结构域序列PCR扩增结果

Fig.1 The PCR amplification result of DM domain in three sex types of *Patinopecten yessoensis*

2.2 *Dmrt*基因DM结构域

从3种性别的克隆产物中分别挑取60个阳性克隆测序, 其中42个雌性(F)克隆测序成功, 雌雄同体(H)44个, 雄性(M)53个, 合计139个。这139个*Dmrt*基因DM保守区序列经UPGMA聚类, 共分为2大类, 一类在3种性别类型中均有出现, 另一类仅雄性中克隆出。第一类DM保守区碱基序列不能完全将3类性别区分开, 但多数雌雄同体、雄性、雌性分别聚在一起。

通过blastn在线检索, 在GenBank查找到与虾夷扇贝*Dmrt*序列相近的软体动物Sequence ID 4个: ABS88697.1(*Crassostrea gigas*1)、EKC22641.1(*Crassostrea gigas*2)、ADK55063.1(*Azumapecten farreri*)和XP_005096932.1(*Aplysia californica*)。于菲菲等^[13]从马氏珠母贝*Pinctada matensii*(Dunker)基因组中克隆获得的3种*Dmrt*基因DM序列(*pmDmrt*2、*pmDmrt*3、*pmDmrt*4)。为清楚地展示DM结构域的变异情况, 作者分别从3种性别中选取发生碱基变异的氨基酸序列与上述物种的进行比对(图2)。经UPGMA聚类, 雄性M-F09和M-C11首先与*Crassostrea gigas*1、*Azumapecten farreri*、*pmDmrt*4聚为一类, 命名为*PyDmrt*4; 其余的氨基酸序列, 雌性(F)先聚在一起, 然后与雌雄同体(H)和雄性(M)相

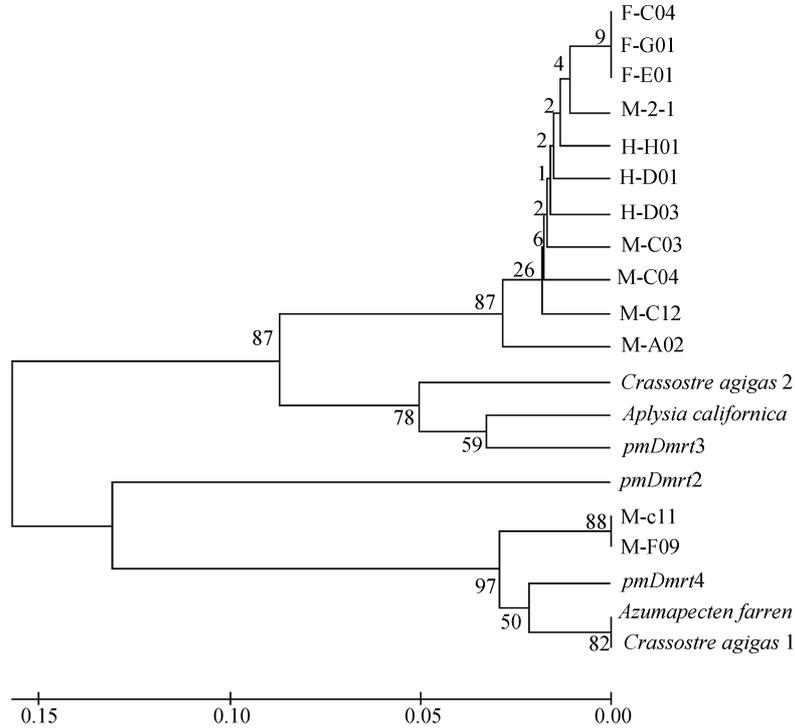


图 3 虾夷扇贝 13 条 *Dmrt* 基因 DM 结构域和相近物种的氨基酸序列 UPGMA 聚类图

Fig.3 The UPGMA clustering figure of amino acid sequence of DM domain in *Dmrt* gene between *Patinopecten yessoensis* and related species

表 1 虾夷扇贝 *PyDmrt3* 核苷酸与氨基酸在不同性别类型中的变异情况

Tab.1 The DNA and amino acid variation in *PyDmrt3* sequences of three sex types of *Patinopecten yessoensis*

性别	序列条数	核苷酸变异位点数	氨基酸变异位点数
雌性	42	5	0
雄性	43	11	9
雌雄同体	44	5	4

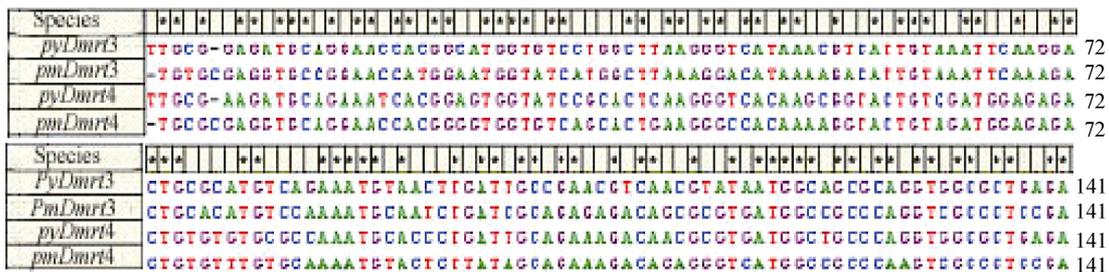


图 4 *PyDmrt3*、*PyDmrt4* 与 *pmDmrt3*、*pmDmrt4* DNA 序列比对及 UPGMA 聚类图

Fig.4 Alignment and UPGMA clustering figure of DNA sequences of DM domain of *PyDmrt3*, *PyDmrt4*, *pmDmrt3* and *pmDmrt4*.

栉孔扇贝与虾夷扇贝在分类地位上同科不同属,二者间存在非常大的遗传差异,在性别表型方面也存在较大的差异,如虾夷扇贝雌雄同体的比例明显高于栉孔扇贝。尽管 *pyDmrt4* 与 *Cf-dmrt4-likeDM* 结构域氨基酸序列一致,但核酸序列仍有 6 个碱基的差异,估计这两种扇贝原始性别决定方式即便一样也还要受到 *dmrt* 等基因的多重调控,所以,相同的基因在不同的物种中的表达会存在很大的差异。陈启龙等^[19]认为, *Dmrt* 基因家族在性别决定及发育中的作用主要表现为广泛参与雄性的性别决定与分化, Kondo 等^[20]认为 *Oryzias latipes* 的 *Dmrt2* 和 *Dmrt4* 可能与精子的发生有关。

pyDmrt3 在雄性中表现出较高的变异频率,其次是雌雄同体,雌性的氨基酸序列则较保守,由此推测,部分雄性可能是由雌雄同体发生性逆转变成的,这种较高的变异性可能也是雌雄同体的一个特点,当然 *pyDmrt3* 基因突变与虾夷扇贝性逆转是否有关还有待进一步研究。水怡等^[21]认为 *Dmrt3* 可能与熊猫睾丸发育有关,因为她发现在人类、小鼠以及鱼类中, *Dmrt3* 基因恰好位于 *Dmrt1* 基因的 3'端,它与 *Dmrt1* 基因一起被认为与人类 9 号染色体短臂缺失引起的性反转相关联。而 *Dmrt1* 基因已被很多的学者证实与雄性性别相关, Matsuda 等^[22]发现了只限于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*, 是 *Dmrt1* 基因的一个拷贝,是青鳉调控雄性发育的一个主效基因。郑江霞等^[23]的实验结果也支持了 *Dmrt1* 是鸟类睾丸发育决定因子的假说。陆怡等^[24]认为,在进化地位不同的物种中, *Dmrt3* 的表达模式存在着差异,说明在进化过程中,其表达模式可能发生迁移(shift),而这种迁移在 *Dmrt* 基因家族成员中较为普遍。我们通过对雌雄同体虾夷扇贝生殖腺进行组织切片观察发现,虾夷扇贝存在性逆转现象,主要是雌性向雄性的逆转(另有文章说明),这与 *pyDmrt3* 基因在雌性中稳定表达,而在雌雄同体,尤其是雄性中高频非同义突变的结果是一致的。

3.2 虾夷扇贝 *Dmrt* 基因 DM 结构域的保守性

blastn 在线检索结果表明,各种动物 *Dmrt* 基因家族的基因成员在结构和功能上具有高度的保守性,说明 *Dmrt* 基因家族在性别分化中的作用是保守的。不同物种 *Dmrt* 基因 DM 结构域核苷酸序列和

氨基酸序列的同源性与其变异性可反映出它们进化地位的差异^[5]。虾夷扇贝 *pyDmrt3* 和 *pyDmrt4* 的核苷酸和氨基酸序列与软体动物、无脊椎动物的同源性高,与尾索和头索动物的同源性也较高,但与脊椎动物的同源性相对较远,恰好体现其在物种进化中的地位。不同物种的 *Dmrt* 基因 DM 结构域均有一定的保守区域,又有其自身的特异性位点或变异位点,这些位点有可能对雌雄同体的产生起决定性的作用。*pyDmrt3* 和 *PyDmrt4* 基因 DM 结构域有 5 个高度保守的区域: LRRCRNHG、SW(A)LKGGH、RH(Y)CK (R)F(W)K(R)D、A(V)CQ(A)KCN(T)LI、I(V)MAAQVALR, 合计 38 个氨基酸,在 47 个氨基酸中占 80.9%,这些氨基酸序列的保守性也暗示了这两个基因功能上的保守性。

pyDmrt3 碱基变异频率高,有同义突变也有非同义突变,徐玲花等^[25]认为 CCHC 和 HCCC 锌离子结合位点是高度保守的,彭巧玲等^[26]也证实 C2/H2 型锌指结构的保守性,然而在本研究中,75 个克隆中雌雄同体 H-D03 和雄性 M-A02 氨基酸突变位点就发生在第 24 位半胱氨酸(C)的位置,这表明虾夷扇贝不同于其他物种,有可能是性逆转的分子依据,待今后实验加以考证。

参考文献:

- [1] 于瑞海,王昭萍,赵雪琳,等. 虾夷扇贝雌雄同体自体受精繁殖生物学的研究[J]. 中国海洋大学学报, 2011, 41(11): 23-26.
- [2] Hong C S, Park B Y, Saint-Jeannet J P. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: It is not just about sex[J]. *Developmental Biology*, 2007, 310(1): 1-9.
- [3] Naimi A, Martinez A S, Specq M L, et al. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology(Part A)*, 2009, 152(2): 189-196.
- [4] 杨岐生. 分子生物学基础[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 92-93.
- [5] 张月圆,王昌留. *DMRT* 基因家族研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 345(11): 1660-1665.
- [6] 彭巧玲,蒲友光,程子华,等. 罗氏沼虾 3 个 *Dmrt* 基因的序列分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(1): 5-9.
- [7] 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[J]. 海洋科学,

- 2010, 34(1): 97-102.
- [8] 葛永斌, 曹承和, 聂刘旺. 饰纹姬蛙 7 个 *Dmrt* 基因 DM 结构域的克隆及序列分析[J]. 生命科学研究, 2008, 12(2): 110-114.
- [9] 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(1-2): 156-172.
- [10] 于菲菲, 余祥勇, 王梅芳, 等. 双壳类的性转换现象及其机理探讨[J]. 水生生物学报, 2007, 31(4): 576-580.
- [11] 于菲菲, 桂建芳, 周莉, 等. 马氏珠母贝 *Dmrt5* 基因的克隆及时序表达模式分析[J]. 水生生物学报, 2009, 844-850.
- [12] 冯政夫, 邵明瑜, 孙大鹏, 等. 栉孔扇贝 *Cf-dmrt4-like* 基因的克隆、序列特征及表达分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 930-939.
- [13] 于菲菲, 周莉, 王梅芳, 等. 马氏珠母贝(*Pinctada matensii*)3 个 DM 结构域的克隆及序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(5): 905-906.
- [14] 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 Physiology (Part D), 2006, 1(1): 59-68.
- [15] 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.
- [16] Cao J L, Cao Z M, Wu T T. Generation of antibodies against DMRT1 and DMRT4 of *Oreochromis aurea* and analysis of their expression profile in *Oreochromis aurea* tissues[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(6): 497-509.
- [17] Guan G J, Kobayashi T, Nagahama Y. Sexually dimorphic expression of two types of DM(*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*oreochromis niloticus*)[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000, 272(3): 662-666.
- [18] 赵寿元, 乔守怡. 现代遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 217-219.
- [19] 陈启龙, 唐鑫生. 大绿蛙 Sox 基因和 *Dmrt* 基因的 PCR-SSCP 分析[J]. 四川动物, 2007, 26(2): 319-322.
- [20] Kondo M, Froschauer A, Kitano A, et al. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*[J]. Gene, 2002, 295(2): 213-222.
- [21] 水怡, 余红仕, 夏来新, 等. 大熊猫 *Dmrt* 基因家族 4 个成员基因的克隆[J]. 遗传学报, 2004, 31(5): 468-473.
- [22] 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.
- [23] 郑江霞, 杨宁. 鸟类性别决定候选基因在性反转鸡胚中的表达[J]. 遗传, 2007, 29(1): 81-86.
- [24] 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[J]. 浙江大学学报(自然科学版), 2012, 39(5): 564-570.
- [25] 徐玲花, 严镇钧, 曾庆韬. 大鳞副泥鳅 3 个 *Dmrt* 基因 DM 保守区的序列分析[J]. 遗传, 2008, 30(11): 1448-1452.
- [26] 彭巧玲, 程子华, 蒲友光, 等. 赤子爱胜蚓 5 个 *Dmrt* 基因的序列分析[J]. 激光生物学报, 2005, 14(5): 343-347.

Sequence analysis of DM domain in two *Dmrt* genes of three sex types of *Patinopecten yessoensis*

ZHOU Li-qing¹, YANG Ai-guo¹, WANG Qing-yin¹, ZHENG Li-bing², LIU Zhi-hong¹, HOU Ya², ZHENG Yan-xin²

(1 . Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2 .College of Fisheries and Life , Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Received: May, 28, 2014

Key words: *Patinopecten yessoensis*; sex; DM domain; *Dmrt* gene; sex reversal

Abstract: In order to study the molecular mechanism of sex determination and the causes of formation of hermaphrodite scallops in cultured *Patinopecten yessoensis* populations, we used degenerate PCR to amplify the *Dmrt* gene conserved DM domain from three sex types of genomic DNA. The PCR products have a length of 141 bp, and after DNA cloning and sequencing analysis, 2 different DM domain sequences were identified and named as *pyDmrt3* and *pyDmrt4*. *pyDmrt3* existed in three sex types, while *pyDmrt4* was only cloned from male scallops genomic DNA. Differences presented in *Dmrt* gene sequences of different sex types. Comparing to other mollusks, the DM domain is evolutionarily conserved, while the highest variation frequency of the DNA and amino acid sequences was in male *pyDmrt3*, secondly in hermaphrodite *pyDmrt3*, but relatively high degree of sequence homology in female DM domain. It is inferred that part of males might come from hermaphrodite sex reversal, and the higher degree variation frequency may be one feature of hermaphrodite scallops. *PyDmrt4* participates in the male sex determination possibly.

(本文编辑: 梁德海)