

海蜇 *dmrta2* 基因的克隆及其在横裂生殖中的表达分析

葛建龙¹, 陈晓辉¹, 陈四清¹, 刘长琳¹, 陈昱辰², 边力¹, 张盛农¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071; 2. 盐城市华亿水产有限公司, 江苏 盐城 224300)

摘要: *Dmrt* 基因家族在后生动物性别决定与分化以及组织和器官的形成等发育过程中发挥着重要作用。为探究 *dmrta* 家族基因在海蜇(*Rhopilema esculentum*)横裂生殖中的功能, 本研究以海蜇转录组测序获得的 *dmrta2* 基因片段为基础, 通过 RACE 技术获得了海蜇 *dmrta2* 基因的 cDNA 全长, 并分析了其在横裂生殖不同时期的表达模式。结果显示海蜇 *dmrta2* 基因 cDNA 全长为 1 804 bp, 开放阅读框为 1 011 bp, 所编码蛋白质含 336 个氨基酸, 分子质量为 37.25 kDa, 理论等电点为 9.11。预测海蜇 *dmrta2* 编码蛋白为亲水性蛋白质, 无跨膜区域, 不含信号肽。在 33 至 79 位氨基酸之间具有 *dmrt* 基因家族保守的 DM 结构域, 与珊瑚、果蝇等物种的同源基因相应区域高度一致。系统进化分析显示, 海蜇 DMRTA2 与鹿角珊瑚 DMRTA2 和 DMRT3 以及海葵 DMRTA2 的亲缘关系最近。原位杂交显示 *dmrta2* 基因在海蜇横裂生殖后期主要表达于感觉缘叶原基位置, 在初生碟状体中表达于感觉棍位置。研究结果表明, *dmrta2* 基因参与海蜇横裂生殖过程, 可能主要与感觉棍神经系统的分化发育相关, 研究为进一步解析海蜇等钵水母横裂生殖的分子调控机制提供了基础数据。

关键词: 海蜇; 横裂生殖; *Dmrt2*; 表达模式

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)06-0042-09

DOI: 10.11759/hyxx20210308002

Dmrt(double-sex and mab-3 related transcription factor) 是指与果蝇 *dsx* 基因和线虫 *mab-3* 基因同源的一类转录调控因子, 主要特征是所编码的多肽链中包含保守的锌指样 DNA 结合基序—DM 结构域^[1]。目前, 除海绵动物外所有后生动物中均报道了 *dmrt* 基因的存在^[2], 而不同物种中 *dmrt* 基因的种类不尽相同^[1], 功能涉及性别决定与分化、组织和器官的形成以及相关功能的维持等多方面^[3]。

海蜇(*Rhopilema esculentum*)主要分布于西北太平洋, 其生长迅速、胶质层厚实, 深受消费者喜爱, 是我国重要的增养殖品种, 同时是我国开展钵水母研究的代表种类^[4]。海蜇具有世代交替的生活史, 包括营栖息生活的无性阶段(即钵口幼体或水螅体)和营浮游生活的有性阶段(即水母体)^[4]。在这样的生命周期中, 从水螅体转变为水母体是通过一个有序变态的过程实现的, 即“横裂生殖”。横裂生殖是海蜇等钵水母特有的一种无性繁殖方式, 首先, 横向收缩将水螅体从近口端向远口端依次分割为裂节, 其次, 两个收缩之间的裂节部分经过变态发育成碟状体, 随后, 它们与水螅体母体脱离开始其浮游生活,

并在几周内生成为幼水母^[5]。随着一次横裂生殖的完成, 一些水螅体可以再生一个新的口柄和触手, 并恢复他们以前的生活方式^[5]。生活史各环节中, 横裂生殖是钵水母从水螅体向水母体转变的重要阶段, 是影响水母体种群数量的重要环节。

横裂生殖作为钵水母特有的无性生殖方式, 其显著地变态发育过程一直吸引着国内外学者的关注^[6-7]。我们先前的研究发现 *dmrt* 家族基因等 11 个转录调控因子可能与海蜇横裂生殖相关^[8], 与该研究结果相似, 在海月水母(*Aurelia aurita*)中也鉴定了一个可能与横

收稿日期: 2021-03-08; 修回日期: 2021-07-20

基金项目: 政府间国际科技创新合作重点专项(2017YFE0111100-5); 国家自然科学基金项目(31702327); 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室开放课题(20603022019020)

[Foundation: Key Program for International S&T Cooperation Projects of China, No. 2017YFE0111100-5; National Natural Science Foundation of China, No. 31702327; Fund of Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, No. 20603022019020]

作者简介: 葛建龙(1988—), 男, 山东泰安人, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物繁殖生物学研究, E-mail: gejl@ysfri.ac.cn; 陈四清(1966—), 通信作者, 研究员, 研究方向: 水产动物繁育及增养殖技术, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

裂生殖相关的 *dmrt* 家族基因^[9], 然而 *dmrt* 家族基因在钵水母横裂生殖中的具体作用尚无研究报道。因此, 本研究基于转录组测序获得的海蜇 *dmrta2* 基因的部分序列, 通过 RACE(rapid-amplification of cDNA ends) 技术获得了该基因的全长序列, 并分析了其海蜇横裂生殖过程的表达模式, 旨在为阐明海蜇横裂生殖分子调控机制提供一定基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

海蜇螵状体来自江苏省盐城市金洋水产良种场, 运回实验室暂养于光照培养箱中, 螵状体为当年繁育获得。采用升温法(培育水温按 2 °C/d, 由 10 °C 升高至 18 °C)诱导其横裂生殖, 分别获取螵状体、横裂初期、横裂后期和碟状体时期的样品, 用于 RNA 提取的样品浸入液氮速冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱。

1.2 总 RNA 提取以及基因全长的克隆

采用 Trizol 法提取各样品总 RNA, 具体步骤参

照 Trizol 试剂(Invitrogen)使用说明书。RNA 质量及浓度分别通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 紫外分光光度计检测合格后, 利用 Prime Script™ RT reagent Kit 试剂盒(TaKaRa), 反转录获得 cDNA 第一链。

首先, 以先前转录组测序中获得的一段 *dmrta2* 同源序列为核心序列, 据此设计核心片段扩增引物(表 1), 通过 PCR 扩增和 Sanger 测序确认核心序列。然后, 以确认后的核心序列为模板分别设计 5'RACE 和 3'RACE 的特异性引物, 按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒(Clontech)操作说明扩增基因 5'末端和 3'末端。PCR 产物经切胶回收目的片段, 连接至 pMD19-T 载体后转入 E. coli DH5α 细胞中, LB 液体培养基培养后均匀涂布于 LA(含氨苄青霉素)固体平板, 挑取阳性克隆样品送至上海生工生物公司测序。最后, 利用 SeqMan 将核心片段及 5'RACE 和 3'RACE 片段的测序结果进行拼接, 获得 cDNA 序列全长。

表 1 基因克隆及表达分析所用引物序列

Tab. 1 Primer sequences for gene cloning and expression analysis

引物编号	引物序列	用途
Redmrt-1F	TCAGTTGGTCATTTGTCGTTTC	核心片段扩增
Redmrt-1R	ATCTGAAGCAGGTCTGTTGGA	核心片段扩增
Redmrt-5'-OUTER	GCTTGAGGTATCCATTTGTGTCC	5'RACE
Redmrt-5'-INNER	ATGCGGTTGTGGTCGGCTTC	5'RACE
Redmrt-3'-OUTER	GCGAAACAGAGAAAGAAGACGAG	3'RACE
Redmrt-3'-INNER	ACATCACATCCCGCAGCAGA	3'RACE
GAPDH-F	ACTTGTTTCCTGGTATGACAAT	内参基因
GAPDH-R	TGAATCATCAAGTCGCAAACAC	内参基因
Redmrt-RT-F	CTGTCTCTCCTTGTGTTCCCTA	RT-PCR
Redmrt-RT-R	GTTTGAGGCAGTGCATTTATTC	RT-PCR
Hy5-17F	TCTGTTTCAGCCTGTGGGTGTAT	探针扩增
Hy5-17R	TAATACGACTCACTATAGGG	探针扩增

1.3 生物信息学分析

利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析基因 ORF 并推导氨基酸序列; BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)预测氨基酸序列的保守结构域及同源序列检索; ClusterX2 将海蜇 *Dmrt* 与其他物种相应的氨基酸序列进行多重序列比对分析; Mega 7 构建 N-J 系统进化树; SignalP 5.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 TMHMM Server v.2.0

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分别预测是否具有信号肽和跨膜结构域; ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)和 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)分析氨基酸序列的理化性质及蛋白质的疏水性; PSORT II Prediction(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)预测蛋白亚细胞定位。

1.4 RT-PCR 定量分析

根据基因全长序列设计实时定量 PCR 引物(表 1),

以 *gapdh* 为内参基因, 以 cDNA 为模板, 采用 SYBR Green 试剂盒(Takara), 在 ABI StepOne™ Plus 荧光定量 PCR 仪上进行定量 PCR 分析。反应体系如下: 2×Green PCR Master Mix 5 μL、引物(10 μmol/L)各 0.2 μL 和 cDNA 模板 1 μL, 加 PCR 水至 10 μL。扩增程序: 95 °C、10 s; 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 40 个循环, 每个循环最后一步时采集荧光信号。每个时期样品设 3 个生物学重复和技术重复, 相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算, 实验数据在 Excel 中进行数据分析和图表绘制, 运用 SPSS 16.0 软件进行 ANOVA 差异显著性分析。

1.5 整体原位杂交

用于整体原位杂交的样品, 先在 2% 乌来糖中(海水配置)麻醉 10 min, 然后用新鲜配制的 4% 多聚甲醛-海水固定 20 min, 按 25%、50%、75%、100% 梯度替换为 4% 多聚甲醛-PBS, 每次 10 min, 4 °C 固定过夜, 最后, 按 25%、50%、75%、100% 梯度替换为 100% 甲醇, -20 °C 保存。

采用体外转录法制备地高辛标记 RNA 探针, 方法参考 T7/SP6 转录试剂盒(Invitrogen)说明书。首先, 设计正义和反义探针引物(表 1), 并分别在正向引物或者反向引物 5' 端加 T7 启动子序列, 进行 PCR 扩增, 产物经纯化后作为探针合成的模板, 纯化试剂盒为 Takara。其次, 采用上述纯化后的模板, 进行 RNA 体外转录合成, 反应体系: 10×transcription buffer 2 μL、10 mmol/L ATP 1 μL、10 mmol/L CTP 1 μL、10 mmol/L GTP 1 μL、10 mmol/L UTP 0.6 μL、3.5 mmol/L UTP-11-DIG 1 μL, RNA polymerase mix (T7/SP6) 2 μL, 模板 DNA 11.4 μL, 轻弹混匀离心后, 37 °C 水浴 1.5 h; 反应完成后, 加入 1 μL DNase I, 于 37 °C 水浴 20 min, 以去除残留的 DNA 模板。最后, 转录反应产物经 Mega RNA 纯化试剂盒回收纯化, 取 1 μL 探针进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, Nanodrop 2000 测定探针浓度, -80 °C 保存备用。

整体原位杂交方法参照先前报道的方法^[9], 略有改动。其中, 蛋白酶 K 处理浓度为 10 g/L, 处理时间 20 min。杂交液: 50% Formamid, 5x SSC, 0, 1% Tween-20, 0, 1% CHAPS, 1x Denhardt's solution, 100 μg/mL Heparin, (t-RNA 20 μg/mL, 现用现加)。采用地高辛检测试剂盒的 NBT/BCIP 显色, 每 5 min 解剖镜下观察一次, PBST 漂洗 10 min 停止染色, 70% 乙醇浸洗 3 次, 每次 10 min, 最后替换为 70% 甘油, 4 °C 冰箱保存并

于解剖镜下观察拍照。

2 结果

2.1 海蜇 *dmrta2* 基因的序列特征

海蜇 *dmrta2* 基因的 cDNA 全长为 1 804 bp, 包含 169 bp 的 3' 端与 624 bp 的 5' 端 UTR, 开放阅读框(ORF)为 1 011 bp, 编码 336 个氨基酸(图 1)。海蜇 *dmrta2* 基因序列已上传 NCBI 数据库, Genbank 登录号为 MT878494。经与参考基因组(http://gigadb.org/dataset/view/id/100720/File_page/2) 比对分析发现, 海蜇 *dmrta2* 位于 Scaffold SWAQ01000558.1, 含有 3 个外显子和 2 个内含子。Protein blast 显示, 海蜇 DMRTA2 蛋白拥有 DM 和 CUE 两个特征结构域, 分别位于第 33~79 和 231~271 位氨基酸。

通过在线软件预测了 DMRTA2 蛋白的理化性质, 结果显示其分子量为 37 252.23 Da, 带负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu)为 36 个, 带正电荷氨基酸残基数(Arg+Lys)为 48 个, 理论等电点(pI)为 9.11, 偏碱性。预测不稳定系数为 52.3, 表明其编码蛋白理化性质不稳定, 摩尔消光系数为 25 285, 理论半衰期 30 h, 脂溶系数为 61.52, 平均亲水系数(GRAVY)为 -0.649, 表明该基因编码蛋白属于亲水性蛋白。组成海蜇 DMRTA2 蛋白的 20 种氨基酸中, 丝氨酸(Ser)最多, 所占比例为 11.6%, 色氨酸(Trp)最少, 所占比例为 0.6%。TMHMM Server v.2.0 分析显示其无跨膜结构, Signal 5.1 分析显示其不具有信号肽, 表明该分子为非分泌性蛋白, 蛋白亚细胞定位预测显示其分布在细胞核的可能性最高, 为 73.9%。

2.2 氨基酸序列比对和系统进化分析

从 NCBI 参考序列数据库中下载代表性物种的 DMRT 家族蛋白序列进行多序列比对, 结果显示海蜇 DMRTA2 蛋白的 DM 结构域序列与其他物种 DMRTA2、DMRT5 和 DMRT99B 序列相似性很高, 含有 DM 结构域最为保守的 CCHHCCCC 基序, 形成锌指结构位点(CCHC 的 Site I 和 HCCC 的 Site II), 与之相比 CUE 结构域保守性较差, 而结构域之外的序列变异程度很高(图 2)。

本研究基于 7 个物种 22 个 DMRT 蛋白的 DM 结构域构建了系统进化树, 结果显示海蜇 DMRTA2 与鹿角珊瑚 DMRTA2、鹿角珊瑚 DMRT3 以及海葵 DMRTA2 的亲缘关系最近, 其次与线虫 MAB-3、线虫 DMD-4 和果蝇 DMRT93B 聚为一支, 亲缘关系


```

1  GACCATAAGCATCAAAGGCACGCCAGTAGGTGTCTTGCAGGGTAGAAGAAAGTTGTTAAGGGAACACCAA
76  GGTATACCTTGCCATAAAAAGCAGTAAAAGAAATAGCATAAATTTGGCAAAACAAGCAATTCTAAGTAGGTGTTA
151  GAGAGACAAGAAGATAAAAATGAGTCTTGTACGCTCAGTTGGTCATTTGTCGTTTCAAAGCGAAGGCCAACGGTTG
1  M S L V R S V G H L S F Q S E G N G C
226  CAAAATGGAAGTAGAGGTAGGCGAGAGAAGCCGACCACAACCCGCATACCAAAATGCGCAAGATGTCGCAATCATGG
20  K M E V E V G R E A D H N R I P K C A R C R N H G
301  CTTGAACAACGTCTTAAAAGGCCACAACATTATTGTCCGTGGAAAAATGGCCATGCGAAAAATGCCAGGCAGT
45  L N N V L K G H K H Y C P W K N C P C E K C Q A V
376  GCTGGAGAGGCAGGATCACGGCAGCAAGGGTAGCATCGCTAAGGCAGCAAAGAAAGGCACATGAGTTTCAGRAC
70  L E R Q R I T A A R V A S L R Q Q R K A H E F R T
451  ACAAATGGATACCTCAAGCAATGATACAAGAGAAGCAAATGAGTTCATCTGGCTTCATAGTGGGACCATGAA
95  Q M D T S S N D T R E A K L S S S G L H S G T M K
526  AAGCCGAGTGATTTCTCTGGGTACACAGTGCAGAAATYCTTGGTCTGGATCAAGGGAAGGAAGGCAACA
120  S R Y M F P V G Y T V Q E I L G L D Q G K C Q
601  AATTGGCTACAGGAAAGATGACGATGAAAGTTCGACAGGCACCCAGCTTCTATGTCACCTGTTTCAAGCCAAA
145  I G Y R K D D D E S S T G T P A S M S P V S S P K
676  AATGAGCACCAGATATACAGCTGGAGAGGAAAGCGAAACMGAGAAAGAAGACGAGGGGGAATCAAAGTTCGA
170  M S T T I Y S W R G K G E T E K E D E S K V E
751  AGGCGTTGAACGGCATGGGACCGAAAGCCAGCGTCATCAGCCTCTGATCAACCTGTCTCTCCTTGTGTTCCCTA
195  G V E R H G T E S P A S S A S D Q P V S P C V Y
826  CATCACATCCCGCAGCAGAATAAATGCACTGCCTCAAACCCAACTCGAGGTTTTATCGAAAATATTTCTGCATA
220  I T S R S R I N A L P Q T Q L E V L S K I P A Y
901  TCCAACAGACCTGCTTCAGATAACACTCATGGAATCCAGGGGGAGTGTGTCTCAMGCAGTTGAGAGAGTATTGTA
245  P T D L L Q I T L M E S R G S V S X A V E R V L Y
976  CGGCTCAGTGCCTCGCACAAGACATGGCGCACCATTTACAGATCGCAGTTCGAGCGCGTTCAAAGAGACAGAGCG
270  G S V P R T R H G A P F H R S Q S S A F K E T E R
1051  GCATGACTGTGGATTGGCAACGTTGTCCACATTATCAACTCTAGTGAGATACTGCAATAGATGCGGTTACCGCGC
295  H D C G L A T L S T L S T L V R Y C N R C G Y R A
1126  CTTTCGAGCAGATAATTTCTGTTTCAGCCTGTGGGTGTATATTGCGAAGGCGTTAAAGAACTGAAAGACATCGA
320  F A A D N F C S A C G C I L R R R *
1201  ATTGAGACAAAAMATCGAACTGAASGAATTGATTCAAGATTAGAACAGCGCATTGAACAAGTTGCATCATTCAA
1276  CTTTCAGCAATTAATCATGGTCAAAGATGTTAGCGCCAGGAAAGCAAAGCAAAGAACAATAATGGGAAATTTTT
1351  AATATGGATAACCTGTGAATCAAACGAAAACTTTATAATCATTGAAACATTTCGGGTATTGAAGACTTGATGATT
1426  ATCAGAGAGCTATTTTAAGAGTAAGAGCTGCTTGGAACTGGCTTTTGTAGAACTTGTGAGCAAGCATTTTATTG
1501  AAACCTGCTGACAACATCTTTCTAATTTTTTGAACATACATGTGAAGCATGGCTTGTGGAAATATTATTTATT
1576  CGTAAAAATTAAGTCTTAAATCTTAAACAATTAACCTATTTAACCTTCATAAACGTCGCGATTATATATATAA
1651  ATTAATAATTAATATCAACATATTATATCATATTATATCATTTTTTATCATTTTTATCATTTGCGCTGAGAAAT
1726  TTAGGCAAGTAACTTGATTGTAGATTTAAAAAAGAGATTGGTTACAAGACAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1801  AAAA
    
```

图 1 海蜇 *dmrta2* 基因的核苷酸序列与推测的氨基酸序列
 Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Rhopilema esculentum dmrta2*
 注: 起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)采用红色标记; polyA 尾巴用蓝色标记

较近, 与智人 DMRT5、非洲爪蟾 DMRT5 以及果蝇 DMRT99B 的亲缘关系最远。特别是海葵 DMRTA1 和 DMRT3 单独聚为一支, 与海蜇 DMRTA2 等腔肠动物 DMRT 蛋白的亲缘关系较远(图 3)。

2.3 海蜇 *dmrta2* 基因的表达模式

荧光定量 PCR 结果显示, 相对于螅状体时期, *dmrta2* 基因在横裂生殖初期和碟状体时期有显著上调表达, 在横裂生殖后期表达量最高, 显著高于其他各时期(图 4)。整体原位杂交显示, *dmrta2* 在螅状体中基本无表达信号, 横裂生殖初期的触手基部有明显表达, 横裂生殖后期显著表达于感觉缘叶原基部位, 碟状体时期主要表达于感觉棍相应区域, 此外, 横裂生殖后期以及碟状体时期在口唇位置有一定表达(图 5)。

3 讨论

腔肠动物是已知最原始的具有 *dmrt* 家族基因

的后生动物^[3], 因此对于 *dmrt* 基因家族起源与进化的研究有着重要意义, 目前仅在少量的腔肠动物中有 *dmrt* 基因的研究报道, 如鹿角珊瑚^[10]、石珊瑚 (*Euphyllia ancora*)^[11]、海葵^[12] 和栉水母 (*Mnemiopsis leidyi*)^[13]。本研究克隆了钵水母纲腔肠动物的一个 *dmrt* 家族基因—海蜇 *dmrta2* 基因, 获得了该基因的 cDNA 全长序列, 通过 NCBI 序列比对发现该基因推导的氨基酸序列具有 DM 结构域, 属于 *dmrt* 基因家族。序列分析发现海蜇 *dmrta2* 基因的 DM 结构域包含保守的 6 个半胱氨酸(C)和 2 个组氨酸(H)序列, 能够形成与 Zn 离子结合的两个位点(CCHC 和 HCCC), 说明海蜇 *dmrta2* 基因功能结构完整。序列比对也显示了海蜇 *dmrta2* 符合 *dmrt* 基因家族的序列特点, 即氨基酸全长序列差异很大, 可观测到的同源性仅限于与 DNA 结合的 DM 结构域^[14]。

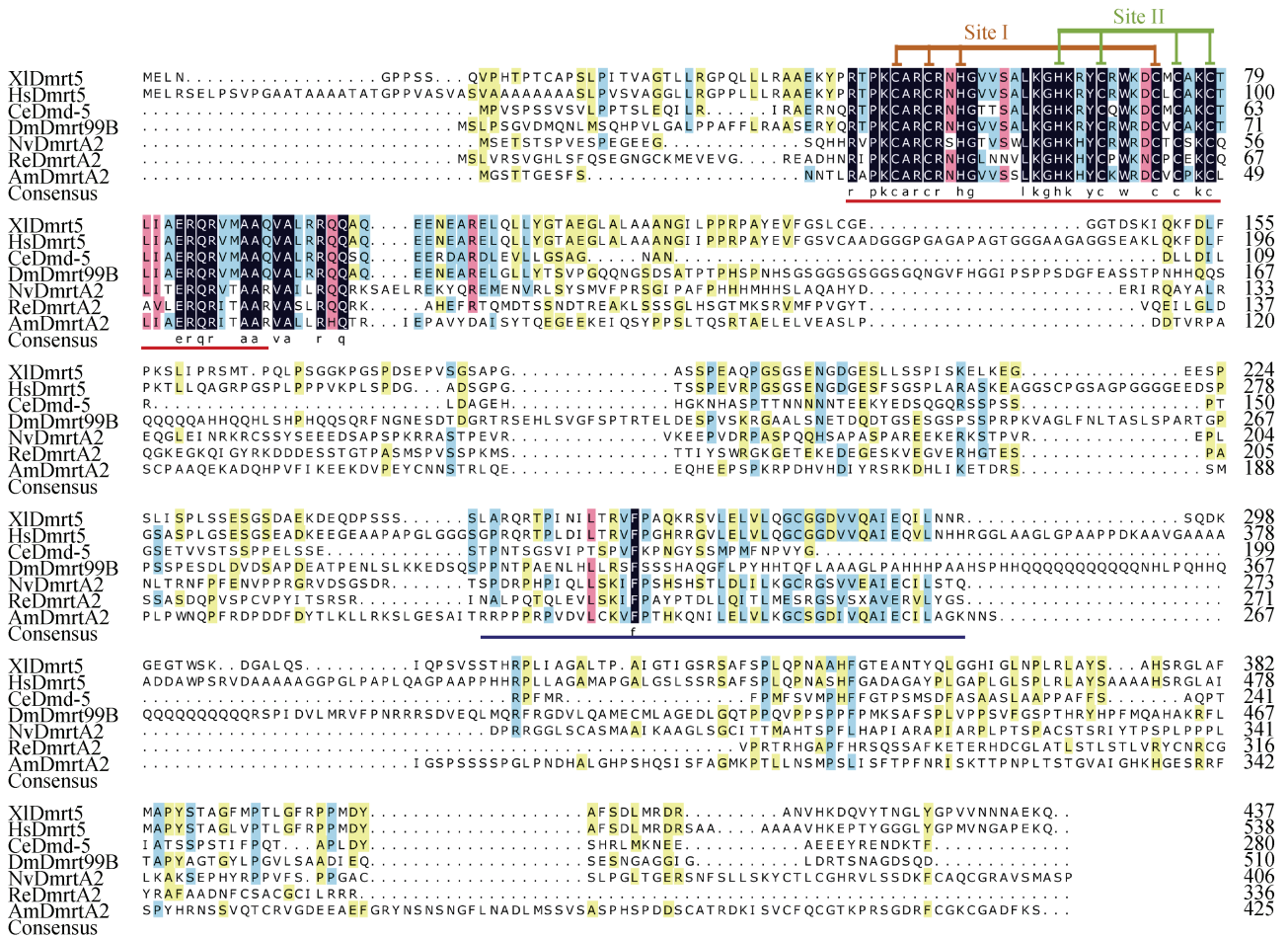


图 2 海蜇 DMRTA2 与同源蛋白的序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of *Rhopilema esculentum* DMRTA2 and homology DMRT proteins of different species

注: 黑色背景表示完全一致的氨基酸; 粉色背景表示相似性大于 75%; 浅蓝色背景表示相似性大于 50%; 黄色背景表示相似性大于 33%; 红色下划线指示保守的 DM 结构域, 蓝色下划线指示 CUE 结构域; 保守的锌指结构域用棕色框线(Site I)和绿色框线(Site II)指示; 非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, *XlDmrt5*: NP_001089148.1); 智人(*Homo sapiens*, *HsDmrt5*: AAI36283.1); 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *CeDmd-5*: NP_495138.2); 果蝇(*Drosophila melanogaster*, *DmDmrt99B*: NP_524549.1); 海葵(*Nematostella vectensis*, *NvDmrtA2*: XP_032231562.1); 鹿角珊瑚(*Acropora millepora*, *AmDmrtA2*: XP_029187503.1)

基于 DM 结构域的系统进化分析结果与已有研究报道基本一致, 如脊椎动物 *dmrt4* 和 *dmrt5*、果蝇 *dmrt99B* 以及线虫 *dmd-5* 可能起源于共同的 *dmrt4/5* 基因, 果蝇 *dmrt11E* 与脊椎动物 *dmrt2* 是直系同源基因^[2], 本研究中这些基因也相应地先聚为一个分支。本研究中海蜇 *dmrta2* 与鹿角珊瑚 *dmrta2*、鹿角珊瑚 *dmrt3* 以及海葵 *dmrta2* 的亲缘关系最近, 其次与线虫 *mab-3*、线虫 *dmd-4* 和果蝇 *dmrt93b* 聚为一支, 符合传统的系统进化关系, 然而系统进化树中海葵 *dmrta1* 和 *dmrt3* 单独聚为一支, 与海蜇 *dmrta2* 等腔肠动物 *dmrt* 基因的亲缘关系较远, 与传统的系统进化关系不符, 一个可能原因是 *dmrt* 家族基因较短的 DM 结构域

(约 70 个氨基酸)使系统进化关系的解析变得困难^[2], 同时说明了 *dmrt* 家族基因在低等腔肠动物中的系统进化关系较为复杂, 有待进一步研究分析。

最初, 在果蝇和线虫中发现了含有 DM 结构域的基因与性别决定相关^[15-16], 而后越来越多的研究发现 *dmrt* 家族基因几乎在所有动物发育的性腺组织中有特异性表达, 如珊瑚^[10]、贝类^[17-18]、甲壳类^[19-20]、鱼类^[21]、爬行类^[22]、鸟类^[23]和哺乳类^[24], 说明了 *dmrt* 家族基因与性别决定和性腺发育的密切相关。而除了在性腺中表达外, 一些研究中发现 *dmrt* 家族成员表达于神经组织, 参与神经系统和感觉器官的分化发育。例如, 在鸡和小鼠中, *dmrt3* 表达于前脑、脊

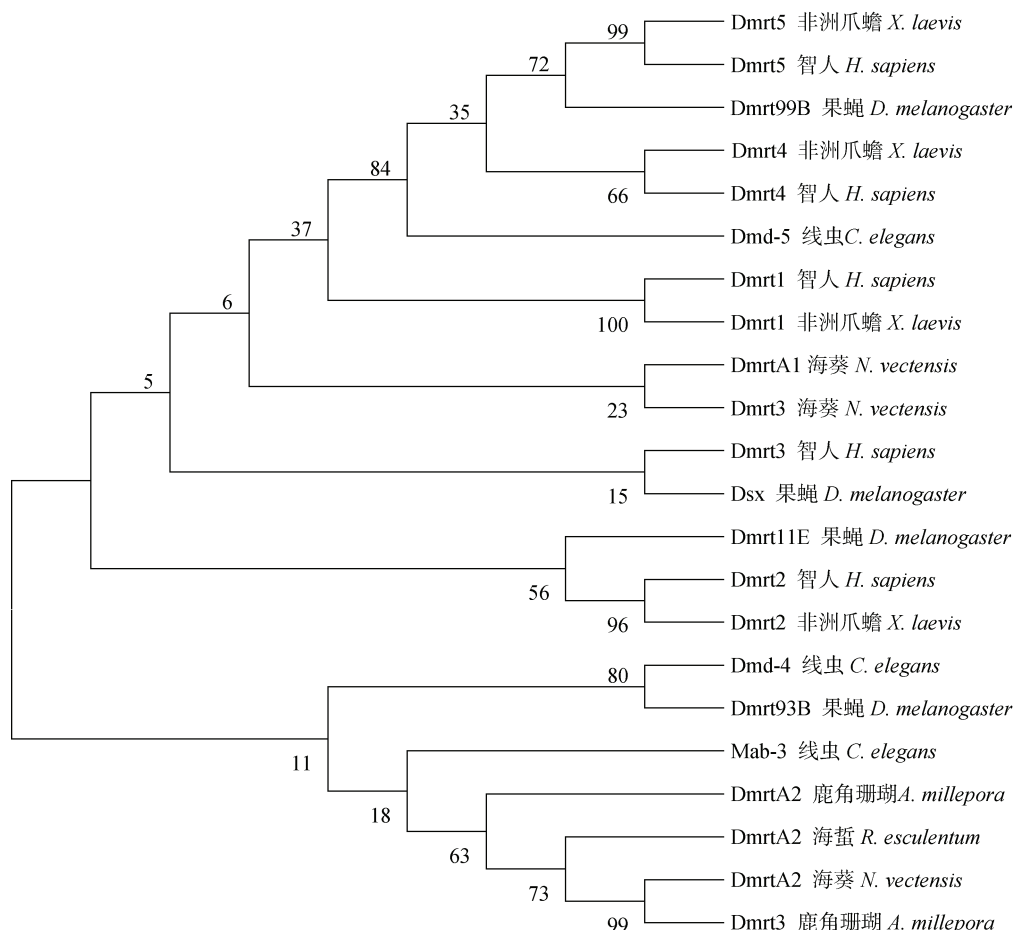


图3 DMRT 家族蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of DMRT proteins among different specie

注: 鹿角珊瑚(*A. millepora*, *Dmrt2*: XP_029187503.1, *Dmrt3*: XP_029183089.1); 海葵(*N. vectensis*, *Dmrt1*: XP_032232660.1, *Dmrt2*: XP_032231562.1, *Dmrt3*: XP_001628137.2); 秀丽隐杆线虫(*C. elegans*, *Mab-3*: NP_001022464.1, *Dmd-4*: NP_510466.1, *Dmd-5*: NP_495138.2); 果蝇(*D. melanogaster*, *Dmrt93B*: NP_524428.1, *Dmrt99B*: NP_524549.1, *Dmrt11E*: NP_511146.2, *Dsx*: NP_731197.1); 非洲爪蟾 (*X. laevis*, *Dmrt1*: NP_001089969.1, *Dmrt2*: NP_001089725.1, *Dmrt4*: NP_001084923.1, *Dmrt5*: NP_001089148.1), 智人(*H. sapiens*, *Dmrt1*: AAR89619.1, *Dmrt2*: NP_006548.1, *Dmrt3*: NP_067063.1, *Dmrt4*: NP_071443.2, *Dmrt5*: AAI36283.1)

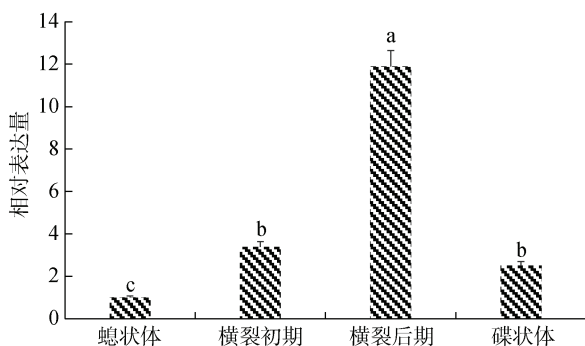


图4 *Dmrt2* 在海蜇横裂生殖过程的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *dmrt2* in the strobilation of *Rhopilema esculentum*

注: 在鳃状体时期的相对表达量设为 1, 其他时期的表达量均以鳃状体表达量的倍数表示; 不同字母表示各组数据之间存在显著性差异($P < 0.01$)

髓和嗅板中^[25]; 在斑马鱼中, *dmrt2* 基因能够调控神经分化基因 *neurogenin1* 的表达, 参与体节形成时端脑神经细胞的分化^[26]; 爪蟾 *dmrt4* 和 *dmrt5* 共同表达于发育中的嗅叶, 是爪蟾嗅觉系统神经形成的重要转录调控因子^[27-28]; 海葵 *nvdmrta* 可能是 *dmrt4/5* 同源基因, 它能够诱导爪蟾的神经形成, 而且 *nvdmrta* 敲降处理的海葵胚胎中神经元细胞明显减少^[28]。已有研究表明横裂生殖过程中一个显著的变化是逐步发育的碟状体感觉棍神经系统 (rhopalial nervous system)^[29], 本研究中, *dmrt2* 基因在海蜇横裂生殖后期主要表达于感觉缘叶原基位置, 在初生碟状体中明显表达于感觉棍位置, 因此, 海蜇横裂生殖中 *dmrt2* 基因的上调表达应该与感觉棍神经系统的分化发育相关。

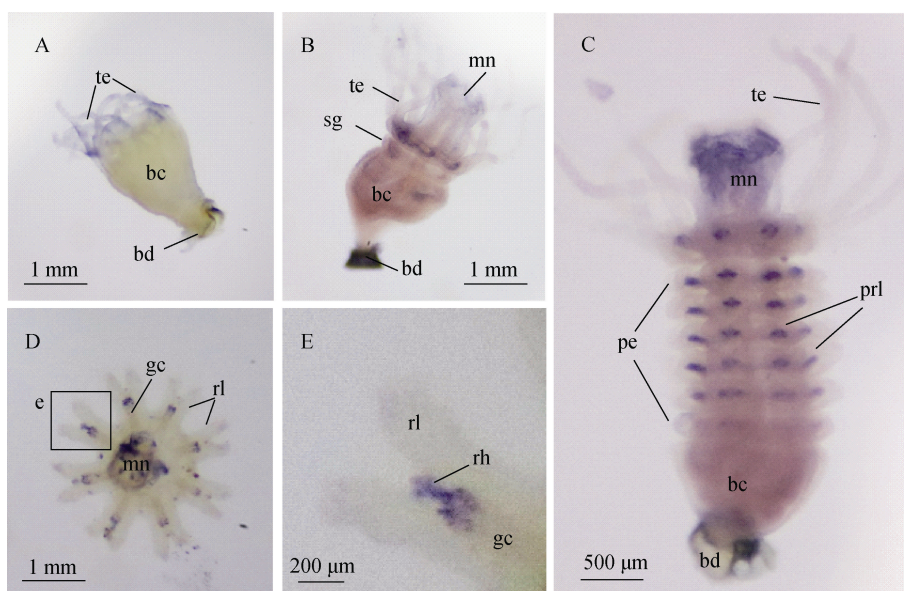


图5 *Dmrt2* 在海蜇横裂生殖过程的整体原位表达

Fig. 5 Whole-mount in situ expressions of *dmrt2* in the strobilation of *Rhopilema esculentum*

注: A. 螵状体时期; B. 横裂生殖初期; C. 横裂生殖后期; D. 碟状体时期; E. 碟状体局部 e 的放大; bc. 体柱; bd. 基盘; gc. 消化腔管; mn. 口唇; prl. 感觉缘叶原基; pc. 碟状体原; rl. 感觉缘叶; rh. 感觉棍; sg. 横向裂节; te. 触手; 蓝色为表达阳性信号

4 结语

综上所述, 本研究成功克隆了海蜇 *Dmrt2* 基因的 cDNA 全长序列, 利用生物学分析软件对其编码蛋白的理化性质和系统进化关系等进行了分析, 通过原位杂交研究了其在横裂生殖中的表达模式, 根据本研究原位表达结果以及已报道的 *dmrt* 同源基因的主要功能, 我们推测该基因在海蜇横裂生殖中主要与感觉棍神经系统的分化发育相关, 研究结果为海蜇等钵水母横裂生殖调控机制的解析提供了基础数据。

参考文献:

- [1] MAWARIBUCHI S, ITO Y, ITO M. Independent evolution for sex determination and differentiation in the DMRT family in animals[J]. *Biology Open*, 2019, 8(8): bio041962.
- [2] 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.
- [3] 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 Cunpeng, LUO Yongju. Research progress of *Dmrt* genes in hydrobiontes[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(5): 1068-1077.
- [4] YOU K, MA C, GAO H, et al. Research on the jellyfish (*Rhopilema esculentum* Kishinouye) and associated aquaculture techniques in China: current status[J]. *Aquaculture International*, 2007, 15(6): 479-488.
- [5] 丁耕芜, 陈介康. 海蜇的生活史[J]. *水产学报*, 1981, 5(2): 93-102. DING Gengwu, CHEN Jiekang. The life history of *Rhopilema esculentum* Kishinouye[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1981, 5(2): 93-102.
- [6] HELM R R. Evolution and development of scyphozoan jellyfish[J]. *Biological Reviews*, 2018, 93(12): 1228-1250.
- [7] 林政飞, 王淑红. 钵水母水螅体横裂诱发条件及调控机制研究进展[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(3): 1057-1066. LIN Zhengfei, WANG Shuhong. Research progress in scyphozoan polyp strobilation-induced factors and regulation mechanism[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(3): 1057-1066.
- [8] GE J, LIU C, TAN J, et al. Transcriptome analysis of scyphozoan jellyfish *Rhopilema esculentum* from polyp to medusa identifies potential genes regulating strobilation[J]. *Development Genes and Evolution*, 2018, 228(1): 243-254.
- [9] FUCHS B, WANG W, GRASPEUNTNER S, et al. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*[J]. *Current Biology*, 2014, 24(3): 263-273.
- [10] MILLER S W, HAYWARD D C, BUNCH T A, et al. A

- DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination[J]. *Evolution & Development*, 2003, 5(3): 251-258.
- [11] CHEN C J, SHIKINA S, CHEN W J, et al. A novel female-specific and sexual reproduction-associated *Dmrt* gene discovered in the stony coral, *Euphyllia ancora*[J]. *Biology of Reproduction*, 2016, 94(2): 1-13.
- [12] TRAYLOR-KNOWLES N G, KANE E G, SOMBATSAPHAY V, et al. Sex-specific and developmental expression of *Dmrt* genes in the starlet sea anemone, *Nematostella vectensis*[J]. *Evodevo*, 2015, 6: 1-6.
- [13] REITZEL A M, PANG K, MARTINDALE M Q. Developmental expression of “germline”- and “sex determination”-related genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*[J]. *Evodevo*, 2016, 7: 1-16.
- [14] VOLFF J N, ZARKOWER D, BARDWELL V J, et al. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 57(s1): S241-S249.
- [15] 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.
- [16] RAYMOND C S, MURPHY M W, O'SULLIVAN M G, et al. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation[J]. *Genes & Development*, 2000, 14(20): 2587-2595.
- [17] WANG Q, SHI Y, HE M. Pf-*Dmrt4*, a potential factor in sexual development in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 36(6): 2337-2350.
- [18] 李茜茜, 秦贞奎, 魏茂凯, 等. 栉孔扇贝 *Dmrt1* 的分子鉴定及表达模式分析[J]. *中国水产科学*, 2020, 27(11): 1277-1284.
- LI Qianqian, QIN Zhenkui, WEI Maokai, et al. Molecular identification and expression pattern analysis of *Dmrt1* in the scallop *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2020, 27(11): 1277-1284.
- [19] KATO Y, KOBAYASHI K, WATANABE H, et al. Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a doublesex gene in the sex-determining pathway[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(3): e1001345.
- [20] YU Y Q, MA W M, ZENG Q cG, et al. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of two *Dmrt* genes in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Agricultural Research*, 2014, 3(2): 181-191.
- [21] HERPIN A, SCHARTL M. *Dmrt1* genes at the crossroads: a widespread and central class of sexual development factors in fish[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(7): 1010-1019.
- [22] 欧阳淑, 刘晓莉, 王亚坤, 等. 黄喉拟水龟 *Dmrt1* 基因克隆及其表达特征[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(4): 749-755.
- OUYANG Shu, LIU Xiaoli, WANG Yakun, et al. Cloning and expression characteristics of *Dmrt1* gene of *Mauremys mutica*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 749-755.
- [23] CHUE J, SMITH C A. Sex determination and sexual differentiation in the avian model[J]. *The FEBS Journal*, 2011, 278(7): 1027-1034.
- [24] 魏于栋, 申单, 程慧玲, 等. *Dmrt1* 与哺乳动物生殖细胞发育[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(2): 278-283.
- WEI Yudong, SHEN Dan, CHENG Huiling, et al. *Dmrt1* in mammalian germ cell development[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(2): 278-283.
- [25] SMITH C A, HURLEY T M, MCCLIVE P J, et al. Restricted expression of *Dmrt3* in chicken and mouse embryos[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 119(s1): s73-s76.
- [26] YOSHIZAWA A, NAKAHARA Y, IZAWA T, et al. Zebrafish *Dmrt2* regulates neurogenesis in the telencephalon[J]. *Genes To Cells*, 2011, 16(11): 1097-1109.
- [27] HUANG X, HONG C S, O'DONNELL M, et al. The doublesex-related gene, *XDmrt4*, is required for neurogenesis in the olfactory system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(32): 11349-11354.
- [28] PARLIER D, MOERS V, CAMPENHOUT C V, et al. The *Xenopus* doublesex-related gene *Dmrt5* is required for olfactory placode neurogenesis[J]. *Developmental Biology*, 2013, 373(1): 39-52.
- [29] NAKANISHI N, HARTENSTEIN V, JACOBS D K. Development of the rhopalial nervous system in *Aurelia sp.1* (Cnidaria, Scyphozoa)[J]. *Development Genes & Evolution*, 2009, 219(6): 301-317.

Cloning of *dmrta2* from jellyfish *Rhopilema esculentum* and its expression analysis during strobilation

GE Jian-long¹, CHEN Xiao-hui¹, CHEN Si-qing¹, LIU Chang-lin¹, CHEN Yu-chen², BIAN Li¹, ZHANG Sheng-nong¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Process, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 2. Huayi aquatic breeding limited company, Yancheng 224300, China)

Received: Mar. 8, 2021

Key words: *Rhopilema esculentum*; strobilation; *dmrta2*; expression pattern

Abstract: The *dmrt* gene family plays an important role in various developmental processes of metazoans, such as sex determination and differentiation and the formation of tissues and organs. Strobilation is a unique asexual reproductive mode of scyphozoan jellyfish and a key stage in the transformation from polyp to medusa. However, the understanding of molecular mechanisms under drastic metamorphosis is still limited. In a previous study, it was preliminary found that the *dmrt* gene family may play a crucial role in the strobilation of the jellyfish (*Rhopilema esculentum*); therefore, this finding is of great interest and needs further validation. In the present study, based on a *dmrta2* fragment from the RNA-sequence of *R. esculentum*, full-length complementary DNA (cDNA) of *dmrta2* was obtained using the rapid amplification of cDNA ends (RACE) method, and its expression patterns during strobilation were studied. The results showed that the full-length cDNA of *R. esculentum dmrta2* was 1804 bp, including an open reading frame (ORF) of 1011 bp length, which encodes 336 amino acids. The complete sequence of *R. esculentum dmrta2* has been submitted to the GenBank database with the following accession number: MT878494. The molecular weight (MW) and theoretical isoelectric point (PI) were predicted to be 37.25 kDa and 9.11, respectively. It was a hydrophilic protein comprising nontransmembrane structure and signal peptides. *DMRTA2* of *R. esculentum* had a conserved DM-domain of *dmrt* gene family between the 33rd and 79th amino acid, which exhibits a great similarity to the homology protein in coral, fruit fly, and so on. Phylogenetic analysis showed that *DMRTA2* of *R. esculentum* was closely related to the *DMRTA2*, *DMRT3* of coral *Acropora millepora* and *DMRTA2* of sea anemone *Nematostella vectensis*. The whole-mount *in situ* hybridizations showed that *dmrta2* lacked expression signal in the polyp stage, whereas it was expressed in the tentacle base of the early strobila stage, expressed distinctly in the pre-rhopalar lappets of late strobila and in the rhopalium region of ephyra. The results indicated that *dmrta2* was involved in the strobilation of *R. esculentum* and probably related to the differentiation and development of the rhopalium nervous system. To the best of our knowledge, all these results may provide important references for future studies of molecular regulation mechanisms of scyphozoan strobilation.

(本文编辑: 康亦兼)