

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)两个 Dmrt 家族基因的时空表达*

张娜^{1,2} 黄雯^{1,2} 许飞¹ 李莉¹ 张国范¹ 郭希明³

(1. 海洋生态养殖技术国家地方联合工程实验室 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院大学 北京 100049; 3. Haskin Shellfish Research Laboratory, Institute of Marine and Coastal Sciences, Rutgers University, Port Norris, New Jersey USA 08349)

摘要 本文以长牡蛎 27 个幼虫发育阶段个体以及成体的 5 个组织作为实验材料, 采用实时荧光定量 PCR 技术对其 Dmrt 家族中的 2 个基因(*CgDsx* 和 *CgDmrtA2*)的表达模式以及在性别决定中的作用进行了研究。结果表明, 长牡蛎 *CgDsx* 基因在胚胎发育初期有大量表达, 从囊胚期到担轮幼虫初期表达量最高, 之后表达量开始降低, 在 D 形幼虫后一直维持在极低的表达水平, 此后仅在成体的雄性性腺中具有高度表达。由此可见, *CgDsx* 可能也对早期胚胎发育起一定调控作用, 同时参与了性别决定。*CgDmrtA2* 在长牡蛎所有组织中均有表达, 各组织间表达差异不显著, 在 D 形幼虫至壳顶后期表达量较高, 说明它参与了胚胎中后期的发育过程, 可能与神经的形成相关, 但是其具体功能还需要进一步研究。

关键词 长牡蛎; Dmrt 家族; 幼虫发育; 组织表达差异; 性别决定

中图分类号 Q78 **doi:** 10.11693/hyhz20140900249

Dmrt (*Doublesex* and *mab-3* related transcription factor)是近年来比较受关注的一个基因家族, 因为这个家族中的一些基因在无脊椎和脊椎动物中都参与性别决定和两性分化相关。DM 结构域最先在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)的性别调控基因 *Doublesex* 中发现的(Burtis *et al*, 1989), 随后又在很多物种, 如鱼类(Guan *et al*, 2000; Marchand *et al*, 2000; Kondo *et al*, 2002; Nanda *et al*, 2002; Koopman *et al*, 2003; Ohmuro-Matsuyama *et al*, 2003)、鸟类(Raymond *et al*, 1999; Smith *et al*, 1999; Ren *et al*, 2001)、爬行类(Raymond *et al*, 1999; Smith *et al*, 1999; Kettlewell *et al*, 2000)和哺乳类(Raymond *et al*, 1998; Raymond *et al*, 1999; Smith *et al*, 1999; De Grandi *et al*, 2000; Moniot *et al*, 2000; Kim *et al*, 2003)的同源基因中都发现了它的存在, 说明该家族的基因在无脊椎和脊椎动物中都是高度保守的。长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中共编码 3 个含有 DM 结构域的基因, 分别是

Cg-Dmrt1(CGI_10015952), *CgDsx*(CGI_10019568)以及 *CgDmrtA2* (CGI_10001830) (Zhang *et al*, 2014)。编号为 CGI_10015952 的基因最初被 Naimi 等(2009)认定为 *Cg-Dmrt1*, 并认为该基因具有与性腺发育相关的作用。CGI_10019568 基因含有典型的 DM 结构域, 而且与果蝇的 *Doublesex* (*Dsx*)基因同源关系很近, 因此被命名为 *CgDsx* (Zhang *et al*, 2014)。果蝇的 *Dsx* 基因与线虫的 *Mab-3* 以及脊椎动物的 *Dmrt1* 基因都对雄性的性别决定起着关键的作用。果蝇的 *Dsx* 基因可通过可变剪切在卵巢和精巢中分别产生雌性和雄性两种剪切形式(Burtis *et al*, 1989)。线虫的 *Mab-3* 与脊椎动物的 *Dmrt1* 基因都在雄性性腺中特异表达并促进雄性特征的发育(Smith *et al*, 2009; Kopp, 2012)。

CGI_10001830除了含有 Dmrt 家族共有的 DM 保守结构域外, 还含有 Dmrt 家族的亚族(subfamily) DmrtA 的 DMA 结构域, 而且其与 *DmrtA2*(*Dmrt5*)同

*国家重点基础研究发展计划(973 项目)资助, 2010CB126401 号; 泰山学者计划。张娜, 博士研究生, E-mail: zhangnazona@hotmail.com

通讯作者: 郭希明, 教授, 博士生导师, E-mail: xguo@hsrl.rutgers.edu

收稿日期: 2014-09-13, 收修改稿日期: 2014-11-18

源性很高, 因此将其命名为 *CgDmrtA2* (Zhang *et al*, 2014)。DmrtA 家族成员包括 *DmrtA1*(*Dmrt4*), *DmrtA2* (*Dmrt5*), *DmrtA3*(*Dmrt3*) (Volfset *et al*, 2003)。在鼠中, *Dmrt4* 在各组织中都有表达(Balciunienet *et al*, 2006)。牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 *Dmrt4* 在精巢中表达量很高, 在卵巢中几乎没有表达, 另外在脑部和鳃中的表达量也远远高于其它组织, 因而牙鲆的 *Dmrt4* 在性腺, 神经以及感觉器官的发育过程中可能起到重要作用(Wen *et al*, 2009)。而该基因在青鳉中的表达模式却很特殊, 只在耳板和苦胆中表达(Winkler *et al*, 2004)。在斑马鱼胚胎发育时期, *Dmrt5* 在原肠胚后期表达量很高, 并主要表达于胚胎时期的中枢神经系统, 特别是中脑及中后脑的神经系统, 而且其在斑马鱼的雌雄性腺的生殖细胞中均有表达(Guo *et al*, 2004)。在斑马鱼体节发生过程中, *Dmrt5* 只在端脑, 中脑和嗅板中表达, 其对后部-背部端脑细胞的分化起着重要的作用(Yoshizawa *et al*, 2011)。Dmrt5 在非洲爪蟾胚胎发育过程中, 对于神经系统的发育具有重要的调节作用(Parlier *et al*, 2013)。另外, *Dmrt5* 对小鼠胚胎早期大脑的皮层及腹侧中脑神经系统的发育都是不可或缺的(Kim *et al*, 2003; Gennet *et al*, 2011; Konno *et al*, 2012; Saulnier *et al*, 2013)。在斑马鱼中, *DmrtA3* 即 *Dmrt3* 对于嗅板、神经管和生殖细胞的发育都具有潜在的影响(Li *et al*, 2008)。在鼠和鸡中, *Dmrt3* 只在胚胎中表达, 其中在鼠胚胎的前脑, 神经管和鼻腔结构中表达, 在鸡胚胎早期形成的体节, 体节前中胚层以及勒氏管中表达(Smith *et al*, 2002)。

Cg-DMI(CGI_10015952)基因已被详细报道过(Naimiet *et al*, 2009)。Zhang 等(2014)通过对基因组和转录组的分析发现 *CgDmrtA2* 可能和性别决定无关, 而 *CgDsx* 可能和性别决定有关。鉴于 Zhang 等的结果是基于有限的转录组数据, 因此作者进一步通过实时

荧光定量 PCR 分析对 Zhang 等的转录组结果加以印证, 对长牡蛎的 *CgDsx* 以及 *CgDmrtA* 两个基因进一步分析, 研究这两个基因在长牡蛎的雌雄个体、组织间的表达特征以及在幼虫各发育时期的时空表达模式, 以确定这两者在长牡蛎性别决定中可能发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用成体长牡蛎于 2013 年 5 月取自青岛市崂东养殖场, 为处于成熟期的二龄牡蛎, 用显微镜检验雌雄后分别取三只雌性和三只雄性的外套膜、鳃、闭壳肌和性腺组织样品用于 RNA 提取。幼虫样品也取自青岛崂东海珍品良种培育有限公司, 发育时期通过显微镜观察确定后, 在适当的时间点取样。样品取出后立刻用液氮冷冻, 随后转移到-80℃ 冰箱保存。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 模板的合成

将取得的样品用液氮充分研磨之后取 100mg 左右的干粉将之加入 Trizol Reagent (Invitrogen)中并按照说明书进行总 RNA 的提取。提取到的总 RNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)检测纯度与浓度。cDNA 的合成使用 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒, 根据使用说明, 每 20μL 反应体系加入 1μg 的总 RNA 进行反转录, 得到的 cDNA 用于下一步的荧光定量 PCR 反应。

1.3 引物设计

本实验所涉及的引物序列详见表 1。引物使用 Primer Premier 5.0 软件进行设计, 送上海生工(Sangon)生物技术有限公司合成。引物稀释成 10μmol/mL 的浓度备用。

表 1 实验涉及引物名称、序列及产物长度
Tab.1 Primer name, sequence, and product length used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
CgDsx-F	CTCATCCCTGTTTCTCGGTTTC	197
CgDsx-R	ATCCAAAAGGCTCCATCTGCT	
CgDmrtA2-F	GTAAAGCCCTCCGTCCCATC	163
CgDmrtA2-R	TCACCAAATCTCCATTACAGCCT	
EF2-F	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG	214
EF2-R	TCCGACGTATTCTTTGCGATGT	
RS18-F	GCCATCAAGGGTATCGGTAGAC	168
RS18-R	CTGCCTGTTAAGGAACCAGTCAG	

1.4 序列比对

CgDsx 以及 *CgDmrtA2* 的蛋白序列可从 <http://oysterdb.cn/> 上获得, 并在 NCBI 上搜索相关的同源蛋白序列, 用于蛋白序列比对分析。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

根据已知的 *CgDsx* 以及 *CgDmrtA2* 序列进行引物设计, 幼虫时期的内参基因使用 Ribosomal protein S18 (RS18), 成体时期的内参基因使用(Eukaryotic translation elongation factor 2 (EF2))。采用相对定量的方法对长牡蛎这两个 DM 家族基因在成体各组织及幼虫各时期的表达进行测定。实验采用 ABI7500 Fast 荧光定量 PCR 仪, SYBR Green I 荧光染料。反应体系如下:

2×SYBR Green PCR Mix (TaKaRa)	10μL
10mmol/L 正向引物(F)	0.4μL
10mmol/L 反向引物(R)	0.4μL
稀释 10 倍的 cDNA	2μL
灭菌水补足到 20μL	

反应条件: 95℃ 30s, 一个循环; 95℃ 5s, 60℃ 30s, 40 个循环。每个样品做 3 个重复, 另外再做 3 个无模板的阴性对照。通过 ABI 7500 V2.0.2 软件输出反应的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对这两个基因在不同组织和不同幼虫时期的表达差异进行相对定量研究。

2 结果

2.1 长牡蛎 *CgDsx* 与 *CgDmrtA2* 基因的同源比较与进化分析

2.1.1 *CgDsx* 的同源比较与进化分析 *CgDsx* 的序列分析及同源关系比对已经在 Zhang 等(2014)的文章中详细阐述过, 这里仅展示其与其它物种同源基因的蛋白序列比对结果(图 1)。从图 1 中可以看出, 长牡蛎的 *CgDsx* 氨基酸序列与其它物种的同源性不高, DM 家族的成员之间除了共有的一个 DM 结构域之外, 其它序列的保守性很低(Kopp, 2012)。

2.1.2 *CgDmrtA2* 的同源比较与进化分析 长牡蛎的 *CgDmrtA2* 的 ORF 长 1173bp, 编码 390 个氨基酸, 含有 2 个外显子。该基因除了含有典型的 DM 结构域外, 还含有一个 DmrtA 家族特有的 DMA 结构域。而且该基因与 *Dmrta2/Dmrt5* 亲缘关系较近, 因此被命名为 *DmrtA2* (Zhang *et al.*, 2014)。 *CgDmrtA2* 与小鼠的 *Dmrta2(Dmrt5)* 同源性达到 79% (e-value 5e-31), 与人类的同源性为 77% (e-value 2e-31), 与斑马鱼的同源性为 36% (e-value 2e-46), 与东方红鳍豚的同源性为

37% (e-value 3e-44)。目前没有软体动物 *Dmrta2/Dmrt5* 方面的报道, 也没有相关的数据可供比对, 目前数据显示, 牡蛎 *CgDmrtA2* 与哺乳动物的 *Dmrta2(Dmrt5)* 同源性更高。

2.2 长牡蛎 *CgDsx* 和 *CgDmrtA2* 基因的时空表达分析

2.2.1 长牡蛎 *CgDsx* 和 *CgDmrtA2* 基因在幼虫时期的表达分析 实验测定了包括卵子在内, 直至稚贝的 27 个时期(见表 2)的表达模式。 *CgDsx* 在卵子到 D 型幼虫中后期的表达量较高, D 型幼虫后期到稚贝期表达量开始降低, 卵子到 D 型幼虫中后期的表达量平均值是其后表达量平均值的 4.15 倍。 *CgDmrtA2* 在卵子和二细胞期的表达量都很低, 到桑椹期开始增高, 到 D4 期的时候达到最高, 随之稍有下降, 到 U11 期又达到一个较高的水平, 到 U30 期降低到点, 之后未有明显升高。

表 2 幼虫分期明细
Tab.2 Details of larval stages

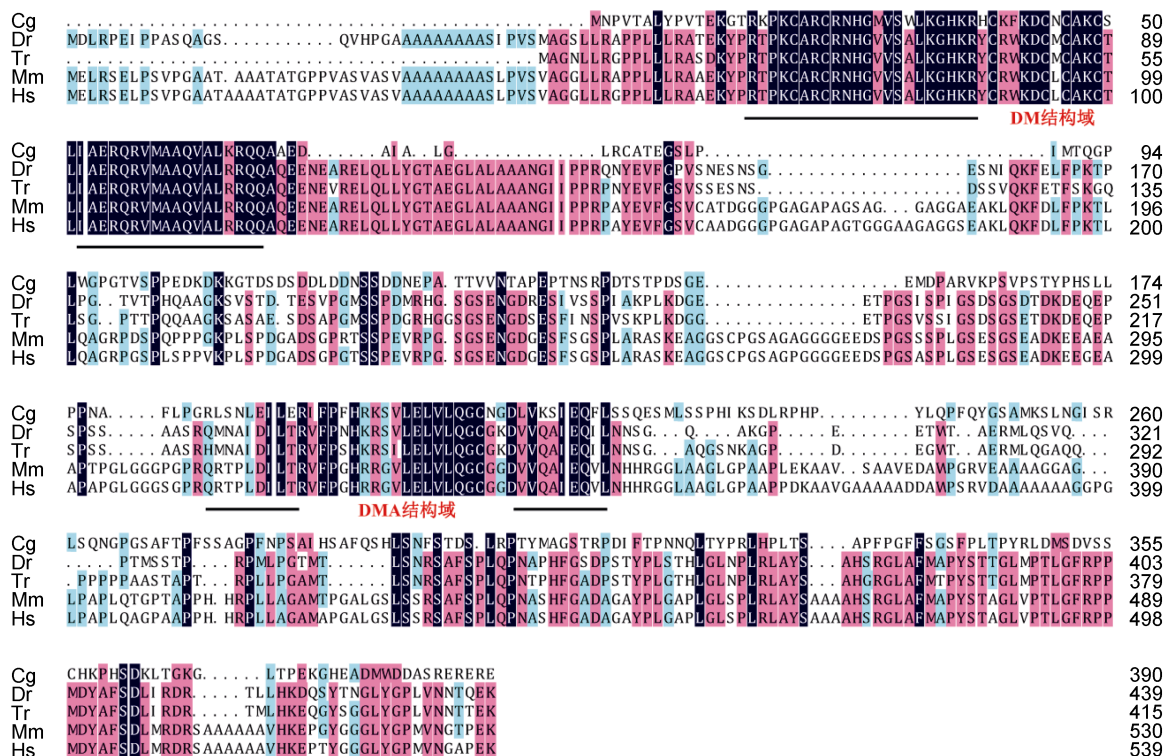
样品编号	发育时期	距受精时间
Egg	卵	0: 00
TC	二细胞期	1: 17
BS	囊胚期	4: 30
GS	原肠期	7: 35
T2	担轮幼虫 2	9: 35
T6	担轮幼虫 6	13: 35
D4	D 形幼虫 4	18: 35
D10+	D 形幼虫 10	1d 0: 30: 00
D11	D 形幼虫 11	2d
D13	D 形幼虫 13	4d
U1	壳顶期前期 1	5d
U5	壳顶期 2	9d
U11	壳顶期 8	15d
U15	壳顶期 12	19d
U19	壳顶期 16	23d
U22	壳顶期 19	26d
U30	壳顶期 27	34d
P2	眼点期 2	38d
F6h	附着后 6h	
F12h	附着后 12h	
F24h	附着后 24h	
F2d	附着后 2d	
F4d	附着后 4d	
F6d	附着后 6d	
F10d	附着后 10d	
F16d	附着后 16d	
J	稚贝期	

CgDsx	MSGNI	5
Dm-M	EE.....NWNST.M.....SDSDMI.....NDVCG.....GASSSSG	27
Dm-F	EE.....NWNST.M.....SDSDMI.....NDVCG.....GASSSSG	27
Ce	EDPVSEICEAKAVDELAQEKNYYCQCLNHGELKPRKGHPDCRYLKPCRECTMVRQL.....NNLSKKKIHCTPATQT	77
Bm-M	MG.....SWKRRV.P.....DDCEE.....RSEPGAS	21
Bm-F	MG.....SWKRRV.P.....DDCEE.....RSEPGAS	21
Dr	MSEEQTNGLS	11
Mm	DD.....TFGKFPSTP.....TEVPHPAGAPPKKGAGGYSKAAGAMAGGSGAGGS.....GGASGSGPSGLGS	57
Hs	DE.....AFSKPSTP.....SEAPHAPGVPPQGRAGGFGKASGALVSGTSAGGSSRGGSGSGASDLGA	59
CgDsx	IIDSELSTRCKNCRNHGRLVTKGHKP.FCQFKCASTOLEMKK...LSTALRRKEKIARDSKIDPLFDLTCQPPVGP	80
Dm-M	SSISPRTPPNCARCRNHGLKITLEGHKR.YCKFRCEKRLTADRQRYMALQTALRRQAQDEQRALHME...VPPANP	102
Dm-F	SSISPRTPPNCARCRNHGLKITLEGHKR.YCKFRCEKRLTADRQRYMALQTALRRQAQDEQRALHME...VPPANP	102
Ce	RDGKRVRDPHCAHSAHGLVLPDRGHKRTMCQFVCTLCTLVEHRRNLMAAQIKLRRSQKSRDGKEPKRN.S...RRKSKD	154
Bm-M	SSGVPRAPPNCARCRNHRLKIBELGHKR.YCKYQCEKRLTADRQRYMAKQTALRRQAQDEARARALEL.G.IQPPGME	98
Bm-F	SSGVPRAPPNCARCRNHRLKIBELGHKR.YCKYQCEKRLTADRQRYMAKQTALRRQAQDEARARALEL.G.IQPPGME	98
Dr	SIRKPSRMPKSCARCRNHGFVSPLEGHKR.FCNWRCKKRLTADRQRYMAAQVALRRQAQDEEMGICSPI.....NLS	83
Mm	GSKKSPRLPKARCRNHGYASPLEGHKR.FCNWRCKKSLTADRQRYMAAQVALRRQAQDEBELGISHPI.....PLP	129
Hs	GSKKSPRLPKARCRNHGYASPLEGHKR.FCNWRCKKSLTADRQRYMAAQVALRRQAQDEBELGISHPI.....PLP	131
DM结构域		
CgDsx	CLVRYQPYKAMCNPSSGSMVESCVRYPHAPIKGQCY.....SPPDTLVTLSLPSLHAAS	139
Dm-M	AATTL.....SHHHHVA..APAHVHAHHVHAHHAGHHSHGHVHLHQQAAAAAASAPASHLGTAAASSIHGHAHA	174
Dm-F	AATTL.....SHHHHVA..APAHVHAHHVHAHHAGHHSHGHVHLHQQAAAAAASAPASHLGTAAASSIHGHAHA	174
Ce	MDMEM.....VVTATDG..QK.....IIG.....TSASPSSTTDTMS...SMSPPC	192
Bm-M	LDRP.....VPP.....VVKAPRSP	113
Bm-F	LDRP.....VPP.....VVKAPRSP	113
Dr	GSDTL.....VKNEAVG..ENVFTLS..SGP.....PSPASSATASPTNLGSRSMSPAMSSRGHTDC	137
Mm	SADEL.....VKRENNNA..SNPCLMAENSSS.....AQPPPA.STPTAASEGRMVIPAVTSRGHMEN	184
Hs	SADEL.....VKRENNNG..SNPCLMTECSGT.....SQPPPA.SVPTTAASEGRMVIPAVTSRGHVEN	186
CgDsx	NSKTSSTSYKTEM...RRYSNI.....TKSIMPTSKTMDTSPSIEVLKQNLVSTNNVIQVPITYWITQSTNTHH	208
Dm-M	HHVHMAAAAAASVAQHQQSHPHSHHHHHQHHPHQPPATQTAPPHSDHGGSGVPATSSSGGAPSSSNAATAAT.SN	253
Dm-F	HHVHMAAAAAASVAQHQQSHPHSHHHHHQHHPHQPPATQTAPPHSDHGGSGVPATSSSGGAPSSSNAATAAT.SN	253
Ce	SPSPLLAQYTLTLAAPIPIPIPMN.....QQLISLQQQFLMS.....IQNMAPS...IGQAPL.....LP	248
Bm-M	MI.....PPSA..PRSLGSASCDs.....VP	132
Bm-F	MI.....PPSA..PRSLGSASCDs.....VP	132
Dr	TSDL.....MYDASYNNLTPIYSSYSNLY.....NYQYQYMPSGNGR..	174
Mm	TSDL.....VSDPAYSSPSLFPYNNLY.....NYPQYSMALSAES.SS	223
Hs	TPDL.....VSDSTYSSPSLFPYNNLY.....NCPQYSMALAADS.AS	225
CgDsx	AIQQ.....PRGSQAA.G.I.....SHPCF.....SVSSSFHRAAPACS...	239
Dm-M	GSSGGGGGGGGSSGGGAGGGRTSVITSADHMTTVPPTAQSLEGSCDSSSPSPSTSGAAILPISVSNNRKNGANVPLV	333
Dm-F	GSSGGGGGGGGSSGGGAGGGRTSVITSADHMTTVPPTAQSLEGSCDSSSPSPSTSGAAILPISVSNNRKNGANVPLV	333
Ce	GISA.....GSA.....I	256
Bm-M	GSP.....VSP.....YAPPPSVPPPTMPPL.....IPTPQPVT	163
Bm-F	GSP.....VSP.....YAPPPSVPPPTMPPL.....IPTPQPVT	163
Dr		174
Mm	GEVG.....NSL.....G..GSPVK.....NSLRSLPAPYVPA.	249
Hs	GEVG.....NPL.....G..GSPVK.....NSLRGLPGYVPG.	251
CgDsx	VQSMPLCEPTTYTLKPVSHVLSYS...ADGAFWMQEQGSQ.....SREA	283
Dm-M	FLDYCQKLLKFRYPWELMPLMYVILKADANIEEASRIIEARVEINRTVAQIYYTPM.ALVNGAPMYLTYPSEIQGRY	412
Dm-F	FLDYCQKLLKFRYPWELMPLMYVILKADANIEEASRIIEGQYVYNEYSRQHNDGG.ELRNTTRQCG.....	402
Ce	LNEFWSMYLKNYGLQA.....	272
Bm-M	LVENCHRLLEKFHYSWEMMPLVLVIMNYARSDLEASRKIYEGYWMHQRLLQYSGAL.ELSARKDVAALCCLRDTC..	240
Bm-F	LVENCHRLLEKFHYSWEMMPLVLVIMNYARSDLEASRKIYEGYWMHQRLLQYSGAL.ELRNRSTQKMLEINNISG..	240
Dr	L.....SSHNVSPQYRTHS..SS..YLSQGLGAACVQP.....	203
Mm	TGNQWQMKTSE.....SRHPVSSQYRMHS..GPPSYLQGSMSQIFTFEEG.....	292
Hs	TGNQWQMKNME.....NRHAMSSQYRMHS..PPPSYLGQSVPPQFTTFEDA....	294
CgDsx	GAMYRDTN.....	291
Dm-M	GAHFTHLPLTQICPPTPEPLALSRSPSSPSGSPSNQKPSRPGSSNGTVHSAASPTMTVTTATTSSPTLSRRQSRSATPT	492
Dm-F		402
Ce	WRPRSRVVCPS..	272
Bm-M	VLSSSMKLFCE.....	253
Bm-F	STCPEPKAAAFSD.GAQDS..V..S..MNAENKLECESS.SESGS...FSVDSIEGATK.....	251
Dr	PSYSEAKAS.VFSPSSQDGLVSSSPMSNESSKGVLECEASSEPSS...YAVNQVLEDEDE.....	254
Mm	PSYPEARAS.VFSPSSQDGLVSSSPISNKRSTKAVLECEPA.SEPSS...FTVTQVIEEDE.....	352
Hs		351
CgDsx		291
Dm-M	TPPPPPPAHSGAYHHGHLVSTAA	517
Dm-F		402
Ce		272
Bm-M		253
Bm-F		251
Dr		254
Mm		352
Hs		351

图1 长牡蛎和其它物种 *Doublesex* 同源基因的氨基酸序列比对Fig.1 Alignment of *Doublesex* homolog amino acid sequences of *C. gigas* and other species

深蓝色表示完全相同的序列, 粉色表示序列相同程度 $\geq 75\%$, 绿色表示序列相同程度 $\geq 50\%$ 。“...”代表氨基酸缺失。Dm-M: 果蝇 *Doublesex* 基因雄性亚型; Dm-F: 果蝇 *Doublesex* 基因雌性亚型; Ce: 线虫 *Mab-3* 基因; Bm-M: 家蚕 *Doublesex* 基因雄性亚型; Bm-F: 家蚕 *Doublesex* 基因雌性亚型; Dr: 斑马鱼 *Dmrt1* 基因; Mm: 小鼠 *Dmrt1* 基因; Hs: 人 *Dmrt1* 基因。

注册号: Cgdxx-KJ489413, Dm-M-AAF54169.1, Dm-F-AAN13385.1, Ce-CAB16489.1, Bm-M-NP_001104815.1, Bm-F-NP_001036871.1, Dr-AAQ04555.1, Mm-AAF12826.1, Hs-AAD40474.1

图 2 长牡蛎和其它物种 *Dmrt2*/*Dmrt5* 基因的氨基酸序列比对Fig.2 Alignment of *Dmrt2*/*Dmrt5* homolog amino acids sequences of *C. gigas* and other species

粉色表示序列相同程度 $\geq 75\%$, 绿色表示序列相同程度 $\geq 50\%$ 。“...”代表氨基酸缺失。Cg: 长牡蛎; Dr: 斑马鱼; Tr: 东方红鲳豚; Mm: 小鼠; Hs: 人

注册号: KC22641.1, Dr- NP_001007065.2, Tr- NP_001033039.1, Mm- AAN10254.1, Hs- AAI43801.1

2.2.2 长牡蛎 *CgDsx* 和 *CgDmrtA2* 基因在不同组织中的表达分析 实验所用成体牡蛎均为二龄成熟期个体, 实验结果显示, *CgDsx* 基因在雄性性腺中的表达量显著($P < 0.01$)高于其它组织, 雄性性腺的表达量是雌性性腺的 8.9 倍。在除性腺之外的体细胞组织中, *CgDsx* 表达量低, 彼此间无太大差异。*CgDmrtA2* 基因在各组织中均有表达, 在雄性性腺中表达量最低, 在雌性性腺中最高, 雌性性腺的表达量是雄性性腺的 5 倍, 在另外 3 个组织中差异也不明显。

3 讨论

Dmrt 家族基因的共有特征就是一个含有锌指结构可与特异 DNA 序列结合的保守结构域-DM 结构域(*Dmrt8* 除外(Veith *et al*, 2006))。该家族基因在许多种类, 包括节肢动物, 线虫类以及脊椎动物中都参与调控性别的分化与发育, 因而该基因家族可能是首例广泛分布的性别调控基因。在线虫 *C. elegans* 中, 含有 DM 结构域的 *Mab-3* 基对于雄性的发育是必需的, 它与果蝇中的 *Doublesex* 基因发挥类似的作用(Shen *et al*, 1988; Yi *et al*, 1999)。在脊椎动物中, *Dmrt1* 基因

展示出在早期的雄性性腺中特异表达的模式(Zarkower, 2001, 2002)。含有 *Dmrt1* 基因的区域被报道与人类男性的性逆转相关(Bennett *et al*, 1993; Crocker *et al*, 1988; Flejter *et al*, 1998; Guioli *et al*, 1998; Veitia *et al*, 1997, 1998), 而且 *Dmrt1* 基因还是小鼠出生后精巢发育所必需的(Raymond *et al*, 2000)。珊瑚虫中也发现一种含有 DM 结构域的基因, 它同样表现出具有与性别决定和分化相关的功能(Miller *et al*, 2003)。

长牡蛎基因组中共发现 3 个含有 DM 结构域的 Dmrt 家族基因, 分别是 *Cg-DM1* (CGI_10015952), *CgDsx* (CGI_10019568)以及 *CgDmrtA2* (CGI_10001830) (Naimi *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2014)。而在线虫、果蝇和人类中的该家族基因的数目分别是 11 个、4 个和 7 个(Matson *et al*, 2012)。*Cg-DM1* (CGI_10015952) 曾被报道过(Naimi *et al*, 2009)。*CgDsx* (CGI_10019568) 与果蝇的 *doublesex*、线虫的 *Mab-3* 以及脊椎动物的 *Dmrt1* 是同源基因。*CgDsx* 虽然含有 3 个外显子, 但没有表现出雌雄相关的可变剪切(Zhang *et al*, 2014)。定量 PCR 结果表明它在雄性性腺中表达量最高,

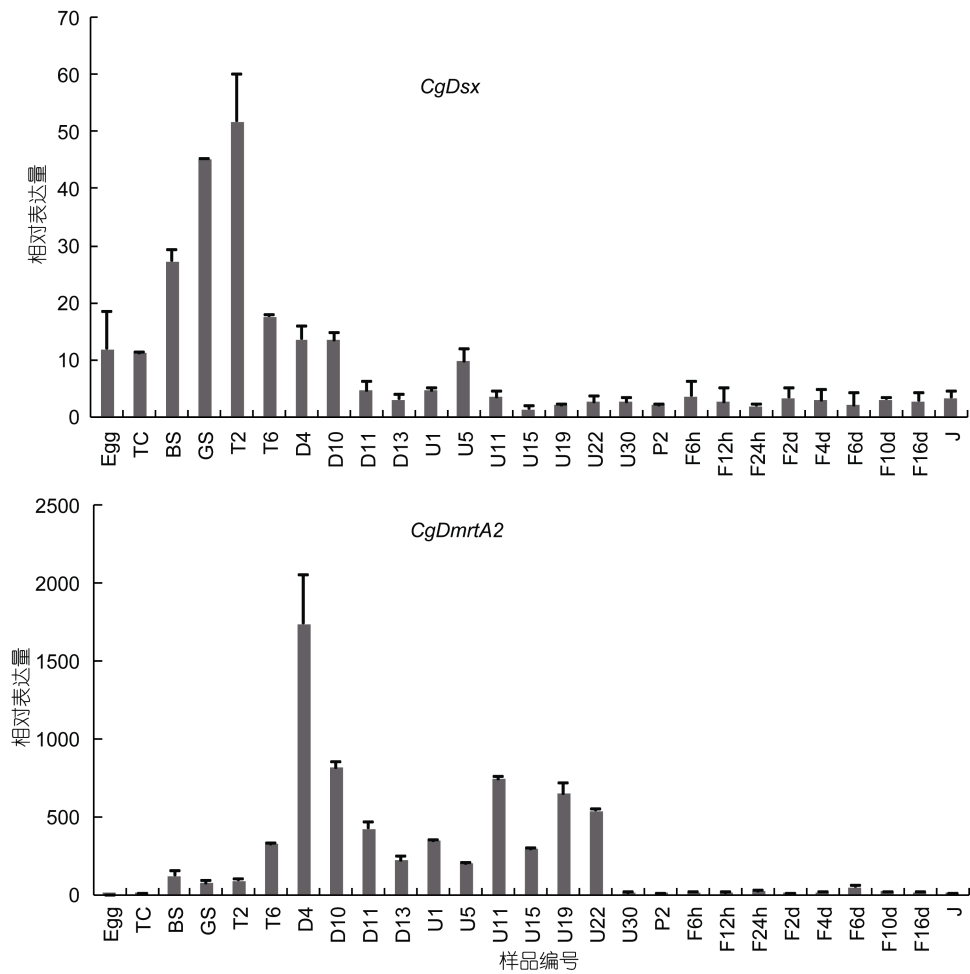


图 3 Real-time qPCR 检测 *CgDsx* 和 *CgDmrtA2* 在幼虫时期的表达模式
Fig.3 Expression profiles of *CgDsx* and *CgDmrtA2* in larval stages
幼虫分期详见表 2

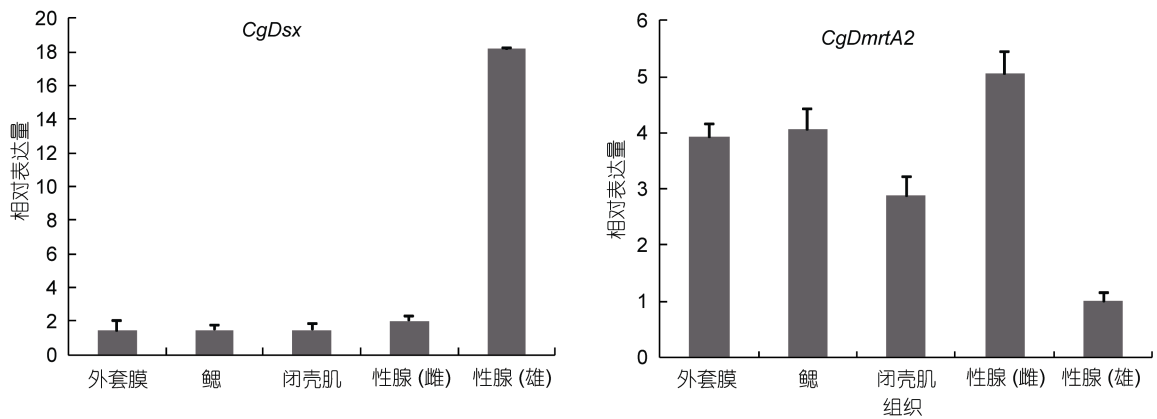


图 4 *CgDsx* 和 *CgDmrtA2* 在不同成体组织中的表达模式
Fig.4 Expression profiles of *CgDsx* and *CgDmrtA2* in different adult tissues

这和转录组结果一致，它很可能在长牡蛎的性别决定中起关键作用或促进雄性发育。其在雌性性腺中也稍有表达，雄性性腺的表达量是雌性性腺的 8.9 倍，这或许意味着雌性性腺中存在着休眠的精子，随时

为性别转变做着准备。牡蛎的性腺中同时存在着两种生殖细胞，这或许是性别转变的先决条件(Cole, 1941; Guo *et al*, 1998; Zhang *et al*, 2014)。

通过 DM 结构域的同源比对及进化分析发现，

CgDsx 与果蝇的 *doublesex* 聚到一起。*CgDsx* 与无脊椎动物的同源基因进化距离较近, 与脊椎动物的 *Dmrt1* 进化距离较远(Zhang *et al*, 2014)。*CgDsx* 在囊胚期到担轮幼虫初期表达量较高, 说明在该段时期的发育需要 *CgDsx* 的参与。

Cg01830(CGI_10001830)是 Dmrt 家族的亚族 DmrtA 中的一员。通过同源比对及进化分析发现, *Cg01830* 与 *Dmrt2/Dmrt5* 同源关系较近(Zhang *et al*, 2014)。据报道, *Dmrt5* 对大脑以及神经系统的发育具有重要的作用(Kim *et al*, 2003; Guo *et al*, 2004; Gennet *et al*, 2011; Yoshizawa *et al*, 2011; Konno *et al*, 2012; Parlier *et al*, 2013; Saulnier *et al*, 2013)。在长牡蛎中, 该基因在卵子和二细胞期的表达量很低, 到桑椹期开始增高, 到 U22 期一直保持较高的表达量, U30 期降低到最低点, 之后未有明显升高。这说明, *CgDmrtA2* 主要在长牡蛎的 D 形到 U22 期幼虫阶段合成, 在这期间发挥的作用可能也与其在斑马鱼及小鼠的胚胎中行使的功能类似, 与神经系统的形成相关。在成体中, 该基因在所有组织中均有表达, 雌性性腺中表达量最高, 其次是鳃和外套膜, 在雄性性腺中表达量最低, 但各组织间表达差异都不显著。因此该基因应不参与长牡蛎的性别决定和分化等功能, 其具体功能还需要进一步探索与研究。

参 考 文 献

- Balcuniene J, Bardwell V J, Zarkower D, 2006. Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles. *Mol Cell Biol*, 26(23): 8984—8991
- Bennett C P, Docherty Z, Robb S A *et al*, 1993. Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*, 30(6): 518—520
- Burtis K C, Baker B S, 1989. *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, 56(6): 997—1010
- Cole H A, 1941. Sex-Ratio in *Urosalpinx cinerea*, the American Oyster Drill. *Nature*, 147: 116—117
- Crocker M, Coghill S B, Cortinho R, 1988. An unbalanced autosomal translocation (7;9) associated with feminization. *Clin Genet*, 34(1): 70—73
- De Grandi A, Calvari V, Bertini V *et al*, 2000. The expression pattern of a mouse *doublesex*-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech Dev*, 90(2): 323—326
- Flejtner W L, Fergestad J, Gorski J *et al*, 1998. A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am J Hum Genet*, 63(3): 794—802
- Gennet N, Gale E, Nan X S *et al*, 2011. *Doublesex* and *mab-3*-related transcription factor 5 promotes midbrain dopaminergic identity in pluripotent stem cells by enforcing a ventral-medial progenitor fate. *P Natl Acad Sci USA*, 108(22): 9131—9136
- Guan G J, Kobayashi T, Nagahama Y, 2000. Sexually dimorphic expression of two types of DM (*Doublesex/Mab-3*)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Bioph Res Co*, 272(3): 662—666
- Guioli S, Schmitt K, Critcher R *et al*, 1998. Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: Refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am J Hum Genet*, 63(3): 905—908
- Guo X M, Hedgecock D, Hershberger W K *et al*, 1998. Genetic determinants of protandric sex in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution*, 52(2): 394—402
- Guo Y Q, Li Q, Gao S *et al*, 2004. Molecular cloning, characterization, and expression in brain and gonad of *Dmrt5* of zebrafish. *Biochem Bioph Res Co*, 324(2): 569—575
- Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D, 2000. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, 26(3): 174—178
- Kim S, Kettlewell J R, Anderson R C *et al*, 2003. Sexually dimorphic expression of multiple *doublesex*-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr Patterns*, 3(1): 77—82
- Kondo M, Froschauer A, Kitano A *et al*, 2002. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*, 295(2): 213—222
- Konno D, Iwashita M, Satoh Y *et al*, 2012. The mammalian DM domain transcription factor *dmrt2* is required for early embryonic development of the cerebral cortex. *PLoS One*, 7(10): e46577
- Koopman P, Loffler K A, 2003. Sex determination: The fishy tale of *Dmrt1*. *Curr Biol*, 13(5): R177—R179
- Kopp A, 2012. *Dmrt* genes in the development and evolution of sexual dimorphism. *Trends Genet*, 28(4): 175—184
- Li Q, Zhou X, Guo Y Q *et al*, 2008. Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish *Dmrt3*. *Biol Cell*, 100(8): 453—463
- Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H *et al*, 2000. *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *BBA-Gene Struct Expr*, 1493(1—2): 180—187
- Matson C K, Zarkower D, 2012. Sex and the singular DM domain: insights into sexual regulation, evolution and plasticity. *Nat Rev Genet*, 13(3): 163—174
- Miller S W, Hayward D C, Bunch T A *et al*, 2003. A DM domain protein from a coral, *Acropora millepora*, homologous to proteins important for sex determination. *Evol Dev*, 5(3): 251—258
- Moniot B, Berta P, Scherer G *et al*, 2000. Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination. *Mech Develop*, 91(1—2): 323—325
- Naimi A, Martinez A S, Specq M L *et al*, 2009. Identification and expression of a factor of the DM family in the oyster *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Phys A Mol Integr Physiol*, 152(2): 189—196
- Nanda I, Kondo M, Hornung U *et al*, 2002. A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *P Natl Acad Sci USA*, 99(18): 11778—11783
- Ohmuro-Matsuyama Y, Matsuda M, Kobayashi T *et al*, 2003. Expression of *DMY* and *DMRT1* in the various tissues of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Physiol Biochem*, 28(1—4): 171

- Parlier D, Moers V, Van Campenhout C *et al*, 2013. The *Xenopus* doublesex-related gene *Dmrt5* is required for olfactory placode neurogenesis. *Dev Biol*, 373(1): 39—52
- Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B *et al*, 1999. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol*, 215(2): 208—220
- Raymond C S, Murphy M W, O'Sullivan M G *et al*, 2000. *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Gene Dev*, 14(20): 2587—2595
- Raymond C S, Shamu C E, Shen M M *et al*, 1998. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391(6668): 691—695
- Ren L L, Cheng H H, Guo Y Q *et al*, 2001. Evolutionary conservation of *Dmrt* gene family in amphibians, reptiles and birds. *Chin Sci Bull*, 46(23): 1992—1994
- Saulnier A, Keruzore M, De Clercq S *et al*, 2013. The doublesex homolog *Dmrt5* is required for the development of the caudomedial cerebral cortex in mammals. *Cereb Cortex*, 23(11): 2552—2567
- Shen M M, Hodgkin J, 1988. *Mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell*, 54(7): 1019—1031
- Smith C A, Hurley T M, McClive P J *et al*, 2002. Restricted expression of *DMRT3* in chicken and mouse embryos. *Mech Develop*, 119(Suppl): S73—S76
- Smith C A, McClive P J, Western P S *et al*, 1999. Evolution-Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, 402(6762): 601—602
- Smith C A, Roeszler K N, Ohnesorg T *et al*, 2009. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461(7261): 267—271
- Veith A M, Klattig J, Dettai A *et al*, 2006. Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less *Dmrt8* genes in the mouse. *Genomics*, 88(2): 185—195
- Veitia R A, Nunes M, Quintana-Murci L *et al*, 1998. Swyer syndrome and 46, XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *Am J Hum Genet*, 63(3): 901—905
- Veitia R, Nunes M, Brauner R *et al*, 1997. Deletions of distal 9p associated with 46, XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics*, 41(2): 271—274
- Volff J N, Zarkower D, Bardwell V J *et al*, 2003. Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol*, 57(Suppl 1): S241—S249
- Wen A Y, You F, Tan X G *et al*, 2009. Expression pattern of *dmrt4* from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in adult gonads and during embryogenesis. *Fish Physiol Biochem*, 35(3): 421—433
- Winkler C, Hornung U, Kondo M *et al*, 2004. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech Develop*, 121(7—8): 997—1005
- Yi W, Zarkower D, 1999. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development*, 126(5): 873—881
- Yoshizawa A, Nakahara Y, Izawa T *et al*, 2011. Zebrafish *Dmrt2* regulates neurogenesis in the telencephalon. *Genes Cells*, 16(11): 1097—1109
- Zarkower D, 2001. Establishing sexual dimorphism: Conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet*, 2(3): 175—185
- Zarkower D, 2002. Invertebrates may not be so different after all. *Novart Found Symp*, 244: 115—126
- Zhang N, Xu F, Guo X M, 2014. Genomic analysis of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reveals possible conservation of vertebrate sex determination in a mollusc. *Genes Genomes Genetics*, 4(11): 2207—2217

EXPRESSION OF TWO *Dmrt* FAMILY GENES IN THE PACIFIC OYSTER *CRASSOSTREA GIGAS*

ZHANG Na^{1,2}, HUANG Wen^{1,2}, XU Fei¹, LI Li¹, ZHANG Guo-Fan¹, GUO Xi-Ming³

(1. National & Local Joint Engineering Laboratory of Ecological Mariculture, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Rutgers University, New Jersey, USA, 08349)

Abstract We detected the expression profiles of two *Dmrt* family genes in the larval of different stages in adult tissues, and their possible roles were also conducted in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Quantitative real-time PCR was used to determine mRNA expression at 27 larval stages in 5 adult tissues. The result shows that the *CgDsx* gene was expressed during early embryonic development and peaked between blastula and early trochophore stages, then decreased after D-stage. Our findings indicate that *CgDsx* may play a role in regulating embryonic development in addition to its role in sex determination. *CgDmrtA2* was expressed in all adult tissues with no significant difference; it was highly expressed in swimming larvae between D- and late umbo stages, suggesting that *CgDmrtA2* may be involved in larval development, perhaps related to nerve development. More studies are called in the future on exact function of the genes.

Key words *Crassostrea gigas*; *Dmrt* family genes; larval development; tissue specific expression; sex determination