

文章编号: 1000-0615(2005)03-0300-07

奥利亚罗非鱼 DMO cDNA 的分离和克隆

唐永凯^{1,2}, 俞菊华¹, 夏德全¹, 王光花^{1,2}, 李建林¹, 吴婷婷¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 法分离和测定了奥利亚罗非鱼 DMO cDNA 的全序列。得到 1571 bp [不含 poly(A)] 的全长 cDNA, 包括 148 bp 5' 非翻译区, 1230 bp 阅读框以及含 Poly(A) 信号 AATAAA 的 193bp 3' 非翻译区 [不包括 Poly(A)]。阅读框共编码 409 氨基酸, 与尼罗罗非鱼 DMO 编码的氨基酸序列进行比较, 同源率为 96.3%, 表明 DMO 在同一物种中差别较小。而与尼罗罗非鱼、红鳍东方鲀、虹鳟、青鳉、鼠、人等动物的 DMRT1 编码的氨基酸序列进行比较, 同源性分别为: 25.7%, 25.8%, 24.3%, 29.7%, 22.5%, 22.0%, 这说明 DMO 和 DMRT1 可能是两个不同的基因。

关键词: 快速扩增 cDNA 末端; DMRT1; DMO; 奥利亚罗非鱼

中图分类号: S917 **文献标识码:** A

Cloning DMO cDNA of *Oreochromis aurea*

TANG Yong-kai^{1,2}, YU Ju-hua¹, XIA De-quan¹, WANG Guang-hua^{1,2}, LI Jian-lin¹, WU Ting-ting¹

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: RT-PCR and RACE (rapid amplification cDNA ends) were used for the isolation of the full length cDNA of DMO gene from ovary of *Oreochromis aurea*. Sequence analysis revealed a 1571 bp cDNA containing the 148 bp 5'-untranslated region, 193 bp 3'-untranslated region and 1230 bp open reading frame encoding 409 amino acid. Sequence analysis revealed the identity rate of deduced amino acid of DMO in *O. aurea* and *O. niloticus* is 96.3%, which showed high homology in species. However, we compared the alignment of deduced amino acid sequences between DMO cDNA from *O. aurea* and DMRT1 cDNA from *O. niloticus*, fugu, rainbow trout, medaka, rat and human. The score was 25.7%, 25.8%, 24.3%, 29.7%, 22.5% and 22.0%, respectively. These results indicated that DMO and DMRT1 gene may be different genes.

Key words: RACE; DMRT1; DMO; *Oreochromis aurea*

DMRT (DM-related transcription factor) 作为一种为性别相关基因, 广泛存在于哺乳类、鸟类、爬行类以及鱼类等动物。该基因家族含有果蝇的 doublesex 基因和线虫的 *mal-3* 基因共有的 DM-domain (doublesex 和 *mal-3* 基因编码结合 DNA 的蛋白质基序)^[1]。DMRT 1 (DM-related transcription factor 1) 基因被认为是一种性别决定和性别分化

基因, 存在于鸡的 Z 染色体^[2], 人的常染色体 9p24.7^[3] 以及鱼类的常染色体上^[4]。国外有关鱼类 DMRT 基因研究工作主要集中在青鳉、尼罗罗非鱼、虹鳟以及河豚上。Matsude 等^[5]通过对青鳉 Y 染色体上的性别相关区段的重组和缺失分析, 分离出一个新基因 DMY (DM domain of Y chromosome), 该基因表达只限于 XY 精巢, Guan

收稿日期: 2004-05-11

资助项目: 国家“863”项目(2001AA243061); 国家自然科学基金(30371116); 无锡市自然科学基金(CK030001)

作者简介: 唐永凯(1978-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 主要从事遗传育种研究

通讯作者: 吴婷婷, Tel: 0510-5554552, E-mail: wutt@ffrc.ac.cn

等^[6]在尼罗罗非鱼的精巢和卵巢中分别分离出 DMRT 1 和 DMO(DM-domain gene in ovary) 基因。鉴于尼罗罗非鱼(XX/XY) 和奥利亚罗非鱼(ZZ/ZW) 的染色体组型不同, 性别调控机制可能不同, 我们根据 DM domain 的保守性, 用 RT-PCR 和 RACE(rapid amplification of cDNA ends) 法在奥利亚罗非鱼卵巢中克隆出 DMO 基因, 为今后的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验鱼 奥利亚罗非鱼取自本实验场, 组织为卵巢。

试剂 Trizol Reagent 购自 Promega; AMV、RnasH、*Tdt* 酶、*Taq* 酶、3' RACE 试剂盒购自 Takara; 胶回收试剂盒、载体 pUCm-T、连接酶购自上海生物工程技术服务有限公司, 大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。引物设计与合成: 根据已知鱼类 DM-domain 保守序列合成了下列引物, 各引物在全序列上的位置如下:

primer1: 5'-AGT GCT CCC GGT GYA GGA AYC AG-3' (300~ 322bp)

primer2: 5'-CTS AAR GGM CAC AAG CGC TTT TG-3' (338~ 360bp)

primer3: 5'-TTG AGC CTG CTG CCK YCK CAR AG-3' (435~ 457bp)

primer4: 5'-TGG TCT CTG CGC TCA AAG GG-3' (327~ 346bp)

primer5: 5'-GAG ACT GCG TGT GCG CAA AGT-3' (369~ 389bp)

Gene Specific primer1: 5'-TAC TCA TTG GGC TTC TCC G-3' (852~ 870bp)

Gene Specific primer2: 5'-GGA GTA CTG GCA GAT ACG-3' (559~ 579bp)

Gene Specific primer3: 5'-AGC CTG CCT CCT CAA AG-3' (435~ 454bp)

测序 将质粒送往上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司测序。

1.2 方 法

总 RNA 的抽提 取奥利亚罗非鱼卵巢称重, 用 Trizol Reagent 抽提总 RNA。用变性琼脂糖凝胶电泳, 溴化已啶染色显示 28 s 和 18 s, 检测 RNA 的完整性。

DM-domain 区的扩增 取 3 μg 总 RNA 以 OligodT-AP [OligodT-AP 5' - CTGATCTAGAGGTACCGGATCC (T) 16-3'] 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应, 然后用 10% 的 RT 液, primer 1 和 primer 3 进行 PCR 反应, PCR 反应体系为 25 μL , 其中含 2.5 μL 10 \times 反应缓冲液, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, 引物各 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.125U *Taq* 酶。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 然后 30 循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增液用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 用 primer 2, primer 3 引物扩增回收液, 验证扩增液为 DM-domain, 将扩增液连接到 pUCm-T 载体, 转化质粒, 测序。

3' RACE 根据试剂盒的操作流程进行, 用 3 μg 总 RNA 以 dF-AP [dF-AP, 5'-CTGATCTAGAGG TACCGGATCC(T) 16-3'] 为引物, 根据 AMV 使用说明进行 RT 反应, 然后用 10% 的 RT 液, AP [AP5' - CTGATCTAGAGGTACCGGATCG-3'] 和 primer 4 进行 PCR, 退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 其它同上。扩增液稀释 5 倍, 取 2 μL 作为模板, AP 和 primer 5 作为引物进行 PCR 反应, 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$, 其它同上。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 连接, 转化质粒, 测序。

5' RACE 方法原理参照陈受宜等^[7], 俞菊华等^[8], 用 5 μg 总 RNA, 以 gene specific primer 1 为引物, 进行 RT 反应, 然后加 RnasH, 分解 mRNA, 用试剂盒回收 cDNA, 去除多余的 dNTP, 引物等; 再用 *Tdt* 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A), 用试剂盒回收加了 poly(A) 尾的 cDNA, 以此为模板, 用 gene specific primer 2 及 dF-AP (同 3' RACE) 为引物, 进行 PCR 反应, 退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 其它同上。PCR 扩增液用胶回收试剂盒回收, 再以此回收液为模板, 用 gene specific primer 3 及 AP, 进行 PCR 反应, 退火温度为 57 $^{\circ}\text{C}$, 反应体系组成同上。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 回收, 连接, 转化质粒, 测序。

PCR 产物的连接与转化 切下琼脂糖胶板上的目的条带, 用胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 在 T4DNA 连接酶的作用下与 pUCm-T 载体进行连接反应, 连接产物转化到大肠杆菌 JM-109 的感受态细胞后, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体

培养基(AMP⁺)。挑白斑,抽提质粒。经 *Eco* IV 和 *Hind* III 双酶切鉴定,并以质粒为模板进行 PCR 产物扩增再鉴定。

序列分析 用 Dnastar 5.2, Dnaman 5.2 分析奥利亚罗非鱼 DMO 序列,以及它与其它鱼类的系统发生。

2 结果

2.1 DM-domain

根据 DM-domain 区的扩增法先得到 primer 1 和 primer 3 的条带,约为 150 bp(图 1-1),再以 primer 1 和 primer 3 扩增产物为模板,用 primer 2 和 primer 3 进行扩增,得到 130 bp 左右的一条带(图 1-2),认为 primer 1 和 primer 3 扩增产物即为 DM-domain,将其转化质粒,双酶切片段约为 270 bp(图 1-3),将质粒测序,序列长 130 bp,经 Blast 分析,与其它鱼类 DM-domain 的同源性高达 90%,确定 primer 1 和 primer 3 的扩增产物即为

DM-domain。

2.2 3' RACE

利用扩增出的奥利亚罗非鱼 DM-domain 的序列,设计引物 primer 4, primer 5。根据 3' RACE 操作流程, primer 4 和 AP 扩增得到较多条带(图 1-4),而 primer 5 和 AP 扩增只有一条带(图 1-5),约为 1300 bp,将其转化质粒,双酶切片段(图 1-6)约为 1400 bp。将质粒测序,得到 1217 bp 片段。经 Blast 分析,确定为奥利亚罗非鱼 DMO 的 3' 端序列。

2.3 5' RACE

利用 3' RACE 得到的序列,设计引物 Gene Specific primer1, Gene Specific primer2, Gene Specific primer3。根据 5' RACE 操作流程,最后获得 500 bp 左右的特异条带(图 1-7),转化质粒,酶切片段(图 1-8)约为 600 bp,将质粒测序,得到 455 bp 片段。经 Blast 分析,确定为奥利亚罗非鱼 DMO 的 5' 端序列。

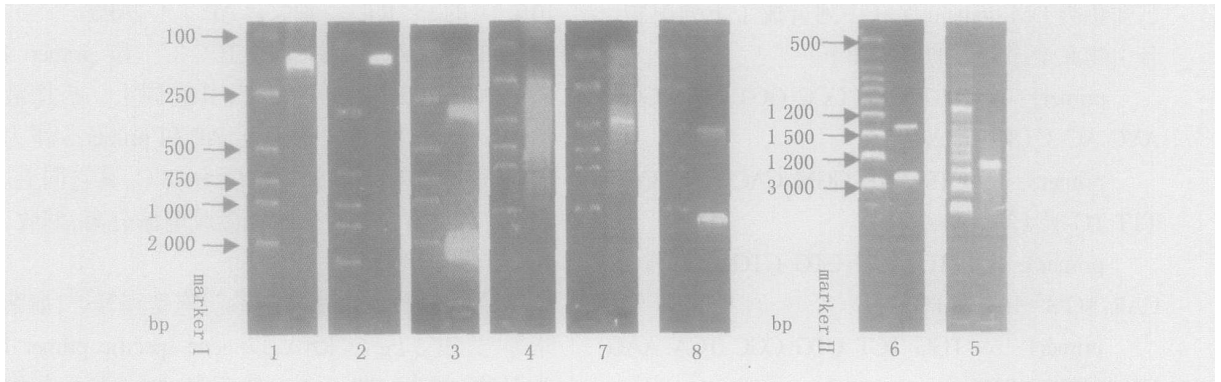


图 1 RT-PCR 和酶切结果

Fig. 1 Results of RT-PCR and enzyme products

Marker iv: DNA Marker DL 2000; Marker ⑤: Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus1, 2, 4, 5, 7 为 PCR 产物,分别为 primer 1 和 primer 3, primer 2 和 primer 3, primer 4 和 AP, primer 5 和 AP, Gene Specific primer 3 和 AP。3, 6, 8 为酶切产物。分别为 primer 1 和 primer 3, primer 5 和 AP, Gene Specific primer 3 和 AP 的产物

1, 2, 4, 5 and 7 are PCR products. They are the products respectively of primer 1 and primer 3, primer 2 and primer 3, primer 4 and AP, primer 5 and AP, Gene Specific primer 3 and AP. 3, 6, 8 are enzyme products. They are the products respectively of primer 1 and primer 3, primer 5 and AP, Gene Specific primer 3 and AP

2.4 序列拼接与分析

根据 3' RACE 和 5' RACE 的结果,使用 Dnastar 5.2 把 5', 3' 拼接得到奥利亚罗非鱼 DMO cDNA 序列(GenBank accession number: AY487938 图 2)。

序列分析显示,奥利亚罗非鱼 DMO cDNA 共 1571 bp, 包括 148 bp 5' 非翻译区, 1230 bp 阅读框

以及含加 Poly(A) 信号 AATAAA 的 193 bp 3' 非翻译区[不包括 Poly(A)]。奥利亚罗非鱼 DMO 阅读框共编码 409 个氨基酸。

使用 Dnaman 对奥利亚罗非鱼 DMO 的氨基酸序列与尼罗罗非鱼的 DMO, DMRT1 以及红鳍东方豚, 虹鳟, 青鳉, 鼠及人等动物的 DMRT1 氨基酸序列进行比较(图 3)。同源性分

别为: 96.3%, 25.7%, 25.8%, 24.3%, 29.7%, 22.5%, 22.0%。从图中可看出, 除了 DM-domain 相似外, DMO 与 DMRT1 的同源性较低。但和尼罗罗非鱼的 DMO 的同源性却较高, 相差的氨基

酸较少。图 4 是根据 Dnmanan 5.2 作的系统树形图。图中直观地显示了奥利亚罗非鱼 DMO 与其它各种动物 DMO, DMRT 1 的相似程度。

```

1 atga tct aga ggt acc gga tcc ttt ttt ttt cat tac aga gac acc agt tgc tca gag 61
62 aag tcc aaa tca cct gaa tge ctc cac cgt aaa cag ttt tgg agg act cgt aga ctt ttt 121
122 ttt ttt ttt aac cct ctc ctc tga gcg ATG GAA AAC AGG ATC CGA CCC CTT GGT CTG ACC 181
                                     M E N R I R P L G L T 11
182 GAT CAC ACC TCC GGC CCG CTC GGT AGC CTG CCG GTA CCC CCT TCC CTT CTG CGC CCT CCG 241
12 D H T S G P L G S L P V P P S L L R P P 31
242 CCT CTC TTC CTC CAG GCT TGC AAC CCC ACG CTG GAG AGG GGA TAC CCC CGG ACC CCG AAG 301
32 P L F L Q A C N P T L E R G Y P R T P K 51
302 TGT GCC AGG TGC AGG AAC CAC GGC GTG GTC TCT GCG CTC AAA GGC CAC AAG CGC TTT TGT 361
52 C A R C R N H G V V S A L K G H K R F C 71
362 CGA TGG AGA GAC TGC GTG TGC GCA AAG TGC ACA CTG ATT GCA GAG AGG CAG CGG GTG ATG 421
72 R W R D C V C A K C T L I A E R Q R V M 91
422 GCC GCG CAG GTG GCT TTG AGG AGG CAG CAG GCT CAG GAA GAG AGC GAG GCC CGG GAT CTT 481
92 A A Q V A L R R Q Q A Q E E S E A R D L 111
482 CGG CTC TTG TAC CCC TGC ACT GGG ATC GGA GGG GAA GCA GGG ATC CCT CAG GGA TCG TCC 541
112 R L L Y P C T G I G G E A G I P Q G S S 131
542 ATT AGC GCC GGG GTA CCC GTA TCT GCC AGC AGT ACT CCG GCA GCT GCC TGT TTT GAT GTT 601
132 I S A G V P V S A S S T P A A A C F V 151
602 TTT GGG AGT GAG AAT CAG AAA GAC GTT TCA GAG GAC AAA TTA AGC AAG TAC AAC TTT TAC 661
152 F G S E N Q K D V S E D K L S K Y N F Y 171
662 AAC GGA TTC ATG GGT CGA CCT CTG TTT GCA CCC CAT TCC CCA CGG CTG CCC TCT CCA AGT 721
172 N G F M G R P L F A P H S P R L P S P S 191
722 GAC AAG AAA GAG CTG TCT CCC AGC AAG GAC AGC GGC GGA AGT CAA TCC CCT GCG ATG GAT 781
192 D K K E L S P S K D S G G S Q S P A M D 211
782 CAC CGC TCA GAC CAT ACA GAG AGC CCG CAG AGG TCA CTT ACC TCC TCG GAT CCA GAG TCG 841
212 H R S D H T E S P Q R S L T S S D P E S 231
842 GGG AGC GAG TCG GAG AAG CCC AAT GAG TAT CTG AGC CCG GAC CGT GAC CCC ACC GAC ATC 901
232 G S E S E K P N E Y L S P D R D P T D I 251
902 ATG GCT AAG ATC TTC CCC CAT CAG GAA CGG GAC ACT CTG GAG TCT ATG GTG AGA ACG TGC 961
252 M A K I F P H Q E R D T L E S M V R T C 271
962 AAA GGT GAC ATT GTC AAA TCC ATT GAG CTG GCG TTG AAC TCC AAA GAG AAC AAA ATT GAC 1021
272 K G D I V K S I E L A L N S K E N K I D 291
1022 GCT GAC AGC GCG CGC AGG CCT TCT GCG GGA CTG CCC GGA GGG CTC GGT GCT CTG GGG GCC 1081
292 A D S A R R P S A G L P G G L G A L G A 311
1082 AAG TCT GCC TTC TCC CCC CTG CAC ATA CCC GCG TCC CCA GGG GGA GAC AGC CTG TAC GAC 1141
312 K S A F S P L H I P A S P G G D S L Y G 331
1142 CTC AGC TCT GCG CTG GGC GTC AGC CCC CTG CGG CTG GCC TAT CCC TCC GCT AAC GGC GGC 1201
332 L S S R L G V S P L R L A Y P S A N G G 351
1202 ATG GCA GGC TTC ATG TCT CCA TAC ATG ACA TCA GGA CTG ATG CCA GTG TTC CCA CTG CGT 1261
352 M A G F M S P Y M T S G L M P V F P L R 371
1262 CCA CCC TTG GAC TCT TAT TCC CTC CCC GGC ATG ATC CGA GAC CTG TCC TAC ATC CAA AGC 1321
372 P P L D S Y S L P G M I R D L S Y I Q S 391
1322 AAG GAG TCT CTA TGC AAT GCA GGC CTG TAC ACA CGG CTA AAC AGC GAG ACC AAA TAA AAA 1381
392 K E S L C N A G L Y T R L N S E T K * 409
1382 agg acg cat gaa aaa aac aac aaa caa aat aat aat AAT AAA aaa agt taa ctg tag ctt 1441
1442 tta aat aac cgc ttt tca agt gcc tcg aac cac agt ggt gta cta caa tct gac gac ttg 1501
1502 atg ctt ttt ttt ttg tta atg taa att ttg cag att gtt tat tgt gaa taa cgt tat ctt 1561
1562 ttc tcg ttt taa aaa aaa aaa 1585

```

图 2 奥利亚罗非鱼 DMO cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of the *Oreochromis aurea* DMO

其中小写字母代表 5', 3' 非翻译区, 上面为核苷酸序列, 下面为氨基酸序列, * 表示终止子, 3' 端 Poly(A) 信号(AATAAA) 用大写表示 The DNA sequences of the 5'- and 3'-untranslated region are shown as lowercase letters, while coding regions are shown as uppercase letters. Stop code are marked asterisks(*). The polyadenylation signals(AATAAA) in the 3'-untranslated regions are shown as upper case letters

```

奥地利DMO -----MENRIRPLGLTDHTSGPLGSLFVPPSLLRPPPLFLQACN
人DMRT1  MFNDEAFSKFSTPSEAPHAGVPPQGRAGGFKAAGALVGAASGTSAGGSSRRGGSSGGA
鼠DMRT1  MFNDDTFGKFSTPEVPHAGAPPKKGAGGYSKAAGAMAGAAGSSGAGGS--GGAGSGSP
尼罗DMRT1 -----MSQDKQSKQV----PDCSGP
尼罗DMO -----MENRIRPLGLTDHTSGPLGSLFVPPSLLRPPPLFLQACN
虹鳟DMRT1 -----MSDDEQTK-L----LECAGP
河豚DMRT1 -----MTKEKQSK-----ASAGT
青鳉DMRT1 -----MSKEKQCR-----FVPEGP

奥地利DMO  PTLERG---YPRTPKCARCRNHGVVSALKGHKRFCRWRDCVCAKCTLIAERQVMAAQVA
人DMRT1  SDLGAGSKKSPRLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFCMWRDCQCKKCNLIAERQVMAAQVA
鼠DMRT1  SGLSGSKKSPRLPKCARCRNHGYASPLKGHKRFCMWRDCQCKKCNLIAERQVMAAQVA
尼罗DMRT1  MSPTKA-QKSPRMPKCSRCRNGYVSPKKGHKRFCNWRDCQCKKCLIAERQVMAAQVA
尼罗DMO  PTLERG---YPRTPKCARCRNHGVVSALKGHKRFCRWRDCVCAKCTLIAERQVMAAQVA
虹鳟DMRT1  PSASPG-KKPRMPKCSRCRNGYVSPKKGHKRFCNWRDCQCKKCLIAERQVMAAQVA
河豚DMRT1  VTPSKG-PKPRMPKCSRCRNGYVSPKKGHKRFCNWRDCQCKKCLIVERQVMAAQVA
青鳉DMRT1  VPGP--QRSRMPKCSRCRNGHLSVPLKGHKRFCRWDCAKACRLIAERQVMAAQVA
          ** ** *.***** * ***** * .** * * * * *****

奥地利DMO  LRRQQAQEESEARDLRLLYPCTGIGGEAGIPQSSISAGVFSASSTPAAACFDVFGSEN
人DMRT1  LRRQQAQEE---ELGISHPIPLP-----SAAELLVKRENNGNPNCLMTECSGT
鼠DMRT1  LRRQQAQEE---ELGISHPIPLP-----SAAELLVKRENNASNPCLMAENSSS
尼罗DMRT1  LRRQQAQEE---ELGICSPVSL-----SGSEMVMK--NEVGADCLFVSGE-R
尼罗DMO  LRRQQAQEESEARDLRLLYPCTGIGGEAGIPQSSISAGVFSVSSSPPAAACFDVFGSEN
虹鳟DMRT1  LRRQQAQEE---EMGLCSPATL-----SSQEVVVK--NEPTGDCLSSVSGGR
河豚DMRT1  LRRQQAQEE---ELGICSPVPL-----SGAGMMVK--NEAGAEFFSAG-R
青鳉DMRT1  LRRQQAQEE---ELGICSP-----EAEVVVK--NEAGADCLFMEG-R
          ***** . . . * . * . *

奥地利DMO  QKDVSDEKLSKYNFYNGFMGRPLFAPHSRPLPSPSDKKELSPSKDSGGSSPAMDHRSDH
人DMRT1  SQPP-----PASVPTTAASEGRMVIQDI PAVTSR-GH
鼠DMRT1  AQP-----PASTPTPAASEGRMVIQDI PAVTSR-GH
尼罗DMRT1  SPTP-----TSHATSAVT-GTRSASSPSPSAAAR-AH
尼罗DMO  QKDVSDEKLSKYNFYNGFMGRPLFAPHSRPLPSPSDKKELSPSKDSGGSSPAMDHRSDH
虹鳟DMRT1  SPTCGN-----TSAGTSPSNAGRSGLASSPTAFSRGQS
河豚DMRT1  NQAA-----TSTSSSVVPAASRVTSRPSAGAR-AA
青鳉DMRT1  SGAPAA-----PPNPIPLSAAGSCPASSSSPSAAAR-VY
          * . *

奥地利DMO  TESPQRSLTSSDPESGSESEKPNLYSPDRDPTDIMAKIFPHQERDTLESVMVRTCKG--
人DMRT1  VENTPDLVSDSTYYSS-----FYQPSLFP--YNNLYNCPQYSMALAADSASGEVGN
鼠DMRT1  MENTSDLVSDPAYSS-----FYQPSLFP--YNNLYNYPQYSMALAESSSGEVGN
尼罗DMRT1  TEGPSDLLLETYYN-----FYQPSRYP-TYYGNLYNYSQY-QMPHGDR-----
尼罗DMO  TESPQRSLPSSDPESGSESEKPNLYSPDRDPTDIMAKIFPHLKRDTLESVMVRTCKG--
虹鳟DMRT1  TDGTADLLVDTSYN-----FYQPSRYPTAYYSNLYKYQY-QMPNGESR-----
河豚DMRT1  NDGQSDLLLESSFYN-----LYQPSYCP-AYYGNLYNYQYQYQMPHGDR-----
青鳉DMRT1  GEEASDLLLETSYN-----FYQPSRYS-SYYGNLYNYQYQYQMPPSDGR-----
          * . .

奥地利DMO -----DIVKS-----IELALNSKENKIDADSARRPSAGLPGLGA
人DMRT1  PLGGSPVKNSLRGLPGPYVPGQTGNQWQMKNMENRHAMSSQYRMHSYPPSYLQGSVPQ
鼠DMRT1  SLGGSPVKNSLRSLPAPYVPAQTGNQWQMKTSERHPVSSQYRMHSYGGPPSYLQGSMSQ
尼罗DMRT1 -----LPS-----HSVSSQYRMHSYYPAAATY/LQGLGS
尼罗DMO -----DIVRS-----IELALNSKENKIDADSARRPSAGLPGLGA
虹鳟DMRT1 -----LSS-----HNVSQYRMHSYYSASYLSQLGQ
河豚DMRT1 -----LQN-----HNVSQYCVHSYCSGGPYLSQGLSS
青鳉DMRT1 -----LSG-----HSMPSQYRMHSFYPGTAYLQGLGS
          * . *

奥地利DMO  LG-----AKSAFSPHLHIPASPGGDSLYGLSSRLGVSPRLRAYPSANGGMA
人DMRT1 -----FFT FEDAP-----SYPEARAS
鼠DMRT1 -----IFT FECP-----SYSEAKAS
尼罗DMRT1 -----TSCVPPFFSLDNN-----NSCSETMAA
尼罗DMO  LG-----AKSAFSPHLHIPASPGGDSLYGLSSRLGVSPRLRAYPSANGGMA
虹鳟DMRT1  GLGQGLGQVLGQGLGQGLGHGLGQGLGTTAACVPPMFSLEDNT-----CHDTKQT

```

```

河豚DMRT1 -----STCVPPIFSVEDNNSNN-----NSCPQTLAT
青鳉DMRT1 -----VPPPYFSLLEDND-----

奥利亚DMO GFMSPYMTSGLMPVFLRPPLDLSYSLPGMIRDLSYIQSKESLCNAGLYTRLNSETK
人DMRT1   VFSPSSQDSGLVSLSSSSPISNKST-KAVLECEPAS-EPSSFTVTPIVEEDE---
鼠DMRT1   VFSPSSQDSGLVSLSSSSPMSNESS-KGVLECEASSEPSSYAVNVQVLEDEDE-
尼罗DMRT1 SFSPGSI SAGHDS TMVCRS ISSLVNG-DAKAECEASS-QAAGFTVDAIEGGATK--
尼罗DMO   GFMSPYMTSGT DASVPTASTLDSYSLPGMIRDLSYIQSKESLCNAGLYTRLNSETK
虹鳉DMRT1 SFSPVSGGANGHDGLSCLSISSLVNSSEGKTECDGQD-QGQGFVTDSTIEGNHK--
河豚DMRT1 AFSPSSPSTGPDSSMTCRPISTMVTS-DLHPECEATG-ETANFTISSIMDGDAGN-
青鳉DMRT1 AFPPSSLTSTHDSLTGGRSISSPVNV-GVKAEFESGG-QPPVFPADSMSSETK---

```

图 3 奥利亚罗非鱼 DMO 与其它动物的 DMO, DMRT1 氨基酸序列比较

Fig. 3 Alignment of DMO and DMRT1 amino acid sequences

相同或相似氨基酸用*、·表示, - 表示此位置缺失氨基酸各物种 DMO, DMRT1 的 Genbank 号分别为: 奥利亚罗非鱼的 DMO (AY487938), 人的 DMRT1 (AF130728), 鼠的 DMRT1 (AF202778), 尼罗罗非鱼的 DMO (AF203489), 尼罗罗非鱼的 DMRT1 (AF203490), 虹鳉的 DMRT1 (AF209095), 红鳍东方豚的 DMRT1 (AJ295039), 青鳉的 DMRT1 (AB091696)

Comparison of DM proteins from *Oreochromis aurea*, human, rat, *Oreochromis niloticus*, rainbow trout, fugu, medaka. Identical and similar amino acid residues are marked by asterisks and dots respectively. The GenBank accession numbers of the sequence used in the figure were as follows: AY487938 (*Oreochromis aurea* DMO), AF130728 (human DMRT1), AF202778 (rat DMRT1), AF203489 (*Oreochromis niloticus* DMO), AF203490 (*Oreochromis niloticus* DMRT1), AF209095 (rainbow trout DMRT1), AJ295039 (fugu DMRT1), AB091696 (medaka DMRT1)

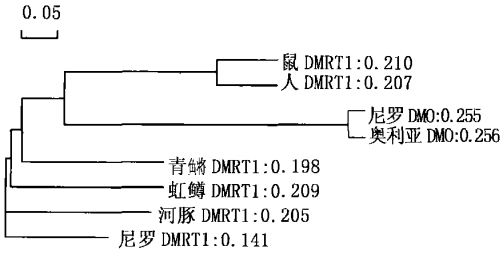


图 4 DMO 和 DMRT1 蛋白质的系统树

Fig. 4 A neighbor-joining tree

based on the DMO and DMRT proteins

3 讨论

3.1 DMO 和 DMRT1 基因的区别

DM-domain 基因在果蝇, 线虫, 脊椎动物以及鱼类上是高度保守的。用 RACE 法分离的奥利亚罗非鱼 DMO 与尼罗罗非鱼的 DMO 相比较, 两者编码的氨基酸同源性高达 96.3%。而与其它鱼类以及鼠和人之间 DMRT1 的同源性则较低, 均为 20% 左右, 除了 DM-domain 相似外, 5' 和 3' 端差异较大。这与 Guan 等^[6] 在尼罗罗非鱼中发现 DMRT1 和 DMO 的同源性较低一致。Guan 等^[6] 还在 XX 型的精巢检测到了 DMRT1 基因的表达, 而 DMO 基因则不表达。这一现象说明, DMO 和

DMRT1 是性别决定的下游基因, DMRT1 基因不是 Y 染色体连锁基因。在对奥利亚罗非鱼 DMO 的研究中, 我们也发现根据 DMO 基因合成的特异引物在雌鱼和雄鱼的 DNA 中扩增到相同的条带, 另外我们在奥利亚罗非鱼中精巢中也克隆出了 DMRT1 的 3' RACE 系列, 除了 DM-domain 相似外, 3' 端差异较大, 这说明 DMO 和 DMRT1 可能是两个不同的基因。有关 DMO 基因在不同组织中的表达, 以及与性激素的关系等, 还有待于进一步研究。

3.2 RACE 法分离全长 cDNA 的优势和关键因素

从 cDNA 文库中分离和克隆目的基因的经典方法繁琐而且代价大。并经常出现 PCR 扩增效率低和特异性差的问题, 不易得到完整的全长序列(包括 5' 和 3' 非翻译区), 特别是在基因的 5' 端。RACE 法技术的出现解决了这些难题, 它可以从低丰度的转录模板中快速扩增 cDNA 的 5' 和 3' 末端, 是一种简便而且有效的方法。通过本实验体会到, 要想获得实验成功, 一定要设计合适的引物, 退火温度不宜太低, 控制在 55~60℃。在 3' RACE 中, 通过 Nested PCR 取得了满意的效果。

参考文献:

- [1] Nanda I, Shan Z, Schartl M, *et al.* 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9 [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(3): 258–259.
- [2] Flejter W L, Fengstad J, Gorski I, *et al.* A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779[J]. *Hum Genet*, 1998, 63: 794–802.
- [3] Kondo M, Froeschauer A, Kitano A, *et al.* A molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(18): 2390–2392.
- [4] Sakamoto T, Danzmann R G, Gharbi K, *et al.* A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2001, 92: 108–110.
- [5] Matsuda M, Nagahama Y, Sato T, *et al.* DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature* 2002, 30: 559–563.
- [6] Guan G J, Tohru Kobayashi, Yoshitaka Nagahama. Sexually dimorphic expression of types of DM (Doublesex/Mab-3) domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [R]. *Biochemical and Biophysical Research in Communications*, 2002, 72: 662–666.
- [7] 陈受宜, 朱立煌(译). PCR 聚合酶链式反应[M]. 北京: 科学出版社, 1994. 25–35.
- [8] 俞菊华, 吴婷婷, 杨弘, 等. RACE 法分离团头鲂生长抑素全长 cDNA 及其序列测定[J]. *水产学报*, 2003, 27(6): 533–539.

【书评】汇集海水鱼类养殖精粹 力推现代养殖产业波澜

由雷霖教授主编的《海水鱼类养殖理论与技术》一书, 已由中国农业出版社出版发行了, 这是我国海水养殖界值得庆祝的一件大喜事。

我国是世界上唯一水产养殖产量超过捕捞产量的国家, 海水养殖业的地位日显重要; 特别在改革开放大潮的推动下, 海水鱼类养殖获得了前所未有的发展良机。近 20 年来, 在广大科技工作者的不懈努力下, 使许多国家优良品种的产业化技术连续获得重大突破; 同时还从国外引进了多个优良品种, 迅速建立起全新的良种养殖模式和新产业。目前, 我国以鱼类养殖为主体的“第四次海水养殖浪潮”波澜壮阔, 受到全球的广泛关注。

在当前海水鱼类养殖产业迅猛发展的大好形势下, 学术界与产业界迫切企盼有一部理论联系实际的海水鱼类养殖专著问世。雷霖教授等 70 多位专家, 以发展我国海水鱼类养殖科技产业为己任, 顺应时代潮流, 在中国农业出版社的大力支持下, 肩负起撰写《海水鱼类养殖理论与技术》的重任, 满腔热情地为满足产、学、研各界朋友的期望而倾注巨大心血。在 5 年的撰写和统稿过程中, 作者们努力克服困难, 不断汲取新信息、开创新论点、追踪新技术, 终于铸就这部宏篇巨著, 奉献给“海洋世纪”和热心从事海水鱼类养殖的广大读者。他们高度的责任心十分难能可贵。

中国水产科学研究院黄海水产研究所的雷霖教授是我国著名海水鱼类养殖学家, 数十年如一日, 全身心地投入海水鱼类养殖理论与技术研究, 先后对 20 多种经济鱼类的育苗和养殖进行了系统、深入的探索, 取得了丰硕的科研成果, 为我国海水鱼类养殖科研和产业的发展做出了重大贡献。由他主持完成的这部《海水鱼类养殖理论与技术》, 是他和多学科的知名专家密切合作和辛勤耕耘的成果。全书共分四篇、47 章, 约 150 万字, 丰富的内容涵盖了海水鱼类养殖的主要理论和技术, 其中:

第一篇 概论: 全面深入论述了我国海水鱼类养殖历史、现状和未来。

第二篇 海水鱼类养殖理论: 分 7 章, 包括海水鱼类养殖生物学基础、繁殖原理、摄食特性、营养物质消化与吸收、营养需求与代谢和能量学研究等基础理论。

第三篇 海水鱼类养殖应用技术与设施: 分 9 章, 包括海水鱼类遗传育种、诱导与催产、病害防治、微藻和动物饵料培养、配合饲料研制、工厂化养鱼工程设施、工业化养鱼水质处理、网箱养鱼等技术与设施。

第四篇 海水鱼类养殖技术各论: 共分 30 章, 论述了 30 种中外名优海水经济鱼类的养殖技术, 包括: 传统的养殖品种, 如鲢、鳙、遮目鱼等; 目前正在大量进行商业化养殖的经济种, 如真鲷、牙鲆、红鳍东方、许氏平鲷、花鲈、大黄鱼、赤点石斑鱼、军曹鱼、杜氏、卵形鲳、花尾胡椒鲷和紫红笛鲷等; 从国外引进的优质良种, 如大菱鲆、美国红鱼、条纹狼鲈等; 还有极具发展潜力的半滑舌鲷和石鲈等国内新开发品种, 以及新近从国外引进的大西洋庸鲽、大西洋牙鲆、塞内加尔鲷、欧洲鲷、斑点海鲷等许多名贵鱼种。

读者可以看出: 该书贯穿了“求新、求全、创新、务实和理论联系实际”的中心思想; 汇集了我国沿海数十年来的科研成果和技术精髓; 大量吸纳了国际上的先进理论和技术基础; 推出了构建未来海水鱼类养殖大产业的理念。全书内容丰富、图文并茂、结构合理、层次清晰、学术观点新颖, 是一部反映时代特征的海水鱼类养殖科技专著, 也是一部具有较高学术价值和使用意义的世纪佳作。它的出版, 将为我国新世纪海水鱼类养殖产业的发展推波助澜, 亦将对科研和教学起到良好的促进作用。

中国工程院院士 张福绥