

文章编号:1000-0615(2007)02-0129-08

奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因的时空表达特征分析

曹谨玲¹, 俞菊华², 曹哲民², 李建琳², 吴婷婷²

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种
和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要:采用荧光定量 RT-PCR 方法对奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因的时空表达进行了研究。结果发现,这两个基因均从原肠胚早期开始转录,一直到出膜,都维持着较高的表达水平,但 *DMO* 表达量明显高于 *DMT*。从鱼苗孵化出膜的第 1 天开始,随着日龄的增加,*DMO* 和 *DMT* 基因的表达量均增加,但 *DMO* 在性腺和脑中都能表达,而 *DMT* 则仅在精巢中专一性表达。鱼苗性腺分化时期,也可影响 *DMO* 和 *DMT* 基因的表达量,提示它们可能与激素调控有关。在雌、雄鱼的肝和肾等 5 种组织中均检测不到这两个基因转录本的存在;在脑中仅可检测到 *DMO* 基因不同强弱的转录本,呈现出很强的中枢神经系统的表达特异性。此外,在成体的卵巢和精巢中分别只可检测到 *DMO* 和 *DMT* 基因的大量表达,显示二者在性别决定和分化中的重要功能。奥利亚罗非鱼 *DMO* 基因在其中枢神经系统发育及卵巢发生和功能维持上有着重要功能;*DMT* 基因在精巢发生和功能维持上起重要作用。

关键词:奥利亚罗非鱼;*DMO*;*DMT*;时空表达;荧光定量

中图分类号:Q 786; S 917.4

文献标识码:A

Temporal and spatial expression of *DMO* and *DMT* gene in *Oreochromis aurea*

CAO Jin-ling¹, YU Ju-hua², CAO Zhe-min², LI Jian-lin, WU Ting-ting²

(1. Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fishery Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: The *DMRT* genes constitute a new gene family related to sex determination. Like the double-sex gene of *Drosophila melanogaster* and the mab-3 gene of *Caenorhabditis elegans*, they encode transcription factors characterized by a conserved zinc-finger like DNA-binding motif, the *DM* domain, which is thought to bind DNA in the process of sex differentiation and development. In 1998, *DMRT1* genes were first identified and found containing *DM* domain in *Homo sapiens* and *Mus musculus*. And *DMRT1* was found to regulate sex determination and differentiation in vertebrates extensively. So far, the *DMRT* genes have been discovered in a wide range of animal species, such as fish, amphibian, reptiles, birds, and mammals.

收稿日期:2006-09-19

资助项目:国家“八六三”高新技术发展计划(2004AA243060);国家“九七三”计划(2004CB117401);国家“十五”重点科技攻关计划(2004BA526B0110)

作者简介:曹谨玲(1979-),女,山西太谷人,博士研究生,主要从事鱼类生物技术研究。Tel:13861704252, E-mail:caojinling7928@163.com

通讯作者:吴婷婷, Tel:0510-85554552, E-mail:wutt@ffrc.cn

These evidently reveal the evolutionary conservation of *DMRT* gene family. *Tilapia* is the most important breeding fish throughout the world. As to *Oreochromis aurea*, sex is an important economic character, for the male is bigger than the female. So to clarify the mechanism of *Oreochromis aurea* sex determination will be of great importance in both theory and application. With the hope of doing further research on the function of *DMRT* genes and clarifying the molecular mechanism of *Oreochromis aurea*, Real-time Quantitative RT-PCR was used in this research to analyze the temporal and spatial expression patterns on the basis of *DMO* and *DMT* gene sequences obtained. Their transcripts appeared from early gastrulae stage during embryonic development, and maintained a considerable high level till the one day's fry, but level of *DMO* was higher than that of *DMT*. With the increase of age, the levels of *DMO* discovered in ovary and brain and *DMT* only observed in testis both improve. During sex differentiation, after treatment with hormone for 30 days, level of *DMO* in estrogen group is significantly higher than that in control group ($P < 0.05$), while level of *DMO* in Hydroxyandrostenedione group, aromatase I and aromatase II are remarkably lower than those in control group ($P < 0.05$); levels of *DMO* in all test groups are similar and lower than those in control group, but there are no significant differences among them ($P > 0.05$); level of *DMT* in estrogen group is significantly lower than that in control group ($P < 0.05$), while levels of *DMT* in Hydroxyandrostenedione group and aromatase II group are higher than those in control group and level in aromatase I is lower, but the differences are insignificant ($P > 0.05$); *DMT* can not be detected in brain in all test groups. These results indicate that treatment with hormone can change level of *DMO* and *DMT* during sex differentiation, implicating that they could be related with hormone regulation. Moreover, treatment with hormone can evidently improve the male or female ratio of *Oreochromis aurea*. No *DMO* and *DMT* transcripts were found in liver, kidney, spleen, heart and muscle, but unequal amount of *DMO* transcripts can be detected in brains tissues of mature female and male *Oreochromis aurea* and the level of *DMO* in female is remarkably higher than that in male, which suggests that *DMO* expression is specific in central nervous system (CNS). In addition, we also found the abundant transcripts of *DMO* in ovary and *DMT* in testis. This supports that the *DMO* and *DMT* genes play important roles not only on the sex determination, but also on the development processes of early embryogenesis. Based on these results, it suggests that *DMO* should play a key role in CNS and ovary development of *Oreochromis aurea* and *DMT* in testis.

Key words: *Oreochromis aurea*; *DMO*; *DMT*; temporal and spatial expression; real-time quantitative RT-PCR

DMRT (doublesex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是一个与性别决定相关的基因家族。该家族成员与果蝇的性别决定基因 double-sex (dsx) 和线虫性别决定基因 (mab-3) 一样, 所编码的蛋白质都含有一个 DNA 结合能力的保守基序, 即 DM (double-sex 和 mab-3) 结构域^[1], 并以锌指结构与特异 DNA 序列相结合, 在性别决定和分化发育中起调控作用^[2]。目前已在哺乳类^[3-8]、鱼类^[9-14]、鸟类^[2,3,5]、爬行类^[3,5,15]、及两栖类^[16] 中检测到 DM 盒基因的存在, 充分表明该基因在脊椎动物进化中的高度保守性。

迄今, 在人类及其它动物中已克隆的 *DMRT*

基因家族成员约有 10 个^[2], 而对其功能的研究则主要集中在 *DMRT1* ~ 4, 其中 *DMRT1* 广泛参与了脊椎动物的雄性性别决定与分化过程^[3,9,12,16-20]; *DMRT2*、*DMRT4* 可能参与精子发生^[14]; *DMRT2*、*DMRT3*、*DMRT4* 参与器官的发育与功能维持^[8,14,21]。鉴于 *DMRT* 基因在性别决定及发育中的重要作用, 进一步对其参与调控的分子机制进行研究有重要意义。

罗非鱼是原产于非洲的热带鱼类, 现已成为世界性的主要养殖鱼类。罗非鱼雄性比雌性生长快 40% ~ 50%, 因此若能在罗非鱼养殖上获得全雄的群体, 将会提高生长速度或控制生态环境^[22], 并大大提高经济效益。所以, 研究罗非鱼

性别决定的机制在理论和应用上都具有重要的意义。奥利亚罗非鱼为 ZW 型性别决定,其性别决定的分子机制尚未得到阐明。本试验在已获得的奥利亚罗非鱼 *DMO* (*DM-domain gene in ovary*)^[23] 和 *DMT* (*DM-domain gene in testis*) 基因序列的基础上,通过实时荧光定量 RT-PCR 技术,研究了奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因的时空表达,以期揭示奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因表达的时、空特异性,进而为人为控制奥利亚罗非鱼性别提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

试验分组及标本收集 奥利亚罗非鱼受精卵、仔鱼和成年雌、雄奥利亚罗非鱼来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心生物技术室试验鱼场。胚胎:分别在高囊期,原肠胚前、中、后期,心跳期和出膜后取样,每期取样 30 粒;仔鱼:选用遗传背景相同、批次相同、发育正常的 1 日龄奥利亚罗非鱼 500 尾,随机分为 5 个组(对照组,雌激素组,雄激素组,芳香化酶 I 组,芳香化酶 II 组),每

组饲料中激素添加量均为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在 15、30 d 仔鱼期分别取脑和性腺,每期取样 10 尾,用荧光定量 RT-PCR 方法进行 *DMO*、*DMT* mRNA 表达水平分析。继续饲养 1 周,每组取 50 尾鱼苗进行奥利亚罗非鱼鱼苗群体性比测定^[24];成鱼:取雌、雄奥利亚罗非鱼各 3 尾,迅速采集端脑、下丘脑、垂体、性腺、肝脏、心脏、脾脏、肾脏、肌肉。各样品立即放入液氮保存备用。

主要试剂和仪器 Trizol Reagent、DNase 及 One Step SYBR[®] (RT-PCR Kit (Takara, 日本);DU-600 紫外分光光度计 (BECKMAN, 美国);MiniOpticon 实时荧光定量 PCR 仪 (MJ Research, 美国)。

引物设计与合成 根据奥利亚罗非鱼 *DMO* (Accession No: AY487938)、*DMT* (Accession No: DQ185027) 和尼罗罗非鱼 β -actin (Accession No: AY116536) 的 cDNA 序列,按照标准荧光定量 PCR 引物原则设计 PCR 引物,并由上海申能博采生物技术有限公司合成。引物的序列及参数见表 1。

表 1 *DMO* 和 *DMT* 目的基因及 β -actin 内标基因的引物序列参数
Tab.1 Parameters of primer pairs for *DMO*, *DMT* and β -actin gene

| 目的基因 product | 引物位置 gene | 引物序列 localization | 产物 (bp) primer sequence |
|-----------------|--------------|--|----------------------------|
| <i>DMO</i> | 424 - 444 | Forward 5'- CGCGCAGGTGGCTTTGAGGAG -3' | 292 |
| | 715 - 695 | Reverse 5'- AGAGGGCAGCCGTGGGGAATG -3' | |
| <i>DMT</i> | 650 - 669 | Forward 5'- CCACAGCGTGTCTCTCAGT -3' | 151 |
| | 800 - 781 | Reverse 5'- GAAGGAGGCTGCCATGGTC -3' | |
| β -actin | 1297 - 1320 | Forward 5'- AGGGCGCTGGTTGTAACGATAGTA -3' | 220 |
| | 1516 - 1496 | Reverse 5'- TGCCGCACATTCCGAGTAAGC -3' | |

1.2 总 RNA 提取和纯度鉴定

用 Trizol Reagent 提取组织样的总 RNA, DNase I 酶解可能残余的基因组 DNA, RNA 溶于 DEPC 水, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取 RNA 的完整性。紫外分光光度法测定 RNA 样品的浓度和纯度。调整各组织样品总 RNA 浓度至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 并在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 实时荧光定量 RT-PCR

20 μL 反应体积中含有 $2 \times$ One Step SYBR RT-PCR Buffer 10.0 μL , Takara Ex Tag HS ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , M-MLV RTase (RNase H free) ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , RNase Inhibitor ($40 \text{ U} \cdot$

μL^{-1}) 0.4 μL , PCR Forward Primer ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , PCR Reverse Primer ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.4 μL , Total RNA 2.0 μL , RNase Free dH_2O 6.2 μL 。反应条件为: 反转录 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, 1 个循环; PCR $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min, 45 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 7 min; 在 $65 \sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$ 做融解曲线, 最后降温至 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。电脑监视器在线显示, 实时监控 PCR 全过程。所有样品检测试验均包含 1 个无模板的阴性对照以排除假阳性结果。

1.4 标准曲线的制备

把获得的 1 管 RNA 进行系列稀释作为实时

荧光定量 RT-PCR 扩增模板,被用于制备 *DMO*、*DMT* 和 β -*actin* 的相对标准曲线。系列稀释的 RNA 模板标准量为 50、20、10、5、2、1、0.5 ng, 试验中各个标准均做 3 个重复,另有 3 个无模板的阴性对照。所有计算采用每个标准 3 个复孔所得的平均循环数值(Ct),且 3 个复孔的 Ct 值之间差异小于 1 个循环。从中绘制出模板标准量的对数与 Δ Ct 的关系图以证明靶基因 *DMO*、*DMT* 和内源控制物 β -*actin* 的扩增效率基本相同。一旦证实所有的 PCR 反应有基本一致的扩增效率,就可以用比较 Ct 法的相对定量策略,而无需每次 PCR 时做相对定量的标准曲线。

1.5 相对 mRNA 表达水平的计算

结果计算采用 Livak 等的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行^[25],并用不同饲料组 *DMO*、*DMT* 在性腺和脑的相对表达量作图。

1.6 统计学方法

实验数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示,用 SPSS12.0 统计软

件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),以 Duncan 方法进行多重比较。

2 结果

2.1 RNA 纯度和完整性分析

提取总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,28S、18S、5S 条带清晰可见,且 28S 比 18S 带亮度大 2~3 倍,带与带之间无明显脱尾现象,表明 RNA 无降解,无明显的 DNA 污染。经分光光度计检测, RNA 样品 A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8~2.0 之间,说明 RNA 未被蛋白质、酚污染。样品总 RNA 浓度为 $0.5 \sim 3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 奥利亚罗非鱼鱼苗群体性比测定

性比测定前,测量每尾鱼苗的体长,测得每尾鱼的体长均在 2.0~2.5 cm 之间,符合性比测定要求。不同饲料组奥利亚罗非鱼鱼苗群体性比测定结果(表 2)表明,在饲料中添加 $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的激素,可显著提高奥利亚罗非鱼的雌、雄比率。

表 2 奥利亚罗非鱼鱼苗群体性比测定结果

Tab.2 Male(female) percentage of fry in different groups

| 组别 group | 雌性(尾) female | 雄性(尾) male | 雌性率(%) female percentage | 雄性率(%) male percentage |
|---|-----------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| 对照组 control | 27 | 23 | 54 | 46 |
| 雌激素组 17 β -estrodinol | 46 | 4 | 92 | 8 |
| 雄激素组 11 β -hydroxyandrostenedione | 3 | 47 | 6 | 94 |
| 芳香化酶 I 组 aromatase I | 2 | 48 | 4 | 96 |
| 芳香化酶 II 组 aromatase II | 3 | 47 | 6 | 94 |

2.3 不同饲料组仔鱼 *DMO* 的相对表达量

不同饲料组仔鱼性腺 *DMO* 的相对表达量分别饲喂 15、30 d 后,所有被检仔鱼的性腺均可检测到 *DMO* 基因的转录本。以对照组 *DMO* mRNA 的相对表达量为 1,确定不同饲料组性腺 *DMO* 的表达高低。每组性腺 *DMO* mRNA 的相对表达量如表 3 所示。统计学分析结果表明:饲喂 15 d 后,雌激素组 *DMO* mRNA 表达量高于对照组,差异显著($P < 0.05$);其他 3 组 *DMO* mRNA 表达量均低于对照组,但只有芳香化酶 I 组差异显著($P < 0.05$)。饲喂 30 d 后,雌激素组 *DMO* mRNA 表达量高于对照组,差异显著($P < 0.05$);

雄激素组、芳香化酶 I 组和芳香化酶 II 组 mRNA 表达量均显著低于对照组($P < 0.05$),而三者之间的 *DMO* mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

不同饲料组仔鱼脑 *DMO* 的相对表达量分别饲喂 15、30 d 后,所有被检仔鱼脑部均可检测到 *DMO* 基因的转录本,以对照组 *DMO* mRNA 的相对表达量为 1,确定不同饲料组脑 *DMO* 的表达高低。脑 *DMO* mRNA 的相对表达量如表 3 所示。统计学分析结果表明:分别饲喂 15、30 d 后,所有试验组 *DMO* mRNA 丰度相似,均低于对照组,但差异不显著($P > 0.05$)。

表 3 不同饲料组仔鱼性腺和脑中 *DMO* 相对表达量
Tab.3 Relative quantification of *DMO* in gonad and brain

| 组别 group | <i>DMO</i> mRNA 相对表达量 relative quantification of <i>DMO</i> in gonad and brain | | | |
|---------------------------------|--|--------------|--------------|--------------|
| | 性腺 gonad | | 脑 brain | |
| | 15 d | 30 d | 15 d | 30 d |
| 对照组 control | 1.00 ± 0.16bc | 1.00 ± 0.15b | 1.00 ± 0.26a | 1.00 ± 0.08a |
| 雌激素组 17β-estrodinol | 1.10 ± 0.10a | 1.11 ± 0.11a | 0.97 ± 0.16a | 0.93 ± 0.14a |
| 雄激素组 11β-hydroxyandrostenedione | 0.92 ± 0.15cd | 0.77 ± 0.08c | 0.88 ± 0.13a | 0.95 ± 0.07a |
| 芳香化酶 I 组 aromatase I | 0.86 ± 0.16d | 0.81 ± 0.15c | 0.95 ± 0.16a | 0.97 ± 0.14a |
| 芳香化酶 II 组 aromatase II | 0.90 ± 0.27cd | 0.83 ± 0.14c | 0.97 ± 0.17a | 0.96 ± 0.15a |

注: 同列数据不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: values with different letters within the same column indicate significantly different ($P < 0.05$)

2.4 不同饲料组仔鱼 *DMT* 的相对表达量

不同饲料组仔鱼性腺 *DMT* 的相对表达量分别饲喂 15、30 d 后, 对照组、雌激素组、雄激素组、芳香化酶 I 组和芳香化酶 II 组分别有 5、5、9、8、9 尾的性腺可检测到 *DMT* 基因的转录本。以对照组 *DMT* mRNA 的相对表达量为 1, 确定不同饲料组性腺 *DMT* 的表达高低。不同饲料组的性腺 *DMT* mRNA 的相对表达量如表 4。统计学分析结果表明: 饲喂 15 d 后, 雌激素组 *DMT* mRNA

表达量低于对照组, 差异显著 ($P < 0.05$); 其他 3 组 *DMT* mRNA 丰度相似, 均高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。饲喂 30 d 后, 雌激素组 *DMT* mRNA 表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 雄激素组和芳香化酶 II 组 *DMT* mRNA 表达量高于对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 芳香化酶 I 组 *DMT* mRNA 表达量低于对照组, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 不同饲料组仔鱼性腺 *DMT* 的相对表达量
Tab.4 Relative quantification of *DMT* in gonad

| 组别 group | <i>DMT</i> mRNA 相对表达量 relative quantification of <i>DMT</i> in gonad | |
|---------------------------------|--|--------------|
| | 性腺 gonad | |
| | 15 d | 30 d |
| 对照组 control | 1.00 ± 0.16a | 1.00 ± 0.26a |
| 雌激素组 17β-estrodinol | 0.91 ± 0.10b | 0.84 ± 0.16b |
| 雄激素组 11β-hydroxyandrostenedione | 1.01 ± 0.15a | 1.02 ± 0.13a |
| 芳香化酶 I 组 aromatase I | 1.02 ± 0.16a | 0.97 ± 0.16a |
| 芳香化酶 II 组 aromatase II | 1.04 ± 0.27a | 1.05 ± 0.17a |

注: 同列数据不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: values with different letters within the same column indicate significantly different ($P < 0.05$)

不同饲料组仔鱼性腺脑 *DMT* 的相对表达量分别饲喂 15、30 d 后, 用荧光定量 RT-PCR 检测仔鱼脑部 *DMT* mRNA 的相对表达量, 结果发现 *DMT* 在脑中不表达。

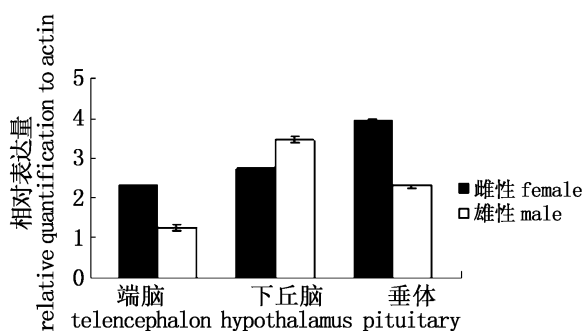
2.5 *DMO* 和 *DMT* mRNA 的时空表达

以奥利亚罗非鱼原肠胚前期 *DMO* mRNA 的相对表达量为 1, 确定 *DMO*、*DMT* 基因在不同时间、不同组织的表达高低。由表 5 可以看出, 奥利亚罗非鱼的 *DMO*、*DMT* 基因均从原肠胚前期开始转录, 一直到 1 d 鱼苗, 都可检测到转录本, 但 *DMO* mRNA 表达水平明显高于 *DMT*。从 1 d 鱼

苗开始, 随着日龄的增加, *DMO* 和 *DMT* 基因的表达量均增加, 但 *DMO* 在性腺和脑中都能表达, 而 *DMT* 则仅在精巢中专一性表达。同样利用荧光定量 RT-PCR 检测成鱼 *DMO*、*DMT* 基因的组织表达谱, 发现 *DMT* 基因仅在奥利亚罗非鱼的精巢中表达, 而 *DMO* 除在卵巢中大量表达外, 在雌、雄鱼的端脑、下丘脑和垂体中均可检测到不同强度的转录本, 呈现出很强的中枢神经系统的特异性。对 3 尾雌、雄鱼 *DMO* 在脑部相对表达量的总和进行 *t* 检验, 结果表明: 雌性 mRNA 表达水平显著高于雄性 ($P < 0.05$) (图 1)。

表 5 *DMO* 和 *DMT* 基因在奥利亚罗非鱼发育阶段的相对表达量Tab. 5 Relative quantification of *DMO* and *DMT* in developmental *Oreochromis aurea*

| 日龄 days | <i>DMO</i> | <i>DMT</i> |
|-------------------------------|----------------|---------------|
| 高囊期 high-blastoderm stage | 0 | 0 |
| 原肠前期 early gastrulae stage | 1.000 ± 0.047 | 0.028 ± 0.08 |
| 原肠中期 medium gastrulae stage | 1.148 ± 0.140 | 0.029 ± 0.09 |
| 原肠后期 terminal gastrulae stage | 1.181 ± 0.021 | 0.031 ± 0.08 |
| 心跳期 palpitation stage | 1.625 ± 0.090 | 0.065 ± 0.12 |
| 出膜后 1 d 鱼苗 one day's fry | 2.250 ± 0.041 | 0.091 ± 0.072 |
| 15 d (gonad) | 2.639 ± 0.156 | 0.168 ± 0.06 |
| 15 d (brain) | 2.694 ± 0.262 | — |
| 30 d (gonad) | 3.204 ± 0.154 | 0.187 ± 0.06 |
| 30 d (brain) | 2.770 ± 0.079 | — |
| 雌鱼卵巢 ovary | 44.017 ± 0.096 | — |
| 雄鱼精巢 testis | — | 3.605 ± 0.086 |
| 雌鱼垂体 female's pituitary | 3.918 ± 0.058 | — |
| 雄鱼垂体 male's pituitary | 2.282 ± 0.051 | — |
| 雌鱼下丘脑 female's hypothalamus | 2.751 ± 0.015 | — |
| 雄鱼下丘脑 male's hypothalamus | 3.458 ± 0.089 | — |
| 雌鱼端脑 female's telencephalon | 2.282 ± 0.032 | — |
| 雄鱼端脑 male's telencephalon | 1.248 ± 0.070 | — |

图 1 *DMO* 在奥利亚罗非鱼雌、雄鱼脑中的相对表达量Fig. 1 Relative expression levels of *DMO* in male and female *Oreochromis aurea* brain

3 讨论

3.1 激素对奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* mRNA 表达水平的影响

DMRT 基因家族是一个与性别决定相关的基因家族,该基因在结构上的高度保守性提示其在性别分化中的重要作用。Guan 等^[9]发现 *DMO* 基因在尼罗罗非鱼 XX 雌性卵巢中专一性表达,而在 XX 雄性和 XY 雄性中均不表达。而本研究发现,*DMO* 基因在所有激素处理的仔奥利亚罗非鱼性腺和脑中均可检测转录本。*DMO* 基因在两种罗非鱼表达的差异可能是由于奥利亚罗非鱼

(ZZ/ZW) 与尼罗罗非鱼 (XX/XY) 染色体组型差异造成的。同时,用激素诱导其产生单性的全雌或全雄的个体中,遗传雄性的个体转变为生理雌性的个体时,*DMO* 基因的表达量上调,但是在遗传雌性的个体转变为生理雄性的个体时,*DMO* 基因的表达量下调,这表明 *DMO* 基因可能是激素直接作用的下游基因。

DMRT1 是 *DMRT* 基因家族中的一员,在雄性性腺分化和形成方面起着关键的作用。Shibata 等^[16]发现 *DMRT1* 在蛙 (*Rana ragosa*) 性腺中的表达是雄性特异的,而在雌性卵巢无表达。另外,*DMRT1* 的表达在 XX 性逆转性腺大大提高,表明 *DMRT1* 可能在两栖类雄性发育中有重要作用。*DMRT1* 在尼罗罗非鱼成体精巢特异性表达;用雄激素处理遗传上 XX 幼鱼使其发生性逆转,发现性腺中也有 *DMRT1* 表达^[9]。虹鳟 *DMRT1* 的表达也是雄性特异的,在雌激素处理的全雌群体中,*DMRT1* 的表达在 10 d 以后大量减少^[12]。本研究中,荧光定量 RT-PCR 结果表明,*DMT* 在精巢的分化过程中高表达,而在卵巢的分化过程中则没有。用激素诱导其产生单性的全雌或全雄的个体中,遗传雄性的个体转变为生理雌性的个体时,*DMT* 基因的表达量下调,但是在遗传雌性的个体转变为生理雄性的个体时,*DMT* 基因的表达量并没有上调,这表明 *DMT* 基因并不是激素直接作用

的下游基因, *DMT* 在此性别发育的调控机制中可能还处于更上游的位置。

3.2 奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因表达的特异性 *DMRT* 基因家族是一个以 *DMRT* 基因为代表的基因家族, 该家族成员可能参与了广泛的发育调控过程。该家族涉及发育调控过程已得到许多证明, 如 *DMRT1* 基因广泛参与了脊椎动物的性别决定和分化发育过程, 在性别决定关键时期, 即在胚胎发育过程的生殖嵴的分化中, 人类、小鼠、龟的 *DMRT1* 基因的表达模式都是一致的, 其在正在分化中的睾丸中的表达量远高于其在卵巢中的表达量。本研究中, 荧光定量 RT-PCR 结果表明, 奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因均在原肠胚早期开始表达, 成鱼卵巢中只有 *DMO* 基因大量表达, 而精巢中只有 *DMT* 基因大量表达, 说明奥利亚罗非鱼 *DMO* 和 *DMT* 基因在成体中分别具有雌、雄性表达上调的特性。

在奥利亚罗非鱼的成体中, *DMO* 基因在卵巢、雌、雄鱼的脑组织中均有不同程度的表达, 而在其他组织中则无表达, 显示该基因具有一定的组织表达特异性, 这进一步证实了该基因与性别发育相关。因为性别的发育不仅在性腺中表达该基因激活性别发育事件, 而且性别的发育成熟还受下丘脑-垂体-性腺发育轴的控制。其表达模式与尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[9]、青鳉 (*Oryzias latipes*)^[4] 和河豚 (*Takifugu rubripes*)^[26] 等不同。在尼罗罗非鱼中, *DMO* 仅在卵巢专一性地表达。在青鳉, *DMRT4* (相当于 *DMO*) 除了在成体的精巢和卵巢中表达外, 还在两性的脑有微量表达和在眼睛、鳃和肾脏中高水平表达。在河豚, *DMRT4* (相当于 *DMO*) 在两性的性腺和脾脏中表达, 暗示其与免疫系统有关。而这些组织表达差异并不因所使用的方法不同而改变。很明显, *DMO* 的表达在不同的物种之间有很大差异, 据此推断 *DMO* 在不同物种中所起的作用不同。

DMT 基因仅在成体睾丸中表达, 表明其可能参与了精子的形成过程; 而在其他组织中无表达, 说明 *DMT* 在器官的发育及功能维持上不具有直接的作用, 这与 Guan 等^[9]、Shibata 等^[16] 和 Marchand 等^[12] 研究的结果, *DMRT1* 仅在成体精巢中专一表达相一致。

通过对奥利亚罗非鱼 *DMO*、*DMT* 基因的时序表达研究, 证实奥利亚罗非鱼 *DMO* 基因在其中

枢神经系统发育及卵巢发生和功能维持上有着重要作用; *DMT* 基因在精巢发生和功能维持上起重要作用。进一步研究并阐明这两个基因在奥利亚罗非鱼性腺分化中的作用机理, 将为人工控制性别提供有力的技术支撑。

参考文献:

- [1] Koopman P, Loffler K. Sex determination: the fishy tale of *DMRT1* [J]. *Current Biology*, 2003, 13 (5): 177.
- [2] Ren L L, Cheng H H, Guo Y Q, et al. Evolutionary conservation of *DMRT* gene family in amphibians reptiles and birds [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46 (23): 1992-1996.
- [3] Smith C A, McCLive P J, Western P S, et al. Conservation of a sex-determining gene [J]. *Nature*, 1999, 402 (6762): 601-602.
- [4] 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.
- [5] Raymond C S, Kettlewell J R, Hirsch B, et al. Expression of *DMRT1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development [J]. *Developmental Biology*, 1999, 215 (2): 208-220.
- [6] Grandi A D, Calvari V, Bertini V, et al. The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation [J]. *Mechanics of Development*, 2000, 90 (2): 323-326.
- [7] Moniot B, Berta P, Scherer G, et al. Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination [J]. *Mechanics of Development*, 2000, 91 (1-2): 323-325.
- [8] Kim S, Kettlewell J R, Anderson R C, et al. Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad [J]. *Gene Express Patterns*, 2003, 3 (1): 77-82.
- [9] Guan G J, Kobayashi T, Nagahama Y. Sexually dimorphic expression of types of *DM* (doublesex-mab-3)-domain genes in a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2000, 272 (3): 662-666.
- [10] Nanda L, Kondo M, Hornung U, et al. A dupli-

- cated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes* [J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (18): 11778 - 11783.
- [11] Koopman P, Loffler K A. Sex determination: the fishy tale of *DMRT1* [J]. *Current Biology*, 2003, 13 (5): 177 - 179.
- [12] Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, et al. *DMRT1* expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Biochemical Biophysics Acta*, 2000, 1493 (1 - 2): 180 - 187.
- [13] Ohmuro-Matsuyama Y, Matsuda M, Kobayashi T, et al. Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Zoological Science*, 2003, 20 (12): 1395 - 1398.
- [14] Kondo M, Froschauer A, Kitano A, et al. A molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Gene*, 2002, 295 (2): 213 - 222.
- [15] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *DMRT1* prior to sexual differentiation [J]. *Genetics*, 2000, 26 (3): 174 - 178.
- [16] Shibata K, Takase M, Nakamura M. The *DMRT1* expression in sex-reversed gonads of amphibians [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2002, 127(3): 232 - 241.
- [17] 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.
- [18] Ellegren H. Hens, cocks and avian sex determination: a quest for genes on Z or W [J]. *EMBO Reports*, 2001, 2 (3): 192 - 196.
- [19] Torres-Maldonado L C, Landa P A, Moreno M N, et al. Expression profiles of *DAX1*, *DMRT1*, and *SOX9* during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* [J]. *General & Comparative Endocrinology*, 2002, 129 (1): 20 - 26.
- [20] Sreenivasulu K, Ganesh S, Raman R. Evolutionarily conserved, *DMRT1*, encodes alternatively spliced transcripts and shows dimorphic expression during gonadal differentiation in the lizard, *Calotes versicolor* [J]. *Gene Expression Patterns*, 2002, 2 (1 - 2): 51 - 60.
- [21] Smith C A, Hurley T M. Restricted expression of *DMRT3* in chicken and mouse embryos [J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 119: 73 - 76.
- [22] 童金苟, 朱嘉濠, 关海山. 鱼类性别决定的遗传基础研究概况 [J]. *水产学报*, 2003, 27(2): 169 - 176.
- [23] 唐永凯, 俞菊华, 夏德全, 等. 奥利亚罗非鱼 *DMO* cDNA 的分离和克隆 [J]. *水产学报*, 2005, 29 (3): 300 - 306.
- [24] 赖秋明. 罗非鱼鱼苗群体性比测定方法研究 [J]. *淡水渔业*, 1999, 29 (3): 12 - 13.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Method*, 2001, 25: 402 - 408.
- [26] 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 and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2006, 1 (1): 59 - 68.