

文章编号:1000-0615(2009)03-0379-10

## 奥利亚罗非鱼 *AMH* 基因结构及其表达

唐永凯, 李建林, 俞菊华

(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:**抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone, AMH), 也称缪勒氏管抑制物质(mullerian inhibiting substance, MIS), 为肽类生长因子, 属于 TGF- $\beta$  生长和分化因子家族。应用 RT-PCR 和 RACE 法, 从奥利亚罗非鱼精巢组织中分离出 *AMH* 的 cDNA。分离到 3'UTR 长为 621 bp 和 168 bp 的两条 cDNA, 除了长度不一, 两者之间只存在两个碱基的差别。5'UTR 为 27 bp, 阅读框为 1 545 bp, 翻译成 514 个氨基酸, 其中, AMH-N 域 237 个氨基酸, TGF- $\beta$  域 93 个氨基酸。同源性分析显示, AMH 保守性偏低, 奥利亚罗非鱼与其它鱼类的相似性为 32% ~ 60%, 与哺乳类动物只有 19% ~ 21%, 而 TGF- $\beta$  域的保守性相对较高, 与其它鱼类的相似性为 54% ~ 72%。基因结构分析显示, 奥利亚罗非鱼 *AMH* 存在 6 个内含子, 和斑马鱼 *AMH* 结构相似, 和人、鼠 *AMH* 有较大差别, 它们缺少奥利亚罗非鱼和斑马鱼 *AMH* 基因共有的内含子 I 和 VI。然而, 启动子转录因子分析结果表明, 奥利亚罗非鱼 *AMH* 启动子中也存在 *SRY*, *SF-1*, *GATA-4*, *Sox5*, *Sox9* 等结合位点。使用 Taqman 探针分析奥利亚罗非鱼 *AMH* 在成鱼不同组织中的表达以及鱼苗、鱼种、成鱼性腺中的表达量, 结果显示 *AMH* 在成鱼的卵巢、精巢中均有表达, 而在脑、肝、肌肉以及心脏中不表达。*AMH* 在鱼苗性腺中不表达, 在鱼种、成鱼中雄鱼 *AMH* 表达量显著高于雌鱼, 而鱼种雄鱼 *AMH* 表达量是成鱼雄鱼的 10 倍。

**关键词:**奥利亚罗非鱼; 抗缪勒氏管激素; 快速扩增 cDNA 末端; 内含子; 启动子; Taqman 探针  
**中图分类号:**Q 786; S 917 **文献标识码:**A

抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone, AMH), 也称缪勒氏管抑制物(mullerian inhibiting substance, MIS), 为糖蛋白, 属于 TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 细胞因子家族<sup>[1]</sup>。研究表明 *AMH* 既在精巢也在卵巢中表达<sup>[2-3]</sup>。雄性, *AMH* 由滋养细胞产生直到在青春期被睾丸酮抑制<sup>[4]</sup>。雌性, *AMH* 由粒细胞产生, 特别是那些排列在卵巢腔周围的粒细胞<sup>[5]</sup>。在哺乳动物中, Y 染色体上的 *SRY* 基因启动胚胎精巢发育, 诱导滋养细胞前体表达 *Sox9* 基因<sup>[6-7]</sup>, *Sox9* 在其他转录因子, 包括 *SF-1*, *Wt1* 和 *GATA-4* 等的协同下, 刺激睾丸细管中的滋养细胞表达 *AMH*<sup>[8-10]</sup>, 诱导缪勒氏管退化, 并使个体向雄性方向发展, 缪勒氏管在雌性分化为输卵管、子宫以及阴道的上

半部分<sup>[11]</sup>; *AMH* 也通过抑制 cAMP 和 FSH 的作用, 影响胚胎精巢表达 *Cyp19a1*, 而 *Cyp19a1* 编码 P450 芳香化酶催化雄激素为雌激素<sup>[12]</sup>。相比哺乳动物, 其他脊椎动物性腺分化的分子遗传调节机制还没研究透彻。鱼类中只有在辐鳍亚纲, 如鲟鱼, 有缪勒氏管并且在雄性也不退化<sup>[13]</sup>。在硬骨鱼类则不存在缪勒氏管<sup>[14]</sup>, 但最近在 4 种硬骨鱼类, 日本鳗 (*Anguilla japonica*)、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)、大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 中分离到了编码与 *AMH* 高度同源的蛋白的基因, 被定名为精子发生抑制物。

罗非鱼 (*tilapia*) 属于鲈形目 (Perciformes)、丽鱼科 (Cichlidae), 罗非鱼属。由于它食性杂, 生长快, 耐低氧, 抗病力强, 现已成为世界性的养殖

收稿日期:2008-07-15

修回日期:2009-01-17

资助项目:江苏省自然科学基金 (BK2006029); 基本科研业务费专项资金 (2007JBFC03)

通讯作者:俞菊华, E-mail: yujh@ffrc.cn

鱼类。但在养殖过程中出现雌雄生长差异明显,雄鱼生长快,个体大,雌鱼则生长慢、个体小,这就常常导致出池规格相差悬殊,从而降低了鱼产品的产量和质量,因此开展罗非鱼性别决定机制研究,探索罗非鱼全雄育种技术,对于罗非鱼养殖产业的发展具有重要意义和应用价值。有关 *AMH* 在罗非鱼性别分化和性腺发育中的研究还属空白,本研究分离、克隆出罗非鱼 *AMH* 基因,分析该基因的结构及其组织表达,为今后研究该基因和其他性别相关基因 *Sox9*, *SF-1*, *P450arom*, *Dax1* 等的调控关系奠定基础。这一方面可以丰富和完善 *AMH* 在鱼类性别分化和精巢发育中的作用认识,另外也可探讨其在罗非鱼雄性化生产中的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验鱼** 奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 鱼苗 (约 2.5 cm)、鱼种 (约 12 g)、成鱼 (约 500 g) 均取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心实验场。

**试剂** Trizol Reagent 购自 Promega; *AMV*、*RnaseH*、*TdT* 酶、*Taq* 酶、3'RACE 试剂盒、LA PCR<sup>TM</sup> *in vitro* cloning kit、限制性内切酶、pMD18-T 载体、Perfect real time PCR 等购自宝生

物工程(大连)有限公司;胶回收试剂盒,连接酶购自上海生工;大肠杆菌 JM109 为本实验室保存。

**仪器** PCR 仪为 eppendorf Mastercycler personal, real time PCR 为 BIO-RA<sup>D</sup> 的 MJ Mini 型。

**引物** 用于实验的所有引物见表 1, 碱基位置以序列 5' 端第一个碱基为“1”计算 (GenBank accession number: DQ257618)。P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> 是根据已知鱼类 *AMH* 的保守序列, 使用 CodeHop 软件设计的兼并引物; P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> 是 3'RACE 的特异引物; P<sub>6</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub> 是 5'RACE 的特异引物。P<sub>9</sub> ~ P<sub>14</sub> 是扩增 *AMH* 的内含子引物; P<sub>15</sub>, P<sub>16</sub> 是扩增 *AMH* 启动子的引物。P<sub>17</sub>, P<sub>18</sub>, P<sub>19</sub> 是根据奥利亚罗非鱼 *AMH* 第五内含子的位置设计的 real time PCR 引物; P<sub>20</sub>, P<sub>21</sub>, P<sub>22</sub> 根据莫桑比克罗非鱼  $\beta$ -actin 序列 (GenBank accession number: AB037865) 设计的用于奥利亚罗非鱼  $\beta$ -actin 的 real time PCR 引物。其中 P<sub>17</sub>, P<sub>21</sub> 跨越内含子, P<sub>19</sub>, P<sub>22</sub> 为 Taqman 探针, Taqman 探针 5' 端用 FAM 标计, 3' 端用 BHQ1 标计。除 Taqman 探针由 Takara 合成外, 其它引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 其中  $W = (A/T)$ 、 $S = (C/g)$ 、 $Y = (C/T)$ 、 $N = (A/C/g/T)$ 。

表 1 实验中使用的引物  
Tab.1 Primers used in experiment

引物 primers	序列 sequence	位置(nt) position	
degenerate primers	1. 5' - CTGYTSAAGGCCTGCAGACG -3'	1192 ~ 1212	
	2. 5' - GTAGCGSASGGGCACGCAGCA -3'	1482 ~ 1462	
	3. 5' - TGCAGCCTCACACACAGWCWGNTG -3'	515 ~ 539	
3'RACE-PCR	4. 5' - GCCCAAGCAGCGCAAACAT -3'	1337 ~ 1355	
	5. 5' - CTGACCAACGGCAACAACCA -3'	1387 ~ 1402	
5'RACE-PCR	6. 5' - TCTCGTATCAGTTCCTCCGTTT -3'	744 ~ 725	
PCR for introns cloning	7. 5' - GTGGACTCGTGCTGATGTTACT -3'	685 ~ 706	
	8. 5' - GCCGTAATCTGCCACCTGTCAT -3'	620 ~ 599	
	9. 5' - GCGCAGACACTGCAAACATG -3'	11 ~ 30	
	10. 5' - CGTATCAGTTCCTCCGTTCCCT -3'	741 ~ 722	
	11. 5' - GGGGAACGGGAAGTACTGATACG -3'	722 ~ 74	
	12. 5' - AGCAGCTCTAGCGGCATCCA -3'	1579 ~ 1560	
	13. 5' - CTGACCAACGGCAACAACCA -3'	1387 ~ 1402	
	14. 5' - GTGCTTGTGTCCCATTTGCTG -3'	2116 ~ 2095	
	PCR for 5 flanking region	15. 5' - TGCTGTTTGTTCAGTTCGCCGCTGICCCCA -3'	253 ~ 224
		16. 5' - TGATGGGGTCTTCGCTGATGGGAGTGAGTA -3'	141 ~ 112
real time PCR for <i>AMH</i>	17. 5' - GGAACGGGAAGTACTGATACGAGATGT -3'	724 ~ 747	
	18. 5' - AGCAGGGTCTCGCTGGAGGA -3'	917 ~ 898	
	19. 5' - ACTCCTTACAGTCTCTGCTCCCT -3'	860 ~ 883	
real time PCR for $\beta$ -actin	20. 5' - GGAAATCGTGGGTGACATCAAAGA -3'	698 ~ 722	
	21. 5' - GGATTCGCGCAGGATCCATACCAA -3'	904 ~ 880	
	22. 5' - GCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCT -3'	763 ~ 788	

## 1.2 方法

**总 RNA 的提取** 取奥利亚罗非鱼成鱼精巢,用 Trizol Reagent 提取总 RNA(用于分离奥利亚罗非鱼 AMH 基因),用变性琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色显示 28S 和 18S,检测 RNA 的完整性。为了检测 AMH 在各组织中的表达,提取雌雄成鱼的脑、肝、心、肌肉、性腺的 RNA。为了检测 AMH 在鱼苗、鱼种以及成鱼性腺中的表达量,提取 3 个不同发育期性腺的 RNA,每发育期取 6 尾鱼,雌雄各 3 尾。由于鱼苗较小,显微镜镜检辨别雌雄后,每 3 尾同性别的鱼苗为一组,雌雄各 3 组。

**保守片段的分离** 取 5  $\mu\text{g}$  从精巢中提取的总 RNA,以 oligodT-AP[5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)<sub>16</sub>-3']为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,然后用 10% RT 液,使用引物 P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub> 扩增 AMH 1 000 bp 左右的保守序列,巢式 PCR(P<sub>1</sub> 和 P<sub>3</sub>) 验证引物 P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> 扩增产物。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ,其中含模板 2  $\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Buffer, 2  $\mu\text{mol/L}$  MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu\text{mol/L}$  dNTP, 引物各 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.125 U Taq 酶。反应条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 然后 30 次循环 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 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶,使用胶回收试剂盒回收,用 pMD18-T 载体连接,克隆,酶切鉴定,测序。根据这些序列设计特异的 3'RACE 和 5'RACE 引物,扩增 AMH 的 3'和 5'端序列。

**3'RACE 方法** 用 5  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 oligodT-AP 为引物进行 RT 反应,然后用 10% 的 RT 液,以 AP[5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'] 和 3'RACE 特异引物 P<sub>4</sub> 进行 PCR,反应体系同“保守片段的分离”,退火温度为 56  $^{\circ}\text{C}$ 。为增加扩增效率及扩增的特异性,把上述 PCR 扩增液稀释 10 倍,取 2  $\mu\text{L}$  作模板,用引物 AP 和 3'RACE 第 2 个特异引物 P<sub>5</sub> 进行再扩增,退火温度为 58  $^{\circ}\text{C}$ ,扩增液用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,测序。

**5'RACE 方法** 用 5  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 P<sub>6</sub> 为引物,根据 AMV 使用说明进行 RT 反应,然后加 RnaseH 分解 mRNA,用胶回收试剂盒回收 cDNA,再用 TdT 酶在 cDNA 3'端加 poly(A),用胶回收试剂盒回收加 poly(A) 尾的 cDNA。以此

为模板,用 P<sub>7</sub> 及 oligodT-AP 为引物,进行 PCR。PCR 扩增液稀释 10 倍,取 2  $\mu\text{L}$  为模板,用 P<sub>7</sub> 及 AP 引物,进行巢式 PCR,PCR 液用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收,克隆,测序。

**Real time PCR** 用 5  $\mu\text{g}$  总 RNA,以 oligodT-AP 和 random primer(Takara)为混合引物进行 RT 反应。以此 cDNA 为模板,按其比例稀释成不同浓度,找出 real time PCR 的最佳浓度。以此浓度的 cDNA 为模板进行 real time PCR,确定 AMH 在奥利亚罗非鱼各组织以及不同发育期中的表达情况。

**内含子和启动子的分离** 以奥利亚罗非鱼血液 DNA 为模板,以配对引物 P<sub>9</sub>, P<sub>10</sub>; P<sub>11</sub>, P<sub>12</sub>; P<sub>13</sub>, P<sub>14</sub> 依次克隆 AMH 内含子系列。用限制酶(Sau3A I, EcoR I, Hind III, Pst I, Xba)将奥利亚罗非鱼血液 DNA 完全酶切,回收产物与具有对应的限制酶切位点的 Cassette(Takara LA PCR<sup>TM</sup> in vitro cloning kit)进行连接反应。然后用 Cassette primer C<sub>1</sub>(Takara)和设计的引物 P<sub>18</sub>进行第一次 PCR 反应,以此反应液为模板,用 Cassette primer C<sub>2</sub>(Takara)和 P<sub>19</sub>进行第二次 PCR 反应,特异性的扩增 AMH 启动子。

**测序和序列分析** PCR 产物克隆到 PMD18-T 载体后,送上海捷瑞生物工程有限公司测序。用 Dnastar, clustalw 分析奥利亚罗非鱼 AMH 序列。

**数据的处理** 试验数据采用 SPSS 统计软件中的 ANOVA 方差分析和 Duncan 氏多重比较分析。

## 2 结果

### 2.1 奥利亚罗非鱼 AMH 的分离

取奥利亚罗非鱼精巢的 RNA,进行 RT-PCR,用引物 P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub> 扩增得到 1 000 bp 左右的条带(图 1-1),经克隆后测序,得到 967 bp 片段。根据所得序列设计合成用于 3'RACE 引物 P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>。使用 RT 液用引物 P<sub>4</sub>, AP 扩增,然后,使用该 PCR 扩增液稀释液作模板,用引物 P<sub>5</sub>, AP 扩增,得到 400 bp, 800 bp 左右的两条条带。克隆后测序得到 354 bp, 807 bp 的两条条带(图 1-2),经比对分析发现 807 bp 片段包含 354 bp 片段,而且只有两个碱基不同。按照 5'RACE 实验程序,最后使用引物 P<sub>8</sub>, AP 扩增获得 600 bp 左右条带(图 1-3),

克隆测序后获得奥利亚罗非鱼 *AMH* 5'端序列 620 bp。

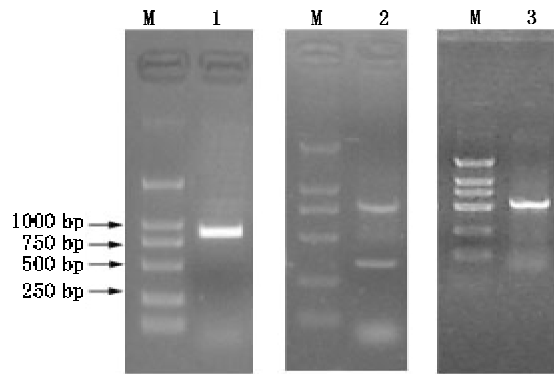


图1 PCR 扩增产物图

M: Marker DL2000; 1: 引物  $P_2, P_3$  扩增条带; 2: 3'RACE 引物  $P_5, AP$  扩增条带; 3: 5'RACE 引物  $P_6, AP$  扩增条带

Fig.1 The results of PCR amplification

M: Marekr DL2000; 1: product of amplification with primer2 and primer3; 2: product of amplification with 3'RACE primer5 and AP; 3: product of amplification with 5'RACE primer7 and AP

## 2.2 序列拼接与分析

使用 DNASTar 软件把上述序列拼接,得到奥利亚罗非鱼 *AMH* 两个全序列 (GenBank accession number: DQ257619, DQ257618), 它们的差别在于 3'UTR。全长为 2 193bp (DQ257619) 的 cDNA 含有 621 bp 3'UTR, 全长为 1 740 bp (DQ257618.1) 的 cDNA 包含 168 bp 3'UTR。621 bp 3'UTR 包含 168 bp 3'UTR, 它们之间只存在两个碱基的差别。两 cDNA 均含 27 bp 的 5'UTR, 1 545 bp 的 5'UTR 阅读框, 翻译成含有 TGF- $\beta$  和 AMH-N 域的 514 个氨基酸。预测的蛋白质分子量为 54.5 ku, 理论等电点 (pI) 为 5.23, 含疏水氨基酸 188 个, 极性氨基酸 157 个, 酸性氨基酸 50 个, 碱性氨基酸 36 个。而且 621 bp 3'UTR 中存在 3 个 poly(A) 加尾信号 (AATAA), 分别位于 1834 ~ 1838; 1898 ~ 1902; 2172 ~ 2176, 但 168 bp 3'UTR 却不存在 poly(A) 加尾信号。

摘录 GenBank 中已登录的一些动物的 AMH 氨基酸序列: 日本鳎 (GenBank accession number: BAB93107), 牙鲆 (GenBank accession number: AB166791), 斑马鱼 (GenBank accession number:

NP\_001007780), 大西洋鲑 (GenBank accession number: AAU85130), 人 (*Homo sapiens*, GenBank accession number: AAC25614), 鼠 (*Mus musculus*, GenBank accession number: NP\_031471)。使用 clustalw 软件对奥利亚罗非鱼 AMH 氨基酸序列和上述动物的 AMH 氨基酸序列进行比对。结果显示, 奥利亚罗非鱼 AMH 的保守性较低, 与牙鲆、大西洋鲑、日本鳎、斑马鱼的相似性分别为 60%, 45%, 36%, 32%; 与人、鼠的相似性更低, 分别为 21%, 19%, 17%。但是, 它们均含有 TGF- $\beta$  和 AMH-N 域 (图 2), 而且 TGF- $\beta$  域的相似性相对较高, 奥利亚罗非鱼与牙鲆、大西洋鲑、日本鳎、斑马鱼的相似性分别为 72%, 63%, 54%, 55%。

根据其它鱼类 *AMH* 内含子的位置设计出扩增奥利亚罗非鱼内含子引物  $P_9 \sim P_{14}$ 。其中引物  $P_9, P_{10}$  扩增出内含子 I、II、III、IV。 $P_{11}, P_{12}$  扩增出内含子 V、VI。 $P_{13}, P_{14}$  没有扩增出内含子。cDNA 和 DNA 的序列比对显示奥利亚罗非鱼 *AMH* 含有 6 个内含子 (图 3)。从 GenBank 中搜索已标出内含子位置的其它动物 *AMH* 序列, 与奥利亚罗非鱼 *AMH* 序列进行比较分析, 发现奥利亚罗非鱼和斑马鱼 *AMH* 基因结构相似, 但和人、鼠之间有较大的区别, 它们缺少奥利亚罗非鱼和斑马鱼 *AMH* 基因共有的内含子 I 和 VI (图 2)。

## 2.3 奥利亚罗非鱼 *AMH* 启动子的分离

使用基因步移法扩增出奥利亚罗非鱼 *AMH* 启动子, 提交到 GenBank (GenBank accession number: EU219911)。根据脊椎动物启动子特性以及 TFsearch 软件分析 *AMH* 转录因子结合位点, 发现启动子区域不存在 TATA 框, 但存在 9 个 SRY (sex-determining region Y gene product), 3 个 Sox5 (SRY-related HMG-box 5), 2 个 GATA-1 (GATA-binding factor 1), 2 个 STATX (signal transducer and activator of transcription), 1 个 GATA (GATA-binding factor), 1 个 GATA-4 (GATA-binding factor), 1 个 SF-1 (steroidogenic factor-1), 1 个 Sox9 (SRY-related HMG-box 9), 1 个 CCAAT-box (CCAAT/enhancer binding protein) 结合位点 (图 4)。

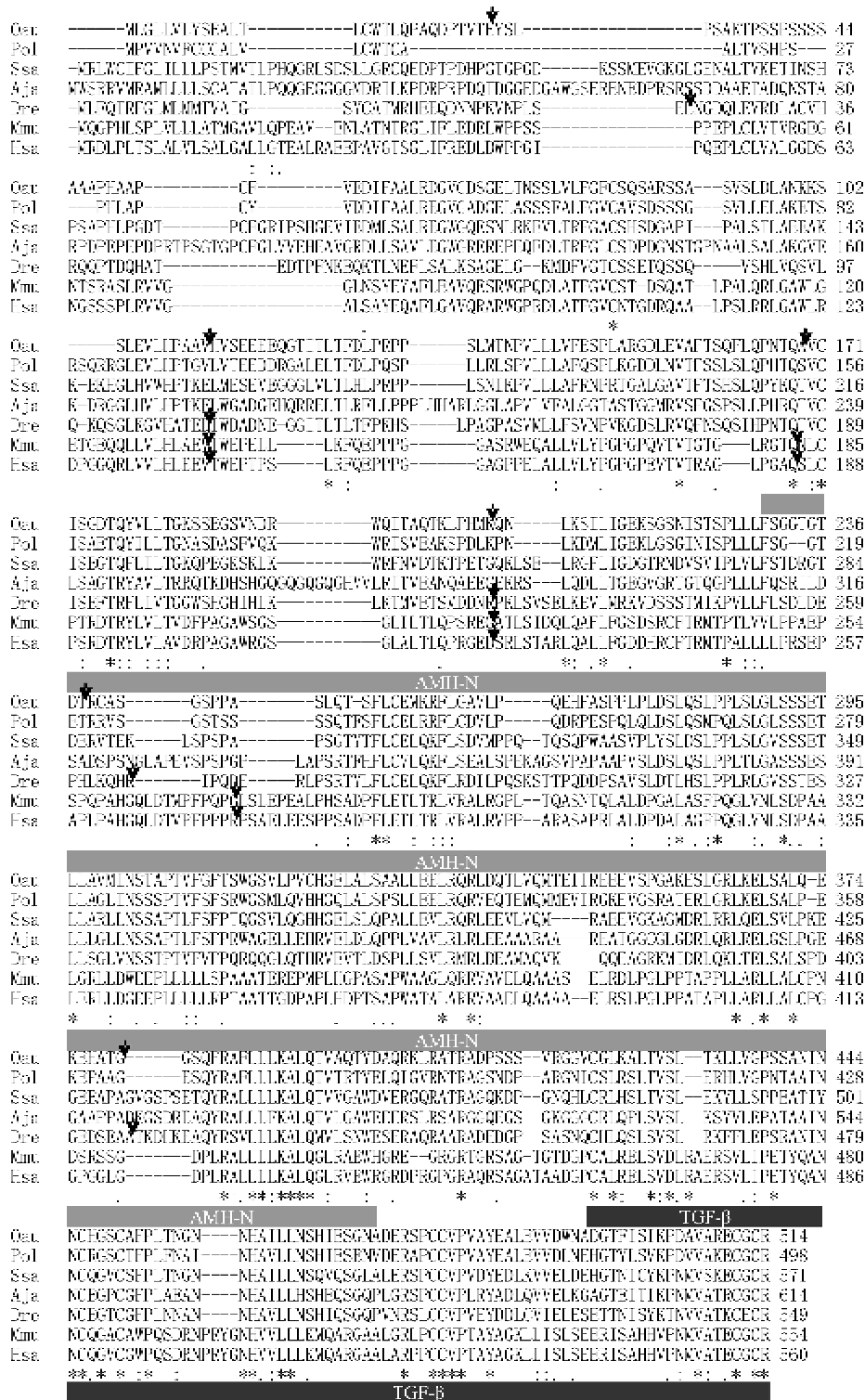


图 2 奥利亚罗非鱼与其它脊椎动物 AMH 氨基酸序列的比较

相同和相似氨基酸分别以星号和点表示,箭头表示内含子插入区。AMH 的 C 末端域 TGF-β 用黑条表示,N 末端 AMH-N 域用灰条表示。8 个保守的半胱氨酸位点用加粗字体表示。Oau:奥利亚罗非鱼;Pol:牙鲆;Ssa:大西洋鲑;Aja:日本鳗;Dre:斑马鱼;Mmu:鼠;Hsa:人

Fig. 2 Protein alignment of *O. aureus* AMH with other vertebrate

Identical and similar amino acids were marked by arrowheads. The TGF-β domain at the C-terminus (TGF-β in black under bar) and the AMH-N domain (AMH-N in grey under bar) that characterized this family were labeled. Each of the eight positions with conserved cysteines was shown in bold. Oau, *O. aureus*; Pol, *P. olivaceus* (Japanese flounder); Ssa, *S. salar* (Atlantic salmon); Aja, *A. japonica* (Japanese eel); Dre, *D. rerio* (zebrafish); Mmu, *M. musculus* (mouse); Hsa, *H. sapiens* (human)

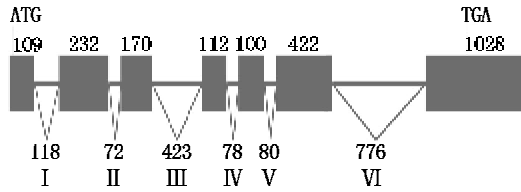


图3 奥利亚罗非鱼 *AMH* 基因结构图

内含子,外显子的相对位置以图表示。图的上部分为外显子碱基数,下面为内含子碱基数,外显子以方框表示,内含子以水平线表示。罗马数字为内含子顺序

Fig. 3 Genomic structure of the *Oreochromis aureus* *AMH* gene

Exon sizes in base pairs were indicated above the scheme and intron lengths were denoted below. Exons were depicted as boxes, introns were indicated as a horizontal line. The sequence of intron was shown in roman numerals

## 2.4 *AMH* 的表达

Taqman 探针法检测奥利亚罗非鱼 *AMH* 在

成鱼卵巢和精巢中均有表达,而在雌雄鱼的脑,肝,肌肉,心脏中未表达,这与我们常规 PCR 得到的结果也一致。即以奥利亚罗非鱼 DNA 为模板, $P_{17}$ , $P_{18}$ 在雌雄鱼各组织中未扩增出条带,而在 cDNA 中只有卵巢,精巢中能扩增出 193 bp 的条带,但  $\beta$ -actin 引物在各组织中均能扩增出条带。图 5 为 *AMH* 在雌鱼各组织以及雄鱼精巢中的表达情况。

为了检测 *AMH* 在奥利亚罗非鱼不同发育期的表达量,将鱼苗、鱼种、成鱼的性腺 RNA 均反转录成 cDNA,real time PCR 结果显示 *AMH* 在鱼苗性腺中不表达,只在鱼种和成鱼的性腺中表达。鱼种,成鱼中 *AMH* 的表达量雄鱼显著高于雌鱼,而鱼种阶段雄鱼 *AMH* 的表达量是成鱼雄鱼 *AMH* 表达量的 10 倍(表 2)。

表 2 奥利亚罗非鱼 *AMH* 在不同发育期的相对表达量

Tab. 2 The relative *AMH* expression of *O. aureus* in different development stage

	鱼种卵巢 juvenile ovary	鱼种精巢 juvenile testis	成鱼卵巢 adult fish ovary	成鱼精巢 adult fish testis
相对初始模板量 relatively initial amount of gene level	0.005 ± 0.00093 <sup>c</sup>	12.52 ± 1.16 <sup>a</sup>	0.026 ± 0.0030 <sup>c</sup>	1.28 ± 0.13 <sup>b</sup>
相对表达量 relative amount of gene transcripts	1	2504	5.2	256

注:同行数据不同上标字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Notes: Different superscript letters following data in the same row indicate significant difference( $P < 0.05$ )

## 3 讨论

从奥利亚罗非鱼精巢中分离到 *AMH* 基因的两个 cDNA,通过比对分析发现他们只是 3'UTR 长短不一,长的 3'UTR 包括短的 3'UTR,两者之间只存在两个碱基的差别,可能是 PCR 扩增过程中的错配、克隆过种中的突变或测序中的错误引起的。两 cDNA 含有相同的阅读框,翻译的蛋白质通过同源性分析,它们具有 *AMH* 共有的 C 末端 TGF- $\beta$  域和 N 末端 AMH-N 域,所以分离出的两序列为奥利亚罗非鱼 *AMH* 基因。同时较长序列的 *AMH* 的 3'UTR 存在 3 个 Poly(A) 信号(AATAAA),这可能会产生具有不同 3'末端的前 mRNA,从而会有不同的剪接方式,导致从奥利亚罗非鱼精巢中分离出 *AMH* 的两个 cDNA。

同源性分析显示,*AMH* 保守性偏低,奥利亚

罗非鱼与其它鱼类的相似性最高仅为 59%,而与其它动物只有 19% ~ 21%。基因结构分析显示,奥利亚罗非鱼和斑马鱼 *AMH* 结构相似,但和人、鼠 *AMH* 有较大差别,这进一步说明了 *AMH* 基因的保守性较差,也不宜作系统进化树。启动子转录因子分析结果表明,奥利亚罗非鱼 *AMH* 启动子中不存在 TATA 框,可见它属于非典型的启动子,这和人类血管内皮细胞一氧化氮合成酶基因启动子相类似<sup>[15]</sup>,可能通过其它因子进行转录。但它存在 *SRY*、*Sox5*、*Sox9*、*SF-1*、*GATA* 等转录因子结合位点,而在哺乳类上,*SRY*、*Sox9* 的表达也较 *AMH* 提前<sup>[7,10]</sup>,*SF-1*、*GATA-4* 结合位点在鼠类滋养细胞中影响着 *AMH* 基因启动子的活性<sup>[16]</sup>,至于奥利亚罗非鱼 *AMH* 启动子结合位点的功能还有待进一步实验证明。

CATGTGAATCTTAATATAAGAAAAGTGCAACCTCAACTCTACGTCTCAGTTTTTCCATATA  
 TAATGTAATGTCAAAAAGTCTCAGTCCCATCCTCTACACCCTGTACGCTCACGACTGTG  
 TCACCTCCAACAAGATAACATCATTTTGAAGTCTCAGATGGCACTGCAGTGAATCGGT  
 CGCGGCACTGCAGTGAATCGGTGCATCACTGGAGGGGACGAAGCGGCTTACAGGAGA  
 GAGGTGGCCGGTCTGGTGTCAATGGCGTGAGGACAACAACCTCACCTCAACACTGAC  
 AAGACAAAGGAGATGATAGTGGACACGAAGAAGAAGAGGAGGCCTCACGACCCGG  
 GTTTTATCCGGGGCCTTGAAGTGGAGAGGGTGAGCAGCTTTAGATACCAGGGCGTCTAC  
 ATTTCTGTGGACATCACCTAGACACTGAACACCACACAGCTGGTCAAGAAGGCTCAGG  
 AACGGCTGCATTTCTTGAGGAGGCTGAGGAAATTTGGTATGATCCTCGGCAGGTTCTA  
 CAGCTGCATTTGGAGAGCACACTGACCAGCTGCATCACTGCATGATA CGGCAGCACT  
 ACTGCCATGGACCGCAATCACCTGCAGAGAGTGATAACA ACTGCAGGGAAGATAATCA  
 GGACTCCGCTGCCCTCTCTGCACAGCATCTACCATCGCAGAGTCCAGAGGAGAGCCGC  
 CTTTATCCTCAAAGACCCCAACATCCCAACCGAAGCTGTTACACTTCTGCCCTCG  
 GGGCGGAGGTTTAGAAGTGTGAAATCCAGAACATCCAGACTCAACAATGCCTTCTTCC  
Sox5  
 CCACTGCCATCAGACTCAACAAGCTGACCTATTTTTGAACATTAATAATAAATTTTTGC  
SRY  
 ACATCAGGTCATCCTGCATGTTAAGCCAGCATATTAAGCTATAGCTCTTTTGCACACATC  
SF-1  
 TCTGTTTACACTTCAATAAATTTGTCTCCTTTCTGTCTTATTTATTTGGTCTATTTGTAT  
SRY  
 TTATCTGTTCTATTTCTATTGTAATAATTAACCGGCATCTGTGGTGGACAGCAAAGCAA  
Sox5  
 TAGTTTCACTGCACAGAGAAATGCCTTTTCTTTGGACACATGACAATAAACACTTTG  
SRY  
 AATCTTGAATCAAGAAAATTTCCATCATAAATAAATAAATGTGTAATATTACAGAAAA  
SRY SRY  
 AAACAAATTTCTGGAGCAGATGGTGA AAAAAAACAGGAACTTTTTTGTCACTGAATTG  
SRY Sox5  
 TTAATCACTTTGGTGTAGCATGAACATGTGGCGGAGTTCTTTATTAGCAGGAAAAGCCA  
 TAAAAATTAAGAAAATACAGTTAAAGTCCAAAATTTATGCCATCCTTCAAAGTGAAGCTG  
 GGTGGAGTCAITGCTGGGTGATTTAGCCCTGGGCTGATGTTGGACACCCCGCT  
 TAGAGAAACAGAAAGATGAAAAACAGTGGATGTGGCTGAAGTTCCCTCAAGGCTT  
SRY  
 TCTGCCAGCAGTCTTTAAGAGGGGTCATCAGTCCAAGCAACAAGTAAAGCAGATTT  
 ACCAAAATGCAAGCAGATAGTGTTCCTTTAAAATCGTTTGAGCTTTGTTGTGACGTTG  
GATA-4 Sox9  
 ATGGAAACAAACCTCCAGTTCTACTGTCCCTTTTGGTTAAACCCTCTCAGGCTCAAATTA  
 GATA-I CCAAT-box  
 AGTTTTAGTTACAGGAAAATTTGATATTTGGGGAATAATATCAAAAAAAAAGACTCA  
STATX STATX  
 TAAAAATATGTATGTAGGGTAATCAGGTTGTTAGTTT TAACTCTTGCAAATCGGCAACGC  
SRY  
 CTGCCTCGAGAGGGTTAAGTTAAGCAGCGTGCATATTAGCTCTGCAGCCACGAAACAT  
 TAAACAGCACTCTTCATCTTTCAGCCTGGTGTATTCCATGAAAGGTTTGTGAGAACTT  
 CCTTTCTGGGACCTGTTTGTGTCTGCTAGATAAGGATGTTTCAGTGTGTCCAAAGTCGTC  
GATA  
 TTCTGTTTACCTTAGTGTCCCGTTTGTGTCCGATTTTAGAATGTTCTCCACAAGCAGGT  
SRY  
 TAAAATACCTCAAATACTGACAATCTCAGTCATCAAGGACACACAGTGTGCTATTTTG  
 GCAGAAAAGGGACCCCGGTGGTGAGAAAGGGAGGTCTGAGGATGTAACCTCCATCC  
GATA-I  
 TGTGAGAGATCTGACCACACAAAACGCACGCGCAGACACTGCAAAACATG

图4 奥利亚罗非鱼 AMH 启动子区域序列以及预测的转录因子结合位点

+1 代表转录起始位点; 翻译起始密码子用方框表示罗马数字为内含子顺序

Fig. 4 The promoter sequence and predicted transcription factor binding sites of AMH in *O. aureus*

+1 marked the transcriptional start sites; the first start coden ATG was framed

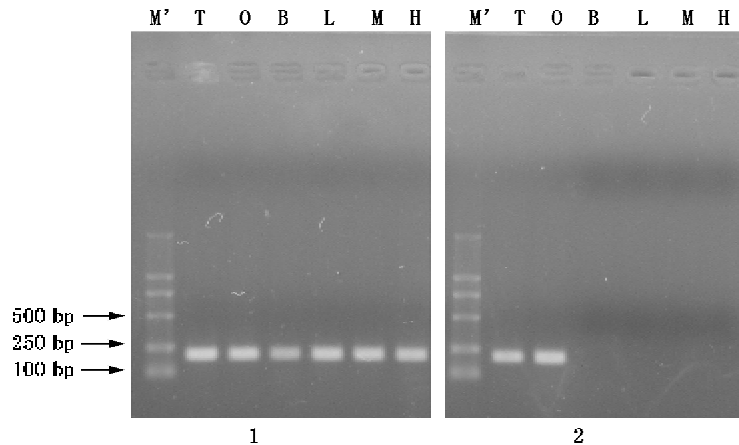


图5 *AMH* 以及  $\beta$ -*actin* 在奥利亚罗非鱼不同组织中的扩增产物

1、2 分别是以 cDNA 为模板的  $\beta$ -*actin*、*AMH* 的扩增产物

M'、T、O、B、L、M、H 分别代表 Marker DL2000、精巢、卵巢、脑、肝、肌肉、心脏

Fig. 5 *AMH* and  $\beta$ -*actin* PCR amplification in different tissues

1, 2 was product of  $\beta$ -*actin* and *AMH* amplification with cDNA as template respectively, M', T, O, B, L, M, H represented Marker DL2000, testis, ovary, brain, liver, muscle and heart respectively

实时定量 PCR 是检测基因表达最灵敏的方法,特别是低丰度的基因,目前在微生物的检测、食品的检测、病原体的检测、药物疗效考核、转基因研究以及基因表达研究等方面有重要的应用价值。本文使用 Taqman 探针法研究了 *AMH* 在奥利亚罗非鱼成鱼雌雄鱼各组织的表达,结果发现 *AMH* 只在精巢,卵巢中表达。在鱼苗、鱼种以及成鱼 3 个不同发育阶段,*AMH* 只在鱼种、成鱼的性腺中表达,而且 *AMH* 的表达量雄鱼显著高于雌鱼,鱼种阶段雄鱼 *AMH* 的表达量是成鱼雄鱼 *AMH* 的表达量的 10 倍。这和 Adriana 等<sup>[17]</sup> 研究斑马鱼 *AMH* 结果相似,在斑马鱼未分化性腺中 *AMH* 就微弱的表达了,在性腺已经分化的斑马鱼幼鱼中 *AMH* 的表达在雌雄鱼不同,受精后 31 d *AMH* 只在精巢中表达,而在成鱼的性腺中均有表达,而且雄鱼的表达量成鱼大于鱼种。但在日本鲷中, $\beta$ -*actin* 只在精巢中表达,而在卵巢中不表达<sup>[18]</sup>。在日本鳗中,*AMH* 在未成熟精巢中就表达了,并阻止精子发生的启动,但有关在卵巢中的表达还未进行研究<sup>[19]</sup>。各研究结果不同原因可能与所研究鱼的种类、发育状态以及检测方法的灵敏度,特异性有关,但一致的是 *AMH* 在精巢发育过程中就开始表达了,这也许可作为性别调控的一个候选基因。而 *AMH* 和 *SF-1*、*Sox9*、*Dax1*、*P450* 芳香化酶等性别相关基因在奥利亚罗非鱼不同发育阶段的关系还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Cate R L, Mattaliano, R J, Hession C, *et al.* Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells[J]. *Cell*, 1986, 45:685-698.
- [2] Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe P K. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications [J]. *Endocrinol Rev*, 2001, 22:657-674.
- [3] Durlinger A L, Visser J A, Themmen A P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone [J]. *Reproduction*, 2002, 124:601-609.
- [4] Rey R, Lordereau-Richard I, Carel J C, *et al.* Anti-Mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77:1220-1226.
- [5] Bezdard J, Viier B, Tran D, *et al.* Immunocytochemical study of anti-Mullerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and postnatal development [J]. *J Reprod Fertil*, 1987, 80:509-516.
- [6] Gubbay J, Collignon J, Koopman P, *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes [J].



- Nature, 1990, 346:245-250.
- [7] Sekido R, Bar I, Narvaez V, *et al.* *Sox9* is up-regulated by the transient expression of *SRY* specifically in Sertoli cell precursors [J]. *Dev Biol*, 2004, 274: 271-279.
- [8] de Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B. Direct interaction of SRY-related protein *Sox9* and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1998, 18:6653-6665.
- [9] Nachtigal M W, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten D L, *et al.* Wilms' tumor 1 and *Dax-1* modulate the orphan nuclear receptor *SF-1* in sex-specific gene expression[J]. *Cell*, 1998, 93:445-454.
- [10] de Santa Barbara, P, Moniot, B, Poulat, F, *et al.* Expression and subcellular localization of *SF-1*, *Sox9*, *WT1*, and AMH proteins during early human testicular development[J]. *Dev Dyn*, 2000, 217: 293-298.
- [11] Lee M M, Donahoe P K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions[J]. *Endocrinol Rev*, 1993, 14:152-164.
- [12] Rouiller-Fabre V, Carmona S, Merhi R A, *et al.* Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats [J]. *Endocrinology*, 1998, 139:1213-1220.
- [13] Wrobel K H. The genus *Acipenser* as a model for vertebrate urogenital development: the Mullerian duct[J]. *Anat Embryol (Berl)*, 2003, 206:255-271.
- [14] Lasala C, Carre-Eusebe D, Picard J Y, *et al.* Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Mullerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species[J]. *DNA Cell Biol*, 2004, 23:572-585.
- [15] 张险峰,陈晶. 人类血管内皮细胞一氧化氮合成酶基因启动子序列的功能分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000,17(1):13-15.
- [16] Watanabe K, Clarke T R, Lane A H, *et al.* Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1624-1629.
- [17] Adriana R M, Yan Y L, Ruth A B, *et al.* Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (*AMH*) relative to *Sox9a*, *Sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development [J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5:655-667.
- [18] Yoshinaga N, Shiraiishi E, Yamamoto T, *et al.* Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 322:508-513.
- [19] Miura T, Miura C, Konda Y, *et al.* Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel[J]. *Development*, 2002, 129:268-2697.

## Characterization and expression pattern of *Oreochromis aureus* anti-Mullerian hormone (AMH)

TANG Yong-kai, LI Jian-lin, YU Ju-hua

(Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Anti-Mullerian hormone (AMH), also known as Mullerian inhibiting substance (MIS), is a peptide growth factor and member of the large TGF- $\beta$  family of growth and differentiation factors. Using RT-PCR and RACE, this paper isolated two *AMH* cDNA from *Oreochromis aureus* which was different in 3' UTR. One was 621 bp, the other was 168 bp. They differed by only 2 bp excluding the different sequence length. The same 5' UTR was 27 bp and the same ORF was 1 545 bp, which encoded 514 amino acids containing the two domains characteristic of the AMH protein family: the TGF- $\beta$  domain 93 amino acids and the AMH-N domain 237 amino acids. Homology analysis showed that AMH shared little conservation. *O. aureus* was more similar to the orthologous regions in other fishes (32% - 60%) than to the corresponding regions of mammalian *AMH* genes (19% - 21%). However, the TGF- $\beta$  domain shared relatively high conservation. The similarity was 54% - 72% between *O. aureus* and other fishes. Comparing the sequence of cDNA to its genome revealed *AMH* gene consisted of six introns, which was similar in zebrafish and different in mouse and human due to the absence of two additional introns (intron I and intron VI). Analysis of *O. aureus* *AMH* promoter showed the presence of several putative transcription factor binding sites: *SRY*, *SF-1*, *GATA-4*, *Sox5*, *Sox9*. Real time RT-PCR (Taqman probe) was used to detect the *AMH* expression in adult fish different tissues including testis, ovary, brain, liver, muscle and heart, and the *AMH* expression level in different development stages including larva, juvenile, adult fish. The results showed that *AMH* was only expressed in ovary and testis. Comparing the *AMH* expression level in the three development stages, we concluded that *AMH* was not expressed in larva, and the amount of gene transcripts was significantly higher in male than in female in juvenile and adult fish, and it was 10 times in male juvenile as in male adult fish.

**Key words:** *Oreochromis aureus*; anti-Mullerian hormone (AMH); RACE; intron; promoter; Taqman probe