

文章编号: 1674-5566(2012)05-0701-08

金鱼 *Dmrt2* 基因表达分析

江山, 陈晓武, 施志仪, 李倩

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用荧光定量 PCR 技术检测了 *Dmrt2* 基因的两个亚型 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在金鱼 (*Carassius auratus*) 不同发育时期以及不同组织中的表达情况, 用 RACE 技术克隆得到金鱼 *Dmrt2a* cDNA 序列的全长为 1 755 bp, 5' 和 3' 非编码区长分别为 188 bp 和 67 bp, 推测的开放阅读框可编码 499 个氨基酸的多肽。分子系统进化分析表明金鱼 *Dmrt2a* 与其它鱼类 *Dmrt2a* 基因聚成一支, 与斑马鱼 (*Danio rerio*)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、罗非鱼 (*Oreochromis Niloticus*) *Dmrt2a* 的同源性分别为 85%、61%、58%、58%。荧光定量 PCR 结果揭示, *Dmrt2a* 在精巢中表达量最高, 在卵巢中次之, 而 *Dmrt2b* 在卵巢中表达量最高, 在精巢中次之, 二者在肾脏、消化道、肝脏、心脏和脑中都有表达, 但表达量低; 不同发育时期胚胎和仔鱼的 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 表达量变化很大, *Dmrt2a* 在受精后 24 h 达到最高值, 之后表达量降低, 而 *Dmrt2b* 在孵化后仔鱼中表达量显著增加。

研究亮点: 首次在金鱼体内发现 *Dmrt2* 基因具有两个亚型, 采用荧光定量 PCR 技术证明 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在金鱼不同发育时期以及组织中有不同的表达图式。相关结果为研究 *Dmrt2* 基因在金鱼生殖系统发育和体节发育过程中的功能提供了基础资料。

关键词: 金鱼; *Dmrt2a*; *Dmrt2b*; 表达分析

中图分类号: S 917

文献标志码: A

Dmrt (double-sex and mab-3 related transcription factor) 是指与果蝇 *Dsx* 基因和线虫 *Mab-3* 基因同源的基因, 所编码的蛋白质均含有一个富含半胱氨酸的保守基序 DM 结构域, 其产物能识别特异的 DNA 序列^[1]。自从 *Dmrt1* 基因作为第一个在脊椎动物中发现的含 DM 结构域的基因^[2], 被证明与睾丸分化有关, 与卵巢发育无关^[3]之后, 大量的研究认为 *Dmrt* 基因家族是一个在脊椎动物和无脊椎动物中都保守存在的, 与性别决定和分化相关的基因家族^[4-5]。近年来的研究证明, *Dmrt* 基因不仅和性别发育相关, 在其他的发育过程中也具有调控作用, 如 *Dmrt2* 参与调控肌肉的发育, 并与躯体左右不对称的建立相关^[6]。

Dmrt2 有两个亚型, *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b*。*Dmrt2a* 存在于所有的脊椎动物中, *Dmrt2b* 是鱼类

特异基因, 两者可能起源于第三次基因组复制事件^[7]。国内外对 *Dmrt2a* 基因的序列克隆、分子进化、基因表达和细胞定位等研究较多, 证明 *Dmrt2a* 在胚胎体节的发育过程中起着重要作用^[8], 并与躯体左右不对称的建立相关^[6,9], 对 *Dmrt2b* 基因的研究仅在少数几种鱼类中有报道, 被认为对胚胎发育中的体节形成和躯体左右不对称的建立起到调控作用^[10-11]。

金鱼 (*Carassius auratus*) 属于鲤科 (Cyprinidae), 鲤亚科 (Cyprininae), 鲫属 (*Carassius*), 是鲫 (*Carassius auratus*) 的一个变种。金鱼作为观赏鱼在中国具有悠久的历史, 养殖范围很广, 从分子生物学水平上研究金鱼生长发育, 对于促进金鱼的健康养殖、品种优化具有重要意义。金鱼 *Dmrt2b* cDNA 全长序列已经被克

收稿日期: 2012-02-14 修回日期: 2012-04-05

基金项目: 国家自然科学基金 (31172392); 上海市教育委员会科研创新项目 (12YZ126); 上海市重点学科水生生物学建设项目 (S30701)

作者简介: 江山 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为动物遗传育种学。E-mail: wdzpj@s163.com

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

隆,本研究获得金鱼 *Dmrt2a* 基因的 cDNA 全长,分析了 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在不同组织和不同发育时间的表达规律,以期为研究 *Dmrt2* 基因的两个亚型在金鱼生殖系统发育和体节发育过程中的功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

主要试剂有:5'-RACE 和 3'-RACE 试剂盒, *Taq* LA DNA 聚合酶, M-MLV 逆转录酶, pMD19-T 载体, T_4 连接酶, dNTP, 反转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit cDNA 全长获取试剂盒, 实时荧光定量试剂 SYBR Premix Ex *Taq*™ 和 T_4 DNA Ligase 购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司。RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, DNA Marker, X-gal, IPTG 购自天根生化科技有限公司。大肠杆菌 DH5 α 感受态由本实验室制作并保存。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。DNA 测序在上海生工生物工程有限公司进行。

一龄金鱼(龙睛)亲鱼均来自南汇金鱼养殖场,置于本实验室循环水系统养殖,水温控制在 23℃ 左右,每天早晚各投喂一次人工饲料。性成熟金鱼发现有追尾现象后,即进行人工授精。受精卵粘附于培养皿上,再放在循环水系统中孵化。开口后的仔鱼投喂卤虫无节幼体。

1.2 RNA 的提取与鉴定

活体解剖金鱼成鱼 6 条,取卵巢、脑、肾、消化道、心脏、肝脏和精巢组织。受精卵分别在受精后 12 h、24 h、36 h、50 h 时取样,不同时相胚胎各取 50 个;仔鱼在出膜后第 1、2、3、7、15 天时取样,不同天数仔鱼各取 30 条。总 RNA 提取按照天根公司 RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒的方法进行,然后通过琼脂糖凝胶电泳检测完整性,并测定 OD_{260}/OD_{280} 值。

1.3 金鱼 *Dmrt2a* 基因全长的扩增

RNA 反转录采用 Prime Script 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa) 试剂盒的方法进行,具体如下,取 2 μ g 总 RNA, 1 μ L dNTP (各 2.5 mmol/L), 1 μ L Oligo dT Primer (50 μ mol/L), 加入无 RNase 离心管中,补充 RNase free dH₂O 至 10 μ L, PCR 反应 65℃ 5 min, 冰上急冷后加入以下试剂: 5 \times PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase

Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript RTase (200 U/ μ L) 1 μ L, 补充 RNase free dH₂O 至 20 μ L; 然后在 PCR 仪上进行反转录,反应条件为: 42℃ 60 min, 70℃ 15 min, 然后冰上放置 2 min, 获得的 cDNA 于 -20℃ 保存。

根据已知物种同源基因保守区,设计 *Dmrt2a* 引物 5'-GTCTTCCTTGCAAGCATCT-3' 和 5'-TGTCGGCAAAGGCTCGTC-3', 取金鱼组织 cDNA 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 10 s, 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收,并将其连接到 pMD19-T 载体上, 16℃ 连接过夜后,转化到大肠杆菌 DH5 α 菌株中,经蓝白斑筛选,挑选白色单菌落,培养后做菌落 PCR 鉴定,挑选正确的阳性克隆抽提质粒后测序。

根据所得金鱼 *Dmrt2a* 片段的序列设计 3'-RACE 特异引物 5'-CGTGATGGCTGCTCAAGTCG-3' 和 5'-CAGCGGCACATTCGTCCATC-3', 进行 3'-RACE PCR 扩增, PCR 反应条件均为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。同样根据金鱼 *Dmrt2a* 片段设计 5'-RACE 特异引物 5'-CCACGTCGATCTCAAACCTCC-3' 和 5'-GCAATGCTCAGGGGAAACT-3', 首先根据 5'-Full RACE Kit (TaKaRa) 进行反转录合成 5'-RACE cDNA 链, 然后进行 5'-RACE PCR 扩增, PCR 反应条件均为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 65 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。3'-RACE 和 5'-RACE PCR 产物经分别经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收目的片段,进行连接、转化、克隆、测序。

1.4 *Dmrt2a* 基因序列分析

将测序得到的核苷酸序列进行拼接得到完整的 cDNA 序列,将所得序列通过 BLAST 程序中进行序列比对,搜索同源基因。应用 NCBI ORF Finder 程序预测开放阅读框,得到蛋白质序列,同样再进行同源性比较。蛋白质理化特性分析在线完成 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/>)。通过 Pfam 远程服务器推导 DM 结构域位置 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)。SignalP 3.0 预测信号肽的长度和位置 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

在 GenBank 中搜索得到 *DMRT* 家族成员,人

(*Homo sapiens*) *DMRT2* CAH70589, 鼠 (*Mus musculus*) *Dmrt2* AAN77205, 鸡 (*Gallus gallus*) *Dmrt2* AAZ03502, 斑马鱼 (*Danio rerio*) *Dmrt2a* AAD38424, 红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) *Dmrt2a* CAC42780, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis Niloticus*) *Dmrt2a* AAN78446, 青鳉 (*Oryzias latipes*) *Dmrt2a* AAL02163, 斑马鱼 *Dmrt2b* DQ307066, 鲫 (*Carassius auratus*) *Dmrt2b* EF029082, 尼罗罗非鱼 *Dmrt2b* AAO74158, 大西洋鲑 (*Salmo salar*) *Dmrt2b* NP001133069, 斑马鱼 *Dmrt1* AY157562, 斑马鱼 *Dmrt3* AAU89440, 红鳍东方鲀 *Dmrt4* BAE16955, 斑马鱼 *Dmrt5* AAU85258, 鼠 *Dmrt6* AAN77235, 鼠 *Dmrt7* AAN77233。使用 Genedoc 软件对金鱼及其它近缘物种的 *DMRT* 家族成员进行多重比对, 然后使用 MEGA 4.0 软件构建 NJ 系统进化树, 并计算其同源性。

1.5 实时荧光定量 PCR

以金鱼各组织各发育时期 RNA 转录得到的 cDNA 为模板, β -actin 作为内参基因进行实时荧光定量 PCR 试验。反转录和定量 PCR 条件和体系参考 TaKaRa 公司 SYBR ExScript RT-PCR Kit 说明书, PCR 总体系为 20 μ L, 其它组分的含量按比例相应降低。利用 SYBR Premix Ex TaqTM 进行定量 PCR, 设计 *Dmrt2a* 荧光定量 PCR 扩增引物 (5'-CTTTCTGGCACGGAGTT-3' 和 5'-TTTGTGCTC GTCTTTGG-3') 以及 β -actin 扩增引物 (5'-GTGCCATCTACGAGGGTGA-3' 和 5'-TCTCGCT GTGCTGGTGAAG-3')。另外根据鲫 *Dmrt2b* 基因序列 (GenBank 登录号: EF029082) 设计荧光定量扩增引物 (5'-AACTGTCTGCTGGTCGT-3' 和 5'-AGGTGCCCTCGTGTAG-3'), 扩增时均为 20 μ L 反应体系: SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ L, 引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 无菌 ddH₂O 8.2 μ L。每个样本均做 3 个重复, 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法进行表达量比较。试验数据利用 IQ5 Optical System Software (Version 2.0) 进行初步处理, 整个实验在 Bio-Rad IQ5TM 实时荧光定量系统上完成。

2 结果

2.1 *Dmrt2a* 基因的 cDNA 全长序列获得及结构分析

拼接后得到 *Dmrt2a* 基因 cDNA 全长为 1 755

bp。5'端和 3'端非编码区分别为 188 bp 和 67 bp, 在 poly (A) 尾前存在一个加尾信号 AATAAA, 位于多聚腺苷酸前 22 bp 处。推测的开放阅读框可编码 499 个氨基酸的多肽, 蛋白质分子量约 54 938 u, 理论等电点 (pI) 为 8.26, 蛋白的不稳定系数为 46.76。该蛋白包括 15 个半胱氨酸, 占有氨基酸的 3.0%, 不存在信号肽。

2.2 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 序列比对结果及进化树构建

在 NCBI 网页的 GenBank 中搜索得到其他 *DMRT* 家族成员, 与之相比较, 发现它们共同拥有氨基酸序列十分保守的 DM 结构域 (图 1)。经 NJ 系统进化树分析 (图 2), 本试验中克隆得到的氨基酸序列与亲缘关系相近的斑马鱼 *Dmrt2a* 聚为一支, 其次与红鳍东方鲀、青鳉、罗非鱼这 3 种鱼类的 *Dmrt2a* 聚为一支, 然后与鸡、人类、鼠的 *Dmrt2* 聚为一支, 最后鲫、斑马鱼、罗非鱼和大西洋鲑的 *Dmrt2b* 基因聚为一大支。故将本试验中克隆得到的基因命名为金鱼 *Dmrt2a* 基因。

将金鱼 *Dmrt2a* 推导得到的氨基酸序列与其他物种相应序列进行比对, 发现金鱼 *Dmrt2a* 与斑马鱼、红鳍东方鲀、青鳉、罗非鱼 *Dmrt2a* 的同源性分别为 85%、61%、58%、58%, 与鸡、人类、鼠 *Dmrt2* 的同源性分别为 49%、47%、45%。

2.3 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 基因在不同组织和发育时期的表达

荧光定量 PCR 结果显示, *Dmrt2a* 在各组织中都有表达, 其中在精巢中表达量最高, 在卵巢中次之, 而在肾脏、消化道、肝脏、心脏和脑中表达较低。*Dmrt2b* 在卵巢中表达量最高, 在精巢中次之, 在肾脏、消化道、肝脏、心脏和脑中表达最少 (图 3)。

不同时期胚胎和仔鱼 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 的表达量定量分析结果表明, *Dmrt2a* 在受精后 12 h 就有表达, 于 24 h 时表达量显著增高, 达到受精后 12 h 的 12 倍, 在受精后 36 h 时降低幅度很大, 而其在仔鱼出膜后各个时间点的表达量无显著差异。同步进行的受精卵显微观察结果显示, 受精后 24 h 时的胚胎开始出现体节的发育。*Dmrt2b* 在金鱼受精后至整个胚胎发育期间的表达量均保持较低的水平, 而在仔鱼出膜后表达量呈升高趋势, 在 15 d 时表达量显著增加 (图 4)。

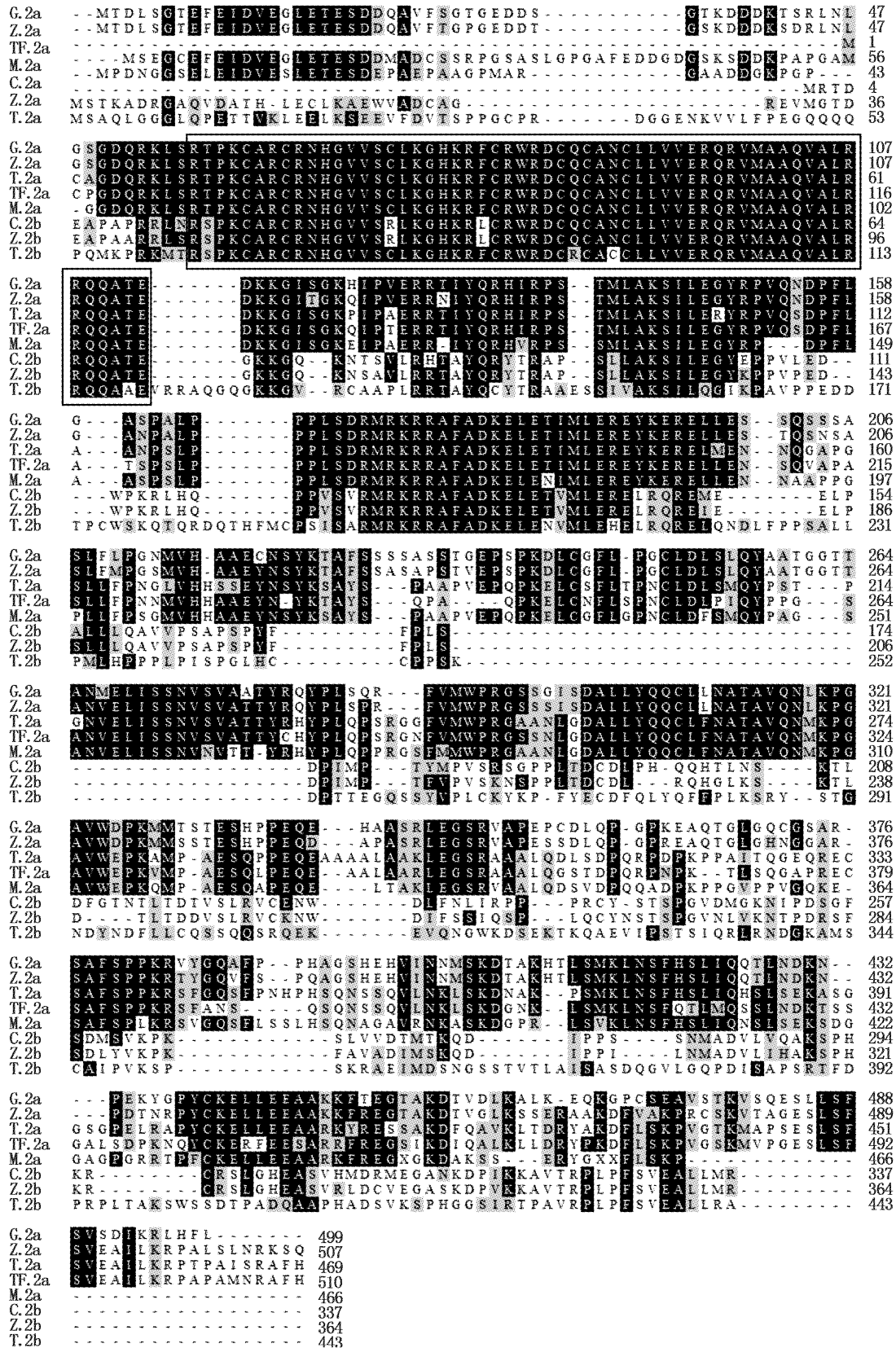


图1 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 氨基酸序列对比分析

Fig.1 Alignment of amino acid sequences of *Dmrt2a* and *Dmrt2b*

G. 金鱼; Z. 斑马鱼; T. 罗非鱼; TF. 红鳍东方鲀; M. 青鲭; C. 鲫; 黑色方框部分为 DM 结构域位置, 黑色区域代表保守的氨基酸, 灰色区域代表相似的氨基酸。

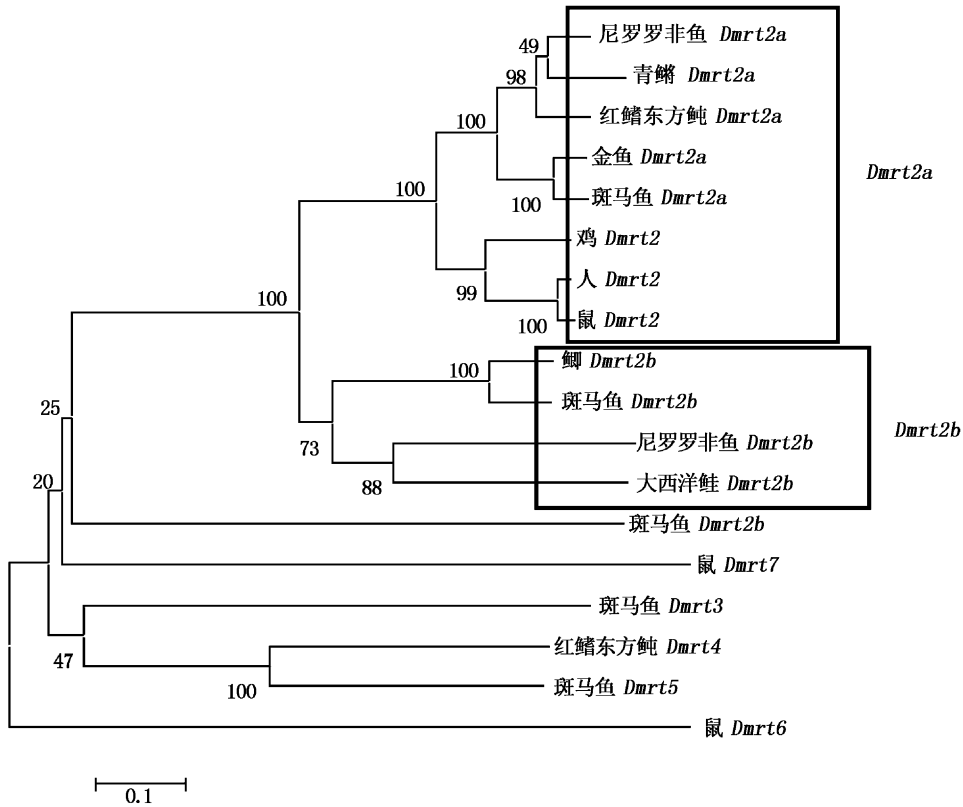


图 2 Neighbor-joining (N-J) 法构建 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 氨基酸序列系统进化树 (自展值为 100)
 Fig. 2 Phylogenetic tree for amino acid sequences of DMRT genes
 (numbers at branch nodes represent the confidence level of 100 bootstrap replications)

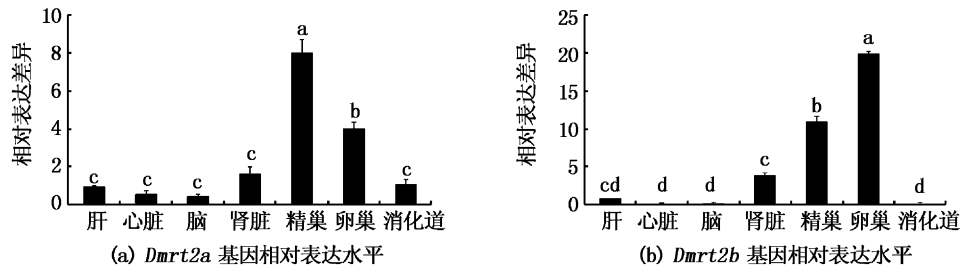


图 3 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 基因在成鱼不同组织的相对表达水平

Fig. 3 Relative expression levels of *Dmrt2a* and *Dmrt2b* gene in different tissues of adult fish
 上标 a、b、c、d 字母相同者表示无显著差异,不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

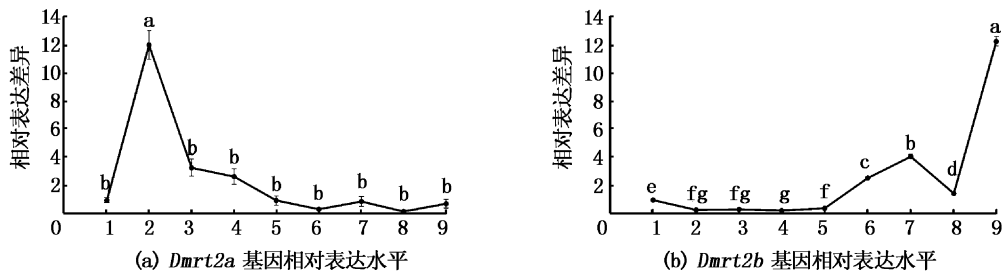


图 4 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 基因在胚胎和仔鱼不同阶段的表达

Fig. 4 Expression of *Dmrt2a* and *Dmrt2b* gene at different stages in embryos and larvae
 横坐标 1-4 分别为受精后第 12、24、36、50 小时,5-9 分别为仔鱼出膜后第 1、2、3、7、15 天;上标 a、b、c、d、e、f、g 字母相同者表示无显著差异,不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

DMRT 家族是一个古老的基因家族,具有多个成员。在人和小鼠体内均有 8 种 *Dmrt* 基因亚型^[6]。饰纹姬蛙中克隆得到 7 个 *Dmrt* 家族成员^[12],在稀有鮟鲫中发现了 13 种 *Dmrt* 家族成员^[13],在红鳍东方鲀中克隆得到 6 个 *Dmrt* 家族成员^[14],青鳉^[15]等鱼类中也都有多个 *Dmrt* 家族成员。迄今为止,从 GenBank 数据库中获取脊椎动物 *Dmrt* 基因家族氨基酸序列超过 70 个。通过构建 *Dmrt* 基因的系统发生树,可明显聚为 7 类,为 *Dmrt1* ~ 7,不同的 *Dmrt* 基因可能具有不同的功能^[16]。其中 *Dmrt2* 具有两个亚型,*Dmrt2a* 和 *Dmrt2b*。*Dmrt2a* 基因在人^[17]、鼠^[18]、鸡^[19]和多种鱼类中均有克隆,*Dmrt2b* 基因则只在鱼类中有报道^[20]。本文在金鱼中克隆到的 *Dmrt2a* 基因的 cDNA 长 1 755 bp,可编码 499 个氨基酸的多肽,已知斑马鱼的 *Dmrt2a* 基因为 507 个氨基酸,红鳍东方鲀的为 510 个氨基酸,而罗非鱼和青鳉比较短,分别为 469 和 466 个氨基酸,金鱼和它们的同源性均高于 58%;与已经报道的银鲫 *Dmrt2b* 基因比较,金鱼 *Dmrt2a* 比其多 162 个氨基酸,金鱼和鲫同属于一起源,说明 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在进化的过程中产生了变异。

比较相同物种中的 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 氨基酸序列可以发现它们除了拥有相同的 DM 结构域外,在其他的若干区域也具有较高的保守型,ZHOU 等^[20]将其中 3 段命名为 DCRas、DCRbs、DCRcs。在本文中,金鱼 *Dmrt2a* 基因与其他物种的 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 相比较也有同样保守的结构域,可见金鱼的 *Dmrt2a* 基因和 *Dmrt2b* 基因也是通过相同的机制形成锌指结构^[21],与特定的 DNA 序列结合来调控下游基因的表达,属于典型的转录因子。另外,在斑马鱼^[20]中 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 中的信号肽是以核定位信号的形式存在,位于 DM 结构域中。

鸭嘴兽 *Dmrt2a* 基因主要存在于雌性鸭嘴兽的成纤维细胞和卵巢中以及雄性鸭嘴兽的肾脏和精巢中,脑和肝脏中无表达^[22]。在一龄的红鳍东方鲀中,*Dmrt2a* 在雌鱼和雄鱼的眼、鳃、心脏、肠、头肾、肝脏、肌肉和脾组织中都有表达,但卵巢和精巢中表达量较高^[14]。青鳉 *Dmrt2* 存在于成鱼的卵巢和精巢中。斑马鱼^[20]中,*Dmrt2a* 在

精巢和卵巢中的表达量比脑、肝和肠中表达量高^[15]。本文研究结果显示,*Dmrt2a* 在金鱼生殖腺包括精巢和卵巢中表达量较高,结果与上述生物中的报道相似。同样,*Dmrt2b* 也主要在金鱼的生殖腺中表达。斑马鱼中,*Dmrt2b* 在精巢、卵巢、脑、肝脏、肠和肌肉中均有表达,且卵巢表达量高于精巢^[20]。银鲫 *Dmrt2b* 在精巢、肾脏、脾脏、卵巢以及肌肉中都有表达,但在肝脏、心脏和脑中表达量低^[10],均与金鱼相似。这些结果表明,*Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 基因可能参与了鱼类生殖系统的生长发育。此外,本文还发现,*Dmrt2a* 基因在金鱼精巢中表达量高于在卵巢中的表达,而 *Dmrt2b* 基因的表达量却是卵巢高于精巢,其反映的功能意义及作用机制仍有待于进一步的研究。

本研究显示,金鱼 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在受精后 12 h 即能检测到。这与其他鱼类相似,斑马鱼 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 在囊胚期就有表达^[20]。红鳍东方鲀 *Dmrt2a* 在孵化后 2 周的仔鱼中表达,且存在于雌鱼排出的卵中^[14]。青鳉中,RT-PCR 结果显示 *Dmrt2* 在胚胎发育的第一、第二天有转录^[15,23]。因而推测金鱼 *Dmrt2a* 和 *Dmrt2b* 可能是母源基因。尤为重要的是,*Dmrt2a* 表达量在金鱼受精后 24 h 显著增高,约为 12h 时的 12 倍。显微观察表明,金鱼胚胎在此时体节开始发育,并出现前几对体节。与此相似,青鳉 *Dmrt2a* 也在体节发育的最初时期表达^[15]。斑马鱼^[20]中,荧光定量结果显示,*Dmrt2a* 的表达量在体节出现初期的开始阶段骤然大幅度增高,随后在出现更多对体节的时期表达量降低;同样,斑马鱼整体胚胎原位杂交结果显示,*Dmrt2a* 仅限于在靠近尾部的最初出现的体节上表达;另有报道,斑马鱼 *terra* 基因即 *Dmrt2a* 基因,主要表达于体节形成前的中胚层以及正在发育的体节中,其在胚胎的早期体节发育中起到重要作用^[8,24]。因而,推测 *Dmrt2a* 基因与金鱼胚胎中早期体节的发育有关。

Dmrt2b 在金鱼受精后 12 h 表达,在受精后 24、36、50 h 各时间点的表达量相对稳定,这与在斑马鱼中相似,斑马鱼^[11] *Dmrt2b* 于受精后 6 h 表达,从受精后 16 h 到 48 h 出膜时保持较稳定的水平,并且通过基因敲降方法证明斑马鱼 *Dmrt2b* 基因与躯体左右不对称的建立有关,且通过 Hedgehog 信号通路参与体节发育过程。但与金鱼 *Dmrt2a* 不同的是,*Dmrt2b* 在金鱼出膜后仔鱼

中的表达量显著增加,说明 *Dmrt2b* 基因在金鱼孵化后发育和生长中也具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] RAYMOND C S, MURPHY M W, O'SULLIVAN, 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.
- [4] 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): 241 - 249.
- [5] ZARKOWER D. Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2: 175 - 185.
- [6] HONG C S, PARK B Y, SAINT-JEANNT J P. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: it is not just about sex [J]. *Developmental Biology*, 2007, 310: 1 - 9.
- [7] CHRISTOFFELS A, KOH EGL, CHIA JER-MING, et al. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21: 1146 - 1151.
- [8] MENG A, MOORE B, TANG H, et al. A drosophila double sex-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates [J]. *Development*, 1999, 126: 1259 - 1268.
- [9] SAUDE L, LOURENCO R, GONCALVES A, et al. *Terra* is a left-right asymmetry gene required for leftright synchronization of the segmentation clock [J]. *Nature Cell Biology*, 2005, 7: 918 - 920.
- [10] 刘沙, 桂建芳. 银鲫 *Dmrt2b* 基因的分子特征及功能分析 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35 (3): 379 - 383.
- [11] LIU S, LI Z, GUI J F. Fish-specific duplicated *Dmrt2b* contributes to a divergent function through Hedgehog pathway and maintains left-right asymmetry establishment function [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e7261.
- [12] 葛永斌, 曹承, 聂刘旺. 饰纹姬蛙 7 个 *Dmrt* 基因 DM 结构域的克隆及序列分析 [J]. *生命科学研究*, 2008, 12 (2): 110 - 114.
- [13] 张小艳, 孙立伟, 查金苗, 等. 稀有鮰鲫 *Dmrt* 基因家族 13 个成员的克隆与序列分析 [J]. *生态毒理学报*, 2007, 2 (1): 88 - 93.
- [14] 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: 59 - 68.
- [15] WINKLER C, HOMUNG U, KONDO M, et al. Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*) [J]. *Mechanisms of Development*, 2004, 121: 997 - 1005.
- [16] 郭一清, 程汉华, 高尚, 等. 脊椎动物 *DMRT* 基因家族的系统发生及同线性分析 [J]. *遗传学报*, 2004, 31 (10): 1103 - 1108.
- [17] OTTOLENGHI C, VEITIA R, BARBIERI M, et al. The human doublesex-related gene, *DMRT2*, is homologous to a gene involved in somitogenesis and encodes a potential bicistronic transcript [J]. *Genomics*, 2000, 64 (2): 179 - 186.
- [18] SEO K W, WANG Y, KOKUBO H, et al. Targeted disruption of the DM domain containing transcription factor *Dmrt2* reveals an essential role in somite patterning [J]. *Developmental Biology*, 2006, 290 (1): 200 - 210.
- [19] RAYA A, IZPISUA B J. Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7 (4): 283 - 293.
- [20] ZHOU X, LI Q, LU H, et al. Fish specific duplication of *Dmrt2*: Characterization of zebrafish *Dmrt2b* [J]. *Biochimie*, 2009, 90: 878 - 887.
- [21] MURPHY M W, ZARKOWER D, BARDWELL V J. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA [J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8 (1): 58.
- [22] EL-MOGHARBEL N, WAKEFIELD M, DEAKIN J E, et al. *DMRT* gene cluster analysis in the platypus: new insights into genomic organization and regulatory regions [J]. *Genomics*, 2007, 89 (1): 10 - 21.
- [23] KONDO M, FROSCHAUER A, KITANO A, et al. Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Gene*, 2002, 295: 213 - 222.
- [24] 赵知行, 华正春, 孟安明. Genomic organization and expression in *E. coli* of zebrafish *terra* [J]. *清华大学学报*, 2001, 6 (3): 265 - 268.

Expression of *Dmrt2* gene in *Carassius auratus*

JIANG Shan, CHEN Xiao-wu, SHI Zhi-yi, LI Qian

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Dmrt2*, *dsx* and *mab-3* related transcription factor 2 are members of a gene family of putative transcription factors which contain a common zinc finger-like DNA binding motif, DM domain. The full-length cDNA of *Dmrt2a* gene was obtained from total RNA isolated from the liver of goldfish by the technology of RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). The complete cDNA of goldfish *Dmrt2a* is 1 755 bp and its ORF (opening reading frame) includes 1 500 bp which codes 499 amino acid residues. *Dmrt2a* in goldfish shares high homology with *Dmrt2a* genes from other fishes via phylogenesis analysis. The sequence homologies between deduced goldfish *Dmrt2a* peptide and that from zebrafish, takifugu, medaka and tilapia are 85%, 61%, 58% and 58%, respectively. SYBR Green I Quantitative Real-time PCR analysis was used to assess the expression of *Dmrt2a* and *Dmrt2b* at mRNA level. The *Dmrt2a* and *Dmrt2b* genes were expressed from early embryo stage to juveniles of 15 days post hatching (dph). *Dmrt2a* was expressed highly in embryos, reached a peak at 24 hours post fertilization (hpf), and decreased at 36 hpf; *Dmrt2b* was expressed lowly in embryos and increased obviously after hatching. In adult goldfish, *Dmrt2a* and *Dmrt2b* genes were expressed highly in ovary and testis, and had a low expression in intestine, kidney, liver, heart and brain.

Key words: goldfish; *Dmrt2a*; *Dmrt2b*; expression analysis