

# 大口黑鲈 *Dmrt* 基因家族的鉴定及性别二态性分析

梁晶婕<sup>1,2,3</sup>, 姚成杰<sup>1</sup>, 陈磊<sup>1,2</sup>, 黄岩<sup>1,2,3</sup>, 陈天圣<sup>1,2,3</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021;  
3. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 利用生物信息学方法从大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 基因组中鉴定出 7 个 *Dmrt* 基因, 包括 *Msdmrt1*、*Msdmrt2a*、*Msdmrt2b*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4*、*Msdmrt5* 和 *Msdmrt6*。这些基因在染色体上分布不一, 其中 *Msdmrt1*-*Msdmrt3*-*Msdmrt2a* 呈线性成簇排列。系统进化关系分析结果显示, 大口黑鲈 *Dmrt* 家族与同属鲈形目的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 关系较近, 与其他硬骨鱼 *Dmrt* 家族的关系相对保守。结合大口黑鲈转录组数据、组织半定量 PCR 与荧光定量 PCR 分析结果显示, *Msdmrt* 基因在性腺中呈现明显的二态性表达, 其中 *Msdmrt1*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4* 和 *Msdmrt6* 仅在精巢中表达, 而 *Msdmrt5* 在脑组织和卵巢中均有表达, 这种表达差异可能与各基因启动子区域所包含的转录因子结合位点不同有关。

[关键词] 大口黑鲈; *Dmrt* 基因家族; 性别二态性; 染色体分布; 系统发育; 基因表达模式谱

[中图分类号] S 917.14

## Identification and Dimorphic Expression of the *Dmrt* Gene Family in Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*)

LIANG Jingjie<sup>1,2,3</sup>, YAO Chengjie<sup>1</sup>, CHEN Lei<sup>1,2</sup>, HUANG Yan<sup>1,2,3</sup>, CHEN Tiansheng<sup>1,2,3</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. National Key Laboratory of Mariculture Biological Breeding, Xiamen 361021, China;

3. Engineering Research Center of Eel Modern Industrial Technology, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In this study, seven *Dmrt* genes, including *Msdmrt1*, *Msdmrt2a*, *Msdmrt2b*, *Msdmrt3*, *Msdmrt4*, *Msdmrt5*, and *Msdmrt6*, were identified from the *Micropterus salmoides* (largemouth bass) genome using bioinformatics methods. These genes are unevenly distributed across the chromosomes, among which *Msdmrt1*, *Msdmrt3*, and *Msdmrt2a* are linearly clustered. Phylogenetic analysis revealed that the *Msdmrt* gene family of largemouth bass is closely related to that of *Larimichthys crocea* (large yellow croaker) from the same order, and relatively conserved compared to other teleost *Dmrt* gene families.

Combined with transcriptome data, semi-quantitative PCR, and quantitative PCR analyses, the *Msdmrt* genes showed clear sexually dimorphic expression in the gonads. *Msdmrt1*, *Msdmrt3*, *Msdmrt4*, and *Msdmrt6* were specifically expressed in the testis, while *Msdmrt5* was expressed in both the brain and ovary. These differences in expression may be associated with distinct transcription factor binding sites in the promoter regions of each gene.

[收稿日期] 2024-03-07

[基金项目] 福建省自然科学基金项目“青鳉 *dmrt3a* 在性腺发育中的功能研究” (2022J05149); 集美大学启动金项目“青鳉双向启动子的筛选、鉴定及应用” (ZQ2022019)

[作者简介] 第一作者: 梁晶婕 (1993—), 博士, 讲师, 从事鱼类遗传与生殖发育调控研究。共同第一作者: 姚成杰 (1995—), 硕士, 从事鱼类分子育种研究。通信作者: 陈天圣 (1977—), 博士, 教授, 从事鱼类分子育种研究。E-mail: tiansheng.chen@jum.edu.cn

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkbb

**Keywords:** largemouth bass(*Micropterus salmoides*); *Dmrt* gene family; sexual dimorphism; chromosomal distribution; phylogeny; gene expression profile

0 引言

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*), 俗称加州鲈, 属于鲈形总目 (Perciformes) 鲈亚目 (Percoidei) 太阳鱼科 (Centrarchidae) 黑鲈属 (*Micropterus*), 原分布于美国中部、东部至墨西哥北部淡水流域, 因具备生长迅速、肉质鲜美、没有肌间刺等优点而受到养殖者和消费者的喜爱, 后被广泛引进到世界各地。我国自 20 世纪 70 年代末从国外引进大口黑鲈, 并于 1983 年实现人工繁殖。目前, 大口黑鲈已成为我国养殖规模最大、产量增速最快最稳定的淡水养殖品种之一<sup>[1]</sup>。研究显示, 雌性大口黑鲈的性腺发育和繁殖过程对其个体生长影响较大, 容易导致腹部肿大、产后体重降低等问题, 不利于市场销售; 此外, 雌鱼产卵季节在每年 2—6 月份, 最适水温在 18~25℃左右, 而在该温度下易引发雌鱼产后病害问题, 造成养殖损失<sup>[2-3]</sup>。由此可见, 建立大口黑鲈全雄养殖对提升养殖效率具有重要意义, 而明确大口黑鲈性别决定和性腺分化的调控机制是实现单性育种的重要前提。

*Dmrt* (double-sex and mab-3 related transcription factor) 基因家族是一类转录因子, 因其家族基因编码产物中包含高度保守的 DNA 结合基序——DM (double-sex and mab-3) 结构域而得名。*Dmrt* 基因家族在动物进化过程中具有重要且保守的功能——参与性别决定和性腺分化的调控。这些基因能够利用其特殊的时空表达模式调控性腺组织的发育, 从而指导特定的细胞群体向雄性或者雌性方向发展<sup>[4]</sup>。研究显示, *Dmrt* 基因家族的进化起源悠久, 自无脊椎动物 (线虫等) 至高等哺乳动物体内均有表达, 在鱼类中也检测出多个种类的 *Dmrt* 基因<sup>[5]</sup>。然而, 不同物种 *Dmrt* 基因家族的成员组成也不尽相同, 在序列种类、可变剪接和组织表达模式等方面均呈现出差异, 进而导致生物学功能不同, 因此不能一概而论。目前尚未有针对大口黑鲈 *Dmrt* 基因家族的系统性报道。

本研究结合大口黑鲈基因组信息及性腺转录组数据对大口黑鲈 *Dmrt* 基因家族 (*Msdmrt*) 全部基因进行系统性挖掘, 分析其基因结构、染色体分布、系统发育进化关系和组织表达模式, 进而绘制 *Msdmrt* 基因家族表达模式谱, 为后续研究 *Dmrt* 基因家族在大口黑鲈生殖发育调控中的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年大口黑鲈体长 (30 ± 2.5) cm, 体重 (450 ± 23) g 购自厦门的夏商农贸市场。实验前将大口黑鲈在实验室养殖系统中暂养 7 d, 水温控制在 (22 ± 1)℃, 每日投喂 2 次。暂养期间鱼摄食正常, 活力良好。待鱼适应环境后, 采集精巢、卵巢、脑、眼、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、鳃等不同组织样本, 同一组织取 3 条鱼的样本作为 1 个混池, 设置为 1 组, 每个组设置 3 个生物学重复。将采集的组织保存于液氮中, 用于后续 RNA 提取实验。本研究涉及的动物实验遵循集美大学动物实验伦理委员会的要求执行。

1.2 大口黑鲈 *Dmrt* 基因的鉴定

从 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载已发表的大口黑鲈基因组信息 (ASM1485139v1、ASM2243578v1)。为了识别大口黑鲈基因组数据库中包含 DM 结构域的蛋白质序列, 本研究从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/family/>) 中下载 DM 结构域的隐马尔可夫模型 (PF00751), 并且针对所有蛋白质序列进行比对。利用 CLUSTALW 对获得的蛋白序列进行对齐, 以重建 *Msdmrt* 蛋白质的特异性 DM 结构域, 并利用该序列对大口黑鲈基因组编码蛋白质序列进行筛选, 选出高置信度 (*E* 值阈值为  $1 \times 10^{-5}$ ) 的 *Dmrt* 蛋白序列, 进一步利用 NCBI 数据库中的 Blastp 工具验证序列的准确性。

1.3 基因序列、结构分析及染色体分布

使用在线 ExPASy 工具 (<http://www.expasy.org/tools/>) 对 *MsDmrt* 家族蛋白的基本物理化学性质 (含相对分子质量和等电点等) 进行评估。利用在线软件 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测蛋白结构域, 并使用 IBS2.0 (<http://ibs.renlab.org/>) 在线网站绘制 *Msdmrt* 基因及其编码的蛋白质结构。利用 Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 功能定位 *Msdmrt* 家族成员在大口黑鲈染色体上的基因分布。

1.4 *MsDmrt* 蛋白的多重序列对比及系统发育分析

使用 ClustalX2 软件对所有大口黑鲈 *Dmrt* 蛋白的氨基酸序列进行多重序列比对, 并提取 DM 结构域蛋白质序列进一步分析。从 NCBI 数据库上获取大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、大西洋鲱鱼 (*Clupea pallasii*)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*)、电鳗 (*Electrophorus electricus*)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、鸡 (*Gallus gallus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、人 (*Homo sapiens*) 等物种的 *Dmrt* 家族成员氨基酸序列用于系统发育分析, 使用 MEGA11 软件进行蛋白质多序列比对, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树, bootstrap 设置为 1000, 利用在线网站 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对进化树进行美化。

1.5 基于转录组数据的 *Msdmrt* 家族基因表达分析

实验室前期针对大口黑鲈精、卵巢及体组织 (混合脑、眼、心脏、肾脏、肝脏、脾脏、鳃) 进行了转录组测序, 结合测序数据, 比对 *Msdmrt* 家族成员在大口黑鲈不同组织中的表达水平, 用 Pheatmap 绘制基因表达热图。

1.6 RT-PCR 与 RT-qPCR 验证 *Msdmrt* 基因的组织表达水平

用 Trizol 法 (Takara) 提取大口黑鲈不同组织 (精巢、卵巢、脑、眼、心脏、肾、肝脏、脾、鳃) 的总 RNA, 用诺唯赞公司的 Hi Script III 1st Strandc DNA Synthesis Kit (+gDNawiper) 反转录获得 cDNA。以 cDNA 为模版, 对 *Msdmrt* 家族基因在不同组织的表达水平进行半定量 PCR 检测; 用诺唯赞公司的 Cham QSYBR qPCR Master Mix 对性腺组织中 *Msdmrt* 家族基因的表达进行荧光定量检测; 以 18S *rRNA* 为内参基因, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *Msdmrt* 家族基因的相对表达水平<sup>[6]</sup>; 通过 SPSS 软件进行统计分析, 用独立样本 *t* 检验分析各组数据的差异情况, 定义  $P < 0.05$  为差异显著。本实验中所涉及的引物参见表 1。

表 1 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences

引物名称	序列(5' - 3')	用途	引物名称	序列(5' - 3')	用途
<i>Msdmrt</i> 1-CDS-F	CTTGGGATTGTAGTCCGTTGT	开 放 阅 读 框 扩 增	<i>Msdmrt</i> 1-qRT-PCR-F	ACTGCCAGTGTCCCAAATGTAA	RT- qPCR
<i>Msdmrt</i> 1-CDS-R	ATTTGGTGGCGTCGATGAT		<i>Msdmrt</i> 1-qRT-PCR-R	AATCCCAAGTTCCTCCTCCTG	
<i>Msdmrt</i> 2a-CDS-F	GCAGCAAAGGCGACGACA		<i>Msdmrt</i> 2a-qRT-PCR-F	GGGAGCCCAAGGTGATGC	
<i>Msdmrt</i> 2a-CDS-R	CCACAGGCTTGGACGGA		<i>Msdmrt</i> 2a-qRT-PCR-R	GCCCGTTGAGGCTCTGATG	
<i>Msdmrt</i> 2b-CDS-F	GCCGACGGAGGGGAGAAT		<i>Msdmrt</i> 2b-qRT-PCR-F	CGGCGTCGTTTCGTGTTT	
<i>Msdmrt</i> 2b-CDS-R	CAAAAGTCCTGCTGGGTGC		<i>Msdmrt</i> 2b-qRT-PCR-R	CCTCTTACCCTGTCTTGTGCT	
<i>Msdmrt</i> 3-CDS-F	AACCACGGCGTGTGTCTG		<i>Msdmrt</i> 3-qRT-PCR-F	CTCTGACACGCAGCCAAGC	
<i>Msdmrt</i> 3-CDS-R	CGGAGTCGGAGCGTTCCTC		<i>Msdmrt</i> 3-qRT-PCR-R	CGGAACACGGACCCACCT	
<i>Msdmrt</i> 4-CDS-F	GCGCTGAAAGGCCACAAG		<i>Msdmrt</i> 4-qRT-PCR-F	GAAACGGGACACCCTGGAG	
<i>Msdmrt</i> 4-CDS-R	TGCTCTGAAGGTAGGAAAGGTC		<i>Msdmrt</i> 4-qRT-PCR-R	CATGTGGAGCGGGGAGAAG	
<i>Msdmrt</i> 5-CDS-F	GTGCCCGCTGTAGGAACC		<i>Msdmrt</i> 5-qRT-PCR-F	TGGACTATGCCCTTAGCGACC	
<i>Msdmrt</i> 5-CDS-R	CGGTGGTGGAGTAGGGAGTC		<i>Msdmrt</i> 5-qRT-PCR-R	TTTTCCGGCGTGTGTGTTGA	
<i>Msdmrt</i> 6-CDS-F	CATCGTCCCGCAGAAAGG		<i>Msdmrt</i> 6-qRT-PCR-F	GAGAAATGTAGCCGCTTTGGAC	
<i>Msdmrt</i> 6-CDS-R	GTTTGGTGGAGGTGGGTATTG		<i>Msdmrt</i> 6-qRT-PCR-R	GTGGACCTGACATCCTGACTTG	

1.7 转录因子结合位点预测

从 NCBI 数据库获取 *Msdmrt* 家族成员基因转录起始位点上游 2000 bp 的序列作为启动子区域, 用线上工具 PROMO 数据库 (<http://algggen.lsi.upc.es/>) 对启动子区域包含的转录因子结合位点进行预测分析。为提高预测的准确度, 将预测物种设置为硬骨鱼纲, 并且将最大矩阵不相似率 (maximum matrix dissimilarity rate) 设置为  $\leq 5\%$ 。将不同基因的预测结果进行比对, 并且用线上工具 <https://bioinfogg.cnbc.csic.es/tools/venny/index.html> 绘制韦恩图。

2 研究结果与分析

2.1 *Msdmrt* 家族基因的鉴定与理化性质分析

本研究从大口黑鲈基因组中共鉴定出 7 个 *Dmrt* 家族成员, 根据硬骨鱼类 *Dmrt* 基因的命名法则分别将其命名为: *Msdmrt1*、*Msdmrt2a*、*Msdmrt2b*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4*、*Msdmrt5* 和 *Msdmrt6*。具体基因信息参见表 2。

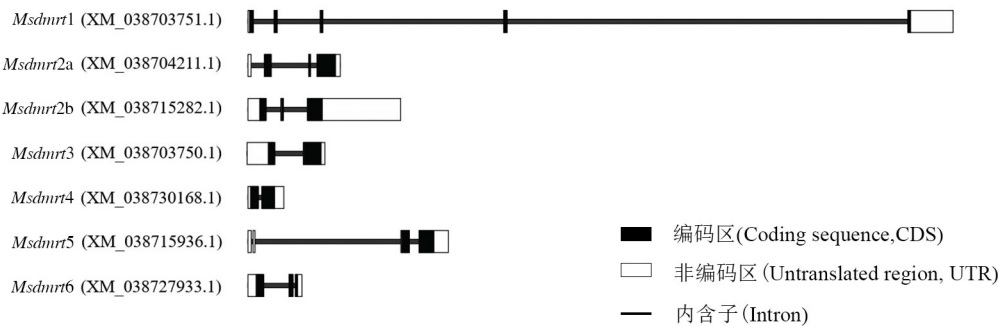
表 2 *Msdmrt* 家族基因信息  
Tab. 2 Gene information of *Msdmrt* gene family

基因名称	染色体/位置	转录本 ID	mRNA 长度/bp	蛋白质	氨基酸链 长度/bp	相对分子 质量/ku	等电点 pI
<i>Msdmrt1</i>	5/27570334-27527966	XM_038703751.1	3548	XP_038559679.1	299	32.7	8.4
<i>Msdmrt2a</i>	5/27507491-27503438	XM_038704211.1	2097	XP_038560139.1	526	57.9	8.6
<i>Msdmrt2b</i>	9/27912827-27921987	XM_038715282.1	6741	XP_038571210.1	445	49.8	9.3
<i>Msdmrt3</i>	5/ 27518760-27515709	XM_038703750.1	2914	XP_038559678.1	473	51.1	6.0
<i>Msdmrt4</i>	19/24700114-24702280	XM_038730168.1	1924	XP_038586096.1	405	43.9	9.1
<i>Msdmrt5</i>	9/17112736-17100913	XM_038715936.1	2566	XP_038571863.1	451	47.8	8.1
<i>Msdmrt6</i>	14/9984292-9987504	XM_038727933.1	1547	XP_038583861.1	273	29.8	7.9

序列定位显示, *Msdmrt1*、*Msdmrt2a*、*Msdmrt3* 在 5 号染色体上形成一个基因簇 (*dmrt1-dmrt3-dmrt2a*), *Msdmrt2b* 和 *Msdmrt5* 分布于 9 号染色体上, *Msdmrt4* 位于 19 号染色体上, 而 *Msdmrt6* 位于 14 号染色体上。*MsDmrt* 家族基因编码蛋白质的氨基酸数在 273 ~ 526 个之间, 蛋白质相对分子质量在 29.8 ~ 57.9 ku 之间, 蛋白质预测理论等电点为 6 ~ 9.33。

2.2 *Msdmrt* 家族基因及编码蛋白质结构分析

进一步分析 *Msdmrt* 家族基因的序列, 结果显示, *Msdmrt* 家族基因在外显子数目上存在一定差异: *Msdmrt1* 有 5 个外显子, *Msdmrt2a* 和 *Msdmrt5* 有 4 个外显子, *Msdmrt2b* 和 *Msdmrt6* 有 3 个外显子, *Msdmrt3* 和 *Msdmrt4* 有 2 个外显子 (见图 1a)。对其编码的蛋白质进行分析的结果显示, 每个 *MsDmrt* 蛋白都含有一个高度保守的 DM 结构域 (见图 1b), 但结构域之外的序列在不同成员之间同源性较低 (见图 2); 此外, *MsDmrt1* 蛋白中还包含有额外的 *Dmrt1* 结构域, *MsDmrt3*、*MsDmrt4* 和 *MsDmrt5* 蛋白中额外包含 DMA 结构域。



a) *Msdmrt* 家族基因结构分析





b) *MsDmrt* 蛋白质结构域分析  
图 1 *Msdmrt* 家族结构分析

Fig.1 Analysis of the structure of the *Msdmrt* family members

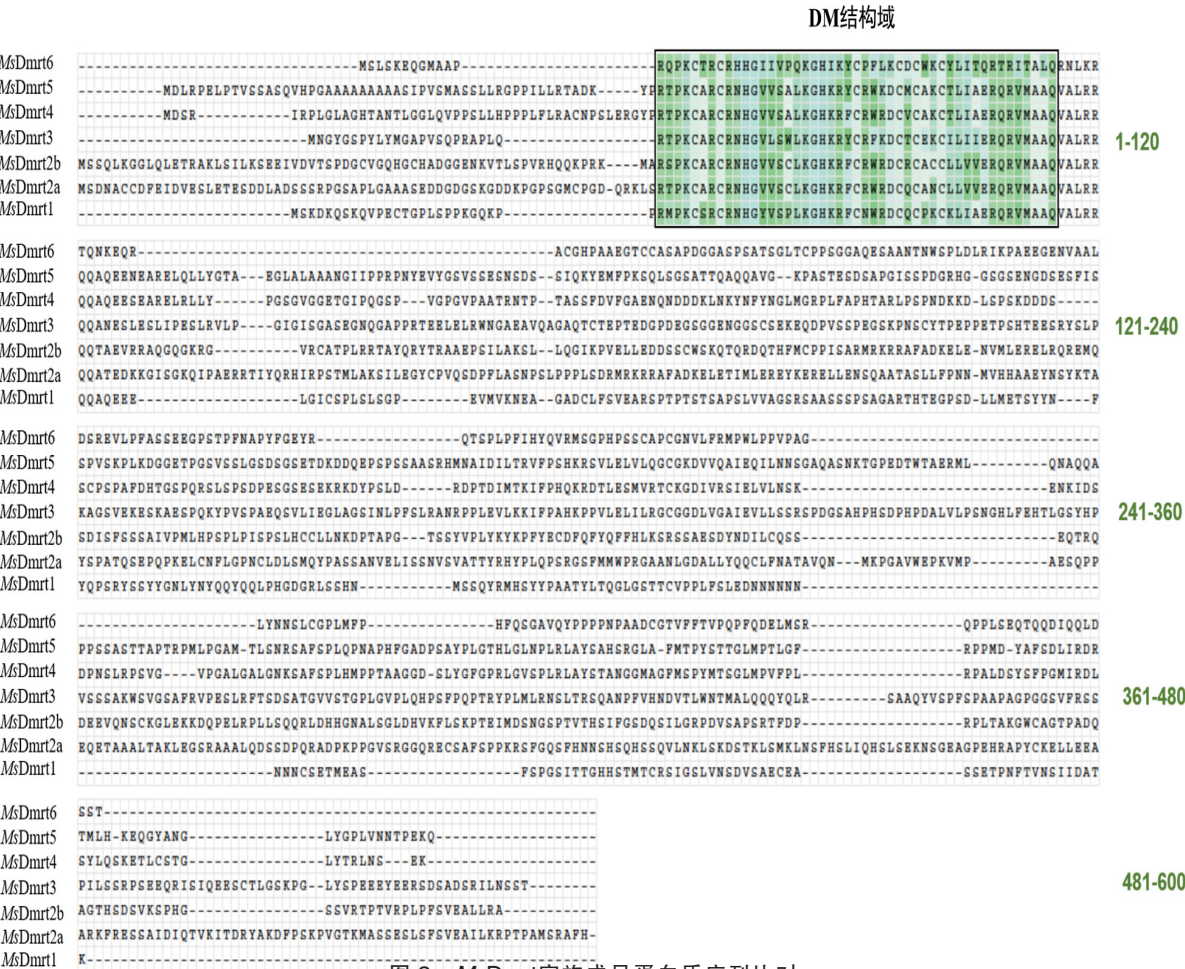


图 2 *MsDmrt* 家族成员蛋白质序列比对

Fig.2 Protein sequence comparison of *MsDmrt* family members

2.3 *MsDmrt* 系统发育分析

为明确大口黑鲈 *Dmrt* 家族在脊椎动物 *Dmrt* 家族中的进化关系，本研究获取来自鱼纲下鲈形总目（大黄鱼、半滑舌鳎）、银汉鱼总目（青鳉）、骨鳔总目（斑点叉尾鲷、电鳗），以及鸟纲（鸡）、两栖纲（非洲爪蟾）、哺乳纲（小鼠、人）等 10 个物种的 *Dmrt* 家族蛋白序列（见表 3），与 *MsDmrt* 家族共同建立基因系统进化树。

表 3 用于大口黑鲈与其他物种 *Dmrt* 家族的系统进化分析的序列信息

Tab. 3 Sequence information for phylogenetic analysis of the *Dmrt* family of largemouth bass and other species

基因名	物种	GenBank 登录号	基因名	物种	GenBank 登录号
<i>Dmrt1</i>	斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017308041.1	<i>Dmrt3</i>	大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_012684056.2
	电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026884883.1		青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	XP_023813900.1
	大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_031426474.1		半滑舌鲷 ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )	XP_008334416.1
	青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	NP_001098150.2		大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_010753534.3
	大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_027133892.1	<i>Dmrt4</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_071443.2
	半滑舌鲷 ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )	XP_008334414.1		小鼠( <i>Mus musculus</i> )	NP_783578.1
	非洲爪蟾 ( <i>Xenopus laevis</i> )	NP_001078952.1		非洲爪蟾 ( <i>Xenopus laevis</i> )	XP_018113157.1
	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	NP_001095301.2		斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017316285.1
	人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_068770.2		电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026879446.2
	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	NP_056641.2		大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_012686270.1
<i>Dmrt2a</i>	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	XP_003643035.3		青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	XP_004079711.1
	人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_870987.2		半滑舌鲷 ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )	XP_008320425.1
	非洲爪蟾 ( <i>Xenopus laevis</i> )	XP_018099312.1		大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_010735509.1
	斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017308058.1	<i>Dmrt5</i>	大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_027145940.1
	电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026885218.2		半滑舌鲷 ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )	XP_024908893.1
	大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_012684022.1		青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	XP_023810346.1
	半滑舌鲷 ( <i>Cynoglossus semilaevis</i> )	QDL88301.1		大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_012677152.2
	大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_010734871.2		斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017323854.1
<i>Dmrt2b</i>	斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017334613.1		电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026857205.1
	大西洋鲱鱼 ( <i>Clupea harengus</i> )	XP_012683793.1		非洲爪蟾 ( <i>Xenopus laevis</i> )	NP_001089148.1
	电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026854611.2		鸡( <i>Gallus gallus</i> )	XP_015146712.1
	青鳉 ( <i>Oryzias latipes</i> )	XP_004068077.2		人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_115486.1
	鸡( <i>Gallus gallus</i> )	XP_046792505.1		小鼠( <i>Mus musculus</i> )	NP_758500.2
<i>Dmrt3</i>	人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_067063.1	<i>Dmrt6</i>	斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017328630.1
	非洲爪蟾 ( <i>Xenopus laevis</i> )	XP_018099314.1		大黄鱼 ( <i>Larimichthys crocea</i> )	XP_019113286.1
	斑点叉尾鲷 ( <i>Ictalurus punctatus</i> )	XP_017308040.1		鸡( <i>Gallus gallus</i> )	NP_001232910.1
	电鳗 ( <i>Electrophorus electricus</i> )	XP_026884873.1		人( <i>Homo sapiens</i> )	NP_149056.1
				小鼠( <i>Mus musculus</i> )	NP_063925.1

如图 3 所示，按照基因家族序列分析可划分为 3 个大支：第一大支包含两个小分支，其中 *Dmrt2a* 与 *Dmrt2b* 同源性较高，聚为一支，而 *Dmrt1* 单独一支；第二大支分为 *Dmrt4* 与 *Dmrt5* 两小支；第三大支分为 *Dmrt3* 与 *Dmrt6* 两小支。按照物种同源性划分结果显示，大口黑鲈 *MsDmrt* 与同属鲈形亚目的大黄鱼先在系统进化树上聚为一支，后与同属鲈形总目鲈形亚目的半滑舌鳎聚为一支，再与其他硬骨鱼类的已知同系物种聚类，这与传统分类地位一致。

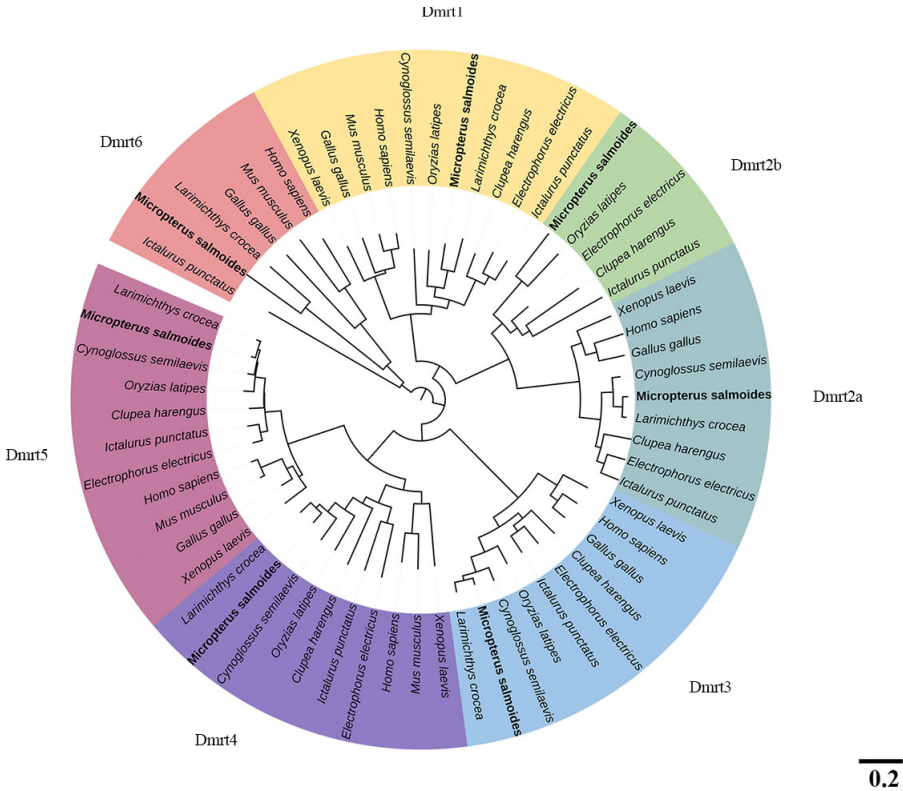


图 3 *MsDmrt* 与其他物种 *Dmrt* 家族系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of *MsDmrt* and *Dmrt* family in other species

2.4 *Msdmrt* 基因家族在大口黑鲈不同组织中的表达

本实验室前期对大口黑鲈成鱼的精巢、卵巢和其他混合的体组织进行了转录组测序，测序结果参见表 4、图 4。

表 4 大口黑鲈组织转录组测序结果中 *Msdmrt* 基因家族的表达水平

Tab. 4 Expression of *Msdmrt* gene family in tissue RNA sequencing of largemouth bass

基因 ID	基因名称	精巢 1	精巢 2	精巢 3	卵巢 1	卵巢 2	卵巢 3	体组织 1	体组织 2	体组织 3
119891840	<i>Msdmrt1</i>	22. 10	28. 55	24. 89	0. 02	0. 06	0. 00	0. 00	0. 00	0. 00
119892110	<i>Msdmrt2a</i>	5. 48	3. 90	7. 60	49. 53	39. 82	13. 90	3. 90	4. 83	4. 98
119900392	<i>Msdmrt2b</i>	0. 06	0. 04	0. 09	0. 03	0. 05	0. 00	0. 16	0. 27	0. 32
119891838	<i>Msdmrt3</i>	1. 50	1. 01	1. 56	0. 00	0. 00	0. 00	0. 02	0. 06	0. 05
119911324	<i>Msdmrt4</i>	1. 14	1. 84	1. 33	0. 19	0. 15	0. 00	0. 20	0. 35	0. 26
119900729	<i>Msdmrt5</i>	0. 24	0. 07	0. 11	6. 25	1. 13	0. 82	2. 01	1. 73	1. 98
119909719	<i>Msdmrt6</i>	75. 71	79. 90	64. 42	0. 00	0. 09	0. 00	0. 04	0. 00	0. 00

注：各组织表达水平由每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数 FPKM（fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments）表示。

*Msdmrt* 家族基因在不同组织中的表达规律不同 (见图 5): *Msdmrt1*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4* 和 *Msdmrt6* 在精巢中呈特异性高表达; *Msdmrt2a* 呈现出泛组织表达的趋势; *Msdmrt2b* 在检测的各个组织中表达水平均较低; *Msdmrt5* 主要表达于卵巢组织和脑组织中。

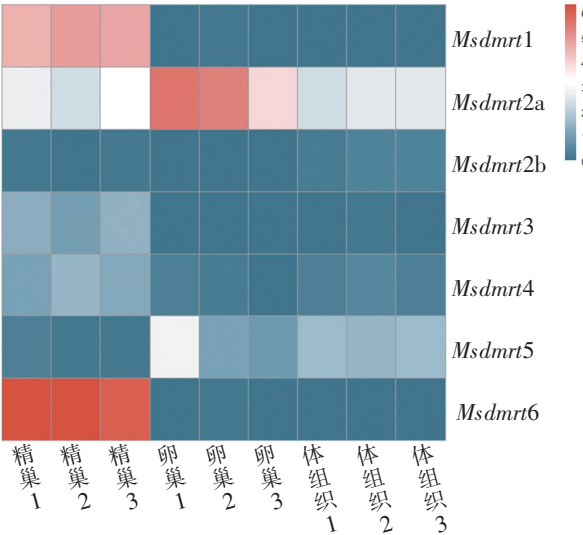


图 4 大口黑鲈组织转录组测序结果中 *Msdmrt* 基因家族在精巢、卵巢和体组织中的表达量热图分析

Fig.4 Heatmap of the expression of *Msdmrt* gene family in testis,ovary and soma from RNA sequencing of largemouth bass tissues

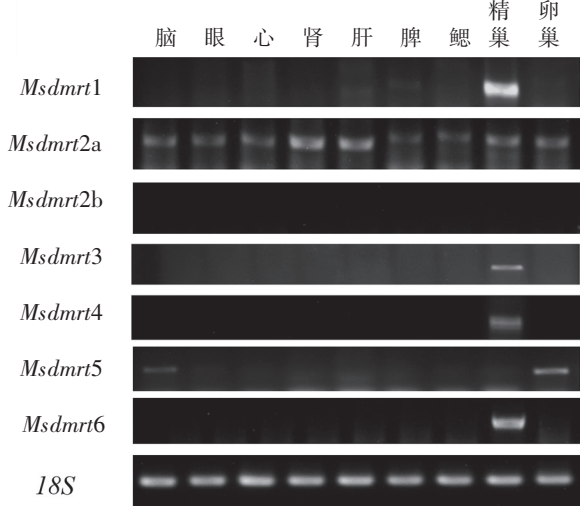


图 5 半定量 PCR 检测 *Msdmrt* 基因家族在各组织中的表达

Fig.5 Semi-quantitative PCR was used to detect the expression of *Msdmrt* gene family in tissues

本研究对具备组织特异性表达特征的 *Msdmrt1*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4*、*Msdmrt5*、*Msdmrt6* 这 5 个基因在性腺中的表达水平进行了荧光定量检测。结果显示, 这些基因在性腺中的表达趋势呈现明显的二态性分布 (见图 6)。

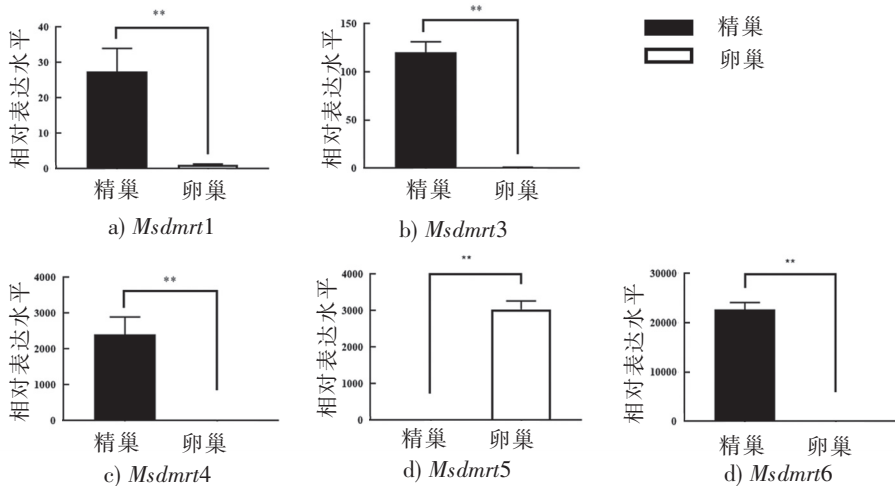


图 6 荧光定量 PCR 检测部分 *Msdmrt* 基因在大口黑鲈精巢和卵巢的表达水平 (\*\* $P < 0.01$ )

Fig.6 The expression levels of *Msdmrt* genes in the testes and ovaries of largemouth bass were detected by fluorescence quantitative PCR (\*\* $P < 0.01$ )

为进一步探索这些基因呈现组织表达差异的原因, 对这 5 个基因的启动子区域进行了分析比对 (见图 7)。由图 7 可见: 在精巢高表达的 4 个基因的启动子区域中可能存在 71 个共同的转录因子结合位点, 其中包含 *Gata1*、*Sry*、*Ar* 等与精巢发育相关的调控因子; 其他精巢调控相关因子如 *Sfl*、



Wt1、Sp1、Spz1 等的结合序列也分别存在于其他基因启动子序列中；对 *Msdmrt5* 基因启动子进行预测，结果发现了一些与卵巢发育相关的因子，如孕激素受体 Pr 等结合位点的存在。这些结果提示 *Msdmrt* 基因家族成员的组织表达差异可能与可结合的转录调控因子不同有关。

3 讨论

*Dmrt* 基因家族在脊椎动物中是高度保守的，在性别决定与分化、神经发育等过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。本研究系统挖掘了大口黑鲈 *Dmrt* 基因家族的基因信息，并检测了不同成员在组织中的表达模式。

3.1 *Msdmrt* 家族的基因保守性与进化

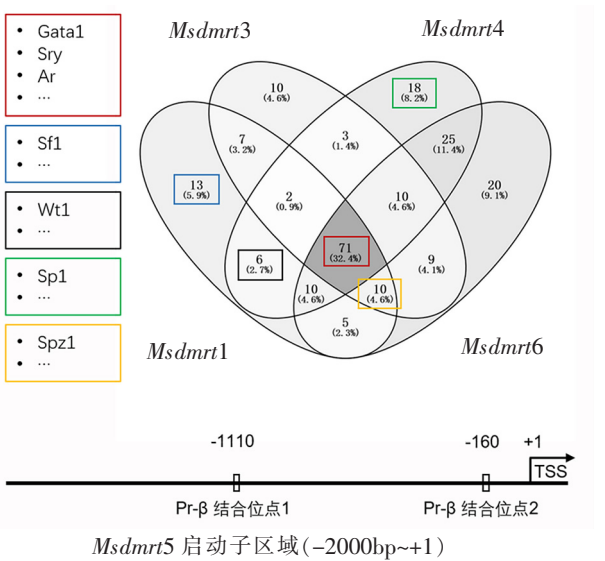
目前从动物中已鉴定出的 *Dmrt* 基因家族共包含 9 个基因（*Dmrt1* ~ 9），这些基因在不同种属间表达不同。例如，*Dmrt1* 仅表达于脊椎动物中，而 *Dmrt2b* 为鱼类特有的 *Dmrt* 基因<sup>[14]</sup>。本研究从大口黑鲈基因组中共鉴定出 7 个 *Dmrt* 基因，分别为 *Msdmrt1* ~ 6，其中 *Msdmrt2* 包含两个基因：*Msdmrt2a* 和 *Msdmrt2b*。分析大口黑鲈 *Dmrt* 家族基因在基因组中的分布结果显示，*Msdmrt1*、*Msdmrt3* 和 *Msdmrt2a* 基因在 5 号染色体上紧密排列为 1 个基因簇，这一现象在人、斑马鱼（*Danio rerio*）、日本青鲙、红鳍东方鲀（*Takifugu rubripes*）中均有报道，提示这 3 个基因的同线性关系在进化上具有保守性<sup>[15]</sup>。*MsDmrt* 家族成员的蛋白质特征分析结果显示，*MsDmrt* 家族成员均只包含一个高度保守的 DM 结构域，除此之外的其他序列在家族成员之间同源性较差。这一现象普遍存在于不同物种的 *Dmrt* 家族基因中，提示这些基因在进化过程中可能发生了较大的结构和功能变化，它们在性别决定和性腺分化中可能扮演了不同的角色。

3.2 *Msdmrt* 基因家族在性别决定、性腺发育及神经系统中的作用

多个物种的相关研究表明，*Dmrt* 家族最主要的功能是促进雄性特异性分化进程，此外，其在非生殖细胞中的表达提示该家族可能也参与神经系统、感官、体节等多组织器官的功能调控。本研究检测发现 4 个 *Msdmrt* 家族成员在大口黑鲈的精巢中特异性表达，提示其主要参与雄性性腺发育调控。

半定量 PCR 结果显示，*Msdmrt1* 在大口黑鲈精巢的表达水平最高。*Dmrt1* 是 *Dmrt* 家族中研究最为广泛的基因，在哺乳动物和鱼类中的研究显示，*Dmrt1* 主要表达于雄性性腺的体细胞中，其可以通过调控雄性性腺发育相关基因 *Sox9* 和 *Amh* 的表达抑制雌性发育信号通路，促使性腺细胞向雄性方向分化<sup>[4,16]</sup>。在小鼠、日本青鲙、半滑舌鳎中过表达或敲除 *Dmrt1* 基因会导致个体出现性别逆转或兼性性腺，这表明 *Dmrt1* 基因在维持雄性性别中的重要地位<sup>[17-18]</sup>。研究显示，*Dmrt1* 受到 *Sox* 家族基因（如 *Sox5* 等）<sup>[19]</sup>、雄激素受体相关基因（*AR*、*GATA1*）的表达调控<sup>[7-8]</sup>，此外，表观遗传机制（如甲基化水平和 *microRNA* 等）也参与调控 *Dmrt1* 的表达<sup>[20-21]</sup>。本研究也在 *Msdmrt1* 基因的启动子序列中发现了部分上述精巢发育相关转录因子的结合位点，提示该基因的表达可能也与这些转录因子有关。

*Dmrt3* 在动物神经系统和性腺中表达。研究显示，*Dmrt3* 突变会导致马的步态异常，运动协调性降低，提示其可能参与运动神经元的发育和功能调控<sup>[22-24]</sup>；生锡绘等<sup>[25]</sup>报道 *Msdmrt3* 也在大口黑鲈的脊髓组织中高表达，提示该基因可能在大口黑鲈性腺和神经系统发育中发挥功能。在小鼠胚胎时期的性腺和斑马鱼的精巢中均能检测到 *Dmrt3*，但其具体生物学功能尚未明确<sup>[26-27]</sup>。本研究检测到 *Ms-*



不同颜色的方块中表示多个基因预测结果的交集所含有的转录因子；卵巢高表达的 *Msdmrt5* 基因的转录因子结合位点预测结果单独陈列在下方；TSS 表示转录起始位点。  
图 7 *Msdmrt* 家族基因启动子区域转录因子结合位点预测  
Fig.7 Transcription factor binding site prediction analysis for the promoter region of *Msdmrt* family genes

*dmrt3* 在精巢中高表达,该基因的启动子区域包含雄激素受体相关基因 (*Ar*、*Gata1*) 和精巢特异性 bHLH (basic helix-loop-helix) 转录因子 *Spz1* 的结合位点,提示该基因的表达可能受这些因子的调控。

据报道<sup>[28-29]</sup>, *Dmrt4* 和 *Dmrt6* 在动物性腺中表达。在小鼠中, *Dmrt4* 突变虽然不会影响生育能力,但会导致雌性小鼠卵巢发育异常,雄性性行为表现异常<sup>[28]</sup>;在精子生成过程中 *Dmrt6* 参与生殖细胞从有丝分裂向减数分裂过渡的调控<sup>[29]</sup>。本研究在大口黑鲈中发现 *Msdmrt4* 和 *Msdmrt6* 均高表达于精巢中,其启动子区域分析结果提示二者的高表达可能与存在 *Gata1*、*Ar*、*Spz1*、*Sp1* 等转录因子的结合位点有关。

本研究检测到 *Msdmrt5* 主要表达于大口黑鲈的脑组织和卵巢组织。*Dmrt5* 是脊椎动物 *Dmrt* 基因家族的一个特别的存在,多个物种的相关研究都显示 *Dmrt5* 参与调控神经元的分化和突触形成,对大脑的正常发育和功能具有重要影响;在生殖调控方面,表达于斑马鱼垂体中的 *Dmrt5* 能够促进皮质激素细胞和性腺激素细胞的分化,从而决定促性腺激素的分泌量,参与了生殖功能的调控<sup>[30]</sup>。*Dmrt5* 在不同物种性腺中的表达情况存在差异。本研究发现其主要在大口黑鲈的卵巢中表达,且其启动子区域包含孕激素受体 *Pr* 的结合位点。在人类和小鼠胎儿时期的卵巢发育中, *Dmrt5* 与减数分裂启动的时间相关,抑制 *Dmrt5* 的表达会导致卵巢组织生长和细胞分化受阻,提示 *Dmrt5* 可能参与调控卵母细胞的发育<sup>[31]</sup>;在斑点叉尾鲷的相关研究中发现, *Lpdmrt5* 在卵巢组织中的表达显著高于其他组织,并且在雌激素诱导产生的 XY 卵巢中 *Lpdmrt5* 的表达显著提升<sup>[32]</sup>。上述研究及本实验结果均提示 *Dmrt5* 可能在卵巢发育中发挥功能,但具体机制有待进一步探究。

## 4 结论

本研究共鉴定了大口黑鲈 7 个 *Dmrt* 基因,并对其基因结构、系统发育和表达模式进行了分析。5 个 *Msdmrt* 基因在性腺中表现出二态性的表达。其中 *Msdmrt1*、*Msdmrt3*、*Msdmrt4* 和 *Msdmrt6* 可能在精巢分化和维持中发挥重要作用;而 *Msdmrt5* 可能参与卵巢的功能调控,并且在脑神经组织的发育中具有潜在功能。本研究对大口黑鲈 *Msdmrt* 基因家族进行了系统的研究,为进一步研究其生物学功能,如生殖发育和性别分化奠定了基础。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] 国家特色淡水鱼产业技术体系. 中国淡水鲈产业发展报告[J]. 中国水产, 2021(3):40-48.
- [2] 周家辉. 大口黑鲈性别特异性标记开发及性逆转研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2022.
- [3] 别汉晴. 大口黑鲈性别分化及雌性化诱导研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2023.
- [4] KOPP A. *Dmrt* genes in the development and evolution of sexual dimorphism[J]. Trends in Genetics, 2012, 28(4):175-184.
- [5] 曹谨玲,陈剑杰,甘西,等. 鱼类 DMRT 基因的研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(1):5.
- [6] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR[J]. Methods, 2002, 25(4):402-408.
- [7] MALOLINA E A, GALIAKBEROVA A A, DASHINIMAEV E B, et al. Establishment of a pure culture of immature Sertoli cells by PDGFRA staining and cell sorting[J]. Molecular Reproduction and Development, 2022(5/6):89.
- [8] YOMOGIDA K, OHTANI H, HARIGAE H, et al. Developmental stage and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells[J]. Development, 1994, 120(7):1759-1766.
- [9] SEKIDO R, LOVELL-BADGE R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific *Sox9* enhancer[J]. Nature, 2008, 453(7197):930-934.
- [10] GAO F, MAITI S, ALAM N, et al. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32):11987-11992.
- [11] THOMAS K, WU J, SUNG D Y, et al. SP1 transcription factors in male germ cell development and differentiation[J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2007, 270(1/2):1-7.

- [12] HSU S H, SHYU H W, HSIEH-LI H M, et al. Spz1, a novel bHLH-Zip protein, is specifically expressed in testis[J]. *Mech Dev*, 2001, 100(2): 177-187.
- [13] BURTIS K C, BAKER B S. Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides[J]. *Cell*, 1989, 56(6): 997-1010.
- [14] 雷蕾, 李忻怡, 张育辉. *Dmrt* 基因在脊椎动物性别决定与分化中的研究进展[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2013, 22(3): 8.
- [15] BRUNNER B, HORNUNG U, SHAN Z, et al. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1[J]. *Genomics*, 2001, 77(1/2): 8-17.
- [16] MATSON C K, MURPHY M W, SARVER A L, et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis[J]. *Nature*, 2011, 476(7358): 101-104.
- [17] MASUYAMA H, YAMADA M, KAMEI Y, et al. *Dmrt1* mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by *Dmy* in the medaka[J]. *Chromosome Research*, 2012, 20(1): 163-176.
- [18] CUI Z K, LIU Y, WANG W W, et al. Genome editing reveals *dmrt1* as an essential male sex-determining gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42213.
- [19] GAO S, ZHANG T, ZHOU X, et al. Molecular cloning, expression of *Sox5* and its down-regulation of *Dmrt1* transcription in Zebrafish[J]. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular & Developmental Evolution*, 2005, 304(5): 476-483.
- [20] WEN A Y, YOU F, SUN P, et al. CpG methylation of *dmrt1* and *cyp19a* promoters in relation to their sexual dimorphic expression in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of fish biology*, 2014, 84(1): 193-205.
- [21] CUI N, HAO G, ZHAO Z, et al. MicroRNA-224 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells via targeting DMRT1[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2016, 20(8): 1503-1512.
- [22] ANDERSSON L S, LARHAMMAR M, MEMI C F, et al. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice[J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 642-646, A2.
- [23] PETERSEN J L, MICKELSON J R, RENDAHL A K, et al. Genome-wide analysis reveals selection for important traits in domestic horse breeds[J]. *Plos Genetics*, 2013, 9(1): e1003211.
- [24] PROMEROVÁU, ANDERSSON L S, JURAS R M, et al. Worldwide frequency distribution of the ‘Gait keeper’ mutation in the *DMRT3* gene[J]. *Animal Genetics*, 2014, 45(2): 274-282.
- [25] 生锡绘, 董浚铨, 孙成飞, 等. 大口黑鲈 *MsDmrt3* 的基因结构、系统进化及时空表达[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(11): 1406-1416.
- [26] 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 Expression Patterns*, 2003, 3(1): 77-82.
- [27] LI Q, ZHOU X, GUO Y, et al. Nuclear localization, DNA binding and restricted expression in neural and germ cells of zebrafish *Dmrt3*[J]. *Biology of the Cell*, 2008, 100(8): 453-463.
- [28] BALCIUNIENE J, BARDWELL V J, ZARKOWER D. Mice mutant in the DM domain gene *Dmrt4* are viable and fertile but have polyovular follicles[J]. 2007, 36(3): 8984-8991.
- [29] ZHANG T, MURPHY M W, GEARHART M D, et al. The mammalian Doublesex homolog DMRT6 coordinates the transition between mitotic and meiotic developmental programs during spermatogenesis[J]. *Development*, 2014, 141(19): 3662-3671.
- [30] MARTIN G, ELIZABETH-RAYE Q W, VIKTOR S M, et al. *Dmrt5* controls corticotrope and gonadotrope differentiation in the zebrafish pituitary[J]. *Molecular Endocrinology*, 2015, 29(2): 187-199.
- [31] POULAIN M, FRYDMAN N, TOURPIN S, et al. Involvement of doublesex and mab-3-related transcription factors in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA strategies[J]. *Molecular Human Reproduction*, 2014, 20(10): 960-971.
- [32] XU S Q, ZHANG S Y, ZHANG W P, et al. Genome-wide identification, phylogeny, and expression profile of the *Dmrt* (Doublesex and mab-3 related transcription factor) gene family in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 891204

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)