中国科学: 生命科学 2014 年 第 44 卷 第 11 期: 1173 ~ 1182
SCIENTIA SINICA Vitae www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

论 文

中华鳖 *Dmrt1* 基因的克隆、表达及在性逆转中的变化分析

葛楚天†, 孙伟†, 桑亚鹏, 王莉, 杨克周, 钱国英*

浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100
†同等贡献
*联系人, E-mail: qiangy@zwu.edu.cn

收稿日期: 2014-04-28; 接受日期: 2014-08-15; 网络版发表日期: 2014-10-10
国家自然科学基金(批准号: 31101884)、浙江省自然科学基金(批准号: LY14C190008)、浙江省公益性技术应用研究项目(批准号: 2013C32054)、宁波市科技创新团队(批准号: 2012B82016)和宁波市自然科学基金(批准号: 2012A610142)资助
doi: 10.1360/N052014-0148

摘要 在大部分脊椎动物中, *Dmrt1* 基因在雄性性别决定和性腺分化中起重要的调控作用. 本文从 mRNA 和蛋白水平分析 *Dmrt1* 基因的组织差异性表达、在不同发育阶段性腺中的细胞定位及在性逆转中的表达变化, 研究 *Dmrt1* 基因在中华鳖性别分化中的调控作用. Rapid-amplification of cDNA ends(RACE)结果显示, *Dmrt1* 基因 cDNA 序列全长 2409 bp, 其中 5′非编码区为 230 bp, 3′非编码区为 1072 bp, 开放阅读框为 1107 bp, 编码 368 个氨基酸, 具有一个高度保守的 DM 结构域. 荧光定量 PCR 和免疫组化结果显示, *Dmrt1* 在性腺分化之前的第 16 期雄性性腺中开始表达, 先于 *Amh* 和 *Sox9* 基因表达. 随着性腺的发育, Dmrt1 蛋白主要定位于性腺 Sertoli 细胞的细胞核上, 在雌性性腺发育过程中并未见其表达. 此外, 在雌二醇诱导的雄性转雌性性逆转胚胎性腺中, *Dmrt1* 表达显著下调; 在芳香化酶抑制剂诱导的雌性转雄性性腺中, *Dmrt1* 表达则显著上升. 上述研究表明, *Dmrt1* 基因是中华鳖雄性特异性基因, 参与雄性性腺的发育过程, 可能在中华鳖早期性别决定中起重要的调控作用.

关键词
Dmrt1
性别决定
雄性
中华鳖

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*), 俗称甲鱼, 隶属于爬行纲、龟鳖目、鳖科, 为中国主要的名贵水产养殖品种. 由于中华鳖雄性比雌性生长快, 裙边宽厚, 脂肪少, 商品价值大大高于雌鳖. 鉴于此, 中华鳖性别决定分子机制与控制技术的研究, 成为中华鳖优质苗种研究的主要内容之一. 研究发现中华鳖存在微小性染色体(Z/W), 其性别决定和性腺分化是一个复杂的、多基因精确调控和激素介导的过程, 分子机制至今尚未明确. 哺乳动物性别决定的分子机理研究表明, Y 染色体的 *Sry*(sex determining region of Y chromosome)基因上调 *Sox9*(SRY-related high mobility group-box gene 9), *Mis*(mullerian inhibiting substance)和 *Dmrt1*(double sex- and mab3-related transcription factor 1)等关键基因的表达, 激活雄性信号通路, 最后决定性器官的分化发育[1,2]. 因此, 解析中华鳖性别决定的分子机制首先要挖掘参与性别决定的一些

引用格式: 葛楚天, 孙伟, 桑亚鹏, 等. 中华鳖 *Dmrt1* 基因的克隆、表达及在性逆转中的变化分析. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1173–1182
Ge C T, Sun W, Sang Y P, et al. Molecular cloning and expression pattern of *Dmrt1* and its expression change in sex reversal in *Pelodiscus sinensis*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 1173–1182, doi: 10.1360/N052014-0148

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

关键基因以及它们在分子级联通路中的角色定位.

在参与性别决定和性腺分化的关键基因中, *Dmrt1* 基因是目前已知的唯一在动物门间保守的基因. 该基因具有与果蝇的 *Dsx* 基因和线虫的 *Mab-3* 基因相似的 DM 结构域, 在哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类及鱼类等不同进化地位的物种中都被发现并克隆. *Dmrt1* 与 *Sry* 基因相似, 在雄性性腺中专一性表达, 参与雄性性腺分化过程, 该基因的缺失会导致雄性向雌性的性别逆转现象[3~6]. 在鸡(*Gallus gallus*)和青鳞(*Oryzias latipes*)中, *Dmrt1* 或其同源基因 *Dmy*(the DM-domain gene on the Y chromosome)位于雄性性染色体(Z/Y)上, 被确定为雄性性别决定的主控基因[4,5]. Kettlewell 等人[7]克隆获得了巴西龟(*Trachemys scripta*) *Dmrt1* 基因的部分 cDNA 序列, 并发现其在雄性生殖嵴中的表达显著高于雌性, 而且向雄性胚胎注射雌激素能显著抑制 *Dmrt1* 基因的表达[8]. 目前, 龟鳖类 *Dmrt1* 的研究刚起步, 主要集中在 mRNA 水平的表达情况, 尚未涉及蛋白和功能研究, 其深度及广度远不及哺乳动物和鸟类, 关于中华鳖 *Dmrt1* 的研究尚未见报道. 为了探索中华鳖性别决定分子机制, 本实验以 *Dmrt1* 基因为切入点, 以其 cDNA 全序列的克隆为基础, 研究 *Dmrt1* 基因在不同组织和不同发育阶段雌雄性腺中的表达情况、细胞定位以及在性激素诱导的性逆转中的表达变化. 本研究旨在初步探索 *Dmrt1* 基因在中华鳖性别决定中的调控作用, 为后续 *Dmrt1* 的功能研究、中华鳖单性育种及性别决定分子机制研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 中华鳖组织及胚胎收集

成年雌雄中华鳖(3 龄)购自浙江余姚明凤甲鱼场, 取性腺(睾丸或卵巢)、肌肉、肝脏、心脏、肾脏、脾脏、脑和肺等组织, 存于–80℃冰箱用于 *Dmrt1* 基因克隆及组织分布检测. 中华鳖受精卵购自绍兴大畈水产合作社, 在浙江万里学院水生动物营养生理及分子调控实验室采用全裸无接触式孵化系统进行孵化, 设定孵化温度为 31℃, 湿度控制为 75%~85%, 孵化 1 天后, 将此时还没有明显受精斑的鳖卵挑出. 按照胚胎发育图谱[9]收集不同发育时期的胚胎, 用于性腺分离提取. 同时取每个标本的血液, 通过外周血淋巴细胞培养的方法[10]制备染色体标本进行染色体核型分析, 以确定染色体型.

1.2 雌二醇及芳香化酶抑制剂处理

中华鳖受精卵在以上恒温恒湿培养箱孵化至 15 天时, 用照蛋器确定中华鳖胚胎的位置, 在正对胚胎的卵壳位置上滴加 5 μL 95%乙醇(对照组)、20 μg/μL 雌二醇(17β-estradiol, E_2, Sigma, 美国)或 20 μg/μL 的芳香化酶抑制剂(AI)来曲唑(Sigma); 第二天, 重新滴加相同剂量的药物, 继续孵化, 收集 15~27 期胚胎用于性腺提取和核型分析.

1.3 中华鳖 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及分析

按 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)操作方法, 提取中华鳖睾丸组织总 RNA, 用 Recombinant DNase Ⅰ(RNase Free)(TaKaRa, 日本)进行 DNase Ⅰ处理. 按照 Fermentas 反转录试剂盒(K1622, Thermo Scientific, 美国)合成 cDNA. 在已有的中华鳖部分 *Dmrt1* 基因片段基础上, 按照 SMART RACE 试剂盒(TaKaRa)方法, 分别设计引物, 进行 5′ RACE 和 3′ RACE. PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳、回收并克隆到 pMD-20T 载体中, 转化 DH5α 大肠杆菌, 培养过夜, PCR 筛选阳性克隆, 测序, 拼接 5′端和 3′端序列, 获得 *Dmrt1* 基因 cDNA 全长.

所得 *Dmrt1* 的 3′端序列及 5′端序列经软件 DNAMAN5.0 及 DNASTAR 拼接, 寻找开放阅读框并推导氨基酸序列; 在 NCBI 中对 AST 基因全长 cDNA 序列 BLAST 比对并做同源性分析; 用 ClustalX 软件及 DNAStar 软件包中的 MegAlign 软件对蛋白序列作比对及同源性分析; 采用 MAGE4.0 软件以邻接法(Neighbour-Joining)根据不同物种的 *Dmrt1* 氨基酸序列构建系统进化树.

1.4 RNA 提取和实时荧光定量 PCR

按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen)方法, 从中华鳖不同组织和不同发育时期胚胎性腺中提取 RNA, 按照 Fermentas 反转录试剂盒(K1622, Thermo Scientific)合成 cDNA. 以合成的 cDNA 为模板, 按照以下参数配置 25 μL PCR 反应液体系: SYBR® Premix (TaKaRa) 12.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, 灭菌蒸馏水 9.5 μL. 按下列参数在 Bio-Rad iCycler 中进行 PCR 扩增: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s; 58℃

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

退火 30 s; 72℃延伸 1 min; 循环 50 次, 最后 72℃再延伸 10 min. 以*β*-actin 作为内参基因, 所用引物如下: *β-actin*(F: 5′-AACTGGGATGACATGGAGAAGA-3′, R: 5′-AACATGATCTGGGTCATCTT-3′, GenBank 登录号: XM006112915); *Dmrt1*(F: 5′-CCGCCTCGGGAAAGAAGTC-3′, R: 5′-TGCTGGATGCCGTAGTTGC-3′); *Sox9*(F: 5′-AGCCTCTATTCCACCTTCAC-3′, R: 5′-ATGTCTGTACCGAGTTTTGC-3′); *Cyp19a1*(F: 5′-CCTCTGCTGGAGATGGTTTT-3′, R: 5′-CCTCTGCTGGAGATGGTTTT-3′), *Foxl2*(F: 5′-GCGGACGTCCTTCTCTCC-3′, R: 5′-GACACACACAGACGGCTGG-3′); *Amh*(F: 5′-CGGCTACTCCTCCCACACG-3′, R: 5′-CCTGGCTGGAG TATTTGACGG-3′).

1.5 蛋白免疫印迹分析

将收集的中华鳖的不同组织和胚胎性腺, 经过组织匀浆器或液氮研磨后, 加入 RIPA 细胞裂解液(Santa Cruz, 美国), 冰上作用 0.5 h, 4℃离心(12000×*g*)后收集上清, 加入 5×SDS 上样缓冲液并煮沸使蛋白变性. 将蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜, 再通过脱脂牛奶封闭、Dmrt1 一抗(1∶1000, Millipore, 美国)和羊抗兔 HRP 二抗(1∶5000, Santa Cruz)等步骤, 最后显影出目的蛋白条带. *β*-actin 蛋白用作内参对照.

1.6 石蜡切片和苏木素-伊红染色

将取出的胚胎性腺组织保存于 4%多聚甲醛内, 固定 24 h 后转入 50%乙醇. 在体视显微镜下进行组织形状修正, 经过乙醇浓度由低到高梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 进行常规石蜡连续切片, 厚度为 5~6 μm. 将切片进行二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水分渗透, 苏木素-伊红染色, 脱水, 封片. 正置显微镜(Nikon, 日本)下观察拍照.

1.7 免疫荧光染色

切片脱蜡后放入 0.01 mol/L 柠檬酸钠溶液, 95℃抗原修复 20 min, 冷却至室温. 在封闭液(10%正常驴血清, 3% BSA, 0.1% Triton X-100)中室温孵育 1 h, 吸去周边多余液体, 分别加兔抗 Dmrt1(1∶250, Millipore)和鼠抗 CTNNB1(1∶250, Sigma), 或鼠抗 γH2AX(1∶500, Abcam, 英国), 4℃过夜. 用 PBST 和洗脱液(1%正常驴血清, 3% BSA, 0.1% Triton X-100)清洗 10 min×3; 在室温避光环境下, 滴加羊抗兔 IgG-488(1∶250, Invitrogen)和羊抗鼠 IgG-594(1∶250, Invitrogen), 孵育 1 h, 用 PBST 和洗脱液清洗 10 min×3. 滴加 DAPI(300 nmol/μL, Sigma)液, 室温避光染色 5 min, PBS 清洗 5 min×3. 加抗荧光淬灭液封片, 于荧光正置显微镜(Nikon)下观察拍照.

1.8 数据分析

所得数据采用 SAS(6.12 版本)软件中 GLM 过程进行方差分析和 Duncan 氏多重比较, 检验误差为 5%和 1%水平.

2 结果

2.1 中华鳖 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及分析

以中华鳖睾丸组织 cDNA 为模板, 采用分段克隆方法和 3′ RACE, 5′ RACE 法对 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 序列进行克隆, 得到全部中间序列和 3′末端, 5′末端. 采用 ContigExpress 软件分析并拼接各片段, 得到 *Dmrt1* 基因 cDNA 序列全长 2409 bp, 其中开放阅读框(ORF)为 1107 bp, 编码 368 个氨基酸, 具有一个高度保守的 DM 结构域. cDNA 全长中还包含 5′非编码区的 230 bp, 一个长的 3′非编码区的 1072 bp, 以及终止密码子 TAA 和多聚 A 尾巴.

为了研究中华鳖 *Dmrt1* 基因与其他物种的同源性, 根据 NCBI 网站的氨基酸序列 BLAST 分析, 选取了一部分典型的脊椎动物物种用 Mega5.0 软件构建进化树, 进行分子系统学分析. 氨基酸序列同源性分析表明, 中华鳖 *Dmrt1* 与同属龟鳖目的乌龟(*Mauremys reevesii*)同源性最高, 其相似性为 88.3%. 与鸡、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、人(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和青鳉的相似性分别为 67.2%, 57.8%, 63.4%, 64.4%, 35.6%和 31.6%(图 1A). 利用 MAGE 4.0 的 Neighbor-joining 法构建的氨基酸进化树显示, 中华鳖与鸡、人、小鼠、非洲爪蟾聚为一大支, 鱼类聚为另一大支. 其中中华鳖与乌龟具有最近的亲缘关系, 与鸡亦有较近的进化关系(图 1B).

2.2 *Dmrt1* 基因在成体组织中的表达分布

RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 结果显示, *Dmrt1* 基因在成年中华鳖睾丸组织中高度特异性表达, 心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、肌肉和卵巢组织中几乎

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

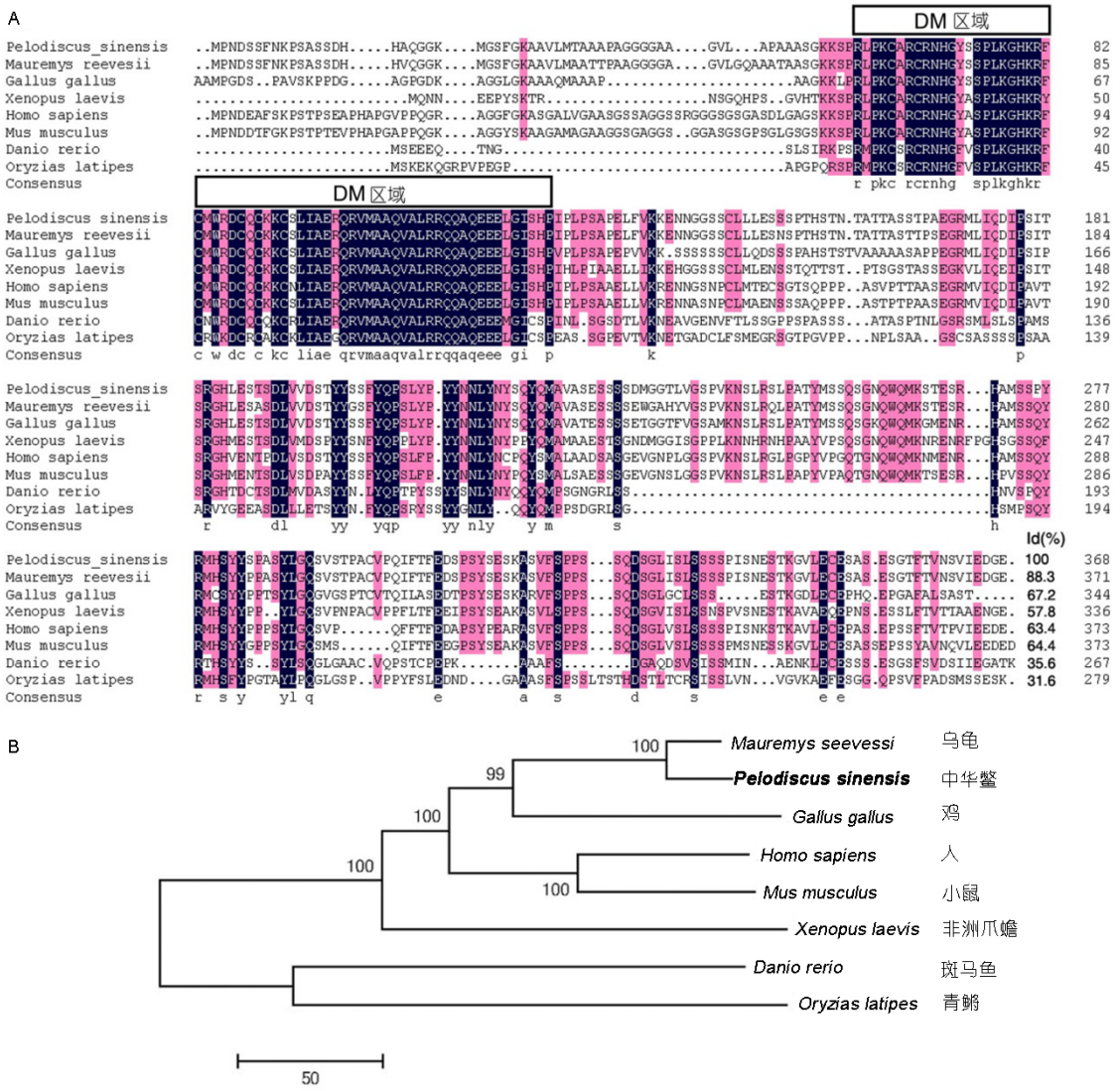


图 1　Dmrt1 氨基酸序列比对及分子进化树构建

A: 不同物种 Dmrt1 氨基酸序列比对, 乌龟(BAG65667.1)、鸡(ADW41582.1)、非洲爪蟾(NP001089969.1)、人(NP068770.2)、小鼠(NP056641.2)、斑马鱼(AAQ04555.1)和青鳉(AAL02165.1); B: 基于 NJ 法构建的中华鳖和其他脊椎动物的 DMRT1 氨基酸系统进化树, 图中数值为 Bootstraps 值, 反映相邻分支间的可靠性, 数值越趋近 100, 可靠性越高

检测不到 *Dmrt1* 基因的 mRNA 表达(图 2A 和 B). Western blot 分析亦证实 Dmrt1 蛋白仅在睾丸组织中大量表达(图 2C).

2.3　*Dmrt1* 基因在不同发育时期性腺中的表达模式

为了研究 *Dmrt1* 在中华鳖雄性性腺发育中的作用, 本实验首先分析了 *Dmrt1* 在早期胚胎发育性腺中的表达规律. 实时荧光定量 PCR 显示, *Dmrt1* 基因在第 15 期雄性性腺中开始出现表达, 16 期开始表达急剧增加, 23 期达到最高表达量, 而在整个胚胎期雌性性腺中未见 *Dmrt1* 基因表达(图 3A). 同时, 还比较了 *Dmrt1*, *Amh*(anti-mullerian hormone)和 *Sox9* 这 3 个雄性基因的表达趋势. 结果显示, *Dmrt1* 基因在性腺分化开始之前就开始表达, 先于 *Amh* 和 *Sox9* 基因, *Sox9* 基因在性腺分化开始后才出现表达(图 3B).

为了进一步明确 *Dmrt1* 在早期胚胎发育过程中的具体表达部位, 本实验通过免疫荧光染色分析了 Dmrt1 蛋白在不同时期胚胎性腺中的具体细胞定位.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

β-连锁蛋白(CTNNB1)是一种细胞黏附蛋白, 与细胞膜上 cadherin 蛋白结合, 参与细胞的黏附作用. 在中华鳖性腺中, CTNNB1 蛋白主要位于雄性性腺髓质区性索细胞以及雌性性腺皮质区细胞的细胞膜上. 本文以 CTNNB1 免疫荧光染色来辅助显示性腺结构. 如图 4 所示, 在性腺分化之前的第 16 期雄性性腺中, Dmrt1 蛋白开始表达, 定位在体细胞核中, 生殖细胞中未见表达. 第 17 期时, 雄性性腺中的 Dmrt1 蛋白表达量显著增加, 雌性性腺中未见表达. 性腺发育至第 19 期时, 性腺分化已经开始, 雄性性腺皮质区退化, 髓质区发育, 原始性索形成, 而雌性性腺皮质区发育, 髓质区退化, 大量生殖细胞分布在皮质区. 此时, Dmrt1 蛋白大量定位于雄性性腺 Sertoli 前体细胞细胞核中, 围绕原始生殖细胞. 随着胚胎进一步发育, 雄性性腺皮质区进一步退化形成单细胞层, 髓质区继续发育形成性索, Dmrt1 蛋白大量表达, 继续定位在 Sertoli 前体细胞上. 而雌性性腺皮质进一步发育, 髓质退化并出现空泡结构, 未见 Dmrt1 蛋白表达(图 4).

出生后, 中华鳖雄性性腺不断发育形成睾丸, 原始性索发育形成曲细精管, 由 Sertoli 细胞围绕形成, 将各级生殖细胞包绕起来. 在 1~3 龄中华鳖睾丸中, Dmrt1 蛋白继续分布在曲细精管基部的 Sertoli 细胞上, 各级生殖细胞未见表达. 在 3 龄中华鳖卵巢中, 未见 Dmrt1 蛋白表达(图 5).

2.4 *Dmrt1* 基因在性激素诱导的性逆转中的表达变化

本实验室前期研究表明, 在性别分化前, 雄性 ZZ 胚胎经过雌二醇(E_2)处理后, 性腺结构明显雌性化(图 6A 和 B), 雄性特异性基因 *Amh* 和 *Sox9* mRNA 表达显著下调, 雌性特异性基因 *Cyp19a1*(cytochrome p450 aromatase gene 1)和 *Foxl2*(forkhead transcription factor gene 2)则急剧上调(图 6E). 雌性 ZW 胚胎经过芳香化酶抑制剂(AI)处理后, 性腺结构呈现雄性化特征(图 6C 和 D), 雌性特异性基因 *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 表达明显下降, 雄性特异性基因 *Amh* 和 *Sox9* 表达显著上升(图 6E). 这说明, 雌激素能诱导 ZZ 胚胎向雌性发育, AI 能促进 ZW 胚胎向雄性分化. 基于此性激素

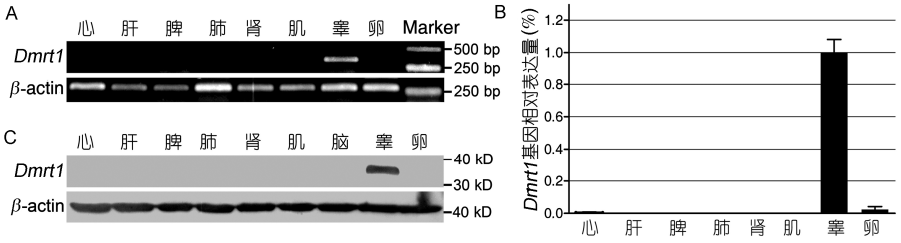


图 2　中华鳖 *Dmrt1* 基因在不同组织中的 mRNA 和蛋白表达分布

A: RT-PCR 检测 *Dmrt1* 在不同组织中的 mRNA 表达水平; B: 实时荧光定量 PCR 检测 *Dmrt1* 在不同组织中的 mRNA 表达水平; C: Western blot 检测 Dmrt1 蛋白在不同组织中的表达分布

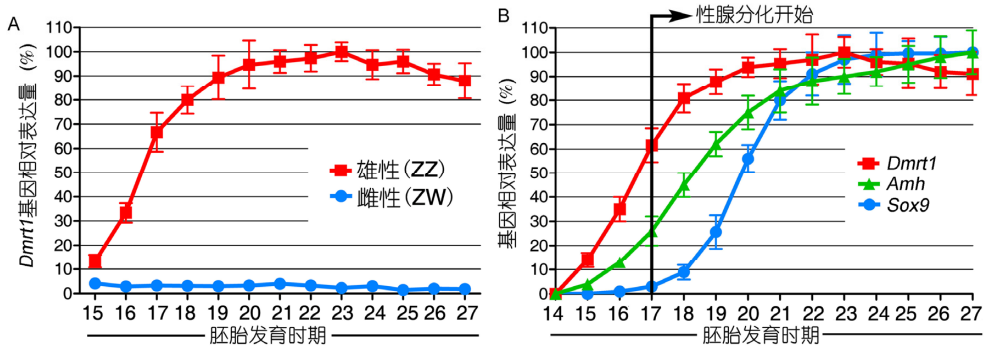


图 3　中华鳖 *Dmrt1*, *Amh* 和 *Sox9* 基因在不同发育时期胚胎性腺中的表达趋势

A: 实时荧光定量 PCR 检测 *Dmrt1* 在第 15~27 期雌雄胚胎性腺中的 mRNA 表达情况; B: 实时荧光定量 PCR 检测 *Dmrt1*, *Amh* 和 *Sox9* 基因在第 14~27 期雄性胚胎性腺中的 mRNA 表达趋势

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

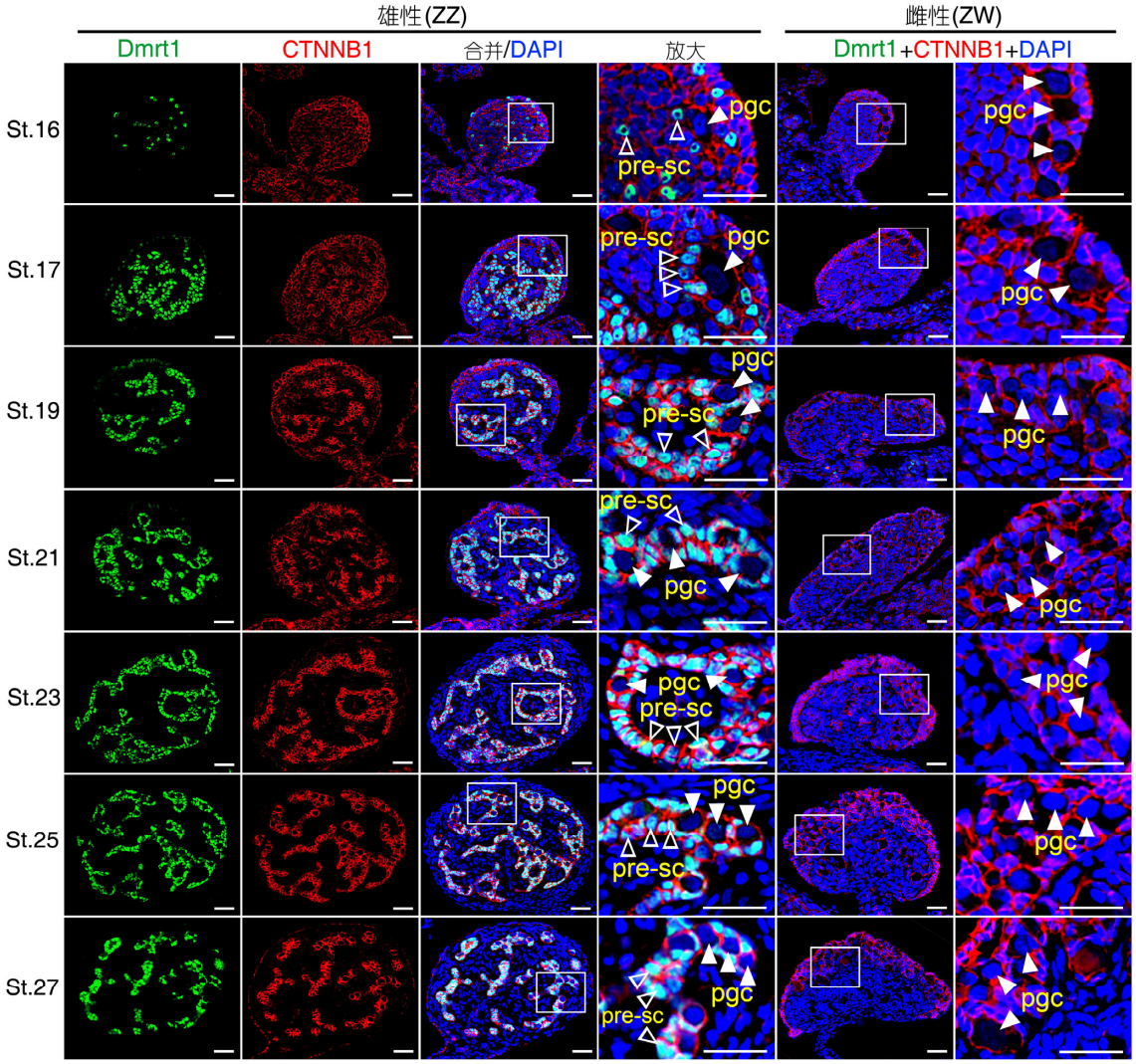


图 4　中华鳖 Dmrt1 蛋白在不同发育时期雌雄胚胎性腺中的细胞定位

16~27 期中华鳖胚胎性腺经过切片, 进行 Dmrt1&CTNNB1 免疫荧光双标染色. pre-sc: sertoli 前体细胞; pgc: 原始生殖细胞. 标尺: 50 μm

诱导的性逆转模型的建立, 本文分析了 *Dmrt1* 基因在性逆转中的表达变化. 实时荧光定量 PCR 结果显示, 在 E_2 诱导的雄性向雌性性逆转过程中, 从 17 期开始 *Dmrt1* 基因表达便显著下降, 25 期至谷底(图 6F). 在 AI 诱导的雌性向雄性性逆转过程中, *Dmrt1* 基因在第 18 期时开始被诱导表达, 26 期表达量达到最高(图 6G).

为了进一步验证 *Dmrt1* 基因在性逆转中的表达变化, 本研究还通过免疫荧光染色检测 Dmrt1 蛋白在性逆转中的表达变化. 脊椎动物性腺分化后, 雌性生殖细胞在胚胎期即进入减数分裂开始分化, 而此时雄性生殖细胞则停滞于有丝分裂 G0/G1 期直至成年性成熟才进入减数分裂. 基于此, 本文以减数分裂特异性蛋白 γH2AX 作为胚胎性腺雌性分子标记. 免疫组化结果显示, 在 27 期正常雄性胚胎性腺中, Dmrt1 蛋白在 Sertoli 前体细胞核中大量表达, 未见 γH2AX 蛋白在生殖细胞中表达(图 7A~A''); 而在正常雌性胚胎性腺中, γH2AX 蛋白在皮质区生殖细胞中大量表达, 但未检测到 Dmrt1 蛋白荧光信号(图 7C~C''). ZZ 胚胎经过 E_2 处理后, Dmrt1 蛋白表达消失, γH2AX 蛋白则被诱导表达(图 7B~B''). 而 ZW 胚胎经过 AI 处理后, Dmrt1 蛋白表达急剧上调, 而 γH2AX 蛋白几

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

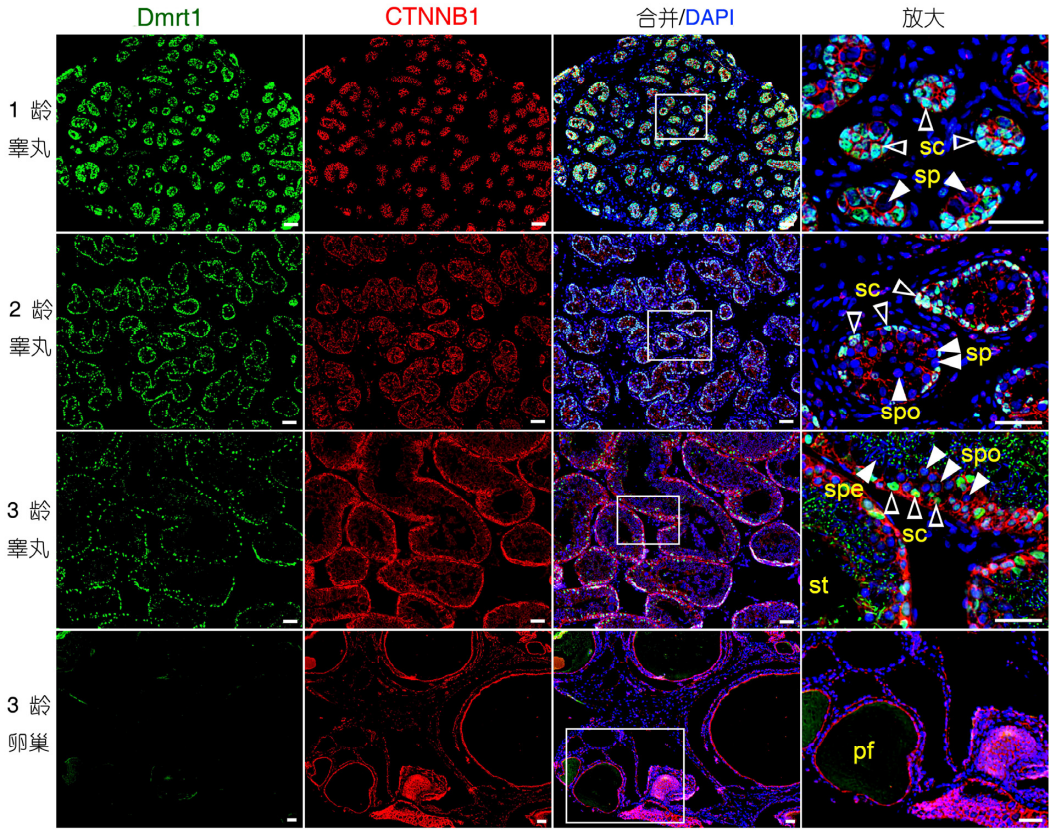


图 5　Dmrt1 蛋白在 1~3 龄中华鳖睾丸和卵巢中的表达分布

1~3 龄中华鳖睾丸和卵巢组织经过固定、切片, 进行 Dmrt1&CTNNB1 免疫荧光双标染色. sc: sertoli 细胞; sp: 精原细胞; spo: 精母细胞; spe: 精子; st: 曲细精管; pf: 原始卵泡. 标尺: 50 μm

乎消失(图 7D~D'').

3　讨论

性别决定是一个可塑的生物发育过程, 一直以来都是发育生物学和进化生物学的研究热点. 大量研究表明, *Dmrt1* 基因在脊椎动物性别决定和性腺分化过程中是一个高度保守的雄性决定调控因子. Smith 等人[4]发现鸡的 *Dmrt1* 基因位于 Z 染色体上, 将雄性(ZZ)个体中的 *Dmrt1* 基因敲低后, 导致雌性化的左侧卵巢的出现以及 *Foxl2* 和 *Cyp19a1* 等雌性基因表达量的上调, 揭示 *Dmrt1* 在鸡雄性性别分化中是必需的. 在鱼类上, 青鳉中位于 9 号染色体的 *Dmrt1* 基因可以复制到 Y 染色体上, 形成 *Dmy* 基因, Matsuda 等人通过突变体手段验证了 *Dmy* 基因为青鳉雄性发育所必需[5]. 龟鳖类上, Murdock 和 Wibbels[8]发现, *Dmrtl* 在红耳龟早期生殖嵴中开始表达, 且雄性个体的表达明显强于雌性. 本研究首先克隆了中华鳖 *Dmrt1* 基因 cDNA 全长序列, 氨基酸序列同源性和系统进化分析发现与其他脊椎动物一样, 中华鳖 *Dmrt1* 具有一个高度保守的 DM 结构域. 实时荧光定量 PCR 和免疫组化结果显示, 早在性腺分化之前的第 15 期雄性性腺中, *Dmrt1* 便开始表达, 先于 *Amh* 和 *Sox9* 基因, 并在不同发育时期雄性性腺中呈现高度特异性表达, 雌性性腺未见表达. 这说明, *Dmrt1* 很有可能参与中华鳖早期性别分化过程, 位于雄性发育分子信号级联通路的上端位置, 作用于 *Sox9*, *Amh* 基因的上游, 与鸡 *Dmrt1* 的功能相似. 而小鼠 *Dmrt1* 位于 *Sry*, *Sox9* 下游, 主要参与后期睾丸分化调控[3,11], *Dmrt1* 在红耳龟雄性性腺中的特异性表达则早于 *Sox9* 等基因[8]. 同时本研究免疫荧光数据显示, Dmrt1 蛋白定位于不同发育时期雄性性腺支持细胞的细胞核上, 生殖细胞上未见表达, 这与小鼠 *Dmrt1* 的表达分布有所不同, 以上研究结果提示, *Dmrt1* 在

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

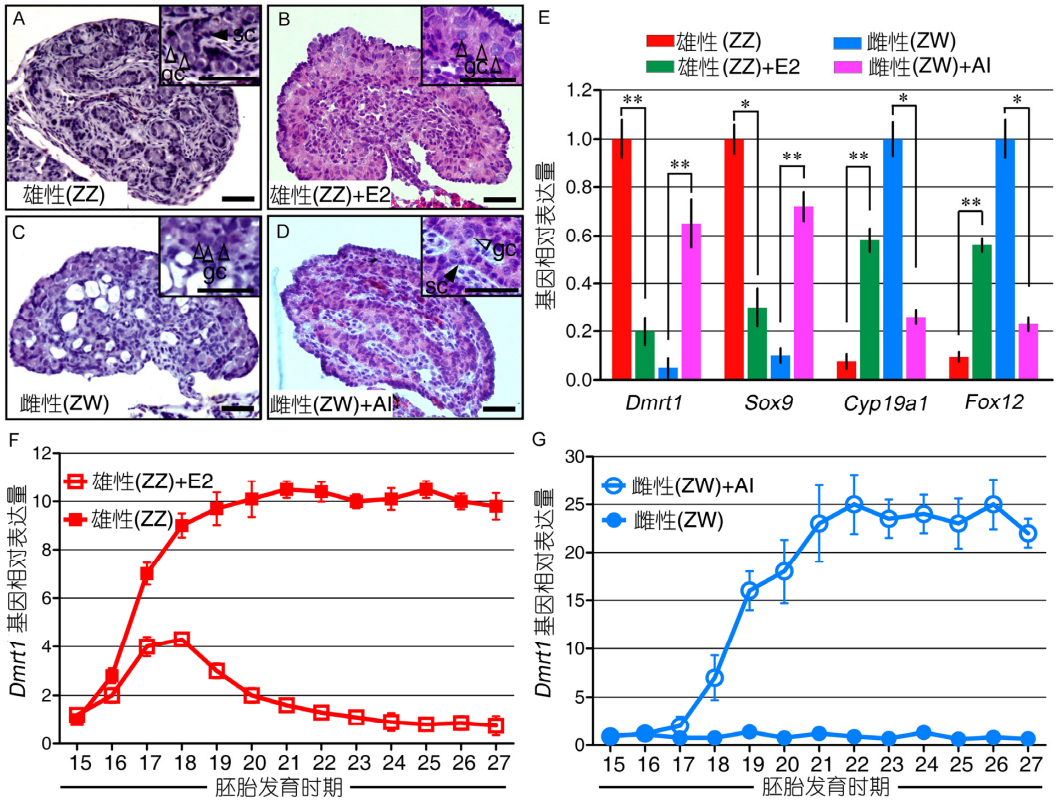


图 6　*Dmrt1* 在性激素诱导的性逆转中的表达变化

A~D: 27 期 ZZ 胚胎性腺、经过 E_2 处理 ZZ 胚胎性腺、ZW 胚胎性腺和经过 AI 处理 ZW 胚胎性腺的组织形态学观察(H&E 染色). sc: sertoli 细胞; gc: 生殖细胞, 标尺: 50 μm; E: 实时荧光定量 PCR 检测在性激素诱导的性逆转中 *Dmrt1*, *Sox9*, *Cyp19a1* 和 *Foxl2* 的 mRNA 表达变化, *: $P<0.05$, **: $P<0.001$; F: *Dmrt1* 在 E_2 诱导的雄性向雌性性逆转中的 mRNA 表达变化; G: *Dmrt1* 在 AI 诱导的雌性向雄性性逆转中的 mRNA 表达变化

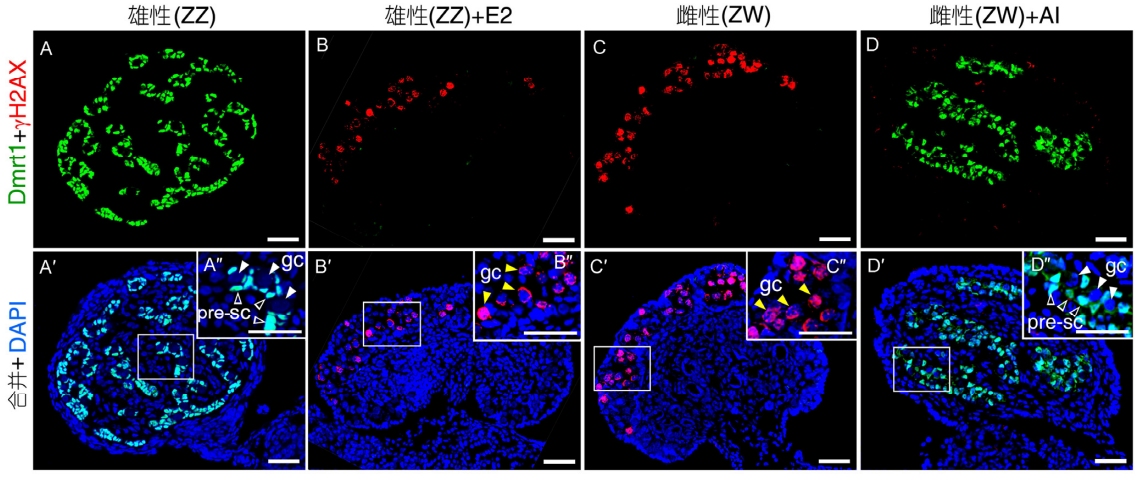


图 7　Dmrt1 蛋白在性激素诱导的性逆转中的表达变化

免疫荧光双标染色检测 Dmrt1 和 γH2AX 蛋白在正常雄性性腺(A~A′′)、E_2 诱导的雄性向雌性逆转性腺(B~B′′)、正常雌性性腺(C~C′′)和 AI 诱导的雌性向雄性逆转性腺(D~D′′)中的表达情况. per-sc: sertoli 前体细胞; gc: 生殖细胞, 标尺: 50 μm

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

雄性性别分化信号级联通路上的调控位置在不同物种中可能存在较大差异.

为了进一步确定 *Dmrt1* 基因在中华鳖雄性性腺分化中的作用, 本实验还研究了 *Dmrt1* 基因在性激素诱导的性逆转中的表达变化. 本实验室前期工作已建立了雌二醇和芳香化酶抑制剂诱导的性逆转模型[12]. 荧光定量 PCR 和免疫组化结果显示, 在雌二醇诱导的雄性向雌性性逆转过程中, *Dmrt1* 基因的 mRNA 和蛋白表达显著下降, 而在芳香化酶抑制剂诱导的雌性向雄性性逆转中, *Dmrt1* 表达则急剧上调. 在两栖动物、鸟类和鱼类中, 雌激素在早期性腺分化中发挥重要的调控作用, 外源性雌激素显著抑制雄性胚胎中 *Dmrt1* 的表达, 甚至使其完全消失[6,13,14]. 在其他龟鳖类上, Shoemaker 等人[15]通过温度置换诱导红耳龟性逆转, 发现 *Dmrt1* 基因表达伴随着性逆转发生显著变化. 此外, 向雄性红耳龟胚胎注射雌激素能显著抑制性腺中 *Dmrt1* 的 mRNA 表达, 而雌性胚胎经过芳香化酶抑制剂处理后, *Dmrt1* 表达则急剧上调[16,17]. 以上研究表明, 龟鳖类动物雌激素主要通过抑制 *Dmrt1* 的表达促进雌性性腺分化, 揭示 *Dmrt1* 在龟鳖类雄性发育级联通路上是一个关键基因. 但是目前 *Dmrt1* 在龟鳖类性别分化中的具体功能尚不明确, 这主要是基因敲除和转基因技术难以在非模式生物上实现的缘故. 最近, Itzel 等人[18]利用 RNA 干扰和体外性腺培养技术成功使太平洋丽龟雄性性腺中 *Sox9* 基因的 mRNA 和蛋白表达量降低 70%~80%, 此技术探索将为龟鳖类 *Dmrt1*, *Sox9* 基因的进一步功能研究打开大门.

综上所述, *Dmrt1* 基因在中华鳖性腺发育中呈现高度雄性特异性表达, 在雄性向雌性性逆转过程中, *Dmrt1* 基因表达显著降低, 而在雌性向雄性性逆转中 *Dmrt1* 则被诱导表达. 本研究初步确定 *Dmrt1* 参与中华鳖雄性性腺分化调控, 关于 *Dmrt1* 的具体功能有待进一步研究.

参考文献

1 Piprek R P. Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals. J Appl Genet, 2009, 50: 347–360
2 Shoemaker C M, Crews D. Analyzing the coordinated gene network underlying temperature-dependent sex determination in reptiles. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20: 293–303
3 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. Genes Dev, 2000, 14: 2587–2595
4 Smith C A, Roeszler K N, Ohnesorg T, et al. The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. Nature, 2009, 461: 267–271
5 Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. Nature, 2002, 417: 559–563
6 Shibata K, Takase, Nakamura M. The *DMRT1* expression in sex-reversed gonads of amphibians. Gen Comp Endocrinol, 2002, 127: 232–241
7 Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle *Dmrtl* prior to sexual differentiation. Genesis, 2000, 26: 174–178
8 Murdock C, Wibbels T. Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. Cytogenet Genome Res, 2003, 101: 302–308
9 Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese soft shelled turtle *Pelodiscus sinensis*(Trionychidae). Zool Sci, 2001, 18: 705–715
10 李国珍. 染色体及其研究方法. 北京: 科学出版社, 1985. 108–164
11 Matson C K, Murphy M W, Sarver A L, et al. *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. Nature, 2011, 476: 101–104
12 王莉, 胡涛, 宓猛冬, 等. 雌激素对中华鳖性腺分化及 *DMRT1*、*SOX9* 基因表达的影响. 水生生物学报, 2014, 38: 469–475
13 Smith C A, Katz M, Sinclair A H. *DMRT1* is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. Biol Reprod, 2003, 68: 560–570
14 Kobayashi T, Kajiura-Kobayashi H, Guan G, et al. Sexual dimorphic expression of *DMRT1* and *SOX9A* during gonadal differentiation and hormone-induced sex reversal in the teleost fish Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dev Dyn, 2008, 237: 297–306
15 Shoemaker-Daly C M, Jackson K, Yatsu R, et al. Genetic network underlying temperature-dependent sex determination is endogenously regulated by temperature in isolated cultured *Trachemys scripta* gonads. Dev Dyn, 2010, 239: 1061–1075
16 Murdock C, Wibbels T. *Dmrt1* expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. J

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148

Exp Zool B Mol Dev Evol, 2006, 306: 134–139
17 Matsumoto Y, Yatsu R, Taylor C, et al. Changes in gonadal gene network by exogenous ligands in temperature-dependent sex determination. J Mol Endocrinol, 2013, 50: 389–400
18 Itzel S R, Horacio M L, Sarah L M, et al. RNAi-mediated gene silencing in a gonad organ culture to study sex determination mechanisms in sea turtle. Genes, 2013, 4: 293–305

Molecular Cloning and Expression Pattern of *Dmrt1* and Its Expression Change in Sex Reversal in *Pelodiscus sinensis*

GE ChuTian, SUN Wei, SANG YaPeng, WANG Li, YANG KeZhou & QIAN GuoYing

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

In many vertebrate species, *Dmrt1* gene is required for male sexual differentiation. In this study, the mRNA and protein expression of *Dmrt1* gene and its cellular localization in gonads of different developmental stages of both sexes were examined to investigate the involvement of *Dmrt1* in sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis*. RACE results showed that the complete cDNA sequence of *P. sinensis Dmrt1* was composed of 230 bp of 5′ un-translated region, 1072 bp of 3′ un-translated region and 1107 bp of open reading frame, bearing a highly conserved DM domain, which encodes 368 amino acids. Real-Time PCR and immunofluorescence analysis revealed that *Dmrt1* gene initiated expression in male embryonic gonad of stage 16 before gonadal differentiation, prior to *Sox9* and *Amh* gene. During the gonadal development, Dmrt1 protein localized in the nuclei of pre-sertoli cells, however, no Dmrt1 signal was detected in female gonad. Moreover, *Dmrt1* expression was significantly decreased in estrogen-induced male to female sex reversal. Whereas, *Dmrt1* was trigged to express in aromatase inhibitor-induced female to male sex reversal. In conclusion, this study indicates that *Dmrt1* gene is a male-specific gene and participates in the male gonadal development, which is likely to play a key role during primary male sex determination in *P. sinensis*.

Dmrt1* gene, gonadal differentiation, male, *Pelodiscus sinensis

doi: 10.1360/N052014-0148

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052014-0148