doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2017.06.001

大黄鱼 gsdf 和 amh 基因的克隆及表达分析

林爱强,谢仰杰,徐双斌,叶 坤,龚诗琦,王志勇 (集美大学水产学院,农业部东海海水健康养殖重点实验室,福建厦门 361021)

摘要:该研究克隆了大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)*gsdf* (gonadal soma derived factor)和 *amh* (anti-Müllerian hormone) 基因的开放阅读框序列并对它们的表达进行分析。大黄鱼 *gsdf* 基因 cDNA 序列开放阅读框长为 618 bp,可编码 205 个氨基酸,含有信号肽和 TGF-β 结构域。系统进化分析显示,大黄鱼 Gsdf 与其他鱼类 Gsdf 聚为一枝,而与 TGF-β 超家族其他成员分开。*Amh* 基因 cDNA 序列开放阅读框为 1 563 bp,可编码 520 个氨基酸,含有信号肽、AMH-N 区域和 TGF-β 保守结构域。系统进化分析显示,大黄鱼 Amh 与舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*)Amh 进化关 系最近。荧光定量 PCR 表达分析显示,*gsdf* 和 *amh* 基因主要在大黄鱼性腺表达,在精巢中的表达量显著高于卵 巢 (*P*<0.05),2 个基因都在性腺分化前开始表达,在雄鱼精巢中表达量呈现先升高后下降的趋势,在卵巢的表达量很低。此外,相比于正常雌鱼,*gsdf* 和 *amh* 基因在伪雄鱼 (遗传性雌鱼)性腺中的表达量显著上调。这些结果表明,*gsdf* 和 *amh* 基因在大黄鱼性腺分化过程中起到重要的作用。

关键词:大黄鱼; gsdf 基因; amh 基因; 基因表达; 性腺分化; 荧光定量 PCR
 中图分类号: S 917.4
 文献标志码: A
 文章编号: 2095 - 0780 - (2017)06 - 0001 - 13

Cloning and expression profiling of *gsdf* and *amh* genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

LIN Aiqiang, XIE Yangjie, XU Shuangbin, YE Kun, GONG Shiqi, WANG Zhiyong (Key Lab. of Healthy Mariculture for East China Sea, Ministry of Agriculture; Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: In this study, the gonadal soma derived factor (gsdf) and anti-Müllerian hormone (amh) were cloned from *Larimichthys crocea*, and their expression patterns were analysed by qRT-PCR. The results shows that the open reading frame (ORF) of *gsdf* gene spaned a region of 618 bp and coded 205 amino acids with a signal peptide and a conserved domain of the TGF- β superfamily. Sequence alignment analysis reveals that the *gsdf* of *L. crocea* and *Dicentrarchus labrax* shared the highest homology. Phylogenetic analysis shows that the fish Gsdf proteins had a clade separated from the rest members of the TGF- β superfamily. The ORF of *amh* gene spaned a region of 1 563 bp and coded 520 amino acids that contained a signal peptide, an AMH-N domain and a TGF- β conserved domain. Phylogenetic analysis shows that Amh proteins of *L. crocea* and *D. labrax* had the nearest relationship. The qPCR analysis reveals that *gsdf* and *amh* genes were expressed mainly in gonad, and the expression levels in testis were significantly higher than that in ovary (*P* < 0.05). Before the gonad differentiation, *gsdf* and *amh* genes had already expressed, and the expression levels of two genes showed an increase-decrease trend in testis whereas the expression levels were very low in ovaries. Besides, compared with normal females, the expressions of two genes had more significant expression in gonad of pseudo-males (genetic females). It is indicated that *gsdf* and *amh* genes play a very important role in the process of *L. crocea* gonad differentiation.

Key words: Larimichthys crocea; gonadal soma derived factor (gsdf); anti-Müllerian hormone (amh); gene expression; gonad dif-

收稿日期: 2017-03-06; 修回日期: 2017-03-29

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31602207); 厦门南方海洋研究中心重大项目 (14GZY70NF34) 作者简介: 林爱强 (1990 –), 男, 硕士研究生, 从事鱼类遗传育种研究。E-mail: Aiqiang_L@163.com 通信作者: 王志勇 (1963 –), 男, 教授, 从事水生生物遗传育种与生物技术研究。E-mail: zywang@ jmu. edu. cn

ferentiation; real time fluorescence qPCR

动物界中普遍存在着性别二态性,然而其性别 决定机制却多种多样¹¹,有遗传性别决定,环境 性别决定,更有两者共同作用的复杂机制。因此, 性别决定基因一直是生命科学研究的热点。自从发 现人类和小鼠的性别决定基因 SRY/Sry 以来 [2-3], 已经在很多物种中发现不同的性别决定基因,而且 分析发现大多数的性别决定基因集中在转录因子部 分,如山羊 (Capra hircus) 雌性性别决定基因 FOXL2^[4], 鸡 (Gallus gallus)和半滑舌鳎 (Cynoglossus semilaevis)的 Dmrt1^[5-6],两栖类非洲爪蟾 (Xeno*pus laevis*)的 DM-W^[7]和青鳉 (Oryzias latipes)的 Dmy^[8]。但是随着研究的深入,发现很多非转录因 子对于性别决定也起到非常重要的作用,如吕宋青 鳉 (O. luzonensis) 和裸盖鱼 (Anoplopoma fimbria) 的 gsdf^[9-10], 银汉鱼 (Odontesthes hatcheri)的 amhy^[11] 以及红鳍东方鲀 (Takifugu rubripes)的 amhr Ⅱ^[12] 等。转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β)是一个拥有众多成员的超家族,这一家族 作用广泛,除影响细胞的增殖、分化、凋亡,对组 织重塑和免疫功能有重要作用外,同时还在胚胎发 育、胞外基质形成、骨的形成和重建等方面也起着 重要作用^[13]。在鱼类性别决定基因的研究中,发 现 TGF-β 信号通路成员在鱼类性别决定与分化中 起重要作用。

Gsdf (gonadal soma derived factor)和 amh (anti-Müllerian hormone) 都属于 TGF-β 超家族成员。Gsdf 基因最早在虹鳟(Oncorhynchus mykis)中被发现, 在虹鳟性腺发育早期, gsdf 基因表达于原始生殖细 胞 (primordial germ cell, PGC) 周围的体细胞中, 在 性腺发育后期,表达于精巢的支持细胞 (Sertoli cells)以及卵巢的颗粒细胞(granulosa cells)中。同 时,在受精卵阶段敲降虹鳟 gsdf 基因的表达后, 虹鳟原始生殖细胞 PGC 的数目降低,表明 gsdf 基 因可能与原始生殖细胞和精原细胞的增殖有关^[14]。 此后,在多种硬骨鱼中成功克隆到 gsdf 基因,如 青鳉^[15]、银大麻哈鱼 (Oncorhynchus kisutch)^[16]、 三斑海猪鱼 (Halichoeres trimaculatus)^[17]、斑马鱼 (Danio rerio)^[18]、尼罗罗非鱼 (Oreochromis niloticus)^[19]等。特别是在罗非鱼的研究中,通过靶向基 因敲除技术敲除 gsdf 基因,发现遗传雄性 (XY)个 体缺失 gsdf 基因导致其发生性逆转,性腺发育为

卵巢, 而在遗传雌性 (XX)个体过表达 gsdf 基因也 能使性腺性逆转为精巢,表明 gsdf 基因在罗非鱼 性别决定中起重要作用。在这些研究中, gsdf 基因 主要在性腺中表达,因此被认为在鱼类性别决定、 分化和生殖细胞的增殖过程中发挥重要的作 用^[12,15-19]。抗缪勒氏管激素 AMH 属于 TGF-B 超家 族的分泌型糖蛋白,在哺乳动物中诱导雄性的缪勒 氏管退化,维持雄性特征。在雄性小鼠缺失 Amh 基因导致小鼠部分雌雄同体,出现子宫和输卵管组 织^[20]。研究表明,在鱼类中并没有发现缪勒氏管, 但却存在 amh 或其同源基因。在银汉鱼中发现 amh 基因在 Y 染色体上有一个特异的复制 amhy, 且该基因在雄性特异表达,时空表达发现 amhy 在 银汉鱼受精后第6天的胚胎中开始表达于精巢的支 持细胞中, 通过敲降 amhy 导致雌性特异基因的表 达上调, 表明 amhy 是银汉鱼的性别决定基因^[11]。 尽管已有研究表明 gsdf 和 amh 基因影响鱼类性别 决定与分化过程,但是在大黄鱼 (Larimichthys crocea)中还未有 gsdf 和 amh 基因的研究报道。

大黄鱼属于鲈形目、石首鱼科、黄鱼属,是中 国重要经济海水鱼类,人工育苗关键技术的突破, 使大黄鱼成为中国南方沿海网箱养殖面积最大、产 量最高的海水鱼类 [21]。与大多海水鱼类相似,大 黄鱼生长存在雌雄差异,雌性生长速度快于雄性且 达到成熟时的个体通常也比雄性大, 使得雌鱼更具 有市场价值,有必要在大黄鱼养殖生产中开展全雌 鱼培育和养殖。然而,目前关于大黄鱼性别分化的 调控网络以及有哪些基因参与到性别决定与分化都 了解得很少,大黄鱼的性别决定机制还不够清楚, 因此开展大黄鱼性别决定机制相关的研究,探索大 黄鱼单性育种技术,对于大黄鱼养殖产业的发展具 有重要意义和应用价值。该研究运用生物信息学的 方法从转录组中注释到大黄鱼的 gsdf 及 amh 基因, 采用分子生物学方法克隆了大黄鱼 gsdf 和 amh 基 因的 cDNA 序列,同时使用实时荧光定量 PCR 研 究这2个基因在大黄鱼不同组织、不同发育时期性 腺的表达规律,并分析它们在雌鱼诱导成伪雄鱼性 腺组织中的表达变化,以期为今后研究这2个基因 和其他性别相关基因的调控关系及大黄鱼的性别决 定与分化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验样品 实验所用的人工养殖大黄鱼 均采自福建省宁德市金陵水产科技有限公司。

1.1.2 实验试剂 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶 回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; TransZol Up Plus RNA Kit、感受态细胞 DH5α 购自 北京全式金生物技术有限公司; GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega)购自上海泰京生物技 术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、pMD19-T、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司 (TaKaRa); 引物在华大基因合成。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备 研究所用大黄鱼样品分别为: 1) 孵化后第6、第13、第20、第27、第34、第 41、第49和第55天分别采集鱼苗样品,将整尾鱼 完整浸入 RNA 保护液中,4℃放置1d,然后更换 RNA 保护液, -80 ℃保存, 用于总 RNA 的提取; 2)分别采集孵化后第69、第84、第98、第112和 第123天的大黄鱼样品,用消毒的刀片去掉鱼的首 尾, 剖开腹部去掉内脏后保存于 RNA 保护液中, 保存方法同上; 3)取8月龄、12月龄、16月龄及 2年龄的成熟大黄鱼性腺样品保存于 RNA 保护液 中,同时取对应每条鱼的鳍条用于基因组 DNA 提 取。8月龄前的样品每个时期至少取20尾,8月龄 后的样品至少有3尾雌鱼和3尾雄鱼;4)分别取成 熟的3尾雌鱼和3尾雄鱼的脑、眼、心脏、肝脏、 脾脏、肾、头肾、肠、胃、肌肉和性腺共11个组 织样品,置于 RNA 保护液中, -80 ℃保存; 5)取 3 尾成熟的伪雄鱼性腺样品,置于 RNA 保护液中, -80 ℃冰箱保存, 取对应的胸鳍用于基因组 DNA 提取。所取鱼的鳍条组织置于95%的乙醇,-20 ℃中保存,用于提取 DNA 进行性别鉴定。

1.2.2 大黄鱼 DNA 的提取及遗传性别的鉴定

未成熟大黄鱼的性别难以根据其外部形态及性腺进行辨别。根据笔者实验室的研究发现,大黄鱼基因组中存在雌雄差异的 DNA 片段(未发表),根据该片段开发出的分子标记可以通过 PCR 扩增及琼脂糖电泳检测准确鉴定大黄鱼的遗传性别。该实验中,首先使用 DNA 提取试剂盒分别提取不同发育时期的大黄鱼及成熟伪雄鱼鳍条的 DNA,所提取的 DNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量并用

MULTISKAN GO 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)测量 DNA 溶度,并将 DNA 溶液稀释至 30 ng•µL⁻¹, -20 ℃保存备用。然后根据笔者实 验室开发的性别特异分子标记对大黄鱼进行遗传性 别鉴定。PCR 扩增体系 (共 10 µL)为 ddH₂O 6.7 µL, 10 × PCR Buffer 1.0 µL, dNTP Mix (2.5 mmol•L⁻¹)0.8 µL,上、下游引物 (10 µmol•L⁻¹, 序列见表 1)各 0.2 µL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U• µL⁻¹)0.1 µL,模板 DNA 1.0 µL。PCR 反应程序 为 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s, 58 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 35 个循环;最后 72 ℃延 伸 10 min,于4 ℃保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电 泳检测根据电泳条带的不同进行性别的判定。

1.2.3 大黄鱼 RNA 的提取和 cDNA 的合成 不 同时期的大黄鱼经性别鉴定后,根据 Trans Zol Up Plus RNA Kit 试剂盒操作说明分别提取不同发育时 期大黄鱼的性腺总 RNA、雌雄大黄鱼成鱼各个组 织中的总 RNA 及伪雄鱼性腺总 RNA,并用 Dnase I 37 ℃ 孵育 30 min 去除基因组 DNA。提取的 RNA 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量并用 MULTISKAN GO 酶标仪测量 RNA 浓度和质量。取 提取的 RNA 2 μg,根据 GoScript[™] Reverse Transcription System 试剂盒说明书合成 cDNA 的第一条 链, cDNA 合成后用内参基因 β-actin 引物 (序列见 表1)对 cDNA 进行检测。

1.2.4 大黄鱼 gsdf 和 amh 基因的克隆 利用笔 者实验室已经测序的大黄鱼转录组数据,经生物信 息学分析得到大黄鱼 gsdf 和 amh 基因片段。根据 参考序列,分别在 gsdf 和 amh 开放阅读框 (ORF) 前后各设计1对引物 gsdf-0 和 amh-0 (序列见表 1), 以大黄鱼精巢 cDNA 为模板, 进行 gsdf 和 amh 片段的 PCR 扩增。20 µL PCR 反应体系包括 RNase Free dH₂O 13.4 μ L 10 × Buffer 2 μ L dNTPs 1.6 μL、正反向引物 (10 μmol·L⁻¹)各 0.4 μL、模板 cDNA 2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 6 U• μL⁻¹)0.2 μL。 PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循 环;最后72℃延伸10 min。扩增产物经1.5%的 琼脂糖凝胶电泳分离后用 DNA 凝胶回收试剂盒回 收目的片段,纯化后的产物与 pMD19-T 载体连接, 转化到感受态细胞 DH5α, 经 LB 平板 (含氨苄青霉 素)培养后,将筛选的阳性克隆送到华大基因有限 公司进行测序。将测序的数据与参考序列进行比对

分析,然后根据比对的序列设计荧光定量 PCR 引物 gsdf-Q、amh-Q (序列见表1)。

1.2.5 序列比较分析 对所获得的 gsdf 和 amh 开放阅读框 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列,采 用 Blast n/p 程序进行同源搜索。用 CLUSTAL W 程 序对搜索得到的 gsdf 和 amh 核苷酸和氨基酸序列 进行多序列比对。利用分析软件 MEGA 5.0 以 Neighbor-Joining 法构建系统树, Bootstrap 设置为 1 000。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 采用 ABI7500 Realtime PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国),按照 SYBR Premix Ex Taq II使用说明,利用引物对 gsdf-Q 和 amh-Q (表1)进行实时定量 PCR 反应。以大黄鱼 *βactin* 为内参,应用 2^{-ΔΔCT}法确定各样品中 gsdf mR-NA 和 *amh* mRNA 的相对含量。20 μ L 反应体系包括 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II Q ×)10 μ L、ROX Reference Dye II 0.4 μ L、正反向引物 (10 μ mol・L⁻¹)各 0.4 μ L、模板 cDNA 50 ng,其余体积用 RNase Free dH₂O 补齐。反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃退火 30 s,荧光采集 82 ℃ 10 s, 40 个循环;熔解曲线反应条件为 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s。PCR 结束后确认扩增曲线及熔解 曲线,以确保其特异性。每个样品重复 3 次。

1.2.7 数据处理 实时荧光定量数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理,相对表达量以平均值 \pm 标准误 $(\overline{X} \pm SE)$ 表

示,采用 SPSS 19.0 软件的 t-检验分析法比较不同 组织中 gsdf 和 amh 基因表达量的差异,显著性水 平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼遗传性别的鉴定

利用笔者实验室开发的大黄鱼性别特异分子标 记对大黄鱼进行遗传性别鉴定,经琼脂糖凝胶电泳 检测 PCR 产物后,根据电泳条带的情况便可判定 待测个体的遗传性别(图1)。雄性个体有2个大小 不同的片段,而雌鱼仅有1个片段。据此,判定了 不同个体大黄鱼的遗传性别。此外,经过人工诱导 雌核发育的子代雌性个体,用17α-甲基睾酮处理 性逆转成伪雄鱼,其性腺外形与大黄鱼雌鱼卵巢相 似,但是成熟的性腺里面生成精子,通过此分子标 记进一步确认其遗传性别是雌性。

2.2 大黄鱼 gsdf 和 amh 基因的克隆及序列分析

根据转录组拼接、注释得到的大黄鱼 gsdf 和 amh 基因的参考序列,分别设计1对引物,通过 PCR 对反转录产物进行扩增,经胶回收、克隆、 测序及比对分析分别得到了大黄鱼 gsdf 和 amh 基 因开放阅读框的 cDNA 序列。大黄鱼 gsdf 基因 ORF 为618 bp,可编码 205 个氨基酸。推导的大黄鱼 Gsdf 氨基酸序列中含有信号肽和 TGF-β 结构域, 在 TGF-β 结构域内含有9 个保守的半胱氨酸残基

	Tab. 1 Frinters and sequences used in the su	luy
引物名 primer name	引物序列 6′-3′) primer sequence	作用 function
mark-F	TGGCTCTGTGAGGCGTCT	性别鉴定
mark-R	ATACAATGATGACATCAATCCTGAT	
gsdf-O-F	ATGTCCTTTACGTTCATTGTCATG	开放阅读框扩增
gsdf-O-R	TTACTCTTCGCTGGGCTGCT	
amh-O-F	ATGTTGTCGGTGGATGTCTTCTG	
amh-O-R	TTAGCGGCATCCGCACTC	
gsdf-Q-F	CTGATGGTGGAAACAGTACGAGCC	荧光定量 PCR
gsdf-Q-R	AGAGTGCACACTGAACGACAGTC	
amh-Q-F	AGCCAACATCAACAACTGCC	
amh-Q-R	TTCATCCAAGTCCACCACCT	
β-actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	β-actin 内参引物
β-actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

表1 相关引物及其碱基序列 Tab 1 Primers and sequences used in the study



图 1 大黄鱼遗传性别的鉴定 Fig. 1 Identification genetic sex of large yellow croaker

(图 2)。使用 NCBI 的 Blastp 分析大黄鱼 Gsdf 氨 基酸序列与其他物种的同源性(表 2)。结果显 示,大黄鱼 Gsdf 氨基酸序列与舌齿鲈 (Dicentrarchus labrax)同源性最高 (69%), 与青鳉同源性为 52%, 与斑马鱼的同源性仅有 33%。对鱼类 Gsdf 氨基酸序列与 TGF-β 超家族内的其他成员使用 MEGA 5.0 构建系统发育树。结果显示, 鱼类 Gsdf单独聚为一枝,与超家族内的其他成员分开, 大黄鱼与赤点石斑鱼 (Epinephelus akaara)、裸盖 鱼的亲缘关系较近,先聚为一枝,然后再与其他 鱼类聚在一起(图3)。大黄鱼 amh 基因 ORF 为1 563 bp, 可编码 520 个氨基酸。推导的大黄鱼 Amh 氨基酸序列中含有信号肽,并包含1个 AMH-N 区域和 TGF-β 结构域,在 AMH-N 区域内 含有3个保守的半胱氨酸残基,在TGF-β结构域 内含有7个保守的半胱氨酸残基(图4)。使用 NCBI 的 Blastp 分析大黄鱼 Amh 氨基酸序列与其 他物种的同源性(表3),结果显示,大黄鱼 Amh 氨基酸序列与舌齿鲈相似性最高 (76%), 与青鳉 相似性为53%,与斑马鱼相似性最低(42%)。 使用 MEGA 5.0 对大黄鱼 Amh 氨基酸序列与其他 脊椎动物的 Amh 构建系统发育树,结果显示大黄 鱼 Amh 紧密的和其他鱼类 Amh 聚为一枝, 且与 鲈形目的亲缘关系最近(图5)。

2.3 大黄鱼 gsdf 和 amh 基因在不同组织、不同发育时期及伪雄鱼性腺的表达分析

通过实时荧光定量 PCR 对雌性和雄性大黄鱼脑、眼、心脏、肝脏、脾脏、肾、头肾、肠、胃、肌肉和性腺共 11 个组织进行表达分析,结果显示在这些组织中 gsdf 和 amh 基因的表达量存在很大

表 2 大黄鱼 Gsdf 氨基酸序列的同源性分析 Tab. 2 Homology of *L. crocea* Gsdf amino acid sequence with other species

物种 species	基因 gene	相似性/% similarity
舌齿鲈 Dicentrarchus labrax	gsdf1	69
赤点石斑鱼 Epinephelus akaara	gsdf	67
舌齿鲈 Dicentrarchus labrax	gsdf2	66
黄鳝 Monopterus albus	gsdf	63
裸盖鱼 Anoplopoma fimbria	gsdf	62
黄鳍棘鲷 Acanthopagrus latus	gsdf	61
斑马宫丽鱼 Maylandia zebra	gsdf	60
尼罗罗非鱼 Oreochromis niloticus	gsdf	60
莫桑比克罗非鱼 Oreochromis mossambicus	gsdf	59
大菱鲆 Scophthalmus maximus	gsdf	59
三斑海猪鱼 Halichoeres trimaculatus	gsdf	58
红鳍东方鲀 Takifugu rubripes	gsdf	53
青鳉 Oryzias latipes	gsdf	52
虹鳟 Oncorhynchus mykiss	gsdf	43
斑马鱼 Danio rerio	gsdf	33

差异。Gsdf基因特异表达于大黄鱼性腺中,而且在 精巢中高表达,约是卵巢中的6倍,在其他组织未 检测到有表达; amh基因同样在精巢中高表达,约 是卵巢中的8倍,而在其他组织表达量很低(图6 - a和6-b)。对大黄鱼gsdf和amh基因在性腺不 同发育时期的表达分析表明,在雄鱼精巢中gsdf 和amh基因都在孵化后第41天(41 dph)检测到微 量表达,而在孵化后55 dph表达都明显上调,在 孵化后123 dph达到最高峰,此后表达量下降。与

		signal peptide L
大黄鱼 L.crocea 舌齿鲈 D.labrax(Gsdf-1) 赤点石斑鱼 E.akaara 舌齿鲈 D.labrax(Gsdf-2) 黄鳝 M.albus 凝盖鱼 A.fimbria 黄鳍鲷 A.latus 斑马宫丽鱼 M.zebra 尼罗罗非鱼 O.niloticus 莫桑比克罗非鱼 O.mossambicus 大菱鮃 S.maximus 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 红鳍东方鲀 T.rubripes 青鳉 O.latipes 虹鳟 O.mykiss 斑马鱼 D.rerio	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	SFT- FI VMTVLLGS PNALAFILOP SKEEP VNSPN HRCQVESLGSI RKVLLRALNLCVEPQLP AS GUDRFREQ NSFT- FI VI MMLLGSS VTI AF VLKP SKEES AAS ANS PVSP- HRCQGESLGSI RKSLLRGLNLCVEPQLP AGGUDGVREQ NSFT- FI VIMMULGSS VVI AF VLOP SREEP AAS ANS PVSP- HRCQGESLGSI RKGLLRGLNLCVEPQLP AGGUDGVRAQ NSFT- FI VITMLLGSS VVI AF VLOP SKEEP AAS ANS PVSP- HRCQGESLGSI RKGLLRGLNLCVEPQLP AGGUDGVRAQ NSFT- FI VITMLLGSS VVI AF VLOP SKDEP TAA SANS PVSP- HRCQGESLGSI RKGLLRGLNLCVEPQLP AGGUDGVRAQ NSFT- FVTTMLLGSS VVI AF VLOP SKDEP TAA SANS PVSP- DRCHGESLGSI RKGLLRGLNLCVEPQLP AGGUDGVREQ NSFT- FVTTMLLGSS VVI AF VLQS SKEEP TAS ANS PVSP- PRCQGGSLGFTRKSLLGALLCTEPQLRAGGDGR REH NSLT- FSVMMLLGVS VVI AF VLQS SKEEP TAS ANS PVSN- PRCQGGSLGFTRKSLLGALLCTEPQLRAGGDGR REH NSLT- FSVMMLLGSS VVI AF VLQS SKEEP TAS ANS PVSN- PRCQGGSLGFTRKSLLGALLCTEPQLP AGGLDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG HRCQGES WSI RKNLL SVL.CTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MMAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MVAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NAFA- FI VMTLLGSS MVAF VLDP SRKEPEAAVLG DRCQGES WSI RKNLLRVLNLCTEPQLP AGALDS WREQ NSCA- FI VMTLLGSS VVI AF VLDP SRKEPEAAVSD QRCHGESLGSI RKSLLRULLVLNLCTEPQLP AGGUDAVRGL NSCA- FI VMTLLGSS VVI AF VLDP SRKEPEAAVSD
十黄色 Laroog	75	SEKUL DADRKAEDTAVPAVSGYSASPDGGINSTSUKCOSMASHUPINKIDUGWDTWMHIPVSUTVVOO ALGNPEVNTVOO
人員 単 L.crocea 舌齿 鲈 D.labrax(Gsdf-1) 赤点石 斑鱼 E.akaara 舌齿 鲈 D.labrax(Gsdf-2) 黄鳝 M.albus 裸 盖鱼 A.fimbria 黄鳍鲷 A.latus 斑马宫丽鱼 M.zebra 尼罗罗非鱼 O.niloticus 莫桑比克罗非鱼 O.niloticus 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 红鳍东方鲀 T.rubripes 青鳉 O.latipes 虹鳟 O.mykiss 斑马鱼 D.rerio	79 779 779 779 779 779 779 779 779 779	STFSNI ADRAKDAAVPAVSGYSVSPDDGSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDNWI HPASLAIVQCALCNPEVNTACCP RKTFSTLTHRAKDTAVPAVSGYSVSPDDGSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDNWI HPASLAIVQCALCNPEVNTACCP RSTFSNMARRAKDSAVPVVSGYSVSPDDRSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDNWI HPASLAIVQCALCNPEQNTVCCP RTTFSTITHRAMDTAVPASGYSVSPDDRSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDNWI HPASLSIVQCALCNPEQNTVCCP RTTFSTITHRAMDTAVPASGYSVSPDDGSTGLRCCPMASEIFNSBLGWDSWVI HPASLSIVQCALCNPEQNTVCCP RTTFSTITHRAMDTAVPASGYSVSHDDENSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDSWVI HPASLTIVQCALCNPEQNTVCCP RTTFSTITHRAMDTAVPASGYSVSHDDENSTSLKCCSMASEIFNKDLGWDSWVI HPTSLTVIQCALCNPENTVCCP RTTFSTISINTHRAMTATPAVPGYSASADNONRASLNCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPTSLTVIQCATCNSAMTTVCCP NRTFSIVSHTAKHTATPAVPGYSASADNONRASLNCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCATCNSAMTTVCCP RSTFSVISTAKHTATPAVPGYSASADNORSASLKCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCATCNSAMTTVCCP RTFSIVSHTAKHTATPAVPGYSASADNGSASLKCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCATCNSAMTTVCCP RSTFSVISTAKHTATPAVPGYSASADNGSSASLKCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCATCNSAMTTVCCP RSTFSVISTAKHTATPAVPGYSASADNGSSASLKCCSIASEIFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCATCNSAMTTVCCP RASFSNIAQKTRDAAVPAISSSPDGGSTSLKCCTSSSEVFNKDLGWDSWVI HPLSLTVVQCALCSPEGDVVCCP RTTFNNARAEDPAVLVDDFTASAEGGSSTCLKCCPLASEVFNKDLGWDSWVI HPSSLTVVQCALCSPEGDVVCCP RTAFSAISHKTQDKAVALPQAEGPAADSSCIICCPLASEVFNKDLGWDSWVI HPSSLIILTCALCDPQGNVVCCP RTAFSAISHKTQDKAVALPQAEGPAADSSCIICCPLASEVFNKDLGWDSWVI PESSTVVQCSPCKSRLDLSPSRCP KNSIHSPPGNSSLPEDSGSSCCRXSQVLVKDLGWDGWVVLPESVAFVQCSPCSGS
大黄鱼 L.crocea 1	53	0 NP DAOVTICCOP TISIOK MURIVI NIMPELATI TI SISMOTI TNSICICO GYGNI OOP SEE
舌齿鲈 D.labrax(Gsdf-1) 」 赤点石斑鱼 E.akaara 」 舌齿鲈 D.labrax(Gsdf-2) 」 黄鳝 M.albus 」 繊盖鱼 A.fimbria 」 黄鳍鲷 A.latus 」 斑母宫丽鱼 M.zebra 」 皮子宫丽鱼 M.zebra 」 夏桑比克罗非鱼 O.noiloticus 」 支桑比克罗非鱼 O.mossambicus 」 大菱鮃 S.maximus 」 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 」 红鳍东方鲀 T.rubripes 」 青鳉 O.mykiss 」 斑鳟 O.mykiss 」 斑鸟鱼 D.rerio 」	157 152 157 154 157 154 153 153 153 153 153 153 153 153 154 157 156 156 156	SSHTNVEEADSQAQNPCCQPTSQEWVPVVVLDEFSTLVISSVQLTHSCGCEHGNIQQPSEE SSHANVQEADSQVSCQOPTSQEWVPVVVLDEFSTLVISSVQLTHSCGCEHGNIQQPSEE SSHTNVQDADSQAQLPCCQPTSQEWVPVVVVLEFSTLVISSVQLTHSCGCEHGNIQQPSEE SSHTDAQDADSQTLVPCQSTSQEWVPVVVVLEFSTLVISSVQLTHSCGCEHGNIQQPSEE SSHTDAQDADSQTLVPCCQPTSQEWVPVVVVLEFSTLVISSVQLTHSCGCEHGNIQPSEE SSDINVQDAESQVPCCPTSQEWVPVVVVLESTVVISSVQLTSSCGCGGGNSDPSEE SSDINVQDSQVPVCCNPTSHKSVPVIVVLESTVVISSVQLTSSCGCGGGNSDPGKE SSQVNVQDANTQDQVPCCRPTSQEEVPIVVVLESTVVISSVQLTSSCGCGGGNSDPGKE SSQVNVQDANTQDQVPCCRPTSQEEVPIVVVLESSTIVISSNQLTRSCGCGLGNSEDRGKE SSQVNVQDANTQDQVPCCRPTSHEEVPIVVVLESSTVVISSNQLTRSCGCGLGNSEDRGKE SSQVNVQDANTQDQVPCCRPTSHEEVPIVVVLESSTVVISSNQLTRSCGCGLGNSEDRGKE SSQVNVQDANTQDQVPCCQPSQEWVPVVVVESGTVVISSNQLTRSCGCGLGNSEDRGKE SSLSSVQDAGPQVQVPCCQAAFQETVPILVVDQSGSVVLSSIQLTSSCGCGGAGNIQPSKE SSLSSVQDAGPQVQVPCCQAAFQETVPILVVVVESGTVVISSNQLTRSCGCGGGNSDMGPSKE SSQSSTLDANLQPNCCQLTSKKNVPIVVVDFSTIVISSVQLARGCGGPGSAQQPCKK SHAPPAQDTPSQNPCQTSTELVPFLVVPESTIVISSVQLARGCGGPGSAQQPCKK SHAPPAQDTPSQNPCQTSTEHVVPFLVVMCSFTIVISSVQLARGCGGPGSAQQPCKK SHAPPAQDTPSQNPCQTTSTEHVVPFLVVMCSGCLVLSTVRLPRDCGCDLAEDTLDPAAMSPP

图 2 大黄鱼 Gsdf 氨基酸序列和其他鱼类 Gsdf 氨基酸序列的比较

箭头代表信号肽切割位点,黑色上画线为 TGF-β 结构域,9 个保守的半胱氨酸残基用星号表示

Fig. 2 Alignment of amino acid of L. crocea gsdf with other vertebrate fishes

The arrow indicates the putative cleavage sites of the signal peptide. The TGF- β domain is labeled with black overline.

The nine positions with conserved cysteines are marked by asterisks.

此相比,在卵巢中 gsdf 和 amh 基因表达量都很低, gsdf 基因在卵巢中的表达量也呈现先升高后下降的 趋势,且在孵化后 123 dph 达到最高;而 amh 基因 在卵巢中的表达量一直处于很低的水平(图7-a和 7-b)。此外,对大黄鱼 gsdf 和 amh 基因在成熟的 正常雌雄鱼和伪雄鱼性腺的表达量分析显示,相对 于正常雌鱼,gsdf 和 amh 基因在伪雄鱼性腺的表 达量显著上升(图8-a和8-b)。 红鳍东方鲀、三刺鱼 (Gasterosteus aculeatus)和青鳉 等鱼类中发现该基因。然而,此前的研究发现 gsdf 基因仅限于硬骨鱼类,后来在肉鳍鱼类矛尾鱼 (Latimeria menadoensis)^[22]和软骨鱼类象鲨 (Callorhinchus milii)^[19]中也发现了 gsdf 基因,表明 gsdf 基因不只是存在于硬骨鱼类。目前,在比鱼类更原 始的物种中,以及鱼类之后的四足类中都未能发现 gsdf 的同源基因^[23],推测 gsdf 基因可能只特定存 在于鱼类,并且该基因的出现有可能是基因组复制 的产物。结合主流的基因组复制学说,第一次基因 组复制发生在脊椎动物有颌类和无颌类分离前,而

3 讨论

从发现虹鳟 gsdf 基因以来,不断地在斑马鱼、







表 3 大黄鱼 Amh 氨基酸序列的同源性分析 Tab. 3 Comparative identity of *L. crocea* Amh amino

acid	sequence	with	other	species	
------	----------	------	-------	---------	--

物种 species	相似性/% similarity
舌齿鲈 Dicentrarchus labrax	76
裸盖鱼 Anoplopoma fimbria	71
金钱鱼 Scatophagus argus	70
奥利亚罗非鱼 Oreochromis aureus	67
银汉鱼 Odontesthes bonariensis	61
三斑海猪鱼 Halichoeres trimaculatus	60
青鳉 Oryzias latipes	53
虹鳟 Oncorhynchus mykiss	49
斑马鱼 Danio rerio	42

第二次基因组复制只发生在有颌类,第三次基因组 复制是辐鳍鱼类特有的基因组复制^[24],推测 gsdf 基因可能是在第二次基因组复制而产生的新基因, 且该基因对于鱼类有特殊的功能。该研究中氨基酸 序列分析显示,大黄鱼 Gsdf 存在 TGF-β 功能结构 域,且在该保守域内有9个半胱氨酸残基。在鱼类 中,TGF-β 这些半胱氨酸残基相对保守,即其保守 半胱氨酸的数量稍有不同。与大黄鱼相比,在三刺 鱼 Gsdf 蛋白的 TGF-β 保守域内,缺少第6位的半 胱氨酸残基^[17]。TGF-β 超家族成员总体上有6个 保守半胱氨酸^[14],这种结构上的保守也可能说明 了其在功能上的保守。系统进化分析显示,大黄鱼

	signal peptide
大黄鱼 L.crocea 舌齿鲈 D.labrax 裸盖鱼 A.fimbria 金钱鱼 S.argus 奧里亚亚罗非鱼 O.aureus 银汉鱼 O.bonariensis 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 青鳉 O.latipes 虹鳟 O.mykiss 斑马鱼 D.rerio	MLSVDVFCCGTLML CAALQVSHGQQQI P VHDTTTTVK- GDHQTTSSTHTGD- VP HNAPCF NDDI F MLSVDVFYCGALMLCWTRLCVALQVSQGLQPI P AWNHMMT- GDHYTS-STETTDSLEMKNNVP HRAPCF NDDI F MLCDFFFCGALMLCCTRLCVALLASHGQQPI LDHDPTET- EHTFPSTDNSSASTVSHHDP INAPCF NDDI F MLVADVFYSGALMLCWTSLCVI LQVSHGQQLI P VQDPTTT- GDHHATGSTETRDDLEI KNRVPLCAPCF NDDI F MLVADVFYSGALMLCWTSLCVI LQVSHGQQLI P VQDPTTT- GDHHATGSTETRDDLEI KNRVPLCAPCF NDDI F MLVADVFYSGALMLCWTSLCVI LQVSHGQQLI P VQDPTTT- GDHHATGSTETRDDLEI KNRVPLCAPCF NDDI F MLVALVFYSGALMLCWT LQVSHGQQLI P VQDPTTT- GDHHATGSTETRDDLEI KNRVPLCAPCF NDDI F MLVLVFYSGALMLCWT LQVSHGQQLI P VQDPTTT GDHHATGSTETRDDLEI KNRVPLCAPCF NDI F MLVUFSSWLGVA- VQVVHRQSPLPI PGASEH AFPSANVTSSAP HNLI PCF NDI V MLVDFFVSGVLMLCCSRMCVALI PLVNPAVTGDHPTSGTTETGGGLE- I TNTTHTSSTKTSSDSTVLHPI PNLPPCF NDNVL NDNVL NDNVL MLVLLFWI GLAG TQQVQHS- STGTD RKVPCFF NDAV MRLWCI F OLI LLLPSTNVTLPHQGRLSDSLLGRCQEDPTP DHPGTGPGDNRSVEVGKGLGENALTVKETI NSHPSAPHLPGDTPCF NDAV NRVPCFF NDAV MLVLFFWIGLAG GSYCATMRHEEQDNNPKVNPLSELN GDQLEVRDLACVHRQQPTDQHATEDTPF EQKTL M
大黄鱼 L.crocea 64 舌齿鲈 D.labrax 77 線盖鱼 A.fimbria 77 金钱鱼 S.argus 74 奥里亚罗非鱼 O.aureus 60 银汉鱼 O.bonariensis 55 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 85 青鳉 O.latipes 39 虹鳟 O.mykiss 10 斑马鱼 D.rerio 75	VAURE AVGNDGELTNS SUANFGLOTVS - DSSGS VLLEUS RET NRNRP EVLHP VGVHLAE - DDERGTLTLTH DLPQS AFLKLN - PVLLLAFESULTGE AAURE GVGHDGELTNS SUTOFGLOTVS DSSGS VLLEUAKET NQRDGLEVLHP AGVHLAE - EDERGTLTLTH DLPQS AFLKLN - PVLLLAFESULTGE AVURE AVGNDGELTNS SUTOFGLOTTS DSSGS VLLEUAKET - NQRDGLEVLHP AGVHLAE - EDERGTLTLTH DLPQS PLLKLS - PALLAFESULTGG AVURE AVGNDGELTNS SUTOFGLOTTS DSSGS VLLEUAKES I RDQRLGFEVLHP TGVLLAE - EDERGTLNLTH DLPQS PLLKLS - PALLAFESULTGG AAURE GVGNNGELTNNSLALF GV TAS - GSSGS VLLEUTKESKRNQRNGLELLNRDGVLS AE - EDETGTLKLTH DLPQS PLLKLS - PALLAFESULTGG AAURE GVGNNGELTNNSLALF GV TAS - GSSGS VLLEUTKESKRNQRNGLELLNRDGVLS AE - EDETGTLKLTH DLPRS PLLGLN - PVLLGVESULAG AAURE GVGNNGELTNNSLALF GV TAS DSSGS VLLEUTKESKRNQRNGLEUNDGVLS AE - EDETGTLKLTH DLPRS PLLGLN - PVLLGVESULARG AAURE AVGNDG GULADS SUSLFG GV SAS SAS VS DLD ANKK SSLEVLHP AAVHVSE - EEGGTLT TLTH DLPRS PLLKLN - PVLLGVESULARG AAURE AVGNDG GULADS SUSLFG GV SAS SAS SSLUS DLANKK SSLEVLHP AAVLVSE ODERAALAVTT DLPRS PLLKLN - PVLLGVESULARG AAURE GVDSGELTNOTT TLFGLCTS ASSASI I TKUSKESHRNQRNGLAVLRIS GELLSE - GEGGCLLKUTT DLPRS PLLKLN - PVLLGVFESULAFE AAURE ALQTDGALS NS SUTLFGA CRAP DPSSRSTLLV SEERRRWP DGGLKVRQP AAVFATE ERGVVTLTH DLPAS SLLENNLLLLLAFESDAAG SAURE GWGGESDURKE DTRFGVCSHS DGAP VP ALSTLAEEAK - KEKHGLHVMPH TKELNEG EVEGGLGLVTH HLIRPPLSNIK - PILLUAFRNDRTGA NEFLSALKS AREEG - KNDFVGT SSOVSHUVGSVLQK VSGLKWPATEDI WDA - DNEGGITLTETFIKHSLP AGPAS VMLLFSVNDVKGD AMH-N
大黄鱼 L.crocea 151 舌齿鲈 D.labrax 169 裸盖鱼 A.fimbria 177 金钱鱼 S.argus 177 奥里亚罗 #鱼 O.aureus 155 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 18 青鳉 O.latipes 133 虹鳟 O.mykiss 194 斑马鱼 D.rerio 17	NUDVTFTS QSLCPINTCS VCTSGETRYI M TCKAS ESNVHQKWRI S VVTKSPDMKQS
大黄鱼 L.crocea 25 舌齿鲈 D.labrax 26 裸盖鱼 A.fimbria 25 金钱鱼 S.argus 26 奧里亚亚 罗非鱼 O.aureus 24 银汉鱼 O.bonariensis 24 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 27 青鳟 O.latipes 23 斑鳟 O.mykiss 29 斑马鱼 D.rerio 27	SPASSQTSSFLCELKRFLGDILL EDHP VSPPLQUDSLQSLPPLTLGLSSSETULAGLINSSALDINSTSSWS-RFQVHHGELALSPALLEEUGQR SLASSQTSSFLCELKRFLGDVLPQAHPESPKLQLTTLQSLPPLTLGSSSETULAGLNSSALDINSTSSWS-RFQVHHGELALSPALLEEUQQR SLASSQTSSFLCELKRFLGDVLPQHPESPKLQLTTLQSLPPLTLGSSSETULAGLNSSSALDINFDTTNWGSMFQVHHGELALSPALLEEUQQR SPASSQTSSFLCELKRFLGDVLPQDHTSSPLQLTSLQSLPPLTLGSSSETULAGLNSSSITTLSSFSWGSVFQVHGELALSPALLEEUQQR SPASSQTSFLCELKRFLGDVLPQDHTSPPLQLTSLQSLPPLTLGSSSETULAGLNSSSITTLSSFASCCSVFRVHRGELALSPALLEEUQQR SPASLQTSFLCEVKRFLGAVLPQDHTSPPLQLTSLQSLPPLTLGSSSETULAGLNSSSALTINSFSSWGSVFQVHGELALSPALLEEUQQR SPASLQTSFLCEVKRFLGAVLPQDHTKLPLLPVDPLQSLPPLALGLSSSETULAGLNSSSALTINSFSWGSVFQVHGELALSPALLEEUQQR SPASLQTSFLCEVKRFLGAVLPQDHTKLPLLPVDPLQSLPPLALGSSSETULAGINSSALTINSSALTINSSSVGSFQUHRLALSPALLEEUQQR SGVP.VQTSFLCEVKFLGAVLPQHTKLPLLPVDPLQSLPPLALGSSSETULAGINSSALTINSSALTINSSALTINSSSVGSFQUHRLESSSPALLEEUQQR SGVP.VQTSFWCELRFLEQVLPQDHTKLPLLPVDPLQSLPPLALGSSSETULAGLNSSALTINSSALTINSSALTINSSSQUSSFQUHREEUSSPALLEEUQQR SGVP.VQTSFWCELRFLEQVLPQDHTKLPLLPVDPLQSLSSSTULAGINSSALTIN
大黄鱼 L.crocea 344 舌齿鲈 D.labrax 355 裸盖鱼 A.fimbria 355 柔鱼名 S.argus 366 奥里亚罗非鱼 O.aureus 339 银汉鱼 O.bonariensis 333 三斑海猪鱼 H.trimaculatus 360 青鳉 O.latipes 329 斑鳟 O.mykiss 399 斑马鱼 D.rerio 37	EQTVVQI MEVI REEENGHRATERLGRUREUSAFPK- KEPP AGESQYRNFULLKALQTVARMYDVQRGLRATRADPNNPARGNI GGUKSLTVSL EQTVLHTMEVI REEDVGRRATERLGRUKQU SAFPE- KEPA AGESQYRNFULLKALQTVARTYEVQRGLRATRADPNNPVRGHTGGRSLTVSL EQIVVKI MEVI REEQVGRATERLGRUKDUSALSM- NEPS AGESQYRNFULLKALQTVARTYEVQRGLRATRADPNNPVRGQCGRSLTVSL EQAVNQI MEVVREEEVGYRATERLGRUFUCHU EUCVPGGTNNR
大黄鱼 L.crocea 43' 舌齿鲈 D.labrax 45' 裸盖鱼 A.fimbria 44' 建鱼 Sargus 45' 奥里亚罗非鱼 O.aureus 43' 银汉鱼 O.bonariensis 43' 百黄鳉 O.latipes 43' 虹鳟 O.mykiss 48' 斑马鱼 D.rerio 46'	EKHLVGPNTANI NNG GOS AF PLVNPKNHGVLLNS HE SGNTDERAPCCVPVS NDALE WVDLD-EHGMTYVSI KTDVVAKECGCR EKLUVAPNTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS Y E SGNVGERAPCCVPVTBEALE WVLNEHGTYLSLEEDVVARECGCR EKRLGLPNTNI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS Y ESENVDERAPCCVPVAYEALE WVLNEHGTYLSLEEDVVARECGCR EKNJ GPNTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H EGGAAS GNVOGRAPCCVPVAYEALE WVLNADGTFI ELRLVYVARECGCR TKLLVGPS SANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H EGGAAS GNVOGRAPCCVPVAYEALE WVDNADGTFI SI KPDAVARECGCR EKULI GPRTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H EGGAAS GNVOGRAPCCVPVAYEALE WVDNADGTFI SI KPDAVARECGCR EKULI GPRTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEALE WVDNADGTFI SI KPDAVARECGCR EKULI GPRTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEALE WVDNEHGTYLSI KPDM VKECGCR ESTLVGPNTANI NNG HOS AFPLVNPKNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEALE WVDNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKULI GPSANI NNG HOS SFPLI NGNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEHLE WNDLNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKULLSPPEANI WNG GOVOS FPLI NGNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEHLE WNDLNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKULLSPPEANI WNG GOVOS FPLI NGNHAULLNS H ESGNANERAPCCVPVAYEHLE WNDLNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKYLLSPPEANI WNG GOVOS FPLI NGNHAULLNS H ESGLALERSPCCVPVAYEHLE WNDLNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKYLLSPPEANI WNG GOVOS FPLI NGNHAULLNS H ESGLALERSPCCVPVAYEHLE WNDLNDEGSFLSI KPDM VKECGCR EKYLLSPPEANI WNG GOVOS FPLI NGNHAULLNS H E

图4 大黄鱼 Amh 氨基酸序列和其他鱼类 Amh 氨基酸序列的比较

箭头代表信号肽切割位点,灰色上画线为 AMH-N 区域,黑色上画线为 TGF-β 结构域,10 个保守的半胱氨酸残基用星号表示

Fig. 4 Alignment of amino acid of L. crocea Amh with other vertebrate fishes

The arrow indicates the putative cleavage sites of the signal peptide. The AMH-N domain and the TGF- β domain that characterized this family are labelled with gray and black overline, respectively. The ten positions with conserved cysteines are marked by asterisks.

的 Gsdf 与其他鱼类的 Gsdf 聚为一枝,而与 TGF-β 超家族的其他成员相分离,表明 Gsdf 是 TGF-β 超 家族一个独特的成员,也可能预示着 Gsdf 具有系 谱特异的功能。 在该研究中,采用实时荧光定量 PCR 比较了 gsdf 基因在大黄鱼不同组织的表达量,结果发现, gsdf 基因在大黄鱼的性腺特异表达且在精巢高表 达,在精巢的表达量约为卵巢的6 倍以上,而在大





黄鱼的其他组织中不表达,表明 gsdf 基因主要在 大黄鱼的性腺中发挥功能。此结果与其他鱼类的研 究结果相似,在尼罗罗非鱼和青鳉中^[15,25],gsdf 基因只特异在性腺中表达,其他组织不表达,而且 在精巢中的表达量显著高于卵巢,预示 gsdf 基因 只在性腺中发挥作用,特别是在精巢中发挥重要的 功能。此外,通过原位杂交 (ISH)发现,在三斑海 猪鱼和青鳉精巢的支持细胞中有很强的 gsdf 基因 表达信号,而只在卵巢的颗粒细胞发现微弱的表达 信号^[15,17]。在这些鱼中,gsdf 表现出明显的性别 表达差异模式,表明 gsdf 基因在鱼类性腺发育过 程中发挥独特的作用。

通过荧光定量 PCR,最先在孵化后第41 天的 大黄鱼雄鱼性腺中检测到 gsdf 基因的表达,而雌 鱼性腺中未发现表达,表现出性别差异。根据游秀 容等^[26]对大黄鱼性腺分化的研究,大黄鱼卵巢的 分化早于精巢,约在孵化后第55天,半数幼鱼性 腺中形成成簇发育的卵原细胞群,减数分裂和卵巢 腔的形成约在孵化后第60天。因此,该研究中gsdf基因的表达要明显早于大黄鱼性腺的分化。相 似的发现在罗非鱼^[25]中报道过,罗非鱼性腺分化 在孵化后第25天左右,然而,通过ISH研究发现 罗非鱼gsdf基因的表达开始于孵化后第4天未分化 的XY鱼苗的性腺,且此时在XX鱼苗性腺中未检 测到gsdf信号,表明gsdf基因在未分化的性腺中 已经行使其功能。在虹鳟孵化前,即性腺还未分 化,通过抑制gsdf基因的翻译,发现原始生殖细 胞的增殖受到抑制,推断在性腺分化前gsdf基因





图 7 gsdf (a)和 amh (b)基因在大黄鱼不同发育时期性腺中的相对表达 Fig. 7 Expressions of gsdf (a) and amh (b) genes in L. crocea gonads during different post-embryonic stages

对原始生殖细胞的增殖可能起到重要的作用^[14]。 第41 天后大黄鱼 gsdf 基因在雄鱼性腺中的表达量 逐渐上升,并且在123日龄左右达到最高峰。大黄 鱼精巢分化约在95日龄左右,在这段时间 gsdf 基 因的表达升高,结合其他鱼类 gsdf 基因特异表达 于原始生殖细胞周围的体细胞中而且在精原细胞周 围体细胞高表达, 推测在这一发育阶段 gsdf 基因 的表达水平升高促进体细胞的扩散或者精原干细胞 的增殖。Gsdf 基因在大黄鱼雌鱼性腺中也有少量表 达, 推测其对于卵巢的发育有一定的调控作用, 但 是具体作用还要进一步研究。

Amh 是一种分泌性糖蛋白, 普遍存在于脊椎 动物中,由一个长的 N 末端和短的 C 末端组 成^[27]。该研究中,通过对大黄鱼 Amh 氨基酸序列 和其他鱼类 Amh 的同源性比对发现,大黄鱼 Amh 与舌齿鲈、裸盖鱼和金钱鱼的同源性比较高,超过 70%。同时,可以发现 Amh 在 C 端保守性较高, 含有7个保守的半胱氨酸残基,由于 Amh 有活性



图 8 gsdf (a)和 amh (b)基因在大黄鱼正常雌雄鱼和伪雄鱼性腺中的相对表达 Fig. 8 Expressions of gsdf (a) and amh (b) genes in different *L. crocea* gonads from females, males and pseudo-males

的区域是 C 末端, 而 N 末端无生物活性, 起到辅助 C 末端穿过细胞膜并分泌的作用, 因此其结构 上的保守是必要的。在构建的进化树中, 大黄鱼 Amh 与其他鱼类 Amh 紧密聚为一枝, 且与舌齿鲈的亲缘关系最相近, 这与氨基酸序列比对的结果一致, 说明在进化过程中该基因具有一定的保守性。

该研究中,采用实时荧光定量 PCR 方法对大 黄鱼 amh 基因在不同组织的表达量进行分析。结 果显示,大黄鱼 amh 基因主要在大黄鱼的性腺表 达且在精巢高表达,其他组织表达很低或者不表 达。在很多鱼类的研究中发现 amh 基因并非性腺 特异基因,在舌齿鲈的脑、性腺、垂体和心脏等组 织中都有发现 amh 基因的表达^[28];半滑舌鳎 amh 基因除在性腺显著表达,在血液、皮肤和脑中也有 表达^[29]。特别的是,大黄鱼脑中 amh 基因也有一 定的表达。在脊椎动物体中,下丘脑 – 垂体 – 性腺 轴是重要的内分泌调节系统,脑及其分泌的激素在 脊椎动物性别分化与性腺发育过程中起着重要的作 用,结合其他鱼类在垂体检测到 amh 基因的表达, 推测 amh 基因可能在下丘脑 – 垂体 – 性腺轴中发 挥一定作用。

与 gsdf 基因相似,在对不同发育时期大黄鱼 性腺中 amh 基因的表达量进行分析发现,同样在 孵化后第41 天的雄鱼性腺中检测到 amh 基因的表 达,在雌鱼的性腺中不表达,此时大黄鱼性腺还未 分化。此后 amh 基因在雄鱼性腺的表达量上升, 特别是在55 日龄显著上升,可能预示着 amh 基因

在这个时间段的大黄鱼雄鱼性腺中有着重要的作 用。这与对斑马鱼和半滑舌鳎的研究相似, 斑马鱼 中性腺显著分化是在受精后第31天,而在受精后 第17天未分化的性腺就发现了 amh 基因的表达, 此后表达逐渐上升,并在第33天的精巢中高表 达⁵⁰; 半滑舌鳎中发现 amh 基因在孵化后第 70 天 之前未分化的雄鱼性腺中有较低的表达,在第70 天即性腺分化前后表达水平显著升高且达到最高 峰^[29]。许多研究发现, amh 基因表达于未成熟精 巢的支持细胞中,并且直到性腺成熟,此外, amh 基因高表达会抑制雄性精子的形成^[31-32]。该研究 中, amh 基因在第112天的雄鱼性腺中的表达量达 到最高峰后出现下降,并在此后维持较低水平到性 腺成熟。在大西洋鲑 (Salmo salar)未成熟的精巢中 amh 基因持续高表达,而在精子快速增殖时开始下 降,在精子生成最多时 amh 基因的表达量最 低^[33]。推测在大黄鱼中 amh 基因的表达量在成鱼 期间维持较低的水平,可能是精子的形成抑制了 amh 基因的表达。通过这些研究表明, amh 基因对 鱼类性腺的分化和发育,特别是雄鱼精巢的分化和 发育有很大的作用。此外, amh 基因在大黄鱼卵巢 中也有少量表达,相似的结果曾在金钱鱼 (Scatophagus argus)^[34]的研究中报道过。Amh 基因在金钱 鱼Ⅲ、Ⅳ期的卵巢中表达量升高,这2个时期为卵 母细胞大生长期和卵黄充满期,表现为滤泡膜细胞 分裂增殖,逐渐积累卵黄,因此认为 amh 基因可 能在金钱鱼卵泡发育过程中发挥作用,但其在鱼类

第6期

卵巢中的作用还需深入的研究。

鱼类性别分化容易受到外界环境的影响,外源 性激素对于鱼类的性别分化具有重要的作用,已经 有多种鱼类成功用外源激素诱导使其发生性别逆 转。为了研究 gsdf 和 amh 基因在性别逆转大黄鱼 性腺中的表达变化,该研究利用17α-甲基睾酮投 喂雌核发育后代的大黄鱼雌鱼幼苗, 使得大黄鱼的 生理性别出现逆转,变成伪雄鱼。通过荧光定量 PCR 发现, gsdf 基因在伪雄鱼性腺中的表达量显著 高于其在雌鱼性腺中的表达量,预示 gsdf 基因在 性别逆转中受到调控,因此表达量发生变化。黄鳝 (Monopterus albus)^[35]中 gsdf 基因在卵巢低表达, 在由雌性向雄性逆转的精巢中表达量上升, 在卵精 巢的后期表达量达到最高峰;相似的结果在三斑海 猪鱼^[17]中也有报道,这些结果表明 gsdf 基因可能 在性别逆转中发挥潜在的作用。相比于正常雌鱼, amh 基因在大黄鱼伪雄鱼性腺的表达量也显著上 升,接近于在雄鱼精巢中的表达量,这与半滑舌 踢^[29]相似。半滑舌蹋中 amh 基因在伪雄鱼性腺的 表达量显著高于正常雌鱼性腺的表达量。由此说 明, amh 基因可能参与了这些鱼类的性逆转过程, 在精巢发育中起到了一定的作用。

Gsdf和 amh 基因同是 TGF-β 超家族成员,而 TGF-β 不仅能影响细胞的增殖、分化,还在胚胎发 育等方面起着重要作用。该研究中观察到,gsdf和 amh 基因都在大黄鱼性腺中显著表达,且在精巢高 表达,在性逆转的性腺中表达量发生显著变化,说 明gsdf和 amh 基因在大黄鱼性别分化和性腺发育 中起到了重要作用。因此,该研究对大黄鱼 gsdf 和 amh 基因的克隆和表达进行分析,为探讨大黄 鱼性别决定及分化的机制奠定了基础。但是,更多 关于大黄鱼 gsdf和 amh 基因的功能,可通过基因 敲除或敲降和过表达,或借助 CRISPR/Cas9 介导 的基因组定点编辑技术进行定向诱变,再配合细胞 学方面的研究,来分析它们潜在的功能,从而进一 步了解它们在大黄鱼性别调控中的作用,为大黄鱼 性别控制及单性育种奠定基础。

参考文献:

- OSPINA-ÁLVAREZ N, PIFERRER F. Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change [J]. PLoS One, 2008, 3 (7): e2837.
- [2] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, et al. A gene from the

human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif $[J\].$ Nature, 1990, 346 (6281): 240-244.

- [3] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. Nature, 1991, 351 (6322): 117-121.
- [4] BOULANGER L, PANNETIER M, GALL L, et al. FOXL2 is a female sex-determining gene in the goat [J]. Curr Biol, 2014, 24
 (4): 404-408.
- [5] 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 [J]. Nature, 2009, 461 (7261): 267-271.
- [6] CHEN S L, ZHANG G J, SHAO C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. Nat Genet, 2014, 46 (3): 253-260.
- [7] YOSHIMOTO S, OKADA E, UMEMOTO H, et al. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis* [J]. P Natl Acad Sci USA, 2008, 105
 (7): 2469-2474.
- [8] MATSUDA M, NAGAHAMA Y, SHINOMIYA A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. Nature, 2002, 417 (6888): 559-563.
- [9] RONDEAU E B, MESSMER A M, SANDERSON D S, et al. Genomics of sablefish (*Anoplopoma fimbria*): expressed genes, mitochondrial phylogeny, linkage map and identification of a putative sex gene [J]. BMC Genomics, 2013, 14 (1): 452-470.
- [10] MYOSHO T, OTAKE H, MASUYAMA H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, Oryzias luzonensis [J]. Genetics, 2012, 191 (1): 163-170.
- [11] HATTORI R S, MURAI Y, OURA M, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. P Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (8): 2955-2959.
- [12] KAMIYA T, KAI W, TASUMI S, et al. A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu) [J]. PLoS Genet, 2012, 8 (7): e1002798.
- [13] WHITMAN M. Smads and early developmental signaling by the TGF superfamily [J]. Genes Dev, 1998, 12 (16): 2445-2462.
- [14] SAWATARI E, SHIKINA S, TAKEUCHI T, et al. A novel transforming growth factor-beta superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Dev Biol, 2007, 301 (1): 266-275.
- [15] SHIBATA Y, PAUL-PRASANTH B, SUZUKI A, et al. Expression of gonadal soma derived factor (GSDF) is spatially and temporally correlated with early testicular differentiation in medaka [J]. Gene Expr Patterns, 2010, 10 (6): 283-289.
- [16] CRESPO B, GÓMEZ A, MAZÓN M J, et al. Isolation and

characterization of Ff1 and Gsdf family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males [J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 191 (9): 155-167

- [17] HORIGUCHI R, NOZU R, HIRAI T, et al. Characterization of gonadal soma-derived factor expression during sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus* [J]. Dev Dyn, 2013, 242 (4): 388-399.
- [18] GAUTIER A, SOHM F, JOLY J S, et al. The proximal promoter region of the zebrafish gsdf gene is sufficient to mimic the spatiotemporal expression pattern of the endogenous gene in Sertoli and granulosa cells [J]. Biol Reprod, 2011, 85 (6): 1240-1251.
- [19] 杨惠惠. 罗非鱼 gsdf 在性腺的表达及其在性别决定中的功能 [D]. 重庆:西南大学, 2014: 13-55.
- [20] JAMIN S P, ARANGO N A, MISHINA Y, et al. Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 211 (1/2): 15-19.
- [21] HONG W S, ZHANG Q Y. Review of captive bred species and fry production of marine fish in China [J]. Aquaculture, 2003, 227 (1/2/3/4): 305-318.
- [22] FORCONI M, CANAPA A, BARUCCA M, et al. Characterization of sex determination and sex differentiation genes in Latimeria [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e56006.
- [23] 闫红伟,田雨顺,姜丽楠,等.红鳍东方鲀 gsdf 基因的克隆 及表达模式分析 [J].大连海洋大学学报,2016,31 (2): 140-146.
- [24] ESCRIVA H, MANZON L, YOUSON J, et al. Analysis of lamprey and hagfish genes reveals a complex history of gene duplications during early vertebrate evolution [J]. Mol Biol Evol, 2002, 19 (9): 1440-1450.
- [25] KANEKO H, IJIRI S, KOBAYASHI T, et al. Gonadal soma-derived factor (gsdf), a TGF-beta superfamily gene, induces testis differentiation in the teleost fish Oreochromis niloticus [J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 415 (1): 87-99.
- [26] 游秀容, 蔡明夷, 姜永华, 等. 大黄鱼性腺性别分化的组织

学观察 [J]. 水产学报, 2012, 36 7): 1057-1064.

- [27] JOSSO N, BELVILLE C, DI CLEMENTE N, et al. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome [J]. Hum Reprod Update, 2005, 11 (4): 351-356.
- [28] HALM S, ROCHA A, MIURA T, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms [J]. Gene, 2007, 388 (1/2): 148-158.
- [29] 刘姗姗,孙冰,梁卓,等.半滑舌鳎抗缪勒氏管激素(AMH)
 基因的克隆及组织表达分析[J].中国水产科学,2013,20
 (1):35-43.
- [30] RODRÍGUEZ-MARÍ A, YAN Y L, BREMILLER R A, et al. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone *amh* relative to *sox9a*, *sox9b*, and *cyp19a1a*, during gonad development [J]. Gene Expr Patterns, 2005, 5 (5): 655-667.
- [31] AL-ATTAR L, NOËL K, DUTERTRE M, et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse [J]. J Clin Invest, 1997, 100 (6): 1335-1343.
- [32] CHEN Y P, WU W H, WU H M, et al. Effects of anti-Müllerian hormone and follicle stimulating hormone levels on *in vitro* fertilization pregnancy rate [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2014, 53 (3): 313-316.
- [33] MAUGARS G, SCHMITZ M. Changes in expression profiles of genes related to sexual maturation during spermatogenesis in testes of early-maturing male Atlantic salmon parr, *Salmo salar* [J]. Cybium, 2008, 32 (2): 167-168.
- [34] 曾文刚,刘振浩,李红,等.金钱鱼抗缪勒氏管激素基因克 隆及其在性腺发育不同时期 mRNA 表达水平的分析 [J].水 产学报,2015,39 (11):1604-1612.
- [35] ZHU Y, WANG C, CHEN X, et al. Identification of gonadal soma-derived factor involvement in *Monopterus albus* (protogynous rice field eel) sex change [J]. Mol Biol Rep, 2016, 43 (7): 629-637.