

大鲵 *Dmrt2* 基因 cDNA 的克隆与表达分析

许宝红, 肖真明, 肖调义*, 陈开健, 刘巧林, 周伟, 刘敏, 姚一彬

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要: *Dmrt2* 是参与性腺发育最古老的发育基因家族 *Dmrt* 家族成员之一, 在维持胚胎组织的正常发育、精子的发生、神经系统和感觉器官发育等方面起重要作用。目前在哺乳动物人类、鸟类红原鸡以及水生动物青鳉中都克隆到 *Dmrt* 家族成员并证明其与性腺和生长发育的密切相关性。研究采用 RACE 方法克隆了大鲵 *Dmrt2* 基因全长 cDNA 序列共 2 026 bp, 开放阅读框长 1 581 bp, 5'非编码区长 58 bp, 3'非编码区长 387 bp, 基因序列提交 GenBank 的登录号为 FJ859987。该基因编码蛋白含 526 个氨基酸, 依生物信息学方法预测该氨基酸为非跨膜蛋白, 无信号肽, 定位在细胞质内, 无分泌蛋白。CDD 数据库分析该 ORF 框翻译的氨基酸, 在 93~146 位含 DM 保守结构域(c102557)的两个成员 pfam00751 和 smart003010, 与哺乳类人 *mab-3*、鸟类红原鸡 *Dmrt2*、两栖类非洲爪蟾 *Dmrt2* 和水生类鲈 *mab-3* DM 结构域存在 I(异亮氨酸)、R(精氨酸)、M(甲硫氨酸)、T(苏氨酸)、C(半胱氨酸)5 个氨基酸的变异; 系统进化树分析表明: 大鲵 *Dmrt2* 与以上四物种首先聚类, 据此推测 *Dmrt* 基因在进化上高度保守, DM 结构域上 5 个氨基酸的变异对蛋白功能的发挥可能无重要影响。实时荧光定量组织差异表达显示, *Dmrt2* 基因在大鲵的精巢和肌肉组织中高表达, 预示该基因可能在性腺发育和生长发育方面起重要作用。

关键词: 大鲵; *Dmrt2*; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

Dmrt 基因家族是参与性腺发育的最古老的发育基因家族, 在进化中具有高保守性^[1]。近期研究表明, *Dmrt* 基因家族不仅和性腺发育相关, 还参与胚胎发育过程中的其他功能^[2]。*Dmrt2* 是 *Dmrt* 家族成员之一, 在维持胚胎组织的正常发育和功能方面起重要作用^[3]。Kondo 等^[4]研究表明, *Dmrt2* 在青鳉(*Oryzias latipes*)成体的精巢中表达, 可能参与了精子的发生。在雌雄尼罗罗非鱼的脑、眼、鳃、心脏中都有表达^[5], 在青鳉胚胎发育时期, *Dmrt2* 主要在体节中胚层中表达^[6], 而在成年青鳉中, *Dmrt2* 主要在鳃中表达^[7], *Dmrt2* 基因可能对于神经系统和感觉器官的组织发育及其功能的维持都起着重要的作用。在斑马鱼(*Danio rerio*)中, *Dmrt2*

主要表达于体节形成前的中胚层以及正在发育的体节中^[8], *Dmrt2a* 基因可能指导体节的发生, 而 *Dmrt2b* 基因对鳃弓的发育具有潜在的作用^[9]。大鲵 (*Andrias davidianus*)属两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科, 是现存个体最大的两栖动物^[10]。两栖类在生物系统进化上是由水生向陆生进化的一个关键环节, 为了深入探讨 *Dmrt2* 在不同进化地位的动物中的功能, 本研究在肖调义等^[11]研究 *Dmrt* 基因 DM 结构域的基础上, 从具有特殊进化地位的大鲵中识别和鉴定该基因, 并将其与不同进化地位物种(爬行类、鸟类、哺乳类等)的同源基因进行比较, 旨在进一步探讨 *Dmrt* 基因家族的生物学功能及其在物种进化中的变化特点。

收稿日期: 2012-01-11

修回日期: 2012-02-13

资助项目: 国家自然科学基金项目(31040083); 湖南省科技厅攻关项目(06NK3049); 湖南省教育厅重点项目(07A012)

通讯作者: 肖调义, E-mail: tyx1128@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

湖南省张家界大鲵国家救护中心提供性腺成熟大鲵1尾, ♂, 体质量 10.5 kg, 体长 80 cm。分别取皮肤、肠、鳃、胃、精巢、肌肉、肾脏新鲜组织, 迅速投入液氮速冻, -80 °C 保存, 备用。

1.2 RNA 的提取和 *Dmrt2* 基因的 cDNA 模板的合成

大鲵组织液氮研磨后利用 Trizol 试剂(Invitrogen)一步法提取总 RNA, RNA 的浓度和纯度用核酸测定仪测定。然后根据 Clontech 公司 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 操作要求合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready-cDNA, 备用。

1.3 引物设计与 *Dmrt2* 基因的克隆测序

通用引物(UPM)为试剂盒自带产品, 5'端(*Dmrt2*-GSP1)和 3'端(*Dmrt2*-GSP2)基因特异性引物是根据 *Dmrt* 基因的 EST 序列^[12]设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(*Dmrt2*-GSP1: 5'-GGTGTCCCTGCCTGAAGGGCCACAAG-3', *Dmrt2*-GSP2: 5'-ACCACCAGCAGGCAGTTGGCACAC-3')。分别以 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA 作为模板, 用通用引物(UPM)分别和 5'端(*Dmrt2*-GSP1)、3'端(*Dmrt2*-GSP2)端基因特异性引物进行 touchdown PCR 扩增反应, PCR 反应体系如下: 10× Advantage 2 PCR Buffer 5 μL, dNTP Mix 1 μL, 5'-RACE-Ready cDNA 或 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μL, UPM 5 μL, *Dmrt2*-GSP1 或 *Dmrt2*-GSP2 1 μL, Advantage 2 Polymerase Mix 1 μL, PCR-Grade Water 34.5 μL, 总体积 50 μL。反应程序为 95 °C 预变性 5.0 min、94 °C 变性 30 s、68 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1.5 min、35 个循环, 72 °C 延伸 7.0 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒(天根生化)进行纯化, 克隆到 pUCm-T(TaKaRa)载体, 16 °C 过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5α, 涂布于含有异丙基硫代 β-半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(X-Gal)和氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)的 LB 平板, 37 °C 恒温培养过夜, 挑单个阳性克隆菌落接种于含有 100 μg/mL Amp 的 LB 液体培养基, 37 °C 220 r/min 振荡培养 8 h, 以菌液为模板, 用载体通用引物进行 PCR 检测, 挑阳性克隆菌液送上海生工生物工

程技术服务有限公司测序。

1.4 序列分析

测序所得 3'端和 5'端的 cDNA 片段通过 Bioedit 软件拼接得到完整的 cDNA 全长, ORF Finder 网站预测开放阅读框, CLC-Protein Workbench 5.3 和 DNAMAN 等软件预测氨基酸组成、理化性质和二级结构及序列同源性比对等, NCBI 网站 Structure 工具检索 CDD(Conserved Domain Database)数据库分析蛋白质序列的保守结构域, NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行同源基因搜索, MEGA 4.0 构建系统发育树, 并分析基因在不同物种中的亲缘关系。

1.5 实时定量 PCR 分析 *Dmrt2* 基因的组织差异表达

根据得到的大鲵 *Dmrt2* 基因的部分 cDNA 片段, 设计一对表达分析引物(*Dmrt2*-F: TTCCTACT CCTACCCATCCTCAAC; *Dmrt2*-R: CCTCGTCTT CATCTCCCGTGT)进行实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)。皮肤、肠、鳃、胃、精巢、肌肉、肾脏 7 种组织的总 RNA 用天根生化的动物组织 RNA 提取试剂盒, 凝胶电泳和核酸蛋白仪检测 RNA 的纯度和浓度后, 按照东洋纺(TOYOBO)反转录试剂盒(ReverTra Ace qPCR RT Kit)操作说明反转录合成 cDNA 模板, 采用 ABI7900 HT Real-time PCR 仪进行相对定量分析, 荧光定量 PCR 扩增条件为 95 °C 60 s、94 °C 15 s、61 °C 30 s、72 °C 60 s、35 个循环, 内参用 β-actin 基因片段(*Actin*-F: TTATGCCCTGCCTCACG; *Actin*-R: CCA TTTCTGC TCAAAGTCC)。PCR 反应体系为 10 μL, 每个样品设置 3 个平行, 采用东洋纺荧光定量试剂盒(SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus), 实验步骤根据说明书进行。用 ABI 7900HT 自带软件 the Sequence Detection System(SDS version 2.3)分析数据, 建立标准曲线, 检测扩增效率, 溶解曲线检验引物扩增特异性, 计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 根据所得数据作柱形图, 并计算标准误(SE)。

2 结果

采用 RACE-PCR 技术扩增获得大鲵 *Dmrt2* 基因 5'端和 3'端 cDNA 片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以单引物扩增结果为阴性对照, 克隆测序获得大鲵 *Dmrt2* 基因 5'-RACE-PCR 产物大

小约为 450 bp, 3'-RACE-PCR 产物大小约为 1 650 bp(图 1); Bioedit 软件拼接后得到大鲵 *Dmrt2* 基因全长 cDNA 共 2 026 bp, 全长与预期相符。开放阅读框长 1 581 bp(58-1639), 5'非编码区长 58 bp, 3'非编码区长 387 bp, 在 3'非编码区存在一个 mRNA 不稳定基序 ATTTA 和 2 个加尾信号 AATAAA。基因序列结果提交 GenBank 的登录号为 FJ859987。

经 CLC-Protein Work-bench 5.3 推测, 编码蛋白含 526 个氨基酸,理论 *pI* 值为 8.40, 呈弱碱性, SignalP 程序预测无信号肽, DNAMAN 软件分析初步推断为非跨膜蛋白, 二级结构有 12 个 α -螺旋, 16 个片层结构及多个卷曲结构。

经 NCBI 网站 Structure 工具检索 CDD(Conserved Domain Database)数据库分析蛋白质序列的

保守结构域, 此蛋白在 93-146 位氨基酸为 DM 保守结构域(c102557)的两个成员 pfam00751 和 smart003010, 该结构域为具有 DNA 结合能力的保守基序、并以锌指结构(C2H2C4)与特异 DNA 序列结合的蛋白结构域。结构域序列与三级结构如图 2, 该结构域与青鳉 *Dmrt2*、尼罗罗非鱼的 *Dmrt2b*、果蝇 *Dmrt11E*、日本拟鲷 *Dmrt* 以及人 *DmrtB1* 的结构域高度保守, 且与水生类的尼罗罗非鱼物种亲缘关系最近, 所以将该基因蛋白命名为大鲵 *Dmrt2* 蛋白。并根据结构域的相似性初步推测该结构域与尼罗罗非鱼的 *Dmrt2b*、果蝇 *Dmrt11E*、日本拟鲷 *Dmrt* 以及人 *DmrtB1* 的结构域具有相似的生物学功能。

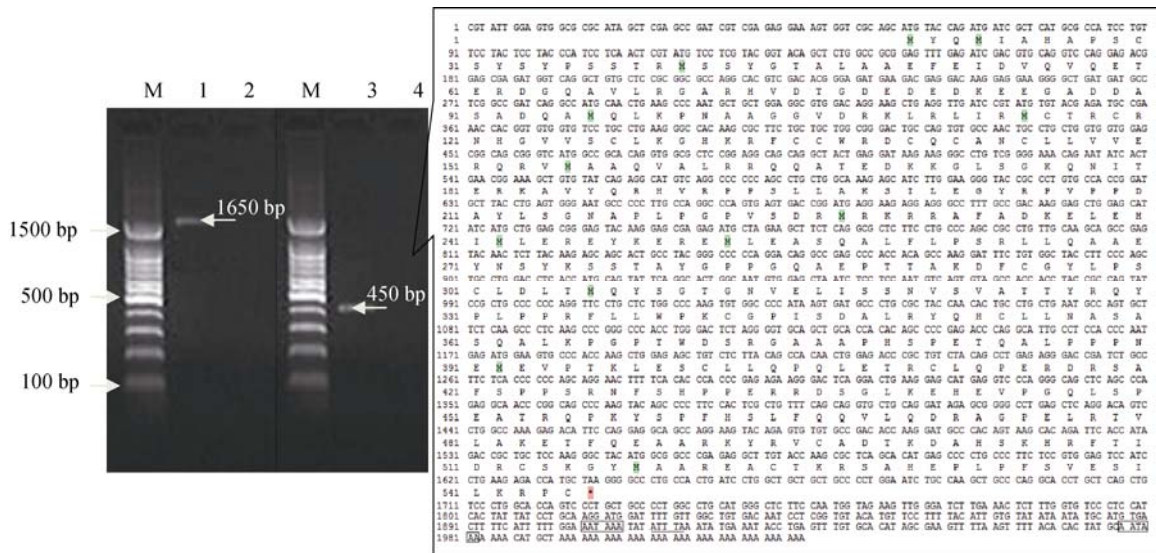


图 1 大鲵 *Dmrt2* 基因序列

M.marker; 1. 3'-RACE-PCR 产物片段; 2. 阴性对照; 3. 5'-RACE-PCR 产物片段; 4. 阴性对照。

Fig. 1 Sequence of *Dmrt2* gene in *A. davidianus*

M.marker; 1. 3'-RACE-PCR product; 2. negative compare; 3. 5'-RACE-PCR product; 4. negative compare.

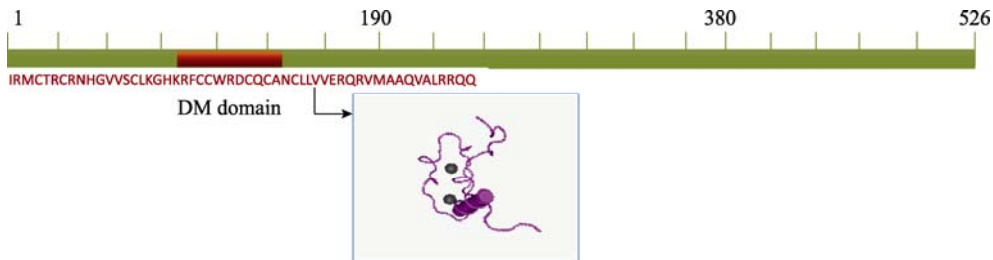


图 2 大鲵 *Dmrt2* 蛋白的 DM 结构域

Fig. 2 DM domain of *Dmrt2* in *A. davidianus*

DNAMAN 软件分析相关蛋白基因(基因名称如表 1)的 DM 结构域, 结果显示, 两栖类非洲爪蟾 *Dmrt2*、鸟类红原鸡 *Dmrt2*、哺乳类人 *mab-3* 以及

水生类鲈 *mab-3* 的 DM 结构域都高度保守, 有 100%的相似性, 而两栖类的大鲵 *Dmrt* 蛋白 DM 结构域则在第 1、2、3、5、24 位发生了突变, 第 1

表 1 相关 Dmrt 类蛋白基因名称及其 GenBank 登录号
 Tab. 1 GenBank accession numbers of protein sequences used for the phylogenetic tree construction

基因名称 gene number	物种 species	NCBI 登录号 NCBI number
<i>mab-3</i>	沼泽鳄 <i>Crocodylus palustris</i>	ACD44643.1
<i>mab-3</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	CAH70589.1
<i>mab-3</i>	小鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_758500.2
<i>mab-3</i>	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_571027.1
<i>Dmrt</i>	中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i>	ADH15934.1
<i>Dmrt2</i>	红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	AAZ03502.1
<i>Dmrt2</i>	非洲爪蟾 <i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>	AAI35448.1
<i>Dmrt2b</i>	尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	gi123905179
<i>Dmrt2</i>	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	AF319992_1
<i>Dmrt11E</i>	果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i>	gi74871671
<i>Dmrt</i>	日本拟鸚鯛 <i>Pseudolabrus japonicus</i>	gi82249159
<i>DmrtB1</i>	人 <i>Homo sapiens</i>	gi74752030
<i>Dmrt2</i>	大鲵 <i>Andrias davidianus</i>	ACO91807.1

位由 T(苏氨酸)突变为 I(异亮氨酸), 第 2 位由 P(脯氨酸)突变为 R(精氨酸), 第 3 位由 K(赖氨酸)突变为 M(甲硫氨酸), 第 5 位由 A(丙氨酸)突变为 T(苏氨酸), 第 24 位由 R(精氨酸)突变为 C(半胱氨酸), 相似性为 90% (图 3)。

将推测的大鲵 *Dmrt2* 蛋白基因编码的氨基酸序列与 NCBI 中典型的模式动物、哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类、水生类等种类的代表物种的性别相关基因(*mab-3* 或 *Dmrt* 家族) 通过 MEGA 4.0 软件构建进化树(基因名称如表 1, 结果如图 4)表明, 大鲵的 *Dmrt2* 蛋白首先与人的 *mab-3* 蛋白和红原鸡的 *Dmrt2* 聚为一支, 再与非洲爪蟾 *Dmrt2* 蛋白聚类, 然后与水生类的斑马鱼 *mab-3* 和青鳉 *Dmrt2* 蛋白聚类, 从基因与物种进化关系来看, 大鲵 *Dmrt2* 及性别相关蛋白 *mab-3* 的进化与物种的进化方向基本一致。

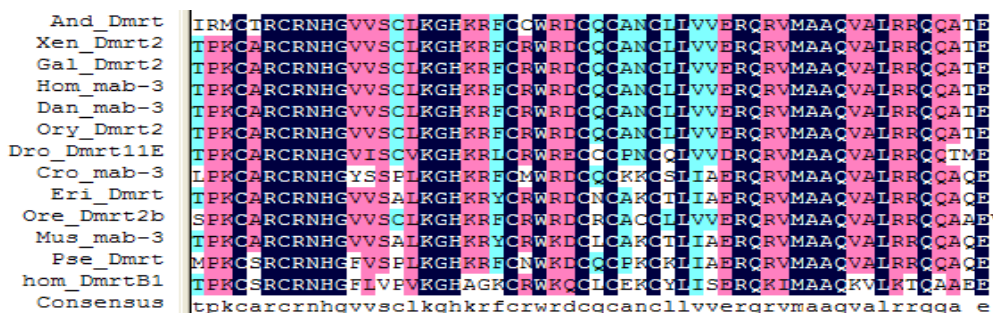


图 3 大鲵 *Dmrt2* 与其他 12 物种相关蛋白 DM 结构域比对

Fig. 3 Comparative analysis of the related amino acid sequences of DM domain between *A. davidianus* and other 12 species

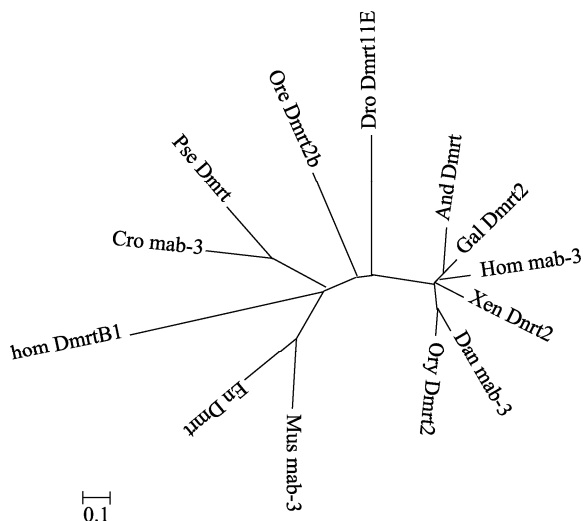


图 4 大鲵 *Dmrt2* 与其他 12 种代表性物种的性别相关蛋白的进化树图

Fig. 4 The phylogenetic evolution tree of *A. davidianus* *Dmrt2*

实时荧光定量表达结果表明, 大鲵 *Dmrt2* 基因在所取的 7 个组织中都有表达, 在精巢中的表达量最高, 其次是肌肉, 在皮肤中的表达量最低(图 5), 由此推测, *Dmrt* 基因在不同组织的差异表达可能与性腺发育相关的生物学功能有关。

3 讨论

跨膜蛋白是一类由强疏水的氨基酸组成的结构独特的蛋白质, 以 α -螺旋或 β -折叠存在于膜的磷脂双分子层间, 信号肽是指多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的氨基酸序列, 位于分泌蛋白的 N 端, 指引蛋白质在细胞内的运输。本试验克隆的大鲵 *Dmrt2* 基因编码的蛋白经生物软件分析为非跨膜蛋白, 无信号肽, 说明该蛋白主要是由亲水氨基酸组成, 存在于细胞质内, 无分泌蛋白,

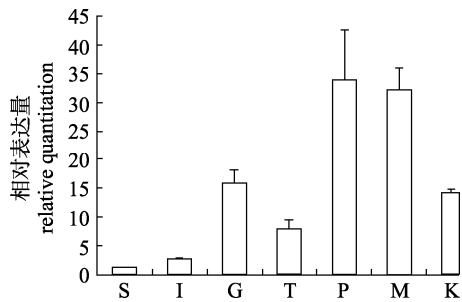


图5 大鲵 *Dmrt2* 蛋白在不同组织中的相对表达
S.皮肤; I.肠; G.鳃; T.胃; P.精巢; M.肌肉; K.肾脏。

Fig. 5 The relative expression in different tissues in *A. davidianus* of *Dmrt2*

S.skin; I.intestines; G.gill; T.stomach; P.spermary; M.muscle; K.kidney.

不具备指导蛋白质进行跨膜运输的功能。一般认为在蛋白质二级结构中, α -螺旋和 β -折叠结构规则不易变形, 难以与抗体嵌合, 因而一般不作为抗原表面, 其主要功能是作为蛋白质骨架起稳定作用, 无规则卷曲区域则决定蛋白质的功能, 酶的功能部位常处于这种构象区域内, 且受侧链相互作用的影响很大, 经常构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位如许多钙结合蛋白中结合钙离子的EF手结构的中央环^[13], 软件预测大鲵 *Dmrt2* 基因二级结构比较复杂, 具有12个 α -螺旋、16个片层结构以及多个卷曲, 可以推断该蛋白结构比较稳固, 且易结合钙结合蛋白等蛋白质。

由于DNA的碱基序列存在突变和缺失等现象, 而这些突变和缺失并不一定会导致氨基酸序列的变化, 所以在分析物种的系统进化时采用氨基酸序列来进行更可靠。本实验氨基酸序列的比对分析表明, 哺乳类人 *mab-3*、鸟类红原鸡 *Dmrt2*、两栖类非洲爪蟾 *Dmrt2*、青鳉 *Dmrt2* 和斑马鱼 *mab-3DM* 结构域氨基酸相似性达到100%, 且通过ORF翻译的氨基酸进行系统进化分类结果表明, 哺乳类人 *mab-3*、鸟类红原鸡 *Dmrt2*、两栖类非洲爪蟾 *Dmrt2* 和水生类鲇 *mab-3* 以及大鲵 *Dmrt2* 首先聚类, 然后再与其他物种聚类, 说明DM结构域的进化和物种的系统进化方向基本一致。但两栖类的大鲵 *Dmrt2* 和非洲爪蟾 *Dmrt2* 虽然系统进化树是聚为一类, 然而两者DM结构域存在I(异亮氨酸)、R(精氨酸)、M(甲硫氨酸)、T(苏氨酸)、C(半胱氨酸)5个氨基酸的变异, 表明由于 *Dmrt* 基因结构域在进化上高度保守^[14], 所以大鲵 *Dmrt2* DM结构域的5个氨基酸的变异对蛋白功能的发挥并无重要影响。

而关于大鲵 *Dmrt* 基因在不同发育时期的表达、生物学功能以及作用机理研究将是下一步研究探讨的重点。

对 *Dmrt2* 基因在大鲵皮肤、肠、鳃、胃、精巢、肌肉、肾脏7个组织中的实时荧光定量分析表明, *Dmrt2* 基因在精巢和肌肉两组织中高表达, 而在皮肤等其他组织中的表达量低, 这一结果与 *Dmrt2* 基因家族主要参与动物性腺发育^[15]的结论基本吻合, 也与曹谨玲等^[16]、邓思平等^[17]的研究 *Dmrt1a* 基因在奥尼罗非鱼及半滑舌鳎的性腺组织中高表达的结论一致, 预示 *Dmrt2* 基因可能在大鲵精巢发育和生长发育方面起重要作用, 而在成年大鲵体内可能参与精子的发生和机体生长发育; 大鲵 *Dmrt2* 基因在雌雄性腺中的表达差异还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 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]. *Dev Biol*, 1999, 215(2): 208–220.
- [2] Hong C S, Park B Y, Saint Jeannet J P. The function of *Dmrt* genes in vertebrate development: It is not just about sex[J]. *Dev Biol*, 2007, 310(1): 1–9.
- [3] 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.
- [4] 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(2): 213–222.
- [5] 杨东. 尼罗罗非鱼性别决定机制和性别相关的分子标记[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [6] Winkler C, Hornung 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(7-8): 997–1005.
- [7] Zhao Z, Hua Z, Meng A. Genomic organization and expression in *E. coli* of zebrafish *terra*[J]. *Tsinghua Science and Technology*, 2001, 6(3): 4.
- [8] Meng A, Moore B, Tang H, *et al.* A drosophila doublesex-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates[J]. *Development*, 1999, 126(6): 1259–1268.
- [9] Zhou X, Li Q, Lu H, *et al.* Fish specific duplication of *Dmrt2*: Characterization of zebrafish *Dmrt2b*[J]. *Biochimie*, 2008, 90(6): 878–887.

- [10] 金立成, 汪建国. 大鲵生物学与养殖实用技术[M]. 台湾: 水产出版社, 1997.
- [11] 肖调义, 吴宝林, 葛熹凯, 等. 中国大鲵 *Dmrt* 基因 DM 结构域的克隆及序列分析[J]. 水生生物学报, 2009 (1): 89-93.
- [12] Lu F, Zhu X. Analysis of characteristics and predication of B-cell epitopes for the human C5a receptor[J]. Immunological Journal, 1998, 14(3): 153-155.
- [13] Song J, Zhu X, Chen K. Prediction of B-cell epitopes of human Fas(H-Fas) antigene[J]. Immunological Journal, 1999, 15(1): 14-16.
- [14] 杨洪雁, 宁方勇, 杜智恒, 等. *Dmrt* 基因家族的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010 (1): 27-28.
- [15] Ren L, Cheng H, Guo Y, *et al.* Evolutionary conservation of *Dmrt1* gene family in amphibians, reptiles and birds[J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(23): 1992-1994.
- [16] 曹谨玲, 曹哲民, 吴婷婷. 奥利亚罗非鱼 *DMRT1* 和 *DMRT4* 抗体制备及组织表达谱分析(英文)[J]. 遗传学报, 2007, 34(6): 497-509.
- [17] 邓思平, 陈松林. 半滑舌鳎 *Dmrt1a* 基因的 cDNA 克隆及其表达[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 577-584.

Molecular cloning and expression analysis of *Dmrt2* gene in *Andrias davidianus*

XU Bao-hong, XIAO Zhen-ming, XIAO Tiao-yi*, CHEN Kai-jian,
LIU Qiao-lin, ZHOU Wei, LIU Min, YAO Yi-bin

(College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Dmrt* family is one of the oldest developmental gene family, and is important to the embryo normal growth, spermatogenesis, and the nervous system and sense organ development. *Dmrt2* is one of the members of *Dmrt* family, which was cloned in mammals such as human, birds such as *Gallus gallus*, aquatic animals such as *Oryzias latipes*, is closely related to gonad development and growth. RACE-PCR technique was used to clone *Dmrt2* gene in *Andrias davidianus*, 2 026 bp full-length cDNA was obtained, containing 1 581 bp open reading frame(ORF), 58 bp 5'UTR, 387 bp 3'UTR, GenBank number is FJ859987. This sequence encoded 526 amino acids, and the amino acid sequence was across the membrane protein, no signal peptide, and the protein positioning in the cytoplasm. The amino acid sequence was analyzed by the Conserved Domain Database(CDD), surveyed that single amino-terminal DM domain is from 93 bp to 146 bp, contains a pattern of conserved zinc chelating residues C2H2C4, super-family pfam00751 and smart003010. Blast DM domain with *Homo sapiens mab-3*, *G. gallus Dmrt2*, *Xenopus (Silurana) tropicalis Dmrt2* and *Danio rerio mab-3*, five amino acid had variation, include Ile, Arg, Met, Thr, Cys. Phylogenetic analysis indicated that the five species of *Homo sapiens*, *G. gallus*, *X. (Silurana) tropicalis* and *D. rerio* were clustered first, that means *Dmrt* family is highly conserved during evolution, and the five amino acids variation had little effect on protein functions. RT-PCR was used to detect the expression of *Dmrt2* in skin, intestines, gills, muscle, stomach, spermary and kidney of *A. davidianus*, and results showed it is high level expression only in spermary and muscle, which indicated that the *Dmrt2* gene may play an important role in gonad development and growth development.

Key words: *Andrias davidianus*; *Dmrt2*; real-time PCR

Corresponding author: XIAO Tiao-yi. E-mail: tyx1128@yahoo.com.cn