

无蹼壁虎 6 个鸟类 Z 染色体连锁基因的 cDNA 克隆和序列分析

夏文君,袁亚辉,贺晓烈,李 鹏,严 洁,周开亚

(南京师范大学生命科学学院,江苏省生物多样性和生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 利用 RT-PCR 技术从无蹼壁虎中获得了 6 个鸟类 Z 染色体连锁基因的 cDNA 片段序列. 与铅山壁虎的同源基因序列相比,除 *CHD1*-5'端序列中有 3 bp 的缺失外,其他基因序列均具有相同的核苷酸和氨基酸长度,且核苷酸序列和氨基酸序列的保守性均非常高(97% ~ 100%). 在与有鳞目、龟鳖目和鳄目的其他已知序列比较时,发现 6 个基因的 8 个片段有不同程度的同源性,其中 *GHR* 基因的同源性最低,与该基因片段在进化分析中较高的 ω 值(Ka/Ks)是一致的. 性染色体连锁基因的克隆和染色体定位,将有助于进一步了解壁虎类甚至高等脊椎动物不同类型性染色体的起源和进化.

[关键词] 无蹼壁虎,性别决定,Z 连锁基因

[中图分类号] Q95 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2014)01-0128-05

cDNA Cloning and Sequence Analyses of Six Avian Z-Linked Genes from Peking Gecko(*Gekko swinhonis*)

Xia Wenjun, Yuan Yahui, He Xiaolie, Li Peng, Yan Jie, Zhou Kaiya

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: We sequenced partial cDNA sequences of the homologues of six avian Z-linked genes from *Gekko swinhonis* by using the RT-PCR approach. Comparing with those obtained from *G. hokouensis*, the lengths of all these fragments were identical at both nucleotide and amino acid levels except the 5' region of *CHD1*, in which there had a deletion of 3 bp, furthermore, sequence similarity was very high (97% - 100%). When comparing with other existing sequences from Squamata, Testudines and Crocodylia, varying degrees of similarity was found in sequences of eight fragments from six genes. *GHR* showed the lowest homology, which was concordant with the relatively high value of ω (Ka/Ks). Cloning and chromosomal location of the sex-chromosome linked genes will be helpful to elucidate the origins and evolutionary processes of different sex chromosomes in geckos or even in higher vertebrates.

Key words: *Gekko swinhonis*, sex determination, Z-linked genes

爬行动物的性别决定主要有基因型性别决定 (Genetic sex determination, GSD) 和温度依赖型性别决定 (Temperature-dependent sex determination, TSD) 2 种类型. GSD 型在爬行动物中也存在几种不同形式: XY 型, 具有 Y 染色体的胚胎将发育为雄性, 无 Y 染色体的胚胎发育为雌性; ZW 型, 具有 W 染色体的胚胎将发育为雌性, 无 W 染色体的胚胎发育为雄性; 以及无异型性染色体分化, 通过存在于常染色体中的性别决定基因控制雌雄.

综合蜥蜴亚目中物种的核型数据, 18 科物种中未检测到异型性染色体; 7 科 (美洲鬣蜥科、石龙子科、球趾虎科、鳞脚虎科、双足蜥科、美洲蜥蜴科和裸眼蜥科) 物种中的雄性为异配性别 (XY); 6 科 (双足蚓蜥科、蜥蜴科、巨蜥科、避役科、鬣蜥科和叶趾虎科) 物种中的雌性为异配性别 (ZW); 唯独壁虎科 (Gekkonidae) 中既有雄性为异配性别的物种又有雌性为异配性别的物种^[1]. 以壁虎属 (*Gekko*) 为例, 在大壁虎 (*G. gecko*)^[2] 和多疣

收稿日期: 2013-07-04.

基金项目: 国家自然科学基金 (31000949)、南京师范大学大学生实践创新训练计划.

通讯联系人: 严洁, 博士, 副教授, 研究方向: 动物学. E-mail: yanjie@njnu.edu.cn

壁虎(*G. japonicus*)^[3]中检测到X和Y染色体;采自日本冲绳的铅山壁虎(*G. hokouensis*)雌性个体中发现异型性染色体Z和W^[4];而在无蹼壁虎(*G. swinhonis*)^[5]、蹼趾壁虎(*G. subpalmatus*)^[6]中均无异型性染色体. 也有其他的一些核型研究并未在大壁虎^[6-8]和多疣壁虎^[5]中检测到性染色体,推测可能与这2个物种中存在隐存支系有关^[9]. 然而孵化实验却证明铅山壁虎、多疣壁虎和无蹼壁虎的性别决定模式均属于TSD型^[10]. 异型性染色体与TSD机制在同一个物种(如多疣壁虎、铅山壁虎等)共存,可为GSD-TSD连续谱^[11,12],即这2种性别决定模式不是独立存在,而是连续谱上的2个极端形式这种假说提供证据. 壁虎类蜥蜴的性别决定模式如此多样,甚至在亲缘关系很近的物种中也完全不同,已成为研究脊椎动物性别决定模式、进化以及性染色体进化机制等模式类群.

性别决定相关基因在壁虎类蜥蜴中的研究相对较少. 仅Kawai等从铅山壁虎(产自日本冲绳)中克隆了6个鸡的Z染色体连锁的基因,将其准确地定位于铅山壁虎Z和W染色体上,并对该物种中的性染色体的起源和分化作出了假设^[4]. 而壁虎属其他物种尚无此类数据. 本实验利用RT-PCR技术从无蹼壁虎中克隆这6个基因,通过序列测定以及保守性和进化分析,以期对壁虎性别决定基因或性染色体的进化提供进一步的依据.

1 材料和方法

1.1 材料

性成熟雌性无蹼壁虎2只,产地安徽宿州.

1.2 主要试剂

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA), Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech, *Ex Taq* 和 DNA Marker 购自 TaKaRa (大连宝生物工程公司).

1.3 总 RNA 的提取

取无蹼壁虎雄性成体性腺,按操作说明书用 TRIzol 试剂盒提取总 RNA,提取的 RNA 及时于 -70 °C 保存备用. 取 1 μ L 总 RNA 样本稀释 50 倍(即 1 μ L RNA 样品加入 49 μ L RNase-free water)于 BioPhotometer 核酸和蛋白质定量仪上检测 RNA 的浓度和纯度(OD_{260}/OD_{280}),另取 3 μ L 总 RNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.4 第一链 cDNA 合成

取 0.5 μ g 总 RNA 样品,采用 Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit 进行第一链 cDNA 的合成,操作按试剂盒说明书进行.

1.5 鸟类 Z-连锁基因的扩增和测序

6 个目的基因分别为 *ACO1/IREBP* (soluble aconitase 1/iron-responsive element binding protein)、*ATP5A1* (ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1, cardiac muscle)、*CHD1* (chromodomain helicase DNA binding protein 1)、*GHR* (growth hormone receptor)、*DMRT1* (doublesex and mab-3-related transcription factor 1) 以及 *RPS6* (ribosomal protein S6). 引物序列参见 Kawai 等^[4],引物由上海生工合成. 取 0.3 μ L 第一链反应液为模板进行 PCR 扩增. PCR 反应总体积为 20 μ L; 10 \times PCR buffer 2.0 μ L, dNTP Mix 2.0 μ L (2.5 mmol/L), Mg^{2+} 1.5 μ L (25 mmol/L), *Ex-Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 上/下游引物各 0.3 μ L (10 μ mol/L), 加灭菌水至 20 μ L. PCR 反应参数: 94 °C 预变性 5 min, 随之以变性 94 °C 30 s, 退火 55 °C ~ 58 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min. 产物经琼脂糖凝胶电泳回收后送于上海生工测定基因序列.

1.6 序列拼接与同源性分析

测得的序列经 SeqMan Pro V 7.1.0 软件 (DNASTar) 进行拼接和校对; 经 BLASTN 和 BLASTX 对所得基因序列在 GenBank 的核苷酸和蛋白质数据库中分别进行同源性比对分析.

1.7 基因片段的选择压力分析

在 MEGA 5.10^[13] 中用默认参数比对上述 6 个基因的 8 个片段与铅山壁虎的同源片段. 使用 KaKs_Calculator^[14] 计算基因非同义突变率与同义突变率的比值 ($\omega = Ka/Ks$). 若 $\omega > 1$, 则认为存在正选择 (positive or adaptive selection); 若 $\omega = 1$, 则认为存在中性突变 (neutral mutation); 而若 $\omega < 1$, 则认为存在纯化选择 (negative or purifying selection).

2 结果

2.1 目的基因的 cDNA 序列分析

以无蹼壁虎雄性性腺组织总 RNA 逆转录得到的第一链 cDNA 为模板,使用 9 对简并引物对 *ACO1/IREBP* (5'和 3'端 2 个片段)、*ATP5A1* (5'和 3'端 2 个片段)、*CHD1* (5'和 3'端 2 个片段)、*GHR*、*DMRT1* 和 *RPS6* 基因的 9 个片段进行了扩增. 除 *ACO1/IREBP* 5'端片段未成功扩增外,其余 8 个片段都能成功扩增出清晰的单一条带,并完成测序. 去除引物之后,各基因片段长度为:*ACO1/IREBP* 3'端片段长 751 bp (KF297327),编码 250 个氨基酸;*ATP5A1* 5'和 3'端 2 个片段长度分别为 478 bp 和 512 bp,分别编码 159 和 170 个氨基酸,按照 GenBank 的要求,2 个片段连同中间的 Gap(100 个 N 代表 Gap 的估计长度)的检索号为 KF297323;*CHD1* 5'和 3'端 2 个片段长度分别为 915 bp 和 345 bp,分别编码 305 和 115 个氨基酸,2 个片段连同中间的 Gap(100 个 N 代表 Gap 的估计长度)的检索号为 KF297324;*DMRT1* 基因片段长 637 bp (KF297325),编码 212 个氨基酸;*GHR* 基因片段长 852 bp (KF297326),编码 284 个氨基酸;*RPS6* 基因片段长 593 bp (KF297328),编码 197 个氨基酸. 与铅山壁虎的同源基因序列相比,除 *CHD1*-5'端序列外,其余的基因片段在核苷酸和氨基酸长度上均相同;*CHD1*-5'端序列在 304 bp ~ 306 bp(第 102 个氨基酸)处有 3 bp 的缺失,不过并未造成编码区的移码突变.

2.2 目的基因的同源性分析

校对和拼接后的 cDNA 序列经 BLASTN 分析,发现各基因与铅山壁虎的同源基因之间的相似性均在 97% ~ 99%;在与有鳞目、龟鳖目和鳄目的其他已知序列比较时,发现 *ACO1/IREBP* 与蜡皮蜥 (*Leiolepis reevesii rubritaeniata*)、中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 的序列相似性分别为 84% 和 83%;*ATP5A1* 5'和 3'端 2 个片段与中华鳖和蜡皮蜥、日本四线锦蛇 (*Elaphe quadrivirgata*) 分别有 84% 和 86%、84% 的序列相似性;*CHD1* 两基因片段在这 3 个目的已有序列比较中,表现出较高的相似性,分别为 87% ~ 90% 和 90% ~ 92%;*DMRT1* 基因的序列相似性在 80% ~ 84%;*GHR* 基因片段表现出最低的同源性(76% ~ 82%);*RPS6* 基因片段的相似性也较高(84% ~ 95%)(表 1).

表 1 6 基因 cDNA 片段序列的同源性搜索结果

Table 1 Blast homology search results of partical cDNA sequences from six genes

基因 GenBank	<i>ACO1/IREBP</i> KF297327	<i>ATP5A1</i> KF297323 ^a	<i>CHD1</i> KF297324 ^a	<i>DMRT1</i> KF297325	<i>GHR</i> KF297326	<i>RPS6</i> KF297328			
有鳞目	<i>Gekko hokouensis</i>	739/750(99%) 230/232(99%)	464/478(97%) 159/159(100%)	499/512(97%) 169/170(99%)	910/918(99%) 303/306(99%)	336/341(99%) 112/114(98%)	634/637(99%) 211/212(99%)	844/852(99%) 278/283(98%)	588/593(99%) 197/197(100%) 489/515(95%)
	<i>Heteronotia binoei</i>								
	<i>Anolis carolinensis</i>		158/159(99%)	166/170(98%)	815/909(90%) 299/305(98%)	319/345(92%) 113/114(99%)	538/639(84%) 182/213(85%)	521/587(89%) 214/285(75%)	193/197(98%)
	<i>Leiolepis reevesii rubritaeniata</i>	592/705(84%) 211/232(91%)		398/463(86%) 157/160(98%)	810/912(89%) 301/305(99%)	520/637(82%) 174/213(82%)			464/516(90%)
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>			411/489(84%) 157/159(99%)	800/915(87%) 300/305(98%)	311/341(91%) 112/114(98%)	528/635(83%) 170/213(80%)	461/582(79%) 170/213(80%)	191/197(97%)
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>						523/635(82%) 170/213(80%)		
	龟鳖目	<i>Staurotypus triporcatus</i>			421/472(89%) 164/170(96%)		518/640(81%) 165/213(77%)	647/833(78%) 182/282(65%)	504/594(85%)
<i>Trachemys scripta</i>						502/624(80%) 160/208(77%)			
<i>Pelodiscus sinensis</i>		620/747(83%) 209/232(90%)	402/477(84%) 153/159(96%)	167/170(98%) 167/170(98%)	808/915(88%) 301/305(99%)	307/341(90%) 111/114(97%)	516/640(81%) 166/213(78%)	631/829(76%) 179/282(63%)	506/593(85%) 192/197(97%)
鳄目	<i>Crocodylus siamensis</i>			797/912(87%) 297/304(98%)	312/341(91%) 112/114(98%)		403/491(82%) 187/284(66%)	501/593(84%) 191/197(97%)	
同源性范围 (<i>G. hokouensis</i> 除外)		83% ~ 84% 88% ~ 91%	84% 96% ~ 99%	84% ~ 86% 96% ~ 98%	87% ~ 90% 98% ~ 99%	90% ~ 92% 97% ~ 99%	80% ~ 84% 77% ~ 85%	76% ~ 82% 63% ~ 75%	84% ~ 95% 97% ~ 98%

a. 同一基因的 2 个片段连同中间未知数目的 Gap 共有的一个检索号.
第一行的数值为 BLASTN 搜索结果;第二行的加粗数值为 BLASTX 搜索结果.

将依据 cDNA 序列翻译得到的氨基酸序列与 GenBank 中的蛋白质数据库进行 BLASTX 比对后,发现

各基因与铅山壁虎的相似基因之间的相似性在 98% ~ 100% 之间;在与有鳞亚目、龟鳖目和鳄目的其他已知序列比较时,发现 *ATP5A1*、*CHD1*、*RPS6* 3 个基因 5 个片段的相似性都比较高(96% ~ 99%);而 *ACO1*/*IREBP* 5'端序列的相似性在 88% ~ 91% 之间,*DMRT1* 基因片段的同源性在 77% ~ 85% 之间,*GHR* 基因的相似性最低,仅为 63% ~ 75% (表 1)。

2.3 选择压力分析

用 KaKs_Calculator 基于 YN 方法^[15]和 MYN 方法^[14]对 6 个基因的 8 个片段的非同义突变率与同义突变率的比值 ω 进行了计算,结果显示,2 个基因 3 个片段(*ATP5A1*-5'端、*ATP5A1*-3'端和 *RPS6*)的 ω 值为 0,表明在这些区域未发生非同义替代;3 个基因片段(*ACO1*-3'端、*CHD1*-5'端和 *DMRT1*)的 ω 值介于 0.1 ~ 0.5 之间;2 个基因(*CHD1*-3'端和 *GHR*)的 ω 值大于 0.5。*CHD1* 基因的 2 个不同片段在 ω 值上相差非常大(表 2)。

表 2 6 个基因 cDNA 片段序列的选择压力分析结果

Table 2 Results of the selective pressure analyses for the partial cDNA sequences from six genes

基因片段	Ka	Ks	ω (YN)	ω (MYN)
<i>ACO1</i> -3'端	0.005 365	0.044 055	0.121 783	0.128 279
<i>ATP5A1</i> -5'端	NA	0.102 447	0	0
<i>ATP5A1</i> -3'端	NA	0.086 191	0	0
<i>CHD1</i> -5'端	0.002 884	0.018 413	0.156 603	0.150 357
<i>CHD1</i> -3'端	0.012 454	0.016 018	0.777 490	0.868 393
<i>DMRT1</i>	0.002 094	0.012 791	0.163 682	0.162 249
<i>GHR</i>	0.008 027	0.013 605	0.590 036	0.588 894
<i>RPS6</i>	NA	0.033713	0	0

NA: not available, 未获得数据; $\omega > 0.5$ 的值加粗显示。

3 讨论

如前所述,壁虎属中既有雄性为异配性别的物种(XY型,如大壁虎),又有雌性为异配性别的物种(ZW型,如铅山壁虎)。Kawai 等对采自日本冲绳的铅山壁虎进行核型分析,发现雌性样本中存在异型性染色体,推断该物种为 ZW 型性染色体。在此基础上,挑选了 6 个鸟类 Z 染色体连锁的基因,在铅山壁虎中进行了 cDNA 克隆和染色体定位。结果出乎意料:从铅山壁虎中克隆出的这 6 个基因都定位在 Z 和 W 染色体上,提示铅山壁虎的性染色体与鸟类的 ZW 染色体有相同的起源^[4]。这个现象在爬行类中是首次发现,因为之前的研究都显示,鸟类的 Z 染色体对应于 3 种蛇类以及一种龟类的常染色体^[16-18]。同时也提示,有鳞目中存在多种类型的性染色体起源方式,以及多种不同的基因参与性别决定^[4]。大壁虎和多疣壁虎虽有性染色体,但至今尚未有性别决定基因或 X/Y 染色体连锁基因的相关报道。

考虑到无蹼壁虎与铅山壁虎有较近的亲缘关系,可能同样有类似的 Z/W 染色体连锁基因,本文使用 RT-PCR 技术进行了这 6 个基因的 8 个 cDNA 片段的克隆,并完成测序。从比对结果来看,除 *CHD1*-5'端序列中有 3 bp 的缺失外,其余基因序列均与来自铅山壁虎的同源基因具有相同的核苷酸和氨基酸长度。同源性分析显示,它们在核苷酸水平和氨基酸水平都具有非常高的保守性(97% ~ 100%)(表 1);在与有鳞目、龟鳖目和鳄目的其他已知序列比较时,发现 6 个基因 8 个片段有不同程度的相似性,*GHR* 基因在核苷酸水平和氨基酸水平的相似性都最低(表 1),与该基因片段在进化分析中较高的 ω 值是一致的。*CHD1* 基因的 2 个片段(5'端和 3'端)的 ω 值相差很大(YN:0.156603 vs. 0.77749;MYN:0.150357 vs. 0.868393),说明这 2 个片段存在不一样的选择压力,而这种选择压力的差异应该是与功能的差异密切相关的。

无蹼壁虎的核型研究显示该物种中并不存在异型的性染色体^[5,19],孵化实验发现其性别决定方式是 TSD 型^[10],但这些并不代表无蹼壁虎中不存在与性别决定相关的基因。相反,GSD 与 TSD 很可能共存于同一物种中,而这在爬行动物中并不罕见。正是由于性别决定机制的复杂性,壁虎类动物中尚未有直接与性别决定相关的基因的报道。从性染色体连锁的基因出发研究其功能,是发现和研究性别决定基因的一个重要途径,因为了解得比较清楚的如哺乳类、鸟类的性别决定基因都是性染色体连锁的。此外,通过这些基因在壁虎类近缘物种中的染色体定位研究,将有助于进一步了解不同类型性染色体的起源和进化。

[参考文献]

- [1] Ezaz T, Sarre S D, O' Meally D, et al. Sex chromosome evolution in lizards: independent origins and rapid transitions [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2009, 127(2/4): 249–260.
- [2] Solleder E, Schmid M. XX/XY sex chromosomes in *Gekko gecko* (Sauria, Reptilia) [J]. Amphibia Reptilia, 1984, 5(3/4): 339–345.
- [3] Yoshida M, Itoh M. Karyotype of the gecko, *Gekko japonicus* [J]. Chromosome Information Service, 1974, 17: 29–31.
- [4] Kawai A, Ishijima J, Nishida C, et al. The ZW sex chromosomes of *Gekko hokouensis* (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species [J]. Chromosoma, 2009, 118(1): 43–51.
- [5] 陈俊才, 彭先步, 余多慰. 壁虎属三种壁虎的核型研究 [J]. 两栖爬行动物学报, 1986, 5(1): 24–29.
- [6] 吴贯夫, 赵尔宓. 大壁虎 (*Gekko gecko*) 和蹼趾壁虎 (*G. subpalmatus*) 的染色体组型研究 [J]. 两栖爬行动物学报, 1984, 3(2): 61–64.
- [7] 王蕊芳, 马昆, 施立明, 等. 大壁虎的染色体及减数分裂联会复合体的研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10(4): 271–275.
- [8] Cohen M M, Huang C C, Clark H F. The somatic chromosomes of 3 lizard species: *Gekko gecko*, *Iguana iguana* and *Crotaphytus collaris* [J]. Experientia, 1967, 23(9): 769–771.
- [9] Gamble T. A review of sex determining mechanisms in *geckos* (Gekkota: Squamata) [J]. Sexual Development, 2010, 4: 88–103.
- [10] 丁国骅. 多疣壁虎的温度依赖性性别决定: 现象和生理机制 [D]. 南京: 南京师范大学生命科学学院, 2012: 1–141.
- [11] Sarre S D, Georges A, Quinn A. The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles [J]. Bioessays, 2004, 26(6): 639–645.
- [12] Shine R, Elphick M J, Donnellan S. Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population [J]. Ecology Letters, 2002, 5(4): 486–489.
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [14] Zhang Z, Li J, Zhao X Q, et al. KaKs_Calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2006, 4(4): 259–263.
- [15] Yang Z, Nielsen R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(1): 32–43.
- [16] Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, et al. Highly conserved linkage homology between birds and turtles: birds and turtle chromosomes are precise counterparts of each other [J]. Chromosome Research, 2005, 13(6): 601–615.
- [17] Matsubara K, Tarui H, Toriba M, et al. Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 2006, 103(48): 18190–18195.
- [18] Kawai A, Nishida-Umehara C, Ishijima J, et al. Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2007, 117(1/4): 92–102.
- [19] 雷富民, 方荣盛, 李克勤. 无蹼壁虎和多疣壁虎种群内的差异 [J]. 陕西师大学报: 自然科学版, 1992, 20(2): 93–94.

[责任编辑: 黄 敏]