

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01132

半滑舌鳎 *Dmrt1* 蛋白表达、纯化及功能

胡乔木^{1,2}, 王凯琳², 陈松林¹

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 通过分析半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *Dmrt1* 重组蛋白注射卵巢后基因表达调控, 探讨 *Dmrt1* 在半滑舌鳎性别决定与分化中的功能。实验利用原核表达系统(Pet-32a)对半滑舌鳎 *Dmrt1* 基因进行重组表达, 并通过亲和层析纯化获得了重组目的蛋白(Pet-32-dmrt1)。重组蛋白注射卵巢后实时定量 PCR 分析结果显示, *Cyp19a* 和 *Foxl2* 在 6~24 h 内两基因表达量均显著下调, *Sox9a* 基因表达量在 6~24 h 内有显著上调, 但 48 h 后 3 个基因的表达量逐渐恢复正常表达水平。研究结果证实, *Dmrt1* 重组蛋白具有生物活性, 且对性别相关基因表达调控具有一定的影响, 在性别决定中发挥一定作用。

关键词: 半滑舌鳎; *Dmrt1*; 蛋白表达; 功能; 性别决定

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1132-07

Dmrt (Doublesex and mab-3 related transcription factor)基因家族是与动物性别决定与性别分化相关的基因家族, 特别在部分鱼类性别决定中发挥至关重要的作用^[1]。其中, *Dmrt1* 是目前发现唯一保守的参与动物性别决定及性腺发育相关的性别基因。近年来, 在鱼类中 *Dmrt1* 基因在斑马鱼(*Danio rerio*)^[2]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[3]、石斑鱼(*Epinephelus merra*)^[4]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[5]、半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis* Günther)^[6]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[7]、胡子鲶(*Clarias fuscus*)^[8]、稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)^[9]中相继克隆和表达研究。发现其仅在性腺中表达, 在其他组织中几乎不表达, 并且在雌雄性腺中还存在显著性的差异表达, 在雄性性腺中表达量显著高于雌性, 表明该基因可能与性别分化和性腺发育相关。但关于该基因的功能的研究报道较少, 在鸡中 Nanda 等^[10]发现 *Dmrt1* 基因定位于 Z 染色体上; Smith 等^[11]采用小

RNA 技术干扰 *Dmrt1* 两个不同外显子, 减弱了 *Dmrt1* 的表达, 遗传雄性的鸡有部分性腺雌性化。

半滑舌鳎属于舌鳎科(Cynoglossidae), 舌鳎属(*Cynoglossus*), 是中国近海常见的暖温性鱼类, 近年来成为一种优良的增养殖对象^[12]。半滑舌鳎雌鱼生长速度是雄鱼的 3~4 倍, 因而对该鱼性别决定与性腺分化机理研究, 培育高雌性苗种, 提高半滑舌鳎产量具有重要意义。本研究室近年来克隆了半滑舌鳎性别相关基因 *Cyp19a*^[13]、*Foxl2*^[14]、*Dmrt1*^[6]、*Sox9a*^[14]等, 并对其不同空间与时间表达模式进行研究, 发现 *Dmrt1* 在雄性性腺中特异表达, 在其他组织中无表达。有关鲆鲽性别相关基因的研究主要见于半滑舌鳎、牙鲆的 *Dmrt1* 和 *Cyp19a*^[5], 大西洋鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[15]的 CYP19Arom。但对这些鲆鲽鱼类性别相关基因的研究仅在于克隆与表达, 对性别相关基因功能的研究鲜见报道。本研究通过构建

收稿日期: 2013-03-05; 修订日期: 2013-04-17.

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA092203); 国家自然科学基金项目(31130057, 31072202); 山东省泰山学者工程专项资助

作者简介: 胡乔木(1984-), 男, 博士研究生, 主要从事水产养殖研究

通信作者: 陈松林, 研究员, 博士生导师, 主要从事水产生物技术. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

Dmrt1 原核表达载体, 将表达纯化 *Dmrt1* 蛋白注射 1 龄半滑舌鲷卵巢, 不同时间检测 *Cyp19a*、*Foxl2*、*Sox9a* 等基因表达情况, 进一步了解 *Dmrt1* 在半滑舌鲷性别决定与分化中的作用, 为半滑舌鲷性别控制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 实验材料 半滑舌鲷取自山东海阳海珍品养殖基地, 精巢取出后迅速投入液氮保存, 后转于 -80°C 低温冰箱保存用于组织 RNA 提取。感受态 TOP10 和表达宿主菌 BL21(DE3)均购于北京天根生化科技有限公司; 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, 表达载体 PET-32a(+)质粒由本实验室保存。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取试剂 TRIzol (Ambion); 限制性核酸内切酶, DNA marker (TaKaRa); 质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶纯化试剂盒(Zymo); T_4 DNA 连接酶(Fermentas); 其他试剂均为国产或进口分析纯产品。

称取 0.1 g 半滑舌鲷精巢组织, 利用 TRIzol 试剂一步法提取总 RNA。cDNA 采用 TaKaRa 反转录试剂盒, 反应条件严格按照说明书操作。

1.2 PET-32a-Dmrt1 的表达与纯化

1.2.1 表达载体的构建 据前期研究中 NCBI 报道的 *Dmrt1* 序列(EU070761)和表达载体 PET-32a(+) 序列特征, 设计原核表达引物 P32- *Dmrt1*-S: 5'-GGCGATATCATGAACAAGAACAAGCAGCGC-3'; P32-*Dmrt1*-A: 5'-CCGGAATTCTTATTTGTTTGT-TTCACCGTAAACG-3'。上游 5'端含 *EcoRV* 酶切位点, 下游 3'端含 *EcoRI* 酶切位点。以精巢 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 扩增 *Dmrt1* 编码区。将 PCR 产物纯化后与克隆载体 pMD18-T 连接, 将阳性克隆进行测序。将测序正确的克隆质粒与 PET-32a(+)同时用 *EcoRI* 和 *EcoRV* 进行双酶切, 琼脂糖电泳回收 *Dmrt1* 片段与表达载体质粒, 按照连接酶说明书, 用 T_4 DNA 连接酶连接, 构建重组表达质粒 PET-32a-*Dmrt1*, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态, 将检测阳性克隆进行测序, 测序

正确的克隆提取质粒。再将 PET-32a-*Dmrt1* 质粒转化表达感受态 BL21(DE3), 同时用 30%甘油保种待用, 脂质体 (DC-CHOL/DOPE) 制备参照 Zhang 等(2010)^[16]。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达与表达产物的初步分析 取 5 μL 保种的菌体与 1 mL 新鲜的 LB 培养基中(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 过夜培养, 将过夜培养的菌体 1%接种与 10 mL 新鲜的 LB 培养基中(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.6 ~ 0.8 时, 在对照组(PET-32a)和实验组(PET-32a-*Dmrt1*)菌液中加入 IPTG 诱导, 使 IPTG 终浓度为 1 mmol/L, 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 继续培养 6 h, 在 0、1、2、3、4、5 和 6 h 分别取样 1 mL, 将采集的样本在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 菌泥用 200 μL 的 PBS 缓冲液(NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 10 mmol/L, KH_2PO_4 2 mmol/L)洗 3 次, 每次漂洗后 12 000 r/min 离心 2 min, 加入 30 μL 的 PBS 混匀, 在加入等体积的 2 \times 上样缓冲液(1 mol/L pH 6.8 Tris-HCl, 1%溴酚蓝, 0.154 g DTT, 10% SDS, 10% 甘油)处理, 沸水浴 5 min 裂解菌体, 收集的样品进行 12%SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.3 重组蛋白的分离纯化 将上述保种菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下大量(250 mL)培养至菌体密度达到 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 28 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 按照 1 g 湿菌体/10mL 裂解缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4 , 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, *DNaseI* 10 U, 200 μL 50 mmol/L, 200 μL 10 mg/L 溶菌酶)的比例重悬菌体, 在冰浴条件下超声破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 将上清用 0.45 μL 的过滤器过滤, 将过滤的上清收集备用。应用 His Trap HP(GE 公司)亲和层析柱进行分离纯化, 具体操作如下: 首先, 用 5 mL 蒸馏水洗 1 mL 柱子一次, 随后 5 mL 结合缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4 , 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)洗柱子, 再将收集的预处理的上清过柱子, 流速为 1 ~ 2 mL/min, 用 5 mL 结合缓冲液洗柱子, 再用 5 mL 的洗脱缓冲液(20 mmol/L Na_3PO_4 , 0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L

咪唑)洗脱 1 次, 最后用 5 mL 的结合缓冲液再生柱子。

1.2.4 蛋白浓度测定 采用北京天根生化科技有限公司的 BCA 蛋白定量试剂盒对纯化后的蛋白进行定量分析, 具体操作按照说明书进行。

1.3 重组目的蛋白(PET-32a-Dmrt1)注射卵巢后基因表达分析

取一龄半滑舌鲷雌鱼 40 尾, 其中 4 尾取性腺, 迅速投入液氮中冻存, 作为 0 h 对照。将目的蛋白与脂质体按照每 100 μ L 脂质体包裹 50 μ g 重组蛋白制备成重组蛋白混合液, 18 尾注射重组目的蛋白混合液, 另 18 尾注射失活重组蛋白(沸水浴 5 min)混合液作为对照组。实验组与对照组分别在注射后 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、72 h 取性腺迅速投入液氮中, 随后转入-80 保存备用, 每个组每个时间点采样 3 尾。根据 NCBI 中报道的半滑舌鲷性别相关基因 *Cyp19a*(EF134716)、*Foxl2*(GQ402462)和 *Sox9a*(GQ402461)等序列设计定量引物:

Cyp19a-S: ACGGGCTGAAATCGCAAG,
Cyp19a-A: GGTGAGGATGTGACCCAGTGT;
Foxl2-S: TGGTTGGAAGTGCGTGGG,
Foxl2-A: GAGAGGAAGGGCAACTACTGGA;
Sox9a-S: CGATTCCCCTGCGTCCA,
Sox9a-A: GCTTCAGTTCGGCTTTATTGG。

对注射重组蛋白后的性腺实时定量 PCR 检测各基因表达变化。将各基因不同时间表达量进行单因素方差多重比较, 用 SPSS 17 统计软件单因素 ANOVA, LSD 两两比较显著性差异, 将有显著性差异的组用不同字母表示。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白表达载体构建

对 *Dmrt1* 和 PET-32a 载体序列进行酶切位点分析, 设计酶切位点引物, 以精巢 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增, 获得含有 *Dmrt1* 的 777 bp 的目的片段(图 1)。回收目的片段, 连接到 pMD18-T 载体测序正确后, 提取阳性质粒, 再将质粒与 PET-32a 载体双酶切, 回收 *Dmrt1* 目的片段与 PET-32a 酶切产物, 用 T4 连接酶连接后转化 TOP10 感受态细胞, 送阳性克隆测序, 同时提质

粒双酶切验证, 结果如图 2 所示。

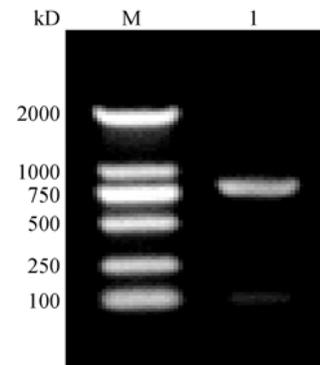


图 1 PCR 扩增 *Dmrt1* 基因

M:DNA 分子量 marker; 1.*Dmrt1* 基因扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *Dmrt1*
 M: marker, 1. The PCR amplification of *Dmrt1*

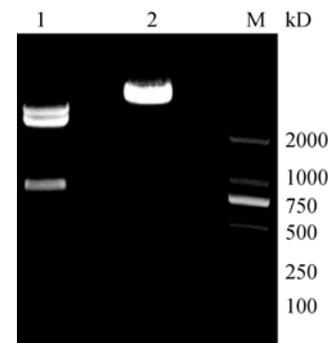


图 2 重组质粒酶切图谱

M: DNA 分子量 marker; 1: 重组质粒 PET-32-Dmrt1 双酶切,

2: 重组质粒 PET-32-Dmrt1

Fig. 2 Electropherogram of plasmid vectors restricted
 M: marker, 1: PET-32-Dmrt1 was restricted.
 2: PET-32-Dmrt1

2.2 重组蛋白的诱导表达和表达产物的纯化

2.2.1 重组蛋白的诱导表达 转化 BL21 感受态的阳性菌株, 经 IPTG 诱导 6 h 后, 12%SDS-PAGE 胶电泳检测重组蛋白的表达, 结果显示: 转化重组质粒的宿主菌蛋白表达谱与空载体对照组表达谱不同。生物信息学预测的分子量为 51 kD, 而宿主菌蛋白表达谱中在分子量 51 kD 的位置出现一条高表达的特异蛋白谱带(图 3), 该蛋白的分子量与空载体组大小不一致, 且表达量与载体对照组显著高, 所以推测这条高表达蛋白谱带为重组目的蛋白。通过凝胶扫描系统分析发现, 重组目的蛋白的表达量占总蛋白表达量的 50%左右。

2.2.2 蛋白的纯化 利用 GE 公司生产的亲和层析柱对超声波破碎菌体后的上清液进行重组蛋白的分离纯化, 经 SDS-PAGE 电泳检测显示在 51 kD 位置有一条单一的条带(图 4), 与预期结果一致。纯化后的目的蛋白经蛋白定量试剂盒检测后浓度为 850 $\mu\text{g/mL}$ 。

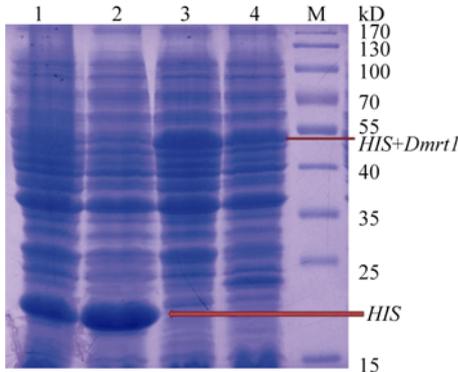


图 3 重组蛋白与 pet-32a 载体经 IPTG 诱导后的 SDS-PAGE 检测结果

M: 蛋白 marker; 1~2: pet-32a 经 IPTG 诱导后结果; 3~4: pet-32-Dmrt1 经 IPTG 诱导后结果。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed PET-32a-Dmrt1 fusion protein in *E. coli* BL21

M: protein marker; lanes 1-2: induced PET-32a; lanes 3-4: induced PET-32a-Dmrt1

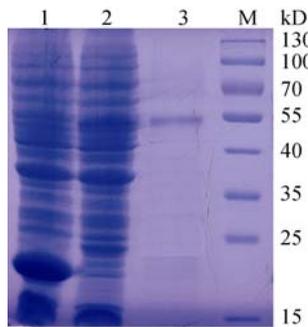


图 4 重组蛋白经亲和层析后结果

M: 蛋白 marker; 1: pet-32a 经 IPTG 诱导后结果; 2: pet-32-Dmrt1 经 IPTG 诱导后结果; 3: pet-32-Dmrt1 经亲和层析纯化后 SDS-PAGE 电泳结果。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed PET-32a-Dmrt1 fusion protein in *E. coli* BL21

M: protein marker; 1: induced PET-32a; 2: induced PET-32a-Dmrt1; 3: Dmrt1 protein purified by Ni column.

2.3 重组蛋白注射后对基因表达影响

对一龄半滑舌鲷卵巢, 通过实验组注射目的蛋白, 对照组注射失活的目的蛋白, 不同时间检

测性别相关基因 *Cyp19a*, *Foxl2* 和 *Sox9a* 等的表达情况变化, 将不同时间表达量进行单因素方差多重比较。分析结果显示; *Cyp19a* 在 6~24 h 内表达量显著下调, 24~36 h 内表达量逐渐上升, 到 36 h 表达量最高, 36 h 之后表达量逐渐恢复至正常水平(图 5); *Foxl2* 在 6~36 h 内表达量显著下调, 在 12 h 表达量最低, 36~48 h 内表达量逐渐上升, 到 48 h 表达量最高, 48~72 h 表达量逐渐恢复至正常水平(图 6); *Sox9a* 在 6~36 h 内表达量显著上调, 6 h 表达量最高, 36 h 后恢复正常水平(图 7)。

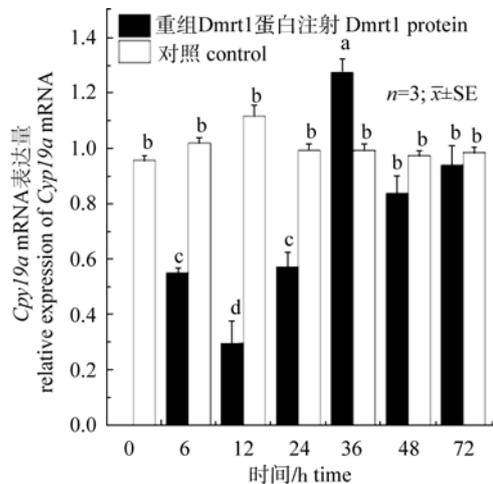


图 5 *Dmrt1* 重组蛋白与高温失活的重组蛋白注射卵巢后不同时间采样的实时定量 PCR 检测 *Cyp19a* 表达结果 柱上不同字母表示表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Expression of *Cyp19a* at different stage of ovary after injection of recombination protein Dmrt1 Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

Dmrt 基因家族是一个保守的性别相关基因家族, 先后在哺育类、鸟类、爬行类和鱼类中发现。*Dmrt1* 基因是 *Dmrt* 基因家族成员之一, 也是继 *SRY* 和 *Sox9a* 之后发现的又一个雄性性别和精巢发育相关基因^[1]。在老鼠的研究中发现, *Dmrt1* 基因的缺失可使支持细胞向粒层细胞转变, 表明 *Dmrt1* 基因是睾丸分化所必需^[17]。Matsuda 等^[18]发现青鳉精巢中表达且位于 Y 染色体上的雄性性别决定基因 *DMY*, 也属于 *Dmrt* 家族, 是 *Dmrt1* 基因的一个拷贝, 在青鳉性别决定中发挥主效作用。

本研究在前期获得半滑舌鲷 *Dmrt1* 全长 cDNA

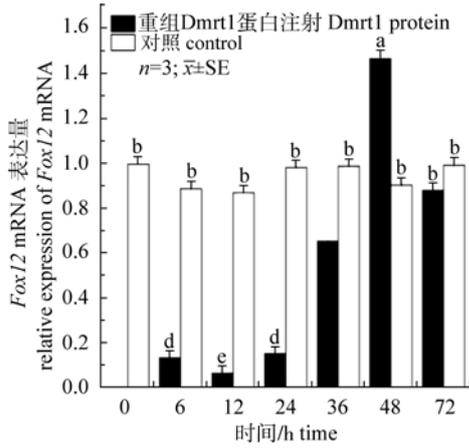


图 6 Dmrt1 重组蛋白与高温失活的重组蛋白注射卵巢后不同时间采样的实时定量 PCR 检测 *Foxl2* 表达结果 柱上不同字母表示表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.6 The expression of *Foxl2* at different stage of ovary after injection of recombination protein Dmrt1 Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

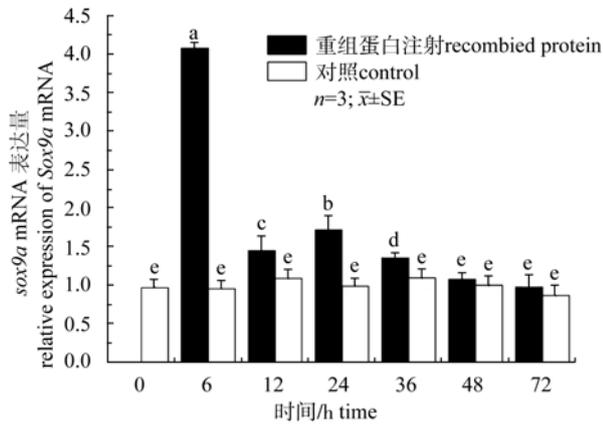


图 7 Dmrt1 重组蛋白与高温失活的重组蛋白注射卵巢后不同时间采样, 实时定量 PCR 检测 *Sox9a* 表达结果 柱上不同字母表示表示与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.7 The expression of *Sox9a* at different stage of ovary after injection of recombination protein Dmrt1 Values with different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

序列(EU070761)的基础上, 通过构建 PET-32-Dmrt1 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 来表达 Dmrt1 蛋白, 通过 6 h 的诱导, His 融合蛋白在原核表达体系中有效表达, 并且通过分离纯化了可溶性的目的蛋白。采用亲和层析的方法对目的蛋白进行了纯化, 并注射一龄半滑舌鲷雌鱼卵巢, 不同时间取性腺提 RNA 定量分析检测。根据以往研究显示蛋白进入细胞有多种途径, 如蛋白转导和蛋白转染。蛋白转导是蛋白中具有蛋白转导结构

域, 具有这种蛋白转导结构域的蛋白可以进入细胞, 无需转导载体; 没有蛋白转导结构域的蛋白有部分也能进入细胞, 但是这种方式进入细胞的机制现在依旧未知。例如, Zhou 等^[19]利用原核表达系统构建带蛋白转导结构域的原核表达载体, 在大肠杆菌中表达携带蛋白转导结构域的 SOX2 等转录因子蛋白, 将表达的转录因子蛋白与干细胞一起孵化, 在细胞中检测到转导的目的蛋白, 同时发现干细胞也被重组蛋白所诱导, 表明重组蛋白能转导进细胞, 并产生生物活性。在没有蛋白转导结构域的蛋白中, 利用蛋白转染载体也能将目的蛋白转染进细胞, 如李铮等^[20]利用两种方法制备阳离子脂质体包裹目的蛋白转染小鼠脾细胞, 用免疫荧光, SDS 聚丙烯酰胺和免疫印迹检测转染效果, 结果表明两种方法都能将目的蛋白转染进细胞, 且无显著性差异。蛋白转染进入细胞主要是通过脂质体将目的蛋白包裹起来, 形成较小的颗粒, 再通过细胞的生理活动将

包裹的颗粒转进细胞中, 这种外来的颗粒在细胞中首先会被溶酶体消化, 所以用这种方法转染蛋白会有部分被消化掉^[21], 但是没有被消化的颗粒就会进入细胞质中, 进入细胞质中的颗粒就会释放出重组蛋白, 释放的重组蛋白可能有部分会被溶酶体再次消化, 剩下一部分蛋白可能就会参与生理活动。如 Zhou 等^[22]用蛋白转染法将蛋白抗原转进 T 淋巴细胞并成功对其诱导, Ignatius 等^[21]利用脂质体包裹卵白蛋白进入 CD8+T 细胞, 在 T 细胞中能检测到卵白蛋白, 且发现 T 细胞有应答作用, 表明卵白蛋白通过脂质体包裹进入 T 细胞, 并发挥一定生物作用。本实验中也采用脂质体包裹重组目的蛋白注射雌鱼卵巢, 不同时期检测 *Cyp19a*、*Foxl2* 和 *Sox9a* 等基因表达变化, *Cyp19a* 基因的表达检测中发现, 6~24 h 内 *Cyp19a* 的表达量较对照组显著性降低, 表明注射的重组 Dmrt1 蛋白转入细胞并对基因表达调控发生影响; 24~36 h 内 *Cyp19a* 的表达量逐渐上升, 到 36 h 时表达量最高, 且显著性高于对照组, 可能是注射蛋白后生物体的一种反弹现象; 36 h 之后 *Cyp19a* 表达量逐渐下降至正常水平, 可能与注射

的蛋白在这个阶段逐渐降解有关。对 *Foxl2* 基因的表达情况进行检测时, 发现 *Foxl2* 表达图谱与 *Cyp19a* 相似 6~36 h 内表达量显著低于对照组, 36~48 h 逐渐增高, 48 h 最高且与对照组也存在显著性差异, 72 h 恢复正常水平。在检测 *Sox9a* 表达情况变化时发现, 在 6 h 时 *Sox9a* 表达量锐增, 并与对照组显著性差异, 12~36 h 内表达量下降但依旧高于对照组, 36 h 之后与对照组无差异, 恢复正常水平。*Sox9a* 与 *Cyp19a* 和 *Foxl2* 表达谱有较大差异, 注射 *Dmrt1* 重组蛋白后 *Sox9a* 表达有个锐增阶段, 随后维持在比对照组稍高阶段; 然而, *Cyp19a* 与 *Foxl2* 的表达在一定阶段受到抑制, 出现这两种差异表达谱的可能是 *Dmrt1* 维持 *Sox9a* 的表达, 但对 *Cyp19a* 与 *Foxl2* 表达有抑制作用。在小鼠中发现, 当敲除 *Foxl2* 基因时, 卵巢细胞表现出雄性化, 且 *Dmrt1* 表达上升, 当敲除 *Dmrt1* 时, *Foxl2* 被激活, 且支持细胞向粒层细胞转变; 另外还发现 *Dmrt1* 能维持 *Sox9a* 基因的表达, 当 *Sox9a* 敲除时, *Foxl2* 表达增强^[11, 16]。

本研究首次构建 *Dmrt1* 原核表达载体, 诱导表达半滑舌鲷 *Dmrt1* 蛋白, 并首次在蛋白水平上对 *Dmrt1* 基因功能初步研究。揭示了 *Dmrt1* 作为一种性别相关基因, 其重组蛋白在一定时间内对 *Sox9a* 表达有维持作用, 对 *Foxl2* 与 *Cyp19a* 表达有抑制作用, 表明纯化的重组蛋白具有一定的生物活性, 且 *Dmrt1* 是一个雄性性别决定与发育相关基因, 但 *Dmrt1* 更精确的生物学功能还有待深入的研究。

参考文献:

- [1] Koopman P. The genetics and biology of vertebrate sex determination [J]. *Cell*, 2001, 105: 843–847.
- [2] Jorgensen A, Morthorst J, Andersen O, et al. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008(6): 25.
- [3] 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*) [J]. *Dev Dynam*, 2008, 237: 297–306.
- [4] Alam M A, Kobayashi Y, Horiguchi R, et al. Molecular cloning and quantitative expression of sexually dimorphic markers *Dmrt1* and *Foxl2* during female-to-male sex change in *Epinephelus smerra* [J]. *Gen Comp Endocr*, 2008, 157: 75–85.
- [5] 文爱韵, 尤锋, 孙鹏, 等. 牙鲆 *dmrt1* 基因的克隆及其与 *CYP19Arom* 基因的组织表达分析[J]. *海洋科学*, 2010, 34(11): 97–102.
- [6] 邓思平, 陈松林. 半滑舌鲷 *Dmrt1a* 基因的 cDNA 克隆及其表达[J]. *中国水产科学*, 2008, 15(4): 577–583.
- [7] 李林, 梁宏伟, 李忠, 等. 黄颡鱼 *DMRT 1* 基因 cDNA 全长克隆及其表达分析[J]. *华中农业大学学报*, 2012, 31(2): 220–226.
- [8] 邓思平, 王静杰, 吴天利, 等. 胡子鲇 *Dmrt1* 基因全长 cDNA 克隆及其表达分析[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 610–617.
- [9] Cao M X, Duan J D, Cheng N N, et al. Sexually dimorphic and ontogenetic expression of *dmrt1*, *cyp19a1a* and *cyp19a1b* in *Gobio cyprisrarus*[J]. *Compar Biochemi Physiol, Part A*, 2012, 162: 303–309.
- [10] Nanda, I, Shan Z, Scharl M, et al. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9[J]. *Nat Genet*, 1999, 21: 258–259.
- [11] 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: 267–271.
- [12] 邓景耀, 孟田湘, 任胜民, 等. 渤海鱼类种类组成及数量分布[J]. *海洋水产研究*, 1988(9): 10–98.
- [13] Deng S P, Chen S L, Liu B W, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of gonadal *CYP19A* aromatase in the half-smooth tongue-sole, *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Aquaculture*, 2008(10): 1–8.
- [14] Dong X L, Chen S L, Ji X S, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Acta Oceanol Sin*, 2011, 30(1): 68–77.
- [15] Matsuoka M P, Van Nes S, Andersen O, et al. Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development [J]. *Compar Biochemi Physiol, Part B: Biochem Molec Biol*, 2006, 144: 128–135.
- [16] Zhang Y, Li H M, Sun J, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factor on plasmid pDNA and siRNA gene delivery[J]. *Intern J Pharm*, 2010, 390: 198–207.
- [17] Matson C K, Murphy M W, Sarver A L, et al. *DMRT1* prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis[J]. *Nature*, 2011, 476: 101–104.
- [18] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. *DMY* is

- aY-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. *Nature*, 2002, 417: 559–563
- [19] Zhou H Y, Wu S L, Joo J Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009(4): 1–4.
- [20] 李铮, 刘君炎. 两种方法制备阳离子脂质体包裹蛋白转染法的比较[J]. *华中医学杂志*, 2004, 28(2): 95–96.
- [21] Ignatius R, Mahnke K, Rivera M, et al. Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8⁺ T-cell responses in vivo[J]. *Blood*, 2000, 96(10): 3505–3513.
- [22] Zhou F T, Rouse B, Huang L. Induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo with protein antigen entrapped in membranous vehicles[J]. *J Immunol*, 1992, 149: 1599–1604.

Protein expression, purification, and elementary function of *Dmrt1* in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

HU Qiaomu^{1,2}, WANG Kailin², CHEN Songlin¹

1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We evaluated the role of *Dmrt1* in regulating sex determination and differentiation in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). The recombinant protein of *C. semilaevis Dmrt1* was expressed by the prokaryotic expression system (Pet-32a) and the protein (Pet-32-dmrt1) was subsequently purified by immobilized-metal affinity chromatography. We measured gene expression after injection of the recombinant protein Pet-32-Dmrt1 into the ovary. The expression of CYP19A and Foxl2 decreased significantly between 6 and 24 h after injection and the mRNA transcription level of Sox9aa was significantly increased between 6 and 24 h. However, the expression of all three genes expression returned to normal 48 h after injection. Our results indicate that *Dmrt1* recombinant protein has biological activity, and plays a role in sex differentiation by regulating sex related gene expression.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *Dmrt1*; protein expression; elementary function

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn