

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)雌性特异基因 CSW3 重组蛋白的表达与应用*

王天姿^{1,2} 王 娜² 胡乔木² 邵长伟² 陈松林^{2①}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003;

2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 CSW3 基因序列来源于半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)全基因组测序项目,是经过筛选得到的雌性特异候选基因之一。本研究探索了半滑舌鳎雌性相关基因 CSW3 的表达与应用,构建了半滑舌鳎雌性特异 CSW3 基因重组表达载体,通过大肠杆菌进行了体外重组表达,对基因表达产物进行分离纯化,并通过蛋白转染的方法研究了纯化的蛋白对几个性别相关基因的影响。结果显示,雌性特异 CSW3 重组蛋白注射鱼体后对半滑舌鳎性腺 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因的表达水平具有显著影响,能够引起雌性相关基因 *foxl2* 表达上调、雄性相关基因 *sox9a* 和 *amh* 表达下降。从蛋白水平对雌性相关基因 CSW3 的基因功能进行初步研究,为半滑舌鳎性别控制及全雌苗育种提供基因资源及技术方法。

关键词 半滑舌鳎;重组蛋白;CSW3;蛋白转染;性别相关基因

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)03-0030-06

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国特有的名贵经济海水养殖鱼类,主要分布于黄渤海区,属于近海温水性底层鱼类。由于其肉质鲜美、营养丰富,深受消费者喜爱。半滑舌鳎雌、雄个体在生长速率上存在巨大差异,雌性比雄性生长快 2-3 倍。由于雄性个体生长缓慢、个体小,致使半滑舌鳎的养殖成本升高,降低了养殖产量和效益,严重影响了半滑舌鳎苗种的推广,阻碍了半滑舌鳎养殖产业的发展。半滑舌鳎性别决定类型为 ZW 型,雌性具有特异的 W 染色体。半滑舌鳎全基因组测序工作的完成为半滑舌鳎雌雄特异基因的筛选鉴定提供有力支撑,而性别相关基因功能的分析研究对于揭示半滑舌鳎性别决定机制、培育半滑舌鳎高雌性化苗种、提高半滑舌鳎的养殖产量至关重要(Chen *et al*, 2014)。

鱼类性别决定相关基因的研究主要集中于 *dmrtl* (Raymond *et al*, 1998; Smith *et al*, 2009; Shetty *et al*,

1999; Tannour-Louet *et al*, 2010; Matsuda *et al*, 2002; 邓思平等, 2008a; Chen *et al*, 2014)、芳香化酶基因(邓思平等, 2008b)、*amh*、*sox9* (Fukada *et al*, 1995; Ito *et al*, 1995; 常重杰等, 2000; Nakamoto *et al*, 2005; Dong *et al*, 2011)、*GSDF* 等基因。另外, *dmrt4*、*foxl2* (Dong *et al*, 2011; Tannour-Louet *et al*, 2010; Uhlenhaut *et al*, 2009)、*sox10*、*dax1*、*dmrt3*、*wtl*、*sfl* 和 *tra2* 基因也有报道。在半滑舌鳎中已克隆出 *dmrtl*、*cyp19a* (Deng *et al*, 2008)、*foxl2*、*sox9a*、*figla* 等性别相关基因(孙建等, 2014), 并从蛋白水平上对雄性特异基因 *dmrtl* 进行基因功能研究(胡乔木等, 2013)。半滑舌鳎雌性特异基因序列来源于半滑舌鳎基因组测序项目(Chen *et al*, 2014), 对半滑舌鳎雌性个体和雄性个体采用 SOLEXA 测序技术分别进行全基因组测序和组装,采用生物信息学方法对获得的雌鱼基因组序列和雄鱼基因组序列进行比对分析,从中筛选出半滑舌鳎雌性

* 国家自然科学基金(31130057)、山东省泰山学者攀登计划专项和中国水产科学研究院基本科研业务费(2013A0402)共同资助。王天姿, E-mail: wangtz163163@163.com

① 通讯作者: 陈松林, 研究员, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-05-10, 收修改稿日期: 2014-06-17

特异候选基因。本研究构建了其中一个雌性特异候选基因 CSW3 的原核表达载体,并将其转化到大肠杆菌 BL21 中,进行 CSW3 基因体外重组表达,获得纯化的重组 CSW3 蛋白,并将纯化后的蛋白注射到 1 龄半滑舌鳎雄鱼精巢,于不同时间检测 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因表达水平,旨在了解 CSW3 在半滑舌鳎性别分化和性腺发育中的作用,为半滑舌鳎性别控制和全雌苗种研究提供基因资源和技术方法。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

注射用半滑舌鳎取自山东海阳黄海水产有限公司,选择 1 龄健康并经过遗传学鉴定的雄鱼 40 尾,体重 100–200 g。注射时间为 2013 年 11 月。

1.2 CSW3 基因重组表达载体的构建

半滑舌鳎雌性特异基因 CSW3 的 cDNA 序列来源于半滑舌鳎全基因组测序项目(Chen *et al.*, 2014),其 cDNA 全长为 1677 bp,包括 414 bp 的开放阅读框(ORF 区域),编码 137 个氨基酸,5'非编码区长 173 bp,3'非编码区长 1090 bp,有多聚腺苷酸加尾信号和多聚腺苷酸尾巴。根据中国水产科学研究院黄海水产研究所水产生物技术基因组研究室获得的 CSW3 基因序列,利用 PCR 技术,通过对 pET32a-CSW3(+)(Novagen)序列和 CSW3 基因 ORF 区序列进行酶切位点分析,设计带酶切位点特异引物 pET-32-CSW3S(AGCGGATCCATGGAGAACGCTCACATGAA)和 pET-32-CSW3A(AGCAAGCTTCTACAATGTCTCCAGGAACG)。上游 5'端含 *Bam*HI 酶切位点,下游 3'端含 *Hind* III 酶切位点。

以本实验室保存的半滑舌鳎卵巢 cDNA 为模板进行 PCR 反应,扩增 CSW3 基因编码区。将 PCR 产物纯化,并与 pET32a(+)同时用 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行双酶切,琼脂糖电泳回收 CSW3 基因片段与表达载体质粒,按照连接酶说明书,用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组表达质粒 pET32a-CSW3,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 pET32a-CSW3 质粒转化表达感受态 BL21(DE3)细菌,将 20% (体积比)的甘油加到感受态细菌菌种中,于 -80℃ 冷冻保存作为保种菌。

1.3 重组蛋白的诱导表达与表达产物的分析

取 5 μ l 保种大肠杆菌菌株,加入到 1 ml 新鲜的 TB 培养基中(含氨苄青霉素终浓度为 100 μ g/ml),25℃、200 r/min 过夜培养,将过夜培养细菌按 1% (体积比)接种到 20 ml 新鲜的 TB 培养基中(含氨苄青霉素终浓度

为 100 μ g/ml),25℃、250 r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时,在实验组(pET32a-CSW3)菌液中加入 IPTG 诱导,使 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L,对照组(pET32a-CSW3)菌液中不加 IPTG,28℃、250 r/min 继续培养 16 h,离心(4℃、12000 r/min,5 min)收集菌体,采用 JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机破碎细胞,离心后分别取上清液和沉淀,进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 重组蛋白的分离纯化

将表达阳性的原菌液 1 : 100(体积比)接种于 1000 ml TB 培养基中,在 37℃ 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,在 25℃ 继续培养 16 h,离心收集菌体,将菌体沉淀重悬于 25 ml pH 为 7.9、冰预冷的结合缓冲液(25 ml 结合缓冲液中含有 0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L 咪唑)中。超声破碎裂解细胞,离心(4℃、12000 r/min,10 min)收集上清液,将上清液用 0.45 μ m 的过滤器过滤,将过滤液收集备用。参照胡乔木等(2013)的方法,应用 His Trap HP(GE 公司)亲和层析柱进行分离纯化。

收集经过亲和层析后纯化的重组蛋白样品,采用 Solarbio 公司的透析袋进行过夜透析处理后,在 Thermo 公司的冻干机 Heto PowerDry LL3000 上真空冷凝干燥,PBS 溶解。15% SDS-PAGE 电泳检测,然后用 His 标签单克隆抗体进行 Western-blot 分析(胡乔木等,2013),鉴定表达的融合蛋白正确与否。

1.5 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,按说明书要求绘制标准曲线,对纯化后的蛋白进行定量分析。

1.6 CSW3 对半滑舌鳎性别相关基因表达的影响

取 100–200 g 重的 1 龄半滑舌鳎雄鱼 40 尾,其中 4 尾取性腺,检测其中的 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因表达水平作为 0 小时对照。将目的蛋白与转染佐剂脂质体 DC-CHOL/DOPE(Sigma 公司,5 μ g/ μ l)按照每 100 μ l 脂质体包裹 150 μ g 目的蛋白的比例制备重组蛋白混合液,用无菌注射器在 18 尾鱼精巢中注射 CSW3 蛋白(15 μ l,1.5 mg/ml),另 18 尾注射失活 CSW3 蛋白(沸水浴 5 min 失活,注射量为 15 μ l,1.5 mg/ml)作为对照组。实验组与对照组分别在注射后 6、12、24、48、72、96 h 取性腺迅速投入液氮中,每组在每个时间点采样 3 尾。根据 NCBI 中报道的半滑舌鳎性别相关基因 *foxl2* (GQ402462)、*sox9a* (GQ402461)和 *amh* (JN100095)等序列设计定量 PCR 引物,各引物的序列如下:

Foxl2-S: GAGAGGAAGGGCAACTACTGGA;
 Foxl2-A: TGGTTGGAAGTGCCTGGG;
 Sox9a-S: CGATCCCCTGCGTCCA;
 Sox9a-A: GCTTCAGTTCGGCTTTATTGG;
 Amh-S: GAGGATTGGCATTGAAAC;
 Amh-A: GACAAGCAGAAGCGGAGT。

采用实时定量 PCR 技术对注射重组蛋白后的半滑舌鲷性腺进行 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因表达水平的分析。

2 结果

2.1 重组蛋白的诱导表达与表达产物的分析

构建了 CSW3 原核表达载体 pET32a-CSW3, 将此载体转染大肠杆菌并用 IPTG 诱导表达。发现经 IPTG 诱导后的菌液上清(图 1-A: 3)中有 1 条分子量为 33 kDa 的蛋白带, 与经分子生物学预测的目的蛋白分子量相同。而菌体沉淀(图 1-A: 4)和未经 IPTG 诱导的对照组中则无此条蛋白带(图 1-A: 1, 2)

2.2 重组蛋白的分离纯化

收集经过亲和层析后纯化的重组蛋白样品, 采用 Solarbio 公司的透析袋进行过夜透析处理后, 在 Thermo 公司的冻干机 Heto PowerDry LL3000 上真空冷冻干燥, PBS 溶解。12% SDS-PAGE 电泳检测, 观察到 1 条单一的分子量为 33 kDa 左右的蛋白, 与预测结

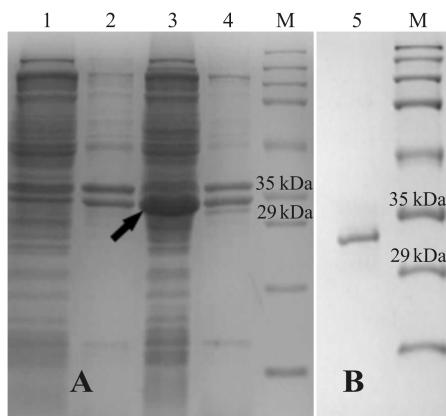


图 1 半滑舌鲷 CSW3 原核表达

Fig.1 The prokaryotic expression of CSW3 of half smooth tongue sole

1, 2: 未诱导的 pET-32a-CSW3 蛋白; 3, 4: 诱导的 pET-32a-CSW3 蛋白; 5: 纯化后的 pET-32a-CSW3 蛋白;
 M: 标准蛋白 Marker
 Lane 1 and 2: pET-32a-CSW3 without induction; Lane 3 and 4: pET-32a-CSW3 induction; 5: pET-32a-CSW3 purified product, M: Protein marker

果一致(图 1-B), 命名为 CSW3 重组蛋白。纯化后的目的蛋白经蛋白定量试剂盒检测, 浓度为 1.5 mg/ml。

2.3 半滑舌鲷 CSW3 重组表达产物生物活性的测定及其应用

将 CSW3 蛋白注射到 100–200 g 的半滑舌鲷雄鱼精巢, 检测重组 CSW3 蛋白对性腺 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因表达水平的影响, 发现注射 CSW3 蛋白, 雌性相关基因 *foxl2* 的表达水平在 12、24、72 h 都有升高趋势(图 2)。与此相反, 雄性相关基因 *sox9a* 的表达水平在注射后 24–96 h 之间都有下降趋势(图 3), 雄性相关基因 *amh* 的表达水平在注射后 12、48、72、96 h 也有下降趋势(图 4)。

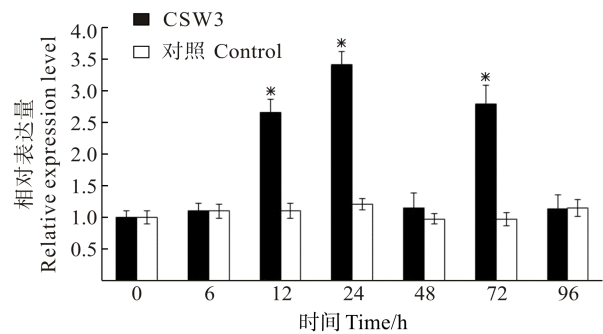


图 2 pET-32a-CSW3 蛋白注射后 *foxl2* 的表达分析
 Fig.2 The expression of *foxl2* after the injection of pET-32a-CSW3

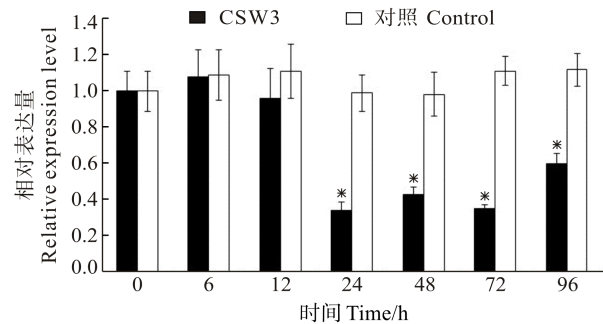


图 3 pET-32a-CSW3 蛋白注射后 *sox9* 表达分析
 Fig.3 The expression of *sox9* after the injection of pET-32a-CSW3

3 讨论

在半滑舌鲷中已发现并克隆出了雄性相关基因 *dmrt1*(邓思平等, 2008a)、*amh*、*sox9* (Dong *et al.*, 2011), 并通过蛋白转染将 *dmrt1* 原核表达蛋白注入雌鱼卵巢, 发现其能引起卵巢雄性相关基因 *sox9a* 表达上调, 并抑制雌性相关基因 *cyp19a* 和 *sox12* 表达(胡乔木等, 2013)。半滑舌鲷雌性相关基因 *cyp19a* (Deng *et al.*, 2008)、*foxl2* (Dong *et al.*, 2011)等基因也相继被克

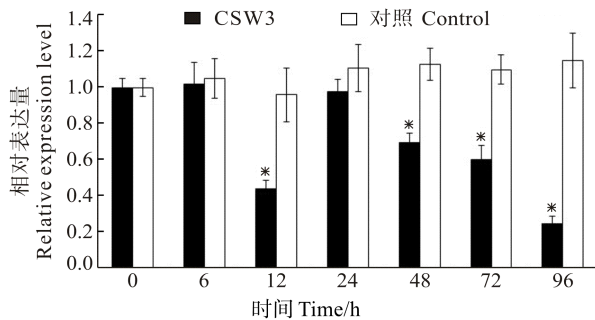


图 4 pET-32a-CSW3 蛋白注射后 *amh* 表达分析
Fig.4 The expression of *amh* after the injection of pET-32a-CSW3

隆, 本实验室先前将 UBC9 重组表达蛋白注入半滑舌鳎卵巢中, 发现在一定时间内能引起 *FST* 基因表达上调, 雌性表达基因 *cyp19a1a*、*foxl2*、*ctnnb1* 表达量下降(Hu *et al*, 2013)。本研究在前期获得 CSW3 基因序列的基础上, 通过将构建的原核表达载体 pET32a-CSW3 转化大肠杆菌 BL21, 优化诱导条件, 成功获得 CSW3 重组蛋白, 通过蛋白转染的方法将目的蛋白导入雄鱼精巢。有关蛋白质等生物大分子在进入细胞发挥生物学作用前首先要跨过主要障碍——细胞膜(Belting *et al*, 2005), 蛋白可利用自身携带的跨膜结构域或与细胞穿透肽等协助跨膜分子融合跨过细胞膜。Frankel 等(1988a、b)发现, HIV-TAT 蛋白含有一段包含 48–60 个氨基酸片段的短肽, 该短肽协助 TAT 蛋白穿过细胞膜继而激活 HIV 特异表达基因。细胞穿透肽(Cell Penetrating Peptide, CPP)是一类含有丰富碱性氨基酸(如精氨酸、赖氨酸)的天然多肽, 能自由跨过细胞膜(EI-Sayed *et al*, 2009)。Kim 等(2009)将 4 种重编程基因(*oct4*, *sox2*, *klf4*, *c-Myc*)表达蛋白与一种锚定 CPP 融合后, 导入人类成纤维细胞, 成功将该细胞诱导为 iPS 细胞, 这种蛋白诱导的人类 iPS 细胞与人类胚胎干细胞在形态、增殖性、特殊标记蛋白表达等方面的极高相似性, 表明生物大分子蛋白质能够被转导进入细胞并发挥生物学功能。对于不具备跨膜转导结构域的蛋白, 还可借助脂质体转染等方法进入细胞。利用逆向蒸发法和超声冻融法制备的脂质体包裹人 IgG 转染小鼠脾细胞, 经检测发现 IgG 成功进入脾细胞(李峥等, 2004)。将制备的沙雷菌肽酶脂质体作用 Caco-2 细胞模型发现, 该酶的跨膜转染效果增强(Kv *et al*, 2008)。脂质体介导的胰高血糖素样多肽进入实验动物细胞中, 能够发挥降血糖功能(Hanato *et al*, 2009)。蛋白可借助脂质体跨过细胞膜障碍进入

细胞中发挥生物学功能。本研究将纯化后的 CSW3 重组蛋白与脂质体混合注射到 100–200 g 重的半滑舌鳎雄鱼精巢, 检测重组 CSW3 蛋白对性腺 *foxl2*、*sox9a*、*amh* 这 3 种性别相关基因表达水平的影响, 发现注射 CSW3 蛋白后, 雌性相关基因 *foxl2* 的表达水平在 12、24、72 h 都有升高趋势。与此相反, 雄性相关基因 *sox9a* 的表达水平在注射后 24–96 h 之间都有下降趋势, 雄性相关基因 *amh* 的表达水平在注射后也有下降趋势, 然而注射后精巢中性别相关基因的表达量变化趋势无规律性, 可能是由于鱼体自身对外源蛋白有免疫与消化过程, 原因有待深入研究。通过蛋白转染初步研究半滑舌鳎性别相关基因功能及相互间的影响, 为今后构建性别相关基因调控网络、探索半滑舌鳎性别决定与分化调控机制打下良好基础。

本项研究首次获得了半滑舌鳎雌性特异基因 CSW3 的重组蛋白, 并通过蛋白转染的方法发现体外重组蛋白 CSW3 蛋白能够明显升高雌性相关基因 *foxl2* 的表达水平, 具有刺激雌性相关基因 *foxl2* 表达的生物学活性, 同时还有降低雄性相关基因 *sox9a* 和 *amh* 表达水平的生物学活性。近年来, 随着微乳载药(Zhang *et al*, 2004; Cheng *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2010)、定位释药(Kumar *et al*, 2008)及基因工程(Page *et al*, 2001; 张文平, 2010¹⁾)技术的不断发展, 多肽和蛋白质药物(PPD)口服制剂的成功开发已不再遥远。半滑舌鳎雌性特异基因及其重组表达蛋白的获得为半滑舌鳎性别特异基因在性别控制和提高雌性鱼苗比例上的应用开辟了一个新的途径, 具有重要的应用潜力。

参 考 文 献

- 邓思平, 陈松林. 半滑舌鳎 *Dmrt1a* 基因的 cDNA 克隆及其表达. 中国水产科学, 2008a, 15(4): 577–584
- 邓思平, 陈松林, 刘本伟, 等. 半滑舌鳎脑芳香化酶基因 cDNA 克隆及表达分析. 动物学研究, 2008b, 29(1): 17–24
- 孙建, 陈松林, 谢明树, 等. 半滑舌鳎含 *sox9* 基因 BAC 克隆的筛选及 BAC-FISH 定位. 渔业科学进展, 2014, 35(1): 34–40
- 李峥, 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. 中华医学杂志, 2004, 28(2): 95–96
- 胡乔木, 王凯琳, 陈松林. 半滑舌鳎 *Dmrt1* 蛋白表达、纯化及功能. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1132–1138
- 常重杰, 周荣家, 余其兴. 大鳞副泥鳅中 *Sox9* 基因保守区的序列分析. 遗传学报, 2000, 27(2): 121–126

1) 张文平. 家蚕生物反应器生产的 BmrhGM-CSF 胶囊 I 期临床试验及口服吸收机制的研究. 浙江大学博士研究生学位论文, 2010

- Belting M, Sandgren S, Wittrup A. Nuclear delivery of macromolecules: barriers and carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(4): 505–527
- Cheng MB, Jin W, Wang JC, *et al.* Preparation and in vitro characterization of oral microemulsions containing earthworm fibrinolytic enzyme. *Chin J New Drugs*, 2009, 18(1): 78–83
- Chen SL, Zhang GJ, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to benthic life. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253–260
- Deng SP, Chen SL, Liu BW. Molecular cloning, characterization and expression analysis of gonadal Cyp19a aromatase in half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture*, 2008, (10): 1–8
- Dong XL, Chen SL, Ji XS. Molecular cloning, characterization and expression analysis of Sox9 and Foxl2 genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 30(1): 68–77
- El-Sayed A, Futaki S, Harashima H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J*, 2009, 11(1): 13–22
- Frankel AD, Bredt DS, Pabo CO. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science*, 1988a, 240(4848): 70–73
- Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 1988b, 55(6): 1189–1193
- Fukada S, Tanaka M, Lwaya M. The Sox gene family and its expression during embryogenesis in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Dev, Growth Differ*, 1995, 37(4): 379–385
- Hanato J, Kuriyama K, Mizumoto T, *et al.* Liposomal formulations of glucagon-like peptide-1: improved bioavailability and anti-diabetic effect. *Int J Pharm*, 2009, 382(1–2): 111–116
- Hu Q, Chen S. Cloning, genomic structure and expression analysis of *ubc9* in the course of development in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 2013, 165(3): 181–188
- Ito M, Ishikawa M, Suzuki S, *et al.* A rainbow trout SRY-type gene expressed in pituitary glands. *FEBS Lett*, 1995, 377(1): 37–40
- Kim D, Kim CH, Moon JI, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472–476
- Kumar P, Mishra B. Colon targeted drug delivery systems-an overview. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5(3): 186–198
- Kv S, Devi GS, Mathew ST. Liposomal formulations of serratiopeptidase: in vitro studies using PAMPA and Caco-2 models. *Mol Pharm*, 2008, 5(1): 92–97
- 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(6888): 556–563
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, *et al.* Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3): 729–736
- Page DT, Cudmore S. Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug Discov Today*, 2001, 6(2): 92–101
- Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, *et al.* Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 1998, 391(6668): 691–695
- Shetty S, Griffin DK, Graves JA. Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res*, 1999, 7(4): 289–295
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, *et al.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 2009, 461(7261): 267–271
- Tannour-Louet M, Han ST, Corbett S. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e15392
- Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, *et al.* Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell*, 2009, 139(6): 1130–1142
- Zhang J, Zhang C, Gao S. The study of oral absorption and delivery systems for peptide drugs. *Prog Pharm Sci*, 2004, 28(10): 437–441
- Zhang Y, Li H, Sun J, *et al.* DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Inter J Pharm*, 2010, 390(2): 198–207

(编辑 冯小花)

The Expression and Application of the Recombinant Protein of the Female Specific Gene CSW3 in Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

WANG Tianzi^{1,2}, WANG Na², HU Qiaomu², SHAO Changwei², CHEN Songlin^{2①}

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China Qingdao 266003;

2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Qingdao 266071)

Abstract The half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is a mariculture fish species in China that has high economic values. The growth of this fish is sexually dimorphic, and females grow 2–3 times faster than males. The tongue sole exhibits the phenomenon of sex reversal during the growth and has a ZZ-ZW sex-determining system, thus it is a valuable animal model in the study of the mechanisms of fish sexual growth dimorphism. Several sex-specific genes have been cloned from half-smooth tongue sole, but the functions of these genes remain unknown. This research aimed to preliminarily study the function of the female-related gene CSW3. CSW3 was one of the female specific genes in half-smooth tongue sole which was identified from the screening in the whole genome sequencing project of half-smooth tongue sole. The full length of CSW3 cDNA was 1677 bp and contained a 414 bp open reading frame which coded 137 amino acids. The sequence also included a 173 bp 5' noncoding region and a 1090 bp 3' noncoding region that possessed a polyadenylation signal and a poly A tail. We constructed a recombinant expression vector for CSW3 and the plasmid was transformed into *E. coli*. IPTG was used to induce the expression of CSW3 protein. The proteins were isolated and purified with His-tag purification of affinity chromatography. The western-blot analysis showed that the recombinant protein was 33 kDa, which was consistent with the bioinformatics prediction. We then investigated the function of CSW3 protein using protein transfection. The liposomes encapsulating CSW3 protein were injected into the gonad of male half-smooth tongue sole. The experimental group was injected with bioactive CSW3 protein, and the control group was injected with heat-inactivated CSW3 protein. Real time quantitative PCR analysis showed that there were changes in the expression of three sex-related genes including one female-related gene and two male-related genes. The results suggested that the female specific CSW3 protein may cause the up-regulation of the female-related gene *foxl2*, and the down-regulation of the male-related genes *sox9a* and *amh*.

Key words Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*); Recombinant protein; CSW3; Protein transfection; Sex-related gene

① Corresponding author: CHEN Songlin, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn