

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*) *CSFR2* 基因的 重组表达及其蛋白纯化与功能分析*

王凯琳^{1,2} 胡乔木³ 陈松林^{1①}

(1. 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;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院长江水产研究所 武汉 430223)

摘要 通过对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)进行全基因组及转录组测序, 预测了一个半滑舌鳎性别相关基因 *CSFR2*, 目前已对该基因进行了克隆和表达分析。为进一步研究 *CSFR2* 基因的功能, 本研究从蛋白层面入手, 构建了原核表达载体 pET-32a-*CSFR2*, 转化到大肠杆菌 *E. coli* 进行诱导表达, 用 His Trap 进行蛋白纯化, SDS-PAGE 电泳检测诱导及纯化产物, 并将表达纯化的 *CSFR2* 蛋白注射 1 龄半滑舌鳎精巢。由于 *CSFR2* 是一个性别相关基因, 因此无法通过免疫反应来直接检测其蛋白活性, 本研究通过不同时间点取样检测半滑舌鳎其他性别相关基因 *Cyp19a* 和 *Foxl2* 的表达量变化, 来间接反应 *CSFR2* 蛋白的活性及功能。实验结果显示, 重组蛋白能够进入到活体细胞内并发挥一定作用, 在 6–72 h 内对性别相关基因 *Cyp19a* 和 *Foxl2* 的表达有上调作用, 说明 *CSFR2* 蛋白具有生物活性, 并能调节其他性别相关基因的表达量, 间接促进雄激素转化为雌激素。本研究进一步了解 *CSFR2* 基因在半滑舌鳎性别决定与分化中的作用, 可为半滑舌鳎性别控制提供理论依据, 在人工诱导鱼类性逆转方面有重要应用价值。此外, 本研究为蛋白活性验证提供了一种新方法。

关键词 半滑舌鳎; 性别相关基因; *CSFR2*; 重组蛋白; 生物活性

中图分类号 S961 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)02-0030-07

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)属鲽形目、舌鳎科、舌鳎属, 和其他硬骨鱼不同, 半滑舌鳎的性别决定类型为雌性异配型(ZW♀/ZZ♂), 并且具有明显的性别二态性, 雌性比雄性生长迅速, 且体型为雄性的 2–4 倍(Zhuang *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009)。然而, 除了染色体性别决定以外, 在正常的养殖水温下(22 ℃), 有 14% 的 ZW 型遗传性别为雌性的个体会发生性反转, 成为表型性别为雄性的个体(Chen *et al.*, 2014)。由于半滑舌鳎性别决定机制复杂, 同时由基因和环境因素共同作用, 因此半滑舌鳎是一个用来研究性别决定机制以及性反转现象的典型范例。此外, 在生产上, 半滑舌鳎全雌育种可以增加经济效益, 研

究其性别决定机制具有实际意义。

目前, 半滑舌鳎全基因组和转录组测序已完成, 克隆获得了 *CSFR2* 基因全长。为进一步验证 *CSFR2* 基因的功能, 本研究从蛋白层面对该基因进行功能分析, 将 *CSFR2* 基因构建到原核表达载体 pET-32a, 诱导表达融合蛋白, 并检测其生物活性与功能。由于 *CSFR2* 是半滑舌鳎性别相关基因, 无法通过免疫反应来检测 *CSFR2* 蛋白的活性, 因此选择通过半滑舌鳎其他性别相关基因表达量的变化来检测 *CSFR2* 蛋白的活性, 间接反映出 *CSFR2* 基因的生物功能。*Cyp19a*(Deng *et al.*, 2009)和 *Foxl2*(Dong *et al.*, 2011)为半滑舌鳎雌性高表达基因, 它们在半滑舌鳎性别分化

* 国家自然科学基金(31130057)和山东省泰山学者工程专项共同资助。王凯琳与胡乔木为并列第一作者, 对本文贡献相等。王凯琳, E-mail: hzaukallen@163.com; 胡乔木, E-mail: hqmu@yfi.ac.cn

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

收稿日期: 2014-04-07, 收修改稿日期: 2014-06-18

和性腺发育中起重要作用, 其中 *Cyp19a* 基因的表达产物芳香化酶可催化雄激素转化为雌激素, 而 *Foxl2* 通过调节芳香化酶基因的表达来间接调控性别 (Yamaguchi *et al.*, 2007; Shigeo *et al.*, 2008)。鉴于 *Foxl2* 和 *Cyp19a* 在半滑舌鳎性别决定中的重要作用, 采用这两个基因为参照, 检测 CSFR2 蛋白的活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2014 年 1 月 21 日在山东省海阳市黄海水产有限公司选取 1 龄雄性半滑舌鳎 48 尾, 在实验室暂养 3 d 后, 进行蛋白注射实验, 之后取出精巢组织, 一部分用 Bouin 氏液固定, 用于性腺组织切片, 另一部分迅速投入液氮, 然后转入 -80°C 保存, 用于提取 RNA。同时剪取鳍条, 用于 DNA 提取。

1.2 实验方法

1.2.1 性别鉴定 首先, 根据本实验室建立的半滑舌鳎遗传性别鉴定技术, 剪鳍条提取 DNA, 用微卫星特异性引物 CseF-SSR1-a、CseF-SSR1-s 检测半滑舌鳎遗传性别 (Chen *et al.*, 2012)。将 Bouin 氏液中的精巢组织取出, 经酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋等步骤, 用切片机切片 (厚度为 $5\ \mu\text{m}$), 摊片, 烘片, H.E 染色, 最后用中性树胶封片。在显微镜下观察切片, 根据其含卵母细胞还是精母细胞来鉴定生理性别。

1.2.2 CSFR2 蛋白的生物信息学分析 利用 NCBI 中的 BLAST 分析 CSFR2 的结构域, 利用 ExPASy 中的 ProtParam 软件 <http://web.expasy.org/protparam/> 预测 CSFR2 蛋白的理化性质, 用 ProtScale 软件 <http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl/> 进行蛋白质疏水性分析, 用在线软件 <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> 进行蛋白质二级结构预测。

1.2.3 原核重组表达载体 pET-32a-CSFR2 的构建

根据原核表达载体 pET-32a(+) 和 CSFR2 序列和酶切位点设计引物 P32-CSFR2-F(GCCGATATCATG-GAGCAGGAGGAA) 和 P32-CSFR2-R(CCGCTTAAGG-AGACACGTACAGTA), 下划线为限制性内切酶 *EcoR* V 和 *EcoR* I 的酶切位点, 利用 Vector NTI 10.01 软件绘制载体图谱 pET-32a-CSFR2。以半滑舌鳎卵巢 cDNA 为模板, 扩增 CSFR2 基因的 ORF 区, 将 PCR 产物连接到载体 pMD-18T (宝生物, 大连), 获得 T-CSFR2, 连接产物转化到大肠杆菌感受态 Top10 (北京, 天根)。第 2 天挑克隆, 进行菌液 PCR, 检测菌体中是否有 CSFR2 特异性条带, 选取阳性克隆送华大基因测序。

将测序正确的菌液扩大培养, 提出质粒 T-CSFR2, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *EcoR* V (宝生物, 大连) 对 T-CSFR2 和 pET-32a 进行双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 用 Zymo (美国) 胶回收试剂盒回收 CSFR2 片段和 pET-32a 载体片段。用 T4 DNA 连接酶 (宝生物, 大连) 连接 CSFR2 片段与线性化的 pET-32a 载体, 将连接产物先转入 *E.coli* Top10 中, 挑克隆, 送华大基因测序, 选取正确的克隆。对于测序正确的菌体扩大培养, 提取质粒 pET-32a-CSFR2, 载体构建完毕。

1.2.4 重组蛋白的诱导与检测 将上述构建的质粒 pET-32a-CSFR2 转入 *E. coli* BL21 感受态细胞 (北京, 天根), 涂平板, 次日挑克隆测序, 阳性菌株即为表达菌株, 扩大培养后, 将菌体用 20% 的甘油溶液混匀, 保存于 -70°C 作为菌种。将菌株按照 1% 的浓度接种到 10 ml LB 培养基 (含有 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄霉素), 在 37°C 、250 r/min 条件下培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.4–0.6, 加入 IPTG, 终浓度为 0.1 mmol/L, 在 0、1、2、3、4、5、6 h 时间点分别取样 1 ml 进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

1.2.5 重组蛋白的分离与纯化 将上述菌种按照 1% 接种到 250 ml LB 培养基中 (含有 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄霉素), 在 37°C 、250 r/min 的摇床中培养至 $OD_{600\text{nm}}$ 为 0.4–0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 在 28°C 条件下低温诱导 6 h。 4°C 、12000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 每克菌体加入结合缓冲液 (20 mmol/L Na_3PO_4 , 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑) 10 ml、DNase I 10 U、50 mmol/L PMSF 200 μl 、10 mg/L 溶菌酶 200 μl , 重悬菌体。用 -70°C 冰箱反复冻融菌液 3 次, 冰浴下进行超声破碎, 超声功率为 800 W, 3 s 超声, 5 s 间隔, 破碎 40 min 左右。破碎后用 4°C 、12000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤, 过滤后的上清液用于蛋白纯化。蛋白纯化步骤按照 His Trap HP (GE, 美国) 说明书进行。

1.2.6 重组目的蛋白 (pET-32a-CSFR2) 注射精巢后基因表达分析 采用 Bradford 试剂盒 (北京, 天根) 对纯化后的蛋白进行定量分析, 测定浓度。脂质体 (DC-CHOL/DOPE) 制备参照 Zhang 等 (2010), 经过浓度梯度分析, 将目的蛋白与脂质体按照每 100 μl 脂质体包裹 50 μg 重组蛋白制备成重组蛋白混合液。一部分蛋白溶液用沸水煮 10 min, 使蛋白变性灭活, 作为对照组, 未灭活的蛋白作为实验组。取 48 尾 1 龄雄性半滑舌鳎, 其中 21 尾作为实验组, 在性腺部位注射重组蛋白, 注射剂量为 $100\ \mu\text{l}/\text{kg}$ 鱼体重, 21 尾作为对照组, 注射同等剂量的灭活蛋白, 另外 6 尾直接取性腺, 迅速放入液氮, 作为空白对照 (0 h)。注射后

6、12、24、36、48、72、96 h 分别取 3 条实验组和 3 条对照组性腺, 迅速放入液氮, -70°C 冰箱保存备用。用 TRIZol 试剂盒(Ambion)提取 RNA, 用 PrimeScript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒(宝生物, 大连)进行反转录实验。根据半滑舌鲷雌性相关基因 *Cyp19a*(EF134716)和 *Foxl2*(GQ402462)设计定量引物, 以 β -actin 为内参(表 1), 用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪(美国), TaKaRa SYBR[®] Premix *Ex Taq*[™] 试剂盒(宝生物, 大连)进行荧光定量 PCR, 每个样品采用 20 μl 体系, 设 3 组平行。将各基因不同时间表达量进行单因素方差多重比较, 用 SPSS 19 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($P<0.05$)的组用不同字母表示。

表 1 实验所用的引物及其序列

Tab.1 Primers and their sequences used in the experiments

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'-3')
Cyp19a-a	GGTGAGGATGTGACCCAGTGT
Cyp19a-s	ACGGGCTGAAATCGCAAG
Foxl2-a	GAGAGGAAGGGCAACTACTGGA
Foxl2-s	TGGTTGGAAGTGCCTGGG
CseF-SSR1-a	TACGACGTA CTCCGGTGGTTTT
CseF-SSR1-s	GAGCCGACAGGATCGTAC
β -actin-a	GCTGTGCTGTCCCTGTA
β -actin-s	GAGTAGCCACGCTCTGTC
P32-CSFR2-R	CCGCTTAAGGAGACACGTACAGTA
P32-CSFR2-F	GCCGATATCATGGAGCAGGAGGAA

2 结果与分析

2.1 半滑舌鲷性别鉴定结果

通过 PCR 扩增、聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染法

染色, 可以看到在 218 bp 和 206 bp 分别扩增出条带的样本的遗传性别为雌性, 只在 206 bp 处扩增出条带的样本遗传性别为雄性(图 1)。

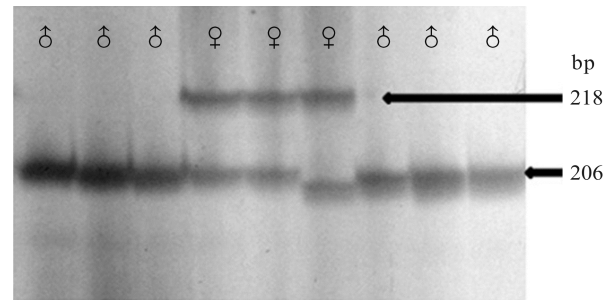


图 1 半滑舌鲷遗传性别鉴定结果

Fig.1 Genetic sex identification of *Cynoglossus semilaevis*

通过性腺组织切片分析, 卵巢和精巢差别明显, 雌鱼卵巢中大部分是处于 III 和 IV 时相卵母细胞, 可以明显观察到圆球形的卵母细胞(图 2-a)。在精巢中观察到该鱼的精子已经排到储精囊中, 属于 VI 期精巢, 精小叶壁较厚, 精小叶空腔较大, 有的空腔内仍可见未排净的精子, 输精管可以看到大量的精子存留(图 2-b)。但是在伪雄鱼精巢精子大部分还没有排除, 充满精小叶, 精小叶壁较图 2-b 的壁薄, 精小叶空腔较小(图 2-c)。

通过以上两方面的检测, 当遗传性别为雌性、生理性别为雄性时, 该样本为伪雄鱼, 在后面的实验结果中予以剔除; 当遗传性别和生理性别均为雌性时, 该样本为雌鱼, 在后面的实验结果中予以剔除。仅保留遗传性别和生理性别均为雄性的样本, 以避免伪雄鱼和雌鱼中 *Foxl2* 和 *Cyp19a* 基因表达量的差异影响实验结果。

2.2 半滑舌鲷 CSFR2 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 理化性质 利用 ExPASy 中的 ProtParam 软

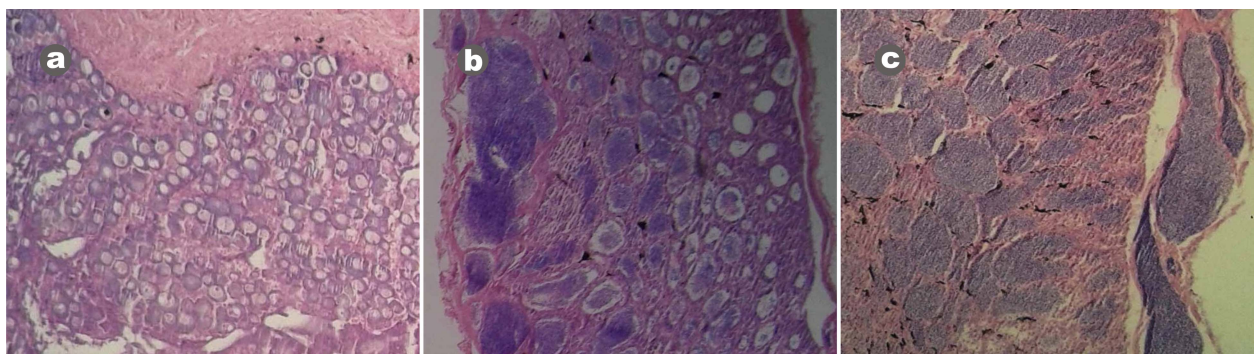


图 2 半滑舌鲷性腺切片

Fig.2 Histological transverse sections of *C. semilaevis* gonads

a. 雌鱼卵巢; b. 雄鱼精巢; c. 伪雄鱼精巢
a. Female ovary; b. Male testis; c. Neo-male testis

件分析 CSFR2 的理化性质, 结果显示, 半滑舌鳎 CSFR2 蛋白的分子量为 25397.4, 理论等电点 pI 为 4.62, 带负电的残基(Asp + Glu)总数为 45 个, 带正电的残基(Arg + Lys)总数为 26 个, 不稳定指数(II)理论值为 69.44, 为不稳定蛋白质。脂溶指数为 82.21, 亲水性平均值(GRAVY)为-0.753。

2.2.2 疏水性分析 利用 ProtScale 软件的 Kyte and Doolittle 算法对半滑舌鳎 CSFR2 蛋白进行亲水/疏水性分析, 结果见图 3。正值越大说明蛋白的疏水性越强, 负值越大说明亲水性越强, 介于+0.5- -0.5 之间的主要为两性氨基酸。分析结果表明, CSFR2 大部分的氨基酸属于亲水性氨基酸, 因此该蛋白是一种可溶性蛋白。

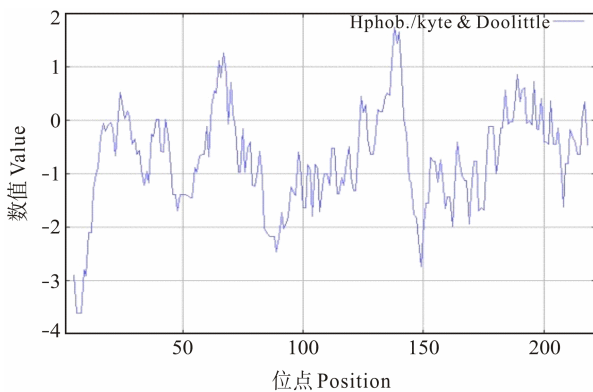


图 3 疏水性分析结果

Fig.3 ProtScale output for CSFR2 protein

2.3 重组蛋白的分离与纯化

根据酶切位点设计酶切位点引物 P32-CSFR2-F 和 P32-CSFR2-R, PCR 扩增 CSFR2 编码区, 经对 PCR 扩增产物及载体双酶切和连接, 构建 pET-32a-CSFR2 原核表达载体(图 4)。将含 pET-32a-CSFR2 菌株经

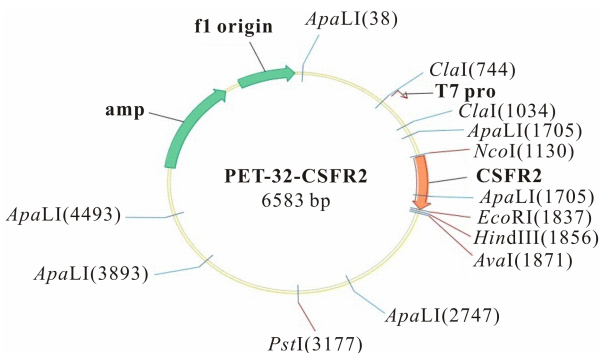


图 4 pET-32-CSFR2 重组表达载体图谱

Fig.4 Recombinant expression vector map of pET-32-CSFR2

橙色箭头表示插入的 CSFR2 片段

The orange arrow indicates the inserted CSFR2 fragment

IPTG 诱导及 SDS-PAGE 检测后, 在约 42 kDa 处可见一特异高表达蛋白条带(图 5), 经亲和层析柱(GE 公司)纯化后, 在 42 kDa 处出现一特异性条带(图 6), 该条带大小与 IPTG 诱导表达的原核蛋白大小一致, 且与预测的目的蛋白大小基本一致。纯化后测定蛋白浓度, 为 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

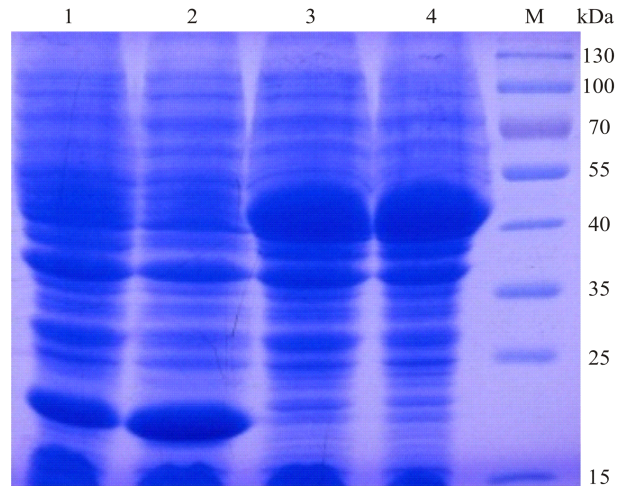


图 5 重组蛋白与 pET-32a 经 IPTG 诱导后 SDS-PAGE 检测结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified pET-32a-CSFR2 fusion protein

M: Marker; 1&2: pET-32a 空载体经 IPTG 诱导; 3&4: pET-32a-CSFR2 经 IPTG 诱导

M: Protein marker; Lanes 1-2: Induced pET-32a; Lanes 3-4: Induced pET-32a-CSFR2

2.4 重组蛋白注射半滑舌鳎精巢后的表达分析

注射重组蛋白后, 检测 *Foxl2* 基因的表达量(图 7), 结果显示, 注射 pET-32a-CSFR2 重组蛋白后 6-72 h 内, 半滑舌鳎 *Foxl2* 基因表达量显著升高, 其中 24 h 的表达量最高, 36 h 以后, 基因表达量逐渐回落, 至 96 h 恢复正常水平。检测 *Cyp19a* 的表达量(图 8), 结果显示, 注射重组蛋白后的 6-48 h, 半滑舌鳎 *Cyp19a* 基因表达量显著升高, 其中 6 h 表达量最高, 72 h 以后, 基因表达量恢复至正常水平。

3 讨论

为了研究半滑舌鳎的性别决定机制, 本实验室与华大基因合作对半滑舌鳎全基因组进行了测序, 比较基因组分析表明, 半滑舌鳎性染色体与鸟类的 Z 和 W 染色体共同来源于原始脊椎动物的原始染色体, 提出半滑舌鳎性别决定基因是 Z 染色体所编码, 雄性是由 Z 染色体编码的 *dmrt1*(Double-sex and mab-3 related

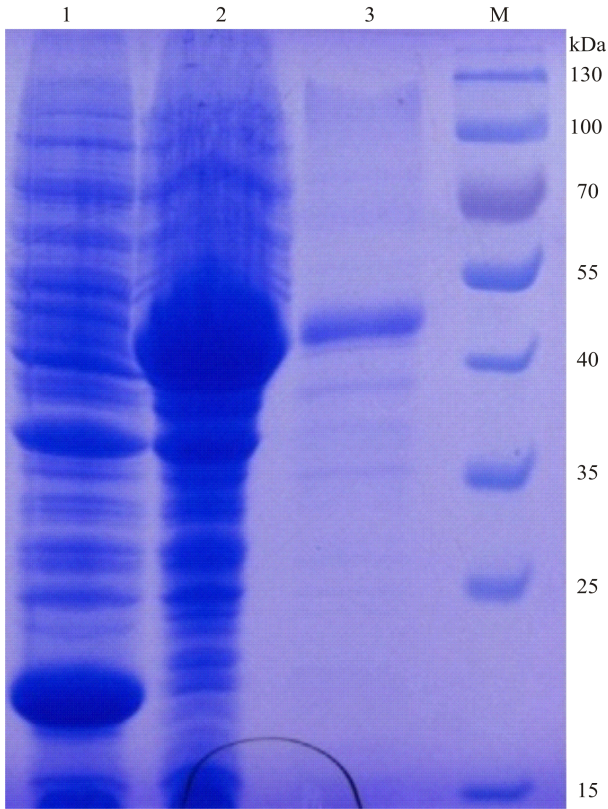


Fig.6 重组蛋白经纯化后的 SDS-PAGE 电泳检测
Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified pET-32a-CSFR2 fusion protein

M: Marker; 1: pET-32a 空载体经 IPTG 诱导; 2: pET-32a-CSFR2 经 IPTG 诱导; 3: 纯化的 pET-32a-CSFR2 蛋白
M: Protein marker; Lane 1: Induced pET-32a; Lane 2: Induced pET-32a-CSFR2; Lane 3: Pure pET-32a-CSFR2 protein

transcription factor 1)基因驱动的, *dmrt1* 同时也是鸟类的雄性性别决定基因(Chen *et al*, 2014)。本实验室采用同源克隆、RACE 和 RT-PCR 等方法, 对半滑舌鲷的性别相关基因 *Cyp19a*、*Sox9a*、*Foxl2*、*dmrt1*、*dmrt3*、*dmrt4*、*FTZ-F1* 和 *Dax1* 等进行克隆和表达分析(董晓丽, 2010¹⁾; 邓思平, 2007²⁾), 并预测了基因功能。*Foxl2* 基因是维持哺乳动物的性腺功能非常重要的转录因子, 哺乳动物的 *Foxl2* 基因的突变能够导致卵巢退化和雌性不育, 是维持卵巢功能的重要因子。在鱼类也对此基因进行了研究, 在石斑鱼的研究中发现, *Foxl2* 基因在性逆转中起一定的作用(Alam *et al*, 2008)。在半滑舌鲷中, 克隆得到 *Foxl2* 基因的 cDNA 序列, 并且对其表达做了研究。*Foxl2* 基因是雌性优势表达的基因, 在脑-垂体-性腺轴上, 都显著高于雄性中的表

达(Dong *et al*, 2011)。Deng 等(2009)克隆了半滑舌鲷芳香化酶基因(*Cyp19a*), 并进行半滑舌鲷各组织表达分析, RT-PCR 结果表明 *Cyp19a* 只在性腺中表达, 其他组织不表达, 且卵巢中的 *Cyp19a* 表达水平远高于精巢。*Cyp19a* 的表达量随着性腺发育而升高, 且各个时期的卵巢表达量均高于精巢, 表明 *Cyp19a* 基因参与了半滑舌鲷的性腺发育和性别决定过程。

蛋白质想要进入生物体内, 首先要克服生物膜的

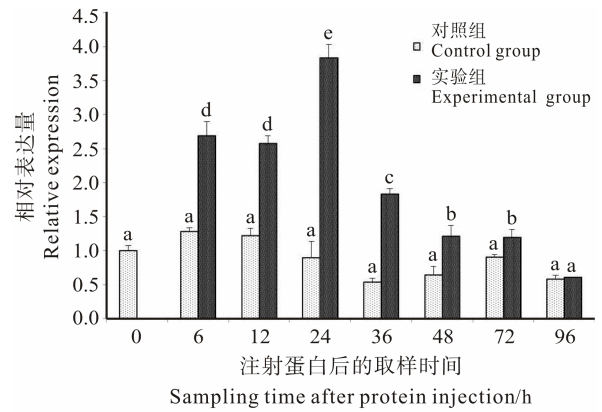


图7 注射 CSFR2 重组蛋白对 *Foxl2* 基因表达量的影响
Fig.7 Expression of the *Foxl2* gene after injection of fusion protein

经单因素方差分析, 不同字母代表显著性差异($P < 0.05$)
Bars with different letters differed with statistical significance at $P < 0.05$, calculated by One-Way ANOVA

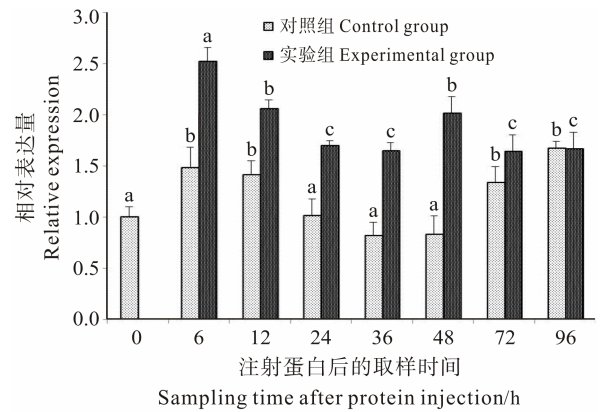


图8 注射 CSFR2 重组蛋白对 *Cyp19a* 基因表达量的影响
Fig.8 Expressions of the *Cyp19a* gene after injection of fusion protein

经单因素方差分析, 不同字母代表显著性差异($P < 0.05$)
Bars with different letters differed with statistical significance at $P < 0.05$, calculated by One-Way ANOVA

1) 董晓丽. 半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)线粒体基因组全序列和性别相关基因的克隆与表达分析. 中国海洋大学博士学位论文, 2010

2) 邓思平. 半滑舌鲷性别相关基因 P450 芳香化酶、FTZ-F1 和 DMRT1 基因克隆及表达分析. 中国海洋大学博士学位论文, 2007

屏障作用,只有少数脂溶性、非极性或不带电的小分子可以经膜自由扩散进入组织。目前有两种方法可以使大分子蛋白质进入细胞,一种是通过蛋白转导结构域,另一种是通过脂质体包裹蛋白。Green 等(1988)发现,将人免疫缺陷病毒反式激活因子(HIV-1-TAT)与细胞共同培养时,TAT 能迅速进入细胞,并且发现该蛋白质 37-72 位氨基酸残基具有细胞内转导性质,这一多肽片段被称为蛋白转导结构域(Protein transduction domain,PTD),它能够穿越细胞膜、转导进入多种类型细胞内(Fawell *et al.*, 1994)。研究证实 HIV-1-TAT-PTD 具有光谱的蛋白转导作用,TAT 的发现在蛋白功能和疾病治疗的研究中具有重要的应用价值。

研究表明,脂质体可以携带大分子物质进入生物体内,减少机体的识别和吞噬细胞的摄取,因此,脂质体可以作为一个运载系统来帮助大分子物质进入体内(Woodle, 1995)。闫森等(2012)研究表明,鱼皮水解胶原蛋白经脂质体包封后,透皮吸收量在 24 h 内达到 21.9%,较直接涂抹胶原蛋白的透皮吸收率提高 1 倍,说明小分子胶原蛋白经脂质体包封能够改善其体外透皮吸收性能。Ignatius 等(2000)利用脂质体包封卵白蛋白进入 CD8⁺ T 细胞,结果发现,在 T 细胞中能够检测到卵白蛋白,且 T 细胞有应答作用,表明脂质体包封后的卵白蛋白成功进入 T 细胞中,并发挥一定生物功能。

本研究利用大肠杆菌原核表达载体 pET-32a 来构建重组质粒,经 IPTG 诱导条件的筛选,不同温度诱导结果显示,28℃ 诱导温度最合适,诱导 4 h 表达量最大。大肠杆菌 BL21(DE3)表达的重组蛋白分为包涵体和可溶性蛋白,其中包涵体没有生物活性,所以本实验选用的是可溶性蛋白,在菌体超声破碎后离心,保留上清液,去除沉淀物。通过 HIS 标签亲和层析柱纯化的 pET-32a-CSFR2 蛋白分子量与预测基本一致,且蛋白纯化较为特异,蛋白浓度较高。为了鉴定重组蛋白的生物活性和功能,进行了蛋白注射实验。利用脂质体包封重组蛋白,将其注射到 1 龄半滑舌鳎雄鱼精巢中,分时段取样,检测半滑舌鳎性别相关基因 *P450* 和 *Foxl2* 的表达量,间接反映出重组蛋白 pET-32a-CSFR2 的活性以及生物功能。结果显示,*Foxl2* 基因表达量在注射重组蛋白后 6-24 h 内升高,且显著高于对照组(注射灭活蛋白),其中 24 h 表达量最高,说明重组蛋白成功进入到细胞内,具有生物活性,并对 *Foxl2* 基因的表达有上调作用。24 h 以后 *Foxl2* 基因表达量逐渐降低,48 h 以后逐渐达到正常水平,这可能是由于重组蛋白被细胞内的溶酶体消化。*P450* 基因的表达量在注射重组蛋白 6 h 后开始升高,且显著

高于对照组,说明重组蛋白对 *P450* 基因表达有上调作用。随着时间推移(6-36 h),*P450* 基因的表达量逐渐下降,可能是由于重组蛋白被细胞内的溶酶体消化,而 48 h 时 *P450* 基因表达量再度升高,可能是由于 *Foxl2* 基因的调节作用(Yamaguchi *et al.*, 2007)。

综上所述,本研究构建 *CSFR2* 原核表达载体,用大肠杆菌 BL21(DE3)诱导表达半滑舌鳎 *CSFR2* 蛋白,得到纯化的可溶性重组蛋白,在蛋白水平上对 *CSFR2* 基因功能进行初步研究。结果表明,*CSFR2* 作为半滑舌鳎雌性相关基因,其重组蛋白在一定时间内对 *P450* 和 *Foxl2* 基因的表达量有上调作用,说明利用脂质体可以介导重组蛋白进入到生物体内,*CSFR2* 重组蛋白具有生物活性。此外,芳香化酶可以使雄激素转化为雌激素,说明 *CSFR2* 蛋白能够对半滑舌鳎性别相关基因起到调节作用,*CSFR2* 基因有可能与半滑舌鳎雌性化有关,但该基因更精确的生物功能还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- 闫森,樊君,谭春雷. 脂质体包裹胶原蛋白的制备及其透皮性能. 精细化工, 2012, 29(6): 576-579
- 刘筠. 养殖鱼类繁殖生理学. 北京: 农业出版社, 1993, 29-30
- Alama MA, Kobayashia 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 merra*. Gen Comp Endocrinol, 2008, 157: 75-85
- Chen SL, Tian YS, Yang JF, *et al.* Artificial gynogenesis and sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Mar Biotechnol, 2009, 11(2): 243-251
- Chen SL, Ji XS, Shao CW, *et al.* Induction of mitogynogenetic diploids and identification of WW super-female using sex-specific SSR markers in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Mar Biotechnol, 2012, 14: 120-128
- Chen SL, Zhang GJ, Shao CW, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. Nature Genetics, 2014, 46(3): 253-260
- Deng SP, Chen SL, Xu JY, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of gonadal *P450* aromatase in the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture, 2009, 287: 211-218
- Dong XL, Chen SL, Ji XS, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of *Sox9a* and *Foxl2* genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Acta Oceanologica Sinica, 2011, 30: 68-77
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(2): 664-668
- Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of

- chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein. *Cell*, 1988, 55(6): 1179–1188
- 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. *Blood*, 2000, 96(10): 3505–3513
- Shigeho I, Hiroyo K, Tohru K, *et al.* Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod*, 2008, 78: 333–341
- Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev*, 1995, 16(2): 249–265
- Yamaguchi T, Yamaguchi S, Hirai T, *et al.* Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Comm*, 2007, 359(4): 935–940
- Zhang Y, Li HM, Sun J, *et al.* DC-Chol/DOPE cationic liposomes: A comparative study of the influence factor on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Int J Pharm*, 2010, 390: 198–207
- Zhuang Z, Wu D, Zhang S, *et al.* G-banding patterns of the chromosomes of tongue fish *Cynoglossus semilaevis* Günther, 1873. *J Appl Ichthyol*, 2006, 22(5): 437–440

(编辑 冯小花)

Recombinant Expression, Purification and Functional Analysis of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*) CSFR2 Protein

WANG Kailin^{1,2}, HU Qiaomu³, CHEN Songlin¹①

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

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

3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223)

Abstract Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) is an important aquaculture species in the north coastal area of China. Male and female *C. semilaevis* exhibit distinct properties, yet their sex determination mechanism is complex and obscure. By genome and transcriptome sequencing of *C. semilaevis*, we identified a sex-related gene *CSFR2*, and we then carried out the cloning, expression in *E. coli*, and 1-step Ni-NTA-based purification to investigate the function of *CSFR2*. We injected the recombinant *CSFR2* protein into *C. semilaevis* and quantified the amounts of two genes presumably to be affected at the transcriptional level using qPCR. The marker genes were positively affected during the first 72 h following injection. A prokaryotic expression plasmid pET-32a-*CSFR2* was constructed transformed into *E. coli* to produce the fusion protein. HisTrap HP was used for protein purification, and SDS-PAGE electrophoresis was used for fusion protein detection. We injected the fusion protein with liposome into fish, and tested the expression of *Cyp19a* and *Foxl2*. The results showed that the expression of *Cyp19a* and *Foxl2* was significantly up-regulated between 6 to 72 h and then returned to the basal level at 72 h after injection. Being a sex-related gene, the activity of the *CSFR2* fusion protein could not be directly detected using immunoreaction. We hence examined the activities of other sex-related genes, which could reflect the activity of *CSFR2*. The results showed that the recombinant *CSFR2* protein up-regulated the expression of female-related genes, *Foxl2* and *Cyp19a*, indicating that *CSFR2* played a role in sex differentiation by regulating the expression of other sex-related genes. Our study proposed a new strategy in the gene function study, and provided fundamental information for the artificial induction of fish sex reversal.

Key words *Cynoglossus semilaevis*; Sex-related genes; *CSFR2*; Recombinant protein; Biological activity

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