

中华绒螯蟹精巢特异表达蛋白 DMRT-like: 抗体制备及免疫鉴定

邱高峰*, 陈 洁

(上海海洋大学农业部水产种质资源与利用重点开放实验室,上海 201306)

摘要: *Dmrt* 是性别调控因子 *Doublesex* 和 *Mab-3* 的相关基因,近年报道了中华绒螯蟹 *EsDmrt-like* 只在精巢中表达,为了验证 *EsDMRT-like* 蛋白是否在中华绒螯蟹精巢中特异表达及其功能,根据中华绒螯蟹 *EsDmrt-like* 基因序列,构建重组质粒 pET-32a-*EsDmrt-like*,转化大肠杆菌 BL21,经融合表达和 SDS-PAGE 分析表明,融合蛋白主要以包涵体形式存在,分子量约为 46 ku。利用 Ni 柱亲和纯化融合蛋白免疫家兔,制备获得 *EsDMRT-like* 多克隆抗体。Western-blotting 检测表明该抗体既能特异地识别重组蛋白,又能特异识别精巢中 *EsDMRT-like* 蛋白,并且该抗体仅在精巢中检测到 *EsDMRT-like* 蛋白的表达,分子量约为 52 ku,为预期单体分子量的二倍。Western-blotting 检测变性后精巢总蛋白,该抗体能识别 52 和 34 ku 两条条带,证明了二聚体的存在。这一结果暗示 *EsDMRT-like* 可能通过形成二聚体形式调控中华绒螯蟹精巢发育。

关键词: 中华绒螯蟹; *EsDMRT-like* 蛋白; 原核表达; 抗体制备; 精巢分化

中图分类号: Q 511; S 917.4

文献标志码: A

Dmrt (*Doublesex* and *Mab-3* related transcription factor) 是与果蝇 *Doublesex* (*Dsx*) 和线虫 *Mab-3* 性别分化基因相关的转录因子,广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物之间^[1]。*Dmrt* 基因家族都包含一个独特的 DNA 结合域,即 DM 域。这种结构域最早在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的 *Dsx* 和线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 *Mab-3* 中发现^[2-3],它们能以锌指结构与特异的 DNA 序列结合,通过调控下游基因的表达参与性别决定和分化^[4-5]。*Dsx* 和 *Mab-3* 在果蝇和线虫性别决定中起了关键作用^[6]。在果蝇中,*Dsx* 直接调控卵黄蛋白基因表达,抑制卵黄蛋白的合成^[7]。雄性线虫 *Mab-3* 的突变会导致雄性不育,*Dsx^M* 缺失的雄性果蝇中也发现了类似的现象^[8]。*Dmrt* 基因家族的另一个重要成员 *Dmrt1* 在脊椎动物性别决定和分化中也起到了重要作用^[9-10]。人类的 *Dmrt1* 基因和 *Sry* (*sex-*

determining region on the Y chromosome) 基因相似,该基因缺失会导致性反转现象的出现^[11]。在雄性小鼠中,*Dmrt1* 基因敲除之后会导致睾丸分化不完全甚至生殖细胞死亡^[12]。

在水产动物研究中,日本研究者已在青鳉 (*Oryzias latipes*) 中找到了一个在 XY 精巢中特异表达的含有 DM 域的基因,命名为 *DMY*。进一步研究表明 *DMY* 基因的突变会导致青鳉向雌性方向发育,证明 *DMY* 是青鳉精巢发育必需的基因,是青鳉性别决定主效基因^[13]。

但是,至今为止关于 *Dmrt* 基因家族在虾蟹中的研究报道还较少。本研究小组在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinenses*) 精巢中分离和鉴定了一个特异表达的 *Dmrt* 基因,命名为 *EsDmrt-like*。原位杂交结果显示该基因转录本主要在精巢的赛托利细胞 (Sterli cell) 和发育早期的雄性生殖细胞中分布,这种表达模式和脊椎动物的 *Dmrt1* 相似。由

收稿日期:2012-03-21 修回日期:2012-05-24

资助项目:国家科技支撑计划项目(2012BAD26B04);国家教育部博士点科研基金项目(20093104110003);上海市科委基础重点科研项目(11JC1404600);国家自然科学基金项目(31272655)

通信作者:邱高峰,E-mail:gfqiu@shou.edu.cn

此推测 *EsDmrt-like* 可能和脊椎动物的 *Dmrt1* 功能相似,控制雄性性腺的发育以及分化^[14]。本研究拟在蛋白水平进一步验证该基因在精巢中特异表达和功能,通过大肠杆菌高效表达 Trx-EsDMRT 重组蛋白,制备免抗 EsDMRT-like 抗体,利用该抗体对精巢中 EsDMRT-like 蛋白进行免疫鉴定,为研究中华绒螯蟹性别分化分子机制提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中华绒螯蟹购自当地水产市场。解剖取出精巢、卵巢、心脏、肝胰腺、肌肉、胸神经节和鳃组织迅速放入液氮后,收集到的组织样品存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。pET-32a 表达载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 DH5 α 和 BL21 (DE3) 均由本实验室保存。Trizol 购自 Invitrogen。First strand cDNA synthesis kit, Ex-Taq DNA 聚合酶和 T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa。*Bam*H I 和 *Eco*R I 购自 Promega。PCR 产物纯化试剂盒购自 OMEGA。IPTG、小牛血清购自北京鼎国生物技术有限公司。低分子蛋白 Maker、预染蛋白 Maker、SDS-PAGE 各组分购自北京天根生化公司。辣根过氧化物标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 购自艾比玛特。Bradford 蛋白定量试剂盒、DAB 显色剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

原核表达载体的构建 使用 Trizol Reagent (Invitrogen) 提取中华绒螯蟹精巢总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶和分光光度计检测 RNA 完整性。将提取的 RNA 按照 cDNA 第一条链反转录说明书 (TaKaRa) 反转录获取中华绒螯蟹精巢 cDNA 作为 *EsDmrt-like* 基因扩增的模板。根据实验室已克隆到的 *EsDmrt-like* 基因全长序列 (GenBank: HM051384) 和原核表达载体 pET-32a 的克隆位点,利用 Primer 5 软件设计特异引物(表 1),用于 *EsDmrt-like* 开放阅读框的扩增。其中,这对引物的 5' 端分别引入了 *Bam*H I 和 *Eco*R I 两个酶切位点(下划线表示),下游引物的终止密码子用方框标出。PCR 扩增条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.5 min,共 30 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应结束后,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,观察结果。PCR 产物经过柱纯化回收 (OMEGA) 与 pET-32a 空质粒,进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h),酶切产物纯化后,使用 T₄ DNA 连接酶 (TaKaRa) 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑选阳性克隆,扩大培养菌液提取质粒 (天根质粒抽提试剂盒),进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 h) 鉴定。选择双酶切鉴定为阳性的质粒送由上海鼎安公司测序验证,测序结果使用 Bioedit 软件与 GenBank 上的 *EsDmrt-like* 基因序列进行比对验证。

表 1 *EsDmrt-like* 原核表达特异引物

Tab.1 Primer sequences of *EsDmrt-like* prokaryotic expression

	引物名称 primers	序列(5'-3') sequences(5'-3')
上游引物	<i>Dmrt</i> F	5'CGGGATCCATGAGCGGGTTCGAACGTGGA3'
下游引物	<i>Dmrt</i> R	5' CGCGAATTC CTA TGTATCTCTGCATCTAT 3'

注:*Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点用下划线标出,下游引物的终止密码子用方框标出。

Notes: *Bam*H I and *Eco*R I restriction sites are marked by underline, and the stop codon is in box.

重组质粒的重新转化和诱导表达 将测序正确的重组质粒 pET-32a-*EsDmrt-like* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。挑选阳性菌落接种于液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养过夜。次日按 1:100 的比例在含 Amp⁺ (终浓度为 $60\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) 的液体培养基中扩大培养至 OD₅₉₅ 介于 0.4~0.6 之间。加入 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达,同时设空质粒诱导表达作为对照组。4 h 后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。用 1 × PBS 重悬菌

体后,在冰浴条件下超声波破碎(超声波时间 4 s, 间歇时间 4 s, 保护温度 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 总时间 90 次)。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min, 分别取等量的上清和 8 mol/L 尿素溶解的沉淀一起进行 SDS-PAGE (5% 浓缩胶, 12% 分离胶) 电泳。经考马斯亮蓝 R250 染色 2~4 h, 过夜脱色观察分析结果。

设 IPTG 终浓度分别为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L 4 个梯度,在 30 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,分别诱导 2~6 h 以确定最佳的诱导温度时间和 IPTG 浓度。

超声波破碎后按上述方法进行 SDS-PAGE 电泳分析,考马斯亮蓝染色,观察结果。最后选用最佳诱导温度时间和 IPTG 浓度高效表达重组蛋白。

Western-blotting 检测融合蛋白 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,使用半干转膜仪将重组蛋白转移到硝酸纤维 NC 膜上。放置在含 10% 小牛血清的 10 mL TTBS 液中封闭 1 h。加入 1:1 000 稀释的抗 His 标签单抗为一抗 4 ℃ 平放过夜。使用 TTBS 缓冲液洗涤 3 次后加入 1:3 000 稀释 HRP 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG 为二抗,在摇床上振荡充分反应 2 h。再用 TTBS 缓冲液洗涤 3 次,去除非特异性结合后,用 DAB 显色液 (DAB15 mg、甲醇 5 mL、30% 双氧水 15 μ L) 处理,显色 (10 ~ 20 min) 水洗停止反应,观察分析结果。

融合蛋白的纯化,多克隆抗体的制备及效价测定 大量表达融合蛋白,使用 Quantity One (Bio-Rad) 软件分析 SDS-PAGE 电泳条带中目的蛋白的纯度。并使用 Bradford 定量试剂盒 (上海申能博彩) 对重组蛋白进行定量分析。使用 Ni 柱亲和纯化目的蛋白。选取 3 只成年健康的大白兔,将纯化的融合蛋白加入弗氏佐剂乳化后,进行兔子背部多点皮下注射。初次免疫 7 d,之后每隔两周免疫一次,4 次免疫后,处死兔子。取全血分离血清,采用抗原亲和纯化血清。将纯化的重组蛋白包被于 ELISA 板上 (每孔包被 100 ng 重组蛋白),进行 ELISA 反应。用酶标仪读取 495 nm 下的光吸收值,分析抗体效价。阴性对照孔加入免疫前的兔血清。

Western-blotting 检测抗体特异性 用组织蛋白抽提液 (博士德) 分别抽提精巢、卵巢、心脏、肝胰腺、肌肉、胸神经节和鳃的总蛋白 (50 mg 组织中加入 1 mL 组织蛋白抽提液冰上充分匀浆后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清)。提取的总蛋白或表达的重组蛋白经 Bradford 蛋白定量试剂盒测定总蛋白浓度,在沸水中水浴 10 min,使蛋白变性。选用 2 μ g 的总蛋白或重组蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后经电转移系统转至 NC 膜上。Western-blotting 分析方法同上,分别使用 1:1 000 稀释的 EsDMRT-like 多克隆抗体为一抗,1:3 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色或超敏底物化学发光观察结果。为了鉴定 EsDMRT-like 蛋白二聚体的存在,使用

加入 9 mol/L 尿素,2% Triton,1% DTT 和 1 mmol/L PMSF 蛋白裂解液抽提和变性处理精巢总蛋白,经过相同条件的沸水浴后根据上述 Western-blotting 条件进行检测分析。

2 结果

2.1 *EsDmrt-like* 开放阅读框的扩增和原核表达载体的构建

以中华绒螯蟹精巢 cDNA 为模板,PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统下观察到一条约为 700 bp 的条带,与目的片段大小基本一致 (图 1-a),定向克隆至原核表达载体 pET-32a 后得到重组质粒。将该重组质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后,电泳检测显示该重组质粒在 700 bp 处有插入片段 (图 1-b)。将该阳性质粒送测序后结果表明,克隆得到的序列与预期序列完全一致,表明重组质粒构建成功,并将此重组质粒命名为 pET-32a-*EsDmrt-like*。此外为了方便重组蛋白的检测,在 *EsDmrt-like* 终止密码子前加入了含 6 个组氨酸的标签蛋白序列 6 \times His-tag。

2.2 重组蛋白的表达和条件的优化

重组质粒 pET32a-*EsDmrt-like* 转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌。在 IPTG 诱导表达后,收集超声波破碎后的工程菌上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳分析。与未经 IPTG 诱导的 pET-32a-*EsDmrt-like* 重组质粒工程菌相比,诱导后的菌体蛋白沉淀泳道出现了一条明显加粗的条带 (图 2),其大小与预期的分子量基本一致,约 46 ku,而上清泳道中则无相应的条带,说明表达的重组蛋白 Trx-ExDMRT 主要以包涵体的形式存在。转入了空质粒的工程菌在 IPTG 诱导后,菌体蛋白上清泳道中出现了明显加粗的条带 (图 2),与 pET-32a 表达载体上的融合蛋白大小相近,约 20.4 ku。

此外,从温度 (30、37 ℃),IPTG 浓度 (0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L) 和时间 3 个角度优化了重组蛋白的诱导条件。结果显示温度和 IPTG 浓度对其表达量均无显著影响。只是在诱导后 2 h 时表达量较低,诱导 4 h 后重组蛋白的表达量不再增加。考虑到大肠杆菌生长最适温度以及高浓度的 IPTG 可能对大肠杆菌的正常生长造成影响,因此选用了 37 ℃,0.1 mmol/L IPTG 和诱导 4 h 作为 Trx-*EsDMRT* 重组蛋白最佳表达条件。

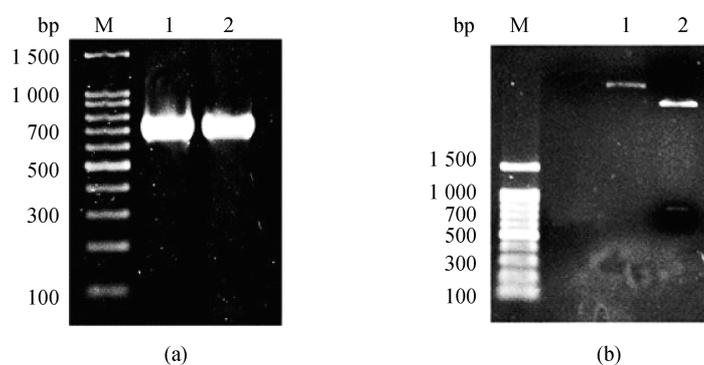


图1 *EsDmrt-like* 基因 PCR 产物和重组质粒 pET32a-*EsDmrt-like* 双酶切电泳图

(a) *EsDmrt-like* 基因 PCR 产物; M. 100bp DNA Maker; 1~2. *EsDmrt-like* 基因 PCR 产物; (b) 重组质粒 pET32a-*EsDmrt-like* 双酶切鉴定; M. 100 bp DNA Maker; 1. pET32a-*EsDmrt-like* 重组质粒; 2. pET32a-*EsDmrt-like* 重组质粒双酶切。

Fig. 1 Electrophoregram of *EsDmrt-like* gene PCR product and recombinant plasmid pET32a-*EsDmrt-like* by double-digestion

(a) *EsDmrt-like* gene PCR product; M. 100 bp DNA Maker; 1~2. *EsDmrt-like* gene PCR product; (b) recombinant plasmid pET32a-*EsDmrt-like* by double-digestion; M. 100 bp DNA Maker; 1. recombinant plasmid of pET32a-*EsDmrt-like*; 2. recombinant plasmid of pET32a-*EsDmrt-like* by double-digestion.

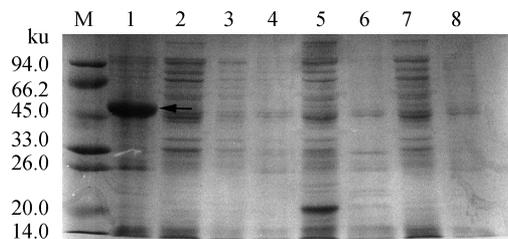


图2 SDS-PAGE 检测 Trx-EsDMRT 重组蛋白

M. 蛋白分子量标准; 1~2. pET32a-*EsDmrt-like* 诱导裂解后沉淀和上清; 3~4. pET32a-*EsDmrt-like* 未诱导裂解后上清和沉淀; 5~6. pET32a 空质粒诱导裂解后上清和沉淀; 7~8. pET32a 空质粒未诱导裂解后上清和沉淀; 箭头标示为目的蛋白。

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein Trx-EsDMRT

M. protein marker; 1~2. precipitation and supernatant of induced pET32a-*EsDmrt-like*; 3~4. supernatant and precipitation of uninduced pET32a-*EsDmrt-like*; 5~6. supernatant and precipitation of induced pET32a; 7~8. supernatant and precipitation of uninduced pET32a; Arrow indicates target protein.

2.3 重组蛋白的鉴定以及定量分析

使用 anti-His 标签的单抗作为一抗对重组蛋白进行 Western-blotting 鉴定,在目的蛋白大小处检测到了特异性条带。而在空质粒诱导后菌体蛋白中未检测到条带,说明表达的重组蛋白为目的蛋白(图 3-a)。

Quantity One 和 Bradford 蛋白定量分析发

现,表达的重组蛋白占包涵体总量 70% 左右,纯化的目的蛋白浓度为 0.2 mg/mL。根据 Bradford 蛋白定量粗略推算出,100 mL 培养体系中目的蛋白表达量约为 5.2 mg。

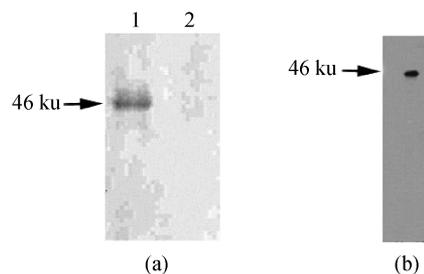


图3 His 标签抗体和 EsDMRT-like 抗体检测重组蛋白的 Western-blotting 分析

(a) His 抗体检测重组蛋白; 1. 重组蛋白; 2. 空质粒诱导; (b) EsDMRT-like 抗体检测重组蛋白。

Fig. 3 Western-blotting analysis of recombinant protein with His-tag antibody and EsDMRT-like antiserum

(a) Western-blotting analysis of recombinant protein with His-tag antibody; 1. pET32a-*EsDmrt* induced; 2. pET32a induced; (b) Western-blotting analysis of recombinant protein with EsDMRT-like antiserum.

2.4 EsDMRT-like 抗体检测与免疫鉴定

纯化的重组蛋白分四次免疫家兔,制备了 EsDMRT-like 克隆抗体。EsDMRT-like 抗体针对 Trx-EsDMRT 重组蛋白的效价达到 800 000。

Western-blotting 结果显示, 1 : 5 000 稀释的 EsDMRT-like 抗体能够特异性地识别重组蛋白 (图 3-b)。

为了验证 EsDMRT-like 蛋白是否在精巢中特异表达, 使用 EsDMRT-like 抗体检测了中华绒螯蟹不同成体组织包括精巢、卵巢、心脏、肝胰腺、肌肉、胸神经节和鳃。结果显示该蛋白在精巢中特异表达 (图 4-a), 与之前在 RNA 水平检测的结果一致^[14]。

但有趣的是, EsDMRT-like 抗体在精巢中检测到的特异性条带为 52 ku, 而不是预期的 26 ku。由此推测 EsDMRT-like 蛋白在体内可能以二聚体的形式存在。为了证明二聚体存在的真实性, 用尿素和 DTT 等强还原剂变性处理精巢总蛋白, Western-blotting 分析结果显示了两条特异条带: 52 和 34 ku。后者与 EsDMRT-like 蛋白单体分子量 (26 ku) 接近, 说明变性处理后 52 ku 可以部分还原为单体形式的 EsDMRT-like 蛋白 (图 4-b)。

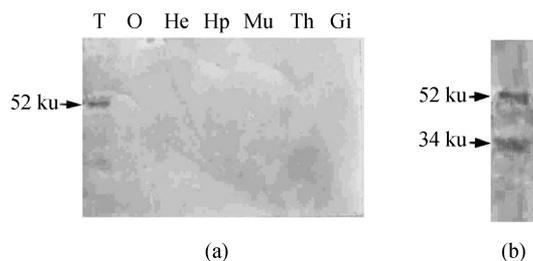


图 4 EsDMRT-like 蛋白不同组织中的表达及二聚体鉴定 (a) EsDMRT-like 蛋白不同组织中的表达; T. 精巢; O. 卵巢; He. 心脏; Hp. 肝胰腺; Mu. 肌肉; Th. 胸神经节; Gi. 鳃; (b) EsDMRT-like 蛋白二聚体鉴定。

Fig. 4 EsDMRT-like protein tissue distribution and dimerization identification

(a) EsDMRT-like protein tissue distribution; T. testis; O. ovary; He. heart; Hp. hepatopancreas; Mu. muscle; Th. thoracic ganglion; Gi. gill; (b) Identification of the EsDMRT-like dimerization.

3 讨论

本研究扩增了 *EsDmrt-like* 基因的开放阅读框, 克隆至 pET-32a 表达载体, 在大肠杆菌中融合表达了 Trx-EsDMRT 重组蛋白 (图 2)。为了高效表达重组蛋白, 从温度、IPTG 浓度以及诱导时间 3 个角度优化了表达条件^[15], 结果显示温度和 IPTG 浓度对其表达量均无显著影响, 只是在诱导后 2 h 重组蛋白表达量较低, 诱导后 4 h 重组蛋白

表达量不再增加。考虑到大肠杆菌生长的最适温度以及高浓度的 IPTG 可能对大肠杆菌生长造成影响两个因素, 因此选用了 37 °C, 0.1 mmol/L IPTG 和诱导 4 h 为 Trx-EsDMRT 重组蛋白的最佳表达条件。SDS-PAGE 电泳结果显示, Trx-EsDMRT 重组蛋白主要存在于菌体蛋白沉淀中, 说明该蛋白以包涵体的形式存在。大量表达该重组蛋白, 经亲和层析纯化, 作为抗原免疫家兔制备 EsDMRT-like 多克隆抗体。ELISA 检测结果显示该抗体效价高达 800 000。Western-blotting 分析结果显示, EsDMRT-like 抗体既能特异性地识别重组蛋白 (图 3-b), 又能特异性地识别中华绒螯蟹精巢 EsDMRT-like 蛋白 (图 4-a), 这说明制备的 EsDMRT-like 抗体效价高, 特异性好。

在人 (*Homo sapiens*)^[16]、大鼠 (*Rattus norvegicus*)^[17]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[18]、奥利亚罗非鱼 (*Oreochromis aurea*)^[19] 和青鳉^[20] 中, 已有研究表明 DMRT1 在精巢中特异表达。本研究使用制备的抗体检测和分析了 EsDMRT-like 蛋白在中华绒螯蟹不同成体组织中的表达情况, 结果显示该蛋白仅在精巢中特异表达 (图 4-a)。这与之前 DMRT1 在鱼类和哺乳动物中所得到的研究结果相同, 暗示 EsDMRT-like 在中华绒螯蟹精巢的发育和分化中起着重要的调控作用。

值得注意的是, 该抗体在精巢中检测到的特异条带分子量 52 ku 是预期单体蛋白 (26 ku) 的二倍, 推测 EsDMRT-like 蛋白在精巢中可能以二聚体的形式存在。Western-blotting 检测变性后的精巢总蛋白, EsDMRT-like 抗体能识别 52 和 34 ku 两条条带, 证明了二聚体的存在 (图 4-b)。这种形成聚体的形式与果蝇 DSX、线虫 MAB-3 和脊椎动物 DMRT1 形成聚体相似^[21-24]。在果蝇中, DSX 存在一个 DM 域, 它能结合特异的卵黄蛋白基因序列 (yolk protein fat body enhancer, FBE), 调控 FBE 基因的表达。并且在雌性果蝇中, DSX 第 398 位的氨基乙酸突变为天冬氨酸后, 会阻断果蝇体内 DSX 二聚体的形成, 导致其蛋白功能丧失, 使雌性果蝇发生性逆转^[21]。在线虫中, MAB-3 存在串联式的 DM 域, 它能结合不对称的位点形成多聚体发挥其基因功能。进一步的研究表明, 线虫中 MAB-3 与 DSX 结合相似的位点, 是卵黄蛋白基因的负调控因子^[22]。在脊椎动物 DMRT1 的研究中发现, 该 DM 域也能与

DSX 一样形成二聚体^[23]。以上研究表明这些蛋白在体内以二聚体或多聚体的形式都得益于其保守而又独特的 DNA 结合域,即 DM 域^[23]。EsDMRT-like 也存在一个 DM 域,该 DM 域和果蝇 DSX 的 DM 域有较高的同源性,它也能像果蝇的 DSX 一样形成二聚体,推测 EsDMRT-like 通过相似的机制调控中华绒螯蟹精巢的发育和分化。

参考文献:

- [1] 任莉莉,程汉华,郭一清,等. 两栖类、爬行类和鸟类存在一个新的 Dmrt 基因家族[J]. 科学通报, 2001(14):1187-1190.
- [2] Baker B S, Ridge K A. Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1980, 94(2):383-423.
- [3] 郭一清,程汉华,高尚,等. 脊椎动物 DMRT 基因家族的系统发生及同线性分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(10):1103-1108.
- [4] 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.
- [5] 陈启龙,唐鑫生. 大绿蛙 Sox 基因和 Dmrt 基因的 PCR-SSCP 分析 [J]. 四川动物, 2007(2):319-322.
- [6] 李楠,王秀利,仇雪梅. SOX、DMRT 性别决定基因家族及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2005(3):5-10.
- [7] Yi W, Zarkower D. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms [J]. Development, 1999, 126(5):873-881.
- [8] Villella A, Hall J C. Courtship anomalies caused by doublesex mutations in *Drosophila melanogaster* [J]. Genetics, 1996, 143(1):331-344.
- [9] Kettlewell J R, Raymond C S, Zarkower D. Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation [J]. Genesis, 2000, 26(3):174-178.
- [10] Matsushita Y, Oshima Y, Nakamura M. Expression of DMRT genes in the gonads of *Rana rugosa* during sex determination [J]. Zoological Science, 2007, 24(1):95-99.
- [11] Moniot B, Berta P, Scherer G, et al. Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination [J]. Mechanisms of Development, 2000, 91(1-2):323-325.
- [12] 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]. Developmental Biology, 1999, 215(2):208-220.
- [13] Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish [J]. Nature, 2002, 417(6888):559-563.
- [14] Zhang E F, Qiu G F. A novel Dmrt gene is specifically expressed in the testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Development Genes and Evolution, 2010, 220(5-6):151-159.
- [15] 崔崢,朱小玲,邱高峰. 日本沼虾 VASA 蛋白的原核表达、抗体制备及其免疫鉴定 [J]. 水产学报, 2010, 34(10):1495-1501.
- [16] Raymond C S, Shamu C E, Shen M M, et al. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes [J]. Nature, 1998, 391(6668):691-695.
- [17] 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]. Developmental Biology, 1999, 215(2):208-220.
- [18] Marchand O, Govoroun M, D' Cotta H, et al. DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1493(1-2):180-187.
- [19] Cao J, Cao Z, Wu T. Generation of antibodies against DMRT1 and DMRT4 of *Oreochromis aurea* and analysis of their expression profile in *Oreochromis aurea* tissues [J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(6):497-509.
- [20] Brunner B, Hornung U, Shan Z, et al. Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1 [J]. Genomics, 2001, 77(1-2):8-17.
- [21] Erdman S E, Chen H J, Burtis K C. Functional and genetic characterization of the oligomerization and DNA binding properties of the *Drosophila doublesex* proteins [J]. Genetics, 1996, 144(4):1639-1652.
- [22] Yi W, Zarkower D. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms [J].

- Development,1999,126(5):873-881.
- [23] Murphy M W,Zarkower D,Bardwell V J. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA[J]. BMC Molecular Biology,2007,8:58.
- [24] Burtis K C,Coschigano K T,Baker B S, et al. The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer [J]. The EMBO Journal,1991,10(9):2577-2582.

The testis-specific protein DMRT-like of the Chinese mitten crab: antibody preparation and immunological identification

QIU Gaofeng*, CHEN Jie

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by Ministry of Agriculture,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Dmrt is a family of genes related to the sexual regulators *Doublesex* and *Mab-3*. Our previous studies showed that *EsDmrt-like* transcripts were detectable only in testis of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. In order to verify whether EsDMRT-like protein is also specifically expressed in testis, the prokaryotic expression plasmid pET-32a-EsDmrt-like was constructed according to the sequence of EsDmrt-like. The recombinant plasmid was transferred into host bacteria *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the recombinant protein Trx-EsDMRT was expressed under the induction of IPTG. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was highly expressed as inclusion body with the molecular weight of 46 ku. The recombinant protein was purified by affinity for preparing EsDMRT-like antibody. The resultant antibody can specifically recognize the recombinant protein and endogenous EsDMRT-like protein in the testis as revealed by Western-blotting analysis. EsDMRT-like was specifically expressed in the testis, with molecular weight of 52 ku, which is twice as those of the monomer. After denatured treatment by urea and DTT, the protein displayed two forms of polypeptides: 52 and 34 ku. Both of them can be recognized by antiserum raised against EsDMRT-like protein, indicating that the form of 34 ku was generated from 52 ku polypeptide and the EsDMRT-like protein exists as a dimer in testis. This result suggested that EsDmrt-like may regulate the male sex development/differentiation by dimerization in the crab.

Key words: *Eriocheir sinensis*; EsDMRT-like; prokaryotic expression; polyclonal antibody; testis differentiation

Corresponding author: QIU Gaofeng. E-mail: gfiu@shou.edu.cn