

石斑鱼性反转相关基因 *ECaM* 的克隆及表达特征分析*

李尚伟^{1,2)} 文建军³⁾ 刘世贵¹⁾ 龙章富^{1)**}

(¹⁾四川大学生命科学学院, 成都 610064; ²⁾贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025;

³⁾电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054)

摘要 用甲睾酮片饲喂 2~4 龄赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*), 6 周后 90% 以上的雌鱼性逆转为功能性雄鱼. 运用抑制性差减杂交技术 (SSH), 结合 SMART cDNA 合成和 RACE-PCR 方法, 从性反转雄鱼性腺中克隆到钙调蛋白基因 (*ECaM*). 该基因 cDNA 全长为 582 bp, 开放阅读框长 450 bp, 编码的蛋白质由 149 个氨基酸组成, 5' 端非编码区 74 bp, 3' 端非编码区 58 bp. 虚拟 RNA 印迹表明, *ECaM* 在性反转雄鱼性腺中表达, 而在正常雌鱼性腺中表达微弱. 各种组织的半定量 RT-PCR 显示, *ECaM* 在脑、心、肝、脾、肾都有转录, 在精巢和下丘脑中表达水平较高, 而在肌肉中表达甚弱. 性反转不同时期性腺的半定量 RT-PCR 及蛋白质印迹表明, 性逆转过程中性腺里 *ECaM* 的表达量逐渐增加. 上述结果提示钙调蛋白可能在赤点石斑鱼性逆转过程中发挥着作用, *ECaM* 可能是促使石斑鱼由雌向雄转变的重要功能基因之一.

关键词 石斑鱼, 钙调蛋白, 性腺, 性反转, 抑制性差减杂交

学科分类号 Q5, S93

钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 是一种小分子酸性蛋白质, 存在于所有真核生物中, 最早是在 20 世纪 70 年代发现的. 钙调蛋白在结构和功能上都具有高度的保守性. 它的主要作用是作为细胞内 Ca^{2+} 的受体, 从而影响依赖 Ca^{2+} 的多种生理生化过程. CaM 与 Ca^{2+} 结合后可以调节磷酸二酯酶、 Ca^{2+} -ATP 酶、腺苷酸环化酶、 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶、磷酸化酶激酶和 NAD 激酶等近 30 种酶的活性^[1], 调节细胞生长和细胞增殖^[2], 参与信号传导, 能行使第二信使功能, 参与激素调节等. 总之, 钙调蛋白是细胞代谢的一种多功能调节剂.

石斑鱼为名贵海水经济鱼类, 肉味鲜美, 经济价值甚高. 赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 属鲷科 (Serranidae), 石斑鱼属 (*Epinephelus*); 为雌雄同体、雌性先熟鱼类, 存在自然性转变现象. 在自然条件下雌鱼大多数在 3 龄性成熟, 一般在 6 龄雌鱼转变为雄鱼^[3]. 因此, 石斑鱼雄亲鱼均高龄化 (一般 6 龄以上), 雌雄生殖不同步, 直接影响石斑鱼的大规模人工繁殖. 为了揭示石斑鱼性逆转过程的分子调控机制, 我们采用抑制性差减杂交技术, 构建了石斑鱼性逆转前和性逆转后的差减 cDNA 文库. 在筛选抑制性差减杂交 cDNA 文库过程中, 我们发现赤点石斑鱼钙调蛋白基因 (*ECaM*) 在从雌鱼转变成雄鱼的过程中差异表达, 进一步克隆了 *ECaM*

基因的全长 cDNA, 并对其在性逆转过程不同时期的性腺和性反转雄鱼不同组织的表达特征进行了研究.

1 材料和方法

1.1 石斑鱼的人工性逆转

赤点石斑鱼的人工性逆转在福建省宁德市水产技术推广站试验场完成. 各取 30 条 2~4 龄雌性赤点石斑鱼于两个网箱中, 一组为实验组, 喂含激素的饲料, 另一组为对照组, 喂正常饲料. 将 20 片甲睾酮 17 α -MT 片 (5 mg/片, 天津力生制药公司) 在研钵中研成粉末, 加适量水混匀, 然后加到 2.5 kg 糜状饲料中, 充分混合, 再加入适量鳗鱼粉, 配成半干饲料, 即可投喂. 每次现配现喂, 每天投喂两次, 早晚各一次. 在投喂 42 天后通过鉴定, 有 90% 以上的雌鱼转变成了功能性雄鱼. 在性反转前、后及性反转过程中 (每隔 7 天取一次样) 分别取实验组 和对照组石斑鱼性腺组织, 保存于 RNAlater (QIAGEN) 中.

* “863” 国家高技术研究发展计划资助项目 (2001AA620111) 和国家大洋协会项目 (4-2-4).

** 通讯联系人.

Tel: 028-84761793, E-mail: LZFO028@163.com

收稿日期: 2004-08-11, 接受日期: 2004-10-31

1.2 RNA 提取、SMART cDNA 合成和差减文库构建

用 TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取正常雌鱼和性反转雄鱼性腺总 RNA. 按 Clontech 公司的 SMART PCR cDNA Synthesis Kit 和 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 手册, 合成石斑鱼性逆转前、后性腺 SMART cDNA 和构建相应时期差减 cDNA 文库.

1.3 钙调蛋白基因差减片段的检出

挑取性反转雄鱼性腺差减杂交 cDNA 文库克隆, 进行 PCR 和斑点杂交筛选, 选取斑点杂交的阳性克隆进行测序, 然后通过 Blastx 在 NCBI 数据库中查询序列同源性, 确定钙调蛋白基因的 cDNA 片段.

1.4 虚拟 RNA 印迹

用引物 Nested PCR primer 1 和 2R、PCR 标记混合物扩增质粒插入片段, 制成生物素标记的探针. 分别取性反转前、性反转后的石斑鱼性腺 SMART cDNA 40 μ l 进行 0.8% 琼脂糖电泳, 凝胶变性、中和后转至 Hybond-N⁺ 尼龙膜 (Pharmacia 公司) 上, 于滤纸上晾干 10 min, 紫外交联 30 s. 预杂交液中加入鲑精 DNA 至终浓度 200 mg/L, 42℃ 预杂交 1 h 后再加入探针继续杂交 16 h. 杂交后用 0.5×SSPE 室温洗膜 2 次各 10 min, 再用预热至 50℃ 的 0.5×SSPE 于 50℃ 洗膜 2 次, 每次 10 min. 浸膜于封闭液中 30 min, 然后加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素 (HRP-SA), 再孵育 20 min. 置膜于鲁米诺中 1 min, 在暗室对 X 线胶片曝光 10 min.

1.5 氨基酸推测和序列比较

用 RACE-PCR 方法获得钙调蛋白基因全长 cDNA, 然后将其核苷酸序列输入 NCBI 进行开放阅读框的查询和氨基酸推测, 得到相应的氨基酸序列. 在 NCBI 数据库查找斑马鱼、爪蟾、人和小鼠等生物相应的氨基酸序列后, 用 Clustal W (1.82) 软件分析序列的同源性. 根据赤点石斑鱼与其他 8 种鱼类的钙调蛋白氨基酸序列, 用 MEGA3 软件构建系统分类树.

1.6 RT-PCR 分析基因的表达特征

用 TRIzol 试剂提取石斑鱼性反转过程中不同时期性腺组织和其他 11 种组织的总 RNA, 用无 RNA 酶的 DNase I 消化后, 取 0.5 μ g 总 RNA, 以寡聚(dT)₁₈ 为引物, 由 M-MuLV 反转录酶催化合成第一链 cDNA. 用差异表达基因的正向引物 (5' ATGGCTGACCAACTAACAG 3') 和反向引物 (5'

TCATTTGGCGGTCATAAT 3') 进行 PCR 扩增, 条件为: 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 50 s, 30 个循环. 分别取 1 μ l 稀释 10 倍后的逆转录产物为模板, 于 25、30、35 和 40 个循环扩增微管蛋白基因 (α -tubulin), 以确定各样品的稀释倍数, 使 RT-PCR 的各样品模板量基本一致.

1.7 ECaM 基因的原核表达、多抗制备及蛋白质印迹检测

根据 ECaM 基因序列和表达载体 pET-GST 的酶切位点, 设计正向引物 5' GGATCC ATGGCTGACCAACTAACAG 3' 和反向引物 5' GTAGCTAGCTCATTTGGCGGTCATAAT 3', 下划线分别表示 BamH I 和 Nhe I 酶切位点. DNA 片段扩增与回收、酶切、电泳鉴定、连接、转化、质粒抽提等操作均按分子克隆实验手册方法进行. 将重组质粒 pET-GST-ECaM 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)plysS, 用 100 mg/L 的 IPTG 诱导表达, 表达产物用 TALON 亲和树脂 (Clontech 公司) 纯化. 用纯化的蛋白质免疫新西兰大白兔, 按常规方法制备多克隆抗体, 共免疫 4 次, 第一次用量 800 μ g, 以后每次用量为 400 μ g. 取正常雌鱼、性反转雄鱼及性反转不同时期鱼的性腺, 加裂解缓冲液, 用匀浆器于冰上匀浆, 4℃ 以 10 000 g 离心 10 min, 上清即是性腺总蛋白. 性腺蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 以 α -tubulin 作对照, 使各样品上样量基本相当, 然后电转移到硝酸纤维素膜上, 丽春红染色, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗用制备的多克隆抗体, 稀释度为 1:500, 二抗用碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体, 稀释度为 1:2 000, BCIP/NBT 显色.

2 结 果

2.1 性反转前后石斑鱼性腺的差异表达 cDNA

图 1 是性反转雄鱼性腺 cDNA (试验者 cDNA) 与正常雌鱼性腺 cDNA (驱动者 cDNA) 进行两次消减后的第 2 轮 PCR 产物的电泳结果, 图 1-1, 2 分别是性反转雄鱼和正常雌鱼 SSH 后的差异表达 cDNA. 图中所示的是在起始 mRNA 量相同的情况下经两轮差减后差异表达 cDNA 的比较, 可以看出反转前后差异表达 cDNA 弥散带都比较亮, 表明石斑鱼性转变是一个非常复杂的生理过程.

2.2 虚拟 RNA 印迹检验差异表达基因

用生物素标记的 ECaM 基因片段为探针进行的虚拟 RNA 印迹结果显示, 在性反转雄鱼性腺

cDNA泳道的 0.6 kb 处形成杂交带，而在正常雌鱼性腺中没有检测到该基因的杂交信号(图 2).

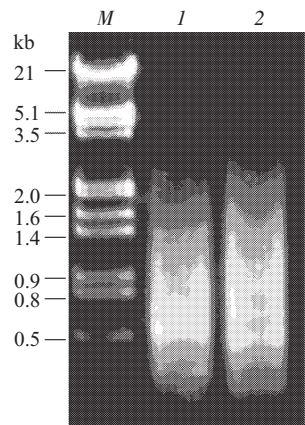


Fig.1 The secondary round PCR products of the subtractive cDNAs from sex-reversed male gonad (1) and normal female gonad (2)
M is the standard molecular marker for λ DNA/*EcoR* I +*Hind* III.

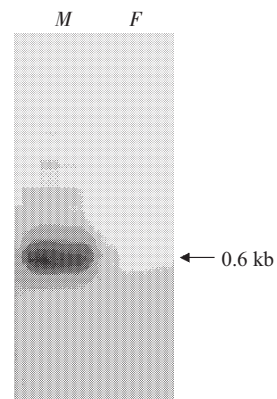


Fig.2 Verifying the differentially expressed gene by virtual Northern blotting
M: sex-reversed males; *F*: normal females.

2.3 *ECaM* 的核苷酸序列及其氨基酸同源性分析
图 3 为赤点石斑鱼钙调蛋白基因全长 cDNA 的核苷酸序列和推断的氨基酸序列.该基因 cDNA

```
1      ACTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTCCTCTCTCCCTGTAGCGTTAGCAGACCGACGTCCC
61     TAACTCCAACAGACATGGCTGACCACTAACAGAAGAGCAGATTGCAGAGTTCAAGGAGG
1      M A D Q L T E E Q I A E F K E
121    CTTTCTCCCTGTTTGATAAGGATGGAGATGGGACCATCACCCTAAGGAGCTGGGCACTG
16     A F S L F D K D G D G T I T T K E L G T
181    TCATGAGGTCACTGGGTCAAACCCAACTGAGGCTGAACTACAGGACATGATCAATGAGG
36     V M R S L G Q N P T E A E L Q D M I N E
241    TGGACGCTGATGGCAACGGGACCATTGACTTTCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGGA
56     V D A D G N G T I D F P E F L T M M A R
301    AGATGAAGGACACTGACAGTGAGGAGGAGATCAGGGAGGCATTACAGGTCTTTGACAAGG
76     K M K D T D S E E E I R E A F R V F D K
361    ATGGCAACGGTTACATCAGCGCAGCAGAGCTGCGTCATGTGATGACTAACCTGGGTGAGA
96     D G N G Y I S A A E L R H V M T N L G E
421    AGCTGACAGATGAGGAAGTAGATGAGATGATCAGAGAAGCAGACATCGATGGAGATGGAC
116    K L T D E E V D E M I R E A D I D G D G
481    AGGTCAACTACGAAGAATTTGTTTCAGATTATGACCGCCAAATGAACTGGGCTCACATTAA
136    Q V N Y E E F V Q I M T A K *
541    AGACAAAGAATCAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig.3 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *ECaM* cDNA
GenBank accession number: AY281363. Four calcium binding domains (EF-hand) are shown in bold.

全长 582 bp，5′非编码区长 74 bp，3′非编码区长 58 bp，开放阅读框位于 75~524 bp，编码 149 个氨基酸，终止密码子为 TGA，3′端有多聚腺苷酸尾.结构功能域分析表明，该蛋白质有 4 个结合 Ca^{2+} 的结构域(EFh)，分别在 12~40、48~76、85~113 和 121~149 之间的氨基酸处.
钙调蛋白是高度保守的，*ECaM* 基因推测的氨

基酸序列与人、鼠、爪蟾、河鲈、斑马鱼和鲑鱼钙调蛋白的同源性为 99%，与电鳗和八目鳗的同源性为 98%，与罗非鱼的同源性为 97%.对赤点石斑鱼与斑马鱼、河鲈、电鳗、电鲛、青鲙、鲑鱼、八目鳗和罗非鱼的氨基酸序列进行系统分析，发现赤点石斑鱼首先与河鲈聚成一类，其次与斑马鱼和电鳗再聚成一类(图 4).

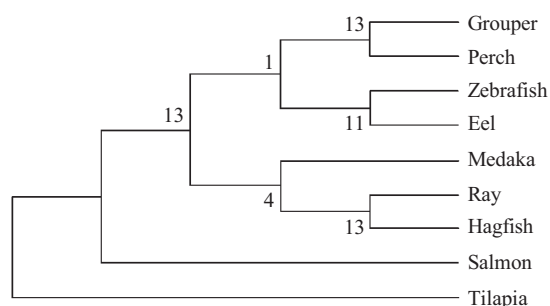


Fig.4 Phylogeny tree based on ECaM amino acid sequences of grouper and eight other fishes

2.4 ECaM 基因的时空表达谱

为了更详尽地了解 *ECaM* 基因在性反转过程中

以及在性反转雄鱼组织中的表达特征, 本研究抽提了赤点石斑鱼性反转过程中不同时期性腺组织和雄鱼多种组织的 RNA, 进行 RT-PCR 检测. 性反转过程中的研究结果显示, 石斑鱼由雌变雄的过程中性腺里 *ECaM* 基因的转录产物水平逐渐增加, 到功能性雄鱼时表达量最高. 性反转雄鱼组织的 RT-PCR 分析表明, 基因 *ECaM* 在性反转雄鱼的心、肝、脾、肾及脑各组织中都有转录, 在下丘脑和精巢中转录水平较高, 而在肌肉中转录甚微 (图 5 和图 6). 然而, 我们在研究中也发现, 随着 PCR 循环数的增加, *ECaM* 基因在正常雌鱼性腺中能检测到痕量的表达. 对照组石斑鱼性腺中 *ECaM* 仅为组成型表达, 没有明显的差异变化.

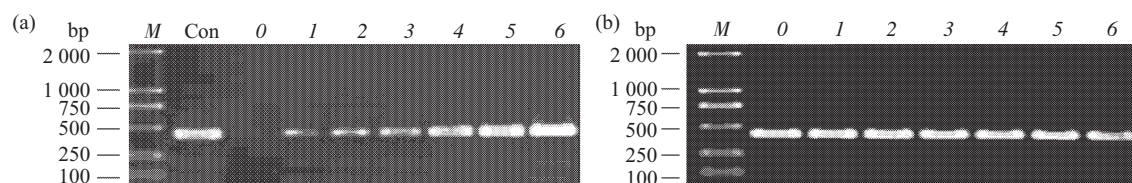


Fig.5 Detecting expression of *ECaM* (a) in gonads at different stages during sex reversal by RT-PCR

The housekeeping gene α -tubulin was used as control (b). M: DL2000 marker; Con: positive control using the plasmid containing *ECaM* cDNA fragment as the template; 0: pre-reversed female gonad; 1~6: grouper gonads at different times (1st- 6th week) during feeding 17 α -MT.

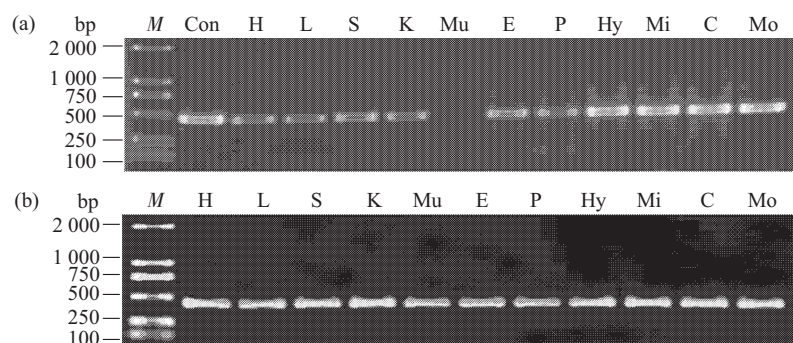


Fig.6 Detecting expression of *ECaM* (a) in various tissues from sex-reversed males by RT-PCR

The housekeeping gene α -tubulin was used as control (b). M: DL2000 marker; Con: positive control using the plasmid containing *ECaM* cDNA fragment as the template; H: heart; L: liver; S: spleen; K: kidney; Mu: muscle; E: endbrain; P: pituitary; Hy: hypothalamus; Mi: midbrain; C: cerebellum; Mo: medulla oblongata.

重组质粒转化 *E.coli* DE3 感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达, 菌体裂解物进行 12% SDS-PAGE 电泳, 表达的融合蛋白分子质量约为 44 ku, 所融合的 GST 分子质量约为 26 ku (图 7a). 融合蛋白经金属离子亲和层析纯化, 纯化的蛋白质经检测达到电泳纯. 用此蛋白质作抗原免疫大白兔 4 次, 得到

效价较高的多克隆抗体. 蛋白质印迹结果显示, 所制备的多克隆抗体在诱导表达了 *ECaM* 基因的大肠杆菌菌体中, 检测到一条约为 44 ku 的特异性杂交带, 说明表达的 GST-*ECaM* 融合蛋白具有较好的免疫学活性 (图 7b). 对性反转不同时期性腺蛋白的蛋白质印迹检测显示, 尽管性腺蛋白的上样量基本

相同, 但杂交信号是逐渐增强的 (图 8). 这表明石斑鱼在由雌变雄的过程中性腺里钙调蛋白的表达量逐渐增加, 与 RT-PCR 检测出的 mRNA 转录结果也是完全一致的.

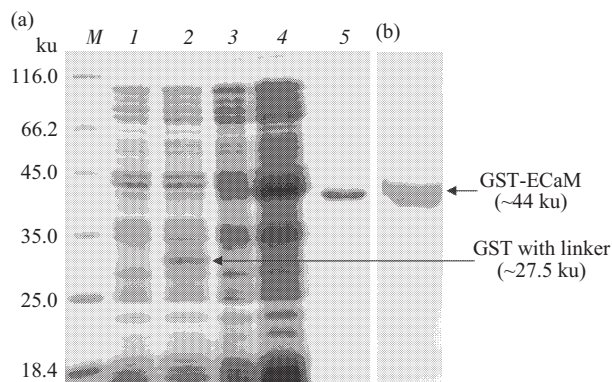


Fig.7 Expression of GST-ECaM fusion protein in *E.coli* (a) and verification of the prepared polyclonal antibody (b)

M: protein molecular mass marker; 1: pET-GST plasmid without induction; 2: pET-GST plasmid induced by IPTG; 3: pET-GST-ECaM plasmid without induction; 4: pET-GST-ECaM plasmid induced by IPTG; 5: purified GST-ECaM fusion protein.

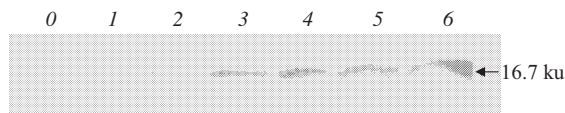


Fig.8 Western blotting analysis of ECaM protein expression in gonads at different stages during sex reversal

0: pre-reversed female gonad; 1~6: grouper gonads at different times (1st~6th week) during feeding 17 α -MT.

3 讨 论

2~4 龄赤点石斑鱼属雌雄同体, 性腺里卵巢和精巢互相交错、镶嵌, 以卵巢组织为主, 在甲睾酮作用下卵巢逐渐退化, 精巢逐渐发达, 最终精子成熟, 转变为功能性雄鱼^[4]. 由于石斑鱼个体发育中普遍存在“先雌后雄”的性转变过程, 导致雌雄亲鱼性成熟不同步配对, 因而受精率较低. 目前育苗的方法主要是用雄性激素诱导性转来培育雄亲鱼, 但激素的过多使用会带来很多弊端, 要彻底摆脱激素诱导性转的弊端, 只有阐明其性别逆转的分子机制, 才能进行人工改良以达到性别控制的目的. 本研究从分子水平探索石斑鱼的性别调控机制, 以期望能开发相应的基因工程产品取代激素的应用.

抑制性差减杂交是一种极为有效的克隆差异表

达基因的方法, 应用该技术已成功克隆了许多与疾病、性别决定和分化、发育相关的重要基因^[5,6]. 本技术能消减共有片段而富集目的基因, 抑制非特异片段扩增, 选择性地扩增差异表达基因片段, 它是鉴别差异表达基因和克隆新基因的有效方法. 我们应用此方法克隆到了性反转前后石斑鱼性腺差别表达基因——石斑鱼钙调蛋白基因 (*ECaM*). 基因芯片技术的飞速发展为大规模筛选差异表达基因提供了新的技术支持, 将 SSH 技术与基因芯片技术结合起来筛选差异表达基因是抑制性差减杂交技术今后发展的主要方向.

一氧化氮合酶 (NOS) 催化 L-精氨酸生成一氧化氮 (NO), NO 的产生离不开 NOS, NOS 的活性直接影响到 NO 的生成, 它是 NO 反应通路的限速酶. 神经型 NOS (nNOS) 和内皮型 NOS (eNOS) 合称为组成型 NOS (cNOS), 其活性依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白, 它在受体激活后的短时间发挥作用. cNOS 与钙调蛋白结合后才能发挥其功能. NO 是一种难溶于水、高脂溶性的小分子气体, 一种具有双重作用的信息分子. 生理范围的 NO 对机体是有益的, 它参与心血管系统、神经系统和免疫功能等的调节. NO 是通过 NO/cGMP 信号转导系统来发挥生理效应的. NO 作为一种信息物质, 是可溶性鸟苷酸环化酶 (sGC) 内源性活化因子, 促进 cGMP 合成. cGMP 是 NO/cGMP 信号转导系统的中心环节, 它作用于 cGMP 门控离子通道, cGMP 调节磷酸二酯酶、cGMP 依赖性蛋白激酶等效应靶分子, 从而调节各种生理功能, 如调节睾丸微循环, 参与睾酮分泌, 调节精子活动等. Davidoff 等^[7]用免疫组化方法证实了在人和鼠的睾丸间质细胞中有 nNOS 分布, 并发现 NOS 阳性细胞与睾酮、钙调蛋白、谷氨酸的含量相关. Koziel 等^[8]对提鼠睾丸间质细胞 NOS 测定结果以及 Wang 等^[9]研究发现睾丸间质细胞内 nNOS 具有严格的表达方式, 都显示间质细胞 cNOS 对雄性性腺分泌雄激素具有重要的调节作用. Valenti 等^[10]对大鼠进行试验后发现, NO 在低浓度时刺激睾酮的分泌, 而在高浓度时抑制睾酮的分泌. 在石斑鱼的性逆转过程中, 钙调蛋白的表达量上调, 也就意味着 cNOS 的表达上调, 使 NO 的浓度有所上升, 促进睾酮的分泌增加. 我们也发现在这一过程中, 一氧化氮合酶蛋白抑制剂基因 (*EPIN*) 表达上调, 它抑制 nNOS 的酶活性. 因此, 我们推测可能是 *ECaM* 与 *EPIN* 共同作用, 动态地调节 nNOS 酶活性, 使 NO 的浓度有所升高但又维

持在生理范围内, 最终精子成熟.

Harley等^[11,12]研究发现, 在 SRY 蛋白的 HMG 区域有 2 个核定位信号(NLS), 分别是 N 端 NLS 和 C 端 NLS, 这 2 个信号彼此靠近. CaM 与 SRY 的 HMG 盒螺旋 1 的 25 个氨基酸序列结合, 这种结合需要 Ca^{2+} 参与, 此区域包含 N 端 NLS. SRY 蛋白必须从胞质完全转运到细胞核内才能发挥正常的生物学效应^[13]. SOX9 是 SRY 的同源基因, 它的高表达总是与睾丸分化相关. Argentaro 等^[14]研究表明, SOX9 蛋白要发挥生理功能, 与 SRY 一样, 必须从胞质转移至细胞核. SOX9 蛋白的 HMG 盒同样有 N 端 NLS 和 C 端 NLS, C 端 NLS 与受体 β 结合, N 端 NLS 与 Ca^{2+} -CaM 结合. CaM 结合 SOX9 蛋白后引起它的构象发生改变, 促进它向核内运输的过程. 钙调蛋白拮抗剂钙咪唑啉 (CDZ) 能减少 SOX9 与 CaM 的结合、SOX9 的核内积累量和转录活性. CaM 促使 SOX9 转移到细胞核, 进入细胞核后 SOX9 蛋白与 DNA 结合, 使其形成一定的角度, 调节其表达. 转基因鼠试验证明, Sox9 能使未分化性腺中 Leydig 细胞前体细胞分化为 Leydig 细胞, 分泌睾酮, 使雄性生殖管道正常发育. 我们已从石斑鱼的性腺及下丘脑中克隆到了 Sox9 基因的完全编码区. 上述这些发现提示, 在石斑鱼中可能是钙调蛋白与 Sox9 相互作用, 同时它也与 nNOS 作用, 调节雄性激素的分泌, 促使雌鱼转变成雄鱼. 为了进一步证实 CaM 在性转换中的作用, 我们下一步将研究在石斑鱼中 Sox9 和 ECaM 基因是否也象它们在人和鼠中那样, 具有同样的功能.

参 考 文 献

- Cheung W Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, 1980, **207** (4426): 19~27
- Chafouleas J G, Lagace L, Bolton W E, *et al.* Changes in calmodulin and its mRNA accompany reentry of quiescent (G0) cells into the cell cycle. *Cell*, 1984, **36** (1): 73~81
- 戴庆年, 张其永, 蔡友义, 等. 福建沿岸海域赤点石斑鱼年龄和生长的研究. *海洋与湖沼*, 1988, **19** (3): 215~225
Dai Q N, Zhang Q Y, Cai Y Y, *et al.* *Oceanol Limnol Sin*, 1988, **19** (3): 215~225
- 洪万树, 张其永, 公茂军, 等. 外源激素诱导赤点石斑鱼雄性化. *台湾海峡*, 1994, **13** (4): 375~381
Hong W S, Zhang Q Y, Gong M J, *et al.* *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1994, **13** (4): 375~381
- Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 1999, **303**: 349~380
- Xie J, Wen J J, Chen B, *et al.* Differential gene expression in full-grown oocytes between genogenetic and gonochoristic crucian carps. *Gene*, 2001, **271**: 109~116
- Davidoff M S, Middendorff R, Mayer B, *et al.* Nitric oxide synthase (NOS- I) in Leydig cells of the human testis. *Arch Histol Cytol*, 1995, **58** (1): 17~30
- Koziel E, Kotula M, Andronowska A, *et al.* Correlation between NADPH- diaphorase and iNOS in bank vole leydig cells *in vitro* and testicular sections with the use of histochemistry and immunocytochemistry. *Folia Histochem Cytobio*, 2000, **38** (2): 71~78
- Wang Y, Newton D C, Miller T L, *et al.* An alternative promoter of the human neuronal nitric oxide synthase gene is expressed specifically in Leydig cells. *Am J Pathol*, 2002, **160** (1): 369~380
- Valenti S, Cuttica C M, Fazzuoli L, *et al.* Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat Leydig cells cultured *in vitro*. *Int J Androl*, 1999, **22**: 336~341
- Harley V R, Lovell-Badge R, Goodfellow P N, *et al.* The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett*, 1996, **391** (1~2): 24~28
- Harley V R, Layfield S, Mitchell C L, *et al.* Defective importin β recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (12): 7045~7050
- Sreenivasan A. In sex reversal, protein deterred by nuclear barrier. *Science*, 2003, **302** (5653): 2050
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, *et al.* A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem*, 2003, **278** (36): 33839~233847

Cloning and Characterization of a Sex-Reversal-Related Gene *ECaM* in *Epinephelus akaara* Gonads *

LI Shang-Wei ^{1,2)}, WEN Jian-Jun ³⁾, LIU Shi-Gui ¹⁾, LONG Zhang-Fu ^{1)**}

(¹⁾ College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

²⁾ Institute of Entomology, Agricultural College, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

³⁾ School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China)

Abstract Red grouper (*Epinephelus akaara*) females between two and four years of age were successfully reversed to functional males by feeding 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) over 42 days. A gene, called *ECaM*, was cloned from sex-reversed male gonads by using the combinative methods of suppressive subtraction hybridization (SSH), SMART cDNA synthesis and RACE-PCR. The full-length cDNA of *ECaM* is 582 bp, containing a 450 bp open reading frame that encodes a 149 amino acid protein. It has a 5' untranslated region (UTR) of 74 nt and a 3' UTR of 58 nt. Virtual Northern blotting shows that *ECaM* is transcribed in sex-reversed male gonads but only slightly transcribed in normal female gonads. Semi-quantitative RT-PCR analyses from various tissues indicate that mRNA of *ECaM* can be detected in the brain, heart, liver, spleen, and kidney but slightly in the muscle. Semi-quantitative RT-PCR and Western blotting from gonads during various stages of sex reversal reveal that expression levels of *ECaM* in gonads increase gradually during the transformation from female to male. Calmodulin is highly conserved across species. *ECaM* is one of the important genes that impels grouper sex reversal.

Key words *Epinephelus*, calmodulin, gonad, sex reversal, suppressive subtraction hybridization (SSH)

*This work was supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA620111) and the National Oceanic Association Program (4-2-4).

**Corresponding author . Tel: 86-28-84761793, E-mail: LZF0028@163.com

Received: August 11, 2004 Accepted: October 31, 2004