

栉孔扇贝 17β -*hsd4* 基因的克隆和表达分析

王 丹, 李海龙, 毕 颖, 刘建国, 张志峰*

(中国海洋大学海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了研究 17β -*hsd4* 基因在无脊椎动物生殖过程中的作用, 实验从栉孔扇贝转录组数据库中获得一个表达序列标签, 采用 cDNA 末端快速扩增技术克隆得到 1 条全长为 2 417 bp 的 cDNA 序列, 其开放阅读框为 2 223 bp, 编码 740 个氨基酸, 推测的氨基酸序列含有 17β -HSDs 特有的 4 个保守区和 17β -HSD4 的 3 个酶结构域, 且与人等脊椎动物的序列相似性均在 58% 以上。半定量 RT-PCR 显示, 该基因在栉孔扇贝精巢、卵巢、肌肉、外套膜、鳃、肝胰腺和肾脏等各组织中均有表达, 其中在肝胰腺和肾脏中表达量明显高于其他组织。对不同发育时期性腺中该基因表达的 qRT-PCR 检测发现, 其在精巢发育周期的表达模式不同, 且在生长期和成熟期的精巢中表达量显著性高于同时期的卵巢。由此推测, 栉孔扇贝多种组织中均可以合成 17β -HSD4, 在精巢的发育和成熟的作用明显高于卵巢。

关键词: 栉孔扇贝; 17β -*hsd4* 基因; 克隆; 序列特征; 组织表达

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

17β -HSDs 通过催化性激素 C17 位上的醇基和酮基之间的氧化还原反应, 使性激素在高活性形式和低活性形式之间相互转化^[1], 从而调节相应的生物学功能, 在动物性别分化、性腺发育和生殖调控中起重要作用。 17β -HSD4 位于动物的过氧化物酶体中, 它可以催化高活性的雄烯二醇和雌二醇转化成低生物活性脱氢表雄酮和雌酮^[2], 目前发现其广泛分布于动物各组织中^[3], 并在人、小鼠、大鼠、猪等的肝脏的肝细胞、肾脏的近端小管上皮细胞、卵巢的粒层细胞、子宫的管腔和腺上皮、精巢的睾丸间质细胞、前列腺的上皮细胞、骨骼肌的肌细胞、视网膜色素细胞和脑的浦肯野氏细胞中均存在明显的特异性表达^[4]。Huyghe 等^[5]发现敲除该基因后, 小鼠的精巢支持细胞中大量累积中性脂质; 幼鼠出现痉挛症状, 成体雌鼠的生殖能力会降低, 雄鼠则完全不育^[4]; 人类 17β -*hsd4* 基因突

变则产生严重的 Zellweger 样综合征^[6]; 在人前列腺癌的上皮细胞中发现该基因在 mRNA 和蛋白水平均出现过表达^[7]。

性类固醇激素在软体动物中广泛存在^[8], 目前已在紫贻贝 (*Mytilus deulis*)、砂海螂 (*Mya arenaria*) 和巨扇贝 (*Placopecten magellanicus*) 等双壳动物中检测到孕酮、雌二醇、睾酮等的存在^[9], 并发现性激素对巨扇贝的排卵、性腺发育和性别决定等有重要的影响^[10]。软体动物中有关 17β -HSDs 家族的研究还较有限。Zhou 等^[11]克隆获得了九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 17β -*hsd12* 全长 cDNA, 发现该基因在生殖期的性腺中表达量最高, 并证明该酶可使雌酮转化为雌二醇, 推测其在九孔鲍生殖阶段的类固醇合成中起着重要作用。Zhai 等^[12]克隆了九孔鲍的 17β -*hsd11*, 瞬时转染入人的胚肾 293 细胞后, 发现该酶可以降低高活性雄性激素 (双氢睾

收稿日期:2012-10-08 修回日期:2012-12-09

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA0A02);青岛市科技计划基础研究项目(11-2-4-1-(10)-jch);山东省自然科学基金重点基金(Z2008D02)

通信作者:张志峰, E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn

酮和睾酮)的水平。最近,在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的基因组中报道了17 β -*hsd4*和17 β -*hsd14*等序列^[13],然而贝类中是否还存在其他的17 β -HSDs成员,目前我们还知之甚少,这无疑限制了人们对贝类性激素的合成和灭活途径、性激素的运输、靶组织定位以及调控等方面的理解。

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)隶属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia),其肉鲜美、营养丰富,是我国重要的海水养殖贝类之一,具有较高的经济价值^[14]。本研究克隆了栉孔扇贝17 β -*hsd4*基因的全长cDNA序列,进一步对其组织表达以及不同发育时期性腺中的表达进行了分析,旨在为贝类性激素合成以及17 β -*hsd4*在贝类中的作用途径等深入研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用2龄栉孔扇贝购自青岛市海德发海产品市场,过滤海水中暂养24h,选择健康的雌雄个体,解剖并获取性腺、肌肉、外套膜、鳃、肝胰腺和肾脏等组织,干液氮中速冻后,存于-80℃冰箱中,用于总RNA提取。部分性腺样本于Bouin氏液中固定24h后,存于70%酒精中用于组织学观察,以确定性腺的发育时期。

1.2 总RNA提取及cDNA第一链的合成

采用异硫氰酸胍法提取栉孔扇贝生长期卵巢的总RNA^[15],1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测RNA的质量和浓度。使用SMARTTM-RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)并按照操作指南合成cDNA第一链。将生成的cDNA模板保存于-20℃备用。

1.3 RACE扩增和全长cDNA序列的获得

从GenBank数据库获得人类、小鼠、野猪、非洲爪蟾、斑马鱼、底鳉等物种的17 β -HSD4蛋白序列,与已经构建的栉孔扇贝转录组数据库中的序列进行Blast比对,筛选出同源性较高的数个基因片段,根据期望值、相似度、得分等参数将基因片段进行筛选,并将最优参数组合的基因片段再次在GenBank上进行Blast,筛选出最符合栉孔扇贝17 β -*hsd4*基因的片段。根据该片段序列设计5' RACE引物P1、P2和3' RACE引物P3、P4(表1),采用已获得的5'、3' RACE

模板,以引物组合10 \times UPM/P1、NUP/P2和10 \times UPM/P3、NUP/P4进行目的基因的5'和3' RACE扩增,PCR反应体系为50 μ L,循环参数为94℃3min;94℃30s,68℃30s,72℃延伸3min,35个循环;72℃10min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶检测,胶回收后与pMD18-T载体连接,然后转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,挑取阳性克隆进行菌落PCR和Hae III酶切鉴定后,送往华大基因进行测序。

1.4 序列特征、同源比对及系统进化树构建

利用DNASTAR软件对所获序列进行全长拼接;通过NCBI的Blast-P程序在GenBank数据库中进行相似性搜索;DNASTAR软件预测其蛋白分子质量和等电点;在线软件Glycosylation Predictor预测该基因糖基化位点;氨基酸多重序列比对由Clustal X和DNAMAN软件完成;系统发生树采用Clustal X和MEGA 4.0程序中的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建。

1.5 半定量RT-PCR分析

根据目的基因全长cDNA序列设计1对特异引物P5和P6(表1),以引物P7和P8(表1)扩增栉孔扇贝 β -*actin*基因(GenBank登录号AY335441)的序列片段作为内参。提取生长期栉孔扇贝的肾脏、外套膜、肝胰腺、鳃、闭壳肌、精巢和卵巢的总RNA,并使用PrimeScript RT reagent Kit(大连宝生物)并按照说明书反转录获得cDNA,用做RT-PCR的模板。PCR反应体系为20 μ L,循环参数为60℃退火30s,72℃延伸1min,30个循环用于扩增715bp的目的基因片段;25个循环用于扩增593bp的 β -*actin*基因片段。

1.6 相对定量qRT-PCR分析

取保存于70%酒精中的性腺组织,经系列酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚度为5 μ m)后,H.E染色,于Nikon E80i显微镜下观察、拍照。根据组织学结构特征^[16],将性腺划分为4个时期(图5):增殖期(滤泡壁由1~2层生殖细胞组成)、生长期(滤泡壁由多层生殖细胞组成,滤泡腔明显)、成熟期(滤泡腔内充满生殖细胞,精巢出现大量精子,卵巢中成熟卵被挤压,呈不规则形状)和休止期(滤泡壁由不成层的细胞组成,滤泡腔极大)。每个时期雌雄各取4个个体的性腺样本,根据已获得的栉孔扇贝目的基因cDNA全长序列设计1对特异引物P9和P10(表1),依

据栉孔扇贝 *β -actin* 基因序列设计 1 对内参引物 P11 和 P12(表 1)。以 *β -actin* 的序列片段(扩增片段长度为 128 bp)作为内参,使用 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪检测目的基因(扩增片段长度为 150 bp)在栉孔扇贝性腺组织中的相对表达,每个性腺样本做 2 个平行检测。PCR 反应体系为 20 μ L,循环参数为 95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1

min,40 个循环。设定栉孔扇贝增殖期卵巢目的基因的表达量为 1,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。以 SPSS 13.0 软件包中 One-way ANOVA 进行显著性分析,Duncan 法进行多重比较($P < 0.05$ 为显著水平),用 Microsoft Office Excel 作图。

表 1 实验中所用的引物序列
Tab.1 Primer sequences used in the study

引物 primer name	序列(5'-3') primer sequence
UPM	long(0.4 mmol/L) CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	short(2 mmol/L) CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
P1	CAGGACAAGTGGCGACACAACTCAGGC
P2	AAGCACCTCGTAAGTGAACCTTG
P3	ACGAGACAGGTCCTTCGCCAGAATCAGC
P4	AGTGTAATACCATCGCACCAATAGC
P5	CTTGATAGCCTTGACTTTCGTG
P6	TGTGGAGGCTGCTAAACAATAC
P7	ATGCCCTCCCTCACGCTAT
P8	GCCAGACTCGTCGTATTCCCT
P9	GTTTAGCGGCACTGTAGTTAGC
P10	TCCACAAGGTTCACTTACGAGG
P11	CCTGGGAACATTGTGCTACC
P12	TTCTTGGAATGGAATCTGCCG

2 结果

2.1 目的基因全长 cDNA 的克隆、序列特征和系统进化分析

利用 DNASTAR 软件去除测序结果的载体序列后对其进行拼接,获得的栉孔扇贝目的基因的 cDNA 序列全长为 2 417 bp(GenBank 登录号 JX678712),其中 5'非编码区为 19 bp,3'非编码区为 175 bp,含有 28 bp 的 poly(A)尾巴;该序列开放阅读框为 2 223 bp,可编码 740 个氨基酸,预测其蛋白分子质量为 79.70 ku,等电点为 8.87。该氨基酸序列含有 4 个 17β -HSD 家族保守区,同时

还含有 11 个 N-糖基化位点(图 1)。

选择哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类和双壳贝类等物种的 17β -HSD4 氨基酸序列进行比对,结果显示栉孔扇贝的 17β -HSD4 与人、原鸡、非洲爪蟾和亚东鲑等物种在 N 端短链脱氢酶结构域(SCAD Box)、中心水解酶结构域(HDE Box)和 C 端固醇载体蛋白结构域(SCP2)的相似性分别为 68%~74%、56%~63%、45%~56%,在全长氨基酸序列的相似性分别为 59.8%、60.2%、58.7% 和 61.2%(图 2)。系统进化树显示,根据本实验所获得的栉孔扇贝目的基因推导的氨基酸序列首先与太平洋牡蛎聚类,之后与斑马

鱼、底鳃和亚东鲑聚类,然后与原鸡、非洲爪蟾、蜥蜴和东部菱背响尾蛇聚类,最后依次与鸭嘴兽、野猪、小鼠和人类聚类(图3)。

2.2 17β-hsd4 基因的时空表达

半定量 RT-PCR 结果显示,17β-hsd4 mRNA 分布广泛,在所检测的栉孔扇贝各组织中均有表达,且以肾脏和肝胰腺中表达量最高(图4)。qRT-PCR 结果显示,17β-hsd4 mRNA 在各发育时

期的精卵巢中均有表达,并且随着性腺成熟其表达量均有升高;其中生长期和成熟期精巢中目的基因的表达量显著性高于增殖期和休止期精巢(P < 0.05);然而卵巢中的表达量在各发育时期之间无显著性差异(P > 0.05);在生长期和成熟期精巢的表达量显著性高于同时期的卵巢,均为3倍(P < 0.05)(图6)。

1 M A A P L R F D G K V V L V [T G A G N G L G] R Q Y A L D F
1 acatgggggactttccaagATGGCAGGCCCTTACGGTTTGACGGAAAGTGGTCTAGTGACAGGTGCCGGGAATGGTCTAGGGAGGCAGTATGCCTTGGACTT
30 A E R G A S V V (N) D L G G N F K D E G A G T R A A D V V V (N) E I K S
106 CCCAGAACCTGGAGCTTCAGTTGCTGTAATGACCTTGTGGAACTTCAAGGGCAAGGTGCAGGACCCAGAGCTGCCGATTTGTAGTCAACGAAATCAAGTC
65 K G G K A V A N Y N S V E E G E K V V Q T A L E N F G R I D V V I N [N]
211 CAACGGTGGAAAGCCGTGGCGAATCAATTCGGTAGAAGAGGGAGAAAAGTAGTACAGACTGCTTTGGGAACTTTGGGAGAATAGATGTCGTCATCAATAA
100 [A G] I L R D R S F A R I S D T D W D L I H K V H L R G A F Q V S R A A
316 TGCTGGTATCCTACGAGACAGGTCCTTCGCCAGAATCAGCGACACAGATTGGGACCTTATCCACAAGTTCACTTACGAGGTGCTTTCCAGGTCCTTCCTGCTEC
135 W P H M K K Q N Y G R I I (N) V T [S] A A G I Y G N F G Q A (N) [Y S A A K] L
421 ATGGCCACACATGAAGAAACAGAACTATGGCAGAATAATTAATGTAACGTCAGCAGTGGTATCTATGGAACTTTGGACAAGTAACTACAGTCCGCTAAACT
170 G V L G L S N T L A I E G K K N N V K C N T I A [P I A G S R] M T E T V
526 AGGAGTCTAGTCTTAGTAACTCTGGCTATAGAGGAAAGAAATAACGTCAGTGAATACCATCGCACCAATAGCAGGCTCCCGTATGACAGAACTGT
205 M P P D M V A A L K P E F V S P L V L Y L S H E D C D E S G S L F E V
631 GATGCCACCAGATAIGGTGGCTGCCCTGAAGCCTGAGTTTGTGTCGCCACTTGTCCTGTATCTGTACATGAAGACTGTGACGAGTCTGGTTCTGTGTTGAGGT
240 G A G W I G K L R W E R T K G V V C R S S N S A M T P E A V R D N W D
736 CCGAGCTGGATGGATAGGAAATACGATGGGAAAGAACAAAAGTGTGTTTGTGATCAAGTAACTCAGCCATGACACCAGAGGCTGTTCGAGATAATTGGGA
275 A V T D F T D S Y T P R S N Q E P A G I M M E V L R K I D Q G P A K P
841 TGCTGTCACGGATTTTACCGACTCCTACACCCCGCTCAAAACCAAGCCAGTGGTATAATGATGGAAAGTGTGAGAAAATAGACCAGGTCACGAAAGCC
310 S R A S S R A A S S G S G P D V E A A K Q Y K P K P I K F T Y S A R D
946 ATCCCGGCCAGCTCCAGGGCGCATCCTCTGTTAGTGGACAGATGTGGAGGCTGCTAAACAATACAAACCAACCAATCAAGTTACCTACTCAGCACGGGA
345 V M L Y A L G V G S S T R A P D Y L (N) F L Y E G G E D F G V I P S E A
1051 TGTGATGTTGACGCTTGGAGTTGGTTGCTGCACCGGACCCAGACTACCTGAAATTTGTTGATGAGGGGGCCAGGACTTTGGAGTATTCCAGCTTTTC
380 V I P A Q M G M E N V I T Q G I P G M E I N P A K I L H G E Q Y V E L
1156 CGTTATCCAGCACAGATGGGAATGTTATAACTCAAGGCATCCAGGCATGGAAATCAATCCAGCCAAAGATCCTACATGGCGAGCAGTATGTTGGAGTT
415 Y K P M P T S G T L T S Q V S I A D V L D K G S G A V I L I N I E T F
1261 ATACAAACCTATGCCTACAAGTGGTACCTGACCTCACAGGTCAGCATCGCCGACGTCCTCGACAAGGATCTGGAGCTGTTATCCTCATCAATATTGAACTTT
450 D E K K E K V C F N Q F N I F A V G Y G K F G G (N) R N S E A A K A P G
1366 TGACGAGAAGAAAGAAAGTCTGTTCAATCAGTTAATAATTTGCTGTTGGATATGAAAGTTGGTGGAAACAGAAATCCGAGGCAGCTAAAGCTCCAGG
485 K A P S R K P D S F L V E T T S V D Q A A L Y R L C G D R N P L H I D
1471 AAAAGCACCATCACGAAACCCAGACTCATTGTTAGTGGAGACTACCAGGTTGGATCAGGGCCCTTTATCGTCTTTGGGAGACAGAAACCCACTACATATCGA
520 P S F A A M G G F T K P I L H G L C S F G Y A T R H V L K Q Y G N N D
1576 CCCCAGCTTCGCTGCAATGGGAGGTTTACCAAACCAATTCGCTGCTGTTGTTGCTGAGCTTTGGTTATGCTACCCGATGCTTCCGAAACAGTACGGCAACATGA
555 V T K V K A I K A R F A K P V L P G Q T I H T D M W K E G N R V M F Q
1681 TGTCACGAAAGTCAAGGCTATCAAGGCAAGATTGGCCAAACAGTGTACCCAGGCGAGACAATCCACAGATATGTTGAAAGGAGGGCAACAGGTCATGTTCCA
590 C K V A E S G D V C L S G G Y I D F H A A P A A S A T T A A P Q V A T
1786 ATCTAAGTTGCAGAGTCGGGAGATGTATGCTCTCAGGAGGATATAGATTTCCATGCAGCACCTGCAGCTTCTGCCACCACCGCTGCCCCAGGTTGCAAC
625 D L K S D L I F E E I G R R A K D E P A M V K K V (N) S V F Q F (N) I T K
1891 AGACTTGAAGAGTACCTCATTGTTGAGGAGATTGGCCCGCTGCCAAGGATGAACCTGCTATGGTGAAGAGGTCACAGTGTATCCAGTTCAACATTACAAA
660 G G K T A A V W T T D M K T P G G A I Y K G E P K Q G K A D C T L T I
1996 GGGAGGAAAACAGCTGCTTTTGGACCACAGCATGAAGCCCGCTGGCCGATCTACAAGGGGAGCCAAACAGGGAAGCTGACTGCACCTCAGCAT
695 S D D N F G D M V T G K L (N) G Q D A F M K G L L K I Q G N L M L A Q K
2101 ATCTGACGATAACTTCGGTGCATGGTCAAGCTAAATGGACAGGATGCATTCAATGAAAGGACTGCTGAAAATACAAGGCAACCTGATGCTCAGAA
730 L G E L F R T R S (N) L *
2206 ACTGGGGAGTTGTTCCGAACAGTCCAACTTAgataaaactccaatcatcagaaattgctaagtgtgactgttttcagctctgaacaaaaaaggaacat
2311 tcagcccaagtgttaattgtaataaagaaactctgaggaatgttttgacagctcttttggtactttgagtgaactaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
2416 aa

图1 栉孔扇贝 17β-hsd4 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

小写字母代表 UTR 序列,大写字母代表编码区序列;双下划线代表翻译的起点和终点;括号区域代表预测的 N-糖基化位点。方框区域代表 17β-HSD 家族保守区,由 N 端向 C 端依次为 TGXXXGXG 辅酶结合位点;NAG 结构性保守序列;Ser, Tyr, Lys 酶活性中心和 PGxxxT。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of full-length 17β-hsd4 cDNA in C. farreri

The lowercases indicate the UTR sequence of 17β-hsd4, while the uppercases indicate the encoding sequence. The start codon(ATG) and the stop codon(TAA) are double underlined. Potential N-glycosylation sites are parenthesized. Conserved region of 17β-HSD family are boxed indicating(from N-end to C-end) coenzyme binding site of TGXXXGXG. NAG structural conserved sequence. Enzyme activity center of Ser, Tyr, Lys and PGxxxT.

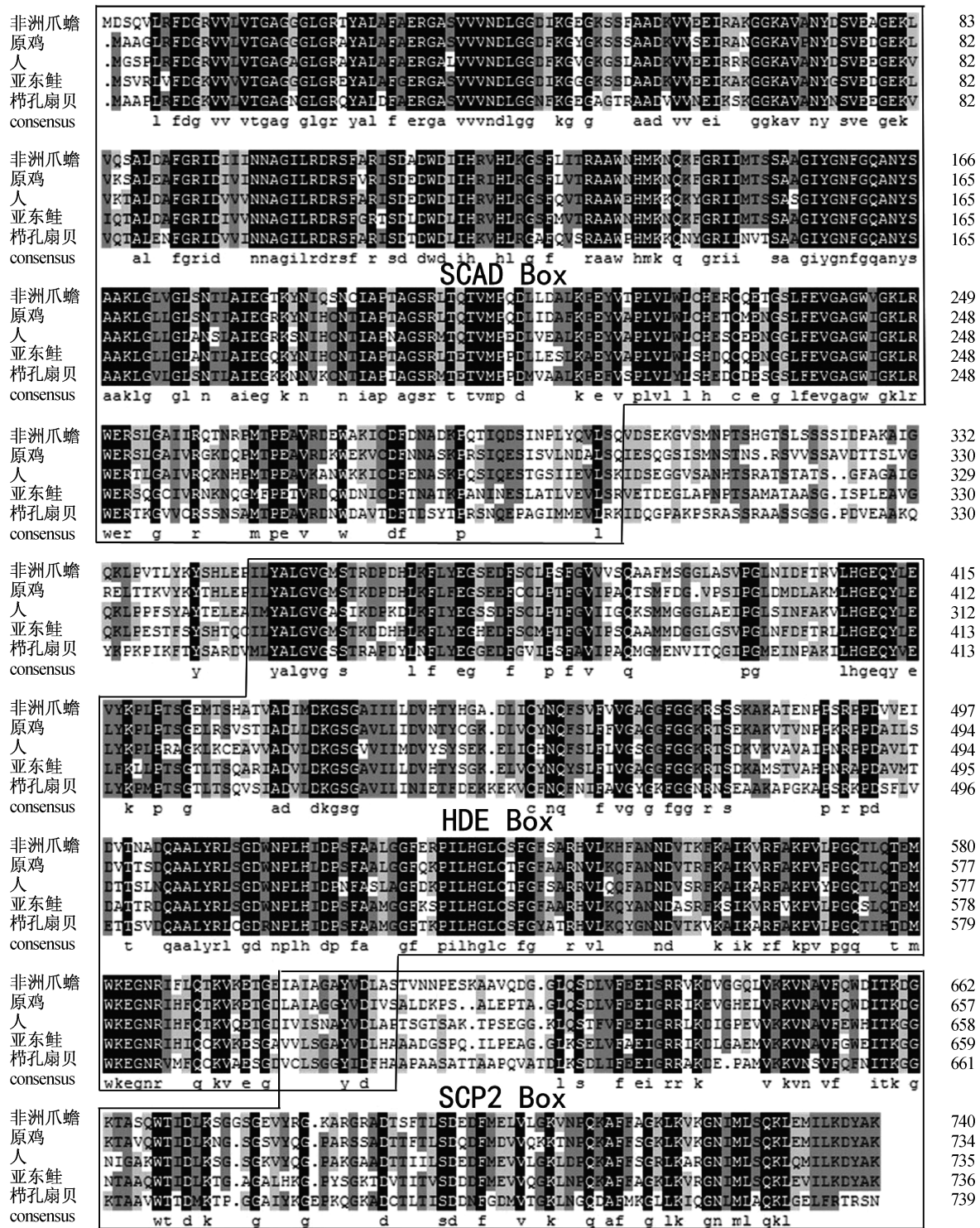


图 2 不同物种的 17β-HSD4 同源蛋白序列比对

阴影区显示同源性的氨基酸,其中黑色区代表氨基酸同源性为 100%,深灰色区代表氨基酸的同源性为 75%以上,浅灰色区代表氨基酸的同源性为 50%。黑框示 17β-HSD4 氨基酸序列中的 3 个催化活性区域:N 端短链脱氢酶结构域(SCAD Box)、中心水解酶结构域(HDE Box)与 C 端固醇载体蛋白结构域(SCP2 Box)。

Homo sapiens:人(NP_000405); *Gallus gallus*:原鸡(NP_990274); *Xenopus laevis*:非洲爪蟾(NP_001086063); *Salmo trutta fario*:亚东鲑(ACN66287); *Chlamys farreri*:栉孔扇贝(JX678712)。

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of 17β-HSD4 among different species

Shaded regions indicate residues sharing homology, black region is 100% homologous sequence, gray region is 75%, light gray region is 50%. Three catalytic active regions are boxed. SCAD: short chain alcohol dehydrogenase; HDE: hydratase-dehydrogenase epimerase; SCP2: sterol carrier protein 2.

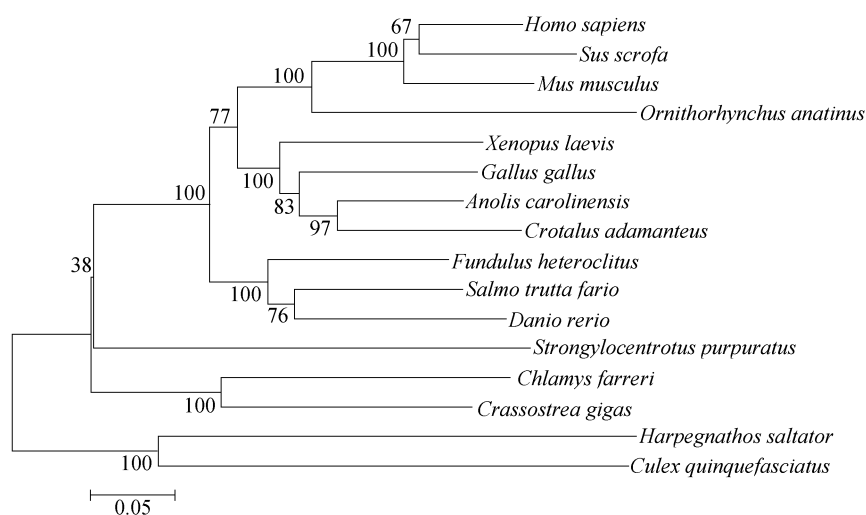


图3 基于17 β -HSD4氨基酸序列绘制的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 17 β -HSD4 based on the homologous of the amino acids

Homo sapiens: 人类 (NP_000405.1); *Sus scrofa*: 野猪 (NP_999471.1); *Mus musculus*: 小鼠 (CAA62015.1); *Ornithorhynchus anatinus*: 鸭嘴兽 (XP_001512505.2); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾 (NP_001086063.1); *Gallus gallus*: 原鸡 (NP_990274.1); *Anolis carolinensis*: 蜥蜴 (XP_003223057.1); *Crotalus adamanteus*: 东部菱背响尾蛇 (AFJ50902.1); *Fundulus heteroclitus*: 底鲮 (BAF74749.1); *Salmo trutta fario*: 亚东鲑 (ACN66287.1); *Danio rerio*: 斑马鱼 (AAH65945.1); *Strongylocentrotus purpuratus*: 紫海胆 (XP_786662.3); *Chlamys farreri*: 栉孔扇贝 (JX678712); *Crassostrea gigas*: 太平洋牡蛎 (EKC42344.1); *Harpegnathos saltator*: 印度跳蚊 (EFN79028.1); *Culex quinquefasciatus*: 库蚊 (XP_001843060.1)。

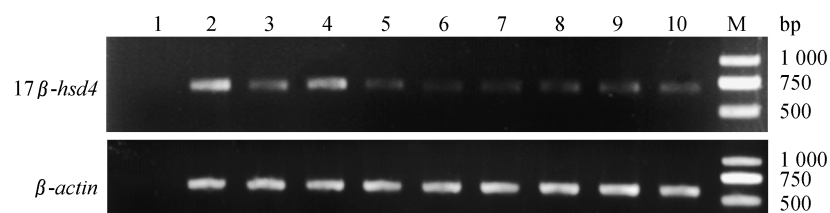


图4 17 β -*hsd4* mRNA 在生长期栉孔扇贝组织中的半定量表达

M. DL 2000 分子量标准; 1. 水; 2. 肾脏; 3. 外套膜; 4. 肝胰腺; 5. 鳃; 6. 闭壳肌; 7. 生长期精巢; 8. 生长期精巢; 9. 生长期卵巢; 10. 生长期卵巢。

Fig. 4 Expression of 17 β -*hsd4* mRNA detected by RT-PCR in tissues of *C. farreri* at growing stage

M. DL 2000 marker; 1. water; 2. kidney; 3. mantle; 4. hepatopancreas; 5. gill; 6. adductor muscle; 7, 8. testis at growing stage; 9, 10. ovary at growing stage.

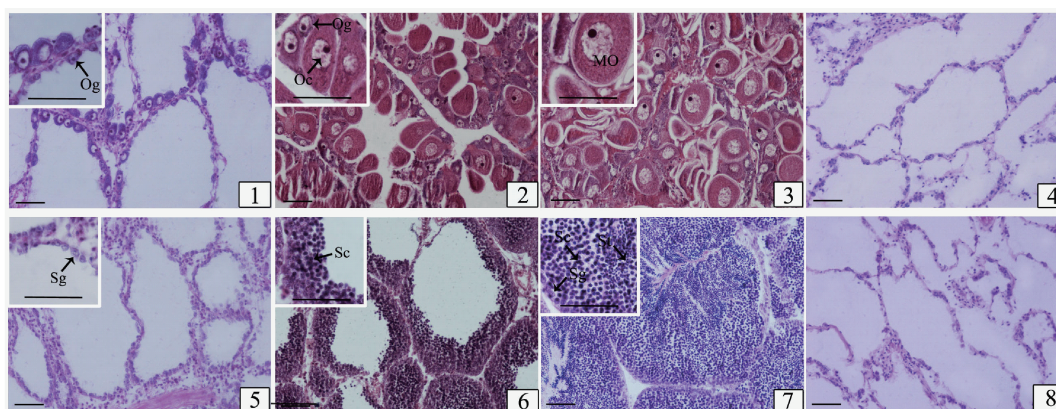


图5 栉孔扇贝不同发育时期的性腺组织学观察

1. 卵巢(增殖期); 2. 卵巢(生长期); 3. 卵巢(成熟期); 4. 卵巢(休止期); 5. 精巢(增殖期); 6. 精巢(生长期); 7. 精巢(成熟期); 8. 精巢(休止期)。Og. 卵原细胞; Oc. 卵母细胞; MO. 成熟卵; Sg. 精原细胞; Sc. 精母细胞; St. 精细胞; Sz. 精子。标尺 = 50 μ m。

Fig. 5 Histological observation on gonads of *C. farreri* in different developmental phases

1. ovary (Proliferative stage); 2. ovary (Growing stage); 3. ovary (Mature stage); 4. ovary (Resting stage); 5. testis (Proliferative stage); 6. testis (Growing stage); 7. testis (Mature stage); 8. testis (Resting stage). Og. oogonium; Oc. oocyte; MO. mature oocyte; Sg. spermatogonium; Sc. spermatocyte; St. spermatid; Sz. sperm. Bar = 50 μ m.

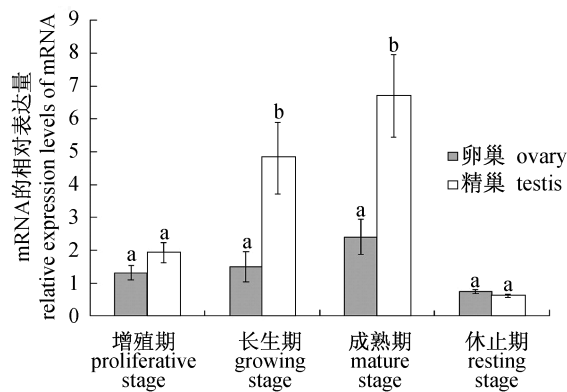


图 6 *17 β -hsd4* 在栉孔扇贝不同发育周期性腺中的定量表达

不同的字母表示基因表达差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 Expression of *17 β -hsd4* mRNA detected by qRT-PCR in the *C. farreri* gonads during reproductive cycle

Different letters indicate significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 栉孔扇贝 *17 β -HSD4* 序列结构及同源性分析

17 β -HSDs 是一类参与类固醇激素合成和代谢活动的酶。目前,已经从脊椎动物中发现了 15 种 *17 β -HSDs*,除了 *17 β -HSD5* 属于醛酮还原酶 (aldo-keto reductase, AKR) 超家族外,其它成员均属于短链脱氢酶/还原酶 (short chain dehydrogenases/reductases, SDR) 超家族^[3]。尽管它们都有保守的超二级结构 (Rossmann 折叠)、辅酶结合位点和催化位点,但是各种 *17 β -HSDs* 之间的序列同源性较低 (25% ~ 30%),尤其是 C 末端的序列多样性可使 *17 β -HSDs* 分别催化不同的底物^[17]。*17 β -HSD4* 为该家族中一类 NAD^+ 依赖的氧化酶类,它是 *17 β -HSDs* 中最长的基因,参与脂肪酸的 β -氧化和雌二醇的灭活^[2]。Leenders 等^[18]首次从猪的肾脏 cDNA 文库中分离出 *17 β -hsd4* 的 cDNA 全长,之后陆续从人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*)、蜥蜴 (*Anolis carolinensis*)、斑胸草雀 (*Taeniopygia guttata*)、亚东鲑 (*Salmo trutta fario*)、紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 和库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 等多种物种中克隆获得该基因的 cDNA,并且对其表达和相关的功能进行研究^[19]。本实验从栉孔扇贝卵巢中获得一个全长为 2417 bp 的 cDNA 序列,该序列不仅含有 *17 β -*

HSDs 共有的保守区 (TGXXXGXXG 辅酶结合位点;NAG 结构性保守序列;Ser, Tyr, Lys 酶活性中心和 PGxxxT),还具有 *17 β -HSD4* 特有的催化活性区域 (N 端短链脱氢酶结构域、中心水解酶结构域和 C 端固醇载体蛋白结构域)。系统进化分析表明,该序列与太平洋牡蛎的 *17 β -HSD4* 处于同一枝。鉴于上述特点,实验认为本研究所获得的目的序列为栉孔扇贝 *17 β -hsd4* 全长 cDNA 序列。

3.2 栉孔扇贝 *17 β -hsd4* 的时空表达分析

17 β -hsd4 广泛分布于动物各组织中,人类在肝脏中表达量最高,其次是心脏、前列腺和精巢,在肺、骨骼肌、肾脏、胰腺和卵巢中适量表达^[3],猪和小鼠等脊椎动物在肝脏和肾脏中表达量最高,并认为这与此类器官中该酶催化长链脂肪酸的 β -氧化^[18],本实验首次报道了贝类中 *17 β -hsd4* 基因的基因克隆和发育表达图式,栉孔扇贝中该基因也是在肝胰腺和肾脏中表达量最高,所以推测该酶在栉孔扇贝的肝胰腺和肾脏中可能也参与脂肪酸的代谢过程;并且精巢、卵巢、鳃、外套膜和肌肉等多种组织检测到其存在,说明栉孔扇贝多种组织均可以合成 *17 β -HSD4*。大鼠肝脏研究表明,过氧化物酶体增殖因子可以增强 *17 β -hsd4* 的表达,且其对雄鼠的诱导作用明显高于雌鼠^[20],栉孔扇贝 qRT-PCR 显示该基因在精巢中整体表达高于卵巢,我们推测类似的诱导作用可能同样存在于栉孔扇贝精巢中。进一步研究发现,该基因敲除的小鼠出生 10 d 细精管开始大量积累脂滴^[4],出生 4 个月后雄鼠睾丸完全萎缩,5 个月后退精上皮萎缩,生精作用完全停止,丧失生育能力^[5],本实验发现在精巢的成熟过程中该基因表达量迅速升高,我们推测 *17 β -HSD4* 在精巢的成熟过程中也具有一定的作用,但具体作用机理及重要程度,我们还不能确定。目前贝类中关于 *17 β -HSDs* 的研究还很有限,并且激素的合成、灭活和运输以及生殖过程的进行是多基因共同调控的结果,所以 *17 β -HSD4* 在这些过程中的具体作用机制还需要更多的实验证据支持。

参考文献:

- [1] Kimoto T, Ishii H, Higo S, et al. Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in the male rat hippocampus

- [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(12): 5795 – 5806.
- [2] Leenders F, Dolez V, Begue A, *et al.* Structure of the gene for the human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV [J]. *Mammalian Genome*, 1998, 9(12): 1036 – 1041.
- [3] 赵刚. 15 型 17 β 羟化类固醇脱氢酶和 1 型 5 α -还原酶在乳腺癌和癌旁组织中的表达[D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [4] Huyghe S, Mannaerts G P, Baes M, *et al.* Peroxisomal multifunctional protein-2: The enzyme, the patients and the knockout mouse model [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-biomembranes*, 2006, 1761(9): 973 – 994.
- [5] Huyghe S, Schmalbruch H, Gendt K D, *et al.* Peroxisomal multifunctional protein 2 is essential for lipid homeostasis in Sertoli cells and male fertility in mice [J]. *Endocrinology*, 2006, 147 (5): 2228 – 2236.
- [6] Buoni S, Zannolli R, Waterham H, *et al.* D-bifunctional protein deficiency associated with drug resistant infantile spasms [J]. *Brain & Development*, 2007, 29(1): 51 – 54.
- [7] Rasiah K K, Gardiner-Garden M, Padilla E J, *et al.* HSD17B4 overexpression, an independent biomarker of poor patient outcome in prostate cancer [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 301 (1 – 2): 89 – 96.
- [8] Janer G, Porte C. Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates [J]. *Ecotoxicology*, 2007, 16 (1): 145 – 160.
- [9] Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard J C. Estradiol-17 β and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) during the reproductive cycle [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 145(2): 133 – 139.
- [10] Wang C, Croll R P. Estrogen binding sites in the sea scallop: characterization and possible involvement in reproductive regulation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(3): 303 – 313.
- [11] Zhou J, Gao Y F, Li L, *et al.* Identification and functional characterization of a putative 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 12 in abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011, 354(1 – 2): 123 – 133.
- [12] Zhai H N, Zhou J, Cai Z H. Cloning, characterization, and expression analysis of a putative 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 11 in abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 130(1 – 2): 57 – 63.
- [13] Zhang G F, Fang X D, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49 – 54.
- [14] 杨凤影, 张弼. 不同地理种群栉孔扇贝营养成分的比较分析 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37 (9): 4073 – 4075.
- [15] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 518 – 531.
- [16] 廖承义, 徐应馥, 王远隆. 栉孔扇贝的生殖周期 [J]. *水产学报*, 1983, 7(1): 1 – 13.
- [17] Lukacik P, Kavanagh K L, Oppermann U. Structure and function of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 248(1 – 2): 61 – 71.
- [18] Leenders F, Adamski J, Husen B, *et al.* Molecular cloning and amino acid sequence of the porcine 17 β -estradiol dehydrogenase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 222(1): 221 – 227.
- [19] Castro L F, Rocha M J, *et al.* The 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 4: Gender-specific and seasonal gene expression in the liver of brown trout (*Salmo trutta fario*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153(2): 157 – 164.
- [20] Corton J C, Bocos C, Moreno E S, *et al.* Peroxisome proliferators alter the expression of estrogen-metabolizing enzymes [J]. *Biochimie*, 1997, 79 (2 – 3): 151 – 162.

Cloning and expression analysis of *17 β -hsd4* gene in *Chlamys farreri*

WANG Dan, LI Hailong, BI Ying, LIU Jianguo, ZHANG Zhifeng*

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To study the role of *17 β -hsd4* in the reproductive process of invertebrates, this study got a partial expression sequence tag from the transcription group database of *Chlamys farreri*. Then a cDNA was cloned by using Rapid Amplification of cDNA End method, of which the full-length was 2 217 bp. It encoded a peptide of 740 amino acids which contained 4 conserved domains and 3 enzyme structural domains, and the amino acid sequence had identities of over 58% with the sequence of vertebrates. For example, *Homo sapiens*. Semi-quantative RT-PCR revealed the mRNA was detected widely in the testis, ovary, adductor muscle, mantle, gill, hepatopancreas and kidney, especially higher in hepatopancreas and kidney. qRT-PCR was adopted at different development stages of gonad in which the gene expressed. It showed different expression patterns between testis and ovary, and the gene expression in testis at growing stage and mature stage was obviously higher than the ovary at the same stages ($P < 0.05$). It could be concluded that *17 β -HSD4* could be synthesized in many tissues of *C. farreri*, and the gene might be more important in regulating the development and maturity of testis than ovary.

Key words: *Chlamys farreri*; *17 β -hsd4* gene; clone; sequence characterization; tissue expression

Corresponding author: ZHANG Zhifeng. E-mail: zzfp107@ouc.edu.cn