



中华鳖 *StAR* 基因的克隆、表达及多克隆抗体制备

刘倩, 马晓*, 岑双双, 田雪, 王璐明,
吴利敏, 刘慧芬, 李学军*

(河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

摘要: 为探索 *StAR* 基因在中华鳖性腺发育过程中的作用, 利用 RACE 技术克隆获得中华鳖 *StAR* 基因全长 cDNA, qRT-PCR 分析其在不同组织及胚胎不同发育时期的表达情况, 并制备多克隆抗体, 采用 Western blot 检测 *StAR* 在不同组织中的表达情况, 通过免疫组化进行定位, 同时检测来曲唑处理雄性中华鳖后 *StAR* 在精巢中的表达情况。结果显示, 该基因全长 2 377 bp, 开放阅读框 903 bp, 编码 300 个氨基酸。氨基酸序列比对及系统进化分析表明, 中华鳖 *StAR* 与龟类亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果表明, *StAR* 基因在精巢中表达量最高, 显著高于其他组织; *StAR* 基因于中华鳖胚胎发育 16 期已有表达, 早于性腺分化启动时期; 来曲唑处理的中华鳖精巢中, *StAR* 表达量先上调后回降。本研究利用原核表达系统构建中华鳖 *StAR* 基因原核重组表达载体, 经蛋白纯化后免疫小鼠, 获得中华鳖 *StAR* 多克隆抗体。Western blot 检测结果显示 *StAR* 在不同组织中的表达量与荧光定量结果一致。免疫组化结果显示, *StAR* 蛋白在卵巢间质细胞、精巢间质细胞, 精原细胞及胞质中表达。综上所述, *StAR* 基因可能是中华鳖性腺分化关键调控因子, 并在类固醇激素合成及精子发生过程中起到重要作用。

关键词: 中华鳖; *StAR* 基因; 克隆; 表达; 性腺; 多克隆抗体

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

类固醇激素是调控低等脊椎动物性别分化与发育的关键, 类固醇激素合成以胆固醇为前体, 经过一系列类固醇合成酶催化, 最终形成性类固醇激素和皮质激素。类固醇激素合成急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, *StAR*) 协助胆固醇由细胞质基质转运至线粒体内膜, 这一过程也是类固醇激素合成的重要限速步骤。*StAR* 首次由 Clark 等^[1]从小鼠睾丸间质细胞中纯化分离得到。研究表明, *StAR* 参与动物性别分化、繁殖、脂代谢等生理调节, 尤其在雄性生殖过程中起到重要作用^[2-3]。*StAR* 基因突变或功能缺失会导致哺乳动物肾上腺增生, 引

发生殖系统病变^[3-4]。水产动物中, 已从大西洋鳕 (*Gadus morhua*)^[5]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[6]、细须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*)^[7]、胡子鲇 (*Clarias gariepinus*)^[8] 等多种鱼类中获得 *StAR* 基因, 并发现该基因与性别发育及精子发生密切相关。*StAR* 突变会降低斑马鱼 (*Danio rerio*) 卵母细胞成熟诱导激素水平, 并抑制卵母细胞成熟^[9]。在尼罗罗非鱼中存在两种 *StAR* 基因, 其中 *StAR1* 在头肾的肾间细胞和精巢的间质细胞中表达, *StAR2* 主要表达于精巢的间质细胞和卵巢的间质细胞。*StAR1* 突变会导致精子发生延迟; *StAR2* 突变会导致卵巢中体细胞雄性化, 但不会

收稿日期: 2019-10-29 修回日期: 2020-04-20

资助项目: 国家自然科学基金 (31702316, 31902371); 河南省重点科技攻关项目 (182102110195)

通信作者: 马晓, E-mail: maxiao@htu.edu.cn; 李学军, E-mail: xjli@htu.edu.cn

引起性逆转^[10]。因此,研究 *StAR* 在性腺分化和发育中的作用有重要意义。

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 隶属于爬行纲 (Reptilia)、龟鳖目 (Testudinata), 又名甲鱼、团鱼, 是我国淡水养殖名贵水产品之一, 因具有较高的营养和药用价值而深受广大消费者喜爱。养殖过程中人们发现, 雄鳖较雌鳖生长速率快, 裙边更为宽厚, 因此培育全雄鳖逐渐成为中华鳖育种工作的重要目标。目前对中华鳖的研究主要集中在营养、疾病和养殖技术等方面^[11-13]。开展性别相关基因的研究, 对中华鳖单性育种工作十分必要。本研究从 *StAR* 基因入手, 克隆得到该基因 cDNA 全长, 制备多克隆抗体, 探究其在不同组织及性腺分化关键时期的表达规律, 同时检测经来曲唑处理的精巢中 *StAR* 基因表达量的变化情况, 为中华鳖性腺分化与发育研究及育种工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与样品采集

中华鳖及受精卵购自河南省晨源水产养殖专业合作社。受精卵置于 (32.0±0.5)℃ 下孵化, 孵化过程中根据中华鳖胚胎发育图谱^[14] 收集不同发育时期 (16~23 期) 的胚胎, 分离性腺用于 RNA 提取。用于来曲唑处理的成熟雄性中华鳖 (300~350 g), 饲养于河南师范大学水产学院养殖基地。解剖获取成鳖心脏、脑、肝脏、肠、脾

脏、胃、肌肉、性腺等组织, 立即投入液氮中冷冻, -80℃ 保存。

1.2 RNA 抽提与 cDNA 合成

Trizol 法提取组织总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶检测。经 Agilent 2100 Bioanalyzer 测定显示 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0, RNA 完整性良好。使用 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 获得相应的第一链 cDNA, 保存于 -20℃ 备用。

1.3 中华鳖 *StAR* 基因 cDNA 全长克隆

参考 Ensemble 数据库中华鳖基因组信息设计引物 *StAR*-R 与 *StAR*-F。以性腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10 μL, 反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 34 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经连接、转化后, 将阳性菌落送北京英俊公司测序。所得 cDNA 部分序列进行 Blast 同源性分析, 并设计 3' RACE 和 5' RACE 特异性引物 (表 1), 采用 TaKaRa SMARTer RACE 5'/3' Kit 试剂盒进行 3' 和 5' 末端扩增。

1.4 中华鳖 *StAR* 基因序列与系统进化分析

测序所得序列使用软件 DNAMAN 进行拼接, 得到中华鳖 *StAR* 基因 cDNA 全长序列, 利用 Open Reading Frame (ORF) Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析开放阅读框及编码氨基酸序列。使用 ClustalX 进行多重比对, 通过

表 1 实验所用引物与序列

Tab. 1 Primers and sequences in this experiment

引物名称 primer	序列(5'-3') primer sequence	引物类别 primer function
<i>StAR</i> -F	TTCAAGCTGTGCGCCGAATCTC	简并引物 degenerate primer
<i>StAR</i> -R	TTGGCTACCACAGCCACCCCAACT	
<i>StAR</i> -3'Race-out	CCGGGACTTCGTCAGCGTCCGCTGTT	3'RACE特异引物 specific primer for 3'RACE
<i>StAR</i> -3'Race-in	GGGCTGGCTGCCGAAGACGATAAT	
<i>StAR</i> -5'Race-out	TGCTGAGCAAGGTGCTCCCGACGT	5'RACE特异引物 specific primer for 5'RACE
<i>StAR</i> -5'Race-in	CAAACCTACCTTTGTGCGCCCTGG	
<i>StAR</i> -RT-F	CGAAGTGGAGATGACCTA	荧光定量引物 real-time quantitative primer
<i>StAR</i> -RT-R	CTCCACCAACTCCTGATA	
<i>StAR</i> -Hind III-R	CCCAAGCTTAGCAGTTGGGGTGGCTGTGGTAGC	蛋白表达引物 protein expression primer
<i>StAR</i> -BamH I-F	CGCGGATCCGTGGAGAGAATGGAGCAGATGGGA	
<i>GAPDH</i> -F	AGAACATCATTCAGCATCC	内参引物 internal primers
<i>GAPDH</i> -R	CTTCATCACCTTCTTAATGTCGTC	

MEGA 6.0 软件, 采用邻近法 (Neighbor-Joining) 构建系统进化树图。通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白质结构域分析, TMHMM (WWW: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析氨基酸疏水性/亲水性, 通过 SignalP 4.1 serves 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其信号肽结合位点, 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测 *StAR* 蛋白质三级结构。通过 ClustalX2 软件进行氨基酸序列同源性比对。通过 GSDS 2.0 (Gene Structure Display Server 2.0) 系统分析制作基因结构图 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)。

1.5 实时荧光定量 PCR

中华鳖各组织 RNA 使用 TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行反转录。设计特异性引物 *StAR*-RT-R 和 *StAR*-RT-F, 以 *GAPDH* 基因为内参。反应体系 10 μ L, 包含 $2 \times$ SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, 大连) 5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, RNase free H_2O 3 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}C$ 30 s; 95 $^{\circ}C$ 5 s, 60 $^{\circ}C$ 30 s, 共 40 个循环。每个处理设 3 个平行。

实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达水平, 以平均值 $\pm$ 标准误差表示 (mean $\pm$ SE, $n=3$)。统计分析采用 SPSS 22.0 软件, 差异显著水平检验采用单因素方差分析 (ANVOA), 显著性差异水平设为 $P<0.05$ 。

1.6 抗体制备

表达载体构建及 *StAR* 蛋白纯化 选择中华鳖 *StAR* 蛋白序列合适区域设计特异性引物并添加特定的酶切位点。目的片段 PCR 扩增后回收凝胶电泳产物, 并与表达载体 pET 32 α 同时用 *Bam*H I、*Hind* III 进行双酶切, 构建重组质粒, 导入 DH5 α 感受态细胞转化, 并提取质粒测序验证。将阳性重组质粒转化感受态细胞 BL21 (DE3), 挑选阳性表达菌株接种于 LB 培养基中扩大培养。当菌液 OD₆₀₀ 值达到 0.4~0.6 时, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 继续诱导 8~10 h。之后进行 SDS-PAGE 验证、菌体收集及蛋白纯化, 具体检测方法参考文献^[15]。

多克隆抗体制备及效价检测 纯化透析后的蛋白溶液与弗氏佐剂等比涡旋混匀, 采用

皮下多点注射的方法免疫小鼠。每 10 天加强免疫 1 次, 共 5 次。免疫结束后取血, 4 $^{\circ}C$ 过夜, 3 000 $\times g$ 离心 5 min, 上清液即为抗体血清。

以免疫前的小鼠血清作为阴性对照, 采用 ELISA 法检测血清中多克隆抗体效价。梯度稀释含有抗体的血清, 利用分光光度计检测 450 nm 条件下各样品的吸光度值。当处理组/阴性对照组的光吸收值比值 ≥ 2 时判定为阳性, 抗体效价即为 ELISA 反应阳性血清最大稀释度。

Western blot 检测 参考田雪等^[16], 用 Western blot 法检测 *StAR* 多克隆抗体的特异性、有效性及在不同组织中的表达情况。纯化后的重组蛋白 (或中华鳖不同组织的提取蛋白) 经 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 用 5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}C$ 封闭 1 h; TBST 缓冲液清洗后加入一抗 (检测多克隆抗体特异性及有效性时使用 1:5 000 倍稀释的购买鼠一抗, 检测不同组织 *StAR* 的表达情况时使用 1:100 倍稀释的自制鼠多抗), 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜; 再次清洗后加入同等稀释倍数的 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h; 利用化学发光凝胶成像仪 (AzureC400, 美国) 曝光显色。

1.7 芳香化酶抑制剂处理

向来曲唑中加入二甲基亚砜 (DMSO) 进行溶解, 使用橄榄油进行稀释, 稀释浓度分别为 5 和 10 mg/100 μ L, 通过腹腔注射法处理成熟雄性中华鳖 (分为对照组、5 mg/kg 处理组和 10 mg/kg 处理组, 每组 5 只)。共注射 8 次, 间隔时间 1 周。注射结束后取性腺提取 RNA, 反转录为 cDNA 后用于检测 *StAR* 基因的表达情况。

1.8 免疫组织化学

选取体态相近、健康的雌性与雄性中华鳖剖取精巢、卵巢, 组织固定后经无水酒精脱水、石蜡包埋并切片, 得到的切片进行免疫组化实验。脱蜡复水后的切片上滴加 3% 的 H_2O_2 -甲醇溶液避光孵育 10 min, 以去除内源性过氧化物酶; PBS 漂洗后在切片上滴加牛血清白蛋白封闭液 37 $^{\circ}C$ 孵育 20 min, 吸除多余液体后直接滴加鼠多抗 (自制, PBS 1:100 稀释), 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜; PBS 漂洗; 滴加羊抗鼠 IgG (Abcam, 英国, PBS 1:2 000 稀释), 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min; PBS 漂洗; 滴加显色剂 (DAB), 苏木精复染、流水反蓝; 脱水透明并封片, 静置干燥后观察拍照。

2.2 StAR 氨基酸序列分析及系统进化树构建

在 NCBI 数据库中查找并下载不同物种 StAR 氨基酸序列, 与克隆得到的中华鳖 StAR 氨基酸序列进行多重比较 (图 2), 采用邻近法 (NJ) 构建系统进化树, 利用 GSDS 2.0 软件 (Gene Structure Display Server 2.0) 构建基因结构图。结果显示,

中华鳖 StAR 与西部锦龟 (*C. picta bellii*)、墨西哥箱龟 (*T. mexicana triunguis*) 相似性最高, 其次为鸟类、爬行动物, 与鱼类亲缘关系最远 (图 3), 这与中华鳖的分类地位相一致。中华鳖 *StAR* 基因组由 7 个外显子及 6 个内含子组成, 与西部锦龟、墨西哥箱龟基因组结构相近。

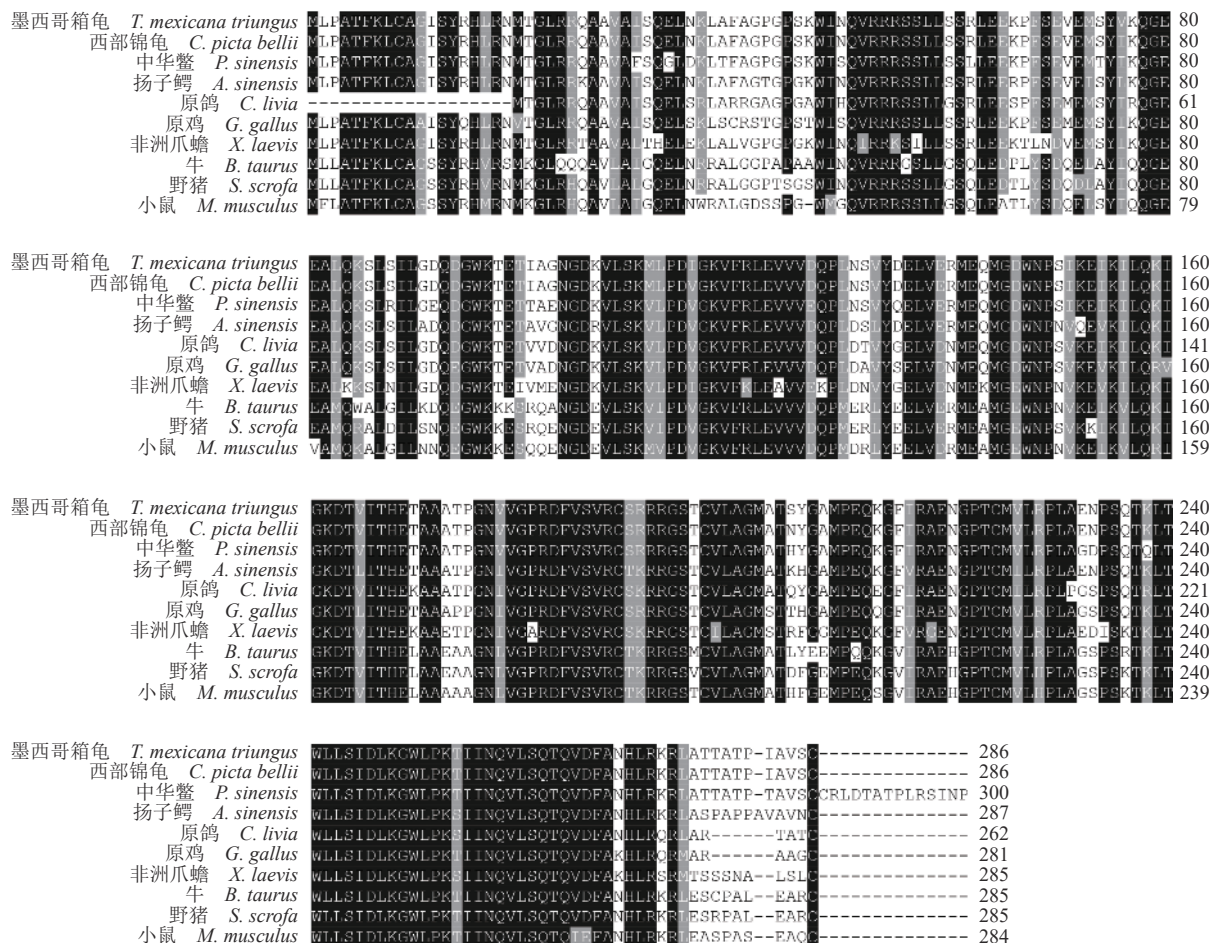


图 2 中华鳖 StAR 和其他物种 StAR 氨基酸序列多重比较

墨西哥箱龟 (XP_024070011.1); 西部锦龟 (XP_005286583.1); 中华鳖 (XP_006134101.1); 扬子鳄 (XP_006023063.1); 原鸽 (PKK17555.1); 原鸡 (NP_990017.1); 非洲爪蟾 (NP_001167502.1); 牛 (CAA76718.1); 野猪 (BAI48104.1); 小鼠 (AAK50433.2)

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequences of different StAR proteins

Terrapene triunguis(XP_024070011.1); *Chrysemys picta bellii*(XP_005286583.1); *P. sinensis*(XP_006134101.1); *Aligator sinensis*(XP_006023063.1); *Columba livia* (PKK17555.1); *Gallus gallus*(NP_990017.1); *Xenopus laevis* (NP_001167502.1); *Bos taurus* (CAA76718.1); *Sus scrofa* (BAI48104.1); *Mus musculus* (AAK50433.2)

2.3 重组表达质粒验证及融合蛋白表达分析

对筛选得到的阳性重组表达质粒进行单酶切 (*Bam*H I) 及双酶切 (*Bam*H I、*Hind* III) 处理, 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析, 结果与预期符合 (图 4-d), 测序验证后命名为 pET32 α -StAR。

阳性重组表达质粒 pET32 α -StAR 扩大培养、诱

导得到的蛋白经 SDS-PAGE 验证, 结果显示有分子量约 34 ku 的目的条带 (实际为 35.6 ku), 与预期相符, 阴性对照在这个位置没有特异性条带 (图 4-a)。

通过 Western blot 检测中华鳖 StAR 重组蛋白的特异性, 结果显示在 35 ku 附近有一条清晰

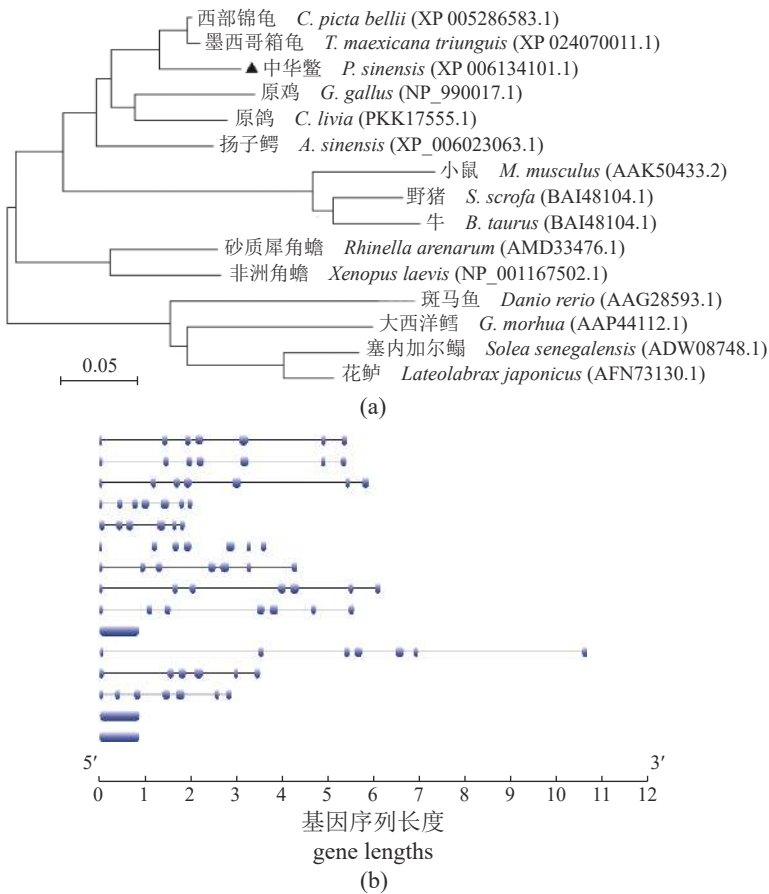


图 3 *StAR* 基因氨基酸序列的 NJ 系统进化树 (a) 及基因结构示意图 (b)

(b) 蓝色表示外显子，中间连线表示内含子

Fig. 3 NJ phylogenetic tree by amino acid sequence(a) and the exon-intron gene structure of *StAR* gene(b)

(b) blue boxes represent exons and lines adjacent to exons represent introns

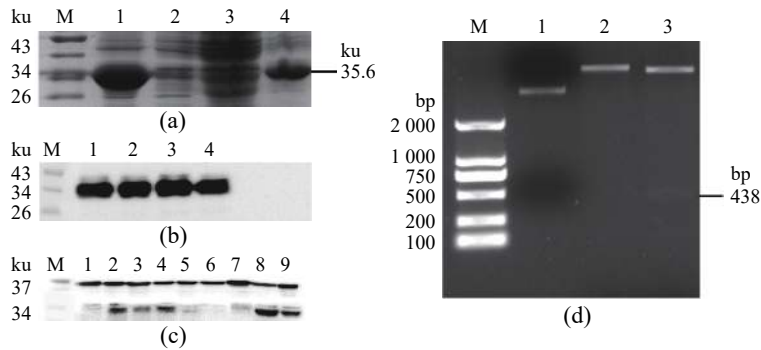


图 4 重组表达质粒构建及融合蛋白表达分析

(a) M.低质量蛋白 Marker; 1.诱导后的菌体总蛋白; 2.未诱导的菌体总蛋白; 3.未诱导的 pET-32α 菌体蛋白; 4.纯化后的蛋白，图 (b) 同; (b) 融合蛋白 Western blot 鉴定结果; (c) 不同组织 Western blot 检测结果，上层为内参，下层 1~9 依次为胃、脑、脾脏、心脏、肠、肌肉、肝脏、精巢、卵巢; (d) M. DL 2000 plus DNA ladder; 1.重组质粒; 2.重组质粒单酶切; 3.重组质粒双酶切

Fig. 4 Construction for *StAR*-expression vector and protein expression analysis of *StAR*

(a) M. protein Marker; 1. recombinant protein of *StAR*; 2. recombinant protein of *StAR*(without IPTG induced); 3. protein of pET-32α(without IPTG induced); 4. purified recombinant protein by affinity chromatography, the same as (b); (b) Western blot; (c) Western blot of different tissues, 1-9. stomach, brain, spleen, heart, intestine, muscle, liver, testis, ovary; (d) M. DL 2000 plus DNA ladder; 1. recombinant plasmid; 2. single enzyme digestion; 3. double enzyme digestion

条带(图 4-b)。通过 Western blot 检测 *StAR* 在中华鳖成鳖各组织中的表达情况, 结果显示其在精巢中表达量最高, 在卵巢和脑中的表达量较高, 在其他组织中的表达量较低(图 4-c)。

2.4 抗体血清效价检测

经 ELISA 检测, 制备的中华鳖 *StAR* 多克隆抗体的效价为 8.1×10^5 , 表明含有抗体的血清合格(表 2), 可进行后续实验。

2.5 中华鳖 *StAR* 基因的表达分析

通过 qRT-PCR 检测中华鳖胚胎不同发育时期的性腺 *StAR* 基因表达情况, 结果显示, 32 °C 孵化条件下 *StAR* 基因 16 期已有表达, 并随胚胎发育表达量逐渐增加, 20 期表达量最高, 之后表达量逐渐降低(图 5-a)。中华鳖 *StAR* 基因的成体组织表达结果表明, 精巢 *StAR* 基因表达量最高, 显著高于其他组织 ($P<0.05$), 其他组织表达量从高到低依次为心脏、卵巢、脾脏、脑、

胃、肝脏、肌肉、肠(图 5-b)。

通过 qRT-PCR 检测经来曲唑处理后中华鳖精巢在不同时间点 *StAR* 基因表达量的变化规律, 结果如图 6 所示, 在注射来曲唑的第 24 小时, 低浓度处理组 (5 mg/kg) 及高浓度处理组 (10 mg/kg) *StAR* 基因的表达量与对照组相比显著增加, 随着时间的推移, *StAR* 基因的表达量呈现先降低后增加的趋势。第 60 天低浓度处理组中华鳖精巢中 *StAR* 基因的表达量显著高于对照组, 而高浓度处理组的表达量与对照组差异不显著。

利用制备的鼠多克隆抗体为一抗, 通过免疫组化实验对中华鳖卵巢组织中 *StAR* 的蛋白表达进行定位。结果表明 *StAR* 在卵巢的间质细胞中阳性表达, 在精巢的间质细胞、精原细胞及胞质中表达(图版)。

3 讨论

本研究克隆得到中华鳖 *StAR* 基因 cDNA 全

表 2 ELISA 法测定多克隆抗体 *StAR* 效价
Tab. 2 Detection of *StAR* polyclonal antibody titer by ELISA method

项目 item	抗体血清稀释倍数 antibody serum dilution factor							
	1×10^2	1×10^3	1×10^4	3×10^4	9×10^4	2.7×10^4	8.1×10^5	2.4×10^6
处理组 treatment group	2.13	2.03	1.64	1.22	0.83	0.43	0.24	0.14
阴性对照组 control group	0.14	0.08	0.08	0.08	0.12	0.10	0.08	0.09
处理组/阴性对照组 treatment group/control group	15.21	25.38	20.50	15.25	6.92	4.30	3.00	1.56

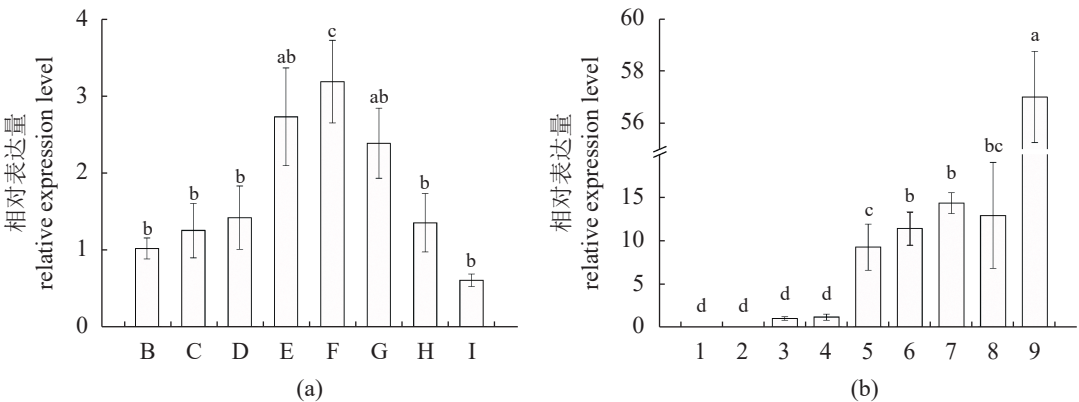


图 5 中华鳖 *StAR* 基因在不同组织及不同时期的表达量

(a) B~I 依次表示中华鳖胚胎发育时期 16~23 期 *StAR* 基因的表达量, 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同; (b) 1~9 依次表示不同组织中华鳖 *StAR* 基因的表达量; 1. 肠; 2. 肌肉; 3. 肝脏; 4. 胃; 5. 脑; 6. 脾脏; 7. 心脏; 8. 卵巢; 9. 精巢

Fig. 5 Distribution pattern of *StAR* in various tissues and different stages of development of *P. sinensis*

(a) B~I denotes the embryonic development period of *P. sinensis* (16-23 stages). Different lowercases represent the difference is significant ($P<0.05$), the same below; (b) 1. intestine; 2. muscle; 3. liver; 4. stomach; 5. brain; 6. spleen; 7. heart; 8. ovaries; 9. testis

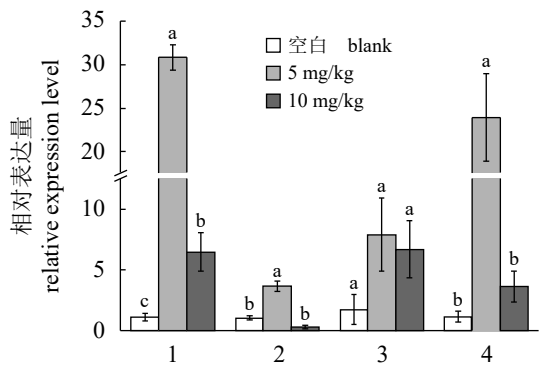


图 6 来曲唑处理中华鳖精巢中 *StAR* 基因的表达量
1. 注射后 24 h; 2. 注射后 48 h; 3. 注射后 96 h; 4. 注射后 60 d.
不同字母表示组内差异显著 ($P < 0.05$)

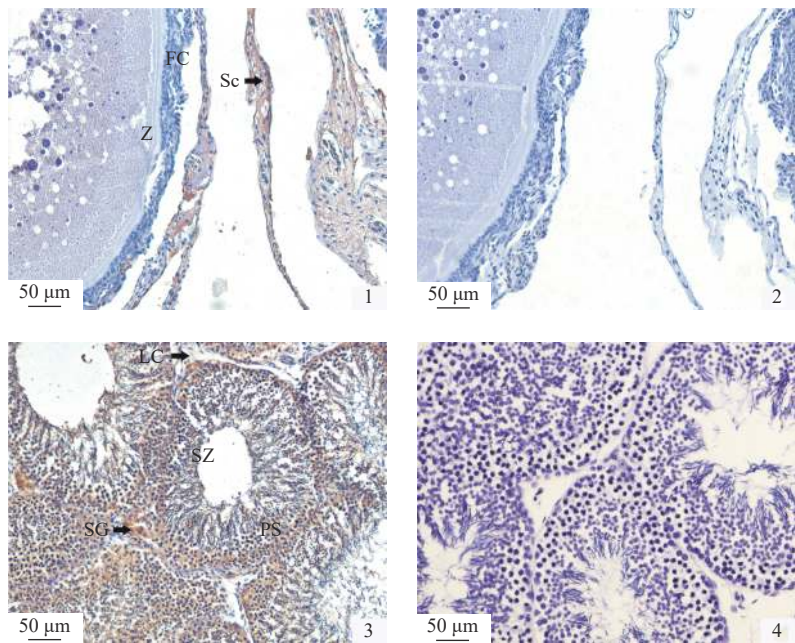
Fig. 6 Effects of letrozole on transcript abundance of *StAR* in *P. sinensis*
1. 24 h after injection; 2. 48 h after injection; 3. 96 h after injection; 4. 60 d after injection. Different letters represented the difference is significant ($P < 0.05$)

长序列，其中开放阅读框 903 bp，编码 300 个氨基酸。中华鳖 *StAR* 基因与龟类亲缘关系最近，相似性最高。*StAR* 蛋白中与脂质或胆固醇连接的部位称为 *StAR* 相关脂质转运结构域 (START)，

此结构域中的氨基酸片段具有防止蛋白酶水解的活性，中华鳖 *StAR* 基因编码蛋白同样存在 START 结构域^[10]。

性类固醇激素是动物性别分化与性腺发育的关键因素，动物体内的类固醇激素主要是在肾上腺与性腺中合成。半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)^[17] *StAR* 基因在精巢中表达量最高，显著高于其他组织。本研究中，中华鳖 *StAR* 基因也主要在精巢中表达，表明 *StAR* 可能参与类固醇激素合成，进而影响精巢发育。中华鳖 *StAR* 基因在胚胎性腺分化前 (第 16 期) 已有表达，在性腺发育和性别决定关键时期 (17~19 期) 表达量呈上升趋势。在尼罗罗非鱼中^[10]，*StAR1* 或 *StAR2* 缺失影响 XY 罗非鱼性腺发育早期阶段雄激素的合成，导致精巢发育缺陷和精子发生延迟；纯合敲除 XX 个体中的 *StAR2* 会导致卵巢体细胞出现雄性化现象，表明 *StAR2* 在卵巢分化早期有重要作用。本研究推测 *StAR* 基因可能参与中华鳖性腺早期发育过程。

作为合成雌激素的重要催化酶，芳香化酶将精巢中产生的雄激素转化为雌激素，这是雄



图版 中华鳖 *StAR* 在性腺中的免疫组化分析

1. *StAR* 在卵巢中的表达，箭头表示阳性信号，FC. 滤泡细胞，Z. 透明带，Sc. 间质细胞；2. 卵巢组织阴性对照；3. *StAR* 在精巢中的表达，箭头表示阳性信号，LC. 间质细胞，PS. 精母细胞，SG. 精原细胞，SZ. 精子；4. 精巢阴性对照

Plate Immunohistochemical results of *StAR* in gonad of *P. sinensis*

1. *StAR* in ovary, arrows show the positive signal, FC. follicular cells, Z. zone pellucida, Sc. stromal cells; 2. ovary negative control; 3. *StAR* in testis, arrows show the positive signal, LC. leydig cell, PS. spermatocyte, SG. spermatogonia, SZ. sperm; 4. testis negative control

性动物体内雌激素的主要来源方式。有研究表明, 芳香化酶活性降低会抑制早期精原细胞发育, 导致生精小管膨胀, 进而影响精巢功能^[18]。因此使用芳香化酶抑制剂处理实验动物, 可有效抑制芳香化酶活性, 从而降低精巢周围循环中的雌激素水平^[19]。来曲唑作为人工合成的芳香化酶抑制剂被广泛应用于性别分化相关研究。本研究中, 通过荧光定量 PCR 分析发现, 经来曲唑处理 24 h 后的精巢中, *StAR* 基因的表达量显著增加, 这可能是由于来曲唑阻碍芳香化酶合成, 导致雄激素无法向雌激素方向转化, 为满足机体对雌激素的需求, 自身发出信号调节类固醇激素合成相关基因 *StAR* 的表达, 从而增加雌激素合成。本实验室前期采用来曲唑对精巢发育成熟的中华鳖进行处理发现, 随着来曲唑处理组浓度增加, 精巢中精母细胞及精子数量显著降低。陈钊^[20]发现内源性雌激素减少导致幼年香猪睾丸组织的生精小管萎缩、生殖细胞减少、精子细胞形态变异, 认为是来曲唑抑制睾丸生殖细胞增殖引起的。本实验中来曲唑注射 24 h 后, 10 mg/kg 处理组 *StAR* 基因的表达量低于 5 mg/kg 处理组, 可能是由于较高浓度的来曲唑短期内抑制精巢中生殖细胞增殖, 从而导致在精巢中 *StAR* 表达量降低。经来曲唑处理 48 h 的中华鳖精巢中, 由于来曲唑对精巢的持续作用, *StAR* 表达量降低。随着时间推移, *StAR* 表达量有所回升, 而来曲唑处理 60 d 的精巢中, 高浓度处理组 *StAR* 表达量减少, 可能是由于高浓度来曲唑持续处理对中华鳖精巢造成较大损害, 导致类固醇激素合成受损, *StAR* 表达受到影响。推测 *StAR* 可能在维持精巢形态与功能方面发挥一定作用。

本研究通过免疫组化实验检测到 StAR 蛋白在中华鳖卵巢间质细胞, 精巢的间质细胞、精原细胞及胞质中阳性表达。有研究表明卵巢间质细胞为卵巢及卵泡的发育提供营养, 是卵巢主要组成部分^[21]。卵巢间质细胞可分泌雄激素, 同时也为滤泡细胞类固醇激素的合成提供支持, 在卵泡发育过程中起到关键作用^[22]。StAR 在卵巢间质中表达, 表明其可能参与雄激素合成和卵泡发育过程。StAR 在中华鳖精原细胞、间质细胞及胞质中表达, 推测中华鳖 StAR 可能在精子发生过程中发挥重要作用。综上所述, 本研

究克隆得到中华鳖 *StAR* 基因 cDNA 序列全长, 对其表达进行分析, 并制备多克隆抗体, 为进一步探索其作用机制及功能奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] Clark B J, Stocco D M. Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells[J]. *Endocrine Research*, 1995, 21(1-2): 243-257.
- [2] 王鲜忠, 孙燕, 吴建云, 等. StAR 蛋白在仔猪睾丸组织中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(6): 624-627. Wang X Z, Sun Y, Wu J Y, *et al.* Expression of StAR protein in the early piglet testes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(6): 624-627(in Chinese).
- [3] Hasegawa T, Zhao L P, Caron K M, *et al.* Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice[J]. *Molecular Endocrinology*, 2000, 14(9): 1462-1471.
- [4] Lin D, Sugawara T, Strauss III J F, *et al.* Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis[J]. *Science*, 1995, 267(5205): 1828-1831.
- [5] Goetz F W, Norberg B, McCauley L A R, *et al.* Characterization of the cod (*Gadus morhua*) steroidogenic acute regulatory protein (StAR) sheds light on StAR gene structure in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 137(3): 351-362.
- [6] Yu X G, Wu L M, Xie L, *et al.* Characterization of two paralogous *StAR* genes in a teleost, Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 392(1-2): 152-162.
- [7] Nunez B S, Evans A N. Hormonal regulation of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in gonadal tissues of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(3): 495-504.
- [8] Sreenivasulu G, Sridevi P, Sahoo P K, *et al.* Cloning and expression of *StAR* during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Bio-*

- logy, 2009, 154(1): 6-11.
- [9] Shang G H, Peng X Y, Ji C, *et al.* Steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone are required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation in zebrafish[J]. *Biology of Reproduction*, 2019, 101(4): 760-770.
- [10] 蔡静. StAR 在尼罗罗非鱼性腺分化和配子发生过程中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2018.
- Cai J. Functional studies of StAR during gonadal differentiation and gametogenesis in Nile tilapia[D]. Chongqing: Southwest University, 2018 (in Chinese).
- [11] 覃川杰, 汪成竹, 陈晓辉, 等. 茯苓多糖对中华鳖非特异性免疫功能的免疫调节作用[J]. *淡水渔业*, 2006, 36(6): 39-43.
- Qin C J, Wang C Z, Chen X H, *et al.* Immunoregulation of fuling polysaccharide on non-specific immune function in soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*) by oral administration[J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(6): 39-43(in Chinese).
- [12] 吴凡, 陆星, 文华, 等. 饲料蛋白质和脂肪水平对中华鳖生长性能、肌肉质指标及肝脏相关基因表达的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(1): 47-54.
- Wu F, Lu X, Wen H, *et al.* Effects of different protein and lipid levels on the growth performance, muscle textural parameters, and genes expression in liver of *Pelodiscus sinensis*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(1): 47-54(in Chinese).
- [13] 申慧, 张英萍, 王利华, 等. 中华鳖 *GnRH 1* 基因 cDNA 克隆及表达特征[J]. *淡水渔业*, 2019, 49(4): 16-21.
- Shen H, Zhang Y P, Wang L H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the *GnRH 1* cDNA in *Pelodiscus sinensis*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(4): 16-21(in Chinese).
- [14] Tokita M, Kuratani S. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae)[J]. *Zoological Science*, 2001, 18(5): 705-715.
- [15] 王俊丽, 陈金顶, 卢荣华, 等. 淇河鲫 IL-8 原核表达系统的构建及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 970-976.
- Wang J L, Chen J D, Lu R H, *et al.* Construction of prokaryotic expression system for *IL-8* of *Carassius auratus* var. *qihe* and preparation of polyclonal antibody[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 970-976(in Chinese).
- [16] 田雪, 王良炎, 陈琳, 等. *SOST* 基因在淇河鲫肌间骨骨化过程中的表达研究[J]. *水产学报*, 2016, 40(5): 673-680.
- Tian X, Wang L Y, Chen L, *et al.* The mRNA and protein expression of gene *SOST* during ossification process of intermuscular bone in crucian carp (*Carassius auratus*) in Qihe River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 673-680(in Chinese).
- [17] 朱颖, 孟亮, 胡乔木, 等. 半滑舌鳎 *StAR* 基因克隆及其在不同组织的时空表达分析[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1221-1229.
- Zhu Y, Meng L, Hu Q M, *et al.* Molecular cloning and temporal expression analysis of *StAR* gene in different tissues of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1221-1229(in Chinese).
- [18] At - Taras E E, Berger T, McCarthy M J, *et al.* Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production[J]. *Journal of Andrology*, 2006, 27(4): 552-559.
- [19] 邢丽, 马迎. 芳香化酶抑制剂来曲唑的研究进展[J]. *天津药学*, 2010, 22(6): 48-51.
- Xing L, Ma Y. The development of aromatase inhibitor letrozole[J]. *Tianjin Pharmacy*, 2010, 22(6): 48-51(in Chinese).
- [20] 陈钊. 来曲唑对贵州香猪睾丸细胞作用的研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- Chen Z. Study on the effect of letrozole in Guizhou Xiang Pig testis cells[D]. Guiyang: Guizhou University, 2017 (in Chinese).
- [21] Bukovsky A, Ayala M E, Dominguez R, *et al.* Changes of ovarian interstitial cell hormone receptors and behavior of resident mesenchymal cells in developing and adult rats with steroid-induced sterility[J]. *Steroids*, 2002, 67(3-4): 277-289.
- [22] Wang H, Andoh K, Hagiwara H, *et al.* Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4930-4936.

Molecular cloning, expression analysis and polyclonal antibody preparation of *StAR* gene in Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)

LIU Qian, MA Xiao*, CEN Shuangshuang, TIAN Xue, WANG Luming,
WU Limin, LIU Huifen, LI Xuejun*

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxing 453007, China)

Abstract: To gain a better understanding of the role in gonadal development of StAR in *Pelodiscus sinensis*, we cloned *StAR* cDNA full length of 2 377 bp, containing an open reading frame (ORF) for 300 amino acid residues. The predicted StAR of *P. sinensis* was maximally identical with turtle StAR protein. qRT-PCR result revealed that *StAR* mRNA was checked in seven different tissues of the turtle, among which the maximum level was detected in testis. The *StAR* mRNA had been expressed at embryonic 16th stage. In the study, the male turtle was treated by letrozole, and the results showed that the level of *StAR* mRNA expression increased rapidly compared to the control firstly, and then the expression levels decreased. The recombinant plasmid was constructed and the StAR polyclonal antibody was obtained by immunizing mice. Western blot analysis showed that the expression of StAR in different tissues was consistent with qRT-PCR result. Immunohistochemical results showed that StAR protein was expressed in ovarian stromal cells. Therefore, the *StAR* gene might play an important role in gonadal differentiation, steroid hormone synthesis and spermatogenesis in *P. sinensis*.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; *StAR* gene; cloning; expression; gonad; polyclonal antibody

Corresponding authors: MA Xiao. E-mail: maxiao@htu.edu.cn;

LI Xuejun. E-mail: xjli@htu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31702316, 31902371); Henan Science and Technology Development Key Program (182102110195)