



日本沼虾 *StAR* 基因克隆及其低氧胁迫下表达分析

郑 诚¹, 薛 程¹, 赵倩倩¹, 孙盛明^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为了研究类固醇激素合成急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, *StAR*) 在日本沼虾应答低氧胁迫过程中所发挥的作用, 实验应用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) PCR 技术克隆了日本沼虾 *StAR* 全长 cDNA 序列, 并利用在线软件对其序列特征进行生物信息学分析, 采用半定量 RT-PCR 方法分析 *StAR* 在日本沼虾不同组织的分布情况, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 与免疫印迹 (Western blot) 技术对其在不同低氧胁迫阶段中的表达规律进行检测, 观察低氧胁迫下精巢组织中 *StAR* 蛋白免疫组化定位。结果显示, 日本沼虾 *StAR* 其 cDNA 全长 3 361 bp (NCBI 登录号: MW263908), 包括 5'-UTR 323 bp, 3'-UTR 2 129 bp, 开放阅读框 909 bp, 编码 302 个氨基酸。氨基酸序列比对及系统进化分析结果显示, 日本沼虾 *StAR* 基因与三疣梭子蟹等甲壳动物 *StAR* 聚类一支, 具有最近的亲缘关系。半定量 RT-PCR 检测结果显示, *StAR* 在日本沼虾不同组织中均有表达, 其表达量在胰腺和心脏组织中最低, 在精巢组织中表达处于较高水平。使用 qRT-PCR 技术检测日本沼虾精巢中 *StAR* 在低氧胁迫下时空表达情况, 结果表明, 与对照组相比, 低氧处理组精巢中 *StAR* 基因表达量在 1~48 h 均显著上调, 而在低氧处理组 96 h 显著降低。此外, 本实验对 *StAR* 进行了原核表达及抗血清制备, 采用 Western blot 检测 *StAR* 蛋白表达丰度基本与基因表达模式相似, 免疫组化结果显示, *StAR* 蛋白在精细胞与间质细胞中均有表达。综上所述, 长期低氧胁迫显著降低了 *StAR* 基因的转录表达水平, 并且该基因可能在类固醇合成路径及精子发生过程中均发挥重要作用。本研究结果为进一步解析日本沼虾类固醇激素合成分子机制奠定基础。

关键词: 日本沼虾; *StAR*; 克隆; 低氧; 表达分析

中图分类号: Q 786; S 917

文献标志码: A

类固醇激素能够在动物的性别分化发育中起到关键作用, 其合成以胆固醇为前体, 通过一系列类固醇合成酶进行催化, 最后形成性类固醇激素和皮质醇素^[1]。*StAR* 编码的类固醇急性调节蛋白是一种在线粒体膜上的转运蛋白, 首次由 Clark 等^[2]从小鼠 (*Mus musculus*) 辜丸间质细胞中纯化分

离得到, 其主要功能是完成胆固醇从线粒体外膜向线粒体内膜的转运过程, 这不仅是类固醇激素合成的起始阶段, 也是类固醇激素合成过程中关键的调控步骤^[3]。迄今为止, *StAR* 已经在多种鱼类研究中相继报道, 如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[4]、波纹绒须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*)^[5]

收稿日期: 2022-03-03 修回日期: 2022-05-16

资助项目: 国家重点研发计划 (2023YFE0205100); 国家自然科学基金 (31672633); 宁夏回族自治区重点研发计划 (2022ZDYF0569); 上海市科技创新行动计划 (23XD1421600, 22015820700)

第一作者: 郑诚 (照片), 从事甲壳动物逆境生理学研究, E-mail: 15058448365@163.com

通信作者: 孙盛明, 从事甲壳动物逆境生理学研究, E-mail: sunshengming621416@163.com



和塞内加尔鳎 (*Solea senegalensis*)^[6]。已有研究表明, *StAR* 在青鳉 (*Oryzias latipes*) 幼鱼孵化后才有表达, 要远远落后于其他类固醇合成酶基因的表达^[7], 而尖齿胡鲇 (*Clarias gariepinus*) *StAR* 在性别分化时期中也极其微量的表达^[8]。针对上述问题有学者发现, 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) *StAR* 具有 2 种亚型 *StAR1* 和 *StAR2*, 并观察到 *StAR2* 可能是由 *StAR1* 重复产生的旁系同源基因, *StAR2* 负责在雌性决定/分化早期尼罗罗非鱼的性腺中产生雌激素 (即雌二醇), 并在性腺组织转录组分析中表明 *StAR2* 可能是雌二醇 (estradiol, E2) 产生以诱导卵巢分化的必要因素, 而两者都参与了雄激素 11-酮基睾酮 (11-keto testosterone, 11-KT) 的产生以促进睾丸分化和维持^[9]。

目前在水生动物类固醇激素研究中主要聚焦在鱼类, 而经济甲壳动物的类固醇激素合成路径及其机制研究却鲜有问津, 甲壳动物是否与鱼类存在相似的类固醇合成途径及其关键节点蛋白, 这是值得深入探讨的问题, 为此本实验以日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 为研究对象, 探讨日本沼虾 *StAR* 在类固醇激素合成中的具体功能。日本沼虾俗称青虾、河虾, 隶属于十足目 (Decapoda) 长臂虾科 (Palaemonidae) 沼虾属 (*Macrobrachium*), 是我国重要淡水养殖经济虾类之一。近年来, 相关课题组在日本沼虾人工养殖技术和群体遗传多样性方面的研究均取得了一定进展^[10-13], 然而日本沼虾对养殖水体溶解氧含量要求较高, 日本沼虾不耐低氧的生物学特性已经成为高密度集约化养殖的限制因素^[14-15]。低氧 (hypoxia) 是指水环境中溶解氧 (DO) 浓度低于 2.8 mg/L 的现象^[16], 其对水生动物生长、存活和繁殖的影响已有大量报道^[17-19]。已有研究表明, 低氧也会干扰鱼类内分泌系统, 会通过减少类固醇生成相关基因表达量, 从而抑制类固醇激素合成和性腺发育^[20-21], 那么低氧是否针对甲壳动物也发挥内分泌干扰物的作用, 从而影响日本沼虾 *StAR* 基因表达与定位, 这值得我们深入研究。

本实验通过对日本沼虾 *StAR* 基因的克隆、序列特征与原核表达分析, 探讨低氧下日本沼虾 *StAR* 基因表达模式, 并采用 Western blot 与免疫组化技术验证了低氧胁迫下日本沼虾 *StAR* 蛋白在精巢组织中的表达与定位, 研究结果为探究低氧下日本沼虾类固醇激素合成途径及其机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验方法及样品采集

性腺成熟的日本沼虾购于上海海洋大学附近的东海农场, 暂养于上海海洋大学水产与生命学院 E 楼循环水养殖玻璃缸 (100 cm×50 cm×60 cm) 中, 实验室暂养 7 d [水温 (25±2) °C, pH (7.72±0.20), 溶解氧充足, 每天早晚定时喂食商品饲料] 后, 用于急性低氧胁迫实验。对照组和实验组 [对照组溶解氧, (6.6±0.2) mg/L; 实验组溶解氧设置浓度参照已有文献报道^[17,22], (2.0±0.2) mg/L] 分别设置 3 个玻璃缸, 每个玻璃缸放 20 尾健康活泼的雄性日本沼虾 [(3.5±0.4) g]。对实验组养殖缸充氮气使得水体溶解氧浓度调节至 2.0 mg/L, 后续每隔 2~3 h 采用便携式溶氧仪 (YSI 公司 ProODO/T Cable Assy, 美国) 定期监测溶解氧含量, 具体方法参照 Sun 等^[23]。低氧胁迫实验均在胁迫阶段 1、3、6、12、24、48、96 h 分别采集精巢组织, 每个时间点在对对照组和低氧处理组分别取 6 尾虾的精巢组织, 同时解剖健康日本沼虾获取脑、鳃、肝胰、心脏、肌肉、肠道及精巢等组织, 立刻放入液氮中, 转入 -80 °C 冰箱中保存。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成

使用 TRIzol 法提取 RNA, 使用 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, 美国) 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值, 比值控制在 1.8~2.0, 之后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各组织总 RNA 的完整性。后续用反转录试剂盒 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus) 将所提 RNA 反转录成 cDNA, 保存于 -40 °C 冰柜中备用, 用于随后 *StAR* 不同组织和不同低氧阶段的表达分析。

1.3 日本沼虾 *StAR* 基因 cDNA 全长克隆

根据本实验室已构建的日本沼虾精巢 cDNA 文库, 通过组装拼接和比对分析, 获得一个类固醇急性调节蛋白 *StAR* 序列片段。以性腺 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 cDNA 序列片段后, 应用 Primer premier 5.0 软件分别设计 5' RACE 和 3' RACE 的特异性扩增引物 (表 1), 以日本沼虾精巢 cDNA 为模板, 结合套式聚合酶链反应扩增出 *StAR* 基因的 5'端和 3'端。聚合酶链反应体系为 50 μL, 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 次循环; 72 °C 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 经连接、转化后, 将阳性菌落送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 primers	序列(5'-3') primer sequences	引物类别 primer function
<i>StAR</i> -3'RACE-out	TGAGGAATCTTGGTTATCGTCTGG	3'RACE特异引物 specific primer for 3'RACE
<i>StAR</i> -3'RACE-in	TGATGATTCTCGACATACAAGGGC	
<i>StAR</i> -5' RACE-out	GTGGTCGCCTATGACCTC	5'RACE特异引物 specific primer for 5'RACE
<i>StAR</i> -5' RACE-in	GTGGTCGCCTATGACCTC	
<i>StAR</i> -RT-F	TGGAGGTTCTAAGAGCACAGTTCCT	荧光定量引物 real-time quantitative primer
<i>StAR</i> -RT-R	AAGTGGGTCAAGTGGTCGCCTAT	
β -actin-F	TATGCACTTCTCATGCCAT	内参引物 internal primers
β -actin-R	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	

1.4 日本沼虾 *StAR* 基因序列与进化分析

利用 cDNA 末端快速扩增技术克隆获得 *StAR* 基因 cDNA 全序列, 运用生物信息学手段通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行序列开放阅读框 (ORF) 分析、使用 DNAMAN 软件进行氨基酸同源序列比对, 通过 MEGA5.0 软件采用邻近法 (Neighbor-Joining) 构建系统法构建进化树、通过 SMART(<https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析, 利用 EXPASY Proteomics Server(<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸序列参数, 分别通过 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 NovoPro(<https://novopro.cn/tools/signal>) 进行蛋白跨膜区和信号肽预测等分析。

1.5 日本沼虾 *StAR* 基因的组织表达分析

本研究采用了半定量 RT-PCR 方法检测了 *StAR* 在脑 (BR)、鳃 (GI)、肝胰腺 (HP)、心脏 (HE)、肌肉 (MU)、肠道 (IE) 及精巢 (TE) 中的表达分布。设计 *StAR* 的特异性引物 *StAR*-RT-F 和 *StAR*-RT-R, 以 β -actin 为内参, 进行 PCR 反应, 反应体系 20 μ L, 包含 TaKaRa 的 Premix EX Taq (Ex TaqTM version 2.0 plus dye) 10 μ L, 各组织 cDNA 模板 (0.1~1.0 μ g/ μ L) 1 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, RNase free H₂O 9.2 μ L。反应程序为 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 将所扩增的 PCR 产物进行 1% 核酸凝胶电泳得出结果。

1.6 qRT-PCR

qRT-PCR 使用 YEASEN 的染料法荧光定量试剂盒, 设计 *StAR* 的特异性引物 *StAR*-RT-F 和 *StAR*-RT-R, 内参为 β -actin, 反应体系 20 μ L, 包

含 Hieff UNICON[®] Power qPCR SYBR Green Master Mix 10 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 9.2 μ L (RNase free H₂O 稀释), 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。每个处理设置 3 个技术重复平行样, 并且进行 3 次生物重复。熔解曲线由 BIO-RAD iQ5 的实时分析软件分析, 荧光定量实验数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析并计算相对表达水平, 以平均值 \pm 标准误表示 (mean \pm SE, $n=3$)。作图采用 Graphpad prism 软件, 方差分析和多重比较采用 SPSS 19.0 软件和 t 检验法, 显著性差异水平设为 $P < 0.05$ 。

1.7 多克隆抗体制备

质粒构建及 *StAR* 蛋白纯化 选择日本沼虾 *StAR* 序列合适区域设计特异性引物并通过 PCR 扩增出足够量的 PCR 产物, 目的片段 PCR 扩增后回收凝胶电泳产物, 并与表达载体 pET-28a 同时用 *Nde* I、*Xho* I 进行双酶切, 构建重组质粒连接液转入 TOP10 感受态中, 检测筛选出阳性克隆进行测序验证, 获得重组质粒。将重组质粒转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞, 热激后涂布在含有对应抗生素的平板上进行培养, 挑取单克隆到含有抗生素的液体培养基中培养, 并当 OD 值达到 0.6 时, 加入 IPTG 诱导剂诱导 4 h 后取出菌液, 超声波破碎, 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液和沉淀, 进行后续的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证及蛋白纯化。

多克隆抗体制备及抗体效价检测 初免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏完全佐剂混匀乳化, 二免、三免、四免抗原为蛋白抗原与等体积弗氏不完全佐剂混匀乳化。一免二免间隔 20 d, 之后都间隔 14 d, 总共 4 次, 免疫结束后进行采血离心获得抗体血清, 使用 ELISA 法检测抗血清效价,

以免疫前的兔血清作为阴性对照, 梯度稀释含有抗体的血清, 利用酶标仪 (Multiskan FC, Thermo Scientific, 美国) 检测 450 nm 条件下各样品的 OD 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。

1.8 Western blot 分析

采用 Western blot 方法分析低氧下日本沼虾精巢中 StAR 表达模式^[9], 根据本实验 StAR 蛋白分子量配置 10% 的分离胶及 5% 的浓缩胶, 将已定量蛋白上样 (20 μg /孔) 并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜采用 NC 膜湿转法。使用 3% BSA-TBST 稀释一抗 [实验组为本实验室制备的 StAR 抗体; 对照组是 β -Actin 抗体 [β -Actin (13E5) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, 美国)], 使用 5% 脱脂奶粉-TBST 稀释 HRP 山羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司), 利用化学发光凝胶成像仪 (Tanon 5200 Multi, 中国) 进行拍照观察。

1.9 免疫组织化学

在低氧胁迫实验中 1、3、6、12、24、48 h 分别选取 2 尾雄性日本沼虾, 解剖取出精巢组织, 4% 多聚甲醛固定组织后用无水乙醇脱水, 石蜡包埋后切片, 对切片做免疫组化实验。首先对切片进行脱蜡复水操作, 然后放到 EDTA 抗原修复液中 100 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 并自然冷却至室温, 用 PBST 洗去修复液。之后加 3% 的 H_2O_2 -甲醇溶液室温下孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶的活性; 用 3%~5% 的 BSA 溶液封闭 30 min, 去除封闭液后使用自制 StAR 抗体 [1 : 100 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 稀释] 进行孵育, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 用 PBS 漂洗 3 遍, 每次 5 min; 加反应增强液 PV-9000 (ZSGB-BIO, 中国), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; 洗去并滴加 HRP 山羊抗兔 IgG (1 : 1 000 PBS 溶液稀释, 体积比), 室温孵育 2 h; 洗二抗用 PBS 漂洗 3 遍, 每次 5 min; 加显色剂 DAB 10~30 s; 之后充分水洗, 染苏木素、水洗、乙醇分化、脱水透明并封片, 静置后荧光显微镜 (ECLIOSE Ci-L, Nikon) 下拍照观察。

2 结果

2.1 日本沼虾 StAR 基因 cDNA 序列特征

通过 RACE-PCR 技术对日本沼虾 StAR 基因 cDNA 序列进行拼接后, 获得全长为 3 361 bp 的

序列 (图 1), 其中 5'-UTR 323 bp, 3'-UTR 2 129 bp, 开放阅读框 909 bp, 编码 302 个氨基酸, 编码蛋白质分子量为 35.29 ku, 理论等电点为 6.03, 通过 NovoPro 网站对日本沼虾的 StAR 氨基酸序列进行预测, 发现其信号肽不存在。日本沼虾 StAR 基因 cDNA 序列已经提交到 GenBank, 登录号为 MW263908。

2.2 StAR 氨基酸序列比对及进化分析

通过 NCBI 数据库中查找并下载不同物种 StAR 氨基酸序列, 与克隆得到的日本沼虾 StAR 序列使用 DNAMAN 软件进行氨基酸同源序列比对 (图 2), 通过 MEGA5.0 软件采用邻近法 (Neighbor-Joining) 构建系统法构建进化树。结果显示, 日本沼虾 StAR 与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 相似性最高, 并与鱼类、两栖类、哺乳类形成了不同分支, 亲缘关系较远 (图 3), 这与日本沼虾的分类地位相一致。

2.3 重组质粒酶切验证及融合蛋白表达检测

根据引物设计的酶切位点对筛选得到的阳性重组表达质粒进行酶切处理, 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果与预期条带符合 (图 4-a), 验证后命名为 pET28a-StAR。将重组质粒培养诱导, 收集菌体制样准备 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 出现分子量约 34 ku 的目的条带, 且与预期分子量大小一致 (图 4-b)。融合蛋白经过纯化, SDS-PAGE 电泳检测理论分子量相接近位置出现明显条带, 可初步确定融合蛋白成功得到了纯化 (图 4-c)。

2.4 抗体血清效价检测

通过 ELISA 法检测, 抗体效价值 $\geq 2.5 \times$ 阴性值, 制备的日本沼虾 StAR 多克隆抗体的效价为 $\geq 5.12 \times 10^5$ (表 2), 可以进行后续的 Western blot 和免疫组化实验。

2.5 日本沼虾 StAR 基因表达分析

不同组织中表达分析 本研究采用了半定量 RT-PCR 方法检测在脑、鳃、肝胰腺、心脏、肌肉、肠道、精巢中的表达分布, 结果显示, 日本沼虾 StAR 在肝胰腺和心脏中表达较低外, 其他组织表达均为较高水平, 这表明 StAR 在日本沼虾组织中分布广泛 (图 5)。

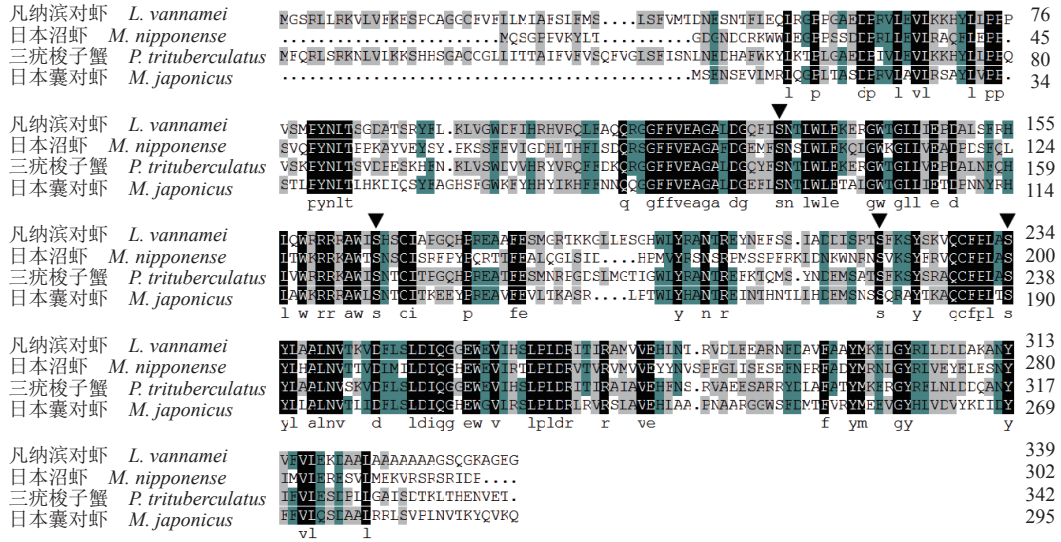


图2 日本沼虾 StAR 和其他物种 StAR 氨基酸同源序列比对

日本沼虾 (MW263908), 三疣梭子蟹 (MPC99197.1), 凡纳滨对虾 (XP_027230069.1), 日本囊对虾 (XP_042893986.1); 三角标注的为保守的磷酸化位点。

Fig. 2 Alignment results of StAR amino acid sequences of *M. nipponense* and other seven species

M. nipponense (MW263908), *P. trituberculatus* (MPC99197.1), *L. vannamei* (XP_027230069.1), *M. japonicus* (XP_042893986.1); conserved phosphorylation sites are marked with triangles.

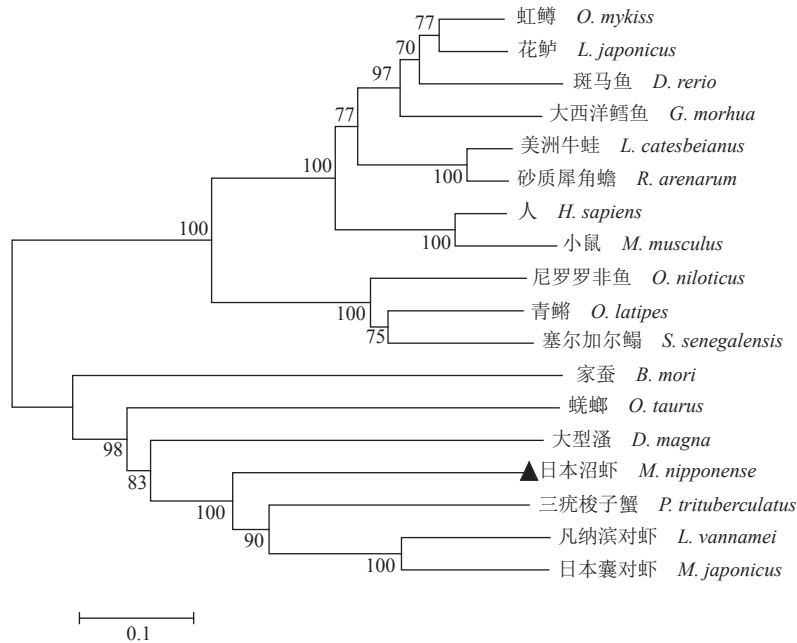


图3 日本沼虾 StAR 与其他物种 StAR 的系统进化树

所涉及物种及 GenBank 登录号: 日本沼虾 MW263908, 虹鳟 NP001117674, 斑马鱼 NP571738, 大西洋鲑 AAP44112, 鸡 AAK50433.2, 美洲牛蛙 ACJ53927, 砂质犀角蟾 AMD33476, 人 NP000340, 大型蚤 XP_032788316.1, 花鲈 AFN73130.1, 三疣梭子蟹 MPC99197.1, 尼罗罗非鱼 StAR2 XP003445653, 青鳉 StAR2 ENSORLP00000011263, 塞尔加尔鳎 StAR2 EU921450, 凡纳滨对虾 XP_027230069.1, 日本囊对虾 XP_042893986.1, 家蚕 AAL51081.1, 蛭螂 XP_022906085.1。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the sequence of *M. nipponense* StAR and StAR from other species

the species involved and the GenBank accession number: *M. nipponense* MW263908, *O. mykiss* NP001117674, *Danio rerio* NP571738, *Gadus morhua* AAP44112, *Mus musculus* AAK50433.2, *Lithobates catesbeianus* ACJ53927, *Rhinella arenarum* AMD33476, *Homo sapiens* NP000340, *Daphnia magna* XP_032788316.1, *Lateolabrax japonicus* AFN73130.1, *P. trituberculatus* MPC99197.1, *Oreochromis niloticus* StAR2 XP003445653, *Oryzias latipes* StAR2 ENSORLP00000011263, *Solea senegalensis* StAR2 EU921450, *L. vannamei* XP_027230069.1, *M. japonicus* XP_042893986.1, *Bombyx mori* AAL51081.1, *Onthophagus taurus* XP_022906085.1.

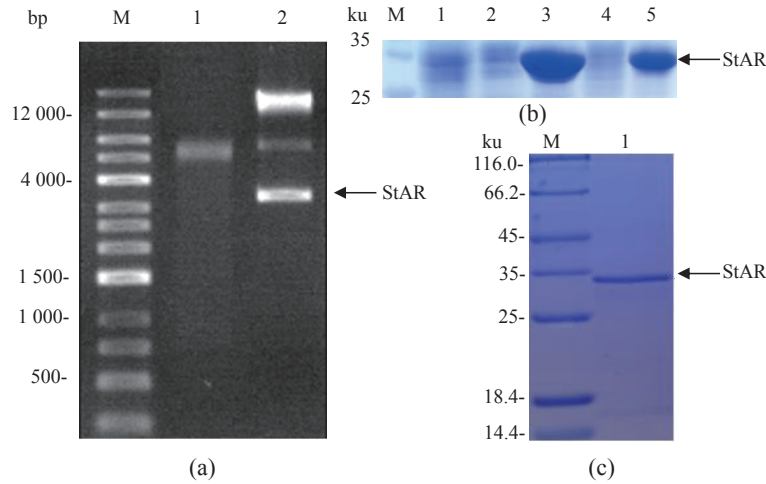


图 4 重组质粒酶切验证及融合蛋白表达

(a) M. marker, 1. 双酶切后的目的基因, 2. 构建好的表达质粒; (b) M. protein marker, 1. 诱导前总蛋白, 2. 20°C 上清液, 3. 20°C 沉淀, 4. 37°C 上清液, 5. 37°C 沉淀; (c) M. protein marker, 1. 纯化后蛋白。

Fig. 4 Recombinant plasmid digestion verification and fusion protein expression detection

(a) M. marker, 1. target gene after double digestion, 2. constructed expression plasmid; (b) M. protein marker, 1. total protein before induction, 2. supernatant at 20 °C, 3. 20 °C pellet, 4. 37 °C supernatant, 5. 37 °C pellet; (c) M. protein marker, 1. purified protein.

表 2 ELISA 法检测 StAR 抗体血清效价

Tab. 2 Detection of StAR polyclonal anti-serum titer by ELISA method

项目 items	抗体血清稀释倍数 antibody serum dilution factor									
	1×10 ³	2×10 ³	4×10 ³	8×10 ³	1.6×10 ⁴	3.2×10 ⁴	6.4×10 ⁴	1.28×10 ⁵	2.56×10 ⁵	5.12×10 ⁵
处理组 treatment group	3.30	3.19	2.92	2.75	2.44	1.73	0.99	0.53	0.29	0.17
阴性对照组 control group	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
处理组/阴性对照 treatment group/control group	66	63.8	58.4	55	48.8	34.6	19.8	10.6	5.8	3.4

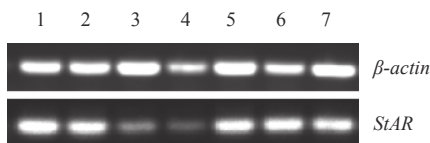


图 5 日本沼虾 StAR 基因组织分布

1. 脑, 2. 鳃, 3. 肝胰腺, 4. 心脏, 5. 肌肉, 6. 肠道, 7. 精巢。

Fig. 5 Distribution of StAR genes in *M. nipponense*

1. brain, 2. gill, 3. hepatopancreas, 4. heart, 5. muscle, 6. intestine, 7. testis.

达(图版), 这与最早在小鼠睾丸间质细胞中发现相一致。

3 讨论

综合文献报道, StAR 蛋白主要功能是完成胆固醇从线粒体外膜向线粒体内膜的转运过程, 这

是类固醇激素合成过程中关键的调控步骤^[24-26]。其中蛋白激酶 A(PKA) 介导的丝氨酸磷酸化的潜在位点, 对于调节 StAR 活性有重要意义^[27], 如人等哺乳动物中的 StAR 蛋白 Ser¹⁹⁵ 和 Ser¹⁹⁴ 的突变会降低类固醇生成的速率^[28-29]。已有研究证实 StAR 基因在类固醇激素合成起始阶段起关键性作用, 而类固醇激素是性别分化与发育的关键^[1-2], 但迄今为止, StAR 基因在甲壳动物中的相关研究鲜有报道, 更少会在低氧胁迫条件下对该基因的表达进行探讨。本研究克隆得到日本沼虾 StAR 基因 cDNA 全长序列, 全长 3 361 bp, 其中开放阅读框 909 bp, 编码 302 个氨基酸。其中 Ser⁹⁹、Ser¹³⁵、Ser¹⁸⁶ 和 Ser²⁰⁰ 几个磷酸化位点在甲壳类 StAR 序列中相对保守, 表明其可能参与调节 StAR 活性。日本沼虾 StAR 基因与甲壳类亲缘关系最近, 并与节肢动物门中昆虫聚成一支, 这基

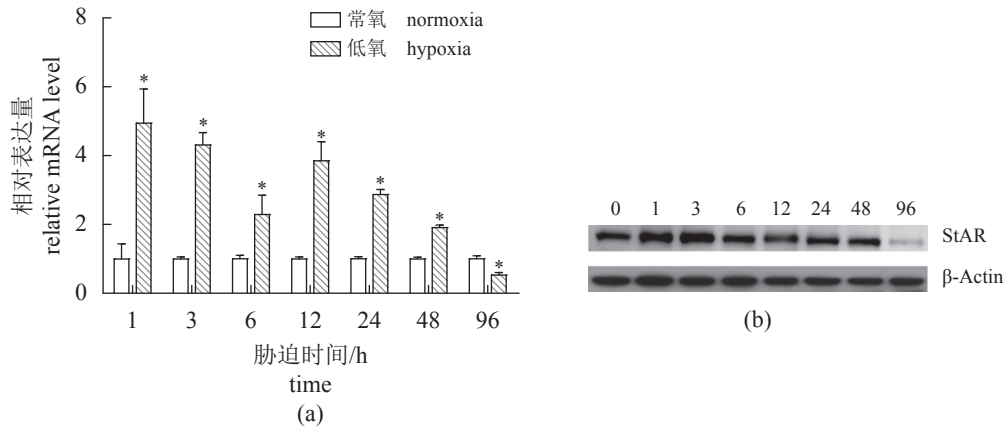
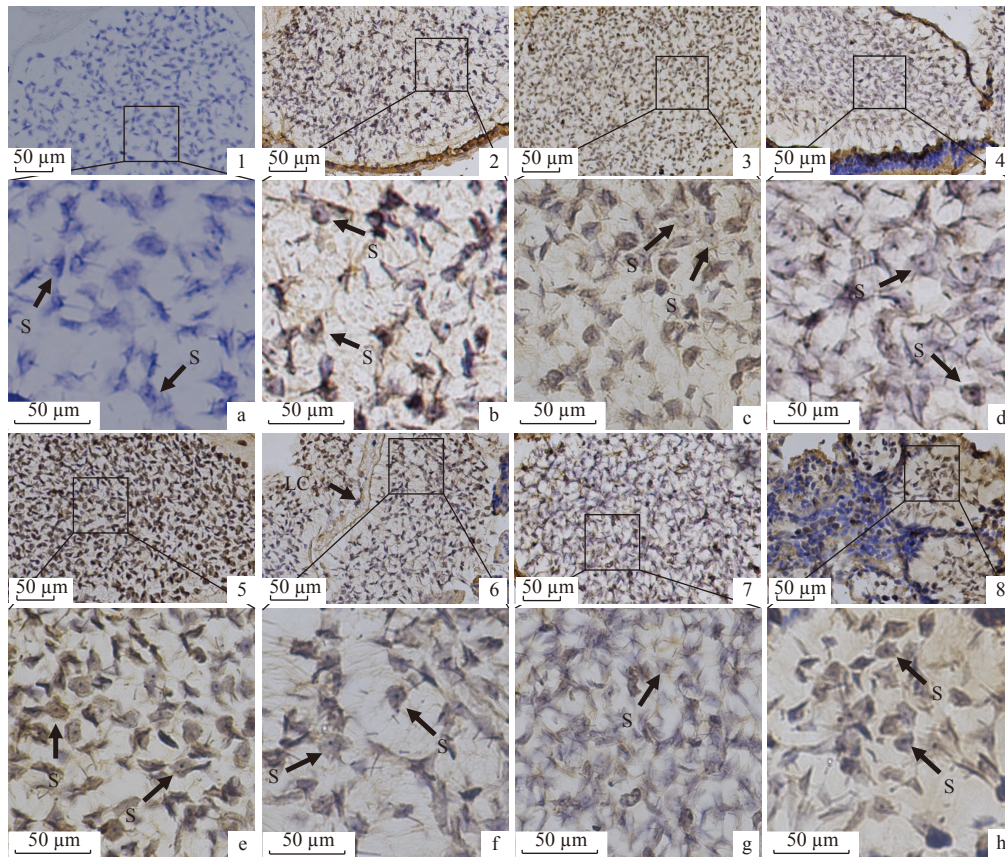


图 6 低氧胁迫不同时间段精巢组织 StAR 转录水平 (a) 和蛋白丰度 (b) 表达变化

(b) 0. 对照, 1. 低氧 1 h, 3. 低氧 3 h, 6. 低氧 6 h, 12. 低氧 12 h, 24. 低氧 24 h, 48. 低氧 48 h, 96. 低氧 96 h.

Fig. 6 Temporal expression of StAR transcriptional levels (a) and protein abundance (b) in testis tissue under hypoxia stress at different time periods

(b) 0. control, 1. hypoxia 1 h, 3. hypoxia 3 h, 6. hypoxia 6 h, 12. hypoxia 12 h, 24. hypoxia 24 h, 48. hypoxia 48 h, 96. hypoxia 96 h.



图版 StAR 蛋白在精巢组织中免疫组化分析

1. 阴性对照, 2. 常氧对照组, 3. 低氧 1 h 组, 4. 低氧 3 h 组, 5. 低氧 6 h 组, 6. 低氧 12 h 组, 7. 低氧 24 h 组, 8. 低氧 48 h 组; S. 精细胞, LC. 间质细胞。

Plate StAR protein immunohistochemical analysis in testis tissue

1. negative control, 2. normoxia control group, 3. hypoxia group for 1 h, 4. hypoxia group for 3 h, 5. hypoxia group for 6 h, 6. hypoxia group for 12 h, 7. hypoxia group for 24 h, 8. hypoxia group for 48 h; S. sperm cell, LC. leydig cell.

本上与传统的动物系统发生和分类次序一致。从实验结果中可以看出 *StAR* 基因在各组织都有表达,

但具有组织表达丰度差异性, 其在精巢中表达较高, 与硬骨鱼类和哺乳类物种 *StAR* 基因组织表达

模式相吻合^[5,30-31]。

已有学者发现低氧能够抑制青鳉精巢发育和精子发生^[32], 并证实低氧作为一种特殊的应激源发挥类似内分泌干扰物的效应, 会通过抑制斑马鱼 *StAR* 基因的表达从而抑制类固醇激素的生成^[33-34]。研究表明, *StAR* 基因在低等脊椎动物鱼类雄性生殖中起到至关重要的作用^[5,35], 且在对尼罗罗非鱼 *StAR* 基因研究中发现, 旁系同源基因 *StAR2* 会影响卵巢发育分化, 而 *StAR1* 和 *StAR2* 都会参与 11-酮基睾酮的合成从而在精巢发育分化中发挥重要作用^[9,36]。本实验 qRT-PCR 结果显示, 低氧 48 h 时日本沼虾精巢组织中 *StAR* 基因表达量显著高于对照, 其原因可能是短期低氧胁迫下日本沼虾能够通过诱导 *StAR* 基因 mRNA 的转录水平上升, 来抵消低氧应激所带来的负面效应。然而, 随着低氧胁迫时间的增加, 日本沼虾精巢组织中 *StAR* 基因表达量总体呈现下降趋势, 表明长期低氧胁迫能够显著降低日本沼虾的 *StAR* 基因的转录水平, 可能会影响性激素分泌, 这与模式动物小鼠与斑马鱼的研究结果相类似^[21,34]。

本实验还构建了 *StAR* 的原核表达系统以及抗体制备, 选择大肠杆菌表达系统成为表达 *StAR* 蛋白的首选, 其优点在于操作简单, 为在蛋白水平验证 *StAR* 在低氧胁迫响应的表达模式奠定了基础。通过 Western blot 实验结果也证实, 低氧胁迫 48 h 前日本沼虾 *StAR* 蛋白表达量水平与对照组相比较, 但其表达量水平随低氧胁迫时间增加呈现下降趋势, 这与低氧条件会抑制小鼠间质细胞 *StAR* 表达水平导致睾酮合成减少等研究结果相一致^[37-38], 可能是由于长期低氧胁迫会诱导精巢中生殖细胞凋亡, 精巢中精母细胞及精子数量显著降低^[23], 从而导致在精巢中 *StAR* 表达量降低。此外, 本研究通过免疫组化实验, 检测到 *StAR* 蛋白在低氧下日本沼虾精巢组织中的精细胞、间质细胞中均有表达, 鉴于精巢间质细胞与雄激素合成以及分泌调节密切相关^[39-40], 这表明日本沼虾 *StAR* 基因可能在类固醇合成路径及精子发生过程中均发挥重要作用, 但具体作用途径及其机制仍需进一步研究。

综上所述, 本研究系统分析了 *StAR* 基因的序列结构域、组织表达特征以及低氧胁迫后该基因的表达模式; 并进行 *StAR* 基因原核表达及其抗血清的制备, 采用 Western blot 与免疫组化在蛋白水平进行表达与定位分析, 为解析低氧下日本沼虾

类固醇激素合成的分子机制奠定了基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 刘倩, 马晓, 岑双双, 等. 中华鳖 *StAR* 基因的克隆、表达及多克隆抗体制备[J]. 水产学报, 2020, 44(11): 1813-1823.
Liu Q, Ma X, Cen S S, et al. Molecular cloning, expression analysis and polyclonal antibody preparation of *StAR* gene in Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(11): 1813-1823 (in Chinese).
- [2] 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.
- [3] Stocco D M. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future[J]. *Journal of Endocrinology*, 2000, 164(3): 247-253.
- [4] Vizziano D, Randuineau G, Baron D, et al. Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(8): 2198-2206.
- [5] 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.
- [6] Marín-Juez R, Castellana B, Manchado M, et al. Molecular identification of genes involved in testicular steroid synthesis and characterization of the response to gonadotropic stimulation in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) testis[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172(1): 130-139.
- [7] Nakamoto M, Fukasawa M, Orii S, et al. Cloning and expression of medaka cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 during gonadal development[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2010, 52(4): 385-395.
- [8] Raghuvveer K, Senthilkumaran B, Sudhakumari C C, et al. Dimorphic expression of various transcription factor and steroidogenic enzyme genes during gonadal onto-

- geny in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*[J]. *Sexual Development*, 2011, 5(4): 213-223.
- [9] 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.
- [10] Fu H T, Jiang S F, Xiong Y W. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in China[J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(7): 993-998.
- [11] 傅洪拓, 乔慧, 李法君, 等. 长江不同江段青虾的遗传多样性[J]. *水产学报*, 2010, 34(2): 204-212.
Fu H T, Qiao H, Li F J, *et al.* Genetic diversity of *Macrobrachium nipponense* on a regional scale in the Yangtze River[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(2): 204-212 (in Chinese).
- [12] 乔慧, 吴滢, 傅洪拓, 等. 应用SSR和SRAP标记构建青虾遗传连锁图谱[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 202-210.
Qiao H, Wu Y, Fu H T, *et al.* Construction of a genetic linkage map for oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) using SSR and SRAP markers[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 202-210 (in Chinese).
- [13] 傅洪拓, 龚永生, 吴滢, 等. 日本沼虾与海南沼虾的人工种间杂交及其同工酶分析[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(3): 327-329.
Fu H T, Gong Y S, Wu Y, *et al.* Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium nipponense* and *Macrobrachium hainanense* and their isozyme analysis[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(3): 327-329 (in Chinese).
- [14] 孙盛明, 祝孟茹, 潘方艳, 等. 低氧对甲壳动物的影响及其分子调控研究进展[J]. *水产学报*, 2020, 44(4): 690-704.
Sun S M, Zhu M R, Pan F Y, *et al.* Research progress on the effect of hypoxia stress on crustacean and its molecular regulation[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 690-704 (in Chinese).
- [15] Zheng C, Zhao Q Q, Li E C, *et al.* Role of hypoxia in the behaviour, physiology, immunity and response mechanisms of crustaceans: a review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(2): 676-687.
- [16] Wu R S S. Hypoxia: From molecular responses to ecosystem responses[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 35-45.
- [17] 管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2010, 30(3): 301-306.
Guan Y Q, Li L, Wang H C, *et al.* Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2010, 30(3): 301-306 (in Chinese).
- [18] Sun S M, Xuan F J, Fu H T, *et al.* Molecular cloning, mRNA expression and characterization of membrane-bound hemoglobin in oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2017, 207: 36-42.
- [19] Wu R S S, Zhou B S, Randall D J, *et al.* Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(6): 1137-1141.
- [20] Perry S F, Reid S G, Gilmour K M, *et al.* A comparison of adrenergic stress responses in three tropical teleosts exposed to acute hypoxia[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 287(1): R188-R197.
- [21] Wang X T, Pan L L, Zou Z R, *et al.* Hypoxia reduces testosterone synthesis in mouse Leydig cells by inhibiting NRF1-activated StAR expression[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 16401-16413.
- [22] 杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 493-503.
Yang M, Sun S M, Fu H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 493-503 (in Chinese).
- [23] Sun S M, Chen Y X, Hu R. Aquatic hypoxia disturbs oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) testicular development: a cross-generational study[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266: 115093.
- [24] Stocco D M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis[J]. *Annual Review of Physiology*, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 2001, 63: 193-213.
- [25] Tsuchiya M, Inoue K, Matsuda H, *et al.* Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and LH receptor in MA-10 cells[J]. *Life Sciences*, 2003, 73(22): 2855-2863.
- [26] Tsujishita Y, Hurley J H. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain[J]. *Nature Structural Biology*, 2000, 7(5): 408-414.
- [27] Arakane F, King S R, Du Y, *et al.* Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(51): 32656-32662.
- [28] Katsumata N, Horikawa R, Tanaka T. Replacement of alanine with asparagic acid at position 203 in human steroidogenic acute regulatory protein impairs the ability to enhance steroidogenesis *in vitro*[J]. *Endocrine Journal*, 2006, 53(3): 427-431.
- [29] Fleury A, Mathieu A P, Ducharme L, *et al.* Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR)[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 91(4-5): 259-271.
- [30] Zhang Y H, Cui Y, Zhang X L, *et al.* Pig StAR: mRNA expression and alternative splicing in testis and Leydig cells, and association analyses with testicular morphology traits[J]. *Theriogenology*, 2018, 118: 46-56.
- [31] 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.
- [32] Wang S Y, Lau K, Lai K P, *et al.* Hypoxia causes transgenerational impairments in reproduction of fish[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12114.
- [33] Lu X Y, Yu R M K, Margaret M B, *et al.* Hypoxia disrupts gene modulation along the brain-pituitary-gonad (BPG)-liver axis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 102: 70-78.
- [34] Tan T F, Yu R M K, Wu R S S, *et al.* Overexpression and knockdown of hypoxia-inducible factor 1 disrupt the expression of steroidogenic enzyme genes and early embryonic development in zebrafish[J]. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2017, 11: 1177625017713193.
- [35] Kusakabe M, Nakamura I, Evans J, *et al.* Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes[J]. *Journal of Endocrinology*, 2006, 189(3): 541-554.
- [36] Li L, Wu Y, Zhao C H, *et al.* The role of *StAR2* gene in testicular differentiation and spermatogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 214: 105974.
- [37] Wang X T, Zou Z R, Yang Z H, *et al.* HIF 1 inhibits STAR transcription and testosterone synthesis in murine Leydig cells[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2019, 62(1): 1-13.
- [38] Kowalewski M P, Gram A, Boos A. The role of hypoxia and HIF1 α in the regulation of STAR-mediated steroidogenesis in granulosa cells[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 401: 35-44.
- [39] Suescun M O, Calandra R S, Lustig L. Effect of testicular macrophage conditioned media from rats with autoimmune orchitis on Leydig cell function[J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2000, 43(2): 116-123.
- [40] Hutson J C. Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat[J]. *Cell and Tissue Research*, 1992, 267(2): 385-389.

Molecular cloning and expression analysis of *StAR* gene from oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) in response to hypoxia

ZHENG Cheng¹, XUE Cheng¹, ZHAO Qianqian¹, SUN Shengming^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Steroid acute regulatory protein (StAR) is an important enzyme in the early stage of steroid hormone synthesis. Recent studies have found that aquatic hypoxia can influence synthesis pathway of steroid hormones in fish as an endocrine disruptor, however, little information was observed in crustaceans. In order to investigate the roles of StAR in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* under hypoxia, *StAR* gene has been cloned and characterized. A full-length cDNA sequence of *StAR* from *M. nipponense* was cloned by RACE (rapid amplification of cDNA ends) PCR. We examined the expression levels of *StAR* gene in different tissues by semi-quantitative RT-PCR, at the same time, the expression profile of *StAR* gene transcription level and protein expression abundance in testis of *M. nipponense* under hypoxia were also examined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot, respectively. The results showed that the cDNA of *StAR* gene was 3 361 bp in length (NCBI: MW263908), including 323 bp 5'-untranslated regions (UTR), 2 129 bp 3'-UTR, 909 bp open reading frame (ORF), which encodes 302 amino acids. Based on bioinformatics analysis, phylogenetic tree analysis showed that the *StAR* gene of *M. nipponense* was closely related to the *StAR* gene of *Portunus trituberculatus*. The semi-quantitative RT-PCR results showed that *StAR* was highly expressed in testis tissues, but the lowest expressed in hepatopancreas and heart tissues. qRT-PCR results showed that the mRNA expression of *StAR* in the testis from hypoxia 1- 48 h was significantly higher than those in control group, but there was a significant lower mRNA expression of *StAR* in hypoxia 96 h group than those in control group. In addition, the recombinant plasmid was constructed and the *StAR* polyclonal antibody was obtained by immunizing rabbit. The expression abundance of *StAR* protein was detected by Western blot, which was basically similar to the gene expression pattern. In addition, immunohistochemical results showed that *StAR* protein was expressed in sperm cells and Leydig cell in testis tissue. Acute hypoxic stress significantly inhibited expression level of *StAR*, which may play an important role in spermatogenesis. The results of this study lay a foundation for further analysis of the molecular mechanism of steroid hormone synthesis in *M. nipponense*.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; *StAR*; clone; hypoxic; prokaryotic expression

Corresponding author: SUN Shengming. E-mail: sunshengming621416@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2023YFE0205100); National Natural Science Foundation of China (31672633); Key Research and Development Program of Ningxia Province, China (2022ZDYF0569); Shanghai Science and Technology Program, China (23XD1421600, 2201580700)