

半滑舌鳎 *StAR* 基因克隆及其在不同组织的时空表达分析

朱 颖^{1,2}, 孟 亮², 胡乔木², 王晓夏², 常亚青¹, 陈松林^{2*}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用半滑舌鳎性腺转录组测序获得的 *StAR* 基因部分序列, 设计 RACE 引物, 克隆了半滑舌鳎 *StAR* 基因的 cDNA 序列, 全长为 1 294 bp, 5'端 UTR 为 132 bp, 3'端 UTR 为 310 bp, 开放阅读框(ORF)为 852 bp, 共编码 283 个氨基酸。将半滑舌鳎 *StAR* 基因与其他物种 *StAR* 基因进行氨基酸同源性分析, 结果显示, 半滑舌鳎 *StAR* 与塞内加尔鳎、大口黑鲈、花鲈、金头鲷的同源性都达到了 85%, 与虹鳟、斜带石斑鱼及日本鳎的同源性分别为 81%、83% 和 76%。雌、雄鱼不同组织 *StAR* 基因的表达分析表明, *StAR* 基因在雄鱼性腺中高表达, 在雄鱼的肝脏、脑及心脏中表达量较低, 而在雄鱼的其他组织中不表达; 在雌鱼肠中不表达, 在其他组织(卵巢、肝脏、脾脏、脑、垂体、肌肉、心脏、肾脏)中微量表达。荧光定量 PCR 分析不同组织与不同时期性腺表达谱表明, 雄鱼性腺中 *StAR* 基因的表达量显著高于雌、雄鱼其他各组织 ($P < 0.05$), 提示 *StAR* 基因对雄鱼精巢发育起重要作用。雄鱼不同时期表达谱分析结果显示, *StAR* 基因在 66 天前的精巢中不表达, 在 150 天时表达量急剧增加, 至 2 龄时表达量最高, 3 龄时表达量下降, 说明该基因在精巢发育成熟过程中起重要作用。原位杂交结果显示, *StAR* 基因主要在雄鱼精巢的精子细胞中表达, 而在雌鱼的卵巢中不表达。研究表明, *StAR* 基因在半滑舌鳎精巢发育中发挥作用, 且可能在精子形成中发挥重要作用。

关键词: 半滑舌鳎; *StAR* 基因; 克隆; 实时荧光定量 PCR; 原位杂交

中图分类号: Q 785; S 965

文献标志码: A

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 属鲽形目 (Pleuronectiformes)、舌鳎科 (Pleuronectiformes)、舌鳎属 (*Cynoglossus*), 主要分布于东北亚海域, 为一种大型冷温性比目鱼类, 生长快、个体大, 是海水鱼类主导养殖品种。半滑舌鳎是目前发现的雌雄生长差异最大的鱼类之一, 雌性个体生长速度是雄性个体的 2~4 倍, 且成年雌鱼个体大小是成年雄鱼的 2~4 倍, 雄鱼个体小、生长慢且比例高, 因而经济价值大大低于雌鱼, 严重影响了半滑舌鳎养殖产业的发展。因此, 研究半滑舌鳎性别决定机制, 挖掘半滑舌鳎性别相关基因, 研究性别和生殖相关基因的结构和功能, 实现半滑舌鳎生殖和性别调控, 对于该养殖产业的发展具有十分重要的意义。

类固醇激素急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory, *StAR*) 是类固醇激素合成过程中的重要调节因子。这种蛋白是 Clark 等^[1] 在 1994 年从小鼠 MA-10Leydig 细胞株中克隆并纯化得到的, 同时将其命名为类固醇激素合成急性调节蛋白, 又称甾体激素合成灵敏调节蛋白。王草叶^[2] 和 Schwarzenbach 等^[3] 研究发现, 在生物体内, *StAR* 蛋白直接影响类固醇激素的合成, 是胆固醇在线粒体中跨膜转运, 以及类固醇细胞合成类固醇限速步骤中的重要调节因子。

StAR 蛋白在动物生长、分化、发育以及繁殖过程中发挥调节作用, 特别是在促进生殖器官发育及维持生精功能中起重要作用。Ikeda 等^[4] 研究认为, *StAR* 参与生物的生殖过程, 主要表现为

收稿日期: 2014-01-01 修回日期: 2014-04-18

资助项目: 国家自然科学基金(31130057); 国家“八六三”高新技术研究发展计划(2012AA092203); 山东省泰山学者工程专项

通信作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

介导孕酮的产生从而影响 hCG 诱导睾酮的分泌。有关类固醇激素参与调控生殖性别分化和性腺发育等方面的研究,已成为目前的研究热点。在对哺乳动物的研究中,Warita 等^[5]发现小鼠 StAR 蛋白的缺失会引起雄性不育,当 StAR 基因表达时,与其相互作用的 SBP 基因表达上调,睾酮激素显著性上调,说明该基因对小鼠雄性的发育起到至关重要的作用。在小鼠中用免疫组化的方法,研究发现在睾丸分化初期就有 StAR 基因的表达。Mizutani 等^[6]在大鼠的卵巢中也克隆得到了 StAR 基因,该基因主要在卵巢的卵泡细胞中表达,对卵巢发育起重要作用。在哺乳动物中该基因主要在类固醇合成组织中表达。相比哺乳动物,鱼类中该基因主要与生殖发育密切相关,并且在不同组织中广泛表达。在鳕鱼 (*Gadus morhua*) 中筛选到两种 StAR 基因,其中 StAR1 基因仅在卵巢、睾丸和头肾中表达,该基因是影响卵巢和精巢发育的重要基因,而 StAR2 在肝、肾、脾、肠等组织中表达^[7]。在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中,StAR 基因在卵巢发育中有重要作用,是卵黄形成过程中的关键基因^[8]。在硬骨鱼性腺发育和配子发生过程中,性类固醇激素是调节和诱导这一过程发生的重要信号。在大西洋黄鱼 (*Micropogonias undulatus*) 中,性腺中检测到该基因,同时下丘脑和头肾中该基因也有表达^[9]。同样,白鲟 (*Acipenser transmontanus*) 中该基因在性腺中表达量较高^[10]。但有关半滑舌鲷 StAR 基因克隆及其在性腺发育中的作用,迄今尚未见报道。本实验克隆了半滑舌鲷 StAR 基因,并对其在不同组织中的表达差异进行了分析,旨在为阐明 StAR 基因在半滑舌鲷性腺发育和生殖调控中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 半滑舌鲷各种组织制备

实验材料半滑舌鲷取自山东海阳海水养殖种子资源北方基地,分别取 2 龄雌、雄鱼各组织(脑、肾脏、脾脏、肝脏、肠、肌肉、心脏、垂体)迅速投入液氮,随后转入 -80 °C 冰箱保存,备用。取不同时期(16 d,36 d,66 d,150 d,6 月龄,8 月龄,1 龄、2 龄、3 龄)雌雄鱼性腺一侧用于 RNA 提取;另一侧性腺用多聚甲醛固定 20 h 后,75% 酒精漂洗 3 次,-20 °C 保存,备用。

1.2 表型性别和遗传性别的鉴定

将多聚甲醛固定的性腺做石蜡切片,进行连续切片,切片厚度为 5 μm, H. E 染色后,用 Olympus 光学显微镜观察性腺结构鉴定其表型性别。取半滑舌鲷尾鳍组织用无水乙醇保存,随后用酚-氯仿法提取基因组 DNA,根据本实验室开发的雌雄特异微卫星标记引物 CseF-SSR1-a/s(表 1),以及 Chen 等^[11]的方法对半滑舌鲷进行遗传性别鉴定。

表 1 实验中所用的特异引物
Tab.1 Primer sequences used in the experiments

引物名称 primer	引物序列 sequence
CseF-SSR1-a	TACGACGTACTCCGGTGGTTTT
CseF-SSR1-s	GAGGCCGACAGGATCGTAC
StARa-a	GATACGCAGGCATCACAC
StARa-s	AGTTCAAACGAGCCAAAGA
S-GSP1	CGAATCCTGAGTCGTTTCCTTGCGC
S-GSP2	TCTCCCGTCTGAGAGACCTGACA
S-NGPS1	CCGTCTTTGGCTCGTTTGAA
S-NGPS2	TGCCCTTATGAGACCTGACA
S-F	GTTGGGGTCGTCAGCAC
S-R	TTGCCATTCACCACGAGC
rStAR-a	ACCTCGTGGGTGACCATCGTGT
rStAR-s	AGGACGGCTGGACCACTGAAAT
iStAR-a	GCCGAATTCCTGAGGTGGTTGGCAA
iStAR-s	GCCGATATCGAGCAGATGGGGGAGTGG
β-actin-a	GCTGTGCTGTCCCTGTA
β-actin-s	GAGTAGCCACGCTCTGTC

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

提取不同组织及不同时期的半滑舌鲷性腺总 RNA,琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性,用反转录试剂盒 (TaKaRa) 将 RNA 反转录成 cDNA,-20 °C 保存备用。

1.4 StAR 基因全长 cDNA 的克隆

根据本实验室对半滑舌鲷转录组测序所得的 StAR 基因部分序列^[12],设计引物 StARa-a/s(表 1),扩增得到该基因部分序列,根据该序列分别设计 5'-RACE 和 3'-RACE 的特异性引物 S-GSP1/2(表 1)、巢式引物 S-NGSP1/2(表 1)。根据 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书分别合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA,进行一轮 touchdown PCR 反应和巢式 PCR,反应程序为 94 °C,30 s,72 °C,3 min,5 个循环;94 °C,30 s,70 °C,30 s,72 °C,3 min,5 个循环;94 °C,30 s,68 °C,30 s,25 个循环延伸 72 °C,10 min;巢式 PCR 反应程序为 94 °C,5 min,94 °C,30 s,59 °C,50 s,72 °C,30 s,30 个循

环; 72 °C 延伸 10 min。将目的片段切胶回收后克隆、测序。

1.5 *StAR* 序列分析及系统进化树的构建

用生物学软件 DNASTar, 将 5'-RACE 和 3'-RACE 得到的 cDNA 序列与已知的部分 cDNA 序列拼接, 并预测开放阅读框及氨基酸序列。在 NCBI 数据库中搜索鱼类 *StAR* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列, 并对氨基酸序列进行比对; 用 ClustalX 和 DNAMAN 软件进行多重比较, 用 MEGA 5 构建系统树。

1.6 RT-PCR 及实时荧光定量 PCR

提取总 RNA, 根据 TaKaRa 反转录试剂盒合成 cDNA, 根据克隆得到的 *StAR* 的全长 cDNA 设计 RT-PCR 引物 S-F/R (表 1), 使用半滑舌鳎的 β -actin 基因作为内参, 来检测 *StAR* 基因在半滑舌鳎不同组织中的表达谱。PCR 反应条件为 95 °C, 5 min, 95 °C, 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 55 s, 72 °C 10 min, 35 个循环。

根据已得到的 *StAR* 序列设计荧光定量 PCR 的特异性引物 rStAR-a/s (表 1), 以 β -actin-a/s (表 1) 作为内参。采用 TaKaRa 公司 SYBR ExScript RT-PCR Kit (反应体系参考说明书), 在 ABI 7500 Real-time PCR 仪 (Applied Biosystems, USA) 上进行荧光定量 PCR 反应。每个样品设置 3 个平行, 所得数据用 SPSS 18.0 进行统计学分析。

1.7 探针的制备及检测

根据 *StAR* 基因序列设计原位杂交特异性引物 iStAR-a/s (表 1) 扩增 *StAR*, 扩增获得的片段长度为 489 bp。将 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后进行切胶回收, 用 *EcoR* V 和 *EcoR* I 对回收产物和载体 pBluescript II SK 进行双酶切, 目的片段与 pBluescript II SK 载体连接转化后, 挑取阳性克隆扩大培养, 提取质粒。质粒双酶切检

测并测序鉴定分析后, 对质粒进行单酶切, 以地高辛标记的 dNTP 为底物, 体外转录合成 *StAR* 的 RNA 探针, 并用试剂盒进行纯化, 分装为 1 μ L 后, 放入 -80 °C 冰箱保存备用。

将合成好的探针用斑点杂交检测探针的有效性^[13]。用去离子水将正义和反义探针原液分别稀释 100 倍、1 000 倍、10 000 倍, 取硝酸纤维素膜用 PBST 浸泡后晾干, 分别取 1 μ L 稀释后的探针按顺序点在硝酸纤维素膜上, 通过紫外照射 1 min 后使其变性, 预杂交液孵育 15 min, 山羊血清封闭 30 min, 加入 1:500 的抗体在 37 °C 进行孵育。PBST 清洗 2 次, 每次 15 min。加入显色液, 在避光条件下进行染色至出现明显信号, PBST 冲洗后, 终止显色过程。

1.8 原位杂交

取多聚甲醛固定的半滑舌鳎雌、雄鱼性腺, 进行浓度梯度的脱水处理后, 用二甲苯透明, 浸入石蜡、包埋、切成 5 μ m 的切片, 过夜烘烤。进行杂交前处理, 切片依次经二甲苯 (3 次) 每次 5 min, 酒精梯度处理, 每次 5 min。4% PFA-PBS 处理 5 min, 1 \times PBS 10 min, 蛋白酶 K 处理 5 min, 1 \times PBST 3 次, 每次 15 min。用预杂交液处理 3 h, 然后用地高辛标记的探针 70 °C 杂交过夜。杂交处理后, 用 0.2 \times SSC 在 70 °C 条件下浸泡 1 h, 血清封闭 3 h, 抗体杂交 4 °C 过夜。1 \times PBST 冲洗 5 次, 每次 10 min, BCIP/NBP 显色, 避光, 显微镜检查。

2 结果

2.1 半滑舌鳎 *StAR* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

根据半滑舌鳎转录组部分序列设计引物进行 RACE 扩增, 分别得到 5'-RACE 405 bp 和 3'-RACE 629 bp 的特异性片段 (图 1)。克隆测序

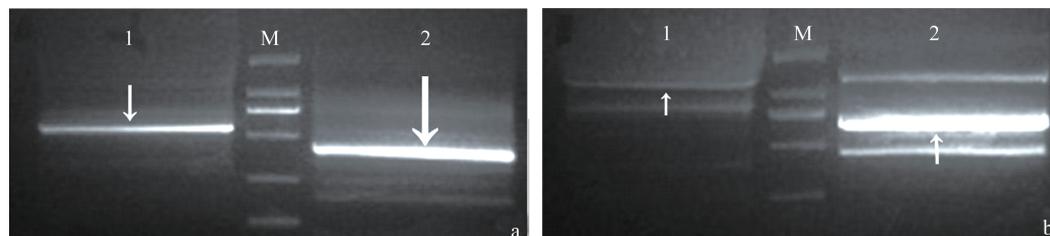


图 1 5'-RACE 电泳结果 (a) 和 3'-RACE 电泳结果 (b)

M: DL2000 marker; 1. touchdown PCR 反应产物; 2. 巢式 PCR 反应产物

Fig. 1 The result of 5'-RACE (a) and 3'-RACE (b) electrophoresis

M: DL2000 marker; 1. touchdown PCR reaction products; 2. Nested PCR reaction products

后,同已知片段拼接得到了 *StAR* 基因的全长 cDNA 序列,共有 1 294 bp,将序列提交 NCBI,获取登陆号 (accession number: KF958251),开放性阅读框 (ORF) 为 852 bp,编码一个 283 个氨基酸。5'-UTR 132 bp, 3'-UTR 310 bp, 含有 2 个 AATAAA 加尾信号 (图 2)。

对半滑舌鲷 *StAR* 基因进行生物信息学分析,得到 STAR 蛋白的分子量为 68.676,等电点为 5.07。该氨基酸有一个 SRPBCC 超家族的配体结合域,此结合域有一个疏水性配体结合口袋,它可以绑定多种配体,这个家族中含有类固醇合成急性调节蛋白相关脂质转移域 (START)。

```

tggagccggagacggagacggagagattcgccgagatttctg 42
cacacggagaccaggtcggagttgtcgggcatcgaagtggagagaagattgatcaacacgaagatcttcaacataagtcctctgcctgaaa 132
ATGCTGCCTGCGACCTTCAAGCTGTGCGCTGGCATCTCTACCGACACATGAGGAACATGACCGGTCGAGAAGGAACGCCATGGTTGCC 222
M L P A T F K L C A G I S Y R H M R N M T G L R R N A M V A 30
ATTACCCACGAGCTGAACCGACTGGCGGGTCCGAGTCCAGTAAGTGGATTAGCCAGGTTCCGAGGAGGAGCTCTTCTCAGTTCTCGG 312
I H H E L N R L A G P S P S N W I S Q V R R R S S L L S S R 60
ATCAGAGAGGAGGAGCAGTTTCAAGTGGAGGAGGTTCTCTACATCAAGCAGGGGGAGGAGGCCCTGCAGAGGGCCATCGGCATCCTCAGC 402
I R E E E Q F S E E E V S Y I K Q G E E A L Q R A I G I L S 90
GAGCAGGACGGCTGGACACTGAAATCGCAGACGCCAACGGAGACAAGGTCCTGAGTAAGGAATACCAGACATCGGAAGGTGTTCAAG 492
E Q D G W T T E I A D A N G D K V L S K E I P D I G K V F K 120
CTGGAGGTGATGATGGAGCAACATCCCGACAACCTTTACCAGGAGCTGGTGGGCAACATGGAGCAGATGGGGAGTGGAAACCCAAAATC 582
L E V M M E Q H P D N L Y Q E L V G N M E Q M G E W N P K I 150
AAAGAGGTCAAGATTCTTCAAAGAATCGGCCAGGACACGATGGTCACCCACGAGGTGCCTGCGGATAACGTGCTGGGCCGAGAGACTTC 672
K E V K I L Q R I G Q D T M V T H E V P A D N V L G R R D F 180
GTCAGTTCGGATGTGCCAAACGGAGAGGCTCCACCTGCTTCTGGCTGCGATGTCCACCAACATCCACGATGCCCGAGCAGAGCGGC 762
V S V R C A K R R G S T C F L A A M S T K H P T M P E Q S G 210
GTGGTCAGGGCAGAGAACGGTCTACATGTATCGTCATGAAACATGTGCTGACGACCCCAACAAGACCAAGTTACCTGGTTACTGAAC 852
V V R A E N G P T C I V M K P C A D D P N K T K F T W L L N 240
ATGGATCTGAAGGGCTGGATCCCGAAGACGATCATCAACAAAATGCTCTCGCAGACGAGGTGGAGTTTCCCAACACCTCAGGCTGAGG 942
M D L K G W I P K T I I N K M L S Q T Q V E F A N H L R L R 270
ATGGCTGACAACGTTTCCATGGAGACGGCTCAGCCTGCTAAcacggggaggtccctggagcttttggccccgacgcacagatggaga 1032
M A D N V S M E T A H A C * 283
caggagccgggagactgactgaagaatcatgcaataaaaaaaaaaacgagagatgtgacggcacagttgatttgccttttttaatttatt 1122
gctttttatccgatgtcaccacagtgtaaacgaccggctcatcagttccctgattttctatgacactaccctaccgtactgtacactgatt 1212
tatccccctcaccctgatgcacaaaaaccccaaaataaaatgatgctaacgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1294

```

图 2 半滑舌鲷 *StAR* 基因的 cDNA 序列和推测的氨基酸序列

ATG 表示起始密码子,双下划线表示 poly(A) 信号,两个相反的箭头区域指示信号蛋白、脂质结合的结构域

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *StAR* in half-smooth tongue sole

ATG shows the start codon. The poly(A) signal sequence is double underlined. Two opposing arrows area indicate regions of signaling proteins and lipid binding domain

2.2 *StAR* 氨基酸序列分析及进化树构建

采用 NJ 构建进化树 (图 3),并将半滑舌鲷 *StAR* 氨基酸序列与不同物种 *StAR* 氨基酸序列比对,结果显示:半滑舌鲷 *StAR* 与塞内加尔鲷 (*Solea senegalensis*)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、的同源性都达到了 85%,和虹鳟为 81%,斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 为 83%,日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 为 76%,该基因的系统进化方式与物种进化理论基本保持一致 (图 4)。

2.3 半滑舌鲷 *StAR* 基因的组织分布

RT-PCR 的结果表明, *StAR* 基因 mRNA 的表达在雌雄成鱼中有明显差异。在雄鱼中,该基因在性腺、肝脏、肾脏及心脏中表达,而在性腺中的表达量明显高于其他各组织 (图 5-a)。在雌鱼中除了在肠中没有表达外,在其他 8 种组

织 (卵巢、肝脏、脾脏、脑、垂体、肌肉、心脏和肾脏) 中都有微弱的表达,并且各组织间的表达不存在明显的差异,在脑、心脏及肾脏中表达相对略高 (图 5-b)。

2.4 半滑舌鲷 *StAR* 基因的定量表达分析

在半滑舌鲷 2 龄雌、雄鱼的不同组织中, *StAR* 基因的表达水平差异明显,在雄鱼精巢中表达量最高,而在雌鱼卵巢中的表达量很低,精巢的表达量是卵巢表达量的 6.75 倍 ($P < 0.05$) (图 6)。在其他组织中,雌鱼脑和雄鱼肝脏的表达量相对较高,但表达量与精巢相比明显偏低,精巢的表达量是雌鱼脑表达量的 6.7 倍。分析该基因分别在雌、雄鱼中的表达量可知,雌鱼中除了脑和心脏,其他组织都只有微量表达,且没有显著差异 ($P > 0.05$)。雄鱼精巢的相对表达量最高,明显高于其他各个组织,且在心脏、垂体、肠、脾脏及肌肉中都极微量表达。

表 2 用于构建 NJ 树的氨基酸序列
Tab. 2 Amino acid sequences used for NJ tree

种类 species	NCBI 检索号 GenBank accession number	种类 species	NCBI 检索号 GenBank accession number
塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	ADW08748	海鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	CBN81516
金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	ABV25959	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	NP035615
花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	AFN73130	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP113746
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	AAZ92554	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP571738
珠光拟梳唇隆头鱼 <i>Tautoglabrus adspersus</i>	ADE06401	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	NP001098380
细须石首鱼 <i>Micropogonias undulatus</i>	ABG34343	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP990017
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NP001117674	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	AAG28595
稀有鮡鲫 <i>Gobiocypris rarus</i>	AEV91663	美洲红点蛙 <i>Salvelinus fontinalis</i>	Q9DE06

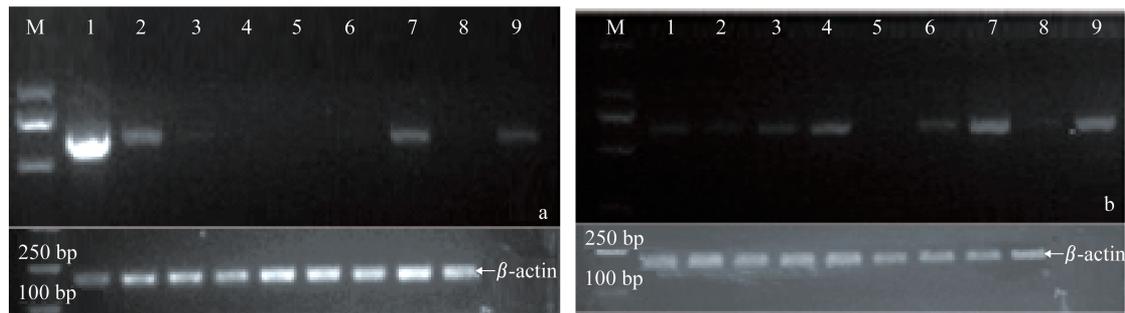


图 5 *StAR* 基因在半滑舌鲷雄鱼 (a) 和雌鱼 (b) 不同组织的表达分析

M. DL2000 marker; 1. 性腺; 2. 肝脏; 3. 脾脏; 4. 脑; 5. 垂体; 6. 肌肉; 7. 心脏; 8. 肠; 9. 肾脏

Fig. 5 Expression of *StAR* in tissues of male (a) and female (b) *C. semilaervis*

M. DL2000 marker 1. gonad; 2. liver; 3. spleen; 4. brain; 5. pituitary; 6. muscle; 7. heart; 8. intestine; 9. kidney

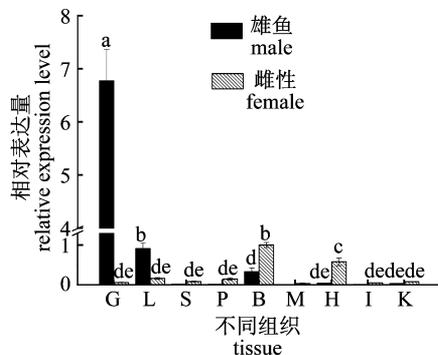


图 6 *StAR* 基因在 2 龄半滑舌鲷雌、雄鱼各组织中的表达

G. 性腺; L. 肝脏; S. 脾脏; P. 垂体; B. 脑; M. 肌肉; H. 心脏; I. 肠; K. 肾脏

图中标有不同的字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$), 下图注释同此

Fig. 6 Expression of *StAR* gene in various tissues of two-year-old male and female *C. semilaervis*

G. gonad; L. liver; S. spleen; P. pituitary; B. brain; M. muscle; H. heart; I. intestinal; K. kidney

Data are expressed as mean \pm standard error of mean. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same as the following

通过半滑舌鲷雄鱼精巢不同发育时期的荧光定量结果可知, *StAR* 基因从 16 ~ 66 d 都没有表达, 从 150 d 开始, 该基因的表达量显著增高, 发育到 8 月龄和 1 龄的过程中, 表达量增加了 1 倍, 2 龄雄鱼精巢中, 该基因表达量继续增加几乎达到 1 龄雄鱼的 2 倍 (图 7)。而 3 龄雄鱼精巢中

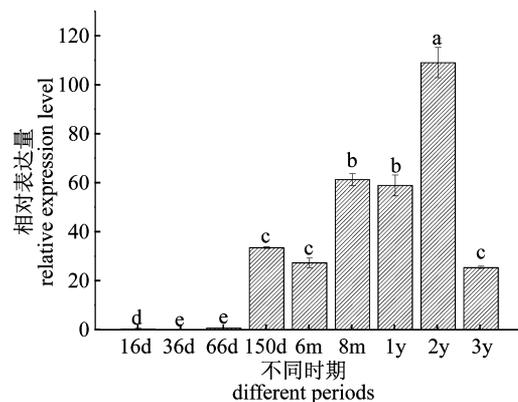


图 7 *StAR* 基因在半滑舌鲷雄鱼幼苗性腺和成鱼精巢中的表达

Fig. 7 Expression of *StAR* gene in gonads of *C. semilaervis* seedling and adult period

StAR 基因的表达量明显下降,下降到与 150 d 的表达量水平相近。该基因在雄鱼精巢中的整体表达趋势为先成倍增长达到最高峰后下降。

2.5 原位杂交结果

原位杂交的结果显示:*StAR* 基因 mRNA 在半滑舌鳎 2 龄雄鱼的性腺中有明显的杂交信号,观察到精巢中成熟精细胞杂交信号强(图 8)。同时,对 86 d 和 66 d 的雄鱼性腺进行了原位杂交分析,结果表明,在 86 d 和 66 d 的雄鱼精巢中都没有检测到杂交信号,同时在 2 年雌鱼的卵巢中也没有检测到杂交信号。

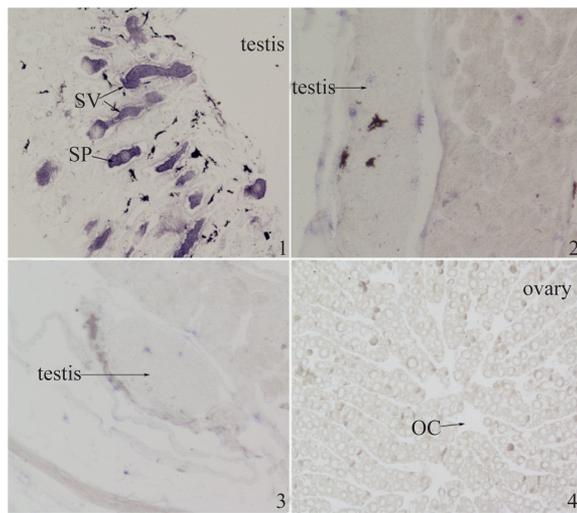


图 8 半滑舌鳎 *StAR* 基因的性腺组织学原位杂交

1. 2 龄精巢 100 ×; 2. 86 d 雄鱼 100 ×; 3. 66 d 雄鱼 100 ×; 4. 2 龄卵巢 100 ×

testis. 精巢; ovary. 卵巢; SV. 精小囊; SP. 精子细胞; OC. 卵巢腔

Fig. 8 *In situ* hybridization of *StAR* gene in *C. semilaevis* gonad

1. testis of two years 100 ×; 2. 86 days male 100 ×; 3. 66 days male 100 ×; 4. ovary two years 100 ×

SV. seminal vesicle; SP. spermatid; OC. ovarian cavity

3 讨论

实验首次克隆了半滑舌鳎 *StAR* 基因,系统进化树分析表明,半滑舌鳎 *StAR* 基因与塞内加尔鳎、大口黑鲈的同源性很高;聚类分析表明,半滑舌鳎 *StAR* 基因与金头鳎、珠光拟梳唇隆头鱼、花鲈、大口黑鲈、细须石首鱼、塞内加尔鳎、青鳉的 *StAR* 基因聚为一类。

RT-PCR 分析表明,半滑舌鳎 *StAR* 基因在类固醇高输出的精巢中表达水平很高,但在非类固

醇合成的组织,如脑、脾脏和心脏中表达量则较低,这一点与其他鱼类 *StAR* 基因在不同组织中的表达模式基本一致。例如,虹鳟 *StAR* 基因不仅在性腺中表达,还在肠、幽门盲囊、脾脏、肾脏中表达^[14];淡水黄颡鱼 (*Potamotrygon* spp.) 的 *StAR* 基因除了在性腺中高表达外,在心脏、鳃、肌肉中也一定有表达^[15]。这说明在鱼类中,该基因不仅在类固醇激素合成组织中发挥重要作用,而且在非类固醇激素合成的组织中也发挥一定作用,这种表达模式被认为是一种解散模式。*StAR* 基因在半滑舌鳎性腺中的高表达为硬骨鱼中 *STAR* 蛋白的演变提供了重要的线索,同时半滑舌鳎 *StAR* 基因在脑组织中的表达则提示 *STAR* 蛋白可能参与合成神经甾的这一过程,这与 Melcangi 等^[16] 的研究结果基本一致。

荧光定量结果表明,半滑舌鳎 *StAR* 基因在精巢发育早期和精巢分化过程中都没有表达,只有发育到 150 d 时雄鱼精巢中才有明显表达,随着精巢的发育,该基因表达量继续升高。而随着成熟精子的释放,*StAR* 基因的表达量明显下调。由此推测,*StAR* 基因可能主要参与精巢的后期发育过程,而不参与精巢早期的分化过程。同样,在非洲鲶 (*Clarias gariepinus*) 中也有类似的研究结果,Sreenivasulu 等^[17] 认为 *StAR* 基因在睾丸中表达量的最高峰值发生在精子释放之前,而且不论在体内还是体外,绒毛膜促性腺激素 (hCG) 都可以促进 *StAR* 基因的表达。Maugars 等^[18] 在研究大西洋鲑 (*Salmo salar*) 过程中,认为 *StAR* 在精巢中早期表达水平很低,而在精子形成过程中表达量明显升高。这与本研究结果基本一致。

本实验采用原位杂交的方法观察到半滑舌鳎的 *StAR* mRNA 主要在成年雄鱼精巢中表达,进一步表明该基因主要在精子成熟过程中起作用,这一点与哺乳类的结果相类似。詹晓庆等^[19] 观察到猪的 *StAR* 基因主要在睾丸间质细胞中表达,且随着精巢的成熟该基因表达量增加。因为在脊椎动物中雄性性腺中的睾丸间质细胞是合成和分泌雄性激素的主要场所,所以该基因在间质细胞中大量表达维持睾丸发育。通过以上结果可以初步推论,该基因在动物类固醇合成细胞中大量存在,且在维持相关组织的发育中起到重要的作用。而有关 *StAR* 基因在半滑舌鳎雄鱼精巢中的作用机理及其与相关激素的调控关系,则有待今后进

一步研究。

参考文献:

- [1] Clark B J, Wells J, King S R, *et al.* The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (45): 28314 - 28322.
- [2] Wang C Y, Wang Y B. Advances in the study of steroidogenic acute regulatory protein [J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 8 (12): 733 - 737. [王草叶, 王玉邦. 类固醇激素合成急性调节蛋白研究进展. *中华男科学杂志*, 2006, 8 (12): 733 - 737.]
- [3] Schwarzenbach H, Manna P R, Stocco D M, *et al.* Stimulatory effect of progesterone on the expression of steroidogenic acute regulatory protein in MA-10 Leydig cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68 (3): 1054 - 1063.
- [4] Ikeda Y, Lala D S, Luo X, *et al.* Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression [J]. *Molecular Endocrinology*, 1993, 7 (7): 852 - 860.
- [5] Warita K, Mitsuhashi T, Fukui S, *et al.* Immunohistochemical analysis of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and StAR-binding protein (SBP) expressions in the testes of mice during fetal development [J]. *Reproductive Biology*, 2013, 13 (1): 92 - 95.
- [6] Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, *et al.* Molecular cloning, characterization and cellular distribution of rat steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovary [J]. *Life Sciences*, 1997, 61 (15): 1497 - 1506.
- [7] 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.
- [8] Nakamura I, Evans J C, Kusakabe M, *et al.* Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2005, 144 (3): 224 - 231.
- [9] 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.
- [10] Kusakabe M, Zuccarelli M D, Nakamura I, *et al.* Steroidogenic acute regulatory protein in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): cDNA cloning, sites of expression and transcript abundance in corticosteroidogenic tissue after an acute stressor [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2009, 162 (2): 233 - 240.
- [11] Chen S L, Li J, Deng S P, *et al.* Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9 (2): 273 - 280.
- [12] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, *et al.* Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle [J]. *Nature Genetics*, DOI:10.1038/ng.2890
- [13] Yang Y R. The distribution of mex-3 mRNA in *C. elegans* wild type embryos via in situ hybridization [J]. *Journal of Xiamen University*, 2003, 42 (5): 665 - 669. [杨玉荣. 原位杂交检测 mex-3 mRNA 在 *C. elegans* 野生型胚胎发育中的分布. *厦门大学学报*, 2003, 42 (5): 665 - 669.]
- [14] Kusakabe M, Todo T I, Mcquillan J H, *et al.* Characterization and expression of steroidogenic acute regulatory protein and MLN64 cDNAs in trout [J]. *Endocrinology*, 2004, 143 (6): 2062 - 2070.
- [15] Nunez B S, Piermarini P M, Evans A N, *et al.* Cloning and characterization of cDNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein from freshwater stingrays (*Potamotrygon* spp.) [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005, 35 (3): 557 - 569.
- [16] Melcangi R C, Garcia-Segura L M, Mensah-Nyagan A G. Neuroactive steroids; state of the art and new perspectives [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65 (5): 777 - 797.
- [17] 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 Biology, 2009, 154(1): 6 – 11.
- [18] Maugars G, Schmitz M. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parrtestes [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 159 (2): 178 – 187.
- [19] Zhang X Q, Wang X Z, Sun Y, *et al.* Expression of *StAR* mRNA in the early piglet testes [J]. China Biotechnology, 2007, 27(3): 60 – 64. [詹晓庆, 王鲜忠, 孙燕, 等. *StAR* mRNA 在仔猪睾丸组织中的表达研究. 中国生物工程杂志, 2007, 27 (3): 60 – 64.]

Molecular cloning and temporal expression analysis of *StAR* gene in different tissues of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

ZHU Ying^{1,2}, MENG Liang², HU Qiaomu², WANG Xiaoxia², CHANG Yaqing¹, CHEN Songlin^{2*}

(1. College of Fisheries and Life Science, Ocean University of Dalian, Dalian 116023, China

2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: Partial *StAR* gene sequence obtained from whole genome sequencing results of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) and its full-length cDNA sequence were acquired by SMART-RACE. The *StAR* complete cDNA was 1 294 bp in length containing 852 bp open reading frame (ORF) and encoded 283 amino acids, 132 bp 5' un-translated region (5'-UTR) and 310 bp 3' un-translated region (3'-UTR). Alignment analysis of the amino acids sequence with other species showed that *StAR* of *C. semilaevis* was 85% similar to most species of *StAR* including *Solea senegalensis*, *Micropterus salmoides*, *Lateolabrax japonicus* and *Sparus aurata*. In order to study the relative expression of *StAR* gene between females and males, and in different stages of male, we chose the real-time fluorescence quantitative methods. The results indicated that *StAR* mRNA was extremely highly expressed in testis, but was hardly expressed in the ovary of *C. semilaevis*. From 16 days to 66 days, *StAR* gene was not expressed in testis. While 150 days the expression was significantly increased, until sexual maturity, *StAR* mRNA doubled the amount of expression. After the discharge of sperm, the expression declined obviously. This suggests that the gene has great function in the development of testis. To determine the temporal *StAR* expression, we chose the method of *in situ* hybridization. The result showed that *StAR* mRNA was expressed in sperm cells of testis. Our results showed that *StAR* gene played important roles in the testis maturation and displayed great function during the period of sperm formation.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; *StAR* gene; cloning; real-time PCR; *in situ* hybridization

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn