

大黄鱼 *hsd17b1* 基因克隆、表达分析及启动子活性

杨强^{1,2}, 韩芳^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 克隆了大黄鱼 *hsd17b1* 基因, 并对其表达模式及启动子活性进行了详细分析。结果表明, 该基因开放阅读框长 873 bp, 编码 290 个氨基酸; 其 mRNA 在大黄鱼不同性别和组织中的表达呈现显著的性别二态性, 主要在卵巢中表达; 通过预测启动子区域, 发现多个转录因子的结合位点, 进一步通过双萤光素酶报告基因实验鉴定了核心启动子区域为 -150 ~ 17 bp。这些发现提示大黄鱼 *hsd17b1* 基因可能在性类固醇激素合成及性别分化过程中发挥重要作用。

[关键词] 大黄鱼; 性类固醇激素; *hsd17b1* 基因; 表达分析; 启动子活性

[中图分类号] S 963

Cloning, Expression, and Promoter Activity Analysis of the *hsd17b1* Gene in *Larimichthys crocea*

YANG Qiang^{1,2}, HAN Fang^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, Xiamen 361021, China)

Abstract: The *hsd17b1* gene was cloned and its expression pattern as well as promoter activity were analyzed. The open reading frame(ORF) of *Lchsd17b1* is 873 bp in length, encoding 290 amino acids. qRT-PCR analysis revealed that *Lchsd17b1* is broadly expressed in all examined tissues from both sexes, with the highest expression observed in the ovary. Bioinformatic predictions of transcription factor binding sites(TFBSs) identified multiple binding sites in *Lchsd17b1*. A dual luciferase assay demonstrated that the deletion mutant from -150 bp to 17 bp of the *Lchsd17b1* promoter exhibited the highest promoter activity. These findings suggest that *Lchsd17b1* plays a critical role in the synthesis of sex steroid hormones and sex differentiation.

Keywords: large yellow croaker(*Larimichthys crocea*); sex steroid hormone; *hsd17b1* gene; expression analysis; promoter activity

0 引言

大黄鱼, 俗称黄瓜鱼或黄花鱼, 隶属于鲈形目(Perciformes)石首鱼科(Sciaenidae)黄鱼属(*Larimichthys*)。2022年全国大黄鱼养殖产量为25.77万t, 在全国海水养殖鱼类中位列首位^[1]。在人工养殖条件下, 大黄鱼展现出明显的雌雄生长二态性, 其中雌鱼的生长速度和成熟体重显著优于雄

[收稿日期] 2024-04-08

[基金项目] 国家海水鱼产业技术体系(CARS-47-G04); 国家自然科学基金面上项目(32072969); 福建省自然科学基金项目(2022J01325); 宁波市科技计划项目(2021Z002); 温州市农业新品种选育协作组项目(2019ZX002)

[通信作者] 王志勇(1963—), 教授, 博导, 从事水生生物遗传育种与生物技术方向研究。E-mail: zywang@jmu.edu.cn

鱼,通过性别控制进行单性化育种能够提升养殖效益,受到业者期待。性别分化过程主要受遗传因素影响,因此对性腺发育分化相关的分子基础进行研究具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

在鱼类中,性别决定基因对性别分化起着至关重要的作用。迄今为止,研究人员已发现多种鱼类的性别决定基因,如日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 *dmy* 基因^[2]、金钱鱼 (*Scatophagus argus*) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 的 *dmrt1*^[3-4] 基因、吕宋青鳉 (*Oryzias luzonensis*) 的 *gsdfY*^[5] 基因、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*) 的 *amh*^[6] 基因以及银汉鱼 (*Odontesthes hatcheri*) 的 *amhy*^[7] 基因等。值得注意的是,这些性别决定基因绝大部分都是雄性性别决定基因。

性类固醇激素在鱼类性腺的分化和维持过程中发挥着至关重要的作用,还影响着鱼类的生长发育、免疫响应以及应激反应等生理过程。其内源性性类固醇激素的合成涉及多种催化酶,其中 17 β -羟类固醇脱氢酶 (17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD) 是在性激素合成途径下催化产生活性形式性激素 (如睾酮和雌二醇) 的关键酶。

在人类中, *HSD17b1* 作为 17 β 羟类固醇脱氢酶家族的首个被发现的基因,相关研究已相对深入。研究表明, *HSD17b1* 与多种雌激素合成疾病有关,包括乳腺癌^[8]、子宫癌^[9] 和上皮性卵巢癌^[10] 等。在鱼类中, *hsd17b1* 的研究同样引起了关注,目前已在日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)^[11]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[12]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[13] 和尼罗罗非鱼^[14] 等鱼类中成功克隆了 *hsd17b1* 基因的核苷酸序列,并在这些鱼类中发现, *hsd17b1* 基因的表达与性激素的合成密切相关。有研究发现,日本鳗鲡的 *hsd17b1* 基因过表达于 HEK 293 细胞后,其功能是把雌酮 (E1) 转化为雌二醇 (E2)^[11]; 同样地,在尼罗罗非鱼中通过酶活性实验检测 *hsd17b1* 的重组蛋白可以高效催化 E1 与 E2 的转化^[14]。但在大黄鱼中尚未见到该基因的研究报道。深入了解 *hsd17b1* 基因的结构、功能和调控机制,将有助于阐明大黄鱼性别发育与分化的分子机理,为大黄鱼性别控制的研究与实践提供理论参考和指引。本实验室前期在大黄鱼早期性腺转录组研究中发现, *hsd17b1* 基因在雌鱼早期卵巢中优势表达^[15],提示其在大黄鱼性腺分化和卵巢发育中具有重要作用。本研究拟分析 *hsd17b1* 基因分子特征,预测蛋白结构与功能,构建表达图谱,确定启动子核心区域,为揭示 *hsd17b1* 基因在大黄鱼性类固醇激素合成中的作用机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的大黄鱼样本于 2022 年 3 月在浙江省温州市洞头基地采集,每尾鱼的体重约为 (500 \pm 50) g。实验中的所有动物操作均遵循了集美大学水产学院动物伦理委员会的相关规定与要求。

1.2 实验试剂

RNA 提取所需的试剂盒 (TransZol Up Plus RNA Kit) 购买自北京全式金生物技术有限公司;逆转录所需的试剂盒 (GoScriptTM Reverse Transcription System Protocol) 由上海泰京生物技术有限公司提供;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒与无内毒素质粒小量提取试剂盒均来自北京天漠科技开发有限公司;高保真酶 (2 \times Phanta^R Max Master Mix)、一步克隆试剂盒 (ClonExpress^R II One Step Cloning Kit) 以及荧光定量染料 (ChamQTM Universal SYBRa^R qPCR Master Mix) 由南京诺唯赞生物科技股份有限公司供应。实验中使用的 pcDNA3.1 载体、萤火虫 pGL3-basic 载体菌株、海肾 pRL-TK 内参载体菌株均为本实验室收藏。胎牛血清由 Gibco 公司提供; Lipo8000TM 转染试剂与双萤光素酶报告基因检测试剂盒由上海碧云天生物技术有限公司供应。所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 大黄鱼样品采集

分别捕捉雌雄大黄鱼各 3 尾,使用丁香酚进行麻醉处理后,将鱼体置于冰上。随后,剪取鱼鳍并保存于 95% 的酒精中,放入 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱内,用于后续的基因组 DNA 提取。接着,依次采集心脏、

脑、脾脏、性腺、肝脏和肾脏 6 种组织样本,并将它们置于 RNA 保护液中,存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱内,待后续提取总 RNA 时使用。

1.3.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

使用 RNA 提取试剂盒,按说明书的操作步骤提取大黄鱼组织样品中的总 RNA;使用逆转录试剂盒,按说明书的操作步骤合成 cDNA 的第一条链。用大黄鱼管家基因 β -actin 检测反转录效果。

1.3.3 大黄鱼 *hsd17b1* 基因的克隆及启动子不同长度片段构建

从本实验室的大黄鱼基因组测序数据库中获得了 *hsd17b1* 基因的开放阅读框 (ORF) 序列,并据之设计了特异性引物 *hsd17b1*-F/R (见表 1),使用大黄鱼性腺 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。扩增得到的 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行验证,随后使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段并将其克隆入 pcDNA3.1 质粒中,待转化入大肠杆菌 *DH5 α* 感受态细胞后,挑选阳性菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。利用 DNAMAN 软件对测序结果与参考序列进行比对分析,并运用 Primer Premier 5.0 软件设计了荧光定量 PCR 引物 q-*hsd17b1*-F/R,用于后续的表达分析。

表 1 本研究中使用的引物

Tab.1 Primers used in the present study

引物名称	序列(5'-3')	作用
<i>hsd17b1</i> -F	taagcttgcggccgc <u>GAATTC</u> ATGGACAAGAAGGTTGTACTCATCAC	ORF 扩增
<i>hsd17b1</i> -R	ttttagtcagcccg <u>GGATCC</u> ATTGTTCTCAGCTGAGAAAATGAT	
β -actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
β -actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	
q- <i>hsd17b1</i> -F	AATGCTGGTGTGGGTTTGATGGG	
q- <i>hsd17b1</i> -R	AAAGCCTGGATGCTTTGGATGGTAC	
P- <i>hsd17b1</i> -R	atcgcagatctcgag <u>CCCGGG</u> GAGCCGAATGTTCTGCTTCA	启动子核心区引物
P1- <i>hsd17b1</i> -F	atttctctatcgata <u>GGTACC</u> TGTATAGGAAAACGCTCATGGGA	
P2- <i>hsd17b1</i> -F	atttctctatcgata <u>GGTACC</u> TTACTGTATCATAACACAATTTAAAGAAAAAT	
P3- <i>hsd17b1</i> -F	atttctctatcgata <u>GGTACC</u> ATAGTGTGCTCGAAGACTGATGGTA	
P4- <i>hsd17b1</i> -F	atttctctatcgata <u>GGTACC</u> AAAAAAGAACTTCCAATATATCTTCAAGTG	
P5- <i>hsd17b1</i> -F	atttctctatcgata <u>GGTACC</u> AAAAACATTGGAGGATTCCAGG	

注:划线部分为酶切位点;划线前为质粒酶切位点前的同源序列;F—上游引物,R—下游引物。

为了鉴定大黄鱼 *hsd17b1* 基因的启动子核心区域,从本实验室大黄鱼基因组数据库中获取了 *hsd17b1* 基因的候选启动子序列,并以大黄鱼鳍条所提取的基因组 DNA 作为模板,通过 PCR 扩增获得了 *hsd17b1* 基因的候选启动子序列。设计一系列不同长度的引物 (P1-P5-*hsd17b1*-F 和 P-*hsd17b1*-R),并在引物的上下游分别加入了与 pGL3-basic 载体相兼容的 *Kpn* I (GGTACC) 和 *Sma* I (CCCGGG) 酶切位点序列以及同源片段,以此构建不同长度的 *hsd17b1* 启动子片段,进一步分析其活性。

1.3.4 实时荧光定量 PCR

为了了解 *hsd17b1* 基因在大黄鱼各组织中的表达模式,根据 *hsd17b1* 的 cDNA 序列设计了特异性引物 q-*hsd17b1*-F/R。使用稀释 50 倍的 cDNA 作为模板,选择大黄鱼的 β -actin 基因为内参基因,采用 ChamQTM Universal SYBR^R qPCR Master Mix 进行荧光定量 PCR 分析。反应体系共 20 μL ,包括 10.0 μL 的 ChamQTM Universal SYBR^R qPCR Master Mix, 0.5 μL 的 q-*hsd17b1*-F/R 引物, 4.0 μL 的 cDNA 模板,补充 ddH₂O 至总体积。每个组织样品进行了 3 个生物学重复和 3 个技术重复,以确保数据可靠稳定。荧光定量 PCR 在 StepOnePlus 系统上进行,扩增程序设置为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s (40 个循环)。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[16] 计算每个样品的目的基因相对表达量。

1.3.5 大黄鱼 *hsd17b1* 基因启动子双萤光素酶报告基因活性检测

用双萤光素酶报告基因系统评估 *hsd17b1* 启动子的活性。当 HEK293T 细胞密度达到 2×10^6 个/孔时, 将细胞接种到含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基的 24 孔板中, 并在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的条件下培养过夜。在细胞密度达到 80%~90% 时, 使用 Lipo8000™ 转染试剂将构建好的重组质粒 *hsd17b1*-P1 ~ P5 和内参质粒 pRL-TK 以 40:1 的比例转染入 HEK293T 细胞。以 pGL3-Basic 载体作为空白对照, 24 h 后收集细胞进行双萤光素酶荧光检测。每个样品设置了 3 个技术重复, 采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (ANOVA) 和 Tukey 多重比较, 评估样品间报告基因萤光素酶活性的差异性。所有数据均表示为平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE), $P < 0.05$ 视为具有显著性差异, $P < 0.01$ 视为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 *hsd17b1* 基因的结构

大黄鱼 *hsd17b1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长度为 873 bp, 编码 290 个氨基酸, 相对分子质量为 31.73 ku, 理论等电点为 6.04。大黄鱼 Hsd17b1 蛋白含有信号肽序列, 但不具备跨膜结构, 有 28 个磷酸化位点, 包括 17 个丝氨酸 (Ser)、9 个苏氨酸 (Thr) 和 2 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点 (见图 1)。

```

1  ATGGACAAGAAGGTTGTACTCATCACAGGTTGCTCCTCAGGAATTGGTCTCAGCCTGGCT
1  M D K K V V L I T G C S S G I G L S L A
61  GTTCGGCTAGCCTCTAATCCCGACAAAACATTTAAAGTCTATGCCACGATGAGAAACCTG
21  V R L A S N P D K T F K V Y A T M R N L
121  GCCAAGAAGGAGCGTCTTTAGAGAGTGTAAAGCGCTGCACAGATACCTTGGACATA
41  A K K E R L L E S V K G L H R D T L D I
181  CTCCAGATGGACGTGACCGGCTGGCAGTCCATCCTGGATGCGAGGGACAGGGTTGTGGAG
61  L Q M D V T G W Q S I L D A R D R V V E
241  AAACGAGTGGACATTCTGGTGTGCAATGTGGTGTGGGTTTGTATGGGGCCGCTGGAGGTG
81  K R V D I L V C N A G V G L M G P L E V
301  CAGTCTTGGACTCAATGAGGCAGATTCTAGAGGTCAACCTCCTTGGTACCATCCAACC
101  Q S L D S M R Q I L E V N L L G T I Q T
361  ATCCAGGCTTTCTGCCGGACATGAAGGCTCAGGGCAAGGGCCGATTCTAGTCACTGGC
121  I Q A F L P D M K A Q G K G R I L V T G
421  AGCATGGGGGGGTTTCATGGTCTTCTTTAATGAGGTGTAAGTGTCCAGTAAATTTGCA
141  S M G G L H G L P F N E V Y C A S K F A
481  ATAGAGGGAGCATGTGAGAGTTTGGCTGTCCCTCCTGCAACACTTCAATATCCATGTGAGT
161  I E G A C E S L A V L L Q H F N I H V S
541  CTCATTGAGTGTGGTCCGGTCAACACTGACTTCTGGTCAACCTGCAGAAGGCAGAGCTC
181  L I E C G P V N T D F L V N L Q K A E L
601  GGGGATGCGTCTCCAACAAGTTGATACCCAGACACTCGGCCCTTATGAAAAACCTG
201  G D A S L Q Q V D T Q T L G L Y E K Y L
661  CAGCACTGTGGCTGTGTTTTCCAAAATGCAGCACAAGACACAGAGGACATTGTAAGGTA
221  Q H C G S V F Q N A A Q D T E D I V K V
721  TTTCTCGAGGCCATCCAGTCACCCAGCCCTGCATTAGATACTTACCAGCGGTGTCATG
241  F L E A I Q S P S P A F R Y F T S G V M
781  CCACCTCTCGCCAAACTGAAGATCACTGAACCAGATGGCTCGCGGTACATCAGTGCCATG
261  P P L A K L K I T E P D G S R Y I S A M
841  GGCAAAATCATTCTCAGCTGAGGAACAATAA
281  G K I I F S A E E Q *

```

蓝色阴影部分表示该基因的结构域; 下划线部分表示信号肽; 红色框表示酪氨酸(Tyr)磷酸化位点; 绿色框表示丝氨酸(Ser)磷酸化位点; 紫色框表示酪氨酸(Tyr)磷酸化位点; 终止密码子用(*)表示。

图 1 大黄鱼 *hsd17b1* 基因 ORF 区序列及其氨基酸序列

Fig.1 The ORF and amino acid sequence of *hsd17b1* gene in *L. crocea*

蛋白质结构域分析预测出 Hsd17b1 含有一个 KR 结构域 (见图 2), 使用 Swiss Model 预测了 Hsd17b1 的三级结构, 发现其由多个 α 螺旋、 β 折叠与无规则卷曲构成 (见图 3)。同源性分析表明, 大黄鱼 Hsd17b1 与棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 的 Hsd17b1 同源性最高, 达到 100 %; 其次是钻嘴鱼 (*Chelmon rostratus*) 和庸鲽 (*Hippoglossus hippoglossus*), 同源性为 96.21 % (见表 2)。系统进化树分析显示, 鱼类、两栖类和哺乳类的 Hsd17b1 各自聚为一支, 反映了物种间的进化关系, 其中大黄鱼 Hsd17b1 与棘头梅童鱼的亲缘关系最近 (见图 4)。

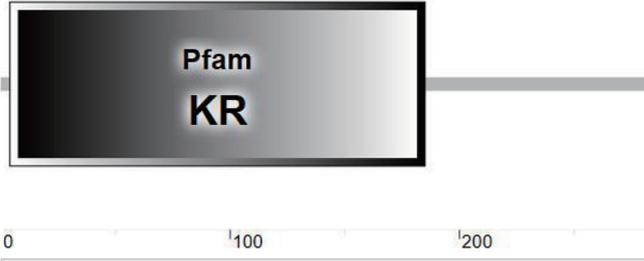


图 2 大黄鱼 Hsd17b1 蛋白的结构域分析
Fig.2 Analysis of the protein domain of Hsd17b1 in *L. crocea*

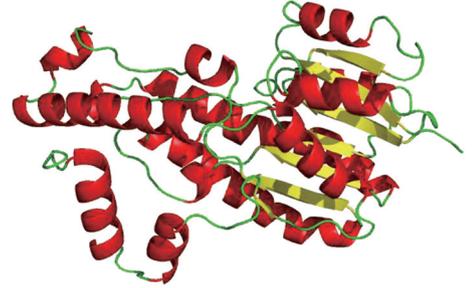


图 3 大黄鱼 Hsd17b1 蛋白的三级结构
Fig.3 Tertiary structure of Hsd17b1 protein in *L. crocea*

表 2 大黄鱼 Hsd17b1 与其他物种氨基酸序列的同源性分析

Tab.2 Homology analysis of Hsd17b1 amino acid sequences between *L. crocea* and other species

GenBank 登录号	物种	相似度/%	GenBank 登录号	物种	相似度/%
TKS92201.1	棘头梅童鱼 (<i>Collichthys lucidus</i>)	100.00	XP_019950004.1	牙鲆(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	92.69
XP_041813282.1	钻嘴鱼(<i>Chelmon rostratus</i>)	96.21	XP_033501630.1	鞍带石斑鱼 (<i>Epinephelus lanceolatus</i>)	91.42
XP_034449095.1	庸鲽(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	96.21	AAI63709.1	斑马鱼(<i>Danio rerio</i>)	84.90
XP_036944924.1	黄鳍棘鲷(<i>Acanthopagrus latus</i>)	95.86	XP_018107456.1	非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>)	77.74
XP_035511159.1	条纹狼鲈(<i>Morone saxatilis</i>)	95.52	EAW60836.1	人(<i>Homo sapiens</i>)	65.49
XP_049925401.1	云纹石斑鱼(<i>Epinephelus moara</i>)	95.52	EDL03877.1	小鼠(<i>Mus musculus</i>)	60.06

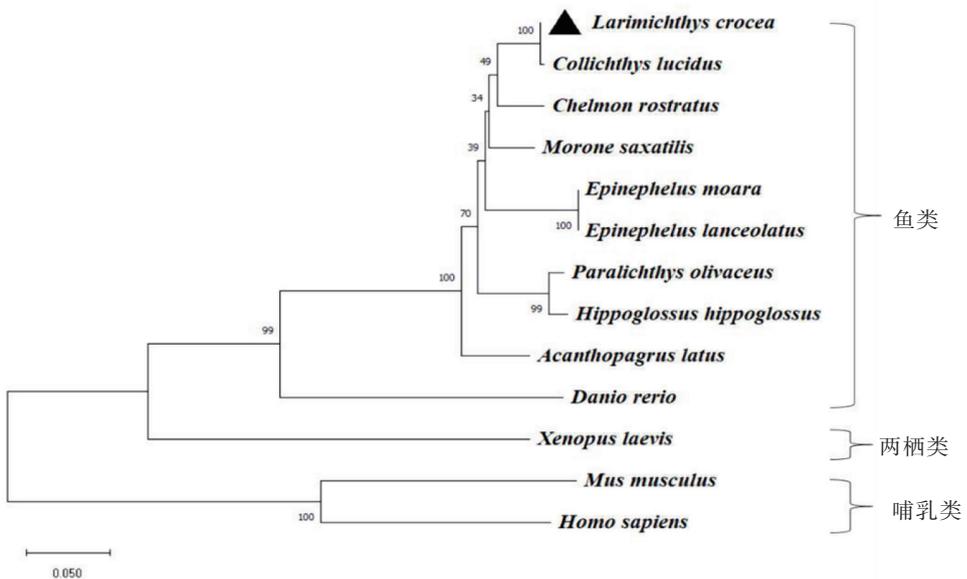


图 4 大黄鱼 Hsd17b1 与其他物种 Hsd17b1 的系统进化分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of Hsd17b1 between *L. crocea* and other species

2.2 *hsd17b1* 基因在大黄鱼雌鱼和雄鱼的组织表达分析

以 β -actin 基因作为内参, 采用 qRT-PCR 技术检测了大黄鱼 *hsd17b1* 基因在不同组织中的表达情况。结果显示, *hsd17b1* 基因的 mRNA 表达呈现显著的性别二态性, 尤其在卵巢中的表达量远高于精巢。雌性大黄鱼的心脏、肝脏、脾脏、肌肉和肾脏也表现出一定程度的表达, 但与卵巢相比其表达量相对较低; 而在雄性大黄鱼中, 除了精巢外, 心脏、肝脏、脾脏、肌肉和肾脏等组织的表达量均显著低于雌性, 特别是远低于卵巢。

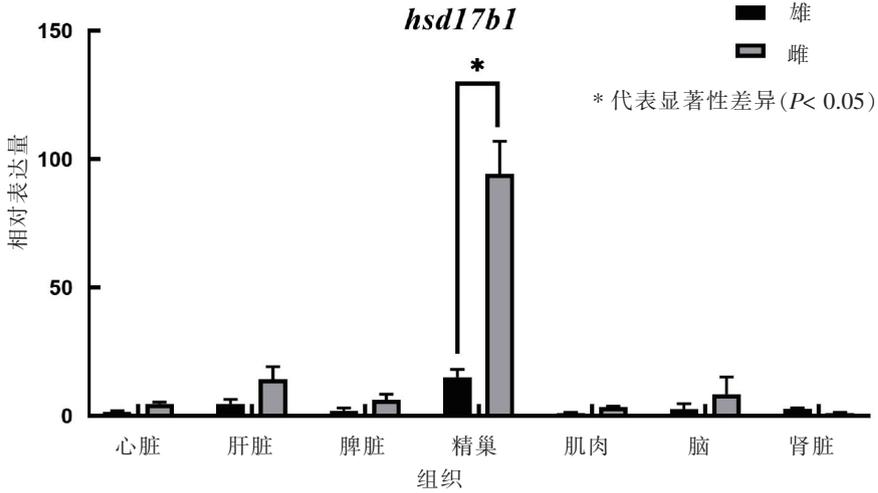


图 5 大黄鱼 *hsd17b1* 基因在各组织中的相对表达量

Fig.5 The relative expression levels of *hsd17b1* gene in various tissues of *L. crocea*

2.3 *hsd17b1* 启动子潜在转录因子结合位点预测

利用在线软件 AliBaba2.1 和 ALGGEN-PROMO 对大黄鱼 *hsd17b1* 启动子区的潜在转录因子结合位点进行预测, 识别出多个潜在的转录因子结合位点, 包括与卵巢发育密切相关的 Sp1 和可以调控性类固醇激素产生的 Sf-1 等 (见表 3), 这些转录因子可能参与 *hsd17b1* 基因的表达调控。

表 3 大黄鱼 *hsd17b1* 基因启动子转录因子结合位点的预测

Tab.3 Prediction transcription factor binding sites in the promoter region of the *hsd17b1* gene in *L. crocea*

转录因子	起始	终止	序列	转录因子	起始	终止	序列
Sp1	-1981	-1972	TAAGAAGGAA	GATA-1	-1257	-1248	GATGAGATAA
	-1636	-1626	TCCAGCCACT		-1490	-1481	GGATTTGCAA
	-1579	-1570	TGGGCCTGGA	C/EBP α	-806	-797	TGCAAACAAA
	-147	-138	TTCCAGGTGG		-110	-101	TGATTGCAAA
	-50	-41	CCCCGTCCTC		-1372	-1364	TGGGCCTTG
NF- κ B	-1689	-1680	AGTCAAATCT	-1031	-1021	CCAGAGGTCAA	
	-1562	-1553	TGGAATTTCT	Sf-1	-559	-549	CTGAAGGTCAG
-1502	-1493	ATTTTATTT	-177		-169	CAAGGACAT	
Oct-1	-1491	-1482	CGGATTTGCA		-119	-111	TTGGCCTTG
	-1022	-1013	AATGTAACCT				

2.4 *hsd17b1* 启动子核心区双萤光素酶报告基因载体构建

在大黄鱼重测序数据库中筛选出 *hsd17b1* 的候选启动子序列, 据此设计大黄鱼 *hsd17b1* 启动子不同长度片段扩增的 5 对引物 (*hsd17b1*-P1 ~5) 并分别进行 PCR 扩增, 使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检

测 (见图6), 将 PCR 产物割胶回收并送去公司测序。结果表明测序结果与数据库中一致。

2.5 *hsd17b1* 启动子核心区双萤光素酶报告基因活性检测

利用双萤光素酶报告基因系统检测了 *hsd17b1* 启动子不同缺失长度片段的相对荧光活性。结果显示, 所构建的不同缺失长度片段的荧光活性均显著高于 pGL3-Basic 空载对照 ($P < 0.05$)。其中: *hsd17b1*-P5 的启动子区域活性最高, 其次是 *hsd17b1*-P3, 两者之间无显著性差异; *hsd17b1*-P1 和 *hsd17b1*-P2 的启动子区域活性显著低于 *hsd17b1*-P5 和 *hsd17b1*-P3 ($P < 0.05$); 而 *hsd17b1*-P4 的启动子区域活性显著低于 *hsd17b1*-P1 和 *hsd17b1*-P2 ($P < 0.05$) (见图7)。

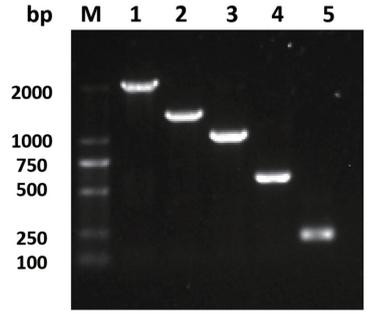


图6 大黄鱼 *hsd17b1* 启动子不同长度缺失片段扩增产物

Fig.6 Amplification of deletion fragments of different lengths at *hsd17b1* promoter in *L. crocea*

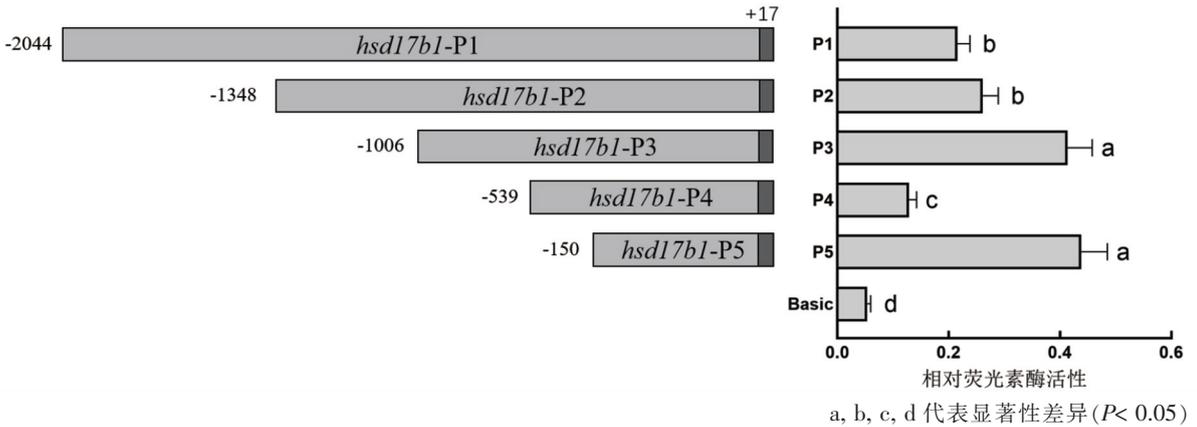


图7 大黄鱼 *hsd17b1* 启动子不同长度缺失片段荧光活性分析

Fig.7 Fluorescence activity analysis of different length deletion fragments of the promoter of *hsd17b1* gene in *L. crocea*

3 讨论

作为 17β -羟类固醇脱氢酶家族的关键成员, *hsd17b1* 基因在性别分化、性腺发育和成熟过程中扮演着至关重要的角色。本研究成功克隆了大黄鱼 *hsd17b1* 基因开放阅读框, 其全长为 873 bp, 编码 290 个氨基酸。通过详细的蛋白质结构和同源性分析, 发现大黄鱼的 Hsd17b1 与其他物种的 Hsd17b1 有较高的相似性, 尤其是与棘头梅童鱼之间的同源性达到 100%。这些发现不仅揭示了 *hsd17b1* 基因在进化过程中的保守性, 也暗示了其在性类固醇激素合成路径中的重要性。

本研究还探讨了 *hsd17b1* 基因在大黄鱼不同性别和组织中的表达模式, 发现其表达具有明显的性别二态性, 主要在卵巢中高表达。这一结果与其他鱼类中的发现相一致, 表明 *hsd17b1* 基因在雌性性腺的性激素合成中可能发挥核心作用^[13]。在早期性别分化时, 有研究发现 *hsd17b1* 基因的表达有助于西伯利亚鲟 (*Acipenserbaerii*) 和鳊鱼 (*Siniperca chuatsi*) 向雌性分化^[18-19]。

此外, 通过分析 *hsd17b1* 启动子区域, 本研究预测到了多个转录因子的结合位点, 主要位于 -150 ~ 17 bp 区域, 其中包括 Sp1、Sf1 等。Sp1 是一种转录激活因子, 可以和启动子中富含 CG 的序列进行特异性结合, 从而激活转录过程^[20-21]。有研究表明, 敲降 Sp1, 可显著抑制原始卵泡的形成, 对卵巢的发育和维持发挥重要作用^[22]。类固醇生成因子 1 (Sf-1) 属于核受体超家族的一员, 也被称为 Ad4BP/NR5a1 或 Ftz-fl^[23-24], 可以直接调控类固醇的产生。在尼罗罗非鱼中, Sf-1 可以与 *cyp19a1* 的

启动子区特异性结合激活 *cyp19a1* 的转录^[25], 同样的在黑鲷中也发现其 *cyp19a1a* 启动子上存在 Sf-1 的结合位点^[26]。自从 Sf-1 被发现以来, 大量研究都表明其主要表达在下丘脑-垂体-性腺轴所涵盖的与内分泌相关的组织器官中, 在脊椎动物中对类固醇的生成起重要作用。Sf-1 也参与肾上腺的生成和性腺发育、性别分化的过程, 并在其中扮演着关键角色^[27-30]。启动子区域存在这些转录因子的结合位点, 提示这些转录因子具有调控 *hsd17b1* 基因表达的作用, 这些转录因子都与性类固醇激素的合成、雌性性腺的发育分化相关。结合 Hsd17b1 蛋白质结构的保守性, 可知大黄鱼 *hsd17b1* 基因在性类固醇激素合成及性别分化过程中发挥着重要作用。

基因在机体内表达调控的过程中会被许多因素所影响, 其中启动子属于基因表达调控过程中的重要作用元件^[31]。通过双萤光素酶报告基因活性检测, 本研究揭示了 *hsd17b1* 启动子区域内存在影响基因表达活性的多个调控元素, 其中 -150 ~ 17 bp 区域为核心启动子区域。这一发现为深入研究阐明 *hsd17b1* 基因表达调控机制提供了重要线索, 对于最终揭示大黄鱼性腺发育与分化的整体调控过程和调控机制以及大黄鱼性别控制研究都有着参考价值。

[参 考 文 献]

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
- [2] MATSUDA M, NAGAHAMA Y, SHINOMIYA A, et al. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish[J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 559-563.
- [3] MUSTAPHA U F, JIANG D N, LIANG Z H, et al. Male-specific *Dmrt1* is a candidate sex determination gene in spotted scat (*Scatophagus argus*) [J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 351-358.
- [4] CHEN S, ZHANG G, SHAO C, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253-260.
- [5] MYOSHO T, OTAKE H, MASUYAMA H, et al. Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis* [J]. *Genetics*, 2012, 191(1): 163-170.
- [6] CÁCERES G, LÓPEZ M E, CÁDIZ M I, et al. Fine mapping using whole-genome sequencing confirms anti-müllerian hormone as a major gene for sex determination in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) [J]. *G3: Genes | Genomes | Genetics*, 2019, 9(10): 3213-3223.
- [7] HATTORI R S, MURAI Y, OURA M, et al. A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(8): 2955-2959.
- [8] ODUWOLE O O, LI Y, ISOMAA V V, et al. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an independent prognostic marker in breast cancer [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(20): 7604-7609.
- [9] CORNEL K M, KRAKSTAD C, DELVOUX B, et al. High mRNA levels of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 correlate with poor prognosis in endometrial cancer [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2017, 442: 51-57.
- [10] WANG R. Expression and role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 5 and 7 in epithelial ovarian cancer [J]. *Université Laval*, 2018, 489: 9-31.
- [11] KAZETO Y, IJIRI S, MATSUBARA H, et al. Cloning of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-I cDNAs from Japanese eel ovary [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 279(2): 451-456.
- [12] MINDNICH R, DELUCA D, ADAMSKI J. Identification and characterization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 215(1/2): 19-30.
- [13] 梁冬冬, 范兆飞, 邹玉霞, 等. 牙鲆 17 β -HSD1 基因克隆及其表达调控的初步研究 [J]. *海洋科学*, 2017, 41(9): 65-73.
- [14] 周林燕. 罗非鱼三种 17 β -羟类固醇脱氢酶 (17 β -HSD1, 17 β -HSD3, 17 β -HSD8) 的克隆、表达及酶活性鉴定 [D]. 重庆: 西南师范大学, 2004.
- [15] 郭一兰. 大黄鱼性别分化期转录组分析与性别决定候选基因 *Dmrt1* 的表达调控研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2024.
- [16] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.

- [17] RAJAKUMAR A, SENTHILKUMARAN B. Molecular cloning and expression analysis of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 12 during gonadal development, recrudescence and after *in vivo* hCG induction in catfish, *Clarias batrachus* [J]. Steroids, 2014, 92:81-89.
- [18] LASALLE A, NORBIS W, VIZZIANO-CANTONNET D. Sex identification of morphologically-undifferentiated *Siberian sturgeon* with statistical analysis of gene expression patterns [J]. Journal of Applied Ichthyology, 2021, 37(6):835-846.
- [19] ZHU Q, HAN C, LIU S, et al. Development and gene expression analysis of gonad during 17 α -methyltestosterone-induced sex reversal in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. Aquaculture Reports, 2022, 23:101049.
- [20] 吴俊, 张雪梅, 贺旭, 等. Sp 样转录因子家族在神经系统发育与疾病中的研究进展 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2014, 22(2):143-147.
- [21] van WIJNEN A J, BIDWELL J P, FEY E G, et al. Nuclear matrix association of multiple sequence-specific DNA binding activities related to SP-1, ATF, CCAAT, C/EBP, OCT-1, and AP-1 [J]. Biochemistry, 1993, 32(33):8397-8402.
- [22] CAI H, LIU B, WANG H, et al. SP1 governs primordial folliculogenesis by regulating pregranulosa cell development in mice [J]. J Mol Cell Biol, 2020, 12(3):230-244.
- [23] LAVORGNA G, UEDA H, CLOS J, et al. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu [J]. Science, 1991, 252(5007):848-851.
- [24] SUN G C, HIROSE S, UEDA H. Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Developmental Biology, 1994, 162(2):426-437.
- [25] WELLER J, SUN G C, ZHOU B, et al. Isolation and developmental expression of two nuclear receptors, MHR4 and β FTZ-F1, in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 31(8):827-837.
- [26] WANG D S, KOBAYASHI T, ZHOU L Y, et al. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 [J]. Molecular Endocrinology, 2007, 21(3):712-725.
- [27] WONG T T, IJIRI S, ZOHAR Y. Molecular biology of ovarian aromatase in sex reversal: complementary DNA and 5'-flanking region isolation and differential expression of ovarian aromatase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*) [J]. Biology of Reproduction, 2006, 74(5):857-864.
- [28] LUO X, IKEDA Y, PARKER K L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation [J]. Cell, 1994, 77(4):481-490.
- [29] PARKER K L, SCHIMMER B P. Genes essential for early events in gonadal development [J]. Annals of Medicine, 2002, 34(3):171-178.
- [30] PARKER K L, SCHIMMER B P. The roles of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 in endocrine differentiation and development [J]. Trends in Endocrinology & Metabolism, 1996, 7(6):203-207.
- [31] 王婧, 李冰, 刘翠翠, 等. 启动子结构和功能研究进展 [J]. 生物技术通报, 2014(8):40.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)