

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.12.009

陈凯利, 班文卓, 唐娜, 等. 中华鳖 *stra8* 基因可变剪切与表达分析及启动子克隆 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(12): 88-98.

中华鳖 *stra8* 基因可变剪切与 表达分析及启动子克隆

陈凯利, 班文卓, 唐娜, 肖其丽, 徐红艳

西南大学 水产学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为明确启动生殖细胞减数分裂的特异标记基因 *stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8) 在中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 生殖细胞发育过程中的调控机制, 通过分析 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中华鳖基因组、转录组数据发现 *stra8* 有 19 种转录异构体 (mRNA), 通过基因克隆、表达定量及启动子片段克隆等技术, 解析其基因特征与功能。结果表明: 中华鳖 *stra8* 包含 10 个外显子和 9 个内含子, 通过 5' 端、3' 端选择性剪切和外显子跳跃等形成 19 种 mRNA, 翻译形成 5 种不同的多肽序列; 定量结果显示 *stra8* 在性腺中特异表达且精巢表达量高于卵巢; 编码第 4 号多肽序列的 mRNA 表达水平最高, 可能作为主要行使功能的转录本。克隆获得的 *stra8* cDNA 片段长 1 113 bp, 包含 54 bp 的 3' 端非编码区和 1 059 bp 的开放阅读框。开放阅读框编码氨基酸 352 个, 其 N 端含有保守的 HLH 结构域且 C 端含有 3 个 BOX 结构域。中华鳖与爬行类 *Stra8* 序列一致性高于 80%, 但与硬骨鱼类 *Stra8* 序列一致性仅为 30%。此外, 克隆获得的 1 052 bp 启动子片段含 TATA box 及 RAR/RXR、Sp1 等转录因子结合位点, 表明其转录可能受视黄酸信号及多因子协同调控。

关键词: 龟鳖类; 减数分裂启动; 选择性剪切; 组织表达; 转录因子结合位点

中图分类号: Q785; S917.4

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2025)12-0088-11



Analysis and Identification of Alternative Splicing and Expression of *stra8* Gene and Its Promoter in Chinese Soft-Shell Turtle (*Pelodiscus sinensis*)

CHEN Kaili, BAN Wenzhuo, TANG Na, XIAO Qili, XU Hongyan

College of Fisheries, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: *Stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8) is a specific marker gene that initiates meiosis in germ

收稿日期: 2025-02-25

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0325); 西南大学研究生科研创新项目(SWUS23144); 西南大学大学生创新创业训练计划项目(X202510635473)。

作者简介: 陈凯利, 博士, 副教授, 主要从事水产经济动物生殖发育研究。

通信作者: 徐红艳, 博士, 教授。

cells and plays a crucial role in the transition from mitosis to meiosis. To elucidate the role of the *stra8* gene in the germ cell development of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*), based on the genomic and transcriptomic databases from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), we preliminarily found that alternative splicing exists in *stra8* gene, resulting in multiple transcript isoforms. To identify the most representative transcript and its encoding protein, we characterized the gene structure, detected mRNA expression levels by using quantitative PCR, and cloned both the *stra8* gene and its promoter sequence via PCR technology. The results showed that the *stra8* gene in *P. sinensis* comprised 10 exons and 9 introns, generating 19 mRNA isoforms by 5' end alternative splicing, 3' end alternative splicing, and exon skipping events, thus a total of 5 kinds of polypeptide sequences were predicted to be translated. *Stra8* was specifically expressed in the gonads with higher expression levels in testes than in ovaries. Notably, the transcript encoding the fourth polypeptides sequence exhibited the highest expression, indicating it may be used as main functional transcript. Furthermore, the cloned cDNA fragment of *stra8* was 1 113 bp in length, including a 54 bp 3' untranslated region and a 1 059 bp open reading frame, encoding 352 amino acids. The amino acid sequence contained a conserved HLH domain at the N terminus and three BOX domains at the C terminus, which shared over 80% identity with reptiles' homologous proteins, but only 30% identity with those of bony fishes. Additionally, we obtained a 1 052 bp *stra8* promoter fragment, which contained a TATA box promoter core element and binding sites for transcription factors such as RAR/RXR and Sp1, indicating that the transcription of *stra8* may be regulated by retinoic acid signal and multiple factors.

Key words: turtle; meiosis initiation; alternative splicing; tissue expression; transcription factor binding sites

爬行动物中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)隶属于龟鳖目鳖科鳖属,进化分支位于动物的中间位置,是物种进化和发育生物学研究的重要模式物种。中华鳖因其营养丰富、药用价值高成为我国两栖爬行类水产品中养殖规模最大的经济物种^[1]。近年来,随着对珍稀野生动物种质资源的收集保护、集约型规模化养殖以及人工杂交、胚胎移植等繁殖调控技术的普遍应用,对中华鳖产业提出了更精准可控的发展要求。生殖细胞作为遗传信息传递的唯一途径,通过减数分裂产生单倍体配子,将遗传信息代代相传,是物种优良性状传递的载体^[2-3]。因此,深入了解和探讨中华鳖生殖细胞发育分化机制尤为重要。

Stra8 (Stimulated by retinoic acid gene 8)是启动生殖细胞减数分裂的特异标记基因,在有丝分裂向减数分裂转变的过程中发挥重要作用^[4]。*Stra8* 基因首先在小鼠(*Mus musculus*)中被鉴定出来^[5],随后在人(*Homo sapiens*)^[6]、猪(*Sus scrofa*)^[7]等其他哺乳动物和鸡(*Gallus gallus*)^[8]等鸟类以及南方鲇(*Silurus meridionalis*)^[9-10]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[11]等硬骨鱼类中也发现了其同源基因。在哺乳动物中,*stra8* 的表达受视黄酸(RA)诱导^[12]。视黄酸进入细胞核后,结合其特异性核受体(RARs)和视黄酸 X 受体(RXR)形成异二聚体,该异二聚体再结合 *stra8* 启动子上的视黄酸反应元件(RAREs)调控 *stra8* 的表达^[13-15]。通过对 *stra8* 启动子上 RAREs 进行突变和缺失,明确了 RAREs 是 RA 诱导 *stra8* 表达的重要元件^[3]。在小鼠胚胎卵巢中,RA 通过诱导 *stra8* 在雌性生殖细胞中启动减数分裂^[16-18]。在胚胎睾丸中,视黄酸降解酶(Cyp26b1)通过降解 RA 阻断 RA 信号,使 *stra8* 表达缺失。13.5 d 后胚胎中 Cyp26b1 的表达逐渐降低,Nanos2 被激活并抑制 *stra8* 的表达,从而阻止雄性生殖细胞启动减数分裂^[15, 17]。在出生后至成年的睾丸中,精原细胞附近的支持细胞产生 RA,诱导 *stra8* 表达促使精原细胞增殖和分化^[19]。

可变剪切又叫选择性剪切,在真核生物中普遍存在,指基因在转录后和 mRNA 形成前,被剪切形成不同的 mRNA 异构体,而这些 mRNA 异构体可能被翻译成不同的蛋白质构体。选择性剪切主要有以下 5 种方式:外显子跳跃、外显子互斥、5'端选择性剪切、3'端选择性剪切、内含子保留^[20]。选择性剪切在真核生物的生殖繁殖、信号传导等过程中发挥重要的生物学作用。前期研究发现中华鳖 *stra8* 基因存在选择性剪切现象,本研究通过对中华鳖基因组和转录组中获取的 *stra8* 序列进行分析,

发现其有 19 个剪切体。首先分析 *stra8* 基因结构和选择性剪切类型以及不同剪切体的转录表达水平, 以获得该基因主要行使功能的转录本; 接着通过 PCR 克隆得到该基因的 cDNA 片段和启动子序列并对其进行生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究供试中华鳖购自重庆市某中华鳖养殖场。暂养后随机选取健康的 1 冬龄雌、雄中华鳖各 3 只, 经酒精消毒后在无菌环境中采用 MS222 麻醉, 然后放血解剖。收集雌、雄性的中华鳖心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、卵巢和精巢组织, 将其迅速在液氮中冷冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于 RNA 的提取。

1.2 中华鳖组织 DNA 和总 RNA 提取及 cDNA 合成

中华鳖总 RNA 和 DNA 的提取采用 Trizol 法。将保存的中华鳖组织(心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑、卵巢和精巢)经冷冻研磨后, 加入 Trizo RNAiso Plus(Takara)进行总 RNA 提取, 使用 TIANamp Genomic DNA Kit(Tiagen)提取 DNA, 方法参考说明书。提取的 RNA 和 DNA 用 NanoDrop 2000 微量分光光度计和 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 以确定其浓度和质量。质检合格的 RNA 使用 Takara PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser Kit 反转录获得 cDNA(用于 RT-PCR 和 RT-qPCR), 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 *Stra8* 基因在中华鳖不同组织中的表达分析

为了明确中华鳖 *stra8* 基因不同转录本的组织表达情况, 根据 NCBI 中 *stra8* 的序列, 设计 RT-PCR 定量引物, 选择中华鳖的 *ef1a* 作为内参基因, 引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系为: 上、下游引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ Taq Master Mix(Tiagen) $10\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $7.4\text{ }\mu\text{L}$, 模板 cDNA $1\text{ }\mu\text{L}$, 共 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, 第 2—4 步进行 35 个循环。PCR 产物用 2% 琼脂糖电泳检测。

表 1 本研究 PCR 所用相关引物

名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp	用途
Ps <i>stra8</i> -rt-F	CCAGCCACTTCGTCTCCTGATC	196	RT-PCR
Ps <i>stra8</i> -rt-R	GACTGCAGTACTGCAAGACGCTG		
P <i>sef1a</i> -F	ACTCGTCCAAGTACAAGCCTC	253	RT-PCR/RT-qPCR
P <i>sef1a</i> -R	CACGGCGAACATCTTTCACAG		
Ps <i>stra8</i> -qrt-F1	CCTCGAGGACTCATCTGATCTG	347	RT-qPCR
Ps <i>stra8</i> -qrt-R1	CAACGTACCCAAAGTCTGCTCCA		
Ps <i>stra8</i> -qrt-F2	CCTCGAGGACTCATCTGATCTG	347	RT-qPCR
Ps <i>stra8</i> -qrt-R2	GAAGGACTCCAAAGTCTGCTCCA		
Ps <i>stra8</i> -qrt-F3	GAAGAGAGCTGGATAGAAATGCTT	171	RT-qPCR
Ps <i>stra8</i> -qrt-R3	GTTGAAGAGTCCTGCCAGTGTA		
Ps <i>stra8</i> -qrt-F4	AGCTGGAGCAGACTTTGGGTAC	261	RT-qPCR
Ps <i>stra8</i> -qrt-R4	GATCAGGAGACGAAGTGGCTGG		
Ps <i>stra8</i> -qrt-F5	CAGCATCAAAGAGTCCTTCAATCTGG	233	RT-qPCR
Ps <i>stra8</i> -qrt-R5	GATCAGGAGACGAAGTGGCTGG		
Ps <i>stra8</i> -F	ATGGAGACATCTGGTACTGTAGC	1 113	cDNA 克隆
Ps <i>stra8</i> -R	CATGCATGTTAAGCAGAGCTCTG		
pPs <i>stra8</i> -F	TGTTGCAGACCGCACTGTC	1 052	启动子克隆
pPs <i>stra8</i> -R	GCAGCAACTTCTGCACCTTCAG		

RT-qPCR 采用 CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad, USA)测定。不同转录异构体的特异引物序列见表 1。反应体系为上、下游引物各 0.8 μL , $2\times$ TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 10 μL , ddH₂O 7.4 μL , 模板 cDNA 1 μL , 共 20 μL 。扩增程序为: 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 高温环境中进行 30 s 预变性, 5 s 变性, 随后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 30 s 扩增, 变性与扩增重复 40 个循环。扩增程序结束后, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 10 s 变性, 再按每 0.05 s 升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 的速度, 将反应温度从 65 $^{\circ}\text{C}$ 升到 95 $^{\circ}\text{C}$, 生成溶解曲线。试验设置 3 个生物学重复, 基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算, 使用 SPSS 20.0 对数据进行 Turkey 方差分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 作图。

1.4 中华鳖 *stra8* 基因和启动子克隆

根据 NCBI *stra8* 基因序列, 分别设计 *stra8* 基因克隆和启动子克隆引物(表 1)。基因克隆以中华鳖雌、雄性腺 cDNA 等量混合物为模板, 启动子克隆以提取的 DNA 为模板, 均使用 PrimerSTAR® Max DNA Polymerase(Takara)进行 PCR。PCR 产物采用 rTaq 酶在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min 加 A 后连接 pGEM-T easy 载体, 转化大肠杆菌感受态(Top10)后进行蓝白斑筛选。挑取白色单克隆菌斑在 LB(Luria-Bertani)液体培养基、37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 180 r/min 转速下过夜培养。采用 $2\times$ Taq Master Mix(Tiangen)进行菌液 PCR 后获得阳性克隆, 送重庆擎科生物科技有限公司测序。

1.5 生物信息学在线分析

本研究采用的生物信息学分析软件如表 2 所示。用 Vector NTI 10.0 软件对推导的中华鳖 *Str*a8 氨基酸序列与 NCBI 数据库中其他物种 *Str*a8 的氨基酸序列进行多重比对分析。采用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树, 计算方法为 Neighbour-Joining(NJ), bootstrap 值设置为 1 000。使用 Neural Network Promoter Prediction 预测中华鳖 *stra8* 基因 5'端转录起始位点(TSS); 使用 PROMO、AliBaba 2.1 对潜在转录因子结合位点进行预测。

表 2 生物信息学分析软件

软件名称	软件来源或网站	软件用途
Vector NTI 10.0	https://vector-nti.updatestar.com/	多重序列比对
MEGA 7.0	https://www.megasoftware.net/	构建系统发育树
Neural Network Promoter Prediction	BDGP: Neural Network Promoter Prediction(fruitfly.org)	预测转录起始位点
AliBaba 2.1	Alibaba2(gene-regulation.com)	预测转录因子结合位点
PROMO	ALGGEN- Algorismica i Genetica(upc.es)	

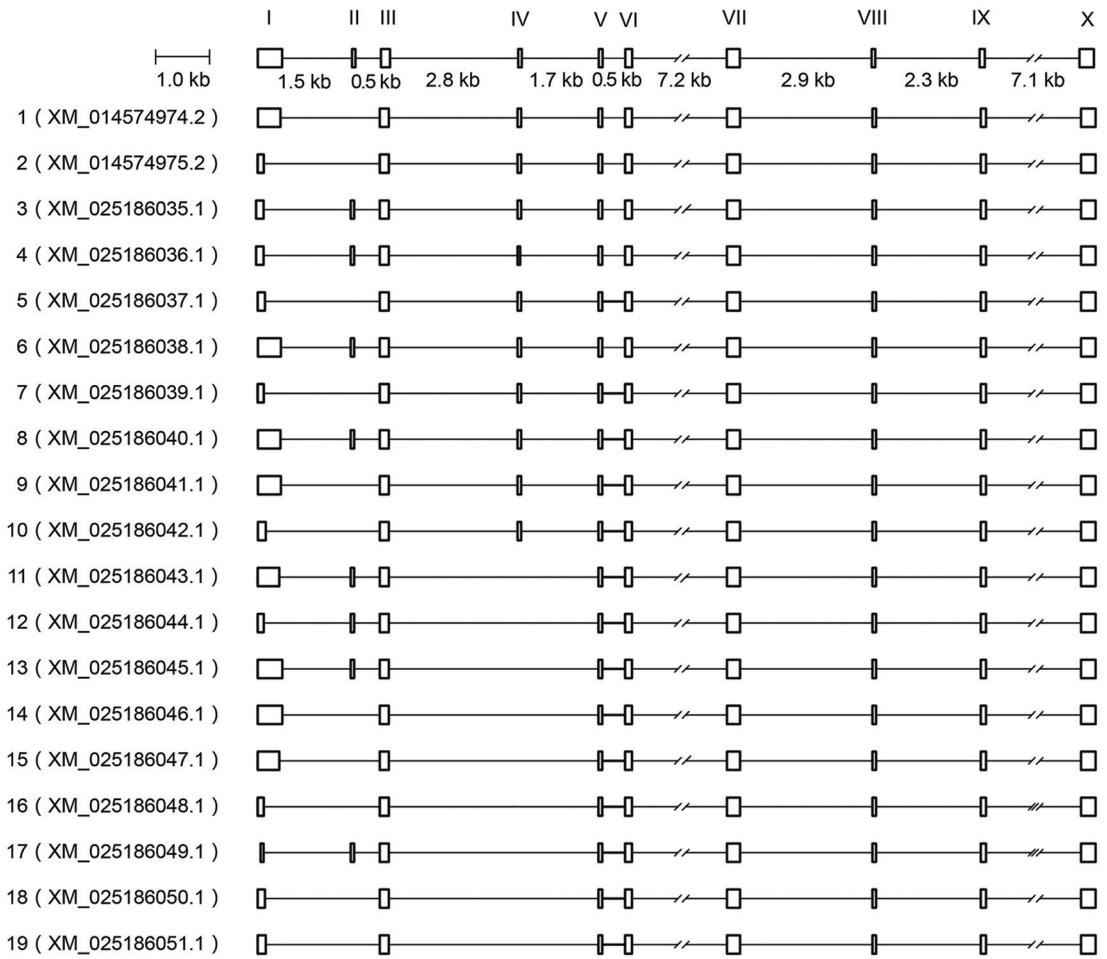
2 结果与分析

2.1 中华鳖 *stra8* 基因可变剪切分析

从 NCBI 数据库中获取了中华鳖 *stra8* 基因的 19 个 mRNA 序列及其参考基因组, 锚定了 *stra8* 基因在基因组序列中的位置, 确定了 *stra8* 基因的 DNA 序列全长为 28 476 bp, 包括 10 个外显子和 9 个内含子(图 1a), 遵循 GT-AG 剪切规律。序列比对发现 *stra8* 基因 19 个转录本的第 III、V-X 个外显子未发生剪切; 第 I 个外显子在第 2—5、7、10、12、16、18、19 号转录本上发生了 3'端选择性剪切, 在第 17 号转录本上既发生了 5'端选择性剪切又发生了 3'端选择性剪切; 第 II 个外显子在第 1、2、5、7、9、10、14、16、18、19 号转录本中发生了跳跃; 第 IV 个外显子在第 11—19 号转录本发生了跳跃, 且仅在第 4 号转录本发生 3'端选择性剪切。由此可见, *stra8* 基因主要发生了 5'端和 3'端选择性剪切以及外显子跳跃等剪切事件。

2.2 中华鳖 *stra8* mRNA 的组织特异性表达

为挖掘出 *stra8* 主要行使功能的转录本和相应的多肽序列, 首先对 *stra8* 不同转录本编码的氨基酸序列进行比对, 结果发现 19 个转录本共翻译 5 种多肽序列: 第 3 号转录本编码第 1 种多肽序列, 第 4 号转录本编码第 2 种多肽序列, 第 5 号转录本编码第 3 种多肽序列, 第 1、2、6—10 号转录本编码第 4 种多肽序列, 第 11—19 号转录本编码第 5 种多肽序列(图 1b)。由图 1b 可见, 第 5 种多肽序列 N 端不再具有典型的 HLH 结构域。



a. 中华鳖 *stra8* 基因 19 个转录本的可变剪切示意图

1	MLLGGGGSTRELFWGSCGRGWAVGTGGLEPVGPEGCSAETPEASSPSRTHLICNSQWVFSQCIQWQFGPLKKQLL	METSGDCSSPCVRVTPGFLTHLQD	100	
2	MLLGGGGSTRELFWGSCGRGWAVGTGGLEPVGPEGCSAETPEASSPSRTHLICNSQWVFSQCIQWQFGPLKKQLL	METSGDCSSPCVRVTPGFLTHLQD	100	
3	MLL	METSGDCSSPCVRVTPGFLTHLQD	27
4	METSGDCSSPCVRVTPGFLTHLQD	24	
5		0	
1	LEPQVARRRLSCARHFAATLAGLFNNLRETVYSQSNNSASKCQVLRKAKNYIQELECPLGTLKMK	ESFNLEDGNPSSLEEVREEYVKMYFSDHSTASPSD	200	
2	LEPQVARRRLSCARHFAATLAGLFNNLRETVYSQSNNSASKCQVLRKAKNYIQELECPLGTLKMK	ESFNLEDGNPSSLEEVREEYVKMYFSDHSTASPSD	193	
3	LEPQVARRRLSCARHFAATLAGLFNNLRETVYSQSNNSASKCQVLRKAKNYIQELECPLGTLKMK	ESFNLEDGNPSSLEEVREEYVKMYFSDHSTASPSD	127	
4	LEPQVARRRLSCARHFAATLAGLFNNLRETVYSQSNNSASKCQVLRKAKNYIQELECPLGTLKMK	ESFNLEDGNPSSLEEVREEYVKMYFSDHSTASPSD	124	
5	MCQGNSTVFPYTSARFGAPGG.....KRTLLSGTTEPYTGRTLCQPAENCIFSYCCFS.....IK	ESFNLEDGNPSSLEEVREEYVKMYFSDHSTASPSD	89	

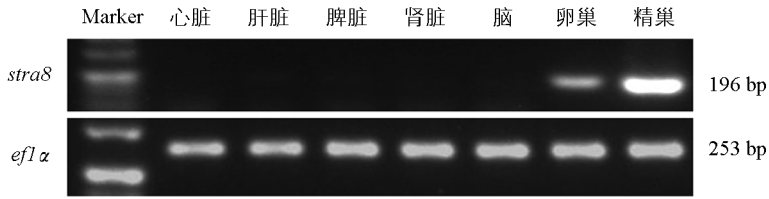
b. 中华鳖 *stra8* 基因推导的部分氨基酸序列比对图

a 中第一列阿拉伯数字为转录本序号及其 NCBI GenBank 登录号; 第一行罗马数字为外显子序号; 矩形框表示外显子, 矩形框间的直线表示内含子及其长度。b 中第一列阿拉伯数字为推导的 5 种中华鳖 *Stras8* 多肽序列序号; 序列为 5 种多肽序列的差异部分; 黑色矩形框所示为 *Stras8* 蛋白 N 端 HLH 结构域。

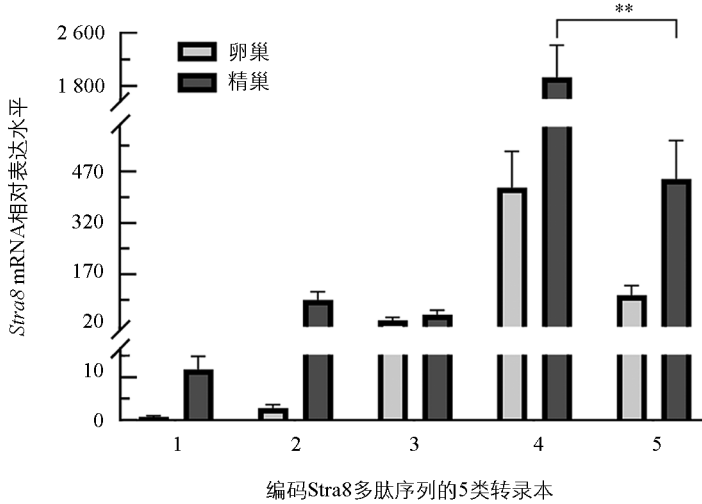
图 1 中华鳖 *stra8* 基因 19 个转录本的可变剪切(a)及推导的部分氨基酸序列比对(b)

根据中华鳖 *stra8* 19 个转录本的共有序列, 设计定量引物(表 1), 获取 1 冬龄中华鳖各组织的 cDNA, 以 *efla* 作为内参基因, 利用特异性引物进行 RT-PCR, 检测 *stra8* 基因在不同组织中的表达情况。结果显示, 未在心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑组织中观察到 *stra8* 产物条带, 仅在卵巢、精巢中分别检测到较弱、较强的条带, 表明 *stra8* mRNA 在性腺组织中特异表达, 且在精巢中的表达水平高于卵巢(图 2a)。针对编码这 5 种多肽序列对应的转录本序列设计特异引物(表 1), 在中华鳖雌、雄性腺中进行 RT-qPCR。结果表明, 检测的 5 类转录本在精巢中的表达量均高于卵巢(图 2b), 与 RT-PCR 检测结果一致(图 2a)。在雌、雄性腺中的表达水平都最高的是编码第 4 种多肽序列的转录本, 其次是编码第 5 种多肽序列的转录本, 且前者在精巢中的表达水平极显著高于后者(图 2b)。由此推测, 编码第 4 种多肽序列的转录本是 *stra8* 中主要行使

生物学功能的转录本,其编码的蛋白为功能性蛋白。



a. 中华鳖 *stra8* 基因 RT-PCR 分析结果



b. 中华鳖 *stra8* 基因 RT-qPCR 分析结果

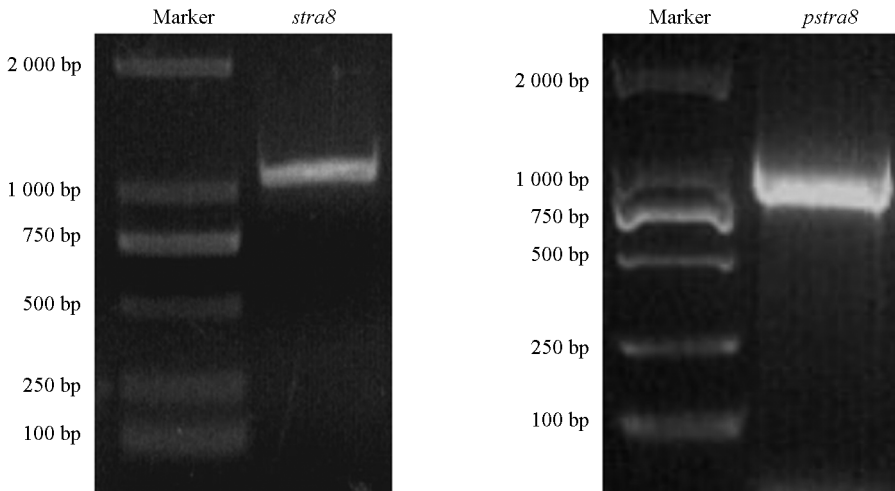
a 中 *eflα* 为内参基因。b 中每列代表 3 次生物学重复的平均值; 误差线表示平均结果的标准差 (SD); 方差分析采用 Turkey 统计方法; ** 表示基因在性腺中的表达在 $p < 0.01$ 水平有极显著差异。

图 2 中华鳖 *stra8* 基因组织特异性分析

2.3 中华鳖 *stra8* 基因和启动子的克隆

根据 2.2 节的研究结果可知, 编码第 4 种多肽序列的转录本是 *stra8* 中主要行使生物学功能的转录本。根据其序列信息, 设计 *stra8* 基因 cDNA 扩增引物 (表 1)。以中华鳖性腺 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 获得的 *stra8* 基因 cDNA 1 113 bp (图 3a) 包含 3' 端非编码区 54 bp 以及一个长度为 1 059 bp 的开放阅读框, 开放阅读框共编码 352 个氨基酸。

此外, 为获得 *stra8* 启动子片段, 根据中华鳖基因组序列设计引物, 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到的启动子片段长度为 1 052 bp (图 3b)。



a. 中华鳖 *stra8* 基因 cDNA 产物

b. 中华鳖 *stra8* 基因启动子片段

图 3 中华鳖 *stra8* 基因克隆电泳图

2.4 中华鳖 *stra8* 基因 cDNA 序列生物信息学分析

采用 Vector NTI 11.0 软件对中华鳖与其他物种 *Stra8* 蛋白进行多重序列比对(图 4)。结果表明, 中华鳖 *Stra8* 蛋白 N 端含有一个保守的 HLH 结构域。HLH 结构域是 *Stra8* 与其他 bHLH 转录因子互作的结构域。此外, 3 个 BOX 结构域是 *Stra8* 蛋白在脊椎动物中的保守结构域。由此可见, *Stra8* 氨基酸序列在进化中较保守, 但是因物种进化程度不同而呈现出一定的差异。中华鳖与黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) *Stra8* 序列一致性最高, 达 92%; 其次与爬行动物扬子鳄 (*Alligator sinensis*) *Stra8* 序列一致性较高, 为 81%; 与鸟类鸡 *Stra8* 序列一致性可达 72%; 与哺乳类动物猪、人和小鼠等 *Stra8* 序列一致性较低, 分别为 59%、58% 和 52%; 与两栖类爪蟾 (*Xenopus laevis*) *Stra8* 序列一致性低至 36%; 与硬骨鱼类大西洋鲑和南方鲷 *Stra8* 序列一致性最低, 均为 30%。

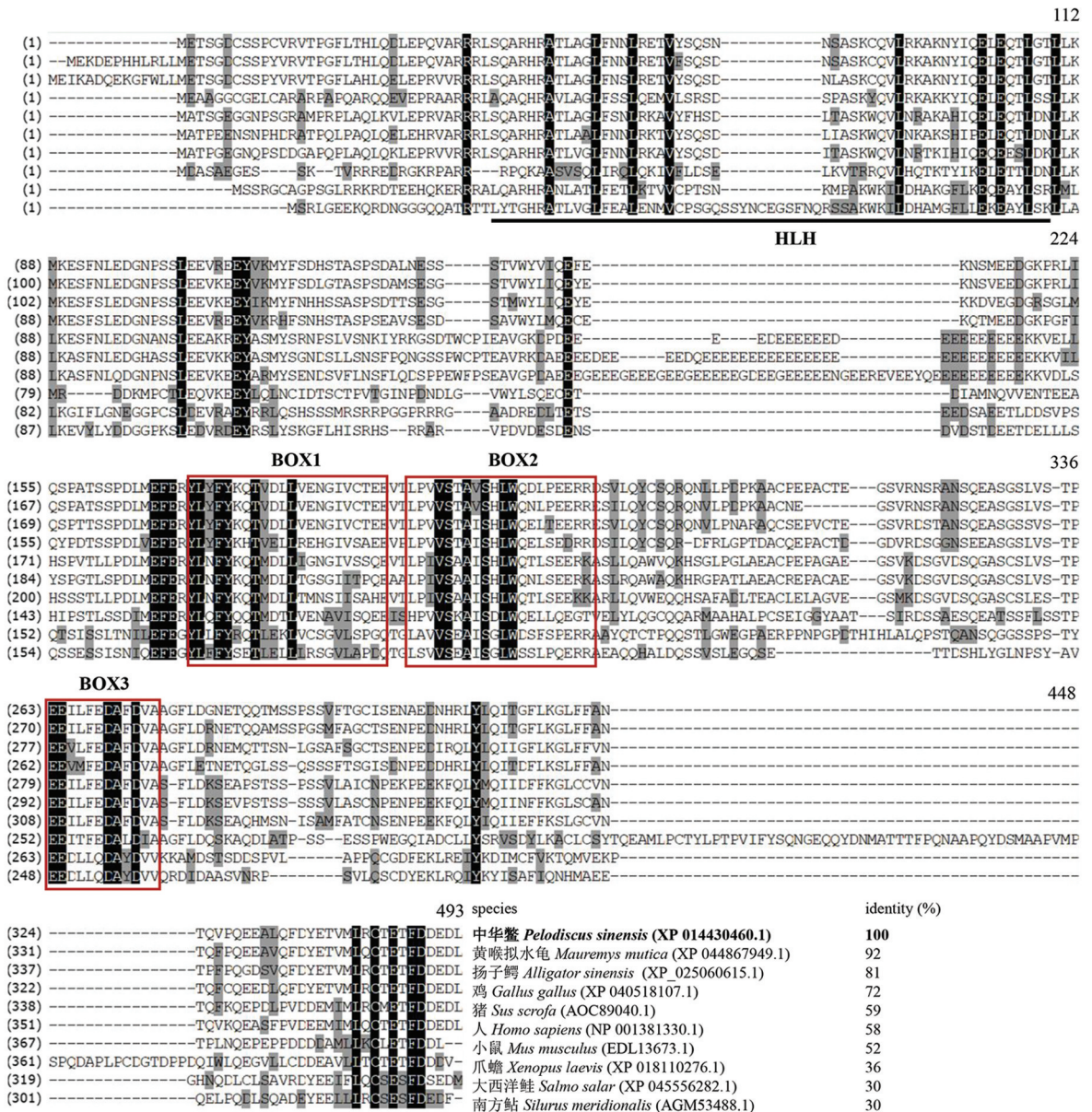


图 4 中华鳖和其他脊椎动物 *Stra8* 氨基酸序列的多重对比图

其他脊椎动物的 *Stra8* 氨基酸序列来源于 NCBI, 黑色下划线区域表示 *Stra8* 的 HLH 结构域, 红色矩形框 BOX1-3 表示 *Stra8* 在所有脊椎动物中的保守结构域。

基于中华鳖和其他物种 *Stra8* 的氨基酸序列, 在 Mega 7.0 软件中采用邻接法进行 1 000 次 bootstraps 验证构建了系统发育树, 展示了中华鳖与其他物种 *Stra8* 之间的进化关系(图 5)。进化分析表明 *Stra8* 主要

聚为四足动物类和硬骨鱼类两大分支。中华鳖 *Stra8* 聚类到爬行类, 并与黄喉拟水龟聚类到一个分支; 与鸟类、哺乳类、两栖类亲缘关系依次降低, 与硬骨鱼类亲缘关系最远。

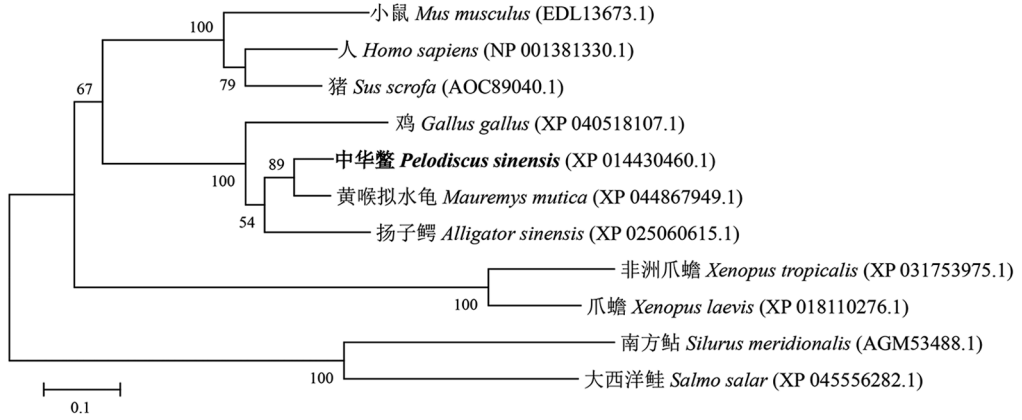


图 5 *Stra8* 蛋白的系统进化树

2.5 中华鳖 *stra8* 基因启动子序列分析

本研究扩增得到的中华鳖 *stra8* 基因启动子片段长度为 1 052 bp(图 3b), 而设计目标长度为 1 044 bp。通过序列比对发现, 获得的启动子序列有 8 bp 的碱基插入(图 6 红色矩形框所示), 其他序列相同。生物信息学分析显示 *stra8* 基因启动子区存在 1 处 TATA box, 无 GAAT box; 通过 Neural Network Promoter Prediction 分析预测到共 3 个可能的 TSS。结合上游 -25~30 bp 的 TATA box 位置分析, 最有可能的 TSS 位于第 993 位, 定为 +1 位(图 6)。

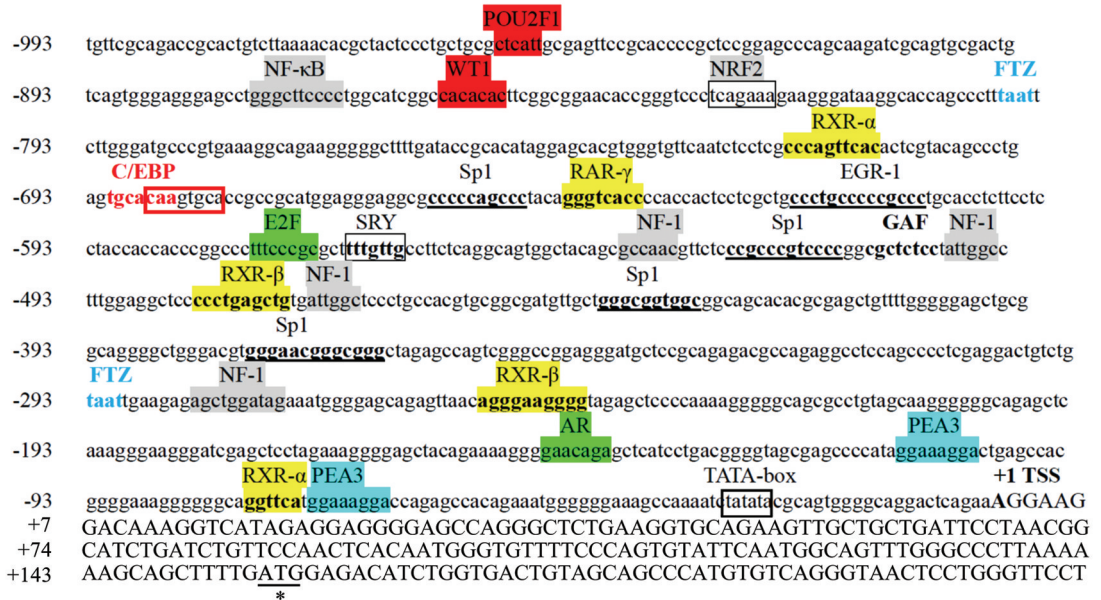


图 6 中华鳖 *stra8* 基因启动子序列分析图

为预测 *stra8* 启动子上游潜在的转录因子结合位点, 本研究采用 PROMO、AliBaba 2.1 等在线数据库进行检索与分析, 结果见图 6。如图 6 所示, 部分预测蛋白与转录调控活性直接相关: Sp1 作为序列特

与 NCBI 预测序列相比, 克隆的启动子序列多出了 8 bp 碱基, 用红色矩形框标注。转录起始位点(TSS, +1 bp)用 Neural Network Promoter Prediction program 预测并用黑色粗体标出。* 所示 ATG 为翻译起始位点。启动子上的核心元件、转录因子结合位点均用不同颜色的矩形框、色块或下划线标注。RXR- α 、RXR- β 、RAR- γ 为视黄酸受体; AR 为雄激素受体; Sp1 为特殊蛋白 1; NF-1 为神经纤维瘤病相关蛋白; PEA3 为多瘤促活化因子 3; WT1 为肾母细胞瘤分离的抑癌基因 1; POU2F1 为神经内分泌系统相关的转录因子; E2F 为腺病毒 E2 基因调控因子; GAF 为 GAGA-factor 先锋转录因子; NF- κ B 为核因子 κ B 蛋白; EGR-1 为人早期生长因子; C/EBP 为增强子结合蛋白; FTZ 为核受体超家族成员; NRF2 为核因子 E2 相关因子 2。

异性 DNA 结合蛋白, 可调控启动子中富含 GC 序列的基因转录; GAF 与靶基因结合并移除核小体, 使启动子区域暴露, 从而促进转录激活; C/EBP 也被证实广泛参与转录调控过程。此外, 部分蛋白主要涉及细胞生长、增殖、分化及保护等功能: RAR/RXR 通过响应视黄酸信号直接调控细胞减数分裂启动; AR 通过与雄激素配体结合, 诱导具有性别依赖性相关基因的转录激活; E2F 转录因子参与细胞周期的调控; PEA3 是多种细胞的增殖、迁移、分化中重要的转录调控因子; WT1 参与多个器官的发育调控, 可能与性腺体细胞分化、性别控制等有关; EGR-1 参与调控细胞生长、分化、应激反应及免疫反应; FTZ 在类固醇的生成和性别分化过程中发挥着重要的作用; NF-1 在调控细胞生长、增殖和分化过程中扮演重要角色; NRF2 参与氧化还原平衡、线粒体自噬、DNA 修复、屏障修复、脂质代谢等, 通过解毒机制产生细胞保护作用。

3 讨论与结论

目前, 中华鳖是我国两栖爬行类水产养殖规模最大的经济物种, 且具有明显的性别差异, 雄性相比雌性具有体型大、生长速度快、脂肪少的特点^[21]。已有研究表明减数分裂启动时间与性别决定和分化密切相关。减数分裂在胚胎期启动, 则生殖细胞向雌性方向发育; 减数分裂在出生后启动, 则生殖细胞向雄性方向发育。而 *stra8* 基因是减数分裂启动的“守门员”, 在减数分裂启动中发挥重要的作用。

据统计, 90%~95% 的人类基因经历了一定程度的选择性剪切^[22-23]。人类蛋白质编码基因的 37% 产生了多种蛋白亚型^[24], 这表明选择性剪切有助于蛋白质组复杂性的维持、细胞分化及其谱系的决定、组织身份的获取和维持、器官的发育^[25]。不同物种中基因的选择性剪切均影响其生长发育, 如三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) *iag* 存在不同剪切体, 在三疣梭子蟹雄性分化及维持中具有重要功能^[26]。鸡的 *glut4* 基因通过多种剪切机制共产生 14 个转录本, 编码 12 种氨基酸序列, 具有明显不同的亚细胞定位, 推测 *glut4* 在鸡的生长发育过程中发挥了重要的生理功能^[27]。在幼年小鼠的两性性腺中, *stra8* 缺陷 (外显子 2~7 缺失) 的生殖细胞都无减数分裂启动的分子特征, 并且不能进入减数分裂^[16, 18]。本研究中, *stra8* 基因主要通过 5' 端选择性剪切、3' 端选择性剪切和外显子跳跃等剪切事件共产生 19 个剪切体, 共可翻译形成 5 种多肽序列。剪切位置主要发生在序列的 5' 端, 尤其是在第 I 个外显子上。通过序列比对发现, 部分序列的第 II 个外显子发生了跳跃, 但不影响翻译; 而第 IV 个外显子发生了跳跃, 导致编码蛋白的 N 端发生了变化。由图 1b 所示, 第 5 种多肽序列 N 端氨基酸序列不再具有 HLH 结构域。由此可见, 虽然 *stra8* 基因剪切转录本多达 19 个, 但最终只翻译形成了 5 种多肽序列, 其目的是保证 *stra8* 的成功转录, 确保功能性蛋白的形成, 进而维持生命活动正常进行。但不同的蛋白异构体也可能在不同的时空发挥不同的功能, 该问题有待进一步探究。

RT-PCR 结果显示 *stra8* 基因在 1 冬龄雌、雄中华鳖性腺中特异表达, RT-qPCR 结果表明所有转录本在精巢中的表达量高于卵巢。这与南方鲇 *stra8* 在精巢和卵巢的表达水平相似这一结果不同^[28], 与鼠、猪 *stra8* 仅在成体组织精巢中表达^[29-31] 的情况也不同。此外, 本研究中, 中华鳖 *stra8* 基因的转录表达水平在 1 冬龄精巢中显著高于卵巢, 说明此时中华鳖卵巢绝大部分雌性生殖细胞减数分裂启动已完成, 而精巢雄性生殖细胞减数分裂启动正处在高峰期, 生殖细胞向雄性方向发育。中华鳖 Stra8 蛋白在进化中较保守, 与其他物种同源蛋白一样, 在 N 端均含有一个保守的 HLH 结构域, 在 C 端均含有 3 个 BOX 结构域。其中 HLH 结构域是 Stra8 与其他 bHLH 转录因子互作的结构域, 预示着 Stra8 常与其他蛋白互作发挥作用。Stra8 是 RA 的靶基因之一, 其启动子区域包含推测的 RAREs^[18, 32-33], 在小鼠中已证实 RARs 直接与出生后小鼠睾丸中 Stra8 启动子区域的 RAREs 结合^[34]。本研究中, RAR、RXR 视黄酸受体结合位点的存在表明 RA-Stra8 信号的保守性, 推测 *stra8* 的表达也受控制 RA 水平的酶 Aldh1a 和 Cyp26a1 的间接调控。

综上, 本研究明确了中华鳖 *stra8* 基因含有 10 个外显子和 9 个内含子, 基因在转录过程中主要发生了 5' 端选择性剪切、3' 端选择性剪切和外显子跳跃等剪切事件。Stra8 基因在性腺中特异表达, 且在精巢中的

表达量高于卵巢, 编码第 4 种多肽序列的转录本是 *stra8* 主要行使功能的转录本。克隆得到了 *stra8* 基因 cDNA 和启动子片段; CDS 编码的氨基酸序列与爬行类同源蛋白具有很高的相似性, 与鱼类一致性较低, 但仍比较保守。启动子片段中含有 RAR、RXR 等转录因子结合位点, 表明 *stra8* 的转录可能受视黄酸途径相关蛋白的调控。

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. 2024 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.
- [2] TELETIN M, VERNET N, GHYSELINCK N B, et al. Chapter Seven Roles of Retinoic Acid in Germ Cell Differentiation [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2017, 125: 191-225.
- [3] FENG C W, BURNET G, SPILLER C M, et al. Identification of Regulatory Elements Required for *Stra8* Expression in Fetal Ovarian Germ Cells of the Mouse [J]. *Development*, 2021, 148(5): dev194977.
- [4] ZHOU Q, LI Y, NIE R, et al. Expression of Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 (*Stra8*) and Maturation of Murine Gonocytes and Spermatogonia Induced by Retinoic Acid in Vitro [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 78(3): 537-545.
- [5] OULAD-ABDELGHANI M, BOUILLET P, DÉCIMO D, et al. Characterization of a Premeiotic Germ Cell-Specific Cytoplasmic Protein Encoded by *Stra8*, a Novel Retinoic Acid-Responsive Gene [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1996, 135(2): 469-477.
- [6] MIYAMOTO T, SENGOKU K, TAKUMA N, et al. Isolation and Expression Analysis of the Testis-Specific Gene, *STRA8*, Stimulated by Retinoic Acid Gene 8 [J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2002, 19(11): 531-535.
- [7] 何庆玲. 猪 *Stra8* 基因的克隆、表达和体外转染精原干细胞的初步研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [8] SMITH C A, ROESZLER K N, BOWLES J, et al. Onset of Meiosis in the Chicken Embryo; Evidence of a Role for Retinoic Acid [J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8: 85.
- [9] DONG R R, YANG S J, JIAO J, et al. Characterization of *Stra8* in Southern Catfish (*Silurus meridionalis*): Evidence for Its Role in Meiotic Initiation [J]. *BMC Molecular Biology*, 2013, 14: 11.
- [10] LI M H, FENG R J, MA H, et al. Retinoic Acid Triggers Meiosis Initiation via *Stra8*-Dependent Pathway in Southern Catfish, *Silurus meridionalis* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 232: 191-198.
- [11] SKAFTNESMO K O, CRESPO D, KLEPPE L, et al. Loss of *stra8* Increases Germ Cell Apoptosis but Is still Compatible with Sperm Production in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 657192.
- [12] GRISWOLD M D, HOGARTH C A, BOWLES J, et al. Initiating Meiosis: The Case for Retinoic Acid [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(2): 35.
- [13] FENG C W, BOWLES J, KOOPMAN P. Control of Mammalian Germ Cell Entry into Meiosis [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 382(1): 488-497.
- [14] POTTER S J, DEFALCO T. Role of the Testis Interstitial Compartment in Spermatogonial Stem Cell Function [J]. *Reproduction*, 2017, 153(4): R151-R162.
- [15] SABA R E, WU Q, SAGA Y. CYP26B1 Promotes Male Germ Cell Differentiation by Suppressing *STRA8*-Dependent Meiotic and *STRA8*-Independent Mitotic Pathways [J]. *Developmental Biology*, 2014, 389(2): 173-181.
- [16] BALTUS A E, MENKE D B, HU Y C, et al. In Germ Cells of Mouse Embryonic Ovaries, the Decision to Enter Meiosis Precedes Premeiotic DNA Replication [J]. *Nature Genetics*, 2006, 38(12): 1430-1434.
- [17] BOWLES J, KNIGHT D, SMITH C, et al. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice [J]. *Science*, 2006, 312(5773): 596-600.
- [18] ANDERSON E L, BALTUS A E, ROEPERS-GAJADIEN H L, et al. *Stra8* and Its Inducer, Retinoic Acid, Regulate Meiotic Initiation in both Spermatogenesis and Oogenesis in Mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 2008, 105(39): 14976-14980.
- [19] VERNET N, DENNEFELD C, ROCHETTE-EGLY C, et al. Retinoic Acid Metabolism and Signaling Pathways in the Adult and Developing Mouse Testis [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 96-110.
- [20] CHEN L, TOVAR-CORONA J M, URRUTIA A O. Alternative Splicing: A Potential Source of Functional Innovation in the Eukaryotic Genome [J]. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012, 2012: 596274.
- [21] 周先文. 中华鳖性别相关基因的筛选及其对性别分化的影响研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [22] PAN Q, SHAI O, LEE L J, et al. Deep Surveying of Alternative Splicing Complexity in the Human Transcriptome by High-Throughput Sequencing [J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(12): 1413-1415.
- [23] WANG E T, SANDBERG R, LUO S J, et al. Alternative Isoform Regulation in Human Tissue Transcriptomes [J]. *Nature*, 2008, 456(7221): 470-476.
- [24] KIM M S, PINTO S M, GETNET D, et al. A Draft Map of the Human Proteome [J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 575-581.
- [25] BARALLE F E, GIUDICE J. Alternative Splicing as a Regulator of Development and Tissue Identity [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(7): 437-451.
- [26] 兰伟康, 李光, 高保全, 等. 三疣梭子蟹 *IAG* 基因结构及不同剪切体时空表达 [J]. *广东海洋大学学报*, 2023, 43(3): 26-34.
- [27] 罗朋娜. 鸡 *GLUT4* 基因可变剪切体鉴定与主要转录本的功能分析 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [28] 焦静. 南方鲇 *stra8* 分子克隆、表达和转录调控的初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- [29] CHEN W, JIA W W, WANG K, et al. Distinct Roles for CBP and P300 on the RA-Mediated Expression of the Meiosis Commitment Gene *Stra8* in Mouse Embryonic Stem Cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66076.
- [30] WANG X Y, CHEN T F, SONG C Y, et al. Cloning and Expression Characteristics of the Pig *Stra8* Gene [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(7): 12480-12494.
- [31] 李罗刚, 王淑燕, 潘伟荣, 等. 版纳微型猪近交系 *STRA8* 基因克隆及功能生物信息学分析 [J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2019, 34(3): 432-439.
- [32] KOJIMA M L, DE ROOIJ D G, PAGE D C. Amplification of a Broad Transcriptional Program by a Common Factor Triggers the Meiotic Cell Cycle in Mice [J]. *eLife*, 2019, 8: e43738.
- [33] ENDO T, ROMER K A, ANDERSON E L, et al. Periodic Retinoic Acid-STRA8 Signaling Intersects with Periodic Germ-Cell Competencies to Regulate Spermatogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(18): E2347-E2356.
- [34] 牛长敏. *Stra8* 在精子发生中的作用及机制研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2020.

责任编辑 张枸

崔玉洁