

李隐侠, 张俊, 钱勇, 等. 湖羊 *NR5A1* 基因全序列克隆和表达特征分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 114-121.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.017

湖羊 *NR5A1* 基因全序列克隆和表达特征分析

李隐侠^{1,2,3}, 张俊^{1,2,3}, 钱勇^{1,2,3}, 孟春花^{1,2,3}, 王慧利^{1,2,3}, 曹少先^{1,2,3},
仲跻峰^{1,2,3}

(1.江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014; 3.农业部种养结合重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 以江苏特色绵羊品种——湖羊为研究对象, 克隆湖羊 *NR5A1* 基因全序列, 分析其序列特征, 并对湖羊组织和大、小卵泡中 *NR5A1* 表达特征进行研究。结果表明, 湖羊 *NR5A1* 基因全长 19 016 bp, 含 6 个外显子和 5 个内含子; 编码区全长 1 386 bp, 编码 461 个氨基酸残基, 包含经典的 DNA 结合区 (DBD) 和配体结合区 (LBD)。RT-PCR 结果显示 *NR5A1* 基因在湖羊组织中广泛表达, 其中在卵巢中高表达, 脾脏次之; qRT-PCR 和 Western blot 结果显示在湖羊大卵泡中 *NR5A1* mRNA 和蛋白质水平均显著高于小卵泡, 表明 *NR5A1* 基因参与调控湖羊卵泡发育, 并与繁殖性能有关。

关键词: 湖羊; *NR5A1* 基因; 序列特征; 表达

中图分类号: S826.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019)01-0114-08

Full sequence cloning and expression characteristics of the ovine *NR5A1* gene

LI Yin-xia^{1,2,3}, ZHANG Jun^{1,2,3}, QIAN Yong^{1,2,3}, MENG Chun-hua^{1,2,3}, WANG Hui-li^{1,2,3},
CAO Shao-xian^{1,2,3}, ZHONG Ji-feng^{1,2,3}

(1. Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. The Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China; 3. Key Laboratory of Crop and Animal Integrated Farming, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Using Hu sheep (Jiangsu featured sheep breed) as the research object, *NR5A1* gene full sequences were cloned and the sequence characteristics were analyzed. The expression features of *NR5A1* gene in Hu sheep tissues and in large and small follicles were explored. The results showed that the complete sequence of ovine *NR5A1* was 19 016 bp in length and contained six exons and five introns. The coding region was 1 386 bp and encoded 461 amino acid residues, including the classical DNA binding domain (DBD) and ligand binding domain (LBD). RT-PCR results showed that *NR5A1*

gene was widely expressed in Hu sheep tissues, which was highly expressed in ovary, followed by kidney. qRT-PCR and western blot results showed that the expression of *NR5A1* in large follicles was significantly higher than that in small follicles, indicating that *NR5A1* gene was involved in regulating follicle development and speculating the reproductive performance of Hu sheep.

Key words: Hu sheep; *NR5A1* gene; sequence

收稿日期: 2018-04-27

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20140750); 国家自然科学基金项目 (31501934); 苏州市科技支撑计划项目 (SNG201416)

作者简介: 李隐侠 (1979-), 女, 河南固始人, 博士, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖方面的研究。 (Tel) 025-84390095; (Email) liyxmh@126.com

通讯作者: 曹少先, (E-mail) caoshaoxian@163.com

characterization; expression

NR5A1 (Nuclear receptor 5A 1) 是孤儿核受体 *NR5A* 家族第一个被发现的成员, 又名 SF-1 (Steroidogenic factor-1) 和 Ad4BP (Ad4-binding protein)^[1], 是调控类固醇生成和繁殖发育的关键因子, 参与调控性腺和肾上腺发育进而调控下丘脑-垂体-性腺轴和下丘脑-垂体-肾上腺轴^[2-4]。研究发现, *NR5A1* 参与调控雌性生殖相关的关键基因表达, 在卵巢组织中 *NR5A1* 主要调控 *AMH*^[5]、*INHA*^[6]、*STAR*^[7]、*CYP17*^[7]、*FDX1*^[8]、*LHCGR*^[9]、*miR-383* 及其宿主基因 *SGCZ*^[10] 等卵泡发育相关基因的表达。另外, 在下丘脑和垂体中 *NR5A1* 还可调控 *LHB*、*FSHB*^[11]、*GnRHR*^[12] 等卵泡发育关键基因的表达。

羊 *NR5A1* 基因的研究较少, 仅本实验室前期在湖羊上进行了 *NR5A1* 基因多态性的筛选和鉴定, 结果表明 *NR5A1* 内含子区多态性可以作为分子标记筛选高繁殖力绵羊^[13], 但是对于湖羊 *NR5A1* 基因序列特征、组织表达模式及其在卵泡中表达的研究并未涉及。本研究以湖羊为研究对象, 通过 PCR 扩增和克隆测序方法克隆湖羊 *NR5A1* 基因全序列, 分析其序列特征, 鉴别其组织表达模式及其在湖羊不同级别卵泡中表达差异, 以期更全面了解 *NR5A1* 基因, 为更详尽探索其参与调控湖羊繁殖性能的分子机制提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从江苏省苏州市东太湖羊资源保种区挑选纯种湖羊母羊, 屠宰后取其心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大肠、小肠、卵巢、子宫和肌肉组织于液氮中保存带回实验室, 于 -70 °C 冰箱保存, 提取 DNA、RNA 和蛋白质用于后续试验。用手术剪分离卵巢中卵泡, 得到大卵泡 (直径 > 5 mm) 和小卵泡 (直径 < 3 mm), 于液氮中保存, 提取 RNA 和蛋白质用于后续试验。

1.2 DNA 和 RNA 的提取

全基因组 DNA 提取采用传统的苯酚-氯仿方法, RNA 提取用 RNA 提取试剂盒 (Bioteke, 北京)。琼脂糖凝胶和 Nandrop 方法测定 DNA 和 RNA 完整性和浓度。

采用随机引物对总 RNA 进行逆转录, 反应体系 25 μ l: 2 μ g 总 RNA, 1 μ g 随机引物, 0.4 mmol/L

dNTP, 20 U RNase 抑制剂, 200 U MMLV 反转录酶, 5 μ l 5 \times RT Buffer (250 mmol/L Tris-HCl pH8.3, 50 mmol/L MgCl₂, 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L 亚精胺)。先加 RNA 模板、dNTP 和随机引物, 70 °C 变性 5 min 后立即放在冰上冷却, 再加其余试剂, 混匀后 41 °C 反应 40 min, RT 产物保存于 -20 °C 备用。

1.3 引物合成、克隆和测序

根据 GenBank 数据库中绵羊 *NR5A1* 基因序列 (序列号: NC_019460.2), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 P1~P19。以湖羊 DNA 为模板, 扩增湖羊全基因组序列, 引物及退火温度和片段长度见表 1。

根据 GenBank 中预测的绵羊 *NR5A1* mRNA 序列 (序列号: XM_004007178), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计 2 对特异性引物 P20、P21, 用于扩增湖羊卵巢组织 *NR5A1* 完整的编码区序列。P22 引物用于 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测 *NR5A1* 基因表达, P23 为内参引物。

PCR 反应体系为 20 μ l, 包含 1.0 μ l DNA 或者 RT 产物, 10.0 μ l PCR 主要混合物 (Mastermix) 和 0.5 μ l 上下游引物以及 8.0 μ l H₂O。PCR 程序: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶, 用 DNA 胶回收试剂盒 (南京 Karroten 公司) 纯化后送至上海美吉生物公司测序。

1.4 序列分析与系统发育树构建

用 DNAMAN 6.0 和 DNASTar 软件进行序列比对和拼接, 氨基酸序列翻译和与其他物种的序列比对。开放阅读框的预测在 NCBI 的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nih.gov/projects/gorf>) 中进行, 同源序列用 NCBI BLAST 进行搜索。用 SWISS-MODEL 在线软件 (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 预测蛋白质的三级结构。

从 GenBank 中挑选 12 个不同物种的 *NR5A1* 基因编码的氨基酸序列 (表 2), 利用 DNASTar 软件进行多序列比对分析和编辑校正。采用 MEGA5.1 软件^[14] 中邻接法 (Neighbor-joinin, NJ) 构建系统发育树, 自举分析 (Bootstrap test) 采用 1 000 次重复抽样检验获得置信度 (Bootstrap percentage, BP)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	长度 (bp)	用途
NR5A1-P1	F: TCTGCCATGAACCTCTCCTC R: CGTCGGAGGCCAAGGTA	55	456	基因扩增
NR5A1-P2	F: GAGGGTGCCGTAGGTCTT R: CTCAGCAAGGAGGTGTC	53	1 198	
NR5A1-P3	F: TGGGACACCCTCCTTGCT R: GCTCTGGGTAGCCATAGGGT	56	1 252	
NR5A1-P4	F: TCAAGGAGCTGGAGGTGA R: TGGGATGTCTTCCGTGT	54	1 077	
NR5A1-P5	F: TAGGTGCCAGGATAAGTAGG R: GCTCAGAGGTGAGAAATGAA	54	1 279	
NR5A1-P6	F: GGGACAGTGAATGGATGA R: TCAAGATGGGTCATTAGGC	52	1 180	
NR5A1-P7	F: AGAACGCCTAATGACCCA R: CTCTGTACCCAGACCTCGA	54	1 115	
NR5A1-P8	F: TAAGAAATCAGGGCCTAGTGT R: CGACGGCAGGATTGGTAT	54	1 137	
NR5A1-P9	F: GAGATGAGCTGGATACCAAT R: ATCTTGTGCGGAACCTTT	55	1 104	
NR5A1-P10	F: CCTTCTGTTCTCCTTCCG R: AGCTCCACAGTCTACCT	54	1 135	
NR5A1-P11	F: CACTGAGTAGTGAGGGAGTGAA R: GGTCCGATCACAGGGTAA	53	1 041	cDNA 克隆
NR5A1-P12	F: GAGACCTGCCCCGTCACCAT R: TTGTCTCGGCTTCCCTTG	54	1 119	
NR5A1-P13	F: GGTAATTTCTTGGCTGAAAG R: R:TCAGTCAGCAGCCTCTGTA	55	1 295	
NR5A1-P14	F: ACTGTGCCTTGTCTTTGGG R: TTCATAAACACCGTGATTGC	56	1 091	
NR5A1-P15	F: TGGCAATCACGGTGTAT R: GTTGATACCAGAGCCAGGAC	56	978	
NR5A1-P16	F: CCTGCTTACCCATAGTGCTT R: CCAAAGTCGGATTAGGGA	55	1 043	
NR5A1-P17	F: GCCCAGATCCTGCCATAC R: TTGTTTAGTCGCTAAGTCGTG	55	1 139	
NR5A1-P18	F: CAGAGGAGCCTGGCGGAATA R: CCGCCGTCAACTACCAAA	54	889	
NR5A1-P19	F: GCTATTGTGCTCCGCTT R: TACGTGCTGGGTCCTGG	56	768	
NR5A1-P20	F: CTATTGCTACGACGAGGACCTG R: AGGTTGTTTCGGGGCATCTC	59	1 158	Real-time PCR
NR5A1-P21	F: ACCACAAACACCTGGGCAAC R: TGGGGCAGAGGTTTAGGGA	56	662	
NR5A1-P22	F: CCTGGTGAAGGAAGCTCAGG R: ATCTCGTTGCCAGGTGTTT	61	174	Real-time PCR
GAPDH-P23	F: FACTTTGGCATCGTGGAGG R: GAAGAGTGAGTGTGCTGTTG	58	379	

表 2 部分哺乳动物 NR5A1 氨基酸序列信息

Table 2 The amino acid sequences information of NR5A1 in different mammals

物 种	GenBank 登录号	氨基酸长度 (AA)
人 <i>Homo sapiens</i>	NP_004950.2	461
牛 <i>Bos Taurus</i>	NP_776828.1	461
猪 <i>Sus scrofa</i>	NP_999344.1	461
鸡 <i>Gallus gallus</i>	NP_990408.1	466
大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_001178028.1	462
家鼠 <i>Mus musculus</i>	NP_620639.1	462
湖羊 <i>Ovis aries</i>	*	461
金丝猴 <i>Rhinopithecus roxellana</i>	XP_010364145.1	461
恒河猴 <i>Macaca mulatta</i>	XP_001082881.1	461

* 代表根据本研究的 CDS 序列翻译的 NR5A1 氨基酸序列。

1.5 qRT-PCR 检测

用 qRT-PCR 检测 NR5A1 基因在湖羊大卵泡和小卵泡中的表达。每 20.0 μ l 反应体系中加 1.0 μ l cDNA, 10.0 μ l SYBR Premix Ex Taq TM 酶, 0.5 μ l 上下游引物和 8.0 μ l ddH₂O。95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 共 44 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, GAPDH 为内参, 重复 3 次。

1.6 Western blot 分析

用蛋白质裂解液 [1 \times PBS、1% 乙基苯基聚乙二醇 (NP40)、0.5% 脱氧胆酸钠、1.0% SDS 和蛋白酶阻断剂] 将湖羊大卵泡和小卵泡彻底裂解, 用 BCA 方法测定蛋白质浓度。参照 Yao 等^[15] 的 Western blot 方法。NR5A1 抗体 (#BA3823) 购于武汉博士德生物公司。使用 Image J 软件进行条带密度分析。

1.7 数据分析

所有试验结果用平均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.0 软件中 T-test 方法进行数据分析。

2 结 果

2.1 NR5A1 基因全序列及序列特征

用 19 对引物 (NR5A1-P1 ~ NR5A1-P19) 扩增 NR5A1 基因从翻译起始位点 (ATG) 开始到翻译终止位点 (TGA) 的全基因组序列。经过序列拼接得到 19 016 bp NR5A1 基因全序列, 并提交 GenBank (序列号: KT778797), 通过与其 cDNA

序列比对发现 NR5A1 基因包含 6 个外显子和 5 个内含子。外显子序列和外显子/内含子边界序列见图 1。从图 1 可以看出, 从第 2 个外显子开始外显子和内含子边界都是以“GT”开始, 以“AG”结束, 与人类 NR5A1 基因序列特征一致, 符合 GT-AG 法则。

2.2 NR5A1 mRNA 序列分析

以湖羊卵巢组织 cDNA 为对象, 用 2 对引物扩增湖羊 NR5A1 基因编码区全序列, 通过序列拼接, 得到湖羊 NR5A1 基因编码区全序列。湖羊 NR5A1 基因编码区全长 1 386 bp, 其中 T、C、A、G 含量分别为 16.5%、33.0%、19.4% 和 31.1%。通过 DNAMAN 比对发现湖羊 NR5A1 的编码区序列与哺乳动物核苷酸序列同源性较高, 其中与牛的核苷酸同源性为 97.92%, 共有 29 个碱基发生了突变, 与人的同源性为 92.83%, 共有 99 个碱基发生突变, 二者的碱基变异类型主要表现为转换和颠换, 不存在碱基的插入和缺失。在 6 个哺乳动物中, NR5A1 基因编码区保守位点百分率为 80%, 变异位点百分率为 20%, 其中简约信息多态位点百分率为 54.3%, 单一多态位点百分率为 45.7%。

2.3 湖羊 NR5A1 蛋白质分析

湖羊 NR5A1 基因编码 461 个氨基酸残基 (图 2), 预测相对分子量为 51 646, 理论等电点为 7.82。BLAST 分析发现湖羊 NR5A1 蛋白质氨基酸序列与牛的同源性为 98.94%, 与人的同源性为 94.04%。氨基酸序列中 Leu 的使用频率最高 (12.8%), 不含 Pyl 和 Sec。进一步分析发现 NR5A1 蛋白质与其他物种一样都含有保守的 DBD 结构域 (Cys13-Leu105) 和 LBD 结构域 (val223-lys459) (图 2)。在线模型预测 NR5A1 蛋白质的三维结构, 发现 NR5A1 包含 8 个 α -螺旋、4 个 β -折叠和一些无规则卷曲 (图 3)。

以家禽 (鸡) 为外类群, 采用 MEGA 5.1 软件中的 NJ 法构建哺乳动物 NR5A1 蛋白质的系统发育树 (图 4), 发现聚类结果与经典分类学结果基本一致。湖羊与 7 个哺乳动物聚在一起, 而外类群家禽自成一类; 在哺乳动物中, 鼠科自成一类 (自举率 = 100%), 3 个家畜品种和灵长类物种聚在一起; 在家畜品种中, 湖羊首先和牛聚为一类 (自举率 = 98%), 然后再与猪聚为一类 (自举率 = 95%)。

图 1 湖羊 *NR5A1* 基因全序列及其序列特征Fig.1 Full sequences and its characterization of *NR5A1* gene in Hu sheep

2.4 湖羊 *NR5A1* 基因组织表达模式 mRNA 水平与湖羊繁殖性能的相关性

用 RT-PCR 方法检测 *NR5A1* 基因在湖羊 10 个组织中的表达模式,发现 *NR5A1* 基因在湖羊各个组织中均有表达,但是在卵巢组织中表达量最高,肾脏次之,其他组织中均低表达,肝脏组织中表达量最低(图 5)。

2.5 *NR5A1* 基因对湖羊卵泡发育的调控

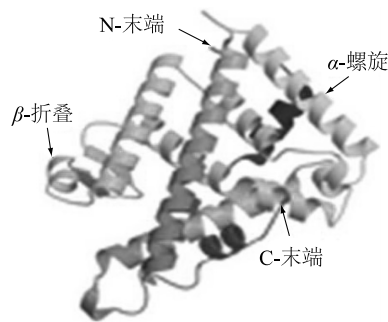
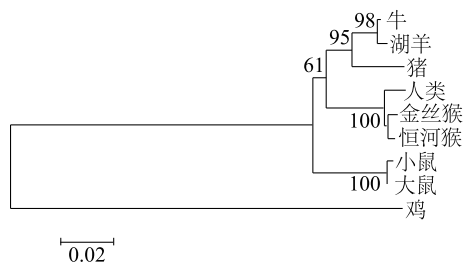
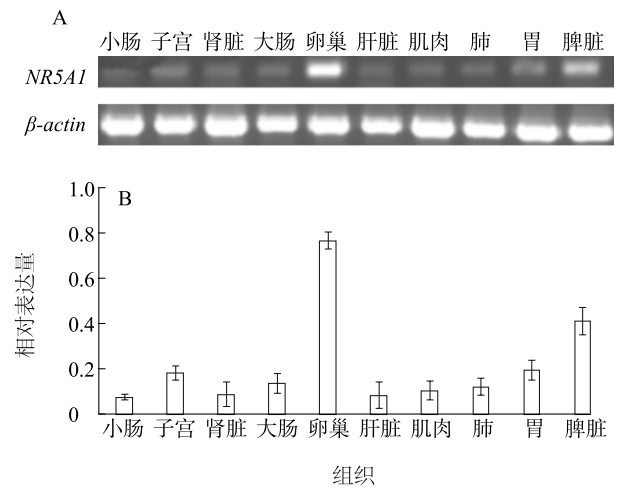
用 qRT-PCR 方法检测 *NR5A1* 基因在湖羊大卵泡和小卵泡中的表达差异,发现 *NR5A1* 基因在湖羊大卵泡中的 mRNA 表达水平显著高于小卵泡 ($P < 0.01$) (图 6A)。同时 Western blot 结果也显示在大卵泡中 *NR5A1* 蛋白质的表达量显著高于小卵泡

(图 6B)。说明 *NR5A1* 基因参与调控湖羊卵泡的发育。

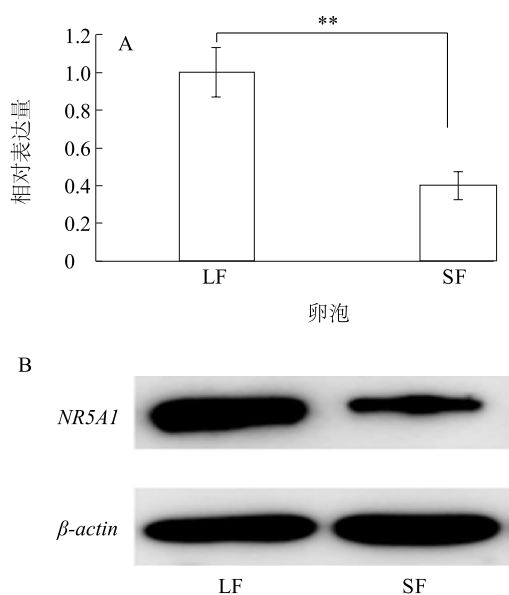
3 讨论

本研究通过克隆测序拼接得到湖羊 *NR5A1* 基因从翻译起始位点开始到翻译终止位点结束的全序列和编码区全序列。湖羊 *NR5A1* 基因全序列长度约 19 kb,包含 6 个外显子和 5 个内含子。外显子/内含子边界符合剪接供体和受体的“GT-AG”规则,与其他哺乳动物一样^[16]。*NR5A1* 基因 CDS 区长 1 386 bp,编码 461 个氨基酸残基。根据在氨基酸 206 位谷氨酰胺残基的缺失与否,哺乳动物 *NR5A1* 蛋白质有 461 个和 462 个氨基酸残基 2 种类型^[16]。

牛	MDYSYDEDLDELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQNNKHYICTESQSCSKIDKT	60
湖羊	MDYSYDEDLDELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQNNKHYICTESQSCSKIDKT	60
人类	MDYSYDEDLDELCPVCGDKVSGYHYGLLTCECKGFFKRTVQNNKHYICTESQSCSKIDKT	60
DBD		
牛	QRKRCPFRCFQKCLTVGMRLEAVRADRMGRGNKFGPMYKRDRAKQKKAQIRANGFKL	120
湖羊	QRKRCPFRCFQKCLTVGMRLEAVRADRMGRGNKFGPMYKRDRAKQKKAQIRANGFKL	120
人类	QRKRCPFRCFQKCLTVGMRLEAVRADRMGRGNKFGPMYKRDRAKQKKAQIRANGFKL	120
牛	ETGPFVGVPPPPFPDYLHGLHASEPKGLASGPPAGFLGDFGAPALFMAVESAHGPI	180
湖羊	ETGPFVGVPPPPFPDYLHGLHASEPKGLASGPPAGFLGDFGAPALFMAVESAHGPI	180
人类	ETGPFVGVPPPPFPDYLHGLHASEPKGLASGPPAGFLGDFGAPALFMAVESAHGPI	180
牛	AGYLYPAFFGRAIKSEYPEPYASPPQGFYGYPEPFGSGGFVPELILQLLQLEPDEDQV	240
湖羊	AGYLYPAFFGRAIKSEYPEPYASPPQGFYGYPEPFGSGGFVPELILQLLQLEPDEDQV	240
人类	AGYLYPAFFGRAIKSEYPEPYASPPQGFYGYPEPFGSGGFVPELILQLLQLEPDEDQV	240
牛	RARIVGCLQEPFGRPDQPAFSLLCRMADQTFISIVDWARRCMVFKELEVADQMTLLQN	300
湖羊	RARIVGCLQEPFGRPDQPAFSLLCRMADQTFISIVDWARRCMVFKELEVADQMTLLQN	300
人类	RARIVGCLQEPFGRPDQPAFSLLCRMADQTFISIVDWARRCMVFKELEVADQMTLLQN	300
牛	CWSELLVFDHIYRCIQHGKESILLVTGQVELTITVAQAGSLLHSLVLRACELVLQLFA	360
湖羊	CWSELLVFDHIYRCIQHGKESILLVTGQVELTITVAQAGSLLHSLVLRACELVLQLFA	360
人类	CWSELLVFDHIYRCIQHGKESILLVTGQVELTITVAQAGSLLHSLVLRACELVLQLFA	360
牛	LQLDRQEFVCLKEILFSLDKFLNNHSLVKAQEKANAALLDYTLCHYPHCGEKQQLL	420
湖羊	LQLDRQEFVCLKEILFSLDKFLNNHSLVKAQEKANAALLDYTLCHYPHCGEKQQLL	420
人类	LQLDRQEFVCLKEILFSLDKFLNNHSLVKAQEKANAALLDYTLCHYPHCGEKQQLL	420
LBD		
牛	LCLVEVRALSMQAKLEYLYHKHLGNEMFRNLLIEMLQAKQT	461
湖羊	LCLVEVRALSMQAKLEYLYHKHLGNEMFRNLLIEMLQAKQT	461
人类	LCLVEVRALSMQAKLEYLYHKHLGNEMFRNLLIEMLQAKQT	461

图2 哺乳动物 *NR5A1* 氨基酸序列的同源性比对及结构特征Fig.2 Amino acid sequence comparison and structural characterization of *NR5A1* in mammals图3 湖羊 *NR5A1* 蛋白质三维结构Fig.3 The three-dimensional structure of *NR5A1* in Hu sheep图4 基于 *NR5A1* 氨基酸序列的哺乳动物系统进化发育树Fig.4 The phylogenetic tree of mammals based on *NR5A1* amino acid sequence图5 湖羊 *NR5A1* 基因在不同组织中的表达Fig.5 Expression of *NR5A1* gene in different tissues of Hu sheep

而湖羊 *NR5A1* 蛋白质属于在 206 位没有谷氨酰胺残基的类型,与人类和牛一样^[16]。通过序列比对分析发现湖羊 *NR5A1* 基因在哺乳动物中相对保守,其编码的氨基酸与人类和牛的 *NR5A1* 基因编码的氨基酸一致性分别为 94.04% 和 98.94%。*NR5A1* 蛋白质具有 *NR5A* 家族保守的结构域^[17]: ① DNA 结



LF:大卵泡;SF:小卵泡。 ** 表示差异极显著。

图6 *NR5A1* 基因(A)和 *NR5A1* 蛋白质(B)在湖羊大、小卵泡中的表达差异

Fig. 6 The expression difference of *NR5A1* gene (A) and *NR5A1* protein (B) in large follicular and small follicular of Hu sheep

合域(DBD),由经典的 *cys2-cys2* 锌指和 FTZ-F1 反应元件组成,而 NR5A 家族与 DNA 结合的特异性就是由 DBD 结构域 C 末端 26 个氨基酸残基组成的 Ftz-F1 盒 (FtZ-F1 box) 所决定的;②配体结合域 (LBD),通过与配体结合反式激活 NR5A 的靶基因。根据 NR5A1 蛋白质氨基酸序列构建的系统发育树聚类结果与经典分类学结果基本一致^[18]。正如其他哺乳动物一样,湖羊 NR5A1 蛋白质也包含典型的 DNA 结合区域和配体结合区域。因此,高度同源性和保守基序使我们相信湖羊 *NR5A1* 基因像其他哺乳动物一样具有相同的功能^[19]。

有报道指出 *NR5A1* 基因参与调控性腺和肾上腺发育^[20-21] 以及类固醇激素生成^[19,22],并且在维持雌性动物卵巢功能和繁殖方面发挥重要的作用。本研究主要关注 *NR5A1* 表达及其是否通过参与调控湖羊卵泡发育进而调控湖羊的繁殖性能。通过 RT-PCR 分析发现 *NR5A1* 基因在湖羊组织中广泛表达,但是在卵巢组织中的表达量最高,这与 Falender 等^[23] 研究结果一致。Jin 等发现 *NR5A1* 主要在卵泡发育各个阶段的颗粒细胞和卵母细胞中表达,调控类固醇激素的产生进而调控卵泡发育^[24]。同时

有研究结果显示 NR5A1 能与 miR320 共同作用阻断颗粒细胞增殖^[25]。miR-764-3p 通过影响 *NR5A1* mRNA 稳定性阻断其表达进而抑制 *Cyp19a1* 基因表达,从而调控小鼠卵巢颗粒细胞发育^[26]。Pelusi 等^[27] 研究发现 *NR5A1* 敲除小鼠卵巢发育不全,卵泡数量减少,且缺乏黄体,颗粒细胞特异性敲除 *NR5A1* 基因显著影响了卵巢中 *NR5A1* 基因靶基因的表达。本研究发现 *NR5A1* 基因在湖羊大卵泡中的表达量显著高于小卵泡,表明 *NR5A1* 基因参与调控湖羊卵泡的发育,推测其通过调控湖羊颗粒细胞功能参与调控湖羊的繁殖。

参考文献:

- [1] IKEDA Y, LALA DS, 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.
- [2] LIN L, ACHERMANN J C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development [J]. *Sexual Development*, 2008, 2(4/5):200-209.
- [3] 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.
- [4] TANTAWY S, LIN L, AKKURT I, et al. Testosterone production during puberty in two 46, XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2012, 167(1):125-130.
- [5] TAIEB J, GRYNBERG M, PIERRE A, et al. FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2011, 25(4):645-655.
- [6] MATMLIS C K, MAYO K E. The LIM domain protein FHL2 interacts with the NR5A family of nuclear receptors and CREB to activate the inhibin- α subunit gene in ovarian granulosa cells [J]. *Molecular Endocrinology*, 2012, 26(8):1278-1290.
- [7] MURAYAMA C, MIYAZAKI H, MIYAMOTO A, et al. Luteinizing hormone (LH) regulates production of androstenedione and progesterone via control of histone acetylation of StAR and CYP17 promoters in ovarian theca cells [J]. *Molecular Cellular Endocrinology*, 2012, 350(1):1-9.
- [8] IMAMICHI Y, MIZUTANI T, JU Y, et al. Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells [J]. *Molecular Cellular Endocrinology*, 2013, 370(1/2):1-10.
- [9] LAW NC, WECK J, KYRISS B, et al. Lhcr expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated β -catenin, TCF3, and FOXO1 [J]. *Molecular Endocrinology*, 2013, 27(8):1295-1310.
- [10] YIN M, LÜ M, YAO G, et al. Transactivation of microRNA-383 by steroidogenic factor-1 promotes estradiol release from mouse o-

- varian granulosa cells by targeting RBMS1 [J]. *Molecular Endocrinology*, 2012, 26(7): 1129-1143.
- [11] FORTIN J, KUMAR V, ZHOU X, et al. NR5A2 regulates Lhb and Fshb transcription in gonadotrope-like cells in vitro, but is dispensable for gonadotropin synthesis and fertility in vivo [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e59058
- [12] SCHANG A L, QUÉRAT B, SIMON V, et al. Mechanisms underlying the tissue-specific and regulated activity of the Gnhrh promoter in mammals [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3: 162.
- [13] 李隐侠, 张俊, 钱勇, 等. 湖羊 *NR5A1* 基因 SNPs 筛选及其与产羔数的关联分析 [J]. *江苏农业学报*, 2017, 33(1): 124-132.
- [14] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] YAO Y, REHEMAN A, XU Y, et al. miR-125b contributes to ovarian granulosa cell apoptosis through targeting BMPR1B, a major gene for sheep prolificacy [J]. *Reproduction Science*, 2018. doi: 10.1177/1933719118770544 .
- [16] OBA K, YANASE T, NOMURA M, et al. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene [J]. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 1996, 226(1): 261-267.
- [17] YUMOTO F, NGUYEN P, SABLIN E P, et al. Structural basis of coactivation of liver receptor homolog-1 by β -catenin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2012, 109(1): 143-148.
- [18] LI Y X, ZHANG J, QIAN Y, et al. Molecular characterization, expression, polymorphism of NR5A2 and its relationship with litter size in Hu sheep [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 12765-12775.
- [19] MLYNARCZUK J, WROBEL M H, ZIOLKOWSKA A, et al. Involvement of the orphan nuclear receptor SF-1 in the effect of PCBs, DDT and DDE on the secretion of steroid hormones and oxytocin from bovine granulosa cells [J]. *Animal Reproduction Science*, 2013, 143(1-4): 30-37.
- [20] BUAAS F W, GARDINER J R, CLAYTON S, et al. *In vivo* evidence for the crucial role of SF1 in steroid-producing cells of the testis, ovary and adrenal gland [J]. *Development*, 2012, 139(24): 4561-4570.
- [21] EL-KHAIRI R, MARTINEZ-AGUAYO A, FERRAZ-DE-SOUZA B, et al. Role of DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (NR5A1) in human adrenal function [J]. *Endocrine Development*, 2011, 20: 38-46.
- [22] EHRLUND A, JONSSON P, VEDIN L L, et al. Knockdown of SF-1 and RNF31 affects components of steroidogenesis, TGF β , and Wnt/ β -catenin signaling in adrenocortical carcinoma cells [J]. *PLoS ONE*, 2013, 7(3): e32080.
- [23] FALENDER A E, LANZ R, MALENFANT D, et al. Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary [J]. *Endocrinology*, 2013, 144(8): 3598-3610.
- [24] JIN X, HAN C S, ZHANG X S, et al. Stem cell factor modulates the expression of steroidogenesis related proteins and FSHR during ovarian follicular development [J]. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 2005, 10: 1573-1580.
- [25] YIN M, WANG X, YAO G, et al. Transactivation of miR-320 by microRNA-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1 proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(26): 18239-18257.
- [26] WANG L, LI C, LI R, et al. MicroRNA-764-3p regulates 17 β -estradiol synthesis of mouse ovarian granulosa cells by targeting steroidogenic factor-1 [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2016, 52(3): 365-373.
- [27] PELUSI C, IKEDA Y, ZUBAIR M, et al. Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2008, 79(6): 1074-1083.

(责任编辑:张震林)