

牛疱疹病毒 I 型 gB 基因原核表达载体的构建和高效表达^{*}

吴春涛¹, 王建华², 侯相山³, 霍雷², 侯艳梅², 牛钟相¹

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018;

2 天津出入境检验检疫局, 天津 300456; 3 东营职业学院 农业工程系, 山东 东营 257091)

[摘要] 用 PCR 法扩增了牛疱疹病毒 I 型 Bartha Nu/67 株 gB 基因, 将其插入原核表达载体 pBAD/TOPO 中构建重组质粒 pBAD-gB。将 pBAD-gB 质粒转化大肠杆菌 TOP10 后进行了诱导表达, 对表达产物进行了纯化和抗原性检测, 并通过改变诱导剂 L-阿拉伯糖的浓度和诱导时间对诱导表达条件进行了优化。结果表明, 重组质粒 pBAD-gB 构建成功, gB 蛋白获得了高效表达, 并以包涵体形式存在, 纯化后 gB 蛋白的纯度达 90% 以上, gB 蛋白抗原性良好, 最佳诱导表达条件: L-阿拉伯糖终浓度为 0.2 g/L, 诱导时间为 5 h。

[关键词] 牛疱疹病毒 I 型; gB 基因; 原核表达

[中图分类号] S851.347.101

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0019-05

Construction and effective expression of the prokaryotic expression vector containing BHV-1 gB gene

WU Chun-tao¹, WANG Jian-hua², HOU Xiang-shan³, HUO Lei², HOU Yan-mei², NIU Zhong-xiang¹

(1 College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2 Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456, China;

3 Department of Animal Science and Technology, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The gB gene fragment of bovine herpesvirus-1 Bartha Nu/67 strain was amplified by PCR and inserted into prokaryotic expressing vector pBAD/TOPO. The recombinant plasmids were then transformed into *E. coli* TOP10 for expression. The expression was optimized with proper inducing conditions of 0.2 g/L L-Arabinose and 5 hours induction. The SDS-PAGE assay showed that the recombinant plasmids could be expressed in inclusion body at a high level when induced with L-Arabinose. The purity of fusion proteins which was purified by magnehis protein purification system was more than 90%. Western-blot showed the good antigenicity of the target proteins.

Key words: bovine herpesvirus-1 (BHV-1); gB gene; prokaryotic expression

牛传染性鼻气管炎(Infectious bovine rhinotracheitis, BR)又名牛疱疹病毒 I 型(Bovine herpesvirus-1, BHV-1)感染症, 是一种急性、热性、接触性传染病, 给全球牛、羊养殖业造成了巨大的经济损失, 被世界动物卫生组织(OIE)列为 B 类疾病, 属我国进境动物和国际动物贸易重点检疫对象。本病主

要的临床特征是高热、呼吸困难、鼻炎、鼻窦炎和潜伏感染, 可引起牛生长发育不良、产乳量和生殖力下降、流产、死亡率和淘汰率增高, 而且急性 BR 呼吸道感染可继发牛致命性细菌性肺炎。本病在世界范围内流行^[1], 除南美部分国家外, 世界各国均已分离到该病毒, 在我国部分省市有蔓延趋势^[2]。牛传染性

^{*} [收稿日期] 2006-12-25

[基金项目] 天津市应用基础研究计划项目(YFJMJC12000)

[作者简介] 吴春涛(1978-), 男, 山东青岛人, 硕士, 主要从事微生物与免疫学研究。

[通讯作者] 牛钟相(1951-), 男, 山东潍坊人, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物与免疫学研究。

鼻气管炎的病原为 BHV-1, 是疱疹病毒科 α -疱疹病毒亚科成员, 系有囊膜双股 DNA 病毒^[3]。gB 蛋白是 BR 的主要抗原蛋白^[4], 具有良好的免疫原性和反应原性^[5-6], 能诱导产生高水平的体液和细胞免疫, 这为本病的诊断提供了重要的分子生物学及免疫学依据。为了评价 gB 重组蛋白在牛传染性鼻气管炎生物检测技术中的利用价值, 本试验构建了 BHV-1 Bartha Nu/67 株 gB 基因的高效原核表达载体, 并将其在大肠杆菌中进行了高效表达, 对表达产物进行了纯化和抗原性检测, 以期建立 BR 新的诊断方法创造良好的物质条件。

1 材料与方法

1.1 材料

牛传染性鼻气管炎病毒 Bartha Nu/67 株、牛肾传代细胞 (Madin darby bovine kidney, MDBK) 由天津出入境检验检疫局王建华博士惠赠; 牛传染性鼻气管炎阳性血清、阴性血清, 购自中国兽药监察所; Taq 酶、LA 酶均购自 Takara 公司; pBAD/Thio-TOPO 表达试剂盒 (含表达宿主菌 TOP10 及诱导剂 L-A rabinose) 购于 Invitrogen 公司; DAB, BSA, Tris 碱、甘氨酸及 HRP 标记的羊抗牛二抗, 购自天津联星公司; Minicycle PCR 仪, 购自美国基因公司; 凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司; Magne-HisTM Protein Purification System 试剂盒购于 Promega 公司。参照 GenBank 公布的牛疱疹病毒 I 型 Bartha Nu/67 株核苷酸序列, 设计 1 对特异引物: 上游引物 P1: 5'-GTT CTC GCT GCT CTA CGC-3'; 下游引物 P2: 5'-CCA CTT CTT GTC CAC CAG-3'。

引物由大连 Takara 公司合成。

1.2 BHV-1 Bartha Nu/67 株 gB 基因的提取与扩增

将 Bartha Nu/67 株接种于单层 MDBK 细胞上, 置 37℃ 温箱中培养 2~3 d, 待其产生典型细胞病变 (Cytopathic effect, CPE) 后提取病毒核酸。吸取 1 μ L 病毒核酸, 50 倍稀释后取 2 μ L 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L: 病毒核酸 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 2 $\times$ GC Buffer I 25 μ L, 上下游引物各 2 μ L, ddH₂O 16.7 μ L, LA 酶 0.8 μ L。瞬时离心后进行 PCR 扩增。反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 TOP10 细胞的转化和鉴定

取 PCR 产物 2 μ L, 盐溶液 1 μ L, 加双蒸水至 5

μ L, 然后再加 TOPO 载体 1 μ L, 轻弹混匀试剂, 室温下连接 5 min 后置于冰上。将 2 μ L 连接产物加到一管 TOP10 感受态细胞中, 轻弹混匀, 冰浴 30 min, 42℃ 热激 30 s 后迅速转移到冰上, 加 250 μ L SOC 培养基 (室温), 37℃、200 r/min 摇菌培养 1 h, 吸取 200 μ L 均匀涂布含氨苄 100 μ g/L 的 LB 平板, 37℃ 温箱培养过夜。随机挑取 8 个菌落, 于 37℃

在含氨苄 (100 μ g/L) LB 液体培养基中 100 r/min 震荡培养 12 h。取 1 μ L 菌液作模板进行菌液 PCR 鉴定, 将阳性质粒命名为 pBAD-gB。

1.4 TOP10 的诱导表达及最佳诱导条件的确定

1.4.1 诱导表达 取含 pBAD-gB 的 TOP10 细菌 6 管, 于 37℃ 摇床培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.5 (细菌密度约为 10×10^7 CFU/mL), 加入 L-A rabinose (终浓度为 0.2 g/L), 37℃ 诱导 4 h, 诱导产物用 120 g/L 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分析, 筛选出能够表达的阳性菌株。

1.4.2 最佳诱导条件的确定 (1) 最佳诱导时间。取其中 1 个表达阳性菌株用上述相同条件诱导, 分别在 3, 4, 5 和 6 h 时取样进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定最佳诱导时间。(2) L-A rabinose 的最佳浓度。在最佳诱导时间下分别以 0.002, 0.02, 0.2 和 2 g/L L-A rabinose 诱导表达, 确定其最佳浓度。

1.5 BHV-1 gB 基因序列测定

将正向连接且能表达的 TOP10 工程菌送 Takara 公司测序, 所测序列与 GenBank 中 Bartha Nu/67 株相应核酸序列进行比对, 以确定扩增片段的可靠性。

1.6 pBAD-gB 融合蛋白的纯化

取最佳诱导条件下诱导表达的基因工程菌 200 mL, 4℃、5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集并称湿菌体质量。向沉淀中加菌体裂解液 (3 mL/g) 悬浮菌体, 再加入溶菌酶 (终浓度为 100 μ g/mL), 混匀后冰浴 10 min, 然后超声裂解 12~20 次^[7] (裂解次数根据菌体浓度和体积确定, 每次超声 30 s, 间隔 30 s)。12 000 r/min 离心 30 s, 取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE (120 g/L 分离胶) 电泳分析。参考 MagneHisTM Protein Purification System 蛋白纯化试剂说明书并稍做改动 (用超声后的沉淀代替菌液), 纯化融合蛋白。

1.7 pBAD-gB 融合蛋白的 Western-blot 检测

取融合蛋白纯化产物, 用 120 g/L 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 70 V 电压转移 2 h, 用 50 g/L 脱脂乳于 4℃ 条件下封闭过夜, BR 阳性血清按 1:200

于 37℃ 振摇 2 h, HRP 标记的二抗按 1:300 于 37℃ 下振摇 1 h, DAB 显色至能看到清晰条带为止。

2 结果与分析

2.1 BHV-1 *gB* 基因的扩增

取 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖电泳。结果显

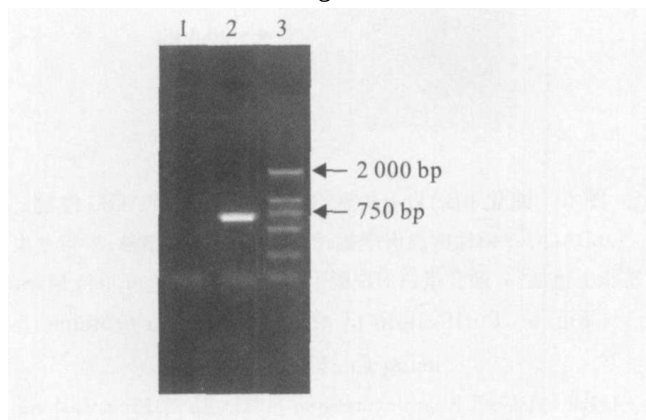


图 1 BHV-1 *gB* 基因 PCR 扩增产物的电泳图

1. 阴性对照; 2. *gB* PCR 产物; 3. DL 2000 Marker

Fig 1 PCR products of *gB* gene

1. Negative control of PCR; 2. *gB* PCR; 3. DL 2000 Marker

2.3 融合蛋白的诱导表达

6 个阳性克隆经浓度为 0.2 g/L 的 L-A 阿拉伯糖诱导 4 h 后, 有 2 个在 35 ku 处有一条特异性条带 (图 3), 大小与预期结果相符, 正向插入率为 33%。0, 3, 4, 5 和 6 h 取样, SDS-PAGE 电泳结果显

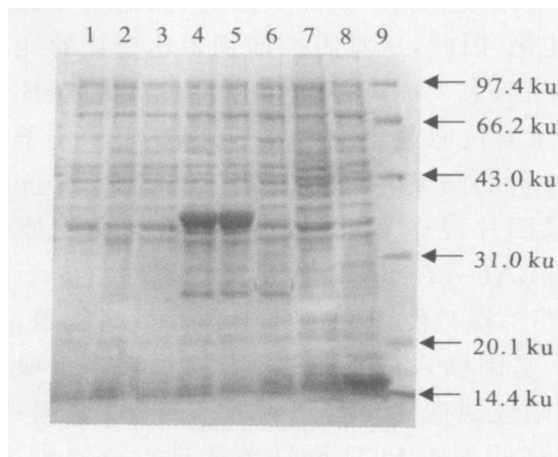


图 3 阳性克隆 TOP10 诱导 4 h 表达产物的 SDS-PAGE 分析

1~6 阳性克隆; 7. PCR 鉴定为阳性克隆;
8 空载体对照; 9 Low MW protein Marker

Fig 3 Analysis of the TOP10 expressed products by SDS-PAGE

1-6 Positive clone of PCR; 7. Negative clone; 8 Control of bacteria with pBAD; 9 Low MW protein Marker

示, 在 580 bp 处出现一条亮度很高的特异条带 (图 1), 与预期长度一致。

2.2 重组质粒 pBAD-*gB* 的 PCR 鉴定

图 2 结果显示, 有 6 管菌液能扩增出特异性条带, 阳性克隆率为 75%。

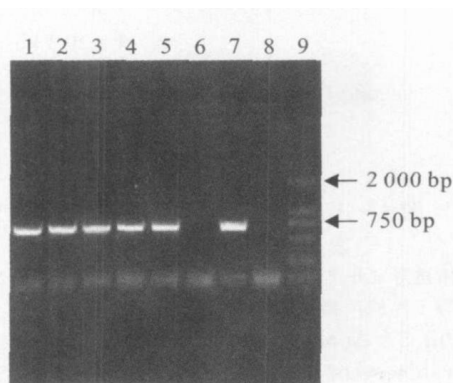


图 2 pBAD-*gB* 质粒的 PCR 鉴定

1~5, 7. 阳性克隆; 6, 8 阴性克隆; 9 DL 2000 Marker

Fig 2 Identification of pBAD-*gB* with PCR

1-5, 7. Positive clone; 6, 8 Negative clone; 9 DL 2000 Marker

示, 诱导 5 h 表达量最高 (图 4), 表明最佳诱导时间为 5 h。诱导 5 h, L-A 阿拉伯糖终浓度为 2 和 0.2 g/L 时的表达量比 0.02 和 0.002 g/L 大 (图 5), 考虑成本因素, 诱导剂最佳浓度为 0.2 g/L。

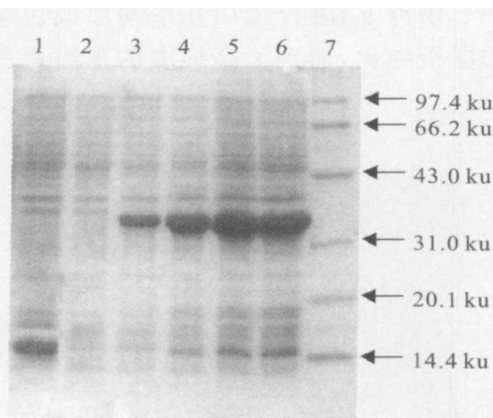


图 4 阳性克隆 TOP10 诱导不同时间表达产物的 SDS-PAGE 分析

1. 空载体诱导 5 h; 2~6 分别为阳性克隆诱导 0, 3, 4, 5, 6 h 的产物;
7. Low MW protein Marker

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the TOP10 expressed recombinant protein pBAD-*gB*

1. Expression product of TOP10 with pBAD induced 5 h with L-A arabinose; 2-6 Expression product of TOP10 with pBAD-*gB* induced 0, 3, 4, 5, 6 h with L-A arabinose; 7. Low MW protein Marker

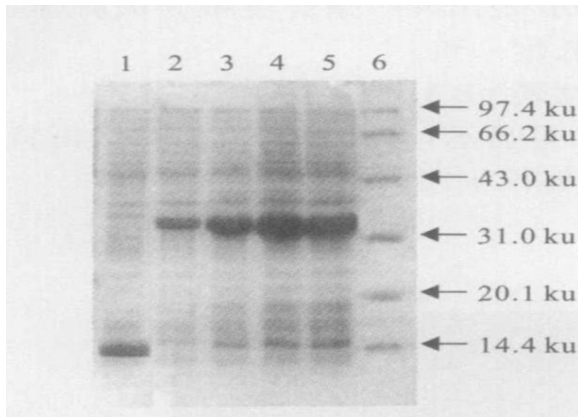


图 5 不同浓度 L-A rabinose 诱导 TOP10 表达产物的 SDS-PAGE 分析

1 空载体诱导 4 h; 2~5 分别为 0.002, 0.02, 0.2 和 2 g/L L-A rabinose 诱导 5 h 的产物; 6 Low MW protein Marker

Fig 5 Analysis of the expressed products with

L-A rabinose of different concentrations by SDS-PAGE

1 Expressed products of TOP10 with pBAD induction for 4 h; 2-5 Expressed products of TOP10 with pBAD-gB induced for 5 h with 0.2 g/L L-A rabinose; 6 Low MW protein Marker

2.4 BHV-1 gB 基因测序结果

将测序结果用 DNAMAN 软件与 GenBank 中 Bartha Nu/67 株的核酸序列进行比对, 结果发现其序列与 Bartha Nu/67 完全一致, 表明 gB 基因具有高度的保守性。

2.5 pBAD-gB 融合蛋白的纯化

pBAD-gB 融合蛋白纯化结果见图 6。图 6 表明, 在 37 °C 条件下, 融合蛋白几乎均形成包涵体, 经一步亲和层析纯化, 得到了高纯度的重组蛋白。

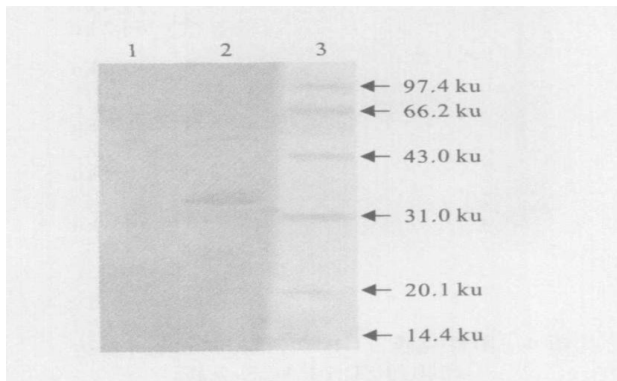


图 7 表达产物的免疫印迹分析

1 空载体对照; 2 融合表达产物; 3 Low MW protein Marker

Fig 7 Analysis of the expressed products by Western blotting

1 Expressed product of TOP10 with pBAD; 2 Expressed products of TOP10 with pBAD-gB; 3 Low MW protein Marker

2.6 pBAD-gB 融合蛋白的抗原性

Western-blot 检测结果显示, 在目标条带 35 ku

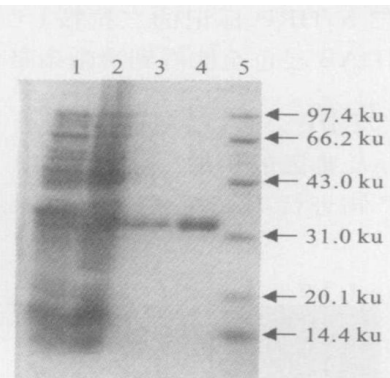


图 6 纯化 pBAD-gB 融合蛋白的 SDS-PAGE 检测

1 pBAD-gB 阳性菌裂解产物; 2 第一次洗涤上清液; 3 第三次洗涤上清液; 4 融合蛋白的洗脱上清; 5 Low MW protein Marker

Fig 6 Purification of pBAD-gB fusion proteins using the Magnellis™

1 Bacterial cell lysate expressing pBAD-gB; 2 First washing supernatant; 3 Third washing supernatant; 4 Eluted supernatant pBAD-gB fusion proteins; 5 Low MW protein Marker

处出现一棕红色印迹, 而空载体对照没有 (图 7), 表明表达产物特异性良好。

3 讨论

表达载体是实现外源基因表达的一个重要的因素。本试验采用的 pBAD/TOPO 是一个高效率的表达系统, 一步法直接插入 Taq polymerase 扩增的 PCR 产物到构建的表达载体只需要 5 min, 在 PCR 程序后不需要连接酶, 就能直接进行转化, 并能进行简单的纯化。因此, 从基因扩增到表达产物的纯化仅需一周左右, 大大提高了工作的效率。根据 gB 蛋白的特点 (主要抗原表位集中在胞外域^[8]) 和分子生物学软件分析的结果, 本研究选用 BHV-1 gB 抗原区的特定基因片段作为目的基因, 构建了重组原核表达载体 pBAD-gB, 并优化了表达条件。由于菌液 PCR 阳性菌株只能说明细菌中含有目的基因, 不能说明 gB 基因插入位点是否正确, 而能够实现表达的 PCR 阳性菌株才含有正确插入的 gB 基因片段。因此, 本试验先对 PCR 阳性菌株进行诱导表达, 再对能够表达的阳性菌株进行序列测定, 节省了测序成本。

目前, 病毒中和试验和 ELISA 是国际贸易双边协定认可的 BHV-1 检测方法^[9]。直接荧光抗体法^[10], 免疫酶试验和放射免疫测定等方法^[11]也可用于 BHV 抗原的检测, 这些方法的主要缺点是耗时耗力且易受不确定因素影响。ELISA 检测速度快,

对实验要求不高,不需要无菌操作,可以自动化操作,检测灵敏,结果可靠,适于实验室血清学诊断、海关检疫及大规模疫病普查。当前诊断 BR 的 ELISA 试剂盒是利用全病毒粒子作为包被抗原,存在成本高和生物安全性差的缺点。本试验中,作者对编码 BHV-1 gB 蛋白主要抗原区域的核苷酸序列进行了原核高效表达,Western-blot 检测结果表明,该重组蛋白具有很好的反应原性和特异性,有望替代全病毒粒子作为检测抗原,从而降低抗原生产成本,解决全病毒粒子作为包被抗原时散毒的潜在威胁。

由此可见,BHV-1 gB 基因片断在大肠杆菌中的高效表达,是获得重组 gB 抗原蛋白的有效途径。本试验为进一步应用以 BHV-1 主要抗原区基因表达蛋白作为抗原,建立 BR ELISA 检测方法的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 于大海,崔砚林. 中国进出境动物检疫规范[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 456-462
- [2] 艾玉萍,谭诗文,冉懋韬,等. 贵州省奶牛传染性鼻气管炎的血清学调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2004(5): 19
- [3] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 988-1030
- [4] Tikoo S K, Campos M, Babiuk L A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) biology, pathogenesis, and control[J]. Adv Virus Res, 1995, 45: 191-193
- [5] Van Drunen Littel-van Den Hurk S, Tikoo S K, Liang S, et al. Bovine herpesvirus-1 vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 1993, 71: 405-408
- [6] Babiuk L A, Van Drunen Littel-van Den Hurk S, Tikoo S K, et al. Novel viral vaccines for livestock[J]. Vet Immun Immunopath, 1996, 54: 355-358
- [7] 古红,杨汉春,郭鑫,等. PRRSVB4株ORF5基因的原核表达与重组蛋白的纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 64-69
- [8] Zhu X P, Wu S X, Geoffrey J L. Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D authentic conformational structure and immunogenicity[J]. Vaccine, 1997, 15(6): 679-688
- [9] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂A类和B类疾病诊断试验及疫苗标准手册[M]. 农业部畜牧兽医局,译. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 359-361
- [10] Terpstra C. Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence[J]. Vet Q, 1997, 1: 138-144
- [11] Suresh S. Detection of BHV-1 in bovine by immunodiffusion and counter immunoelectrophoresis tests[J]. Journal of Bombay Veterinary College, 1993, 4: 37-40
- [12] 贾林芝,张育辉. 山溪鲵卵巢滤泡细胞的显微与超微结构[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 419-421
- [13] Zhang Y H, Jia L Z. Microstructure and ultrastructure of vitellogenesis in oocytes of the stream salamander (*Batrachuperus tibetanus*) [J]. Acta Zool Sin, 2002, 48(4): 534-542
- [14] Callard I P, Ho S M. Vitellogenesis and viviparity[M]//Chester-Jones I, Ingleton P M, Phillips J G. Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. New York: Plenum Press, 1987: 214-216
- [15] 徐剑. 西藏山溪鲵生殖腺的季节性变化[J]. 动物学杂志, 1995, 30(3): 47-49
- [16] 王宏元,张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化[J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 484-490
- [17] Fortune J E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages[J]. Dev Biol, 1983, 99: 502-509
- [18] Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor[J]. J Endocrinol, 1998, 17: 2008-2018
- [19] Castoria G, Barone M V, Domenico M D, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis[J]. J Endocrinol, 1999, 18: 2500-2510
- [20] Thibier-Fouchet C, Mulner O, Ozon R. Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes of *Xenopus laevis*[J]. Biol Reprod, 1976, 14(3): 317-326
- [21] Callard I P, Fileti L A, Perez L E, et al. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity[J]. Am Zool, 1992, 32: 264-275
- [22] Fortune J E, Tsang P C. Production of androgen and estradiol-17 β by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins in vitro[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 43(2): 234-242
- [23] Zerani M, Vellano C, Amabili F. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur.) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 82(3): 337-344
- [24] Degani G, Sharon R, Warburg M. Ovarian steroid levels in *Salamandra atra* during the reproductive cycle[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106(3): 356-360
- [25] Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings[J]. Steroids, 2002, 67: 511-517
- [26] Hammes S R. Steroid and oocyte maturation- a new look at an old story[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(4): 769-775
- [27] Haas D, White S N, Lutz L B, et al. The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(8): 2035-2046

(上接第18页)

- [12] 贾林芝,张育辉. 山溪鲵卵巢滤泡细胞的显微与超微结构[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 419-421
- [13] Zhang Y H, Jia L Z. Microstructure and ultrastructure of vitellogenesis in oocytes of the stream salamander (*Batrachuperus tibetanus*) [J]. Acta Zool Sin, 2002, 48(4): 534-542
- [14] Callard I P, Ho S M. Vitellogenesis and viviparity[M]//Chester-Jones I, Ingleton P M, Phillips J G. Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. New York: Plenum Press, 1987: 214-216
- [15] 徐剑. 西藏山溪鲵生殖腺的季节性变化[J]. 动物学杂志, 1995, 30(3): 47-49
- [16] 王宏元,张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化[J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 484-490
- [17] Fortune J E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages[J]. Dev Biol, 1983, 99: 502-509
- [18] Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor[J]. J Endocrinol, 1998, 17: 2008-2018
- [19] Castoria G, Barone M V, Domenico M D, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis[J]. J Endocrinol, 1999, 18: 2500-2510
- [20] Thibier-Fouchet C, Mulner O, Ozon R. Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes of *Xenopus laevis*[J]. Biol Reprod, 1976, 14(3): 317-326
- [21] Callard I P, Fileti L A, Perez L E, et al. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity[J]. Am Zool, 1992, 32: 264-275
- [22] Fortune J E, Tsang P C. Production of androgen and estradiol-17 β by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins in vitro[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 43(2): 234-242
- [23] Zerani M, Vellano C, Amabili F. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur.) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 82(3): 337-344
- [24] Degani G, Sharon R, Warburg M. Ovarian steroid levels in *Salamandra atra* during the reproductive cycle[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106(3): 356-360
- [25] Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings[J]. Steroids, 2002, 67: 511-517
- [26] Hammes S R. Steroid and oocyte maturation- a new look at an old story[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(4): 769-775
- [27] Haas D, White S N, Lutz L B, et al. The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(8): 2035-2046