

文章编号: 1674 - 5566(2016)05 - 0641 - 11

DOI:10.12024/jsou.20160301702

克氏原螯虾泛素结合酶 *E2r* 基因的克隆及表达分析

钱照君¹, 祝天凉¹, 姜虎成², 石宝通¹, 李家乐¹

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

摘要: 为了解泛素结合酶 *E2r* 基因在克氏原螯虾性腺发育中的作用, 利用 RACE 技术得到了 cDNA 全序列, 命名为 *Pc-UBE2r*。该基因序列全长为 3 671 bp, 包含泛素结合酶的特有结构域, 以及半胱氨酸残基活化位点。开放阅读框为 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 预测蛋白分子量约为 27.6 ku。BLAST 比对发现, 克氏原螯虾 *UBE2r* 基因与节肢动物 *UBE2r* 基因具有较高的同源性。系统进化分析表明, *Pc-UBE2r* 基因与日本囊对虾聚为一枝。qRT-PCR 研究表明, *Pc-UBE2r* 基因在性腺中的表达量显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。在卵巢中, *Pc-UBE2r* 基因的表达量在未发育期最低, 在卵黄发生前期表达量快速增长, 随后表达量逐渐降低。在精巢中, *Pc-UBE2r* 基因的表达量在精母细胞发生期达到最高水平。组织原位杂交结果显示, *Pc-UBE2r* 基因在卵巢中均匀分布在未发育期的卵母细胞细胞质中, 随后逐渐迁移到卵母细胞细胞核以及滤泡细胞周围。在精巢中, *Pc-UBE2r* 基因主要分布在精母细胞的周围。组织总蛋白 Western blot 检测发现, *UBE2r* 蛋白在精巢和卵巢中的表达量也显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。综上所述, 我们推测 *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾配子发生和性腺发育方面发挥了重要作用, 本研究将为虾蟹类性腺发育调控的分子机制奠定基础 and 提供依据。

关键词: 泛素结合酶 *E2r*; 性腺; 原位杂交; Western blot; 克氏原螯虾

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 又名小龙虾, 原产于美国中南部以及墨西哥东北部^[1], 因其味道鲜美和营养丰富, 已成为我国重要的水产养殖物种之一^[2-3]。近年来, 国内外克氏原螯虾的消费需求量快速增长^[4-6], 优质苗种的缺乏在一定程度上约束了克氏原螯虾养殖产业的发展。性腺发育是甲壳动物进行有性生殖的基础, 对于克氏原螯虾性腺发育的研究, 将有助于推动克氏原螯虾养殖产业的发展。目前, 有关克氏原螯虾性腺发育的研究, 主要集中在性腺组织结构及发育分期方面, 在分子水平上研究性腺发育机制尚显不足。因此, 在分子水平上研究其参与性腺发育机制的调节具有重要意义。

泛素化途径是生物体内一种高效率和高选择性的蛋白降解途径。泛素化途径参与许多细胞过程, 如细胞周期的调控、细胞信号转导、发育与分化和物质代谢等^[7-9]。泛素结合酶 *UBE2r*

(ubiquitin-conjugating E2r, *UBE2r*) 是泛素化途径中重要的泛素结合酶之一, 由蛋白激酶 *Ck2* 磷酸化形成。近年来, *UBE2r* 已先后从酵母、爪蟾和人类等生物中被成功分离出来。研究发现 *UBE2r* 在酿酒酵母细胞 G1-S 过渡期的调节中是必不可少的, 是细胞周期的一种抑制剂^[10]。YEW 等^[11] 研究发现 *UBE2r* 基因在非洲爪蟾的卵中具有调节 *Cdk2-cyclinE* 启动的功能。REYMOND 等^[12] 研究显示, *UBE2r* 基因在人类细胞周期中, 参与细胞核和细胞质的迁移, 同时也在有丝分裂后期发挥作用。PATI 等^[13] 报道, 无论在减数分裂还是有丝分裂细胞周期中, *UBE2r* 基因可能对 cAMP 诱导基因调控具有影响。沈冰玲等^[14] 对日本囊对虾的研究发现, *UBE2r* 基因在性腺中高表达, 且在性腺发育各时期表达存在显著差异, 推测其在精子和卵子发生中发挥了重要作用。

收稿日期: 2016-03-22 修回日期: 2016-05-03

基金项目: 上海工程技术中心能力提升项目(13DZ2280500); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206)

作者简介: 钱照君(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: zhaojunqian1216@163.com

通信作者: 李家乐, E-mail: jlli@shou.edu.cn

本研究中我们利用 RACE 技术获得了克氏原螯虾 *UBE2r* 基因的序列全长,结合 qRT-PCR 技术和原位杂交技术,对克氏原螯虾 *UBE2r* 基因在不同组织及性腺发育过程中的表达情况进行研究。通过 Fmoc 法合成多肽 C-SDNDIDDGDDSGNGES-NH₂,制备人工抗体,并利用 Western blot 技术进一步验证其在蛋白层面的表达情况。本研究旨在为进一步探讨克氏原螯虾 *UBE2r* 基因的功能提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用克氏原螯虾于 2015 年采自江苏盱眙满江红龙虾产业园有限公司。克氏原螯虾于实验室暂养 72 h,经低温麻醉后,活体解剖。收集眼柄、鳃、肝胰腺、心脏、肠、肌肉、精巢和卵巢组织样品。基于克氏原螯虾卵巢的外部形态、颜色和组织学特征^[15],参照李胜等^[16]对克氏原螯虾卵巢的分期方法,将卵巢分为 6 个时期:未发育期(O1)、发育早期(O2)、卵黄发生前期(O3)、卵黄发生期(O4)、成熟期(O5)和恢复期(O6)。参照黄文虎等^[17]对精巢的分期方法,将克氏原螯虾精巢分为 3 个时期:精原细胞增殖期(T1)、精母细胞发生期(T2)和精子细胞生成期(T3)。从 9 个不同个体中分别取出各组织,等量混匀后液氮速冻,-80 °C 超低温保存,以备后续实验使用。用于原位杂交和组织学观察的组织,用 4% 多聚

甲醛处理后,再经甲醇处理,-20 °C 保存。用于 Western blot 检测的组织经 DEPC 处理水清洗后立即投入液氮中,-80 °C 保存。

1.2 实验方法

使用 TRIzol 法提取各组织的总 mRNA,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 分光光度计检测合格后,置于 -80 °C 冰箱保存备用。基于已构建的克氏原螯虾性腺转录组文库^[18]中 *UBE2r* 基因的部分序列,利用 Primers 5.0^[19] 设计短片段引物 F1、R1(表 1)进行目的片段扩增。按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification 试剂盒(Clontech,美国)说明书进行反转录,以 SMART cDNA 为扩增模板,使用试剂盒自带的 UPM 引物与基因特异性引物,分别进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。反应体系为:41.5 μL Master Mix;2.5 μL cDNA 模板;5 μL 10 × Universal Primer A Mix;1 μL GSP-F2(或 GSP-R2)。扩增程序为:94 °C 变性 30 s;72 °C 退火 3 min,5 个循环;94 °C 变性 30 s,70 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 3 min,5 个循环;94 °C 变性 30 s,68 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 3 min,25 个循环。采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根,中国)切胶回收 3'RACE 产物及 5'RACE 产物,将 PCR 产物纯化后连接到 Pgem-T Easy 载体上,转化到感受态细胞 *E. coli* DH5α 中,经蓝白斑筛选后挑选阳性克隆进行测序,实验中所用的引物及测序均由上海生工工程有限公司完成。

表 1 实验引物及序列

Tab. 1 The primers and sequences used in this experiments

引物名称 primer name	引物序列 sequence(5' - 3')	扩增用途 amplification target
F1	GGACAAAAAAGGATGGCTA	短片段扩增
R1	CGTGGGTCCGTGAGAGTTA	
GSP-F2	TGGCGACGACAGTGGTAATG	3'RACE
GSP-R2	CGTGGGTCCGTGAGAGTTA	5'RACE
RT-F3	AGAGGGACAAAAAAGGATGGC	荧光定量
RT-R3	GTTGAGGAGCTTGACGCAGA	
UPM(long)	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG CACTGGTATCAACGCAGACT	3'RACE 及 5'RACE
UPM(short)	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
EIF-F	GGAATAAGGGGACGAAGACC	荧光定量
EIF-R	GCAAACACACGCTGGGAT	

1.3 生物信息学分析与系统进化树构建

采用 NCBI 在线分析工具 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorfhttp://>

www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) 对所得到的序列进行开放阅读框和氨基酸预测,并对编码蛋白的各种基本理化特性进行预测。在

线 BLAST 其他物种的 *UBE2r* 基因序列,结合 BioEdit^[20] 软件对基因序列进行多重比对,用 MEGA 4.0^[21] 软件构建 NJ 系统进化树。

1.4 *Pc-UBE2r* 基因的表达分析

分别以克氏原螯虾眼柄、鳃、肝胰腺、心脏、肠道、肌肉、精巢和卵巢 8 个组织总 RNA 为模板,以及精巢发育的 3 个时期和卵巢发育的 6 个时期的组织总 RNA 为模板,使用 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 合成用于 RT-PCR 反应的 cDNA, 定量引物为: RT-F3、RT-R3 (表 1)。选择在克氏原螯虾各组织中可稳定表达的内参基因 EIF 来校正基因的表达量^[22]。实时定量 PCR 反应按照 SYBR[®] Premix ExTaq[™] II (Tli RnaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书进行, PCR 反应体系: 12.5 μ L 2 \times SYBR Green qRT-PCRtime PCR Master Mix; 0.5 μ L RT-F3; 0.5 μ L RT-R3; 2 μ L cDNA; 9.5 μ L RNase/DNase free ddH₂O。其中每个样品的目的基因和内参基因分别进行 4 次技术重复。PCR 反应的扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法^[23] 计算 *Pc-UBE2r* 基因在不同组织以及性腺发育不同时期的相对表达量。应用 SPSS 18.0 软件^[24] 对各数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 并进行显著性分析 ($P < 0.01$)。所有图片采用 SigmaPlot 12.5^[25] 软件绘制。

1.5 原位杂交

石蜡切片经常规脱蜡, 经 3% H₂O₂ 室温处理 10 min 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水洗涤 2 次。切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C 或室温消化 3 ~ 30 min, 0.5 mol/L PBS 洗 3 次 \times 5 min, 蒸馏水洗 1 次。按每张切片 20 μ L 加预杂交液, 恒温箱 37 ~ 40 $^{\circ}$ C 放置 2 ~ 4 h。用杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针, 每张切片上加 20 μ L 杂交液, 恒温箱 37 ~ 40 $^{\circ}$ C 杂交过夜。30 ~ 37 $^{\circ}$ C 左右 2 \times SSC 洗涤 2 次, 每次 5 min; 0.5 \times SSC 洗涤 15 min; 0.2 \times SSC 洗涤 15 min。恒温箱 37 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后, 滴加生物素化鼠抗地高辛, 于恒温箱 37 $^{\circ}$ C 放置 60 min 后, 用 0.5 mol/L 的 PBS 清洗 4 次, 每次 5 min。滴加 SABC, 室温放置 30 min 后, 用 0.5 mol/L 的 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。使用 DAB 显色试剂盒进行显色后, 显微镜下观察并拍照。

1.6 Western blot 检测

对提取的各组织蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 用制备的 *UBE2r* 多克隆抗体作为一抗, 对克氏原螯虾各组织蛋白进行 Western blot 检测。电泳时每个上样孔加变性后的上样液 40 μ g, 留一孔加 10 μ L 预染的 Marker。先用 70 V 恒压电泳, 约 30 min, 后改用 90 V 恒压电泳。转印蛋白及免疫检测: 200 mA 恒流转膜 70 min。转膜结束后, 快速取出 PVDF 膜, 放入 5% BSA 室温封闭 2 h。取出膜, 于摇床上用 TBST 洗膜 5 min \times 3 次。孵育袋中加入封闭液稀释的 *UBE2r* 抗体 (1:1 000), β -actin (Boster 1:2 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 5 min \times 3 次, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (Jackson 1:2 000) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠二抗 (Jackson 1:2 000) 室温孵育 2 h。膜于化学发光检测试剂 (试剂 A: 试剂 B = 1:1) 反应 2 min, 取出膜, 用保鲜膜包好 PVDF 膜, 暗室中用 X 胶片感光、显影、定影。

2 结果

2.1 *Pc-UBE2r* 基因序列分析

Pc-UBE2r 基因序列全长 3 671 bp (GenBank 登录号: KX091172), 包括 554 bp 的 5' 端非编码区 (5'-UTR)、729 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 和 2 389 bp 的 3' 端非编码区 (3'-UTR), 在 3'-UTR 有典型的加尾信号 AATAA。该序列可编码 242 个氨基酸, 预测分子量大小为 27.6 ku, 等电点为 4.17。UBE2r 蛋白的 82 ~ 97 位氨基酸序列为泛素结合酶家族特有的一个结构域, 且在该区域存在一个半胱氨酸残基 (Cys94) 活化位点。

2.2 多序列比对及系统进化分析

经 BLAST 比对发现, *Pc-UBE2r* 与节肢动物 *UBE2r* 的序列同源性较高 (图 1), 与日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*, ACA09717.1) *UBE2r* 基因的同源性为 97%, 与二疣犀甲 (*Oryctes borbonicus*, KRT82395.1)、美洲螯 (*Limulus polyphemus*, XP013783757.1) 和黄翅菜叶蜂 (*Athalia rosae*, XP012253743.1) 的一致性分别为 85%、76% 和 78%。采用邻接法 (Neighbor joining, NJ) 构建系统进化树, *Pc-UBE2r* 先与日本囊对虾聚为一枝, 再与其他节肢动物聚为一大枝

(图 2), 鸟类、两栖类和哺乳类等脊椎动物单独聚为一枝, 结果与各物种的进化关系保持一致。

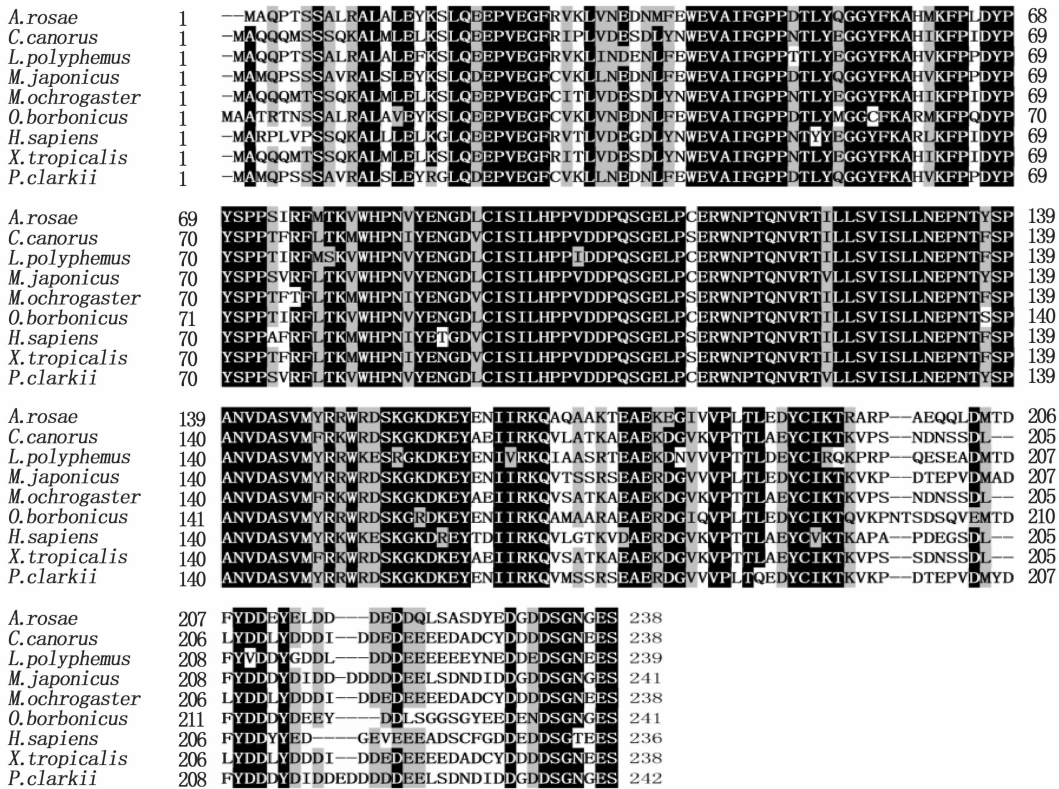


图 1 *Pc-UBE2r* 和其他物种 *UBE2r* 氨基酸序列多重比较

Fig. 1 Alignment of the amino acid sequences of different *UBE2r* proteins

A. rosae. 黄翅菜叶蜂; *C. canorus*. 杜鹃; *L. polyphemus*. 美洲蚶; *M. japonicus*. 日本囊对虾; *M. ochrogaster*. 草原田鼠; *O. borbonicus*. 二疣犀甲; *H. sapiens*. 人类; *X. tropicalis*. 非洲爪蟾; *P. clarkii*. 克氏原螯虾。

所有氨基酸序列 GenBank 登录号 The GenBank Login number of amino acid sequence : 黄翅菜叶蜂 *Athalia rosae*, XP_012253743.1; 杜鹃 *Cuculus canorus*, XP_011439446.1; 美洲蚶 *Limulus polyphemus*, XP_013783757.1; 日本囊对虾 *Marsupenaeus japonicus*, ACA09717.1; 草原田鼠 *Microtus ochrogaster*, XP_005362063.1; 二疣犀甲 *Oryctes borbonicus*, KRT82395.1; 人类 *Homo sapiens*, NP_004350; 非洲爪蟾 *Xenopus tropicalis*, AAI24047.1。

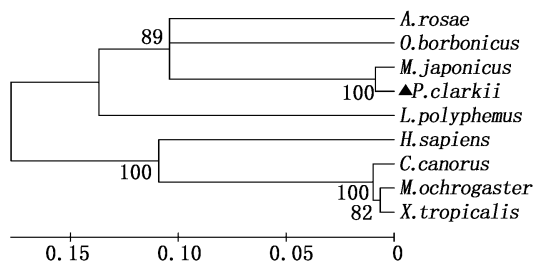


图 2 *Pc-UBE2r* 和其他物种 *UBE2r* 氨基酸序列系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of the *UBE2r* amino acid sequences between *P. clarkii* and other species

2.3 *Pc-UBE2r* 基因的表达特征

qRT-PCR 结果显示, *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾各组织中均有表达 (图 3), 其中眼、鳃、肝胰腺、心脏、肠和肌肉组织中的表达量较低, 在性腺中显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。如图 4a 所示, *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾卵黄发生前期 (O3) 表达量最高, 在未发育时期表达量最低。在卵黄发生期以后, *Pc-UBE2r* 的表达量开始逐渐减少。在精巢发育的不同时期中, 在精母细胞发生期 (T2 期) 中的表达量开始升高, 且显著高于其他时期 ($P < 0.05$), 在精子细胞生成期阶段 (T3 期) 表达量显著降低 (图 4b)。

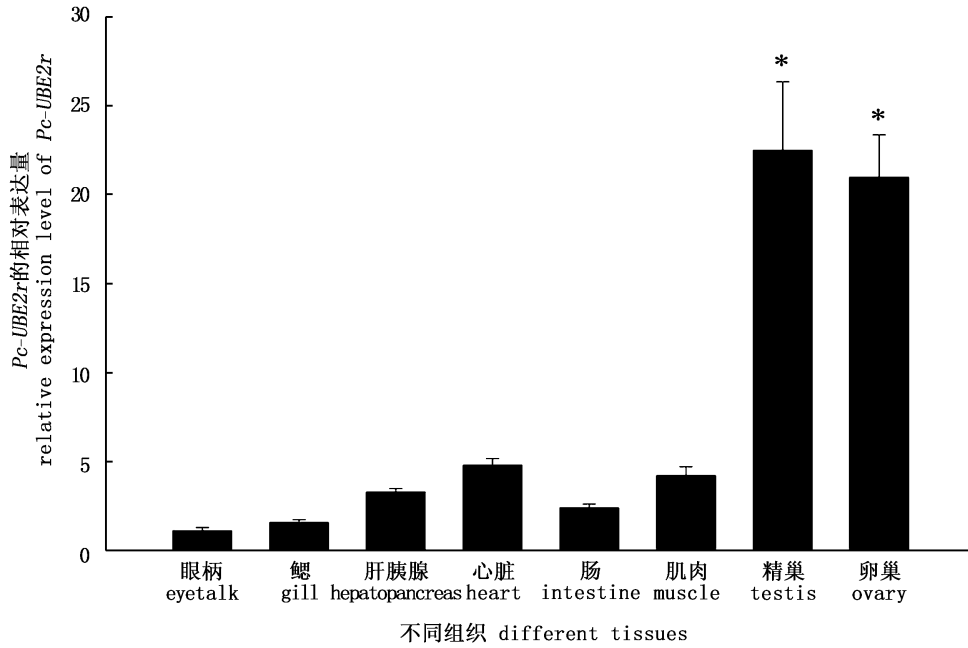


图3 *Pc-UBE2r* 基因在不同组织间的表达特征

Fig.3 Distribution pattern of *Pc-UBE2r* in various tissues

柱状图上标注的星号表示 *Pc-UBE2r* 的表达量在精巢和卵巢中显著高于其他组织 ($P < 0.05$)。

The asterisk on the histogram indicates that the expression of *Pc-UBE2r* in testes and ovaries were significantly higher than other tissues ($P < 0.05$).

2.4 原位杂交检测

原位杂交结果显示,卵巢未发育期(O1期), *Pc-UBE2r* 的阳性信号均匀地分散在细胞质中。随着卵巢的逐渐发育,在卵巢发育早期(O2期)中,阳性信号逐渐迁移到细胞核的周围。在卵黄发生前期(O3期)和卵黄发生期(O4期),阳性信号始终集中在细胞核的周围。在卵母发育成熟

期(O5期)的细胞中,阳性信号逐渐迁移到滤泡细胞周围。当亲虾排完卵,卵巢进入恢复期(O6期),阳性信号也逐渐消失(图版I)。在精原细胞增殖期(T1)和精子形成期(T3), *Pc-UBE2r* 的阳性信号在精原细胞、精子细胞中分布很少或者没有分布。而在精母细胞发生期(T2),阳性信号主要分布在初级精母细胞的周围(图版II)。

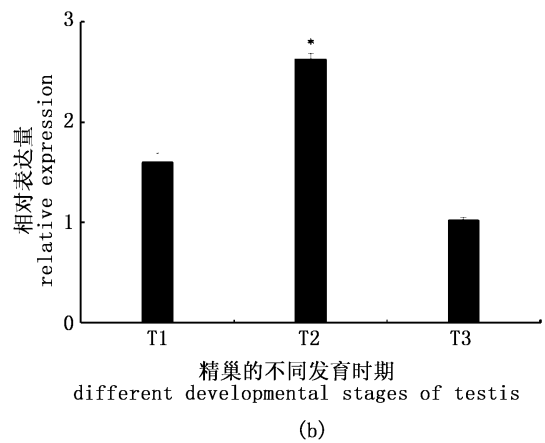
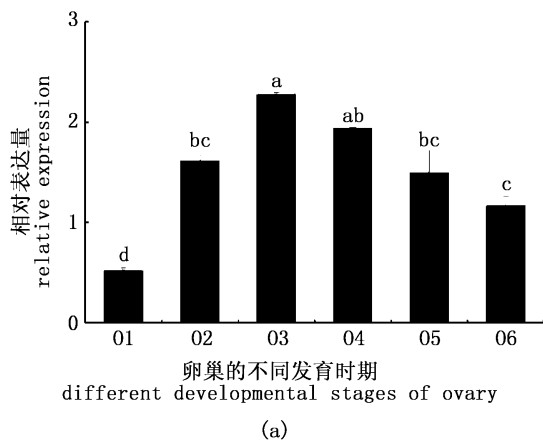


图4 *Pc-UBE2r* 基因在性腺不同发育时期的表达

Fig.4 The expression of *Pc-UBE2r* during gonad developmental stage

O1. 未发育期; O2. 发育早期; O3. 卵黄发生前期; O4. 卵黄发生期; O5. 成熟期; O6. 恢复期; T1. 精原细胞增殖期; T2. 精母细胞发生期; T3. 精子细胞生长期。不同字母和星号表示有显著差异 ($P < 0.05$)。

O1. no developmental stage; O2. early developmental stage; O3. previtellogenic stage; O4. vitellogenic stage; O5. mature stage; O6. post-spawning; T1. Spermatogonial cells proliferation stag; T2. spermatocyte generation stage; T3. sperm generation stage. Different letters and the asterisk represent significant difference ($P < 0.05$).

2.5 组织总蛋白 Western blot 检测

利用 Western blot 技术检测 UBE2r 蛋白在克氏原螯虾眼柄、鳃、肝胰腺、心脏、肠、肌肉、精巢及卵巢中的表达情况,发现其在眼柄、心脏、肠、肌肉、精巢和卵巢中均有表达,大小约为 27.6 ku,与预测分子量大小一致。检测各组织的表达量,发现 UBE2r 蛋白在克氏原螯虾各组织中的表达量存在极显著差异($P < 0.01$),在精巢和卵巢中高表达,在眼柄、鳃、肝胰腺、心脏、肠、肌肉等组织中低表达(图 5)。

3 讨论

泛素结合酶 E2 主要通过和泛素形成硫酯键作用使其与底物蛋白结合,从而使其转移到泛素连接酶 E3 上。作为泛素途径中重要的组成部分,其在结构上高度保守,在 30% ~ 40% 的泛素结合酶中都有一个 16 ku UBC 保守区域。在该结构域中还存在一个硫酯形成所需的特异性半胱氨酸残基活化位点^[26]。在酵母^[27]的研究中发现,UBE2r 基因特异性的 C 末端的缺失会造成一些酶不能进入酵母细胞 S 期。同样在人类的 UBE2r 基因中也发现,其通过特异性的 C 末端与细胞内其他蛋白发生特异性的相互作用以及介导其在细胞内的定位^[28]。同源性比对发现, *Pc-UBE2r* 基因序列与其他节肢动物 UBE2r 基因序列同源性较高,其中与日本囊对虾的同源性高达 97%。系统进化分析表明,UBE2r 在进化过程中保守性很高。据此可以推测 *Pc-UBE2r* 基因可能具有与日本囊对虾 UBE2r 基因同样的功能。

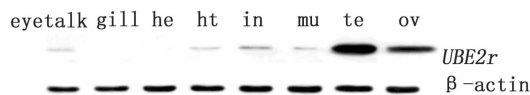


图 5 *Pc-UBE2r* 在克氏原螯虾各组织中的 Western blot 检测

Fig. 5 Western blot detection of *Pc-UBE2r* in different tissues of *P. clarkii*

eyestalk. 眼柄; gill. 鳃; he. 肝胰腺; ht. 心脏; in. 肠; mu. 肌肉; te. 精巢; ov. 卵巢。

实时定量 PCR 结果显示, *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾不同组织中广泛表达,这与凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 和斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 中 E2 基因的表达模式较为一致^[29-30],而且在精巢和卵巢中的表达量相对较高。同时 Western blot 检测结果也显示, *Pc-UBE2r* 蛋白在

精巢和卵巢的表达水平显著高于其他组织。这些结果可能表明, *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾性腺中具有重要作用。MICHAEL 和 NEWPORT^[31] 在非洲爪蟾的卵子提取物中发现, UBE2r 基因负责介导负调节因子蛋白激酶 Wee 的降解,而 Wee 在细胞周期 S 期对有丝分裂有关键性的作用。精子和卵子在分裂过程中,需要发生蛋白质的合成和降解^[32-33],而 UBE2r 介导一些细胞周期过程中蛋白激酶的降解,来参与调控精子和卵子的发生。本研究中 *Pc-UBE2r* 基因在精巢和卵巢的发育过程中表达量有明显的变化。在卵巢中, *Pc-UBE2r* 基因的表达量在 O1 期最低,在 O3 期表达量快速增长并到达最高值,随后表达量逐渐降低;在精巢中, *Pc-UBE2r* 基因的表达量在 T2 期达到最高水平。在细胞周期过程中,各时相的过渡都需要细胞周期蛋白的降解,而大多数细胞周期蛋白都是通过泛素化途径降解的。由于卵巢和精巢中一些细胞周期所必需的蛋白质聚集, *Pc-UBE2r* 的表达量在 O1 期和 T1 期都不高。随着细胞周期的进行,这些蛋白通过 *Pc-UBE2r* 介导的泛素蛋白酶途径降解细胞内的蛋白,在卵巢发育 O3 期和精巢发育 T2 期的表达量达到最高。随着降解蛋白达到一个平衡状态, *Pc-UBE2r* 的表达量开始逐渐降低,分别在卵巢发育 O4 期和精巢发育 T3 期出现下降的趋势。这些结果表明,克氏原螯虾精子和卵子的发生过程中,生殖细胞内蛋白的降解可能和 UBE2r 基因的活动有关。

已经有许多研究表明泛素及泛素相关基因在性腺发育和配子发生过程中发挥着重要作用^[34-35]。在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中泛素 C-末端水解酶 L1 被定位在卵黄发生前期的卵母细胞上^[36]。戴燕彬等研究发现泛素 (*Ub*) 在拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 卵巢中高表达^[37]。沈冰玲等^[14] 对日本囊对虾的研究发现, UBE2r 基因在性腺中高表达,且在性腺发育各时期表达存在显著差异。在雄性果蝇精巢中, *UbcD1* 基因突变会引起雄性减数分裂的破坏,导致雄性不育^[38]。ROEST 等对小鼠 *HR6B* 基因在精巢中的研究发现,该基因在染色体构建中有一定的作用,在精子发生时由于其突变,从而导致雄性小鼠不育^[39]。本研究通过 *Pc-UBE2r* mRNA 在卵巢中的定位显示, *Pc-UBE2r* mRNA 在未发育的卵母细胞中均有分布,随着卵母细胞的发育,

逐渐迁移到卵黄发生前期、中期和后期卵母细胞的细胞核周围,最后分布在成熟卵母细胞的滤泡细胞中。这些结果与 REYMOND 等研究 *UBE2r* 基因在人类细胞周期中参与细胞核和细胞质迁移的结果一致。结合这些结果,我们推测 *Pc-UBE2r* 基因可能通过调控生殖细胞分裂和分化过程中的胞质重组而调节克氏原螯虾配子的发生过程。通过 *Pc-UBE2r* mRNA 在精巢中的定位显示,*Pc-UBE2r* 的阳性信号主要在 T2 期精巢的次级精母细胞中高度表达,在其他时期的精细胞中阳性信号很弱或者没有。在 T2 期的精巢中,精母细胞大多处于第一次和第二次减数分裂时期,染色体出现分裂和重组,*Pc-UBE2r* 在该时期精巢中高度表达。而这一研究结果和 *UBE2r* 在哺乳动物精子发生的减数分裂后期达到最高表达水平结果相似^[40]。从这些研究来看,推测 *Pc-UBE2r* 基因可能在染色体构建过程中起着重要作用。

本研究从克氏原螯虾中获得了 *UBE2r* 基因的 cDNA 全长,通过对其进行生物信息学和同源进化分析,以及在性腺发育过程中的差异表达与定位,证明了 *UBE2r* 基因在克氏原螯虾的性腺发育和配子发生过程中起着重要的作用,从而为虾蟹类性腺发育调控的分子机制奠定基础 and 提供依据。

参考文献:

- [1] HUNER J V. *Procambarus* in North America and elsewhere [M]//HOLDICH D M, LOWERY R S. Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation. London: Croom Helm Ltd, 1988: 239-261.
- [2] 丁建英,康璠,徐建荣. 克氏原螯虾肌肉营养成分分析与评价[J]. 水产科技情报, 2010, 37(6): 298-301.
DING J Y, KANG J, XU J R. Nutritional composition of analysis and evaluation of *Procambarus clarkii*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2010, 37(6): 298-301.
- [3] 姚根娣,孙振中,郭履骥,等. 克氏原螯虾(*Cambarus clarkii*) 含肉率和营养成份分析[J]. 水产科技情报, 1993, 20(4): 177-179.
YAO G D, SUN Z Z, GUO L Y, et al. Meat rate and nutrient composition analysis in the *Cambarus clarkii* [J]. Fisheries Science & Technology Information, 1993, 20(4): 177-179.
- [4] FAO. Fishery and aquaculture statistics 2012 [M]. Rome: Food and Agriculture Department of the United Nations, 2014.
- [5] 陈昌福,贺中华,孟小亮,等. 湖北省克氏原螯虾养殖现状与产业发展中的技术问题[J]. 养殖与饲料, 2008(11): 14-19.
CHEN C F, HE Z H, MENG X L, et al. Status of aquaculture and technical problems in the development of industry in the *Procambarus clarkii* from Hubei province[J]. Animals Breeding and Feed, 2008(11): 14-19.
- [6] 沈勤,谢荣林,张汉民,等. 浙北地区小龙虾养殖情况的调查与分析[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(12): 54-55.
SHEN Q, XIE R L, ZHANG H M, et al. Investigation and analysis of crayfish farming in North Region of Zhejiang Province[J]. Shandong Fisheries, 2010, 27(12): 54-55.
- [7] CIECHANOVER A, ORIAN A, SCHWARTZ A L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction [J]. BioEssays, 2000, 22(5): 442-451.
- [8] WILKINSON K D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes [J]. The FASEB Journal, 1997, 11(14): 1245-1256.
- [9] GOEBL M G, YOCHEM J, JENTSCH S, et al. The yeast cell cycle gene *CDC34* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme[J]. Science, 1988, 241(4871): 1331-1335.
- [10] SCHWOB E, BÖHM T, MENDENHALL M D, et al. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*[J]. Cell, 1994, 79(2): 233-244.
- [11] YEW P R, KIRSCHNER M W. Proteolysis and DNA replication; the *CDC34* requirement in the *Xenopus* egg cell cycle[J]. Science, 1997, 277(5332): 1672-1676.
- [12] REYMOND F, WIRBELAUER C, KREK W. Association of human ubiquitin-conjugating enzyme *CDC34* with the mitotic spindle in anaphase[J]. Journal of Cell Science, 2000, 113(10): 1687-1694.
- [13] PATI D, MEISTRICH M L, PLON S E. Human *CDC34* and *Rad6B* ubiquitin-conjugating enzymes target repressors of cyclic AMP-induced transcription for proteolysis [J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(7): 5001-5013.
- [14] SHEN B L, ZHANG Z P, WANG Y L, et al. Differential expression of ubiquitin-conjugating enzyme *E2r* in the developing ovary and testis of penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(5): 1149-1157.
- [15] 郭风英. 克氏原螯虾卵巢发育的周年变化及组织切片观察[D]. 上海:上海海洋大学, 2011.
GUO F Y. Study on the ovary development by annual changes and tissue section of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011.
- [16] 李胜,赵维信. 克氏原螯虾大颚器在卵巢发育周期中的组织结构变化[J]. 上海水产大学学报, 1999, 8(1): 12-18.
LI S, ZHAO W X. Structural changes of mandibular organ

- during the ovary developing cycle in crayfish[J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 1999, 8(1): 12-18.
- [17] 黄文虎. 克氏原螯虾的精巢、输精管及精荚组织学与精巢周年变化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- HANG W H. Studies on the testis, vas deferens, spermatophore histology and testis' annual variation of *Procambarus clarkii* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [18] JIANG H C, XING Z J, LU W, et al. Transcriptome Analysis of red swamp crawfish *Procambarus clarkii* reveals genes involved in gonadal development [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105122.
- [19] SINGH V K, MANGALAM A K, DWIVEDI S, et al. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence[J]. Biotechniques, 1998, 24(2): 318-319.
- [20] HALL T A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41(2): 95-98.
- [21] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [22] JIANG H C, QIAN Z J, LU W, et al. Identification and characterization of reference genes for normalizing expression data from red swamp crawfish *Procambarus clarkii* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(9): 21591-21605.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. Method, 2001(25): 402-408.
- [24] GIGLIOTTI E. Discovering statistics using SPSS [J]. Journal of Advanced Nursing, 2007, 58(3): 303.
- [25] WASS J A. SigmaPlot 11: Now with total sigmastat integration [Z]. Scientific Computing International, 2009.
- [26] JENTSCH S. The ubiquitin-conjugation system [J]. Annual Review of Genetics, 1992, 26(1): 179-207.
- [27] FELDMAN R M R, CORRELL C C, KAPLAN K B, et al. A complex of *Cdc4p*, *Skp1p*, and *Cdc53p*/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p [J]. Cell, 1997, 91(2): 221-230.
- [28] JENTSCH S, MCGRATH J P, VARSHAVSKY A. The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme [J]. Nature, 1987, 329(6135): 131-134.
- [29] 傅明骏, 赵超, 周发林, 等. 斑节对虾泛素结合酶 *PmUbc* 基因的克隆及表达分析 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 41-48.
- FU M J, ZHAO C, ZHOU F L, et al. Molecular cloning and expression analysis of Ubiquitin-conjugating enzyme gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(6): 41-48.
- [30] 李传香, 薛淑霞, 刘逸尘, 等. 凡纳滨对虾泛素交联酶 E2 基因的克隆及表达分析 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 661-668.
- LI C X, XUE S X, LIU Y C, et al. Cloning and expression of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 661-668.
- [31] MICHAEL W M, NEWPORT J. Coupling of mitosis to the completion of S phase through *CDC34*-mediated degradation of Wee1 [J]. Science, 1998, 282(5395): 1886-1889.
- [32] GRØNDAHLI C, LESSL M, FAERGE I, et al. Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin [J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(3): 775-780.
- [33] 王艺磊, 张子平, 李少菁. 刀额新对虾精子发生过程中碱性蛋白的变化 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1996, 35(6): 947-951.
- WANG Y L, ZHANG Z P, LI S J. Basic proteins changes during spermatogenesis in *Metapenaeus ensis* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 1996, 35(6): 947-951.
- [34] BAARENS W M, ROEST H, GROOTEGOED J A. The ubiquitin system in gametogenesis [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1999, 151(1/2): 5-16.
- [35] SUTOVSKY P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: killing three birds with one stone [J]. Microscopy Research and Technique, 2003, 61(1): 88-102.
- [36] MOCHIDA K, MATSUBARA T, KUDO H, et al. Molecular cloning and immunohistochemical localization of ubiquitin C-Terminal hydrolase expressed in testis of a teleost, the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Journal of Experimental Zoology, 2002, 293(4): 368-383.
- [37] 戴燕彬, 韩坤煌, 颜素芬, 等. 拟穴青蟹泛素基因的克隆及其在性腺发育过程中的表达 [J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 946-955.
- DAI Y B, HAN K H, YAN S F, et al. Molecular characterization and expression profiles of Sp-Ub during gonad development in *Scylla paramamosain* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 946-955.
- [38] CENCI G, RAWSON R B, BELLONI G, et al. *UbcD1*, a *Drosophila* ubiquitin-conjugating enzyme required for proper telomere behavior [J]. Genes & Development, 1997, 11(7): 863-875.
- [39] ROEST H P, VAN KLAVEREN J, DE WIT J, et al. Inactivation of the *HR6B* ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification [J]. Cell, 1996, 86(5): 799-810.
- [40] DESJARDINS C, EWING L L. Cell and molecular biology of the testis [M]. Oxford: Oxford University Press, 1993.

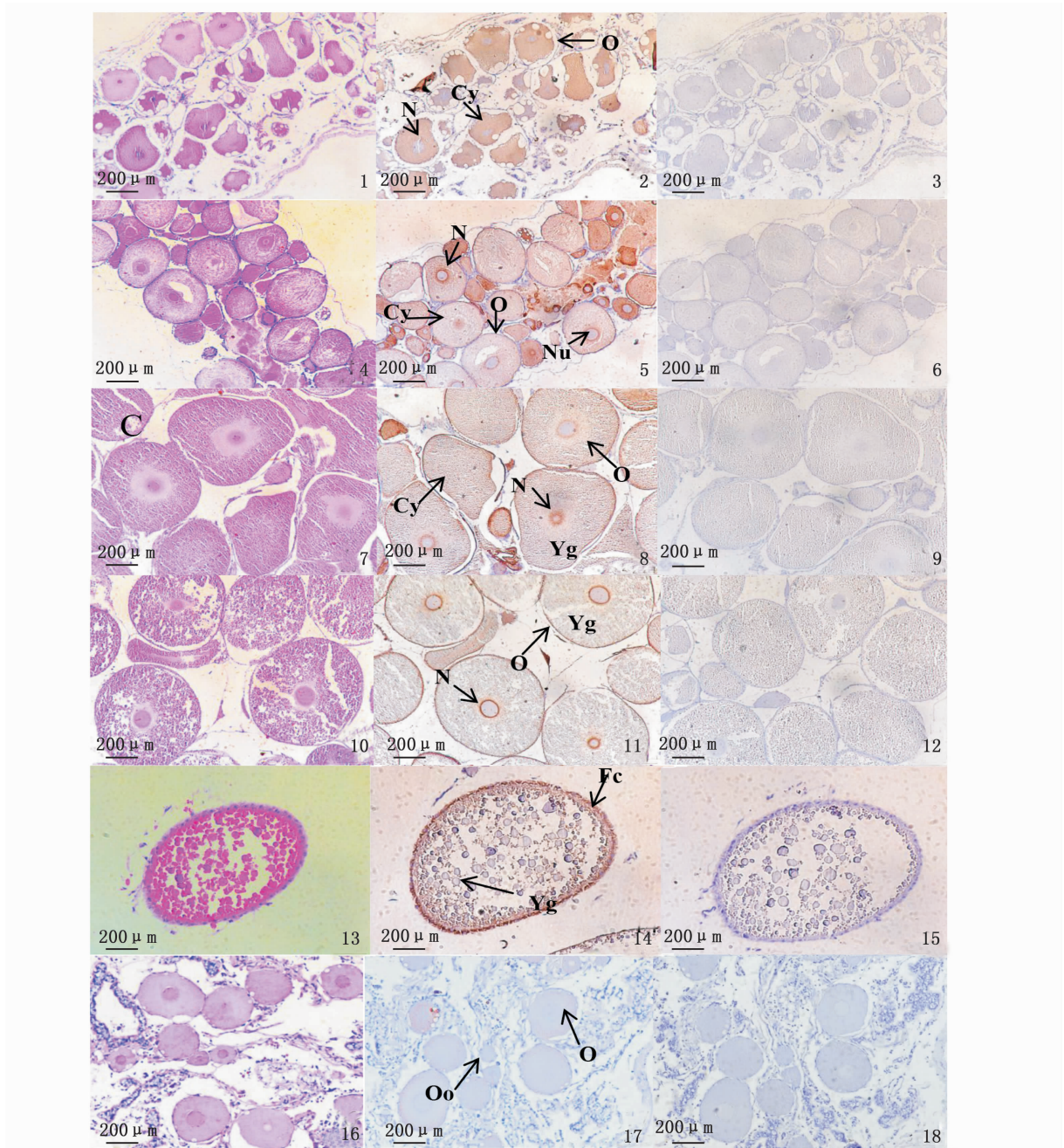
Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme *E2r* in *Procambarus clarkii*

QIAN Zhaojun¹, ZHU Tianliang¹, JIANG Hucheng², SHI Baotong¹, LI Jiale¹

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, Jiangsu, China)

Abstract: In our study, for a better understanding of the role regarding *UBE2r* in the development of gonad in crawfish, the full length cDNA of *Procambarus clarkii UBE2r* gene (*Pc-UBE2r*) were cloned and characterized. The full-length *Pc-UBE2r* cDNA sequence obtained was 3671 base pairs (bp) including 554 bp of 5'-UTR and 2 389 bp in 3'-UTR, while containing an open reading frame of 729 bp encoding a protein of 242 amino acids with a predicted molecular weight of 27.6 ku. Bioinformatics analysis indicated that the *Pc-UBE2r* gene had a conserved domain specified in ubiquitin proteasome family and Cys94 sites. The homology and phylogenetic analysis showed that the deduced amino acid sequence of *UBE2r* shared high homology in different species and the highest conservation with *Marsupenaeus japonicus*. Quantitative real-time PCR analysis revealed that *Pc-UBE2r* was distributed in various tissues, while its expression in the ovary and testis was significantly higher than other tissues ($P < 0.05$). In the development of ovary, the expression of *Pc-UBE2r* was the lowest in the non-developmental stage, and increased rapidly in the previtellogenic stage. With the maturity of the ovary, the expression of *Pc-UBE2r* decreased gradually. Meanwhile, during the development of testis, the expression of *Pc-UBE2r* was proven highest in the spermatocyte generation stage. In our in situ hybridization experimental procedure, the positive signal of *Pc-UBE2r* was observed uniformly distributed in the oocyte cytoplasm in the non-developmental stage of the ovary. With the development of the ovary, the positive signals of *Pc-UBE2r* surrounded the oocyte nucleus and follicle cells can be found. In the testis, the positive signals were mainly distributed in the secondary spermatocytes. Besides, Western blotting analysis exhibited that the expression distributions of *UBE2r* in tissues were significantly different, but remained high in ovary and testis ($P < 0.05$). Overall, the experimental results demonstrated that *Pc-UBE2r* may play an important role in the gametogenesis and gonadal development of crawfish.

Key words: ubiquitin-conjugating *E2r*; gonad; in situ hybridization; Western blot; *Procambarus clarkii*

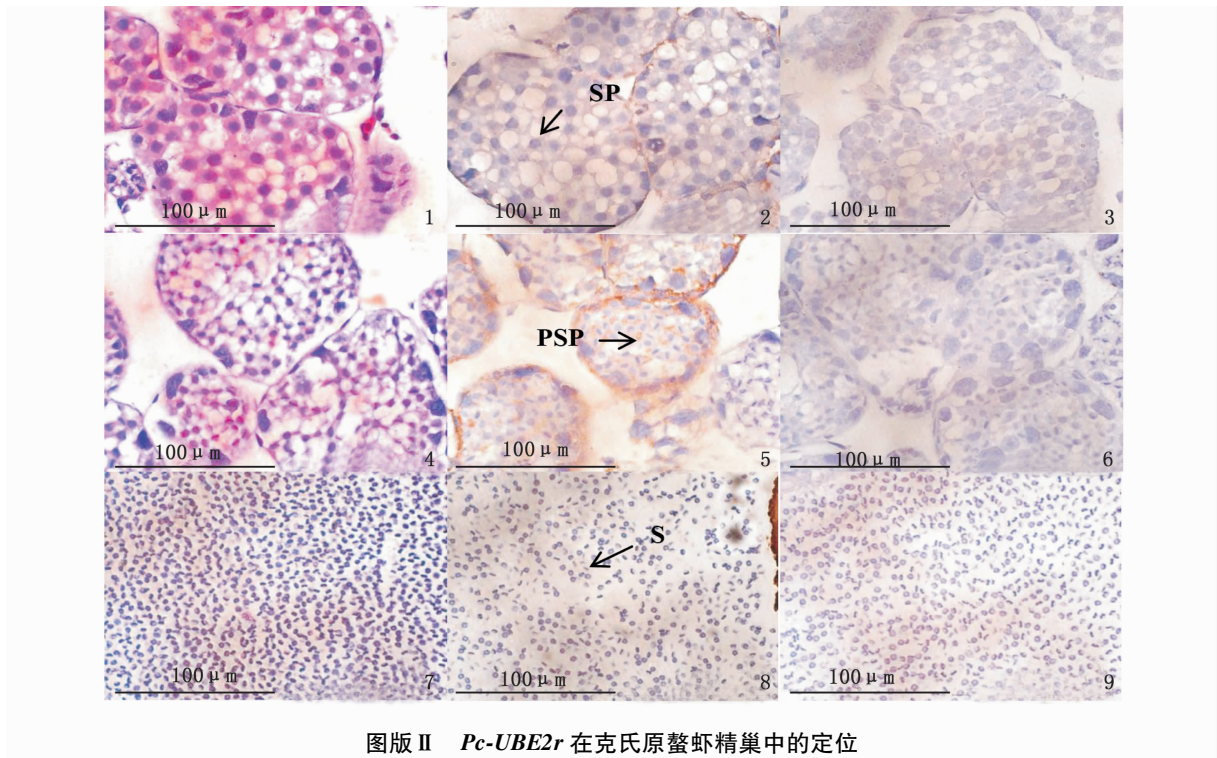


图版 I *Pc-UBE2r* 基因在克氏原螯虾卵巢发育过程中的定位

Plate I Localization of *Pc-UBE2r* transcripts in different development stages of ovary in *Procambarus clarkii*

1, 4, 7, 10, 13 和 16 的组织切片为 HE 染色的结果; 2, 5, 8, 11, 14 和 17 为地高辛标记的正义 RNA 探针杂交结果; 3, 6, 9, 12, 15 和 18 为反义 RNA 探针杂交结果。O: 卵原细胞; Oo: 卵母细胞; Cy: 细胞质; N: 细胞核; Nu: 核仁; Yg: 卵黄颗粒; Fc: 滤泡细胞。1, 2, 3: 未发育期; 4, 5, 6: 发育早期; 7, 8, 9: 卵黄发生前期; 10, 11, 12: 卵黄发生期; 13, 14, 15: 成熟期; 16, 17, 18: 恢复期。

Regular histological section was stained with hematoxylin and eosin (1, 4, 7, 10, 13, 16). The results of In situ hybridization with DIG-labeled antisense RNA probe (2, 5, 8, 11, 14 and 17 for *Pc-UBE2r*) and sense probe as negative control (3, 6, 9, 12, 15 and 18 for *Pc-UBE2r*) were shown. O: oogonium; Oo: oocyte; Cy: cytoplasm; N: nucleus; Nu: nucleolus; Yg: yolk granules; and Fc: follicle cells. 1, 2, 3: no developmental stage; 4, 5, 6: early developmental stage; 7, 8, 9: previtellogenic stage; 10, 11, 12: vitellogenic stage; 13, 14, 15: mature stage; 16, 17, 18: post-spawning.



图版 II *Pc-UBE2r* 在克氏原螯虾精巢中的定位

Plate II Localization of *Pc-UBE2r* transcripts in testis from *Procambarus clarkii*

1、4 和 7 的组织切片为 HE 染色的结果；2、5 和 8 为地高辛标记的正义 RNA 探针杂交结果；3、6 和 9 为反义 RNA 探针杂交结果。SP: 精原细胞；PSP: 初级精母细胞；S: 精子细胞。1、2、3: 精原细胞增殖期；4、5、6: 精母细胞发生期；7、8、9: 精子细胞生成期。

Regular histological section was stained with hematoxylin and eosin (1, 4, 7). The results of In situ hybridization with DIG-labeled antisense RNA probe (2, 5, 8 for *Pc-UBE2r*) and sense probe as negative control (3, 6, 9 for *Pc-UBE2r*) were shown. SP: spermatogonium; PSP: primary spermatocyte; S: sperm. 1, 2, 3: Spermatogonial cells proliferation stage; 4, 5, 6: spermatocyte generation stage; 7, 8, 9: sperm generation stage.