

doi: 10.3969/j. issn. 2095 - 0780. 2016. 01. 011

斑节对虾泛素融合蛋白 *UbS27* 基因克隆与表达分析

吴 松^{1,2}, 唐 蕾^{1,3}, 傅明骏¹, 杨丽诗¹, 黄建华¹, 周发林¹, 江世贵¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510640)

摘要: 从构建的斑节对虾(*Penaeus monodon*)肝胰腺转录组数据中筛选出泛素核糖体融合蛋白 *UbS27* 基因(ubiquitin/ribosomal S27 fusion protein, *PmUbS27*)片段, 利用 SMART-RACE 技术克隆出 *PmUbS27* 基因 cDNA 全长, 并利用软件对其进行分析; 利用实时荧光定量技术检测 *PmUbS27* 基因在斑节对虾不同组织及卵巢不同发育期的表达情况。结果显示, *PmUbS27* 基因 cDNA 全长为 514 bp, 开放阅读框 465 bp, 编码 154 个氨基酸, 含有泛素(1 ~72 aa)和核糖体蛋白(101 ~147 aa)2 个结构域。以 DNA 为模板克隆得到的基因序列由 3 个内含子和 4 个外显子组成。实时荧光定量结果显示, *PmUbS27* 基因在斑节对虾各组织中均有表达, 但是在卵巢中表达量最高, 其次为肝胰腺、血淋巴和精巢。*PmUbS27* 在卵巢发育前期(Ⅰ期)和成熟期(Ⅲ期)的表达量显著高于其他各期($P < 0.05$)。结果表明, *PmUbS27* 参与斑节对虾卵巢发育的过程并可能在卵巢发育进程中起到重要的调控作用。

关键词: 斑节对虾; 卵巢发育; 泛素融合蛋白; 实时定量 PCR

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095 - 0780 - (2016) 01 - 0077 - 08

Cloning and expression analysis of *PmUbS27* gene of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

WU Song^{1,2}, TANG Lei^{1,3}, FU Mingjun¹, YANG Lishi¹, HUANG Jianhua¹, ZHOU Falin¹, JIANG Shigu¹

(1. Key Lab of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510460, China)

Abstract: We screened the ubiquitin/ribosomal S27 fusion protein (*PmUbS27*) from hepatopancreas transcriptome data of *Penaeus monodon* and cloned the full-length *PmUbS27* cDNA sequence by SMART-RACE technology. Besides, we studied the expression of ovaries of *PmUbS27* gene at different developmental stages and in different tissues by real-time quantitative detection. The *PmUbS27* cDNA was 514 base pairs (bp) long, containing a 3'-UTR of 39 nucleotides and a 465 bp open reading frame (ORF) encoding a 154 amino acid polypeptide. The *PmUbS27* protein contained the conserved Ub domain and ribosome structure. The DNA-cloned gene sequence consisted of four exons and three introns. *PmUbS27* mRNA was ubiquitously detected in all tested tissues, comparatively high in the ovary, hepatopancreas and lymph. The expression level of *PmUbS27* mRNA was significantly higher in ovary at Stage Ⅰ and Stage Ⅲ ($P < 0.05$). It is showed that *PmUbS27* had an important role in oogenesis of *P. monodon*.

Key words: *Penaeus monodon*; ovary development; ubiquitin/ribosomal S27 fusion protein; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2015-05-04; 修回日期: 2015-05-30

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-47); 国家自然科学基金项目(210202019); 广东省科技计划项目(2013B020201001, 2013B040402016); 海南省自然科学基金项目(313116); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2012TS27, 2014TS12)

作者简介: 吴松(1989-), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖与生物技术研究。E-mail: wusong1989129@126.com

通信作者: 江世贵(1964-), 男, 博士, 研究员, 从事水产动物遗传育种研究。E-mail: jiangsg@scsfri.ac.cn

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin/proteasome pathway, UPP)是由以色列科学家 HERSHKO、CIECHANOVER 和美国科学家 ROSE 发现的泛素调节蛋白质降解的途径^[1]。在 UPP 途径中泛素通过分别与泛素激活酶(E1)、泛素结合酶(E2)、泛素连接酶(E3)之间进行一系列级联反应, 最后以单体或不同结构的多泛素聚合链的形式结合在底物蛋白上, 再经过蛋白酶体 26S 将蛋白降解^[2]。同时 UPP 途径对蛋白的选择性降解是通过蛋白泛素化区域和多泛素链结构来完成的^[3]。UPP 参与多种细胞活动, 如细胞周期调控、膜受体内吞作用、基因的转录与表达等, 它通过降解细胞活动中各个通路的抑制因子或激活因子发挥相应的调节作用。泛素是一个由 76 个氨基酸组成高度保守的蛋白, 广泛存在于真核和原核生物细胞中, 是 UPP 通路中的重要组成部分。泛素前体有 3 种形式: 1 种是相同泛素单体串联形成的泛素聚合体; 另外 2 种是泛素分子 N-端分别与 L40 或 S27 核糖体融合形成的泛素融合蛋白^[4]。融合蛋白 UbS27 是泛素前体中一种, 由泛素结构域和核糖体 S27 结构域两部分组成, 泛素融合蛋白 UbS27 碳末端的双甘氨肽能被特定的肽链内切酶识别并剪切, 释放出成熟的泛素单体^[5], 释放的泛素单体进一步参与生物细胞内蛋白质的降解。

目前泛素在动物生殖繁育调控中的研究取得了较大的进展。有研究证明 UPP 参与一些动物配子的发生。失活的泛素结合 DNA 修复酶 HR6B 会导致雄性小鼠不育, 说明这种失活泛素的结合作用在小鼠的生殖活动中具有重要的作用^[6]。IHARA 等^[7]在生长和发育过程中的小鼠卵母细胞核小体中发现了 UBE2I 表达, UBE2I 可以诱导基因的转录, 并对卵母细胞中基因表达调控蛋白起到 SUMO 作用。GU 等^[8]发现 UCHL1 蛋白在小鼠青春早期异常的卵母细胞中的表达量变化显著, 推测 UCHL1 在介导异常卵母细胞凋亡中具有重要的作用。周鹏等^[9]在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)性腺中筛选出性腺发育相关基因 *UBE2D* 和 *UBC9* 基因, 发现该基因在性腺中表达量明显高于其他组织。同时, 泛素在甲壳动物中的研究也相继展开, WANG 等^[10]研究发现泛素融合蛋白 *UbL40* 和 *UbS27* 基因在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)性腺中均有较高的表达量, 并推测这两种基因与中华绒螯蟹的性腺发育有密切关系。戴燕彬等^[11]研究发现拟穴青蟹

(*Scylla paramamosain*) 泛素基因对其生殖细胞的生长和发育有重要作用。韩坤煌^[12]在拟穴青蟹的 EST 文库筛选出 *UB*、*UCE2*、*UCHL3* 和 *UCHL5* 等泛素相关基因, 表达结果显示这些基因可能与性腺发育有密切关系。

目前, 泛素融合蛋白基因在斑节对虾(*Penaeus monodon*)性腺发育中的作用未见报道。该实验从斑节对虾转录组数据中筛选获得泛素核糖体融合蛋白 *PmUbS27* 基因, 通过对 *PmUbS27* 的基因克隆、序列分析及定量分析, 初步了解 *PmUbS27* 基因在卵巢发育中的表达特征, 其结果可为探讨 *PmUbS27* 及其介导的 UPP 途径在斑节对虾卵巢发育中的作用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

从海南省三亚市购买的斑节对虾(平均体质量 80 ~200 g), 卵巢发育阶段判断依据黄建华等^[13]的研究, 室内暂养 3 d 后取样, 冰浴麻醉后取脑、心脏、胃、肌肉、胸腹神经、肝胰腺、肠、鳃、血、淋巴、精巢、卵巢组织, 并分各时期取卵巢组织, 每组设 5 个平行(每组平行取 3 份备用), 取出的样品立即放入液氮速冻, 然后置 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 斑节对虾 RNA 的提取及逆转录 根据 TRIzol(Life Technology) 说明书提取斑节对虾的卵巢发育各期总 RNA 和各组织总 RNA, 取 2 μL 总 RNA 样品用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 RNA 的质量。用核酸蛋白分析仪 Nanodrop 2000 (Thermo) 检测其浓度及光密度 OD_{260}/OD_{280} 比值以验证其纯度。取 5 μg 从肝胰腺中提取的总 RNA 用 SMARTTM cDNA kit(TaKaRa 公司) 进行逆转录合成 cDNA, 用于基因片段的克隆, 用 TaKaRa 公司的 Prime ScriptTM Real-time PCR Kit 逆转录试剂盒进行 cDNA 的合成, 用于实时荧光定量 PCR。

1.2.2 RACE 获得 *PmUbS27* 全长 斑节对虾的泛素核糖体融合蛋白 S27 序列从斑节对虾肝胰腺转录组数据文库中筛选出来, 得到了该基因 5 端部分序列, 并验证了 5 端部分序列正确性。实验中以斑节对虾 3 RACE cDNA 为模板, *UbS27-rF1*(表 1) 和试剂盒中的 UPM 为引物进行第一次特异性扩增。25 μL 反应体系为 16 μL RNase Free dH₂O,

2.5 μ L 10 \times PCR Buffer, 2 μ L dNTP Mix(2.5 mmol·L⁻¹), 1 μ L 3 cDNA, 0.5 μ L UbS27-rF1 (10 mmol·L⁻¹), 2.5 μ L UPM, 0.5 μ L ExTaq PCR 反应条件为 94 预变性 3 min; 94 变性 30 s, 65 退火 30 s, 72 延伸 3 min, 5 个循环; 94 变性 30 s, 63 退火 30 s, 72 延伸 3 min, 5 个循环; 94 变性 30 s, 61 退火 30 s, 72 延伸 3 min, 25 个循环; 72 延伸 3 min, 4 保存。第一次扩增产物稀释 50 倍, 以该稀释产物为模板, UbS27-rF2 和 NUP 为引物进行第二次特异扩增。反应体系和反应条件同第一次扩增(退火温度为 61)。取 5 μ L 第二次扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 割胶回收 PCR 产物, 然后将胶回收产物与 pMD18-T 载体(TaKaRa 公司) 16 连接过夜, 转化到感受态细胞(DH5)中, 涂板, 37 培养过夜, 挑取阳性克隆进行测序。

表 1 所用引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

| 引物名称 | primer | 引物序列 | primer sequence |
|-----------|--------|----------------------------|-----------------|
| UbS27-F | | CCATGCAGATCTCGTTA | |
| UbS27-R | | CATCAACTTATTCTGGCT | |
| UbS27-rF1 | | CGTGAGTGTCCCAGTGACGAGTG | |
| UbS27-rF2 | | TGGAAAGATGCCACTTGACTTTGTCT | |
| UbS27-qF | | GTGAGTGTCCCAGTGACGAGTG | |
| UbS27-qR | | AAAGACAAAAGTCAAGTGGCATC | |
| -actin-qF | | GCCCTTGCTCCTTCCACTATC | |
| -actin-qR | | CCGGACTCTTCGTACTCATCCT | |

1.2.3 *PmUbS27* 的 cDNA 及 DNA 克隆 以斑节对虾 cDNA 和 DNA 为模板, 以 UbS27-F、UbS27-R(表 1)为引物, 分别在 25 μ L 的体系中进行 PCR 扩增, 扩增体系为去离子水 18.2 μ L, 10 \times Ex buffer 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ExTaq 0.3 μ L。PCR 的扩增条件为 94 预变性 3 min; 94 变性 1 min, 55 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min; 4 保存。按上述步骤进行 PCR 产物回收, 克隆及测序。

1.2.4 序列及系统发生分析 利用 NCBI 数据库中 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)、Blast(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>) 等软件分析测序结果, 利用 DNAMan 软件进行序列拼接, 利用 ExPASY 软件 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 进行等电点及分子量的预测, 使用 NCBI BLAST 工具栏分析所得序列和其他物种的蛋白序列相似度 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 使用 Expasy 软件 (<http://prosite.expasy.org/>) 进行功能位点的分析, 利用 NetPhos 2.0 server 程序查找磷酸化位点, 用 SMART 软件进行蛋白结构域和功能域的预测和分析, 用 PSIPRED Protein Structure Prediction Server 网站 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 进行蛋白质二级结构的预测, 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三级结构的预测。在 NCBI 的 Protein Blast 数据库中搜索其他物种的 UBS27 蛋白序列, 用 Clustal X 软件进行多序列比对, MEGA 5.0 进行聚类分析, 并采用 Neighbour-Joining 方法构建系统发生树。

1.2.4 *PmUbS27* 在斑节对虾各组织中的表达情况 以各组织和卵巢发育各期的 cDNA 第一条链为模板, 设计扩增产物为 95 bp 的定量 PCR 引物, 以 EF1 为内参基因, 每个样品进行 3 次重复。按照 $2^{-\frac{CT}{CT_{ref}}}$ 来计算各组织表达水平。反应体系为 20 μ L, 10 μ L 2 \times SYBR Premix ExTaq, 0.5 μ L UbS27-qF, 0.5 μ L UbS27-qR, 2 μ L cDNA 模板, 16.7 μ L RNase Free dH₂O。反应条件为 95 预变性 30 s; 95 变性 5 s, 60 退火 20 s, 40 个循环; 65 延伸 15 s; 40 冷却 5 min。实验数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当 $P < 0.05$ 表示为显著性差异。

2 结果

2.1 斑节对虾 ***PmUbS27*** 基因的克隆与序列分析

斑节对虾 *PmUbS27* 基因 cDNA 全长 514 bp (GenBank: KR106186), 开放阅读框长 465 bp, 编码 154 个氨基酸, 其蛋白分为泛素 (1 ~ 72 aa) 和核糖体蛋白 (101 ~ 147 aa) 2 个结构域, 5 非编码区 10 bp, 3 非编码区 39 bp, 在 27 bp 的 poly(A) 尾前 10 bp 处有个加尾信号。预测等电点为 9.78, 分子量为 41.042 kD(图 1)。序列含有 5 个磷酸化位点 (Thr₂₂、Ser₅₇、Tyr₈₅、Thr₈₇ 和 Ser₁₂₃), 1 个由 4 个的半胱氨酸残基构成的 C2-C2 型锌指结构, 在泛

1 GACTGCCACatgcagatctcgtaaaaacattaacgggaaagaccatcacccttgaggt 60
 1 M Q I F V K T L T G K T I T L E V 17
 61 cgagcctcagatactatcgaaaatgtgaaggcaaagatccaggataaggagggattcc 120
 18 E P S D T I E N V K A K I Q D K E G I P 37
 121 cccagaccaacagcgtttatcttgctggcaagcaactagaagatggcgtactctgtc 180
 38 P D Q Q R L I F A G K Q L E D G R T L S 57
 181 tgactacaacatccagaaagaatcgactcttcaactggtaactgcgcctcggtgggc 240
 58 D Y N I Q K E S T L H L V L R L R G G A 77
 241 caagaagcgcaagaagaattacactaccccaagaagattaagcacaagcataagaa 300
 78 K K R K K K N **Y** T **T** P K K I K H K H K K 97
 301 ggttaagcttgctgtgctgaagtactataagggtggatgataatggcaagatccccca 360
 98 V K L A V L K Y Y K V D D N G K I T R Q 117
 361 gcgcgtgagtgtcccagtgacgagtgcgggtgctgggtattcatggcaacatgttga 420
 118 R R E C P S D E C G A G V F M A N M F D 137
 421 tcgtcagtactgtggaagatgccacttgactttgtcttaataagccagaataaAGTG 480
 138 R Q Y C G R C H L T F V F N K P E * 154
 481 ATGGTAGAAAAAAA 514

图 1 斑节对虾 *PmUbS27* 基因 cDNA 全长序列及编码的氨基酸序列

cDNA 序列长度在两侧标注, 泛素蛋白结构域用下划线表明, 核糖体蛋白结构域用双下划线表明, 波浪线标注的是双甘氨肽, 磷酸化位点加粗斜体表示, 构成 C2-C2 锌指结构的半胱氨酸残基用黑色圆圈表明,

AATAAA 磷酸化信号序列用黑色方框标注, Poly(A) 用阴影字体表示

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PmUbS27*

Numbers on both sides are the lengths of cDNA. Ubiquitin domains are underlined and ribosomal S27 domains are double-underlined. Glycylglycine is wavy lined. Phosphorylation sites are in bold font. Black circles represent C2-C2 zinc finger constituted by cysteine residue. Black box indicates AATAAA polyadenylation signal sequence. Poly (A) signal sequence is in shadow.

素结构域末端有一个由 2 个甘氨酸形成的双甘氨肽 (Gly74-Gly75)。利用 UbS27-F/R 引物, 在基因组 DNA 上扩增出 *PmUbS27* 基因序列全长为 1 401 bp, 由 3 个内含子和 4 个外显子组成 (图 2)。其中 114 ~211 bp、299 ~760 bp、892 ~1 251 bp 分别为 3 个内含子。第一、第二个内含子区域符合 GT-AG 规律, 第三个内含子为 AT-AT。

2.2 *PmUbS27* 的二级结构及三级结构预测

利用二级结构预测网站对斑节对虾的 *PmUbS27* 氨基酸序列进行二级结构的预测, 分析结果发现 *PmUbS27* 的二级结构主要是由 -螺旋、-片层和无规则卷曲组成 (图 3)。泛素结构域主要由 5 个 -片层、1 个 -螺旋和连接的无规则卷曲构成, 而核糖体蛋白 S27 结构域由 4 个 -片层、1 个 -螺旋和连接的无规则卷曲构成。利用 SWISS-MODEL 网站进行 *PmUbS27* 蛋白质三级结构的预测。泛素结构域的三维结构由 2 个 -螺旋和 4 个 -折叠构成一个“泛素折叠”, 并在结构末端伸出

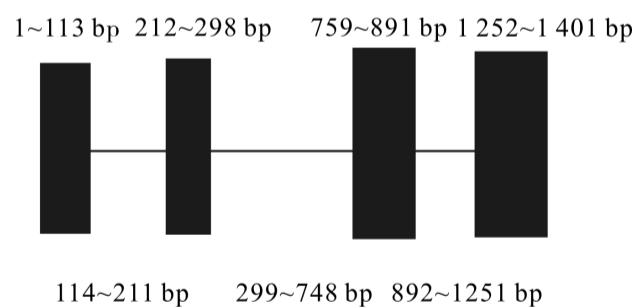


图 2 *PmUbS27* 基因图示

黑色方块代表外显子, 线条代表内含子, 顶部数据为外显子长度, 底部数据为内含子长度。

Fig. 2 Gene structure of *PmUbS27*

Black squares is exon. The line is intron. The data at the top is length of exon. The data at the bottom is length of intron.

泛素碳末端的延伸部分; 核糖体 S27 结构域由 5 个 -折叠和 1 个 -螺旋构成 (图 4)。

2.3 多重序列比对

利用 MEGE 5.0 软件, 将 *PmUBS27* 与 NCBI 上其他物种的该蛋白序列进行序列比对 (图 5), 结果显示不同物种的泛素-核糖体融合蛋白基因的前 76

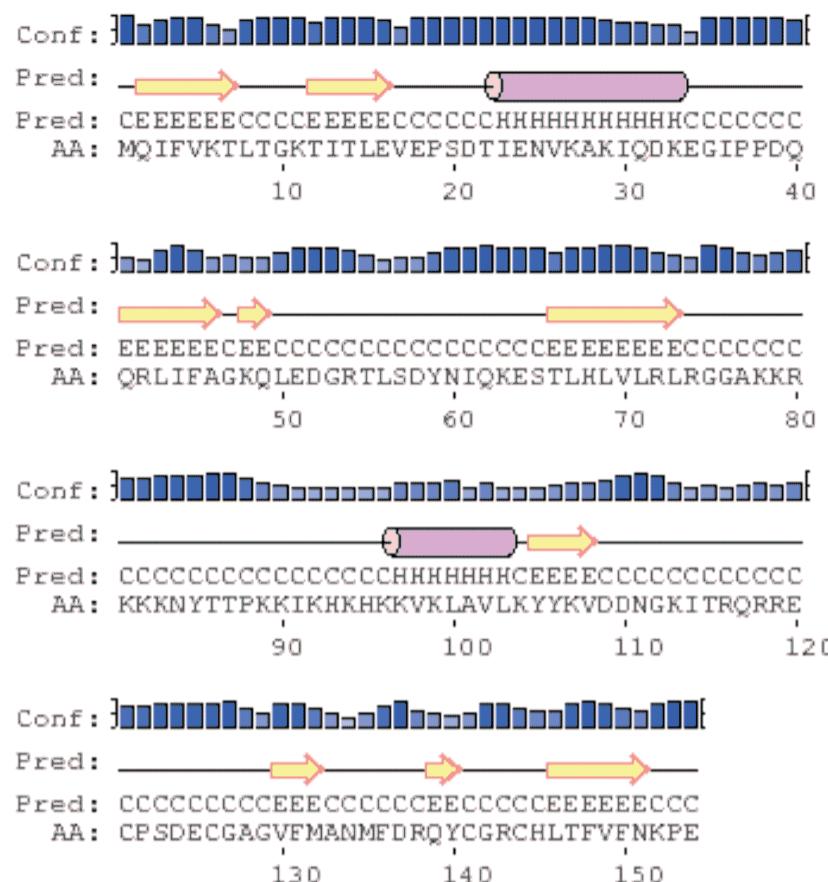


图 3 PmUbS27 的二级结构模拟预测图

Fig. 3 Protein secondary structure prediction of PmUbS27

aa 的泛素结构域保守性特别高，仅有 4 个氨基酸存在差异。后面的羧基末端核糖体蛋白序列相似度虽然不是很高，但其构成 C2-C2 锌指结构的 4 个半胱氨酸残基高度保守。与斑节对虾的 UbS27 氨基酸序列同源性最高的是克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*, AEB54653)，同源性达到 99.35%；其次是中华绒螯蟹 (ADF45325)，同源性为 98.05%；与文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*, AAL55470) 的同源性为 93.51%；与长牡蛎 (*Cassostrea gigas*, AFI80900) 的同源性为 92.86%；与

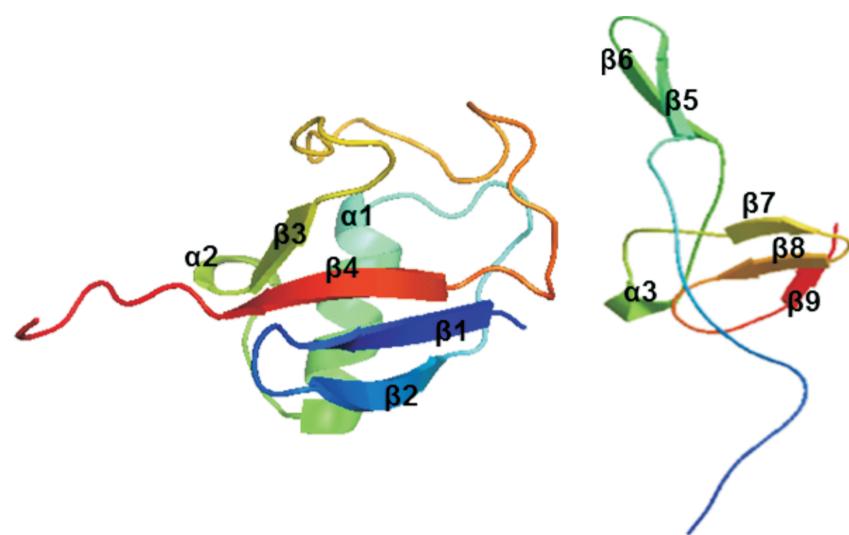


图 4 PmUbS27 的三级结构模拟预测

Fig. 4 Protein three-dimensional structure prediction of PmUbS27

肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*, AAY66925) 的同源性为 91.56%；与人类 (*Homo sapiens*, NP_002945)、啄木鸟 (*Picoides pubescens*, KFV68543)、小家鼠 (*Mus musculus*, NP_077239)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_9S6796)、变异革蜱 (*Demacentor variabilis*, ACF35544) 的同源性为 90.91%。

2.4 进化树构建

用 MEGA 5.0 软件构建斑节对虾 *UbS27* 与其他物种的系统发育树(所用序列同图 5), 如图 6 所示该进化树中甲壳纲中斑节对虾和克氏原螯虾、中华绒螯蟹聚为一支, 具有较近的亲缘关系, 与人类的亲缘关系最远, 符合生物群体进化的规律。

2.5 斑节对虾 *PmUpS27* 基因的表达情况

2.5.1 斑节对虾 *PmUbS27* 基因在各组织中的表达情况 实时荧光定量 PCR 检测斑节对虾

| | | | |
|--|----|---|-----|
| 斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri tsingtauense</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 长牡蛎 <i>Crassotrea gigas</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 人类 <i>Homo sapiens</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 啄木鸟 <i>Picoides pubescens</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 肩突硬蜱 <i>Ixodes sca pularis</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 家鼠 <i>Mus musculus</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| 变异革蜱 <i>Derma centor variabilis</i> | 1 | MQ1FVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVAKAKIQDKEGIPPDQQQLIFAGKQLEDGRTLSdynIQKESTLHLVLRLRGGAKKR | 80 |
| <i>Clustal consensus</i> | 1 | ***** | 80 |
| 斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i> | 81 | KKKNYTPPKKIHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 154 |
| 中华绒螯蟹 <i>Eriocheir sinensis</i> | 81 | KKKNYTPPKKIHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 154 |
| 克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i> | 81 | KKKNYTPPKKIHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 154 |
| 文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri tsingtauense</i> | 81 | KKKNYTPPKKIHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 154 |
| 长牡蛎 <i>Crassotrea gigas</i> | 81 | KKKNYTPPKKIHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| 人类 <i>Homo sapiens</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| 啄木鸟 <i>Picoides pubescens</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| 肩突硬蜱 <i>Ixodes sca pularis</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| 家鼠 <i>Mus musculus</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 157 |
| 变异革蜱 <i>Derma centor variabilis</i> | 81 | KKKNYTPPKKNHKHKKVKLAVLKYKVDDNGKITRQRRECPSECGAGVFMANMFDRQYCGCRCHLTIVFNKPE-- | 156 |
| <i>Clustal consensus</i> | 81 | ***** | 142 |

图 5 斑节对虾 PmUbS27 蛋白与其他物种的 UbS27 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 5 Amino acid sequence comparison of UbS27 between *P. monodon* and other species

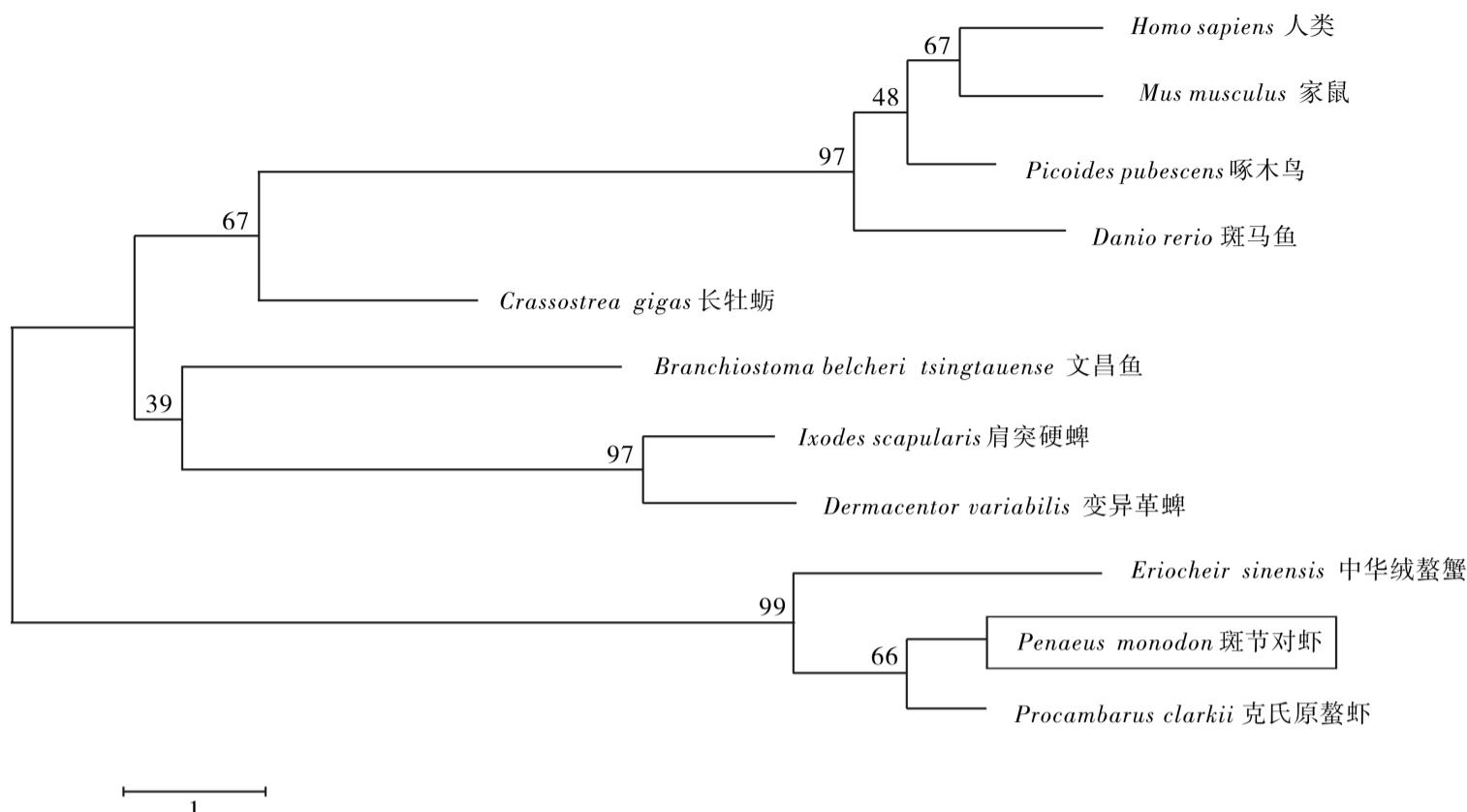


图 6 邻位法构建斑节对虾 PmUbS27 蛋白与其他物种 UbS27 的系统进化树
斑节对虾 PmUbS27 用黑色方框标明

Fig. 6 Phylogenetic tree of PmUbS27 amino acid sequences between *P. monodon* and other species
The black box is *P. monodon*.

PmUbS27 基因在不同组织中的表达水平(图 7), 以 *-actin* 为内参基因, 设定肝胰腺组织表达水平为 1, *PmUbS27* 基因在斑节对虾所检测的 11 种组织(脑、胸腹神经、心脏、肝胰腺、肠、肌肉、血、淋巴、鳃、精巢和卵巢等)中均有表达, 在卵巢中表达水平最高, 肝胰腺和淋巴次之, 与其他组织的表达水平有显著性差异($P < 0.05$)。

2.5.2 斑节对虾 *PmUbS27* 基因在卵巢发育各期的表达情况 用实时荧光定量 PCR 检测 *PmUbS27* 基因在斑节对虾不同的卵巢发育时期的表达水平变化, 设定卵巢发育一期 *PmUbS27* 基因表达水平为 1, 结果显示在斑节对虾卵巢的不同发育时期 *PmUbS27* 基因的表达呈现周期性变化(图 8)。
PmUbS27 在一期时表达量很低, 在卵巢发育前期中表达骤然升高($P < 0.05$), 并达到峰值, 为一期的 36 倍, 随后在二期和三期显著下降, 恢复发育前的水平, 但在成熟期四期又显著升高, 为一期的 12 倍。

3 讨论

UPP 途径是生物重要的蛋白水解途径, UbS27 作为 UPP 途径重要的组成部分——泛素的前体形式之一, 对于 UPP 途径参与的细胞活动具有重要的作用。实验克隆了 *PmUbS27* 基因并预测了该基

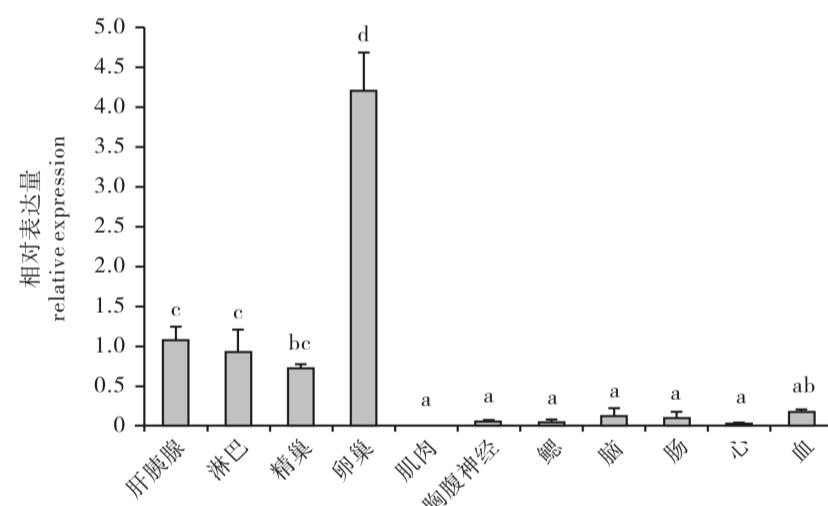


图 7 *PmUbS27* 基因在不同组织中的表达
不同字母代表具有显著性差异($P < 0.05$), 图 8 同此。
Fig. 7 Expression of *PmUbS27* in various tissues
Different letters indicate significantly different expression
($P < 0.05$). The same case in the Figure 8.

因编码的蛋白, 其结构上存在 5 个磷酸化位点(Thr_{22} 、 Ser_{57} 、 Tyr_{85} 、 Thr_{87} 、 Ser_{123})和 1 个由 4 个半胱氨酸残基构成的 C2-C2 型锌指结构, 在泛素结构域末端有一个由 2 个甘氨酸形成的双甘氨肽结构($\text{Gly}_{74}\text{-Gly}_{75}$), 这种结构与中华绒螯蟹泛素融合蛋白 UbS27 结构相似^[14]。核糖体蛋白 S27 结构域行使分子伴侣功能, 可以促进核糖体结构的组装, 研究发现在出芽生殖的酵母细胞中, 核糖体结构 S27 负责游离泛素的聚集^[15-16]。在特异性的肽链内切酶剪切下泛素核糖体融合蛋白 S27 能释放出成熟

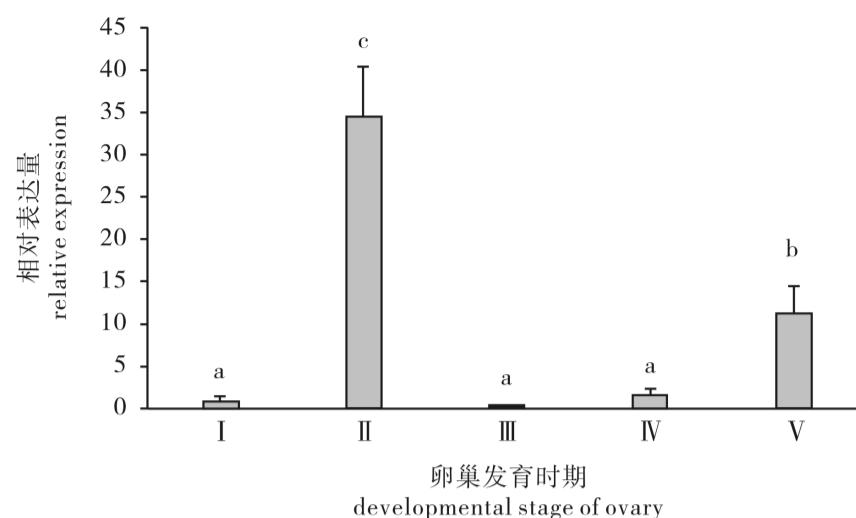
图 8 *PmUbS27* 基因在卵巢不同发育时期的表达

Fig 8 Expression of *PmUbS27* at different developmental stages of ovary

的泛素分子, 而 S27 核糖体部分会成为 80S 核糖体的组分。同时, 锌指结构是一种调控基因转录的重要功能结构^[17], 表明 *PmUbS27* 可能参与斑节对虾卵巢发育中功能蛋白的转录调控。

UbS27 在不同物种之间高度保守, 进化树分析结果与多重序列比对结果一致, 同属于甲壳动物纲的几个物种亲缘关系较近, 聚为一支, 与传统分类学和进化观点相统一。表明 *PmUbS27* 在序列进化上的高度保守性。人类泛素蛋白为球状结构, 主要由 5 个 β -折叠和 1 个 α -螺旋构成, 其中 α -螺旋与 β -折叠呈对角线形式结合^[18], 该实验中预测 *PmUbS27* 蛋白的二级结构和三级结构空间模拟图结果与其他人预测结果相似(图 3, 图 4), 这表明泛素蛋白在各物种间功能上也是高度保守的。

泛素蛋白广泛分布在机体内, 在各组织中均有表达, 约占细胞总蛋白含量的 0.1% ~5%^[19]。已有研究发现在中华绒螯蟹各组织中, 类泛素蛋白 (*EsSUMO*)、泛素活化酶基因 (*EsUba2*) 和泛素结合酶基因 (*EsUbc9*) 在性腺组织中表达显著较高^[20]; 陈丽丽^[14] 研究了中华绒螯蟹中泛素融合蛋白 *EsUbS27* 和 *EsUbL40* 基因在中华绒螯蟹各组织中的表达, 发现两种基因在精巢、卵巢和副性腺中表达量显著较高, 这些研究可以说明泛素相关蛋白在性腺发育过程中可能具有某种重要的作用。该实验中对 *PmUbS27* 基因在斑节对虾各组织的定量结果显示, 在卵巢中的表达显著高于其他组织, 其次为肝胰腺、淋巴和精巢。肝胰腺是卵巢发育过程中的重要支持组织, 研究表明, 卵黄蛋白原在卵巢发育初期的肝胰腺中大量表达并在发育过程中转运至卵巢中。*PmUbS27* 在性腺及性腺支持组织中显著高表

达, 提示该基因与斑节对虾性腺发育可能具有一定相关性。

斑节对虾卵巢发育过程是卵子形成和卵黄物质积累的过程, 在卵巢发育从 I 期开始到 V 期过程中, 卵原细胞大量增殖并形成卵母细胞^[13], 卵母细胞的形成是通过减数分裂和有丝分裂来带动, 同时减数分裂和有丝分裂是在一系列细胞周期蛋白调控下完成的。已有研究表明, 细胞周期过程是一个精密而复杂的过程, 其中细胞周期蛋白依赖激酶 (CDKs) 对于细胞周期进程具有重要的作用, CDKs 能磷酸化并调节数百种蛋白的活性^[23-25], 同时 CDKs 功能的发挥也是在多种蛋白调控下完成的, 如 cyclins E^[26]、CKIs、Wee1、Cdc25 等。有研究发现, 在细胞周期过程中大多数的细胞周期调控蛋白是通过 UPS 途径进行降解的^[27], 如细胞周期 G1 期细胞周期蛋白 (cyclins) 周期性的降解^[28-29]。SAKAGUCHI 等^[30] 发现泛素结合酶 Ubp9 在真菌的减数分裂和有丝分裂过程中具有调控作用。涂华玉^[29] 研究发现染色质组蛋白 H2B 泛素化修饰会影响酵母细胞减数分裂的进程, 朱虎^[30] 发现泛素融合蛋白 UFP 与人的精子发生相关。ZHANG 等^[31] 克隆了中华绒螯蟹泛素结合酶 *Ubc9* 基因, 发现该基因在卵巢和精巢中表达显著且在卵巢发育 I~2 期表达最高, 并通过原位杂交在精子细胞和卵母细胞中发现了 *EsUbp9* 表达。以上研究表明泛素相关基因参与的泛素化作用与配子的发生具有紧密的联系。该实验的定量结果显示, *PmUbS27* 基因在卵巢发育 II 期表达量最高, 在斑节对虾卵巢发育 I 期大量的卵原细胞进行减数分裂和有丝分裂并形成卵母细胞, 推测这个过程中 *PmUbS27* 作为成熟泛素单体的供体, 大量表达并释放出泛素单体参与泛素化进程对细胞周期活动的调控, 对于斑节对虾卵母细胞的减数分裂和有丝分裂具有重要作用。与其他结果不同, 实验中斑节对虾 *PmUbS27* 基因在卵巢发育 III 期后开始降低, 在卵巢发育 IV 期 (成熟期) 又显著升高且低于 II 期, 说明该基因可能参与了斑节对虾卵巢成熟期蛋白的表达调控, 对斑节对虾卵巢成熟的进程具有一定作用。

综上所述, 此实验克隆了斑节对虾 *UbS27* 基因的全长 cDNA 序列并分析了其 DNA 序列, 初步了解了 *UbS27* 在组织中和卵巢发育期的表达特征, 为进一步研究 *UbS27* 及其介导的 UPS 途径在卵巢发育中的作用与功能提供了参考, 同时可以推测出

PmUbS27 基因对斑节对虾卵巢的发育、卵子发生可能具有一定影响, 但其具体的分子机制尚未清晰, 需要进一步的研究与探索。

参考文献:

[1] 李炎武, 谭卫兵, 邝雪英, 等. 泛素调节的蛋白质降解——2004 年诺贝尔化学奖简介 [J]. 化学教育, 2004(11): 6-7, 32.

[2] KLEIGER G, MAYOR T. Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system [J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(6): 352-359.

[3] XU P, DUONG D M, SEYFRIED N T, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation [J]. Cell, 2009, 137(1): 133-145.

[4] NENOI M, ICHIMURA S, MITA K. Interspecific comparison in the frequency of concerted evolution at the polyubiquitin gene locus [J]. J Mol Evol, 2000, 51(2): 161-165.

[5] JONES D, CANDIDO E P. Novel ubiquitin-like ribosomal protein fusion genes from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* [J]. J Biol Chem, 1993, 268(26): 19545-19551.

[6] 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.

[7] IHARA M, STEIN P, SCHULTZ R M. UBE2I (UBC9), a SUMO-conjugating enzyme, localizes to nuclear speckles and stimulates transcription in mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2008, 79(5): 906-913.

[8] GU Y Q, CHEN Q J, GU Z, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 contributes to the oocyte selective elimination in prepubertal mouse ovaries [J]. Acta Physiologica Sinica, 2009, 61(2): 175-184.

[9] 周鹏. 若干大黄鱼性腺发育相关基因的克隆与表达 [D]. 厦门: 集美大学, 2009: 56-62.

[10] ANG Q, CHEN L, WANG Y, et al. Expression characteristics of two ubiquitin/ribosomal fusion protein genes in the developing testis, accessory gonad and ovary of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(6): 6683-6692.

[11] 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.

[12] 韩坤煌. 拟穴青蟹细胞周期及泛素系统若干基因参与性腺发育的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2010: 75-80.

[13] 黄建华, 马之明, 周发林, 等. 南海北部野生斑节对虾卵巢解剖结构及组织学的研究 [J]. 南方水产, 2005, 1(3): 49-53.

[14] 陈丽丽. 中华绒螯蟹泛素融合蛋白基因的克隆及表达分析 [D]. 上海: 华东师范大学, 2012: 36-53.

[15] CATIC A, PLOEGH H L. Ubiquitin-conserved protein or selfish gene? [J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(11): 600-604.

[16] FINLEY D, BARTEL B, VARSHAVSKY A. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal-proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis [J]. Nature, 1989, 338(6214): 394-401.

[17] 余晓丹, 沈晓明, 颜崇淮. 锌指蛋白结构和功能研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(3): 171-175.

[18] BYSTROFF C, THORSSON V, BAKER D. HMMSTR: a hidden Markov model for local sequence-structure correlations in proteins [J]. J Mol Biol, 2000, 301(1): 173-190.

[19] OSAKA H, WANG Y L, TAKADA K, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron [J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(16): 1945-1958.

[20] 王莹. 中华绒螯蟹类泛素化修饰(SUMOylation)途径相关基因的克隆及表达分析 [D]. 上海: 华东师范大学, 2012: 52-64.

[21] HOLT L J, TUCH B B, VILLENE J, et al. Global Analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution [J]. Science, 2009, 325(5948): 1682-1686.

[22] UBERSAX J A, WOODBURY E L, QUANG P N, et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1 [J]. Nature, 2003, 425(6960): 859-864.

[23] DEPHOURE N, ZHOU C S, VILL N J, et al. A quantitative Atlas of mitotic phosphorylation [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(31): 10762-10767.

[24] 戴文婷, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 CDK2 基因全长 cDNA 克隆及表达分析 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 1-11.

[25] YEN H C, XU Q, CHOU D M, et al. Global protein stability profiling in mammalian cells [J]. Science, 2008, 322(593): 918-923.

[26] BLOOM J, CROSS F R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(2): 149-160.

[27] MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 153-166.

[28] SAKAGUCHI K, KOSHIYAMA A, IWABATA K. Meiosis and small ubiquitin-related modifier (SUMO)-conjugating enzyme, Ubc9 [J]. FEBS J, 2007, 274(14): 3519-3531.

[29] 涂华玉. 组蛋白 H2B 泛素化修饰在减数分裂过程中作用的初步研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2011: 36-41.

[30] 朱虎. 精子发生相关基因的克隆及功能研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2002: 73-82.

[31] ZHANG F, CHEN L, WUP, et al. cDNA cloning and expression of Ubc9 in the developing embryo and ovary of Oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* [J]. Comp Biochem Physiol B, 2010, 155(3): 288-293.