

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20201109001

http://www.ykxjz.cn/

高威, 戴琴, 张攀, 宋崇阳, 朱杉杉, 赖晓芳, 高焕, 阎斌伦. 脊尾白虾 *UCHL5* 的基因克隆及其在卵巢发育中的功能研究. 渔业科学进展, 2022, 43(1): 163-171

GAO W, DAI Q, ZHANG P, SONG C Y, ZHU S S, LAI X F, GAO H, YAN B L. Molecular cloning of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5 and its functional analysis during ovarian development in *Exopalaemon carinicauda*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(1): 163-171

## 脊尾白虾 *UCHL5* 的基因克隆及其在卵巢发育中的功能研究\*

高威<sup>1</sup> 戴琴<sup>1</sup> 张攀<sup>1</sup> 宋崇阳<sup>1</sup> 朱杉杉<sup>1</sup>  
赖晓芳<sup>1,2,3</sup> 高焕<sup>1,2,3</sup> 阎斌伦<sup>1,2,3</sup>①

(1. 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室 江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏海洋大学 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心 江苏 连云港 222005; 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台 江苏 南京 210014)

**摘要** 为了解泛素羧基端水解酶 5 基因(ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5, *UCHL5*) 在脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)卵巢发育中的作用, 本研究采用 RACE 技术克隆了脊尾白虾 *UCHL5* 全长 cDNA, 并对其在脊尾白虾不同组织和不同卵巢发育时期的表达情况进行分析, 在此基础上构建了 pET32a-*UCHL5* 原核表达载体, 进行诱导表达研究。结果显示, *UCHL5* cDNA 全长为 1440 bp, 共编码 329 个氨基酸, 预测其相对分子量为 37.57 kDa, 理论等电点为 5.51。系统进化分析表明, 脊尾白虾 *UCHL5* 氨基酸序列与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)同源性最高(83%), 与同为甲壳纲的凡纳滨对虾、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)聚为一支。荧光定量 PCR 分析结果显示, *UCHL5* 在鳃中的表达量最高, 其次是卵巢, 且在以上 2 种组织中的表达量均显著高于其他组织; 在卵巢不同发育时期, *UCHL5* 的表达呈先上升后下降的趋势, 在产后恢复期(V期)急剧下降至最低水平。构建的 *UCHL5* 原核表达载体在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功表达 *UCHL5* 融合蛋白。本研究结果表明, *UCHL5* 可能与脊尾白虾卵巢发育有密切关系, 为研究甲壳动物卵巢发育的分子调控机制提供了理论基础。

**关键词** 脊尾白虾; *UCHL5*; 卵巢; 实时荧光定量 PCR; 原核表达

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)01-0163-09

泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway, UPP)是广泛存在于真核生物中的一种高效的蛋

白质降解途径, 单个或者多个泛素分子通过一系列酶的作用结合到底物蛋白上, 被标记的蛋白可被特异性

\* 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19-2288; KYCX18-2572)、江苏省优势学科建设工程资助项目(PAPD)和江苏省海洋生物资源与环境重点实验室开放课题基金(SH20191203)共同资助 [This work was supported by Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX19-2288; KYCX18-2572), Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD), and Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology (SH20191203)]. 高威, E-mail: 631606497@qq.com

①通讯作者: 阎斌伦, 教授, E-mail: yanbinlun1962@163.com

收稿日期: 2020-11-09, 收修改稿日期: 2020-12-08

地识别并被降解(于佳瑞等, 2019)。然而这一过程并不是不可逆的, 去泛素化的存在使得泛素化这一修饰过程可以保持在一个稳定的状态, 去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)可将已经泛素化的蛋白上的泛素移除, 防止底物蛋白的降解(贾雪冰等, 2020)。UCH 家族(ubiquitin carboxy termina hydrolases, UCH)的结构在去泛素化酶家族中是最先被发现和报道的, UCH 家族属于半胱氨酸蛋白酶, 大多是小分子蛋白, 通常作用于一些小分子的蛋白底物, 通过裂解 C 末端 76 位的甘氨酸, 将泛素单体释放出来(陈雨晗等, 2014)。研究表明, UCH 家族与生殖调控有着密切的关系, Mochida 等(2002)研究发现, UCH 的 mRNA 在罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的脑和卵巢中表达, 并且通过免疫组织化学分析发现, UCH 定位在罗非鱼卵巢的卵黄发生前期的卵母细胞中, 推测其对卵母细胞的生长有重要作用。

Han 等(2018)研究发现, UCHL3 和 UCHL5 在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)卵巢中的表达水平显著高于其他组织, 表明其在拟穴青蟹的性腺发育中起着重要的作用。孙兆贵等(2003)研究发现, 中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)泛素羧基末端水解酶(tUCH)对卵母细胞成熟过程中卵泡的破裂起到调控作用。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)具有繁殖周期短、生长速度快、适应性强等优点, 是我国特有的经济虾类之一(王盼等, 2021)。王绪峨(1987)初步研究了脊尾白虾的性腺发育、生殖蜕皮、交尾、产卵等生理活动。栗治国等(2014)利用石蜡切片和 HE 染色技术对脊尾白虾的精巢和卵巢进行组织结构观察, 将脊尾白虾卵巢发育分为增殖期(I)、小生长期(II)、大生长期(III)、成熟期(IV)和产后恢复期(V) 5 个时期。除细胞水平的研究外, 对性腺发育的研究也深入到了分子水平, 许多与脊尾白虾卵巢发育相关的功能基因也被相继报道(李志敏等, 2016; 马骊等, 2018; Liang *et al.*, 2020)。但关于 UCHL5 基因在脊尾白虾卵巢发育中的功能研究尚未见报道。本研究拟克隆脊尾白虾 UCHL5 全长 cDNA 序列, 并分析其在不同组织和卵巢发育不同时期的表达情况, 构建 UCHL5 原核表达载体并诱导表达, 为在分子水平上阐明脊尾白虾的卵巢发育机制提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

本研究所用脊尾白虾是由实验室自繁而来的同一个家系中的个体。选取身体健康、大小一致[体长

为(5.90±0.30) cm, 体重为(1.65±0.12) g]的脊尾白虾, 取眼柄、鳃、心脏、肝胰腺、卵巢、胃、肠、腹索神经和肌肉 9 个组织(每个组织样品均由 3 只虾混合而成), 加入 Trizol 后于-80℃保存。参照栗治国等(2014)对脊尾白虾卵巢分期的方法, 根据卵巢的形状、颜色, 取不同卵巢发育时期的脊尾白虾卵巢组织, 以相同的方法保存。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

**1.2.1 总 RNA 的提取** 采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]分别提取上述组织 RNA, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, Gene Quantity Pro 测定 RNA 的纯度及浓度, 合格的 RNA 样品于-80℃备用保存。

**1.2.2 cDNA 第一链的合成** 使用 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa), 以脊尾白虾 9 个组织混合 RNA 为模板分别合成 5'和 3' RACE-ready cDNA, 用于基因片段的克隆。使用 Primer Script™ RT Master Mix 试剂盒(TaKaRa)将脊尾白虾 9 个组织和不同时期的卵巢 RNA 分别反转录为 cDNA, 用于不同组织及卵巢不同时期基因表达情况的检测。

### 1.3 引物合成

实验所用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 序列见表 1。

### 1.4 脊尾白虾 UCHL5 基因的克隆

**1.4.1 脊尾白虾 UCHL5 基因 cDNA 核心片段的克隆** 根据脊尾白虾转录组序列, 设计 UCHL5 基因核心序列引物(表 1), PCR 扩增得到 UCHL5 基因核心片段, 回收纯化产物经克隆转化送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

**1.4.2 脊尾白虾 UCHL5 基因 cDNA 5'和 3'的快速扩增** 根据获得的核心片段设计特异性引物 UCHL5-GSP-194、UCHL5-GSP-593 用于 5'端的快速扩增, UCHL5-GSP-569、UCHL5-GSP-809 用于 3'端的快速扩增(表 1)。按 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒(TaKaRa)进行 PCR 反应, 产物经过纯化和克隆测序后, 使用 DNAMAN 8 对测序结果进行拼接, 得到完整的 cDNA 序列。

### 1.5 脊尾白虾 UCHL5 基因的生物信息学分析

使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对 UCHL5 基因的 cDNA 序列及氨基酸序列进行比对; 利用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析 UCHL5 基因的开放阅读框及其编码的氨基酸序

表 1 引物序列  
Tab.1 Primers sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	用途 Purpose
UCHL5-F1	GTGACCCTGGAGTTTTTACCGA	核心序列扩增引物
UCHL5-R1	CACCTGCCACCTTGACCTTTTT	
UCHL5-GSP-194	GGTTGGTCTTCTTGCTGCCATTTG	5'RACE 引物
UCHL5-GSP-593	CAATCGGTTCTTGAGCAATGGG	
UCHL5-GSP-569	GACCCATTGCTCCAGGAACCGAT	3'RACE 引物
UCHL5-GSP-809	CAAAAAGGTCAAGGTGGCAGGTG	
UCHL5-F2	TATCTACCGCTAATTGTCA	荧光定量引物
UCHL5-R2	AGCACTCGTCTTCTCCTT	
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	内参基因引物
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT	
UCHL5-F3	GAATTCATGGTTGTGTCAGACGCTGGTAATT	原核表达引物
UCHL5-R3	CTCGAGTCAAGCACTCGTCTTCTCCTTTGAC	

列; 利用 DNA star 进行理论等电点和分子量的计算; 利用 GeneDoc 进行氨基酸序列的多重比对; 利用 MEGA 6.0 进行系统进化树的构建。

### 1.6 脊尾白虾 *UCHL5* 基因表达特征分析

根据获得的 *UCHL5* 基因 cDNA 序列设计荧光定量引物, 以脊尾白虾 18S rRNA 为内参基因(表 1)进行组织表达特征分析(孙金秋等, 2020)。根据 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(TaKaRa)说明书, 设置反应体系和程序, 使用 Step One Plus 仪进行 qRT-PCR 扩增,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析定量结果(易健明等, 2015)。

### 1.7 原核表达载体的构建

根据 *UCHL5* 的 cDNA 序列设计原核表达引物 UCHL5-F3 和 UCHL5-R3 (表 1), 在引物的 5'端分别添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点。PCR 扩增产物进行胶回收后连接到 pEASY-T3 载体上进行克隆转化, 挑选阳性克隆送至公司测序。挑取测序正确的菌液抽取质粒, 然后用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切导入目的片段的 pEASY-T3 质粒和 pET32a 质粒, 胶回收目的片段和载体, T4 连接酶 4℃ 过夜连接。转化到感受态细胞, 提取重组质粒进行双酶切和 PCR 鉴定, 同时送至公司测序。

### 1.8 重组蛋白的诱导表达

将构建成功的重组质粒转化到 BL21 感受态细胞中, 挑选单克隆获得重组菌液, 将重组菌液接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 3 h 左右, 菌液光密度( $OD_{600\text{ nm}}$ )达到 0.4~0.6 时, 加入 IPTG 至最终浓度为 1 mmol/L, 30℃ 继续培养诱导表达。以 pET32a 空载体为阴性对照, 分别于表达 2、4、6 和 8 h 时取 2 mL 菌液保存, 离心沉淀, 裂解后, 进

行 SDS-PAGE 电泳分析, 通过 Western blot 检测 His 标签, 验证重组蛋白的正确性。

### 1.9 数据分析

实验最终各定量结果采用 SPSS 18.0 和 Excel 软件进行统计分析, 并进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和最小显著差异法(LSD)比较不同数据组间的差异,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *UCHL5* 基因 cDNA 全长序列分析

如图 1 所示, *UCHL5* 基因全长 cDNA 序列为 1440 bp, 其中, 5'UTR 为 164 bp, 3'UTR 为 286 bp, 开放阅读框为 990 bp, 编码 329 个氨基酸, 预测蛋白质分子量为 37.57 kDa, 理论等电点为 5.51,  $N^8$ -Y<sup>213</sup> 为泛素羧基末端水解酶家族 1 的保守序列。

### 2.2 系统发育分析

利用 GeneDoc 软件进行多重序列比对, 结果如图 2 所示, 脊尾白虾 *UCHL5* 氨基酸序列与其他物种的此氨基酸序列具有较高的同源性, 其中与凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的同源性最高, 为 83%。使用 MEGA 6.0, 采用邻位相接法, 将脊尾白虾 *UCHL5* 与其他物种的氨基酸序列构建系统进化树, 结果如图 3 所示, 进化树分为两大分支, 脊尾白虾 *UCHL5* 先与凡纳滨对虾聚为一小支, 再与拟穴青蟹和三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)等无脊椎动物聚为一分支; 小家鼠(*Mus musculus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、牛(*Bos taurus*)、原鸡(*Gallus gallus*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、非洲爪蟾

1	ACATGGGGAACCTTCGAACTAAAAGTGCAGTTGTTTCAGTGATGTTTAGTCTTAATCCOCATGGTTTT	66
67	TCACATTCTGAAGTCTTTAAGTTTTOGAGTAATACATTTAATATAGTACATTTATATAAAAAGCAAG	132
133	ATTGCCGTTTATTCTACAAACATCTTGCATC <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">ATG</span> TTGTGTCAGACGCTGGTAATTGGTGCTTGA	198
1	<u>M V V S D A G N W C L</u>	11
199	TAGAGAGTGACCCTGGAGTTTTTACCGAGCTCATCATGAAATTTGGTGTTAAGGGTGTTCAGTTG	264
12	<u>I E S D P G V F T E L I M K F G V K G V Q V</u>	33
265	AAGAATTGTGGAGCTTAGAGGATGAGTCATTTTCAAACCTGAAGCCAGTACATGGGCTCATCTTCC	330
34	<u>E E L W S L E D E S F S N L K P V H G L I F</u>	55
331	TTTTCAAATGGCAGCAAGAAGACCAACCTTCAGGAAGTGTGGTCCAAGATAACAGACTGGATAAAA	396
56	<u>L F K W Q Q E D Q P S G T V V Q D N R L D K</u>	77
397	TATTTTTGCAAAACAGATGATCAACAATGCTTGTGCTACTCAAGCTAATCTTTCAGTTTTGTGTA	462
78	<u>I F F A K Q M I N N A C A T Q A I L S V L L</u>	99
463	ATACCAAACATGCAGATGTACAGCTGGTCCCACACTATCAGAATTCAGGAATTCACACAGACTT	528
100	<u>N T K H A D V Q L G P T L S E F K E F T Q T</u>	121
529	TTGATGCCCATATGAAAGGATTGGCCCTCTCAAACCTCCGATACCATTCTGTAATGTTCCAAATTCCT	594
122	<u>F D A H M K G L A L S N S D T I R N V H N S</u>	143
595	TTGCTAAGCAAACATTTTGGAGTTGACTGCAACAACCAACTGAGGATGATGATGCTTTTCATT	660
144	<u>F A K Q T L F E F D C K Q P T E D D D V F H</u>	165
661	TTGTTGGATATATCCAGTTGAAGGGCGCCTGTATGAACTAGATGGCCTGAAAGAGGGTCCGATTG	726
166	<u>F V G Y I P V E G R L Y E L D G L K E G P I</u>	187
727	ACTTGGGAACCATGCTCCAGGAACCGATTGGTTAACAGTTGTACAACAGTCATTCAAAGACGAA	792
188	<u>D L G P I A P G T D W L T V V Q P V I Q R R</u>	209
793	TCCAAAAGTATAGTGAGGGAGAAATTCATTTCAACTTGATGGCTATAGTCAGCGATGCAAAATGG	858
210	<u>I Q K Y S E G E I H F N L M A I V S D R K M</u>	231
859	TTATTGAACGCAACATGCTAGAATACAAAAGGAAGTAGAGGAAGGTGGAATGGATAGTTCAGTCC	924
232	<u>V I E R N I A R I Q K E V E E G G M D S S V</u>	253
925	ATGAGGAAGAACTAGCACGGCTTAGAGGCTTATTAGAAAGTGAAGAAACAAAAGGTCAGGTGGC	990
254	<u>H E E E L A R L R G L L E S E E T K R S R W</u>	275
991	AGGTGGAAAATATTAGACGTAAGCACAATTATCTACCGCTAATTGTCAACATGATGAAAATATTGG	1056
276	<u>Q V E N I R R K H N Y L P L I V N M M K I L</u>	297
1057	CTGAAGAAGGTAACCTTTTACCAATCTATCATGCAGCTAAAGAAAAGGCCAGAGAAAGACTTGAGA	1122
298	<u>A E E G K L L P I Y H A A K E K A R E R L E</u>	319
1123	AAGCGAAGTCAAAGGAGAAGACGAGTGT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">TGA</span> CATGCTAGACTTCAGAACACATGTTAATCCGGA	1188
320	<u>K A K S K E K T S A *</u>	329
1189	TTGTTTCTGTCTGTGCGTTCATGTAAGACCAGGTTCAAATCACTTTAGTGTACATTTTTTTAA	1254
1255	CCAAAAATATTTATGCATTGAATTTTTGGAAATAAAGTATTTAGCCTTTTTTTATAAAAAATTTCTG	1320
1321	TAGGAAGAAATAGATTTTCTCTCACTTCAGGTATAAAGAATAACATTAGTAATTGGATTCTGTAGT	1386
1387	TTTTATAAATTAAGTTTATGTTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1440

图 1 脊尾白虾 *UCHL5* 基因 cDNA 序列及氨基酸序列Fig.1 cDNA sequence and amino acid sequence of *UCHL5*

起始密码子(ATG)和终止密码子(TGA)用方框标出,下划线部分为泛素羧基末端水解酶家族 1 的保守序列,

双下划线部分表示加尾信号(AATAAA)

The initiation codon (ATG) and termination codon (TGA) are marked with boxes. The underlined part is the conserved sequence of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase family 1, and the double underlined part indicates the polyadenylation signal (AATAAA)

(*Xenopus laevis*)等脊椎动物聚为一支。

其他组织( $P < 0.05$ )。

### 2.3 *UCHL5* 基因在脊尾白虾不同组织的表达

以 18S rRNA 作为内参基因,实时荧光定量 PCR 检测 *UCHL5* 基因在脊尾白虾不同组织中的表达水平,结果如图 4 所示,*UCHL5* 在脊尾白虾 9 个组织中都有表达,在鳃中表达最高,卵巢次之,显著高于

### 2.4 *UCHL5* 基因在卵巢不同发育时期的表达

如图 5 所示,在脊尾白虾卵巢的不同发育阶段,*UCHL5* 基因的相对表达量呈先上升后下降的趋势,IV 期达到最高值,V 期下降到最低水平,具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

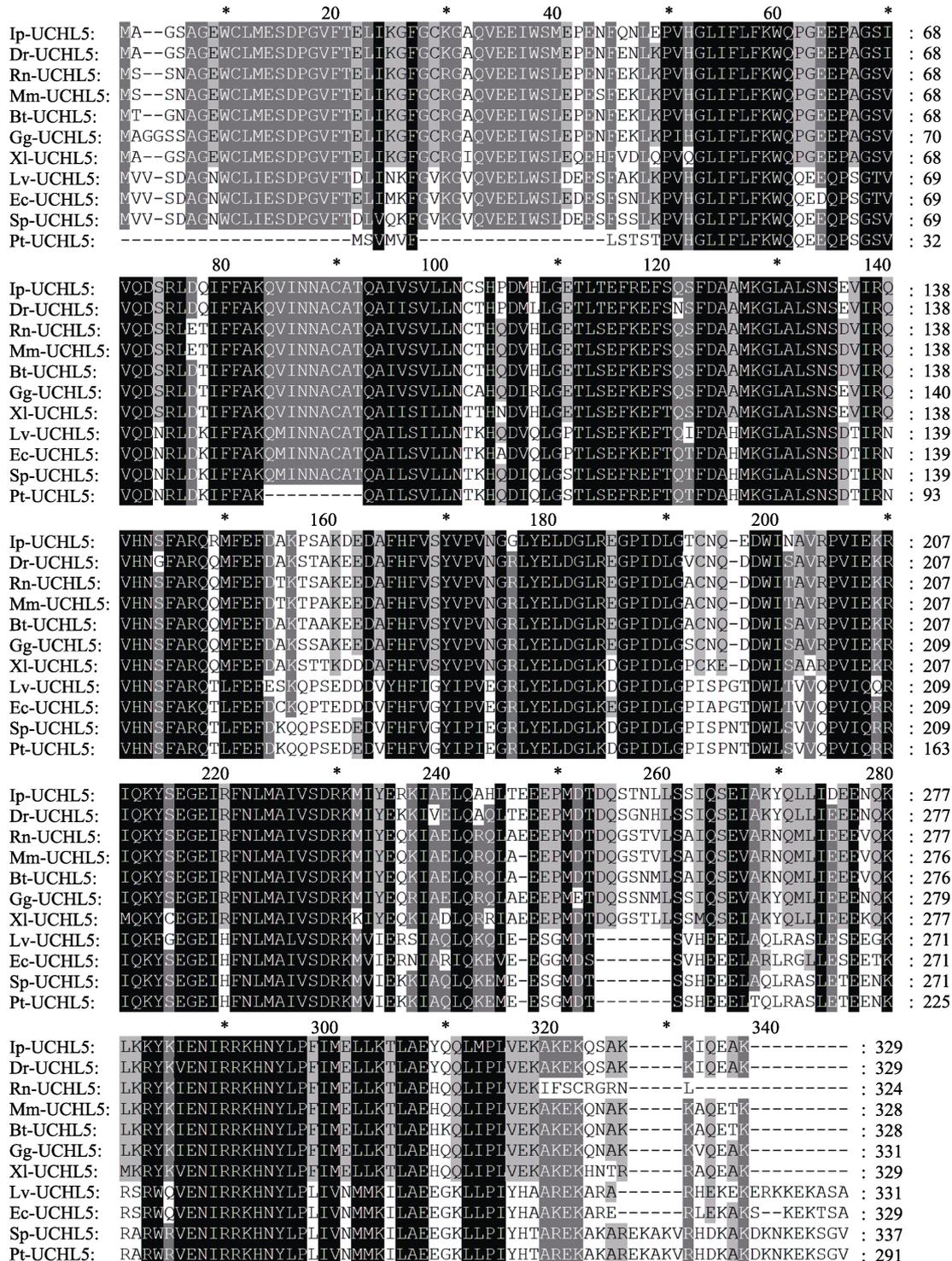


图 2 脊尾白虾 *UCHL5* 氨基酸序列的多重比对结果

Fig.2 Alignment of the amino acid sequences of different *UCHL5* proteins

Ip: 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*); DR: 斑马鱼(*Danio rerio*); Rn: 褐家鼠(*Rattus norvegicus*); Mm: 小家鼠(*Mus musculus*); Bt: 牛(*Bos taurus*); Gg: 原鸡(*Gallus gallus*); Xl: 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*); Lv: 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); Ec: 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*); Sp: 拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*); Pt: 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)

2.5 *UCHL5* 基因的原核表达载体构建及原核表达分析

成功构建了脊尾白虾 *UCHL5* 原核表达重组质粒

(pET32a-*UCHL5*), 通过菌液 PCR、测序等方法验证了重组质粒的正确性。同时进行 *UCHL5* 基因的原核表达, 在 1 mmol/L IPTG、30℃ 条件下, 得到了一条

位于 52 kDa 的蛋白条带，符合预期的蛋白大小(图 6)。利用 Western blot 进行验证，重组蛋白可以检测出 His 标签，并且和预期大小相一致(图 7)。

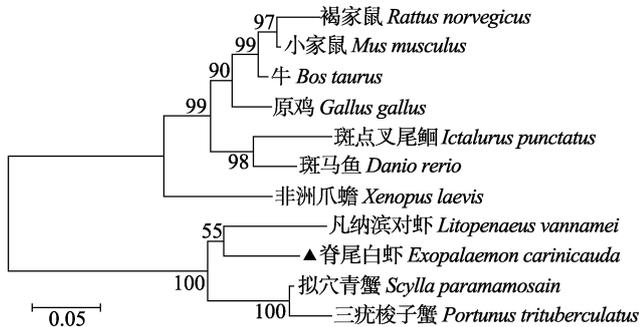


图 3 基于 *UCHL5* 氨基酸序列的系统进化树  
Fig.3 NJ phylogenetic tree based on amino acid sequences of the *UCHL5*

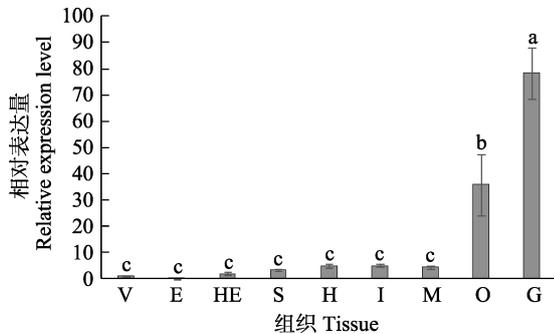


图 4 *UCHL5* 基因在不同组织中的表达特征  
Fig.4 *UCHL5* gene expression in different tissues

V: 腹索神经; E: 眼柄; HE: 肝胰腺; S: 胃; H: 心脏;  
I: 肠; M: 肌肉; O: 卵巢; G: 鳃  
不同字母代表差异显著( $P<0.05$ ), 下同  
V: Ventral nerve; E: Eyestalk; HE: Hepatopancreas;  
S: Stomach; H: Heart; I: Intestine; M: Muscle; O: Ovary;  
G: Gill. Different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ). The same as below

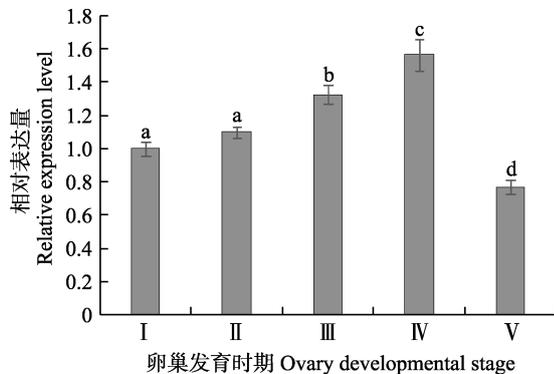


图 5 *UCHL5* 基因在卵巢不同发育时期的表达  
Fig.5 Expression pattern of *UCHL5* in different ovary developing stages

### 3 讨论

研究报道，UCH 家族在卵母细胞的成熟中起着重要的作用，UCHL1 和 UCHL3 的 mRNA 在小鼠和恒河猴(*Macaca mulatta*)的 GV 和 M II 期的卵母细胞中高度表达(Mtango *et al*, 2012)，在猪卵母细胞的 GV 和 M II 期也检测到 UCHL1 的高表达(Ellederova *et al*, 2004)，UCHL3 和 UCHL5 在拟穴青蟹卵巢中的表达量也显著高于其他组织(Han *et al*, 2018)。本研究获得了脊尾白虾 *UCHL5* 的全长 cDNA 序列，与凡纳滨对虾、三疣梭子蟹和拟穴青蟹的 *UCHL5* 具有较高的同源性。荧光定量结果显示，*UCHL5* 在脊尾白虾鳃和卵巢中表达水平较高，且显著高于其他组织。鳃是脊尾白虾的主要免疫器官之一，*UCHL5* 可能通过对免疫相关蛋白的去泛素化以防止免疫相关蛋白被降解，从而在免疫反应中发挥作用。Mazumdar 等(2010)

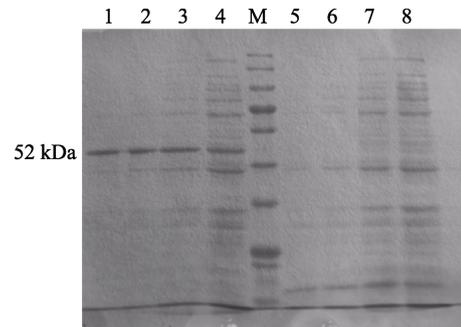


图 6 *UCHL5* 在大肠杆菌中的表达  
Fig.6 Expression of *UCHL5* in *Escherichia coli*

1、2、3、4 分别为 IPTG 诱导 2、4、6、8 h 的 pET32a-*UCHL5*;  
5、6、7、8 分别为 IPTG 诱导 2、4、6、8 h 的非重组菌(空质粒 pET32a); M: 蛋白分子量标准  
1, 2, 3, 4: Expressions of recombinant plasmid pET32a-*UCHL5* induced by IPTG at 2, 4, 6 and 8 hours, respectively; 5, 6, 7, 8: Expressions of non-recombinant bacterium (pET32a) induced by IPTG at 2, 4, 6 and 8 hours, respectively; M: Protein marker

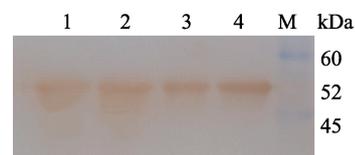


图 7 重组蛋白 Western blot 检测  
Fig.7 Western blot detection of recombinant protein

1、2、3、4 分别是 IPTG 诱导 2、4、6、8 h 的 pET32a-*UCHL5*;  
M: 蛋白分子量标准  
1, 2, 3, 4: Expressions of recombinant plasmid pET32a-*UCHL5* induced by IPTG at 2, 4, 6 and 8 hours, respectively; M: Protein marker

研究指出, Rpn13/*UCHL5* 的复合体参与调节与免疫相关的一氧化氮合酶和 NF- $\kappa$ B 的降解, 在免疫调节中发挥作用。细胞分裂需要一系列细胞周期蛋白的调控, 细胞周期蛋白大多都依靠 UPP 途径降解, 如细胞周期蛋白、细胞周期依赖激酶抑制蛋白等(周蕊等, 2003)。脊尾白虾卵巢的细胞分裂水平比其他组织要高, 所以 *UCHL5* 在卵巢中有较高的表达, 这与韩坤煌(2010)的研究结果相一致。克氏原螯虾泛素结合酶 *E2* 基因表达量从卵巢发育初期到成熟期逐渐上升, 产卵后表达量下降(石宝通等, 2018); 斑节对虾泛素结合酶 *UBE2H* 基因表达量在卵巢不同发育时期呈先上升后下降的趋势, 在卵巢 II 期表达量最高(唐蕾等, 2016); 拟穴青蟹泛素 *Ub* 基因在卵巢发育 V 期表达量最高, II 期表达量最低(戴燕彬等, 2012)。以上研究表明, 泛素及其相关基因对卵巢的发育起着重要的调控作用。本研究中, 在脊尾白虾卵巢不同发育时期, *UCHL5* 表达量呈先上升后下降的趋势, 在 V 期急剧下降到最低水平。梁俊平(2013)研究发现, 脊尾白虾卵黄蛋白原(vitellogenin)基因在卵巢发育不同时期也呈先上升后下降的趋势, 说明 *UCHL5* 对脊尾白虾卵黄蛋白原的合成起着重要的作用。

为进一步研究脊尾白虾 *UCHL5* 的生物学活性和蛋白表达情况, 本研究构建了 pET32a-*UCHL5* 的重组表达质粒, 诱导表达出大小约为 52 kDa 的融合蛋白。通过 Western blot 检测 His 标签, 得到了符合预测大小的蛋白条带, 由此可推断, 诱导出的蛋白为目的蛋白, 为接下来的抗体制备、免疫印迹、卵巢组织免疫组化提供实验材料, 以便进一步研究 *UCHL5* 蛋白在脊尾白虾卵巢发育过程中的功能与作用。

## 参 考 文 献

- CHEN Y H, ZHANG L Q, HE F C. The pivotal roles of DUBs in gene expression control. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2014, 41(2): 126–138 [陈雨晗, 张令强, 贺福初. 去泛素化酶与基因表达调控. *生物化学与生物物理进展*, 2014, 41(2): 126–138]
- DAI Y B, HAN K H, YAN S F, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of *Sp-Ub* during gonad development in *Scylla paramamosian*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 946–955 [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. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 946–955]
- ELLEDEROVA Z, HALADA P, MAN P, *et al.* Protein patterns of pig oocytes during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction*, 2004, 71(5): 1533–1539
- HAN K H. The study of cell-cycle and UPP related genes in the gonad development of mud crab, *Scylla paramamosain*. Master's Thesis of Jimei University, 2010 [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. 集美大学硕士研究生学位论文, 2010]
- HAN K, DAI Y, ZHANG Z, *et al.* Molecular characterization and expression profiles of *Sp-uchl3* and *Sp-uchl5* during gonad development of *Scylla paramamosain*. *Molecules*, 2018, 23(1): 213
- JIA X B, LI Q. Research advances on deubiquitinating enzymes involved in the development of hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2020, 47(5): 260–264 [贾雪冰, 李琦. 去泛素化酶在肝癌发生发展中的研究进展. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(5): 260–264]
- LI Z G, ZHANG C S, LI F H, *et al.* Histological study on the gonadal development of *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis, 1950). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(3): 362–370 [栗治国, 张成松, 李富花, 等. 脊尾白虾的性腺发育及组织结构观察. *水产学报*, 2014, 38(3): 362–370]
- LI Z M, LI J, LI J T, *et al.* The expression analysis of farnesoic acid o-methyl transferase (*FAMEt*) gene during the ovarian development cycles of *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(1): 46–51 [李志敏, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) *FAMEt* 基因在卵巢发育周期中的表达分析. *渔业科学进展*, 2016, 37(1): 46–51]
- LIANG J P, ZHANG W L, LI H, *et al.* Abundances of vitellogenin and heat shock protein 90 during ovarian and embryonic development of *Exopalaemon carinicauda*. *Animal Reproduction Science*, 2020, 223: 106633
- LIANG J P. Study on the technology of artificial breeding and expression of genes involving in reproducing of *Exopalaemon carinicauda*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [梁俊平. 脊尾白虾全人工繁育及繁殖相关基因的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- MA L, GE Q Q, XU Y, *et al.* Cloning of the translationally controlled tumor protein gene (*TCTP*) and expression analysis of autophagy regulatory related genes during the development of ovary in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(4): 101–109 [马骊, 葛倩倩, 许杨, 等. 脊尾白虾翻译控制肿瘤蛋白基因 *TCTP* 克隆及自噬调控相关基因在卵巢发育期的表达. *渔业科学进展*, 2018, 39(4): 101–109]
- MAZUMDAR T, GORGUN F M, SHA Y B, *et al.* Regulation of NF- $\kappa$ B activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(31): 13854–13859
- 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*. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(4): 368–383

- MTANGO N R, SUTOVSKY M, VANDEVOORT C A, *et al.* Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227(5): 2022–2029
- SHI B T, QIAN Z J, WANG H, *et al.* Cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme E2 gene of *Procambarus clarkii*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2018, 27(6): 814–824 [石宝通, 钱照君, 王辉, 等. 克氏原螯虾泛素结合酶 E2 基因的克隆及其在卵巢中的表达分析. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(6): 814–824]
- SUN J Q, XUN W Y, MANG H K, *et al.* Cloning and expression analysis of serine hydroxyl methyltransferase (SHMT) genes from *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 127–134 [孙金秋, 徐莞媛, 马杭柯, 等. 脊尾白虾丝氨酸羟甲基转移酶基因的克隆及其表达特征分析. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 127–134]
- SUN Z G, KONG W H, YAN S, *et al.* The functions in the progesterone-induced oocyte maturation of toad ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (tUCH) is independent of its UCH activity. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2003, 36(2): 105–112 [孙兆贵, 孔维华, 颜山, 等. 蟾蜍泛素羧基末端水解酶(tUCH)以不依赖其 UCH 活性的方式参与卵母细胞成熟调控. *实验生物学报*, 2003, 36(2): 105–112]
- TANG L, FU M J, LIU W S, *et al.* Cloning and expression of *UBE2H* gene in *Penaeus monodon*. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(11): 1958–1965 [唐蕾, 傅明骏, 刘文生, 等. 斑节对虾 *UBE2H* 基因克隆及其表达. *南方农业学报*, 2016, 47(11): 1958–1965]
- WANG P, SHI W J, WANG X H, *et al.* Effects of hypoxia and reoxygenation on respiratory metabolism enzyme and antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 106–115 [王盼, 史文军, 万夕和, 等. 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化酶活力的影响. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 106–115]
- WANG X E. Preliminary observation on reproduction biology of *Exopalaemon carinicauda*. *Chinese Journal of Zoology*, 1987, 22(1): 7–10 [王绪峨. 脊尾白虾繁殖生物学的初步观察. *动物学杂志*, 1987, 22(1): 7–10]
- YI J M, QU W B, ZHANG C G. Data analysis methods of real-time fluorescent quantitative PCR. *Letters in Biotechnology*, 2015, 26(1): 140–145 [易健明, 屈武斌, 张成岗. 实时荧光定量 PCR 的数据分析方法. *生物技术通讯*, 2015, 26(1): 140–145]
- YU J R, CONG J, ZHANG M, *et al.* Progress in research on ubiquitination in the field of reproduction. *China Medical Herald*, 2019, 16(29): 37–40 [于佳瑞, 丛晶, 张茗, 等. 泛素化在生殖领域中的研究进展. *中国医药导报*, 2019, 16(29): 37–40]
- ZHOU R, YU Z H. Regulation of cell cycle by the ubiquitin pathway. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2003, 15(3): 147–150 [周蕊, 余泽华. 泛素化途径与细胞周期的关系. *生命科学*, 2003, 15(3): 147–150]

(编辑 马瑾艳)

## Molecular Cloning of the Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase Isozyme L5 and Its Functional Analysis During Ovarian Development in *Exopalaemon carinicauda*

GAO Wei<sup>1</sup>, DAI Qin<sup>1</sup>, ZHANG Pan<sup>1</sup>, SONG Chongyang<sup>1</sup>, ZHU Shanshan<sup>1</sup>,  
LAI Xiaofang<sup>1,2,3</sup>, GAO Huan<sup>1,2,3</sup>, YAN Binlun<sup>1,2,3</sup>①

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 2. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-Industry Technology, Lianyungang, Jiangsu 222005, China; 3. Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

**Abstract** The ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* belongs to the suborder Pleocyemata, in the family Palaemonidae, and is one of the most economically important pond-reared shrimp. At present, most of the egg-carrying broodstock are harvested from natural sea areas, which considerably restricts the development of *E. carinicauda* aquaculture. Thus, artificial propagation methods are required to enhance the productivity of *E. carinicauda* in aquaculture systems. To develop these systems, there is a need for a greater knowledge base encompassing the mechanism of ovarian and embryonic development of *E. carinicauda*. Ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHLs) are a subset of deubiquitinating enzymes that are involved in numerous physiological processes. Many studies have shown that the UCH family of deubiquitinating enzymes plays an important role in reproduction. In this experiment, the full-length cDNA of *UCHL5* was identified and characterized using an approach that combines transcriptome data and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The expression profile of *UCHL5* in different developmental stages of the ovary and various tissues was determined using real-time quantitative PCR. The pET32a-*UCHL5* prokaryotic expression recombinant plasmid was constructed and induction expression was carried out. The cloned *UCHL5* gene was 1440 bp in length, encoding 329 amino acids. Isoelectric point (pI) of *UCHL5* protein was 5.51, and molecular weight was 37.57 kDa. Homology and phylogenetic analysis showed that the deduced amino acid sequence of *UCHL5* shared high homology in different species and the highest conservation with *Litopenaeus vannamei* (83%). Real-time quantitative PCR results indicated that the expression quantity of *UCHL5* was the highest in the gill tissue of *E. carinicauda*, followed by that in the ovary. The expression quantities of *UCHL5* at different ovary developmental stages (I~IV) were progressively upregulated, and the expression of *UCHL5* was the lowest in stage V. The fusion protein *UCHL5* obtained through prokaryotic expression was 52 kDa. From the results of this study, we may conclude that *UCHL5* is possibly playing an important role in the ovarian development of *E. carinicauda*.

**Key words** *Exopalaemon carinicauda*; *UCHL5* gene; Ovary; Real-time quantitative PCR; Prokaryotic expression

① Corresponding author: YAN Binlun, E-mail: yanbinlun1962@163.com