

大黄鱼 LcDCAF17 基因的克隆与表达分析

罗辉玉^{1,2}, 张东玲^{1,2}, 叶 坤^{1,2}, 王志勇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] E3 泛素连接酶是细胞泛素化过程中的重要因子, DCAF17 (DDB1-and CUL4-associated factor between 17 and the like protein) 是 E3 泛素连接酶的底物受体。为了探讨 DCAF17 蛋白在大黄鱼性腺发育过程中的作用, 从大黄鱼转录组数据库拼接出该基因, 命名为 LcDCAF17。LcDCAF17 基因全长 1733 bp, 开放阅读框 1530 bp、编码的蛋白质含 509 个氨基酸、分子量 89.281 ku、等电点 5.05。LcDCAF17 与其他鱼类的 DCAF17 同源性较高, 达 70% 以上。荧光定量 PCR 分析显示 LcDCAF17 基因在大黄鱼稚鱼、幼鱼、成鱼的各个组织/器官中均有表达, 卵巢表达量最高, 精巢次之。LcDCAF17 在性腺发育过程中表现出逐渐升高的趋势, 在成熟期表达量最高, 排空期降低。表明 LcDCAF17 在大黄鱼性腺发育过程中可能发挥着重要的作用。

[关键词] LcDCAF17; 性腺发育; 大黄鱼

[中图分类号] S 917

Molecular Cloning and Expression Analysis of LcDCAF17 in *Larimichthys crocea*

LUO Huiyu^{1,2}, ZHANG Dongling^{1,2}, YE Kun^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: E3 ubiquitin ligase, as a key factor in ubiquitin process, plays an important role in cell cycle regulation, and DDB1-and CUL4-associated factor between 17 and the like protein (DCAF17) is a substrate receptor protein of E3 ubiquitin ligase. To investigate the function of DCAF17 in gonad development of large yellow croaker *Larimichthys crocea*, DCAF17 gene (designated as LcDCAF17) was identified from a comprehensive transcriptome. The full-length cDNA of LcDCAF17 is 1733 bp, containing an open reading frame (ORF) of 1530 bp which encoded a deduced protein of 509 amino acids. The molecular weight of the deduced protein was 89.281 kDa and the isoelectric point was 5.05. The phylogenetic tree showed that LcDCAF17 shared high identities with DCAF17 from other fishes. The qPCR demonstrated that LcDCAF17 expressed in all tested tissues of Juvenile, young and adult fish and the highest expression level was in ovaries and the secondly high level in testes. With the gonad development, LcDCAF17 expression exhibited an increasing trend and peaked in maturation stage and ebbed in void phase. These results suggested that LcDCAF17 might be involved in gonad development in *L. crocea*.

Keywords: LcDCAF17; gonad development; *Larimichthys crocea*

[收稿日期] 2016-02-12

[修回日期] 2016-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (U1205122)

[作者简介] 罗辉玉 (1990—), 女, 硕士生, 主要从事水产分子遗传学研究。通信作者: 王志勇 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: zywang@jmu.edu.cn; zywang78@qq.com。

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 隶属于脊椎动物门 (Vertebrata)、辐鳍鱼纲 (Actinopterygii)、鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、黄鱼属 (*Larimichthys*)，是我国重要的海洋经济鱼类。由于长时间过度捕捞，导致大黄鱼渔业资源严重衰退，并出现性早熟现象^[1]，而在养殖大黄鱼中这种现象尤为严重^[2-3]。虽然国内外针对大黄鱼从基础生物学到全基因组测序已经有很多研究报道，但在生殖生物学方面的研究并不多，主要有尤永隆等^[4-5]应用电子显微镜技术观察了大黄鱼的精子发生过程；林丹军等^[6]观察并探讨了人工养殖条件下大黄鱼第一次性周期内性腺发育、性成熟特征；游秀容等^[7]对大黄鱼的性别分化做了组织学的研究等。迄今尚没有关于大黄鱼性腺周期的分子机制方面的研究报道。DCAF17 突变会造成人患 WSS 综合症，其症状是性腺功能减退，主要表现为卵巢发育不全，组织中只有纤维条，无卵母细胞，精巢中促性腺激素少，中低睾酮，少精子^[8-11]。这说明 DCAF17 在性腺发育过程中对维持生殖系统发挥着重要作用。本研究拟克隆 LcDCAF17 基因全长对其进行结构和组织表达谱分析，并观察其在性腺发育周期的表达水平变化，分析其在大黄鱼性腺发育周期中的作用，以期为查明大黄鱼性腺发育调控的分子机制提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

实验大黄鱼来自宁德市金铃水产科技有限公司育苗场，解剖采集大黄鱼的稚鱼（体长平均 6 cm，体重平均 10 g）、幼鱼（体长平均 13 cm，体重平均 65.5 g）、成鱼（体长平均 22.5 cm，体重平均 245 g）的性腺、肝脏、肠、肾脏、心脏、肌肉、脾脏、头肾、脑。性腺取出后，一部分用 RNA 保护液固定，一部分置于波恩氏液中固定，24 h 后，都置于 70% 酒精中 4 ℃ 保存，用于制作组织切片以鉴定性别和性腺发育时相。其他内脏取出后分别置于 RNA 保护液中。

1.1.2 引物设计

从大黄鱼转录组测序数据直接拼接获得 LcDCAF17 全长 cDNA 序列，使用 Primer 5.0 软件设计特异性的全长引物、定量引物和原核表达引物，送深圳华大基因科技有限公司进行合成（见表 1）。对定量 PCR 引物和原核表达引物进行扩增测序，待验证其序列的正确性后用于实验。

表 1 实验过程中所用的引物
Tab. 1 Oligo nucleotide primers used in this study

引物 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence	用途 Usage
DCAF17-F	TGTTGTCTGCTCCTGCTGCCC	ORF 扩增 PCR primers
DCAF17-R	GAGCTTAATTCACCTCTGTGCCACT	ORF 扩增 PCR primers
DCAF17-RT-F	ACAGCACTATGGCAACAAATGG	qRT-PCR
DCAF17-RT-R	CCTGATGAGGTGACGGTGAAT	qRT-PCR
β-actin-F	TTATGAAGGCTATGCCCTGCC	
β-actin-R	TGAAGGAGTAGCCACGCTCTGT	

1.2 实验方法

1.2.1 性腺总 RNA 的提取与 cDNA 第一条链的合成

采用 Trizol 试剂提取大黄鱼的稚鱼、幼鱼和成鱼的肝脏、肠、肾脏、心脏、肌肉、脾脏、头肾、脑等组织的总 RNA，用 RNA 试剂盒提取不同发育时期的精巢和卵巢的总 RNA。RNA 提取后，用 DNaseI (37 ℃，30 min) 去除基因组 DNA，用 Nandodrop 2000 测定总 RNA 的质量浓度，并根据 OD_{260/280} 的比值判别其纯度，通过 1.5%（质量分数）琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。检测合格后，

用随机引物按照 Promega 逆转录试剂盒的具体操作说明进行模板 cDNA 的合成。

1.2.2 LcDCAF17 基因 cDNA 的验证

根据转录组序列设计的引物进行 PCR 扩增以得到 LcDCAF17 的全长。25 μL PCR 反应体系: Taq 酶 (10μmol/L) 0.2 μL, DCAF17-F 和 DCAF17-R (10 μmol/L) 各 0.5 μL, ddH₂O 19.8 μL, dNTP (10 μmol/L) 0.5 μL, Buffer 2.5 μL, 模板 cDNA 1.0μL。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。

1.2.3 生物信息学分析

序列拼接用 Prabi 软件 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) ; 查找开放阅读框用 ORF Finder; 蛋白等电点和分子量分析用 Compute PI/Mw tool (<http://web.expasy.org/cgi-bin/compute-pi/pi-tool>) ; 磷酸化位点和糖基化位点的预测分别用 NetPhos2.0 (<http://www.dtu.dk/services/NetPhos/>) 和 NetNGlyc1.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ; 预测蛋白结构域用 InterProScan software (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) , 蛋白的三级结构用 SWISS-MODEL、PyMOL viewer 软件制作, 信号肽预测用 SingalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ; 氨基酸序列的同源性比对使用 DNAMAN (V6) , 构建系统进化树用 MEGA 5.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 。

1.2.4 性腺组织学分析

将保存在 70% (体积分数) 酒精中的精巢和卵巢取出, 并切成小块用于组织切片的制作, 制作方法参照游秀容^[12] 毕业论文中所描述的方法进行。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

对 1.2.2 合成的 cDNA 模板进行一定程度的稀释后用于定量 PCR 扩增, 设置空白对照, 内参基因为 β-actin (引物序列见表 1) , 每个组织或器官选 5 条鱼做重复实验, 每个反应设 3 个平行。设计的全部引物先进行普通 PCR 扩增, 再经琼脂糖凝胶电泳检测有无引物二聚体产生, 并割胶测序验证所扩增序列的正确性。

荧光定量 PCR 的 20 μL 反应体系中包括: SYBR © Premix Ex Taq II 10 μL, ROX Reference Dye 0.4 μL, cDNA 模板 8 μL, LcDCAF17-RT-R 和 LcDCAF17-RT-R 各 0.8 μL。

Real-Time PCR 反应条件为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 45 s, 40 个循环。融解曲线检测有无引物二聚体。

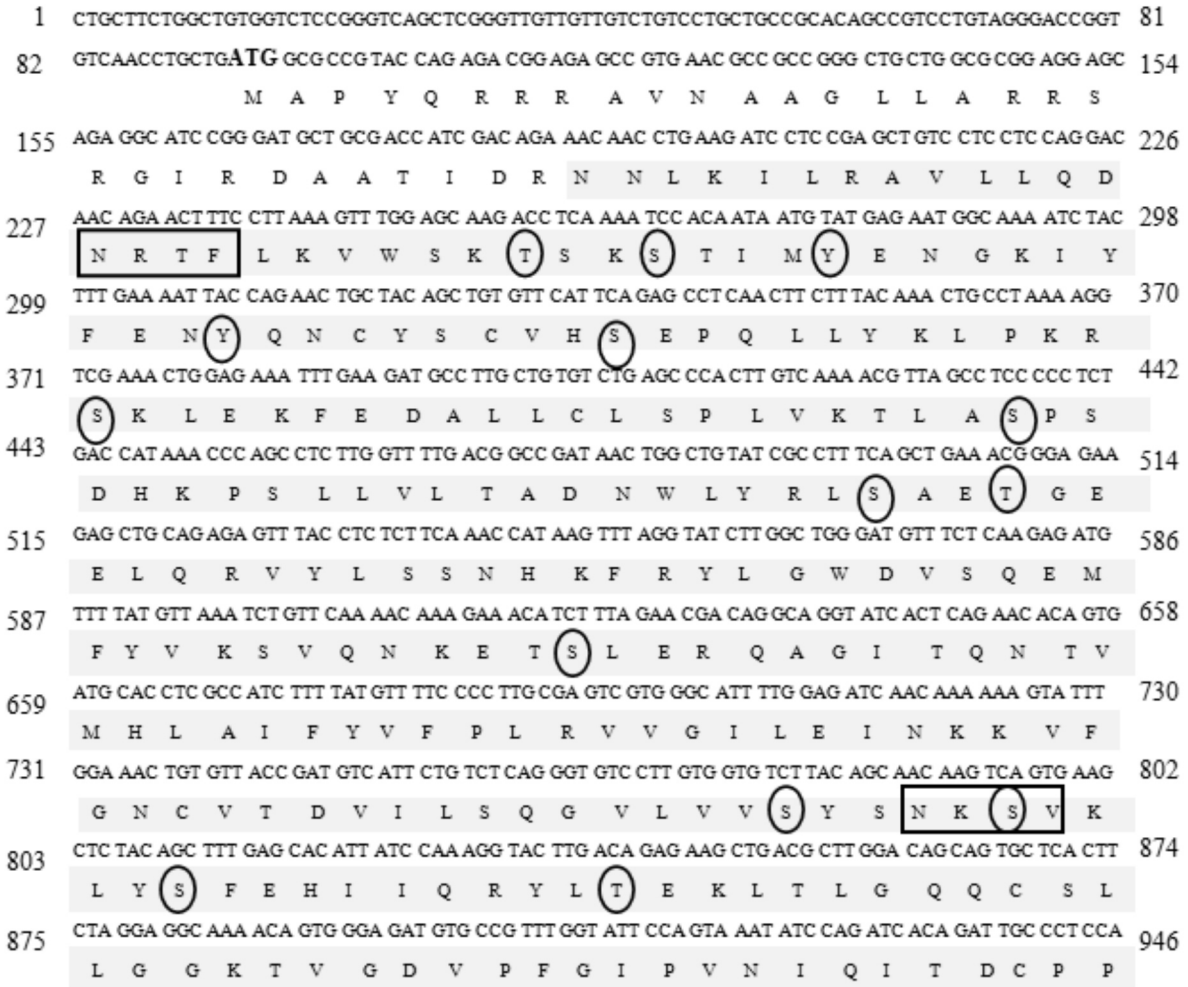
根据 Applied Biosystems StepOne Plus TM Real-Time PCR System 仪器导出的 C_t 值, 每个样品的相对定量值 (RQ) 为 2^{-ΔΔC_t}, (ΔC_t = 目的基因的 C_t 值 - 内参基因的 C_t 值, ΔΔC_t = ΔC_t 值 - 第一个样品的平均 C_t 值)。每个样品的 RQ 值用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 多重比较分析, 用 Origin7.0 对统计结果作图并分析, P < 0.05 视为差异显著。

2 结果

2.1 基因的 cDNA 的全长克隆和序列分析

以大黄鱼精巢 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 通过 PCR 技术克隆获得 DCAF17 基因的全长 cDNA 序列, 经 Blast 比对确认该基因为大黄鱼的 DCAF17 基因, 与转录组数据获得的序列相似性高达 100%, 因而将其命名为 LcDCAF17, 该序列已提交至 GenBank 数据库中(登录号:XP_010744241.1)。克隆获得的 LcDCAF17 基因全长 1733bp, 含有 1530bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码的蛋白质含 509 个氨基酸, 分子量 89.281ku, 等电点 5.05。TMHMM 分析发现其无跨膜区, SignalP 分析未发现信号肽。NetPhos2.0 预测显示该序列有 13 个丝氨酸磷酸化位点 (S58、S93、S114、S135、S176、S229、S234、S239、S322、S353、S379、S386、S443)、7 个苏氨酸磷酸化位点 (T55、T138、T249、T311、T407、T423、T475)、3 个酪氨酸磷酸化位点 (Y62、Y72、Y429), NetNGlyc1.0Server 预测显示有 4 个丝氨酸磷酸化位点、4 个糖基化位点 (⁴⁵ NRTF⁴⁸、³² NKSV²³⁵、

³⁹²NNTS³⁹⁵和⁴⁵⁷NQSG⁴⁶⁰）（见图 1）。



说明:起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)用加粗大号标出;糖基化位点用黑色方框标出;丝氨酸磷酸化位点、苏氨酸磷酸化位点、酪氨酸磷酸化位点均用圆圈标出。

Notes:The initiation codon(ATG) and the stop codon(TAA) are characterized in bold;the four glycosylation sites are in black boxes;serine phosphorylation sites,phosphorylation site of threonine and tyrosine phosphorylation sites are all marked by circles.

图 1 大黄鱼 LcDCAF17 基因全长 cDNA 的核苷酸序列及对应的的氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of LcDCAF17 from *Larimichthys crocea*

经 BLAS、BLASTx 以及多序列比对表明,此氨基酸序列与红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、革首南极鱼(*Notothenia coriiceps*)、斑马拟丽鱼(*Maylandia zebra*)、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、青鲈(*Oryzias latipes*)等的 DCAF17 氨基酸序列具有很高的相似性,都是 75% 以上;与哺乳类和鸟类的同源性相对较高,达 50% 以上;说明 DCAF17 蛋白从鱼类—鸟类—哺乳类、人类都具有较高的保守性(见表 2)。

2.2 DCAF17 系统进化分析

根据所推导的 DCAF17 的氨基酸序列,在 NCBI 上进行 Blast,获得相关物种的 DCAF17 的氨基酸序列。采用 MEGA 5.0 软件,以邻接法构建系统进化树(Bootstrap 值为 1000)。结果(见图 2)显示:哺乳类和鸟类的 DCAF17 聚为一大支,其中哺乳类、鸟类分别聚为一支;鱼类聚为一大支,其中,大黄鱼、红鳍东方鲀和革首南极鱼(*Notothenia coriiceps*)单独聚为一小支,斑马拟丽鱼、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*)、罗非鱼、红丽鱼(*Pundamilia nyererei*)聚为一支,青鲈和剑鱼(*Xiphophorus maculatus*)分别单独聚为一支。这符合从鱼类到鸟类再到哺乳类的进化关系。

表 2 大黄鱼与其他物种 DCAF17 氨基酸序列相似性的 BLAST 比对结果

Tab.2 Pairwise similarities to selected DCAF17 proteins

物种名 Species	Genbank 登录号 Accession no.	氨基酸一致性% Amino acid identity
1. 东北虎 <i>Panthera tigris altaica</i>	XP_007074643.1	51
2. 山羊 <i>Capra hircus</i>	XP_013824348.1	51
3. 小家鼠 <i>Mus musculus</i>	XP_006500402.1	52
4. 非洲象 <i>Loxodonta Africana</i>	XP_003406033.2	53
5. 人类 <i>Homo sapiens</i>	NP_079276.2	53
6. 鸭嘴兽 <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	XP_007669409.1	52
7. 家鸽 <i>Columba livia</i>	XP_005498715.1	52
8. 红喉潜鸟 <i>Gavia stellate</i>	XP_009813060.1	52
9. 红腿叫鹤 <i>Cariama cristata</i>	XP_009707819.1	53
10. 帝企鹅 <i>Aptenodytes forsteri</i>	XP_009276944.1	53
11. 朱鹮 <i>Nipponia nippon</i>	XP_009460363.1	52
12. 剑鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	XP_005799456.2	53
13. 青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_004081966.1	74
14. 大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	XP_010744241.1	100
15. 革首南极鱼 <i>Notothenia coriiceps</i>	XP_010772750.1	80
16. 红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	XP_003961966.1	75
17. 罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	XP_005452992.1	76
18. 红丽鱼 <i>Pundamilia nyererei</i>	XP_005723525.1	76
19. 斑马拟丽鱼 <i>Maylandia zebra</i>	KF732874	76
20. 伯氏朴丽鱼 <i>Haplochromis burtoni</i>	XP_014186356.1	76

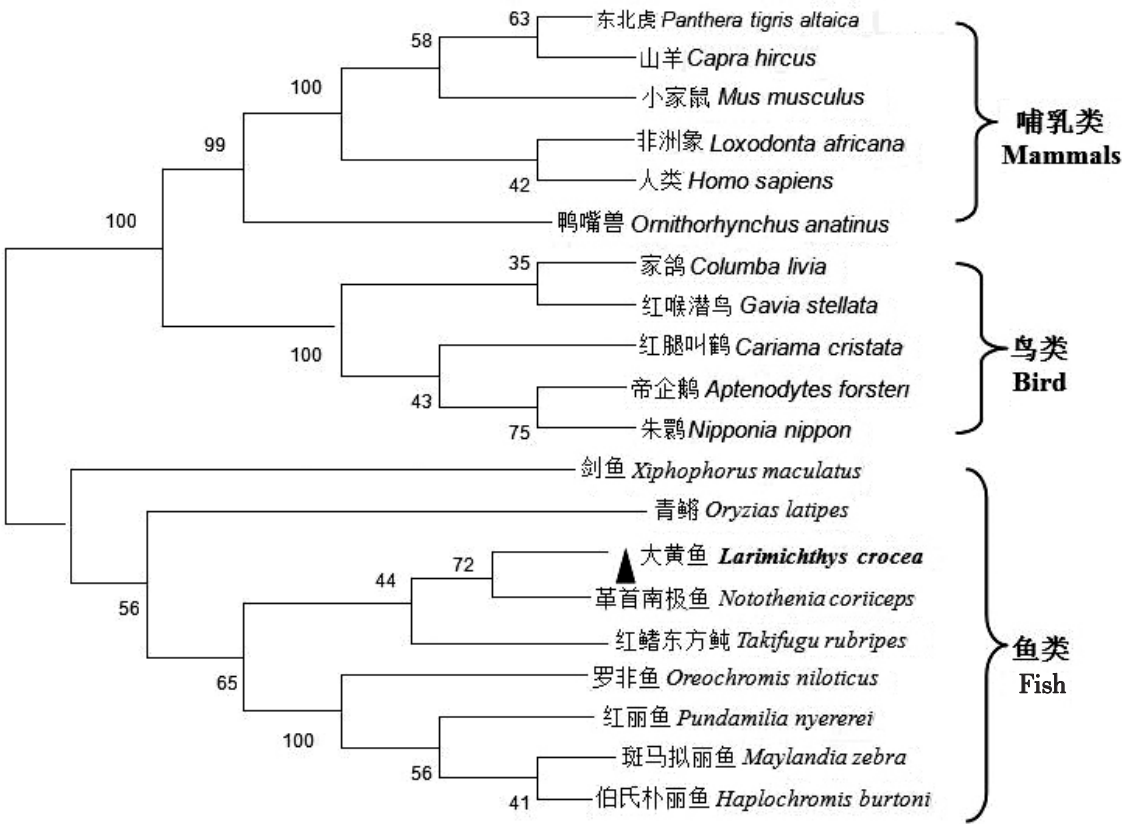
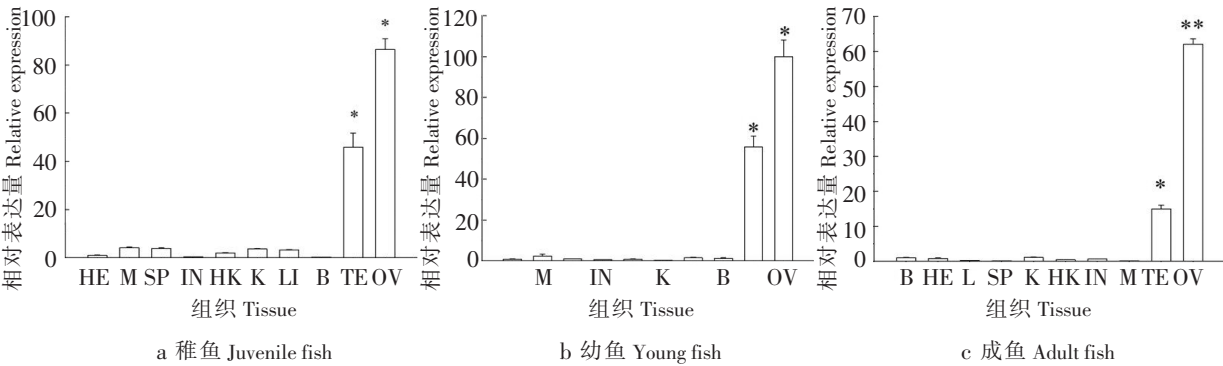


图 2 鱼类与哺乳动物 DCAF17 的进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis of DCAF17 proteins from mammals ,birds and fishes

2.3 LcDCAF17 基因的组织表达特性

用 DCAF17-RT-F、DCAF17-RT-R 为荧光定量 PCR 的引物，以大黄鱼稚鱼、幼鱼和成鱼的 10 器官或组织的 cDNA 为模板，β-actin 为内参基因，利用实时定量 PCR 技术方法研究大黄鱼 LcDCAF17-mRNA 的组织表达特性，设置心脏的表达量为 1。结果（见图 3）显示，LcDCAF17 基因在所检测的段雌雄大黄鱼 3 个不同发育阶各组织中均有不同程度的表达，其中精巢和卵巢的表达量最高，且显著高于其他各组织（ $P < 0.05$ ）；卵巢的表达量要高于精巢。



说明：B—脑；HE—心脏；L—肝脏；SP—脾脏；K—肾脏；HK—头肾；IN—肠；M—肌肉；TE—精巢；OV—卵巢；
* 表示与其他组织比较有显著性差异($P<0.05$)；** 表示与其他组织比较有极显著差异($P<0.01$)。

Notes: B—brain; HE—heart; L—liver; SP—spleen; K—kidney; HK—head-kidney; IN—intestines; M—muscle; TE— Testis; OV—ovaries; * indicates significant difference compared with others($P<0.05$); ** indicates greatly significant difference compared with others($P<0.01$).

图 3 LcDCAF17 在大黄鱼的各组织表达特性

Fig.3 Quantity PCR analysis of the LcDCAF17 gene expression from different tissues

2.4 LcDCAF17 基因在精巢和卵巢各发育时期的表达特性

2.4.1 性腺切片分期

根据林丹军等^[6]的研究，把大黄鱼的性腺分为增殖期、小生长期、大生长期、成熟期、排空期（见图 4）。

1) 卵巢

增殖期：外观呈透明丝状，卵原细胞分散在细胞质中，强嗜碱性，胞质薄，核质网状。

小生长期：外观浅肉色圆带状，可见血管。核增大，细胞质中常见多个着色深的核仁，细胞核透亮核质稀疏。核膜四周分布着多个核仁。

大生长期：卵巢增大，透过卵膜可见细小的卵粒。细胞近似圆形，弱嗜碱性。在核外周出现小脂肪滴。

成熟期：卵巢充满整个腹腔，轻压腹部有卵粒顺畅流出。胞质中充满卵黄颗粒，并聚集成球状，脂肪滴互相融合成大油球，占据在细胞中央。细胞核移至卵膜附近，核仁消失。

排放期：成熟卵子的排放使滤泡腔内产生大小不一的空腔，部分滤泡腔内还存留着少数几个生殖细胞。呈蜂窝状。

2) 精巢

增殖期：外观呈透明细丝状，出现精巢腔，精小叶增大加厚，在精小叶内可见还未分化的精原细胞，另外精小囊内可见许多处于分化增殖的精原细胞。

小生长期：外观浅肉色鞭带状，内侧可见血管。核增大，强嗜碱性，在精小囊内出现了精细胞，在精小叶内的生精细胞出现了不同步发育，但是，同一个精小囊的发育是相同的。

大生长期：成乳白色长囊状，血管明显，每个精小叶中除了各期的生精细胞外，在小叶腔中还有许多精子聚集成团。

成熟期：精巢饱满肥厚，轻压有白色液体流出。精小叶四周的壁变得很薄，整个腔变得更大，充满了密密麻麻的精子。

排放期：精小叶中的精子几乎排出了体外，残留的被消化吸收，精小叶壁仅仅由一层精原细胞构成。

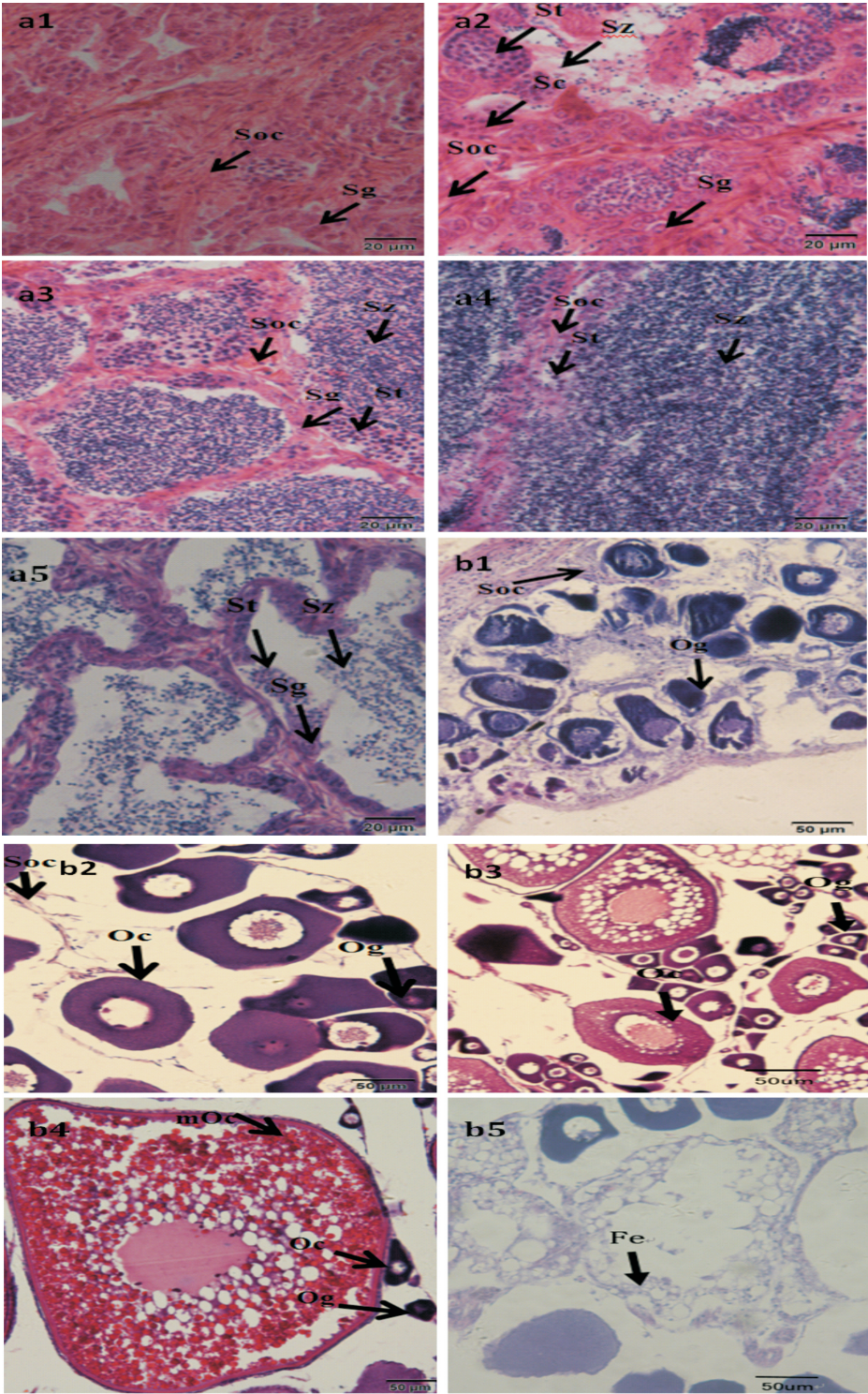


图 4 大黄鱼性腺发育周期石蜡切片图

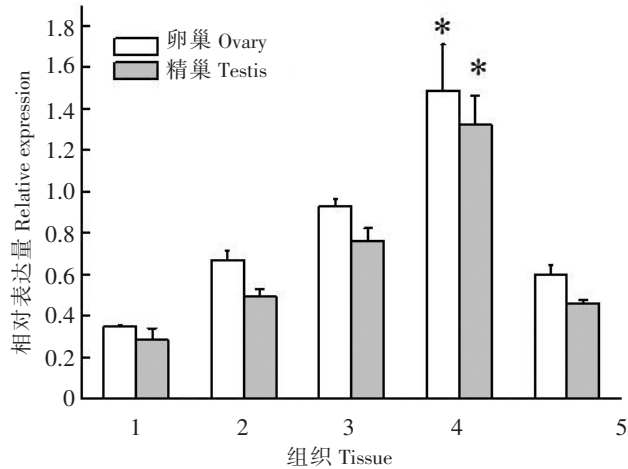
Fig.4 Paraffin section diagrams of gonad development cycle of large yellow croaker

说明:a—精巢;b—卵巢;a1、b1—增殖期;a2、b2—小生长期;a3、b3—大生长期;a4、b4—成熟期;a5、b5—排空期;Soc—体细胞;Sg—精原细胞;Sc—精母细胞;St—精子细胞;Sz—精子;Og—卵原细胞;Oc—卵母细胞;mOc—成熟期卵母细胞;Fe—滤泡膜。

Notes:a—testis;b—ovary;a1,b1—proliferative stage;a2,b2—young growing stage;a3,b3—large growing stage;a4,b4—mature stage;a5,b5—emptying stage;Soc—somatic cells;Sg—spermatogonium;Sc—spermatocyte;St—spermatid;Sz—spermatozoon;Og—oogonium;Oc—oocyte;mOc—mature oocyte;Fe—follicular membrane.

2.4.2 大黄鱼性腺周期荧光定量 PCR

根据石蜡切片结果确定性腺发育分期，提取对应性腺的 RNA，利用 quantitative RT-PCR 方法检测大黄鱼精巢与卵巢各发育阶段 DCAF17 基因的表达情况，设置增殖期性腺的表达量为 1，结果如图 5 所示。在卵巢和精巢的不同发育阶段，LcDCAF17 的表达量呈先上升后下降的趋势，从增殖期到成熟期逐渐增高，在成熟期的表达量最高，显著高于增殖期和生长期 ($P < 0.05$)，在排空期表达量显著下降到与小生长期与大生长期之间。



说明：1—增殖期；2—小生长期；3—大生长期；4—成熟期；5—排空期。
Notes: 1—proliferative stage; 2—young growing stage; 3—large growing stage; 4—mature stage; 5—voiding stage.

3 讨论

LcDCAF17 不存在信号肽序列，也未发现跨膜区，它既不是分泌蛋白，也不属于膜蛋白。已有的研究表明 DCAF 蛋白与 DDB1-CUL4 E3 泛素连接酶的 DDB1 连接方式具有多样性，其中发现的 60 多种 DCAFs 蛋白中有 50 多种含 WDR 重复结构域 (domain)，且大约 4~7 个重复可以形成一个 β -Propeller 螺旋桨。大部分 WDR 结构域含有 2 个基序 (motifs)，这些基序在 WD40- β -Propeller 螺旋桨叶子底端的用于与 DDB1 结合，在螺旋桨叶子顶端的用于与底物结合。DCAFs 蛋白中 CSA、DCAF8、Cdt2 和 DCAF12 的结构都是这种模式^[13-14]。而 DDB2 只有一个 WDXR 基序与 DDB1 结合，另外 N-端还有一个 α 螺旋与 DDB1 的三个 β -propeller (β PC, β PB, β PA) 中的一个 β PC 结合^[15-16]。蛋白结构预测过程中发现 DCAF17 与同家族的 DDB2 一样在 N 端有一个 α 螺旋，但是否与其具一样的作用，还有待研究，并且大黄鱼 DCAF17 在蛋白结构分析中并未发现和同家族一样的 WD40 结构，那么它如何与 E3 泛素连接酶结合发挥作用，需要通过实验进行验证。

图 5 LcDCAF17 基因在性腺发育过程中的相对表达情况
Fig.5 The relative expression of LcDCAF17 gene indifferent gonad development stage

性腺发育周期中精子和卵子的发生与成熟是一个复杂的过程，涉及有丝分裂和减数分裂，必须通过蛋白降解和 DNA 损伤修复来严格监管这些过程。DDB1-CUL4 E3 泛素连接酶通过泛素化调控细胞周期发生过程的细胞增殖、DNA 复制错误的损伤修复、基因组的完整性等^[15]。文献 [17] 研究表明 E3 泛素连接酶调控小鼠的精子形成过程的减速分裂，因此 DDB1-CUL4 E3 泛素连接酶参与调控生殖细胞周期。作为 DDB1-CUL4 E3 泛素连接酶复合物的底物受体，DCAF17 在结合 DDB1-CUL4 E3 泛素连接酶复合物后提供底物结合结构，传递泛素化小分子，使目标蛋白泛素化后降解。Sugasawa 等^[18] 和 Groisman 等^[19] 利用人类细胞系作为研究对象，发现 DCAFs 家族中的 DDB2 和 CSA 的功能相似，Cul4-DDB1^{DDB2} 泛素化 DNA 修复因子 XPC，Cul4-DDB1^{CSA} 转泛素化修复偶联因子 CSB，参与细胞周期过程中的 DNA 修复、复制、转录等。DCAF17 与 DDB2、CSA 同属于 DCAF 家族，其作用机理可能与 DDB2、CSA 相似，参与大黄鱼性腺发育周期中 DNA 修复。如前所述，DCAF17 基因在人类性细胞增殖与生殖系统维持中具有重要的作用，该基因的突变会导致人出现 WSS 综合征^[10]。但是，对于鱼类 DCAF17 基因是否具有同样作用，迄今尚无研究报道。本研究克隆了 LcDCAF17 基因 cDNA 全长，组织表达谱的分析结果显示，LcDCAF17 基因在大黄鱼的心脏、肌肉、脾脏、肠、头肾、肾脏、肝脏、脑以及精巢和卵巢组织中均有不同程度的表达，说明其在各种组织细胞中发挥着作用，其中卵巢的表达量最高，精巢次之，且显著高于其他各组织，表明该基因与大黄鱼性腺的发育密切相关，与人类 DCAF17 基因的研究结果一致。研究显示，LcDCAF17 蛋白质氨基酸序列结构与人的 DCAF17 蛋白保持着较高的相似性，表明 DCAF17 的结构和功能从鱼类到人类具有很大的保守性。对大黄鱼不同发育阶段性腺基因表达量的研究结果显示：在性腺发育早

期(增殖期),精原细胞和卵原细胞分裂形成精母细胞和卵母细胞,主要处于增殖状态,此时细胞分裂相对没有那么旺盛,对于细胞周期因子要求没有那么高,所以 LcDCAF17 基因表达量不高;随着性腺逐步发育到大小生长期,此时性腺中精母细胞和卵母细胞需要经过减速分裂形成精子、卵子,细胞分裂速度增加, LcDCAF17 基因的表达量也相应地逐步增加;到性腺成熟期,性腺的生殖细胞分裂达到了峰值, DNA 损伤修复以及周期蛋白选择性的降解在该生殖周期的作用也达到最强,此时 LcDCAF17 的表达量达到最高,显著高于其他各时期 ($P < 0.05$);排空期性腺退化, LcDCAF17 基因的表达量也显著下降到介于小生长期与大生长期 III 期之间的水平,表现出与性腺发育程度非常显著的相关性,这进一步说明 LcDCAF17 基因是性腺发育与成熟过程中的一个重要基因。

本实验首次获得了大黄鱼 LcDCAF17 基因的 cDNA 全长,通过对其组织表达特性以及性腺不同发育时期表达情况的分析,证明其与大黄鱼的性腺发育周期显著相关,是性腺发育与成熟过程中的重要基因,推测其在生殖细胞发生与增殖分化过程中为保持 DNA 正确复制和基因组的完整性发挥着重要作用。

[参 考 文 献]

- [1] 徐开达,刘子藩. 东海区大黄鱼渔业资源及资源衰退原因分析 [J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(5): 392-396.
- [2] 方永强,翁幼竹,周晶,等. 大黄鱼性早熟问题的研究:网箱养殖鱼性腺发育状况 [J]. 台湾海峡, 2000, 19(3): 354-359.
- [3] 杨小强,张诚,黄海宁,等. 网箱饲养大黄鱼性早熟的调查研究 [J]. 水产科技情报, 2002, 29(6): 24-245.
- [4] 尤永隆,林丹军,陈连云. 大黄鱼的精子发生 [J]. 动物学研究, 2001, 22(6): 461-466.
- [5] 尤永隆,林丹军. 大黄鱼精子的超微结构 [J]. 动物学报, 1997, 43(2): 119-126.
- [6] 林丹军,张健,骆嘉,等. 人工养殖的大黄鱼性腺发育及性周期研究 [J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 1992, 8(3): 81-87.
- [7] 游秀容,蔡明夷,姜永华,等. 大黄鱼性腺性别分化的组织学观察 [J]. 水产学报, 2012, 36(7): 1057-1061.
- [8] RACHMIEL M, BISTRITZER T, HERSHKOVIZ E, et al. Woodhouse-Sakati syndrome in an Israeli-Arab family presenting with youth-onset diabetes mellitus and delayed puberty [J]. Horm Res Paediatr, 2011, 75(5): 362-366.
- [9] BEN-OMRAN T, ALI R, ALMUREIKHI M, et al. Phenotypic heterogeneity in Woodhouse-Sakati syndrome: two new families with a mutation in the C2orf37 gene [J]. Am J Med Genet, 2011, 155A(11): 2647-2653.
- [10] STEINDL K, ALAZAMI A M, BHATIA K P, et al. A novel C2orf37 mutation causes the first Italian cases of Woodhouse Sakati syndrome [J]. Clin Genet, 2010, 78(6): 594-597.
- [11] AI-AWADI S A, FARAG T I, TEEBI A S, et al. Primary hypogonadism and partial alopecia in three sibs with Mullerian hypoplasia in the affected females [J]. Am J Med Genet, 1985, 22(3): 619-622.
- [12] 游秀容. 大黄鱼原始生殖细胞发生、迁移及性腺性别分化的组织学研究 [D]. 厦门:集美大学, 2012.
- [13] PETROSKI M D, DESHAIES R J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(1): 9-20. DOI:10.1038/nm1547.
- [14] JIN J, ARIAS E E, CHEN J, et al. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1 [J]. Mol Cell, 2006, 23(5): 709-721.
- [15] LEE J, ZHOU P. DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase [J]. Mol Cell, 2007, 26(6): 775-780.
- [16] LI T, CHEN X, GARbutt K C, et al. Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase [J]. Cell, 2006, 124(1): 105-117. DOI:10.1016/j.cell.2005.10.033.
- [17] YIN Y, LIN C, KIM S T, et al. The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis [J]. Developmental Biology, 2011, 356(1): 51-62. DOI:10.1016/j.ydbio.2011.05.661. Epub 2011 May 23.
- [18] SUGASAWA K, OKUDA Y, SAIJO M, et al. UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex [J]. Cell, 2005, 121(3): 387-400.
- [19] GROISMAN R, POLANOWSA J, KURAOKA I, et al. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage [J]. Cell, 2003, 113(3): 357-367.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马英)