



脊尾白虾uhrf1基因在卵巢发育中的功能研究

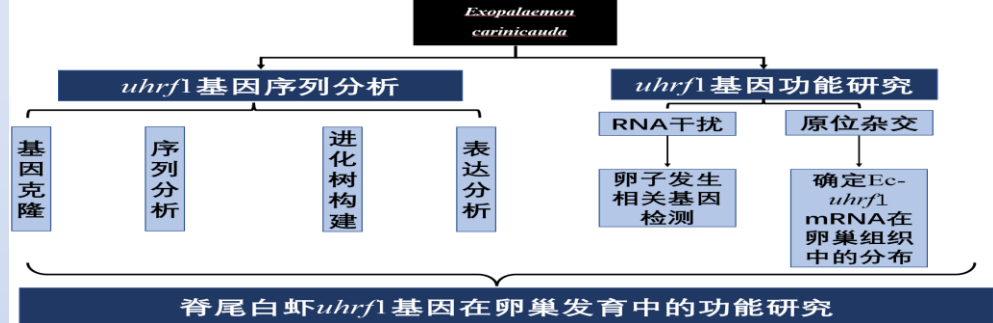
花松松^{1a,b}、史婷婷^{1a,b}、刘雪^{1a,b}、谢姝敏^{1a,b}、阎斌伦^{1,2,3}、高焕^{1,2,3}

- 1.江苏海洋大学a.海洋科学与水产学院; b.江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 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

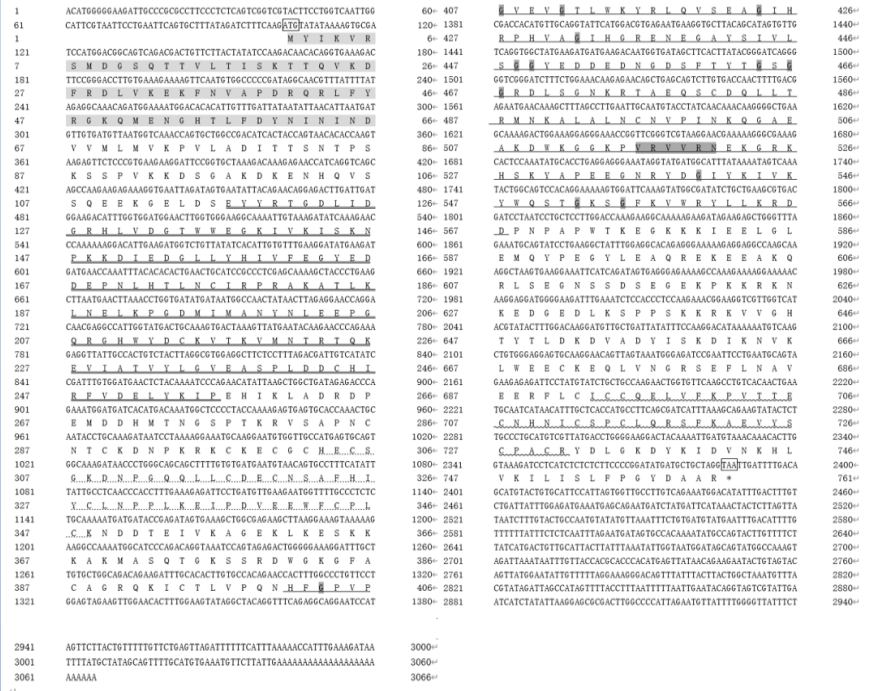
脊尾白虾具有很高的繁殖能力，一年可繁殖多达3-4代的虾类，为探讨影响脊尾白虾性腺发育的遗传因子，本研究在克隆脊尾白虾uhrf1基因（Ec-uhrf1）基础上，对其在卵巢发育中的功能进行了探索。脊尾白虾uhrf1基因开放阅读框2286bp,共编码761aa，拥有UBL，TTD，PHD，SRA，RING finger等多个基因组甲基化、组蛋白识别、染色质修饰相关结构域。通过系统进化分析，Ec-Uhrf1氨基酸序列与凡纳滨对虾(*Litopenaeus Vannamei*)Uhrf1相似性最高，与同为甲壳纲凡纳滨对虾和斑节对虾（*Penaeus monodon*）聚为一支。荧光定量PCR结果显示，uhrf1在脊尾白虾卵巢组织中的表达量最高，且显著高于其他组织(P<0.05)。另外，其在卵巢发育I-IV期逐渐上升，在IV期表达量最高且显著高于其他时期 (P<0.05)。RNAi结果显示，敲降uhrf1基因的表达，可显著降低细胞增殖相关基因*pcna*和DNA甲基化相关基因*dnmt1*表达的表达，说明uhrf1对*pcna*和*dnmt1*的表达具有调控作用。原位杂交结果表明，uhrf1基因在卵母细胞增殖，及外源性营养物质积累中具有重要作用。通过构建的uhrf1原核表达载体在大肠杆菌中成功表达了Uhrf1融合蛋白。本研究结果表明，uhrf1在脊尾白虾卵巢细胞增殖以及外源性营养物质累积上扮演着重要角色。

技术流程

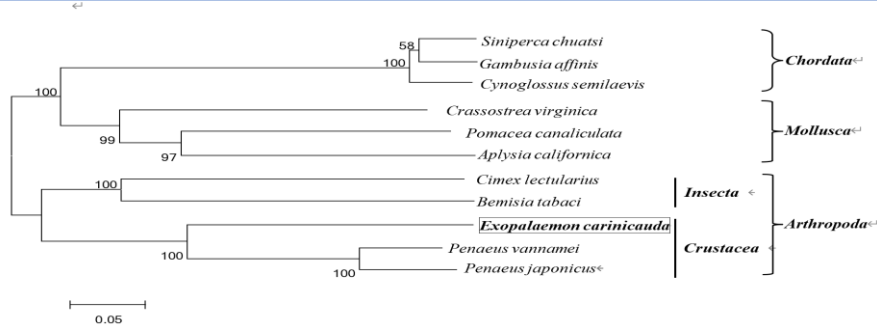


实验结果

(1) Ec-uhrf1基因全长cDNA克隆及进化树分析



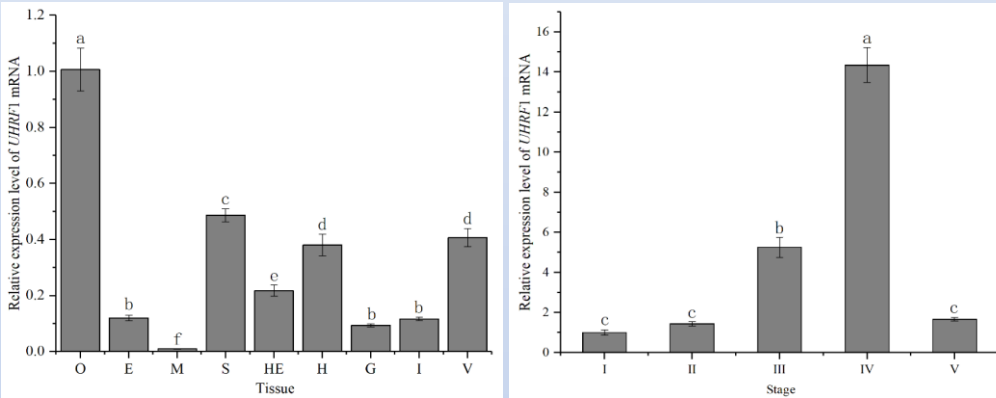
脊尾白虾uhrf1基因cDNA全长3066bp，开放阅读框2286bp，5’端非编码区102bp，3’端非编码区678bp，共编码761个氨基酸(图1)。通过软件DNA Star推测出脊尾白虾uhrf1基因蛋白质分子量为86.44kDa，理论等电点为8.17。通过对其蛋白质结构分析，拥有UBL,TTD,PHD,SRA,RING finger结构域，分别在1-74 aa,117-257 aa,302-349 aa,401-567 aa,692-731aa处。



构建了Ec-Uhrf1系统进化树，进化树结果显示，脊尾白虾uhrf1基因与同为甲壳纲的凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)和斑节对虾(*Penaeus japonicus*)同源性最高，先聚为一支，然后与昆虫纲聚为一支，最后与脊索动物和软体动物聚为一支(图2)。这也与传统分类学的结果相一致。

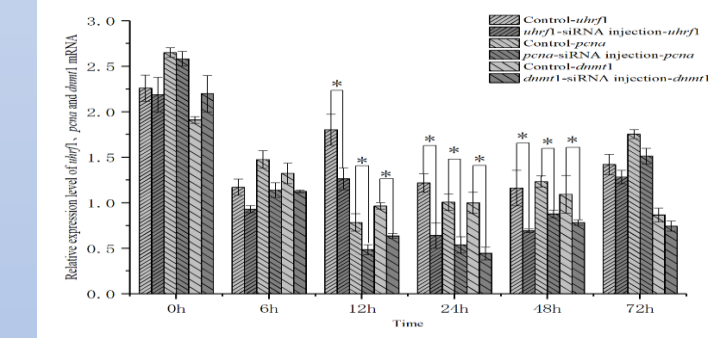
实验结果

(2) Ec-uhrf1表达分析



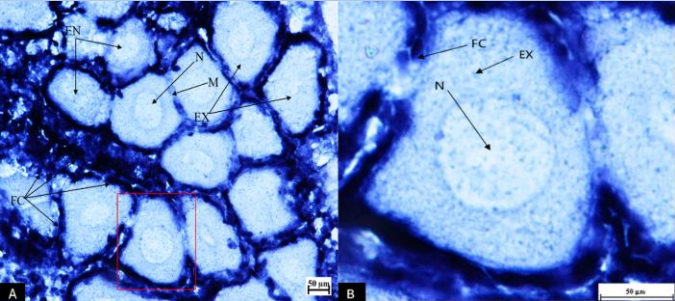
Ec-uhrf1基因在脊尾白虾性腺、眼柄、肌肉、胃、肝胰腺、心脏、鳃、肠道以及腹索神经9个组织中具有表达，其中在性腺中的表达显著高于其他组织。在卵巢发育的 I - V 期中，I - IV 期表达量逐渐升高，V 期表达量骤降。

(3) RNA干扰



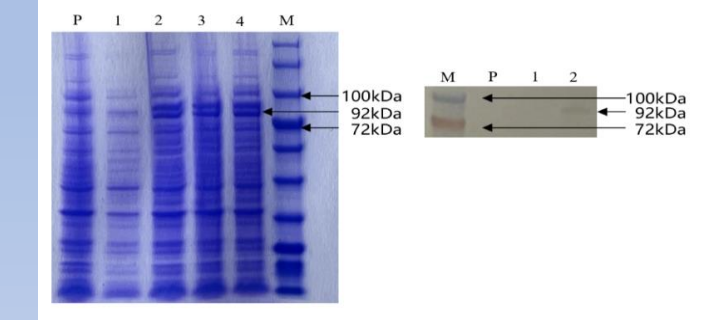
RNA结果显示，敲降uhrf1基因的表达，可显著降低细胞增殖相关基因*pcna*和DNA甲基化相关基因*dnmt1*表达的表达

(4) 原位杂交



原位杂交结果显示，uhrf1基因在滤泡细胞中的信号最为强烈。在外源性卵黄合成期卵母细胞及内源性卵黄合成器卵母细胞中信号较弱。

(5) 原核表达



结论

脊尾白虾uhrf1基因cDNA全长3066bp，开放阅读框2286bp，共编码761个氨基酸。其在个组织中均有表达，在卵巢中的表达最高，在卵巢 I - IV 期表达量逐渐升高。RNAi及原位杂交实验结果表明，uhrf1脊尾白虾卵巢细胞增殖以及外源性营养物质累积上扮演着重要角色