

尚秋萍,黄林,胡雨薇,等. 牦牛和犏牛睾丸中泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36* 表达水平的比较[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):19-21.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.006

牦牛和犏牛睾丸中泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36* 表达水平的比较

尚秋萍,黄林,胡雨薇,雷杰雯,金素钰,郑玉才

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都 610041)

摘要:为探讨蛋白质泛素化与牦牛杂交后代睾丸精子发生异常的相关性,比较了参与泛素化的 2 种酶基因(泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36*) 在成年牦牛和雄性不育犏牛睾丸中的 mRNA 水平。定量 PCR 分析显示,牦牛($n=9$)睾丸中 *Ube2n*、*Trim36* 基因的 mRNA 水平分别显著、极显著高于犏牛($n=7$),其中 *Trim36* mRNA 水平相差 10 倍以上。研究结果提示,犏牛睾丸蛋白质泛素化水平明显下降,可能会影响精子发生过程中正常的蛋白质更新。

关键词:牦牛;杂交雄性不育;睾丸;蛋白质降解;泛素化

中图分类号:S823.82;Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0019-03

牦牛(*Bos grunniens*)主要分布在中国,数量 3 000 万头以上,是青藏高原特有的牛种和畜牧业主体。牦牛与普通牛(*Bos taurus*)的杂交后代称为犏牛,具有明显的杂种优势,产乳和产肉量显著提高,但表现为回交三代内雄性不育,无法产生正常精子^[1],而雌性杂交后代生殖正常,其分子机制尚未明确。

已有研究表明,犏牛睾丸中很多生殖相关基因的 mRNA 或蛋白质水平均显著低于其亲本牦牛和黄牛,如 *SYCP3*、*Boule*、*Dazl*、*Dmrt7*、*Dmcl* 等^[2-5]。也存在少量蛋白质在犏牛

睾丸中上调的情况^[6]。也有研究表明,犏牛睾丸中细胞凋亡增加^[7]。尽管目前犏牛雄性不育的分子机制尚不明确,但总体认为,犏牛雄性不育的机制可能涉及精子发生过程中复杂的基因调控网络,并与睾丸中多种特异或非特异蛋白质的异常表达有关。然而,这些变化是否影响睾丸中蛋白质降解尚不明确。鉴于蛋白质泛素化在蛋白质降解中的重要作用,本研究比较牦牛与犏牛睾丸中与泛素化相关的泛素结合酶(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, *Ube2n*)、泛素连接酶(E3 ubiquitin-protein ligase *TRIM36*, *Trim36*) 基因的 mRNA 水平,以探讨泛素化与犏牛雄性不育是否具有相关性。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

麦洼牦牛(*Bos grunniens*)和犏牛(公黄牛与母麦洼牦牛

收稿日期:2015-09-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240053)。

作者简介:尚秋萍(1992—),女,湖南吉首人。E-mail: m18782278962@163.com。

通信作者:郑玉才,博士,教授,主要从事泌乳生物化学、高原家畜生化与分子遗传学研究。E-mail: yucaizheng65@hotmail.com。

[10]崔国艳,汪世平,程红兵,等. 灭钉螺微生物的筛选及功效研究[J]. 中国人兽共患病学报,2015,31(2):109-112.

[11]Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

[12]曾静, 窦岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 133-137.

[13]李琬, 李璐, 李景鹏, 等. 三株田间分离大豆根瘤菌 16S rDNA 基因鉴定及序列比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 725-728.

[14]Hugenholtz P, Huber T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 289-293.

[15]殷婷婷, 薛梦颖, 丁雨燕, 等. 嗜盐细菌 XJ12 的分子鉴定与生长特性研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 368-370.

[16]Sridhar S, Lam F, Blleloh G E, et al. Direct maximum parsimony phylogeny reconstruction from genotype data [J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8(1): 472-486.

[17]Foulds L R, Graham R L. The Steiner problem in phylogeny is NP-complete[J]. Advances in Applied Mathematics, 1982, 3(1): 43-49.

[18]张丽娜, 荣昌鹤, 何远, 等. 常用系统发育树构建算法和软件鸟瞰[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 640-650.

[19]郭青云, 郭道义, 李永东, 等. 几种杀螺细菌的筛选与功效研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 31-34.

[20]Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review[J]. Toxins, 2013, 5(6): 1119-1139.

[21]Reis A L S, Montanhini M, Bittencourt J V M, et al. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(4): 1195-1198.

[22]Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, et al. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus* [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(4): 893-899.

的杂交 F₁ 代)的睾丸组织于秋季采自四川省成都市近郊某屠宰场。健康的成年公牦牛(*n* = 9)和雄性不育公犏牛(*n* = 7)在屠宰后立刻取其睾丸,切成适当大小后,与干冰一同带回实验室,于 -80 ℃ 下保存备用。本研究对牦牛和犏牛睾丸均进行常规组织切片分析,证实犏牛睾丸中无精子。

1.2 主要试剂和仪器

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 Thermo Scientific 公司, Trizol Reagent 购自美国 Ambion 公司, QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自德国 QIAGEN 公司, Super Taq DNA Polymerase 购自美国 GeneCopoeia 公司。

C1000 Thermal Cycler 型梯度 PCR 仪、C1000 Touch Thermal Cycler 型荧光定量 PCR 仪、Versa Doc 1000 型凝胶成像系统均为美国 Bio - Rad 公司产品, CR21G 型高速冷冻离

心机为日本日立公司产品。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

采用 Trizol 法并按照试剂盒说明书提取牦牛睾丸的总 RNA,采用核酸蛋白检测仪测定核酸浓度。采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 以 2 μg 总 RNA 为模板,利用随机引物进行反转录获得 cDNA。

1.4 睾丸组织 *Ube2n* 和 *Trim36* 基因的定量 PCR 分析

参照普通牛的 *Ube2n* (NM_001076258)、*Trim36* (XM_005890859)、内参基因 *GAPDH* (NM_001034034)、18S RNA (NR_036642)序列,采用 Primer Premier 5.0 软件分别设计定量 PCR 引物(表 1)。分别对上述 4 个基因进行 PCR 扩增,产物纯化后经 10 倍梯度稀释作为模板,进行荧光定量 PCR 扩增。利用定量 PCR 仪上的软件绘制标准曲线。

表 1 引物序列

目的基因	引物(5'→3')	产物长度(bp)
<i>Ube2n</i>	F:CCTTAGAGGGCATCAGATCCTCAG;R:AAGGTTCCAACCCACAGGTTAACA	240
<i>Trim36</i>	F:TCTATGGCTCATTGGTAATAAGTAT;R:AAACCACCCAAGAAAGAGTATCT	185
<i>GAPDH</i>	F:CGACTTCAACAGCGACACTCA;R:GGTCCAGGGACCTTACTCCTT	169
18S RNA	F:CTGAGAAACGGCTACCACATC;R:CAGACTTGCCCTCCAATGG	168

以反转录的牦牛和犏牛睾丸组织 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *Ube2n*、*Trim36* 基因在睾丸中的相对表达量。25 μL PCR 体系为:2 × QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL、上游及下游引物各 1 μL、模板 cDNA 1 μL、RNase - free water 9.5 μL。PCR 程序为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 15 s,64 ℃ 退火 15 s(*Ube2n*)或 54 ℃ 退火 20 s(*Trim36*),72 ℃ 延伸 15 s,共 40 个循环。于 65 ~95 ℃ 下制作溶解曲线。

1.5 数据统计

采用 2^{-ΔΔC_T} 法计算目的基因在睾丸中的 mRNA 水平。采用双内参 *GAPDH* 和 18S RNA 的几何平均数进行标准化,以牦牛睾丸的表达量为对照。试验数据以“平均值 ± 标准误”

表示,采用 SPSS 18.0 软件对荧光定量数据进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 *Ube2n* 和 *Trim36* 基因表达的荧光定量 PCR 分析方法

本研究提取的睾丸 RNA 质量经核酸蛋白检测仪和琼脂糖凝胶电泳系统的检测分析,浓度和质量均符合要求。本试验建立了牦牛 *Ube2n* 和 *Trim36* 基因 mRNA 的定量 PCR 检测方法,采用双内参基因进行标准化。目的基因和内参基因扩增的特异性高(图 1),扩增效率为 98.6% ~ 103.8%,标准曲线线性关系较好(*R*² 约为 0.99),符合所用仪器的定量及相应算法要求。

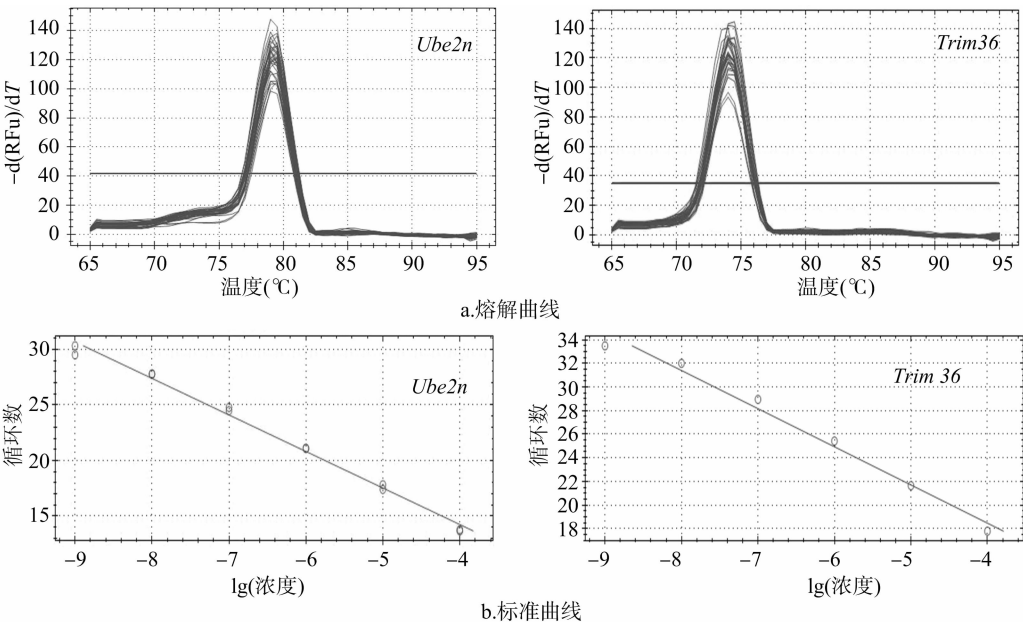
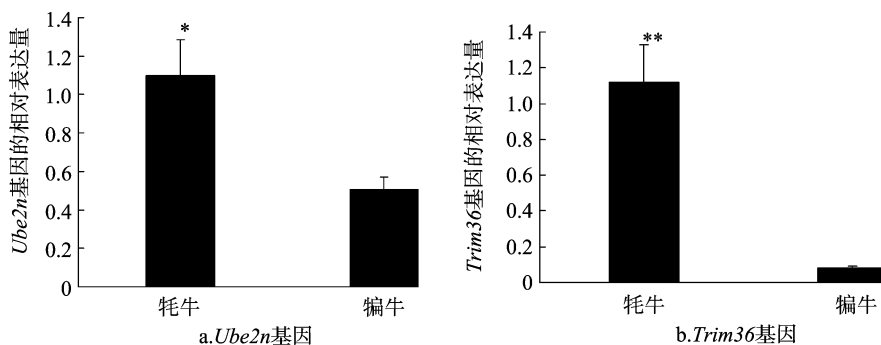


图1 *Ube2n*、*Trim36*基因的融解曲线和标准曲线

2.2 牦牛和犏牛睾丸组织 *Ube2n*、*Trim36* 基因 mRNA 水平的比较

对成年牦牛和雄性不育犏牛睾丸中 *Ube2n*、*Trim36* 基因 mRNA 水平的定量 PCR 检测显示,犏牛睾丸中 *Ube2n*、*Trim36*



“*” “***” 分别表示在 0.05、0.01 水平下差异显著

图2 牦牛和犏牛睾丸中 *Ube2n*、*Trim36* 基因的 mRNA 相对水平

3 结论与讨论

蛋白质的泛素化是其在细胞中降解的关键,在调节各种细胞生物学过程(细胞周期、DNA 损伤的修复、信号转导等)中发挥重要作用,涉及 3 种酶的参与以及多种修饰模式^[8-9]。本研究在 mRNA 水平证实,2 种参与泛素化的酶基因(*Ube2n*、*Trim36*)在犏牛睾丸中的表达均显著下降,提示犏牛睾丸中蛋白质的泛素化降解可能存在异常。牦牛和犏牛睾丸中 *Ube2n*、*Trim36* 基因 mRNA 的变化趋势与其蛋白质水平的变化趋势相同^[6](部分为待发表资料),进一步验证了参与泛素化的 2 种酶在犏牛睾丸中表达异常。

犏牛的杂种优势具有重要的应用价值,但其雄性不育在很大程度上制约了犏牛的高效利用。犏牛睾丸组织中无精子^[7],精子发生受阻很可能与减数分裂异常有关。犏牛睾丸中很多与生殖相关的基因表达下调^[2-7],但与其雄性不育的因果关系尚未明确。犏牛睾丸组织泛素化水平降低与其精子发生异常是否存在关联,需要进一步研究证实。笔者推测,由于犏牛睾丸中多数蛋白质的表达水平可能下降^[2-7],其泛素化水平的降低很可能是适应蛋白质水平改变的结果。*Ube2n* 和 *Trim36* mRNA 水平在犏牛睾丸中的显著下降或许不是犏牛雄性不育的关键原因,但其机制可能涉及睾丸精子发生过程中复杂的网络调控。精子发生过程中减数分裂异常的原因很多,如生殖隔离中减数分裂前期 DNA 双链断裂(DSB)不能修复、染色体联会或重组异常等^[10]。这种 DNA 的修复或许直接导致蛋白质泛素化修饰相关酶的改变,已有研究表明,参与 DNA 双链断裂修复的蛋白质或 DNA 损伤可通过一些机制影响其他蛋白质的泛素化^[11-12]。雄性不育犏牛睾丸组织 *Ube2n* 和 *Trim36* mRNA 水平显著下降,是其精子发生异常所涉及的基因网络调控的一部分。

参考文献:

[1] 张旭静. 牦牛和普通牛种间杂种公牛睾丸的组织学观测与研究

基因的 mRNA 水平分别显著、极显著低于牦牛,其中 *Ube2n* mRNA 水平相差约 2 倍,而 *Trim36* mRNA 水平相差 10 倍以上(图 2)。

- [J]. 畜牧兽医学报,2001,32(4):314-318.
- [2] 屈旭光,李齐发,刘振山,等. 牦牛、犏牛睾丸组织中 *SYCP3* 基因 mRNA 表达水平研究[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(8):1132-1136.
- [3] 付永,魏雅萍,吴克选,等. Real-time PCR 检测黄牛、牦牛、犏牛睾丸组织中 *Boule*、*Dazl* 基因 mRNA 表达[J]. 生物技术通报,2012(10):150-155.
- [4] 金帅,郭宪,包鹏甲,等. 牦牛和犏牛 *Dmrt7* 基因序列分析及其在睾丸组织中的表达水平[J]. 中国农业科学,2013,46(5):1036-1043.
- [5] 李贤,李齐发,赵兴波,等. 牦牛和犏牛 *Dmrt1* 基因序列分析及睾丸组织转录水平研究[J]. 中国农业科学,2010,43(15):3221-3229.
- [6] 付伟,李彩霞,刘文静,等. 利用双向电泳-质谱技术鉴定牦牛和犏牛睾丸中的差异表达蛋白质[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2014,40(1):11-15.
- [7] Lou Y N, Liu W J, Wang C L, et al. Histological evaluation and *Prdm9* expression level in the testis of sterile male cattle-yaks[J]. *Livestock Science*,2014,160:208-213.
- [8] Komander D, Rape M. The ubiquitin code[J]. *Annual Review of Biochemistry*,2012,81:203-229.
- [9] 何玲,张令强. 线性泛素化修饰研究进展[J]. 遗传,2015,37(9):911-917.
- [10] Li X C, Barringer B C, Barbash D A. The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility[J]. *Heredity*,2009,102(1):24-30.
- [11] Shang Z F, Tan W, Liu X D, et al. DNA-PKcs negatively regulates cyclin B1 protein stability through facilitating its ubiquitination mediated by Cdh1-APC/C pathway[J]. *International Journal of Biological Sciences*,2015,11(9):1026-1035.
- [12] Jiang Z H, Dong X W, Shen Y C, et al. DNA damage regulates ARID1A stability via SCF ubiquitin ligase in gastric cancer cells[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2015,19(17):3194-3200.