



## 半滑舌鲷 *Cs-UBE2D4* 基因的克隆、表达模式及启动子活性

程 鹏<sup>1,2,3</sup>, 陈张帆<sup>2,3</sup>, 徐文腾<sup>2,3</sup>, 王 娜<sup>2,3</sup>, 杨 倩<sup>1,2,3</sup>,  
巩志宏<sup>2,3,4</sup>, 崔忠凯<sup>2,3</sup>, 胡元日<sup>1,2,3</sup>, 陈松林<sup>2,3\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071;

4. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 泛素-蛋白酶体系统作为重要的蛋白质修饰途径, 参与多个生物学过程, 其中泛素结合酶 E2 作为关键酶可以决定泛素化对靶蛋白的影响。为了探究泛素结合酶 E2 在半滑舌鲷雌性性腺发育中的作用, 本研究克隆了半滑舌鲷 *Cs-UBE2D4* 基因的开放阅读框 ORF, 检测了该基因在不同组织和不同发育阶段性腺中的表达模式; 构建了其启动子报告基因载体 (pGL3-*Cs-UBE2D4*) 并进行了启动子活性分析。*Cs-UBE2D4* 开放阅读框为 360 bp, 编码 119 个氨基酸, 含有保守的泛素结合酶 E2 结构域。荧光定量 PCR 结果显示, *Cs-UBE2D4* 在雌鱼各组织中广泛表达, 其中在卵巢和肝脏中表达量较高, 而在雄鱼中几乎检测不到表达; 在卵巢各发育阶段中, 该基因的表达量从 90 日龄开始上调, 6 月龄达到峰值, 之后开始下调, 在 1.5 龄时表达量最低, 在 3 龄时表达量有所回升, 其中 6 月龄表达量为 90 日龄表达量的 1.97 倍。双荧光素酶活性检测结果显示, *Cs-UBE2D4* 启动子具有较强的转录活性。本实验将为进一步开展 *Cs-UBE2D4* 基因对半滑舌鲷卵巢发育和性别调控相关机制的研究提供理论依据。

**关键词:** 半滑舌鲷; 泛素-蛋白酶体系统; 卵巢发育; *UBE2D4* 基因

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

泛素-蛋白酶体系统/泛素-蛋白酶体通路 (ubiquitin-proteasome system/ubiquitin-proteasome pathway) 是一种高度保守的蛋白质修饰调控途径, 细胞内有 80% 以上蛋白质的降解依赖于此途径<sup>[1-2]</sup>。泛素化过程是通过逐步酶促级联反应, 使泛素与特定靶蛋白共价结合完成的: 泛素通过泛素激活酶 E1 (ubiquitin-activating enzyme, E1) 激活, 活化

的泛素转移到泛素结合酶 E2 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 上形成中间体, 之后 E2 与泛素蛋白连接酶 E3 (ubiquitin ligase, E3) 相互作用, 将泛素中间体转移到靶蛋白上, 并根据蛋白质底物上氮素修饰类型进行选择标记或者降解蛋白质<sup>[3-4]</sup>。越来越多的研究表明, 该系统可以调节多种生物学过程, 如转录调控、胚胎干细胞分化、组织器

收稿日期: 2021-12-17 修回日期: 2022-01-11

资助项目: 国家自然科学基金 (31730099); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2020TD20); 泰山学者攀登计划项目

第一作者: 程鹏 (照片), 从事鱼类生物技术研究, E-mail: 936310648@qq.com

通信作者: 陈松林, 从事鱼类基因资源发掘和抗病分子育种研究, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn



官发育、激素反应等<sup>[5-8]</sup>。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 属硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲽形目 (Pleuronectiformes) 舌鳎科 (Cynoglossidae) 舌鳎属 (*Cynoglossus*)，主要分布在我国黄渤海区域，是我国近海重要的名贵经济品种之一<sup>[9]</sup>。半滑舌鳎雌雄个体差异较大，雌性成鱼个体体长为雄性个体的 2~4 倍，雌性成熟个体体质量可达雄性个体的 2~3 倍<sup>[10-12]</sup>。由于半滑舌鳎养殖周期长，雄性个体生长缓慢，这种现象严重影响了经济效益，制约了半滑舌鳎养殖业的可持续发展<sup>[13]</sup>。因此，开展半滑舌鳎不同性别之间生长差异相关分子过程的研究，探究其性别分化的机制，综合基因组、表型组等数据，进行基因组育种，以此提高养殖群体雌性比例，辅助种质优化升级，为该领域重要的研究课题<sup>[14]</sup>。

鱼类中由于性别导致的生长异形现象较为常见，其性别的形成又涉及多方面的影响因素，如遗传、环境、胚胎发育和性腺分化等<sup>[15-16]</sup>。泛素-蛋白酶体系统中多种因子对于配子发生、类固醇激素受体功能调节和细胞分化等生命活动产生调控作用<sup>[17]</sup>。泛素结合酶 E2 作为泛素-蛋白酶体系统的重要组成部分，通过控制泛素链的转换、调控合成链的持续性以及建立组装链的拓扑结构，从而决定泛素化对修饰蛋白的影响<sup>[18-19]</sup>。有研究表明，泛素结合酶 E2 在小鼠 (*Mus musculus*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 等物种的配子发生和性腺发育过程等方面都有重要的调控作用<sup>[19-21]</sup>。Hu 等<sup>[22]</sup> 对半滑舌鳎的研究表明，*Ubc9* 基因作为一种 E2 结合酶，参与了胚胎发生和性别修饰。Xu 等<sup>[23]</sup> 通过比较半滑舌鳎性别分化关键时期的性腺转录组数据，发现 *UBE2D4* (ubiquitin-conjugating enzyme E2 D4) 基因为显著性差异基因，这预示 *UBE2D4* 基因可能与半滑舌鳎性别分化有关。本研究将聚焦半滑舌鳎 *UBE2D4* (*Cs-UBE2D4*) 基因，通过克隆获得 *Cs-UBE2D4* 基因的 ORF，对序列特征进行生物信息学预测分析，并检测该基因在雌雄成鱼中的不同组织和不同发育时期性腺中的表达模式，以及启动子的转录活性对基因转录的影响，以此来探究该基因与卵巢发育的关系，为半滑舌鳎的性别分化等相关机制的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本研究所使用的半滑舌鳎分别取自山东省黄

海水产有限公司和河北省唐山市维卓水产有限公司。半滑舌鳎个体经麻醉后 (使用 MS-222 用海水稀释至 20 mg/L)，通过解剖分别取雌雄鱼不同发育时期的性腺，包括 90 日龄、6 月龄和 1.5 龄，每个时期的雌雄个体各取 6 尾。另取 3 龄成鱼个体的组织，收集脑、性腺、肝脏、脾脏、心脏、肾脏、肠道和肌肉共 8 个组织，每种组织雌雄个体各取 3 尾。取样后迅速放入 RNA 保存液中，置于 -80 °C 冰箱保存，用于 RNA 提取。另采集所有实验鱼的鳍条，放入无水乙醇中，置于 -20 °C 保存，用于遗传性别鉴定。实验过程中操作人员严格遵守实验动物相关伦理规范。

### 1.2 遗传性别鉴定

使用碱裂解法<sup>[13]</sup>提取各实验鱼的基因组 DNA 后，采用刘洋等<sup>[24]</sup>开发的半滑舌鳎性别特异性引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 15  $\mu$ L: 2 $\times$  Rapid *Taq* Mix (Vazyme, 中国) 7.5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 模板 DNA (浓度 50 ng/ $\mu$ L) 3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3.5  $\mu$ L。PCR 扩增程序: 95 °C, 10 min; 95 °C 30 s; 57 °C 30 s, 72 °C, 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。使用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，扩增出单一条带 (169 bp) 的为雄鱼，扩增出两条条带 (134 和 169 bp) 的为雌鱼。

### 1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 Trizol 法 (Invitrogen, 美国) 提取各样品的总 RNA，用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，使用超微量分光光度计 P100 (Pultron, 美国) 检测 RNA 的浓度及纯度。对符合要求的 RNA 使用反转录试剂盒 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 去除痕量基因组 DNA，并合成 cDNA。

### 1.4 *Cs-UBE2D4* 基因核心片段序列克隆

基于半滑舌鳎全基因组序列<sup>[25]</sup>和转录组数据<sup>[23]</sup>获得 *Cs-UBE2D4* 基因部分序列，使用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1)，以半滑舌鳎雌雄鱼性腺混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 25  $\mu$ L: Ex *Taq* Mix (TaKaRa, 日本) 12.5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L; 反应程序: 95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 38 个循环; 72 °C, 10 min。采用凝胶回收试剂盒 (诺唯赞, 中国) 对 PCR 产物进行纯化，连接到 pEASY-T1 载体，转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中，挑取阳性克隆送至北京睿博兴科

表 1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

名称 primer	用途 application	序列 sequence
Cs-sex-F	遗传性别鉴定	CCTAAATGATGGATGTAGATTCTGTC
Cs-sex-R	遗传性别鉴定	GATCCAGAGAAAATAAACCCAGG
Cs-UBE2D4-F	基因克隆	ATGGCGTTGAAAAGAATACAGAAGG
Cs-UBE2D4-R	基因克隆	GGGGGGGATCATTAAAGATTAGAGA
Cs-UBE2D4-RT-F	qPCR	GCGACGACAAAAGCCGAA
Cs-UBE2D4-RT-R	qPCR	TTCAACGCCATTGCCTCG
$\beta$ -actin-F	内参基因	GCTGTGCTGTCCCTGTA
$\beta$ -actin-R	内参基因	GAGTAGCCACGCTCTGTC
Cs-UBE2D4-P-F	启动子区克隆	AGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTCAAACCTAGCCTTACAATA
Cs-UBE2D4-P-R	启动子区克隆	CAACAGTACCGAATGCCAAGCTCATCACTGCTCCGCTGTGT

生物技术有限公司(青岛)测序。

### 1.5 *Cs-UBE2D4* 基因序列分析

采用 DNASTar V7.1.0 软件、在线工具 SMART ([http://smart.embl.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)) 和 NetPhos - 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 分析预测半滑舌鲷 *Cs-UBE2D4* 基因的开放阅读框(ORF)、氨基酸序列、蛋白分子质量(Mw)、蛋白质结构域和磷酸化位点等生物信息学特性;使用 BLASTP ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) 和 DNAMAN (V6.0.3.99) 进行多序列比对;用 MEGA X 软件中的邻接法(NJ)构建系统进化树。使用在线工具 PROMO 预测启动子区的转录因子 ([http://algen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3))。本研究中使用的氨基酸序列 GenBank 注册号见表 2。

### 1.6 *Cs-UBE2D4* 表达模式检测

通过实时荧光定量 PCR(qPCR) 检测 *Cs-UBE2D4* 基因在半滑舌鲷不同组织及不同发育时期性腺中的表达水平。各组织设置 3 个生物学重复, 各发育时期设置 6 个生物学重复(3 龄鱼性腺是 3 个生物学重复), 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 引物根据 *Cs-UBE2D4* 基因编码区序列设计(表 1)。反应使用 ABI 7500 Fast Real-time (Applied Biosystems, 美国) 仪器进行定量分析, 反应体系参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 日本) 说明书, 反应程序设置: 95 °C, 30 s; 95 °C, 3 s, 60 °C, 33 s, 40 个循环; 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s; 95 °C, 15 s。

本实验所得数据采取  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[26]</sup> 进行分析, 计算 *Cs-UBE2D4* 基因的相对表达量, 并采用 SPSS 25.0 软件进行方差分析, 设定  $P < 0.05$  为显著差异。

### 1.7 半滑舌鲷 pGL3-*Cs-UBE2D4* 质粒构建

根据半滑舌鲷基因组序列, 选取 *Cs-UBE2D4* 基因的转录起始位点上游 2 000~2 500 bp, 并根据该序列设计引物 *Cs-UBE2D4*-P-F/R(表 1)。以半滑舌鲷 3 龄雌鱼基因组 DNA 样品为模板, 用 PCR 方法扩增其启动子区, 扩增片段长度为 2 224 bp。采用 In-Fusion 同源重组技术, 在 *Cs-UBE2D4* 启动子的正、反向引物的 5'端分别添加 *Hind* III 及该酶切位点前后 26 和 20 bp 的载体序列。反应体系为 25  $\mu$ L: Ex Taq Mix (TaKaRa, 日本) 12.5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L; 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 38 个循环; 72 °C 10 min。产物回收方法同“*Cs-UBE2D4* 基因核心片段序列克隆”。使用 Soso 重组克隆试剂盒(擎科, 中国)将启动子片段连接至已通过 *Hind* III 酶切的 pGL3-basic 载体上(命名为 pGL3-*Cs-UBE2D4*), 进行测序鉴定。测序正确后, 菌液扩培, 并使用无内毒素酶质粒小提试剂盒(天根, 中国)提取质粒。重组克隆和质粒提取实验方法均按照该试剂盒说明书指导方法进行。

### 1.8 细胞转染及 *Cs-UBE2D4* 基因启动子区活性检测

使用含 10% 牛胎血清及 bFGF 的 DME/F-12 培养基, 于 37 °C 恒温、5% 二氧化碳的条件下培养人类胚胎肾 (human embryonal kidney, HEK) 293T

表 2 实验所用 UBE2D4 蛋白编号

Tab. 2 Accession numbers of UBE2D4 proteins used in this study

物种 species	编号 accession no.
半滑舌鲷 <i>C. semilaievis</i>	XP_024908518.1
斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	XP_017323313.1
牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	XP_019938366.1
山羊 <i>Capra hircus</i>	XP_005695543.1
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	NP_001082922.1
人 <i>Homo sapiens</i>	XP_024302563.1
小鼠 <i>M. musculus</i>	NP_598538.1
塞内加尔鲷 <i>Cynoglossus senegalensis</i>	XP_043882199.1
非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	XP_018110595.1
荫平鲈 <i>Sebastes umbrosus</i>	XP_037611222.1
湖红点鲑 <i>Salvelinus namaycush</i>	XP_038843429.1
匙吻鲟 <i>Polyodon spathula</i>	XP_041088367.1
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XP_036791773.1
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	XP_018963837.1
大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	XP_035495050.1
鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>	XP_033475898.1
青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	XP_004072543.1

细胞。在转染前 1 天, 细胞转移至 24 孔板中培养, 当细胞覆盖度达到 80%~90% 时进行转染。采用 Lipo8000 转染试剂盒 (碧云天, 中国), 按照说明书建议, 将 pGL3-basic (空质粒)、pGL3-*Cs-UBE2D4* 和 pGL3-control (该质粒包含 SV40 启动子和增强子序列, 具有很强的荧光素酶活性, 作为阳性对照), 按照每孔 500 ng 为标准, 转染至 HEK 293T 细胞, 同时将 pRL-TK 质粒作为内参, 以每孔 40 ng 为标准进行共转染。转染 48 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (碧云天, 中国) 在 Variskan Flash spectral scanning multimode reader 酶标仪 (Thermo, 芬兰) 上检测细胞的萤火虫荧光素酶和海参荧光素酶活性, 每个样本设置 3 个重复。所有数据通过 SPSS 25.0 软件中的 LSD (least-significant difference) 法进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示显著差异。

## 2 结果

### 2.1 半滑舌鲷 *Cs-UBE2D4* 基因序列分析

*Cs-UBE2D4* 基因 ORF 为 360 bp, 编码 119 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量 Mw 为 13.23

<https://www.china-fishery.cn>

ku, pI 为 7.994。SMART 软件预测结果显示, *Cs-UBE2D4* 的氨基酸序列 4~113 aa 区段为典型的泛素结合酶 E2 结构域 (图 1), 在该结构域中含有一个半胱氨酸残基 (Cys<sup>85</sup>) 活化位点, 其糖基化位点位于 N<sup>81</sup>~S<sup>83</sup>, 包含 4 个丝氨酸磷酸化位点 (S<sup>11</sup>、S<sup>22</sup>、S<sup>43</sup> 和 S<sup>91</sup>)、2 个酪氨酸磷酸化位点 (Y<sup>45</sup> 和 Y<sup>60</sup>) 和 4 个苏氨酸磷酸化位点 (T<sup>36</sup>、T<sup>70</sup>、T<sup>71</sup> 和 T<sup>98</sup>)。

```

1  ATGCGGTTGAAAAGAATACAGAAGGAACCTTCAGACCTGCAGAGGGACCCCTGCCAG
1  M A L K R I Q K E L S D L Q R D P P A Q
61  TGTTCTGGACCAAGTTGGGGATGATTTGTTTCATTGGCAGGCCACAATAATGGGTCCG
21  C S A G P V G D D L F H W Q A T I M G P
121  AGTGACAGCCCCTATCAAGGTGGAGTGTTTTTCTTACTATTCACTCCCAACAGATTAT
41  S D S P Y Q G G V F F L T I H F P T D Y
181  CCATTTAAACCACCTAAAATTGCATTACGACAAAGATTTACCACCTAATATCAACAGC
61  P F K P P K I A F T T K I Y H P N I N S
241  AATGGAAGTATTGTCTGGATATACTGAGATCACAAATGGTCCCTGCCCTAACAGATCG
81  N G S I C L D I L R S Q W S P A L T V S
301  AAAGGTAACGTGAAGCAAATAATCTCTATCACGCCTATATTTGAAATCTCTAATCTTAA
101  K G N V K Q I I S I T P I F E I S N L *

```

图 1 半滑舌鲷 *Cs-UBE2D4* 基因 ORF 序列及对应的氨基酸序列

起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAA) 用红字加粗标注; 泛素结合酶 E2 结构域区域用黑色下划线标注; 糖基化位点用字体加粗黄色高亮标注; 保守半胱氨酸残基用□标注。

Fig. 1 ORF and predicted amino acid sequences of *Cs-UBE2D4* gene

Initiation codons (ATG) and termination codons (TAA) are highlighted in bold red; conserved domain is indicated by black underline; glycosylation sites are highlighted in yellow; conserved cysteine residue is labeled with □.

### 2.2 同源性分析及系统进化树分析

同源性分析显示, *Cs-UBE2D4* 蛋白与其硬骨鱼 *UBE2D4* 序列相似性较高 (94.17%~97.03%), 其中与塞内加尔鲷的序列相似度最高 (图 2)。系统进化树的结果显示, 鱼类和小鼠分别聚为两支, 其中半滑舌鲷的 *Cs-UBE2D4* 与荫平鲈、斑点叉尾鲷和牙鲆聚为一支 (图 3)。

### 2.3 *Cs-UBE2D4* 基因在 3 龄成鱼不同组织中的表达水平

qPCR 结果显示, *Cs-UBE2D4* 基因在雄鱼各组织中均未检测到表达, 而在雌鱼各组织中广泛表达 (图 4, 雄鱼结果未显示)。其中, 在雌鱼的卵巢和肝脏中显著高表达 ( $P < 0.05$ ), 脑、肠道和脾脏中表达量次之, 肌肉中表达量最低。

### 2.4 *Cs-UBE2D4* 基因在不同发育时期的表达模式

为了探究 *Cs-UBE2D4* 基因在性腺发育中的

作用, 采用 qPCR 方法分别检测了该基因在雌雄鱼不同发育时期性腺中的表达模式。结果显示, Cs-UBE2D4 基因在雄鱼各发育时期的精巢中均未检出 (图 5, 雄鱼结果未显示); 在雌鱼卵巢中, 表达量从 90 日龄开始上调, 在 6 月龄时达到峰值,

较 90 日龄的表达量显著提高 1.97 倍 ( $P<0.05$ ), 之后, 表达量下降, 1.5 龄时表达量最低, 在 3 龄时表达量有所回升, 但仍显著低于 6 月龄时的表达水平 ( $P<0.05$ )。

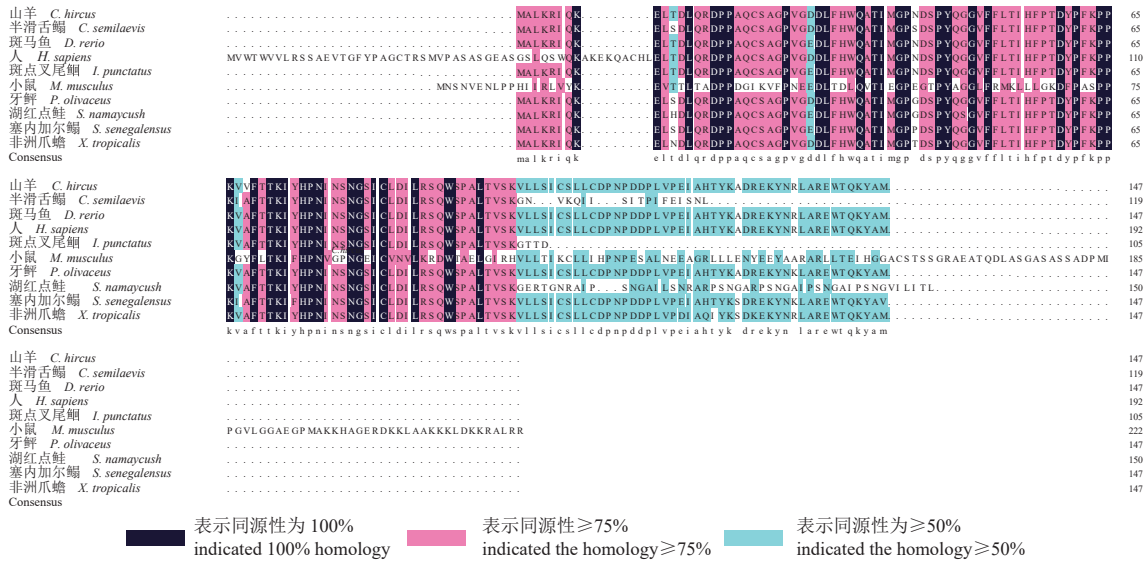


图 2 不同物种 UBE2D4 氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of UBE2D4 amino acid sequences

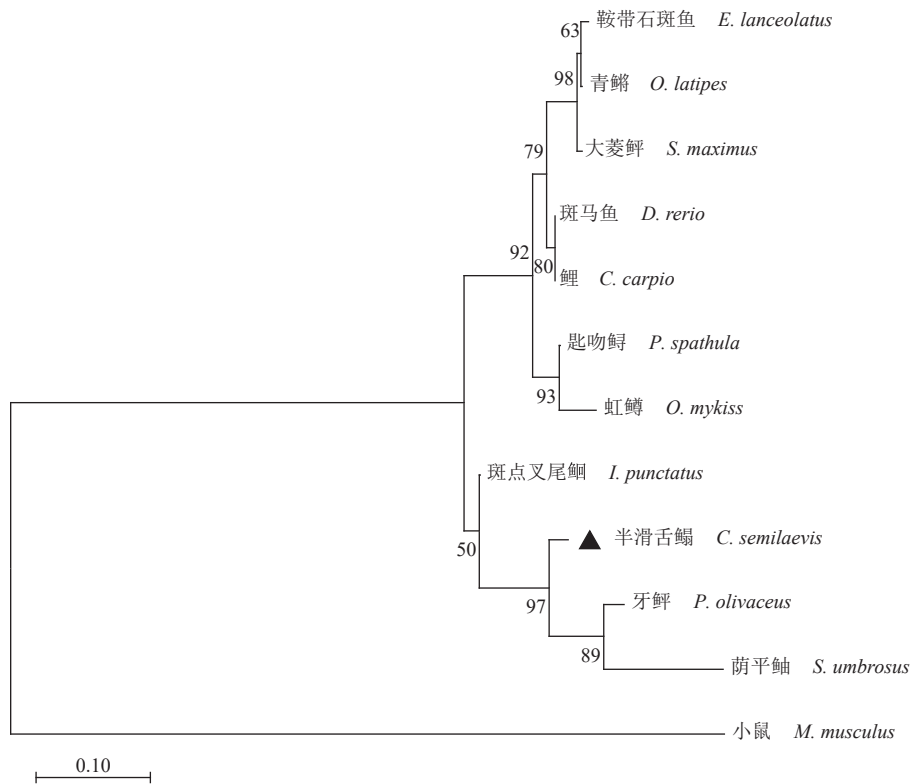


图 3 Cs-UBE2D4 蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of Cs-UBE2D4 protein

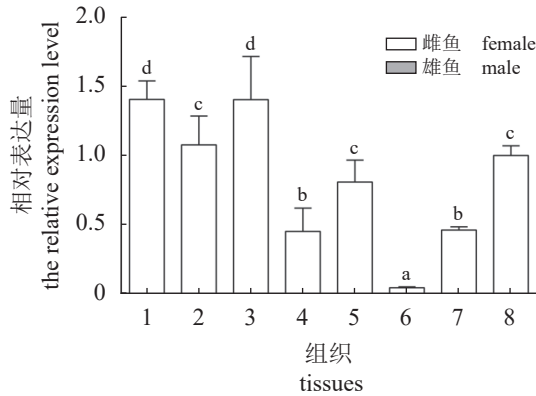


图4 *Cs-UBE2D4* 基因在不同组织中的表达模式

1.性腺, 2.脑, 3.肝脏, 4.心脏, 5.肠道, 6.肌肉, 7.肾脏, 8.脾脏; 不同小写字母表示组间差异显著,  $P < 0.05$ , 下同。

Fig. 4 Relative expression levels of *Cs-UBE2D4* gene in various tissues

1. gonad, 2. brain, 3. liver, 4. heart, 5. intestines, 6. muscle, 7. kidney, 8. spleen, different letters represent significant differences among species,  $P < 0.05$ , the same below.

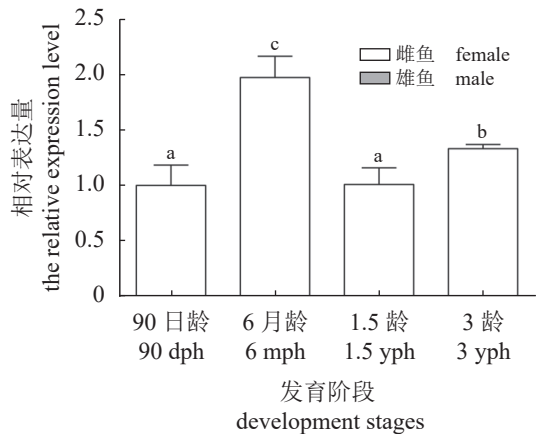


图5 *Cs-UBE2D4* 基因不同发育时期中的表达模式

Fig. 5 Relative expression levels of *Cs-UBE2D4* gene in different development stages

dph. days post-hatching, mph. months post-hatching, yph. years post-hatching.

## 2.5 启动子区序列分析及活性检测

通过对 *Cs-UBE2D4* 基因的启动子区扩增, 得到了 2 224 bp 的启动子区序列。在 293T 细胞转染后, 检测结果显示 pGL3-*Cs-UBE2D4* 的活性显著高于 pGL3-basic 空载体, 为 pGL3-basic 空载活性的 21.02 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。通过 PROMO 对启动子区序列进行预测, 发现启动子区中一些与生长发育及转录调控相关的转录因子位点 (图 7), 包括位于 -2 166/-2 160 的 YY1 (Yin Yang 1); -1 976/-1 970 的 LCR-F1 (locus control region-factor 1);

<https://www.china-fishery.cn>

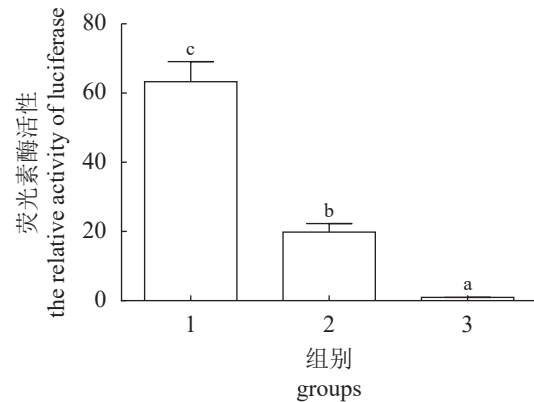


图6 在 293T 细胞中的 *Cs-UBE2D4* 基因启动子活性分析

报告基因活性以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值表示。不同字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。1. pGL3-control, 2. pGL3-*Cs-UBE2D4*, 3. pGL3-basic。

Fig. 6 Promoter activity analysis of *Cs-UBE2D4* gene in 293T cells

Reporter gene activity is expressed as the ratio of firefly luciferase activity to renilla luciferase activity. Different letters represent significant differences,  $P < 0.05$ . 1. pGL3-control, 2. pGL3-*Cs-UBE2D4*, 3. pGL3-basic.

-1 424/-1 416 的 TBP (TATA box binding protein); -1 391/-1 384 的 GR (glucocorticoid receptor); -564/-559 和 -149/-144 的 POU1F1a (pituitary-specific positive transcription factor 1) 等。

## 3 讨论

泛素结合酶 E2 是一种重要的蛋白水解调控蛋白, 该蛋白含有一个保守的泛素结合酶 E2 结构域, 已活化的泛素会与该结构域中保守的半胱氨酸残基结合后进行泛素化<sup>[27]</sup>。本研究通过克隆获得了半滑舌鳎 *Cs-UBE2D4* 基因的 ORF, 通过序列特征的预测分析发现, 该蛋白同样具有一个泛素结合酶 E2 结构域, 且不含信号肽和跨膜结构, 结构域中含有半胱氨酸残基位点和磷酸化位点, 这些蛋白结构特征均与大黄鱼、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 和克氏原螯虾等的 UBE2 蛋白相似。通过氨基酸多序列比对后发现, *Cs-UBE2D4* 氨基酸序列与其他硬骨鱼的 UBE2 氨基酸序列相似度较高 (94.17%~97.03%), 而与小鼠的相似度较低 (56%)。系统进化分析结果显示, 该蛋白与小鼠的分为两支, 与硬骨鱼进化地位较为接近。以上结果说明该蛋白结构在硬骨鱼间较为保守, 并且功能可能较为相似。

卵巢由基本功能单位卵泡组成, 作为雌性生殖系统的主要器官, 对雌性发育、生殖等生命活

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

```

-2 224 TCAAACCTAGCCTTACAATAAAACCTGAAAATAATATATAAACACATATATGTGCCGAAAATGCTGTCTCAAGGAGTCCAACGCCATATGAACAATGAAATATTAATATATTTGTAAT
-2 104 GCCCCTGGCATAGACAGCTCGGACGCTCCGTACTCTTTGGAACCTTATGTAAATAACAGTATGACAGTAGTGTGTGCTTCCGGAGTTCAAATGAACGAATCTTTCACATGAGTGTG
-1 984 GACTCCCGAGTCATATGAAAGATTCGTGACTCATGACTACGGAGTCATATAAATATTTATTCATATTGAACCTCAGCAATCACTCACAATCACTACTGCAAACATCACTACTCTGG
-1 864 AACTAATCACTCACTGCAAAACAACTACTCTCTGCAAACTAATCTTTCTACTGTGAACATACTTTCTACTACGATCTAATTACTCTGCAAACATATCTTTCACACGATCAATTAATCTCTG
-1 744 CAAACTAATCTTTCAGTGAACAACTCTTTCATGCAACGAATCACTGTGAACAACTCTTTTGTCTGAACAACTCTTTCGCTGTGAACGAATCATTCTCTGTGAACAGGGGTGGGC
-1 624 GATACTGGGAATTTTGGTATCGATCCGATACCAAGTAAATACAGGGTAGTATCGCCGATACCGATACGATACCGATACCTTTTGGCTTGGAAATGTATGATCATTGAATAATTGACTCC
-1 504 CCCAGTACTCTTTATAAATATGATAAACACAGCACAATATTTTTTATAAATACTACAATGCAAACTCAACAGTATATAAAAAAATCTTACTACAACAACCTGTTCAGAACAA
-1 384 AAGTCAAGAGAGTCAAAAAGCAGCAATGTAAACGAAAAACAATAAACAATGTCAACATGACAACATAAAATACCTCCATTGCACAATGTTTTGAAAAAAGTCAAGTAGTCAAAATAA
-1 264 AGTGTAAACACAATGGCTCATTCCAGCCTTTGGCTCTCTGCTCCAAGGAAGAAATCCCTTTGGCTCTGTTGCCATAGTGACAACGGATTTCAGGTTTTTGTTCAGGAA CAGTAACAT
-1 144 GACAAAAATGATTAAGATGATTAAGTCTGTAACCTGTAATCTGAAAAATGCACTAAATAGGAATGCTACTTTTCCTTCAACAGTTAACACTAAAGAGTTATTATAGTCAGCAATAATTCATATT
-1 024 TTGGCTGGGGAGAGAGAGAGGGTGGCTATTGGCGAGAGAAAGCGGCTTTGAGGAATGGTGGAGGAGCGAAGTATCGATCCAGGACAATAGTATCGATCCGATCAAGTCAAGTCTGG
-904 CTTAGTATCGATAATATCGATATTTGGATCGATCGCCCACCCTACTGTGAACATACTGTTGCCGTGAACAACTCTTTCGCGTGAACAACTCTTTTGTCTGTAACAACTCTTTTGTCT
-784 GTGAACATAACTACTATGAACGGATCATTCTCTGTGAACATACTTTGCCTCGTCTCGCAGATTGCTTTCATTGTGCACGTGAAAGAGCTCGGGTCTTTTTGTCTCTCATCTTCA
-664 CATTGTGGTGTGTTTTTATTCTTAGCTTTTACATGGTTTTAATTAATCTTATGGCATTGTGTACTTTGTAGACGTTTTCAACGGAAGCAAACCGACACTAAATACTGAAGGCAACATG
-544 CCTTCAGTATTTAGTGTCCGAGAACCGACCTCTTTACAACGCCACATCGTAAAACGAATGAAATGATTAGTTCAGAAATGCTTCATTTACTGTCGAGAAACAAAGATTCAAAATC
-424 AATAAAAAGAGTGGTCTTCCATCACTAATTGACTTATATAGCAACTTATATAACGCCACACTGTTCTCCGCCGAGCTTCACTCTCTCATCTTCACTCCCTCTCACTCCAGACCT
-304 CCAGCCACACCCACAGTCTACCACACTCCACACTCCGGAACTATAACCTTTCAACCCATGAACATAACGATATGACTATTACAATATTACAACACTACTAATGTTGGATTAGA
-184 AACACACTTTTATAAATAAACAATGATCATATAAATGGCTGTTTGTCTACTCTTATTGTATCATTAACCTCAGTTCTATTAGTAGTTTCCAAATGTTCAACTATAAACCCTTCT
-64 TCCATTTTTAAATAGATAAAAAGGTCTCGCGATTTTACTCAACAAACACAGCGGAGCAGTGATG

```

图 7 *Cs-UBE2D4* 基因启动子区序列信息及转录因子结合位点

下划线表示转录因子特异性结合位点, 红色加粗为转录起始位点。

Fig. 7 Sequence information and transcription factor binding site of *Cs-UBE2D4* gene promoter region

The underline indicates transcription factor specific binding sites, and the red bold font indicates transcription initiation sites.

动有重要作用<sup>[28]</sup>。有研究表明, *Ube2s* 基因在小鼠原始卵泡和初级卵泡的卵母细胞中高表达, 之后表达量下调, 通过 PMSG 诱导卵泡发育的实验, 显示 *Ube2s* 基因的表达与其在卵母细胞中的表达规律一致, 进一步验证了 *Ube2s* 的表达可能与卵泡发育有关<sup>[19]</sup>。克氏原螯虾中, *UB-E2* 基因在卵巢中显著高表达, 并且表达量会随着卵巢发育而逐渐升高至产卵后期; 且该基因对 17 $\alpha$ -孕酮刺激的表达响应与卵巢发育过程一致, 从而表明了 *UB-E2* 对卵巢发育有重要作用<sup>[21]</sup>。在半滑舌鳎中, 个体孵化后 50~70 日龄卵巢开始发育, 约 106 日龄可以通过组织学清楚观察到卵巢腔结构, 140~200 日龄卵巢分化完成, 随后卵巢继续发育至 2 龄后进入成熟期, 可进行产卵<sup>[29-30]</sup>。本研究中, *Cs-UBE2D4* 基因只在雌性各组织中表达, 而在雄性各组织中并未检测到表达, 说明 *Cs-UBE2D4* 基因和半滑舌鳎雌性性腺发育有关。Xu 等<sup>[23]</sup> 的研究发现, 该基因在 48、68 和 108 日龄 3 个时间点的表达水平逐渐升高。本研究中, 该基因表达水平从 90 日龄开始上调, 在 6 月龄达到表达量顶峰, 之后下降, 其表达趋势与半滑舌鳎卵巢发育各时期相对应, 表明 *Cs-UBE2D4* 基因可能与卵巢发育有关 (图 5)。6 月龄后该基因表达量下调, 可能是由于该时期后卵巢发育速率相对于发育初期有所降低, 而在 3 龄时又上调, 可能是由于产卵时期卵巢细胞活动等相对活跃导致 (图 5)。组织表达模式结果显示, *Cs-UBE2D4* 基因在性腺和肝脏中显

著高表达 (图 4), 由于肝脏是重要的代谢器官, 故该基因在肝脏中高表达暗示其可能参与蛋白水解过程。有研究者发现, 泛素-蛋白酶通路中的一些成员在神经疾病中会受到影响, 这表明这条通路可能与大脑发育有关<sup>[31]</sup>。通过各组织的定量结果发现, *Cs-UBE2D4* 基因在脑中也高表达, 可能暗示泛素化与神经系统有关联, 将来还需要深入研究。

基因的表达调控过程受多个方面的影响, 其中启动子是重要的顺式作用元件, 参与基因表达调控过程<sup>[32]</sup>。启动子是 RNA 聚合酶识别结合并起始转录的特定 DNA 序列, 可以调控基因表达的程度、部位及模式<sup>[33]</sup>。本研究中 *Cs-UBE2D4* 基因的启动子区活性显著高于空载活性 ( $P < 0.05$ ) (图 6), 表明该启动子对转录的调控作用较强。通过对序列进行生物信息学分析预测, 得出 *Cs-UBE2D4* 基因潜在的转录结合位点 GR (glucocorticoid receptor)、TBP (TATA box binding protein)、LCR-F1 (locus control region-factor 1) 等位点均与正常发育和生长有关, 并且这些位点作为转录因子具有转录调控活性<sup>[34-37]</sup> (图 7)。因此探究这些转录因子对 *Cs-UBE2D4* 基因表达的调控作用将更有助于了解半滑舌鳎泛素化过程。

在鱼类中, 性别决定和分化一直都是困扰研究人员的难题, 其机制复杂且容易受到外界环境的影响, 此外, 性别决定分化机制具有一定的物种特异性。近年来, 泛素化的相关研究越来越多,

但多聚焦于植物中的各种生物学功能, 在动物中研究较少。随着转录组技术的发展, *Cs-UBE2D4* 基因在牛<sup>[38]</sup>、大黄鱼<sup>[20]</sup>和半滑舌鲷<sup>[22-23]</sup>等多个物种的性腺发育数据库中已被鉴定为显著性差异基因, 说明该基因作为泛素网络中的关键元素对卵巢发育有重要作用, 此后还需要深入研究该基因对泛素网络的调控作用, 以探究其对性别决定和分化机制的影响。

综上所述, 本研究通过对 *Cs-UBE2D4* 基因的克隆、序列特征和表达模式分析, 发现 *Cs-UBE2D4* 基因可能参与半滑舌鲷卵巢发育过程, 为深入研究 *Cs-UBE2D4* 基因在半滑舌鲷性别相关机制中的作用奠定了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 韩坤煌, 张子平, 王艺磊, 等. Cyclin-CDK-CKI及UPP参与生殖调控及在甲壳动物性腺发育中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(7): 48-54.  
Han H K, Zhang Z P, Wang Y L, et al. Cyclin-CDK-CKI and UPP participate in the regulation of reproduction and the progression of gonad development in crustacean[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(7): 48-54 (in Chinese).
- [2] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1998, 67: 425-479.
- [3] Tan G B, Qiu M N, Chen L Q, et al. JS-K, a nitric oxide pro-drug, regulates growth and apoptosis through the ubiquitin-proteasome pathway in prostate cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 376.
- [4] Liu W G, Tang X, Qi X H, et al. The ubiquitin conjugating enzyme: an important ubiquitin transfer platform in ubiquitin-proteasome system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2894.
- [5] Bowerman B, Kurz T. Degrade to create: developmental requirements for ubiquitin-mediated proteolysis during early *C. elegans* embryogenesis[J]. *Development*, 2006, 133(5): 773-784.
- [6] Hochstrasser M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(8): E153-E157.
- [7] Naujokat C, Šarić T. Concise review: role and function of the ubiquitin-proteasome system in mammalian stem and progenitor cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(10): 2408-2418.
- [8] Koops P, Pelsers S, Ignatz M, et al. EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(15): 5547-5560.
- [9] 柳学周, 徐永江, 刘乃真, 等. 半滑舌鲷卵巢发育的组织学和形态数量特征研究[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(6): 25-35.  
Liu X Z, Xu Y J, Liu N Z, et al. Study on histological and morphometric characters of gonad development of *Cynoglossus semilaevis* Günther[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(6): 25-35 (in Chinese).
- [10] Sun Y Y, Yu H Y, Zhang Q Q, et al. Molecular characterization and expression pattern of two zona pellucida genes in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 155(3): 316-321.
- [11] 胡元日, 杨倩, 王佳林, 等. 半滑舌鲷Inc-XR\_003049606.1及其靶基因 $pmelb$ 在无眼侧皮肤黑化过程中的表达[J]. *水产学报*, 2022, 46(4): 529-536.  
Hu Y R, Yang Q, Wang J L, et al. Expression analysis of LNC-XR\_003049606-1 and its target gene  $pmelb$  in blind side skin melanization in *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(4): 529-536 (in Chinese).
- [12] Ji X S, Liu H W, Chen S L, et al. Growth differences and dimorphic expression of growth hormone (GH) in female and male *Cynoglossus semilaevis* after male sexual maturation[J]. *Marine Genomics*, 2011, 4(1): 9-16.
- [13] 王佳林, 杨英明, 杨倩, 等. 性类固醇激素雌二醇、睾酮对半滑舌鲷雌、雄、伪雄鱼生长性能的影响[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(4): 27-34.  
Wang J L, Yang Y M, Yang Q, et al. Effects of sex steroid hormones (estradiol and testosterone) on growth traits of female, male and pseudo-male Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(4): 27-34 (in Chinese).
- [14] 陈松林, 徐文腾, 刘洋. 鱼类基因组研究十年回顾与展望[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 1-14.  
Chen S L, Xu W T, Liu Y. Fish genomic research: decade review and prospect[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 1-14 (in Chinese).
- [15] Gemmel N J, Todd E V, Goikoeuxa A, et al. Chapter Three-Natural sex change in fish[J]. *Current Topics in* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries



- Developmental Biology, 2019, 134: 71-117.
- [16] 陶彬彬, 胡炜. 鱼类性别控制育种研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(2): 1-10.  
Tao B B, Hu W. Research progress on sex control breeding of fish[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2022, 24(2): 1-10 (in Chinese).
- [17] Baarends W M, Roest H P, Grootegoed J A. The ubiquitin system in gametogenesis[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1999, 151(1-2): 5-16.
- [18] Ye Y H, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(11): 755-764.
- [19] 吴浩, 于浩楠, 倪华. Ube2s 在小鼠卵泡发育和黄体形成过程中的表达研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(5): 106-111.  
Wu H, Yu H N, Ni H. Expression of Ube2s during follicular development and luteal formation in mice[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2020, 56(5): 106-111 (in Chinese).
- [20] 韩坤煌, 周鹏, 邹志华, 等. 大黄鱼 *Lc-UBE2D4* 基因的克隆及其表达分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 166-173.  
Han K H, Zhou P, Zou Z H, et al. Cloning and expression profiles of *Lc-UBE2D4* gene from large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(11): 166-173 (in Chinese).
- [21] 钱照君, 祝天谅, 姜虎成, 等. 克氏原螯虾泛素结合酶 *E2r* 基因的克隆及表达分析[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(5): 641-651.  
Qian Z J, Zhu T L, Jiang H C, et al. Molecular cloning and expression analysis of ubiquitin-conjugating enzyme *E2r* in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(5): 641-651 (in Chinese).
- [22] Hu Q M, Chen S L. Cloning, genomic structure and expression analysis of *ube9* in the course of development in the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 165(3): 181-188.
- [23] Xu W T, Cui Z K, Wang N, et al. Transcriptomic analysis revealed gene expression profiles during the sex differentiation of Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 40: 100919.
- [24] 刘洋, 陈松林, 高峰涛, 等. 半滑舌鲷性别特异微卫星标记的 SCAR 转化及其应用[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(6): 787-792.  
Liu Y, Chen S L, Gao F T, et al. SCAR-transformation of sex-specific SSR marker and its application in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(6): 787-792 (in Chinese).
- [25] Chen S L, Zhang G J, Shao C W, et al. Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(3): 253-260.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] Cook W J, Martin P D, Edwards B F P, et al. Crystal structure of a class I ubiquitin conjugating enzyme (Ubc7) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.9 Å resolution[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(7): 1621-1627.
- [28] McGee E A, Hsueh A J W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles[J]. *Endocrine Reviews*, 2000, 21(2): 200-214.
- [29] 王立萍, 叶展, 张亚群, 等. 半滑舌鲷早期不同性别的形态差异及判别分析[J]. 海洋渔业, 2021, 43(1): 42-50.  
Wang L P, Ye Z, Zhang Y Q, et al. Morphological differences and discriminant analysis of different sex in early stage of *Cynoglossus semilaevis*[J]. *Marine Fisheries*, 2021, 43(1): 42-50 (in Chinese).
- [30] 梁卓, 陈松林, 张静, 等. 半滑舌鲷养殖群体性腺发育观察[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 2074-2078.  
Liang Z, Chen S L, Zhang J, et al. Gonadal development process observation of half-smooth tongue sole in rearing population[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(12): 2074-2078 (in Chinese).
- [31] Cheon S, Dean M, Chahrour M. The ubiquitin proteasome pathway in neuropsychiatric disorders[J]. *Neurobiology of Learning and Memory*, 2019, 165: 106791.
- [32] 王婧, 李冰, 刘翠翠, 等. 启动子结构和功能研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(8): 40-45.  
Wang J, Li B, Liu C C, et al. Advances of the studies on structure and function of promoter[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(8): 40-45 (in Chinese).
- [33] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 等. 植物基因启动子研究进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1455-1464.

- Zhang C X, Wang W Q, Jiang X N, *et al.* Review on plant gene promoters[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(12): 1455-1464 (in Chinese).
- [34] Webster J C, Cidlowski J A. Mechanisms of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 1999, 10(10): 396-402.
- [35] Zhou J G, Cidlowski J A. The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses[J]. *Steroids*, 2005, 70(5-7): 407-417.
- [36] Hahn M E, Timme-Laragy A R, Karchner S I, *et al.* Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88: 275-289.
- [37] Kramm K, Engel C, Grohmann D. Transcription initiation factor TBP: old friend new questions[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 411-423.
- [38] Schütz L F, Hurst R E, Schreiber N B, *et al.* Transcriptome profiling of bovine ovarian theca cells treated with fibroblast growth factor 9[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2018, 63: 48-58.

## Cloning, expression pattern and promoter activity analysis of *Cs-UBE2D4* gene in Chinese tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)

CHENG Peng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Zhangfan<sup>2,3</sup>, XU Wenteng<sup>2,3</sup>, WANG Na<sup>2,3</sup>, YANG Qian<sup>1,2,3</sup>,  
GONG Zhihong<sup>2,3,4</sup>, CUI Zhongkai<sup>2,3</sup>, HU Yuanri<sup>1,2,3</sup>, CHEN Songlin<sup>2,3\*</sup>

(1. School of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,  
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes,

Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China;

4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** The ubiquitin-proteasome system is an important protein modification pathway, involved in many biological processes. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 is the key enzyme in regulating protein ubiquitination. In order to explore the function of ubiquitin-conjugating enzyme E2 in female gonad development of *Cynoglossus semilaevis*, the Open Reading Frame (ORF) of *Cs-UBE2D4* gene was cloned in this study. Its expression pattern was measured in various tissues of male and female adults, and at different developmental stages of gonads as well. Then, we constructed *Cs-UBE2D4* promoter reporter vector (pGL3-*Cs-UBE2D4*) and detected its activity. The ORF of *Cs-UBE2D4* gene was 360 bp, encoding 119 amino acids with a conserved ubiquitin-conjugating enzyme E2 domain. qPCR results showed that *Cs-UBE2D4* was widely expressed in all tissues of females, especially in ovary and liver, but it was hardly detected in males. The gene expression increased from 90 days post-hatching (dph), peaked at 6 months post-hatching (mph), and decreased afterwards. Its expression level was lowest at 1.5 years post-hatching (yph) and increased at 3 yph. During this period, its expression was 1.97-fold higher at 6 mph than that at 90 dph. Dual luciferase assay showed strong activity of the promoter of *Cs-UBE2D4* gene, indicating its participation in transcription. This study provides a theoretical basis for future research on *Cs-UBE2D4* gene in ovarian development and gender-related mechanisms of *Cynoglossus semilaevis*.

**Key words:** *Cynoglossus semilaevis*; ubiquitin-proteasome system; ovarian development; *UBE2D4* gene

**Corresponding author:** CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31730099); Central Public-interest Scientific Institute Basal Research Fund, CAFS (2020TD20); Taishan Scholar Climbing Program of Shandong Province