

# 拟穴青蟹 *OTUB* 的分子克隆及其在性腺发育过程中的表达

高洁<sup>①</sup> 邹志华<sup>①</sup> 贾锡伟<sup>①</sup> 林鹏<sup>①</sup> 张子平<sup>②</sup> 王艺磊<sup>①\*</sup>

① 集美大学水产学院 厦门 中国 361021; ② 西东大学生物系 新泽西州 美国 07079

**摘要:** OTUB1 是哺乳动物雌激素信号通路中的一个关键因子,它可以使雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 去泛素化并抑制其转录活性。本研究从实验室拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 转录组测序数据库中筛选出 *OTUB* 基因片段,利用 SMART RACE 技术克隆得到 *Sp-OTUB* 的 cDNA 全长。该序列全长 1 261 bp,包括 5' 非编码区(5'-UTR)40 bp,开放阅读框(ORF)804 bp 和 3' 非编码区(3'-UTR)417 bp。其 ORF 编码 267 个氨基酸,预测其分子量为 31 ku。该蛋白序列中包含一个 OTU 样的半胱氨酸蛋白酶催化结构域和一个由半胱氨酸(C)、天冬氨酸(D)和组氨酸(H)组成的催化三联体。实时定量 PCR 结果显示,*Sp-OTUB* 在成熟拟穴青蟹各组织器官中均有表达,其中在血淋巴中的表达量最大,精巢中表达量最低。在卵巢发育过程中,*Sp-OTUB* 的表达量在卵巢增值期为最大,与其他各时期具有显著差异;在精巢发育各阶段,*Sp-OTUB* 表达量在精子细胞期达到最大,显著高于精母细胞期和成熟精子期。同源系统进化分析 *Sp-OTUB* 与大多数物种的 OTUB1 聚为一支,与肩突硬蜱 (*Ixodes scapularis*) 和紫海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 亲缘关系最近。实验结果初步显示 *Sp-OTUB* 在拟穴青蟹生殖调控方面可能发挥重要作用。

**关键词:** 拟穴青蟹;组织表达;性腺发育;包含 OTU 结构域的泛素乙醛结合蛋白

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2013)03-407-10

## Molecular Cloning and Expression Analysis of *OTUB* during Gonadal Development in *Scylla paramamosain*

GAO Jie<sup>①</sup> ZOU Zhi-Hua<sup>①</sup> JIA Xi-Wei<sup>①</sup> LIN Peng<sup>①</sup> ZHANG Zi-Ping<sup>②</sup> WANG Yi-Lei<sup>①\*</sup>

① Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

② Department of Biological Science, Seton Hall University, New Jersey 07079, USA

**Abstract:** OTUB1 is a key factor of the estrogen signaling pathway in mammals. It has been proved that OTUB1 is a novel ER $\alpha$ -interacting protein with capability of deubiquitinating ER $\alpha$  and then repressing its transcriptional activity. In this study, expressed sequence tag (EST) of *Scylla paramamosain* *OTUB* gene (OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein) was identified from transcriptome sequencing library and cloned by using SMART Rapid Amplification of cDNA end (RACE) technique. The full-length cDNA of *Sp-OTUB* is 1 261 bp, including 40 bp in 5'-UTR, 804 bp in open-reading frame (ORF) and 417 bp in 3'-UTR. The ORF encodes 365 amino acids with a predicted molecular weight of 31 ku, and the translated protein contains a typical OTU-like cysteine protease catalytic domain and a putative catalytic triad which was composed of conserved cysteine,

基金项目 国家自然科学基金项目(No.31072200),集美大学创新团队基金项目(No.2010A001);

\* 通讯作者,E-mail:ylwang@jmu.edu.cn;

第一作者介绍 高洁,女,硕士研究生;研究方向:水产动物功能基因组学;E-mail:jiiegao234@163.com。

收稿日期:2012-10-29,修回日期:2013-01-03

histidine, and possibly the aspartate residues. Real-time quantitative PCR showed that *Sp-OTUB* was expressed in all detected tissues of mature crabs with the highest expression in haemolymph and the lowest expression in testis. In the process of ovarian development, *Sp-OTUB* showed the highest expression in proliferation stage compared to other development stages. In secondary spermatocyte stage, the expression of *Sp-OTUB* reached the highest and was significantly higher than that of primary spermatocyte stage or spermatid stage. Phylogenetic analysis based on the OTUB protein homologue sequences indicated that *Sp-OTUB* was separated together with OTUB1 in most other species, and *Sp-OTUB* had the closest genetic relationship with that of *Ixodes scapularis* or *Strongylocentrotus purpuratus*. The preliminary experimental results showed that *Sp-OTUB* may play an important role in reproductive regulation.

**Key words:** *Scylla paramamosain*; Tissue expression; Gonadal development; OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein (OTUB)

蛋白的泛素化修饰是生物体内一个重要的调节机制,同时它也是一个可逆的调节过程,由去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)介导完成。去泛素化酶自发现起就被认定在调节细胞内蛋白水平和功能方面发挥重要作用,更是涉及到许多细胞生长发育和信号转导的调节等重要的生理过程以及部分疾病与肿瘤的发病机制(王素霞等 2009)。

在众多的去泛素化酶成员中, Otubain (OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein, OTUB)蛋白家族序列保守,广泛存在于从病毒、细菌、原核生物到植物和动物等各类真核生物体中,主要在免疫和病毒感染方面发挥作用(李杨等 2006, Frias-Staheli et al. 2007)。Otubain 家族成员与其他 DUBs 没有明显的相似性,但是相互之间很相似,都包含 OTU 结构域,与果蝇(*Drosophila melanogaster*)的卵巢肿瘤基因(*ovarian tumor gene, Otu*)同源(Makarova et al. 2000),而且是最先被发现在体外可以发挥去泛素化酶功能的蛋白酶(Nijman et al. 2005)。近来研究发现 OTUB1 (OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein1)是哺乳动物雌激素信号通路中的一个关键因子,OTUB1 可以使雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )去泛素化并抑制其转录活性(Stanišić et al. 2009)。雌激素受体在脊椎动物体内广泛存在,在无脊椎动物中也相继被克隆(Kajiwara et al. 2006, Matsumoto et al. 2007, Zhang et al. 2012),据 Ye 等(2008)的研究,雌

激素受体在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)脑和胸神经节中存在免疫阳性反应。因此,OTUB1 或许在无脊椎动物生殖调控方面也发挥一定作用。

拟穴青蟹广泛分布于我国东南沿海,经济价值高,是我国重要的水产养殖对象。关于拟穴青蟹的生殖生物学(叶海辉等 2006, Zeng et al. 2011, Zou et al. 2011)、神经内分泌学(Cui et al. 2005, Ye et al. 2008, 叶海辉等 2008)、免疫学(陈昌福等 2003, Liu et al. 2011, Xu et al. 2011, 徐栋梁等 2011)和遗传育种(崔海玉等 2011, Ma et al. 2012)等方面的研究一直是水产领域的重点。本研究根据本实验室拟穴青蟹转录组数据库中已有的 OTUB 基因片段,克隆得到了其 cDNA 全长,命名为 *Sp-OTUB*,并分析了其在各组织器官及性腺发育过程中的表达情况,旨在为拟穴青蟹生殖调控研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验材料** 拟穴青蟹购买于漳浦青蟹养殖户,根据性腺的颜色、形态和性腺指数(gonado-somatic index, GSI,  $GSI = \text{性腺重量}/\text{总体重}$ )以及组织学切片观察对青蟹性腺的不同发育阶段进行分期(Islam et al. 2010, Dai et al. 2012)。卵巢分为 5 个时期:增殖期(O1 期,  $GSI = 0.57 \pm 0.47$ ),卵黄生成前期(O2 期,  $GSI = 2.19 \pm 0.21$ ),卵黄生成早期(O3 期,  $GSI =$

= 3.68 ± 0.20), 卵黄生成中期 (O4 期, GSI = 7.81 ± 0.94), 卵黄生成晚期 (O5 期, GSI = 10.49 ± 0.49); 每个时相各取 12 只。精巢分为 3 个时期: 精母细胞期 (T1 期, GSI = 0.07 ± 0.01), 精子细胞期 (T2 期, GSI = 0.21 ± 0.01), 成熟精子期 (T3 期, GSI = 0.34 ± 0.01)。每个时相各取 5 只。成熟青蟹各组织 (包括性腺、肝胰腺、眼柄、脑、鳃、肌肉、肠、胃、心和血淋巴, 各组织至少 5 个样品), 解剖取样后立即放入液氮, 置于 -80℃ 冰箱储存备用。

### 1.1.2 主要试剂 RNA 抽提试剂 RDP 配方参

照文献 (王艺磊等 2003), 由实验室自行配制; 逆转录 PCR 试剂盒购自 Promega 公司; GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自捷瑞生物公司; pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司; SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 TOYOBO 公司。

**1.1.3 引物** 根据本实验室转录组测序所得到的 *OTUB* 基因的 EST (expressed sequence tag) 片段设计 SMART-RACE 引物, 实验所用引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。各引物及其序列见表 1。

表 1 引物序列表

Table 1 Sequences of primers

引物名称 Primer	引物用途 Application of primer	引物序列 Sequence
5'-GSP1	5'RACE 特异引物 1	5'-CAGAAATGAGAAGTCGCAAATACACCA-3'
5'-GSP2	5'RACE 特异引物 2	5'-AGGAAACAGTTGCCATCTGGTCTTG-3'
3'-GSP1	3'RACE 特异引物 1	5'-TTGCGACTTCTCATTCTGCTCACC-3'
3'-GSP2	3'RACE 特异引物 2	5'-ATGTATCTTGACCGAGGGGAGGG-3'
OTUB-F	Real-time PCR 上游引物	5'-TTGCGACTTCTCATTCTGCTCA-3'
OTUB-R	Real-time PCR 下游引物	5'-CCTCCACTGTCTCCACCTTC-3'

## 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 的合成** 总 RNA 的抽提和逆转录均按照试剂盒说明进行操作。总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 同时测定  $A_{260}/A_{280}$  值和 RNA 浓度。若有 DNA 的污染, 则用无 RNase 的 DNase I 经 37℃ 30 min 处理, 去除基因组 DNA。检测合格即可进行下一步逆转录。

**1.2.2 5'/3'-RACE PCR** 利用 RACE 特异引物 (GSP1 和 GSP2) 和试剂盒提供的 2 个通用引物进行巢式 PCR。第一轮 PCR 扩增反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 70 ~ 65℃ 梯度退火 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 16℃ 5 min。第二轮以第一轮 PCR 产物为模板, 反应程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min; 16℃ 5 min。

**1.2.3 cDNA 完整序列确定** 将 RACE 的扩增产物电泳检测、割胶回收并送至生工生物工程 (上海) 有限公司完成测序。将测序结果正

确的片段与原有 EST 片段拼接, 确定基因 cDNA 完整序列。

**1.2.4 实时定量 PCR** 逆转录 RT-PCR cDNA 第一链稀释适当倍数后作为实时定量 PCR 反应模板, 18S rRNA 作为内参基因。每个样品做至少 4 个平行样。20 μl 反应体系, SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μl, OTUB-F (10 μmol/l) 和 OTUB-R (10 μmol/l) 各 0.5 μl, cDNA 模板 9 μl。反应条件为: 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。

基因表达水平由 RQ (relative quantitative) 的平均值 (平均值 ± 标准误, Mean ± SE) 来表示。用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA)。P < 0.05 显著性差异。

**1.2.5 生物信息学分析** 使用 NCBI 中的 ORF finder 进行开放阅读框确定; 利用 ProtParam 进行编码蛋白的各种基本理化特性分析; 用 SWISS MODEL 和软件 PyMOL Viewer 完成三维空间结构的构建和分析; 用 MEGA 5.0 软件的邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树;







**2.3 氨基酸同源性分析** 通过多重对比发现, *Sp*-*OTUB* 与图 3 中所列各物种的 *OTUB1* 氨基酸序列一致性(47.3% ~ 50.9%)要明显高于 *OTUB2*(31.9% ~ 33.9%);同其他物种 *OTUB1* 一样, *Sp*-*OTUB* 也具有一段较长的氨基末端(N 端)序列,说明 *Sp*-*OTUB* 与 *OTUB1* 具有更高的同源性。此外, *Sp*-*OTUB* 的氨基酸序列与肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*) *OTUB* 一致性最大,为 55.6%,与日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*) *OTUB* 一致性最低,为 24.8%。

**2.4 系统进化树分析** 依据 NCBI 中现有的 *OTUB1* 和 *OTUB2* 的氨基酸序列构建系统进化树,分析发现 *OTUB1* 与 *OTUB2* 明显聚为两大枝。在 *OTUB1* 这一大枝中,日本血吸虫单独为一小枝,拟穴青蟹、肩突硬蜱和紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*) 3 种无脊椎动物聚为一枝,其他脊椎动物各物种聚为一枝。

*Sp*-*OTUB* 与大多数物种的 *OTUB1* 聚为一大枝,说明同 *OTUB2* 相比, *Sp*-*OTUB* 与 *OTUB1* 亲缘关系更近(图 4)。

**2.5 在各组织器官中的表达分析** 在成熟青蟹各组织器官中, *Sp*-*OTUB* mRNA 均有表达(图 5)。其中,在血淋巴中的表达量最大,其次为鳃和心,在精巢中的表达量最低。血淋巴中的表达量与其他各组织均有显著差异( $P < 0.05$ )。

**2.6 在性腺发育各时期的表达分析** 如图 6 所示,在卵巢发育过程中, *Sp*-*OTUB* 的表达量在卵巢增值期(O1 期)为最大,与其他各时期具有显著差异( $P < 0.05$ );随着卵巢的成熟,其表达量呈现逐渐降低的趋势。在精巢发育各阶段, *Sp*-*OTUB* 表达量在精子细胞期(T2 期)达到最大,显著高于精母细胞期(T1 期)和成熟精子期(T3 期),待精巢成熟时即成熟精子期(T3 期)其表达急剧下降( $P < 0.05$ )。

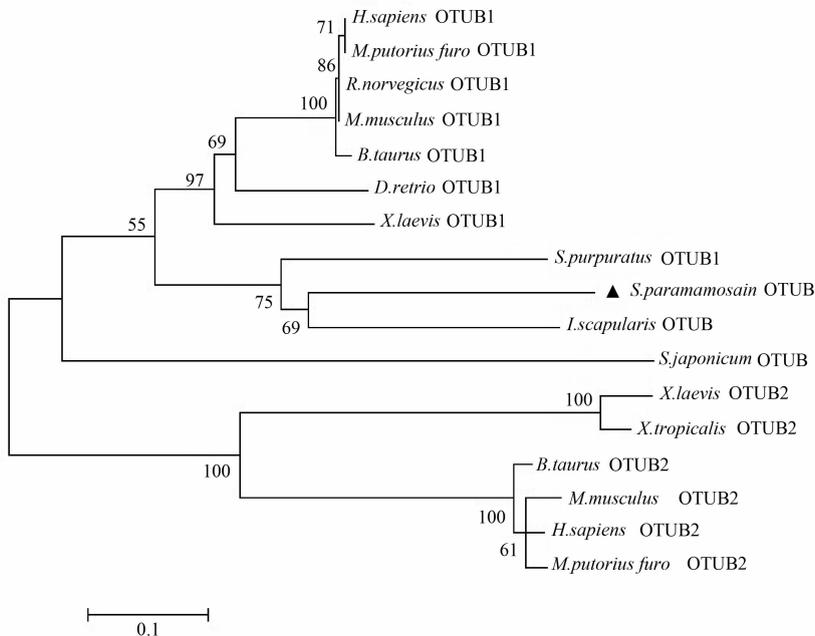


图 4 *OTUB* 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *OTUB*

树枝长度代表遗传距离,节点数字代表置信度。 *Sp*-*OTUB* 由三角标出;所涉及物种名称参照图 3。

Branch length indicates evolutionary distance, and bootstrap supporting values are shown at branch nodes. The triangle represents *Sp*-*OTUB*. The name of species consults Fig. 3.

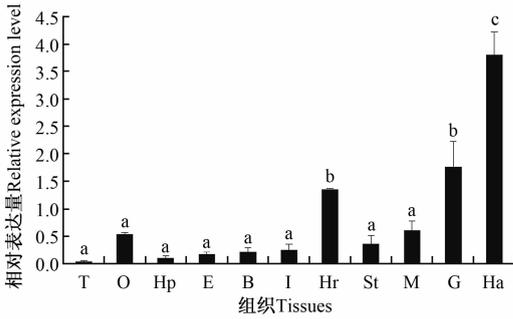


图 5 *Sp-OTUB* mRNA 在各组织器官的表达

Fig. 5 The expression of *Sp-OTUB* mRNA in different tissues

T. 精巢; O. 卵巢; Hp. 肝胰腺; E. 眼柄; B. 脑; I. 肠; Hr. 心; St. 胃; M. 肌肉; G. 鳃; Ha. 血淋巴。

数据柱上标注不同字母表示有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

T. Testis; O. Ovary; Hp. Hepatopancreas; E. Eyetalk; B. Brain; I. Intestines; Hr. Heart; St. Stomach; M. Muscle; G. Gill; Ha. Haemolymph. The different letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

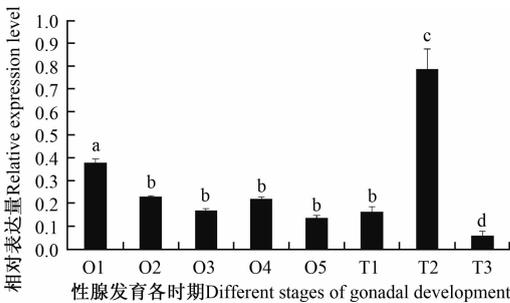


图 6 *Sp-OTUB* mRNA 在性腺发育各时期的表达

Fig. 6 The expression of *Sp-OTUB* mRNA during gonadal development

O1 ~ O5 代表卵巢发育各时期: O1. 增殖期, O2. 卵黄生成前期, O3. 卵黄生成早期, O4. 卵黄生成中期, O5. 卵黄生成晚期; T1 ~ T3 代表精巢发育各时期: T1. 精母细胞期, T2. 精子细胞期, T3. 成熟精子期。不同字母表示有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

O1 - O5 represents different stages of ovary development: O1. Proliferation, O2. Previtellogenesis, O3. Primary vitellogenesis, O4. Secondary vitellogenesis, O5. Tertiary vitellogenesis; T1 - T3 represents different stages of testis development: T1. Primary spermatocytes, T2. Secondary spermatocytes, T3. Spermatids. Different letters represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

Otubain 家族是泛素-去泛素蛋白酶系统中新发现的一类具有去泛素化作用的半胱氨酸蛋白酶,包括两个亚型,预测其蛋白分子量分别为 31 ku 和 27 ku,分别命名为 OTUB 1 和 OTUB 2。研究发现,*OTUB1* 在人体各组织泛表达,而 *OTUB2* 在脑中表达量最高 (Balakirev et al. 2003)。目前对于其生理功能知之甚少,是新近研究的重点。

本文克隆获得的 *Sp-OTUB* 基因 cDNA 全长,推导的氨基酸序列中存在一个 OTU 结构域和半胱氨酸蛋白酶的催化三联体,它们是所有 Otubains 蛋白发挥去泛素化酶功能的结构。OTU 结构域负责介导去泛素化作用,其中泛素作用基序 (UIM) 和泛素相关结构域 (UBA) 是结合泛素所必须的结构基序,在泛素信号通路上的蛋白通常都具有这两个基序 (Hofmann et al. 1996, 2001)。同时催化三联体活性位点也发挥着不可替代的重要作用,若 OTUB1 序列中 OTU 结构域的催化残基发生突变,则 OTUB1 就会丧失其功能活性,而序列其他区域的半胱氨酸残基发生突变则不会影响其活性 (Balakirev et al. 2003)。如一种 OTU 蛋白酶——A20 蛋白 (Evans et al. 2001),若 OTU 结构域发生突变,会降低其对 NF- $\kappa$ B 转录活性的调节 (Balakirev et al. 2003)。*Sp-OTUB* 蛋白中含有一个核定位信号 (NLS),说明 *Sp-OTUB* 蛋白在组装完成后是分泌到细胞核中发挥功能的,这在猪 (*Sus scrofa*) *OTUB1* 基因的研究中也得到了证实 (Shan et al. 2009)。

多重比对结果表明, *Sp-OTUB* 与各物种 OTUB1 的氨基酸序列一致性要明显高于 OTUB2 (图 3)。同时系统进化树分析也显示 *Sp-OTUB* 与各物种的 OTUB1 聚为一枝 (图 4),再者空间结构模拟发现 *Sp-OTUB* 蛋白的 3D 结构与人类的 OTUB1 更为相似 (图 2),这一系列的分析表明 *Sp-OTUB* 与 OTUB1 具有更高的同源性,即 *Sp-OTUB* 可能与 OTUB1 有着更为相似的功能。

*Sp-OTUB* 在拟穴青蟹各组织是泛表达的,这与人类 *OTUB1* 基因的表达模式 (Balakirev et al. 2003) 一致。而血淋巴是青蟹最主要的免疫的防御体系 (徐海圣等, 2001), *Sp-OTUB* 在血淋巴中的高表达说明 Otubains 蛋白在免疫系统发挥着一定作用,这与小鼠 (*Mus musculus*) 中的研究结果 (Soares et al. 2004) 相吻合。

Stanišić 等 (2009) 在哺乳动物中的研究发现, *OTUB1* 在体内和体外都可以使 ER $\alpha$  去泛素化,是雌激素信号通路上 ER $\alpha$  的一个特异负调控因子。*OTUB1* 的高表达会显著降低 ER $\alpha$  的表达水平从而抑制 ER $\alpha$  介导的转录。先前的研究表明,甲壳动物卵巢发育的初始阶段需要大量的 17 $\beta$ -雌二醇 (17 $\beta$ -estradiol, E2) 来促进卵黄蛋白的生成和性腺的成熟,而一旦卵巢发育成熟,对雌二醇的需求也就渐渐减少了 (Ghosh et al. 1993, 蔡生力等 2000, 崔青曼等 2005)。相应的,雌二醇的大量存在需要更多的雌激素受体来响应其特定的生理反应,因此在卵巢发育早期雌激素受体的表达也相应增多。*Sp-OTUB* 在卵巢中的表达模式或许正是针对此生理反应而表现出的一种调控机制,卵巢发育早期高表达的 *Sp-OTUB* 可以起到负调控雌激素受体的作用;随着卵巢的成熟,对雌二醇的需求下降,由雌激素作用的信号通路引起的 *OTUB* 的负调控作用减弱, *Sp-OTUB* 的表达量也随之下降。雌激素不仅可以调控卵巢的发育,对精巢成熟也具有重要影响。在小鼠 (O'Donnell et al. 2001)、鲮 (*Mugil cephalus*) (宋海霞等 2010) 和白蚁 (*Reticulitermes aculabialis*) (苏晓红等 2007) 等的研究中发现,17 $\beta$ -雌二醇通过雌激素受体的介导促进精巢的成熟和精子的发生。*Sp-OTUB* 在精巢特别是在精子细胞期的高表达,说明 *OTUB* 是参与精巢发育的一个重要的调控者。当然这只是本研究的初步推测, *Sp-OTUB* 在性腺发育和生殖调控中的具体作用机制还有待于进一步深入研究。

本研究是首次从甲壳动物中获得 *OTUB* 的 cDNA 全长,通过对其进行生物信息学和同源进化分析,结合该基因在成熟蟹体各组织器官

和性腺发育各时期的表达情况,实验数据初步认为拟穴青蟹的 *OTUB* 在免疫防御及生殖调控方面都可能发挥重要作用。

## 参 考 文 献

- Balakirev M Y, Tchermiuk S O, Jaquinod M, et al. 2003. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *European Molecular Biology Organization Report*, 4 (5): 517–522.
- Cui Z X, Liu H, Lo T S, et al. 2005. Inhibitory effects of the androgenic gland on ovarian development in the mud crab *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140 (3): 343–348.
- Dai Y B, Han K H, Zou Z H, et al. 2012. *SUMO-1* of mud crab (*Scylla paramamosain*) in gametogenesis. *Gene*, 503 (2): 260–268.
- Evans P C, Taylor E R, Coadwell J, et al. 2001. Isolation and characterization of two novel A20-like proteins. *Biochemical Journal*, 357 (3): 617–623.
- Frias-Staheli N, Giannakopoulos N V, Kikkert M, et al. 2007. Ovarian tumor (OTU)-domain containing viral proteases evade ubiquitin-and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host and Microbe*, 2 (6): 404–416.
- Ghosh D, Ray A K. 1993. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: relation to ovarian condition and estrogen treatment. *General and Comparative Endocrinology*, 89 (2): 248–254.
- Hofmann K, Bucher P. 1996. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 21 (5): 172–173.
- Hofmann K, Falquet L. 2001. Ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (6): 347–350.
- Islam M S, Kodama K, Kurokora H. 2010. Ovarian development of the mud crab *Scylla paramamosain* in a tropical mangrove swamps. Thailand. *Journal of Scientific Research*, 2 (2): 380–389.
- Kajiwara M, Kuraku S, Kurokawa T, et al. 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *General and Comparative Endocrinology*, 148 (3): 315–326.
- Liu H P, Chen F Y, Gopalakrishnan S, et al. 2010. Antioxidant

- enzymes from the crab *Scylla paramamosain*: gene cloning and gene/protein expression profiles against LPS challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(5/6): 862–871.
- Ma H Y, Cui H Y, Ma C Y, et al. 2012. High genetic diversity and low differentiation in mud crab (*Scylla paramamosain*) along the southeastern coast of China revealed by microsatellite markers. *Journal of Experimental Biology*, 215(17): 3120–3125.
- Makarova K S, Aravind L, Koonin E V. 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2): 50–52.
- Matsumoto T, Nakamura A M, Mori K, et al. 2007. Oyster estrogen receptor: cDNA cloning and immunolocalization. *General and Comparative Endocrinology*, 151(2): 195–201.
- Nijman S M B, Luna-Vargas M P A, Velds A, et al. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, 123(5): 773–786.
- O' Donnell L, Robertson K M, MJones M E, et al. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3): 289–318.
- Shan T L, Tang Z L, Guo D Z, et al. 2009. Partial molecular cloning, characterization, and analysis of the subcellular localization and expression patterns of the porcine *OTUB1* gene. *Molecular Biology Reports*, 36(6): 1573–1577.
- Soares L, Seroogy C, Skrenta H, et al. 2004. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. *Nature Immunology*, 5(1): 45–54.
- Stanišić V, Malovannaya A, Qin J, et al. 2009. OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER)  $\alpha$  and affects ER $\alpha$  transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24): 16135–16145.
- Xu W F, Qiao K, Huang S P, et al. 2011. The expression pattern of scygonadin during the ontogenesis of *Scylla paramamosain* predicting its potential role in reproductive immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(10): 1078–1090.
- Ye H H, Huang H Y, Li S J, et al. 2008. Immunorecognition of estrogen and androgen receptors in the brain and thoracic ganglion mass of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Progress in Natural Science*, 18(6): 691–695.
- Zeng H, Huang J R, Li W X, et al. 2011. Identification of differentially expressed genes in the thoracic ganglion of the mud crab, *Scylla paramamosain* during ovarian maturation. *Marine Biology Research*, 7(6): 617–622.
- Zhang H, Pan L Q, Zhang L. 2012. Molecular cloning and characterization of estrogen receptor gene in the Scallop *Chlamys farreri*: Expression profiles in response to endocrine disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(1): 51–57.
- Zou Z H, Zhang Z P, Wang Y L, et al. 2011. EST analysis on the gonad development related organs and microarray screen for differentially expressed genes in mature ovary and testis of *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(2): 150–157.
- 蔡生力, 杨丛海. 2000. 体外注射激素对中国对虾卵巢发育的影响. *中山大学学报: 自然科学版*, 39(增刊1): 91–95
- 陈昌福, 陈莹, 陈超然, 等. 2003. 水产甲壳动物的免疫防御机能及其免疫预防研究进展. *华中农业大学学报*, 22(2): 197–203.
- 崔海玉, 马洪雨, 马春艳, 等. 2011. 利用微卫星标记比较分析拟穴青蟹不同家系的遗传多样性. *海洋渔业*, 33(3): 274–281.
- 崔青曼, 袁春营, 吴婷婷. 2005. 中华绒螯蟹离体卵巢发育的调控作用. *中国水产科学*, 12(4): 487–491.
- 李杨, 宋平. 2006. 泛素化/去泛素化系统的生物化学和生物学功能. *生命的化学*, 26(6): 515–517.
- 宋海霞, 翁幼竹, 方永强. 2010. 17 $\beta$ -雌二醇激发鳊早期精子发生的作用机制. *中国水产科学*, 17(6): 1192–1199.
- 苏晓红, 邢连喜, 阴灵芳, 等. 2007. 雌激素受体在白蚁精子发生过程中的免疫组织化学定位. *分子细胞生物学报*, 40(2): 173–178.
- 王素霞, 刘媛, 吴慧娟, 等. 2009. 去泛素化酶的研究及其进展. *临床与实验病理学杂志*, 24(6): 734–737.
- 王艺磊, 张子平. 2003. 日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建. *动物学杂志*, 38(2): 9–13.
- 徐栋梁, 李洁颖, 彭永鹤, 等. 2011. 拟穴青蟹抗菌肽 CrusSp 基因克隆表达及抑菌活性分析. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 131(1): 93–97.
- 徐海圣, 徐步进. 2001. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展. *大连水产学院学报*, 16(1): 49–56.
- 叶海辉, 艾春香, 黄辉洋, 等. 2006. 蟹类生殖生理学研究进展. *厦门大学学报: 自然科学版*, 45(增刊2): 170–175.
- 叶海辉, 黄辉洋, 王桂忠, 等. 2008. 卵巢发育过程拟穴青蟹前脑神经分泌细胞超微结构的变化. *厦门大学学报: 自然科学版*, 47(2): 265–267.