

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15401

## 三疣梭子蟹细胞 *Cdk7* 基因克隆及其在卵巢发育中的表达

贾复龙<sup>1,2</sup>, 孟宪亮<sup>1,2</sup>, 刘萍<sup>1,2</sup>, 李健<sup>1,2</sup>, 高保全<sup>1,2</sup>

1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

**摘要:** 本实验应用 RACE 技术克隆获得了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)周期蛋白依赖性激酶 7(*Cdk7*)基因 cDNA 序列全长。基因 5'和 3'非编码区域(UTR)以及开放阅读框的长度分别是 23 bp、178 bp 和 1056 bp, 预测编码一个含有 351 个氨基酸, 分子量为 39.91 kD 的蛋白质, 包含一个丝氨酸/苏氨酸催化保守结构域和 T-loop 结构。同源性分析表明, 三疣梭子蟹 CDK7 氨基酸序列与其他物种 Cdk7 相似度较高, 说明 *Cdk7* 基因具有很好的保守性。实时荧光定量 PCR 结果显示, 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在卵巢组织中的表达量显著高于其他组织( $P < 0.05$ )。 *Cdk7* 基因在卵巢发育不同时期的表达量存在差异, 其在 I 期和 II 期的表达量显著高于其他时期( $P < 0.05$ )。去除眼柄后该基因在卵巢组织中的表达呈现先升高后降低的趋势, 并于第 4 天达到最大值。本研究的结果表明, *Cdk7* 基因参与了三疣梭子蟹卵巢发育调控, 为深入开展三疣梭子蟹和其他甲壳动物性腺发育调控机理研究提供了重要信息。

**关键词:** 三疣梭子蟹; *Cdk7*; 基因克隆; 眼柄摘除; 基因表达

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)05-1032-09

细胞周期蛋白依赖性激酶 7 (cyclin-dependent kinase 7, Cdk7)是 Schachter 等<sup>[1]</sup>在 1994 年首次发现的 Cdk 家族成员, Fisher<sup>[2]</sup>研究发现其功能主要是促进细胞周期正常地运转。Cdk7 作为 Cdk 家族重要一员, 在细胞周期各项功能活动中的作用明显, 通过与细胞周期蛋白(Cyclins)的结合, 控制细胞的分裂和增殖活动<sup>[3]</sup>。Cdk7 可与 Cyclin H 结合构成复合体, 即周期蛋白依赖性激酶活化激酶(cyclin-activating kinase, CAK), 在真核细胞有丝分裂和减数分裂中都起着至关重要的作用。既能激活与 G1 期细胞周期蛋白结合的 Cdk2、Cdk4 和 Cdk6, 促使细胞由 G1 期过渡到 S 期; 也可以通过 Cdk1 的磷酸化或去磷酸化从而参与成熟促进因子(maturation or M-phase promoting factor, MPF)的激活途径, 促使细胞从 G2 期进入

M 期, 进而促使细胞发生分裂和增殖<sup>[3-6]</sup>。此外, 转录因子 II H (TF II H)可以在细胞周期运转、核苷酸修复以及转录过程中发挥重要作用, Cdk7 作为 TF II H 的重要组成部分, 同样具有重要地位<sup>[7-8]</sup>。鉴于在细胞周期调控中的重要作用, Cdk7 受到研究者的广泛关注。Fujii 等<sup>[9]</sup>曾发现 *Cdk7* 基因过表达能够加速猪卵子减数分裂的进程, 而抑制该基因的表达能够抑制卵子减数分裂。*Cdk7* 基因的突变和表达异常还与卵巢癌、直肠癌、皮血管瘤、乳腺癌等相关<sup>[10-11]</sup>。目前, 针对该基因的研究主要集中在脊椎动物中, 而甲壳动物的相关研究还很少<sup>[12-13]</sup>。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae)、梭子蟹

收稿日期: 2015-10-24; 修订日期: 2016-01-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41576147, 41306178); 泰山领军人才工程高校生态农业创新类计划项目(LJNY2015002).

作者简介: 贾复龙(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海水养殖生物种质资源与工程育种研究. E-mail: 1360639373@qq.com

通信作者: 刘萍, 硕士生导师, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

属, 广泛分布于中国、日本、韩国等海域, 是我国重要的海水养殖经济蟹类<sup>[14-16]</sup>。目前, 在池塘养殖三疣梭子蟹过程中, 卵巢发育不良、抱卵质量差等问题普遍存在, 深入开展性腺发育调控尤其是配子发生调控机制研究有助于此类问题的解决<sup>[17]</sup>。本研究采用 SMART RACE 的方法, 获得了三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因的 cDNA 序列全长, 并通过实时荧光定量 PCR 技术, 分析了 *Cdk7* 基因在三疣梭子蟹各组织以及不同发育时期的卵巢组织中的差异表达状况; 同时还通过去除眼柄探究该基因在去除眼柄后卵巢组织中表达量的改变。研究结果将为三疣梭子蟹以及其他甲壳动物性腺发育调控机制研究提供重要信息。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验所用三疣梭子蟹取自本实验室昌邑市养殖基地户外养殖池, 于周转箱(560 mm×360 mm×280 mm)中暂养 7 d(周转箱通过使用 3 块中间相通的 PVC 板分隔, 每个周转箱 6 个小格, 每格一只)。水温 (20±2)°C、盐度 33, pH 8.2, 持续充氧, 每天换水 1/3、清污、定时投喂蛤蜊肉。

Trizol Reagen 购自 Invitrogen 公司, SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司, DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II 荧光定量试剂盒、PrimeScript RT reagent Kit、PMD18-T 载体和 DH5 $\alpha$  感受态细胞均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 三疣梭子蟹卵巢不同发育时期卵巢组织的采集

于 2014 年 7 月至 2015 年 3 月每月一次在海丰水产养殖责任有限公司进行连续取样, 参照吴旭干等<sup>[18]</sup>对三疣梭子蟹卵巢的分期方法, 首先通过卵巢外部特征进行初步分期, 从初步分期后的每组样品中选取 5 个样品进行切片, HE 染色后显微镜下观察各样品组织学特征, 从而进行最终卵巢时期的确定。

### 1.3 去除眼柄实验

将实验所用雌性暂养 7 d 后随机分为对照、去

单侧眼柄和去双侧眼柄 3 组, 每组 40 个个体。去眼柄方法采用烧红的镊子紧捏三疣梭子蟹眼柄庞大处基部 3 s, 之后放入单独的小格中, 防止打 斗。于去眼柄后第 1、4、7、10 天每组分别取 5 只三疣梭子蟹的卵巢组织, 立即放入液氮中保存, 用于 RNA 提取。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 RACE 第一链合成** 通过 Trizol 试剂提取三疣梭子蟹组织总 RNA, 提取方法参照说明书, 得到总 RNA 后, 采用紫外分光光度计与琼脂糖凝胶电泳等方式对提取的总 RNA 质量进行检测。选取质量及完整性较好的卵巢组织总 RNA, 按照 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 说明书的方法合成 3'和 5'RACE 的 cDNA 第一链。

**1.4.2 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 序列全长的克隆** 依据三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因的 EST 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'和 5'RACE 引物(表 1)后由北京擎科新业生物技术有限公司合成。3'和 5'末端扩增使用 Advantage 2 PCR Kit, 参照 SMART RACE 说明书, 引物 CDK7-3'-1 和 CDK7-5'-1 分别与 UPM 配对, 进行 *Cdk7* 基因 cDNA 3'和 5'末端扩增。PCR 反应程序: 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min, 30 个循环。参照核酸凝胶回收试剂盒说明书, 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后通过切胶回收得到扩增目的片段, 将得到的目的片段参照 PMD18-T 说明书与 PMD18-T 连接, 之后将连接产物转入 DH5 $\alpha$ , 经涂板过夜培养后, 将通过蓝白斑筛选的菌落挑出, 于 AMP 液体培养基中培养 6 h 后进行菌液 PCR 及琼脂糖凝胶电泳检测并送测序。

表 1 本实验用到的所有引物的序列  
Tab. 1 The sequences of primers used in this study

引物 primer	序列(5'-3') sequence(5'-3')
CDK-3'-1	TCTTCACAGCACTTGGCACA
CDK-5'-1	CTCCTCACGGCTACCCAG
CDK7-F	CCTGGATGTGTTTGGCTACA
CDK7-R	GGGTGAGAATGATGTTGTCTG
$\beta$ -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG
$\beta$ -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC

**1.4.3 生物信息学分析** 利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>) 在线软件去掉载体留下目的片段序列, 然后使用 Contig Express Project 软件与三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 EST 序列拼接后得到三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 序列全长。通过使用 EditSeq 预测开放阅读框(ORF), 并对其氨基酸序列翻译。将得到的三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 EditSeq 翻译得到的氨基酸序列通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比对。利用 ExPASy ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 进行分子量及等电点的预测, 利用 InterproScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>) 进行蛋白质功能结构域分析, 利用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行蛋白质磷酸化位点分析。将 GenBank 中下载的其他物种 *Cdk7* 氨基酸序列和三疣梭子蟹 *Cdk7* 氨基酸序列一起使用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列比对, 利用 MEGA 5.0 软件对 *Cdk7* 基因构建 NJ 系统进化树。

**1.4.4 组织表达分析** 将三疣梭子蟹卵巢、精巢、鳃、胃、肠、肝胰腺、胸神经节、脑神经节、血淋巴、眼柄、心脏、肌肉等组织以及不同发育时期和去眼柄后的卵巢组织提取的 mRNA, 参照 PrimeScript<sup>RT</sup> reagent Kit 说明书反转录合成 cDNA。

根据三疣梭子蟹 *Cdk7* 和  $\beta$ -actin 基因开放阅读框 cDNA 序列, 由上海生工生物工程股份有限公司分别设计合成 1 对荧光定量引物( $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R、CDK7-F 和 CDK7-R)(表 1), 参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 说明书对 *Cdk7* 基因在三疣梭子蟹不同组织(鳃、胃、肠、肝胰腺、胸神经节、脑神经节、血淋巴、眼柄、心脏、肌肉)及不同发育时期卵巢组织中的相对表达量进行分析。反应体系和程序参照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 说明书, 10  $\mu$ L 反应体系包括: 5  $\mu$ L SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (2 $\times$ ), 0.2  $\mu$ L ROX Reference Dye II (50 $\times$ ), 0.4  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 的正反向引物、3.0  $\mu$ L DEPC 水、1.0  $\mu$ L cDNA。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。反应完成后结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算, 并对结果利用 SPSS19.0

软件进行差异显著性等统计学分析,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因的获得及其序列分析

将抽提得到的总 RNA, 经紫外分光光度计分析后发现其 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 均在 1.9~2.0; 在进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后发现, 28S 和 18S rRNA 条带清晰完整, 这两部分结果能够说明实验所用总 RNA 质量较好, 可用于 RACE 模板合成。参照 SMART<sup>TM</sup> RACE Amplification Kit 说明书方法合成的 3'和 5'RACE 的 cDNA 第一链为模板, 使用特异性引物 CDK7-5'-1 和 CDK7-3'-1 分别与通用引物 UPM 配对进行 5'和 3'末端 RACE 扩增, 所得产物经测序以及拼接后得到三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 全长序列, GenBank 登录号 KT804694。该基因 cDNA 序列全长 1257 bp, 包含 1056 bp 的 CDS(包括终止密码子)、23 bp 的 5'UTR 和 178 bp 的 3'UTR (图 1)。

### 2.2 氨基酸序列分析

将三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 序列全长使用多种软件预测后得到其开放阅读框(ORF)长 1056 bp, ORF 共编码 351 个氨基酸, 预测编码一个分子量为 39.91 kD, 理论等电点为 8.69 的蛋白。在线分析预测显示三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因包含 14 个磷酸化位点和 4 个糖基化位点(N-62, N-92, N-286, N-292)。在线分析发现三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因包含 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(18~302 aa)以及 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活化位点(140~152 aa)(图 1)。

### 2.3 同源性及系统进化分析

通过 BLAST 同源性比对分析, 发现三疣梭子蟹 *Cdk7* 氨基酸序列与斑节对虾 *Cdk7* 的同源性最高, 为 93%; 与其他物种如内华达古白蚁、黑脉金斑蝶、家蚕、猕猴的同源性分别为 72%、70%、70%、69%, 且都含有丝氨酸/苏氨酸催化结构域和 T-loop 结构(图 2)。

利用 MEGA5.0 软件对 *Cdk7* 进行系统进化分析, 结果表明, 10 个不同物种的 *Cdk7* 聚为两个类

M A G E R K G R I R M E E K L

```

1 ACATGGGGAATAACAGAAAAGCCatg|gcgggcgagaggaaagggaggattcgc|atggaagaaaactt 68
  K R Y E K I D F L G E G Q F A T V Y K A M D V
69 aaaagatatgagaagattgactttcttggcgaggacagtttgccactgtatacaaggctatggatgt 136
  E T K Q I V A V K K I K L G S R E E A R D G I
137 cgagacaagcagattgttctgtttaaagaataaagctgggtagccgtgaggaggctcgagatggca 204
  N R T A L R E I K L L Q E V H H P N L I G L
205 tcaaccgtactgcctcagagaaataaagctcttgcaggaagttcaccaccctaacctgattggtctc 272
  L D V F G Y K S N V S L V F D F M D T D L E V
273 ctggatgtgttggctacaaatcaaactgtctttagtgtttgacttcatggacacagatttggaggt 340
  I I K D T D N I I L T P A N I K A Y T L Q T L
341 tatcatcaaggacacagacaacatcattctcaccctgccaatatcaaggcatacactctccagacc 408
  K G L E F L H L H W I L H R D L K P N N L L
409 tcaaaggccttgaatttctacatctccactggatcctccacagagacctcaagcccaacaatttactt 476
  V N S E G V L K I G D F G L A R F F G S P N R
477 gtaaactcagaaggtgtcttgaataaggtgactttgggttggcagcagattcttggttcccctaacag 544
  Q Y S H Q V V T R W Y R S P E L L F G A R S Y
545 acagtattcccacaggtgtaaccagatggtagcagagccagagttgctgtttggagcagcaggtcat 612
  G T G V D M W A I G C I L A E M L V R C P Y
613 atggaactggagtgacatgtggcaataggtgcattttggccgagatgctagtgcgatgtccctac 680
  F P G D S D L D Q L T R I F T A L G T P T D E
681 ttcccaggagactctgaccttgaccagcttaccaggatcttcacagcacttggcacacctactgatga 748
  N W K D M T E L P D Y V S F K H L E G S P L R
749 aaattggaaggatgacagaacttccagactactgtccttcaaacacttgaaggatctcctttaa 816
  D L F P A A S D D L Q L L G S L L T I N P
817 gagacctgttctcctgcagccagtgatgactgctttagttgcttggctcttactgaccatcaatcct 884
  S K R C N C T Q A L K M N Y F S N R P A P T P
885 tctaagcgtgtaactgcacacaagccctcaagatgaactactttagcaatcgaccggcaccaacacc 952
  G P M L P L P P S I R D R K E Q E K P S L K R
953 tgggcccatgttggcccttcccccttccattcgggacaggaaggagcaagaaaagccttctcttaagc 1020
  K I I E E S G F G G S L P K K L Q F *
1021 gcaagatcatagaagagtcagatttggaggatctttaccaaagaaactacagttc|tag|GGTCATGC 1088
1089 AGCAACCAAGAAACTCGCCTTTGTTTTCCCTTCCAGTCTTACATACAATGCTATTCTGCTGTGATA 1156
1157 AATAATAATGTCAAAAATATTTTGTACTGCTCTTGTATAACAATCCACATTAATATATATATG 1224
1225 ACTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1257
    
```

图 1 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因序列全长以及氨基酸推导序列

丝氨酸/苏氨酸催化结构域用阴影表示, T-loop 以下划线标出, 起始密码子和终止密码子用方框标出。

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Portunus trituberculatus's Cdk7* gene. The catalytic domain of the serine/threonine kinase, T-loop, initiation codon and stop codon were marked with shadow, underline and black box, respectively.

群, 三疣梭子蟹 *Cdk7* 首先与斑节对虾 *Cdk7* 紧密聚为一枝, 后与黑脉金斑蝶、家蚕、黑腹果蝇等亲缘关系较近的聚为一枝, 和猕猴、智人、长鳍真鲷以及斑马鱼等脊椎动物亲缘关系较远(图 3)。

#### 2.4 组织差异表达分析

*Cdk7* 基因在各组织中均有表达, 其中在卵巢组织中的表达量显著高于其他组织( $P < 0.05$ ), 之后依次是精巢、眼柄、脑神经节、胸神经节、肌肉、肝胰腺、肠、胃、鳃、血淋巴等组织(图 4)。

#### 2.5 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在不同发育时期卵巢组织中的差异表达分析

*Cdk7* 基因在三疣梭子蟹不同发育时期卵巢组织中的表达量存在显著差异( $P < 0.05$ ), 其中 II

期卵巢组织表达量最高, 之后依次是 I 期、III 期、VI 期和 IV 期, V 期卵巢组织中表达量最低(图 5)。

#### 2.6 去眼柄后三疣梭子蟹卵巢组织中 *Cdk7* 基因差异表达分析

对去眼柄后三疣梭子蟹卵巢组织进行实时荧光定量 PCR 分析后发现, 去眼柄后第 1、4、7 天, 所有去眼柄组的 *Cdk7* 基因在卵巢组织的表达量相对于对照组都有所升高, 且在去眼柄后第 4 天达到峰值而呈现先升高后降低的趋势, 去眼柄后第 10 天去眼柄组卵巢组织 *Cdk7* 基因表达量下降到与对照组同一水平; 前 7 天中去眼柄组的表达量高于去除单侧眼柄组的表达量, 且第 4 天差异显著( $P < 0.05$ , 图 6)。



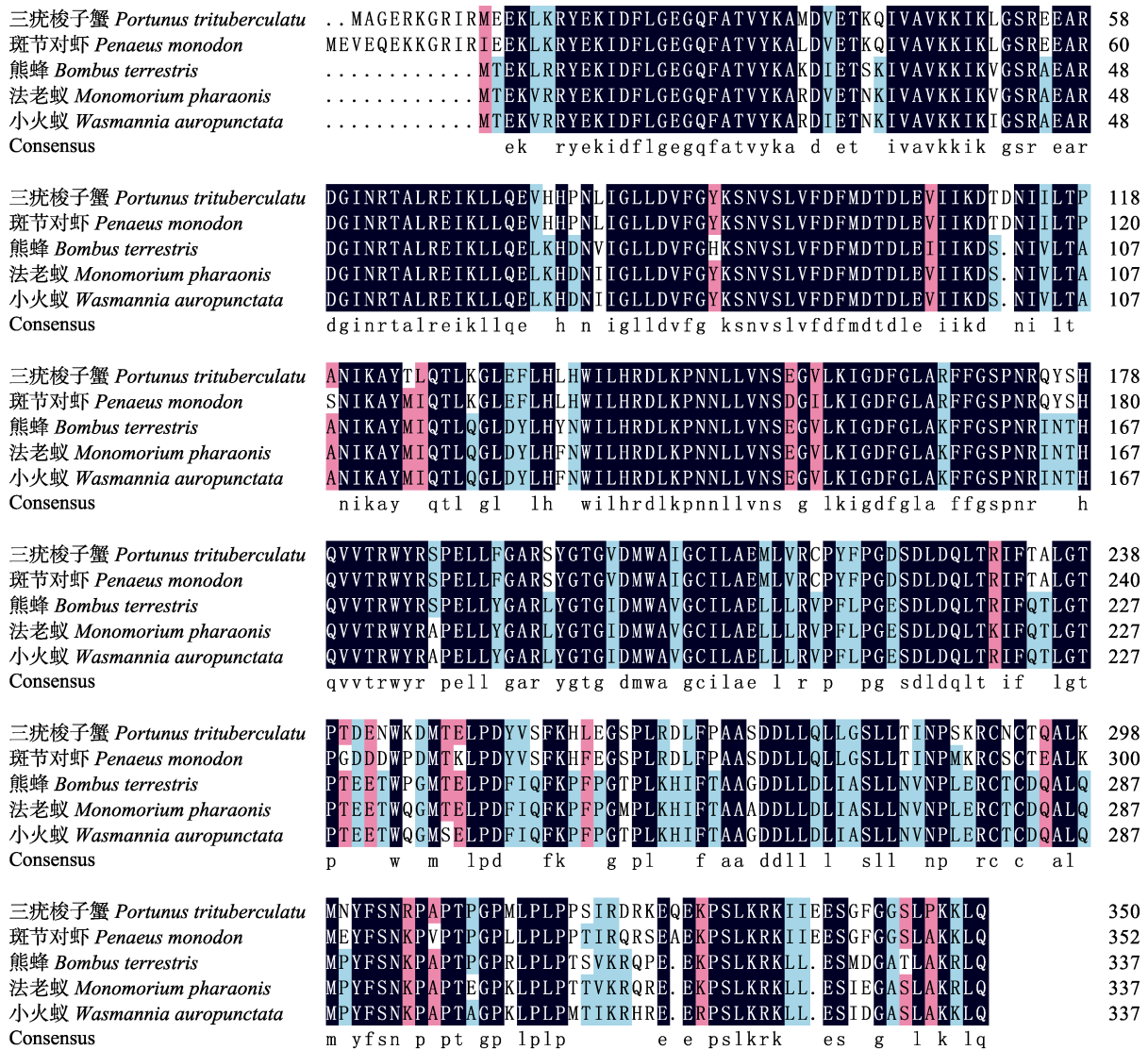


图 2 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因编码的氨基酸序列与其他物种 *Cdk7* 基因编码的氨基酸序列的比对  
 各物种 *Cdk7* 序列 GeneBank 登录号: 三疣梭子蟹(KT804694), 斑节对虾(AIX11620.1), 熊蜂(XP\_003396102.1), 法老蚁  
 (XP\_012528779.1), 小火蚁(XP\_011694124.1).

Fig. 2 Multiple alignments of the amino acid sequences deduced by *Cdk7* gene of *Portunus trituberculatu* with other species  
 The GenBank accession numbers of *Cdk7* gene were as follows: *Portunus trituberculatus* (KT804694), *Penaeus monodon*  
 (AIX11620.1), *Bombus terrestris* (XP\_003396102.1), *Monomorium pharaonis* (XP\_012528779.1), *Wasmannia auropunctata*  
 (XP\_011694124.1).

### 3 讨论

本研究克隆获得了三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 序列全长, 并分析了其在三疣梭子蟹不同组织、不同发育时期卵巢组织及眼柄摘除后卵巢组织中的表达差异。作为 CAK 的催化亚基, *Cdk7* 通过磷酸化一系列 Cdk, 对真核细胞周期调控产生重要影响<sup>[19]</sup>。通过序列分析发现, 三疣梭子蟹

*Cdk7* 氨基酸序列中包含 Cdk 家族保守丝氨酸/苏氨酸激酶催化结构域(17~315 aa), 以及 T-loop 环(162~189 aa, DFGLARFFGSPNRQYSHQVVTRWYRSPE)。T-loop 环磷酸化与去磷酸化可以调节激酶的激活状态。与其他 Cdk 不同<sup>[20]</sup>, 有研究表明 *Cdk7* 的激活需要 T-loop 环的双磷酸化。Martinez 等<sup>[21]</sup>和 Larochelle 等<sup>[22]</sup>先后分别发现爪蟾(*Xenopus laevis*)和果蝇 *Cdk7* 的激活需要 T-loop 环中 Ser-170 和

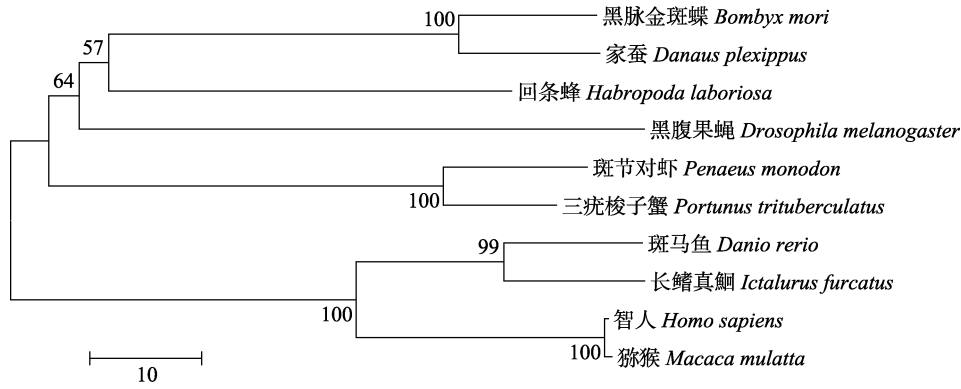


图 3 基于 *Cdk7* 基因编码的氨基酸序列的 NJ 进化树

各物种 *Cdk7* 基因序列 GenBank 登录号: 黑脉金斑蝶(EHJ67061), 家蚕(NP\_001166283), 回条蜂(KOC69523), 黑腹果蝇 (NP\_511044), 三疣梭子蟹(KT804694), 斑节对虾(AIX11620), 猕猴(NP\_001253586), 智人(NP\_001790), 长鳍真鲷(ADO28014), 斑马鱼(NP\_998126).

Fig. 3 NJ tree based on *Cdk7* amino acids

The GenBank accession numbers of different species were as follows: *Danaus plexippus* (EHJ67061), *Bombyx mori* (NP\_001166283), *Habropoda laboriosa* (KOC69523), *Drosophila melanogaster* (NP\_511044), *P. trituberculatus* (KT804694), *Penaeus monodon* (AIX11620), *Macaca mulatta* (NP\_001253586), *Homo sapiens* (NP\_001790), *Ictalurus furcatus* (ADO28014), *Danio rerio* (NP\_998126).

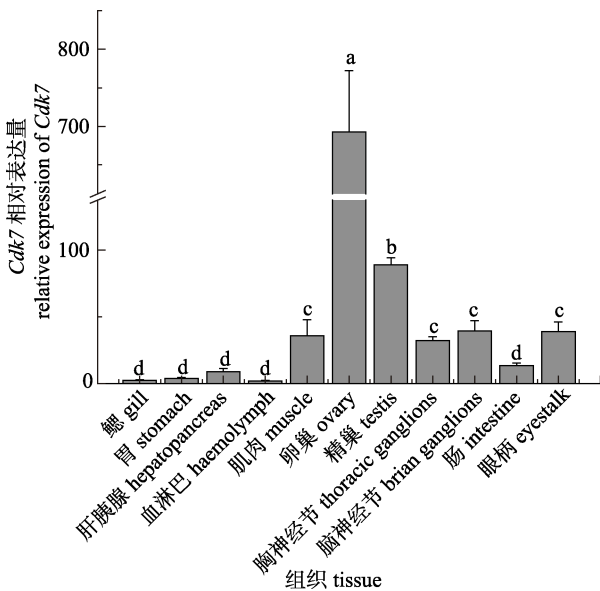


图 4 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在不同组织中的表达分布状况不同的字母上标表示组织间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 4 Distribution of *Cdk7* in different tissues of *Portunus trituberculatus*

The different letters up the error bars indicate significant difference between different tissue ( $P < 0.05$ ).

Thr-176、Ser-164 和 Thr-170 各自两个位点同时处于磷酸化状态。本研究序列分析结果显示, 三疣梭子蟹 *Cdk7* 氨基酸序列 T-loop 中存在 4 个潜在的磷酸化位点(Ser-171, Ser-177, Thr-182, Ser-187), 而确切的磷酸化位点尚需要进一步研究确定。

作为 CAK 的催化亚基, *Cdk7* 基因的差异表达预示着 CAK 活性的差异, 从而造成细胞周期活动频率的不同, 引起细胞增殖、生长等活动区域在时期上的差异性<sup>[3]</sup>。本研究通过分析三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在不同组织中的表达差异情况, 发现其在三疣梭子蟹各组织中均有表达但组织间差异较大, 其中卵巢组织中表达量显著高于其他组织

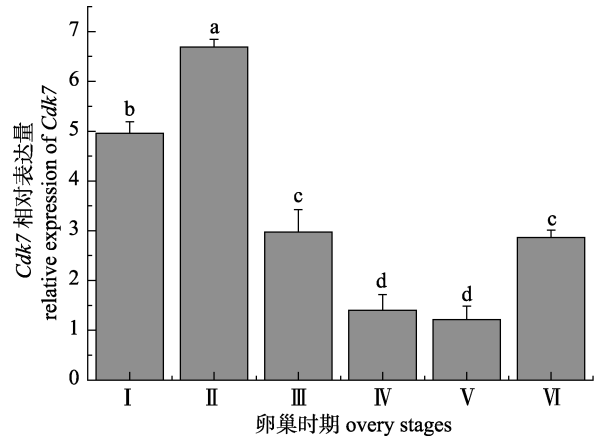


图 5 三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在不同发育时期卵巢组织中的表达

O: 卵巢; 不同的小写字母上标表示不同时期间差异显著 ( $P < 0.05$ ).

Fig. 5 The expression of *Cdk7* gene in ovary of *Portunus trituberculatus* in different gonadal stages O: ovary. Different letters up the error bars indicated significant difference between different ovary stages ( $P < 0.05$ ).

( $P < 0.05$ ), 精巢次之。性腺是细胞分裂非常旺盛的组织, *Cdk7* 基因在该组织中高表达的特点与其在细胞分裂调控中的重要作用相一致。在对三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在不同发育时期的卵巢组织进行表达分析后发现, 该基因在卵巢发育早期(I 期和 II 期卵巢)的卵巢组织中的表达水平显著高于其他卵巢发育时期, 卵巢发育早期为卵原细胞增殖期, *Cdk7* 在此时期的高表达表明其可能在卵原细胞有丝分裂调控中发挥重要作用。*Cdk7* 与 *Cdc2* 基因(编码 MPF 催化亚基)在其他甲壳动物卵巢发育过程中的表达模式类似<sup>[23]</sup>, 该结果说明 *Cdk7* 可能与 *Cdc2* 相似, 通过激活 MPF 参与甲壳动物早期卵巢发育调控。

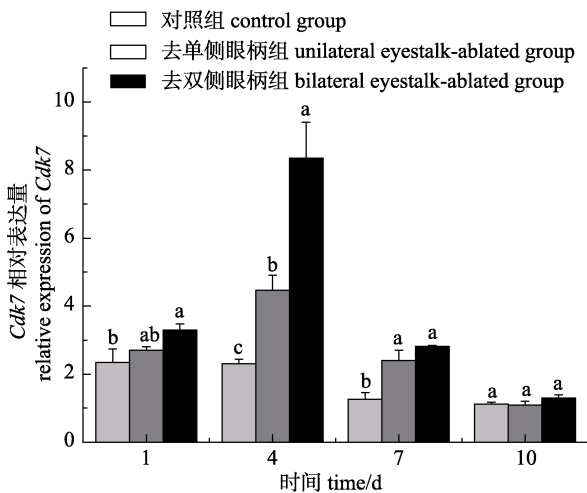


图 6 去眼柄后三疣梭子蟹卵巢组织中 *Cdk7* 基因的表达差异

不同的小写字母上标表示同一时间点不同处理组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 6 The expression of *Cdk7* gene in ovary of *Portunus trituberculatus* after eyestalk ablation. The different letters up the error bars indicated significant difference between groups at the same time ( $P < 0.05$ ).

甲壳动物眼柄中的 X-器官囊腺复合体是调控性腺发育的关键部位, 其合成分泌的性腺抑制激素(GIH)可抑制卵巢发育, 去除眼柄是生产中促进性腺发育的一种常用方式, 但这不可避免地会造成亲体损伤, 且存在卵质量下降、孵化率降低的缺陷<sup>[24-25]</sup>。为探寻同样促进性腺发育而降低不利影响的方法, 近些年研究者针对去眼柄促进性腺发育的内在分子机制开展了较为深入的研究<sup>[26-28]</sup>。

Preechaphol 等<sup>[29]</sup>在去除斑节对虾单侧眼柄后发现卵巢成熟加快, 孕酮胞膜受体组件 1 和孕酮胞内受体相关蛋白 p23 的表达量显著上调, 这说明孕酮介导的卵母细胞成熟途径可能因眼柄的去除被进一步激活, 而 MPF 作为卵母细胞成熟的关键调控因子, 其激活过程受孕酮介导<sup>[29-30]</sup>。*Cdk7* 作为 CAK 的催化亚基, 对 MPF 的活性也有着调节作用。Uawisetwathana 等<sup>[31]</sup>在去除斑节对虾单侧眼柄后发现 *Cdk7*、*Cyclin B* 和 *Cdc2* 基因在卵巢组织中的表达量都有显著上调。本研究中, 去除眼柄后第 1、4、7 天三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因在卵巢组织中的表达量相对于对照组都有显著升高, 且去双侧眼柄组表达量显著高于去单侧眼柄组。因此, 笔者推测去除眼柄对于卵巢成熟的促进作用可能与 *Cdk7* 参与的 MPF 激活有关。

本研究通过 RACE 技术克隆得到三疣梭子蟹 *Cdk7* 基因 cDNA 序列全长, 分析了该基因在三疣梭子蟹不同组织、不同发育时期卵巢组织及去除眼柄后的卵巢组织中的表达差异, 推测其参与了三疣梭子蟹卵母细胞成熟分裂调控, 为进一步研究三疣梭子蟹卵母细胞成熟分裂及去眼柄对甲壳动物卵巢发育促进作用的分子机制提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Schachter M M, Fisher R P. The Cdk-activating kinase Cdk7: taking yes for an answer[J]. Cell Cycle, 2013, 12(20): 3239-3240.
- [2] Fisher R P. Secrets of a double agent: Cdk7 in cell-cycle control and transcription[J]. J Cell Sci, 2005, 118(22): 5171-5180.
- [3] Chu L, Qian M, Yan Y C. Advances in the studies of cyclin development kinase-activating kinase (CAK)[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2006, 18(2): 127-132. [储琳, 钱旻, 严缘昌. 细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶(CAK)的研究进展[J]. 生命科学, 2006, 18(2): 127-132.]
- [4] Fesquet D, Labbe J C, Derancourt J, et al. The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues[J]. EMBO J, 1993, 12(8): 3111-3121.
- [5] Kaldis P. The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals[J]. Cell Mol Life Sci, 1999, 55(2): 284-296.
- [6] Phinyo M, Nounurai P, Hiransuchaler R, et al. Characterization and expression analysis of Cyclin-dependent kinase 7

- gene and protein in ovaries of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Aquaculture*, 2014, 432: 286–294.
- [7] Roy R, Adamczewski J P, Seroz T, et al. The MO15 cell cycle kinase is associated with the TF II H transcription-DNA repair factor[J]. *Cell*, 1994, 79(6): 1093–1101.
- [8] Shiekhhattar R, Mermelstein F, Fisher R P, et al. Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TF II H[J]. *Nature*, 1995, 374(6519): 283–287.
- [9] Fujii W, Nishimura T, Kano K, et al. CDK7 and Cyclin H are components of CDK-activating kinase and are required for meiotic progression of pig oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(6): 1124–1132.
- [10] Kelso T W, Baumgart K, Eickhoff J, et al. Cyclin-dependent kinase 7 controls mRNA synthesis by affecting stability of preinitiation complexes, leading to altered gene expression, cell cycle progression, and survival of tumor cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(19): 3675–3688.
- [11] Ji Q B, Xu X J, Zhang Q, et al. Construction and identification of plasmid vector of *Cdk7*[J]. *Military Medical Sciences*, 2014, 38(12): 932–935. [冀全博, 徐小洁, 张强, 等. 人 *CDK7* 基因真核表达载体的构建与鉴定[J]. *军事医学*, 2014, 38(12): 932–935.]
- [12] Darbon J M, Devault A, Taviaux S, et al. Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40MO15 catalytic subunit of cdk-activating kinase[J]. *Oncogene*, 1994, 9(11): 3127–3138.
- [13] Ganuza M, Santamaria D. *Cdk7*: open questions beyond the prevailing model[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(19): 3519–3520.
- [14] Tune S. *Crabs of Japan and Adjacent Seas*[M]. Tokyo: Kodansha, 1976: 773–752.
- [15] Sun Y M, Yan Y, Sun J J. Larval development of the swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. *J Fish China*, 1984, 8: 219–226.
- [16] Meng X L, Liu P, Jia F L, et al. De novo transcriptome analysis of *Portunus trituberculatus* ovary and testis by RNA-Seq: Identification of genes involved in gonadal development[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e128659.
- [17] Jia L. Preliminary study on the ovary development of the crab *Portunus trituberculatus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. [贾磊. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)卵巢发育的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.]
- [18] Wu X G, Yao G G, Yang X Z, et al. A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4): 120–127. [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究[J]. *海洋学报(中文版)*, 2007, 29(4): 120–127.]
- [19] Devos M, Mommaerts E, Migeot V, et al. Fission yeast *Cdk7* controls gene expression through both its CAK and C-terminal domain kinase activities[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(9): 1480–1490.
- [20] Dai W T, Fu M J, Zhao C, et al. Molecular cloning and expression analysis of *CDK2* gene from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 1–11. [戴文婷, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 *CDK2* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 1–11.]
- [21] Martinez A M, Afshar M, Martin F, et al. Dual phosphorylation of the T-loop in *cdk7*: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity[J]. *EMBO J*, 1997, 16(2): 343–354.
- [22] Larochelle S, Chen J, Knights R, et al. T-loop phosphorylation stabilizes the *CDK7*-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity[J]. *EMBO J*, 2001, 20(14): 3749–3759.
- [23] Wang L, Zuo D, Lv W W, et al. Characterization of *Cdc2* kinase in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*): Evidence for its role in regulating oogenesis[J]. *Gene*, 2013, 515(2): 258–265.
- [24] Guan Z B, Shui Y, Zhou X, et al. Participation of calmodulin in ovarian maturation induced by eyestalk ablation in red swamp crayfish *Procambarus clarkia*[J]. *Aquac Res*, 2013, 44(10): 1625–1631.
- [25] Shui Y, Shi Y H, Xu Z H, et al. Advances of growth and development in crustaceans induced by eyestalk ablation[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(21): 124–126. [水燕, 史永红, 徐增洪, 等. 眼柄切除快速诱导甲壳动物生长发育研究进展[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(21): 124–126.]
- [26] Lee S O, Jeon J M, Oh C W, et al. Two juvenile hormone esterase-like carboxylesterase cDNAs from a *Pandalus* shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning, tissue expression, and effects of eyestalk ablation[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2011, 159(3): 148–156.
- [27] Bai H K, Qiao H, Li F J, et al. Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation[J]. *Gene*, 2015, 562(1): 22–31.
- [28] Kang B J, Okutsu T, Tsutsui N, et al. Dynamics of vitellogenin and vitellogenesis-inhibiting hormone levels in adult and subadult whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*: relation to molting and eyestalk ablation[J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(1): 12.
- [29] Preechaphol R, Klinbunga S, Yamano K, et al. Molecular cloning and expression of progesterin membrane receptor component 1 (*Pgmrc1*) of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 168(3): 440–449.



- [30] Paul S, Banerjee N, Chatterjee A, et al. Arsenic-induced promoter hypomethylation and over-expression of ERCC2 reduces DNA repair capacity in humans by non-disjunction of the ERCC2-Cdk7 complex[J]. *Metallomics*, 2014, 6(4): 864–873.
- [31] Uawisetwathana U, Leelatanawit R, Klanchui A, et al. Insights into eyestalk ablation mechanism to induce ovarian maturation in the black tiger shrimp[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24427.

## Cloning and expression analysis of *Cdk7*, a gene involved in ovarian development, from swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

JIA Fulong<sup>1,2</sup>, MENG Xianliang<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, GAO Baoquan<sup>1,2</sup>

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

**Abstract:** The full-length cDNA encoding *Cdk7* was cloned from swimming crab (*Portunus trituberculatus*) using the rapid amplification of cDNA ends technique (RACE). The complete cDNA was 1257 bp long, and contained an open reading frame (ORF) of 1056 bp, a 23-bp 3' untranslated region, and a 178-bp 5' untranslated region. The ORF encoded a polypeptide of 351 amino acids containing a serine/threonine kinase domain and a T-loop. An homology analysis revealed that the *Cdk7* of *P. trituberculatus* had high identity with those from other species. Quantitative real-time PCR analyses showed that *Cdk7* transcripts were present in all of the tissues examined, with the highest transcript levels in the ovary. The high transcript level of *Cdk7* in the ovary was consistent with its role in regulating cell division. The *Cdk7* mRNA levels in oögonia were higher in the first and the second stages than in the other stages of oövery development, indicating that *Cdk7* may play an important role in oögonial mitosis. After eyestalk ablation, the transcript levels of *Cdk7* significantly increased in the ovary to peak on day 4, and then decreased. Together, these results suggested that *Cdk7* may play important roles in ovarian development, especially oögenesis, in *P. trituberculatus*. These data provide useful information for further research on the regulation of gonad development in this species and other crustaceans.

**Key words:** *Portunus trituberculatus*; *Cdk7*; gene cloning; eyestalk ablation; gene expression

**Corresponding author:** LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn