

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15473

斑节对虾 *cyclin G2* 基因克隆及不同刺激下的表达分析

谢波波^{1,2}, 郭松^{1,2}, 傅明骏¹, 赵超¹, 杨其彬^{1,3}, 焦宗珪⁴, 邱丽华^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 中国水产科学研究院 南海水产研究所 热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018;

4. 广东省海洋工程职业技术学校, 广东 广州 510320

摘要: 细胞周期蛋白 G2(cyclin G2)是细胞周期中的重要调控因子。该研究初步探讨斑节对虾(*Penaeus monodon*)细胞周期蛋白 G2(*Pmcyclin G2*)在卵巢发育中的作用, 利用 RACE 技术克隆获得 4075bp *Pmcyclin G2* cDNA 全长, 其开放阅读框(ORF)1161bp, 编码 386 个氨基酸。利用荧光定量 PCR 技术研究了 *Pmcyclin G2* 组织表达模式, 结果显示, *Pmcyclin G2* 在斑节对虾的心脏、血淋巴、肝胰腺、卵巢等组织中均有表达, 其中肌肉中表达量最高; 卵巢发育不同阶段 *Pmcyclin G2* 的表达分析则表明, *Pmcyclin G2* 在 III 期表达量最高; 注射 5-羟色胺(5-HT)能诱导卵巢 *Pmcyclin G2* 基因表达升高, 多巴胺(DA)则抑制卵巢中 *Pmcyclin G2* 基因表达。利用原核表达技术获得了 cyclin G2 的体外重组蛋白, Western Blot 分析证实重组蛋白为 cyclin G2 蛋白。此结果为进一步研究该蛋白的功能提供了条件。以上研究结果表明, *Pmcyclin G2* 基因可能与斑节对虾卵母细胞发育有密切关系, 该结果可为进一步探究斑节对虾卵巢的发育机理提供理论依据。

关键词: 斑节对虾; 周期蛋白 G2; 卵巢发育; 5-羟色胺; 多巴胺

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)04-0823-10

细胞周期进程是由细胞周期蛋白(cyclins), 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)等精密调控的过程^[1-3]。细胞周期蛋白 G2(cyclin G2)是新发现的细胞周期蛋白家族成员, 其功能可能主要在细胞周期调控和分化方面起作用^[4-8]。一般情况, cyclins 和 CDKs 结合调控细胞周期进程。研究表明, cyclin G2 在以下两方面不同于其他周期蛋白: 一是 cyclin G2(CCNG2)与蛋白质磷酸脂酶 2A (PP2A)形成复合体 CCNG2-PP2A, 抑制 CDK2, 而 PP2A 的 B'亚基能够促进金鱼(*Carassius auratus*)的卵巢发育^[9-10]; 二是 cyclin G2 在细胞受到生长抑制刺激和抗原

引导细胞周期阻滞或凋亡期间表达上调, 而在增殖的细胞中表达降低^[11-15]。随着细胞周期蛋白广泛和深入的研究, cyclin G2 在一些物种中相继被克隆获得, 如人(*Homo sapiens*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、小鼠(*Mus musculus*)、鲑疮痂鱼虱(*Lepeophtheirus salmonis*)等, 但该基因在斑节对虾中的研究尚未见报道。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是世界三大对虾养殖种类之一, 具有很高的经济价值和营养价值。在斑节对虾养殖过程中, 亲虾繁育技术一直是一个非常重要的限制因素, 但目前对于斑节对虾卵巢发育的分子机理知之甚少。研究表明, 5-羟

收稿日期: 2015-12-14; 修订日期: 2016-01-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101903); 海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014057); 广东省科技计划项目(2014A020208039); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项(A201501A11); 农业部 948 计划项目(2015-Z20); 海南省自然科学基金项目(20163147).

作者简介: 谢波波(1990-), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖研究. E-mail: 15521095991@163.com

通信作者: 邱丽华(1971-), 女, 博士, 研究员, 从事海洋生物功能基因研究. E-mail: qiu902@126.com

色胺(5-HT)和多巴胺(DA)作为与对虾卵巢发育相关的重要神经递质与卵巢发育进程密切相关^[16-17], 因此对斑节对虾卵巢发育相关机理进行研究势在必行。本研究通过 RACE 技术, 首次在斑节对虾中获得了 *cyclin G2* 基因的 cDNA 全长, 并预测其基因结构和功能; 然后, 通过实时荧光定量 PCR(qPCR)技术, 分析了斑节对虾 *cyclin G2*(*Pmcyclin G2*) mRNA 在不同组织和卵巢发育各个时期的相对表达量, 且探究 5-HT 和 DA 的注射对卵巢中 *Pmcyclin G2* mRNA 表达的影响, 最后构建了 *Pmcyclin G2* 原核表达体系, 初步研究了该蛋白在体外重组表达。本研究旨在为深入了解斑节对虾卵巢发育调控的分子机理提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用斑节对虾均来源于中国水产科学院南海水产研究所深圳试验基地, 100~200 g, 水泥池暂养 3 天。取斑节对虾的卵巢、心脏、肝胰腺、胃、鳃、肌肉、胸神经和肠等组织以及卵巢发育到 I-V 期的卵巢组织样品(组织切片确定卵巢分期), 液氮保存备用。5-羟色胺(5-HT)和多巴胺(DA)注射实验时, 设置 PBS 为对照组, I 期斑节对虾(22.42 g±2.15 g)注射量为 50 μg/g 体重, 分别在 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 各取 3 尾斑节对虾卵巢保存于 RNAlater (Invitrogen, USA)中, 然后保存-80 备用。

1.2 总 RNA 提取与逆转录

用上述所取的组织样品, 按 Trizol(Invitrogen, USA)说明书提取不同组织的总 RNA, 溶解于 DEPC 处理水, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测浓度。以总 RNA(2 μg)为模板, 根据 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech, USA)说明书操作, 在反转录酶的作用下合成 cDNA 第一链。

1.3 基因的克隆与测序

根据本实验室斑节对虾转录组测序结果, 筛选得到 *PmCyclin G2* EST 序列, 使用 Primer 5.0 软件设计特异性引物 Cyclin G2-3GSP1(5'-AGGTAGT

GCGGCACACAAAAGATAC-3') 和 Cyclin G2-3GSP2(5'-GTAATCGATGCGACAGAACCTCGT-3')。根据 SMARTTM RACE cDNA 合成试剂盒(Clontech, USA)说明书扩增斑节对虾 *cyclin G2* 基因的 3'未知序列, 具体方法依据戴文婷等^[18]试验步骤。对 PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳后, 用胶回收试剂盒(OMEGA)对目的片段进行回收, 回收产物与 pMD18-T(TaKaRa, Japan)载体连接, 转化到 DH5α, 挑取阳性克隆送公司测序。

1.4 序列分析

利用在线网页 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)查找开放阅读框; 用 NCBI 网站上的 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列同源性比对和相似性搜索; 用 Bioedit 软件进行多序列比对; 用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)程序预测信号肽; 磷酸化位点预测采用 NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)程序; 糖基化位点预测采用 NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)程序; 构建系统进化树采用 MEGA5.0 软件。

1.5 实时荧光定量 PCR(Real-time Quantitative PCR)

提取斑节对虾不同组织、发育各时期的卵巢和注射 5-羟色胺和多巴胺不同时间点组织的总 RNA, 按照 SYBR PremixExTaqTM Kit (TaKaRa, Japan)说明书逆转录为 cDNA。设计定量引物 qG2-F(5'-CCTCACATCCTCCTATCATT-3')和 qG2-R (5'-GAACTCTTCGTCGTAATCG-3'), EF-F(5'-AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT-3')和 EF-R (5'-CGTGGTGCATCTCCACAGACT-3')为内参 EF-1α 基因的引物, 目的基因和内参基因各设置 3 个重复, 使用 LC480 定量仪器进行试验, *PmCyclin G2* 相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

1.6 *Pmcyclin G2* 的原核表达

根据已经获得的 *Pmcyclin G2* 序列, 设计原核表达引物 bG2-F(5'-CCGGAATTC ATGGCGTCGCTCCGTCTCCT-3')和 bG2-R(5'-CCCAAGCTTTGCAAGCGGTTATGTTTTCGGT-3'), 引物 5'

端加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点和保护碱基。双酶切 *cyclin G2* 和 pET21a, 用 T4 连接酶连接, 转化到 DH5 α 挑取阳性克隆进行测序, 将测序正确的重组质粒 pET21a-Pmcyclin G2 转入大肠杆菌 BL21 进行表达, 将重组菌液按照 1:100 进行接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基的锥形瓶, 37℃ 培养 2 h 左右, 使菌液 OD 值达到 0.4~0.6, 加入异丙基硫代半乳糖甘(IPTG)。在 37℃ 条件下诱导表达, 在诱导 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 取样备用。诱导产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 考马斯亮蓝染色。

1.7 免疫印迹(Western blot)

将 SDS-PAGE 胶中的蛋白转至硝酸纤维素(NC, Millipore, USA)膜上, 通过预染蛋白 Marker 转移效果检测目的蛋白的转移情况, 然后进行免疫印迹(Western blot)检验。主要步骤为: 转膜后用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭 12 h; 次日 PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 带有 HRP 标记的兔源 6 $\times$ His 标签抗体(1:2000, *V:V*, 封闭液稀释)中室温孵育 60 min; PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 之后用

HRP/DAB 显色试剂盒(天根生物)避光显色。

1.8 数据分析

使用 SPSS 22 软件进行数据单因素方差分析(one-way ANOVA), 结果以“平均值 $\pm$ 标准差”(x $\pm$ SD)表示, 差异显著 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 Pmcyclin G2 基因的序列分析

使用 SMART RACE 技术, 克隆获得 *Pmcyclin G2* 基因(GenBank 登录号: KP676145)全长 cDNA 为 4075 bp, 包括 189 bp 的 5'非编码区(5'UTR)和 2725 bp 的 3'UTR, 1161 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 386 个氨基酸(aa), 预测氨基酸序列理论相对分子量和等电点分别为 43.4 kD 和 8.25。BLAST 同源性分析以及 SMART 分析显示, *Pmcyclin G2* 序列包含 1 个保守的周期蛋白框 cyclin box(图 1); 利用 NetNGlyc 1.0 和 NetPhos 2.0 对预测氨基酸序列分析, 表明 *Pmcyclin G2* 含有 2 个糖基化位点和 29 个潜在的磷酸化位点; SignalP 3.0 在线软件检测表明, *Pmcyclin G2* 不含有信号肽序列。

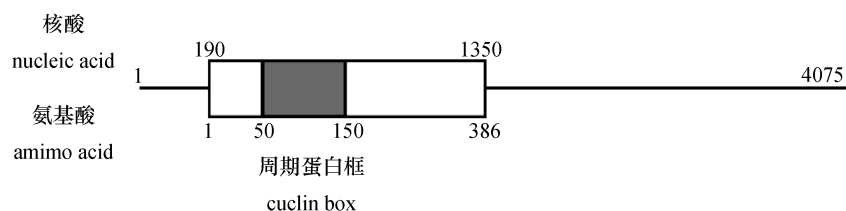


图 1 *Pmcyclin G2* 基因 cDNA 全长序列示意图

Fig. 1 A schematic diagram of full-length cDNA of *Pmcyclin G2*

2.2 多重比对和进化树分析

从 NCBI 选取哺乳类、两栖类、鱼类和节肢动物类等物种的 *cyclin G2* 氨基酸序列, 与斑节对虾 *cyclin G2* 氨基酸序列进行多重比对的结果显示(图 2), *Pmcyclin G2* 与鲑疮痂鱼虱(*Lepeophtheirus salmonis*)、大型蚤(*Daphnia magna*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、斑马鱼(*Danio rerio*)、安大略鲑(*Salmo salar*)、绿蠍龟(*Chelonia mydas*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、小鼠(*Mus musculus*)、野牦牛(*Bos mutus*)、裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*)、猕猴(*Macaca mulatta*)、普通狨(*Callithrix*

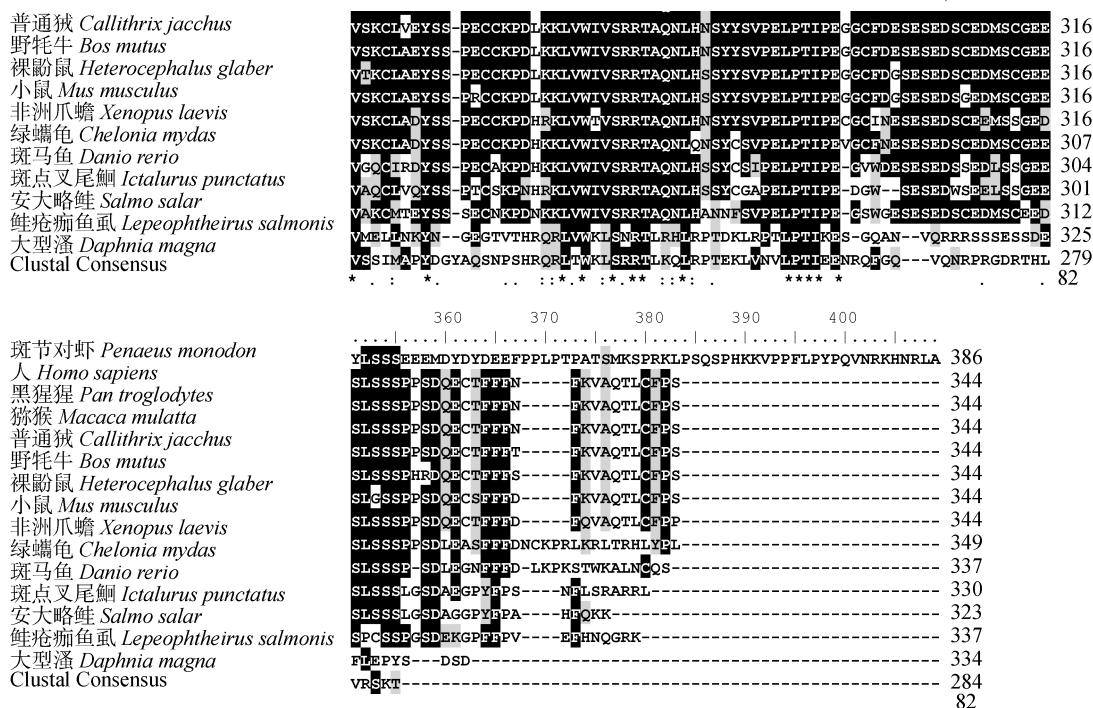
jacchus)、黑猩猩(*Pan troglodytes*)和人(*Homo sapiens*)的 *cyclin G2* 一致性分别为 48%、47%、31%、30%、31%、29%、33%、33%、31%、30%、31%、31%、31%、31%, 揭示 *cyclin G2* 在不同物种中保守性较低。NJ 进化树分析(图 3), *Pmcyclin G2* 与鲑疮痂鱼虱、大型蚤聚为一支, 脊椎动物聚为一支。

2.3 Pmcyclin G2 mRNA 在斑节对虾组织中的表达分析

利用 qPCR 技术, 检测 *Pmcyclin G2* mRNA 在斑节对虾各个组织中的表达情况, 发现该基因的 mRNA 在肌肉中的表达量最高, 心脏次之, 肝

(图 2 待续 Fig. 2 continued)

(续图 2 continued Fig. 2)

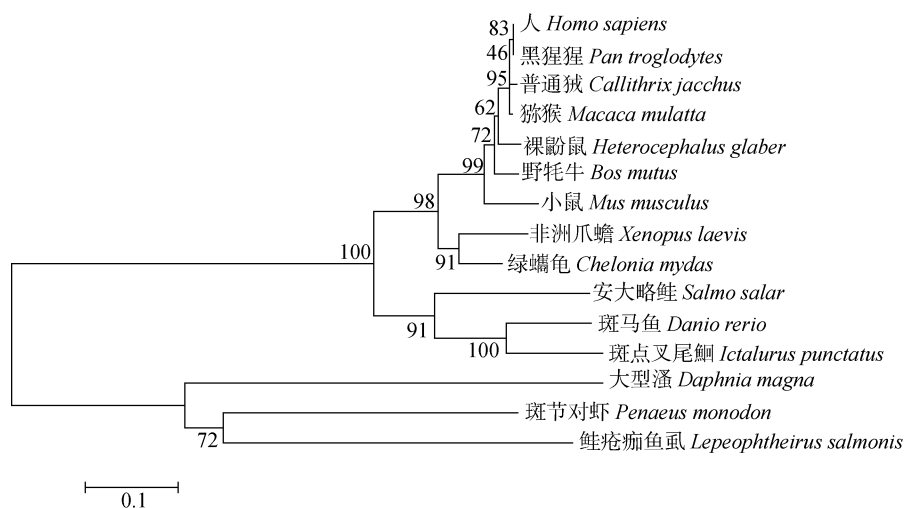
图 2 斑节对虾 *Pmcyclin G2* 和其他物种 *cyclin G2* 氨基酸序列多重比对

黑色背景部分为一致性和灰色背景部分为相似性。

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of cyclinG2 from *penaeus monodon* and other species

Identical and similar sites are shown with sparks (*) and dots (. or :), respectively.

多重序列比对采用 GenBank 上的 cyclin G2 序列登录号: 人(*Homo sapiens*): NP_004345.1; 黑猩猩(*Pan troglodytes*): JAA07024.1; 猕猴(*Macaca mulatta*): EHH25900.1; 普通狨(*Callithrix jacchus*): JAB51783.1; 野牦牛(*Bos mutus*): ELR53962.1; 裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*): EHB09510.1; 小鼠(*Mus musculus*): NP_031661.3; 非洲爪蟾(*Xenopus laevis*): NP_001084883.1; 绿蠵龟(*Chelonia mydas*): EMP29469.1; 斑马鱼(*Danio rerio*): NP_998337.1; 斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*): AHH42919.1; 安大略鲑(*Salmo salar*): NP_001133438.1; 鲑疮痂鱼虱(*Lepeophtheirus salmonis*): ADD38909.1; 大型蚤(*Daphnia magna*): JAN05083.1.

图 3 利用 MEGA5.0 软件基于 *cyclin G2* 基因编码的氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

分叉处数值表示 1000 次重复抽样所得到的置信度百分比。

Fig. 3 Building NJ phylogenetic tree based on amino acid sequence encoded by *cyclin G2* via MEGA 5.0 software

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1000 replicates).

胰腺中最低, 在鳃等其他 5 个组织的中也有表达(图 4)。

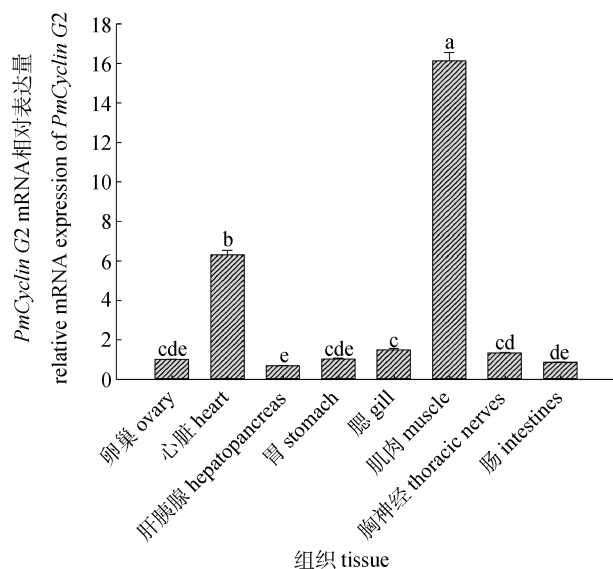


图 4 *Pmcyclin G2* 在斑节对虾各个组织中的相对表达
图中值为平均值±标准差($n=3$); 不同的小写字母表示显著性差异($P<0.05$).

Fig. 4 Relative expressions of *Pmcyclin G2* transcripts in different tissues

Each Bar represent the mean±SD ($n=3$). Different lowercase letters indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

2.4 卵巢发育各时期 *Pmcyclin G2* mRNA 的表达

利用 qPCR 技术, 对斑节对虾卵巢发育各个时期 *Pmcyclin G2* 的表达量进行检测, 发现它在

卵巢发育的第 III 期相对表达量显著高于其他时期, 在 IV 期和 V 期中表达下降(图 5)。

2.5 5-HT 和 DA 注射后卵巢中的表达模式

在卵巢中, 注射 5-HT 12 h 后, *Pmcyclin G2* 的表达量和对照组相比显著增加, 在 96 h 达到最大表达量, 为对照组的 5.5 倍($P<0.01$); 注射 DA 12h 后, *Pmcyclin G2* 的表达量和对照组相比明显下降, 在注射 96 h 后恢复初始水平(图 6)。

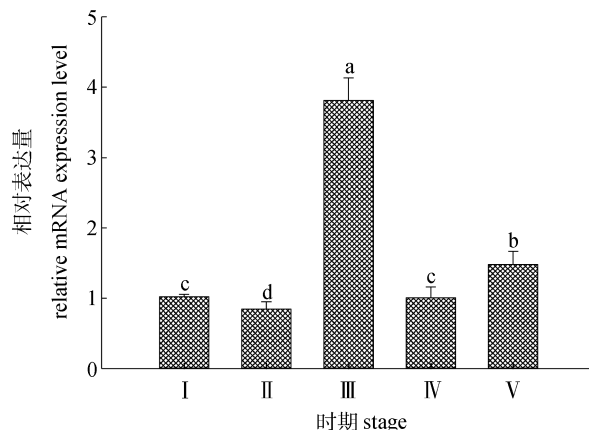


图 5 *Pmcyclin G2* 在斑节对虾卵巢发育各时期的表达
I. 卵原细胞期; II. 核染色质期; III. 周边核仁期; IV. 卵黄囊期; V. 成熟期; 图中值为平均值±标准差($n=3$).

Fig. 5 Relative expression level of *Pmcyclin G2* at different developmental stages of ovarian development

I. ovogonium stage; II. chromatin nucleolus stage; III. Perinucleolus Stage; IV. yolk stage; V. cortical rods tage; Each Bar represent the mean ± SD ($n=3$).

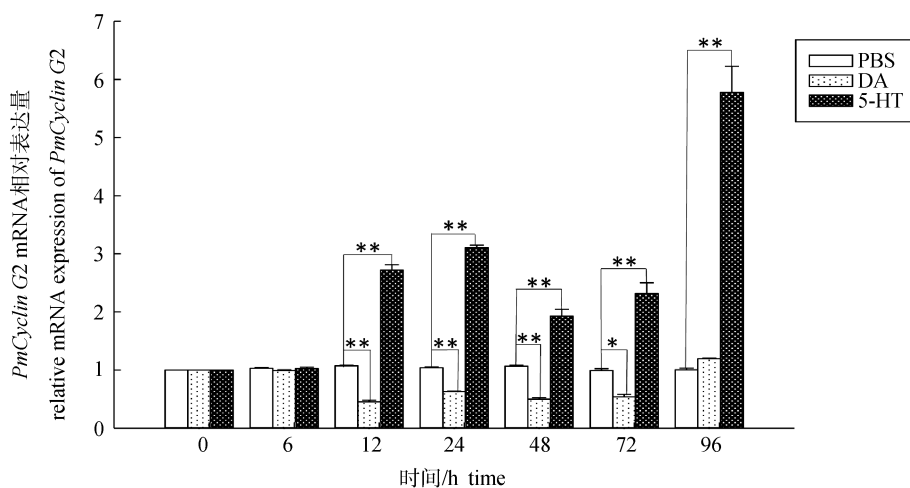


图 6 注射 5-HT 和 DA 后 *Pmcyclin G2* 在斑节对虾卵巢中的相对表达量

图中值为平均值±标准差($n=3$); *表示显著性差异($P<0.05$), **表示极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 6 Relative expression levels of *Pmcyclin G2* in ovary while shrimp were injected with 5-HT and DA

Each Bar represent the mean±SD ($n=3$). One asterisk indicates statistically significant differences ($P<0.05$), and double asterisks indicate statistically extremely significant differences ($P<0.01$).

2.6 Pmcyclin G2 原核表达

采用 IPTG 诱导重组表达菌株, 并对菌液进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示试验组和未诱导、空质粒对照组相比, 诱导出的蛋白分子量和理论值 43.4 kD 相符合。Western blot 验证发现, 诱导的重组质粒和未诱导的相比可以检测出 His 标签, 该结果和 SDS-PAGE 电泳检测结果是一致的(图 7)。

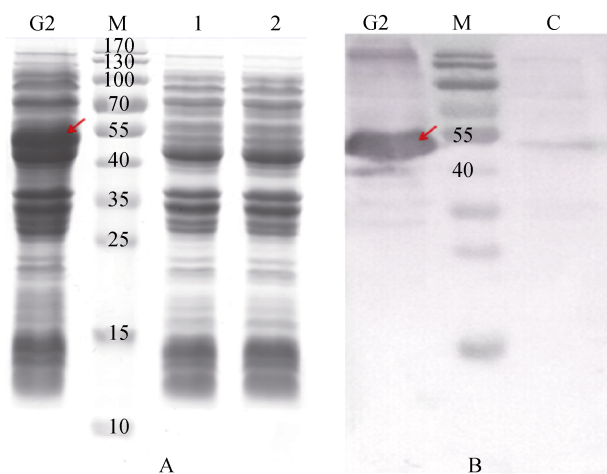


图 7 *PmCyclin G2* 在大肠杆菌中的表达

A: SDS-PAGE 分析的重组蛋白的表达情况, G2 是试验组, M 为蛋白标准, 1 是未诱导对照, 2 是空质粒对照。B: Western Blot 分析的重组蛋白效果, G2 为试验组, M 为蛋白标准(10~170 kD), C 为未诱导对照。图中箭头表示目的条带位置。

Fig. 7 Expression of *PmCyclin G2* in *E. coli*

A: SDS-PAGE analysis of expression of the recombinant *PmCyclin G2* protein. G2 is experimental, M is prodein Maker (10~170kDa), 1 is the control group that without induction, 2 is another control that pET21a vector was used. B: Western blot analysis of the recombinant *PmCyclin G2* protein. G2 is experimental, M is prodein Maker (10~170 kD), C is the control that without induction. Arrows in figure show objective straps.

3 讨论

细胞周期调控是细胞增殖调节的核心环节, cyclins-CDKs-CKIs 形成一个精密的调控网络对细胞周期进行监督调控。Cyclin G2 不同于对细胞增殖起正调节作用的经典周期蛋白, 而对细胞增殖起负调节作用^[1]。邱高峰等^[19]发现细胞周期相关蛋白参与调控日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的卵巢发育, 但目前对于周期蛋白参与调控斑节对虾卵巢发育的分子机理了解不深, 因

此, 对 Cyclin G2 进行研究分析有助于对斑节对虾卵巢发育分子机理进行了解。

该研究从斑节对虾中克隆获得了 *Pmcyclin G2* cDNA 全长 4075 bp, 其开放阅读框 1161 bp, 编码 386 个氨基酸(aa), 预测氨基酸序列理论相对分子量为 43.4 kD。利用生物信息学分析了目的基因的结构和特征, 该基因编码的氨基酸序列有一个保守的周期蛋白框(cyclin box), 其结构域为 50~150 aa, 多重序列比对发现斑节对虾 *Pmcyclin G2* 和其他物种在此区域有相当高的保守性。研究表明, 细胞周期蛋白均包含一个保守的周期蛋白框, 该序列介导 Cyclin 与 CDK 结合。Cyclin 与 CDK 结合后具有激酶的活性, 使靶蛋白磷酸化而产生相应的生理效应^[20]。以上研究表明克隆得到的基因是 *cyclin G2* 基因。

利用 qPCR 技术检测 *Pmcyclin G2* mRNA 在斑节对虾各个组织中的表达情况, 结果表明它在肌肉和心脏中的表达较高, 而在胰腺腺组织中的表达量最低。这可能由 *cyclin G2* 自身的作用特点调控的。其在细胞受到生长抑制刺激和抗原引导细胞周期阻滞或凋亡期间表达上调, 而在增值的细胞中表达降低^[11]。至于 *cyclin G2* 在斑节对虾卵巢中的表达量比较低, 而其他周期蛋白 *cyclin A*、*cyclin B*、*cyclin E* 和 *cyclin Y* 在斑节对虾卵巢中表达量最高^[21-24], *cyclin* 基因家族不同成员在斑节对虾组织中的表达差异表明不同的 *cyclin* 基因的功能具有一定的差异。黄建华等^[25]研究结果表明, 在斑节对虾卵巢发育中, I 期和 II 期主要进行卵原细胞和卵母细胞的增殖, III 期进行卵母细胞增大, III 期是最关键的时期^[26-27]。*Pmcyclin G2* mRNA 在卵巢发育的 III 期相对表达量显著高于其它时期, 这是因为 *cyclin G2* 在增值的细胞中表达降低, 卵巢 III 期中的细胞内卵黄颗粒增加, 细胞增大, 表明该基因可能与卵母细胞的增殖有关, 参与了卵巢的发育, 可能在卵巢发育中起着重要作用。

甲壳动物的卵巢成熟是由眼柄上的 X-器官窦腺系统合成和释放的多种神经激素调控, 5-HT 和 DA 可以调节 X-器官窦腺系统神经激素的合成和释放^[28-31]。以往对甲壳动物 5-HT 和 DA 的研

究,主要集中在卵巢发育方面: Richardson 等^[32]首次在招潮蟹(*Uca pugilator*)发现 5-HT 可以促进卵巢发育; Sarojini 等^[33]在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)发现 DA 通过抑制促性腺激素释放抑制卵巢发育; Tinikul 等^[29]的实验结果表明, 5-HT 可以促进罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)卵巢的成熟和产卵, DA 则产生抑制作用; Vaca 等^[34]在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)发现 5-HT 可以促进卵巢的发育, DA 会抑制卵巢发育; Kanokpan 等^[35]在斑节对虾发现 5-HT 可以诱导卵巢的发育和产卵率, 主要存在于卵母细胞, DA 会抑制卵巢发育。Shirley 等^[36]在刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)发现, 注射 5-HT 诱导眼柄和脑中 5-羟色胺受体基因(5HT1)的表达上调, 5HT1 在眼柄和脑中的上调对于信号转导途径或者调控基因表达是非常重要的。类似的, 本研究在斑节对虾中注射 5-HT 12 h 后, 发现其卵巢中 *Pmcyclin G2* mRNA 表达量和对照组相比显著增加, 在 96 h 后表达量是对照组的 5.5 倍($P < 0.01$); 而注射 DA 后, 其卵巢中 *Pmcyclin G2* mRNA 表达量和对照组相比在 12 h 后显著降低, 96 h 后恢复初始水平^[16], 故推测 5-HT 和 DA 在斑节对虾卵巢发育中可能起着重要作用。卵巢的成熟过程不仅有卵母细胞的增殖, 也有包括卵黄颗粒积累、卵母细胞的增大。虽然 *cyclin G2* 在增值的细胞中表达降低, 但是斑节对虾注射 5-HT 和 DA 后, 卵巢中 *Pmcyclin G2* mRNA 表达量较对照组增加或降低的现象, 可能与此时期斑节对虾的卵巢主要进行卵母细胞的增大有关。但是, 斑节对虾中 *cyclin G2* 如何参与到卵巢发育中的具体分子机制还不清楚, 有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Tian Y L, Liu J, Zhang X. Eukaryotic expression vector and its function of cyclin G2 in human[J]. China Biotechnology, 2006, 26(6): 30–35. [田玉楼, 刘洁, 张学. 人细胞周期蛋白 G2 基因真核表达载体构建及其功能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(6): 30–35.]
- [2] Lin S T, Yang Y Z. The mechanism of cyclin G involved in cell cycle regulation[J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2006, 15(3): 320–322. [林松挺, 杨玉珍. 细胞周期蛋白 G 参与细胞周期调控的机制[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2006, 15(3): 320–322.]
- [3] Jensen M R, Audolfsson T, Keck C L, et al. Gene structure and chromosomal localization of mouse cyclin G2 (Ccng2)[J]. Gene, 1999, 230(2): 171–180.
- [4] Jia J S, Xu S R. Research Status of cyclin G[J]. International Journal of Blood Transfusion and Hematology, 2004, 27(2): 129–133. [贾晋松, 徐世荣. 细胞周期素 G 的研究现状[J]. 国外医学: 输血及血液学分册, 2004, 27(2): 129–133.]
- [5] Song Y L, Hu G H. Cyclin G2 and head and neck cancer[J]. Journal of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2006, 30(1): 8–11. [宋勇莉, 胡国华. 细胞周期蛋白 G2 与头颈肿瘤[J]. 国际耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2006, 30(1): 8–11.]
- [6] Kimura SH, Nojima H. Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein[J]. Gen Cells, 2002, 7(8): 869–880.
- [7] Endo Y, Fujita T, Tamura K, et al. Structure and chromosomal assignment of the human cyclin G gene[J]. Genomics, 1996, 38(1): 92–95.
- [8] Nakamura T, Sanokawa R, Sasaki Y F, et al. Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain[J]. Exper Cell Res, 1995, 221(2): 534–542.
- [9] Fu H, Ma H, Zheng C, et al. Molecular cloning and differential expression patterns of the regulatory subunit B' gene of PP2A in goldfish, *Carassius auratus*[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2009, 52(8): 724–732.
- [10] Wang S, Zeng Y. The Significance and the Expression of CCNG2 and CDK2 in colon cancer[J]. Journal of Hunan Normal University: Medical Sciences, 2015(5): 2. [王赛, 曾亚. CCNG2 和 CDK2 在结肠癌中的表达及意义[J]. 湖南师范大学学报: 医学版, 2015(5): 2.]
- [11] Bennin D A, Don A S A, Brake T, et al. Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest[J]. J Biolog Chem, 2002, 277(30): 27449–27467.
- [12] Horne M C, Goolsby G L, Donaldson K L, et al. Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue-specific and cell cycle-regulated expression[J]. J Biolog Chem, 1996, 271(11): 6050–6061.
- [13] Cui X, Liu A, Xu Z, et al. Expression of Cyclin G2 and its clinical significance in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2009, 23(6): 277–279. [崔晓峰, 刘爱军, 徐振明, 等. CyclinG2 在喉鳞癌组织中的表达及其与微血管密度的相关性研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2009, 23(6):

- 277–279.]
- [14] Shan G, Shan S, Zhang X. Expression and clinical significance of cyclin G1 and cyclin G2 in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 18: 268–272. [陕光, 陕声国, 张孝斌, 等. 细胞周期素 G1 和 G2 在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2009, 18: 268–272.]
- [15] Choi M-G, Noh J H, An J Y, et al. Expression levels of cyclin G2, but not cyclin E, correlate with gastric cancer progression[J]. J Surg Res, 2009, 157(2): 168–174.
- [16] Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R, et al. Effects of gonadotropin-releasing hormones and dopamine on ovarian maturation in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and their presence in the ovary during ovarian development[J]. Aquaculture, 2014, 420: 79–88.
- [17] Wen W G, Huang J H, Yang Q B, et al. The role of serotonin in the ripening process from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*)[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(1): 59–63. [温为庚, 黄建华, 杨其彬, 等. 血清素在斑节对虾催熟过程中的作用[J]. 南方水产科学, 2009, 5(1): 59–63.]
- [18] 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.]
- [19] Qiu G F, Yamano K. Three forms of cyclin B transcripts in the ovary of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*: their molecular characterizations and expression profiles during oogenesis[J]. Compar Biochem Physiol Part B: Biochem Molec Biol, 2005, 141(2): 186–195.
- [20] Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases[J]. Trends Biochem Scie, 2005, 30(11): 630–641.
- [21] Visudtiphole V, Klinbunga S, Kirtikara K. Molecular characterization and expression profiles of cyclin A and cyclin B during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Compar Biochem Physiol Part A: Molec Integr Physiol, 2009, 152(4): 535–543.
- [22] Zhao C, Fu M, Zhou F, et al. Characterization and expression analysis of a cyclin B gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Genet Molec Res: GMR, 2014, 14(4): 13380–13390.
- [23] Zhao C, Fu M J, Jiang S G, et al. Characterization and expression analysis of a cyclin E gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 464–473. [赵超, 傅明骏, 江世贵, 等. 斑节对虾细胞周期蛋白 E 基因的克隆与表达分析[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 464–473.]
- [24] LI W J, FU M J, ZHAO C, et al. Characterization and expression analysis of a cyclin Y gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 896–907. [李伟杰, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾细胞周期蛋白 Y 基因克隆与原核表达[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 896–907.]
- [25] Huang J H, Zhou F L, Ma Z M, et al. Morphological and histological observation on ovary development of *Penaeus monodon* from northern South China Sea[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(3): 47–52. [黄建华, 周发林, 马之明, 等. 南海北部斑节对虾卵巢发育的形态及组织学观察[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(3): 47–52.]
- [26] Huang J H, Zhou F L, Ma Z M, et al. Morphological and histological observation on ovary development of *Penaeus monodon* from northern South China Sea[J]. J Trop Oceanogr, 2005, 25(3): 47–52.
- [27] Tan-Fermin J D. Effects of unilateral eyestalk ablation on ovarian histology and oocyte size frequency of wild and pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock[J]. Aquaculture, 1991, 93(1): 77–86.
- [28] Chen Y, Fan H, Hsieh S, et al. Physiological involvement of DA in ovarian development of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2003, 228(1): 383–395.
- [29] Tinikul Y, Soonthornsumrith B, Phoungpetchara I, et al. Effects of serotonin, dopamine, octopamine, and spiperone on ovarian maturation and embryonic development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)[J]. Crustaceana, 2009, 82(8): 1007–1022.
- [30] Tinikul Y, Mercier A J, Sobhon P. Distribution of dopamine and octopamine in the central nervous system and ovary during the ovarian maturation cycle of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Tiss Cell, 2009, 41(6): 430–442.
- [31] Han P, Yang L S, Wu S, et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone and dopamine antagonistic on ovarian tissue development in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 50–56. [韩萍, 杨丽诗, 吴松, 等. 促性腺激素释放激素及多巴胺拮抗物地欧酮对斑节对虾卵巢组织发育的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 50–56.]
- [32] Richardson H G, Deecaraman M, Fingerma M. The effect of biogenic amines on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugilator*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1991, 99(1): 53–56.
- [33] Sarojini R, Nagabhushanam R, Fingerma M. In vitro inhibition by dopamine of 5-hydroxytryptamine stimulated ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Experientia, 1996, 52(7): 707–709.
- [34] Vaca A A, Alfaro J. Ovarian maturation and spawning in the

- white shrimp, *Penaeus vannamei*, by serotonin injection[J]. Aquaculture, 2000, 182(3): 373-385.
- [35] Kanokpan W, Asuvapongpatana S, Poltana P, et al. Serotonin stimulates ovarian maturation and spawning in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1447-1454.
- [36] Shirley H K, He J G, Chan S M. Organization and expression study of the shrimp (*Metapenaeus ensis*) putative 5-HT receptor: up-regulation in the brain by 5-HT[J]. Gene, 2005, 353(1): 41-52.

Molecular cloning and expression analysis of *cyclin G2* gene from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) under different stimulation

XIE Bobo^{1,2}, GUO Song^{1,2}, FU Mingjun¹, ZHAO Chao¹, YANG Qibin^{1,3}, JIAO Zongyao⁴, QIU Lihua^{1,3}

1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China;
4. Guangdong Province Vocational School of Oceanographic Engineering, Guangzhou 510320, China

Abstract: *Penaeus monodon* is the largest species of shrimp, with its high economic and natural nutritional value. However, during its breeding process, broodstock breeding technology has been a very important limiting factor. With the development of molecular biology techniques, there are growing concerns about the function of cell cycle genes of crustaceans, especially shrimp. Recently, molecular mechanisms of cell cycle regulatory proteins have been researched. In the study, cell cycle-related protein family genes relating to ovarian development also become a hot topic. Cyclin G2 is a newly discovered cell cycle-related protein that plays an important role during embryonic development, cell cycle progression and development, and disease. Cyclin G2 in some species have been cloned out, but the study of the gene has not been reported in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Gonads of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, mature if the eye stalk is removed. Thus, the full-length cyclin G2 cDNA sequence from *Penaeus monodon* (denoted as *Pmcyclin G2*) was cloned by means of rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches to better understand the potential function of cyclin G2 in the regulation of shrimp reproduction. The full-length cDNA sequence was 4075 bp and contained 189 bp 5'untranslated region (UTR) and a 2725 bp 3'UTR. The open reading frame was 1161 bp and coded 386 amino acids (aa) which was highly homology to other species cyclin G2. Bioinformatics analysis showed that the amino acid coding sequence had a conserved cyclin box and the homologous protein box structure domain was 50-150 aa. The predicted molecular weight was about 43.4 kD, and the theoretical isoelectric point was 8.25. The deduced amino acid of cyclin G2 contained 29 phosphorylation sites including 17 Ser, 7 Thr, and 5 Tyr residues. SignalP 4.0 analysis revealed that cyclin G2 did not contain a typical signal peptide sequence. The temporal expression of *Pmcyclin G2* in different tissues (ovary, heart, intestine, hepatopancreas, brain, muscles, stomach and gills) and different developmental stages of ovary was investigated by Real-time quantitative polymerase chain reaction (QRT-PCR). The lowest expression level of *Pmcyclin G2* was observed in the hepatopancreas, and the highest in the muscle. During the ovary development stages, *Pmcyclin G2* was significantly high expressed in stage III ovaries than the other stages. The relative expression of *Pmcyclin G2* in the ovary was up-regulation after 5-hydroxytryptamine (5-HT) injection, while down-regulation after dopamine (DA) challenge. The study obtained recombinant expression *Pmcyclin G2* in prokaryotes and offered theoretical basis for further research on *Pmcyclin G2* protein function. Those results offered additional information to understand the development mechanisms of *P. monodon* ovaries.

Key words: *Penaeus monodon*; cyclin G2; ovarian development; 5-hydroxytryptamine; dopamine

Corresponding author: QIU Lihua. E-mail: qiu902@126.com