

DOI: 10.12264/JFSC2025-0027

草鱼 *cdk2* 的分子特征、表达调控及其蛋白与 CDX2 的相互作用

何志敏¹, 罗君涵¹, 王辰浩洋¹, 唐翔¹, 蒋然^{1, 2}, 王麒翔¹, 刘晶¹, 李艳芳¹, 高星¹, 曾鹏¹, 卿艳玲¹, 罗雅楠¹, 刘臻^{1*}

1. 长沙学院生物与化学工程学院, 水生动物营养与品质调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410022;
2. 湖南师范大学生命科学学院, 动物肠道功能调控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410081

摘要: 为探究草鱼(*Ctenopharyngodon idella*) *cdk2* 的分子特征、CDK2 蛋白与 CDX2 的相互作用及其表达营养调控, 本研究通过克隆获得草鱼 *cdk2* 基因序列, 其开放阅读框 897 bp, 编码 298 个氨基酸, 与其他物种 CDK2 氨基酸序列同源性达到 80% 以上, 且具有保守 S_TKc 功能域; 基于 *cdk2* 的密码子偏好性及聚类分析均表明, 草鱼与斑马鱼(*Danio rerio*)的亲缘关系最近; 相对基于 *cdk2* RSCU 的聚类分析, 基于 CDK2 氨基酸序列的系统进化树分析更符合传统物种的分类; 组织表达分析结果表明, 草鱼 *cdk2* mRNA 在血液组织表达水平最高($P < 0.05$), 肝脏和脾脏次之。通过分子对接和酵母双杂交分析了草鱼 CDK2 与其下游磷酸化底物蛋白 CDX2 的相互作用, 结果表明草鱼 CDK2 与 CDX2 具有相互作用。本研究进一步通过养殖实验探究了饲料中添加不同水平的游离氨基酸 CAA (游离 lys 和 glu)、二肽 KE (lys-glu, KE), 三肽 GHK (gly-his-lys, GHK) 对 *cdk2* 的表达调控, 结果表明, 相比对照组, 0.5% GHK 对草鱼 *cdk2* mRNA 的表达促进作用最大, 氨基酸 CAA 相比具有同样氨基酸组成的 KE 二肽, 更能促进 *cdk2* 的表达。综上所述, 草鱼 *cdk2* 基因表达具有组织特异性, CDK2 与 CDX2 相互作用, *cdk2* 表达水平受到饲料中氨基酸和小肽水平的影响。本研究可为研究其他硬骨鱼类 *cdk2* 分子特征, 肠道功能基因的调控机制提供新的线索, 并为后续开展 *cdk2* 基因调控氨基酸及小肽的转运吸收分子机制研究提供理论基础。

关键词: 草鱼; *cdk2*; CDX2; 相互作用; 营养调控

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)05-0581-14

细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinases, CDKs)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 具有丝氨酸激酶活性, 其激酶活性功能的发挥取决于与其相连的 cyclin 亚基^[1-3]、及各种调节蛋白^[4-5], 它们与 CDK 蛋白形成异二聚体复合物以调节动物不同的生理过程。细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin dependent kinase 2, CDK2) 是 CDK 家族成员之一, 目前该家族在动物中共鉴定到 21 个家族成员^[6-7], 它们在结构、功能和调控方面具有较高的相似性^[8-9]。对 CDK 及其调控机制的研

究表明, CDK 是细胞周期调控的核心蛋白, 参与细胞周期、增殖、凋亡, DNA 减数分裂及损伤修复等生理过程^[2, 6, 10-12]。大部分 CDK 家族蛋白通过磷酸化底物促进 G1 期到 S 期的进程^[2, 13]。

近年, 国内外学者对水产动物 CDK 功能及调控展开了较为深入的研究。在水产动物中, 多项研究表明 CDK 影响生殖及胚胎发育, 如 Zhang 等^[14]研究发现敲除斑马鱼(*Danio rerio*) *cdk1* 影响斑马鱼精原细胞有丝分裂过程, 导致细胞周期和 DNA 复制相关基因表达异常, 从而使染色体加倍, 改

收稿日期: 2025-02-08; 修订日期: 2025-03-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目(U21A2026731902345); 湖南省自然科学基金面上项目(2023JJ30075); 湖南省教育厅重点项目(22A0597); 湖南省领军人才计划项目(2023RC1072); 湖南省现代农业产业技术体系项目(HARS-07).

作者简介: 何志敏, 副教授, 研究方向为水生动物分子营养. E-mail: z20180831@ccsu.edu.cn

通信作者: 刘臻, 教授, 研究方向为水生动物分子营养. E-mail: z20040625@ccsu.edu.cn

变斑马鱼的倍性,产生大头精子。Webster 等^[6]发现 *cdk21* 缺失导致斑马鱼性腺发育不全、生育能力降低和雌性性别发育失败。*cdk2* 的表达水平在脂肪酸 β 氧化介导的黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*) 卵母细胞成熟过程上调^[15]。脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*) CDK2、CDK8 和 CDK9 参与卵巢发育,如卵母细胞的增殖、外源性卵黄物质的合成运输以及卵黄蛋白的运输^[9]。Matrone 等^[16]发现抑制斑马鱼 *cdk9* 的表达会导致细胞增殖减少,并增加细胞凋亡,从而影响胚胎结构的躯体生长和发育。斑马鱼 cyclinA2-CDK2 磷酸化 UHRF1 影响胚胎的发育^[17]。在细胞增殖及凋亡方面,抑制斑马鱼 CDK9 活性会减少心肌细胞的增殖,损害和增强心脏对损伤的反应^[18]。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)毒鱼豆素 1 类似物通过激活细胞周期基因 *cdk2* 等促进淋巴细胞的增殖^[19]。在分化的神经元细胞中表达水平最高的 *cdk5* 被证实能抑制 Rohon-Beard (RB) 神经元细胞的凋亡^[20]。日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*) *cdk2* 同源基因可以抑制细胞的凋亡,抑制其表达会诱发细胞凋亡并促进细胞凋亡诱导剂放线菌素 D 诱导细胞凋亡^[21]。而在细胞周期调控方面,干扰中华绒鳌蟹(*Eriocheir sinensis*) *cdk2* 的表达会提升细胞的 G0-G1 周期,但是 S 期及 G2-M 期显著降低^[10]。敲降三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*) *cdk6* 导致部分细胞无法通过 G0/G1 期进入 S 期^[22]。

已有研究表明,人体肠道上皮细胞尾型相关同源盒转录因子蛋白 2 (caudal type homeobox 2, CDX2)在染色体维持蛋白 1 (chromosome region maintenance 1, CRM1)和 CDK2 的协同作用下,从细胞核转运至细胞质中,被 CDK2 磷酸化后进入泛素化降解通道。CDX2 在动物肠道上皮组织形态、维持和分化等方面发挥关键作用。CDX2 在肠道上皮细胞分化中的作用与 CDK2 对其的磷酸化有着密切的关系^[2]。进一步的研究表明,CDX2 与 CDK2 相互作用,CDK2 通过相互作用的磷酸化调控 CDX2 核转运以及泛素化降解^[23-24]。与 CDK2 在哺乳动物中的广泛研究相比,我们对 CDK2 在低等脊椎动物鱼类中的作用知之甚少。本课题组前期的研究表明,草鱼 CDX2 蛋白具有

多个磷酸化位点,并通过 26S-蛋白酶体泛素化途径进行降解;采用 CDK2 抑制剂 Roscovitine 处理表达了草鱼 CDX2 的细胞及草鱼肠道细胞,草鱼 CDX2 蛋白及 mRNA 的表达水平降低^[25]; *cdx2* mRNA 及蛋白水平变化均会影响草鱼小肽转运蛋白 1 (oligopeptide transporter 1, PepT1)的表达水平^[26]。以上研究表明,在草鱼中可能存在与高等哺乳动物中相似的 CDK2 与 CDX2 相互作用机制,然而关于 CDK2 在草鱼中的功能及营养调控研究目前还尚未有报道。

草鱼是我国产量最高的淡水养殖鱼类品种,其产量在全国淡水养殖鱼类产量中占有重要地位。2023 年草鱼的产量近 594.13 万 t^[27],草鱼养殖业对饲料蛋白的需求量是巨大的,饲料蛋白在鱼体内经蛋白酶的消化作用最终降解成小肽和游离氨基酸,本研究通过草鱼 *cdk2* 对外源营养信号的响应研究,对后续以 CDK2 为调控靶点提高草鱼营养吸收,最终提高草鱼饲料蛋白的吸收利用对降本增效践行水产绿色养殖具有重要的生产实践意义。

本研究在草鱼中克隆鉴定 CDK 家族代表成员 *cdk2* 基因 CDS 区,进行 *cdk2* 的生物信息学分析,草鱼 *cdk2* 在各组织的表达分析,与 CDX2 的相互作用分析;探究不同水平氨基酸和不同水平不同种类小肽对 *cdk2* 表达的调控分析,揭示草鱼 *cdk2* 的分子特征,其蛋白与 CDX2 的相互作用及其表达营养调控,为解析 CDK2 对 CDX2 的调控机制,探究不同饲料营养对草鱼肠道 *cdk2* 的调控研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用草鱼幼鱼购自湖南省水产科学研究所。养殖实验在长沙市望城区养殖基地室外网箱进行。在正式养殖实验前 12 d,所有养殖鱼均用对照饲料喂养以适应实验条件。实验开始前一天禁食,用 60 mg/L MS222 麻醉,选 630 尾规格均匀且健康的草鱼幼鱼[(10.69 $\pm$ 0.07) g],随机分配为 7 组,每组 3 个重复,共 21 个网箱(1.0 m $\times$ 1.0 m $\times$ 1.5 m),每个网箱 30 尾草鱼。在整个实验期间,每

天记录摄食情况和死亡情况, 每两周测量一次水质参数, 水温为 25.3~35.7 ℃, pH 为 7~7.4, 氨氮浓度<0.05 mg/L, 溶解氧>3 mg/L。在 63 天的投食期内, 每天 9:00 和 17:30 人工投喂 2 次, 每日投喂量约为体重 3%。

1.2 样品采集

在本研究中, 所有的实验用鱼在解剖前用 60 mg/L MS222(间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐, 美国 Sigma-Aldrich 公司) 麻醉, 用无菌注射器抽取血液后, 用无菌镊子及剪刀分离采集所需测定的草鱼组织如心、肠、前肠、中肠、后肠、肝、脑、肾、脾、肌肉等组织, 用于组织表达分析的样本, 每个组织取样 6 个重复, 整个解剖过程在冰上进行, 取样后迅速将样品冷冻在液氮中暂时保存, 然后转移至-80 ℃保存。

1.3 草鱼 *cdk2* 的营养调控分析

本研究在基础饲料中分别添加 0.0%、0.5%、1.5%的游离氨赖氨酸和谷氨酸混合物(lys 和 glu,

CAA)、L-赖氨酰-L-谷氨酰胺二肽(lys-glu, KE, 源叶生物, 上海)和 L-甘氨酰-L-组氨酰-L-精氨酰胺三肽(gly-his-lys, GHK, 莱昂生物, 南京)组成 7 种实验饲料, 具体配方如表 1 所示。采用室外网箱进行养殖, 每个处理组 3 个网箱每个网箱 30 尾实验鱼[(10.69±0.07) g], 分别在每天的 9:00 和 17:30 饱食投喂 2 次, 养殖周期为 63 天。取样前, 实验鱼禁食 24 h, 每个处理组 3 个网箱, 每个网箱随机捞取 2 尾鱼, 冰上解剖采集其肠道组织后混合为 1 个样本, 3 个网箱共 3 个混合样本作为每个处理组的生物学重复样本, 后续通过 qRT-PCR 分析 *cdk2* 基因的相对表达水平。

1.4 草鱼 *cdk2* 的克隆及酵母双杂交表达载体的构建

从 NCBI 中初步获得草鱼 *cdk2* 的基因序列, 利用 primer5 设计用于克隆 *cdk2* 的全长引物以及构建酵母表达载体 pBridge 的克隆引物(*cdk2*-F: 5'-CGAGAATTCATGGAGTCCTTTCAGAAAGT

表 1 本研究使用饲料配方与组成
Tab. 1 Formulation and composition of experimental diets used in this study

成分 ingredient	实验饲料 experimental diet						
	0%	0.5%CAA	1.5%CAA	0.5%KE	1.5%KE	0.5%GHK	1.5%GHK
氯化胆碱 choline chloride	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
小肽 peptide				0.5	1.5	0.5	1.5
赖氨酸 lysine		0.25	0.75				
谷氨酸 glutamate		0.25	0.75				
二甲基-β-丙酸噻亭 DMPT	1	1	1	1	1	1	1
鱼粉 fish meal	1	1	1	1	1	1	1
多维多矿预混 vitamin&mineral premix	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
羧甲基纤维素钠 CMC	3	3	3	3	3	3	3
α-淀粉 α-starch	5	5	5	5	5	5	5
面粉 wheat flour	15	15	15	15	15	15	15
纤维素 cellulose binder	15.5	15	14	15	14	15	14
玉米淀粉 corn starch	20	20	20	20	20	20	20
酪蛋白 casein	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2	32.2
鱼油 fish oil	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85
豆油 soybean oil	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85	2.85
总计 total	100	100	100	100	100	100	100
近似组成 proximate composition							
粗蛋白 protein	26.4	27.6	28.5	27.9	28.0	28.1	28.8
粗脂肪 lipid	6.8	6.2	5.8	6.9	5.5	6.7	7.0
水分 moisture	13.11	12.19	14.00	13.32	14.84	11.66	13.99
灰分 ash	96.95	96.92	96.93	96.96	96.98	96.93	96.96

GGA-3'; *cdk2*-R: 5'-CGAGTCGACCAGGCGTAA GGGAGGCACT-3'), 采用高保真酶 PrimeSTAR® HS(Takara, Cat#R040) 配制 50 μL 的扩增体系, 以草鱼 cDNA 为模板, 通过以下克隆程序: 98 °C 30 s 预变性; 接下来 30 个循环(98 °C 10 s 变性, 56 °C 30 s 退火, 72 °C 45 s 延伸); 72 °C 5 min 后延伸; 16 °C~∞。克隆片段经过琼脂糖凝胶电泳后切胶回收, 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根, DP209)对 *cdk2* 特异性扩增片段进行纯化回收; 后续进一步采用限制性内切酶 EcoRI 和 Sail (TaKaRa) 对 *cdk2* 扩增片段及酵母表达载体 pBridge 进行酶切, 酶切后的 *cdk2* 片段及 pBridge 载体经电泳切胶回收并采用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化回收; 酶切纯化后的 *cdk2* 片段及 pBridge 载体经 T4 连接酶的连接作用后热激转入大肠杆菌 DH5α, 挑选阳性克隆 PCR 检测后测序, 获得草鱼 *cdk2* 的具体序列及酵母表达重组载体 pBridge-CDK2。

1.5 总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR

所取样本在液氮中研磨后, 采用 TRIzol 试剂提取样本总 RNA, 提取的总 RNA 经凝胶电泳及 nanodrop 测定分析后参照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(TaKaRa, Kusatsu, Japan)说明书以 1 μg 总 RNA 为模板合成 cDNA。采用 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒(Accurate biology, AG11701), 配制 20 μL 的定量反应体系, 利用 Prism 7500 定量仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)通过以下反应程序: 95 °C 30 s 预变性; 随后进行 40 个循环(95 °C 10 s, 55 °C 30 s)。以 β -actin (β -actin-RT-F: 5'-GCTATGTGGCTCTTGACTTC G-3'; β -actin-RT-R: 5'-GGGCACCTGAACCTCTC ATT-3')为内参分析各样本中 *cdk2* 基因(*cdk2*-RT-F: 5'-ATGATTACTCGGAGGGCACTGTTTC-3'; *cdk2*-RT-R: 5'-AAGGAGGGTTTGTAGTCTGGCATTG-3')的相对表达量。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对 *cdk2* mRNA 相对表达量, 所有结果均为 3 次生物学重复的平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)

1.6 草鱼 *cdk2* 序列及进化分析

本研究在 GenBank 中进行 blast 分析, 获得 33 个物种 *cdk2* 基因及蛋白序列, 33 个物种 *cdk2* 的 GenBank 登录号如表 2 所示。采用 SMART

表 2 33 个物种 *cdk2* 基因序列登陆号
Tab. 2 Accession number of *cdk2* genes of 33 species

序号 number	物种 species	GeneBank 号 GeneBank No.
1	日本沼虾 <i>Macrobrachium nipponense</i>	MH006613.1
2	罗氏沼虾 <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	JQ936559.1
3	绵羊 <i>Ovis aries</i>	FJ422550.1
4	金仓鼠 <i>Mesocricetus auratus</i>	D17350.1
5	水螅 <i>Hydra vulgaris</i>	MT653637.1
6	安氏钝口螈 <i>Ambystoma andersoni</i>	MT653636.1
7	高原虎纹钝口螈 <i>Ambystoma velasci</i>	MT653635.1
8	墨西哥钝口螈 <i>Ambystoma mexicanum</i>	MT653634.1
9	蓝蝙蝠海星 <i>Patiria pectinifera</i>	AB481376.1
10	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	JN833622.1
11	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	EF182713.1
12	牛 <i>Bos taurus</i>	BT020790.1
13	山羊 <i>Capra hircus</i>	EF035041.1
14	人 <i>Homo sapiens</i>	BC003065.2
15	家鼠 <i>Mus musculus</i>	BC005654.1
16	非洲爪蟾 <i>Xenopus laevis</i>	BC106636.1
17	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	BC062836.1
18	褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	BC061832.1
19	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	KT727915.1
20	微小扇头蜉 <i>Rhipicephalus microplus</i>	KC968966.1
21	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	XM_051913113.1
22	黑鲫 <i>Carassius carassius</i>	XM059538485.1
23	溪鲢 <i>Salvelinus fontinalis</i>	XM_055869196.1
24	虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	XM_021610105.2
25	大西洋鲑 <i>Salmo trutta</i>	XM_029693771.1
26	美洲黑石斑鱼 <i>Centropristis striata</i>	XM_059328988.1
27	条纹狼鲈 <i>Morone saxatilis</i>	XM_035661622.1
28	翘嘴鲌 <i>Siniperca chuatsi</i>	XM_044170772.1
29	美洲鳗 <i>Anguilla rostrata</i>	XM_064305379.1
30	欧洲鳗 <i>Anguilla anguilla</i>	XM_035386873.1
31	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	XM_055216284.1
32	大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	XM_038696430.1
33	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	XM_017451095.3

(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测蛋白结构域; 采用 Bioedit 软件将草鱼 CDK2 氨基酸序列分别与其他物种的相应氨基酸序列多重比对。本研究利用 CodonW 软件对不同物种 *cdk2* 进行密码子偏好性分析。利用 Cluster 和 MEGA 11 软件通过

邻接法构建基于 CDK2 氨基酸序列的系统进化树, 1000 次自举重复检验进化树的频次。利用 SPSS18.0 软件对 33 条序列的相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)采用组间连接法构建基于不同物种 *cdk2* RSCU 聚类分析树状图, 以此判断不同物种基于 *cdk2* 基因在进化上的亲缘关系并比较两种聚类分析方法的准确性。

1.7 草鱼 CDK2 与 CDX2 相互作用的分析

本研究首先采用 MOE (molecular operating environment) 软件进行同源建模。通过 LigX 对蛋白的质子化状态和加氢的方向, 在 pH 7.0, 温度 26.8 °C 进行优化。目标序列与模板序列进行比对, 根据不同的螺旋和侧链旋转异构, 在所有模型中选取最佳模型用于后续分子对接分析。采用 MOE 对接程序进行蛋白与蛋白的分子对接, 所有分子对接构象先通过 London dG 进行评分, 然后用 GBVI/WSA dG 对前 30 个构象进行力场优化, 选取结合能量最低、可信度分值最高的构象作为两个蛋白结合的最佳构象, 获得该构象下两个蛋白相互作用的置信度。

进一步采用酵母双杂交实验验证草鱼 CDK2 与 CDX2 的相互作用。具体如下: 采用 LiAc 法, 按照 Clontech 酵母转化步骤, 将重组载体按照 pB-CDK2/pG-CDX2、pB-CDK2/pG、pB/pG-CDX2、pB/pG 组合共转酵母 AH109, 通过 SD/-Leu-Trp 筛选阳性转化, 并进一步通过酵母 PCR 检测阳性克隆, 后续进一步将阳性克隆通过营养缺陷型培养基 SD/-Leu-Trp-his 验证其相互作用。

1.8 统计分析

使用 SPSS 18.0 对所有实验数据进行单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 认为具有显著性差异。实验结果均以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *cdk2* 基因克隆及序列分析

本研究从草鱼 cDNA 文库中克隆得到 *cdk2* (NCBI GenBank 登录号: XM_051913113.1), 其基因开放阅读框 897 bp, 编码 298 个氨基酸(图 1)。SMART 在线分析结果表明 CDK2 主要由 S_TKc 功能域组成(图 2)。与不同物种如水螅(*Hydra*

vulgaris)、家蚕(*Bombyx mori*)、原鸡(*Gallus gallus*)、牛(*Bos taurus*)、人(*Homo sapiens*)、家鼠(*Mus musculus*)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)、斑马鱼(*Danio rerio*) CDK2 的序列同源性分析结果表明草鱼 CDK2 与其他物种 CDK2 具有较高的同源性(图 3)。

```

1 aat aga ttt aga gfg gaa gtt tcc ccg gaa aag ggg gag ttt gac atg gag tcc ttt cag
1 N R F R V E V S P E K G E F D M E S F Q
16 aaa gfg gaa aag att gga gag ggg aca tat ggg gfg gtl tat aaa gcc aag aat aaa atc
6 K V E K I G E G T Y G V V Y K A K N K I
76 act gga gag act gtc gcg ctg aag aaa att cga tta gac aca gaa act gaa ggt gtt ccc
26 T G E T V A L K K I R L D T E T E G V P
136 age act gcc ata cgt gag atc tct ctg cta aaa gag ctc aat cac cca aac ata gtc aaa
46 S T A I R E I S L L K E L N H P N I V K
196 ttg cgt gat gfg ata cac aca gaa aat aag ctt tac ttg gfg ttt gaa ttt ctt cac caa
66 L R D V I H T E N K L Y L V F E F L H Q
256 gac ctg aag agg ttt atg gac tca tcc tct gtt tct ggc ata tct ttt cca ctc gfg aag
86 D L K R F M D S S S V S G I S L P L V K
316 agt tac ctg ttc cag ttg ctc cag gga ttg gcc ttc tgt cac tcc cat cgg gtt ctt cac
106 S Y L F Q L L Q G L A F C H S H R V L H
376 agg gat ctc aaa ccc cag aat ctc ctg atc aat gct cag ggc gag atc aaa ctg gct gac
126 R D L K P Q N L I N A Q G E I K L A D
436 ttt ggt ttg gcc aga gca ttt ggt gta cct gta cgg act tat aca cat gag gfg gta act
146 F G L A R A F G V P V R T Y T H E V V T
496 ttg tgg tac aga gct cca gag att ctc ctg gga tgt aaa tat tat tct aca gct gtt gac
166 L W Y R A P E I L L G C K Y Y S T A V D
556 atc tgg agt ttg ggc tgc atc ttt gct gaa atg att act cgg agg gca ttg ttt cct gga
186 I W S L G C I F A E M I T R R A L F P G
616 gac tct gaa ata gac cag ctc ttc cga ata ttt cga aca ctg ggc act cgg gat gaa tct
206 D S E I D Q L F R I F R T L G T P D E S
676 ata tgg cct gga gtc acc tca atg cca gac tac aca ccc tcc ttt ccc aag tgg gca cga
226 I W P G V T S M P D Y K P S F P K W A R
736 cag gac ctg tct aaa gfg gfg cct cct ctg gat gat gat ggc cga gac ctc ctt gcg caa
246 Q D L S K V V P P L D D D G R D L L A Q
796 atg atg atc tat gat cct aac aag agg atc tca gca aaa aac gcc ctt gtt cat cgg ttc
266 M M I Y D P N K R I S A K N A L V H R F
856 ttc cgt gac gtc acc atg cca gtc cct ccc tta cgc ctg taa ggg cac gac tac ttc age
286 F R D V T M P V P L R L *

```

图 1 草鱼 *cdk2* CDS 序列及氨基酸序列

标下划线 atg 表示起始密码子; *表示终止密码子。

Fig. 1 *cdk2* CDS and amino acid sequences in *Ctenopharyngodon idella*

The “atg” marked with underline indicates the start codon; * represents termination codon

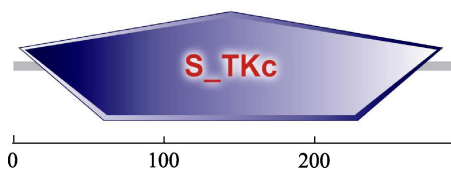


图 2 草鱼 CDK2 蛋白保守结构域预测

Fig. 2 Prediction of conserved domain in CDK2 protein of *Ctenopharyngodon idella*

如图 4 所示, 基于相对同义密码子使用度 RSCU 的热图显示草鱼 *cdk2* 密码子偏好性与其他物种之间存在一定的相似性, 在所有分析物种中 *cdk2* 基因对编码密码子 CUG 和 AUC 的偏好性普遍较高; 此外, 草鱼、黑鲫(*Carassius carassius*) 以及斑马鱼 *cdk2* 基因在密码子偏好性上具有高度的相似性和趋势。

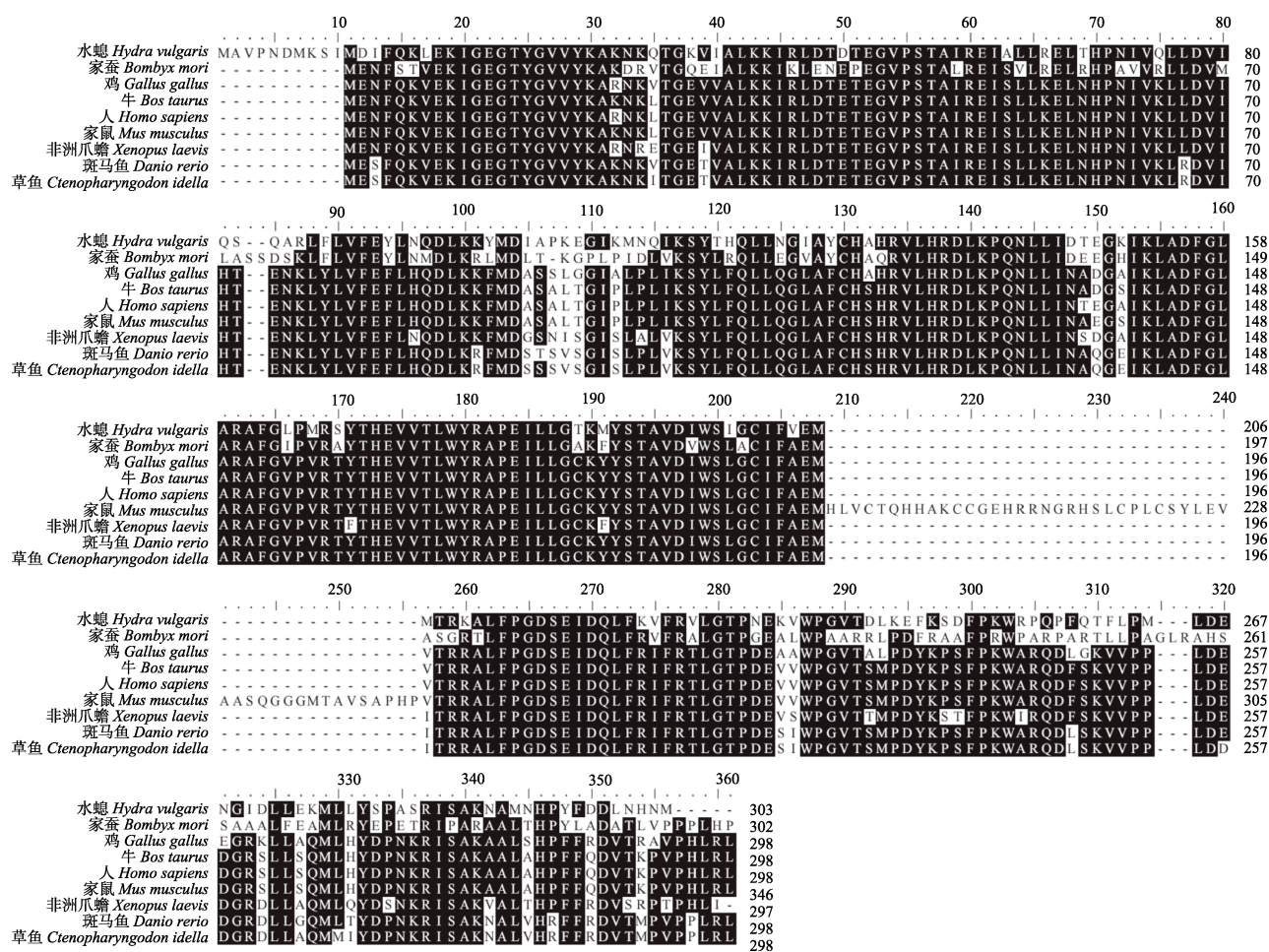


图 3 草鱼 CDK2 和其他已知物种 CDK2 氨基酸序列的多序列比对分析

黑色阴影部分表示完全匹配的氨基酸残基。

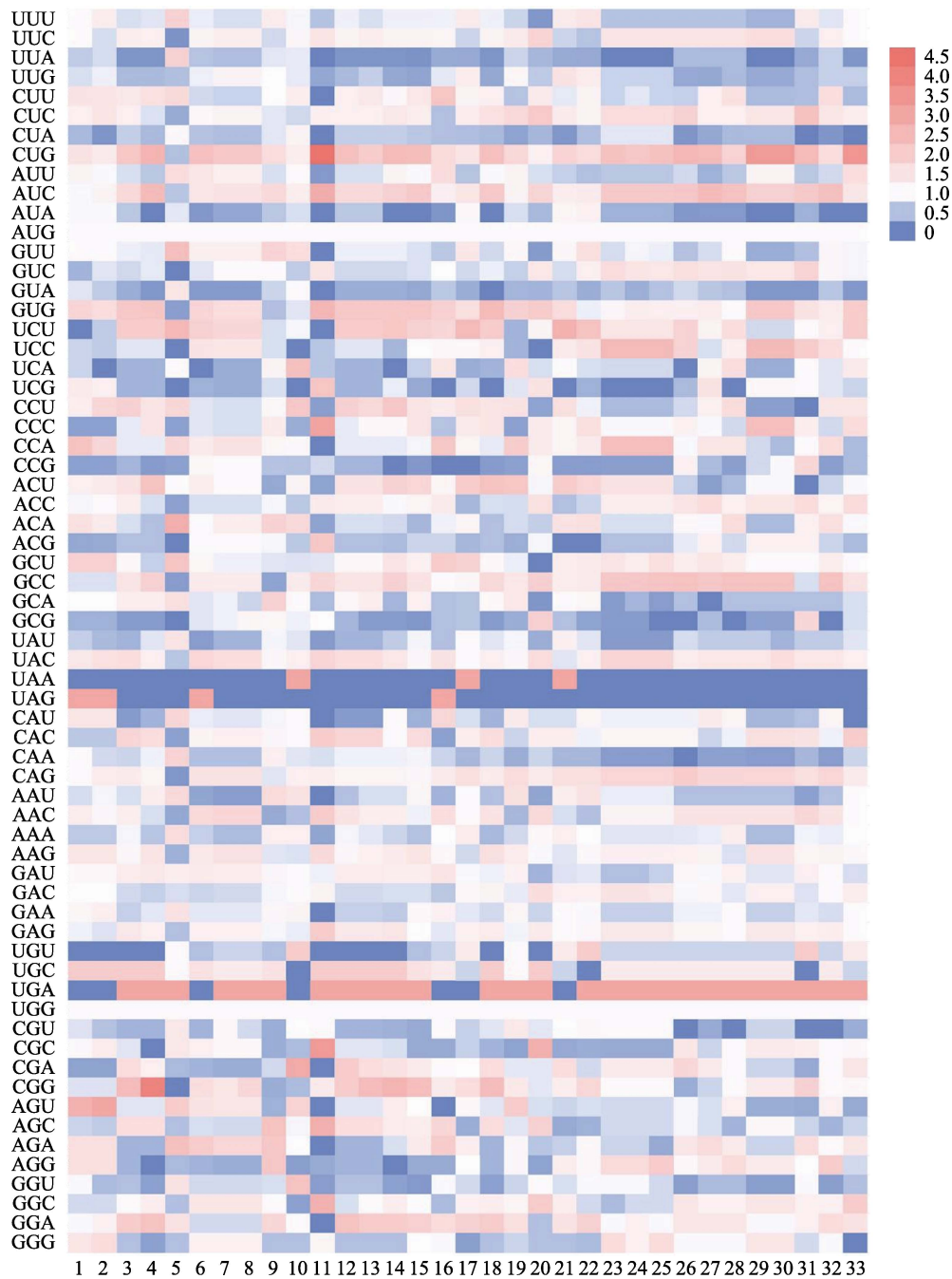
Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of *Ctenopharyngodon idella* CDK2 and other known CDK2 amino acids sequences
The black shaded part indicates the completely matched amino acid residues.

图 5 所示为 ENC-plot 图, ENC 值位于 20~61 之间, 越接近于 20, 说明偏好性越强。草鱼 *cdk2* 的 ENC 值为 57.05, 说明草鱼 *cdk2* 的密码子偏好性较弱。原鸡 *cdk2* 基因的 ENC 值为 33, 密码子偏好性最强。33 个物种的 (GC3s, ENc) 散点大部分分布在标准曲线下方较近的位置, 说明突变是 *cdk2* 基因密码子偏好性形成的主因, 尤其是处于标准曲线上及接近标准曲线的水螅、高原虎纹钝口螈 (*Ambystoma velasci*)、墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*) 和安氏钝口螈 (*Ambystoma andersoni*)。原鸡 (GC3s, ENc) 离标准曲线较远, 说明自然选择主导其 *cdk2* 基因密码子偏好性的形成。

2.2 基于 CDK2 的物种聚类分析

系统进化树聚类分析结果如图 6a 所示, 高

等脊椎动物与低等脊椎动物之间具有明显的分支, 由于进化亲缘关系草鱼、斑马鱼和黑鲫聚类成一支并与其他鱼类及水产动物聚为大分支, 且大部分的水产动物与哺乳动物、两栖类动物等具有明显的分支, 该分类结果基本符合物种分类, 表明系统发育树显示的亲缘关系与传统分类学基本一致。基于 RSCU 的聚类分析结果可以看出草鱼与斑马鱼聚为一个分支, 但是黑鲫与斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 聚为一小分支, 且存在同科属动物被聚类到不同的分支, 如在系统进化树中被聚为一支的两栖类动物安氏钝口螈、高原虎纹钝口螈、墨西哥钝口螈和非洲爪蟾被分别聚类为较远的两个分支 (图 6b)。

图 4 33 个物种 *cdk2* 的 RSCU 热图

1. 日本沼虾; 2. 罗氏沼虾; 3. 绵羊; 4. 金仓鼠; 5. 水螅; 6. 安氏钝口螈; 7. 高原虎纹钝口螈; 8. 墨西哥钝口螈;
9. 蓝蝙蝠海星; 10. 家蚕; 11. 原鸡; 12. 牛; 13. 山羊; 14. 人; 15. 家鼠; 16. 非洲爪蟾; 17. 斑马鱼; 18. 褐家鼠;
19. 斑节对虾; 20. 微小扇头蜉; 21. 草鱼; 22. 黑鲫; 23. 溪鲢; 24. 虹鳟; 25. 大西洋鲑; 26. 美洲黑石斑鱼;
27. 条纹狼鲈; 28. 翘嘴鲈; 29. 美洲鳗; 30. 欧洲鳗; 31. 泥鳅; 32. 大口黑鲈; 33. 斑点叉尾鲷。

Fig. 4 Heat map of RSCU values of *cdk2* from 33 species

1. *Macrobrachium nipponense*; 2. *Macrobrachium rosenbergii*; 3. *Ovis aries*; 4. *Mesocricetus auratus*; 5. *Hydra vulgaris*;
6. *Ambystoma andersoni*; 7. *Ambystoma velasci*; 8. *Ambystoma mexicanum*; 9. *Patiria pectinifera*; 10. *Bombyx mori*; 11. *Gallus gallus*;
12. *Bos taurus*; 13. *Capra hircus*; 14. *Homo sapiens*; 15. *Mus musculus*; 16. *Xenopus laevis*; 17. *Danio rerio*; 18. *Rattus norvegicus*;
19. *Penaeus monodon*; 20. *Rhipicephalus microplus*; 21. *Ctenopharyngodon idella*; 22. *Carassius carassius*;
23. *Salvelinus fontinalis*; 24. *Oncorhynchus mykiss*; 25. *Salmo trutta*; 26. *Centropomus striata*; 27. *Morone saxatilis*; 28. *Siniperca chuatsi*;
29. *Anguilla rostrata*; 30. *Anguilla anguilla*; 31. *Misgurnus anguillicaudatus*; 32. *Micropterus salmoides*;
33. *Ictalurus punctatus*.

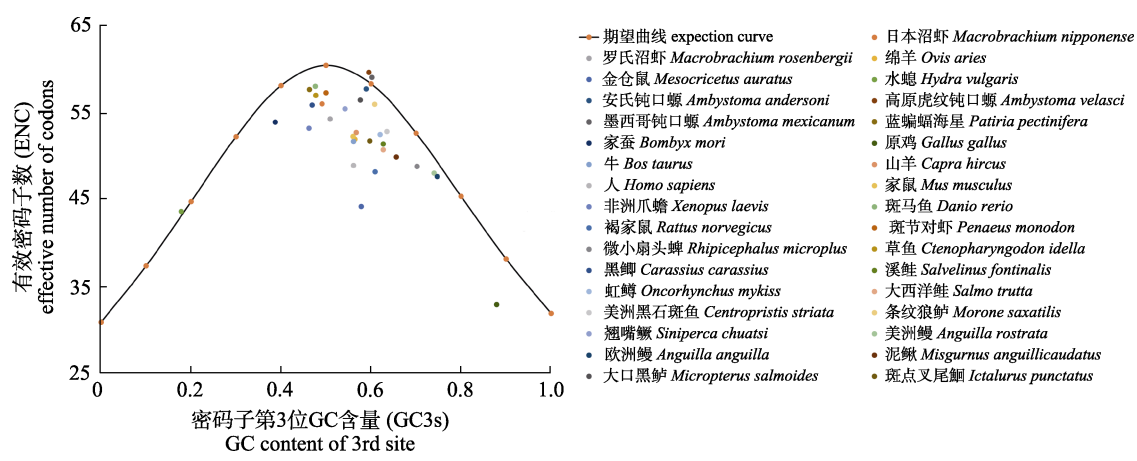


图 5 不同物种 *cdk2* 基因的 ENC-plot 分析
Fig. 5 ENC-plot analysis of *cdk2* in different species

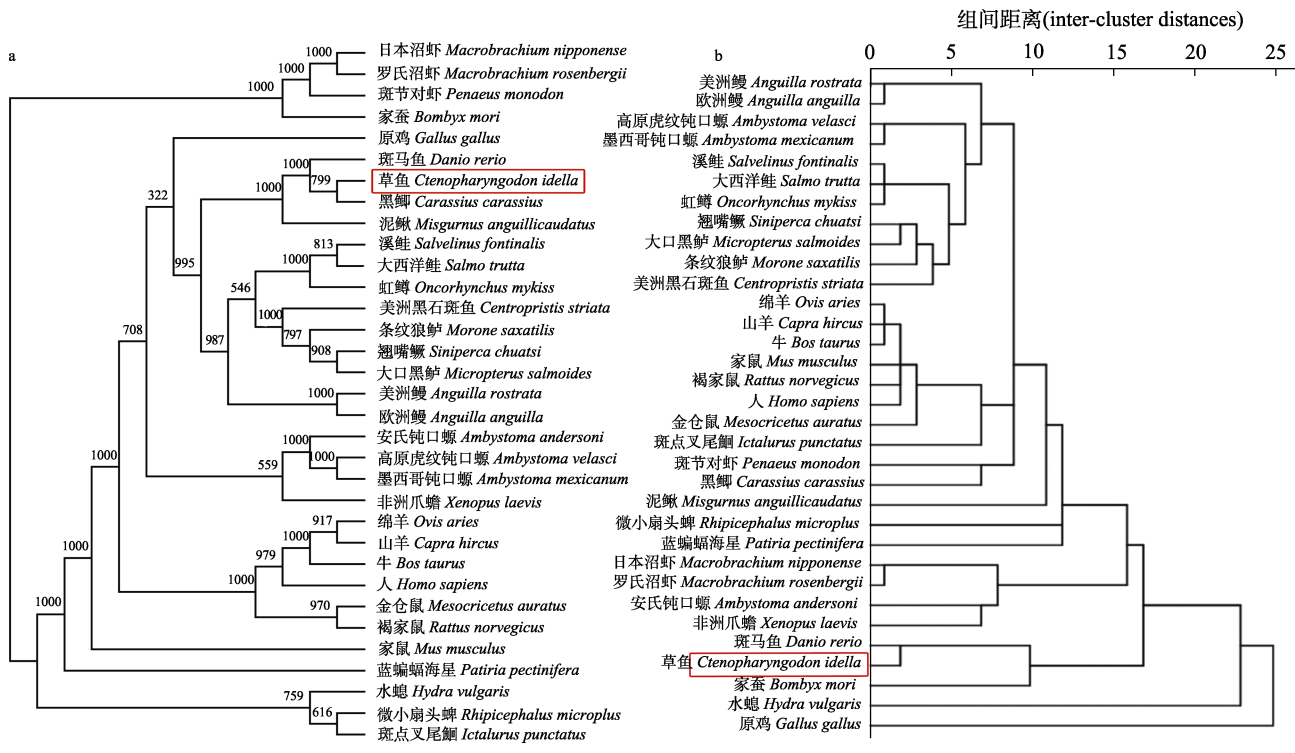


图 6 基于 CDK2 的物种聚类分析

a. 基于不同物种 CDK2 氨基酸序列构建的系统进化树(NJ 法), 节点处数字表示 1000 次自举检验频次;
b. 基于 *cdk2* RSCU 值构建的聚类分析树状图.

Fig. 6 Species cluster analysis based on CDK2

a. Phylogenetic tree of different species based on CDK2 amino acid sequence by NJ method, figures on the nodes represent percentage frequencies for tree topology after 1000 iterations; b. Cluster tree of different species based on *cdk2* RSCU value.

2.3 草鱼 *cdk2* 组织差异表达分析

为探究不同组织 *cdk2* 的表达丰度, 本研究对草鱼脑、肝脏、肌肉、全肠、前肠、中肠、后肠、脾脏、心脏、肾脏和血液 11 个组织取样, 采用荧光定量 PCR 分析, 结果显示 *cdk2* mRNA 在所取

11 个组织中表达差异较为显著($P<0.05$), 在血液组织中表达最高, 其后依次是肝脏、脾脏、心脏、脑和肌肉, 在肾脏中表达最低, 在全肠及前中后肠之间表达水平无明显差异, 血液组织中 *cdk2* mRNA 表达水平是肾脏中表达水平的 9 倍(图 7)。

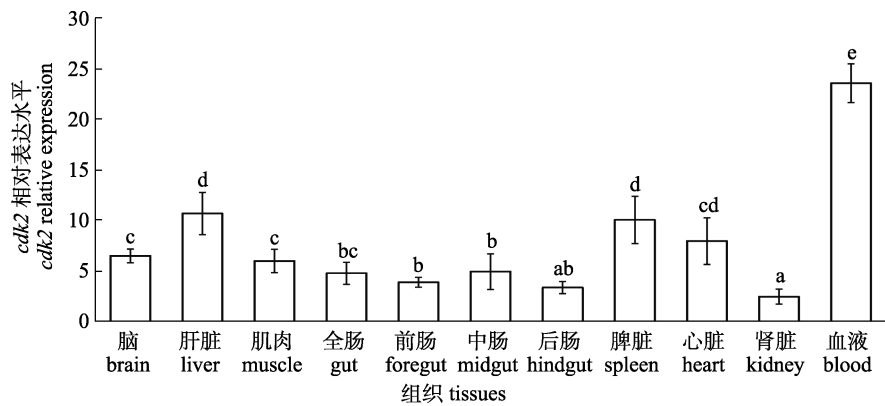


图 7 *cdk2* 在草鱼各组织中的相对表达水平
不同字母表示不同组织间差异显著($P<0.05$).

Fig. 7 Relative expression levels of *cdk2* in various tissues of *Ctenopharyngodon idella*
Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 草鱼 CDK2 与 CDX2 相互作用分析

在高等动物中, CDX2 是磷酸激酶 CDK2 的底物, 能被 CDK2 磷酸化, 导致 CDX2 蛋白稳定性降低。为在草鱼中验证 CDK2 与 CDX2 的相互作用, 本研究通过 3D 建模, 分子对接预分析了草鱼 CDK2 与 CDX2 相互作用模式及可信分值, 两者相互作用的可信分值高, 达到了 0.9485 (图 8a)。基于

此分析结果, 本研究构建 CDK2 与 CDX2 酵母表达载体 PG-CDX2 和 PB-CDK2, 并转入酵母 AH109, 通过酵母双杂交分析草鱼 CDK2 与 CDX2 的相互作用, 结果显示, 阴性对照组在 SD/-leu-trp-his 培养基中均不能生长, 实验组 PG-CDX2/PB-CDK2 能在 SD/-leu-trp-his 中生长(图 8b), 表明两者具有相互作用。

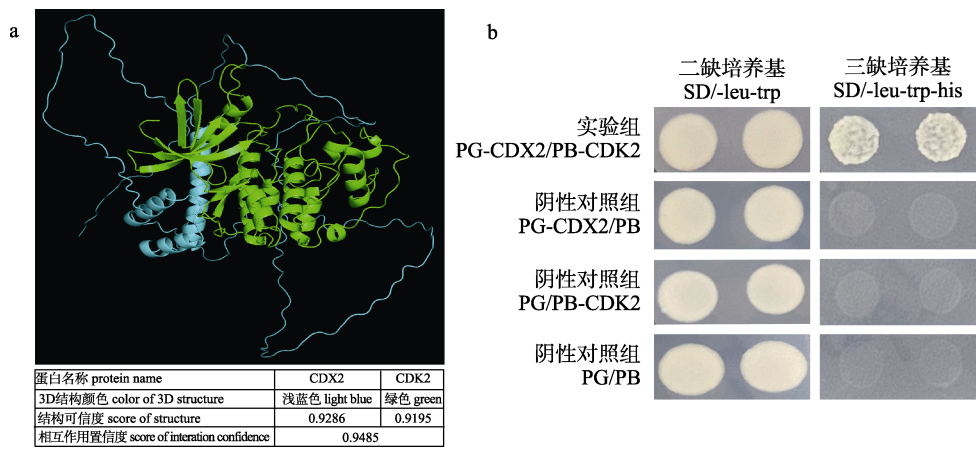


图 8 草鱼 CDX2 与 CDK2 相互作用分析

a. 草鱼 CDX2 与 CDK2 蛋白相互作用模拟分析; b. 草鱼 CDX2 与 CDK2 相互作用酵母双杂交分析.
酵母重组载体 PB-CDK2: pBridge-CDK2; PasssG-CDX2: pGARDT7-rec-CDX2; PB: pBridge; PG: pGARDT7-rec.
Fig. 8 The interaction analysis of *Ctenopharyngodon idella* CDX2 and CDK2
a. Simulation analysis of *Ctenopharyngodon idella* CDX2 and CDK2; b. Yeast two hybrid interaction analysis of *Ctenopharyngodon idella* CDX2 and CDK2. Yeast recombinant vectors PB-CDK2: pBridge-CDK2; PG-CDX2: pGARDT7-rec-CDX2; PB: pBridge; PG: pGARDT7-rec.

2.5 草鱼肠道 *cdk2* 表达的营养调控分析

在饲料中分别添加不同浓度的 CAA、KE 和 GHK 进行养殖实验, 通过对养殖实验的草鱼肠道

取样并采用荧光定量 PCR 对 *cdk2* 的相对表达进行测定, 结果表明, 0.5%CAA、1.5%CAA、1.5%KE 和 0.5%GHK 组 *cdk2* 表达水平显著高于对照组

($P < 0.05$), 其他组 *cdk2* 表达水平与对照组无明显差异($P > 0.05$)。不同水平 KE 对 *cdk2* 的表达促进作用明显低于具有相同氨基酸组成的同水平的 CAA 组($P < 0.05$), 说明 lys 与 glu 混合游离形式对 *cdk2* 的表达促进作用高于两者以 lys-glu 二肽形式对其的作用。在 GHK 组中, 0.5%GHK 组的 *cdk2* 表达水平显著高于对照组, 1.5%GHK 的 *cdk2* 表达水平略低于对照组。各组中, 0.5%的 GHK 对 *cdk2* mRNA 的表达促进作用最大(图 9)。

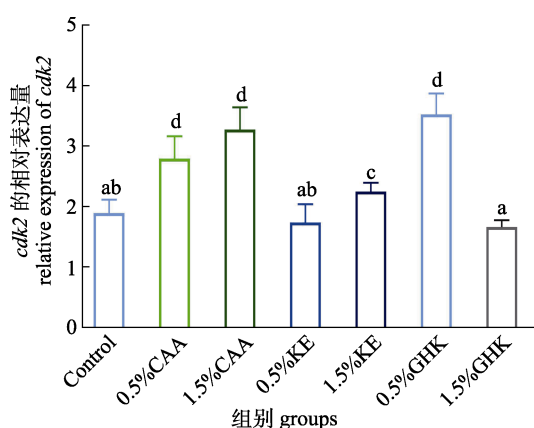


图 9 草鱼 *cdk2* mRNA 表达氨基酸和小肽的营养调控响应分析

Fig. 9 Amino acids and oligopeptide nutrients regulation response analysis of *cdk2* mRNA expression in *Ctenopharyngodon idella*

3 讨论

3.1 草鱼 *cdk2* 序列分析

本研究结果表明, 草鱼 *cdk2* 基因的开放阅读框(ORF)长度为 897 bp, 编码 298 个氨基酸, 其中包含一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化功能域(S_TKc), 位于第 4 至 286 位氨基酸之间。该功能域是 CDK 家族的核心催化模块, 其结构由 N 端 β -折叠小叶和 C 端 α -螺旋小叶组成, 两者通过铰链区形成 ATP 结合口袋^[28]。关键功能位点如 ATP 结合位点 Gly11、lys33、Asp145; 激活环 Thr160 磷酸化位点及 cyclin 结合界面 PSTAIRE 基序在草鱼中保守^[29-31], 与斑马鱼^[17]、哺乳动物^[32]及中华绒螯蟹^[10] CDK2 与其他物种 CDK2 序列的高度保守性研究结果一致。Expasy 预测显示, 草鱼 *cdk2* 的分子量为 34.05 kDa, 等电点(pI)为 8.97, 其较

高的 pI 可能通过静电相互作用促进其与底物蛋白的结合^[33]。

草鱼 CDK2 的进化保守性在序列比对中较为显著: 催化核心残基 asp145、asn132 和 thr160 在大部分脊椎动物中保守^[34], 而底物结合区的 leu148 和 trp150 构成保守的疏水口袋, 特异性识别 pro-X-ser/thr 基序^[31]。这些保守特征在功能上至关重要, 例如斑马鱼 CDK2 的 thr160ala 突变会导致激酶活性丧失并引发胚胎发育缺陷^[35]。综上, 草鱼 CDK2 的结构与功能特征高度保守, 但其非结构区域的物种特异性变异可能反映适应性进化。后续可以通过结构解析和功能突变实验, 进一步揭示其在细胞周期调控中的独特作用。

3.2 草鱼 *cdk2* 的密码子偏好性及进化分析

ENC-plot 分析显示, 草鱼及其他物种 *cdk2* 的 ENC 值较高, 草鱼 ENC 为 57.05, 表明其密码子偏好性较弱, 可能主要由突变压力驱动; 而原鸡 *cdk2* 的 ENC 值为 33, 相比其他物种 ENC 值较低, 提示自然选择在其密码子偏好性中起主导作用^[32]。这种差异可能反映两者不同的表达水平: 如原鸡 *cdk2* 作为高表达基因参与肠道上皮细胞的快速增殖; 而草鱼 *cdk2* 的表达水平较低或具有组织特异性, 其密码子选择更多受突变影响^[36]。在果蝇中, 高表达基因的密码子偏好性通常与高翻译效率相关, 而低表达基因则受突变-漂变平衡主导^[37], 这一规律是否适用于鱼类仍需验证。

GC 含量是影响密码子偏好性的另一关键因素。原鸡 *cdk2* 61.4% GC3 显著高于草鱼 52.3% 的 GC3, 可能与其恒温生理需求下 mRNA 热稳定性的优化相关^[38]。高 GC 含量还可通过基因转换在重组活跃区域积累^[39], 如人类 *cdk2* 基因位于重组热点, 其高 GC3 可能部分源于此机制^[40]。草鱼 *cdk2* 较低的 GC3 是否与其基因组重组特征或低温适应性相关, 需结合比较基因组学进一步解析。此外, mRNA 二级结构也影响基因的密码子偏好性^[41], 草鱼 *cdk2* 的密码子偏好性较弱可能与其 mRNA 折叠自由能较高相关, 可通过 RNAfold 预测结合核糖体图谱验证^[42]。tRNA 丰度与密码子使用的匹配度是翻译优化的核心^[43-44]。草鱼 *cdk2*

的密码子可能是因 tRNA 资源分配效率较低而导致偏好性较弱。蛋白质结构对密码子选择的间接影响亦需关注^[45-46]。CDK2 S_TKc 催化结构域的核心残基如 lys33、Asp145 在进化中高度保守, 其密码子使用可能受结构稳定性与翻译准确性的双重影响^[47]。如人类 CDK2 的 lys33 使用 AAG 密码子以匹配高丰度 tRNA, 而草鱼中同一残基同样使用 AAG, 提示功能位点的选择压力跨越物种界限。然而, 非结构区域的密码子使用可能更多受中性突变驱动, 导致整体 ENC 值升高。这种共进化模式为解析基因功能与密码子偏好性的关联提供了新视角。

亲缘关系较近的物种在密码子偏好性方面通常表现出较高的相似性, 这一现象在本研究中得到印证: 草鱼、斑马鱼与黑鲫的 *cdk2* 基因具有高度一致的 RSCU 模式, 提示三者具有较近的进化关系。基于 CDK2 序列的系统进化树分析进一步支持了这一结论, 三者聚为一支并与其他鱼类形成明显分支(图 6a)。CDK2 作为细胞周期调控的核心基因, 其 S_TKc 催化结构域在大部分物种中趋同保守^[48], 这使得基于 CDK2 序列的进化分析能够更准确地反映物种的亲缘关系, 而 RSCU 聚类可能因环境适应产生偏差, 适合作为系统发育分析的重要补充。

3.3 草鱼 *cdk2* 基因组织表达分析

草鱼 *cdk2* 的组织表达谱分析结果显示其在血液中表达水平最高, 这与凡纳滨白虾^[48]和中华绒螯蟹^[10] *cdk2* 在肝胰腺高表达、脊尾白虾^[9] *cdk2* 在卵巢高表达及斑节对虾^[49] *cdk2* 在精巢高表达, 提示 *cdk2* 的组织表达可能具有物种特异性。这可能与 CDK2 在不同动物不同发育阶段或环境条件下的功能差异有关。在本研究中, *cdk2* 在血液中的高表达提示其可能参与与血液相关的生理调控过程, 如抗氧化和免疫反应。

3.4 CDK2 与 CDX2 的相互作用及营养调控分析

CDK 蛋白通过磷酸化底物蛋白的特定氨基酸残基调控其功能, 如丝氨酸/苏氨酸。本研究发现草鱼 CDK2 与 CDX2 存在相互作用, 且这一作用与哺乳动物中 CDK2 磷酸化 CDX2 的 thr234 和 ser240 位点以调控其核质转运的机制高度相似^[23, 50]。

通过同源建模发现, 草鱼 CDX2 的 C 端结构域与 CDK2 的催化口袋存在互补性, 提示 CDK2 可能靶向 CDX2 的保守磷酸化基序(图 8a)。近期在斑马鱼中的研究显示, CDK2 通过磷酸化 UHRF1 的 ser311 调控胚胎发育^[17], 这为草鱼 CDX2 磷酸化位点的鉴定提供了方向。此外, CDX2 的 NLS 核定位信号可能依赖 CDK2 介导的磷酸化修饰, 类似机制在哺乳动物中已有报道^[23], 但其在鱼类中的调控仍需通过定点突变结合功能实验验证。

氨基酸和小肽是蛋白质营养的重要组成部分。小肽的转运吸收主要通过质子依赖的小肽转运载体 PepT1^[51]。CDX2 是调控高等哺乳动物和低等脊椎动物小肽转运载体 PepT1 的肠道特异性转录因子。在水生动物中的研究表明, 适量的牛磺酸能显著提高鲫鱼 *cdx2* 和 *pept1* 的表达^[52]。CDX2 介导了丁酸钠对三倍体鱼 *pept1* 表达的调控^[53]。而丁酸甘油三酯则通过上调草鱼 *cdx2* 的表达促进 *pept1* 的转录^[25]。本研究的营养调控实验表明, 相比对照组, 小肽和氨基酸均能调控草鱼 *cdk2* 的表达, 0.5% 的 GHK 相比 KE 更能促进 *cdk2* 的表达, 说明草鱼 CDK2 可能通过 CDX2 的介导参与小肽的转运吸收, 且不同小肽对 *cdk2* 的调控作用存在差异。草鱼 CDK2 可能通过磷酸化 CDX2 影响其稳定性或转录活性, 从而间接调控 PepT1 介导的小肽吸收。在哺乳动物中, CDK2 磷酸化 CDX2 并抑制其泛素化降解并增强其核定位^[50]。若草鱼中存在相似的调控机制, 则 *cdk2* 的上调可通过稳定 CDX2 提高 *pept1* 表达, 形成正反馈循环, 进一步促进 GHK 等小肽的转运吸收。CDK2-CDX2-PepT1 的级联调控可能是 GHK 对 CDK2 表达显著诱导效应^[26]。草鱼作为我国主要淡水养殖品种, 饲料中添加适量 GHK 或 CAA 可能通过增强 CDK2-CDX2-PepT1 轴功能, 以提升小肽或氨基酸吸收效率及肠道健康。

4 结论

本研究揭示了草鱼 *cdk2* 的分子特征, 且证实了 CDK2 与 CDX2 的相互作用及氨基酸与小肽对草鱼 *cdk2* 的营养调控。这将为其他硬骨鱼类 *cdk2* 分子特征的研究, 鱼类肠道功能的调控机制探索提

供了新的线索,并为后续开展 CDK2 调控氨基酸及小肽的转运吸收分子机制研究提供理论基础。

参考文献:

- [1] Bergman M T, Zhang W G, Liu Y L, et al. Binding modalities and phase-specific regulation of cyclin/cyclin-dependent kinase complexes in the cell cycle[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2024, 128(39): 9315-9326.
- [2] Armstrong C, Passanisi V J, Ashraf H M, et al. Cyclin E/CDK2 and feedback from soluble histone protein regulate the S phase burst of histone biosynthesis[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(7): 112768.
- [3] He C C, Liang J H, Wu Z Q, et al. Study on the interaction preference between CYCD subclass and CDK family members at the poplar genome level[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): Article No.16805.
- [4] Phillips A H, Kriwacki R W. The role of intrinsic protein disorder in regulation of cyclin-dependent kinases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2024, 88:102906.
- [5] He Z Y, Zhuo R G, Yang S P, et al. CircNCOR1 regulates breast cancer radiotherapy efficacy by regulating CDK2 via hsa-miR-638 binding[J]. *Cellular Signalling*, 2023, 109: 110787.
- [6] Webster K A, Henke K, Ingalls D M, et al. Cyclin-dependent kinase 21 is a novel regulator of proliferation and meiosis in the male germline of zebrafish[J]. *Reproduction*, 2018, 157(4): 383-398.
- [7] Hoodless L. Role of cyclin-dependent kinase 9 in the resolution of innate inflammation in a zebrafish tailfin injury model[D]. Edinburgh: The University of Edinburgh, 2016.
- [8] Wood D J, Endicott J A. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family[J]. *Open Biology*, 2018, 8(9): 180112.
- [9] Zhang P. Cloning and function of cyclin-dependent kinase gene (CDK) in the ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[D]. Lianyungang: Jiangsu Ocean University, 2022. [张攀. 脊尾白虾 CDK 基因的克隆及其功能研究[D]. 连云港: 江苏海洋大学, 2022.]
- [10] Yang B, Jia Y K, Jia Z H, et al. The cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) mediates hematopoiesis through G1-to-S transition in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2018, 81: 156-166.
- [11] Wang Z Y, Wang Y H, Wu T Y, et al. INTS11 promotes the proliferation of bovine myoblasts by mediating the transcription of CDK2 and CYCLIND1[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2024, 55(7): 2927-2939. [王子岩, 王亚慧, 吴天弋, 等. INTS11 通过介导 CDK2 和 CYCLIND1 的转录促进牛成肌细胞增殖[J]. 畜牧兽医学报, 2024, 55(7): 2927-2939.]
- [12] Lin L L, Mo X Y, Liu L, et al. RAD51AP1 affects the proliferation, cell cycle and apoptosis of ovarian cancer cell through CDK1/PI3K/AKT pathway[J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2024, 32(9): 1812-1819. [林丽丽, 莫新宇, 刘莉, 等. RAD51AP1 通过 CDK1/PI3K/AKT 通路影响卵巢癌细胞增殖、细胞周期和凋亡[J]. 中国优生与遗传杂志, 2024, 32(9): 1812-1819.]
- [13] Kargbo R B. Selective cyclin-dependent kinase inhibitors and their application in cancer therapy[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2022, 13(10): 1561-1563.
- [14] Zhang Y B, Li R Y, Li H, et al. Morpho-histological and transcriptome analysis reveal the unreduced sperm formation mechanism in *cdk1*-depletion zebrafish[J]. *Marine Biotechnology*, 2024, 26(6): 1206-1218.
- [15] Song Y F, Tan X Y, Pan Y X, et al. Fatty acid β -oxidation is essential in leptin-mediated oocytes maturation of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1457.
- [16] Matrone G, Mullins J J, Tucker C S, et al. Effects of Cyclin Dependent Kinase 9 inhibition on zebrafish larvae[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(22): 3060-3069.
- [17] Chu J, Loughlin E A, Gaur N A, et al. UHRF1 phosphorylation by cyclin A2/cyclin-dependent kinase 2 is required for zebrafish embryogenesis[J]. *Molecular Biology Cell*, 2012, 23(1): 59-70.
- [18] Matrone G, Wilson K S, Maqsood S, et al. CDK9 and its repressor LARP7 modulate cardiomyocyte proliferation and response to injury in the zebrafish heart[J]. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(24): 4560-4571.
- [19] Huang X Z, Hu B C, Yang X D, et al. The putative mature peptide of piscidin-1 modulates global transcriptional profile and proliferation of splenic lymphocytes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 1035-1043.
- [20] Kanungo J, Li B S, Zheng Y L, et al. Cyclin-dependent kinase 5 influences Rohon-Beard neuron survival in zebrafish[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(1): 251-259.
- [21] Xu Y, Tian Y, Zhao H, et al. A novel CDK-2 homolog identified in lamprey, *Lampetra japonica*, with roles in apoptosis[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(6): 1829-1843.
- [22] Feng S L. Identification and functional exploration of cell cycle G1 phase related genes CCND2 and CDK6 in *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022. [冯上乐. 三角帆蚌 G1 期细胞周期蛋白 CCND2 及其激酶 CDK6 的分子克隆及功能研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.]
- [23] Boulanger J, Vézina A, Mongrain S, et al. Cdk2-dependent phosphorylation of homeobox transcription factor CDX2

- regulates its nuclear translocation and proteasome-mediated degradation in human intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(18): 18095-18107.
- [24] Wang Y, Jiang R K, Wang Q, et al. Silencing LINC01021 inhibits gastric cancer through upregulation of KISS1 expression by blocking CDK2-dependent phosphorylation of CDX2[J]. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2021, 24: 832-844.
- [25] He Z M, Liu N, Cai Y Y, et al. Effect of tributyrin on growth performance and pathway by which tributyrin regulates oligopeptide transporter 1 in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12(19): 2498.
- [26] He Z M, Cai Y Y, Yang M, et al. Transcription factor CDX2 directly regulates the expression of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal PepT1 to mediate the transportation of oligopeptide[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 24: 101148.
- [27] Fisheries and Fisheries Administration of The Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Promotion Station, China Fisheries Society. 2024 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2024. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴-2024 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2024.]
- [28] Endicott J A, Noble M E. Structural principles in cell-cycle control: Beyond the CDKs[J]. *Structure*, 1998, 6(5): 535-541.
- [29] Jeffrey P D, Russo A A, Polyak K, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a CyclinA-CDK2 complex[J]. *Nature*, 1995, 376(6538): 313-320.
- [30] Russo A A, Tong L, Lee J O, et al. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase CDK6 by the tumour suppressor p16INK4a[J]. *Nature*, 1998, 395(6699): 237-243.
- [31] Brown N R, Noble M E, Endicott J A, et al. The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases[J]. *Nature Cell Biology*, 1999, 1(7): 438-443.
- [32] Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30(11): 630-641.
- [33] Zhou S Y, Blechner S, Hoagland N, et al. Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases[J]. *Current Biology*, 1994, 4(11): 973-982.
- [34] Hanks S K, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: Kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. *FASEB Journal*, 1995, 9(8): 576-596.
- [35] Martín A, Odajima J, Hunt S L, et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27 Kip1 and p21 Cip1[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(6): 591-598.
- [36] Duret L, Mouchiroud D. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(8): 4482-4487.
- [37] Pouyet F, Aeschbacher S, Thiéry A, et al. Background selection and biased gene conversion affect more than 95% of the human genome and bias demographic inferences[J]. *elife*, 2018, 7:e36317.
- [38] Singer G A C, Hickey D A. Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content[J]. *Gene*, 2003, 317(1-2): 39-47.
- [39] Borges R, Szöllösi G J, Kosiol C. Quantifying GC-biased gene conversion in great ape genomes using polymorphism-aware models[J]. *Genetics*, 2019, 212(4): 1321-1336.
- [40] Capra J A, Pollard K S. Substitution patterns are GC-biased in divergent sequences across the metazoans[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2011, 3: 516-527.
- [41] Parvathy S T, Udayasuriyan V, Bhadana V. Codon usage bias[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(1): 539-565.
- [42] Weinberg D E, Shah P, Eichhorn S W, et al. Improved ribosome-footprint and mRNA measurements provide insights into dynamics and regulation of yeast translation[J]. *Cell Reports*, 2016, 14(7): 1787-1799.
- [43] Masuda I, Yamaki Y, Detroja R, et al. tRNA methylation resolves codon usage bias at the limit of cell viability[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(4): 111539.
- [44] Rocha Eduardo P C. Codon usage bias from tRNA's point of view: Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization[J]. *Genome Research*, 2004, 14(11): 2279-2286.
- [45] Liu K S, Ouyang Y Q, Lin R, et al. Strong negative correlation between codon usage bias and protein structural disorder impedes protein expression after codon optimization[J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 343: 15-24.
- [46] Baeza M, Sepulveda D, Cifuentes V, et al. Codon usage bias in yeasts and its correlation with gene expression, growth temperature, and protein structure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1414422.
- [47] Frumkin I, Lajoie M J, Gregg C J, et al. Codon usage of highly expressed genes affects proteome-wide translation efficiency[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(21): E4940-E4949.
- [48] Nuñez-Hernandez D M, Camacho-Jiménez L, González-Ruiz R, et al. Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk-2) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Molecular characterization and tissue-specific expression during hypoxia and reoxygenation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & integrative physiology*, 2019, 230: 56-63.
- [49] 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.]
- [50] Gross I, Lhermitte B, Domon-Dell C, et al. Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor CDX2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation[J]. Oncogene, 2005, 24(54): 7955-7963.
- [51] Ito K, Hikida A, Kitagawa S, et al. Soy peptides enhance heterologous membrane protein productivity during the exponential growth phase of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2012, 76(3): 628-631.
- [52] Wu Q, Tang J Z, Liu Z, et al. Proper taurine-enriched fishmeal promotes growth of crucian carp *Carassius auratus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(6): 1516-1523. [伍琴, 唐建洲, 刘臻, 等. 牛磺酸对鲫鱼(*Carassius auratus*)生长、肠道细胞增殖及蛋白消化吸收相关基因表达的影响[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(6): 1516-1523.]
- [53] Dalmaso G, Nguyen H, Charrier-hisamuddin L, et al. Butyrate transcriptionally induces peptide transporter PepT1 expression and activity via CDX2 and CREB transcription factors: P-079[J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2008, 14(1): S33.

Molecular characteristics, expression regulation and its coding protein's interaction with CDX2 of *cdk2* in *Ctenopharyngodon idella*

HE Zhimin¹, LUO Junhan¹, WANG Chenhaoyang¹, TANG Xiang¹, JIANG Ran^{1,2}, WANG Qixiang¹, LIU Jing¹, LI Yanfang¹, GAO Xing¹, ZENG Peng¹, QING Yanling¹, LUO Yanan¹, LIU Zhen^{1*}

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Nutrition and Quality Control of Aquatic Animals, Department of Biological and Chemical Engineering, Changsha University, Changsha 410022, China;
2. Hunan Provincial Key Laboratory of Animal Intestinal Function Regulation, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: To investigate the molecular characteristics, interaction, and nutritional regulation of CDK2 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), we obtained the grass carp *cdk2* sequence by cloning; its open reading frame is 897 bp, encoding 298 amino acids. It exhibited a high degree of sequence and structure conservation in the analyzed species. The results of codon bias and cluster analyses based on CDK2 suggested that the grass carp has the closest relationship with zebrafish. Compared with clustering based on *cdk2* RSCU, a phylogenetic tree analysis based on CDK2 sequence was more consistent with the conventional species classification. Tissue expression analysis showed the highest *cdk2* mRNA levels in blood ($P < 0.05$), liver, and spleen; molecular docking and yeast two-hybrid assays were employed to analyze the interaction between grass carp CDK2 and its downstream phosphorylated substrate protein CDX2. The results showed that grass carp CDK2 interacted with CDX2. Furthermore, the regulation of different inclusion levels of free amino acid CAA (free amino acids: lys and glu), dipeptide KE (lys-glu, KE), tripeptide GHK (gly-his-glu, GHK) on *cdk2* expression were examined, and the results revealed that compared with the control and other treatment groups, *cdk2* expression showed the highest expression in the 0.5% GHK group; *cdk2* expression of the CAA groups was higher than those of the KE dipeptide group which showed similar amino acids as the CAA group. In summary, *cdk2* expression in grass carp exhibits tissue specificity; CDK2 interacted with CDX2; and its expression was regulated by the inclusion level of amino acids and oligopeptides. This study provides new clues for studying the molecular characteristics of grass carp *cdk2*, exploring the regulatory mechanism of intestinal function in other teleost fish, and provides a theoretical basis for further study on the molecular regulating mechanism of *cdk2* on transporting and absorption of amino acids and oligopeptides.

Key words: grass carp (*Ctenopharyngodon idella*); *cdk2*; CDX2; interaction; nutrient regulation

Corresponding author: LIU Zhen. E-mail: z20040625@ccsu.edu.cn