DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.14481

斑节对虾细胞周期蛋白 Y 基因克隆与原核表达

李伟杰^{1,2}, 傅明骏^{1,3}, 赵超^{1,3}, 郭松^{1,2}, 江世贵^{1,3}, 周发林^{1,3}, 杨其彬^{1,3}, 邱丽华^{1,3}

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300

摘要:为了研究细胞周期蛋白 Y(cyclin Y)在斑节对虾(*Penaeus monodon*)卵巢发育中的作用,从斑节对虾转录组数 据中筛选获得 cyclin Y 基因部分序列,采用 SMART-RACE 方法克隆得到斑节对虾细胞周期蛋白 Y (Pm-cyclin Y) 基因 cDNA 全序列。Pm-cyclin Y 基因 cDNA 全长 1576 bp,其中包含 108 bp 的 5'非编码区(5'UTR)和 439 bp 的 3' 非编码区(3'UTR)以及 1029 bp 的开放阅读框(ORF),可编码 342 个氨基酸。生物信息学分析显示,其编码的氨基酸 序列有 1 个保守的周期蛋白框(cyclin box)同源结构域(172~257 aa),预测的分子量约为 37.6 kD,理论等电点 6.64。 实时定量 PCR 显示其 mRNA 在卵巢的表达量显著高于其他组织(P<0.05);并且在卵巢 5 个不同发育期都有表达, 在 III 期卵巢中的表达量最高。本研究通过原核表达方法对 Pm-cyclin Y 进行重组表达,为其蛋白质功能方面的研 究奠定了基础。

关键词: 斑节对虾; cyclin Y 基因; 分子克隆; 实时荧光定量 PCR; 原核表达 中图分类号: S917 _____文献标志码: A _____文章编号: 1005-8737-(2015)05-0896-12

细胞周期蛋白家族(cyclins)成员随着细胞周 期的变化依次合成并降解,每个成员都有一个保 守的周期蛋白框序列(cyclin box),由 100 个左右 的氨基酸组成^[1]。不同的周期蛋白成员通过 cyclin box 与不同的周期蛋白依赖性激酶(CDK)相结合, 然后控制细胞周期的启动和关键监测点(check point)^[2-3]。cyclin 家族中, cyclin Y 是一个关键的 细胞周期调节器,有类似生长因子传感器的功能, 参与调控细胞周期和转录过程^[4]。目前研究表明, 与 cyclin Y 相互作用的受体 CDK 分为两大类:即 PCTAIRE 激酶(PCTKs)与 PFTAIRE 激酶(PFTKs), 前者命名为 CDK14,在真核生物中高度保守;后 者为 Eip63E 的同源 CDK^[5]。Jiang 等^[6]和 Yue 等^[7] 通过研究发现与 CDK14 序列上高度同源的 cyclin Y的另一个受体,命名为 CDK16。基于对 cyclin Y 基因功能的研究, cyclin Y 参与细胞周期调控的机 理成为研究热点。赵晓婷等^[8]和江妹^[9]发现 cyclin Y 在非小细胞肺癌肿瘤组织和肺癌细胞系中高表 达,且其表达模式与组织类型和肿瘤大小呈现统 计学差异; Zhang 等^[10]发现,高表达的 cyclin Y 可以促进直肠癌瘤细胞的细胞增殖,同时在肿 瘤的免疫以及肿瘤细胞的凋亡、黏附等方面发 挥重要作用。目前 cyclin Y 基因的功能在甲壳 动物中未见报道,但在节肢动物中,对果蝇 (*Drosophila melanogaster*)的研究比较清楚。 cyclin Y 基因对果蝇的胚胎发育具有重要的作 用,如 Sanchez 等^[11]突变果蝇 cyclin Y 基因后,发现 果蝇生长迟缓、发育产生畸形或缺陷; Shu 等^[12]和 Liu

收稿日期: 2014-11-20; 修订日期: 2015-01-19.

基金项目:国家自然科学基金项目(40976101, 31101903);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-47);中央级公益性科研院 所基本科研业务费专项资金项目(2012TS27, 2014TS12);海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014057). 作者简介:李伟杰(1989-),女,硕士研究生,专业方向为海洋分子生物学.E-mail:vicky 890114@163.com

通信作者: 邱丽华, 研究员. E-mail: giu902@126.com

等^[13]研究发现, 膜定位的 cyclin Y 与 Eip63E(果蝇 Ecdysone-induced protein63E)结合, 使 LRP6 正常 磷酸化, 从而保证 Wg/Wnt 信号通路正常活化, 使细胞可以通过 G2 期/M 期的关键监测点(check point)。

随着分子生物学技术的发展、人们越来越关 注甲壳类动物尤其是对虾中细胞周期蛋白基因的 功能,对细胞周期蛋白的分子调控机制已有所研 究, 如 Qiu 等^[14]利用同源克隆和锚式 PCR 技术克 隆出斑节对虾(Penaeus monodon)cyclin B 基因、 并鉴定出它在卵巢中的表达量最高; Qiu 等^[15]在 日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus)卵巢中找到 5种不同形式的 cvclin B 转录体,并检测了它们在 卵子发生过程中的不同表达模式; Fang 等^[16]克隆 出中华绒螯蟹 cyclin B 基因全长、并研究了其在 卵黄发生期的表达模式; Visudtiphole 等^[17]在斑节 对虾卵巢中克隆出 cyclin B 和 cyclin A 基因、并 检测到两个基因在性成熟个体的表达量高于未成 熟个体, 而 cyclin A 在卵巢发育过程中以及产卵 后的个体没有显著变化: 赵超等^[18]对斑节对虾 cyclin E 进行了初步探索。此外,关于刀额新对虾 (Metapenaeus ensis)^[19]、拟穴青蟹(Scylla paramamosain)^[20]等甲壳动物生殖细胞中细胞周期 蛋白的分子调控机制也有报道。细胞周期蛋白在 甲壳动物尤其是对虾的生长发育繁殖方面的研究 已成为热点。本实验以节肢动物门甲壳动物纲的 斑节对虾为实验材料, 通过对其 cyclinY cDNA 序列的克隆和生物信息学分析, 了解该基因的结 构特征;通过对其在 mRNA 水平的表达模式分析 和蛋白水平的初步探索,为进一步探索细胞周期 蛋白家族对斑节对虾卵巢发育的分子调控机制奠 定基础。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料

实验用斑节对虾来源于海南省三亚市附近海 域,从捕捞的野生斑节对虾(体重 100~200 g)中挑 选卵巢发育不同阶段的斑节对虾,解剖取组织样品; 并用液氮速冻卵巢、肝等组织,用 4%多聚甲醛固定 卵巢组织,石蜡组织切片法确认卵巢的分期。

1.2 斑节对虾总 RNA 提取与鉴定

对已经确定卵巢发育分期的斑节对虾,每期 各取3尾,每尾卵巢组织取约30 mg样品。利用 Trizol 试剂(Invitrogen)参照说明书手提法提取总 RNA。然后,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测其完整 度,用 Nano Drop 2000/2000c分光光度计(Thermo) 测定其纯度及浓度。

 SMART-RACE 技术获得 Pm-cyclin Y 的 cDNA 全长

1.3.1 逆转录 以提取的斑节对虾总 RNA 为模板, 参考 SMARTTM RACE 试剂盒中的逆转录方法合成 cDNA 第一条链。将得到的 cDNA 模板经 β-actin 通 用引物检测, 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测显示条带清 亮且无杂带, 然后进行分装, -80 °C 保存, 备用。 **1.3.2** Pm-cyclin Y 的分子克隆 通过对斑节对 虾转录组数据筛选获得 cyclin Y 的基因片段, 用

Primer5.0 软件设计特异性引物 F(5'-TGGGCAA CAAACAC-3')和 R(5'-GCTATTCTGTCATGATCT TG-3')。以 cDNA 为模板, 对该序列进行验证, 经 Blast 比对, 获得开放阅读框序列 ORF。

参考 SMARTTM RACE 试剂盒中 UPM 和 NUP 引物序列,采用 cDNA 末端快速扩增技术(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) 扩增 Pm-cyclin Y的 cDNA 的 5'和 3'末端。利用半巢式 (semi-nested)PCR 方法、首先由 GSP1(3'GSP1: 5'-ATCAATGTGCCGTCCTCTGTGTATG-3'和 5'GSP1: 5'-TCAGGACCCCAGTCTTCACCCAACA-3') 和 Adaptor primer(接头引物 UPM) 进行降落 PCR 反 应。然后,将所得 PCR 产物稀释 100 倍, 取 1 µL 作为模板,利用引物 GSP2(3'GSP2: 5'-GCAG AACAGTTATGCCGTAATGGTC-3'和 5'GSP2: 5'-TGTGTTTATCCTGGGGGGAAGGTCGG-3')和 NUP 再进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10×Buffer 反应缓冲液 2.5 µL, 10 mmol/L dNTP 0.5 µL, UPM 2.5 µL, 1 000 U Ex Taq 酶 0.5 µL, 1 µL cDNA 模板, 用双蒸水将反应体系补充至 25.0 μL。反应条件为: 94℃变性 4 min; 94℃, 30 s, 68℃, 30 s, 72℃, 2 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。所得的 PCR 产物经

1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶回收试剂盒 (OMEGA)对目的片段进行切胶回收,回收产物与 pMD19-T 载体(TaKaRa)连接,然后转化到大肠杆 菌(*Escherichia coli*)DH5α感受态细菌,将 PCR检

测为阳性的克隆菌液送深圳华大公司测序。

1.4 序列分析

对克隆得到的 Pm-cyclin Y 序列进行生物信 息学分析,所用软件和方法如表 1 所示。

表 1 分析 Pm-cyclin Y 基因序列所用的生物信息学方法 Tab. 1 Bioinformatics methods about Pm-cyclin Y gene sequences

生物信息学分析 bioinformatics analysis	分析方法/软件 software tool/method
序列同源分析 sequence homology analysis	NCBI Blast(http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/)
相似性搜索 similarity metric	BioEdit; MatGAT
多重序列比对 multiple alignment	Clustalx1.81; BioEdit
氨基酸序列 amino acid sequence	Scan Prosite(EXPASy Molecular Biology Server)
蛋白结构域分析 protein structure domain analysis	SMART4.0, ScanProsite
糖基化位点预测 glycosylation site prediction	NetNGlyc2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)
磷酸化位点预测 phosphorylation site prediction	NetPhos 2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
二级结构预测 secondary structure prediction	PHYRE2; Predictprotein(https: //www.predictprotein.org)
邻位相连法构建进化树 construct phylogenetic tree by Neighbor-Joining	Clustalx1.83, MEGA6.0

1.5 Real-time PCR 检测 Pm-cyclin Y 的 mRNA 分布

取9尾健康成熟的斑节对虾(体重大约150g) 的卵巢、肝胰腺、脑、肠和胃等10个组织、用 Trizol 试剂手提法提取各个组织的总 RNA. 测定其纯度 和浓度、并于-80℃保存。通过石蜡组织切片、参 考黄建华等^[21]的研究确定斑节对虾卵巢的分期(I: 原生质细胞阶段、II:核染色质期、III:周边核仁 期、IV: 卵黄囊期、V: 成熟期)、同样方法提取卵 巢发育各期的总 RNA、测定其纯度和浓度、-80℃ 保存。将每3尾虾对应组织的总 RNA 混合作为一 组、这样每个组织就得到了3组样品作为平行样、 每组样品供 3 次实验重复操作。分别取 1 µg 各组 织和发育各期卵巢的 RNA 作为模板、按照 Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time, TaKaRa)的使用说明进行逆转录, 所得 cDNA 用 β -actin 引物检测,显示无杂带,稀释 8 倍,分装并放置在-80℃,作为备用模板。设计特 异性引物 Cy-F(5'-CCCCTAAGTAAAGAACGA-3') 和 Cy-R(5'-CAGAATAGCCACTGAACG-3'), 内参 基因 EF-1a 的引物 EF-F(5'-ATGGTTGTCAAC TTTGCCCC-3')以及 EF-R(5'-TTGACCTCCTTG ATCACACC-3')。参照 Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG(Invitrogen)Kit 的使用说明, 分别 利用这两对引物进行实时荧光定量 PCR 扩增、扩

增体系为: 2×Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG 10 μL, 引物各 0.5 μL, cDNA 模板 2.0 μL, 双蒸水补至 20 μL。以蒸馏水代替模板作为阴性 对照, 样品和内参均设 3 个重复,分别以心脏和 卵巢发育 I 期作为对照。扩增条件为: (1)预变性 (95℃, 30 s), (2)PCR 反应(95℃, 5 s, 60℃, 20 s, 40 个循环), (3)熔解曲线(65℃, 15 s), (4)降温至 40 ℃。扩增结果显示熔解曲线为单峰、无杂峰,实 验无污染也没有非特异性产物,结果可信。借助 SPSS10.0 软件,用 $\Delta\Delta C_T$ 法和单因素方差分析 (ANOVA)对实验数据进行分析。

1.6 Pm-cyclin Y 的重组表达

1.6.1 重组质粒的构建 取健康成熟的斑节对虾 (体重大约 150 g)的卵巢和肝胰腺组织,用 Trizol 试剂手提法提取这两个组织的总 RNA,测定其纯 度和浓度,混合这两个组织的 RNA 样品并于-80℃ 保存。参考反转录试剂盒 PrimeScript II 1_{st} Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)得到 cDNA 模板,根 据已知的 Pm-cyclin Y 基因序列,设计原核表达引 物,扩增反应的正向引物 F 含有 *Xho*I 酶切位点 (5'-CTCGAGTGACAGAATAGCCACTGAACGT-3'), 扩增反应的反向引物 R 含有 *Eco*R I 酶切位点 (5'-GAATTCATGGGCAACAAACACAGC-3'); PCR 扩增反应体系: 10×PCR Buffer for KOD-Plus 5 μ L, dNTP 5 µL, MgSO₄ 2 µL, 正向引物 F 和反向引物 R 各 1.5 µL, KOD-Plus 1 µL, 模板 cDNA 1 µL, 加 双蒸水补至 50 µL; 扩增 PCR 反应程序为 94℃变 性 2 min; 94℃, 40 s, 68℃, 40 s, 72℃, 1.5 min, 35 个循环; 68℃延伸 8 min。所得 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测显示条带清亮,利用胶回收 试剂盒将 PCR 产物切胶回收,过夜连接到 PMD-19T 载体,并转化到大肠杆菌 DH5 α ,将测 序正确的单克隆菌株扩大培养并提质粒。用 *Xho* I 和 *Eco*R I 对得到的目的质粒和 pET21a 质粒进行 双酶切,胶回收双酶切所得到的目的片段。将带 有酶切位点的 Pm-cyclin Y 与同样经过双酶切的 pET21a 质粒连接得到重组质粒。

1.6.2 重组质粒的表达 将构建所得的重组子转 化到 DH5α、挑单克隆并检测阳性菌送公司测序、 将测序正确的菌株扩大培养并提质粒, 再转化至 大肠杆菌感受态 BL21、挑单克隆于 5 mL 含氨苄 青霉素(Amp)的 LB 液体培养基中 37℃振荡培养 10 h 左右, 检测阳性菌送公司测序, 将测序正确 的菌株按1 100比例扩大培养。原核表达最优条 件摸索:分别对诱导温度(16℃、24℃、28℃、33℃、 37℃)和诱导时间(10 h、2 h、3 h、4 h、5 h)及 IPTG 浓度(0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L)进行摸索、同时经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测分析、确定 Pm-cyclin Y 的最优表达 条件、并在该条件下、大量诱导表达重组菌液 200 mL, 离心收集菌体, 超声破碎得到包涵体蛋 白, 用带有 His 和 HRP 双标签的抗体 Western-blot 方法检测重组蛋白是否挂上 His 标签。目的蛋白 的大小参考克隆得到的 Pm-cyclin Y 基因, 可编码 342 个氨基酸, 预测分子量约为 37.6 kD, 选用的 酶切位点是 XhoI 和 EcoR I, 根据载体 pET21a 的 质粒结构、从表达起始到目的片段 F 引物的 Xho I 位点、需要再加上约 0.6 kD、故此、目的片段约 为 38.2 kD。Western 检测是否杂交上 His 标签, 使 用杭州华安生物公司的 His-HRP 双标签抗体。 SDS-PAGE 和 Western 检测得到的目的条带都约 为 38 kD。且纯化得到的蛋白已经送杭州华安生 物公司做多克隆抗体、为后续实验做准备材料。 1.6.3 重组蛋白的纯化 亲和镍柱层析法纯化蛋

白,将上述包涵体蛋白分别经包涵体洗液 I/II/III 洗涤,每个洗液洗涤2次,每次30min,离心收集 沉淀,并用蛋白溶解液悬浮后放置4℃过夜。第2 天将溶解后的样品经 0.22 µm 的滤膜过滤,待过 柱。依次用8mL去离子水和 Binding Buffer冲洗 并平衡柱子。将待上样样品离心然后上样过柱, 并用5mL Binding Buffer 过柱子洗涤杂蛋白2次, 然后用5mL Elution Buffer 洗脱并收集纯化的蛋 白样品。用完的柱子用清水洗涤并用20%的乙醇保 存。纯化得到的蛋白经 BCA 试剂盒检测,质量浓度 为0.632 mg/mL,符合制备多抗所需蛋白浓度(最低 0.5 mg/mL,浓度越高越好)。纯化后的蛋白满足做 抗体的条件,抗体制备为期4个月,分4个阶段采 集血清并做效价检测,为后续实验做准备。

2 结果与分析

2.1 Pm-cyclin Y 基因的特征

设计特异性引物扩增出的 cyclin Y 开放阅读 框序列、通过 Blast 比对发现, Pm-cyclin Y 与蚤状 溞(Daphnia pulex)的细胞周期蛋白 Y 具有高度同 源性(相似性为 67%)、根据开放阅读框序列 ORF、 设计特异性引物、对序列进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增、测序结果经拼接比对、获得了 Pm-cyclin Y 的基因全长(GenBank no.: KM362907)。Pm-cyclin Y的 cDNA 包括 108 bp 的 5'UTR 和 439 bp 的 3'UTR 以及 1029 bp 的 ORF 片段, 全长为 1576 bp (图 1)。生物信息学软件预测 Pm-cyclin Y 编码 342 个氨基酸, BlastX分析显示, Pm-cyclin Y 预测的氨 基酸序列和其他已知周期蛋白 Y 具有非常高的同 源性^[22]; Blast 和 SMART 在线程序分析显示, Pm-cyclin Y有1个 cyclin 结构域(172~257 aa)(图 2)。通过在线预测(http://web.expasy.org/compute_ pi/), Pm-cyclin Y 蛋白分子量约为 38.7 kD, 理论 等电点 6.64。 Signal P 3.0 程序分析显示, Pm-cyclinY 不包含信号肽序列; NetNGlyc1.0 Server 程序分析显示, Pm-cyclin Y 不存在糖基化 位点(N-Glycosylation); NetPhos2.0 预测结果显示: Pm-cyclin Y 共含有 24 个潜在的磷酸化位点,包 括 17 个 Ser 位点, 2 个 Thr 位点和 5 个 Tyr 位点。 PHYRE2 软件预测 Pm-cyclin Y 编码蛋白的二级 结构显示: Pm-cyclin Y 编码的蛋白包括 13 个 α 螺 旋,螺旋占总结构的 54%; 1 个 β 折叠片,占总结构 的 1%; 无规则卷曲结构占 47%(图 3)。选取 Blastp 比对结果中哺乳类、禽类、两栖类、节肢动物和鱼 类、爬行类等代表物种的 cyclin Y 氨基酸序列,用 Clustalx1.83 软件和 BioEdit 软件对 Pm-cyclin Y 进行 多序列比对(图 4),结果显示, Pm-cyclin Y 与大黄蜂、 蚤状溞高度相似,相似性分别为 72%和 67%。 MAGA6.0 软件构建系统进化树结果^[23]显示,斑节对 虾的 Pm-cyclin Y 编码蛋白和大黄蜂、家蚕、蚤状溞 以及果蝇聚为一支, 与哺乳类、鱼类、爬行类等代表 物种的 cyclin Y 编码蛋白聚类(图 5)。



图 1 Pm-cyclin Y 全长 cDNA 序列模式图





图 2 Pm-cyclin Y 的 CYCLIN 结构域

Fig.2 The CYCLIN domain structure of Pm-cyclin Y





蜥蜴 Anolis carolinensis 斑马鱼 Daniorerio 长尾猴 Macaca fascicularis 家鸡 Gallus gallus	RRKYSSCST SKKYSSCST ARKYSSCST RRKYSSCST	IFLDDST IFIDDST IFLDDST IFLDDST	V <mark>S</mark> QPNLKYT V <mark>S</mark> QPNLKST V <mark>S</mark> QPNLKYT V <mark>S</mark> QPNLKYT	IKCVALAIYY IKCVTLAIYY IKCVALAIYY IKCVALAIYY	HIKNRDTDG) HIKNRDS) HIKNRDPDG) HIKNRDPDG)	RMLLDIF DENL DRSLDIF DEKM RMLLDIF DENL RMLL <mark>DIF DE</mark> NL	HPLSKSEVPPD HPLSREQVPDD HPLSKSEVPPD HPLSKSEVPPD	YDKHDPEQKQJ YSRTDPEHKLJ YDKHNPEQKQJ YDKHDPEQKQJ	YRFVRTLF YRFVRTLF YRFVRTLF YRFVRTLF	SAAQL SAAQL SAAQL SAAQL	188 182 197 184
同源性 clustal consensus	:* .****	*::*:**	*.**** *	:***:**:**	**:** .	:*****.:*	**:: *. :*	.*::: :*:	*:***.*	***	100
	3	70	380	390	400	410	420	430	440	450	
		.									
斑节对虾 Penaeus monodon	YF <mark>SLRTLA</mark> E	ANDLTEP	ABPLSKERA	QKLPAMSRIC	EG <mark>K</mark> YAEQLC:	RNGHKKWSS <mark>L</mark> I	NVHAAS-RRSV	AILS			342
大黄蜂 Bombus impatiens	YF DLR TLAE	ANELTEP	SEPLSKEK <mark>A</mark>	QKL <mark>D</mark> AMSRVY	ED <mark>K</mark> VTAEAL	RTGIKRWSSL <mark>I</mark>	NICIGGPRRSI	AILS			342
蚕蛾 Solenopsis invicta	YF <mark>DLRTLA</mark> E	ANELTEP	SEPLSKEK <mark>A</mark>	QKLEAMSRVY	ED <mark>K</mark> VTAEAL	RTGIKKWSSL <mark>I</mark>	NICIGGPRRSI	AILS			342
蚤状溞 Daphnia pulex	YF <mark>DLRTL</mark> AE	AN EMN P	AEPLTKEK A	TKLEAMSRVC	ED <mark>K</mark> LASDIL	RANLKRSASM	NVNISRRSI	AILS			342
果蝇 Drosophila melanogast	eryFDLRTLAE	ANELNEP	TEPLSKERA	QKLEAMSRVM	IQD <mark>K</mark> VTAEAL	KNGIKKWSSM <mark>I</mark>	NISQGGPRRSV	AILS			406
斑点雀鳝 Lepisosteus oculatu	65 YF DLR SLAI	DN NIMIN E P	LEPLSKERA	QRL <mark>P</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y–KDLG	KAAMRRSFSA <mark>D</mark>	NLVGIRRSH	IAVLS			343
家兔 Ochotona princeps	YFDLR <mark>SLA</mark> E	ANNLSEP	LEPLSRDRA	HKLDAISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLR:	RSARKRSASA	NLTLPRWSP	AIIS			341
人 Homo sapiens	YFDLRSLAE	A NLS P	LEPLSRERA	HK <mark>LD</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLRI	RSARKRSASAD	NLTLPRWSF	AIIS			341
非洲象 Loxodonta africana	YFDLRSLAE	ANNLSEP	LEPLSRERA	HKLDAISRLC	EDKY-KDLR	RPTRKRSASA	NLTLTRWSB	AIIS			341
牛 Bos Taurus	YFDLRSLAE	ANNLSEP	LEPLSRERA	HKL <mark>P</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLR	RPTRKRSASA	NLTLPRWSE	AIIS			341
东北虎 Panthera tigris taltaid	ayf DLR SLAE	ANNLSEP	L <mark>BPL</mark> SRER <mark>A</mark>	HKL <mark>P</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLR	RPTRKRSASA <mark>D</mark>	NLTLPRWSP	AIIS			341
小鼠 Mus musculus	YFDLRSLAE	ANNLSEP	LEPLSRERA	HKL <mark>P</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLR	KPMRKRSASA <mark>D</mark>	NLILPRWSB	AIIS			341
虎鲸 Orcinus orca	YF <mark>DLR</mark> SLAE	ANNLSEP	LEPLSRERA	HK <mark>LP</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y–KDLR:	RPTRKRSASA	NLTLPRWSF	AIIS			341
非洲爪蟾 Xenopus tropicalis	YFDLR SLAE	SNNLSEP	LEPLSRDRA	CKLPAISRLC	ED <mark>K</mark> Y–KDFR	KLAKRRSASA <mark>I</mark>	NLTVVRWSB	AIIS			339
蜥蜴 Anolis carolinensis	YFDLR <mark>SLA</mark> E	ANNLSEP	L <mark>BPL</mark> SRER <mark>A</mark>	CKLPAISRLC	ED <mark>K</mark> Y–KDFR:	KSAKKRSVS <mark>I</mark>	NLTVVRWSB	AIIS			345
斑马鱼 Daniorerio	YFDLRSLAD	DNNLSEP	LEPLSNER A	QK <mark>LD</mark> AISRLC	ED <mark>K</mark> Y-KDLS:	RVAMRRSFSA	NLVGIRRSN	AVLS			339
长尾猴 Macaca fascicularis	YFDLRSLAE	ANNLSEP	LEPLSRERA	HKL <mark>DAISR</mark> LC	EDKY-KDLR	RSARKRSASA <mark>I</mark>	NLTLPRWSP	AIIS			354
家鸡 Gallus gallus	YFDLRSLAE	ANNLSEP	LEPLSRDRA	YKLEAISRLC	EDKY-KDFR:	KSAKKRSVSA	LTVVRWSB	AIIS			341
同源性 clustal consensus	**.**:**:	*::.**	***:.::*	:***:**:	:.* : :	:: * **	* *:	*			341

图 4 预测的 Pm-cyclin Y 氨基酸序列与其他物种 cyclin Y 氨基酸序列的多重序列比对 图中*表示同源位点∷表示相似位点、右侧数字指碱基数.

Fig.4 Multiple alignment of *Penaeus monodon*'s cell cyclin Y amino acid sequence with other species' cell cyclin Y amino acid sequence Homology and similar sites were shown with sparks (*) and dots (:), respectively. The figures on the right side refer to the number of bases.





Fig. 5 NJ phylogenetic tree based on cell cyclin Y amino acid sequence using MEGA6.0 software

2.2 Real-time PCR

从结果可以看出, Pm-cyclinY 的 mRNA 在所 检测的 10 个组织中的表达量存在明显的差异, 其 中, 在卵巢中的表达量最高, 且高于其他组织的 表达量 10 倍左右, 其次是鳃、淋巴、脑、胸腺、 心脏及肝胰腺, 在眼柄及肠中的表达量较低, 而 在肌肉中的表达几乎检测不到(图 6)。从斑节对虾 卵巢发育 5 个时期的荧光定量 PCR 结果(图 7)可 以看出: Pm-cyclin Y 在卵巢发育的 III 期表达量最 高,出现高峰值;其次是 I 期表达量较高,而 II 期 与 IV 期表达量接近,但明显低于 I 期; V 期的表 达量最低、极不明显。













2.3 原核表达结果

分析不同的诱导温度、诱导时间和 IPTG 诱 导浓度下 SDS-PAGE 结果,确定其最适诱导条件 为在 IPTG浓度为0.8 mmol/L下,33℃振荡培养4 h。 诱导表达及蛋白纯化结果如图 8 所示,在 Pm-cyclin Y 原核表达过程中,摸索了 pRSET、 pGEX、pET28a、pET21a、pET32a 这 5 种载体与 cyclin Y 重组后的表达情况,发现只有 pET21acyclinY 成功表达。进一步摸索 IPTG 浓度、温度、 时间,得到最优表达条件后表达量仍然不高,且 经洗涤纯化后又有损失;但可以纯化出目的蛋 白。目的蛋白的大小参考克隆得到的 Pm-cyclin Y 基因 cDNA,包含 1029 bp 的开放阅读框(ORF), 可编码 342 个氨基酸,预测分子量约为 37.6 kD, 选用的酶切位点是 *Xho* I 和 *Eco*R I,根据载体 pET21a 的质粒结构,从表达起始到目的片段 F 引 物的 *Xho* I 位点,需要再加上约 0.6 kD,故此,目的 片段约 99 个氨基酸,分子量为 38.2 kD。应用杭州

		and the second se									Marker /	kD
А	未诱	导 诱导后	包涵体	洗液I洗涤	Ⅱ洗涤	Ⅲ洗涤	上样	前	纯化后	В		170
kD	marker uning	duced induced	inclusion	n washed	by lotic	on by lotion	befor	e loading	g purified	1000001 100000	designation of	100
170	Sector 1			by lotion I	Π	Ш					Section of	-0
130	Martin	140	-	1.44					And the second second		Cocil	70
100		1.00	-	1000		and south the	-			Contract of the local	and the second	55
70	-	1.8.0		011		ale de la competencia de la co	-			A Real Property of the second	Constant	
55	-	100	-	t t						Construction of the	and the second	40
40		-	Second .	Sec. 1	-						State State	
40	Sec. a	X			-	-	-	-		Martin Constant	125 10	25
35			in such	and a	-		Sec.				and the second	35
55			-	-	Sec.					The second second	The set	
25	-									and the second second	Section P.	25
25											19.002	
										and the second second	15.90	
		14										
1.7			1.1	141						all search searching		
15	P		- 121	No.								
10			10							Section Section		15
											1.1.1.1.1.1.1	

图 8 斑节对虾 cyclin Y 重组蛋白表达及纯化

A 图从左到右依次表示未诱导蛋白、诱导蛋白、包涵体、洗液 I/II/III 洗涤后、上柱前和纯化后的结果, B 图表示免疫印迹阳性 结果, 图中箭头表示目的条带位置.

Fig. 8 Recombinated Pm-cyclin Y protein expression and purification

A. From left to right in turn are protein not induction, induction, inclusions, after washing by the lotion I/II/III, before loading and after purification. B. The Western positive result. Arrows in figure show objective straps.

华安生物公司的 His-HRP 双标签抗体, Western 检 测是否杂交上 His 标签。SDS-PAGE 和 Western 检 测得到的目的条带均约为 38 kD。纯化得到的蛋白 做多克隆抗体, 为后续实验做准备材料。

3 讨论

本研究利用基因克隆技术克隆得到了目的基因的全 cDNA 序列(Genbank No. KM362907),利用生物信息学手段分析了该基因的结构和特征。 该基因编码的氨基酸序列有 1 个保守的周期蛋白框(cyclin box),其同源结构域为 172~257 aa,基因联配发现此区域都位于相当保守的区域。经同源性分析,其与蝇蛹金小蜂(Nasonia vitripennis)的细胞周期蛋白 Y 具有高度同源性,E 值为 2e⁻¹⁶⁰,与 蚤 状 溞 (Daphnia pulex)、果蝇 (Drosophila melanogaster)、大黄蜂(Bombus impatiens)具有很高的相似性。从分析得到的斑节对虾细胞周期蛋白 Y 的二维结构可以看出,所得到的斑节对虾的 cyclin Y 的结构与典型的细胞周期蛋白 Y 结构域相似,并且都在保守区域内。以上研究说明本研 究克隆得到的目的基因是 cyclin Y 的同源基因, 是细胞周期蛋白家族成员。

cyclin Y 作为细胞周期蛋白家族的一员,在 胚胎发育、细胞周期进程及病害发生发展中扮演 重要角色^[24],对 cyclin Y 的研究已成为热点,而 关于它的功能和作用机制的报道还很少、且主要 集中在肿瘤和医药方面、在甲壳类中的研究还未 见报道。现有的研究表明、细胞周期内有两个阶 段最为重要、即 G1 期到 S 期和 G2 期到 M 期、 cyclin Y 主要调控区间是 G2~M 期^[25]、保证细胞 分裂正常进行。在肿瘤研究中,沉默 cyclin Y 基 因会导致肺癌细胞周期阻滞在G1/S期、无法正常 完成细胞周期、从而显著抑制肺癌细胞的体内外 生长。本实验 Pm-cyclin Y 在斑节对虾各组织中 mRNA 相对表达量除卵巢较高外, 其他各组织均 无明显差异; 在卵巢发育的 5 个时期中, III 期相 对表达量最高,I期稍低于III期,这两个时期显著 高于 II 期、IV 期和 V 期, 说明 I 期和 III 期累积 了较多 cyclin Y 的 mRNA, I 期、III 期是卵巢发育 的关键时期、I 期是准备发育、III 期是已启动发育

到发育高峰阶段。在卵巢发育 III 期、即斑节对虾 卵巢发育的周边核仁期、在向卵黄囊期过渡、组 织切片显示该期已出现少量的卵黄囊卵母细胞。 在此期, 卵母细胞继续增大, 同时存在核染色质 期或核仁周期初级卵母细胞^[26-27]。斑节对虾各组 织和卵巢发育各期的这种表达模式反映了细胞周 期蛋白 Y 可能与斑节对虾卵巢发育相关、并在卵 巢发育中起着重要的作用。cyclin Y 在斑节对虾 各个组织中的表达模式与已经报道的 cyclin A、 cyclin B和 cyclin E在斑节对虾各个组织中的表达 模式均相同、即在斑节对虾卵巢中的表达量远远 高于其他各组织、但它们在卵巢发育各个期的表 达模式却不尽相同。甲壳动物中、关于细胞周期 蛋白的研究有很多,本实验室发现细胞周期蛋白 主要在卵巢发育 II 期呈现出相对高的表达量, 这 与该调控基因所处的时相有关, 如 cyclin E 主要 负责调控G1~S期的表达^[28],而 cyclin Y 主要参与 细胞周期 G2 到 M 期的过渡, 主要在细胞周期调 控信号通路的中下游起作用^[29]。

本研究摸索了 Pm-cyclin Y 原核表达的最优 诱导条件,并在最适条件下得到了 Pm-cyclin Y 的 重组蛋白,对蛋白进行纯化,在蛋白水平上对斑 节对虾 cyclin Y 的特征进行了初步探索,为后续 Pm-cyclin Y 在卵巢发育中的功能研究奠定了基 础。至于细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依 赖性蛋白激酶(CDK)以及细胞周期蛋白依赖性蛋 白激酶抑制剂(CKI)三者^[30–31]形成怎样的调控体 系,从而保证细胞周期的正常进行,进而影响性 腺发育,将是下一步深入探讨的重点。

参考文献:

- Yu J J, Ye H H, Huang H Y, et al. The research progress on cyclins in aquatic animals[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2006, 45(S2): 185–189.[虞晋晋, 叶海辉, 黄辉洋, 等.水生动物细胞周期蛋白研究进展[J].厦门大 学学报:自然科学版, 2006, 45(S2): 185–189.]
- [2] Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms[J]. Oncogene, 2009, 33: 2925–2939.
- [3] Liu D, Guest S, Finley R L, et al. Why cyclin Y? A highly conserved cyclin with essential functions[J]. Fly, 2010, 4(4):

278-282.

- [4] Pang E Y, Bai A H, To K F, et al. Identication of PFTAIRE protein kinase1, a novel cell division cycle-2 related gene, in the motile phenotype of hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology, 2007, 46(2): 436–445.
- [5] Davidson G, Shen J, Huang Y L, et al. Cell cycle control of wnt receptor activation[J]. Dev Cell, 2009, 17(6): 788–799.
- [6] Jiang M, Gao Y, Yang T, et al. Cyclin Y, a novel membrane-associated cyclin, interacts with PFTK1[J]. FEBS Lett, 2009, 13: 2171–2178.
- [7] Yue W T, ZhaoX T, Zhang L N, et al. Cell cycle protein cyclin Y is associated with human non-small cell lung cancer proliferation and tumorigenesis[J]. Clin Lung Cancer, 2011, 12(1): 43–50.
- [8] Zhao X T, Jiang M, Yue W T. The function and molecular mechnism of cyclin Y protein[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2013(11): 605–608.[赵晓婷,江妹,岳文涛,等. — 种新的细胞周期蛋白——Cyclin Y 的功能和分子机制的 研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2013(11): 605–608.]
- [9] Jiang M. Research on the role and mechanism of cancer related genes CCNY and ZFX regulation of lung cancer proliferation[D]. Beijing: Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, 2012.[江妹. 肿瘤相关基因 CCNY、ZFX 调控肺癌增值的作用和机理研究[D]. 北京: 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2012.]
- [10] Zhang Y T, Geng Y P, Si L S, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(7): 725–732.
- [11] Sanchez I, Dynlacht B D. New insights into cyclins, CDKs, and cell cyclecontrol[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(3): 311–321.
- [12] Shu F, Lv S, Qin Y, et al. Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(22): 9248–9253.
- [13] Liu D, Jr. Finley R L, Cyclin Y is a novel conserved cyclin essential fordevelopment in Drosophila[J]. Genetics, 2010, 184(4): 1025–1035.
- [14] Qiu L, Jiang S, Zhou F, et al. Molecular cloning and characterization of a cyclin B gene on the ovarian maturation stage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Mol Biol Rep, 2007, 38(3): 1921–1927.
- [15] Qiu G F, Yamano K. Three forms of cyclin B transcripts in the ovary of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*: Their molecular characterizations and expression profiles during oogenesis[J]. Comp Biochem Physiol B, 2005, 141(2): 186–195.

- [16] Fang J J, Qiu G F. Molecular cloning of cyclin B transcript with an unusually long 3' untranslation region and its expression analysis during oogenesis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(6): 1521–1529.
- [17] Visudtiphole V, Klinbunga S, Kirtikara K, et al. Molecular characterization and expression profiles of cyclin A[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2009, 152(4): 535–543.
- [18] Zhao C, Fu M J, Jiang S G, et al. Molecular cloning and expression analysis of the cyclin E gene from black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 463–472.[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): 463–472.]
- [19] Yang Y N, Ye H H, Shang L L, et al. Molecular cloning and analysis of cyclin B from shrimp *Metapenaeus ensis*[J]. Journal of Xiamen University: Natural ccience, 2012(4): 753-758. [杨亚男,叶海辉,尚丽丽,等. 刀额新对虾周期蛋 白 B 基因的分子克隆及序列分析[J]. 厦门大学学报: 自然科 学版, 2012(4): 753-758.]
- [20] Li W X, Huang H Y, Huang J R, et al. Molecular cloning, expression profiles and subcellular localization of cyclin B in ovary of mud crab, *Scylla paramamosain*[J]. Genes Genom, 2013(35): 185–195.
- [21] 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(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(3): 47–52.]
- [22] Wan J, Feng P C, Wang W J. Bioinformatics analysis of cyclin families[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2012(30): 14668–14672.[万晶, 冯沛春, 王万军. 细胞周期蛋白家族的

生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2012(30): 14668-14672.]

- [23] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30: 2725–2729.
- [24] Yue W T, Zhao X T, Zhang L N, et al. Overexpression of cyclin Y in non-small cell lung cancer is associated with cancer cell proliferation[J]. Sci Chin: Life Sci, 2010, 53(4): 511–516.
- [25] Zhou S J, Jiang S, Zhao X T, et al. The function study and cell localization of Cyclin Y and Cyclin X in lung cancer cell line A549[J]. China Cancer, 2013(7): 570–574.[周世杰, 江姝, 赵晓婷, 等. Cyclin Y 和 Cyclin X 在肺癌细胞株 A549 中的细胞定位和功能[J]. 中国肿瘤, 2013(7): 570–574.]
- [26] Xu Z, Primavera J H, de la Pena L D, et al. Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp(*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites[J].Aquaculture, 2001, 199(1-2): 13–40.
- [27] Pratoomchaat B, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P, et al. Sperm quality of pond reared and wild caught-*Penaeus monodon* in Thailand[J]. World Aquacult Soc, 1993, 24(4): 530–540.
- [28] Zhao H. Cyclin in cell cycle and progress in studies of cyclin[J]. Qinghai Agriculture and Forestry, 2000(2):
 28-29.[赵华. 细胞周期中的 Cyclin 蛋白及其研究进展[J].
 青海农林科技, 2000(2): 28-29.]
- [29] Koff A, Cross F, Fisher A, et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family[J]. Cell, 1991, 66(6): 1217–1228.
- [30] Dante R A, Sabelli P A, Nguyen H N, et al. Cyclin-dependent kinase complexes in developing maize endosperm: Evidence for differential expression and functional specialization[J]. Planta, 2014, 239(2): 493–509.
- [31] Nigg E A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle[J]. Bioessays, 1995,17(6): 471–480.

Molecular cloning and expression analysis of the cyclin Y gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

LI Weijie^{1, 2}, FU Mingjun^{1, 3}, ZHAO Chao^{1, 3}, GUO Song^{1, 2}, JIANG Shigui^{1, 3}, ZHOU Falin^{1, 3}, YANG Qibin^{1, 3}, QIU Lihua^{1, 3}

- 1. 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;
- Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China

Abstract: Cyclin Y is a newly discovered cell cycle-related protein that plays an important role during embryonic development, cell cycle progression and development, and disease. Current research on cyclin Y is very active but no data have been reported on cyclin Y in crustaceans. Gonads of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, mature if the eye stalk is removed. Thus, the full-length cyclin Y cDNA sequence from *P. monodon* (denoted as Pm-cyclin Y) was obtained using the rapid amplification of complementary DNA ends method to better understand the potential function of cyclin Y in the regulation of shrimp reproduction. The full-length cDNA sequence was 1578 bp and contained 108 bp 5' untranslated region (UTR) and a 439 bp 3'UTR. The open reading frame was 1029 bp and coded 342 amino acids (aa). A bioinformatics analysis showed that the amino acid coding sequence had a conserved cyclin box and the homologous protein box structure domain was 172–257 aa. The predicted molecular weight was about 38.7 kD, and the theoretical isoelectric point was 6.64. A real-time quantitative polymerase chain reaction analysis detected significantly higher Pm-cyclin Y mRNA expression in the ovary than that in other tissues. Pm-cyclin Y mRNA was expressed in the ovary at five different developmental stages, and the expression level was highest during phase III. The study abtained recombinant expression Pm-cyclin Y in prokaryotes and offered theoretical basis for further research on Pm-cyclin protein function. These results provide a basis for further functional studies of Pm-cyclin Y.

Key words: *Penaeus monodon*; cyclin Y gene; molecular cloning; real-time PCR; prokaryotic expression Corresponding author: QIU Lihua. E-mail: qiu902@126.com