

# 长牡蛎细胞周期调控关键基因 cyclin B3 的克隆及其在性腺发育中的作用

王 桐<sup>1,2</sup>, 李 莉<sup>1</sup>, 阙华勇<sup>1</sup>, 张国范<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 首次在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中克隆得到细胞周期蛋白 B3(cyclin B3)的 cDNA 全长序列和基因组结构序列。cyclin B3 基因 cDNA 全长 2383 bp, 其中编码区长度为 1293 bp, 编码一条含 430 个氨基酸的多肽链, 氨基酸序列比对和结构域分析均表明其为其他物种 cyclin B3 的同源蛋白, 预测的蛋白大小为 47.8 kD。cyclin B3 基因含有 10 个外显子和 9 个内含子, 外显子和内含子的数目和大小与其物种的进化地位相符。Real Time PCR 分析表明, 该基因表达有较强的组织特异性, cyclin B3 mRNA 在性腺中的含量最高, 而在外套膜中的含量最少, 前者是后者的 92 倍左右; 对处于不同发育阶段性腺中 cyclin B3 基因表达分析结果显示, 性腺中 cyclin B3 mRNA 含量随性腺发育程度的提高而提高, 这与其在细胞分裂和减数分裂中的作用相符, 同时也有助于满足早期胚胎发育时期旺盛的细胞分裂对 cyclin B3 蛋白需求。

**关键词:** 长牡蛎(*Crassostrea gigas*); 细胞周期调控; cyclin B3; 性腺; Real Time PCR

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)12-0001-09

细胞周期是一个在 S 期进行 DNA 复制并在 M 期进行染色体分离的循环过程, 对大多数细胞而言, 还有 G1、G2 两个时相, 分别为细胞进入 S 期和 M 期在营养物质等方面做必要准备<sup>[1]</sup>。细胞周期的时相转换是一个复杂的过程, 蛋白激酶或调控因子如细胞周期蛋白(cyclin)、周期蛋白依赖性激酶(Cyclin Dependent Kinase, CDK)、CDK 抑制性因子(CDKI)、CDK 活化激酶(CDK Activation Kinase)、PLK (Polo-like Kinase)等组成的调控网络组成的调控网络参与其中, 为细胞周期时相的有序推进进行精细调控。

周期蛋白 B(cyclin B)是首先在海洋无脊椎动物海胆中发现的一种细胞周期调控因子, 以在细胞周期中其蛋白丰度呈现周期性变化为典型特征, 在细胞分裂间期积累, 在细胞分裂期被蛋白酶复合物 APC 降解。cyclin B 作为调节亚基依靠周期蛋白框与 CDK1(p34<sup>CDK2</sup>)组成 MPF(Maturation 或 M-phase Promoting Factor)二聚体复合物<sup>[2]</sup>, 在精母/卵母细胞减数分裂、G1/S 和 G2/M 转化中发挥作用<sup>[3-8]</sup>, CDK1 的 T14、Y15 的去磷酸化和 T161 的磷酸化实现 MPF 的活化<sup>[9-12]</sup> 而 MPF 活性降低依靠 CDK1 上述氨基酸位点的去磷酸化以及 cyclin B 蛋白的泛素化降解途

径<sup>[13]</sup>实现。目前已知的 MPF 的底物有 200 多种, 如组蛋白 H1(histone 1), DNA 复制相关的基因(cdc6、orc2/6 等)、纺锤体组装相关基因(Ase1、Kar3、Kip2/3、Slk19、Stu2 等)、微丝聚合相关基因(Bem1/3)等<sup>[14]</sup>, MPF 通过磷酸化上述底物, 完成细胞周期时相的转换或停滞, 实现体细胞的增殖和分化、配子减数分裂, 进而保证胚胎或机体生长发育和生殖等生理过程的正常进行。

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是世界上重要海水养殖物种, 也是我国传统的四大养殖贝类之一, 目前对长牡蛎细胞周期调控基因克隆方面的研究还未见报道。本研究中克隆了长牡蛎 cyclin B3 基因的 cDNA 全长序列和基因组结构序列, 对其进行比较分析, 利用 Real Time PCR 技术检测了该基因在不同组织中的表达特点并分析了其在性腺发育中的作用。本研究首次在贝类中克隆得到 cyclin B3 基因, 初步证

收稿日期: 2010-12-25; 修回日期: 2011-02-25

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2006AA10A401); 国家“973”计划资助项目(2010CB126401); 国家公益性行业(农业)科研专项(3-53)  
作者简介: 王桐(1987-), 男, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事海洋贝类功能基因研究, 电话: 0532-82898726, E-mail: humanexplorer@126.com; 阙华勇, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898713, E-mail: hque@qdio.ac.cn

实了 cyclin B3 基因与性腺成熟发育的密切关系, 期望对深入研究双壳贝类性腺成熟机理和指导长牡蛎养殖实践能起到一定作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与主要试剂

本研究中所用的牡蛎个体购自青岛市南山水产品市场, 实验前选择活力强、壳长 8.8~11.8 cm 的长牡蛎去净附着物后在海水温度  $19\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  的暂养池中充气暂养 7d 以上, 每天换水一次并每天 3 次定时定量投喂螺旋藻粉饵料, 使其充分适应实验室环境。

本实验研究中所用基因组 DNA 提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购自上海飞捷生物技术有限公司, M-MLV、DNase I 等购自 Promega 公司, dNTP mix、DNA 片段纯化试剂盒、末端转移酶(TdT)、dCTP、反转录试剂盒(含 gDNA Eraser)、Real Time PCR 试剂盒等购自 TAKARA 公司, 高保真 Taq 酶、pEASY-T1 克隆载体、Trans1-T1 化学感受态细胞购自北京 TransGen 生物技术有限公司, PCR 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, 实验所用引物由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1), 序列测定由上海桑尼生物科技有限公司完成。

表 1 本研究所用到的主要引物序列及用途

Tab. 1 Sequences and applications of primers used in this study

引物名	序列(5'→3')	用途
test-F	CAGACCACGTTGACCACAAACAT	cyclin B3 EST 片段的验证
test-R	AGCAGAAGACATGCGGAAGCCAT	
3'GSP1	CTCAATCCGACAGGTGCCCAAGGA	3'RACE 基因特异性引物
3'GSP2	GCGGACGGAGTTCCTGGAGATGG	
5'GSP1	AGCAGAAGACATGCGGAAGCCAT	5'RACE 基因特异性引物
5'GSP2	CTTGAGGAGCGTCCTTTCCATCT	
AP-G <sub>10</sub>	GGCCACGCGTCGACTAGTACG <sub>10</sub>	5'RACE 接头引物
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	5'RACE 锚定引物
DK-F1	CGCTGACCGTCTTTATTGTAC	Overlap PCR1
DK-R1	GTGTCTTGTAGATTTTCTGTGTC	
DK-F2	AACAGTTCATGCAAAAAGCAGTC	Overlap PCR2
DK-R2	CCAGTCCACCAAAATGGCAC	
DK-F3	CTCTACGCACCATTTCATCTTCAG	Overlap PCR3
DK-R3	GAGGAAGCGATAGGACAAGGGCA	
DK-F4	CTGGAGATGGAAAGGACGCTC	Overlap PCR4
DK-R4	ACCAGACATTAGTGACATAGCCA	
RT-F	AGATGAAAAAGAAACAGTCCCAGCA	Real Time PCR cyclin B3 基因特异性引物
RT-R	CCTCCACCAGCCAGTCCACCAAAAT	
EF-F	AGTCACCAAGGCTGCACAGAAAG	Real Time PCR 内参引物(EF1- $\alpha$ )
EF-R	TCCGACGTATTTCTTTGCGATGT	

### 1.2 长牡蛎 cyclin B3 基因全长 cDNA 序列的克隆与分析

#### 1.2.1 cDNA 的制备

取长牡蛎性腺组织, 用飞捷组织 RNA 抽提试剂盒提取其总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳法验证其完整性和 DNase I 去除混杂的基因组 DNA 后用 M-MLV 反

转录酶进行反转录, 合成的第一链 cDNA 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

#### 1.2.2 一段长牡蛎 cyclin B3 基因 EST 序列的验证

通过 BLASTx 同源比对, 在 NCBI 数据库中找到一段长牡蛎 cyclin B3 基因的 EST 序列(Accession NO. CU998380.1), 通过这段 EST 序列用 Primer Premier 5.0 软件设计一对引物 test-F 和 test-R, 以 cDNA 为模

板进行 PCR 反应, 对产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳、切胶、回收纯化目的片段、将目的片段连接到 pEASY-T1 载体中、连接产物转化 Trans1-T1 化学感受态细胞后送测序, 用 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对分析。

### 1.2.3 长牡蛎 cyclin B3 基因 cDNA 全长的克隆和序列分析

3'端序列的获得: 根据 EST 验证结果设计一对巢式 PCR 引物 3'GSP1 和 3'GSP2。以用 3'CDS 为引物反转录合成的 cDNA 为模板, 以 3'GSP1/UPM 和 3'GSP2/NUP 为引物进行巢式 PCR, 将获得的产物进行回收测序, 方法同前。

5'序列的获得: 根据 EST 验证结果设计一对巢式 PCR 引物: 5'GSP1 和 5'GSP2。用 DNA 片段纯化试剂盒纯化反转录的 cDNA。用 TdT 在 cDNA 3'末端加上 Poly C 尾巴。以加尾后的 cDNA 作为模板, 以 AP-G<sub>10</sub>/5'GSP1 和 AP/5'GSP2 为引物进行巢式 PCR, 将获得的产物回收测序, 方法同前。

用 DNAMAN 6.0 软件将测序结果与 EST 验证结果进行拼接, 得到基因的 cDNA 全长, 并通过重测序消除不确定碱基。通过 BLASTx 比对, 在 NCBI 网站上查找相关物种的 cyclin B3 蛋白氨基酸序列, 用 DNASTAR 7.0 软件进行蛋白大小等性质预测, 用 Mega 4.0 软件进行序列比对分析和系统进化树构建。

### 1.3 长牡蛎 cyclin B3 基因基因组结构序列的克隆和分析

提取 1.2 中长牡蛎个体鳃组织的基因组 DNA, 电泳法检测 DNA 的纯度和完整性。利用获得的 cyclin B3 cDNA 全长序列和长牡蛎基因组序列, 在 cyclin B3 基因编码区和 3'和 5'UTR 侧翼序列分别设计 4 对 Overlap PCR 引物 DK-F1/R1、DK-F2/R2、DKF3/R3、DKF4/R4, 将获得的 PCR 产物回收并克隆测序, 用 DNAMAN6.0 软件完成片段拼接, 获得 cyclin B3 基因的外显子-内含子序列, 利用 cyclin B3 基因 cDNA 序列和其基因组序列在 NCBI 网站上的 Splign 内含子分析工具分析获得 cyclin B3 基因的外显子-内含子结构, 并对 cyclin B3 的结构进行种间比较分析。

### 1.4 长牡蛎 cyclin B3 基因 RNA 水平表达特点分析

长牡蛎 cyclin B3 基因的组织表达分析在 ABI 7500 Fast Real Time PCR 仪上实现。分别取 3 只长牡

蛎得鳃、外套膜、血淋巴、性腺(白色、基本遮住内脏团, 但光学显微镜下仍不能分辨其性别)、闭壳肌、消化腺, 将每种组织混在一起, 提取上述组织的总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 完整性, 反转录获得 Real Time 实验用 cDNA 模板。cyclin B3 基因特异性引物为 RT-F/R, 内参引物为 EF-F/R, 用 TAKARA Premix Ex Taq (Perfect Real Time) Real Time PCR 试剂盒配成体系上机, 反应程序为 94℃ 30s (94℃ 5s、60℃ 30s)×40 个循环, 收集并用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。

分别选取性腺透明内脏团完全可见、性腺初现白色且内脏团可见和性腺白色且基本遮盖内脏团但光学显微镜下仍不能分辨性别的长牡蛎各 3 只, 编号 Gn1、Gn2、Gn3, 剪取各组性腺组织块, 组内混合在一起并提取其总 RNA, 进行完整性检测后反转录获得实验用 cDNA 模板。Real Time PCR 检测各性腺发育时期的 cyclin B3 基因表达水平, 方法同前, 收集并用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 cyclin B3 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

#### 2.1.1 EST 序列的验证

用 test-F 和 test-R 获得 PCR 的扩增产物经测序获得 473 bp 的片段, 双序列比对结果显示与待验证 EST 中对扩引物之间的序列有 99.32% 的一致性, 证明该 EST 的正确性, 可用于 cDNA 全长的克隆。

#### 2.1.2 cyclin B3 基因 cDNA 全长的克隆和序列分析

3'RACE 获得一条长 1147 bp 的片段, 5'RACE 得到一条长 1082 bp 的片段。将上述序列与 EST 验证测序结果进行拼接, 获得长牡蛎 cyclin B3 基因全长 cDNA 序列(Accession NO. HQ878119), 总长 2383 bp(含 Poly A 尾), 其中编码区长度为 1293 bp, 终止密码子为 UAG, 编码 1 条含 430 个氨基酸的多肽链。5'UTR 长度为 185 bp, 3'UTR 长度为 880bp, 含有 2 个加尾信号(AAUAAA), 4 个 cyclinA/B mRNA 降解敏感性位点(AUUUA)以及 10 个 CPE 元件(A/UUUUUUAU/A)。所编码的多肽链预测蛋白大小约为 48.7 kD, 等电点为 5.56。该多肽链含有 B3-型周期蛋白特有的结构域, 如中部含有可与 MPF 的催化亚基 CDK1(p34<sup>CDC2</sup>)结合的周期蛋白框, N 端第 60~68 位含有可与泛素结合进而被蛋白酶体降解的 M 期 B3 型周期蛋白降解盒(destruction box)序列

RXAFGXIXN, 且降解盒下游有一个在整条多肽链中 Lys 最丰富的区域, 第 77~107 位区域中共有 13 个 Lys 位点(cyclin 蛋白中该区域平均 Lys 含量为 6 个<sup>[13]</sup>), 在 cyclin 泛素降解途径中执行与泛素(Ubiquitin)结合的功能; C 端第 313~319 位有 B3-型周期蛋白的典型序列 cAMP 依赖的 pKA 磷酸化相关区域 FLRRXAK。

将推导的长牡蛎 cyclin B3 氨基酸序列与水螅 (*Hydra magnipapillata*, Accession NO. XP\_002160446.1)、佛罗里达弓背蚁 (*Camponotus floridanus*, Accession NO. EFN74068.1)、海星 (*Marthasterias glacialis*, Accession NO. CBG91877.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, Accession NO. AAI54345.1)、爪蟾 (*Xenopus laevis*, Accession NO. NP\_001079361.1)、鸡 (*Gallus gallus*, Accession NO. NP\_990570.1) 的 cyclin B3 氨基酸序列进行多序列比对, 发现上述 6 个物种与长牡蛎 cyclin B3 氨基酸序列一致性在 40%~45% 之间, N 端和 N 端近中部的氨基酸长度和氨基酸序列变化较大, 而 C 端和 C 端近中部的保守性明显较高, 七个物种都具有上述 cyclin B3 蛋白特征性的结构域。详见图 1 和图 2。

通过邻接法构建了 cyclin B3 基因的系统发育树 (bootstrap test 中 replications 值设为 1000000), 如图 3 所示。脊椎动物 cyclin B3 聚为一个大的分支, 而长牡蛎 cyclin B3 基因的进化地位与其物种的进化地位相似, 总体上处于无脊椎动物的大分支上, 并且与水螅、旋毛虫聚在一个次分支而与佛罗里达弓背蚁、印度跳蚁和海星处在不同的进化分支上。

## 2.2 长牡蛎 cyclin B3 基因组结构的获得与分析

用 Overlap PCR 的方法获取了长牡蛎 cyclin B3 基因的基因组结构信息, 共获得 5347 bp 的该基因的基因组序列信息 (Accession NO. HQ878120), 将其与 2.1 中获得的 cDNA 全长序列用 NCBI 上的 Splign 内含子在线分析工具进行分析, 发现该基因共含有 10 个外显子和 9 个内含子, 且内含子-外显子边界均符合“GT-AG”的剪接规则。不同物种 cyclin B3 的基因组结构比较显示, 随物种的进化, 外显子和内含子数逐渐增多, 长牡蛎的 cyclin B3 基因的外显子数目和编码蛋白大小处于过渡阶段, 至哺乳类时数目稳定在 12 个, 编码蛋白的大小也相应增大; 除个别例外以外, 内含子随物种进化逐渐变长。对昆虫纲的埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 和致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 等的 cyclin B3 基因组结构信息进行分析发现,

```

1      TATTGTACAAAAATTAACAAACCACTTGGTGGTCAAGCTGATAGTGTGTTTATATCTGTA
61     GAATGAGAATTTGGGGTGAAGAAATTTGACACGAGATAAAACCGGGTGGTCTACTTG
121    GTTATAGATGGCAATGCAAGTTCTCCAGCATGATGTTTGTGTTGGCAGGAGAAAAACA
181    ACACAATGAACCTCTAAAAAATCAAAGGGCACTGATGTTGGCGCTAAGGAAATCTAAAT
1      M N S K K S K G T S L L D V R K S K
241    CAGGAACAAGCTCATTAGGAGAAAATTCACGACGATGCAAGAAACTGCTGCTAAATGTCG
19     S G T S S L G Q I H Q D P K K L V L N V
301    TGAGTAATTTGAATGGAATCAAAGCCGCAAGGATAGCATGATGACACGAGAACGAAAGA
39     L S N L N G I K R Q G D S M M D Q K Q K
361    GAAGAGTGCCATTTGGTGCATCAAAATGCTATCAATGAAATAACACGGCTAAGAAAG
59     R R A A F G D I T N A I N E N N T L K K
421    ATGCACAGAAAAAGCCAGCCGCTGTAGGACTTAATATTAAGTGACCAAAAAGAAAT
79     D A Q K K A K P P V G L N I K V T K K K
481    CAGAAAAGAAAAAGACAGTCAAACTGAGAAGCGGTGACCGGCTTTAGATGACATGCTTC
99     S E K K K T V K T E N A D P A L D D I I
541    AGCTATCCAGGAAATCCCTAGTATCAAGTCTCAGGACAGCAAGCTTCATGCAAAAAGCA
119    Q L S Q E S L V S S S D S N S S C K S
601    GTCTAAGAGATTTAAGTCAAATAGCAGTCTGTGAGAAGTGAAGAAAGAACAGTCCGAG
139    S L T D L S Q I S T V S E D E K E T V P
661    CAACAGTAGATGATGTGGACACGAAAAATCTACAGACACTGCCAATGTGCACCTACG
159    A T V D D V D T E N L Q D T A Q C A L Y
721    CACGATTCATCTCAGATACACAAAAGAGAGAGCTGGTGTGTTTATGGTCCCATGTACA
179    A P F I F R Y Y K E R E L L F M V P M Y
781    TGGACCTCAGACAGCTTGAACCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
199    M D T Q T T L T T N M R A I L V D N L V
841    AGGTGGAGGAGAACTTTGAGTTGAACCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
219    E V Q E N F E L N H E T L Y L A V K L V
901    ACACCTACCTCTCAATCCGACAGGTCGCCAAGGAAACCTCCAGCTTGTGGGCGCGGCT
239    D T Y L S I R O V P K E N L Q L V G A A
961    CCTTGTGTTGCTTGAAGTTCGATGAGGAGTGCCTCCTCAATTAAGGATTTCTGTG
259    S L F V A C K F D E G C P L I E D F L
1021   ACATTTGTGACGAGGCTCAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
279    Y I G C D D A Y R R T E F L E M E R T L L
1081   AGACGATAGGATTTGACATGGATGCCCTGTGCTATGCTTCTCAGAAAGATACGCCA
299    K T I G F D I G M P L S Y R E L R R Y A A
1141   AGTGTGCTAGAGCATCCATGGACACACTAACGATGGCCAGGAACTTATCTAGAGATGCTCT
319    K C A R A S M E T L T M A R Y I L E M S
1201   TGATGGATGAGTTTATCAATACAGGAAATGAAATGGCTCCGATGCTCTCTG
339    L M E Y E F I K Y R E S K M A S A C L L
1261   TGGCAATGAAAATGAAAAGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
359    L A M K M K N A G E W S S T L E Y Y T G
1321   ACACAGACAAGACATCAGTGTGTTGTCGGGAACTGAATGCAATGATGCCCTCCGAC
379    Y T D K D I S G L V R E L N A M I A S P
1381   CCAACAGCTAACCCAGCATCAGATCAGGATTTCCAGCAGAGTGTGTTCTAGAGATGCGCA
399    P K Q L T T I R S K Y S H S V F Y E V A
1441   AGGTACGAGCTTATCAGAGGAGGCGCTGACATCTGAGGCGCATGTTCTCATACAGCTT
419    K V P A L S E E A L T S *
1501   GAAGGAAGAGACAAGTCCCTCGTAATACCTGCAGAGCTGATGCTGATATTCATGAAA
1561   AGCCGACGATCTCTTAACCGGTTGTGTGTTGTTTAAACCTGCAAGATCTACAAAG
1621   CTCCCTAAAATGAGGATATGTTTCATGATAATACAGAGAACTTGTAAATGCAAGT
1681   TTAATTTGACAGGGAATTTGTGACTAATAAGCATAGTATAGGTTTCCGCTCTTAC
1741   TATCCACTTATCTGTGTGACATAGAATATCTGTTTATGATGATGATGATGATGATGATG
1801   TTTTATTTCAACAATTAATTTACTAGTACATCAATTTTTTTAAATTTCTTAATG
1861   GCAAAAATTTGGCTAAATTTTATATAAGTATCAACATTAATAAAAGTTATCTAGC
1921   CTTTTATAGATGAAATGGGTAATTAATCATGTTAAATACGTTTAGTCAGTATTGA
1981   ATCAGAAATATGATTTGAGTATGGAGTGTGTTTATACCAAAAATAGTCAATTTACT
2041   TGAATGAGATATGGCAGCTTCCGATTAACCCATCATTTTGTTAACATGTAATAAAA
2101   AGGAAGTCAGATTTAGTGGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
2161   AATGCAATAATTTGTTTAAAGTGTGCTTATGTTTACAGTCCCTTTTATGATG
2221   ACATGATGATGTTTGGGATTTTATATAAATCACTTTTATTTATTTTATGATGATGATGATG
2281   AATACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
2341   CATAAAGATGTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 1 长牡蛎 cyclin B3 基因 cDNA 序列全长及推导的氨基酸序列

Fig. 1 The nucleotide and deduced amino acid sequence of *Crassostrea gigas* cyclin B3 cDNA

起始密码子和终止密码子用加粗字体表示, Poly A 加尾信号 (AAUAAA) 用双下划线表示, 有底纹序列表示胞质多聚腺苷化元件 (CPE), 用矩形框表示的位点为可能的 cyclinA/B mRNA 降解敏感性相关位点 (AUUUA); M 期周期蛋白破坏框 (destruction box) 用加粗字体及下划实线表示, 有波浪下划线的赖氨酸位点为可能的泛素化位点, cAMP 依赖的 pKA 磷酸化位点用加粗字体及下划虚线表示

The start condon and stop condon are in bold letters. The polyadenylation signals (AATAAA) are double-underlined. Letters in background represent cytoplasmic polyadenylation elements (CPE). CyclinA/B mRNA degradation sensitive sites (AUUUA) are surrounded by boxes. The destruction box is in bold letters and is underlined. Lysines (K) wave-underlined are possible ubiquitination sites. The cAMP-dependent phosphorylation motif is illustrated in boldface and dot-underlined

<i>Crassostrea gigas</i> Cyclin B3	MNSKKSQTSLLDVRKSKSGTSSLG--QIHQDPKKLVNLVSLNNGIKR	47
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	-----MPVARSSKAQSSKQ--PRASKAPSVTENVPPEKEEGCQA	37
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	-----MMPSLRPSRPVASKL--PKLGK-PVTAENNRDLKVEISQT	37
<i>D.erio</i> Cyclin B3	-----MPFSKGGKPTTSKI--PKLNS-----KLENQDGLQT	30
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	-----MPLALRRKPKTVTV--QIHHQ-----DKPSGAPTQRQN	31
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	---MAPPKVLGQNRQNSTTTLRKGVTTRSQNALLNNVVKQSVSRDTRKR	47
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	-----MKETTTQNSKLIHQERESTMFTRSKNQRSLIAKQKPAKR	39
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	QGDSMMDQKQK-- <b>RRAAF</b> GGDTNA <b>IKNN</b> -----	74
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	KRSPS-SPQGG-PRKRS <b>AF</b> GGDTNA <b>IKN</b> -----	63
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	KRSPS-SPQGG-AR <b>RRAAF</b> GGDTNA <b>IKNP</b> -----	64
<i>D.erio</i> Cyclin B3	KRSSS-SPQGA-PR <b>KRTAF</b> VDITNA <b>IKIE</b> -----	57
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	KRRSSGSPKQQP <b>RRAAF</b> GGDTNA <b>IKR</b> DDGKKGGTTVTS-----	73
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	KAEAS-PPKEK-T <b>RRSAF</b> TNTNA <b>IT</b> SLGGQNHLLTKKMVTHVKPIVVDK	95
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	SVSDISPNAIET <b>RRSAF</b> GGDTNA <b>QA</b> HTRLN-----	73
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	---TLKKDAQKKAQPPVGLN <b>IKVTKK</b> SEKKK <b>TK</b> TENADPA <b>DD</b> ---	116
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	---QVVTGKKE---GVK <b>APT</b> TRKATRAP <b>PA</b> IVAKNNE <b>IK</b> KK---	99
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	---QLIQKKE---GQK <b>VA</b> IKKTSAP <b>SD</b> IT-KNNEL <b>IK</b> KK---	99
<i>D.erio</i> Cyclin B3	---LCN <b>PI</b> KK---K <b>DP</b> AKK <b>VQ</b> TS---VLLKND <b>VN</b> KS---	86
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	---KKSTTI <b>Q</b> ALKAKSLAVK <b>AK</b> PE <b>VI</b> PE <b>VG</b> EV <b>TD</b> DD <b>DS</b> EE <b>I</b> MSQ	117
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	PADINIAK <b>VI</b> PK <b>SK</b> PLPR <b>VK</b> PI <b>IK</b> DD <b>KE</b> IS <b>NK</b> VINRHSTDE <b>KS</b> ED <b>N</b>	145
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	---LARKRS <b>SI</b> DS <b>SK</b> QAQ <b>SK</b> LKLSTIT <b>TR</b> NR <b>TK</b> TD <b>SK</b> PN <b>E</b> KN---	116
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	---IQL <b>SQ</b> ESLV <b>SS</b> SSQ <b>DS</b> NS <b>SK</b> SS <b>LT</b> DL <b>SQ</b> IT <b>SV</b> S-----	150
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	---SLR <b>KT</b> PP---AD <b>VP</b> VE---PE <b>KD</b> SV <b>PE</b> E-----	121
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	---TQ <b>KA</b> T <b>VT</b> EE <b>HL</b> PE <b>VK</b> EEK <b>IN</b> TE <b>QT</b> SV <b>PT</b> K-----	130
<i>D.erio</i> Cyclin B3	---I <b>VS</b> PEEK-LEEL <b>KN</b> VES <b>DT</b> E <b>ET</b> SK <b>DP</b> IP <b>PH</b> -----	116
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	G <b>SS</b> Q <b>ES</b> SS <b>SS</b> PS <b>SS</b> SS <b>Q</b> SV <b>SS</b> SM <b>T</b> EN <b>S</b> DE <b>V</b> LM <b>N</b> H <b>K</b> NE <b>RT</b> AE <b>FD</b> ---	163
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	SL <b>Y</b> ISALE <b>DT</b> DS <b>L</b> KK <b>TR</b> SS <b>TK</b> IDENE <b>KE</b> IE <b>KN</b> E <b>ISE</b> PM <b>S</b> M <b>N</b> KK <b>KA</b> LA	195
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	---EAD <b>I</b> SL <b>PC</b> FI <b>SE</b> HF <b>SS</b> AI <b>EN</b> GN <b>SS</b> K <b>ME</b> Q <b>S</b> FT <b>SD</b> K <b>SE</b> CH <b>EQ</b>	156
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	---E <b>DE</b> KET <b>VP</b> AT <b>V</b> DD <b>V</b> DT <b>EN</b> L <b>Q</b> DT <b>A</b> Q <b>CA</b> LY <b>AP</b> FF <b>FR</b> Y <b>Y</b> KE <b>RE</b> LL <b>FM</b> V	195
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	---P <b>V</b> Q <b>Q</b> ---V <b>P</b> V <b>VE</b> DI <b>DK</b> E <b>Q</b> L <b>GD</b> PY <b>AN</b> A <b>E</b> Y <b>AK</b> E <b>FD</b> Y <b>ME</b> RE <b>EE</b> K <b>F</b> LL	163
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	---E <b>IP</b> EEK <b>VL</b> PP <b>GV</b> ED <b>ID</b> Q <b>S</b> L <b>DD</b> PF <b>SN</b> SE <b>Y</b> AT <b>DF</b> SY <b>MR</b> D <b>RE</b> E <b>K</b> F <b>LL</b>	176
<i>D.erio</i> Cyclin B3	---L <b>LP</b> ---E <b>IP</b> PE <b>FD</b> IS <b>E</b> HL <b>SD</b> SS <b>HT</b> SE <b>Y</b> AK <b>E</b> FD <b>YL</b> KN <b>KE</b> E <b>F</b> VL	159
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	IK <b>DA</b> VA <b>AI</b> SL <b>Q</b> ET <b>P</b> AY <b>DD</b> IDE <b>EN</b> K <b>GD</b> PN <b>Q</b> SP <b>I</b> YA <b>Q</b> DF <b>NY</b> L <b>KE</b> RE <b>LL</b> TP <b>I</b>	213
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	ID <b>L</b> IT <b>VP</b> ARE <b>L</b> PK <b>D</b> V <b>Q</b> W <b>DF</b> V <b>EN</b> W <b>LD</b> PF <b>Q</b> VS <b>Q</b> Y <b>AM</b> DF <b>E</b> Y <b>L</b> KE <b>RE</b> LL <b>FR</b> I	245
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	SK <b>DM</b> PE <b>Q</b> M <b>N</b> VS <b>ST</b> SS <b>Q</b> SL <b>SG</b> K <b>VR</b> PP <b>VI</b> P <b>AS</b> I <b>L</b> Q <b>R</b> VE <b>ED</b> IR <b>SP</b> AK <b>Y</b> PV <b>I</b>	206
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	PM <b>Y</b> MD <b>T</b> ET <b>LT</b> TN <b>M</b> RA <b>L</b> L <b>VD</b> W <b>L</b> VE <b>V</b> ---Q <b>EN</b> F <b>EL</b> N <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> TL	242
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	PD <b>Y</b> ME <b>K</b> SD <b>I</b> SR <b>DM</b> RA <b>L</b> L <b>VD</b> W <b>L</b> VE <b>V</b> ---Q <b>EN</b> F <b>EL</b> N <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> HL	210
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	PN <b>Y</b> LEM <b>DT</b> DI <b>SK</b> DM <b>RA</b> L <b>L</b> VD <b>W</b> L <b>VE</b> V---Q <b>EN</b> F <b>EL</b> N <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> HL	223
<i>D.erio</i> Cyclin B3	CD <b>Y</b> MD <b>EP</b> N <b>L</b> NT <b>N</b> M <b>RA</b> L <b>L</b> VD <b>W</b> L <b>VE</b> V <b>Q</b> IL <b>Q</b> EN <b>F</b> EL <b>N</b> H <b>ET</b> L <b>Y</b> LA <b>V</b> K <b>VT</b> VE <b>Y</b> HL	209
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	QS <b>Y</b> FE <b>K</b> PE <b>V</b> NT <b>H</b> M <b>RA</b> V <b>L</b> W <b>L</b> VE <b>V</b> ---Q <b>EN</b> F <b>EL</b> N <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> RY	260
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	AD <b>Y</b> ME <b>R</b> SV <b>CL</b> SR <b>W</b> M <b>RA</b> L <b>L</b> VD <b>W</b> L <b>VE</b> V---Q <b>ES</b> F <b>EL</b> N <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> LY	292
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	N <b>YL</b> IK <b>E</b> NC <b>ET</b> T <b>G</b> PM <b>RA</b> L <b>L</b> VD <b>W</b> L <b>VE</b> V---Q <b>EN</b> F <b>EL</b> Y <b>H</b> ET <b>L</b> Y <b>LA</b> V <b>L</b> VE <b>Y</b> N <b>EL</b>	253
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	S <b>IR</b> Q <b>VP</b> KE <b>N</b> L <b>Q</b> L <b>V</b> GA <b>AS</b> L <b>F</b> V <b>AK</b> FD <b>E</b> GC <b>PL</b> IE <b>DF</b> Y <b>I</b> CD <b>DA</b> Y <b>K</b> RE <b>FE</b> LE	292
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	VE <b>V</b> SM <b>R</b> DK <b>L</b> Q <b>L</b> I <b>GT</b> AV <b>LI</b> AS <b>N</b> F <b>ER</b> CP <b>PC</b> V <b>DD</b> Y <b>I</b> CD <b>DA</b> Y <b>K</b> RE <b>EL</b> IA	263
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	AV <b>S</b> V <b>Y</b> M <b>K</b> E <b>K</b> L <b>Q</b> L <b>I</b> GT <b>AV</b> LI <b>AS</b> N <b>F</b> ER <b>CP</b> PC <b>V</b> DD <b>EM</b> Y <b>I</b> CD <b>DA</b> Y <b>K</b> RE <b>DE</b> IA	270
<i>D.erio</i> Cyclin B3	AV <b>S</b> Q <b>T</b> K <b>RE</b> AL <b>Q</b> L <b>I</b> GT <b>AM</b> LI <b>AS</b> N <b>F</b> ER <b>AP</b> PC <b>V</b> DD <b>Y</b> I <b>CD</b> DA <b>Y</b> K <b>RS</b> Q <b>L</b> IS	259
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	M <b>K</b> V <b>VT</b> RD <b>VL</b> Q <b>L</b> L <b>G</b> AT <b>AL</b> F <b>I</b> AG <b>NY</b> DR <b>CP</b> AL <b>DD</b> Y <b>I</b> CD <b>DA</b> Y <b>ER</b> Q <b>Q</b> IF <b>D</b>	310
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	TK <b>Y</b> TV <b>GE</b> K <b>ET</b> L <b>L</b> L <b>G</b> A <b>AS</b> L <b>F</b> I <b>AS</b> N <b>F</b> ER <b>IP</b> PM <b>VE</b> DF <b>Y</b> I <b>CD</b> GA <b>Y</b> T <b>Q</b> RE <b>LI</b> R	342
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	Q <b>NN</b> PT <b>PK</b> EQ <b>L</b> Q <b>L</b> V <b>G</b> AT <b>ALL</b> E <b>AC</b> NI <b>EE</b> HH <b>PP</b> LD <b>DF</b> Y <b>I</b> CD <b>DA</b> Y <b>TH</b> K <b>M</b> FI <b>N</b>	303
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	MF <b>RT</b> L <b>L</b> KT <b>IG</b> FD <b>IG</b> MP <b>LS</b> SR <b>FL</b> RR <b>Y</b> AK <b>ARA</b> SM <b>ET</b> TL <b>M</b> AR <b>Y</b> IL <b>EL</b> MS <b>ME</b> Y	342
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	ME <b>TS</b> IL <b>RT</b> LE <b>FD</b> IN <b>IP</b> IP <b>SR</b> FL <b>RR</b> FA <b>K</b> ARA <b>SM</b> ET <b>TL</b> LA <b>RF</b> VC <b>EM</b> TL <b>Q</b> E <b>Y</b>	310
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	ME <b>ME</b> IL <b>QL</b> Y <b>FD</b> IN <b>IP</b> IP <b>SR</b> FL <b>RR</b> FA <b>K</b> A <b>A</b> HA <b>T</b> ET <b>TL</b> LA <b>RY</b> IC <b>EL</b> TL <b>Q</b> E <b>Y</b>	323
<i>D.erio</i> Cyclin B3	ME <b>IS</b> IL <b>Q</b> AL <b>FD</b> IN <b>IP</b> IP <b>SR</b> FL <b>RR</b> Y <b>AK</b> EV <b>NA</b> G <b>MD</b> TL <b>LA</b> RF <b>IC</b> EL <b>S</b> LEM	309
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	TF <b>MA</b> IL <b>RL</b> LD <b>FD</b> L <b>G</b> IP <b>LS</b> SR <b>FL</b> RR <b>Y</b> AK <b>E</b> A <b>A</b> SM <b>ET</b> TL <b>LA</b> RF <b>IL</b> EL <b>HS</b> ME <b>S</b>	360
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	ME <b>AN</b> VL <b>RV</b> V <b>DF</b> L <b>G</b> IP <b>LS</b> SR <b>FL</b> RR <b>Y</b> AR <b>CA</b> K <b>V</b> SM <b>PT</b> TL <b>LA</b> RY <b>IL</b> E <b>Y</b> SM <b>DM</b> Y	392
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	ME <b>L</b> K <b>I</b> F <b>K</b> AL <b>DF</b> V <b>N</b> IP <b>IS</b> SR <b>FL</b> RR <b>Y</b> AR <b>WT</b> SM <b>S</b> QL <b>L</b> TL <b>AR</b> Y <b>IL</b> EL <b>S</b> Q <b>EA</b>	353
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	EF <b>I</b> K <b>Y</b> RE <b>SK</b> MA <b>SA</b> CE <b>LL</b> AM <b>K</b> M <b>K</b> NA <b>EW</b> SS <b>TE</b> Y <b>YT</b> DT <b>K</b> DI <b>SG</b> LV <b>RE</b> LN	392
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	D <b>Y</b> AR <b>ER</b> PS <b>K</b> LA <b>AS</b> CE <b>LL</b> AL <b>T</b> M <b>R</b> N <b>L</b> GG <b>WT</b> PT <b>LE</b> Y <b>YS</b> GV <b>CA</b> Q <b>DL</b> H <b>PL</b> V <b>K</b> R <b>LN</b>	360
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	DF <b>V</b> Q <b>ER</b> AS <b>K</b> MA <b>AS</b> CE <b>LL</b> AL <b>Q</b> M <b>K</b> L <b>GR</b> WT <b>AT</b> L <b>HY</b> YS <b>GV</b> Q <b>T</b> ND <b>LL</b> PL <b>V</b> K <b>R</b> LN	373
<i>D.erio</i> Cyclin B3	EF <b>V</b> VR <b>AS</b> LL <b>AS</b> CE <b>LL</b> AL <b>V</b> T <b>K</b> DL <b>GG</b> WT <b>Q</b> L <b>Q</b> F <b>HS</b> GV <b>SA</b> ED <b>L</b> AP <b>V</b> VR <b>K</b> L <b>H</b>	359
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	Q <b>F</b> LE <b>TR</b> DS <b>K</b> I <b>AA</b> AL <b>LL</b> AF <b>K</b> M <b>K</b> T <b>GE</b> WD <b>AT</b> L <b>V</b> H <b>YS</b> SY <b>KA</b> SEL <b>ME</b> LT <b>K</b> Q <b>L</b>	410
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	SM <b>I</b> TF <b>SD</b> SK <b>V</b> AAA <b>AL</b> LL <b>AL</b> L <b>K</b> DL <b>GG</b> WT <b>PT</b> LE <b>Y</b> YS <b>GV</b> K <b>L</b> DD <b>IR</b> DI <b>C</b> N <b>L</b> I <b>N</b>	442
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	Q <b>F</b> V <b>DR</b> SS <b>K</b> IS <b>AA</b> CE <b>LL</b> AL <b>K</b> M <b>K</b> DE <b>DE</b> WE <b>AN</b> L <b>SY</b> HT <b>GV</b> Q <b>E</b> RE <b>L</b> ST <b>L</b> V <b>T</b> N <b>L</b> N	403
<i>C.gigas</i> Cyclin B3	AM <b>E</b> AS <b>PP</b> -K <b>Q</b> TT <b>IR</b> SK <b>YS</b> SH <b>S</b> V <b>F</b> Y <b>E</b> V <b>AK</b> VP <b>AL</b> SE <b>E</b> AL <b>TS</b> ---	430
<i>G.gallus</i> Cyclin B3	FL <b>ET</b> Y <b>Q</b> PC <b>DR</b> L <b>K</b> AV <b>RT</b> KS <b>SR</b> V <b>F</b> FE <b>V</b> AK <b>TP</b> MD <b>MM</b> K <b>LE</b> E <b>KL</b> KS	403
<i>X.laevis</i> Cyclin B3	FL <b>ET</b> Y <b>PP</b> N <b>K</b> RL <b>K</b> AV <b>RS</b> K <b>YS</b> SR <b>V</b> F <b>FE</b> V <b>AK</b> LP <b>PM</b> DM <b>L</b> TL <b>TE</b> AL <b>QS</b>	416
<i>D.erio</i> Cyclin B3	HM <b>E</b> SS <b>PA</b> DS <b>K</b> L <b>AV</b> I <b>RS</b> K <b>Y</b> AK <b>V</b> F <b>FE</b> VAL <b>IP</b> TV <b>N</b> LE <b>K</b> LE <b>GF</b> L <b>K</b> -	401
<i>M.glacialis</i> Cyclin B3	SM <b>ET</b> AT <b>PN</b> K <b>Q</b> MT <b>LR</b> N <b>K</b> Y <b>SH</b> K <b>V</b> F <b>FE</b> V <b>AK</b> LP <b>P</b> V <b>D</b> V <b>L</b> Q <b>L</b> ---	447
<i>C.floridanus</i> Cyclin B3	QC <b>EH</b> KK <b>H</b> K <b>DT</b> EM <b>TV</b> R <b>N</b> K <b>Y</b> SH <b>N</b> AML <b>L</b> L <b>AR</b> -----	471
<i>H.magnipapillata</i> Cyclin B3	TM <b>ET</b> N <b>AP</b> K <b>S</b> RL <b>QT</b> LR <b>N</b> K <b>Y</b> LP <b>V</b> F <b>FE</b> V <b>AK</b> IP <b>AV</b> D <b>PL</b> FL-----	440

图 2 长牡蛎与 6 个物种的 cyclin B3 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignments of the deduced amino acid sequence of *Crassostrea gigas* cyclin B3 with six other species. 黑色表示相同氨基酸, 灰色表示相似氨基酸; 周期蛋白破坏框用实线框表示, cAMP 依赖的 pKA 磷酸化位点用虚线框表示, 下划线部分表示的是可与 MPF 的催化亚基 CDK1(p34<sup>CD2</sup>)结合的周期蛋白框

The same amino acids are in black background and the similar amino acids are in gray background. The cyclin destruction box is surrounded by a solid line box. The cAMP-dependent phosphorylation motif is surrounded by a dotted line box. The part underlined represents cyclin box that may combine with the catalytic subunit of MPF, CDK1 (p34<sup>CD2</sup>)

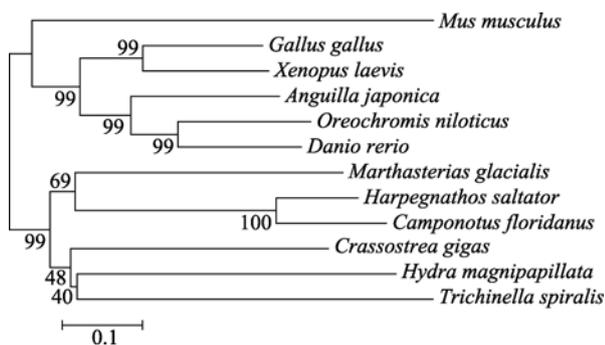


图 3 cyclin B3 基因邻接法系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of cyclin B3 gene

昆虫纲(至少是双翅目昆虫)的外显子-内含子进化不符合上述规律。详见图 4、表 2 和表 3。

### 2.3 长牡蛎 cyclin B3 基因 RNA 水平上表达特点分析

Real Time PCR 分析 cyclin B3 组织表达特点如图 5 所示, 该基因在长牡蛎各器官中均有表达, 但也呈现出较强的组织特异性, 其中在性腺中表达量最多, 其次是血淋巴, 表达量最少的组织是外套膜, 前两个组织中 cyclin B3 基因的表达量分别约是外套膜的 92 倍和 12 倍。LSD 法多重比较结果显示, 血淋巴与其他组织 cyclin B3 基因表达差异显著 ( $P < 0.05$ ), 性腺与其他组织 cyclin B3 基因表达差异极显著 ( $P < 0.01$ )。性腺和血淋巴是细胞分裂非常旺盛的部位, 该基因在这两种组织中的高表达特点与它在体细胞有丝分裂和生殖细胞减数分裂过程中的重要作用是相一致的。

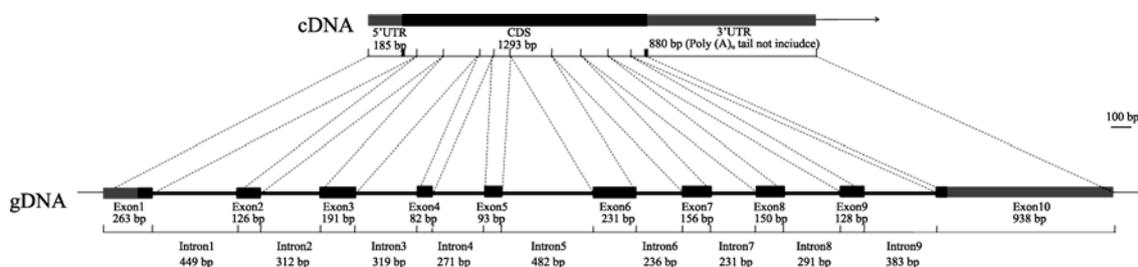


图 4 长牡蛎 cyclin B3 的基因组结构

Fig. 4 Genome structure of *Crassostrea gigas* cyclin B3 gene  
箭头方向表示 5'→3', 矩形黑块表示编码区, 灰色区块表示 cDNA 中非翻译区的对应序列

The arrow represents 5'→3' of nucleotide sequence. Rectangular blocks in black color are coding sequences. Blocks in gray color are untranslated regions

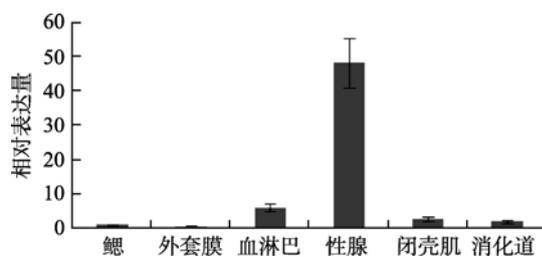


图 5 长牡蛎 cyclin B3 组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue-specific expressions of *Crassostrea gigas* cyclin B3

不同发育阶段的长牡蛎性腺中 cyclin B3 基因表达特点如图 6 所示, 该基因的 mRNA 在细胞中含量随性腺发育程度的提高而提高, 在透明状性腺中的最低(Gn1)而在白色且基本遮盖内脏团的性腺(Gn3)中最高(后者约为前者的 24 倍), LSD 法多重比较结果显示, Gn3 与 Gn1 和 G2 cyclin B3 基因表达差异均极显著 ( $P < 0.05$ )这与其在生殖细胞减数分裂中的作用是一致的, 同时也为早期胚胎细胞的有丝分裂储

备物质基础。

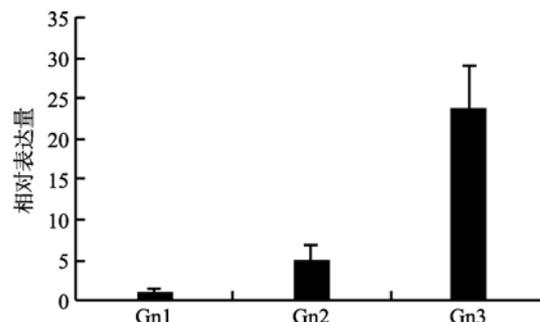


图 6 三个不同发育阶段长牡蛎性腺 cyclin B3 基因表达特点分析

Fig. 6 Expressions of *Crassostrea gigas* cyclin B3 in gonad at three development stages

## 3 讨论

### 3.1 cyclin B3 基因组结构的进化

通过对多个物种 cyclin B3 基因外显子-内含子

结构的比较(表 2 和表 3), 发现该基因基因组结构在进化上存在一定规律性: (1)随进化外显子的数目增多, 到哺乳类时稳定在 12 个, 蜕皮动物至少肢动物的进化可能另成体系; (2)根据长牡蛎 E6~E8、海胆 E7~E9 及更高级物种 E9~E11 可以推断进化过程中海胆及后续高等物种的 E-6 是由于某个事件插入进来的, 长牡蛎的 E-6(即海胆的 E-7)分拆为高等物种的 E7 和 E8, E6 插入及分拆的机制和原因值得我们深入探索; (3)进化中一些外显子大小逐渐稳定下来, 如 E-7、E-8、E-9、E-10、E-11 等; 哺乳类的 E-5 相比于其他物种其大小急剧膨胀, 相应编码的 cyclin B3 蛋白也增大很多, 这种进化中外显子膨胀的原因及机制以及对基因功能的影响有待深入研究。(4)内含子进化方面, 其数目变化规律与外显子进化是一

致的, 在大小上总体上无脊椎动物比脊椎动物的内含子要小, 脊椎动物随进化内含子有增大的趋势, 出现了 1 万~2 万甚至 7 万多个碱基的巨型内含子, 如何在短时间内转录如此长的 hnRNA 并通过剪接获得 mRNA 以满足一些细胞分裂旺盛的组织对细胞周期蛋白 B3 的需求以及保持这种巨型 hnRNA 在细胞中稳定性的机制值得更深一步的研究。(5)昆虫在进化中外显子规律性不是很明显, 外显子数目及大小都与其物种的进化地位不符, 昆虫该基因的基因组结构变化较大, 如埃及斑蚊和致倦库蚊的外显子数有 4 个而果蝇却只有 1 个, 且编码的蛋白大小比前两者大很多, 但编码的蛋白大小却相差很大, 产生这种现象的原因及其与节肢动物起源的关系值得我们更进一步的探讨。

表 2 一些物种 cyclin B3 基因外显子(E)的数目及大小(bp)

Tab. 2 The number and size (bp) of exons (E) in cyclin B3 gene in some species

物种名	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
人类( <i>H. sapiens</i> )	77	133	108	131	2992	96	93	138	156	150	131	308
狗( <i>C. familiaris</i> )	152	118	87	131	2839	96	93	138	156	150	131	307
爪蟾( <i>X. tropicalis</i> )	97	107	84	119	112	105	93	138	156	150	131	279
斑马鱼( <i>D. rerio</i> )	114	100	81	98	109	99	93	147	156	150	131	448
海胆( <i>S. purpuratus</i> )	118	140	111	191	82	168	231	156	150	131	113	—
牡蛎( <i>C. gigas</i> )	263	126	191	82	93	231	156	150	128	938	—	—
线虫( <i>C. elegans</i> )	56	95	423	494	502	—	—	—	—	—	—	—
果蝇( <i>D. melanogaster</i> )	2543	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
埃及斑蚊( <i>A. aegypti</i> )	332	804	331	592	—	—	—	—	—	—	—	—
致倦库蚊( <i>C. quinquefasciatus</i> )	38	1078	331	287	—	—	—	—	—	—	—	—

表 3 一些物种 cyclin B3 基因内含子(I)的数目及大小(bp)

Tab. 3 The number and size (bp) of introns (I) in cyclin B3 gene in some species

物种名	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9	I-10	I-11
人类( <i>H. sapiens</i> )	512	3522	5977	13513	1042	1225	28254	4314	820	3447	237
狗( <i>C. familiaris</i> )	3653	2824	5856	5980	843	1207	16338	3563	802	3272	226
爪蟾( <i>X. tropicalis</i> )	3607	2121	712	753	98	96	581	208	1159	111	483
斑马鱼( <i>D. rerio</i> )	239	88	1814	120	2529	91	107	3472	4797	3920	73088
海胆( <i>S. purpuratus</i> )	1762	1192	389	956	883	770	877	604	856	794	—
牡蛎( <i>C. gigas</i> )	449	312	319	271	482	236	231	291	383	—	—
线虫( <i>C. elegans</i> )	52	52	50	45	—	—	—	—	—	—	—
埃及斑蚊( <i>A. aegypti</i> )	81	69	399	—	—	—	—	—	—	—	—
致倦库蚊( <i>C. quinquefasciatus</i> )	1610	67	68	—	—	—	—	—	—	—	—

### 3.2 关于 cyclin B3 mRNA 的翻译调控和在卵细胞中的储备

cyclin B 蛋白作为调节亚基与 CDK1(p34<sup>CDK2</sup>)的

结合是活化 MPF 的必要条件, MPF 的活化促使细胞周期从 G2 期向 M 期转变; 细胞分裂的完成伴随 MPF 的活性消失, 这是通过 cyclin B 的水解实现的<sup>[13]</sup>, 因此, 在蛋白水平上 cyclin B 蛋白在细胞中不会有

高的存量, 满足分裂细胞对 cyclin B 蛋白的需求主要靠 mRNA 翻译水平的调控实现的。在贝类<sup>[15-16]</sup>、昆虫<sup>[17]</sup>、鱼类<sup>[18]</sup>、两栖类<sup>[19-20]</sup>、哺乳类<sup>[21]</sup>等动物类群中的研究发现, 多聚腺苷化(polyadenylation)和去腺苷化(deadenylation)是一种普遍的实现翻译调控的机制, 其中 mRNA 3'UTR 区的细胞质多聚化元件(CPE)等顺式作用元件起了重要作用, 很多反式作用因子如 CPEB、Bruno、Pumilio、Bicoid 等参与了翻译调控过程的实现。本研究发现在长牡蛎 cyclin B3 的 3'UTR 区有多达 10 个 CPE 元件(在中华绒螯蟹中为 8 个<sup>[22]</sup>, 在日本对虾中为 4 个<sup>[23]</sup>), 可见 CPE 元件在调控 cyclin B3 蛋白翻译过程的重要作用。在许多多细胞生物中, 受精后 4h 内细胞转录没有或水平很低, 早期胚胎发育所需的大量 mRNA 主要靠卵细胞含有的母源性 mRNA (保存在 mRNA 颗粒中)提供<sup>[24]</sup>, 因此在性腺发育过程中必然也会积累大量的 cyclin B3 mRNA 以满足早期胚胎发育需求, 本研究中发现长牡蛎 cyclin B3 mRNA 含量在性腺中含量很高, 也印证了此猜测。

本研究首次在长牡蛎中克隆得到 cyclin B3 cDNA 全长和基因组结构, 并对其组织表达特点及在性腺发育中的作用进行了初步探讨, 下一步将通过蛋白水平的研究进一步探讨长牡蛎性腺发育中 cyclin B3 蛋白的作用机理。

致谢: 本研究过程中得到了实验室李娟博士和张琳琳同学在实验技术等方面的诸多帮助, 在此深表感谢!

#### 参考文献:

- [1] Norbury C, Nurse P. Animal-cell cycles and their control[J]. Annual review of biochemistry, 1992, 61: 441-470.
- [2] Gautier J, Minshull J, Lohka M, et al. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*[J]. Cell, 1990, 60(3): 487-494.
- [3] Kishimoto T. Cell-cycle control during meiotic maturation[J]. Current opinion in cell biology, 2003, 15(6): 654-663.
- [4] Nurse P, Bissett Y. Gene required in G-1 for commitment to cell-cycle and in G-2 for control of mitosis in fission yeast[J]. Nature, 1981, 292(5823): 558-560.
- [5] Stark G R, Taylor W T. Control of the G(2)/M transition[J]. Molecular biotechnology, 2006, 32(3): 227-248.
- [6] Nurse P M. Cyclin dependent kinases and cell cycle control[J]. Bioscience reports, 2002, 22(5-6): 487-499.
- [7] Lew D J, Kornbluth S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control[J]. Current opinion in cell biology, 1996, 8(6): 795-804.
- [8] Katsu Y, Yamashita M, Kajiura H, et al. Behavior of the components of maturation-promoting factor, cdc2 kinase and cyclin-B, during oocyte maturation of goldfish[J]. Developmental biology, 1993, 160(1): 99-107.
- [9] Borgne A, Meijer L. Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition[J]. Journal of biological chemistry, 1996, 271(44): 27847-27854.
- [10] Honda R, Ohba Y, Nagata A, et al. Dephosphorylation of human p34(cdc2) kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25b phosphatase[J]. Febs letters. 1993, 318(3): 331-334.
- [11] Draetta G. Cdc2 activation: the interplay of cyclin binding and Thr161 phosphorylation[z]. 1993, 3: 287-289.
- [12] Gautier J, Matsukawa T, Nurse P, et al. Dephosphorylation and activation of *Xenopus*-p34cdc2 protein-kinase during the cell-cycle[J]. Nature. 1989, 339(6226): 626-629.
- [13] Glotzer M, Murray A W, Kirschner M W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway[J]. Nature. 1991, 349(6305): 132-138.
- [14] Ubersax J A, Woodbury E L, Quang P N, et al. Targets of the cyclin-dependent kinase CDK1[J]. Nature. 2003, 425(6960): 859-864.
- [15] Standart N, Dale M. Regulated polyadenylation of clam maternal messenger-RNAs *in-vitro*[J]. Developmental genetics. 1993, 14(6): 492-499.
- [16] Walker J, Dale M, Standart N. Unmasking mrna in clam oocytes: role of phosphorylation of a 3' UTR masking element-binding protein at fertilization[J]. Developmental biology. 1996, 173(1): 292-305.
- [17] Salles F J, Lieberfarb M E, Wreden C, et al. Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger-RNAs[J]. Science. 1994, 266(5193): 1996-1999.
- [18] Rosenthal E T, Tansey T R, Ruderman J V. Sequence-specific adenylations and deadenylations accompany changes in the translation of maternal messenger-RNA after fertilization of *spisula* oocytes[J]. Journal of molecular biology. 1983, 166(3): 309-327.

- [19] Fox C A, Sheets M D, Wickens M P. Poly(A) addition during maturation of frog oocytes - distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU[J]. *Genes & development*. 1989, 3(12b): 2151-2162.
- [20] Megrew L L, Dworkinrastl E, Dworkin M B, et al. Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element[J]. *Genes & development*. 1989, 3(6): 803-815.
- [21] Gebauer F, Xu W H, Cooper G M, et al. Translational control by cytoplasmic polyadenylation of c-mos messenger-RNA is necessary for oocyte maturation in the mouse[J]. *Embo journal*. 1994, 13(23): 5712-5720.
- [22] Fang J J, Qiu G F. Molecular cloning of cyclin B transcript with an unusually long 3' untranslated region and its expression analysis during oogenesis in the Chinese mitten crab, *eriocheir sinensis*[J]. *Molecular biology reports*. 2009, 36(6): 1521-1529.
- [23] 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]. *Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology*. 2005, 141(2): 186-195.
- [24] Seydoux G. Mechanisms of translational control in early development[J]. *Current opinion in genetics & development*. 1996, 6(5): 555-561.

## Molecular cloning and characterization of the key regulator of cell cycle cyclin B3 in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*), and its role in gonad development

WANG Tong<sup>1, 2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, QUE Hua-yong<sup>1</sup>, ZHANG Guo-fan<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Received:** Dec., 25, 2010

**Key words:** Pacific oyster (*Crassostrea gigas*); cell cycle regulation; cyclin B3; gonad; Real Time PCR

**Abstract:** The full length cDNA sequence of cyclin B3 was cloned from Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) for the first time. Cyclin B3 cDNA was 2383 bp in length, containing a 1293bp CDS that encoded a peptide of 430 amino acids with a calculated molecular weight of 47.8 kD. Multiple alignment and converted domain analysis showed that this peptide was a homolog of cyclin B3. The gDNA sequence of cyclin B3 contained 10 exons and 9 introns, which was consistent with the position in evolution of *C. gigas*. Expression of cyclin B3 gene was found in all tissues, but also showed a very strong tissue-specific feature; the amount of cyclin B3 in gonad was the highest among tissues, 100 times of mantle, the lowest expression tissue. The mRNA amount of cyclin B3 in gonad increased with the maturation of gonad. The expression implied the important role of cyclin B3 in mitosis, meiosis and early development of embryo.

(本文编辑: 梁德海)