

Doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2016.01.009

斑节对虾细胞周期蛋白 T 基因的克隆和表达分析

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

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 中国水产科学研究院
南海水产研究所热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018)

摘要: 真核生物的转录调控多发生在转录的延伸阶段, 细胞周期蛋白 T(cyclin T)是细胞转录的重要调控因子。文章利用 RACE 技术获得斑节对虾(*Penaeus monodon*)cyclin T(*Pmcyclin T*)cDNA 全长, 其全长为 3 421 bp, 其中开放阅读框(ORF)3 135 bp, 编码 1 044 个氨基酸; 生物信息学分析显示, 该氨基酸序列含有一个周期蛋白家族特有的 CYCLIN 保守区, 并含有 N-糖基化位点和磷酸化位点; 经 BLAST 同源性分析显示, 细胞周期蛋白 T 编码的蛋白与柑橘木虱(*Diaphorina citri*)、切叶蚁(*Acromyrmex echinatior*)等多种节肢动物有很高的同源性; 利用 qRT-PCR 技术对 *Pmcyclin T* 在不同组织及卵巢发育各时期的 mRNA 水平的表达谱进行了研究。结果表明, 细胞周期蛋白 T 在斑节对虾的心、卵巢等 7 个组织中均有表达, 其中卵巢中表达量显著高于其他组织($P < 0.05$); 在卵巢发育各时期中, 细胞周期蛋白 T 在Ⅲ期表达量最高。

关键词: 斑节对虾; 细胞周期蛋白 T; 基因克隆; 表达分析; 卵巢发育

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2016)01-0059-08

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

GUO Song^{1,2}, FU Mingjun¹, ZHAO Chao¹, LI Weijie^{1,2}, JIANG Shigui¹,
YANG Qibin³, ZHOU Falin¹, QIU Lihua¹

(1. Key Lab of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Tropical Aquaculture Research and Development Center of South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China)

Abstract: Cyclin T is a critical factor that stimulates the process of transcription elongation. We obtained the full-length cDNA sequence of cyclin T from black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) (denoted as *Pmcyclin T*) by RACE PCR. The cDNA of *Pmcyclin T* was 3 421 bp, encoding a polypeptide of 1 044 amino acids. Bioinformatics analysis shows that the amino acid sequence contained a CYCLIN conserved region of a periodic protein family as well as N-glycosylation sites and phosphorylation sites. The results of Blast and phylogenetic analyses suggest that *Pmcyclin T* shared very high homology with other kinds of arthropod such as

收稿日期: 2015-04-07; 修回日期: 2015-05-04

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-47); 国家自然科学基金项目(31101903); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201300B03); 广东省科技计划项目(2013B040402016); 海南省应用技术研发与示范推广专项(ZDXM2014057); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2014TS12)

作者简介: 郭松(1987-), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖研究。E-mail: guosong0804@163.com

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

Diaphorina citri, *Acromyrmex echinatior* and so on. Besides, we measured the mRNA expression of *Pmcyclin T* in seven tissues by real-time PCR. Expression was highest in the ovary and moderate in the intestine, brain and so on. While at different stages of ovary, *Pmcyclin T* was highest expressed at Stage I, suggesting that *Pmcyclin T* might play an important role in ovary development of black tiger shrimp.

Key words: *Penaeus monodon*; cyclin T; gene clone; express analysis; ovary development

细胞周期蛋白 T(cyclin T) 是细胞转录的重要调控因子, 和细胞周期蛋白依赖性激酶 9(cyclin dependent kinase 9, CDK9) 等组成正性转录延长因子 b(positive transcription elongation factor b, P-TEFb), 参与细胞转录延伸反应的正性调控。cyclin T 和 CDK9 组成的 P-TEFb 协同 CDK8、cyclin C、cyclin K、RNA 聚合酶 (POLR2A)、负性调控因子 (DSIF、NELF) 等共同调控细胞转录, 保证细胞功能的正常发挥^[1-4]。目前已知的 cyclin 家族成员以 A~J 进行编号, 共有约 15 种^[5], 其中 cyclin T 作为转录的重要调控因子, 在艾滋病、心肌肥大、肿瘤等疾病中有较深入的研究^[1]。Cyclins 不仅是 CDKs 的激活亚基, 而且是复合体(cyclins/CDKs)与其他基团或者调节因子直接作用时的识别效应器^[6]。1995 年, 人们首先从果蝇中分离纯化出 P-TEFb, 通过实验进一步确认了其成分主要是 cyclin T 和 CDK9 等^[4]。近几年的研究表明, cyclin T 是胚胎正常发育、细胞生长与分化以及艾滋病病毒(HIV-1) 转录复制等过程必不可少的关键因子之一, 其功能和作用机理是目前研究的热点。随着细胞周期蛋白研究的不断广泛和深入, cyclin T 基因在一些物种中相继被克隆出来, 如人(*Homo sapiens*, AAC39638.1)、小鼠(*Mus musculus*, AAD17205.1)、果蝇(*Drosophila melanogaster*, AAC73052.1)、斑马鱼(*Danio rerio*, XP_005167592.1) 和印度跳蚊(*Haipernathos saltator*, EFN77646.1) 等, 但该基因在对虾中尚未见报道。

斑节对虾(*Penaeus monodon*) 是世界三大对虾养殖品种之一, 人工育种过程中广泛采用的剪除单侧眼柄催熟卵巢的技术会导致亲虾死亡率高和产卵质量低等问题^[7-11]。对卵巢成熟促进因子(Mature Promoting Factor, MPF, cyclin B/CDC2) 的研究揭示了细胞周期蛋白在甲壳动物卵巢发育中具有重要的潜在研究价值^[12-13]。此实验通过 RACE 技术首次在对虾中获得了 *cyclin T* 基因的 cDNA 全长, 并利用生物信息学分析了基因的结构, 对基因的特征进行了研究; 通过实时荧光定量 PCR(qPCR) 技术

分析了 *cyclin T* 基因在不同组织和卵巢发育各个时期的 mRNA 水平的相对表达谱, 以为进一步揭示细胞周期蛋白在斑节对虾卵巢发育中的作用机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用斑节对虾均购自于海南三亚, 约 80~200 g, 水泥池中暂养 3 d 后取卵巢、脑、胸神经、肝胰腺、心、血淋巴和肠等组织。所取各组织保存于液氮中带回实验室。

1.2 cDNA 文库的构建与 EST 序列分析

从 3 只性成熟的斑节对虾中解剖获得卵巢及眼柄等组织, 使用 ZAP-cDNA 合成试剂盒和 ZAP-cDNA Gigapack Gold cloning kit 试剂盒(Stratagene, USA) 构建斑节对虾 cDNA 文库并利用 T3 引物随机测序。对获得的 6 782 个测序结果进行 BLAST 分析, 结果显示一条 3 232 bp 的 EST 序列与蝇蛹金小蜂(*Nasonia vitripennis*) *cyclin T* 基因高度同源。

1.3 总 RNA 提取与逆转录

取液氮中保存的卵巢组织按 Trizol (Invitrogen, USA) 说明书提取斑节对虾总 RNA, 溶解于 DEPC 处理水, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测浓度, 以 aligo-dT/adaptor(5'-GGCCACGCGACTAGTAC(T)₁₆-3') 为反转录引物在 M-MLV 反转录酶(Promega, USA) 的作用下合成 cDNA 第一链。

1.4 基因的克隆与测序

对获得的 EST 序列进行验证后, 根据验证的片段设计基因特异性引物, 利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE) 和半巢式 PCR(semi-nest PCR) 技术扩增斑节对虾 *cyclin T* 基因的 3 和 5 未知序列。3 RACE 中第一轮 PCR 使用引物 T3 SP1 (5'-CAAAAGGACCTGTTG-GAGGCACAT-3') 和接头通用引物 AP (GGC-CACGCGACTAGTAC)^[5]; 第二轮 PCR 使用正向引

物 T3SP2(5'-GACCGCCTTCGTCTGAAAAGGAATC-3) 和接头通用引物 AP^[5]。5 RACE 中以 T5SP1(5'-CAGGGTCTGTAGCAAAATGTTCTCA-3) 和 oligo-dG(5'-GGGGGGGGGGGGGGGG-3) 为引物进行第一轮 PCR, 以 T5SP2(5'-CGGTGAAAACGGGT-GAACGGATGAT-3) 和 oligo-dG 为引物进行第二轮 PCR^[5], PCR 产物送深圳华大基因进行测序。

1.5 序列分析

使用在线软件 Clustal W(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 对测序片段进行比对拼接; 使用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站上的 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 和 BLAST X 程序分析起始密码子和终止密码子。

氨基酸序列的预测利用 Predict Protein (EMBL-Heidelberg); 序列同源性比对和相似性搜索用 NCBI 网站上的 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行; 用 Bioedit 软件进行多序列比对; 信号肽预测用 SingalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序; 蛋白结构域分析用 SMART 4.0(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线程序和 ScanProsite(<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) 在线程序; 糖基化位点预测采用 NetNGlyc 1.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 程序; 磷酸化位点预测采用 NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 程序; 3D 结构预测和查看采用 phyre2 软件(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)、Swiss-model(<http://swissmodel.expasy.org>) 和 FirstGlance in Jmol(<http://bioinformatics.org/firstglance/>) ; 核苷酸序列同源性和相似性分析用 MatGAT 2.01 软件; 采用 MEGA 5.0 软件以邻位相连法(neighbor-joining, NJ) 构建进化树^[5]。

1.6 qRT-PCR 相对定量分析 **Pmcyclin T mRNA** 的组织和卵巢发育时相表达特征

提取健康斑节对虾不同组织(脑、胸神经、肝胰腺、心、卵巢、血淋巴和肠) 和不同发育时期卵巢^[11] 的总 RNA, 使用引物 reT-F(5'-TTA-GATGCCGCAGTAGTTAGAA-3) 和 reT-R(5'-TTTG-GCTCAGGAGGTTACG-3) 扩增目的基因, rEF-F(5'-AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTT-3) 和 rEF-R(5'-CGTGGTGCATCTCCACAGACT-3) 扩增 EF-1 基因作为内参^[5], 实验数据采用相对 CT 法

(2⁻ CT 法) 分析 *Pmcyclin T* 基因在斑节对虾各组织和卵巢不同发育时期的相对表达量, 分别以脑中的表达量和卵巢发育一期表达量为对照样本。运用统计学软件 SPSS 19.0 进行相对独立的单因素方差分析, 结果以“平均值 ± 标准误”($\bar{X} \pm SE$) 表示, $P < 0.05$ 为差异显著^[5]。

2 结果与分析

2.1 **Pmcyclin T** 基因 cDNA 序列信息

通过 5 和 3 RACE 技术获得的序列经拼接得到 *Pmcyclin T* cDNA 全序列(图 1)。全长 3 421 bp, 包括 3 135 bp 的开放阅读框(ORF), 14 bp 的 5' 非编码区(UTR) 和 271 bp 的 3' UTR, 3' UTR 含有 1 个多聚腺苷酸化信号和 30 poly(A)⁺(图 1)。预测 *Pmcyclin T* 具有 1 044 个氨基酸, 理论相对分子量约为 116.8 kD, 理论等电点(pI) 为 9.45。BLAST 同源性分析及 SMART 分析显示, *Pmcyclin T* 氨基酸序列包含 1 个保守的 CYCLIN 同源结构域(40 ~ 139 aa, 图 1); 利用 SignalP 3.0 在线软件未检测到 *Pmcyclin T* 含有信号肽序列; 对糖基化位点(N-Glycosylation sites) 和磷酸化位点(Phosphorylation sites) 分析显示 *Pmcyclin T* 含有 6 个糖基化位点, 有 103 个潜在的磷酸化位点[包括 6 个酪氨酸(Tyr) 位点, 79 个丝氨酸(Ser) 位点, 18 个苏氨酸(Thr) 位点]。选择哺乳类, 鸟类, 两栖类, 爬行类, 鱼类, 和节肢动物类等物种的 cyclin T 氨基酸序列进行多重比对, 结果显示 *Pmcyclin T* 与柑橘木虱(*Diasphorina citri*)、爪蟾(*Xenopus laevis*)、密西西比鳄(*Alligator mississippiensis*) 和斑马鱼等物种的 cyclin T 相似, 一致性分别是 75%, 68%, 72% 和 57%, 保守结构域在不同物种中较为保守(图 2)。系统进化树显示, 斑节对虾 cyclin T 氨基酸序列首先与柑橘木虱、蝇蛹金小蜂、印度跳蚁等聚为一支, 后与斑马鱼、原鸡(*Gallus gallus*)、爪蟾、小鼠和人等聚为一支(图 3)。*Pmcyclin T* 三级结构(图 4) 呈细长型, 包含 2 个重复, 每个重复为 5 个螺旋结构, 2 个重复之外是 N 端和 C 端短螺旋结构。斑节对虾不同 cyclins 以及不同物种 cyclin T 在蛋白质三级结构(图 4) 较为保守, 区别在于折叠和螺旋的长短有所不同。

2.2 **Pmcyclin T** 的组织差异分析

利用 qRT-PCR 技术对 *Pmcyclin T* 在斑节对虾中组织差异表达进行检测和分析(图 5), 可知 *Pm-*

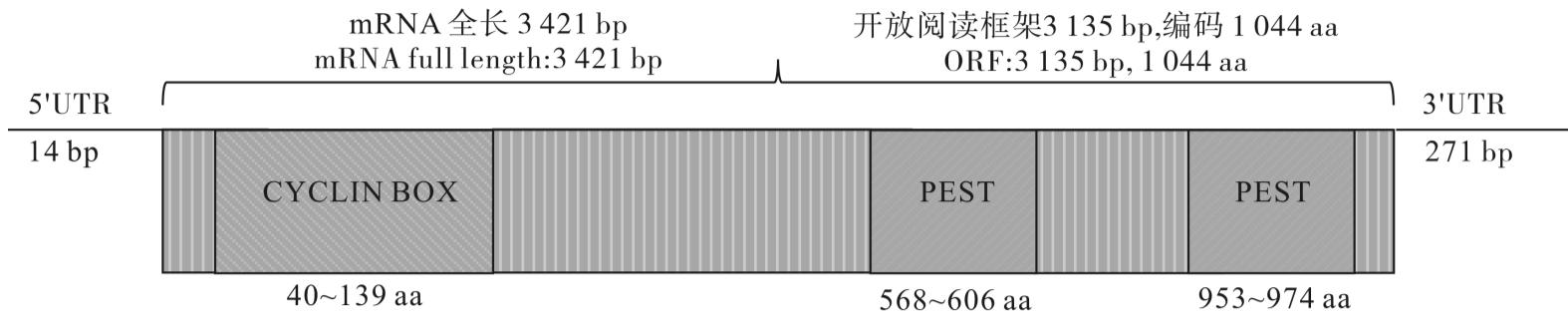


图 1 *Pmcyclin T* 的全长 cDNA 和氨基酸序列特征展示图

Pmcyclin T cDNA 全长为 3 421 bp, 包含 3 135 bp 的开放阅读框, 编码 1 044 个氨基酸(Genbank 注册号为 KP676143); 预测的 CYCLIN 结构域(40 ~139 aa) 和 PEST 基序(568 ~606 aa, 953 ~974 aa) 在图中用标签和阴影标示

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

The full-length of *Pmcyclin T* contains an ORF of 3 135 bp encoding 1 044 amino acids (accession No. KP676143).

The predicted CYCLIN BOX domain (positions 40 ~139 aa) and PEST motifs (positions 568 ~606 aa)

953 ~974 aa) in the deduced Pmcyclin T protein were indicated by label and shading

斑节对虾	<i>Penaeus monodon</i>	1	-----MLMAAEERWYFTKEEINNSPSRRCGIDAEEKELSYRQQGANLIQDMGQRLQVNQL	54
小家鼠	<i>Mus musculus</i>	1	MEG---ERKNN-----NKRWFYTREQLENSPSRRFGVDSDKELSYRQQAANLLQDMGQRLNVSQL	57
柑橘木虱	<i>Diaphorina citri</i>	1	MSTNTTQGSHS-----PDRWFYTKEQLENTPSRKCGYDAEKELSCRQQAANLIQDMGQRLQVTQL	60
墨西哥脂鲤	<i>Astyanax mexicanus</i>	1	MAASRGS-----STRWFFTREQLDNTPSRRCGVEADRELSEYRQQAANLIQDMGQRLNVSQL	56
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	1	MAASFSPSPSQN-----NNKWFYTREQIENSPSRRAGLDPDKELLYRQQAANLLQDMGQRLNVSQL	60
爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	1	MADCRAP-----ASRWYFTREQLESSPSRKCGMEADKELSYRQQAANLVQDMGQRLNVSQL	56
斑胸草雀	<i>Taeniopygia guttata</i>	1	MAAAGAGSAGSAARGGGSSAASRWFFSREQLENTPSRRCGVEADKELSYRQQAANLIQDMGQRLNVSQL	70
蝇蛹金小蜂	<i>Nasonia vitripennis</i>	1	MAT-----DEKWYFTKEQLANTPSRKCGIDADKELSYRQQAANFIQDMGQRLVVSQ	52
人	<i>Homo sapiens</i>	1	MEG---ERKNN-----NKRWFYTREQLENSPSRRFGVDPDKELSYRQQAANLLQDMGQRLNVSQL	57
<i>Clustal consensus</i>		1	:*: :*: :*: . :***: * . :*: ** ***. **: :***** *.* **	37
斑节对虾	<i>Penaeus monodon</i>	55	AINTAIVYMHRFMYHPFTRFHRNSIAPAALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVAYHCLFRDHPPLDTQSEAYL	124
小家鼠	<i>Mus musculus</i>	58	TINTAIVYMHRFMIQSFTQFHRYSMAPAALFLAAKVEEQPKKLEHVIKVAHTCLHPQESLPDTREAYL	127
柑橘木虱	<i>Diaphorina citri</i>	61	CINTAIVYMHRFYVFHSFTQFHRSNIATAALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVIRVAQLCLFKNQPPLDPRSEAYQ	130
墨西哥脂鲤	<i>Astyanax mexicanus</i>	57	TINTAIVYMHRFMYHSFTKFHRNIISPTTLFLAAKVEEQPRKLEHVIKVAHACLNQPEPPLDAKSNAYL	126
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	61	TINTAIVYMHRFYMQSFTRFHRNVIAPAALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVTHACLNQDPSPDTRSDTYL	130
爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	57	TINTAIVYMHRFYMHSFTKFHRNMSPTALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVAHACLNQVEPQLDTKSEAYL	126
斑胸草雀	<i>Taeniopygia guttata</i>	71	TINTAIVYMHRFYMHSFTKFNRNIMSPTALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVANACLHPQEPLDTKSDAYL	140
蝇蛹金小蜂	<i>Nasonia vitripennis</i>	53	CINTAIVYMHRFYVFHSLSQFHRNSIAAAALFLAAKVEEQPRKLEHVIKVAHMCLRDTPPLDTKSEQYL	122
人	<i>Homo sapiens</i>	58	TINTAIVYMHRFMIQSFTQFPGNSVAPAALFLAAKVEEQPKKLEHVIKVAHTCLHPQESLPDTREAYL	127
<i>Clustal consensus</i>		37	*****: :*: :*: . :*: :*****:*****: *: ** . *. :*: * 87	
斑节对虾	<i>Penaeus monodon</i>	125	ERAQELVVNENILLQTLGFDVAIDHPHTHVVKKCCQLVRATKDLAQTSYFMATSSLHMTTMCLQYKPTVVA	194
小家鼠	<i>Mus musculus</i>	128	QQVQDLVILESIILQTLGFELTIDHPHTHVVKCTQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFSLQYTPPVVA	197
柑橘木虱	<i>Diaphorina citri</i>	131	EQAQEIVVNENVLLQTLGFDVGIEHPHTYVVKKCHLVRASKDLAQTSYFMASNSLHLTTMCLQYRSTVVA	200
墨西哥脂鲤	<i>Astyanax mexicanus</i>	127	QQAQELVILETIVLQTLGFEITIEHPHTDVVKCSQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFCLQYKPTVIA	196
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	131	QQAQDLVILESIILQTLGFEITIDHPHTHVVKCTQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFCLQYSPIVA	200
爪蟾	<i>Xenopus laevis</i>	127	QQAQELVLTLETIMLQTLGFEITIEHPHTDVVKCTQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFCLQHKPTVIA	196
斑胸草雀	<i>Taeniopygia guttata</i>	141	QQAQELVILETIMLQTLGFEITIEHPHTDVVKCTQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFCLQYKPTVIA	210
蝇蛹金小蜂	<i>Nasonia vitripennis</i>	123	EEAQQDLVFNENVLLQTLGFDVAIDHPHTHVRCCCHLVASKDLAQTSYFMASNSLHLTTMCLQYKPTVVA	192
人	<i>Homo sapiens</i>	128	QQVQDLVILESIILQTLGFELTIDHPHTHVVKCTQLVRASKDLAQTSYFMATNSLHLTTFSLQYTPPVVA	197
<i>Clustal consensus</i>		88	:*: :*: * . :*****: *:**** **: * :***:*****: . ***: **: . :*: * 145	

图 2 *Pmcyclin T* 基因与其他物种 *cyclin T* 基因氨基酸序列保守结构域的多重比对

保守 cyclin 结构域为方框内氨基酸序列; * . 一致性; . 或者:. 相似性

Fig. 2 Multiple sequence alignment of *Pmcyclin T* with *cyclin T* from other animals

The nucleotide sequences in the boxes are conserved domains. Identical and similar sites were shown with sparks (*) and dots(. or :) respectively.

cyclin T在不同组织有不同程度的表达。*Pmcyclin T* 在卵巢中的表达量最高，肠、血淋巴、心、肝胰腺和胸神经之间差异不显著，在脑中的表达量显著低

于卵巢和肠中的。

2.3 卵巢发育各时期 *Pmcydin T* 的表达

利用 qRT-PCR 技术对斑节对虾卵巢发育各个

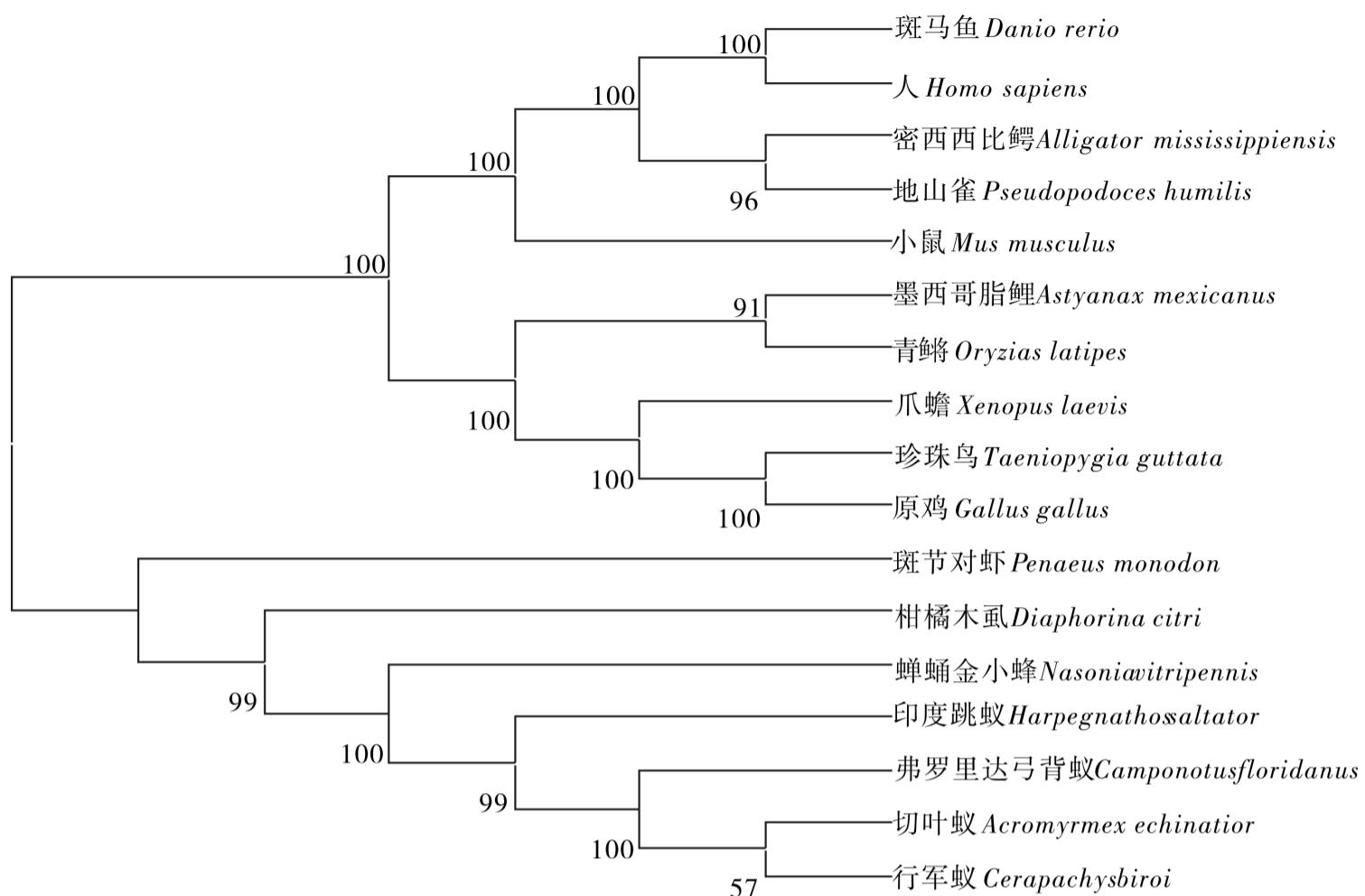


图3 基于 cyclin T 氨基酸序列利用 MEGA 5.0 软件构建的 NJ 系统进化树

Fig 3 NJ phylogenetic tree using MEGA 5.0 software based on cell cyclin T amino acid sequence

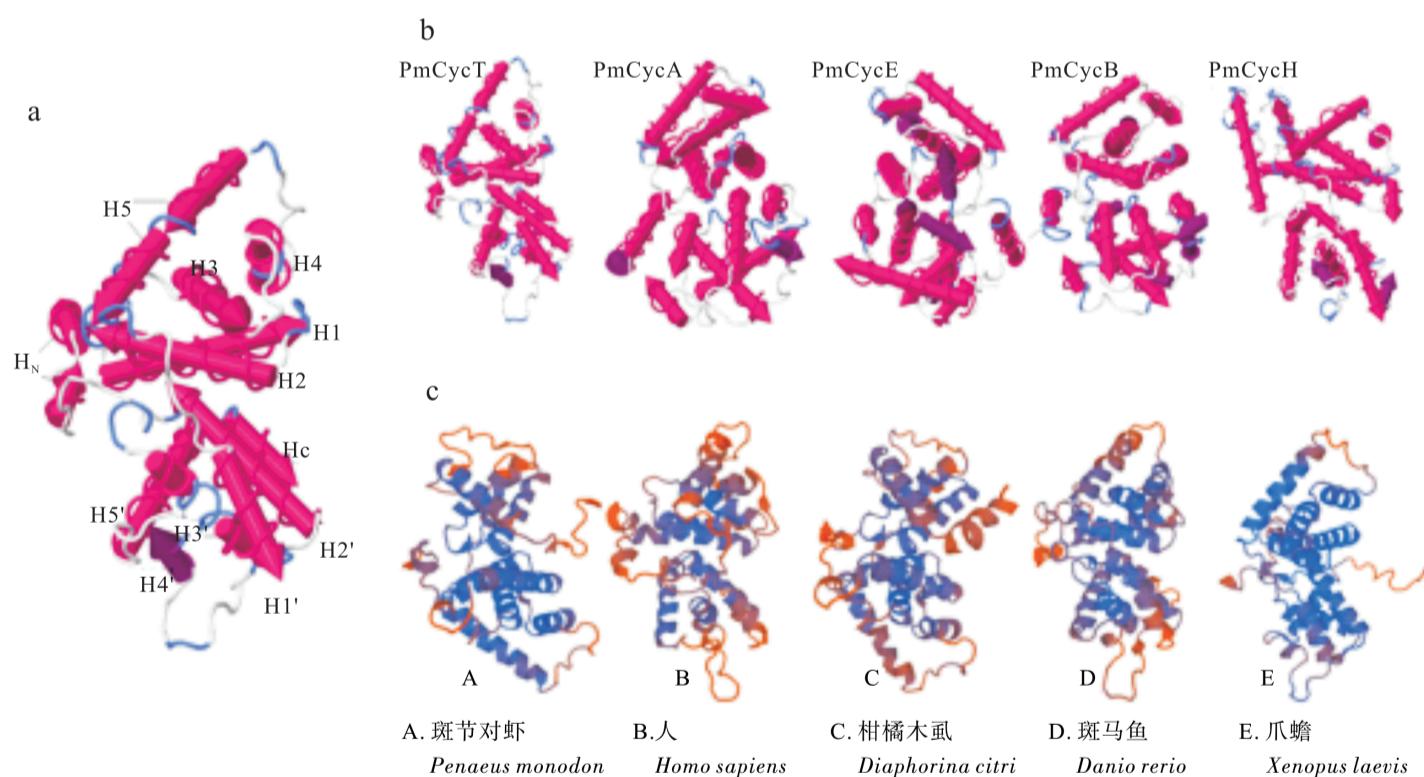
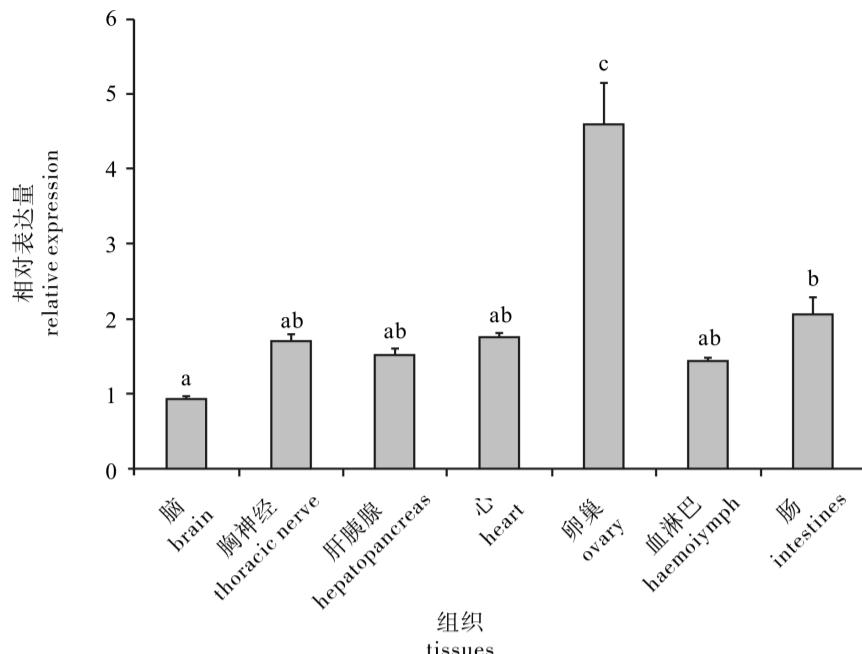


图4 使用 phyre 和 FirstGlance in Jmol 在线预测蛋白质 3D 结构

a. Pmcyclin T 的三级结构；b. 已知斑节对虾 cyclins 的三级结构，PmCycA 是 cyclin A(Genbank 注册号 ACH72071. 1)，PmCycE 为 cyclin E(Genbank 注册号 AGW23550. 1)，PmCycB 为 Pmcyclin B(Genbank 注册号 ABM54576. 1)，PmCycH 为 cyclin H(Genbank 注册号 AGP03382. 1)；c. 其他物种 cyclin T 的三级结构

Fig 4 Tertiary structure of protein speculated by onlian software phyre and FirstGlance in Jmol

a. tertiary structure of Pmcyclin T; b. tertiary structure of cyclins of *P. monodon* that can be obtained from GenBank. PmCycT is cyclin T; PmCycA is *P. monodon* cyclin A (GenBank accession No. ACH72071. 1); PmCycE is *P. monodon* cyclin E (GenBank accession No. AGW23550. 1); PmCycB is *P. monodon* cyclin B (GenBank accession No. ABM54576. 1); PmCycH is *P. monodon* cyclin H (GenBank accession No. AGP03382. 1); c. tertiary structure of cyclins

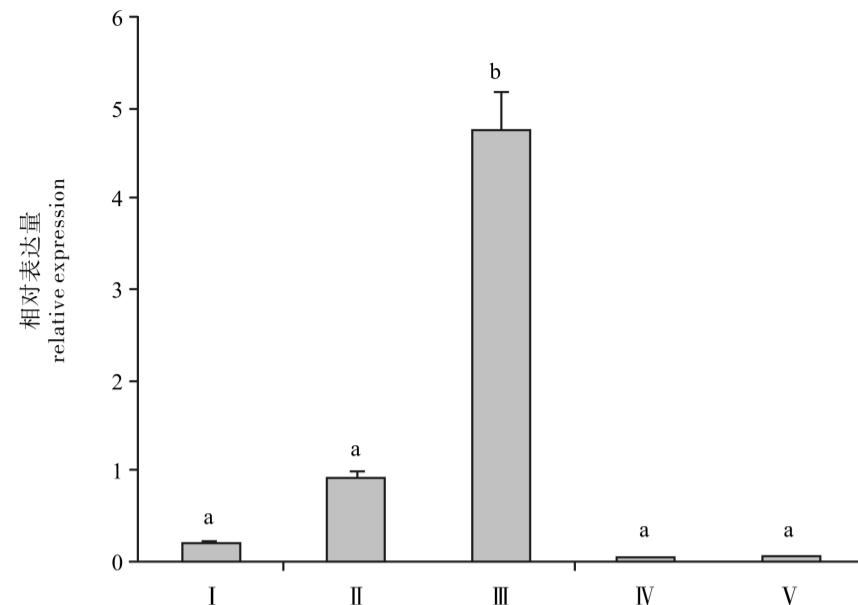
图 5 *Pmcyclin T* 在斑节对虾不同组织中的表达垂直线表示平均值 \pm 标准误 ($n=3$)，不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)，图 6 同此Fig. 5 Relative expression level of *Pmcyclin T* in tissuesVertical bars represent $\bar{X} \pm \text{SE}$ ($n=3$). Different letters above bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

The same case in Figure 6.

时期 *Pmcyclin T* 的表达量进行检测(图 6)，*Pmcyclin T* 在卵巢发育的第一期相对表达量显著高于其他时期，在Ⅳ期及Ⅴ期中几乎没有表达。

3 讨论

cyclin T 是细胞转录调控中的重要因子，对于细胞中的转录调控和艾滋病、肿瘤发生等有重要意义^[14-16]。越来越多的研究表明，真核生物的转录调控多发生在 RNA 聚合酶 II 的延伸阶段^[17]，*cyclin T* 作为活化亚基与 CDK9 组成 P-TEFb 复合体^[18]。P-TEFb 是目前已知的唯一正性通用转录延伸因子，可以磷酸化 RNA 聚合酶 II 的 C 端结构域 (CTD) 和负性延伸因子 (NELF) 以及 DRB 敏感诱导因子 (DSIF)，使停止的延伸反应得以进行^[19-20]。在细胞内使用 RNA 干扰 (RNAi) 技术敲除 *cyclin T* 能够抑制 HTV-1 基因的表达和复制而不会使细胞凋亡^[21-22]。有研究表明，人外周血单核细胞在分化为巨噬细胞时，*cyclin T1* 的表达水平显著增加，分化过程后期，其水平降低。研究发现利用 PMA 和 PHA 对 T 淋巴细胞激活，*cyclin T* 的蛋白水平也会显著增加^[23-25]。除此之外，在模式生物秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 胚胎中使用 RNAi 研究发现，P-TEFb 与早期胚胎发育相关的众多基因的表达调控有密切关系^[26]。对 *cyclin T* 的分析将有

图 6 *Pmcyclin T* 卵巢发育时相表达

- 卵原细胞期； · 核染色质期； · 周边核仁期；
- 卵黄囊期； · 成熟期

Fig. 6 Relative expression level of *Pmcyclin T* at different developmental stages of ovary

- ovogonium stage; · chromatin nucleolus stage; · perinucleolus stage; · yolk stage; · cortical rod stage

助于阐述卵母细胞和卵巢发育机制，以及真核细胞转录调控机制。

文章利用 RACE 技术从斑节对虾中克隆获得了全长为 3 421 bp 的 cyclin T cDNA 全序列，其中 ORF 片段 3 135 bp，编码 1 044 个氨基酸。该氨基酸序列含有周期蛋白家族特有的 CYCLIN 保守区 (40 ~139 aa)，并具有 N-糖基化位点及潜在磷酸化位点，说明目的基因是 CYCLIN 家族成员。多序列连配发现这些特征区域都位于保守区域内。同源性比对发现 *Pmcyclin T* 基因预测的氨基酸序列与柑橘木虱、切叶蚁等多种节肢动物具有高度同源性 (*E*-value 分别为 1e-131、4e-130)，*E* 小于 0.005 则说明序列间具有高度的同源性，是同源序列^[22]。系统树研究发现 *Pmcyclin T* 与节肢动物聚为一支，说明 *Pmcyclin T* 为 cyclin T 家族成员之一，并与节肢动物的 cyclin T 具有相同或者相似的功能。其三级结构为细长型，包含 2 个典型的 5 个螺旋的重复，重复两端是 N 端和 C 端的位于外侧的螺旋，而已知的斑节对虾 *cyclins* 基因的三级结构都具备这些典型的特点，比较人类中不同 *cyclins* 时也发现了这一特点^[6]，说明同一物种的 *cyclins* 在结构特征上具有一定的保守性。该研究对不同物种的 cyclin T 的三级结构进行比较，也发现了这一典型特点(图 4)。从三级结构与一级结构的相似性及保守性上可以看出 cyclin T 结构域在不同物种中具有

的保守性, 从而揭示了 cyclins 功能的重要性以及不同 cyclins 之间可能具有相对紧密的关系。

P-TEFb 在细胞活化、增殖、分化过程中起到关键的作用。cyclin T 经 SKP2 作用泛素化途径降解直接影响 P-TEFb 整体的降解速度和生物学功能的发挥^[27]。在对人类细胞发育的研究时发现, P-TEFb 复合体中 cyclin T 的蛋白水平在整个细胞周期进程中几乎没有变化, CDK9 在整个细胞周期中也是持续表达^[28]。

利用 qRT-PCR 技术发现 Pmcyclin T 在所检测的斑节对虾各组织(脑、胸神经、肝胰腺、心、卵巢、血淋巴和肠)中均有表达, 除在卵巢中相对表达量显著高于其他组织外, 其余组织中的表达无显著差异, 说明该基因可能在卵巢中具有重要作用。在对人类的 cyclin T 研究中发现了类似的结果, 其在人类的各种组织中的表达也是保守的。可见, P-TEFb 作为基础转录调控因子, 在生物体的发育中起着至关重要的作用。在对虾卵巢中的相对高表达说明 Pmcyclin T 在卵巢发育相关基因转录调控中可能具有重要的作用。Pmcyclin T 在卵巢发育的各个时期表达量有所不同, 说明 Pmcyclin T 可能与卵巢发育的时期转换有关^[29]。Pmcyclin T 在卵巢发育期(卵巢从未成熟到成熟的关键时期)相对表达量最高, 说明 Pmcyclin T 和卵巢的成熟有密切的关系。Cyclin T 在其他虾蟹卵巢中的研究尚未见报道, 其他 cyclins 在虾蟹中的研究多见于 cyclin B, 其在不同物种中的表达有差异, 但大多在卵巢启动发育到成熟之间表达量最高或呈逐渐上升的趋势^[30-31]。

从研究结果可以推断 Pmcyclin T 可能参与了斑节对虾卵巢的发育调控, 但其在斑节对虾卵母细胞中的细胞定位以及在胚胎发育中的作用还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] ARRIGA J, GRANA X. Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes[J]. Gene, 2004, 337: 15-23.
- [2] RAMAKRISHNAN R, YU W, RICE A P. Limited redundancy in genes regulated by Cyclin T2 and Cyclin T1 [J]. BMC Res Notes, 2011, 4: 260.
- [3] 曹华, 高瀛岱. CDK9/Cyclin T(P-TEFb) 及其生物学功能 [J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(2): 161-163.
- [4] 胡向明, 陈瑞川. P-TEFb 的功能及其活性调控机制 [J]. 生命的化学, 2010, 30(3): 429-433.
- [5] 赵超, 傅明骏, 江世贵, 等. 斑节对虾细胞周期蛋白 E 基因的克隆与表达分析 [J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 464-473.
- [6] ANAND K, SCHULTE A, FUJINAGA K, et al. Cyclin box structure of the P-TEFb subunit cyclin T1 derived from a fusion complex with EIAV Tat [J]. J Mol Biol, 2007, 370(5): 826-836.
- [7] PRATOOMCHAAT B, PIYATIRATIVORAKUL S, MENASVETA P, et al. Sperm quality of pond reared and wild caught *Penaeus monodon* in Thailand [J]. J World Aquac Soc, 1993, 24(4): 530-540.
- [8] 林汝榕, 何进金, 丘虎三. 诱导池养斑节对虾的性腺发育与产卵 [J]. 水产学报, 1990, 14(4): 277-285.
- [9] 张加润, 江世贵, 林黑着, 等. 不同品牌饲料对斑节对虾生长及水质影响的研究 [J]. 南方水产科学, 2013, 9(6): 20-26.
- [10] 温为庚, 林黑着, 牛津, 等. 野生斑节对虾卵巢发育过程中不同组织的氨基酸组成 [J]. 南方水产科学, 2013, 9(5): 32-36.
- [11] 黄建华, 马之明, 周发林, 等. 南海北部野生斑节对虾卵巢解剖结构及组织学的研究 [J]. 南方水产, 2005, 1(3): 49-53.
- [12] VISUDTIPHOLE V, KLINBUNGA S, KIRTIKARA K. Molecular characterization and expression profiles of cyclin A and cyclin B during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Comp Biochem Physiol A, 2009, 152(4): 535-543.
- [13] HAN K, DAI Y, ZOU Z, et al. Molecular characterization and expression profiles of cdc2 and cyclin B during oogenesis and spermatogenesis in green mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 2012, 163(3/4): 292-302.
- [14] BRES V, YOSHIDA T, PICKLE L, et al. SKIP Interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation [J]. Mol Cell, 2009, 36(1): 75-87.
- [15] MANCHBO H Y, LEE G, FLYGARE J, et al. P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation *in vivo* and *in vitro* [J]. Genes Dev, 1997, 11(20): 2633-2644.
- [16] ZHANG H S, WU M R. SIRT1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation through activating AMP-activated protein kinase [J]. Virus Res, 2009, 146(1/2): 51-57.
- [17] ADELMAN K, LIS J T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(10): 720-731.
- [18] PENG J, MARSHALL N F, PRICE D H. Identification of a cyclin subunit required for the function of *Drosophila* P-TEFb [J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13855-13860.
- [19] SAUNDERS A, CORE L J, LIS J T. Breaking barriers to transcription elongation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(8): 557-567.
- [20] PETERLIN B M, PRICE D H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb [J]. Mol Cell, 2006, 23(3): 297-305.
- [21] LI Z Y, XIONG Y, PENG Y, et al. Specific inhibition of HIV-1 replication by short hairpin RNAs targeting human cyclin T1 without inducing apoptosis [J]. FEBS Lett, 2005, 579(14): 3100-

- 3106.
- [22] ANDERSON I, BRASS A. Searching DNA databases for similarities to DNA sequences: when is a match significant? [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(4): 349-356.
- [23] LIU H, HERRMANN C H. Differential localization and expression of the Cdk9 42k and 55k isoforms [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203(1): 251-260.
- [24] HERRMANN C H, CARROLL R G, WEI P, et al. Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines [J]. *J Virol*, 1998, 72(12): 9881-9888.
- [25] SHIM E Y, WALKER A K, SHI Y, et al. CDK-9 /cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C elegans* embryo [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(16): 2135-2146.
- [26] HIRANSUCHALERT R, THAMNIEMDEE N, KHAMNAMTONG B, et al. Expression profiles and localization of vitellogenin mRNA and protein during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2013, 412: 193-201.
- [27] BARBORIC M, PETERLIN B M. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV tat and the control of transcriptional elongation [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(2): 200-203.
- [28] GARRIGA J, BHATTACHARYA S, CALBO J, et al. CDK9 is constitutively expressed throughout the cell cycle, and its steady-state expression is independent of SKP2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(15): 5165-5173.
- [29] JIANG S G, QIU L H, ZHOU F L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a heat shock protein (Hsp90) gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(1): 127-134.
- [30] 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.
- [31] LI W X, HUANG H Y, HUANG J R, et al. Molecular cloning, expression profiles and subcellular localization of cyclin B in ovary of the mud crab, *Sylla paramamosain* [J]. *Genes Genom*, 2013, 35(2): 185-195.