

## 近缘新对虾 *cyclin B* 基因的克隆与原核表达

杨亚男, 黄辉洋, 黄小帅, 叶海辉\*, 李少菁

(厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 采用 RACE 技术, 克隆了近缘新对虾 *cyclin B* 基因, 该序列全长 1 667 bp, 编码区 1 209 bp 共编码 402 个氨基酸, 所推导的氨基酸序列 N 端不存在信号肽。BLAST 比对后发现, 其氨基酸序列与刀额新对虾的同源性达 90%。经 RT-PCR 检测, *cyclin B* 基因在近缘新对虾的卵巢和肌肉中表达水平最高, 胸神经节和心脏次之, 鳃、眼柄神经节、肝胰腺几乎没有表达。推测主要与 *cyclin B* 在细胞周期中调控细胞分裂的功能有关。原核表达结果显示, pET32a 表达载体在 0.2 mmol/L IPTG、25 °C 诱导 4 h 条件下可得到纯度较高的分子量约 67 ku 的蛋白。

**关键词:** 近缘新对虾; *cyclin B* 基因; 克隆; 原核表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

成熟促进因子 (maturation-promoting factor, MPF) 参与细胞分裂的多个事件的发生, 在真核生物细胞周期的 G2/M 期转变过程中发挥着广泛的调控作用。MPF 由调控亚基周期蛋白 B (Cyclin B) 与催化亚基周期蛋白依赖性蛋白激酶 1 (cyclin-dependent kinase 1, CDK1) 共同组成。其中调控亚基 cyclin B 是 CDK1 活化并发挥其激酶活性所必需的<sup>[1-2]</sup>。在大多数脊椎动物成熟的卵细胞中, Cyclin B 从 G1 期早期开始合成并与 CDK1 相结合形成无活性的前体 MPF (preMPF)。然后通过一系列磷酸化和去磷酸化 preMPF 才表现出活性<sup>[3]</sup>。Cyclin B 在脊椎动物精卵发生中的机制已有不少的研究, 但在甲壳动物方面至今报道尚少。目前, 只对斑节对虾 (*Penaeus monodon*)、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)、日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 中 Cyclin B 的分子克隆及与卵子发生的关系进行了研究<sup>[4-7]</sup>。

近缘新对虾 (*Metapenaeus affinis*) 隶属于节肢动物门 (Arthropoda), 甲壳纲 (Crustacea), 十足目 (Decapoda), 对虾科 (Penaeidae), 新对虾属 (*Metapenaeus*), 主要分布在印度、澳大利亚、日本

以及马六甲海峡等海域。我国广东、福建沿海也盛产此虾。该虾肉味鲜美、肉质脆爽、营养丰富, 在国内外市场颇受欢迎。迄今近缘新对虾生殖生物学的研究尚少, 本实验报道了近缘新对虾 *cyclin B* (MaCB) 基因的分子克隆、序列分析、组织表达和 *cyclin B* 蛋白的原核表达情况, 为探索卵母细胞成熟机制提供了理论基础与参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

近缘新对虾购自福建省厦门市第八菜市场, 挑选活性好的雌性个体, 体质量 15 ~ 20 g。20 °C 暂养 1 d 后, 将其组织 (胸神经节、眼柄神经节、肝胰腺、心脏、肌肉、鳃、胃) 取出并放入液氮中迅速研磨。

#### 1.2 引物设计

下载 NCBI 中节肢动物门埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*), 丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*), 日本囊对虾, 斑节对虾和刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) *cyclin B* 的 cDNA 序列, 用 Clustal X 软件进行比对, 找出氨基酸序列保守区, 遵循引物设计原则, 利用 Oligo6.0 和 Primer

收稿日期: 2012-06-14 修回日期: 2012-11-23

资助项目: 国家自然科学基金项目 (40406030)

通信作者: 叶海辉, E-mail: haihuiye@xmu.edu.cn

Premier 5.0 软件设计简并引物(上游引物 DJF 和下游引物 DJR),进行 *cyclin B* 部分 cDNA 序列克隆。根据已经获得的 *cyclin B* 部分 cDNA 序列,分别设计 3'端和 5'端引物。由测序结果获得的 *cyclin B* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)序列,设计 JF 及 JR 作为半定量 RT-PCR 引物。

根据 *MaCB* 基因全长 cDNA 序列,设计扩增

*MaCB* cDNA 的 ORF 的引物;参照载体 pET32a 和 pET-His 多克隆位点的排列,选定在上游引物 JEF 5'端加上 *EcoR* I 酶切位点和在下游引物 JER 5'端加上 *Hind* III 酶切位点,PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后可直接插入到经相同酶切载体 pET32a 和 pET-His 的多克隆位点区,分别形成 pET32a、pET-His 和 *MaCB* 的重组质粒。引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 引物序列

Tab. 1 Oligonucleotide primers in different experiment

引物类别 primer function	引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence
简并引物 degenerate primer	DJF	AYYTKACYRTKGCWAYCAT
	DJR	YCKSARGAARTGHARVGGDAGVGG
3'RACE 特异引物 specific primer for 3'RACE	J3F	ACAGATTTCTCCAGACCCAG
5'RACE 特异引物 specific primer for 5'RACE	J5R	ATTTTTCGGATCTCTGCCTTTG
半定量引物 semi-quantitative primer	JF	TTTGAGGGAGTTGGAGGA
	JR	TTCCATACTCTGGCAAGC
蛋白表达引物 protein expression primer	JEF	CGGAATTCATGGCTTTGAGGACGTCTAGTCAC
	JER	CCCAAGCTTTCATGCATACTGTGCACTTTTCTCT

### 1.3 实验方法

**cDNA 模板的合成** 提取新鲜卵巢组织总 RNA,分别制备简并引物扩增及 3'端、5'端 RACE 所需要的模板。参照 Fermentas 公司 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 获得简并引物所需的 cDNA 模板。通过 BD SMARTTM RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)获得 3'RACE 和 5'RACE 所需的模板。

***cyclin B* cDNA 克隆** 根据设计的简并引物,以稀释至 1/10 浓度的卵巢 cDNA 为模板进行中间片段的 PCR 扩增。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳回收纯化,连接至 pMD19-T(TaKaRa)载体,转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ ,菌落 PCR 鉴定阳性克隆并测序,从而获得该基因部分 cDNA 序列。利用试剂盒提供的外引物和内引物与根据 *cyclin B* 部分 cDNA 序列所设计的引物进行半巢式 PCR。通过上述相同步骤获得该基因全长 cDNA 序列。

***cyclin B* 基因在不同组织中差异表达** 分别制备近缘新对虾 7 个不同组织(鳃、眼柄神经节、卵巢、肝胰腺、肌肉、胸神经节和心脏)的 cDNA 模板,调整至合适的模板量以 JF 与 JR 为特异性引物进行半定量 RT-PCR 3 次重复试验,

以  $\beta$ -actin 为内参。反应程序为 94  $^{\circ}$ C 3 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,52  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。全部产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 2 000 bp DNA marker 作为标准分子质量对照,凝胶成像系统观察及拍照。

**数据处理** 将测得的序列用 Mega 软件进行拼接得到全长 cDNA 序列,利用 NCBI 数据库 BLAST 程序进行验证<sup>[8]</sup>。采用 Clustal X 与 MEGA 软件<sup>[9]</sup>对序列进行同源性的分析,并采用邻位相接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。蛋白性质参数通过 ProtParam 相应程序完成(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)。利用 SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)寻找 *cyclin B* 信号肽,NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)寻找 *cyclin B* 磷酸化位点。

*cyclin B* 基因的扩增和原核表达载体的构建以 JEF 和 JER 为引物,“*cyclin B* 基因在不同组织中差异表达”中提到的模板和方法获得带有双酶切位点的 ORF 序列。将 PCR 产物回收、纯化后,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切,以得到具有粘性末端的表达序列。提纯的两种载体质粒也经过同样的处理,得到具有相同粘性末端的线性物质

粒。酶切后 PCR 片段分别与线性化质粒 pET32a 和 pET-His 连接并转化 *E. coli* 感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。以 DEF 和 DER 为引物,按前述方法用菌落 PCR 鉴定阳性克隆,并测序。将经测序鉴定正确的重组质粒重新转化到表达菌株 *E. coli* Rosetta 中,菌落 PCR 鉴定阳性克隆。

重组质粒的诱导表达及表达条件的优化 挑选带有重组质粒的表达菌株的单菌落,接种在 5 mL 的含氨苄(氨苄青霉素 100  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 培养过夜;次日,以 1:100 的比例扩大培养,至 OD<sub>600</sub> 介于 0.4~0.6,加入 IPTG 诱导表达。同时设置未诱导的菌液为阴性对照。

IPTG 诱导浓度为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 mmol/L 4 个梯度,在 25  $^{\circ}$ C 下诱导,于 2~6 h 收集菌体检测,以确定最佳诱导剂浓度和诱导时间。大量诱导表达的菌液经 8 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 30 min, Lysis Buffer (50 mmol/L Tris pH8.0, 500 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 20 mmol/L 咪唑, 5 mmol/L  $\beta$ -ME, 1 mmol/L PMSF) 重悬菌液后在冰浴中超声破碎,20 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 30 min。

对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

重组蛋白的纯化 使用 Novagen 公司的 Ni-NTA His. Bind Resin 进行目的蛋白亲和纯化,50、100、200 和 500 mmol/L 咪唑依次洗脱,收集洗脱液,SDS-PAGE 电泳检测后对含目的蛋白洗脱组分进行透析并于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 *cyclin B* 序列分析

实验利用简并引物 DJF 和 DJR,以近缘新对虾卵巢 cDNA 为模板克隆得到一个部分 cDNA 序列,测序后在 GenBank 数据库中进行比对,发现该序列与十足目甲壳动物的 *cyclin B* 序列显示了较高的相似性,基本确认为 *MaCB* 基因序列。根据所获得的部分 cDNA 序列设计引物进行 RACE 扩增,最后拼接得到长度为 1 667 bp 全长 cDNA 序列。ORF 检索发现,该序列由 1 209 bp 编码区、111 bp 的 5' UTR 区域和 347 bp 的 3' UTR 区域组成。3' UTR 区域含有典型的加尾信号 AATAAA 和 10 bp 的 poly A 尾(图 1)。BLAST 检验得出, *cyclin B*

```

CTGATGATCAGTCGATGGAAAAGTCCGAGCTTAAA36
CCGAGAGAGAGAGGACCTACATTTACGCTCTTAGAAGCC111
ATGGCTTTGAGGACGCTAGTCATCTTAACATCGAGCATGAC186
M A L R T S S H L N I E H D L N N P R K V E A K M25
ATCCAGGGGCCAACTTTGAGGCGCGCTGCCCTGGGGGATG261
I Q G P T L R R A A L G D V G N R S I P V H G P K50
GTTCCCTGAAGCCGGGCGACCTCTCCAGGAAGACTACGGA336
V P L K P G D L S R K A T T E Q I Q P L K A K T G75
TCCAGTCTTTGTCAAGATCTGACAAGGAAATGTAAGCCCT411
S S L L S R S D K E N V K P L K E V V E H E E Q M100
GATGTGGAAAGGGAGATGAAAGTGGAGCAGCTGGCAATT486
D V E G E M K V E Q L A I A F S T Q R L N V E G I125
GATGCACAGGATAGTGACAACCCCTCAACTGGTATCTGAA561
D A Q D S D N P Q L V S E Y V N D I Y N Y L R E L150
GAGGAAGCCAAACCGTAAAGCTAGATACCTGGAAGGCCA636
E E A N Q V K P R Y L E G Q V I T G K M R T I L I175
GATTGGCTTGTCCAAGTGCACCTTCGCTTCACATTAAG711
D W L V Q V H L R F T L L Q E T L Y L T V A I I D786
AGATTCTCCAGACCCAGAGAGATGTACCTCGTAATAAGC861
R F L Q T Q R D V P R N K L Q L V G I T A M F I A936
AGCAAGTATGAAGAGATGTACTGCCAGAAATGGGGACT1011
S K Y E E M Y C P E I G D F A Y I T D K A Y S K A1086
GAGATCCGAAATGGAAGTACCATGCTGAAATGCTGAGCT1161
E I R K N E V T M L K M L S F N V S F P L P L H F1236
CTGGGAGAAATAGCAAAGCTGGTTGGTTGATGCTTCTCA1311
L R R N S K A G S V D A S Q H T L A K Y L M E L C1386
TTGCCAGAGTATGGAATGTGCCACTACAATGCTCATGAT1461
L P E Y G M C H Y K S S M I A A A A L C L S L K L1536
CTGGATGGTAACTGGAGTGATACATGACCTTTTATCTCG1611
L D G N T W S D T L T F Y S R Y T E D Q L M P V I1667
TGCAAGATGGCTGAGTTGTAGTCAAGAGCAGTACAGCAA1667
C K M A A V V V K S S T A K Q Q A V R Q K Y K A S1667
AAACTGATGAAGATCAGCGAGATCCCCAGCTGAAATCC1667
K L M K I S E I P Q L K S R L I T S L A E K S A Q1667
TATGATGAGATTGTCATCGTGTAAACGTTTGTACATAG1667
Y A *
AGGTGCCAGATTTTGAAGTCTGGCTTAGAATAGTACAAC1667
TCTGGGTTAGGATATTTTAAACAACCCAGGACAGTGT1667
AGATTGAATCTGGAAAGGATTTCTTAATATATAAATGG1667
TAGTGCTATATGATTTCCAATAAATAACAGTATTATCA1667

```

图 1 *MaCB* 基因 cDNA 以及推导的氨基酸序列

第一个氨基酸所对应的是起始密码子; \* 代表终止密码子; 方框所示为加尾信号; 实线所示为简并引物结合位点; 虚线所示为 RACE 引物结合位点。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *M. affinis cyclin B*

The initiator codon was corresponded to the first amino acid in this figure and the terminator codon was indicated by an asterisk. The polyadenylation signal was enclosed in a box. The binding sites of degenerate primers and RACE primers were underlined by solid lines and dashed line respectively.

cDNA 全序列与刀额新对虾、斑节对虾有较高的相似性(达 90%),基本确定该序列为 *MaCB* 基因序列。获得的序列共编码 402 个氨基酸,该蛋白平均分子量为 45.6 ku,理论 pI 为 8.92,分子式 C2024H3285N551O599S21。预测不稳定系数为 43.49,因此该蛋白归类为不稳定蛋白。SingnlaP 3.0 分析 *MaCB* 没有发现信号肽。NetPhos 2.0 分析发现 8 个磷酸化位点。BLAST 分析后发现 *MaCB* 存在一个高度保守区域和一个单拷贝的周期蛋白框,周期蛋白框存在 2 个激酶结合位点,并且高度保守区域属于 *cyclin B* 超家族,定位在周期蛋白框的折叠区域。

## 2.2 *Cyclin B* 的同源性和进化树分析

选取目前 NCBI 上已知的十足目甲壳动物的同源氨基酸序列进行序列比对和系统进化分析。

比对结果显示,周期蛋白框和蛋白激酶 A (protein kinase A, pkA) 位点 (FLRRXSK) 都是高度保守的,周期蛋白破坏框 (cyclin destruction box, CDB) 保守性却很低。近缘新对虾 CDB 中异亮氨酸 (I) 被替换成缬氨酸 (V),CDB 被更改为 RXALGXVXN。

通过 NCBI 蛋白质保守区域寻找, *Cyclin B* 氨基酸序列具有较高的保守性。*MaCB* 与刀额新对虾的同源性达 90%,与哺乳动物 *Cyclin B* 的同源性有达 50%。比对结果通过邻位相接法绘制 *cyclin B* 的系统进化树,置信度检验 1 000 次。获得的进化树由两个主要分支组成,一支包括 *Cyclin B1*、*Cyclin B2* 和单型 *Cyclin B*,另一支包括 *Cyclin B3* (图 2)。

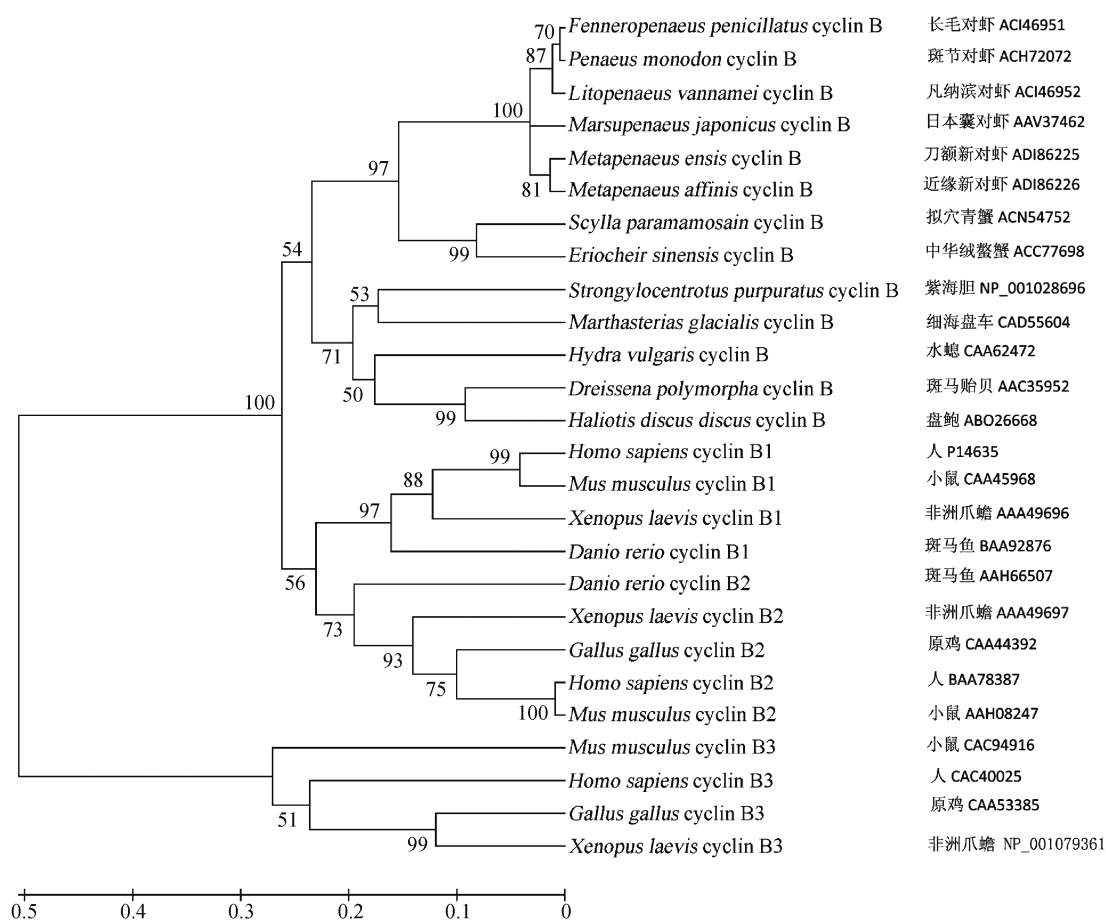


图 2 基于 NJ 法构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogram based on NJ method

## 2.3 *cyclin B* 基因在不同组织中的表达

半定量 RT-PCR 方法研究 *MaCB* 基因在不同组织(鳃、眼柄神经节、胸神经节、卵巢、肝胰腺、

肌肉和心脏)的表达情况,发现 *MaCB* 基因在卵巢和肌肉中表达水平最高,胸神经节和心脏次之,鳃、眼柄神经节、肝胰腺中几乎没有表达(图 3)。

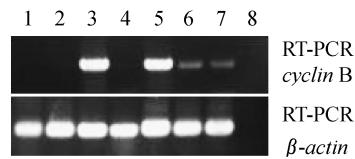


图3 *MaCB* 基因的 RT-PCR 检测

1. 鳃; 2. 眼柄神经节; 3. 卵巢; 4. 肝胰腺; 5. 肌肉; 6. 胸神经节; 7. 心脏; 8. 空白对照。

Fig.3 Expression of *cyclin B* mRNA from *M. affinis*

1. gill; 2. eyestalk; 3. ovary; 4. hepatopancreas; 5. muscle; 6. thoracic ganglion; 7. heart; 8. control.

#### 2.4 Cyclin B 蛋白重组表达载体的鉴定

以 JEF 和 JER 为引物所扩增的序列,测序后经 BLAST 比为正确的 *MaCB* 的 ORF 序列,并包含 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切位点与预期结果相符

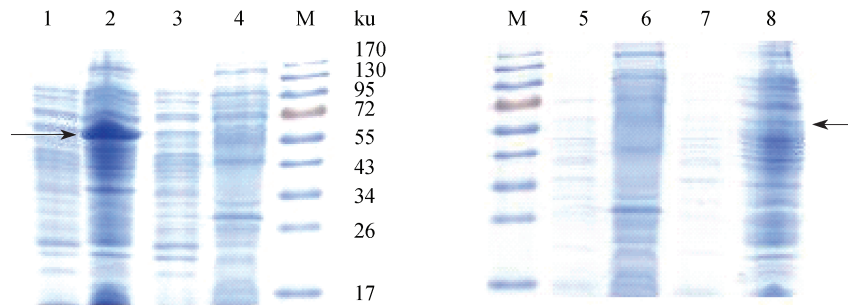


图4 *MaCB* 重组蛋白的表达分析

1~4. 32a-*MaCB* 诱导裂解后上清和沉淀及未诱导裂解后上清和沉淀; M. 标准蛋白分子量; 5~8. His-*MaCB* 未诱导裂解后上清和沉淀和诱导裂解后上清和沉淀; 箭头示目的蛋白。

Fig.4 Expression analysis of recombinant protein *MaCB*

1~4. supernatant and precipitation of induced and uninduced 32a-*MaCB*; M. protein marker; 5~8. supernatant and precipitation of uninduced and induced His-*MaCB*; arrow indicates target protein.

在 25 °C (Rosetta 在该温度条件下目的蛋白表达量较高)条件下,通过调节 IPTG 诱导浓度和诱导时间,对 *MaCB* 的表达条件进行了优化。发现,0.1 mmol/L IPTG 诱导下的两种重组蛋白表达量明显低于其他组。其余浓度的 IPTG 对重组蛋白的表达几乎没有显著的影响。0.2 mmol/L IPTG 诱导下,对不同诱导时间下重组蛋白的研究显示,重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加,但当诱导时间超过 3 h (His-*MaCB*) 和 4 h (32a-*MaCB*),重组蛋白的表达量不再增加(图 5,图 6)。因此,最终确定 32a-*MaCB* 重组蛋白最佳诱导表达条件为:0.2 mmol/L IPTG、25 °C 诱导 4 h(图 5);His-*MaCB* 重组蛋白最佳诱导表达条件为:0.2 mmol/L IPTG、25 °C 诱导 3 h(图 6);对比发现 32a-*MaCB* 在不同诱导剂浓度及诱导时间的

合。将其分别转至表达载体 pET32a 和 pET-His 中形成重组质粒。进一步测序分析证明,目的片段按正确的方向成功插入表达载体 pET32a 和 pET-His 中,用于表达的重组质粒的序列完全正确。将重组质粒分别命名为 32a-*MaCB* 和 His-*MaCB*。

#### 2.5 Cyclin B 重组蛋白在大肠杆菌中的表达及表达条件优化

收集的菌液经超声破碎,分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。与未诱导的菌液相比,经 IPTG 诱导后,不同表达载体的菌体沉淀分别在 67 和 47 ku 处出现 1 条明显加粗的条带,而上清则无显著变化,表明重组蛋白主要以包涵体的形式存在(图 4)。

表达量均高于相应条件下的 His-*MaCB*。因此,合适的表达载体是 pET32a。

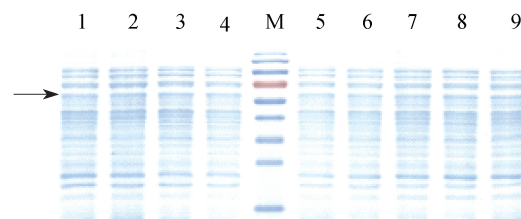
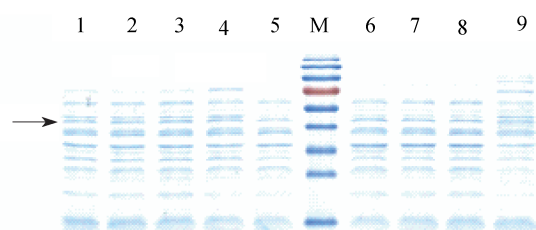


图5 32a-*MaCB* 重组蛋白诱导表达条件优化

优化 IPTG 浓度 1~4. 1.0、0.5、0.2、0.1 mmol/L; 优化诱导时间 5~9. 2、3、4、5、6 h; M. 标准蛋白分子量。

Fig.5 Optimizing induction conditions of recombinant protein 32a-*MaCB*

Optimization of IPTG concentration 1~4. 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 mmol/L; time course expression of recombinant protein 5~9. 2, 3, 4, 5, 6 h; M. protein marker.



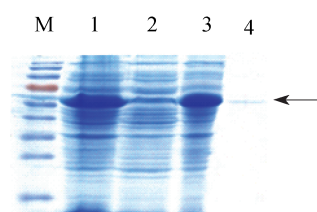
**图 6 His-MaCB 重组蛋白诱导表达条件优化**  
优化诱导时间 1~5、6、5、4、3、2 h; 优化 IPTG 浓度 6~9、1.0、0.5、0.2、0.1 mmol/L; M: 标准蛋白分子量。

**Fig. 6 Optimizing induction conditions of recombinant protein His-MaCB**

Time course expression of recombinant protein 1~5、6、5、4、3、2 h; optimization of IPTG concentration 6~9、1.0、0.5、0.2、0.1 mmol/L; M: protein marker.

## 2.6 Cyclin B 重组蛋白的纯化

由于 pET32a 表达载体融合 6 个 His 标签, 利用亲和层析原理纯化重组蛋白。在 20 mmol/L 咪唑的 Wash Buffer 洗脱杂蛋白后, 在以 3 倍柱体积分含 200 mmol/L 咪唑的 Elute Buffer 洗脱后并进行透析, 得到了良好的纯化效果(图 7)。超滤后获得 2.4 mL 蛋白浓缩液, Bradford 法测定蛋白浓度为 0.11 mg/mL。从而推算重组蛋白的含量, 500 mL 菌液可获得 0.26 mg 该蛋白。



**图 7 纯化后的重组蛋白分析**

1. 32a-MaCB 全蛋白; 2. 裂解后上清液; 3. 裂解后沉淀; 4. 亲和层析纯化的重组蛋白; M: 标准蛋白分子量。

**Fig. 7 Analysis of purified recombinant protein**

1. recombinant protein of 32a-MaCB; 2. supernatant; 3. precipitation; 4. purified recombinant protein by affinity chromatography; M: protein marker.

## 3 讨论

实验利用获得的 *cyclin B* 部分 cDNA 序列, 采用 RACE 技术首次克隆了 *MaCB* 基因。该基因全长 1 681 bp (GenBank 登录号: HM113467), 包括 1 215 bp, 编码 404 个氨基酸的开放阅读框。所推导的氨基酸序列 N 端不存在信号肽。在 3' UTR 中只找到一个加尾信号 (AATAAA), 这与

已报道的斑节对虾<sup>[4]</sup>和中华绒螯蟹<sup>[5]</sup> *cyclin B* 相似。但日本囊对虾 3' UTR 中存在 3 种 *cyclin B* 变异体, 这些变异体是由可变聚腺苷酸化位点产生的<sup>[6]</sup>。

*cyclin B* 存在 3 个标志性的结构, 包括周期蛋白框、CDB 和 pK 位点。本实验获得的 *MaCB* 的周期蛋白框和 pK 与其它物种具有很高的保守性(图 2), 但 CDB 的保守性却很低, 存在氨基酸替换(异亮氨酸被替换成缬氨酸)。

已报道的脊椎动物中, Cyclin B 至少存在 3 种亚型 (Cyclin B1、B2、B3), 包括人、鼠、鸟、蛙、鱼<sup>[10-16]</sup>。从系统树可以看出 Cyclin B 由分成 2 支组成, 一支包括 Cyclin B1、Cyclin B2 和单型 Cyclin B, 另一支包括 Cyclin B3。与单型的 Cyclin B 相比, Cyclin B1 和 Cyclin B2 在脊椎动物中紧密相连。十足目甲壳动物的 Cyclin B 聚类在一起构成另一个亚支, 基本上能反映出各物种间的进化关系。

半定量 RT-PCR 方法研究表明, *MaCB* 基因表达具有明显的组织特异性, 在卵巢和肌肉中表达水平最高, 胸神经节和心脏次之, 鳃、眼柄神经节、肝胰腺几乎没有表达。该差异性推测主要与 *cyclin B* 在细胞周期中调控细胞分裂的功能有关。不同组织表达显示, 卵巢中 *cyclin B* 的大量表达, 表明该基因可能与卵巢内卵原细胞的增生和卵母细胞的形成有关。有关中华绒螯蟹的研究表明, *cyclin B* 基因可能与卵原细胞增殖和卵母细胞减数分裂成熟存在密切关系<sup>[5]</sup>。肌细胞是终末特化细胞, 不再进行细胞分裂。但本研究中肌肉 *cyclin B* 的也大量表达, 其原因尚待进一步分析。*cyclin B* 在细胞周期中有重要的调控作用, 一般从 G1 期晚期开始表达并逐渐积累, 到 G2 期后期阶段出现最大表达量, 并一直持续到 M 期的中期阶段, 然后迅速降解<sup>[17-18]</sup>。近缘新对虾表达的差异性可能反映了不同组织所处的生理状态不同。

对 *MaCB* 基因进行原核表达研究, *MaCB* 蛋白主要以包涵体的形式存在, 这与中华绒螯蟹的研究结果相同<sup>[19]</sup>。为了获得大量的重组蛋白, 本实验从表达载体、诱导剂浓度和诱导时间 3 个方面优化表达条件。重组蛋白经表达条件优化后, 表明合适的表达载体是 pET32a; 考虑到高浓度的 IPTG 可能影响大肠杆菌的生长, 所以选择 0.2

mmol/L IPTG。在最适表达条件下,经镍琼脂糖凝胶预成柱纯化重组蛋白,得到纯度较高的融合蛋白,拟用于后续相关实验。

本实验结果为进一步开展近缘新对虾卵巢发育过程中 *cyclin B* 的时空表达,抗体制备等研究奠定基础。探索 *cyclin B* 与卵原细胞增殖和卵母细胞减数分裂的关系,有助于从分子水平阐明该物种卵母细胞成熟过程的机制。

#### 参考文献:

- [1] Masui Y, Markert C L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1971, 177(2):129-145.
- [2] Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase[J]. *Nature*, 1990, 344(6266):503-508.
- [3] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000:395-404.
- [4] Qiu L, Jiang S G, Zhou F L, et al. Molecular cloning and characterization of a cyclin B gene on the ovarian maturation stage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2007, 34:1-8.
- [5] 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.
- [6] 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 Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 141(2):186-195.
- [7] 房君江. 中华绒螯蟹、罗氏沼虾 Cyclin B 基因 cDNA 克隆及其在卵子发生过程中表达分析[D]. 上海:上海海洋大学,2008.
- [8] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17):3389-3402.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [10] Jackman M, Firth M, Pines J. Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures; B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus [J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(8):1646-1654.
- [11] Ihara J, Yoshida N, Tanaka T, et al. Either cyclin B1 or B2 is necessary and sufficient for inducing germinal vesicle breakdown during frog (*Rana japonica*) oocyte maturation [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1998, 50(4):499-509.
- [12] Minshull J, Blow J J, Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis [J]. *Cell*, 1989, 56(6):947-956.
- [13] Chapman D L, Wolgemuth D J. Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1992, 33(3):259-269.
- [14] Chapman D L, Wolgemuth D J. Isolation of the murine cyclin B2 cDNA and characterization of the lineage and temporal specificity of expression of the B1 and B2 cyclins during oogenesis, spermatogenesis and early embryogenesis [J]. *Development*, 1993, 118:229-240.
- [15] Gallant P, Nigg E A. Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B- type cyclins [J]. *The EMBO Journal*, 1994, 13(3):595-605.
- [16] MacLachlan T K, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer [J]. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 1995, 5(2):127-156.
- [17] Piaggio G, Farina A, Perrotti D, et al. Structure and growth-dependent regulation of the human cyclin B1 promoter [J]. *Experimental Cell Research*, 1995, 216(2):396-402.
- [18] Müller R. Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle [J]. *Trends in Genetics*, 1995, 11(5):173-178.

## Molecular cloning and prokaryotic expression of *cyclin B* from shrimp *Metapenaeus affinis*

YANG Yanan, HUANG Huiyang, HUANG Xiaoshuai, YE Haihui\* , LI Shaojing

( College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China )

**Abstract:** *Cyclin B* gene was cloned from shrimp *Metapenaeus affinis* using RACE. The results showed that the full-length cDNA of *cyclin B* gene is 1 667 bp, including 1 209 bp coding sequence, the open reading frame encodes a putative peptide of 402 amino acid. The encoded protein does not contain signal peptides in this sequence. BLAST search has shown that the deduced peptide shared 90% sequence identity with that of *Metapenaeus ensis*. Gene expression profiling by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) demonstrated that *cyclin B* expression levels are the highest in ovary and muscle, then in thoracic ganglion and heart, but almost no expression in gill, hepatopancreas and eyestalk. The results suggest that *cyclin B* expression levels may relate to its function as a regulator of cell division during cell cycle. Result of prokaryotic expression showed that, the recombinant protein was expressed with expression plasmid pET32a. At last we got a high quantity of recombinant protein (67 ku) in the optimum induction conditions, when the concentration of IPTG was 0.2 mmol/L for 4 h at 25 °C for 32a-MaCB.

**Key words:** *Metapenaeus affinis*; *cyclin B*; gene cloning; prokaryotic expression

**Corresponding author:** YE Haihui. E-mail: haihuiye@xum.edu.cn