

雌核发育二倍体鲫鱼及其他倍性鱼 *cdc2* 基因 cDNA 全序列克隆及表达

陶 敏, 刘少军*, 钟 欢, 周 毅, 宋 灿, 张 纯, 刘 筠
(湖南师范大学生命科学学院, 教育部蛋白质化学与发育生物学重点实验室, 湖南 长沙 410081)

摘要: 为研究雌核发育二倍体鲫鱼产生二倍体卵子的分子机制, 实验采用 PCR 和 cDNA 末端快速分离法, 克隆获得了雌核发育二倍体鲫鱼第三代(G_3)、二倍体红鲫、三倍体湘云鲫和四倍体鲫鱼的细胞周期相关基因——*cdc2* 基因 cDNA 全序列。结果显示, 4 种不同倍性鱼 *cdc2* 基因均编码含有 302 个氨基酸蛋白, 而且编码的蛋白都含有与其他 CDK 激酶相当保守的序列 PSTAVRE; 同源性分析发现, 4 种鱼 *cdc2* 基因编码的氨基酸序列之间的相似度大于 97.6%, 说明 Cdc2 蛋白在这 4 种不同倍性鱼中具有高度保守性。采用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 对 *cdc2* 基因在 G_3 、二倍体红鲫、三倍体湘云鲫及四倍体鲫鱼早期卵巢中的表达进行分析, 结果发现, G_3 *cdc2* 基因比普通二倍体红鲫和三倍体湘云鲫表达要高, 比四倍体鲫鱼的表达水平低。该研究从分子水平证明了 G_3 早期性腺中存在着大量的多倍体卵原细胞。同时, 研究表明, *cdc2* 基因在雌核发育二倍体鲫鱼早期卵巢的高表达暗示着 G_3 多次进入 S 期却不经 M 期导致二倍体配子的产生。

关键词: 雌核发育二倍体鲫鱼; *cdc2* 基因; 早期卵巢; 二倍体卵子; 细胞周期

中图分类号: Q 781; S 917.4

文献标志码: A

在红鲫 (*Carassius auratus red var.*) (♀) × 湘江野鲤 (*Cyprinus carpio L.*) (♂) 中发现部分可育后代, 它们自交获得二倍体 $F_2^{[1]}$, 部分 F_2 能产生二倍体卵子和二倍体精子, 它们受精后在 F_3 中形成了两性可育的异源四倍体鲫鱼 (4nAT), 该异源四倍体鲫鱼 F_3 交配形成了 F_4 , 经过连续繁殖, 目前已繁殖到了 F_{22} , 形成了一个四倍体性能代代相传, 遗传性状稳定的四倍体鱼新种群 ($F_3 \sim F_{22}$), 这是世界上在鱼类乃至脊椎动物中人工培育的首例两性可育异源四倍体鱼类^[2-3]。雌性四倍体鲫鱼产生的二倍体卵子具有 2 套染色体, 用灭活的散鳞镜鲤 (scattered mirror carp) 精子激活四倍体鲫鱼 ($F_8 \sim F_{10}$) 产生的二倍体卵子进行雌核发育, 在没有染色体加倍处理情况下, 该二倍体卵子发育为二倍体雌核发育鲫鱼第一代 ($2n = 100, G_1$)。与鲫鱼 F_2 相似, G_1 也能产生不减数的

二倍体卵子, 这些二倍体卵子经灭活精子诱导, 无需染色体加倍处理, 发育成为二倍体雌核发育鲫鱼第二代 ($2n = 100, G_2$)。通过相同的方法获得了 G_3, G_4, G_5 和 G_6 。这样就建立了一个二倍体雌核发育鲫鱼克隆品系 ($G_1 \sim G_6, 2n = 100$)^[4-5]。二倍体雌核发育鲫鱼克隆品系的建立为研究二倍体杂交鱼产生二倍体卵子提供了很好的平台。

二倍体杂交鱼产生不减数的二倍体配子是演化形成杂交四倍体鱼的关键因素。不减数配子的形成与生殖细胞的核内复制或核内有丝分裂或生殖细胞融合有关^[6-8]。核内复制是指细胞多次进入 S 期而没有进入有丝分裂阶段和经历细胞质分裂, 这主要是由于细胞进入有丝分裂前被阻止在 G_2 期。核内复制将导致具有特大核的细胞产生, 其主要特征是 MPF 失活及 S 期 CDKs 激酶活性呈周期性振荡^[6,9]。已有的研究表明, 脊椎动物

收稿日期:2012-07-02 修回日期:2012-10-04

资助项目:国家自然科学基金青年基金项目(31001105);湖南省自然科学基金青年基金项目(10JJ4018);淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金(2011FB15);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(优先发展领域)(20114306130001)

通信作者:刘少军, E-mail:lsj@hunnu.edu.cn

中 *cdc2* 基因的产物 Cdc2 与细胞周期蛋白 B 结合形成 MPF 并协同启动 G₂ 期向 M 期的过渡^[9];而且 Cdc2 蛋白即 CDK 激酶和细胞周期蛋白 A 在 S 期复制及 M 早期染色体凝集也具有较为重要的作用^[9-10]。我们已经对雌核发育二倍体鲫鲤生殖细胞的染色体行为^[11-12]及其受精生物学^[5]进行了观察,初步获得了二倍体配子产生的细胞生物学证据,证明其早期生殖细胞存在着大量的多倍体卵原细胞。因此,本实验将对二倍体红鲫、三倍体湘云鲫、四倍体鲫鲤及雌核发育二倍体鲫鲤第三代(G₃)的 *cdc2* 基因 cDNA 全序列进行克隆,并对 *cdc2* 基因在不同倍性鱼的早期卵巢表达差异进行研究,旨在寻找细胞周期相关基因与二倍体配子产生的关联性,为雌核发育二倍体鲫鲤二倍体配子的产生提供一定的分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼均取自湖南师范大学教育部多倍体鱼繁殖及育种技术工程研究中心,为池养健康的 G₃ (2*n* = 100)、红鲫(♀, 2*n* = 100)、三倍体湘云鲫(♀, 3*n* = 150)和异源四倍体鲫鲤(♀, 4*n* = 200)。将其卵巢取出并剪成小块, -80 °C 保存备用。根据组织切片观察表明不同倍性鱼所取卵巢处于 I 期,性腺中充满了卵原细胞和极少数的初级卵母

细胞。

1.2 RNA 的分离和 cDNA 第一条链的获得

每种不同倍性鱼随机各取 6 条,按照 Promega 总 RNA 提取试剂盒 (RNAagents Total RNA Isolation System) 分别从其性腺中提取总 RNA,将提取的总 RNA 沉淀溶解于无核酸酶的水中,然后在 -70 °C 下保存备用。

以总 RNA 为模板, oligo (dT₁₂₋₁₈) Primer 为引物, Promega 的逆转录酶 70 °C 作用 5 min, 42 °C 作用 60 min 以合成第一条链 cDNA。

1.3 雌核发育二倍体鲫鲤 *cdc2* 基因编码区中间片段的克隆

根据斑马鱼 (*Danio rerio*)、金鱼 (*Carassius auratus*) 和日本青鳉 (*Oryzias latipes*) *cdc2* 基因 cDNA 的保守序列设计的简并引物(表 1),已经获得了二倍体红鲫、三倍体湘云鲫以及四倍体鲫鲤 *cdc2* 基因编码区中间片段 651 bp^[13]。在此基础上,利用该简并引物通过 PCR 扩增获得了雌核发育二倍体鲫鲤 *cdc2* 基因编码区中间片段。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测到目的片段,继而将反应体系扩大,进行回收纯化。

将回收的 DNA 片段克隆于 pMD18-T 载体。连接反应及细菌转化均按 pMD18-T 载体试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书进行操作。通过菌液 PCR 及限制性酶切鉴定为阳性重组质粒克隆后,送上海生物工程公司测序。

表 1 实验所使用的引物
Tab. 1 Primers used for this study

| 引物名称 primer name | 引物序列(5'-3') primer sequence | 用途 usage |
|------------------------|--|---------------|
| cdc2-1 | CCTGCT(G/A)GATGT(A/G)(T/C)TGATGC | 扩增中间片段 |
| cdc2-2 | ATTGCTTG(C/T)CGTGC(C/T)GA(G/A)AT | 扩增中间片段 |
| 3'sites Adaptor Primer | 5'CTGATCTAGAGGTACCGGATCC3' | 3'-RACE |
| Z1 Primer | 5'GGGATTCTGTTCTGCCACTG 3' | 3'-RACE |
| Z2 Primer | 5'GAAAAACCTGGACAAGAACGG 3' | 3'-RACE |
| SMART II™ A | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3' | 5'-RACE |
| 5'-RACE CDS Primer A | 5'-(T)25V N-3'(N = A, C, G, or T; V = A, G, or C) | 5'-RACE |
| UPM Primer(Mix) | 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'(long) 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'(short) | 5'-RACE |
| NUP Primer | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' | 5'-RACE |
| GSP1 Primer | 5'-GGTCAATGCCGTTCTTGTCCAGGTTT-3' | 5'-RACE |
| GSP2 Primer | 5'-GAATAACGTGAGGCTCCCAGCAAGAC-3' | 5'-RACE |
| cdc2-S(R) ₁ | 5'CAGCACGACAAGCAATGACA 3' | real-time PCR |
| cdc2-A(R) ₁ | 5'CACCCAATAAACAAGTGAGCAAAA 3' | real-time PCR |
| β2(+) | 5'TCCCTTGCTCCTTCCACCA3' | 内参基因引物 |
| β2(-) | 5'GGAAGGGCCAGACTCATCGTA3' | 内参基因引物 |

1.4 cDNA 的末端分离

3'末端的扩增 根据已克隆的 *cdc2* 基因部分 cDNA 序列合成特异 3'-RACE 正向引物 Z1 和 Z2(表 1)。首先以 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 中的 oligo dT-3sites Adaptor Primer 为引物进行反转录反应,然后用另外两对引物进行套式 PCR。第一次 PCR 用 3'sites Adaptor Primer 和 Z1 扩增;第二次 PCR 用 3'sites Adaptor Primer 和 Z2 扩增。

5'末端的扩增 使用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit(Clonetech 公司)对不同倍性鱼 *cdc2* 基因的 5'末端进行分离。根据已克隆的 *cdc2* 部分 cDNA 序列和 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 要求,用 Primer Premier 5.0 软件、Jellyfish 1.4 软件设计了两个反向引物 GSP1 和 GSP2(表 1)。首先使用 SMART IITM A Oligonucleotide 和 5'-RACE CDS Primer A 引物(表 1),PowerScriptTM Reverse Transcriptase 进行反转录反应。然后用另外两对引物进行套式 PCR。第一次 PCR 用 UPM 和 GSP1 进行 PCR 扩增;第二次 PCR 用 NUP 和 GSP2 扩增(表 1)。

与“1.3”的克隆方法一样,通过对 3'-RACE 和 5'-RACE 的产物进行测序获得 4 种鱼 *cdc2* 基因的全长 cDNA 序列。

1.5 同源性分析

在 NCBI 的 GenBank 数据库中搜索脊椎动物 Cdc2 的蛋白质序列,选取了 7 种代表性脊椎动物的 Cdc2 氨基酸序列:金鱼(P51958),斑马鱼(NP_997729),日本青鲈(NP_001098309),吕宋青鲈(Q9DG98),非洲爪蟾(NP_001080093),小鼠(AAB09465),人(EAW54204)。

运用 DNASTAR 对“1.3”中获得 4 种鱼 *cdc2* 基因的全长 cDNA 序列进行分析,分别找到其开放阅读框,推导出相应的氨基酸序列。采用 EBI 提供的 Clustal W 在线服务(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)对这 4 种鱼与搜索的其他 7 个物种进行序列比对分析并人工校正。然后通过 MEGA 4.1^[14] 软件构件邻接系统进化树(Neighbour-Joining tree, NJ tree),同时采用 Bootstrap 重复检验 1 000 次该进化树的置信度。

1.6 *cdc2* 基因的表达分析

用 real-time PCR 的方法来研究 *cdc2* 基因(β -*actin* 基因作为 *cdc2* 基因的内参)在雌核发育二

倍体鲫(G_3)及其他不同倍性鱼早期卵巢中的转录水平。首先取 RNA 做反转录,反应体系为 25 μ L,选用的引物是 oligo(dT12-18) primer, AMV 反转录酶 5 U(Promega),并加入 DNase 以排除可能存在的 DNA 干扰。所用的特异引物 *cdc2*-S(R)1 和 *cdc2*-A(R)1 及 β -*actin* 基因引物见表 1。通过 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检测是否有非特异性条带扩增和确定最适合的退火温度。对每一种样品的分析都重复 3 次;定量 PCR 反应条件为 50 $^{\circ}$ C 2 min;95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,61 $^{\circ}$ C 45 s,40 个循环。同样参照 Livak 等^[15]提出的相对标准曲线法对相对定量的结果进行分析,得到 G_3 及其他不同倍性鱼 *cdc2* 基因的相对表达量图谱。用熔解曲线法来检测实时定量 PCR 的产物是否特异。

2 结果

2.1 *cdc2* 基因 cDNA 全长序列的克隆及分析

对扩增获得的雌核发育二倍体鲫 *cdc2* 基因编码区 650 bp 左右的片段进行测序,用 Jellyfish 软件和 NCBI 网址的 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对测序结果进行同源性分析。可知该片段大小为 651 bp,并且与已获得的二倍体红鲫、三倍体湘云鲫以及四倍体鲫 *cdc2* 基因编码区中间片段的序列相似度大于 95%,可推测是 *cdc2* 基因的同源基因。

分别对获得的 G_3 、二倍体红鲫、三倍体湘云鲫及四倍体鲫中 *cdc2* 基因的 5'-RACE 和 3'-RACE 产物进行测序,与之前扩增部分编码区序列拼接后可获得不同倍性鲫 *cdc2* 基因 cDNA 全长。其中 G_3 cDNA 全长 1 333 bp(GenBank 登录号:JX481170),二倍体红鲫 cDNA 全长 1 346 bp(GenBank 登录号:JX481173),三倍体湘云鲫 cDNA 全长为 1 303 bp(GenBank 登录号:JX481171),四倍体鲫 cDNA 全长为 1 334 bp(GenBank 登录号:JX481172)。并且分离的这 4 种鱼 *cdc2* 基因的开放阅读框都为 909 bp,编码 1 个含 302 个氨基酸的蛋白质。

2.2 同源性分析和分子进化树的构建

应用 Clustal W 软件进行的同源性分析表明,在所比较的 11 种动物中,Cdc2 氨基酸序列具有较高的同源性(图 1),其中任何两者的相似度都达到了 81% 以上,特别是 G_3 、红鲫、三倍体湘云

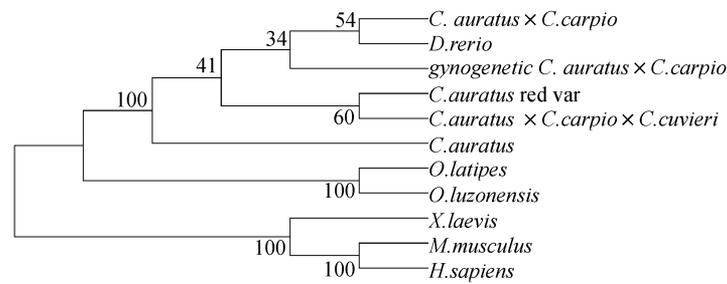


图 2 基于不同脊椎动物的 *Cdc2* 氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树

节点上的数字表示 bootstrap 的置信度。各序列在 GenBank 中的登录号分别为雌核发育二倍体鲫鲤, JX481170; 红鲫, JX481173; 三倍体湘云鲫, JX481171; 四倍体鲫鲤, JX481172; 金鱼, P51958; 斑马鱼, NP997729; 日本青鲮, NP001098309; 吕宋青鲮, Q9DG98; 非洲爪蟾, NP_001080093; 小鼠, AAB09465; 人, EAW54204。

Fig. 2 The phylogenetic tree generated by NJ method based on *Cdc2* in different species

Bootstrap values are indicated at nodes. GenBank accession numbers: gynogenetic *C. auratus* × *C. carpio*, JX481170; *C. auratus* red var., JX481173; *C. auratus* × *C. carpio* × *C. cuvieri*, JX481171; *C. auratus* × *C. carpio*, JX481172; *C. auratus*, P51958; *D. rerio*, NP997729; *O. latipes*, NP001098309; *O. luzonensis*, Q9DG98; *X. laevis*, NP_001080093; *M. musculus*, AAB09465; *H. sapiens*, EAW54204.

2.3 *cdc2* 基因的表达分析

溶解曲线和 PAGE 胶检测结果均显示扩增产物单一且大小符合预期设计。Real-time PCR 结果表明, *cdc2* 基因在二倍体红鲫、雌核发育二倍体鲫鲤(G_3)、三倍体和四倍体鱼性腺中的表达存在差异(图 3):以二倍体红鲫卵巢为参照(即假设二倍体卵巢的 *cdc2* mRNA 起始含量为 1), 雌核发育二倍体鲫鲤(G_3)、三倍体和四倍体鱼卵巢中的 mRNA 的相对拷贝数分别为 $10^{1.03}$ 、 $10^{0.87}$ 和 $10^{1.44}$ 。

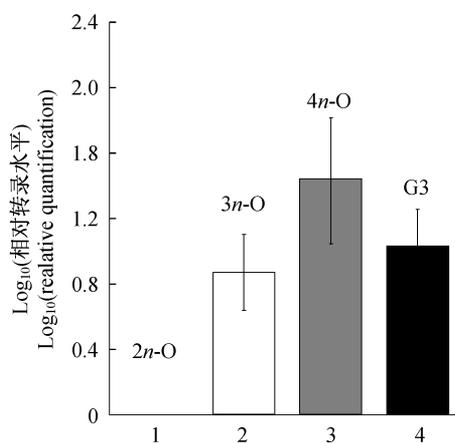


图 3 *cdc2* 基因在不同倍性鱼性腺中的 real-time PCR 结果

1. 二倍体红鲫卵巢; 2. 三倍体卵巢型; 3. 四倍体卵巢; 4. 雌核发育二倍体鲫鲤(G_3)卵巢。

Fig. 3 The expression of *cdc2* mRNA in different ploidy level fishes by real-time PCR

1. ovary of diploid red curcian carp; 2. ovary of triploids; 3. ovary of tetraploids; 4. ovary of G_3 .

3 讨论

在雌核发育二倍体鲫鲤的早期性腺中, 大部分卵原细胞通过减数分裂前的核内复制或核内有丝分裂或生殖细胞融合形成了 $4n$ 甚至 $8n$ 的细胞核^[4-5,11]。这些多倍体卵原细胞中大部分是 $4n$, 它们经历染色体加倍形成大量的 $4n$ 卵原细胞, 再经过正常的减数分裂就可以形成 $2n$ 的卵子。通过受精生物学^[5], 早期生殖细胞的染色体观察^[12,16] 和早期生殖细胞培养, 我们获得了不减数配子的产生机制的细胞生物学证据, 但是, 对不减数配子产生的分子机制研究甚少。Macauley 等^[8] 认为核内复制的发生与细胞分裂周期调控基因的功能直接相关。已有的研究表明, 脊椎动物中 *cdc2* 基因的产物 p34cdc2 (即 Cdc2) 与周期蛋白 B 结合形成 MPF 并协同启动 G_2 期向 M 期的过渡^[9]; 而且 Cdc2 蛋白即 CDK 激酶和细胞周期蛋白 A 在 S 期复制及 M 早期染色体凝集也具有较为重要的作用^[9]。当 p34^{cdc2} (CDK1)/CyclinB 未能达到细胞分裂的阈值^[9,17], 或者 *cdc2* 或者 *cyclinB* 基因在 RNA 水平或者蛋白水平的表达异常, 或者 Cdc2 和 CyclinB 蛋白的磷酸化或者去磷酸化发生紊乱时, 都有可能引起核内复制的发生。所以, 本实验对细胞周期调控的关键因子 Cdc2 的转录水平进行了研究。

本实验首次获得了二倍体红鲫、雌核发育二倍体鲫鲤、三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤的 *cdc2* cDNA 全序列。通过 Clustal W (1.83) 软件和

NCBI 网址的 BLAST 进行同源性分析,发现这 4 种鱼 *cdc2* 基因编码的氨基酸序列的同源性高达 97.6%,并且基于不同物种 *cdc2* 基因氨基酸序列构建的 NJ 系统进化树表明,这 4 种鱼类聚集在一起,Cdc2 蛋白在这 4 种不同倍性鱼中具有高度保守性。这 4 种不同倍性鱼 *cdc2* 基因均编码含有 302 个氨基酸蛋白,而且编码的蛋白都含有与其他 CDK 激酶相当保守的序列 PSTAVRE^[18],这段保守序列对于周期蛋白的结合十分重要。根据氨基酸序列的高度保守性和推导蛋白具有的 CDK 蛋白特殊的结构域,可以确定实验获得的正是不同倍性鲫鲤的 *cdc2* 基因,并且在功能上与其他物种具有很高的保守性。

已有研究证明,Cdc2 蛋白在 M 期早期使组蛋白 H₁ 上的特殊位点磷酸化,从而使染色体在螺线管基础上聚缩成更高级的结构,有促进染色体凝集并启动分裂的功能^[10]。二倍体红鲫、三倍体湘云鲫和四倍体鲫鲤染色体数目是成倍数增加的(分别为 100,150,200 条)。在之前的实验中发现,在不同倍性鱼的早期卵巢中,*cdc2* 基因的转录水平会随倍性的递增而依次升高^[13],这种现象可能与 Cdc2 蛋白凝集染色体的相应功能有关。当多倍体染色体凝集时,Cdc2 蛋白需要磷酸化的组蛋白数量及需要凝集的染色体数目会随之增加,我们推测多倍体合成比较多的 *cdc2* mRNA 模板是为了转译更多的 Cdc2 蛋白来参与染色体的凝集活动。在 G₃ 早期性腺中,*cdc2* 的表达水平并没有受到抑制,甚至比二倍体红鲫和三倍体湘云鲫的早期性腺的表达量都要高。如果 G₃ 像普通的二倍体一样,早期的性腺只含有 2n 的卵原细胞,那么两者的 *cdc2* 基因的表达量基本会一致,但实验结果表明,G₃ 的表达量比二倍体和三倍体要高,而比四倍体鱼表达量稍低。这从分子水平上表明 G₃ 早期性腺存在着大量的多倍体卵原细胞,但由于并不是所有的卵原细胞都发生了染色体加倍,G₃ 比四倍体鱼表达量稍低。

核内复制的发生和调控是由多种因素共同作用的结果^[9,17],因此,虽然 G₃ 中有 *cdc2* 基因的表达,若不能进行正常的磷酸化和去磷酸化^[19],或者 MPF 的调节亚基 *cyclinB* 基因表达异常,都会影响 G₂→M 的转化^[9,20-21]。其次,Cdc2 蛋白与 CylinA 结合成 SPF 复合体^[9,22-24](S phase-promoting factor,SPF,S 期启动因子),它能启动

细胞进入 S 期^[19]。我们推测雌核发育二倍体鲫鲤可能发生了核内复制即从 G₂ 末期或者 M 最早期跳跃 M 期进入 G₁ 期,然后再次进入 S 期,从而形成多倍体卵原细胞,所以 *cdc2* 基因的表达自然比只进行一次复制的二倍体红鲫要高。不过,有关 *cdc2* 基因在雌核发育二倍体鲫鲤早期卵原细胞表达情况与核内复制的关系有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘筠,周工健.红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究[J].水生生物学报,1986,10(2):101-108.
- [2] Liu S J, Liu Y, Zhou G J, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization [J]. Aquaculture, 2001, 192: 171-186.
- [3] Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, et al. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors [J]. Theriogenology, 2002, 57(4): 1229-1249.
- [4] Liu S J, Sun Y D, Zhang C, et al. Production of gynogenetic progeny from allotetraploid hybrids of red crucian carp × common carp [J]. Aquaculture, 2004, 236: 193-200.
- [5] Liu S J, Duan W, Tao M, et al. Establishment of the diploid gynogenetic hybrid clonal line of red crucian carp × common carp [J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2007, 50(2): 186-193.
- [6] Ullah Z, Lee C Y, DePamphilis M L. Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy [J]. Cell Division, 2009(4): 10.
- [7] Liu S J. Distant hybridization leads to different ploidy fishes [J]. Science China Series C: Life Sciences, 2010, 53(4): 416-425.
- [8] Macauley A, Cross J C, Werb Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells [J]. Molecular Biology Cell, 1998, 9(4): 795-807.
- [9] 杨蕾,赵云云,何奕昆.核内再复制分子机制研究进展[J].植物学通报,2004,21(3):280-287.
- [10] Labbe J C, Picard A, Peaucellier G, et al. Purification of MPF from starfish; identification as the histone H1 Kinase P34cdc2 and a possible role for its periodic activation [J]. Cell, 1989, 57(2): 253-263.
- [11] 张纯,孙远东,刘少军,等.二倍体雌核发育鱼产生二倍体卵子的证据[J].遗传学报,2005,32(2):

- 136 - 144.
- [12] 张纯,刘少军,孙远东,等. 远缘杂交形成的二倍体鱼和多倍体鱼生殖细胞染色体研究[J]. 分子细胞生物学报,2008,41(1):53 - 60.
- [13] 曾琛,陶敏,刘少军,等. 不同倍性鱼 *cdc2* 基因 cDNA 部分序列的克隆及其在卵巢中的表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报,2006,29(3):73 - 76.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*,2007,24(8):1596 - 1599.
- [15] Livark K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method [J]. *Methods*,2001,25(4):402 - 408.
- [16] 张纯,刘少军,李涛,等. 红鲫(♀)×鲤(♂)杂交鱼的胚胎染色体组倍性研究[J]. 水产学报,2011,35(9):1455 - 1460.
- [17] Andrew CG Porter. Preventing DNA over-replication: a Cdk perspective[J]. *Cell Division*,2008(3):3.
- [18] 翟中和,王喜忠,丁明孝. 细胞生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000:399 - 402.
- [19] Solomon M J, Glotzer M, Lee T H, *et al.* Cyclin activation of p34cdc2 [J]. *Cell*, 1990, 63 (5): 1013 - 1024.
- [20] Sheaff R J, Roberts J M. Regulation of G1 phase [M] // *Cell cycle control*. Springer Press, 1998: 7 - 10.
- [21] 吴宁华. 细胞周期的基因调控[M]. 北京:高等教育出版社,1996:159 - 157.
- [22] Pacek M, Prokhorova T A, Walter J C. Cdk1: unsung hero of S phase? [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3 (4): 401 - 403.
- [23] Hohegger H, Dejsuphong D, Sonoda E, *et al.* An essential role for Cdk1 in S phase control is revealed via chemical genetics in vertebrate cells [J]. *Journal of Cell Biology*,2007,178(2):257 - 268.
- [24] John A B, Karen M, Stephen J A. Origins and complexes: the initiation of DNA replication [J]. *Journal of Experimental Botany*,2001,52:193 - 202.

**The cloning of *cdc2* cDNAs and a comparative study of
its expression in different ploidy fishes including the
diploid gynogenetic hybrid of red crucian carp × common carp**

TAO Min, LIU Shaojun* , ZHONG Huan, ZHOU Yi, SONG Can, ZHANG Chun, LIU Yun

(Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Education Ministry of China,

College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: Cdc2 (Cyclin Dependent Kinase, namely CDK1) encoded by *cdc2* gene and CyclinB combination regulates G₂/M transition. To find out molecular mechanism that diploid hybrid fish could produce diploid gamete, the full length cDNAs of *cdc2* in the third gynogenetic generation (G₃), red crucian carp (*Carassius auratus* red var.), triploid crucian carp and allotetraploid were obtained by PCR and rapid amplification of cDNA ends. Our data showed that all the cDNAs of *cdc2* gene in the four different ploidy fishes encode a protein of 302 amino acids containing a domain (PSTAVRE) which combine Cyclins. A high homology of 97.6% of the Cdc2 protein can be drawn by comparing the amino acid sequences in these four fishes, which indicates the higher conservative function and evolution of Cdc2 protein in these four fishes. A comparative expression pattern of *cdc2* in early-stage gonads of G₃ and different ploidy fishes was carried out by Real-time PCR using specific primers against the same sequences of coding regions in the four fishes. The results showed that the expression of *cdc2* in the ovary of G₃ was higher than those of red crucian carp and triploid crucian carp, while lower than that of allotetraploid, which, at the molecular level, indicates existence of polyploid oogonia in early-stage gonads of G₃. The higher expression of *cdc2* in G₃ suggests that consecutive S-phase replication may occur without intervening mitosis, which might be related to the formation mechanisms for the diploid eggs generated by diploid hybrids.

Key words: the diploid gynogenetic hybrid of red crucian carp × common carp; *cdc2* gene; early-stage gonads; the diploid eggs; cell cycle

Corresponding author: LIU Shaojun. E-mail: lsj@hunnu.edu.cn