

大菱鲆周期蛋白依赖激酶基因 *cdk1*、*cdk6* 克隆及表达分析

郭佳伟¹, 朱香萍¹, 吴志昊², 宋宗诚³, 范兆飞^{2,4}, 谭训刚², 尤 锋²

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 中国科学院 海洋研究所 中国科学院实验海洋生物学重点实验室, 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 威海圣航水产科技有限公司, 山东 威海 264200; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 通过同源克隆以及 5'/3'RACE 的方法扩增得到大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)细胞周期蛋白依赖激酶基因 *cdk1* 和 *cdk6* 的全长 cDNA 序列, 在 mRNA 水平上分析了它们组织表达特征, 并对比分析了静水压处理对其胚胎期表达的影响。结果显示, *cdk1* 基因全长 cDNA 序列为 1281 bp (GenBank 登录号: KP339306), 编码区为 912 bp; *cdk6* 基因 cDNA 全长 1400 bp (GenBank 登录号: KT186374), 编码区长度为 978 bp。组织 RT-PCR 分析表明, *cdk1* 基因表达具有广泛性, 在性腺、肾脏等生长发育较快的组织中表达量较高; *cdk6* 基因也在多个组织中表达, 在性腺中表达量最高。通过 Real time RT-PCR 检测基因在胚胎中的表达水平发现, 静水压处理组 *cdk1*、*cdk6* 在胚胎发育中, 总体变化趋势与对照组类似。大菱鲆胚胎对照组中 *cdk1* 在原肠期以前相对神经胚期及以后时期表达量较高, 静水压处理组基因表达变化与对照组趋势相同; 对照组中 *cdk6* 在原肠期出现表达高峰, 但静水压处理组在原肠期表达量相对较低。静水压处理对 *cdk1* 和 *cdk6* 的表达量的影响不同, 这可能与基因还有除调控细胞周期的其他功能有关。为解析这两个基因在大菱鲆胚胎发育中的作用及其机制提供了参考。

关键词: 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); *cdk1* 和 *cdk6*; 克隆; 组织; 胚胎; 静水压; RT-PCR

中图分类号: Q75 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)04-0011-11

doi: 10.11759/hyxx 20150726003

三倍体鱼性腺不发育或者低育而具有生长速度快的特性, 但是, 三倍体需要每次进行人工诱导, 限制了其在生产中的应用。四倍体的生殖细胞含有偶数染色体组预期是可育的, 成熟的四倍体与正常的二倍体杂交则可进行大批量、一劳永逸的三倍体生产, 故四倍体研究一直被关注。据不完全统计, 自 20 世纪 80 年代以来, 已在超过 40 种鱼类中开展了人工诱导四倍体的尝试, 如淡水鱼类罗非鱼(*Oreochromis spp.*)^[1]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[2]和海水鱼欧鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[3]等。这些研究多限于处理方法参数筛选优化, 对其后期生长发育到成熟个体的报道较少, 仅有淡水鱼异源四倍体鲫鲤(♀*Carassius auratus* red. Var X ♂*Cyprinus carpio* 的杂交可育后代)^[4]等的相关报道, 故鱼类四倍体诱导技术尚需要进一步完善, 其诱导机制研究也尤显重要。但目前, 有关海水鱼中四倍体诱导的分子生物学研究几乎未见到, 严重影响了海水鱼类四倍体诱导技术的提升及三倍体育种实现。

四倍体的诱导, 既要有效地破坏纺锤体、抑制分裂进程, 也要保证诱导结束后, 受精卵能够准确地

重新启动, 确保加倍的染色体组协同一致, 完成后续分裂和发育过程, 而该过程的顺利实现并非易事, 这也许就是现今人们只获得了四倍化胚胎, 而很难得到四倍体鱼的原因^[5]。卵裂抑制后的重新启动与细胞分裂周期的重新启动密切相关。因此, 通过细胞周期相关基因的表达变化, 可以分析重新启动过程中分子水平变化和调整机制, 研究四倍体的形成机制, 从而指导诱导参数的优化。细胞周期指连续分裂的细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成的

收稿日期: 2015-07-26; 修回日期: 2015-10-21

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2012AA10A402); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CM035); 国家自然科学基金资助项目(31502156); 山东省科技发展计划资助项目(2013GHY11526); 鲆鲽类产业技术体系课题(NCYTX-50-G03)

[Foundation: National High Technology Research and Development Program of China (863 Programme), No. 2012AA10A402; Natural Science Foundation of Shandong, No. ZR2011CM035; National Natural Science Foundation of China, No. 31502156; Science and Technology Development Project of Shandong, No. 2013GHY11526; and the National Flatfish Industry System Construction Programme, No. nycytx-50-G03]

作者简介: 郭佳伟(1991-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 主要从事海水鱼类分子细胞学研究, E-mail: guojiawei51@126.com; 朱香萍, 通信作者, 副教授, E-mail: zhuxp980216@163.com; 尤锋, 通信作者, 研究员, E-mail: youfeng@qdio.ac.cn

整个过程,分为G1、S、G2和M期4个时相。细胞周期进程的实现在于有赖于各级调控因子对细胞周期精确而严密的调控,细胞周期蛋白依赖激酶 CDKs 对细胞周期不同时期相的推进和转化有重要作用。其中,CDK1(又称 p³⁴CDC2、cdc2)在精母/卵母细胞减数分裂、G1/S 和 G2/M 转化中发挥作用^[6],而 CDK6 是一种多功能的蛋白,在生长因子刺激下,与 Cyclin D 结合,促使细胞进入 S 期,反之细胞周期停滞于 G1 期^[7]。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)20 世纪 90 年代初由欧洲引入中国,目前已经成为中国北方重要的海水养殖鱼类^[8]。近年对大菱鲆的研究比较集中在温度和盐度对鱼体影响等方面^[9-10],国外有关大菱鲆三倍体诱导研究发现,大菱鲆三倍体性腺的确不能正常发育,且一龄以上三倍体生长显著快于二倍体($P<0.05$)^[11],因而进行其三倍体育种研究具有实用价值。大菱鲆四倍体研究目前仅有本实验室开展的诱导报道^[12],通过静水压法获得了四倍体胚胎及仔鱼。作者拟分析四倍体诱导组受精卵与对照组受精卵胚胎发育过程中,细胞周期相关基因 *cdk1* 和 *cdk6* 的差异表达,以期为阐述这些基因在四倍体诱导中的作用机制提供基础数据,也为进一步完善鲆鲽鱼及其他海水鱼类四倍体诱导技术提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

进行相关基因克隆和组织表达的样品,取自中国科学院海洋研究所水族楼常规培育的大菱鲆,培育条件为:每天换水 2 次,并吸底排污 2 次,投喂适口商业饵料 2 次;水温变化范围为 15~25℃,pH 为 7.8~8.2,盐度 30,DO>5 mg/L。大菱鲆样品全长 13~14.5 cm,共 6 尾。解剖取其心脏、肝脏、脾脏、鳃、头肾、肾脏、脑、眼、肌肉、肠、胃和性腺组织,立即置于液氮中速冻,然后在-80℃冰箱保存备用。

大菱鲆四倍体诱导实验在山东威海圣航水产科技有限公司进行,经控光控温培育,选取性腺发育成熟的雄鱼和雌鱼,分别人工挤出精卵后,进行半干法授精。受精卵在 15.3±0.3℃海水中孵育,取大部分受精卵进行静水压诱导处理,其余少部分受精卵作为对照组。四倍体诱导条件为:第一次卵裂前 15 min 以 67.5 MPa 静水压处理 6 min^[12],处理后与对照组在相同条件下孵育。在多胞期至出膜期的各发育阶段,诱导组与对照组分别取约 200 粒胚胎置于 0.5 mL RNA-Solv Reagent(Omega Bio-tek, 美国)中,

液氮暂时保存后转移到-80℃超低温冰箱,用于 RNA 提取、反转录和表达实验。

1.2 *Cdk1*、*cdk6* 基因克隆及序列分析

取上述大菱鲆各组织,按照 RNA-Solv Reagent 说明书抽提总 RNA,通过 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整度和纯度,使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测其浓度。取 1 μg 总 RNA 经过 Dnase1(TAKARA, 日本)消化处理,用 M-MLV Reverse Transcriptase(Promage, 美国)反转录合成 cDNA 的第一链模板 20 μL,储存在-20℃备用。并用 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit(Clontech, 美国)完成 3'/5'RACE cDNA 模板构建。

根据 GenBank 获得已知鱼类 *cdk1*、*cdk6* 的基因序列,设计简并引物(表 1),以大菱鲆性腺和肾脏 cDNA 为模板通过 PCR 反应(2xEs Taq MasterMix 25 μL, ddW 19 μL, Primer-F(10 μmol/L) 2 μL, Primer-R(10 μmol/L) 2 μL, cDNA 2 μL)扩增它们的保守序列,*cdk1* PCR 程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,30 个循环;72℃再延伸 5 min;*cdk6* PCR 程序除退火温度为 55℃、35 个循环外,其余条件相同。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后,经 Gel Extraction Kit(OMEGA, 美国)纯化,连接、转化,并经蓝白斑筛选和 PCR 检测,将阳性克隆菌株送至上海桑尼生物科技有限公司测序。根据获得的 *cdk1*、*cdk6* 保守片段设计 3'和 5'RACE 特异性引物(表 1)。使用 SMART RACE cDNA Amplification Kit 扩增两基因 cDNA 的 3'和 5'端序列。PCR 反应条件为:94℃变性 30 s;68℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,30 个循环。PCR 产物按照上述同样方法纯化、连接转化、检测、测序分析。测序结果在 NCBI 网站上 Blast 比对,使用 BioEdit 进行拼接,获得 cDNA 全长序列。设计特异性引物(表 1),进行全长验证。根据 cDNA 序列,用 BioEdit 软件翻译 *cdk1*、*cdk6* 基因的氨基酸序列,并用 DNAMA 进行氨基酸多序列比对,进化树的构建是采用软件 ClustalX 和 MEGA5 结合 GenBank 上各物种的 *cdk1*、*cdk6* 氨基酸序列进行比对聚类分析而完成的。

1.3 *Cdk1*、*cdk6* 表达分析

1.3.1 组织表达分析

利用 Primer5.0 软件设计特异性引物(表 1),通过 RT-PCR 分析 *cdk1*、*cdk6* 在大菱鲆 12 种组织中的表达, β -actin 作为内参基因。PCR 反应体系:2xEs Taq

表 1 大菱鲂 *cdk1*、*cdk6* 基因克隆、RT-PCR 和 Real time RT-PCR 分析所用引物序列

Tab. 1 Primers used in cloning, RT-PCR, and real-time RT-PCR of *Scophthalmus maximus cdk1* and *cdk6* genes

引物名称	核酸序列(5'-3')	作用
cdk1F	GGYGAGGGDTCCTAYGGW	<i>cdk1</i> 中间保守区获得
cdk1R	CACAGCCMADWGCCCCAVAC	
cdk6F	GCWMGRGATTTGAASAAC	<i>cdk6</i> 中间保守区获得
cdk6R	GGNARNCCNACYTCYTGNGGC	
cdk1-GSP1-5R	GGTGGAGGACTCGACGACAGTGAC	<i>cdk1</i> 5'UTR 获得
cdk1-GSP2-5R	GGTACAGGTAGCTCTTGACCAGCATG	
cdk1-GSP1-3F	CATGGAGACTCTGAGATCGACCAGC	<i>cdk1</i> 3'UTR 获得
cdk1-GSP2-3F	GATGTGTGGCCCGAAGTAGAGAGC	
cdk6-GSP1-5R	GCTTCAAGCTGCTTCAGTACCGCC	<i>cdk6</i> 5'UTR 获得
cdk6-GSP2-5R	GCTTCAAGCTGCTTCAGTACCGCC	
cdk6-GSP1-3F	GATGTTCAGGAGAAGACCGCTATTTTCG	<i>cdk6</i> 3'UTR 获得
cdk6-GSP2-3F	CGAGGAAACTCAGATGTTGATCAGC	
cdk1ORF-F	GTCGTCGGTCCACGGTTACAC	<i>cdk1</i> 全长验证
cdk1ORF-R	CATTGCCGACAGACAGAACTTTAC	
cdk6ORF-F	CAAATTCTGCAACAATGGACAATG	<i>cdk6</i> 全长验证
cdk6ORF-R	CAGGATGATTACAGGTGAGGGAG	
cdk1RT-F	GACTGCTGGATGTCCTGATG	<i>cdk1</i> 组织差异表达
cdk1RT-R	GCTTCTTGGTGGCGAGTT	
cdk6RT-F	CCAGAAGTGCTGCTCCAGTCCAGTT	<i>cdk6</i> 组织差异表达
cdk6RT-R	ATAGTGGGCTTGTTGCTTG	
cdk1QRT-F	CATCAAAGTGGCGGACTTC	<i>cdk1</i> 荧光定量
cdk1QRT-R	CTTGGTGGCGAGTTCAGC	
cdk6QRT-F	TGGTTCCAGACATGGACGAG	<i>cdk6</i> 荧光定量
cdk6QRT-R	CATAGTGGGCTTGTTGCTTG	
actin-RT-F	GCGTGACATCAAGGAGAAGC	组织差异表达内参
actin-RT-R	TGGAAGGTGGACAGGGAAGC	
actin-QRT-F	CGTGCGTGACATCAAGGAG	荧光定量内参
actin-QRT-R	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	

注: D(T, G, A)W(A, T)M(A, C)Y(C, T)S(C, G)V(A, C, G)R(A, G)N(A, T, C, G)

MasterMix, 12.5 μ L; H₂O, 9.5 μ L; Primer-F(10 μ mol/L), 1 μ L; Primer-R(10 μ mol/L), 1 μ L; cDNA, 1 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将电泳检测结果使用 Gel-Pro analyzer 进行灰度分析, 并使用 SPSS Statistics 17.0 软件进行单因素方差分析确定不同组织之间差异的显著水平。

1.3.2 胚胎发育阶段的表达分析

cDNA 模板取来自相同亲本静水压处理组或对照组不同时期胚胎各约 50 粒, 分别按照 1.2 中的方法提取, 取 1 μ g 总 RNA 反转录得到 cDNA 的第一链模板 20 μ L 加 RNase-free Water 稀释到 30 μ L, 每个样品 3 次重复。利用 Primer5.0 软件设计 Real time

RT-PCR 特异性引物(表 1), 用 TAKARA TP800 荧光定量 PCR 仪进行扩增。反应体系: SYBR Premix Ex TaqTMII(Tli RNaseH Plus), 10 μ L; RNase-free Water, 7.8 μ L; Primer-F(10 μ mol/L), 0.6 μ L; Primer-R(10 μ mol/L), 0.6 μ L; cDNA, 1 μ L。采用 3 部法程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后绘制溶解曲线以确保扩增的特异性和准确性。通过检测 SYBR Green 荧光染料在 PCR 反应过程中荧光信号的变化, 记录每个 PCR 反应的 Ct 值, 然后以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量。使用 SPSS Statistics 17.0 软件选择 tukey 法进行单因素方差分析, 确定不同发育阶段及诱导组与对照组之间差异的显著性水平。

2 实验结果

2.1 大菱鲆 *cdk1*、*cdk6* cDNA 序列及氨基酸同源分析

通过基因克隆和全长验证, 获得了大菱鲆 *cdk1*、*cdk6* 基因的 cDNA 全长序列。*cdk1* 基因 cDNA 全长 1281 bp(KP339306), 编码区长度为 912 bp, 编码一条含 303 个氨基酸的蛋白。保守结构域搜索发现了 STKc-CDK1-euk 结构域, 属于 PKc-like 超家族的一员。通过 Compute pI/MW 在线软件分析等电点 pI 为 8.30, 相对分子质量为 34591.15。大菱鲆 CDK1 氨基

酸序列具有高度保守性, 与银鲑鱼(*Anoplopoma fimbria*, ACQ58326.1)相似度最高达到 96%, 与人类(*Homo sapiens*, NP_001777.1)相似度为 81%。由氨基酸比对(图 1 A)和系统进化树(图 1 B)可以看出其与鱼类的先聚在一起, 然后再与其他物种聚在一起。

大菱鲆 *cdk6* 基因 cDNA 全长 1400 bp, 编码区长度为 978 bp, 编码一条含 325 个氨基酸的蛋白, 也发现了 STKc-CDK6-euk 结构域, 同属 PKc-like 超家族的一员。其等电点 pI 为 5.62, 相对分子量为 36632.9。大菱鲆 CDK6 氨基酸序列具有高度保守性, 和亚马逊帆鳍鲈(*Poecilia formosa*, XP_007547583.1)相似度

A	
<i>Scophthalmus maximus</i>	NEDYLKI EKI GEGTYGVVYKGRHKATGQI VANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Anoplopoma fimbria</i>	NEDYLKI EKI GEGTYGVVYKGRHKATGQI VANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Oreochromis niloticus</i>	NEDYLKI EKI GEGTYGVVYKGRHKATGQI VANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Larimichthys crocea</i>	NEDYLKI GKI GEGTYGVVYKGRHKATGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Oryzias latipes</i>	NEDYVKI EKI GEGTYGVVYKGRHKS TGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Takifugu rubripes</i>	NEDYLKI EKI GEGTYGVVYKGRHKTGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREVS LLQELKHPNVVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Salmo salar</i>	NEDYVKI EKI GEGTYGVVYKGRHKS TGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREI SLLKELAHPNVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ANDYVKI EKI GEGTYGVVYKGRHKS TGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREI SLLKELAHPNVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Danio rerio</i>	MDDYLKI EKI GEGTYGVVYKGRNKTGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAVREI SLLKELQHPNVRLLDVLMQES RLYLI F 80
<i>Xenopus laevis</i>	NDEYTKI EKI GEGTYGVVYKGRHKATGQVAVANKKI RLENEEEGVPS TAI REI SLLKELQHPNI VCLLDVLMQDS RLYLI F 80
<i>Chelonina mydas</i>	MDDYTKI EKI GEGTYGVVYKGRHKS TGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAI REI SLLKELHHPNI VCLQDVLMQDS RLYLI F 80
<i>Gallus gallus</i>	NEDYTKI EKI GEGTYGVVYKGRHKTGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAI REI SLLKELHHPNI VCLQDVLMQDARLYLI F 80
<i>Rattus norvegicus</i>	MEDYI KI EKI GEGTYGVVYKGRHRTGQI VANKKI RLES EEEGVPS TAI REI SLLKELRHPNI VS LQDVLMQDS RLYLI F 80
<i>Homo sapiens</i>	NEDYTKI EKI GEGTYGVVYKGRHKTGQVAVANKKI RLES EEEGVPS TAI REI SLLKELRHPNI VS LQDVLMQDS RLYLI F 80
<i>Mus musculus</i>	MEDYI KI EKI GEGTYGVVYKGRHRVTGQI VANKKI RLES EEEGVPS TAI REI SLLKELRHPNI VS LQDVLMQDS RLYLI F 80
Consensus	m y ki k i g e g t y g v v y k g t g q v a n k k i r l e s e e e g v p s t a v r e i s l l k e l a h p n v r l l d v l m q d s r l y l i f 80
<i>Scophthalmus maximus</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI FFCHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Anoplopoma fimbria</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI YS CHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Oreochromis niloticus</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI YF CHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Larimichthys crocea</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI YF CHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Oryzias latipes</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI YF CHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Takifugu rubripes</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQYNDPMLVKS YLYQI LEGI YF CHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Salmo salar</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI LFCHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYNDPMLVKS YLYQI LEGI LFCHCRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGVPVRYV 160
<i>Danio rerio</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Xenopus laevis</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PS GQYVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Chelonina mydas</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQFVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Gallus gallus</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQFVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Rattus norvegicus</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQFVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Homo sapiens</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQFVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
<i>Mus musculus</i>	EFLSNDLKKYLDLSI PPGQFVDSMLVKS YLYQI LQGI VFCHSRRVLRDLKPCNLLI ENKGVI KLADFGLARAFGI PVRVY 160
Consensus	e f l s n d l k k y l d l s i p s g q y n d p m l v k s y l y q i l e g i f f c h c r r v l r d l k p c n l l i e n k g v i k l a d f g l a r a f g i p v r v y 160
<i>Scophthalmus maximus</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Anoplopoma fimbria</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Oreochromis niloticus</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Larimichthys crocea</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Oryzias latipes</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Takifugu rubripes</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGS PRYS TPVDVWS TGTF AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Salmo salar</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGAPRYS TPVDVWS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDI WPEVESLPDYKNT 240
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGAPRYS TPVDVWS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDI WPEVESLPDYKNT 240
<i>Danio rerio</i>	THEVVTLWYRAPEVLLGAS RYS TPVDLWS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRTLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Xenopus laevis</i>	THEVVTLWYRAS EVLLGS V RYS TPVDVWS VGTI F AEI ATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRSLGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Chelonina mydas</i>	THEVVTLWYRS PEVLLGS ARYS TPVDI WS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRALGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Gallus gallus</i>	THEVVTLWYRS PEVLLGS ALYS TPVDI WS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRALGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Rattus norvegicus</i>	THEVVTLWYRS PEVLLGS ARYS TPVDI WS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRALGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Homo sapiens</i>	THEVVTLWYRS PEVLLGS ARYS TPVDI WS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRALGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
<i>Mus musculus</i>	THEVVTLWYRS PEVLLGS ARYS TPVDI WS I GTI F AELATKKPLFHGDS EI DQLFRI FRALGTNPNDVWPEVESLPDYKNT 240
Consensus	t h e v v t l w y r a p e v l l g s p r y s t p v d v w s t g t f a e l a t k k p l f h g d s e i d q l f r i f r t l g t n p n d v w p e v e s l p d y k n t 240
<i>Scophthalmus maximus</i>	* FPKWKGNNI S S NVKS LDKNGLDLLGKMLTYNPPKRI S AREAMTHAYFDDLD . . . X 291
<i>Anoplopoma fimbria</i>	FPKWKS GNLS S NVKNL DKNGLDLLAKMLTYNPPKRI S AREAMTHCYFDDLD . . . X 291
<i>Oreochromis niloticus</i>	FPKWKAGNLS S NVKNL DKNGLDLLAKMLTYNPPKRI S AREAMTHPYFDDLD . . . X 291
<i>Larimichthys crocea</i>	FPKWKS GNLS S NVKNL DINGLDLLAKMLTYNPPKRI S AREAMTRPYFDDLD . . . X 291
<i>Oryzias latipes</i>	FPKWKEG LS S NVKNL DKNGLDLLAKMLTYNPPKRI S AREAMTHPYFDDLD . . . X 291
<i>Takifugu rubripes</i>	FPKWKS GNLS . . VKNLEKNGLDLLAKMLTYNPPKRI S ARQAMTHPYFDDLDKS . . . X 291
<i>Salmo salar</i>	FPKWKS GNLS S NVKNL DKNGI DLLAKTLI YDPPKRI S ARQAMSHPYFDDLD . . . X 291
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	FPKWKS GNLS S NVKNL DKKGI DLLAKTLI YDPPKRI S ARQAMSHPYFDDLD . . . X 291
<i>Danio rerio</i>	FPKWKS GNLAN TVKNL DKNGI DLLAKMLI YDPPKRI S ARQAMTHPYFDDLD . . . X 291
<i>Xenopus laevis</i>	FPKWKGGS LS S NVKNI DEDGLDLLS KMLVYDPAKRI S ARKAMLHPYFDDLD . . . X 291
<i>Chelonina mydas</i>	FPKWKPGS LAS HVKNL DEDGLDLLS KMLI YDPAKRI S GKMLNHPYFDDLD . . . X 291
<i>Gallus gallus</i>	FPKWKPGS LGTHVCNLD DEDGLDLLS KMLI YDPAKRI S GKMLNHPYFDDLD . . . X 291
<i>Rattus norvegicus</i>	FPKWKPGS LAS HVKNL DEDGLDLLS KMLVYDPAKRI S GKMLNHPYFDDLD . . . X 291
<i>Homo sapiens</i>	FPKWKPGS LAS HVKNL DEDGLDLLS KMLI YDPAKRI S GKMLNHPYFDDLD . . . X 291
<i>Mus musculus</i>	FPKWKPGS LAS HVKNL DEDGLDLLS KMLVYDPAKRI S GKMLNHPYFDDLD . . . X 291
Consensus	f p k w k g n n i s s n v k s l d k n g l d l l g k m l t y n p p k r i s a r e a m t h a y f d d l d . . . x 291

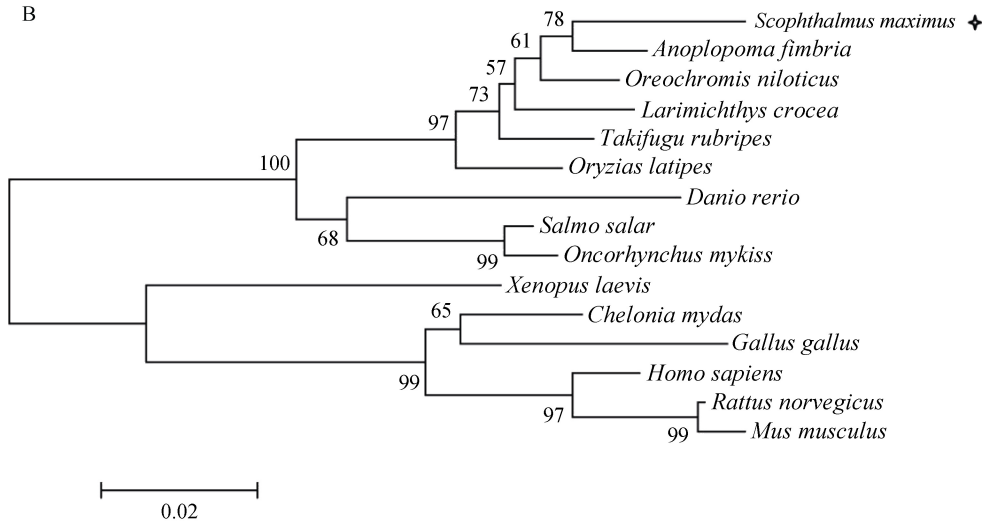


图 1 大菱鲆 *cdk1* 基因氨基酸序列、结构及同源性分析

Fig. 1 Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of *Scophthalmus maximus cdk1*. A. 大菱鲆 *cdk1* 与其他物种 *cdk1* 氨基酸比对结果。图中 CDK1 激酶 3 个保守的磷酸化位点用“*”表示, 4 个保守色氨酸位点用“x”表示, 已知功能的保守氨基酸序列用“_”标注; B. 基于 NJ 法构建 *cdk1* 氨基酸序列系统进化树(Bootstrap 运算 1000 次)。其中, 银鲑鱼 (ACQ58326.1)、罗非鱼 (XP_003455045.1)、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*, XP_003978924.1)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*, NP_001290309.1)、青鳉 (*Oryzias latipes*, NP_001098309.1)、大西洋鲑 (*Salmo salar*, NP_001134623.1)、虹鳟 (NP_001118132.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, NP_997729.1)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, 2005165A)、绿海龟 (*Chelonia mydas*, EMP40429.1)、原鸡 (*Gallus gallus*, NP_990645.1)、小鼠 (*Mus musculus*, NP_031685.2)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, NP_062169.1) 和人 (NP_001777.1)

A. Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequences of *S. maximus cdk1* with the *cdk1* sequences of other species. Three conservative kinase phosphorylation sites of *cdk1* are marked with an “*.” Four conservative tryptophan sites are marked with an “x.” Conserved amino acid sequences of known function are underlined. B. Phylogenetic tree of *S. maximus* and other animal *cdk1* amino acid sequences based on the neighbor-joining method (calculated from 1000 bootstrap samples)

最高达到 98%, 与人相似度为 85%。由氨基酸比对 (图 2 A) 和系统进化树 (图 2B) 可以看出, 其与鱼类的相似性较高, 与高等脊椎动物的相似性较低。

2.2 *Cdk1*、*cdk6* 基因在大菱鲆各组织中的表达

Cdk1 和 *cdk6* 基因在各组织中 RT-PCR 表达和电泳图灰度分析如图 3 所示。*Cdk1* 基因在各组织中广

Species	Sequence	Position
<i>Stegastes partitus</i>	QYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Larimichthys crocea</i>	QYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Oryzias latipes</i>	QYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Takifugu rubripes</i>	RYEAVA EI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Poecilia formosa</i>	QYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Salmo salar</i>	RYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Danio rerio</i>	QYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLES FEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Cathartes aura</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTS EEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Gallus gallus</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTS EEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Mus musculus</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTS EEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Bos taurus</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Homo sapiens</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Rattus norvegicus</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRHLETFEHPNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
<i>Tinamus guttatus</i>	QYECVAEI GEGAYGKVF KARDLKNNGRFVALKRVRVQTS EEEGNPLS TI REVAVLRHLEPFEP. HALFDVCTVS RTDRE	78
<i>Scophthalmus maximus</i>	RYEPVAEI GEGAYGKVKARDLKNNGRFVALKRVRVQTEEEGNPLS TI REVAVLRQLEAFEHNNVRLFDVCTVS RTDRE	80
Consensus	ye vaeigegaygkv kardl n grfvalk rrvqt <u>eeegnp</u> lstirevavl le <u>le</u> p lfdvctvsrt dre	
<i>Stegastes partitus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Larimichthys crocea</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Oryzias latipes</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKVPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Takifugu rubripes</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Poecilia formosa</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Salmo salar</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Danio rerio</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
<i>Cathartes aura</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Gallus gallus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Mus musculus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Bos taurus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Homo sapiens</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Rattus norvegicus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	160
<i>Tinamus guttatus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLDKVPPEGVPTETI KDMYQLL RGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS S GQI KLADFGLARI YS	158
<i>Scophthalmus maximus</i>	TKL TLVFEHVDQDL TTYLEKAPDPGVPPETI KDMYQLL QGLDFLHS HRVVHRDLKPCNI LVTS GGQI KLADFGLARI YS	160
Consensus	t <u>tl</u> lvfehv d qdl t t y l e k a p d p g v p p e t i k d m y q l l q g l d f l h s h r v v h r d l k p c n i l v t s g g q i k l a d f g l a r i y s	

<i>Stegastes partitus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ AEDWPQEVLPQ	240
<i>Larimichthys crocea</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ AEDWPQEVLPQ	240
<i>Oryzias latipes</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ AEDWPQEVLPQ	240
<i>Takifugu rubripes</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ AEDWPQEVLPQ	240
<i>Poecilia formosa</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ PDDWPQEVLPQ	240
<i>Salmo salar</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ VEDWPQEVLPQ	240
<i>Danio rerio</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ PEDWPQEVLPQ	240
<i>Cathartes aura</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVI GLPEEDWPNDVALPR	240
<i>Gallus gallus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVI GLPEEDWPNDVALPR	240
<i>Mus musculus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI LDI I GLPGEEDWPRDVALPR	240
<i>Bos taurus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI LDVI GLPGEEDWPRDVALPR	240
<i>Homo sapiens</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI LDVI GLPGEEDWPRDVALPR	240
<i>Rattus norvegicus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAELFRFRPLFRGNS DVDQLGKI LDVI GLPGEEDWPRDVALPR	240
<i>Tinamus guttatus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVI GLPEEDWPNDVALPR	238
<i>Scophthalmus maximus</i>	FQNALTS VVVTLWYRAPEVLLQS \$ YATPVDLWS VGCI FAENFRFRPLFRGNS DVDQLGKI FDVVGVP\$ ADDWPQEVLPQ	240
Consensus	<u>f q n a l t s v v v t l w y r a p e v l l q s \$ y a t p v d l w s v g c i f a e n f r r p l f r g n s d v d q l g k i d g p d w p v l p</u>	
	* * * *	
<i>Stegastes partitus</i>	\$ AFTPRPPKPI EDLVPMDEQGRALL	266
<i>Larimichthys crocea</i>	\$ AFTPRPPKPI ENLVPMDEQGRALL	266
<i>Oryzias latipes</i>	\$ AFTPRPPKPI EDLVPMDEQGRALL	266
<i>Takifugu rubripes</i>	\$ AFTPRPPKPI ENLVPMDEQGRALL	266
<i>Poecilia formosa</i>	\$ AFTPRPPKPI EDLVPMDEQGRALL	266
<i>Salmo salar</i>	\$ AF\$ PRPPQPI GNLI PDMDELGKSLI	266
<i>Danio rerio</i>	\$ AF\$ PRPAQPI ENLVPMDELGKSLI	266
<i>Cathartes aura</i>	NAFTS RPAQPI EKFPVDI DELGKDLL	266
<i>Gallus gallus</i>	NAFAS RPAQPI EKFPVDI DDGKDLL	266
<i>Mus musculus</i>	QAFHS KS AQP I EKFPVDI DELGKDLL	266
<i>Bos taurus</i>	LAFHS KS P Q P I EKFPVDI DEQKDLL	266
<i>Homo sapiens</i>	QAFHS KS AQP I EKFPVDI DELGKDLL	266
<i>Rattus norvegicus</i>	QAFHS KS AQP I EKFPVDI DELGKDLL	266
<i>Tinamus guttatus</i>	NAFTS RPAQPI EKFPVDI DELGKDLL	264
<i>Scophthalmus maximus</i>	\$ AFTPRPPKPI EDLVPMDEQGRALL	266
Consensus	a f p i d d g l	

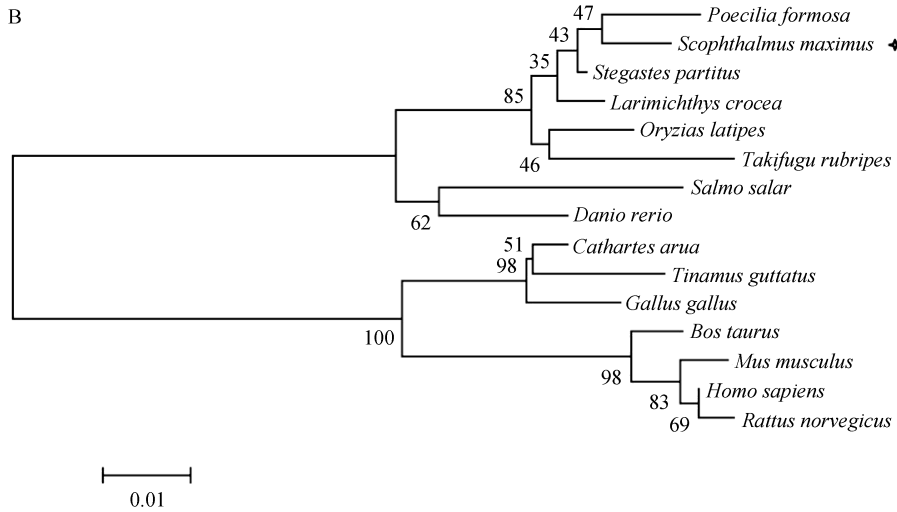


图 2 大菱鲆 *cdk6* 基因氨基酸序列、结构及同源性分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis of the deduced amino acid sequences of *Scophthalmus maximus cdk6*

A. 大菱鲆 *cdk6* 与其他物种 *cdk6* 氨基酸比对结果。与 cyclin 结合的氨基酸序列下划线标注，活性中心的氨基酸序列用“*”表示；B. 基于 NJ 法构建大菱鲆 *cdk6* 氨基酸系统进化树 (Bootstrap 运算 1000 次)。其中，亚马逊帆鳍鲈(XP_007547583.1)、深裂眶锯雀鲷(*Stegastes partitus*, XP_008293584.1)、青鳉(XP_004074048.1)、红鳍东方鲀(XP_003969443.1)、大黄鱼(XP_010739841.1)、大西洋鲑(NP_001140089.1)、斑马鱼(*D. rerio*, NP_001137525.1)、原鸡(*G. gallus*, NP_001007893.1)、白喉鸚(*Tinamus guttatus*, KGL841113.1)、红头美洲鸚(*Cathartes aura*, KFP51458.1)、牛(*Bos taurus*, NP_001179230.1)、褐家鼠(NP_001178790.1)、小鼠(NP_034003.1)和人(NP_001250.1)

A. Multiple sequence alignment of the deduced amino acid sequences of *S. maximus cdk6* with the *cdk6* sequences of other species. The CDK/cyclin interface is underlined. Active sites are marked with an “*.” B. Phylogenetic tree of *S. maximus* and other animal *cdk6* amino acid sequences based on the neighbor-joining method (calculated from 1000 bootstrap samples)

泛表达，性腺中表达量最高，在肾脏、头肾中表达量次之，脑、眼睛和肌肉中表达量较低。大菱鲆 *cdk6* 基因整体表达量较 *cdk1* 低，在各个组织中也都有表达，性腺中表达量最高，在肝脏、脑、眼等组织中的表达量较低。

2.3 静水压处理后 *cdk1*、*cdk6* 在胚胎发育过程中的差异表达

实验中所获得的静水压处理组大菱鲆胚胎的四倍体诱导率(四倍体分裂相数/总分裂相数×100%)在 70%~90%。

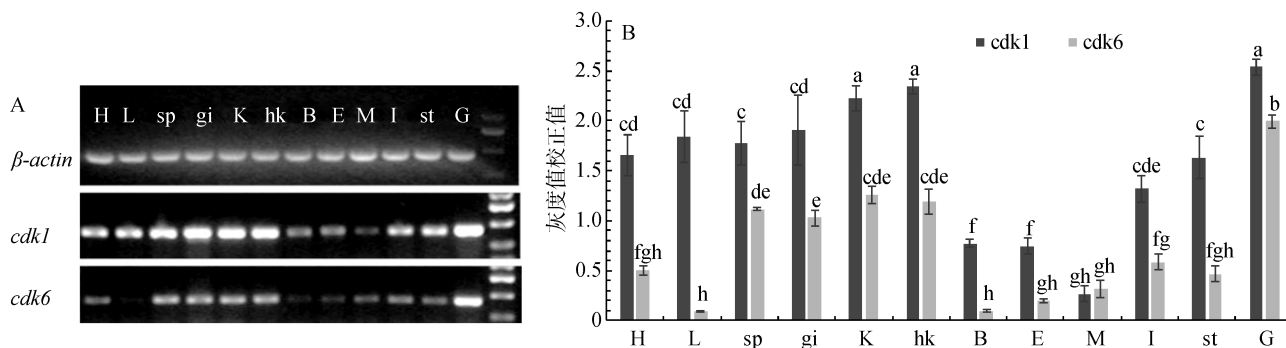


图3 大菱鲆 *cdk1* 和 *cdk6* 组织差异表达

Fig. 3 *Cdk1* and *cdk6* expression patterns in 12 tissues of *Scophthalmus maximus*

A 图. *cdk1* 和 *cdk6* 基因在不同组织表达电泳图; B 图. 电泳灰度统计表; H. 心脏; L. 肝脏; sp. 脾脏; gi. 鳃; K. 肾脏; hk. 头肾; B. 脑; E. 眼; M. 肌肉; I. 肠; st. 胃; G. 性腺, 不同的字母表示有显著差异(图4, 图5同)

A. Electrophoresis pattern of *cdk1* and *cdk6* expressed in different tissues. B. Gray level statistics of electrophoresis pattern. H, heart; L, liver; sp, spleen; gi, gill; K, kidney; h, head; k, kidney; B, brain; E, eye; M, muscle; I, intestines; st, stomach; G, gonad; Different letters represent significant differences (the same as Figs. 4 and 5)

大菱鲆胚胎 *cdk1* 基因 Real time RT-PCR 表达如图4所示。对照组中, 多胞期到原肠后期均较高水平表达, 神经胚期表达量降低, 其后表达量相对较低。静水压处理组具有相同的总趋势, 高囊胚、原肠早期

表达量相对较高, 神经胚以后处于稳定的低表达状态。在高表达阶段, 对照组变化幅度较大, 静水压处理组变化较小; 在高囊胚、原肠早期, 对照组的表达水平显著高于处理组($P < 0.05$)(图4)。

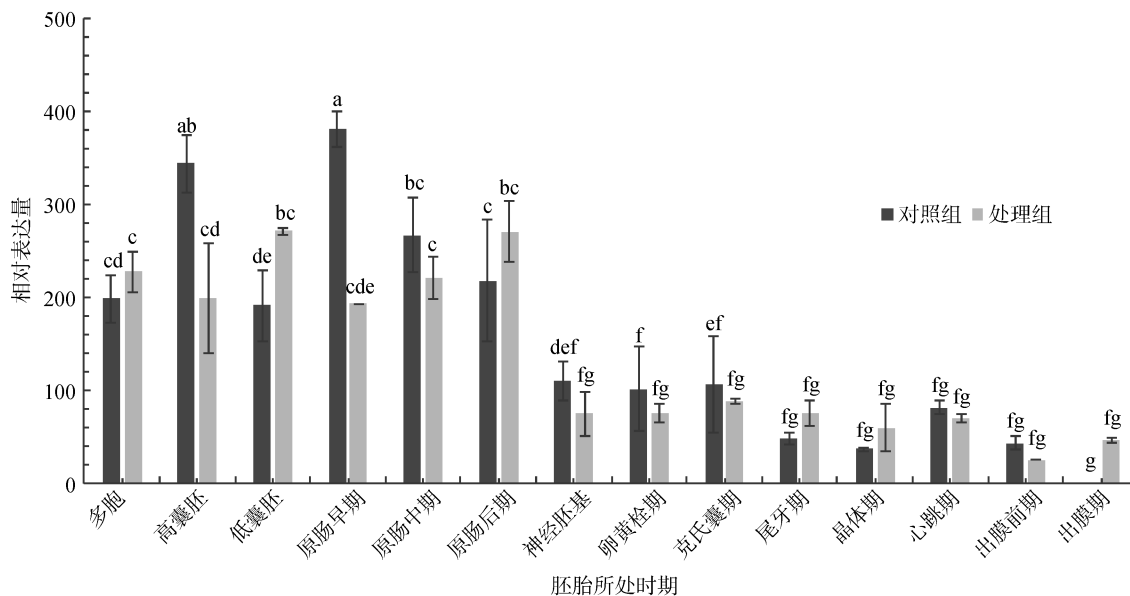


图4 大菱鲆 *cdk1* 基因在对照组和静水压处理组不同发育时期胚胎差异表达

Fig. 4 The expression levels of *cdk1* in *Scophthalmus maximus* embryos at different stages with hydrostatic pressure treatment

Cdk6 基因 Real time RT-PCR 检测结果如图5所示, 对照组多胞期到低囊胚期表达量较低, 原肠早期表达量明显升高, 原肠中期达到最高水平, 随后原肠后期至克氏囊期表达量下降, 直至出膜前期持续下降, 出膜期时最低。静水压处理组的总体变化趋势与对照组相同, 也是在原肠期至神经胚期表达量较高, 但总体上较对照组低, 在原肠早、中期显著低

于对照组($P < 0.05$)(图5)。

3 讨论

3.1 大菱鲆 *cdk1* 和 *cdk6* 基因的序列结构及组织表达差异

Cdk1、*cdk6* 是编码细胞周期蛋白依赖激酶的重要基因, 其编码蛋白 CDK1 和 CDK6 在细胞周期各

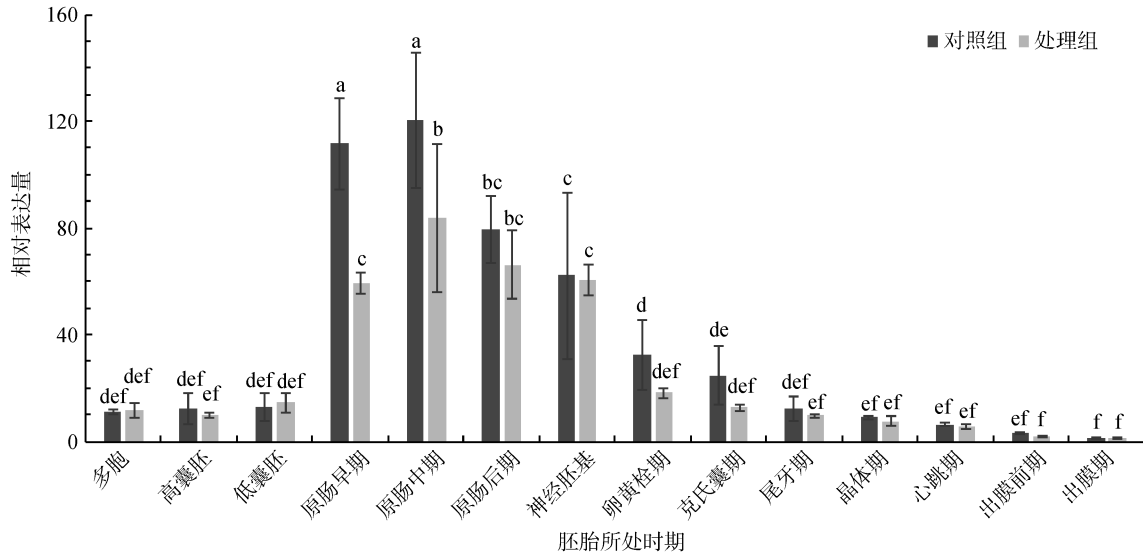


图 5 大菱鲆 *cdk6* 基因在对照组和静水压处理组胚胎发育中的差异表达

Fig. 5 The expression levels of *cdk6* in *Scophthalmus maximus* embryos at different stages with hydrostatic pressure treatment

时相的转化中起重要作用。CDK1 通过磷酸化一些功能蛋白而调控细胞周期进程^[13]。大菱鲆 *cdk1* 氨基酸序列具有高度保守性, 含有 STKc-CDK1-euk 结构域, 属于 PKC-like 超家族的一员, 也具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族特征序列 DLKPQN 和 G/V-T/S-X-X-Y/F-X-A-P-E、CDK1 活性相关的 3 个磷酸化位点 T14、Y15、T161, 以及与 cyclin B 结合位点保守序列 PSTAIRE 和与 ATP 结合位点相关保守序列 GXGXXG 和 K33。在细胞周期进程中, CDK6 是 G1 期重要的调控因子, 它与 cyclinD 结合形成复合物, 在细胞周期蛋白依赖激酶活化激酶的协同作用下, 使下游的 pRb 磷酸化, 从而解除对转录因子 E2F-1 的抑制效应, 启动 DNA 复制, 促进细胞增殖^[14]。大菱鲆 *cdk6* 氨基酸序列和其他鱼类的高度保守, 也含有丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸蛋白激酶家族特征序列 ADFGLARIYSFQMALTSVVVTLW, 还有与 cyclin 结合位点相关的保守序列 EEGM、SHR 和 RIYSF-QMALT 以及与 ATP 结合位点相关的保守序列 GXGXXG 和 K32。

作者的组织表达分析发现, 大菱鲆 *cdk1* 和 *cdk6* 基因组织表达具有相似性, 在心脏、肝脏、脾脏等组织中均有不同程度的表达, 但 *cdk6* 表达量要略低于 *cdk1*。两基因在脑、眼、肌肉中表达量都较低, 性腺中表达量最高, 分析可能与所取鱼体的性腺正处于快速生长发育期有关。这与大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[15]、虹鳟^[16]的 *cdk1* 结果类似, 各个组织中也均检测到其表达, 且在性腺中表达量最高。在以往的人

类研究中 *cdk6* 在不同种类细胞中也都有表达, 正常组织中的表达量较癌症组织中低^[17]。即这两个基因在细胞分裂旺盛的组织中表达较高, 可作为参考说明细胞的分裂情况。

3.2 大菱鲆胚胎 *cdk1* 和 *cdk6* 基因的表达特点以及静水压处理对基因表达的影响

经静水压处理, 作者获得了四倍体诱导率较高 (70%~90%) 的大菱鲆胚胎。对照组中检测大菱鲆 *cdk1* 基因在多胞期、囊胚期、原肠期表达量较高, 这与胚胎发育过程中的生理特点密不可分, 多胞期后细胞向四周扩散, 在原肠作用下进行有规律的定向迁移、排列和分化形成胚层。这些时期胚胎发育速度快, 细胞处于高速生长发育过程中有丝分裂旺盛, 需要大量 CDK1 对有丝分裂进程进行调控。在神经胚期以后 *cdk1* 表达量处于相对稳定的低水平, 这与该时期细胞分化程度增加、迁移减慢和细胞分化程度低有关。静水压处理后, 检测 *cdk1* 基因的转录水平在胚胎发育过程中的变化趋势与正常大菱鲆二倍体相同, 且四倍体诱导组中的表达量略低于对照组的, 也就是说水静压对其细胞分裂可能有一定的抑制作用。而在不同倍性鲫鱼 (红鲫 (*Carassius auratus red. Var*) 和湘江野鲤 (*Cyprinus carpio*) 杂交后代异源四倍体鲫鱼 (allotetraploids hybrids)、雄性异源四倍体鲫鱼与雌性二倍体日本白鲫 (*Carassius auratuscuvieri*) 交配产生三倍体湘云鲫 (allotriploid crucian carp)、红鲫卵巢中, *cdk1* 基因的转录水平会随倍性的递增而依

次升高^[18]。两者结果不同,分析其原因可能是,在胚胎发育早期 *cdk1* 表达受到多种因子的调控并不因倍性增加而增加 *cdk1* 的转录水平,抑或是如前所述水静压会减缓其细胞分裂引起的,但这需要进一步实验进行验证。关于 *cdk1* 基因功能研究在哺乳类中较深入,小鼠胚胎发育早期 *cdk1* 基因缺失会引起胚胎死亡,推测其在胚胎发育中有重要作用^[19]。通过 shRNA 技术低表达 *cdk1* 使阻塞 G2/M 转换可诱导 HO8910 细胞凋亡^[20]。研究表明,恶性肿瘤 *cdk1* 的表达量一般高于正常组织,揭示 *cdk1* 表达受细胞分化状态影响,大菱鲂胚胎发育早期细胞分化程度低时 *cdk1* 表达量较高,也提示其与细胞分化状态相关。

本实验对照组 *cdk6* 基因表达量在早期处于较低水平,在原肠早期突然升高,原肠中期达到最高,后期开始缓慢下降。如前所述,CDK6 是 G1 期调控的重要因子,通过一系列诱导可以启动细胞周期进程及细胞增殖^[21]。故大菱鲂原肠期高表达 *cdk6* 与旺盛的细胞分裂密切相关。静水压处理组胚胎 *cdk6* 在发育过程中的变化趋势与对照组基本一致,但总体上较低,特别在原肠期的表达量明显低于对照组。*Cdk6* 主要集中在哺乳动物和人类癌症的相关研究。研究发现 *cdk6* 具有调节细胞周期、影响血细胞功能、影响特定细胞的分化等多种功能。当 CDK6 的活性受到抑制或下降,能阻止细胞 G1/S 期转换^[22]。在小鼠 ES 细胞的研究中发现,诱导 ES 细胞分化后 *cdk6* 表达水平明显下调,通过 siRNA 技术沉默 *cdk6* 基因,发现未分化相关基因明显下调,而分化相关基因明显上调,揭示 *cdk6* 基因表达与细胞未分化状态密切相关^[23]。关于 *cdk6* 基因在鱼类及其多倍体中都未见报道,大菱鲂静水压处理组 *cdk6* 表达量降低的原因是否是由于水静压减缓其细胞分裂引起的,还需要进一步研究探讨。

在天然多倍体和成功获得成熟个体人工多倍体中基因表达的相关研究中仅见多倍体生长以及性别相关基因的研究。静水压诱导染色体加倍机制在细胞水平上是静水压处理早期胚胎破坏细胞内纺锤体结构抑制有丝分裂而形成^[24]。在分子水平上细胞周期蛋白基因 *cdk1* 和 *cdk6* 在细胞周期中起到重要的调控作用,染色体完成加倍后细胞进入周期性有丝分裂,基因表达水平直接影响加倍胚胎的生长发育。在细胞周期中 *cdk1* 和 *cdk6* 同样起到重要的调控作用,但在大菱鲂胚胎发育中的变化趋势不同,并且静水压处理后变化趋向亦不同。在多胞期、囊胚期、原

肠期胚胎细胞分化程度低, *cdk1* 高表达,不同的是 *cdk6* 在多胞期和囊胚期表达量较低,说明 *cdk6* 表达量和细胞未分化程度不是简单的正相关,还具有更复杂的关系。在静水压处理后 *cdk1* 基因在早期胚胎各时期中出现过表达或低表达现象,而 *cdk6* 基因表达在处理后的各个发育时期低表达,故两个基因在胚胎发育过程中可能有不同的作用机制,由此对静水压作用的响应机制也不同,但尚需深入研究。

参考文献:

- [1] Myers J M. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp.[J]. *Aquaculture*, 1986, 57: 281-287.
- [2] 马涛,朱才宝,朱秉仁. 热休克诱导虹鳟四倍体[J]. *水生生物学报*, 2005, 11(4): 329-336.
Ma Tao, Zhu Caibao, Zhu Bingren. Tetraploid of rainbow trout (*Salmo gairdneririchardson*) induced by heat shocks[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 11(4): 329-336.
- [3] Peruzzi S, Chatain B. Induction of tetraploid gynogenesis in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)[J]. *Genetica*, 2003, 119: 225-228.
- [4] Long Y, Tao M, Liu S J, et al. Differential expression of *Gnrh2*, *Gth β* , and *Gthr* genes in sterile triploids and fertile tetraploids[J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 338(1): 151-159.
- [5] 桂建芳,肖武汉. 静水压休克诱导水晶彩鲫三倍体和四倍体的细胞学机理初探[J]. *水生生物学报*, 1995, 19(1): 49-55.
Gui Jianfang, Xiao Wuhan. Preliminary study on the cytological mechanism of triploidy and tetraploidy induced by hydrostatic pressure shock in transparent colored crucian carp[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 1995, 19(1)49-55.
- [6] Kishimoto T. Cell-cycle control during meiotic maturation[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15: 654-663.
- [7] Donjerkovic D, Scott D W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle[J]. *Cell Research*, 2000, 10(1): 1-16.
- [8] 申雪艳,宫庆礼,雷霖霖,等. 进口大菱鲂苗种的遗传结构分析[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4): 332-341.
Shen Xueyan, Gong Qingli, Lei Jilin, et al. Population genetic structure analysis of the imported turbot seedlings *Scophthalmus maximus* using RAPD and microsatellite technique[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(4): 332-341.
- [9] 纪利芹,蒋克勇,韩龙江,等. 连续降温对大菱鲂成鱼代谢机能的影响[J]. *海洋科学*, 2014, 38(5): 46-53.
Ji Liqin, Jiang Keyong, Han Longjiang, et al. Effect of continuous cooling on metabolic function of adult *Scophthalmus maximus*[J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(5): 46-53.
- [10] 王新安,郭黎,马爱军,等. 基于响应面法分析温度

- 和盐度及其交互作用对大菱鲆幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2014, 38(6): 17-23.
- Wang Xinan, Guo Li, Ma Aijun, et al. Effects of temperature, salinity and their interaction on the activities of antioxidant enzymes of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* based on response surface methodology[J]. Marine Sciences, 2014, 38(6): 17-23.
- [11] Cal R M, Vidal S, Gómez C, et al. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture, 2006, 251: 99-108.
- [12] 吴志昊, 尤锋, 宋宗诚, 等. 大菱鲆四倍体的人工诱导研究[J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(3): 657-662.
- Wu Zhihao, You Feng, Song Zongcheng, et al. Induction of tetraploid in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2014, 45(3): 657-662.
- [13] Nurse P, Thuriaux P. Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Genetics, 1980, 96(3): 627-637.
- [14] Rivadeneira D B, Mayhew C N, Thangavel C, et al. Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells[J]. Gastroenterology, 2010, 138(5): 1920-1930.
- [15] 蔡明夷, 周鹏, 韩坤煌, 等. 大黄鱼 *cyclinB1* 和 *cdc2*cDNA 序列特征及组织表达分析[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2014, 53(1): 132-141.
- Cai Mingyi, Zhou Peng, Han Kunhuang, et al. Characterization and tissue expression profiles of cyclin B1 and Cdc2 in large yellow croaker(*Larimichthys crocea*) [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2014, 53(1): 132-141.
- [16] Qiu G F, Ramachandra R K, Rexroad C E, et al. Molecular characterization and expression profiles of cyclin B1, B2 and Cdc2 kinase during oogenesis and spermatogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Animal Reproduction Science, 2008, 105(3): 209-225.
- [17] Gossel M J, Hinds P W. From cell cycle to differentiation: an expanding role for *cdk6*[J]. Cell Cycle, 2006, 5(3): 266-270.
- [18] 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.
- Zeng Chen, Tao Min, Liu Shaojun, et al. Comparative analysis of transcriptional level in ovaries with different ploidy level[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2006, 29(3): 73-76.
- [19] Santamara D, Barriere C, Cerqueira A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle[J]. Nature, 2007, 448(7155) : 811-815.
- [20] Xi Q, Huang M, Wang Y, et al. The expression of CDK1 is associated with proliferation and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer[J]. Tumor Biology, 2015: 1-10.
- [21] Cole A M, Myant K, Reed K R, et al. Cyclin D2- cyclin-dependent kinase 4/6 is required for efficient proliferation and tumorigenesis following Apc loss[J]. Cancer Research, 2010, 70(20): 8149-8158.
- [22] Hu M G, Deshpande A, Enos M, et al. A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis[J]. Cancer Research, 2009, 69(3): 810-818.
- [23] 王娟娟, 刘会贤, 侯杰, 等. Cdk6在维持ES细胞自我更新中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(10): 958-965.
- Wang Juanjuan, Liu Huixian, Hou Jie, et al. The role of Cdk6 in maintaining the self-renewal state of ES cells[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(10): 958-965.
- [24] Zhang X, Onozato H. Hydrostatic pressure treatment during the first mitosis does not suppress the first cleavage but the second one[J]. Aquaculture, 2004, 240(1): 101-113.

Cloning and expression analysis of *cdk1* and *cdk6* in *Scophthalmus maximus*

GUO Jia-wei¹, ZHU Xiang-ping¹, WU Zhi-hao², SONG Zong-cheng³, FAN Zhao-fei^{2, 4}, TAN Xun-gang², YOU Feng²

(1. Animal Science and Technology Department, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China; 3. Shenghang Aquatic Science and Technology Co., Ltd., Weihai 264200, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Jul. 26, 2015

Key words: *Scophthalmus maximus*; *cdk1* and *cdk6*; cloning; tissue; embryo; hydrostatic pressure treatment; RT-PCR

Abstract: Whole cDNA sequences of cyclin-dependent protein kinase genes (*cdk1* and *cdk6*) in turbot (*Scophthalmus maximus*) were sequenced using homologous cloning and 5'/3'-RACE. The open reading frames of *cdk1* and *cdk6* were 912 bp (GenBank accession number, KP339306) and 978 bp (GenBank accession number, KT186374), respectively. Gene expression in turbot tissues was analyzed using RT-PCR. The results showed that both *cdk1* and *cdk6* were widely expressed in several turbot tissues. *cdk1* expression levels were higher in the gonads and kidneys than in other organs, and *cdk6* expression level was the highest in the gonads. *cdk1* and *cdk6* expression levels in turbot embryos were studied using real-time RT-PCR. In the control group, *cdk1* expression levels were higher at the gastrula stage and earlier compared to those at the neurula stage and later, and *cdk6* expression level at the gastrula stage was the highest. Trend variation pertaining to *cdk1* and *cdk6* expression levels in the hydrostatic pressure treatment group (tetraploid induction group) was similar to that in the control group, except for the expression level, which was lower in the treatment group than in the control group. Hydrostatic pressure treatments had different effects on *cdk1* and *cdk6* expression levels, suggesting *cdk1* and *cdk6* in turbot to have different functions. The above results could provide a basis for the analysis of functions and mechanisms of the two genes in turbot embryo development.

(本文编辑: 谭雪静)