

脊尾白虾CDK2基因的克隆及其功能分析

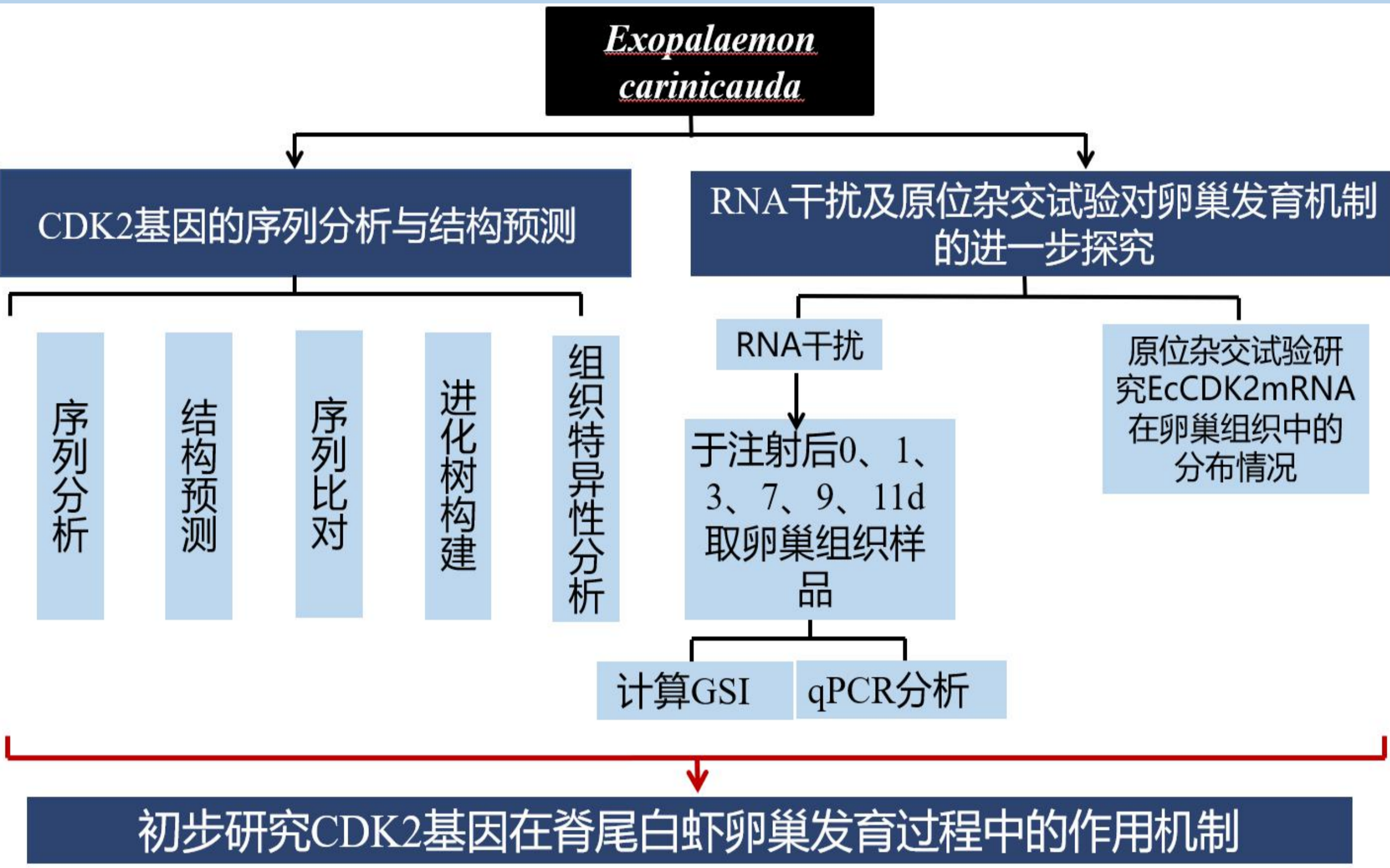
张攀1a,b、花松松1a,b、张思勉1a,b、王攀攀1a,b,2,3、阎斌伦1a,b,2,3、高焕1a,b,2,3

- (1. 江苏海洋大学a. 海洋科学与水产学院; b. 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏连云港 222005
- 2. 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222005;
- 3. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014;)

摘要

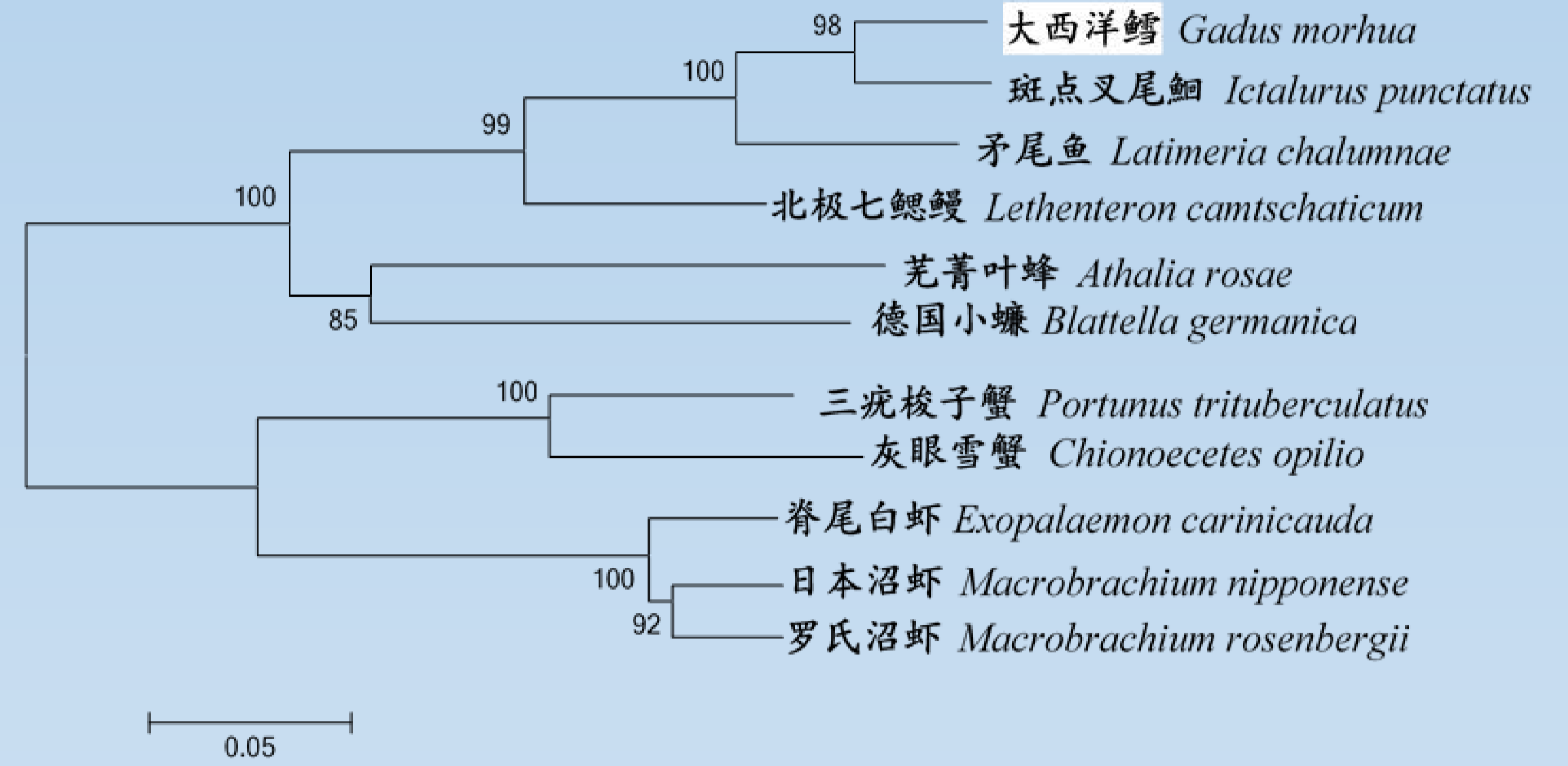
为了研究CDK2在卵巢发育过程中的分子调节机制, 本研究克隆得到CDK2基因全长cDNA序列, 并进行了相关研究, 结果如下: 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) CDK2全长 cDNA长度为1722bp, 开放阅读框918bp, 编码着305个氨基酸。在进化上与同为十足目的日本沼虾和罗氏沼虾亲缘关系最近。Ec-CDK2在卵巢中表达最高, 随着卵巢的发育Ec-CDK2的表达量逐渐增加, 并在III期达到到顶峰。RNAi结果显示, 注射dsRNA可以明显延缓卵巢发育周期。这些结果表明, Ec-CDK2在脊尾白虾外源性卵黄物质的积累中发挥了关键的作用, 为进一步研究脊尾白虾卵巢发育的分子调控机制提供理论基础。

技术流程



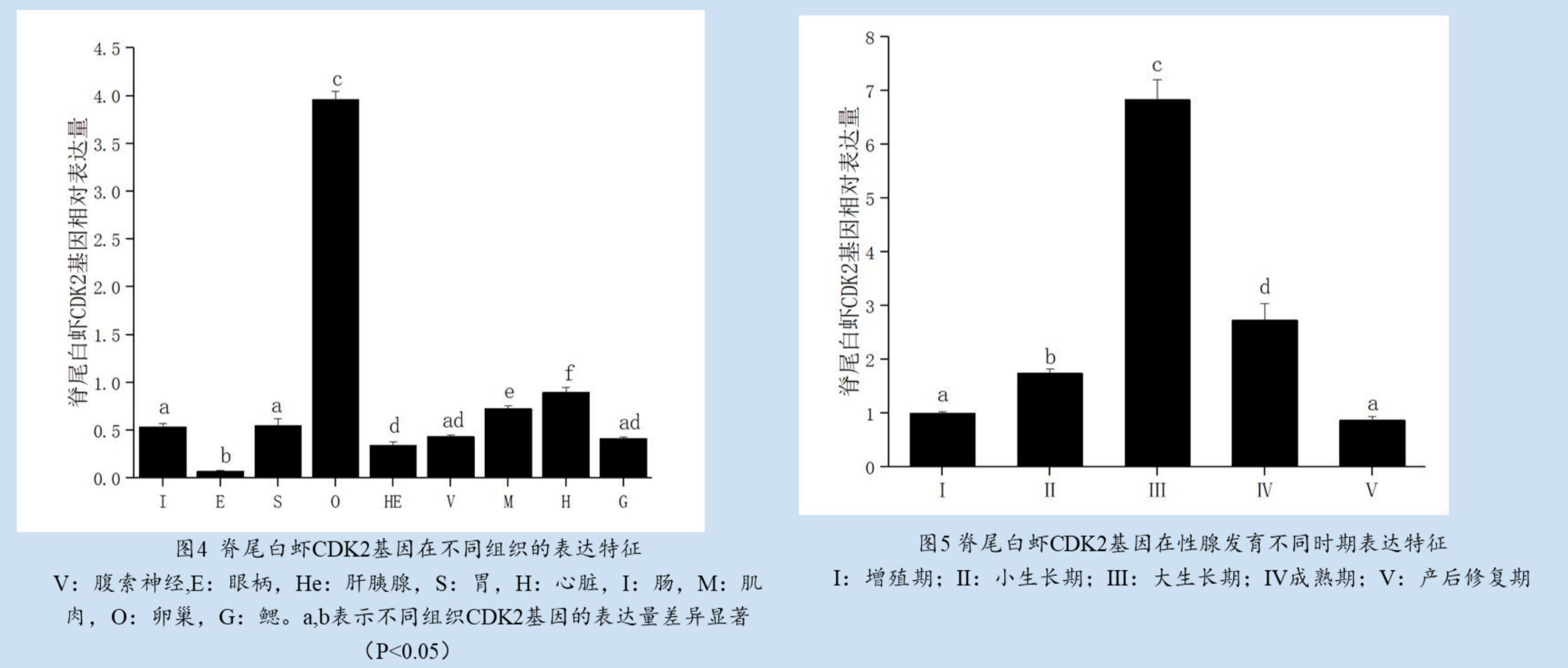
实验结果

(2) CDK2基因进化树的构建



脊尾白虾与同为十足目的日本沼虾和罗氏沼虾, 之后与三疣梭子蟹和芫菁叶蜂等节肢动物聚为了一支, 最后与北极七鳃鳗、矛尾鱼、大西洋鳕等脊索动物聚为了一支。

(3) EcCDK2表达特征分析



EcCDK2在脊尾白虾的眼柄、鳃、肝胰腺、肠道、胃、心脏、腹索神经、卵巢和肌肉9个组织中均有表达, 在性腺中表达水平是最高的, 从I期卵巢中至III期卵巢, 表达水平升高, 并在III期达到峰值。随着卵巢发育到IV期和V期, EcCDK2 mRNA表达水平显著降低。

实验结果

(1) EcCDK2基因全长cDNA生物学信息分析

Ec-CDK2基因cDNA全长为1722bp, 包括146bp5'-UTR, 658bp3'-UTR, 开放阅读框918bp, 第6-290aa处具有一个S₂TKc结合区域

图1 脊尾白虾CDK2基因的cDNA序列及预测的氨基酸序列
ATG起始密码子, TGA终止密码子, AATAAA多聚腺苷酸加尾信号

(2) CDK2氨基酸序列比对及同源性分析。

Mn-CDK2	MSVNYEKIERIGEGTGVYFAQIRIRRRVAKKRIENEVGVPSTAREITLLKEL	60
Mr-CDK2	MSVNYEKIERIGEGTGVYFAQIRIRRRVAKKRIENEVGVPSTAREITLLKEL	60
Pt-CDK2	MSVNYEKIERIGEGTGVYFAQIRIRRRVAKKRIENEVGVPSTAREITLLKEL	60
Co-CDK2	...MNMGNARQTEAVGNEPVALG...RASCVEGSSDVPSTAREITLLKEL	51
Ar-CDK2	...MMNEVIERIGEGTGVYFAQIRIRRRVAKKRIENEVGVPSTAREITLLKEL	59
Ec-CDK2	MSVNYEKIERIGEGTGVYFAQIRIRRRVAKKRIENEVGVPSTAREITLLKEL	60

(4) RNA干扰

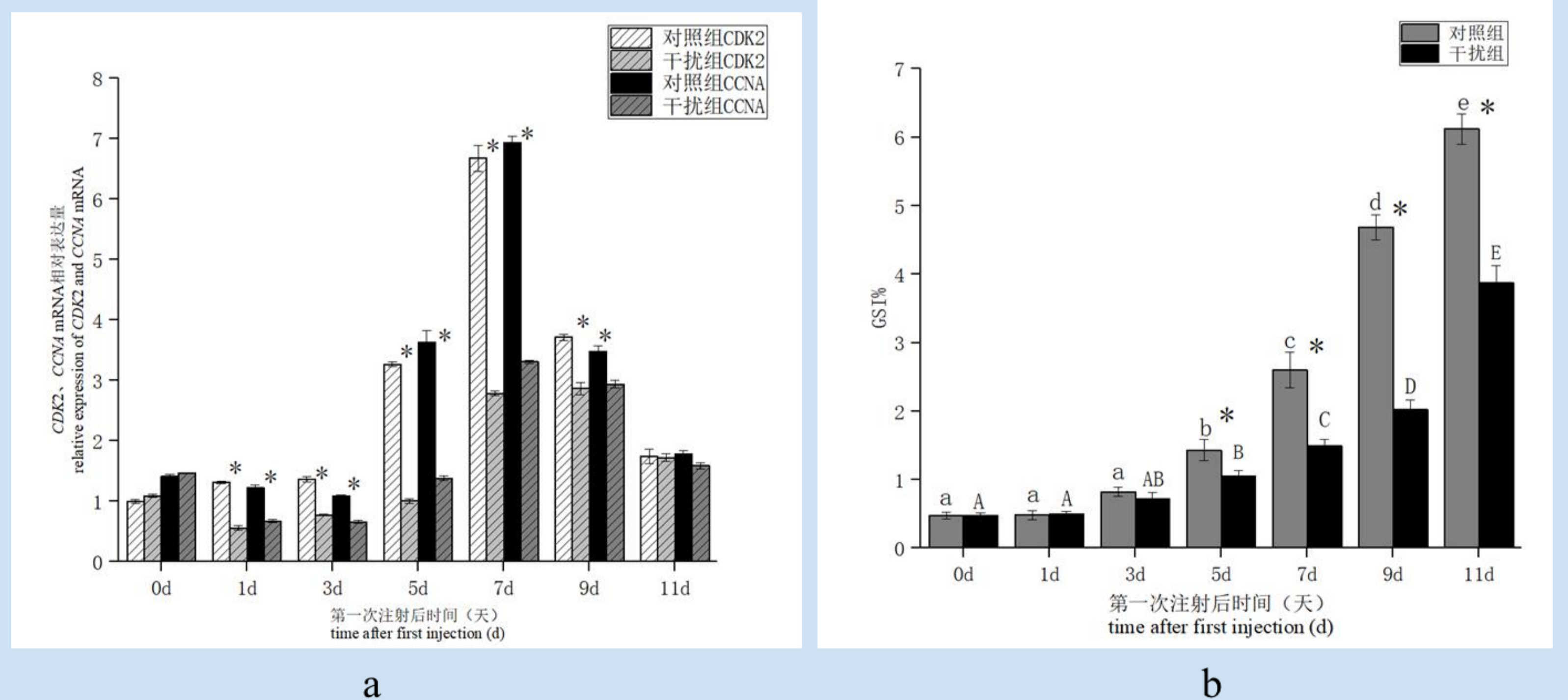


图6 a: Ec-CDK2 干扰后CDK2和CCNA在卵巢中的表达水平; b: Ec-CDK2 DsRNA (4μg/g) 对性腺体指数 (GSI) 的影响

干扰组脊尾白虾卵巢发育速度明显慢于对照组, 在第一次注射后第5天, 对照组和实验组GSI首次出现显著性差异, 此时对照组脊尾白虾卵巢发育接近III期, 在第9天对照组卵巢已经发育到IV期 (GSI>4.5%), 而干扰组生长到11天时尚未发育到IV期

结论

尾白虾CDK2全长 cDNA长度为1722bp, 编码着305个氨基酸。在各组织中均有表达, 在卵巢中表达量最高, 并且随着卵巢的发育其表达量不断增加, 在III期 (大生长期) 达到最高。RNA干扰试验表明了EcCDK2在卵子发生和外源性卵黄的合成运输中的具有关键性作用。

CDK2与其他物种中的CDK2蛋白表现为较高的同源性, 与日本沼虾和罗氏沼虾的同源性最高, 三疣梭子蟹和灰眼雪蟹次之, 黄翅菜叶蜂的同源性最低