

庞连慧,罗双双,石林林,等.团头鲂 *cdc20* 基因的序列特征和表达分析[J].华中农业大学学报,2022,41(4):226-232.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.028

团头鲂 *cdc20* 基因的序列特征和表达分析

庞连慧¹,罗双双¹,石林林¹,陈天圣²,刘红¹,王焕岭¹

1. 华中农业大学水产学院/农业农村部淡水生物繁育重点实验室,武汉 430070;
2. 集美大学水产学院/农业农村部东海海水健康养殖重点实验室,厦门 361021

摘要 为研究鱼类细胞分裂周期蛋白20基因(*cell division cycle 20 homolog, cdc20*)的功能,以团头鲂为试验对象,经PCR扩增获得了团头鲂 *cdc20* 基因的CDS,基于多序列比对和系统进化树分析该基因的结构和不同物种间的进化关系,采用半定量PCR(semi-quantitative reverse transcription PCR, sqRT-PCR)、荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和切片原位杂交的方法检测了该基因的时空表达模式。结果显示,该基因编码区所包含的序列长度为1 482 bp,编码493 aa。团头鲂 Cdc20氨基酸序列在进化上十分保守,具有7个WD40基序形成的稳定7叶β螺旋桨状结构,与鲤和斑马鱼的相似性最高。qRT-PCR结果显示团头鲂 *cdc20* 基因在早期胚胎中的表达量最高,随后呈下降趋势。sqRT-PCR检测发现 *cdc20* 基因主要在性腺中表达。性腺切片原位杂交结果显示 *cdc20* 在团头鲂各时期卵母细胞中均有表达,主要集中在Ⅱ期卵母细胞的胞质和Ⅲ、Ⅵ期卵母细胞的卵黄颗粒中;另外也发现该基因在精巢的精原细胞和生精小管的生殖上皮中表达量最高,在精子中的表达较低。以上结果表明团头鲂 *cdc20* 基因是一个母源基因,可能参与生殖细胞的发育。

关键词 团头鲂; *cdc20* 基因; 减数分裂; 母源基因; 表达模式; 性腺成熟

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0226-07

鱼类性腺成熟是生殖细胞不断增殖、分化成熟配子的过程,而配子的成熟需要经过2次减数分裂,其中涉及了同源染色体的配对、联会、重组和分离等,其中任何环节的异常都会导致减数分裂过程无法正常进行,进而导致配子发育的异常^[1],因此,这个过程需要精确而复杂的分子调控。细胞分裂周期蛋白20(*cell division cycle 20 homolog, CDC20*)是细胞周期、有丝分裂和减数分裂的重要调节因子^[2]。据报道,不同物种CDC20蛋白的结构域十分保守,一般含有7个WD40基序形成稳定的7叶螺旋桨状结构,作为支架介导泛素结合酶与底物之间相互结合^[3]。在卵母细胞减数分裂中,CDC20蛋白是同源染色体分离的关键因子,通过影响减数分裂的重要调控蛋白——后期促进复合物(anaphase promoting complex/cyclosome, APC/C)的活性促进Ⅱ期姐妹染色体分离。研究发现CDC20蛋白表达量降低会导致小鼠受精卵几乎不能正常发育^[4],而其蛋白失活会引起

胚胎死亡^[5]。在人类中,CDC20基因的突变导致女性不育^[6]和男性的生殖能力降低^[7]。这些研究表明CDC20在动物生殖、胚胎发育中发挥重要作用。目前,CDC20的功能研究在鱼类中尚未涉及。因此,为了解鱼类 *cdc20* 基因的功能,本研究以团头鲂为试验对象,对其 *cdc20* 基因的序列特征、系统进化和时空表达模式进行初步研究,旨在为后续的基因功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 团头鲂总RNA的提取与cDNA合成

使用TRIzol(康为世纪生物科技股份有限公司)提取团头鲂成鱼不同组织的总RNA,包括脑、眼睛、鳃、心脏、肝脏、脾脏、肠、肾脏、卵巢、精巢和肌肉。采集不同发育时期(受精卵、2-细胞期、16-细胞期、囊胚期、原肠期、神经期、体节期、心跳期和孵化期)的胚胎并提取总RNA。将提取的总RNA用Prime-Script[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser (TaKa-

收稿日期:2022-04-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31872542)

庞连慧,E-mail:819555965@qq.com

通信作者:王焕岭,E-mail:hbauwhl@hotmail.com

Ra)试剂盒进行反转录合成第一链cDNA。

1.2 团头鲂 *cdc20* 基因的克隆和进化分析

将斑马鱼的 *cdc20* cDNA 序列 (Accession: NM_213080) 与笔者所在实验室的团头鲂转录组数据进行比对, 获得团头鲂 *cdc20* 基因的编码区序列。并根据此序列使用 Oligo 7 和 Beacon Designer 7 软件设计 PCR 引物以扩增团头鲂 *cdc20* 基因的编码区序列。根据预测的氨基酸序列利用 ClustalX 软件进行多序列比对以及使用 SWISS 在线网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白结构域; 基于 MEGA 6.0 软件的 Neighbor-joining 方法构建进化树。

1.3 sqRT-PCR

采用 sqRT-PCR 方法检测 *cdc20* 基因在团头鲂成鱼各组织中的表达模式, 以 β -actin 作为内参基因, 引物序列见表 1。PCR 条件如下: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 10 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增结束后, 取 10 μ L PCR 产物, 使用 1% 的琼脂糖凝胶, 140 V 电压下电泳 15 min, 检测该基因在各组织中的表达量。

1.4 qRT-PCR

使用 SYBR[®] Green qPCR Mix 试剂盒, 在 CFX96 Real-Time PCR Detection System 中进行 qRT-PCR。每个样品 3 次重复, 以 β -actin 作为内参基因。以团头鲂不同发育时期胚胎的 cDNA 为模板, 参照下列反应体系进行 PCR 扩增: 模板 cDNA 1 μ L, 正向引物和反向引物各 0.4 μ L; SYBR[®] Green qPCR Mix 10 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 10 s, 39 个循环; 72 °C 5 min。结果通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *cdc20* 的相对表达量, 数值用“平均值 \pm 标准差” ($n=3$) 表示, 用 GraphPad Prism 8 软件作图。采用单因素方差分析方法 (ANOVA) 和 Duncan's 检测 mRNA 表达水平的差异, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。

1.5 性腺组织切片 H.E 染色及观察

团头鲂的性腺组织用 4% PFA (DEPC 水处理) 固定后送武汉赛维尔公司做切片, 依次将切片进行如下操作: 二甲苯洗 2 次, 每次 20 min; 无水乙醇洗 2 次, 每次 10 min; 95% 乙醇 5 min; 90% 乙醇 5 min; 80% 乙醇 5 min; 70% 乙醇 5 min; 蒸馏水冲洗后, 苏木素染色 3~8 min, 自来水洗; 1% 的盐酸乙醇分化数秒, 自来水冲洗; 0.6% 氨水返蓝, 流水冲洗; 伊红染液中染色 1~3 min; 将切片放入 95% 乙醇洗 2 次, 每次

5 min; 无水乙醇洗 2 次, 每次 5 min; 二甲苯洗 2 次, 每次 5 min, 切片拿出来稍晾干, 中性树胶封片。以上操作完成后于显微镜 (Leica, DFC550) 下观察。

1.6 切片原位杂交

以团头鲂 *cdc20* cDNA 序列作为模板, 设计探针引物 (表 1), 在反向引物的 5' 端加上 T7 启动子序列, 并参照下列反应体系进行体外转录: DNA 模板 1 μ g, 10 \times transcription buffer 2 μ L, T7/SP6 RNA 聚合酶 2 μ L, DIG-NTP Mix 2 μ L, RNase Inhibitor 1 μ L, RNase-free 水加至 20 μ L; 体系混匀后, 37 °C 水浴 4 h 后完成体外转录, 合成的探针大小为 342 bp。利用石蜡切片进行原位杂交, 具体如下: 二甲苯洗 5 次, 每次 5 min; 二甲苯: 无水乙醇 (体积比) = 1:1 洗 2 次, 每次 3 min; 无水乙醇洗 2 次, 每次 3 min; 依次用 95%、90%、85%、75%、50% 乙醇各洗 1 次, 每次 3 min; 85 °C DEPC 水洗 3 min; 滴加 65 °C 预热的预杂交液, 预杂交 1~2 h; 然后将 5 ng/ μ L 探针滴加到组织块上, 放入湿盒, 65 °C 杂交过夜; 用 2 \times SSCT 65 °C 清洗切片 2 次, 每次 30 min; 0.2 \times SSCT 65 °C 清洗切片 15 min, 50% 甲酰胺/2 \times SSCT 65 °C 清洗切片 2 次, 每次 30 min; 用 5% 的羊血清封闭 1~2 h; 二抗 (Anti-Digoxigenin-AP) 室温孵育 1.5 h; 滴加 BCIP/NBT (1 mL 平衡液加 4.5 μ L NBT 和 3.5 μ L BCIP) 染色; 显色完成后置于显微镜下观察。

2 结果与分析

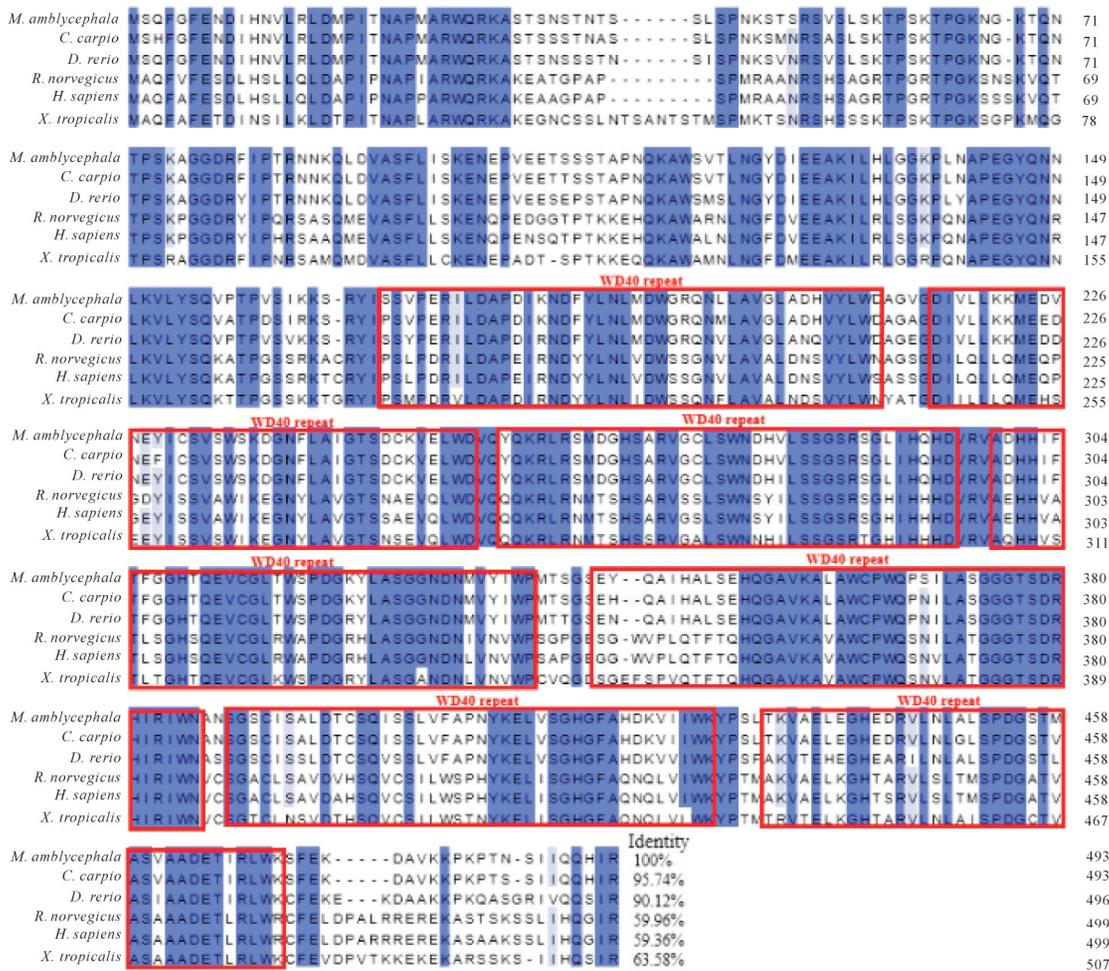
2.1 团头鲂 *cdc20* 基因的分子特征和进化分析

通过 PCR 测序及生物信息学分析证实团头鲂 *cdc20* 编码区的基因组长 3 960 bp, 包含 10 个外显子和 9 个内含子, cDNA 长 1 482 bp, 编码 493 aa; 预测蛋白的理论分子质量为 5.44 ku, 等电点为 7.68。氨基酸序列多重比对结果显示 (图 1), 团头鲂 Cdc20 与鲤和斑马鱼的相似度分别高达 95.74% 和 90.12%, 与大鼠、人类和非洲爪蟾的相似度分别为 59.96%、59.36% 和 63.58%。结构域分析显示 Cdc20 有 7 个 WD40 重复基序, 且该基序在不同物种中都相对保守, 进一步分析发现每个 WD40 基序形成 4 股反向平行 β 折叠, 7 个 WD40 基序构成稳定的 7 叶螺旋桨状结构 (图 2)。

基于多个物种 Cdc20 氨基酸序列的系统进化分析显示, 团头鲂与鲤的系统进化关系最近, 其次是斑马鱼。而亲缘关系较远的两栖类、鸟类和哺乳类形成一个独立分支 (图 3)。

表1 本研究所用引物
Table 1 All primers used in this study

引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	用途 Usage
<i>cdc20</i> ORF-F	TGCATCAGAGGAACGAAGTTG	ORF 扩增 Amplification of ORF
<i>cdc20</i> ORF-R	AAACCTCCCAACTCCTGTTT	
<i>cdc20</i> -QF	TACAGCACCAAATCAGAAAGC	表达分析 Expression analysis
<i>cdc20</i> -QR	TCTGCCTTCCCCAATCCATTA	
<i>cdc20</i> -Probe-F	TATCTGAACCTAATGGATTGG	合成 <i>cdc20</i> 探针 Synthesis of <i>cdc20</i> probe
<i>cdc20</i> -Probe-R	TAATACGACTCACTATAGGGTCTGCTACTCTAACATCAT	
β -actin-QF	AAAATCAAGATCATCGCCCCAC	表达分析(内参基因) Expression analysis (internal gene)
β -actin-QR	TACTCTGCTTGCTAATCCAC	



所有氨基酸一致用深蓝色表示,75%一致用浅蓝色表示;WD40重复序列区域用红色框标识。Identical amino acids are indicated in navy blue and 75% in light blue; the WD40 repeat domains are noted with red frames.

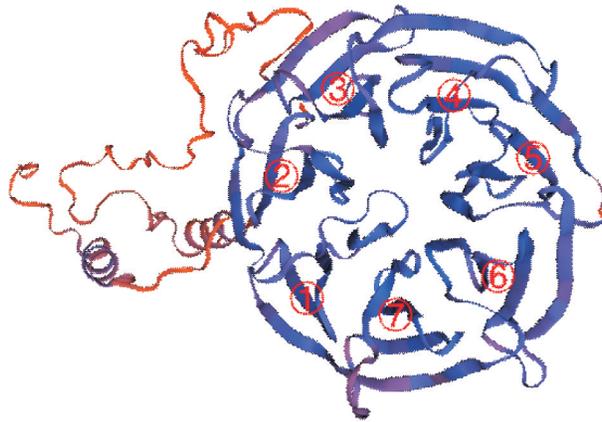
图1 团头鲂 Cdc20 蛋白的多序列比对

Fig.1 Multiple sequence alignment of Cdc20 proteins of *Megalobrama amblycephala*

2.2 团头鲂 *cdc20* 在成鱼各组织和胚胎发育各时期的表达

通过 sqRT-PCR 检测 *cdc20* 基因在团头鲂成鱼

不同组织中的表达情况,结果如图4所示,*cdc20* mRNA 在脑、鳃、心脏、脾脏、肠道、肾脏和肌肉中有微弱的表达,而在卵巢和精巢中表达量最高,说明



①~⑦分别代表每个WD40基序形成的四股反向平行的β折叠结构。①~⑦ represents four-stranded antiparallel β-sheets folded by each WD40 motif.

图2 团头鲂Cdc20蛋白预测的三级结构

Fig.2 Predicted structure model of *M. amblycephala* Cdc20 protein

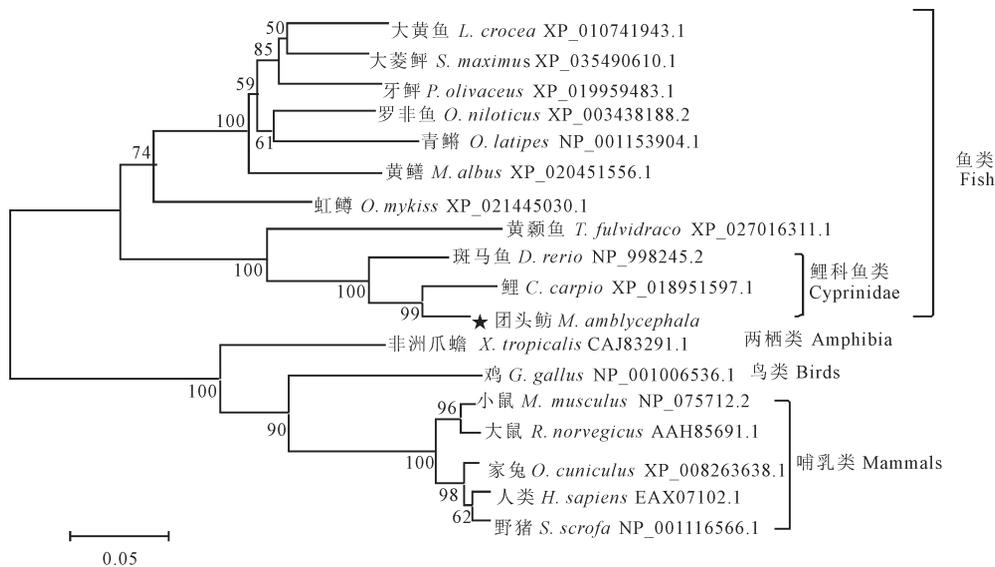


图3 脊椎动物CDC20蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic analysis of the protein sequences of CDC20 in vertebrates



M: Marker; Br: 脑 Brain; E: 眼睛 Eye; G: 鳃 Gill, H: 心脏 Heart; S: 脾脏 Spleen; I: 肠道 Intestine; K: 肾脏 Kidney; O: 卵巢 Ovary; T: 精巢 Testis; Mu: 肌肉 Muscle; C: 空白对照 Control.

图4 团头鲂 *cdc20* 基因在成鱼各组织中的表达

Fig.4 Expression of *cdc20* gene in different tissues of *M. amblycephala*

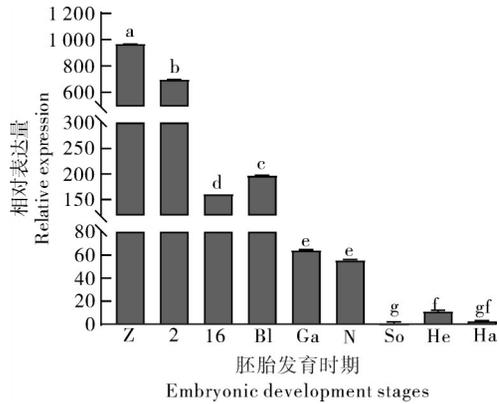
cdc20 可能与团头鲂性腺发育有关。

通过 qRT-PCR 检测 *cdc20* 在团头鲂各发育阶段胚胎中的表达情况,包括受精卵、2-细胞期、16-细胞期、囊胚期、原肠期、神经期、体节期、心跳期和孵化

期。结果(图5)显示该基因在受精卵中的表达水平最高,随着胚胎发育的进行,其表达量呈逐渐下降的趋势,推测团头鲂 *cdc20* 可能是1个母源基因,对维持胚胎的早期发育具有重要作用。

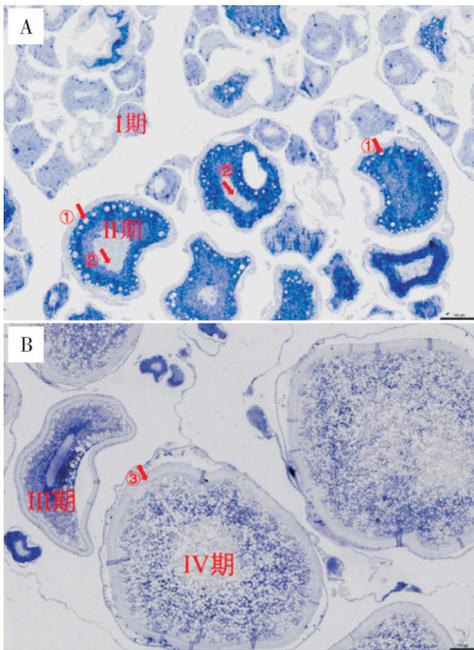
2.3 团头鲂 *cdc20* 在生殖细胞中的表达模式

根据团头鲂性腺切片原位杂交的结果(图6), *cdc20* 基因在 I 期卵母细胞信号最弱。卵母细胞进入 II 期后,其表达量开始升高,且在卵母细胞的胞质内表达,而在皮质泡和细胞核中几乎没有表达。而在 III 期卵母细胞的卵黄颗粒中检测到了强烈的探针信号,但细胞核中信号较弱。IV 期卵母细胞中充满了卵黄颗粒,观察不到细胞核和皮质泡, *cdc20* 基因在 IV 期卵母细胞的卵黄颗粒中表达,而在放射带几



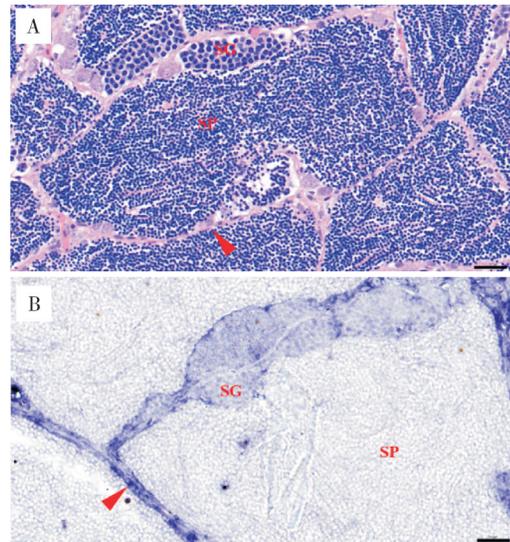
柱上的不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。Different letters mean significant differences, $P < 0.05$. Z: 受精卵时期 Zygote stage; 2: 2-细胞期 2-cell stage; 16: 16-细胞期 16-cell stage; Bl: 囊胚期 Blastocyst stage; Ga: 原肠期 Gastrula stage; N: 神经期 Neural stage; So: 体节期 Somite stage; He: 心跳期 Heartbeat stage; Ha: 孵化期 Hatching stage.

图5 团头鲂 *cdc20* 基因在胚胎发育各时期中的表达
Fig.5 Expression of *cdc20* gene at different embryonic development stages of *M. amblycephala*



A: 团头鲂 II 期卵巢, 以 I 期和 II 期卵母细胞为主。B: 团头鲂 IV 期卵巢, 以 IV 期卵母细胞为主, 同时含有少量 III 期卵母细胞。① 箭头表示皮质泡; ② 箭头表示细胞核; ③ 箭头表示放射带。比例尺: 100 μm 。A: Stage II ovary of *M. amblycephala*, mainly consisted of oocytes with stage I and stage II. B: Stage IV ovary of *M. amblycephala*, mainly consisted of oocytes with stage IV and several stage III. ① Arrow indicates cortical vesicles; ② Arrow indicates nuclei; ③ Arrow indicates radial band. Bar: 100 μm .

图6 *cdc20* 基因在团头鲂不同发育时期卵母细胞中的表达
Fig.6 Expression of *cdc20* gene at different development stages of *M. amblycephala* oocytes



A: 精巢 H.E 染色; B: 精巢切片原位杂交。SG: 精原细胞; SP: 精子。红色箭头表示生殖上皮。比例尺: 20 μm 。A: HE staining of testis; B: *In situ* hybridization of testis. SG: Spermatogonia; SP: Sperm. The red arrow indicates the germinal epithelium. Bar: 20 μm .

图7 团头鲂 *cdc20* 基因在精巢中的表达
Fig.7 Expression of *cdc20* gene in testis of *M. amblycephala*

乎不表达。与 H.E 染色(图 7A)对比, 基于精巢切片原位杂交的结果显示, 在精原细胞以及生精小管的生殖上皮中该基因的表达量最高, 而在成熟精子中的表达量低(图 7B)。

3 讨论

CDC20 蛋白通过 C 端的 WD40 结构域(即 WD40 基序)识别、激活和结合 APC/C 调节细胞分裂中姐妹染色体的分离^[8], 被认为是生殖细胞成熟的重要调节因子^[9], 在生物体生长和生殖中发挥重要作用。WD40 蛋白最早在牛的 G 蛋白 β 亚基中发现^[10], 该蛋白的 7 个 WD40 基序形成稳定的螺旋桨状结构^[11], 参与信号转导、染色质组装、凋亡、细胞周期调控等过程^[12]。本研究发现团头鲂 Cdc20 包含的 7 个 WD40 基序可形成 7 叶螺旋桨状结构, 这种特殊的结构形成稳定的支架, 为蛋白质的识别和组装提供位点, 并增强蛋白之间的互作^[12]。氨基酸序列和结构域的保守性说明团头鲂 *cdc20* 基因可能与在小鼠、人类中的功能相类似, 参与了细胞周期调控、有丝分裂和减数分裂的过程。

本研究还发现, 团头鲂 *cdc20* 主要在性腺中表达。类似地, 有研究发现 *cdc20* 基因在斑马鱼性腺中高表达, 且对斑马鱼卵子和精子发生过程具有重要

作用^[13]。在其他物种中,该基因同样与生殖相关。小鼠CDC20蛋白表达量的降低导致雌性失去生殖能力^[5],人类CDC20基因发生突变导致女性不孕^[6]和男性无精子症^[7]。因此,我们推测团头鲂 *cdc20* 基因可能参与生殖和性腺发育。另外,本研究发现在卵巢成熟过程中,随着卵母细胞的发育,该基因的表达量逐渐升高,这与在猪卵母细胞中的表达一致^[14]。而精巢切片的原位杂交结果与卵巢相反,*cdc20*在精原细胞中的表达量最高,而在发育成熟的精子中表达量最低。这些研究结果说明,*cdc20*基因可能在团头鲂卵巢和精巢中发挥的功能不同,在卵巢中可能参与卵母细胞的成熟过程,而在精巢中对精原细胞早期的形成具有重要作用。

此外,团头鲂 *cdc20*在胚胎发育早期大量表达,然后逐渐下降,因此推测该基因是一个母源基因,对早期胚胎发育具有重要意义,包括激活卵子、促进早期的卵裂、促进合子基因的表达等^[15]。在秀丽隐杆线虫中的研究发现,CDC20蛋白与APC/C复合物结合后参与母源因子卵母细胞成熟蛋白(oocyte maturation proteins, OMA)介导的卵母细胞到早期胚胎发育的过程^[16]。此外,有文献报道APC/C复合物是一个母源因子^[17],而APC/C复合物的激活需要CDC20蛋白,由此推测CDC20蛋白存在于胚胎发育的早期。这些结果说明团头鲂 *cdc20*可能是1个母源基因。

综上,本研究克隆并分析了团头鲂 *cdc20*基因的序列特征及其时空表达模式,结果可为后续深入研究该基因的功能奠定理论基础。

参考文献 References

- [1] BAUDAT F, IMAI Y, DE MASSY B. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation [J]. *Nature reviews genetics*, 2013, 14(11): 794-806.
- [2] HADJIHANNAS M V, BERNKOPF D B, BRÜCKNER M, et al. Cell cycle control of Wnt/ β -catenin signalling by conductin/axin2 through CDC20 [J]. *EMBO reports*, 2012, 13(4): 347-354.
- [3] YU H T. Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine [J]. *Molecular cell*, 2007, 27(1): 3-16.
- [4] JIN F, HAMADA M, MALUREANU L, et al. Cdc20 is critical for meiosis I and fertility of female mice [J/OL]. *PLoS genetics*, 2010, 6(9): e1001147 [2022-04-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001147>.
- [5] LI M, SHIN Y H, HOU L F, et al. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory [J]. *Nature cell biology*, 2008, 10(9): 1083-1089.
- [6] ZHAO L, XUE S G, YAO Z Y, et al. Biallelic mutations in CDC20 cause female infertility characterized by abnormalities in oocyte maturation and early embryonic development [J]. *Protein & cell*, 2020, 11(12): 921-927.
- [7] LI L W, FAN L Q, PENG N N, et al. R383C mutation of human CDC20 results in idiopathic non-obstructive azoospermia [J]. *OncoTarget*, 2017, 8(59): 99816-99824.
- [8] PETERS J M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2006, 7(9): 644-656.
- [9] GOTO M, EDDY E M. Speriolin is a novel spermatogenic cell-specific centrosomal protein associated with the seventh WD motif of Cdc20 [J]. *Journal of biology chemistry*, 2004, 279(40): 42128-42138.
- [10] FONG H K, HURLEY J B, HOPKINS R S, et al. Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the CDC4 gene and identification of related mRNAs [J]. *PNAS*, 1986, 83(7): 2162-2166.
- [11] LAMBRIGHT D G, SONDEK J, BOHM A, et al. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein [J]. *Nature*, 1996, 379(6563): 311-319.
- [12] STIRNIMANN C U, PETSALAKI E, RUSSELL R B, et al. WD40 proteins propel cellular networks [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2010, 35(10): 565-574.
- [13] GROH K J, SCHÖNENBERGER R, EGGEN R I L, et al. Analysis of protein expression in zebrafish during gonad differentiation by targeted proteomics [J]. *General and comparative endocrinology*, 2013, 193: 210-220.
- [14] YAMAMURO T, KANO K, NAITO K. Functions of FZR1 and CDC20, activators of the anaphase-promoting complex, during meiotic maturation of swine oocytes [J]. *Biology of reproduction*, 2008, 79(6): 1202-1209.
- [15] 胥鹏飞, 孟安明. 斑马鱼母源因子在胚胎发育中的作用 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44(10): 954-964. XU P F, MENG A M. Maternal factors regulate embryonic development in zebrafish [J]. *Scientia sinica*, 2014, 44(10): 954-964 (in Chinese with English abstract).
- [16] HU Y B, HU X W, LI D C, et al. The APC/C FZY-1/Cdc20 complex coordinates with OMA-1 to regulate the oocyte-to-embryo transition in *Caenorhabditis elegans* [J/OL]. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2021, 9: 749654 [2022-04-01]. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.749654>.
- [17] VERLHAC M H, TERRET M E, PINTARD L. Control of the oocyte-to-embryo transition by the ubiquitin-proteolytic system in mouse and *C. elegans* [J]. *Current opinion in cell biology*, 2010, 22(6): 758-763.

Sequence characteristics and expression analysis of *cdc20* gene in *Megalobrama amblycephala*

PANG Lianhui¹, LUO Shuangshuang¹, SHI Linlin¹, CHEN Tiansheng², LIU Hong¹, WANG Huanling¹

1. *Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/
College of Fisheries, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China;*

2. *Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture
and Rural Affairs/College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China*

Abstract In order to investigate function of cell division cycle 20 homolog (Cdc20), in the present study, the coding sequence (CDS) of *Megalobrama amblycephala cdc20* gene was cloned, and the domains and evolutionary relationship of Cdc20 were analyzed based on multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. The temporal and spatial expression patterns of *cdc20* were detected by semi-quantitative reverse transcription PCR (sqRT-PCR), quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and *in situ* hybridization. The results showed that the *cdc20* CDS of *M. amblycephala* is 1 482 bp in length and encodes 493 aa. Multiple sequence alignments and phylogenetic analysis revealed that amino acids sequences of Cdc20 were very conserved through evolution and consisted of seven-bladed β propeller structure, which was formed by seven WD40 motifs. The similarity of *M. amblycephala* Cdc20 was the highest with those of *Danio rerio* and *Cyprinus carpio*. Based on qRT-PCR, the mRNA levels of *cdc20* were the highest at the zygote stage, and gradually decreased with the development of embryos. Additionally, the *cdc20* gene also exhibited tissue-specific expression pattern, which was abundant in the gonads based on sqRT-PCR. The results of *in situ* hybridization showed that the *cdc20* mRNA was widely expressed in all stages of *M. amblycephala* oocytes, mainly in the cytoplasm of stage II oocytes and the yolk granules of stage III and IV oocytes. In the testis, the *cdc20* expression was the highest in spermatogonia and reproductive epithelium, but low in sperm. In conclusion, the results suggested that the *M. amblycephala cdc20* may be a maternal gene and play a vital role in the development of germ cells.

Keywords *Megalobrama amblycephala*; *cdc20* gene; meiosis; maternal gene; expression pattern; gonad maturity

(责任编辑:边书京)