论文

BmCyclin B 和 *BmCyclin B3* 是家蚕细胞周期进程所必需的

潘敏慧, 洪开丽, 陈向云, 潘春, 陈雪梅, 匡秀秀, 鲁成*

西南大学, 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

* 联系人, E-mail: lucheng@swu.edu.cn

收稿日期: 2012-08-14; 接受日期: 2013-01-04

国家自然科学基金(批准号: 31272505, 31172269)和高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20120182110010)资助项目

摘要 B 型细胞周期蛋白(Cyclin B)是细胞 G2 期向 M 期转化的重要调节因子. 家蚕基因组数据分析表明, 家蚕有 2 个 *Cyclin B* 基因, 即 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3*. 利用家蚕 EST 数据, 成功克隆了家蚕 *Cyclin B3* 基因(EU074796), 该基因全长 1665 bp, ORF 长 1536 bp, 由 6 个内含子和 7 个外显子构成, 编码 511 个氨基酸, 含有 1 个蛋白破坏盒和 2 个周期蛋白盒, 预测分子量 57.8 kD. 家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 的 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因 RNA 干扰结果表明, *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 是家蚕细胞完成细胞周期进程所必需的, 二者干涉后均能导致细胞周期阻滞于 G2/M 期, 抑制细胞的增殖.

关键词家蚕
细胞周期
BmCyclin B
BmCyclin B3
细胞增殖

Cyclin B 是一种有丝分裂细胞的周期蛋白, 它从 G1 期晚期开始表达并逐渐积累, 到 G2 期后期达到最大值并一直维持到 M 期的中期, 然后迅速降解. 它的积累和降解在细胞有丝分裂和减数分裂中起关键作用^[1-3]. 所有细胞周期蛋白都具有周期蛋白盒(Cyclin box)和周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)结合域. A 和 B 型周期蛋白具有 1 个周期蛋白破坏盒(destruction-box, D-盒), 位于近 N 端的 9 个氨基酸, 是在细胞有丝分裂过程中细胞周期蛋白的泛素依赖性降解所需要的靶标^[4-6].

Cyclin B 基因在系统演化上形成了两大分支, 即 B 型周期蛋白家族和 B3 型周期蛋白家族^[7]. B 型周期蛋白存在于酵母和高等真核生物中. 在无脊椎动物中, 只有唯一一个周期蛋白 Cyclin B 被发现, 而在脊椎动物中 B-type 周期蛋白有一对, Cyclin B1 和

Cyclin B2, 它们是紧密联系的, 并且在亚细胞定位上存在差异^[8,9]. B3 型周期蛋白家族在后生动物中是保守的, 在周期蛋白盒上的相似性在 39%~46% 之间^[10-12]. Cyclin B 和 Cyclin B3 均有 1 段相当保守的氨基酸序列, 称为细胞周期蛋白盒, 与 CDK1 结合形成复合体, 被 CDK 激活激酶(CDK activating kinase, CAK)激活后通过一系列级联反应从而驱动细胞通过 G2 期限制点进入 M 期, 推动细胞周期进程. 家蚕 *Cyclin B* 基因(*BmCyclin B*)最初由蚕卵克隆得到^[13]. 在家蚕卵巢细胞系里, 用病毒感染细胞, 发现病毒感染后的细胞 *BmCyclin B* 表达下降, 24 h 后几乎没有 *BmCyclin B* 的表达, 随着病毒的感染 BmN 细胞停滞在 G2/M 期^[14].

家蚕(*Bombyx mori*)是完全变态昆虫, 也是鳞翅目昆虫的典型代表, 其细胞周期调控机制的解析将

引用格式: 潘敏慧, 洪开丽, 陈向云, 等. *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 是家蚕细胞周期进程所必需的. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 240-246, doi: 10.1360/052012-285

英文版见: Pan M H, Hong K L, Chen X Y, et al. *BmCyclin B* and *BmCyclin B3* are required for cell cycle progression in the silkworm, *Bombyx mori*. Sci China Life Sci, 2013, 56, doi: 10.1007/s11427-013-4459-3

推动家蚕模式生物化研究的进程. 利用家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1, 本实验克隆了家蚕 *Cyclin B3* 基因 (*BmCyclin B3*), 并分析了 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 在家蚕细胞周期进程中的功能.

1 材料与方法

1.1 细胞系与家蚕

家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1^[15]和家蚕丝腺细胞系 BmSG-SWU1 于 27℃, 在含有 10%胎牛血清的 Grace 昆虫培养基中培养; 家蚕幼虫(大造品种)于 25℃下用新鲜桑叶按 12 h:12 h 的昼夜光照周期常规饲养.

1.2 生物信息分析

用于生物信息分析的数据库(包括家蚕 9X 基因组数据库、家蚕 EST 数据库和家蚕预测蛋白质库)均来自 <http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>. 果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 *Cyclin B*(M33192)和 *Cyclin B3*(AJ012568)基因序列来自美国国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 并作为分析的询问序列. 应用 BlastP 软件以果蝇 *Cyclin B3* 基因的蛋白质预测序列作为询问序列在家蚕预测蛋白质库中进行同源比对, 得到候选家蚕基因后再将这些基因在 NCBI 蛋白质数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进一步确认. 以家蚕候选基因的保守区域为询问序列, 对家蚕预测蛋白质库进行 BlastP 检索和对家蚕 9X 基因组数据库进行 TblastN 检索.

1.3 RNA 提取和 cDNA 制备

利用 Trizol 试剂(invitrogen, USA)提取 BmN-SWU1 细胞、BmSG-SWU1 细胞和家蚕 5 龄 3 天的组织(包括丝腺和卵巢)的总 RNA, 通过分光光度计(Gene Spec V; HITACHI, Japan)测定 RNA 浓度. 应用 cDNA 合成试剂盒(Promega, USA)合成 cDNA, cDNA 合成方法按照试剂盒操作说明书进行.

1.4 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因的克隆

BmCyclin B 基因的 PCR 引物依据 *BmCyclin B* 基因序列设计^[13], 其正向引物为 5'-GGAGACAACAACAGCCCTT-3', 反向引物为 5'-AAACAAAATCGCCAACATC-3'. *BmCyclin B3* 基因的 PCR 引物依据推

测的 *BmCyclin B3* 基因序列设计, 其正向引物为 5'-AAAAGTAGGTCCGTAATGGCG-3', 反向引物为 5'-GATCTTGCGGACTAGGCTAACAG-3'. PCR 扩增体系为 25 μL: 6 μg cDNA, 15 pmol 正、反向引物各 1 μL, 2 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 0.25 mmol/L dNTP 1 μL, 1× 缓冲液 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 加双蒸水至 25 μL. PCR 扩增程序为: 首先 94℃变性 5 min; 再执行 25 个循环, 循环程序为 94℃变性 50 s, 55℃退火 40 s, 72℃延伸 90 s; 最后 72℃延伸 10 min. PCR 扩增产物用 1%琼脂糖电泳检测, 目的条带用 Qiaex II 胶回收试剂盒(Qiagen, USA)回收, 并亚克隆到 pGEM-T 载体(Promega, USA)上, 用 ABI PRISM™ 310 遗传分析仪(PE Applied Biosystems, USA)进行 DNA 测序.

1.5 *BmCyclin B3* 基因的序列分析

BmCyclin B3 基因的内含子和外显子通过 Sim4 在线预测(<http://gamay.univ-perp.fr/analyseseq/sim4>). *BmCyclin B3* 的蛋白质分子量和保守结构域通过 Expasy 在线预测(<http://expasy.org/cgi-bin>). *BmCyclin B3* 的蛋白质与 NCBI 中其他物种的 *Cyclin B* 蛋白质序列通过 ClustalW 软件进行比对分析, 这些物种包括家蚕、果蝇、鸡(*Gallus gallus*)和线虫(*Caenorhabditis elegans*). 家蚕、果蝇、鸡、线虫、人类(*Homo sapiens*)、鼠(*Mus musculus*)和爪蟾(*Xenopus laevis*)等不同物种的 *Cyclin B* 蛋白序列的系统发育树通过 MEGA4.0 软件构建^[16].

1.6 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因表达分析

通过 5 龄 3 天的家蚕芯片数据(<http://www.silkdb.org/microarray/Bmarray.php>)对 *BmCyclin B3* 和 *BmCyclin B* 基因的表达情况进行分析. *BmCyclin B*(引物 P1: 5'-GGAGACAACAACAGCCCTT-3'; 5'-AAACAAAATCGCCAACATC-3'), *BmCyclin B3*(引物 P1: 5'-AAGACCCACCCAAGCAAGT-3'; P2: 5'-TCGTCAATAGGGAAAAGGC-3'), *BmCyclin A*(引物 P1: 5'-ACCCTCAGTAATAGCAGCGT-3'; P2: 5'-GCCTTCAAACCTTGTTGCTCT-3'), *BmPCNA*(引物 P1: 5'-AAAGTTCTCGGCAACAGGC-3'; P2: 5'-CGCCAGGTAGTAGCGGATGT-3')和 *Bmaction3*(P1: 5'-AACACCCCGTCCTGCTCACTG-3'; P2: 5'-GGGCGAGACGTGTGATTCCT-3')等基因的表达通过 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa, China)进行检测. 利用成对引物 P1 和 P2

进行 RT-PCR, 模板为 300 ng 来自 5 龄 3 天的家蚕组织的 cDNA. RT-PCR 扩增程序为: 首先 94℃ 变性 3 min; 再执行 30 个循环, 循环程序为 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s; 最后 72℃ 延伸 10 min. 家蚕 *actin-3* 基因作为内参, PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖电泳后在凝胶成像系统 Gel Doc 2000(BIO-RAD, USA)上检测.

1.7 双链 RNA 的制备

利用 RNA 合成试剂盒(Ribomax™ Large Scale RNA Production System-T7 和 Ribomax™ Large Scale RNA Production System-SP6, Promega)合成 *BmCyclin B* (引物 P1: 5'-GGAGACAACAACAGC-CCTT-3'; 5'-AAACAAAATCGCCAACATC-3')和 *BmCyclin B3* (引物 P1: 5'-AAGACCCACCCAAGCAA-GT-3'; P2: 5'-TCGTCAATAGGGAAGGC-3')的双链 RNA(dsRNA). 正义和反义链通过混合、消化和沉淀, 得到 dsRNA.

1.8 RNA 干扰(RNAi)

dsRNA 通过 FuGENE[®]HD 转染试剂(Roche, USA)进行转染, 转染方法按照说明书进行. dsRNA 用转染试剂稀释到 2 μg/100 mL 配成转染混合液. 转染混合液室温放置 45 min 后进行细胞转染. RNAi 实验分成 5 个处理组: 对照 1(未进行任何处理的正常 BmN-SWU1 细胞)、对照 2(18 μL 的转染试剂处理细胞)、*BmCyclin B* 组(18 μL 转染试剂+3 μL *BmCyclin B* dsRNA 处理细胞)、*BmCyclin B3* 组(18 μL 转染试剂+3 μL *BmCyclin B3* dsRNA 处理细胞)和 *BmCyclin B/B3* 组(18 μL 转染试剂+3 μL *BmCyclin B* dsRNA+3 μL *BmCyclin B3* dsRNA 处理细胞), 每个处理组重复 3 次, 转染 48 h 后收集细胞并进行检测.

1.9 细胞周期分析

收集每个处理组的细胞, PBS 清洗 2 次, 弃上清液, 加入 70% 冷乙醇, 轻轻混合细胞, 在 4℃ 下固定 12 h 以上, 然后用 PBS 在 1000 r/min 下离心 5 min 洗涤除去乙醇. 加入 10 mg/mL RNase A 至终浓度为 100 μg/mL, 室温放置 30 min, 再加入碘化丙啶(PI)至终浓度 10 μg/mL, 4℃ 避光染色 30 min. 用流式细胞仪(BD FACS Aria, USA)检测细胞周期.

1.10 MTT 检测

将经 RNAi 处理的细胞中加入 0.5% MTT(Sigma, USA)液 200 μL, 28℃ 常规培养 4 h, 然后吸掉上清, 加入 200 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min. 用酶联免疫检测仪(iMark, Bio-Rad, USA)检测 A₄₉₂ 处各处理组吸光值, 每组设 3 个重复. 根据 A 值来计算细胞成活率. 细胞成活率(%)=实验组(A)/对照组(A)×100%.

2 结果

2.1 *BmCyclin B3* 基因的克隆与序列分析

克隆获得的 *BmCyclin B3* 基因(NCBI 登录号: GenBank EU074796)由 7 个外显子与 6 个内含子组成, ORF 长 1536 bp, 编码 1 个含 511 氨基酸的蛋白, 预测蛋白的分子量大小为 57.8 kD. 在线 SMART 程序结构域分析表明, Cyclin B3 含有 2 个周期蛋白盒, 分别位于 288~379 aa 之间和 392~473 aa 之间, 近 N 端有 1 段由 9 个氨基酸组成的周期蛋白破坏盒, 其中心结构是 RxxFGxxxN, 该序列为 RAAFGDITN, 位于 75~84 aa 之间.

通过 NCBI 的 BLAST 程序进行在线蛋白质序列比对, *BmCyclin B3* 与 NCBI 上登录的果蝇(CAA10059)、人类(CAC40024)、爪蟾(XP001660237)、鼠(CAD88195)、鸡(NP990570)和线虫(NP001024112)的 Cyclin B3 结构域蛋白序列相似性分别是 44%, 50%, 43%, 46%, 51% 和 42%. CLUSTALW 软件多序列比对分析表明, 家蚕 Cyclin B3 的保守结构域与其他几个物种的 Cyclin B3 序列的周期蛋白破坏盒蛋白序列相似(图 1).

通过 MEGA4.0 软件构建了 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 蛋白质序列与其他物种的 Cyclin B 和 Cyclin B3 蛋白质序列的 NJ(neighbour joining)系统发生树(图 2). 系统发生树明显分为 2 大类群, 即 B 型周期蛋白和 B3 型周期蛋白. 2 大类群中, 无脊椎动物的家蚕和果蝇聚为一支, 脊椎动物聚为一支, 而线虫的 Cyclin B 最原始.

2.2 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因在家蚕组织与细胞系中的表达

利用家蚕组织芯片数据, 对 *BmCyclin B3* 和

图 1 7 个物种 Cyclin B3 蛋白的蛋白质破坏盒序列

黑色阴影表示相同氨基酸; 灰色阴影表示相似氨基酸

图 2 不同物种的 Cyclin B 和 Cyclin B3 系统发生树

用 MEGA4.0 软件构建 NJ 系统发生树. *Mm*: 小鼠; *Hs*: 人类; *XI*: 爪蟾; *Gg*: 鸡; *Dm*: 果蝇; *Bm*: 家蚕; *Ce*: 线虫

BmCyclin B 基因在家蚕 5 龄 3 天幼虫不同组织中的表达进行了分析. 结果表明, *BmCyclin B3* 和 *BmCyclin B* 基因在家蚕具有分裂增殖能力的幼虫精巢和卵巢组织中大量表达, 而在细胞处于高度分化状态的其他组织中低量表达(图 3).

利用 RT-PCR 方法对 *BmCyclin A*, *BmCyclin B*, *BmCyclin B3* 和 *BmCPA* 基因在家蚕幼虫的卵巢和丝腺组织、家蚕卵巢细胞系 BmN-SWU1 和家蚕丝腺细胞系 BmSG-SWU1 中的表达进行分析. *BmCyclin A* 和 *BmCPA* 基因在所有的样品中均有表达; *BmCyclin B* 基因在家蚕丝腺组织中无表达, 而在其他样品中大量表达; *Cyclin B3* 基因与 *BmCyclin B* 表达情况类似, 但其在家蚕丝腺中有低量表达; *BmAction 3* 基因为内参(图 4).

图 3 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 在家蚕 5 龄幼虫各组织中的表达

图 4 细胞周期相关基因在家蚕幼虫组织和细胞系中的表达

2.3 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因的 RNA 干扰对家蚕细胞周期的影响

正常 BmN-SWU1 细胞组(对照 1)、转染试剂处理组(对照 2)、*BmCyclin B* dsRNA 处理组(*BmCyclin B*)、*BmCyclin B3* dsRNA 处理组(*BmCyclin B3*)、*BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* dsRNA 共处理组(*BmCyclin B/B3*)在 RNAi 处理 48 h 后, 通过流式细胞仪分析各处理组细胞周期的变化.

BmN-SWU1 细胞 RNAi 处理 48 h 后, 在

BmCyclin B3, *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B/B3* 等的 RNAi 处理组中, 细胞中 G2/M 期细胞数明显增多, 各处理组细胞中 G2/M 期细胞数分别占 63.65%, 65.43% 和 69.56%. 而对照 1 与 2 细胞中 G2/M 期细胞百分比基本相同, 分别占 36.69% 和 32.99%. 在各处理组 G0/G1 期细胞所占比例中, 对照 1 与 2 无显著差异, *Cyclin B3* 与 *Cyclin B/B3* 间无显著差异, *Cyclin B3* 和 *Cyclin B/B3* 与 *Cyclin B* 间存在显著差异($P<0.05$), 2 个对照与其他处理组间存在极显著差异($P<0.01$)(图 5).

在 S 期细胞所占百分比中, 2 个对照间无显著差异, *Cyclin B* 与 *Cyclin B/B3* 间无显著差异; *Cyclin B* 和 *Cyclin B/B3* 与 *Cyclin B3* 间存在极显著差异($P<0.01$), 2 个对照与其他处理组间存在极显著差异($P<0.01$). 在 G2/M 期细胞所占百分比中, 2 个对照间无显著差异, *Cyclin B* 与 *Cyclin B/B3* 间有显著差异($P<0.05$), *Cyclin B3* 和 *Cyclin B/B3* 与 *Cyclin B* 间存在极显著差异($P<0.01$), 2 个对照与其他处理组间存在极显著差异($P<0.01$)(图 5).

这些结果表明, *BmCyclin B* 与 *BmCyclin B3* 基因干涉将导致家蚕细胞阻滞于 G2/M 期, G2/M 期细胞数明显增加, *Cyclin B* 对细胞周期的影响高于 *Cyclin B3*, 且二者共同作用才能推动细胞周期的正常进行.

2.4 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因干涉对细胞增殖的影响

不同处理组的细胞转染 48 h 后, *Cyclin B/B3* 处理组对 BmN-SWU1 细胞生长的抑制作用最明显, 细胞数仅为正常细胞组(对照 1)的 48.45%, 其次为 *Cyclin*

B 和 *Cyclin B3* 处理组, 分别为正常细胞组(对照 1)的 58.69% 和 63.92%. 统计分析表明, 正常组(对照 1)和转染试剂组(对照 2)无明显差异, *Cyclin B* 和 *Cyclin B3* 处理组对细胞增殖的影响差异不显著, 但二者与 *Cyclin B3/B* 转染组存在极显著差异($P<0.05$); 同时, 2 个对照组与其他处理组存在极显著差异($P<0.01$)(图 6).

3 讨论

家蚕与果蝇一样, 存在 *Cyclin B* 和 *Cyclin B3* 两种类型的 B 型周期蛋白. 敲除 *Cyclin B* 基因的果蝇胚胎细胞, 其纺锤体出现多极化, 并且没有牵引染色体运动的动力, 细胞虽然能正常进行分裂但速度明显减慢. 敲除 *Cyclin B3* 基因的果蝇胚胎细胞, 染色体不凝聚, 在细胞开始胞质分裂的同时染色体还在浓缩, 细胞也能正常进行分裂, 比敲除 *Cyclin B* 基因的果蝇胚胎的细胞分裂速度要快. 阻断或敲除 *Cyclin B* 和 *Cyclin B3* 基因的果蝇细胞不能顺利通过 G2/M 检查点, 细胞周期延长, 伴随 G2 和 M 期阻滞, 细胞容易凋亡^[7].

BmCyclin B, *BmCyclin B3* 在家蚕体外培养细胞 BmN-AWU1 中高量表达(图 4), 不论是对 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 进行单干涉还是双干涉, 细胞与正常细胞相比, 都极显著地阻滞于 G2 和 M 期(图 5), 并极显著地抑制了细胞的增殖(图 6). 同时, 干涉 *BmCyclin B* 对细胞周期和增殖的影响大于干涉 *BmCyclin B3* 基因, 二者不存在显著性差异, 但单干涉与双干涉间存

图 5 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因的干涉对家蚕细胞周期的影响

对照 1: 未进行任何处理的 BmN-SWU1 细胞; 对照 2: 转染试剂处理的细胞; *BmCyclin B*: *BmCyclin B* dsRNA 处理的细胞; *BmCyclin B3*: *BmCyclin B3* dsRNA 处理的细胞; *BmCyclin B/B3*: *BmCyclin B* dsRNA+3 μ L *BmCyclin B3* dsRNA 处理的细胞. *: 示差异显著($P<0.05$); **: 示差异极显著($P<0.01$)

图6 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 基因的干涉对家蚕细胞增殖的影响

对照 1: 未进行任何处理的 BmN-SWU1 细胞; 对照 2: 转染试剂处理的细胞; *BmCyclin B*: *BmCyclin B* dsRNA 处理的细胞; *BmCyclin B3*: *BmCyclin B3* dsRNA 处理的细胞; *BmCyclin B/B3*: *BmCyclin B* dsRNA+3 μ L *BmCyclin B3* dsRNA 处理的细胞. *: 示差异显著 ($P<0.05$); **: 示差异极显著 ($P<0.01$)

在显著性差异. 这些结果表明, 在家蚕细胞周期调控中, *CyclinB*, *CyclinB3* 是家蚕细胞完成细胞周期必不可少的基因, 是细胞周期中 M 期的限速因素.

家蚕丝腺细胞是终末端分化细胞, 它在整个幼

虫发育阶段体积不断增大, 但其数目却不增加, 只是进行细胞核内有丝分裂^[17-19]. 在细胞核内有丝分裂期间, 只有 G1~S 期的相互转变, 缺乏 M 期, 导致细胞 DNA 含量的增加^[20]. 在家蚕幼虫时期, 中部丝腺和后部丝腺的细胞 DNA 经过 17~19 轮复制, 其细胞 DNA 的含量增加 $2^{17}\sim 2^{19}$ 倍, 约是正常 2 倍体细胞 DNA 量的 40 万倍^[21]. 在家蚕胚胎发育至 25 期后, 丝腺中只表达 *CyclinE*, 但不表达 M 期的 *Cyclin B*, 此时丝腺细胞只进行核内有丝分裂^[8,22].

BmCyclin B, *BmCyclin B3* 在家蚕体外培养的丝腺细胞系里高量表达, 而 *BmCyclin B* 在家蚕丝腺组织中不表达, *BmCyclin B3* 仅在丝腺组织中低量表达 (图 4), 表明这 2 种周期蛋白在高度特化的丝腺细胞重返细胞周期中起重要作用, 是家蚕细胞完成细胞周期必不可少的基因. 果蝇中, *Cyclin B3* 或 *Cyclin B* 并不是细胞有丝分裂所必需的, 但是二者是雌性生殖所必需的, *Cyclin B* 也是雄性生殖所必需的^[7]. 家蚕中 *BmCyclin B* 和 *BmCyclin B3* 是否具有其他功能还需要进一步研究.

参考文献

- Minshull J, Blow J, Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell*, 1989, 56: 947-956
- Murray A, Kirschner M. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 1989, 339: 275-286
- Westendorf J, Swenson K, Ruderman J. The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol*, 1989, 108: 1431-1444
- Glutzer M, Murray A W, Kirschner M W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 1991, 349: 132-138
- King R W, Deshaies R J, Peters J M, et al. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 1996, 274: 1652-1658
- King R W, Glutzer M, Kirschner M W. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell*, 1996, 7: 1343-1357
- Jacobs H W, Knoblich J A, Lehner C F. *Drosophila* Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. *Genes Dev*, 1998, 12: 3741-3751
- Pines J, Hunter T. Human cyclin A and cyclin B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle dependent nuclear transport. *J Cell Biol*, 1991, 115: 1-17
- 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. *EMBO J*, 1995, 14: 1646-1654
- Gallant P, Nigg E A. Identification of a novel vertebrate cyclin: Cyclin B3 shares properties with both A-type and B-type cyclins. *EMBO J*, 1994, 13: 595-605
- Kreutzer M A, Richards J P, De Silva-Udawatta M N, et al. *Caenorhabditis elegans* cyclin A-type and B-type genes: a cyclin A multigene family, an ancestral cyclin B3 and differential germline expression. *J Cell Sci*, 1995, 108: 2415-2424
- Sigrist S, Jacobs H, Stratmann R, et al. Exit from mitosis is regulated by *Drosophila* fizzy and the sequential destruction of cyclins A, B and B3. *EMBO J*, 1995, 14: 4827-4838
- Takahashi M, Niimi T, Ichimura H, et al. Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs. *Dev Genes Evol*, 1996, 206: 288-291
- Baluchamy S, Gopinathan K P. Characterization of a cyclin homolog from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res*, 2005, 108: 69-81
- Pan M H, Cai X J, Liu M, et al. Establishment and characterization of an ovarian cell line of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell*, 2010, 42:

42–46

- 16 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- 17 Dhawan S, Gopinathan K P. Cell cycle events during the development of the silk glands in the mulberry silkworm *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol*, 2003, 213: 435–444
- 18 Zhang C D, Li F F, Chen X Y, et al. DNA replication events during larval silk gland development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 2012, 58: 974–978
- 19 Perdrix-Gillot S. DNA synthesis and endomitoses in the giant nuclei of the silkgland of *Bombyx mori*. *Biochimie*, 1979, 61: 171–204
- 20 Zimmet J, Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol*, 2000, 28: 3–16
- 21 Gage L P. Polyploidization of the silk gland of *Bombyx mori*. *J Mol Biol*, 1974, 86: 97–108
- 22 Edgar B A, Orr-Weaver T L. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*, 2001, 105: 297–306