

# Cdc25B 在小鼠受精卵的表达和定位

崔 城<sup>1</sup> 宿文辉<sup>2</sup> 于秉治<sup>2\*</sup>(中国医科大学基础医学院,<sup>1</sup>生理学教研室,<sup>2</sup>生物化学与分子生物学教研室,沈阳 110001)

**摘要** 为阐明细胞分裂周期(Cdc)25B 调控小鼠受精卵发育的机制,利用 Western 印迹检测小鼠受精卵各时期 Cdc25B 的表达及 Cdc2-Tyr15 的磷酸化状态。利用间接免疫荧光技术观察 Cdc25B 在小鼠受精卵的定位。构建 pEGFP-Cdc25B 融合表达载体并显微注射到受精卵中,观察 Cdc25B 在受精卵 M 期的定位变化。结果表明 Cdc25B 在 G<sub>1</sub> 和 S 期被磷酸化,在 G<sub>2</sub> 和 M 期去磷酸化。Cdc2-Tyr15 在 G<sub>1</sub> 和 S 期处于磷酸化状态, G<sub>2</sub> 期只检测到 Cdc2-Tyr15 轻微的磷酸化信号, M 期末检测到任何 Cdc2-Tyr15 的磷酸化信号。Cdc25B 在 G<sub>1</sub> 期定位于细胞质和细胞核中, S 和 G<sub>2</sub> 期定位于细胞质的皮质部分, M 期由细胞质转向核区。证明 Cdc25B 核输出后激活有丝分裂促进因子,从而启动小鼠受精卵的有丝分裂。

**关键词** 小鼠受精卵; Cdc25B; MPF; 表达; 定位

细胞周期包括 4 个时期,分别是 DNA 合成前期(G<sub>1</sub> 期), DNA 合成期(S 期), DNA 合成后期(G<sub>2</sub> 期)和分裂期(M 期)。小鼠受精卵的早期发育机制目前尚未完全研究清楚,因而也成为目前国际上研究的热点之一。众多关于有丝分裂的研究几乎都集中在细胞是如何跨越分裂间期(包括 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> 期)到达分裂期(M 期)。细胞分裂周期 25(cell division cycle 25, Cdc25)磷酸酶家族是一种双重磷酸酶,在裂殖酵母中首次发现,可以以剂量依赖性的方式启动有丝分裂<sup>[1]</sup>,并在 G<sub>2</sub>/M 期转变中直接激活细胞分裂周期 2(cell division cycle 2, Cdc2)<sup>[2]</sup>,因此被认为是有丝分裂的启动者。哺乳动物 Cdc25 包括 A、B、C 三种亚型,研究认为 Cdc25B 在 G<sub>2</sub>/M 期转变中具有更重要的作用。剔除小鼠的 *Cdc25b* 基因,虽然小鼠可以生存,但雌鼠却由于卵细胞发育异常而导致不孕<sup>[3]</sup>。Cdc25B 在细胞周期中的作用也受到其他蛋白质的调节,最为常见的就是 14-3-3。14-3-3 是一种普遍存在于多种动、植物细胞的蛋白质,功能广泛,特别是在细胞周期进程中常作为“调质蛋白”发挥作用。在 G<sub>2</sub> 期阻滞的爪蟾卵母细胞中,14-3-3 与 Cdc25 结合在一起,从而调控卵母细胞的成熟<sup>[4]</sup>。我们前期的研究已经证明小鼠受精卵各时期 14-3-3 位于细胞核和细胞质中<sup>[5]</sup>。那么小鼠受精卵 Cdc25B 的功能及定位是否与 14-3-3 的亚细胞定位有关,从而控制有丝分裂的进程。因此本实验利用 Western 印迹、间接免疫荧光技术及构建绿色荧光蛋白融合表达载体(pEGFP-

Cdc25B)并将其显微注射到受精卵中,鉴定小鼠受精卵 Cdc25B 的表达和亚细胞定位。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中国医科大学实验动物部提供昆明系雌、雄性小白鼠;质粒 pBluescriptII/SK-Cdc25B (简称为 pBSK-Cdc25B)由美国 Tony Hunter 教授(The Salk Institute)惠赠; pEGFP-C3 载体由复旦大学刘喻博士惠赠;质粒 DNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购于 Omega 公司; Cdc25B 抗体(E-19)、Cdc2 磷酸酪氨酸 pTyr15 抗体、14-3-3 抗体(K-19)购于 Santa Cruz 公司;小鼠 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化抗体由 Proteintech Group 公司合成;限制性内切酶 *XhoI*、*BamHI* 购于 MBI 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG、TRITC 标记的兔抗山羊 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司;感受态 *E.coli* JM109 菌株购于宝生物有限公司; M2 和 M16 培养液、Hoechst 33258 购于 Sigma 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 小鼠超排卵及受精卵的采集和培养 取 3~5 周成熟雌性昆明系小鼠,经严格明暗循环喂养 3~4 天

收稿日期: 2007-04-27 接受日期: 2007-06-29

国家自然科学基金资助项目(No.30570945)

\* 通讯作者: Tel: 024-23261253, Fax: 024-23261253, E-mail:

yzbiochem@yeah.net

后,腹腔内注射 10 IU 孕马血清促性腺激素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG), 46~48 h 后腹腔注射 10 IU 人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)。当日将注射 hCG 后的雌鼠分别与分开饲养的成熟雄性昆明系小鼠合笼过夜。次日将小鼠脱颈椎处死,受精卵取自合笼有阴栓母鼠的输卵管壶腹部。将受精卵放入 M2 培养液中,以透明质酸酶去除颗粒细胞,需要培养的受精卵移入 M16 培养液中,覆盖矿物油,在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养,按注射 hCG 后的时间分别搜集各时期受精卵。注射 hCG 19 h 后收集 G<sub>1</sub> 期(hCG 后 12~20 h 为 G<sub>1</sub> 期)受精卵,可见在卵细胞中雌雄原核相距较远,雌原核略小于雄原核;注射 hCG 23 h 后收集 S 期(hCG 后 20~26 h 为 S 期)受精卵,可见雌雄原核体积增大并相互靠近,出现可见的核仁;注射 hCG 27 h 后收集 G<sub>2</sub> 期(hCG 后 26~28 h 为 G<sub>2</sub> 期)受精卵,此时雌雄原核的轮廓已经消失,胞浆呈粗大的颗粒状;注射 hCG 29 h 和 30 h 后收集 M 期(hCG 后 28~30 h 为 M 期)受精卵,此时受精卵胞体已经拉长,胞质分裂及染色体分散到两极。

**1.2.2 Western 印迹** 分别收集 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 期受精卵(每组 400 个),3 000 r/min,离心 10 min 后,加入 20 μl 蛋白质提取缓冲液,室温和 -70 °C 反复冻融裂解 3 次,加入 SDS 样品缓冲液,100 °C 煮沸 5 min,10% SDS-PAGE 分离后将蛋白质转至硝酸纤维素膜上,含 10% 奶粉的 TBST(pH 7.4)将滤膜于室温摇动温育 1 h 进行封闭,与 Cdc25B 抗体(1:200 稀释)、β-肌动蛋白抗体(1:1 000 稀释)、Cdc2-Tyr15 的磷酸化抗体(1:500 稀释)和小鼠 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化抗体(1:200 稀释)4 °C 温育过夜。辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔 IgG 和兔抗羊 IgG 作为二抗(1:2 000 稀释),室温温育 2 h, ECL 化学发光法显色。X 射线底片经 UVP 凝胶成像分析系统进行扫描成像,Fluor Chem 系统分别测定 Cdc25B 和 β-肌动蛋白条带的光密度值,以 Cdc25B 光密度值/β-肌动蛋白光密度值的相对比值代表 Cdc25B 的表达量。

**1.2.3 间接免疫荧光实验** 将 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 期受精卵放入含有 1% 聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)的 PBS(pH 7.4)中洗涤 3 遍,2% 多聚甲醛溶液室温下固定 30 min,0.1% Triton X-100 固定 10 min,用含 5%BSA 的 PBS 室温下封闭 40 min。加入 Cdc25B 单克隆抗体(1:100 稀释)和 14-3-3 多克隆抗体(1:1 000 稀释)4 °C 过夜。次日加入 FITC 标记的羊抗兔

IgG (1:100 稀释)和 TRITC 标记的兔抗山羊 IgG(1:100 稀释)37 °C 1 h。加入 Hoechst 33258(终浓度为 25 μg/ml)37 °C 染色 30 min,使核酸着色,分别以 530 nm、488 nm 和 260 nm 激发波长激发标本,在荧光显微镜下观察小鼠受精卵中 Cdc25B 的定位、与 14-3-3 的共定位及核酸染色情况。

**1.2.4 pEGFP-Cdc25B 表达载体的构建** 将 pBSK-Cdc25B 与 pEGFP-C3 载体同时用 *Xho*I 和 *Bam*HI 双酶切,37 °C 过夜,酶切反应体系各 20 μl(6 μl pBSK-Cdc25B 或 6 μl pEGFP-C3, 4 μl 10×Y<sup>+</sup>/Tanqo(带 BSA), *Bam*HI 和 *Xho*I 各 1 μl, 8 μl 灭菌水)。1% 琼脂糖电泳检测酶切产物,按凝胶回收试剂盒说明书割取凝胶回收酶切产物。将回收片段进行连接反应,Cdc25B cDNA 与 pEGFP-C3 按摩尔比 3:1 混合,反应体系为 10 μl [6 μl Cdc25B cDNA (30 ng), 1 μl pEGFP-C3 (60 ng), 1 μl 10×T4 连接酶缓冲液, 1 μl T4 DNA 连接酶 (3 U/μl), 1 μl 灭菌水], 4 °C 反应过夜。将连接产物转化 *E. coli* JM109,涂布于含 Kana<sup>+</sup> 的琼脂平板培养基中,37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落于含 Kana<sup>+</sup> 的 LB 培养基中培养约 12 h,测其 A<sub>600</sub> 值约 4~6 时提取质粒,进行 *Xho*I 及 *Bam*HI 双酶切鉴定。选择酶切片段大小与预期相符合的阳性克隆保存并进行序列测定分析,由大连宝生物公司完成,构建成含 Cdc25B-WT 的绿色荧光蛋白融合表达载体 pEGFP-Cdc25B-WT。

**1.2.5 显微注射** 显微注射应用 Eppendorf Transferrman 显微操作系统, Olympus IX-70 倒置显微镜, DIC 调制相差观察。取 G<sub>1</sub> 期受精卵,将 1 ng pEGFP-Cdc25B-WT 质粒注射到细胞核中,注射体积约为受精卵总体积的 5% (10 pl), 1 h 内注射完毕。注射后放入 M16 培养液中培养。以 488 nm 激发波长激发标本,在荧光显微镜下观察 Cdc25B 在 M 期的定位变化。

**1.2.6 数据处理** 每次实验重复 3~5 次,采用 SPSS11.5 统计软件进行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 绿色荧光蛋白融合表达载体的构建

将 pEGFP-Cdc25B-WT 重组体经 *Xho*I/*Bam*HI 双酶切鉴定,琼脂糖电泳结果可见约 4 700 bp 的载体及 1 800 bp 的目的条带,与预期结果一致,经测序证明重组体构建成功(图 1)。

### 2.2 受精卵 Cdc25B 表达的鉴定

G<sub>1</sub> 和 S 期的 Cdc25B 的蛋白质条带略高于 G<sub>2</sub> 期

和 M 期, 大约位于 70 kDa; G<sub>2</sub> 期和 M 期的蛋白质条带约位于 65 kDa, 证明在 G<sub>1</sub> 和 S 期 Cdc25B 被磷酸化, G<sub>2</sub> 期和 M 期去磷酸化(图 2)。作为对照的  $\beta$ -肌动蛋白约在 43 kDa 左右。对光密度值的相对比值进行分析, G<sub>1</sub> 期 Cdc25B 表达量较少, S 期开始增加, G<sub>2</sub> 期达到最大量(对比于 G<sub>1</sub>、S、M 期表达水平有显著性差异,  $P < 0.05$ ), M 期又开始减少(图 3)。

### 2.3 小鼠受精卵 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化状态的检测

我们合成了含 Cdc25B 的 321 位丝氨酸的一段多肽(CQRLFRSPpSMP, 共 11 个氨基酸), 将 321 位丝氨酸标记磷酸, 并与钥孔血蓝蛋白(KLH)连接, 免疫兔子, 制备 Cdc25B-S321 的特异性磷酸化抗体。分别收集 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 期受精卵, 应用 Cdc25B-S321 位磷酸化抗体检测各时期 Cdc25B 321 位丝氨酸的磷酸化状态。在 G<sub>1</sub> 和 S 期检测到磷酸化的 Cdc25B, 约位于 70 kDa 左右; 而 G<sub>2</sub> 和 M 期没有检测到任何 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化信号, 说明 Cdc25B 321 位丝氨酸在 G<sub>1</sub> 和 S 期被磷酸化, 在 G<sub>2</sub> 和 M 期去磷酸化, 这一结果与图 2 结果一致(图 4)。

### 2.4 Cdc25B 在受精卵中的定位

**2.4.1 Cdc25B 在受精卵 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub> 和 M 期的定位** 在受精卵中可以观察到, 红色荧光标记的 Cdc25B 在 G<sub>1</sub> 期位于细胞核及细胞质中, S 期与 G<sub>2</sub> 期主要位于细胞质的皮质部分(接近细胞膜处), M 期位于整个细胞中。绿色荧光标记的 14-3-3 在各时期位于细胞质和细胞核中, 与文献<sup>[5]</sup>结果一致。将 14-3-3 和 Cdc25B 的定位融合在一起(merge), 呈黄色荧光的为两种蛋白质的共定位。在 G<sub>1</sub> 期共定位于细胞质和细胞核, 细胞质的荧光共定位信号较强; S 期与 G<sub>2</sub> 期两种蛋白质共定位于细胞质的皮质部分(接近细胞膜处), M 期共定位于整个卵细胞, 蓝色荧光标记核酸物质(图 5)。

**2.4.2 Cdc25B 在 M 期受精卵中定位的动态变化** 为了观察 Cdc25B 在 M 期受精卵的动态变化, 利用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记 Cdc25B。取 G<sub>1</sub> 期受精卵, 将 pEGFP-Cdc25B-WT 质粒注射到细胞核中。每隔 3 h 在荧光显微镜下观察融合蛋白的表达情况。注射后经过 17 h, 既 hCG 29 h 后, 受精卵已进入 M 期, 在荧光显微镜下可观察到 EGFP-Cdc25B 融合蛋白的表达。可看到 EGFP 标记的 Cdc25B 主要位于细胞质皮质部分, 卵细胞中心部位的核区有少量表达; 1 h 后, 既 hCG 30 h 后, 可见 Cdc25B 在细胞质与中心部位的核区及核区周围都有表达, 核区部位的绿色荧

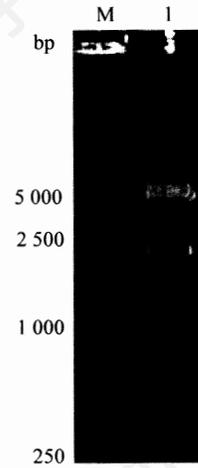


图 1 pEGFP-Cdc25B-WT 表达载体的双酶切结果

M: DL15000 DNA marker; 1: pEGFP-Cdc25B-WT 的双酶切产物, 1 800 bp 处为 Cdc25B-WT, 4 700 bp 处为 pEGFP-C3 载体。

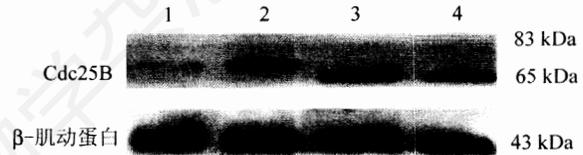


图 2 Western 印迹分析小鼠受精卵 Cdc25B 的表达

1: G<sub>1</sub> 期, 大约位于 70 kDa, 蛋白质被磷酸化; 2: S 期, 大约位于 70 kDa, 蛋白质被磷酸化; 3: G<sub>2</sub> 期, 大约位于 65 kDa, 蛋白质去磷酸化; 4: M 期, 大约位于 65 kDa, 蛋白质去磷酸化。

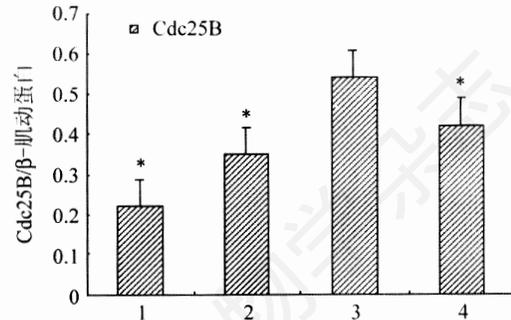


图 3 Cdc25B 在小鼠受精卵中的表达

1: G<sub>1</sub> 期, Cdc25B 表达量较少; 2: S 期, Cdc25B 表达量开始增加; 3: G<sub>2</sub> 期, Cdc25B 表达量达到最大量; 4: M 期, Cdc25B 表达量又开始减少。与 G<sub>2</sub> 期比较,  $*P < 0.05$ 。

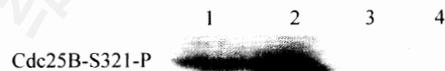


图 4 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化状态的检测

1: G<sub>1</sub> 期, 可检测到 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化信号; 2: S 期, 可检测到 Cdc25B 321 位丝氨酸磷酸化信号; 3: G<sub>2</sub> 期, 无磷酸化信号; 4: M 期, 无磷酸化信号。

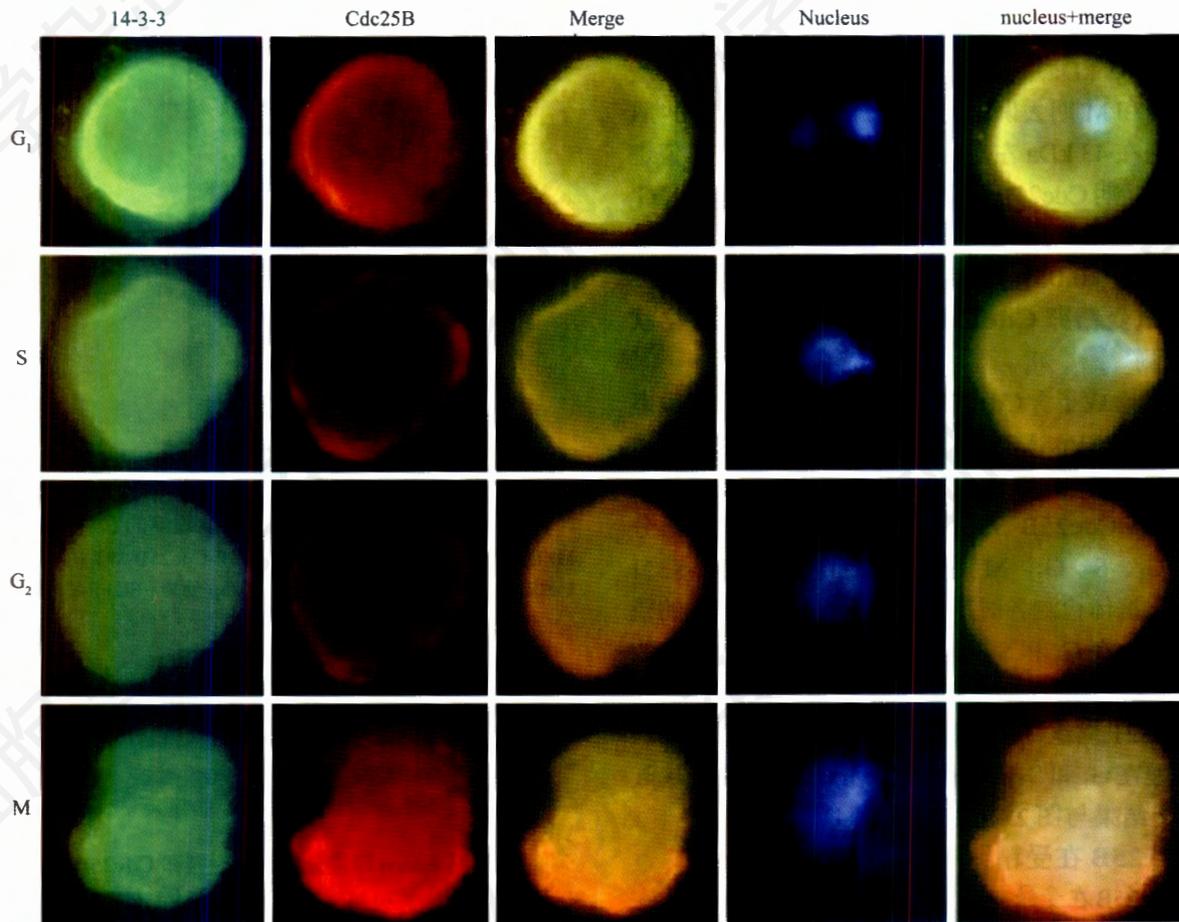


图5 小鼠受精卵  $G_1$ 、S、 $G_2$  和 M 期 Cdc25B 的定位及与 14-3-3 的共定位(400 ×)

红色为 Cdc25B, 绿色为 14-3-3, 蓝色为核酸物质。顶端为  $G_1$  期, 中间为 S 和  $G_2$  期, 底部为 M 期。右侧为融合图像。Cdc25B 与 14-3-3 在  $G_1$  期共定位于细胞质和细胞核, S 期与  $G_2$  期共定位于细胞质皮质部分(接近于细胞膜处), M 期共定位于整个卵细胞。

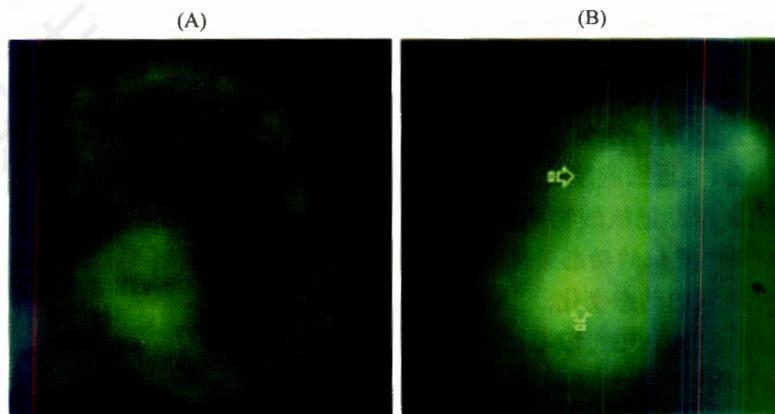


图6 小鼠受精卵 M 期 Cdc25B 的定位 (400 ×)

A: hCG 29 h 后, Cdc25B 主要位于细胞质皮质部分, 核区有少量表达; B: hCG 30 h 后, Cdc25B 集中在受精卵中间部位的核区及其周围(箭头所示)。

光信号明显强于细胞质荧光信号, 表明 Cdc25B 一部分从细胞质转移到核区(图 6)。

## 2.5 小鼠受精卵不同时期 Cdc2-Tyr15 的磷酸化

### 状态检测

分别收集  $G_1$ 、S、 $G_2$  和 M 期受精卵, 检测 Cdc2-Tyr15 的磷酸化状态。  $G_1$  期和 S 期可检测到很强的



图7 小鼠受精卵不同时期 Cdc2-Tyr15 的磷酸化状态检测  
1: G<sub>1</sub> 期, 有很强的磷酸化信号; 2: S 期, 有很强的磷酸化信号; 3: G<sub>2</sub> 期, 只有微弱的磷酸化信号; 4: M 期, 无任何磷酸化信号。

Cdc2-Tyr15 的磷酸化信号, 表明有丝分裂促进因子 (M-phase promoting factor, MPF) 处于失活状态; 在 G<sub>2</sub> 期 Cdc2-Tyr15 的磷酸化信号很弱, 表明 MPF 开始激活; 而 M 期未发现任何 Cdc2-Tyr15 的磷酸化信号, 表明 MPF 已经激活(图 7)。

### 3 讨论

蛋白质在细胞周期中磷酸化状态及定位的改变是调节生命活动的一种方式。在人类细胞中 Cdc25B 的活性在 S 期末期开始出现, 在 G<sub>2</sub> 期达到峰值<sup>[6]</sup>。本实验 Cdc25B 表达量的变化与上述文献有相似性, 提示这种变化是与 Cdc25B 的促进有丝分裂的功能相一致的。我们利用 Cdc25B 抗体检测到在小鼠受精卵 G<sub>1</sub>、S 期 Cdc25B 的蛋白质条带比 G<sub>2</sub> 和 M 期略为上移, 提示在 G<sub>1</sub>、S 期的蛋白质有可能被磷酸化。爪蟾卵母细胞中的研究表明, 蛋白激酶 A (cAMP-dependent protein kinase A, PKA) 可直接磷酸化 Cdc25 的 287 位丝氨酸, 此位点磷酸化后导致 Cdc25 失活, 卵母细胞发生 G<sub>2</sub> 期阻滞<sup>[7]</sup>。与爪蟾卵母细胞 Cdc25-S287 的情况相近, 人类细胞中 Cdc25B 对应爪蟾卵母细胞 Cdc25-S287 的相应位点为 Cdc25B-S323, 此位点被磷酸化后也导致细胞发生 G<sub>2</sub> 期阻滞<sup>[8,9]</sup>。通过与爪蟾 Cdc25 和人类 Cdc25B 的氨基酸序列比对发现, 位于 C 末端的 S321 为爪蟾 Cdc25-S287 和人类 Cdc25B-S323 在小鼠 Cdc25B 中的对应位点。我们的前期工作表明 Cdc25B-S321 参与了小鼠卵母细胞 G<sub>2</sub> 期阻滞<sup>[10]</sup>, 因此我们制备了小鼠 Cdc25B-S321 的特异性磷酸化抗体, 发现在受精卵中 Cdc25B-S321 的确存在磷酸化状态的变化, 提示 Cdc25 在小鼠受精卵细胞周期的 S/G<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>/M 期转变中发挥重要作用。

除蛋白质水平和磷酸化状态的调节之外, Cdc25B 的亚细胞定位改变也是调节细胞周期进程的重要方式, 而 14-3-3 常常参与其中。过表达 Cdc25B 可迅速使 S 和 G<sub>2</sub> 期细胞进入到有丝分裂期, 无论 DNA 复制是否完成, 这一现象与 Cdc25B 在 G<sub>1</sub> 期位于核中、S 和 G<sub>2</sub> 期位于细胞质中的定位变化直接相关<sup>[11]</sup>。Woo

等<sup>[12]</sup>发现在 G<sub>1</sub> 期 Cdc25B2 位于 CHO 细胞的细胞质中, 而在 S 到 G<sub>2</sub>/M 期转变时逐渐转移到核中, 这种定位的改变直接参与了 G<sub>2</sub>/M 限制点的调节。研究认为 14-3-3 是一种“脚手架”蛋白, 常以其特有的保守的模体与靶蛋白被磷酸化的丝氨酸/苏氨酸相结合而形成复合体, 调节靶蛋白的功能<sup>[13]</sup>。实验证明 14-3-3β 与 Cdc25B 的 309 位被磷酸化的丝氨酸结合, 驱动 Cdc25B 定位于细胞质。如果 309 位丝氨酸突变为丙氨酸则消除了 Cdc25B 的细胞质定位<sup>[14]</sup>。本实验中, 我们观察到 Cdc25B 和 14-3-3 在 G<sub>1</sub> 期和 S 期共定位于细胞质, 并且在这两个时期 Cdc25B 都处于磷酸化状态, 提示在 G<sub>1</sub> 期一部分 Cdc25B 开始从细胞核向细胞质转移; 当受精卵发展到 S 期时, Cdc25B 完全从核中转移到细胞质中, 位于细胞质中的 Cdc25B 321 位丝氨酸可能被磷酸化后与 14-3-3 结合, 14-3-3 可能起着“锚定” Cdc25B 的作用。那么这种核质之间的转移对细胞分裂有什么作用呢? 在 HeLa 细胞中, 间接免疫荧光试验发现在分裂前期 Cdc25B 积累于核周及细胞质中<sup>[14]</sup>。此外, Cdc25B 的核输出对于其有效的促进有丝分裂的启动是必须的, 干扰 Cdc25B 的核输出可以减弱有丝分裂的启动<sup>[15]</sup>。因此, 我们推断 Cdc25B 从受精卵的细胞核输出至细胞质, 是启动有丝分裂的前提条件; 14-3-3 与磷酸化的 Cdc25B-S321 结合后可能控制受精卵的发育进程。

MPF 由 Cdc2 和细胞周期蛋白 B(cyclin B) 组成, 是有丝分裂的直接启动子。MPF 的催化亚基是 Cdc2, 又称细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 1(cyclin dependent kinase 1, Cdk1), 它是一种分子量大小为 34 kDa 的蛋白激酶。Cdk1 的 14 位苏氨酸残基(Thr14) 和 15 位酪氨酸残基(Tyr15) 的磷酸化可使 MPF 失活<sup>[16,17]</sup>, 失去促有丝分裂的作用; 而去磷酸化可激活 MPF。研究证明 Cdc25B 可以使 MPF 的 Thr14 和 Tyr15 去磷酸, 从而激活 MPF, 进入有丝分裂<sup>[18]</sup>。本实验观察到受精卵 G<sub>1</sub> 期和 S 期 MPF 处于失活状态, G<sub>2</sub> 期开始激活, M 期完全激活, 结合 Cdc25B 在 G<sub>2</sub> 和 M 期处于激活状态(即去磷酸化状态)可以推测 Cdc25B 在 G<sub>2</sub> 期激活 MPF, 激活的 MPF 诱导小鼠受精卵进入有丝分裂。因此, Cdc25B 在 G<sub>2</sub> 期激活 MPF 是受精卵分裂的必要条件。

爪蟾卵母细胞 M 期开始之前, 14-3-3 先与 Cdc25 分离, 然后蛋白磷酸酶 1(protein phosphatase 1, PP1) 使 Cdc25 的第 287 位丝氨酸去磷酸化, 激活 Cdc25, 进入 M 期, 而且 14-3-3 与 Cdc25 的分离是 Cdc25 去磷

酸化的先决条件<sup>[19]</sup>。本实验发现G<sub>2</sub>期Cdc25B与14-3-3仍共定位于细胞质,但此期Cdc25B已经处于去磷酸化状态,因此推测Cdc25B在G<sub>2</sub>期已经与14-3-3分离,处于激活状态。那么Cdc25B在G<sub>2</sub>期仍然停留在细胞质中的作用是什么呢?研究认为MPF在细胞质中的活化先于其在细胞核中的活化<sup>[20]</sup>,而且在前期发现激活的Cdk1-细胞周期蛋白B1复合体首先出现在中心体<sup>[21]</sup>。Cdc25B可以先于Cdc25A激活中心体中的Cdk1-细胞周期蛋白B1复合体,诱导有丝分裂<sup>[22]</sup>。由此提示Cdc25B在G<sub>2</sub>期与14-3-3分离后仍位于细胞质中是为了激活细胞质中的MPF。此外,本实验注射pEGFP-Cdc25B融合表达载体发现在M期Cdc25B呈现出从细胞质转移到核区的现象。研究证实所有的Cdc25可以通过核膜快速的穿梭,因此可以与核中的细胞周期蛋白A-Cdk2和细胞质中心体中的细胞周期蛋白B1-Cdk1相作用<sup>[23,24]</sup>。由此,提示Cdc25B可能在G<sub>2</sub>期激活细胞质中的MPF,使细胞发生G<sub>2</sub>/M期转变,然后进入核区激活其中的MPF,进一步诱导有丝分裂的完成。

## 参考文献(References)

- [1] Russell P *et al.* *Cell*, 1986, **45**: 145
- [2] Morgan DO *et al.* *Nature*, 1995, **374**: 131
- [3] Lincoln AJ *et al.* *Nat Genet*, 2002, **30**: 446
- [4] Yang J *et al.* *EMBO J*, 1999, **18**: 2174
- [5] 崔城等. *生殖与避孕*, 2006, **26**: 643
- [6] Lammer C *et al.* *J Cell Sci*, 1998, **111**: 2445
- [7] Duckworth BC *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 16794
- [8] Peng CY *et al.* *Science*, 1997, **277**: 1501
- [9] Forrest A *et al.* *Oncogene*, 2001, **20**: 4393
- [10] 张阳等. *生殖与避孕*, 2005, **25**: 195
- [11] Karlsson C *et al.* *J Cell Biol*, 1999, **146**: 573
- [12] Woo ES *et al.* *Oncogene*, 1999, **18**: 2770
- [13] Yaffe MB *et al.* *Cell*, 1997, **91**: 961
- [14] Gabrielli BG *et al.* *J Cell Sci*, 1996, **109**: 1081
- [15] Lindqvist A *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 4979
- [16] Parker LL *et al.* *Science*, 1992, **257**: 1955
- [17] Mueller PR *et al.* *Mol Biol Cell*, 1995, **6**: 119
- [18] Nishijima H *et al.* *J Cell Biol*, 1997, **138**: 1105
- [19] Margolis SS *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 5734
- [20] De Souza CP *et al.* *Exp Cell Res*, 2000, **257**: 11
- [21] Jackman M *et al.* *Nat Cell Biol*, 2003, **5**: 143
- [22] Lindqvist A *et al.* *J Cell Biol*, 2005, **171**: 35
- [23] Kallstrom H *et al.* *Exp Cell Res*, 2005, **303**: 89
- [24] Graves PR *et al.* *Oncogene*, 2001, **20**: 1839

## Expression and Localization of Cdc25B in Mouse Fertilized Eggs

Cheng Cui<sup>1</sup>, Wen-Hui Su<sup>2</sup>, Bing-Zhi Yu<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Physiology, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract** The purpose of this study is to elucidate the mechanism of Cdc25B regulating the development of mouse fertilized eggs. Using Western blot to detect the expression of Cdc25B and the phosphorylation status of Cdc2-Tyr15 at various phases in mouse fertilized eggs. The localization of Cdc25B was investigated using fluorescence microscopy at one-cell stage. pEGFP-Cdc25B plasmid was microinjected to mouse fertilized eggs in order to detect location variation of Cdc25B at mitosis. Western blots revealed that Cdc25B was phosphorylated at G<sub>1</sub> and S phase, dephosphorylated at G<sub>2</sub> and M phase. There was strong phosphorylation signal of Cdc2-Tyr15 detected at G<sub>1</sub> and S whereas only slight phosphorylation signal of Cdc2-Tyr15 found at G<sub>2</sub> and no phosphorylation signal of Cdc2-Tyr15 was identified at M phase in mouse fertilized eggs. The subcellular localization of Cdc25B showed that Cdc25B was mainly in cytoplasm and nucleus at G<sub>1</sub>, but in cytoplasm cortex at S and G<sub>2</sub> phase. Cdc25B transferred from cytoplasm to nucleus region in part at M phase in mouse fertilized eggs. Our findings identify that Cdc25B exported from nucleus initiates the mitosis by activating M-phase promoting factor in mouse fertilized eggs.

**Key words** mouse fertilized eggs; Cdc25B; M-phase promoting factor; expression; localization

Received: April 27, 2007 Accepted: June 29, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570945)

\*Corresponding author. Tel: 86-24-23261253, Fax: 86-24-23261253, E-mail: yzbiochem@yeah.net