

不同日龄犊牛睾丸中细胞周期调控基因 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 表达的差异

姚晓磊¹, 宋瑞高¹, 吕丽华¹, 李鹏飞², 刘 强¹, 黄 洋¹, 陈建伟¹,
姜晓龙¹, 曹 霞¹, 赵妙妙¹, 张贵花¹, 王永新¹, 石 磊^{1*}

(1. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801)

摘 要: 旨在探究不同日龄犊牛睾丸中细胞周期调控基因 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 的表达情况。本试验选取发育正常、体重相似的 5~6 d 荷斯坦哺乳公犊 18 头, 随机分为 3 组, 每组 6 头, 饲喂相同的基础日粮, 分别在 30(断奶)、60 和 90 d 时从各组分别随机抽取 2 头, 采集其睾丸备用; 通过 qRT-PCR 技术检测不同日龄犊牛睾丸中细胞周期调控基因 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达规律, 免疫组化技术对睾丸 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 进行定位分析。结果表明: 90 d 时 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达量显著高于 30 与 60 d ($P < 0.05$), 但 30 与 60 d 两种基因 mRNA 表达量均差异不显著 ($P > 0.05$); *p34^{cdc2}* 蛋白在不同日龄犊牛表达差异显著 ($P < 0.05$); *CyclinB1* 蛋白在 60、90 d 的表达量显著高于 30 d ($P < 0.05$), 但 60 和 90 d 差异不显著 ($P > 0.05$)。综上表明, *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 和蛋白在睾丸的表达量随着犊牛日龄的增加而增加, 且不同的日龄 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 和蛋白表达量存在一定的差异。

关键词: 睾丸; 细胞周期调控; *CyclinB1*; *p34^{cdc2}*

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)02-0245-06

Expressions of Cell Cycle Regulation Genes *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* in the Testes of Calves Aged on Different Days

YAO Xiao-lei¹, SONG Rui-gao¹, LÜ Li-hua¹, LI Peng-fei², LIU Qiang¹, HUANG Yang¹, CHEN Jian-wei¹,
JIANG Xiao-long¹, CAO Xia¹, ZHAO Miao-miao¹, ZHANG Gui-hua¹, WANG Yong-xin¹, SHI Lei^{1*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This study was performed to investigate the expression of cell cycle regulation genes *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* in testis of calves at different ages. The eighteen 5-6 days healthy Holstein calves (with similar weight) were randomly divided into 3 groups and fed with the similar basal diet. The testes of 2 calves from each group were collected at the time of 30, 60 and 90 d respectively. QRT-PCR method was used to detect the mRNA expression of the cell cycle regulatory genes *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* in testes of calves at different ages. The location of *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* in the testes was detected by immunohistochemical methods. The results showed that the highest expression of *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* mRNA and protein was obtained in the calves' testes of 90 d. The mRNA and protein expression levels of *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* increased with the increasing age. The mRNA expression level of the 2 genes at the age of 90 d were significantly

收稿日期: 2014-10-10

基金项目: 山西省回国留学人员科研资助项目(2014-重点5); 山西农业大学引进人才博士科研启动费资助(2014ZZ04); 国家自然科学基金项目(31172211; 31272471); 国家重点实验室开放课题(SNKF-2012-02); 农业部 948 项目(2010-Z43); 山西农业大学横向协作项目(2010HX54); 山西省青年基金项目(2012021027-6); 山西农业大学科技创新项目(201201)

作者简介: 姚晓磊(1989-), 男, 山西运城人, 硕士生, 主要从事动物繁殖生理方面的研究, E-mail: 1248725303@qq.com

* 通信作者: 石 磊, 博士, 副教授, 主要从事动物生殖生理和繁殖营养调控等方面的研究, Email: sxau51@gmail.com

higher than that at 30 and 60 d ($P < 0.05$). However, no significant difference was observed between 30 and 60 d ($P > 0.05$). The protein expression of $p34^{cdc2}$ in the testes of calves at different ages was significant ($P < 0.05$). Although the protein expression of *CyclinB1* at 60 and 90 d had no significant difference ($P > 0.05$), they were significantly higher than those at 30 d. This study indicated that the expression of *CyclinB1* and $p34^{cdc2}$ mRNA and protein increased with the increasing age and *CyclinB1* and $p34^{cdc2}$ in the testes of calves at different ages was significant.

Key words: testis; cell cycle regulation; *CyclinB1*; $p34^{cdc2}$

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。在这一过程中,每个事件都是有规律且精确地发生,在时空上受到严格的调控^[1-2]。真核细胞的细胞周期包括间期 G1、S、G2 和有丝分裂 M 期。其中细胞 G2/M 期的转换由 *CyclinB1*/*CDC2* (*CDK1*)来调控^[3-4]。近年来对细胞周期的研究取得了许多突破性进展,明确了细胞促分裂因子 (Mitosis-promoting factor, MPF)是由 *CyclinB1* 与 $p34^{cdc2}$ 组成的异质二聚体,MPF 活性是通过 $p34^{cdc2}$ 亚基中与 ATP 绑定的精氨酸和苏氨酸残基的磷酸化和脱磷酸化来实现的,该活性能促进细胞周期从 G2 到 M 转变^[1],因此,细胞分裂的完成需要这两种蛋白的保护来抵抗生殖细胞的凋亡^[5-7]。J. Yuan 等^[8]利用 RNA 干扰技术抑制 *CyclinB1* 表达,结果造成 G2/M 期阻滞,细胞生长被抑制并凋亡。精子发生与细胞周期失调密切相关^[9-10],同时细胞周期调控因子也参与了体内多种细胞的分化^[11],因此,对细胞周期调控的研究具有重要的理论价值。

近年来对动物睾丸中 $p34^{cdc2}$ 和 *CyclinB1* 表达量的研究均有报道,但对不同时期犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 $p34^{cdc2}$ 表达量未曾报道。本研究从 mRNA 水平和蛋白水平探讨 *CyclinB1* 和 $p34^{cdc2}$ 的表达规律,对探究牛睾丸精子发生及细胞凋亡等过程具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样品采集

选取发育正常、体重相似的 5~6 d 荷斯坦哺乳公犊 18 头,随机分为 3 组,每组 6 头,严格按照规范化程序饲养。分别在 30(断奶)、60 和 90 d 从各组随机抽取 2 头,采集睾丸;放入 DEPC 水处理过的 EP 管;−80 °C 冰箱保存备用;取睾丸相同部位,切成 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 的组织块,4% 多聚甲醛固定。

1.2 试剂

Trizol Reagent 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), SYBR PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa Bio Inc., Japan, TaKaRa; DRR037A 和 RR820L)、Rabbit Anti-CyclinB1 (BA0766) 和 Mouse Anti-P34cdc2 多克隆一抗 (BM1029)、Goat Anti-Rabbit (BA1003) 和 Goat Anti-Mouse 二抗 (SA1021)、黄色 DAB 染料 (AR1022)、即用型 SABC 试剂盒 (SA1027) 均购自博士德公司;其他试剂为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取及反转录 按 Trizol Reagent 试剂盒操作说明分别提取每组 6 头犊牛睾丸总 RNA,并调整浓度至 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 左右;反转录体系为 20 μL ,具体严格按照反转录试剂盒操作;反应条件:7 °C 15 min,85 °C 5 s;−20 °C 保存。

1.3.2 引物设计与合成 根据 NCBI 上 *Bos taurus* (*Calve*) 的相关基因序列,Primer 5.0 在线软件设计引物(表 1);由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物序列。

1.3.3 qRT-PCR 扩增前需要进行标准曲线的制作,比较目的基因和内参基因扩增效率。依据标准曲线和不同基因的不同扩增条件进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 20 μL ,严格按照 qRT-PCR 试剂盒进行;反应条件:95 °C 变性 10 s,95 °C 5 s,60 °C 25 s,40 个循环。

1.3.4 免疫组化 免疫组化流程严格按照 SABC 试剂盒步骤进行,其中做了部分修改;Rabbit Anti-CyclinB1 和 Mouse Anti- $p34^{cdc2}$ 一抗分别 1 : 100 稀释,4 °C 过夜,PBS 洗;Goat Anti-Rabbit 和 Goat Anti-Mouse 二抗分别 1 : 100 稀释,37 °C 30 min;同时设置阴性对照,用 PBS 代替一抗;Olympus 生物显微镜下观察,Image Pro Plus 6.0 软件拍照。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers of quantitative PCR

基因类型 Genotype	基因名称 Gene symbol	产物/bp Product size	登录号 Accession No.	引物序列(5'-3') Primer sequence
目的基因 Target gene	<i>CyclinB1</i>	197	XM_005889358.1	F:GGATACCTATGTGCCCAAGAAG R:GACGGCGACCCAGACTAAA
	<i>P34^{cdc2}</i>	86	NM_174016.2	F:CCGCTTGGAAAGTTAGGGACA R:AGTGGGTATGGTAGACCCCG
内参基因 Reference gene	18S	117	DQ222453.1	F:CAGACAAATCACTCCACCAA R:GAAGGGCACCACCAGGAGT

1.4 数据处理与图像分析

各目的基因相对表达量采用 $\Delta\Delta CT$ 法计算,目的基因的相对表达水平 $=2^{-\Delta\Delta CT}$,其中各基因表达量均经内参基因 18S 表达量的校正;每个个体在显微镜下取不少于 5 个视野进行拍照,使用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行分析,得出阳性区域的平均光密度值。以上数据采用 SPSS(Statistic Package for Social Science 19.0)统计软件分析检验,结果表示为“平均值 \pm 标准差”。

2 结果

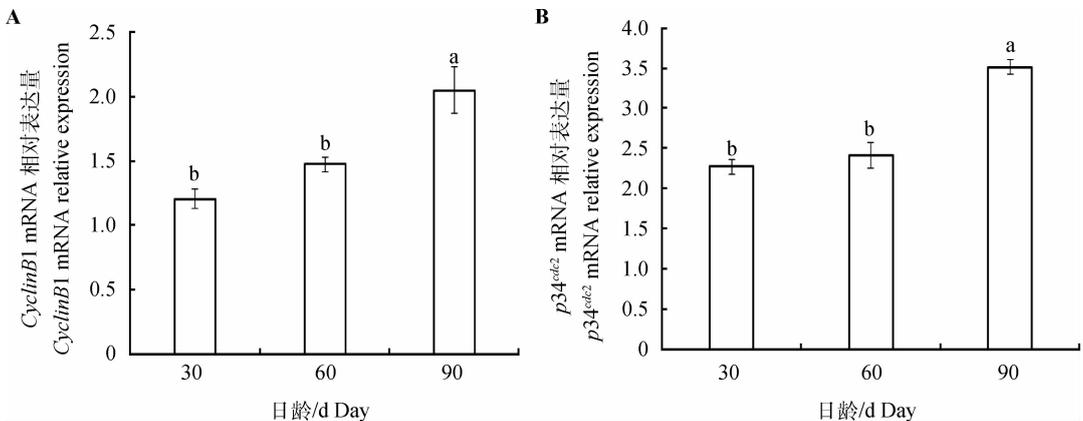
2.1 不同日龄犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达

不同日龄犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 相对表达量分析结果如图 1 所示,经过内参 18S 分别对其表达量的校正,*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 的表达

水平随着犊牛日龄的增加而升高,且二者 90 d 的表达水平显著高于 30 和 60 d($P < 0.05$),而 30 与 60 d 差异不显著。

2.2 不同日龄犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 蛋白表达与定位

由表 2 可知,90 d 犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 蛋白表达量均较高,随着犊牛日龄的增加,两种蛋白的表达量呈上升趋势。其中,*p34^{cdc2}* 在不同日龄犊牛蛋白表达量差异显著($P < 0.05$);*CyclinB1* 在 60 和 90 d 的蛋白表达量显著高于 30 d ($P < 0.05$),但 60 和 90 d 差异不显著($P > 0.05$)。免疫组化结果(图 2)显示,90 与 60 d *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 蛋白表达较高,30 d 表达量相对较少,与图片分析软件得出的平均光密度值基本一致。同时,这两种蛋白主要在靠近曲精细管的精原细胞上表达。



A. *CyclinB1* mRNA 相对表达量; B. *p34^{cdc2}* mRNA 相对表达量。不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

A. *CyclinB1* mRNA relative expression; B. *p34^{cdc2}* mRNA relative expression. Values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)

图 1 不同日龄犊牛睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 相对表达量

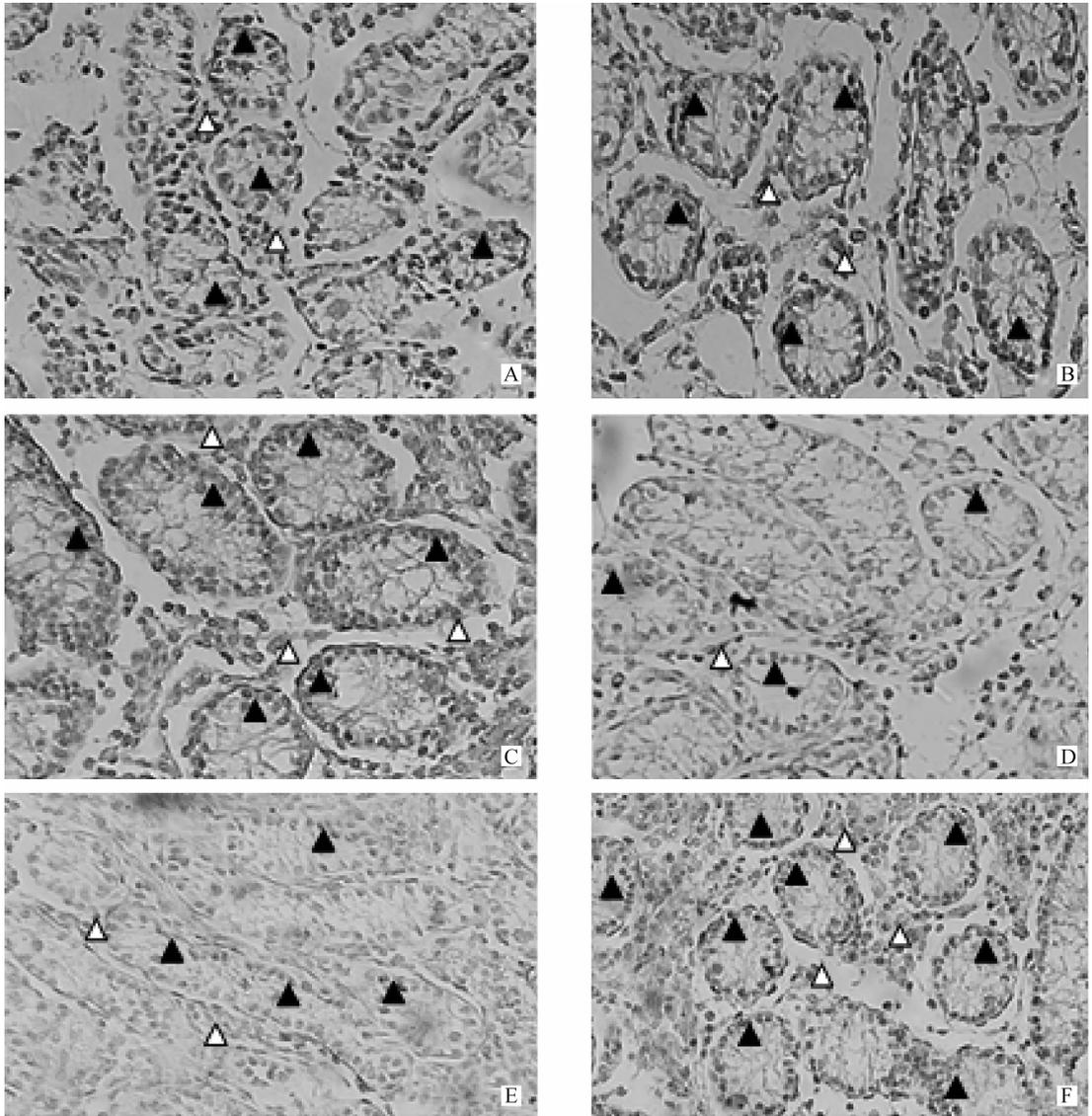
Fig. 1 Real time PCR analysis of *CyclinB1* and *p34^{cdc2}* mRNA on the testes of calves aged in different days

表 2 不同日龄犊牛睾丸组织中 CyclinB1 和 p34^{cdc2} 的平均光密度Table 2 The mean optical density value of CyclinB1 and p34^{cdc2} on the testes of calves aged in different days

项目 Items	日龄/d Days		
	30	60	90
CyclinB1	0.169±0.003 3 ^b	0.228±0.087 0 ^a	0.214±0.017 2 ^a
p34 ^{cdc2}	0.090±0.014 7 ^c	0.122±0.023 0 ^b	0.144±0.007 4 ^a

同一行数字肩注不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$)



A~C. 30、60 和 90 d CyclinB1 检测到的阳性产物；D~F. 30、60 和 90 d p34^{cdc2} 检测到的阳性产物；▲. 精原细胞；△. 睾丸间质细胞

A-C. The positive expression of CyclinB1 in different days (A. 30 d; B. 60 d; C. 90 d); D-F. The positive expression of p34^{cdc2} in different days (D. 30 d; E. 60 d; F. 90 d); ▲. Spermatogonium; △. Leydig cell

图 2 不同日龄犊牛睾丸中 CyclinB1 和 p34^{cdc2} 的蛋白表达 100×

Fig. 2 Immunohistochemical of CyclinB1 and p34^{cdc2} protein on the testes of calves in different days 100×

3 讨 论

细胞周期的顺利进行与完成依赖于细胞周期蛋白、细胞周期依赖性激酶(CDKs, cyclin-dependent kinase)和细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂(CKIs, cyclin-dependent kinase inhibitor)等一系列正负调节因子的相互作用而实现^[12]。细胞周期蛋白在细胞周期运转过程中有序地出现于某些特定时相,在细胞这一复杂的网络系统中发挥着中枢桥梁的作用,并在细胞周期的转换中起着重要的作用,细胞周期蛋白基因表达或者调控失常将导致细胞周期的进行发生障碍,进而导致凋亡^[13]。*CyclinB1* 与 *p34^{cdc2}* 形成的复合物 MPF 或 M 期促进因子(M phase-promoting factor)是启动有丝分裂的关键分子,活化后可以使核内蛋白磷酸化,调节染色质浓缩、核膜破裂,并形成纺锤体,从而可以使细胞从 G1/S 期进入 G2/M 期^[1]。*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 及蛋白表达量在整个生精过程的细胞周期中会呈现时间和空间上的变化。本试验利用 qRT-PCR 研究睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 的表达情况,得出了 90 d 的 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达量显著高于 30 和 60 d,而 30 和 60 d 之间却差异不显著,这说明随着犊牛日龄的增加,睾丸中 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达量也随着增加。通过免疫组化研究不同日龄睾丸中细胞周期蛋白定位和表达的差异,也发现 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 两种蛋白的表达量随着犊牛日龄的增大而逐渐升高,且 90 d 两种蛋白表达量均显著高于 30 d。在某种程度上,mRNA 和蛋白水平上得出总的表达趋势基本一致,推测二者基因在睾丸细胞的分化、增殖、精子发生过程中发挥了重要作用。B. Z. Yu 等^[14] 研究表明,*p34^{cdc2}* mRNA 在睾丸生殖细胞中的表达随着小鼠日龄的增大而增加,且在 40 d 表达量最高,这与本研究得出的表达趋势一致。G. F. Qiu 等^[15] 也得出,*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 在虹鳟鱼性成熟的睾丸表达量较多,而在不同时期的早期胚胎的 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 表达量较少且差异不显著。

睾丸内激素、自分泌和旁分泌因子交织形成十分精巧的调控网络,其中下丘脑—垂体—性腺轴是调节的核心^[16]。免疫组化结果表明,随着犊牛日龄的增加,精原细胞的数量逐渐增加,这可能与睾丸间质细胞分泌雄性激素和睾酮水平等有关。分泌的雄激素可以激活下丘脑—垂体—睾丸轴,对青春期前生

殖系统的生后发育起重要作用;分泌的睾酮是影响精子发生和性功能的主要激素^[17]。而睾丸间质细胞是黄体生成素(LH)的重要靶细胞,间质细胞膜上有 LH 阳性产物分布。位兰等^[18] 通过在不同日龄鸵鸟研究 LH 在睾丸上的表达情况,得出了在鸵鸟刚出生前后,随着年龄的增加,LH 主要在间质细胞和精原细胞上表达,进一步说明 LH 对鸵鸟原始生殖细胞分化为精原细胞的和间质细胞分化过程起着一定的调节作用。刚出生前后,雄激素和孕酮的分泌量基本呈上升趋势,对各级生精细胞的形成有一定的促进作用,所以与本试验得出的结果相符合。

本研究结果表明,*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 两种蛋白主要在靠近曲精细管的精原细胞上表达。表达的 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 可作为精原细胞的增殖分化能力鉴定指标之一,也说明这两种基因在睾丸细胞分化、增殖、精子发生等细胞周期中起着非常重要的作用。Y. Ren 等^[19] 研究在山羊睾丸 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 在精原细胞上有较少表达。K. Han 等^[20] 研究在拟穴青蟹睾丸 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 在精原细胞较少表达,主要在精子细胞和次级精母细胞上表达,这与本试验结果基本一致。但 Y. Ren 等^[19] 和 K. Han 等^[20] 研究两种基因主要在精子细胞和次级精母细胞上表达,本试验之所以没有得出此结论,因为 90 d 的犊牛还没有开始形成各级生精细胞。要得出 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 基因在何种生精细胞过表达,还有待于进一步的研究。免疫组化结果表明,随着犊牛的年龄增大,其曲精细管的厚度增大。这与王锦荣等^[21] 通过观察荷斯坦奶牛不同阶段发育情况得出的结论一致。不同日龄猪^[22] 睾丸发育情况的研究,也得出了相应的结论。但要证实本研究推论的正确性,仍需进一步研究证实。

4 结 论

犊牛生长到 90 d 时,*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* 不同时期主要在睾丸的精原细胞上表达;随着犊牛日龄增加,*CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 和蛋白的表达量也增加,且不同的日龄 *CyclinB1* 和 *p34^{cdc2}* mRNA 和蛋白表达量存在一定的差异;同时曲精细管的完整度和厚度也随着日龄而增加。

参考文献 (References):

- [1] DOREE M, HUNT T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its partner [J]. *J Cell Sci*,

- 2002,115:2461-2464.
- [2] HARTWELL L H, WEINERT T A. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events [J]. *Science*, 1989, 246: 629-634.
- [3] KAUSHAL N, BANSAL M P. Inhibition of Cdc2/CyclinB1 in response to selenium-induced oxidative stress during spermatogenesis: potential role of Cdc25c and p21 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 298(1-2): 139-50.
- [4] BLETHROW J D, GLAVY J S, MORGAN D O, et al. Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 1442-1447.
- [5] CALLARD G V, JORGENSEN J C, REDDING J M. Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Dev Genet*, 1995, 162: 1401.
- [6] SINHA-HIKIMI A P, LUE Y, DIAZ-ROMERO M, et al. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85(2): 175-182.
- [7] SINHA HIKIM A P, SWERDLOFF R S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis [J]. *Rev Reprod*, 1999, 4: 38-47.
- [8] YUAN J, KRAMER A, MATTHESS Y, et al. Stable gene silencing of CyclinB1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1753-1762.
- [9] KONG W H, ZHENG G U, JI NING L U, et al. Temperature dependent expression of p34^{cdc2} and CyclinB1 in spermatogenic cells during spermatogenesis [J]. *Cell*, 2000, 10: 289-302.
- [10] YU Q, WU J. Involvement of cyclins in mammalian spermatogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 315(1-2): 17-24.
- [11] POOLMAN R A, BROOKS G. Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(10): 2121-2135.
- [12] CHARRIER-SAVOURNIN F B, CHATEAU M T, GIRE V, et al. P21-mediated nuclear retention of CyclinB1-CDK1 in response to genotoxic stress [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 3965-3976.
- [13] YU F, YANG G, ZHAO Z, et al. Apoptosis related protein 3, an ATRA-up regulated membrane protein arrests the cell cycle at G1/S phase by decreasing the expression of CyclinD1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 358: 1041-1046.
- [14] YU B Z, SONG Y T, YU D H, et al. Expression and immunohistochemical localization of Cdc2 and P70S6K in different stages of mouse germ cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2006, 24(2): 113-117.
- [15] QIU G F, RAMACHANDRA R K, REXROAD C E, et al. Molecular characterization and expression profiles of CyclinB1, B2 and Cdc2 kinase during oogenesis and spermatogenesis in rainbow trout [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(3): 209-225.
- [16] 朱士恩. 动物生殖生理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- ZHU S E. Animal reproductive physiology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005. (in Chinese)
- [17] OSHAUGHNESSY P J, BAKER P J, JOHNSTON H. The foetal leydig cell differentiation, function and regulation [J]. *Int J Androl*, 2006, 29(1): 90-95.
- [18] 位 兰, 彭克美, 罗来强. 黄体生成素和褪黑素受体在不同日龄雏鸵鸟睾丸内的分布研究[J]. 经济动物学报, 2011, 15(1): 25-28.
- WEI L, PENG K M, LUO L Q. Distribution of luteinizing hormone and melatonin receptor in the testis during developmental period of Ostrich chicks [J]. *Journal of Economic Animal*, 2011, 15(1): 25-28. (in Chinese)
- [19] REN Y, WANG Q, SHI L, et al. Effects of maternal and dietary selenium (Se-enriched yeast) on the expression of p34^{Cdc2} and CyclinB1 of germ cells of their offspring in goats [J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 123: 187-191.
- [20] HAN K, DAI Y, ZOU Z, et al. Molecular characterization and expression profiles of Cdc2 and CyclinB1 during oogenesis and spermatogenesis in green mud crab [J]. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol*, 2012, (163): 292-302.
- [21] 王锦荣, 杨章平, 臧胜兵, 等. 荷斯坦奶牛生长发育规律研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(8): 3426-3428.
- WANG J R, YANG Z P, ZANG S B, et al. Growth and development law of Holstein cows [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(8): 3426-3428. (in Chinese)
- [22] 郑丕留, 李国贤, 蒋世娥, 等. 公猪 2~8 月龄生殖器官发育的解剖学及组织学观察[J]. 畜牧兽医学报, 1965, 8(4): 233-246.
- ZHENG P L, LI G X, JIANG S E, et al. Some anatomical and histological studies on the development of reproductive organs of 2 to 8 month-old boars [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1965, 8(4): 233-246. (in Chinese)