



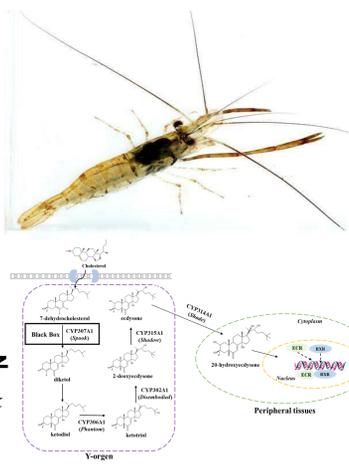
RNA干扰表明, 20—羟基蜕皮激素 (20E) 的前体基因 *Spook* 对日本沼虾的蜕皮有调节作用

原虎威¹, 乔慧², 傅洪拓^{1, 2, *}, 张文宜², 金舒博²

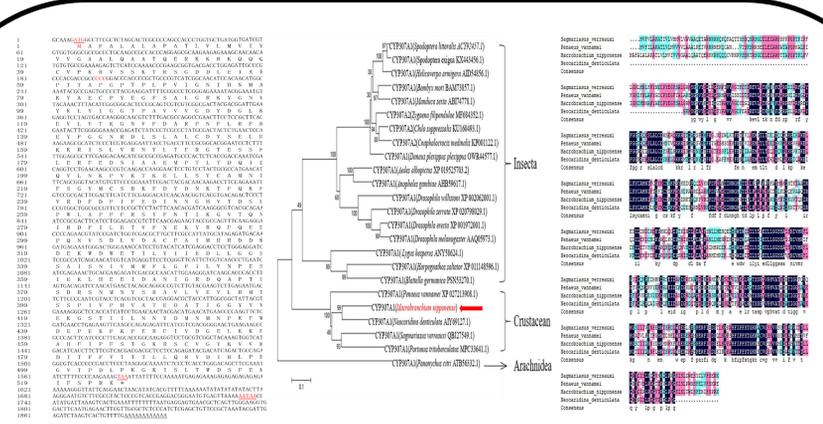
1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081

研究背景

- 日本沼虾是我国重要的淡水经济虾, 每年因不正常蜕皮大量死亡, 但是关于其蜕皮的分子机制仍不清楚, 从分子水平探究日本沼虾蜕皮现象得到背后机理有重要意义。
- 20-羟基蜕皮激素 (20E) 是一种蜕皮甾醇羟基化合物, 在节肢动物蜕皮过程中起重要作用。
- 节肢动物本身不能产生 20E, 而是通过从外界摄食的胆固醇由万圣节家族基因催化合成 20E。
- Spook* 基因是万圣节家族基因的重要成员之一, 在黑匣子中行使功能。我们在日本沼虾转录组文库中发现了 *Spook* 基因, 进而研究 *Spook* 基因在日本沼虾中行使的功能。



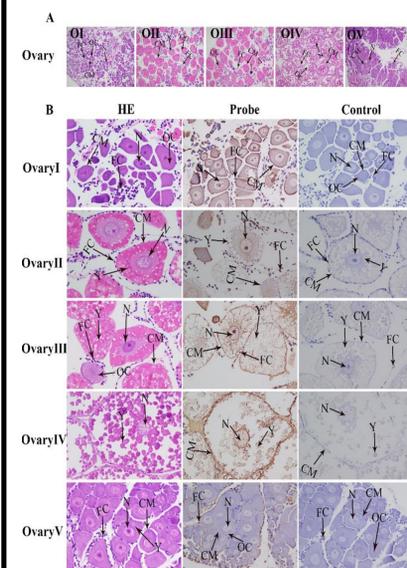
实验结果



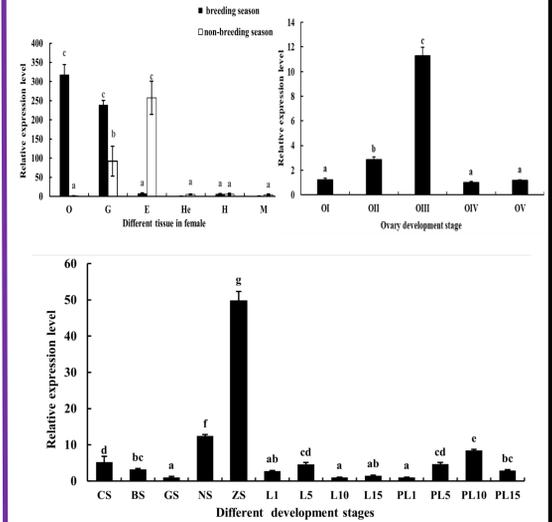
1. *Mn-spook* 核酸序列, 系统进化树, 氨基酸序列比对

材料与方法

健康成年日本沼虾 (1.5g—2.65g) 取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心。使用 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术克隆在日本沼虾卵巢中 *Mn-Spook* 基因的全长 cDNA。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 来分析 *Mn-Spook* 在不同组织、胚胎阶段和卵巢发育中的表达。使用原位杂交 (ISH) 分析 *Mn-Spook* 基因在卵巢中的位置。通过 RNA 干扰技术 (RNAi) 敲降 *Mn-Spook* 基因的表达, 以及使用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测实验组和对照组中日本沼虾 20E 的含量。最后, 通过比较实验组与对照组中日本沼虾的蜕皮频率来验证 *Mn-Spook* 基因在日本沼虾中行使的功能。



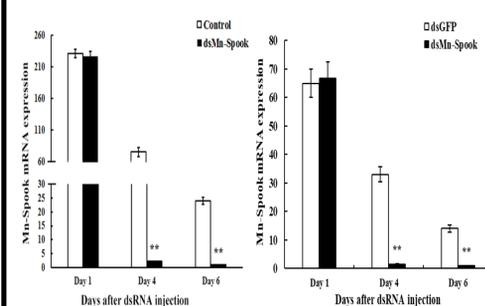
2. *Mn-spook* 原位杂交



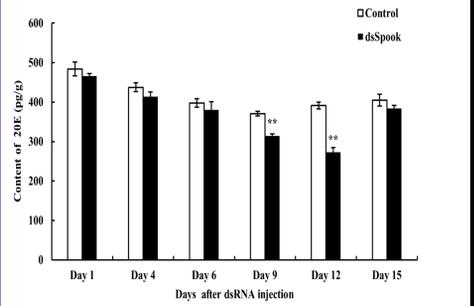
3. *Mn-spook* 在不同组织, 卵巢分期和不同发育时期的表达

结论

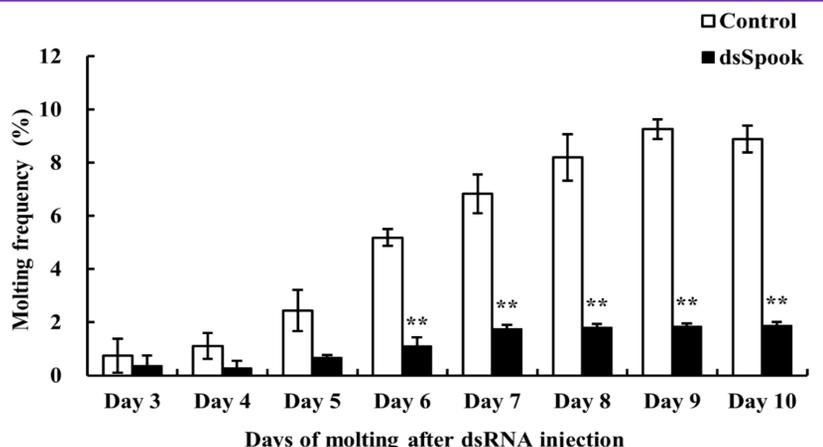
- Mn-Spook* cDNA 全长为 1,892 bp。系统进化树分析表明, 日本沼虾与多齿新米虾亲缘关系最近, 氨基酸序列比对表明日本沼虾与绿岩龙虾相似度最高为 63.8%。
- 繁殖季节卵巢和鳃中 *Mn-Spook* 表达水平显著高于非繁殖季节 ($P < 0.05$)。然而, 在眼柄中 *Mn-Spook* 的 mRNA 水平显示出相反的模式 ($P < 0.05$)。 *Mn-Spook* mRNA 在卵巢中的表达呈先升高后降低的趋势, 在 OIII 中达到最大值。胚胎中 *Mn-Spook* 的表达水平从 GS 到 ZS 逐渐增加 ($P < 0.05$), 然后迅速下降。
- 原位杂交结果显示 *Mn-Spook* 信号在卵母细胞的细胞质和细胞核中积累, 更多的信号在卵巢发育的第三阶段积累在细胞核中。在卵黄颗粒和滤泡细胞中也检测到 *Mn-Spook* 信号, 但在阴性对照中未观察到信号。
- RNAi 后, 实验组日本沼虾第 1、4、6 天 20E 含量低于对照组, 但差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 9 天和第 12 天, 实验组 20E 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。
- RNAi 干扰后第 1 天, 实验组与对照组的表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 实验组注射后第 4 天和第 6 天 *Mn-Spook* 基因的表达显著降低 ($P < 0.05$)。相对于对照组, 实验组在 RNAi 后第一天 *Mn-Spook* 基因表达下降 2.27% (2.87%), 第 4 天和第 6 天分别下降 97.08% (95.43%) 和 95.83% (92.83%)。
- 我们计算了实验组和对照组在 RNAi 后的蜕皮时间并计算了日本沼虾的蜕皮频率 (图 11)。RNAi 后, 日本沼虾在第 3 天开始蜕皮, 实验组和对照组在第 3-5 天的蜕皮频率没有显著变化 ($P > 0.05$)。实验组的蜕皮频率在第 6 天至第 10 天显著低于对照组 ($P < 0.05$)。



4. RNAi 干扰后 *Mn-spook* 基因的下降效率



5. RNAi 干扰后实验组和对照组中日本沼虾体内 20E 含量



6. RNAi 干扰后日本沼虾蜕皮频率