青虾 Ran 基因的克隆、表达及其在卵巢发育中的功能

卜宗元¹, 傅洪拓^{1,2}, 孙盛明², 乔慧², 金舒博², 张文宜², 龚永生², 蒋速飞², 熊贻伟², 吴滟²

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081

摘要:本研究应用 RACE 技术克隆了青虾(*Macrobrachium nipponensis*) *Ran* (Ras related nuclear protein, Ras 相关核 蛋白)基因全长 cDNA 序列,该基因 cDNA 全长 1191 bp,包括 218 bp的 5'UTR,648 bp的开放阅读框(ORF),405 bp的 3'UTR,编码 215 个氨基酸。青虾 *Ran* 基因属于 P-loop-NTPase 超级家族,拥有 PTZ00132 跨结构域,多肽分子 量约为 24.57 kDa,理论等电点 7.13。系统进化树分析表明,在动物界进化中非常保守的青虾 Ran 多肽与罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*)聚为一支,具有最近的亲缘关系。使用荧光定量 PCR 技术检测 *Ran* 基因在成体青虾不 同组织和卵巢不同发育期的表达差异,结果显示,*Ran* 基因在青虾不同组织中均有表达,其表达量在卵巢中最高, 是精巢表达量的 7~8 倍;随着卵巢的发育,*Ran* 基因的表达水平呈现上升趋势,在卵巢消退期又恢复到较低水平。 RNA 干扰后,实验组 *Ran* 基因表达量显著低于对照组(*P*<0.05),同时卵巢发育关键基因 *Vg*(vitellogenin)在卵巢中的 表达量也显著低于对照组(*P*<0.05),推测 *Ran* 基因参与雌性卵巢发育过程并对 *Vg* 基因的表达起到调控作用。

关键词:青虾; *Ran* 基因;克隆;卵巢发育; RNA 干扰 中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2017)03-0459-11

Ran(Ras related nuclear protein, Ras 相关核 蛋白)是小G蛋白家族的一员^[1], 真核生物的小G 蛋白可以分为 5 个家族: Ras, Rab, Rho, Arf 和 Ran^[2]。Drivas 等^[3]首次在人畸胎瘤细胞 cDNA 中 发现了 *Ran* 基因的开放阅读框,随后 Bischoff 等^[4] 从 HeLa 细胞中分离纯化到 Ran 多肽分子。 Koizumi 等^[5]发现 Ran 具有 GTP 酶活性,能连接 并水解 GTP, 参与真核细胞 DNA 复制、RNA 的 转录和加工、核质转运等一系列的生物过程。 Kimura 等^[6]发现 Ran 有控制细胞有丝分裂和减数 分裂的开始和结束、纺锤体的组装、染色体的正确 分配、核膜破裂和重组等重要功能。刘佩伟等^[1]发 现 Ran 参与细胞周期进程相关过程的调节,还影响 生长素信号通路。*Ran* 基因对非洲爪蟾(*Xenopus*)卵 母细胞的细胞发育周期有着重要影响^[7-8]。李常健 等^[9-10]发现 Ran 在异育银鲫(Carassius auratus gibelio)生殖细胞的发生和发育、精核解凝中发挥 作用。Zhou 等^[11]发现 Ran 基因可能影响斑节对虾 的卵巢发育, 然而 Ran 基因在青虾的克隆与表达 研究未有报道。

青虾(Macrobrachium nipponense)又名日本沼虾, 隶属于十足目(Decapoda),长臂虾科(Palaemonidae), 沼虾属,是我国重要的淡水养殖经济虾类^[12]。随 着青虾养殖规模的扩大、集约化程度的提高,导 致池塘密度过大,生长规格不齐、近亲交配等一 系列问题,严重制约了青虾养殖业的健康发展。因 此,开展青虾生殖相关基因的研究,不仅有助于深 层次、系统地了解青虾繁殖和发育规律,而且在控

收稿日期: 2016-12-13; 修订日期: 2017-02-14.

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)重点项目(BE2016308); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项项目(2016HY-ZD0402); 国家自然科学基金面上项目(31572617); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(15)10124]; 江苏省水产三新工程 (D2015-16); 无锡科学科技发展基金项目(CLE02N1514).

作者简介: 卜宗元(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 375334258@qq.com

通信作者: 傅洪拓(1964-), 男, 研究员, 博士, 主要研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: fuht@ffrc.cn

制青虾性早熟等方面具有广阔的应用前景。迄今, 有关青虾性腺发育相关基因的研究主要集中在性 腺抑制激素(gonad-inhibiting hormone)^[13]、促性腺激 素释放激素(gonadotropin-releasing hormone)^[14]、泛 素相关修饰蛋白结合酶(SUMO-conjugating enzyme)^[15]、MnvWD-Kazal^[16]、青虾精(卵)母细胞特 有因子(Gtsf1)^[17]等,但是关于 Ran 基因在青虾中 的功能尚不清楚。

本实验室已测得青虾精巢和卵巢表达谱序列, 获得了大量生殖发育相关基因^[18-19]。鉴于 Ran 基 因在水生动物生殖发育过程中的重要性^[9-11],本 研究从实验室构建的精巢和卵巢表达谱序列中筛 选出一个 Ran 基因同源序列,通过 RACE 技术克 隆得到青虾 Ran 基因 cDNA 序列全长,研究了 Ran 基因在成体青虾雌雄各组织间以及在卵巢不 同发育时期表达差异,并采用 RNA 干扰技术研究 了 Ran 基因对成体青虾卵巢发育的影响。本研究 旨在发现 Ran 基因在青虾卵巢发育的影响。本研究 旨在发现 Ran 基因在青虾卵巢发育的影响。本研究 方青虾卵巢的发育规律,为完善甲壳动物 Ran 基 因作用机制和解决青虾性早熟问题提供基础数据, 为青虾养殖业的健康发展提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验用虾

本实验用虾为野生青虾,取自无锡太湖湖区 (120°13'44"E,31°28'22"N),活力较强,雄性20只, 体重(3.59±0.24)g,雌性200只体重(2.44±0.19)g。 所有实验用虾在室内玻璃缸(120 L,93.5 cm × 43.5 cm × 30.5 cm)充气暂养1周,每天早晚定时 投喂螺蛳及配合饲料,投喂量约占体重的3%~5%, 每两天换水1次,换水量为40%~50%。

1.2 试剂

RNA 提取试剂有 DNA I Rnase Free 和 RNAiso Plus; 反转录试剂盒、5'-Full RACE 及 3'-Full RACE 试剂盒; PCR 所用试剂: DL-2000 DNA Marker、LA *Taq* DNA 聚合酶、dNTP 等。以 上试剂(盒)均购自宝生物(TaKaRa Bio Inc. Japan)。DEPC 水购自上海生工生物工程技术服务有 限公司。DH5α 感受态细胞和 pMD18-T 载体购自 全式金公司。自配试剂按照《分子克隆实验指南 精编版》^[20]上的方法配制。实验中用到的引物均 由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。

1.3 样品采集

参考梁国霞等^[17]的方法,采集雌雄不同组织 表达样品,取健康成熟青虾雌雄各 10 尾,冰浴麻 醉,雌雄各取性腺、肌肉、鳃、心脏、脑、眼柄、腹 神经等共计 14 个组织(*n*=5),样品均保存在-80℃ 冰箱,用于 RNA 提取。

根据 Qiao 等^[13]的卵巢分期标准,挑选健康的 成体雌虾,分别取卵巢增殖期、初级卵黄发生期、 次级卵黄发生期、成熟期、消退期 5 个不同发育 时期的卵巢组织(*n*=5)。冰浴麻醉,活体解剖各时 期卵巢,样品均保存在-80℃冰箱,用于 RNA 提取。

参考江丰伟等^[21]的方法进行青虾 RNA 干扰 研究, RNA 干扰试验后, 分别于第 1、4、7、10、 13 和 16 天收集各实验组和对照组卵巢样品(*n*=5), 样品均保存在-80℃冰箱, 用于 RNA 提取。

1.4 青虾 Ran 基因引物设计

根据从本实验室构建的精巢和卵巢表达谱序 列中 *Ran* 的 EST 序列, 遵循引物设计原则, 使用 Primer 5 软件设计特异性的引物^[22]快速扩增 cDNA 末端技术(RACE 技术), 从青虾卵巢中分别 克隆出 *Ran* 基因的 3'端和 5'端,并拼接成全长序 列。在 cDNA 全长序列的基因上, 采用同样的方 法设计1对荧光定量引物, 荧光定量引物已验证其 是有效的。荧光定量中所用到的 β-actin 引物参考 Zhang 等^[23]的设计, 并且广泛应用到青虾中^[24-25]。 实验所需全部引物见表 1。

1.5 青虾 Ran 基因的克隆

取青虾卵巢混合样,按 Trizol reagent 试剂的说 明方法提取总 RNA。所使用的 RNA 样品 OD_{260/280} 值在 1.9~2.1 之间。按 TaKaRa RACE 试剂盒的说 明,采用套式 PCR 对青虾 *Ran* 基因的 3'和 5'端进 行扩增。第一、二轮反应条件参考金舒博等^[26]: 94℃预变性 1 min;随后 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。

分别取 PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶(经过溴 化乙锭染色)电泳 15 min 后,切取特异性目的条 带,用生工胶回收试剂盒切胶回收纯化。将纯化 产物与 pMD18-T 载体进行连接,反应体系

引物	引物序列(5'-3')	长度/	作用
primer	primer sequence $(5'-3')$	bp length	function
MF1	GTAGTTCTTCCCCAGCTCTTTCC	23	中间序列扩增 middle sequence amplification
MR1	AAAAACGGAGTTGTCATAGGGTG	23	中间序列扩增 middle sequence amplification
F1	CCCTTCCAGAGGATGATGAAGAC	23	3'RACE 引物 primer for 3'-RACE
F2	GGGATACTGCTGGTCAAGAGAAG	23	3'RACE 引物 primer for 3'-RACE
3'-RACE outer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	23	3'RACE 引物 primer for 3'-RACE
3'-RACE inner	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	34	3'RACE 引物 primer for 3'-RACE
R1	AGCTTCTCTTGACCAGCAGTATC	23	5'RACE 引物 primer for 5'-RACE
R2	CCATTGTGACTTCTGGAGGTAGA	23	5"RACE 引物 primer for 5'-RACE
5'-RACE outer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	23	5'RACE 引物 primer for 5'-RACE
5'-RACE inner	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	32	5'RACE 引物 primer for 5'-RACE
QF1	GCTGAGCAAGATATGCCAACATT	23	RT-PCR 引物 forward primer for RT-PCR
QR1	AACCATCTCTCAATCCTCCAAGC	23	RT-PCR 引物 primer for expression
β -actin F	TATGCACTTCCTCATGCCATC	21	RT-PCR 对照引物 control primer for RT-PCR
β -actin R	AGGAGGCGGCAGTGGTCAT	19	RT-PCR 对照引物 control primer for RT-PCR
IF1	TAATACGACTCACTATAGGGCTGCTGAGCAAGATATGCCA	40	双链 RNA 制备 primer for dsRNA preparation
IR1	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGAGGTAGAAGTGCAGGC	40	双链 RNA 制备 primer for dsRNA preparation

表 1 本实验所用引物列表 Tab. 1 List of primers used in the current study

为:4 μL DNA, 1 μLpMD18-T, 5 μL Solution I。混 匀后 PCR 仪上 16℃连接过夜。将连接产物转化到 Trans DH5α 大肠杆菌感受态细胞, 37℃过夜培养 后,将含有目的片段重组质粒的菌液送往上海博 尚生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.6 青虾 Ran 基因时空表达分析

用不同发育时期样品的总 RNA 作为 cDNA 第 一链的合成模板,按照 BIO-RAD iScript cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明进行 cDNA 第一链的 合成。根据分光光度计所测量出样品 RNA 的浓度, 分别取 1 μg 总 RNA 为模板,分别进行独立的反 转录反应,所有操作均在冰上进行,产物–80℃冰 箱保存备用。使用 BIO-RAD iQ5 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应,所用引物见表 1,反应过程按 照 BIO-RAD SsoFast EvaGreen Supermix 推荐条 件如下:首先 95℃预变性 1 min; 然后进入 40 个 循环,每个循环中包括 95℃变性 10 s,55℃延伸 30 s 两个步骤;循环结束后,从 55℃缓慢升温到 95℃,绘制熔解曲线。每个样本设置 3 个重复,每 次反应都以 β -actin 基因作为阴性对照,最后由系 统自动记录荧光曲线和数据,用于后期数据分析。

PCR 产物均须用 1.2%的琼脂糖凝胶(经过溴 化乙锭染色)电泳检测其是否为单一特异性扩增 条带, 以确保实验结果的可靠性。

1.7 青虾生物学信息分析和数据统计分析

在 NCBI 中用 BLASTN 对测序结果进行比对 分析,使用 ORF Finder 软件(http://www.ncbi.nlm. nih.gov/gorf)分析开放阅读框,采用 DNAMAN5.0 软件将中间序列、3'端序列、5'端序列进行拼接得到 青虾 *Ran* 基因 cDNA 序列。用在线 DNA 和蛋白序 列处理工具(http://www.91bio.com/SMS2/rev-comp. html)推导蛋白质分子量。用 SignalP4.1Server (http://www.cbs.dtu.dk/services)进行信号肽预测。

数值计算参考 2^{-ΔΔC_r}方法进行^[27]。数据用平均 值±标准差(*x*±SD)表示,使用 SPSS 17.0 进行单因 素方差分析(One-Way ANOVA),使用 Turkey B 检 验法进行两两比较,以 0.05 作为差异显著性水平。 用 Excel 绘制青虾 *Ran* 基因的相对表达量直方图。

1.8 青虾 Ran 基因双链 dsRNA 的合成

按照 Transcript Aid TM T7 High Yield Transcription kit (Fermentas, Inc., USA)试剂盒的操作 步骤进行 dsRNA 的制备。并用 1.2%~1.5%的琼脂 糖凝胶电泳检验纯化后 dsRNA 的质量。使用 Bio Photometer 紫外分光光度计测定 dsRNA 的浓度, 用 DEPC 水将其调至实验所需浓度, -80℃冰箱保 存备用。

1.9 青虾 Ran 基因的 RNA 干扰实验

根据江丰伟等^[21]进行青虾 RNA 干扰预实验, 通过荧光定量数据分析确定青虾 Ran 基因 RNA 干扰有效。挑选健康、活力强,体重(2.44±0.19)g 的雌性青虾分为3组,每组50只,实验所用雌虾 处于卵黄发育成熟期(IV 期): 注射组和对照组(注 射 DEPC)。将上述 dsRNA 溶液以 4 µg/g 的剂量 注射到青虾围心腔内。对照组注射相同体积 DEPC 水,分别收集注射后的第 1、4、7、10、13 和 16 天卵巢样品(n=5),并将组织保存于-80℃冰箱。

用荧光定量 PCR 检测注射 Ran dsRNA 后卵 巢中 Ran 基因和 Vg 基因的表达规律。

结果与分析 2

2.1 Ran 基因 cDNA 序列结构特征

青虾 Ran 基因 cDNA 全长序列(登录号为 KY270878)为 1191 bp, 其中开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)为 648 bp, 共编码 215 个氨 基酸, 3'UTR 中具有典型的加尾信号(AATAA)和 Poly(A)尾(图 1)。用在线 DNA 和蛋白序列处理

1	GGTAGCGCCAGGCCAAGCCTAGCTTAGGCCCAATTGAATGGGAGGTTAACCAGGAGAGCT
61	GCCCCTTGGGTTGAATTCGTCTTGTGTTTGCCGCCCGGGTTGGAAGACGTAGTTCTTCCC
121	CAGCTCTTTCCAGGAGTCATAGTTAGACTGCCACTACCAACCA
181 aa1	AATTAGGACCTGCAATATTTGATACTTGACTGATAAAA ATG GCTGCTGAGCAAGATATGC M A A E Q D M
241 aa8	CAACATTCAAGTTGGTGTGGTGGGGGGGGGGGGGGGGGG
301 aa28	GACACTTGACTGGAGAATTTGAAAAGAAGTATGTTGCAACACTAGGTGTTGAAGTTCATC R H L T G E <u>F E K K Y V A</u> T L G V E V H
361 aa48	CACTTGTATTCCACACAAACAGAGGTCCTATCAAATTTAATGTATGGGATACTGCTGGTC PLVFHTNRGPIKFNVWD <u>TAG</u>
421 aa68	AAGAGAAGCTTGGAGGATTGAGAGATGGTTATTATATCCAGGCCCACTGTGCAGTCATTA Q E K L G G L R D G Y Y I Q A H C A V I
481 aa88	TGTTTGATGTCACCTCAAGAGTAACATACAAGAATGTCCCCAATTGGCATCGTGACCTTG M F D V T S R V T Y K N V P N W H R D L
541 aa108	TGCGTGTTTGTGAAAACATACCTATTGTTCTATGTGGCAATAAGGTAGATGTTAAGGATC V R V C E N I P I V L C G N K V D V K D
601 aa128	GTAAGGTGAAAGCAAAATCTATCATATTCCACAGGAAGAAGAATCTCCAGTATTATGACA R K V K A K S I I F H R K K N L Q Y Y D
661 aa148	TCTCTGCAAAATCGAATTACAACTTTGAGAAGCCCTTCCTCTGGCTTGCAAGGAAACTTA ISAKSNYNFEKPFLWLARKL
721 aa168	TCGGAGATCCTAACCTTGAATTTGTTGCCATGCCTGCACTTCTACCTCCAGAAGTCACAA I G D P N L E F V A M P A L L P P E V T
781 aa188	TGGATCCACAGTGGCAGCAACAGATTGAAAATGACTTGCAAGAAGCATCTCAGACTGCCC M D P Q W Q Q Q I E N D L Q E A S Q T A
841 aa208	TTCCAGAGGATGATGAAGACTTG TAA GCTGAACTGTGATATATAAACAGAAAATTATAAC L P E D D E D L $*$
901	${\tt CTCTCCACTTTACTTTTATAAGGATGTTAAGGATTGTTCATTATAGGTTTATCATTGGAT}$
961	TATTTTTGTTACTCCAGTATCCAAATTAACAGTTGTAATTTTTTTGCAGCAAAGGAATTT
1021	TTCTTTTCCATCTGTGAAGCATTCCTTTTCTGCAATGAATTGATTG
1081	GTAATACCTGTAATTGATTTCAACAAATTGAGGGGTGTTGCACCCTATGACAACTCCGTT
1141	ТТТТААТАА

图 1 青虾 Ran 基因 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

大写字母是上方核苷酸序列对应的氨基酸序列;起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA)以粗体表示;下划线表示下游效应分子结合结构域;阴 影部分表示 GDP/GTP 结合活性的结构域;加尾信号1(AATAA)用方框表示.*表示终止密码子.

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of Ran cDNA

Capital letters below the nucleotide sequences indicate the corresponding amino acid sequence. The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are shown in boldface. Downstream effector molecule binding domain is underlined. Structure domains of GDP/GTP binding activity related peptide are shaded. Signal sequence (AATAA) is boxed. Asterisk indicates stop codon.

工具推导 *Ran* 基因蛋白质分子量约为 24.6 kDa, 理论等电点 7.13;使用 SignalP 4.1 Server 对 Ran 进行信号肽分析,结果如图 2 所示,max C 在 22 位点上的分值为 0.108,max Y 在位点 11 的分值为 0.288,max S 在位点 1 上的分值为 0.160,mean S 和 mean D 在 1~10 的位点间分值分别为 0.116 和 0.118,表明 Ran 蛋白没有明显的信号肽特征序列, 该蛋白不属于分泌型蛋白。





Original cut site score: C-score; Signal peptide score: S-score; Integrated cutting site score: Y-score.

2.2 青虾 Ran 基因系统进化分析

利用 MEGA 5.0 软件对青虾 Ran 与昆虫类等其 他物种 Ran 的氨基酸序列进行系统发育分析,计 算方法采用 Bootstrap 法重复计算 1000 次,系统进 化树见图 3。从图 3 可以看出,青虾与罗氏沼虾聚 为一支,亲缘关系最近,其次是中国明对虾和斑 节对虾。Ran 蛋白在进化过程中具有极高的保守性, 所有的甲壳类聚为一支,鸟类聚为另外一支。

2.3 青虾 Ran 基因同源进化分析

利用 DNAMAN5.0 对甲壳类和昆虫类的动物 等多个物种的 Ran 进行氨基酸序列比对,发现与 青虾 Ran 同源性较高的都是小G蛋白家族的 Ran, 青虾的 Ran 基因所编码的氨基酸序列与罗氏沼虾 的相似性为 99%,与中国明对虾的相似性为 98%, 与斑节对虾的相似性为 98%。如图 1 和图 4 所示, 青虾 Ran 含有 4 个具有 GDP/GTP 结合活性的结 构域,其中 EXSAX4 和 N(T)KXD 为 GDP/GTP 的 结合部位,DXXG 和 GXXXGKS(T)为 GTP 酶的活 性部位,以及 1 个下游效应分子结合结构域 (FEKKYVA)。从第 10 个氨基酸至第 175 个氨基 酸为 P-loop NTPase 保守结构域,拥有能水解 GTP 为 GDP 的 α 亚基。

2.4 青虾 Ran 基因的组织分布

使用实时荧光定量 PCR 分别检测 Ran 基因在 雌性青虾和雄性青虾各 7 个成体不同组织中的表 达模式和分布情况,如图 5 所示。

Ran 基因在雌性青虾中的卵巢、脑、腹神经 节和眼柄等 7 个组织中均有表达,在卵巢中表达 量最高,在肌肉、腹部神经和眼柄等其他组织中 都有少量的表达。Ran 基因在雄性青虾中的精巢、 心脏、腹神经节和肌肉等 7 个组织中都有表达,但 是都显著低于卵巢中的表达量(P<0.05)。

2.5 Ran 基因在青虾卵巢不同发育时期的表达 规律

为了研究 Ran 基因在青虾卵巢中的作用,本研究使用实时荧光定量 PCR 检测 Ran 基因在青虾不同卵巢发育时期的表达模式和分布情况,如图 6 所示。

Ran 基因表达在卵巢发育过程中有先降低后升高的趋势。从初级卵黄发育期到成熟期这个过程中, Ran 基因的表达量显著上升(P<0.05)。以次、初级 卵黄发育时期为分界点,再从卵巢成熟直到初级卵 巢发育期, Ran 基因的表达水平恢复到较低水平。

2.6 RNA 干扰 Ran 基因对卵巢发育的影响

使用实时荧光定量 PCR 检测 RNA 干扰后, Ran 基因在青虾卵巢发育不同发育时期的表达情况如图 7 所示。随着对照组卵巢的发育, Ran 基因 在卵巢中呈现了先降低后升高的表达规律, Ran 基因表达量从第 1 天卵巢发育成熟期到第 7 天消 退期逐渐降低到低谷,随后伴随卵巢第 2 轮发育 又继续上升。从图 7 中可以看出,注射组这一规 律明显被延后,通过荧光定量检测到注射组卵巢 中 Ran 基因的表达量都显著低于同期对照组 (P<0.05),表明 RNA 干扰有效。

进行 RNA 干扰后,使用实时荧光定量 PCR 检测 Vg 基因在青虾卵巢发育不同发育时期的表达







情况如图 8 所示。用于 RNA 干扰的实验组和对照 组青虾都处于卵巢发育成熟期,随着对照组卵巢 的发育, Vg 基因在卵巢中呈现了先降低后升高的 表达规律, Vg 基因表达量从第 1 天卵巢发育成熟 期到第 7 天消退期逐渐降低到低谷,随后伴随卵 巢第 2 轮发育又继续上升。从图 8 中可以看出,注 射组这一规律明显被延后,注射组卵巢中 Vg 基 因的表达量都显著低于同期对照组(P<0.05),表 明进行有效的 RNA 干扰降低青虾卵巢中 Ran 基 因的表达量之后, Vg 基因的表达也受到了影响。

3 讨论

3.1 青虾 Ran 基因序列特征

为了更好地研究青虾卵母细胞的发育机制,

本研究克隆了青虾Ran基因全长,同时使用软件预 测其所编码的氨基酸序列含有P-loop_NTPase保守 跨膜结构域;含有4个具有GDP/GTP结合活性的结 构域,这4个结构域的共有序列从I到IV分别为 GXXXGKS(T)、DXXG、N(T)KXD和EXSAX,以 及1个下游效应分子结合结构域(FEKKYVA);信 号肽预测青虾Ran基因存在信号肽;拥有GTP等结 合位点,拥有能水解GTP为GDP的α亚基,这说明 Ran蛋白具有GTP结合活性。利用DNAMAN5.0对 甲壳类和昆虫类的动物等多个物种的Ran多肽进 行氨基酸序列比对,发现与青虾Ran蛋白同源性较 高的都是小G蛋白家族的Ran蛋白,青虾与罗氏沼 虾的相似性为99%,与中国明对虾的相似性为99%, 与斑节对虾的相似性为98%。所构建的Ran基因分

 $\begin{array}{c} 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \\ 215 \end{array}$

座头鲸 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本嚢对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	MAQEADMPTFKCVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MAAEQDMPTFKLVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MAQENDMPTFKCVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MAAEQDMPTFKLVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MAAEQDMPTFKLVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MAAEQDMPTFKLVLVGDGGTGKTTVKRHLTGEFEKKYVA MAAEQDMPTFKLVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MANEPDMPTFKCVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA MATEPDMPTFKCVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVA
座头鲸 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本囊对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	TLGVEVHPLIFHTNRGPIRFNVWDTAGQEKFGGLRDGYYI TLGVEVHPLVFHTNRGPIKFNVWDTAGQEKLGGLRDGYYI TLGVEVHPLIFHTNRGPIRFNVWDTAGQEKFGGLRDGYYI TLGVEVHPLVFHTNRGPIKFNVWDIAGQEKLGGLRDGYYI TLGVEVHPLVFHTNRGPIKFNVWDTAGQEKLGGLRDGYYI TLGVEVHPLVFHTNRGPIKFNVWDTAGQEKLGGLRDGYYI TLGVEVHPLIFHTNRGPIRFNVWDTAGQEKFGGLRDGYYI TLGVEVHPLIFHTNRGPIRFNVWDTAGQEKFGGLRDGYYI TLGVEVHPLIFHTNRGPIRFNVWDTAGQEKFGGLRDGYYI
座头鯨 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本囊对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	QGQCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAIIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QGQCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAIIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAIIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAIIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QGQCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QGQCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG QAHCAVIMFDVTSRVTYKNVPNWHRDLVRVCENIPIVLCG
座头鲸 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本囊对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	NKVDIKDRVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDVKDRKVKAKSIIFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDIKDRVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDVKDRKVKAKSIIFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDVKDRKVKAKSIIFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDVKDRKVKAKSIIFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDIKDRKVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDIKDRKVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDIKDRKVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF NKVDIKDRKVKAKSIVFHRKKNLQYYDISAKSNYNFEKPF
座头鲸 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本囊对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVQMDPQWQRQ IENDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVQMDPQWQQQ IENDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVQMDPQWQRQ IENDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVQMDPQWQRQ IENDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVQMDPQWQRQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IEKDL LWLARKL IGDPNLEFVAMPALLPPEVTMDPQWQQQ IENDL
座头鲸 Dufourea novaeangliae 中国明对虾 Fenneropenaeus chinensis 印度跳蚁 Harpegnathos saltator 罗氏沼虾 Macrobrachium rosenbergii 日本囊对虾 Marsupenaeus japonicas 斑节对虾 Penaeus monodon 斑节对虾 Penaeus monodon(2) 红火蚁 Solenopsis invicta 扁胸切叶蚂蚁 Vollenhovia emeryi 青虾 Macrobrachium nipponensis	KEAQETALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL KEAQETALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL KEAQETALPEDDEDL KEAQETALPEDDEDL QEASQTALPEDDEDL

图4 不同物种Ran编码蛋白的氨基酸序列比对

灰色表示序列完全相同,粉红色表示序列相似度为60%~100%,蓝色表示序列相似度在60%以下.

Fig. 4 Alignment of deduced amino acid sequence of Ran between different species

The sequences with gray background are exactly the same; the pink background indicates that the sequence similarity is 60%–100%, the blue background indicates that the sequence similarity is below 60%.

系统进化树显示,青虾 Ran 多肽与罗氏沼虾聚为 一支,具有最近的亲缘关系。以上结论表明,青虾 Ran 基因在动物界进化中非常保守。有研究表明, Ran 基因对非洲爪蟾卵母细胞的细胞发育周期有 着重要影响^[7-8];作为重要的细胞分裂调控因子, Ran 基因参与调控细胞周期中各个时期的许多生 命活动,包括间期核质运输、有丝分裂前期纺锤 体的组装、染色体的正确定位和平均分配、有丝 分裂末期核膜重建以及核孔复合体的重建进程等, 确保细胞周期顺利进行^[28-33]。青虾 Ran 基因与已 研究物种 Ran 基因有极高的相似度,预示 Ran 基 因可能在青虾体内同时行使多种功能。



图 5 Ran 基因在青虾不同成体组织中的表达 小写字母不同表示差异显著(P<0.05).





图 6 Ran 基因在青虾卵巢不同发育时期的表达规律 I: 卵原细胞增殖期; II: 初级卵黄发生期; III: 次级卵黄 发生期; IV: 成熟期; V: 消退期. 小写字母不同表示差异 显著(P<0.05).

Fig. 6 Expression of *Ran* gene in different development stages of *Macrobrachium nipponense* ovary
I: oogonium proliferation; II: primary vitellogenesis; III: secondary vitellogenesis; IV: maturation stage; V: paracmasis stage. Different lowercase letters indicate significant differences(*P*<0.05).





Fig. 7 Real-time PCR analysis of *Ran* expression levels in the *Macrobrachium nipponense* ovary after inject with *Ran* dsRNA(4 µg/g)

Different lowercase letters indicate significant differences statistically(*P*<0.05).



图 8 Ran dsRNA 注射后 Vg 在青虾卵巢中的表达量变化 小写字母不同表示差异显著(P<0.05).

Fig. 8 Real-time PCR analysis of Vg expression levels in the *Macrobrachium nipponense* ovary after inject with *Ran* dsRNA(4 µg/g)

Different lowercase letters indicate significant differences statistically(*P*<0.05).

3.2 青虾 Ran 基因的组织表达差异

李常健等^[9]研究发现, Ran 基因在异育银鲫卵 巢和精巢中表达水平较高,在其他组织表达水平 较低,同时检测到 Ran 在银鲫不同胚胎发育阶段 均有较强表达,这表明 Ran 基因在银鲫中可能起 着多种作用,尤其在生殖细胞的发生中具有重要 作用。本研究发现青虾 Ran 基因在雌虾卵巢中的 表达水平高于其他组织,在雄性青虾各组织中表 达量都偏低, Ran 基因在青虾卵巢中的表达水平 比精巢高 7~8 倍,这与在斑节对虾中的研究结果 类似^[11]。

Ran 基因在卵巢发育过程中有先降低后升高的表达趋势。从初级卵黄发育期到成熟期这个过程中, Ran 基因的表达量显著上升。以次级卵黄发生期为分界点,再从卵巢成熟直到初级卵巢发育

期, Ran 基因的表达水平恢复到较低水平。有研究 表明卵子的发育与卵巢发育同步^[15],随着青虾从 卵巢逐渐发育成熟也就是整个卵子形成过程中, Ran 基因的表达水平不断增加,与卵黄蛋白原基 因(Vg)在卵巢不同发育时期的表达规律一致。Bai 等^[34]研究发现,青虾 Vg 基因是青虾卵巢发育的 关键基因, Vg 基因不仅可以促进卵母细胞的生长 和分化,同时也为胚胎的发育提供营养来源,通 过调控 Vg 基因的表达可直接影响到青虾卵巢发 育。青虾 Ran 基因在卵巢中的表达规律与 Vg 基 因保持一致,这也预示着 Ran 基因与青虾卵巢发 育关系密切。

3.3 RNA 干扰 Ran 基因对卵巢发育的影响

为了进一步验证了 Ran 基因与卵巢发育的关 系,本研究针对青虾进行了 RNA 干扰,发现注射 Ran dsRNA 的实验组其 Ran 基因表达量均低于同 期对照组,表明 RNA 干扰有效。同时检测了青虾 卵巢中 Vg基因的表达变化,发现注射 Ran dsRNA 的实验组其 Vg 基因表达量均低于同期对照组, 表明进行有效的 RNA 干扰降低青虾卵巢中 Ran 基因的表达量之后,Vg基因的表达情况也受到了 影响。Vg基因表达量从卵巢发育成熟期到消退期 逐渐降低到低谷,随后伴随卵巢第二轮发育继续 上升,Vg基因在卵巢中呈现先降低后升高的表达 规律,与 Ran 基因一致。这表明青虾 Ran 基因可 能调控着 Vg 基因的表达,进而影响卵巢的发育。

参考文献:

- [1] Liu P W, Qi M, Ren H Y. Functions of the small GTPase protein Ran in cell cycle regulation[J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(30): 2472–2477. [刘佩伟,齐洺,任海云.小 G 蛋白 Ran 在细胞周期调控中的作用[J]. 科学通报, 2011, 56(30): 2472–2477.]
- [2] Vernoud V, Horton A C, Yang Z B, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2003, 131(3): 1191–1208.
- [3] Drivas G T, Shih A, Coutavas E, et al. Characterization of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(4): 1793–1798.
- [4] Bischoff F R, Ponstingl H. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(23): 10830–10834.

- [5] Koizumi K, Stivers C, Brody T, et al. A search for Drosophila neural precursor genes identifies ran[J]. Dev Genes Evol, 2001, 211(2): 67.
- [6] Kimura T, Hashimoto I, Nishikawa M, et al. Nucleocytoplasmic transport of luciferase gene mRNA requires CRM1/Exportin1 and Ran GTPase[J]. Med Mol Morphol, 2009, 42(2): 70–81.
- [7] Ohba T, Nakamura M, Nishitani H, et al. Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound *Ran*[J]. Science, 1999, 284(5418): 1356–1358.
- [8] Clarke P R, Zhang C. Ran GTPase: a master regulator of nuclear structure and function during the eukaryotic cell division cycle[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(9): 366–371.
- [9] Li C J, Liu J, Shi Y H, et al. Full length cDNA cloning and tissue expression specificity of *Ran* gene in color crucian carp[J]. Zoological Research, 2003, 24(3): 173–179. [李常健, 刘军, 石耀华, 等. 彩鲫 *Ran* 基因全长 cDNA 的克隆及其 组织表达特异性分析[J]. 动物学研究, 2003, 24(3): 173–179.]
- [10] Li C J, Liu J, Gui J F. cDNA cloning of *Ran* gene and analyses on its expression characterization and role in sperm nuclei decondensation *in vitro* in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(3): 297–304. [李常健, 刘军, 桂建芳. 银鲫 *Ran* 基因的 cDNA 克隆、表达特征及其在精核解凝中的作用[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 297–304.]
- Zhou F L, Zheng L, Yang Q B, et al. Molecular analysis of a ras-like nuclear (Ran) gene from *Penaeus monodon*, and its expression at the different ovarian stages of development[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(4): 3821–3827.
- [12] Fu H T, Wan S Q, Fu C P, et al. Screening of microsatellite markers associated with growth traits in *Macrobrachium nipponense*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2010, 34(5): 1043-1048. [傅洪拓, 万山青, 付春鹏, 等. 青虾生长性状相关的微卫星标记筛选[J]. 水生生物学报, 2010, 34(5): 1043-1048.]
- [13] Qiao H, Xiong Y, Zhang W, et al. Characterization, expression, and function analysis of gonad-inhibiting hormone in Oriental River prawn, *Macrobrachium nipponense*, and its induced expression by temperature[J]. Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, 2015, 185: 1–8.
- [14] Du Y X, Ma K Y, Qiu G F. Discovery of the genes in putative GnRH signaling pathway with focus on characterization of GnRH-like receptor transcripts in the brain and ovary of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Aquaculture, 2015, 442: 1–11.
- [15] Zhang F, Chen L, Ping W, et al. cDNA cloning and expression of *Ubc9* in the developing embryo and ovary of oriental

第 24 卷

river prawn, *Macrobrachium nipponense*[J]. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol, 2010, 155(3): 288–293.

- [16] Zhang F, Chen L, Qin J, et al. A novel gene with a vWD domain and three Kazal-type domains: Molecular cloning and expression in the ovary of the oriental river prawn, *Mac-robrachium nipponense*[J]. Genetika, 2011, 47(9): 1190–1195.
- [17] Liang G X, Fu H T, Qiao H. Molecular characterization and developmental expression of *Gtsf1* in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 261–267. [梁国霞,傅洪拓,乔慧,等.青虾精 (卵)母细胞特有因子 Gtsf1 基因的克隆及其时空表达分析 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(2): 261–267.]
- [18] Qiao H, Xiong Y W, Jiang S F, et al. Gene expression profile analysis of testis and ovary of oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, reveals candidate reproduction-related genes[J]. Genet Mol Res Gmr, 2015, 14(1): 2041–2054.
- [19] Qiao H, Fu H, Jin S, et al. Constructing and random sequencing analysis of normalized cDNA library of testis tissue from oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*)
 [J]. Comp Biochem Physiol D: Genom Proteom, 2012, 7(3): 268–276.
- [20] Huang P T. Condensed protocols from molecular cloning[M].
 Beijing: Chemical Industry Press, 2008(6): 707-707. [黄培 堂. 分子克隆实验指南精编版[M]. 北京: 化学工业出版 社, 2008(6): 707-707.]
- [21] Jiang F W, Fu H T, Qiao H, et al. The RNA interference regularity of transformer-2 gene of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014(32): 32–37. [江丰伟,傅洪拓,乔慧,等. 青 虾 transformer-2 基因 RNA 干扰规律的研究[J]. 中国农学 通报, 2014(32): 32–37.]
- [22] Zhai Z H, Chen X N, Wang J, et al. Primer design with Primer Primier 5.0[J]. Northwest Medical Education, 2008, 16(4): 695-698. [翟中会,陈希南,王娟. 利用 Primer Premier 5.0 进行引物设计[J]. 西北医学教育, 2008, 16(4): 695-698.]
- [23] Zhang Y, Jiang S, Xiong Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of extra sex combs gene during development in *Macrobrachium nipponense*[J]. Turk J Fish Aquat Sci, 2013, 13(2): 331–340.
- [24] Ma K Y, Lin J Y, Guo S Z, et al. Molecular characterization and expression analysis of an insulin-like gene from the an-

drogenic gland of the oriental river prawn, *Macrobrachium* nipponense[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 185(3): 90-96.

- [25] Wang Y T, Mao H, Hou C C, et al. Characterization and expression pattern of KIFC1-like kinesin gene in the testis of the *Macrobrachium nipponense*, with discussion of its relationship with structure lamellar complex (LCx) and acroframosome (AFS)[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(7): 7591–7598.
- [26] Jin S B, Wang N, Qiao H, et al. Molecular cloning and expression of a full length cDNA encoding crustacean hyper-glycemic hormone (CHH) in oriental river pawn (*Macrobrachium nipponense*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 37(1): 82–92. [金舒博, 王宁, 乔慧, 等. 青虾 高血糖激素基因全长 cDNA 序列的克隆及表达分析[J]. 中国水产科学, 2013, 37(1): 82–92.]
- [27] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [28] Zhang C, Hughes M, Clarke P R. *Ran*-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts[J]. J Cell Sci, 1999, 112 (Pt 14): 2453–2461.
- [29] Moore J D. The *Ran*-GTPase and cell-cycle control[J]. Bio-Essays, 2001, 23(1): 77–85.
- [30] Ach R A, Gruissem W. A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a Schizosaccharomyces pombe cell-cycle mutant[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(13): 5863–5867.
- [31] Merkle T, Haizel T, Matsumoto T, et al. Phenotype of the fission yeast cell cycle regulatory mutant *pim1-46*, is suppressed by a tobacco cDNA encoding a small, Ran-like GTPbinding protein[J]. Plant J Cell Mol Biol, 1994, 6(4): 555– 565.
- [32] Sazer S. The search for the primary function of the *Ran* GTPase continues[J]. Trends Cell Biol, 1996, 6(3): 81–85.
- [33] Seki T, Yamashita K, Nishitani H, et al. Chromosome condensation caused by loss of RCC1 function requires the cdc25C protein that is located in the cytoplasm[J]. Mol Biol Cell, 1993, 3(12): 1373–1388.
- [34] Bai H K, Qiao H, Li F J, et al. Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*, and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation[J]. Gene, 2015, 562(1): 22–31.

Molecular characterization and developmental expression of Ras-related nuclear protein in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference on ovarian maturation

BU Zongyuan¹, FU Hongtuo^{1, 2}, SUN Shengming², QIAO Hui², JIN Shubo², ZHANG Wenyi², GONG Yongsheng², JIANG Sufei², XIONG Yiwei², WU Yan²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: Ras-related nuclear protein (Ran) is a small GTPase with many functions, such as hydrolysis of GTP, control of cell development, replication of DNA, and RNA transcription. In this study, the cDNA-encoding Ran of the oriental river prawn (Macrobrachium nipponense) was cloned using expressed sequence tag (EST) analysis and a rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. The full-length cDNA of Ran was 1191 bp, comprising a 5' untranslated region of 218 bp, a 3' untranslated region of 405 bp, and an open reading frame of 648 bp. The deduced protein had 215 amino acid residues with a molecular mass of 24.6 kD, and 7.13 point of theoretical isoelectric. Ran belongs to the P-loop NTPase super family. Ran has a PTZ00132 model that crosses multiple domains. The members of P-loop NTPase super family have extremely conservative nucleotide sequences. Phylogenetic analyses indicate evolution of Ran proteins within the animal kingdom is very conservative, with that of M. nipponense most closely related to that of M. rosenbergii. Quantitative real-time RT-PCR analysis revealed the Ran gene was expressed in testis, ovary, brain, muscle, eyestalk, abdominal nerve, heart and gill tissues. The ovary has the highest level of expression and the eyestalk has the lowest level of expression (P < 0.05). The Ran gene expression of ovary is seven-eight times higher than that of testis, and the expression level of *Ran* gene increased with the development of ovary. After ovulation in ovarian regression period, the expression level of Ran gene was at a low level. After RNA interference (RNAi), expression of Ran gene in an experimental group of adult females was significantly lower than in the control group (P<0.05). After RNA interference (RNAi) in the mature female prawns, the expression of Ran gene in experimental group (injected dsRNA solution into the shrimp's pericardial cavity) was significantly lower than in the control group (injected equal amount of DEPC water into the pranw's pericardial cavity) (P < 0.05). The expression of Ran gene changes with the development of ovary. The expression of *Ran* gene increased from the early stage of ovarian development to the mature stage and decreased rapidly after ovulation in the ovary. Expression of *Ran* in ovarian tissues in the experimental group was also significantly lower than that of control group (P<0.05), indicating RNA interference was effective. Expression of vitellogenin was significantly affected by RNA interference, with expression in the experimental group significantly lower than in the control group (P < 0.05). We speculate that the Ran gene plays a regulatory role in expression of the Vg gene, and that the Ran gene is involved in female ovary development.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; *Ran* gene; clone; ovary development; RNA interference Corresponding author: FU Hongtuo. E-mail: fuht@ffrc.cn