

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170401001

http://www.yykxjz.cn/

张小辉, 孟宪亮, 高保全, 刘萍, 王竹青, 张杰, 蔡影. 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因克隆及其在性腺发育过程中的表达分析. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 126-136

Zhang XH, Meng XL, Gao BQ, Liu P, Wang ZQ, Zhang J, Cai Y. Molecular cloning of *Drosha* and *Exportin 5* and their expression during gonadal development in the swimming crab (*Portunus trituberculatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 126-136

三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因克隆 及其在性腺发育过程中的表达分析*

张小辉^{1,2,3} 孟宪亮^{2,3} 高保全^{2,3} 刘萍^{2,3}①
王竹青^{1,2,3} 张杰^{1,2,3} 蔡影^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071;

3. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 本研究利用 RACE 技术克隆了三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因的 cDNA 全长序列, *Drosha* 基因长度为 3443 bp, 编码 1038 个氨基酸, 预测蛋白质包含 2 个相邻的 RNA 酶 III 结构域(RIIIIda 和 RIIIIdb)和 1 个双链 RNA 结合结构域(dsRBD)。*Exportin 5* 基因全长为 5000 bp, 编码 1208 个氨基酸, 预测蛋白质包含 1 个 Importin-β N-末端结构域(IBM-N)和 1 个核输出蛋白结构域(XPO-1)。同源分析显示, 三疣梭子蟹 *Drosha* 氨基酸序列与其他物种高度相似, 与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)相似度最高, 达 94%。qRT-PCR 分析结果显示, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在三疣梭子蟹各组织中均有表达, 其在卵巢和肝胰腺中的表达量最高($P < 0.05$); 在精巢不同发育时期, 2 个基因表达量的变化趋势一致, 均在 II 期(精母细胞增殖、分化期)表达量最高; 在卵巢发育过程中, 2 个基因表达量的变化趋势也大致相同, 随着卵巢发育(II~V 期)逐渐升高。研究表明, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因可能通过调控 miRNA 的合成来影响三疣梭子蟹性腺发育过程, 为深入解析三疣梭子蟹性腺发育调控机制提供了重要参考。

关键词 三疣梭子蟹; *Drosha*; *Exportin 5*; 基因克隆; 基因表达

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0126-11

MicroRNAs(miRNA)是一类长约 18~25 个核苷酸的非编码小 RNA 分子, 广泛分布于真核生物中(Guarnieri *et al*, 2008), 主要在转录后水平参与基因表达的调控, 在细胞增殖、分化、代谢、凋亡等一系列

生理过程中发挥着重要的作用(Ott *et al*, 2016; Li *et al*, 2016; Shigeyasu *et al*, 2017; Han *et al*, 2013; Yan *et al*, 2012; Nothnick *et al*, 2010; Passon *et al*, 2012)。已有研究表明, miRNA 与性腺发育密切相关(Grossman *et al*,

* 国家自然科学基金项目(41576147; 41306178)、泰山领军人才工程高效生态农业创新类计划项目(LJNY2015002)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2018HY-ZD0201)共同资助 [This work was supported by National Natural Science Foundation of China (41576147; 41306178), Program of Shandong Leading Talent (LJNY2015002), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS(2018HY-ZD0201)]. 张小辉, E-mail: 18623971672@163.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-04-01, 收修改稿日期: 2017-04-26

2016), 其在原始生殖细胞分化(Yang *et al*, 2016; Wu *et al*, 2011; Huszar *et al*, 2013)、卵泡发育和精子发生过程中发挥着重要的调控作用(Modzelewski *et al*, 2015; Kaneda *et al*, 2009; Kim *et al*, 2013)。

miRNA 的合成过程受到多个基因的共同调控, 其中, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因发挥着至关重要的作用(Kim *et al*, 2016; Kuehbachner *et al*, 2007)。首先, 在细胞核中 miRNA 基因的初级转录产物(pri-miRNA) 由 RNA 酶III *Drosha* 剪切成前体 miRNA (pre-miRNA) (Denli *et al*, 2004); 随后, pre-miRNA 被转运蛋白 *Exportin 5* 转运到细胞质中进行后续处理(Romero-Cordoba *et al*, 2014)。已有研究报道, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因能够通过调节性腺 miRNA 的合成, 进而调控性腺的发育(Yang *et al*, 2016; Wu *et al*, 2012; Song *et al*, 2007)。Yang 等(2016)发现, *Drosha* 能够调控 miRNA 的合成, 从而影响果蝇(*Drosophila*)原始生殖细胞的分化和卵巢的发育; Wu 等(2012)发现, 敲除雄性小鼠(*Mus musculus*)*Drosha* 基因, 能够造成生殖细胞 miRNAs 严重缺失, 精子发生异常, 最终导致雄性不育; Song 等(2007)发现, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)卵巢中均有较高表达。目前, *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在性腺发育调控方面的研究主要集中在模式生物中, 在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)中尚未见相关报道。

三疣梭子蟹广泛分布于中国、日本、韩国等海域, 是我国重要的捕捞对象和海水养殖品种(管卫兵等, 2009b)。无论对于三疣梭子蟹野生资源的合理利用, 还是养殖业的可持续发展, 研究其繁殖生物学都是十分必要的基础性工作。但目前, 有关三疣梭子蟹繁殖生物学的研究还相对匮乏。本研究利用 RACE 技术, 首次克隆了三疣梭子蟹 miRNA 合成通路重要基因 *Drosha* 和 *Exportin 5*, 通过 qRT-PCR 分析了其在不同组织以及性腺发育不同时期的表达水平, 为进一步探究三疣梭子蟹等甲壳类性腺发育调控机制提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用健康三疣梭子蟹均取自中国水产科学研究院黄海水产研究所的实验基地山东昌邑海丰水产有限公司, 在塑料箱(560 mm×360 mm×280 mm)中暂养 7 d, 持续充氧, 控制水温为 20±2℃, pH=8.2, 盐度为 33, 氨氮含量为 0.078~0.127 mg/L, 亚硝酸盐含量为 0.074~0.132 mg/L, 每天换水 1/3, 并清理箱底

排泄物, 早晚各投喂适量蛤蜊肉。

SMART RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司, Trizol Reagent 购于 Invitrogen 公司; E.Z.N.A-Gel Extraction Kit 购于 Omega 公司; LA Taq 酶, pMD18-T 载体, DH5 α 感受态细胞, PrimeScript RT Reagent Kit 和 SYBR-Premix Ex Taq II 均购于 TaKaRa 公司; 实验中所有引物合成和测序反应均在青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行。

1.2 三疣梭子蟹性腺不同发育时期组织样品的采集

从 2015 年 7 月~2016 年 3 月, 每月于实验基地连续取样, 在性腺不同发育时期, 每时期各取 5 只。参考相关文献(管卫兵等, 2009a; 吴旭干等, 2007), 根据精巢和卵巢的外部特征进行粗略分期, 取不同个体相同部位的精巢和卵巢样品, 分别固定、切片、HE 染色后, 根据精巢和卵巢组织学特征, 确定精巢和卵巢组织的具体分期。

1.3 总 RNA 提取及 RACE 一链 cDNA 的合成

Trizol 试剂提取三疣梭子蟹各组织总 RNA, 通过核酸定量仪和 1.0%的琼脂糖凝胶检测其质量。选取质量好的总 RNA 样品, 用 SMART RACE Amplification Kit 合成 3'和 5' RACE 的一链 cDNA。

1.4 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因全长克隆

根据三疣梭子蟹性腺转录组数据库中 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因的序列片段, 用 Primer Premier 5.0 设计其 3'和 5' RACE 引物(表 1), 3'和 5'末端使用 Advantage 2 PCR Kit 进行扩增, 运用巢氏 PCR 方法, 第 1 轮反应使用外侧引物 DS-3'-F、DS-5'-F、E-3'-F 和 E-5'-F, 分别与 UPM 配对, 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 68℃ 3 s, 72℃ 1 min, 30 个循环。第 2 轮反应以第 1 轮扩增产物为模板, 使用内侧引物 DS-3'-S、DS-5'-S、E-3'-S 和 E-5'-S, 分别与 NUP 配对, 反应程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环。扩增产物用 E.Z.N.A-Gel Extraction Kit 切胶回收纯化, 将纯化后的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 然后转入 DH5 α 感受态细胞, 经 37℃活化 45 min, 涂板, 过夜培养后, 通过蓝白斑筛选, 挑取阳性单克隆, 菌落 PCR 检测后送公司测序。

1.5 生物信息学分析

测序得到 RACE 结果序列, 利用 Contig Express 软件, 将其与三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因 EST 序列拼接后, 获得 2 个基因的 cDNA 全长序列。利用 ORF Finder 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

projects/gorf/orfig.cgi)预测其开放阅读框,利用 Gene Tool 软件进行序列分析。利用 EditSeq 软件进行氨基酸序列预测,利用 NCBI Blastx 软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列相似性比对,利用 NCBI Conserved domain 软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析其蛋白质功能结构域,利用 ExPASy 软件(http://web.expasy.org/compute_pi/)预测其分子量和等电点,利用 SignalP 4.1 Server 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测基因信号肽序列,利用 SOSUI 软件(<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>)分析其跨膜区域。从 GenBank 中下载其他物种的 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因序列,利用 DNAMAN 软件进行同源分析,在此基础上,利用 MAGE 5.0 软件构建 2 个基因的 NJ 系统进化树。

表 1 本实验用到的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	功能 Purpose
DS-3'-F	CGGCGAGCCAGACATTCCATA	3'RACE
DS-3'-S	CCAGCGGAGAGTGATTGAGAAGAGT	3'RACE
E-3'-F	ACCAAAGTGCCCTCCTCTCCCTCCAG	3'RACE
E-3'-S	TGTGTTCTCTATTTGGACCTG	3'RACE
DS-5'-F	GGTCTCTCACTAACTTGGTCCCG	5'RACE
DS-5'-S	GCAAGTTTCCGCACAAATCTCG	5'RACE
E-5'-F	CGTCGCCGCTGATTGATTC	5'RACE
E-5'-S	CCTTCTGTTGGACGGATA	5'RACE
β -actin-F	CGAAACCTTCAACACTCCCG	qRT-PCR
β -actin-R	GGGACAGTGTGTGAAACGCC	qRT-PCR
DS-RT-F	GCATCAACACGCTCATCAAC	qRT-PCR
DS-RT-R	AACTCCACCACAGCATCTCC	qRT-PCR
E-RT-F	AGAGTGTGATGAGCCGTGTG	qRT-PCR
E-RT-R	GATGAGTGGGTCCGTTGTCT	qRT-PCR

1.6 组织表达分析

用 Trizol 提取三疣梭子蟹的胃、眼柄、输精管、鳃、肠、肝胰腺、脑神经节、胸神经节、血淋巴、肌肉、心脏以及卵巢和精巢不同时期组织的总 RNA(每个组织取 3 个个体)。使用 PrimeScript RT Reagent Kit 反转录成 cDNA, -20°C 保存。

根据已获得的三疣梭子蟹 β -actin、*Drosha* 和 *Exportin 5* 开放阅读框序列,设计 qRT-PCR 引物(表 1),分析 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在三疣梭子蟹不同组织(胃、眼柄、输精管、鳃、肠、肝胰腺、脑神经节、胸神经节、血淋巴、肌肉、心脏)及精巢和卵巢不同时期的相对表达量(每个样品设 3 个重复)。反应体系为 10 μl : 5 μl SYBR Premix Ex Taq II (2 \times)、0.4 μl 正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.4 μl 反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)、0.2 μl

ROX Reference Dye II (50 \times)、1.0 μl cDNA、3.0 μl DEPC 水。反应程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 个循环; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因相对表达量,用 SPSS 19.0 软件进行数据差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因 cDNA 全长的获得和序列分析

将测序得到的 3' 和 5' RACE 序列,分别与三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因 EST 序列拼接后,得到其 cDNA 全长,GenBank 登录号分别为 KY625632 和 KY402080。序列分析显示, *Drosha* 基因 cDNA 序列全长 3443 bp, 包括 5' 非编码区 184 bp 和 3' 非编码区 142 bp, 其中, 开放阅读框 3117 bp, 编码 1038 个氨基酸, 理论等电点为 8.22, 预测蛋白质的分子量为 121.09 kDa; *Exportin 5* 基因 cDNA 序列全长 5000 bp, 包括 3627 bp 的 ORF, 1204 bp 的 3' 端 UTR 以及 169 bp 的 5' 端 UTR。编码 1208 个氨基酸, 预测分子量为 136.15 kDa, 理论等电点为 5.86。NCBI Conserved domain 软件分析发现, 三疣梭子蟹 *Drosha* 基因包含 2 个相邻的 RNA 酶 III 结构域(RIIIDa)(456~567aa)和 R III Db(620~749aa)和 1 个双链 RNA 结合结构域(dsRBD)(755~826aa)(图 3)。 *Exportin 5* 基因包含 1 个 IBN-N(38-111aa)结构域和 1 个 XPO-1(112-272aa)结构域(图 4)。同时, 在 *Drosha* 基因 RIIIDa 和 RIIIDb 两结构域中分别发现了 RNA 酶 III 家族所特有的, 由 9 个氨基酸残基组成的特征性标记位点 ERLEFLGDA 和 QRLEFLGDT(图 1、图 2)。相关在线软件分析发现, 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因的编码蛋白均没有跨膜结构和信号肽序列, 为水溶性蛋白。

2.2 同源性及系统进化树分析

利用 NCBI blastx 软件分析得知, 三疣梭子蟹 *Drosha* 与日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)该蛋白的氨基酸序列同源性最高, 为 94%, 与白蚁(*Zootermopsis nevadensis*)、达氏按蚊(*Anopheles darlingi*)和黑森瘦蚊(*Mayetiola destructor*)的同源性分别为 79%、75% 和 73%。三疣梭子蟹 *Exportin 5* 与黑蚁(*Lasius niger*)和蓝莓蜂(*Habropoda laboriosa*)该蛋白氨基酸序列同源性最高, 为 44%。

利用 MEGA 5.0 以邻接法(Neighbor-joining)构建三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 系统进化树, 结果显示, 二者均可分为脊椎动物和节肢动物两大簇, 且

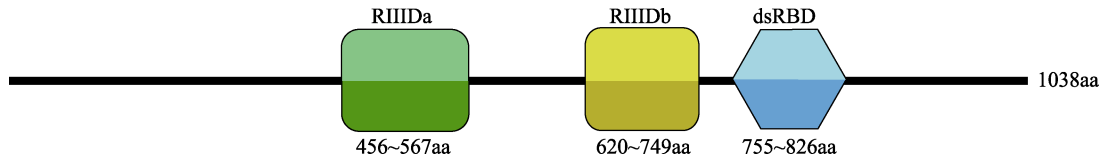


图 3 三疣梭子蟹 *Drossha* 蛋白的结构域示意

Fig.3 Domain organization of the swimming crab *Drossha* protein

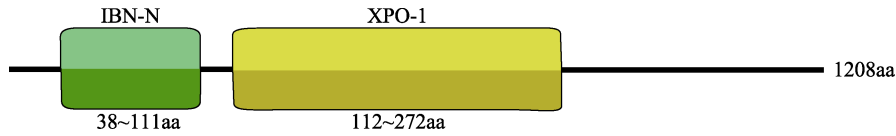


图 4 三疣梭子蟹 *Exportin 5* 蛋白的结构域示意图

Fig.4 Domain organization of the swimming crab *Exportin 5* protein

三疣梭子蟹 *Drossha* 和 *Exportin 5* 均在节肢动物一簇中, 与鱼类和哺乳类等脊椎动物亲缘关系较远, 其中, 三疣梭子蟹 *Drossha* 与日本对虾紧密聚为一支, 亲缘关系最近, 其次为白蚁和木蚁(*Camponotus floridanus*), 而三疣梭子蟹 *Exportin 5* 与水蚤(*Daphnia magna*) 在进化上关系最近(图 5 和图 6)。

2.3 三疣梭子蟹 *Drossha* 和 *Exportin 5* 基因组织差异表达分析

2.3.1 三疣梭子蟹 *Drossha* 和 *Exportin 5* 基因组织表达分布 qRT-PCR 分析三疣梭子蟹 *Drossha* 和 *Exportin 5* 基因在不同组织中的相对表达量(图 7 和图 8), 结果显示, 2 个基因在各种组织中均表达, 其

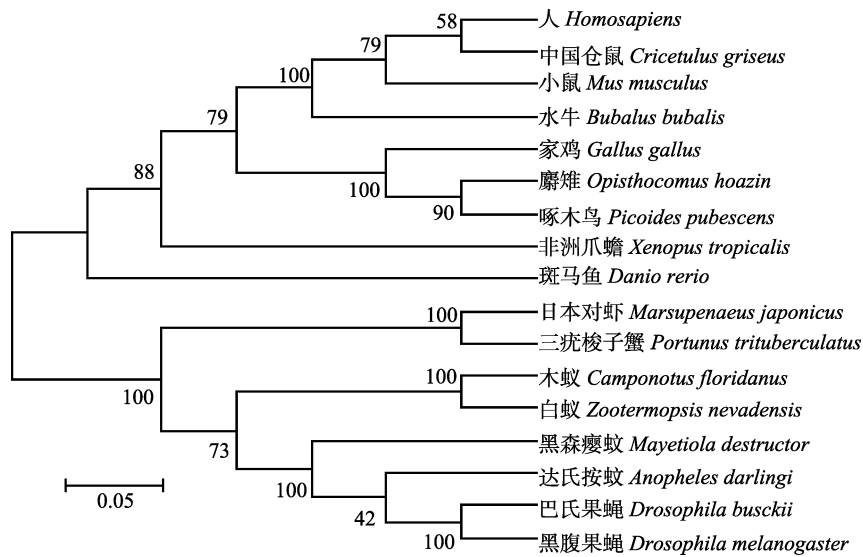


图 5 基于 *Drossha* 氨基酸序列的 NJ 进化树

Fig.5 NJ tree based on *Drossha* amino acid sequences

各物种 *Drossha* 基因 GenBank 登录号: 人(NP_037367.3)、中国仓鼠(ERE81427.1)、小鼠(NP_001123621.1)、水牛(BAS30507.1)、家鸡(NP_001006379.1)、麝雉(KFR12253.1)、啄木鸟(KFV67625.1)、非洲爪蟾(NP_001107152.1)、斑马鱼(NP_001103942.1)、日本对虾(ADB65770.2)、三疣梭子蟹(KY625632)、木蚁(EFN62400.1)、白蚁(KDR08017.1)、黑森瘿蚊(AFX89030.1)、达氏按蚊(ETN65888.1)、巴氏果蝇(ALC42743.1)、黑腹果蝇(NP_477436.1)

The GenBank accession numbers of different species' *Drossha* gene were as follows: *Homo sapiens*(NP_037367.3), *Cricetulus griseus*(ERE81427.1), *Mus musculus*(NP_001123621.1), *Bubalus bubalis*(BAS30507.1), *Gallus gallus*(NP_001006379.1), *Opisthocomus hoazin*(KFR12253.1), *Picoides pubescens*(KFV67625.1), *Xenopus tropicalis*(NP_001107152.1), *Danio rerio*(NP_001103942.1), *Marsupenaeus japonicus*(ADB65770.2), *Portunus trituberculatus*(KY625632), *Camponotus floridanus*(EFN62400.1), *Zootermopsis nevadensis*(KDR08017.1), *Mayetiola destructor*(AFX89030.1), *Anopheles darlingi*(ETN65888.1), *Drosophila busckii*(ALC42743.1), *Drosophila melanogaster*(NP_477436.1)

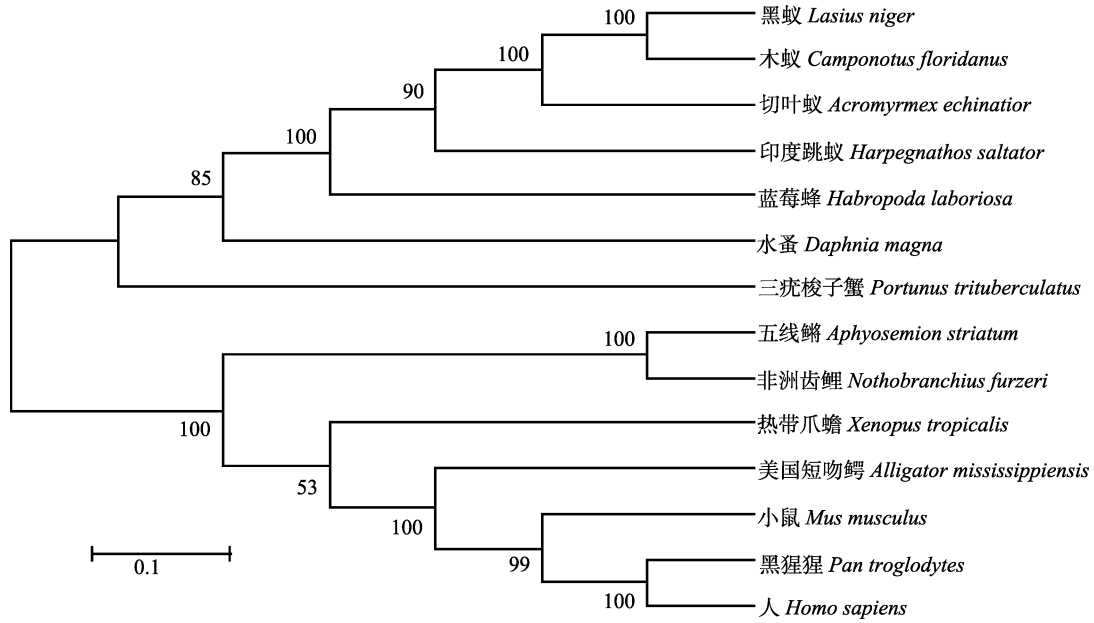


图 6 基于 *Exportin 5* 氨基酸序列的 NJ 进化树
Fig.6 NJ tree based on *Exportin 5* amino acid sequences

各物种 *Exportin 5* 基因序列 GenBank 登录号：木蚁(EFN62948.1)、黑蚁(KMQ95474.1)、切叶蚁(EG170297.1)、印度跳蚁(EFN89855.1)、蓝莓蜂(KOC65194.1)、水蚤(JAN75960.1)、三疣梭子蟹(KY402080)、五线鲂(SBP29565.1)、非洲齿鲤(SBP51127.1)、热带爪蟾(NP_989112.2)、美洲短吻鳄(KQL87848.1)、小家鼠(AAI31662.1)、黑猩猩(JAA34037.1)、人(NP_065801.1)

The GenBank accession numbers of different species' *Exportin 5* gene were as follows: *Camponotus floridanus*(EFN62948.1), *Lasius niger*(KMQ95474.1), *Acromyrmex echinator*(EG170297.1), *Harpegnathos saltator*(EFN89855.1), *Habropoda laboriosa*(KOC65194.1), *Daphnia magna*(JAN75960.1), *Portunus trituberculatus*(KY402080), *Aphyosemion striatum*(SBP29565.1), *Nothobranchius furzeri*(SBP51127.1), *Xenopus tropicalis*(NP_989112.2), *Alligator mississippiensis*(KQL87848.1), *Mus musculus*(AAI31662.1), *Pan troglodytes*(JAA34037.1), *Homo sapiens*(NP_065801.1)

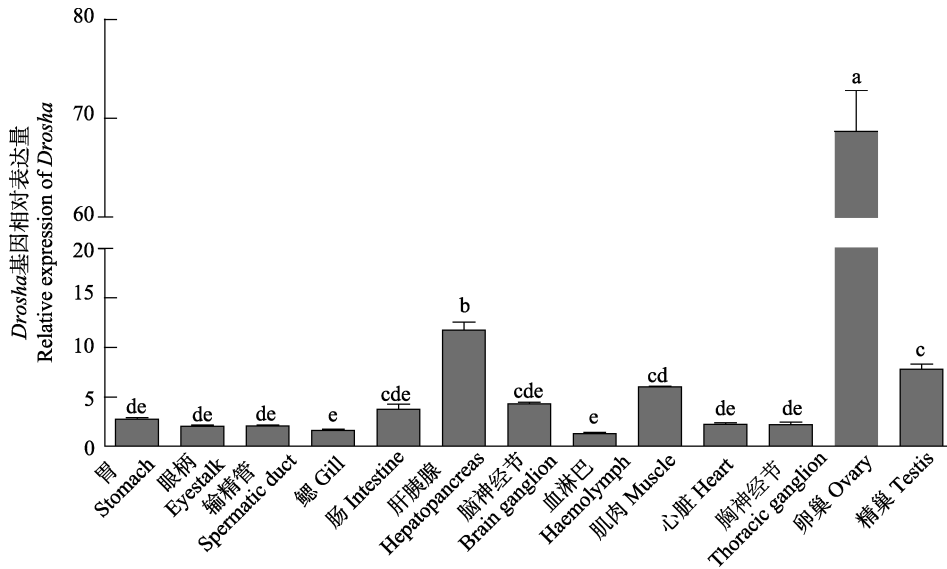


图 7 三疣梭子蟹 *Droscha* 基因在不同组织中的表达分布状况
Fig.7 The distribution of *Droscha* gene in different tissues of the swimming crab

不同字母表示组间差异显著(P<0.05), 下同

The different lowercase letters represented the significant difference in the different tissues of swimming crab (P<0.05), the same as below

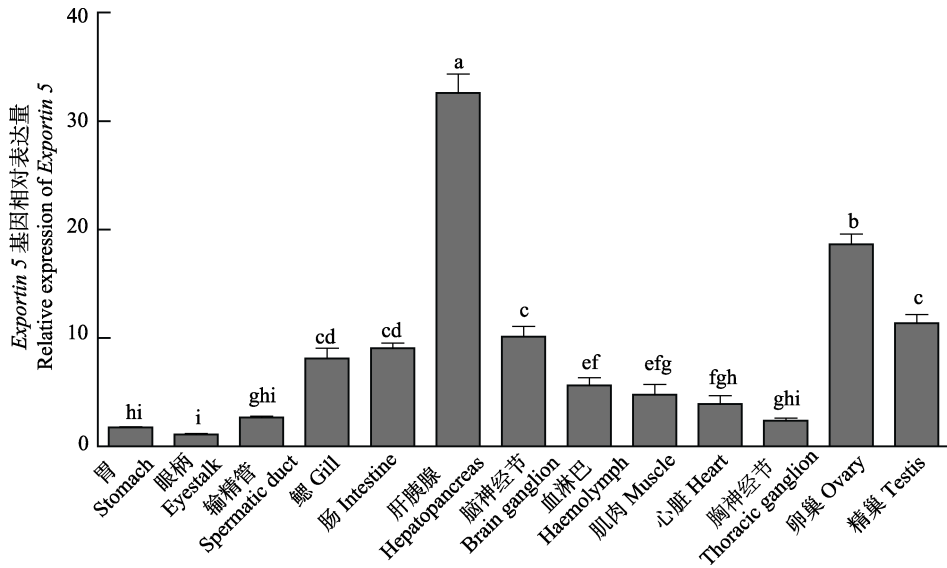


图 8 三疣梭子蟹 *Exportin 5* 基因在不同组织中的表达分布状况

Fig.8 The distribution of *Exportin 5* gene in different tissues of the swimming crab

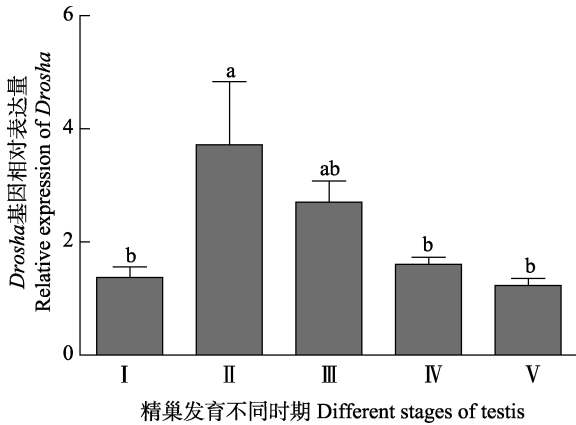


图 9 三疣梭子蟹 *Drosha* 基因在不同发育时期精巢组织中的表达

Fig.9 The expression of *Drosha* gene in testis of the swimming crab at different gonadal stages

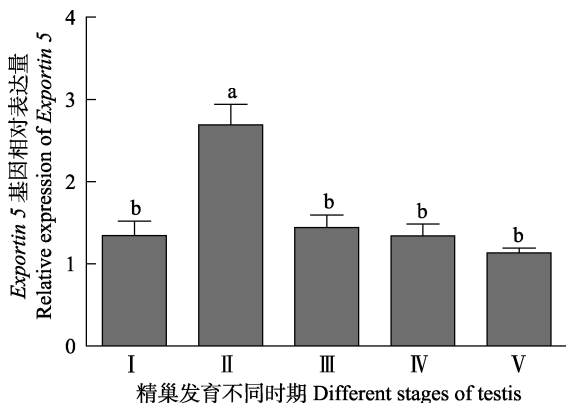


图 10 三疣梭子蟹 *Exportin 5* 基因在不同发育时期精巢组织中的表达

Fig.10 The expression of *Exportin 5* gene in testis of the swimming crab at different gonadal stages

中, *Drosha* 基因在卵巢中表达量最高($P < 0.05$), 其次依次为肝胰腺和精巢, 而 *Exportin 5* 基因高表达于肝胰腺($P < 0.05$), 其次依次为卵巢和精巢。

2.3.2 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在精巢不同发育时期的差异表达分析 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在精巢发育不同时期表达均存在差异(图 9 和图 10), 但变化趋势一致, 且其在 I 期、III 期、IV 期和 V 期表达量差异均不显著($P > 0.05$)。此外, 2 个基因都在精巢发育 II 期高表达, 之后呈下降趋势。

2.3.3 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在卵巢不同发育时期的差异表达分析 三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因在卵巢发育不同时期表达量变化趋势大致相同, 均随着卵巢发育(II~V 期)逐渐升高, 且在卵巢发育 V 期, 2 个基因的表达量均显著高于其他时期($P < 0.05$)(图 11 和图 12)。其中, *Drosha* 基因在 IV 期也显著高于 I 期、II 期、III 期和 VI 期($P < 0.05$), 而 *Exportin 5* 基因在 I 期、III 期、IV 期和 VI 期表达量差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

Drosha 和 *Exportin 5* 基因是 miRNA 合成通路中的重要基因, 本研究克隆获得三疣梭子蟹 *Drosha* 和 *Exportin 5* 基因 cDNA 全长序列。序列分析发现, *Drosha* 包含 2 个相邻的 RNA 酶 III 结构域(RIII Da 和 R III Db)和 1 个 dsRBD, 属于 RNA 酶 III 家族(Lee *et al*, 2006; Filippov *et al*, 2000; Wu *et al*, 2000)。RIII Da 和 R III Db 结构域可各结合 1 个 DGCR8, 发挥其双链

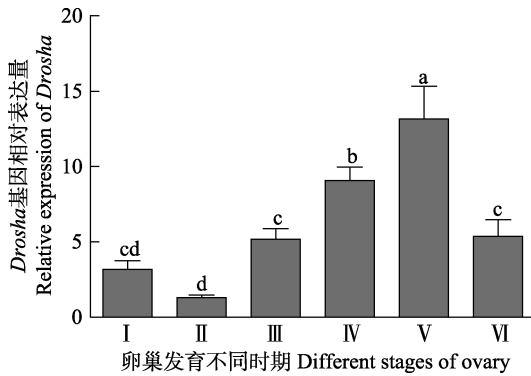


图 11 三疣梭子蟹 *Droscha* 基因在不同发育时期卵巢组织中的表达

Fig. 11 The expression of *Droscha* gene in the ovary of swimming crab at different gonadal stages

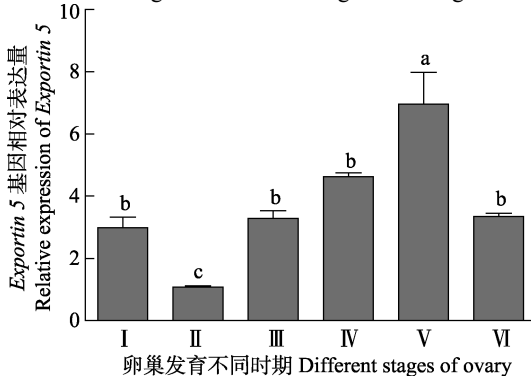


图 12 三疣梭子蟹 *Exportin 5* 基因在不同发育时期卵巢组织中的表达

Fig. 12 The expression of *Exportin 5* gene in the ovary of swimming crab at different gonadal stages

RNA 剪切功能(Kwon *et al*, 2016; Huang *et al*, 2012)。*Exportin 5* 基因包含 IBN-N 和 XPO-1 两个功能结构域,是核质蛋白 β 家族中的一员(Brownawell *et al*, 2002),XPO-1 是其发挥核输出受体功能的关键结构域,IBN-N 具体功能暂不清楚(Sharma *et al*, 2017)。同源分析结果显示,三疣梭子蟹 *Droscha* 氨基酸序列与其他无脊椎动物的相似性为 67%~94%,序列高度保守。三疣梭子蟹 *Exportin 5* 与其他无脊椎动物的同源度较低,为 39%~46%。但有研究发现,从低等真菌酵母菌到高等生物人类,*Exportin 5* 与靶 RNA 的结合活性位点高度保守(Shibata *et al*, 2006)。

本研究对三疣梭子蟹 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因组织差异性表达分析结果显示,其在检测的各组织中均有表达,但在不同组织中的表达差异较大,在肝胰腺和卵巢中的表达量均显著高于其他组织,其次为精巢。该结果暗示三疣梭子蟹 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因可能在性腺发育过程中发挥调控作用。性腺不同发育时期的表达分析结果显示,在性腺发育过程中,

Droscha 和 *Exportin 5* 基因表达量的变化趋势大致相同,暗示这 2 个基因可能协同调控三疣梭子蟹性腺发育过程。在精巢发育过程中,*Droscha* 和 *Exportin 5* 基因在精巢发育 II 期的表达量最高,之后均呈依次下降趋势,表明两个基因可能在精巢发育 II 期发挥重要调控作用。精巢发育 II 期是精子发生的重要时期,期间初级精母细胞大量分化,并减数分裂生成次级精母细胞,细胞代谢旺盛(管卫兵等, 2009b)。Wu 等(2012)敲除小鼠 *Droscha* 基因发现,其精母细胞存在大量基因表达失调现象,导致精母细胞减数分裂中断,精子发生困难;Iwasaki 等(2013)发现抑制小鼠胚胎纤维细胞 *Exportin 5* 基因表达,导致细胞增殖缺陷,表现为从 G1 期到 S 期过渡延迟,同时发现,其细胞周期开始前,整体 miRNA 水平的提高与 *Exportin 5* 的调控密不可分。由此可见,*Droscha* 和 *Exportin 5* 基因可能参与了精子发生过程的调控,同时也暗示 miRNA 可能在三疣梭子蟹精母细胞的分化和减数分裂过程中发挥重要作用。在卵巢不同发育时期,三疣梭子蟹 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因表达量从 II 期到 V 期均逐渐升高,且在 V 期达到峰值($P < 0.05$),期间卵母细胞大量积累其减数分裂所需营养物质,并逐渐发育成熟(吴旭干等, 2007)。其中,*Droscha* 基因在 IV 期也显著高于 I 期、II 期、III 期和 VI 期($P < 0.05$),而 *Exportin 5* 基因在 I 期、III 期、IV 期和 VI 期表达量差异不显著($P > 0.05$),暗示 2 个基因在三疣梭子蟹卵巢发育过程中的不同功能。有研究表明,在海胆成熟卵巢中 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因均有较高表达(Song *et al*, 2007)。Yang 等(2016)发现,*Droscha* 能够调控果蝇原始生殖细胞的分化和卵巢的发育。因此,推测这 2 个基因可能通过调节 miRNAs 的合成在三疣梭子蟹卵母细胞成熟过程中发挥着重要的作用。

本研究首次成功克隆三疣梭子蟹 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因 cDNA 全长序列,分析了其在三疣梭子蟹不同组织和精巢不同时期的表达情况,暗示 *Droscha* 和 *Exportin 5* 基因可能在三疣梭子蟹性腺发育过程中发挥协同调控作用,为进一步深入研究 miRNA 在三疣梭子蟹性腺发育过程的分子机制提供了基础资料。

参 考 文 献

- Brownawell AM, Macara IG. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *Journal of Cell Biology*, 2002, 156(1): 53-64
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, *et al*. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature*, 2004,

- 432(7014): 231–235
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, *et al.* A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, 2000, 245(1): 213–221
- Grossman H, Shalgi R. A Role of MicroRNAs in cell differentiation during gonad development. Springer International Publishing, 2016, 58: 309–336
- Guan WB, Xuan FJ, Chen HH, *et al.* Reproductive characteristics and condition status of adult swimming crab *Portunus trituberculatus* (Brachyura: Portunidae) in East China Sea. *Marine Fisheries*, 2009, 31(2): 120–127 [管卫兵, 宣富君, 陈辉辉, 等. 东海三疣梭子蟹成熟群体生殖特征和条件状况. *海洋渔业*, 2009a, 31(2): 120–127]
- Guan WB, Xuan FJ, Dai XJ, *et al.* Spermatogenesis and spermatophore formation of swimming crab (*Portunus trituberculatus* Miers, 1876) in East China Sea. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(2): 173–182 [管卫兵, 宣富君, 戴小杰, 等. 东海三疣梭子蟹精子发生及精荚形成. *中国水产科学*, 2009b, 16(2): 173–182]
- Guarnieri DJ, Dileone RJ. MicroRNAs: A new class of gene regulators. *Annals of Medicine*, 2008, 40(3): 197–208
- Han Y, Liu Y, Gui Y, *et al.* Inducing cell proliferation inhibition and apoptosis via silencing Dicer, Drosha, and Exportin 5 in urothelial carcinoma of the bladder. *Journal of Surgical Oncology*, 2013, 107(2): 201–205
- Huang T, Xu D, Zhang X. Characterization of shrimp Drosha in virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(3): 575–581
- Huszar JM, Payne CJ. MicroRNA 146 (Mir146) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biology of Reproduction*, 2013, 88(1): 15
- Iwasaki YW, Kiga K, Kayo H, *et al.* Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *RNA*, 2013, 19(4): 490–497
- Kaneda M, Tang F, O'Carroll D, *et al.* Essential role for Argonaute2 protein in mouse oogenesis. *Epigenetics & Chromatin*, 2009, 2(1): 1–8
- Kim YJ, Ku SY, Kim YY, *et al.* MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. *Human Reproduction*, 2013, 28(11): 3050–3061
- Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(13): 1881–1889
- Kuehbachner A, Urbich C, Zeiher AM, *et al.* Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circulation Research*, 2007, 101(1): 59–68
- Kwon SC, Nguyen TA, Choi YG, *et al.* Structure of human DROSHA. *Cell*, 2016, 164(1–2): 81–90
- Lee Y, Han J, Yeom KH, *et al.* Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2006, 71: 51–57
- Li Y, Wang X, He B, *et al.* Downregulation and tumor-suppressive role of XPO5 in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 415(1): 1–9
- Modzelewski AJ, Hilz S, Crate EA, *et al.* Dgcr8 and Dicer are essential for sex chromosome integrity during meiosis in males. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(12): 2314–2327
- Nothnick WB, Healy C, Hong X. Steroidal regulation of uterine miRNAs is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. *Endocrine*, 2010, 37(2): 265–273
- Ott CA, Linck L, Kremmer E, *et al.* Induction of exportin-5 expression during melanoma development supports the cellular behavior of human malignant melanoma cells. *Oncotarget*, 2016, 7(38): 62292–62304
- Passon N, Gerometta A, Puppini C, *et al.* Expression of Dicer and Drosha in triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 2012, 65(4): 320–326
- Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, *et al.* miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 2014, 15(11): 1444–1455
- Sharma C, Mohanty D. Sequence- and structure-based analysis of proteins involved in miRNA biogenesis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2017, 1–13
- Shigeyasu K, Okugawa Y, Toden S, *et al.* Exportin-5 functions as an oncogene and a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 2017, 23(5): 1312–1322
- Shibata S, Sasaki M, Miki T, *et al.* Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(17): 4711–4721
- Song JL, Wessel GM. Genes involved in the RNA interference pathway are differentially expressed during sea urchin development. *Developmental Dynamics*, 2007, 236(11): 3180–3190
- Wu H, Xu H, Miraglia LJ, *et al.* Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(47): 36957–36965
- Wu J, Bao J, Wang L, *et al.* MicroRNA-184 downregulates nuclear receptor corepressor 2 in mouse spermatogenesis. *BMC Developmental Biology*, 2011, 11(1): 1–10
- Wu Q, Song R, Ortogero N, *et al.* The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(30): 25173–25190
- Wu XG, Yao GG, Yang XZ, *et al.* A study on the ovarian development of *Portunus trituberculatus* in East China Sea during the first reproductive cycle. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(4): 120–127 [吴旭干, 姚桂桂, 杨筱珍, 等. 东海三疣梭子蟹第一次卵巢发育规律的研究. *海洋学报*, 2007, 29(4): 120–127]
- Yang H, Li M, Hu X, *et al.* MicroRNA-dependent roles of Drosha and Pasha in the *Drosophila* larval ovary morphogenesis. *Developmental Biology*, 2016, 416(2): 312–323
- Yan M, Huang H, Wang T, *et al.* Dysregulated expression of Dicer and Drosha in breast cancer. *Pathology & Oncology Research*, 2012, 18(2): 343–348

Molecular Cloning of *Drosha* and *Exportin 5* and Their Expression During Gonadal Development in the Swimming Crab (*Portunus trituberculatus*)

ZHANG Xiaohui^{1,2,3}, MENG Xianliang^{2,3}, GAO Baoquan^{2,3}, LIU Ping^{2,3}^①,
WANG Zhuqing^{1,2,3}, ZHANG Jie^{1,2,3}, CAI Ying^{1,2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;
Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Process, Qingdao National Laboratory
for Marine Science and Technology, Qingdao 266071;

3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research
Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract In the present study, full-length complementary DNA (cDNA) of *Drosha* and *Exportin 5* involved in the pathway of microRNA (miRNA) biogenesis of the swimming crab *Portunus trituberculatus* were cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACEs). The length of the *Drosha* gene is 3443 bp, which is predicted to encode a polypeptide of 1038 amino acids, containing two ribonuclease (RNase) III domains (RIIIda and RIIIdb) and a double-stranded RNA binding domain (dsRBD). The full-length of *Exportin 5* is 5000 bp, which is predicted to encode a polypeptide of 1208 amino acids, containing an importin- β N-terminal domain (IBN-N) and an exportin 1-like domain (XPO-1). Homology analysis revealed that *Drosha* in *P. trituberculatus* is highly similar to those in some species and shares the highest similarity with that in *Marsupenaeus japonicus* (94%). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *Drosha* and *Exportin 5* are expressed in all the tested tissues, and were highly expressed in the ovary and hepatopancreas tissues ($P < 0.05$). At different stages of testis development, the expression of the genes *Drosha* and *Exportin 5* shared the same trend, and both showed the highest expression at stage II. During ovarian development, the expression level of the genes *Drosha* and *Exportin 5* increased gradually from phase II to phase V. The results suggest that the genes *Drosha* and *Exportin 5* cooperatively regulate the gonadal development of *P. trituberculatus* in an miRNA-dependent manner. Furthermore, the results provide useful information for studies on the regulation of gonadal development in *P. trituberculatus*.

Key words *Portunus trituberculatus*; *Drosha*; *Exportin 5*; Gene cloning; Expression analysis

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn