

doi: 10.7541/2023.2023.0107

两个与中华拟同形溞生殖相关基因的筛选及其RNA干扰研究

赵雅洁 李国庆 王业平 金齐德 邓道贵

(淮北师范大学生命科学学院, 淮北 235000)

摘要: 为了筛选与中华拟同形溞(*Daphnia sinensis*)生殖相关的基因, 选择4个生长阶段的中华拟同形溞(雌性幼溞JF、成熟前1龄雌溞BM、第1成龄雌溞MA和第4成龄雌溞RF)进行转录组测序。在BM vs. JF、MA vs. JF、RF vs. JF、RF vs. MA、MA vs. BM、RF vs. BM等6个组合中, 选择每个组合的前30个上调基因进行筛选, 获得了163个差异表达基因。这些差异表达基因以鱼类信息素培养的第4成龄雌溞为样本进行RT-qPCR检测, 共筛选出19个与生殖相关的候选基因, 选择其中2个基因(Cluster-13168.32243, *Dsussp*和Cluster-13168.22885, *Dsmapk*)进行RNAi实验。在RNAi后, *Dsussp*和*Dsmapk*基因的表达量在含有其dsRNA的大肠杆菌(*Escherichia coli*)浓度组均显著小于对照组(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP), 且与EGFP组相比, *Dsmapk*和*Dsussp*基因的表达量在2%和5%大肠杆菌浓度组分别下降了28.1%和32.3%、41.1%和55.6%。在RNAi后, 中华拟同形溞在*Dsussp*和*Dsmapk*组的怀卵数及产幼溞数与对照组相比均减少, 且5%大肠杆菌浓度组均小于2%大肠杆菌浓度组。随着龄数的增加, RNAi对中华拟同形溞怀卵数和产幼溞数的抑制影响均加强。因此, *Dsussp*和*Dsmapk*基因被证实在中华拟同形溞的生殖发育中起重要作用。

关键词: RNA干扰; 生殖; 转录组测序; 中华拟同形溞

中图分类号: Q958

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2024)01-0176-09



溞属枝角类隶属于节肢动物门、甲壳亚门、鳃足纲, 它们不仅能够滤食水体中的细菌、藻类及碎屑, 而且还是一些无脊椎动物和淡水鱼类的重要饵料, 在水生食物链中发挥着承上启下的作用^[1, 2]。通常, 溞属枝角类的生殖方式有两种, 即孤雌生殖和两性生殖。当环境条件发生变化时, 枝角类可通过生殖方式的改变以适应变化的环境^[3, 4]。当环境条件良好时(如食物丰富、温度适宜等), 枝角类进行孤雌生殖, 迅速扩大种群数量, 而当环境条件恶化时(如温度过高或过低、食物匮乏、种群密度高等), 枝角类进行两性生殖, 产生雄体和两性生殖雌体, 受精后形成休眠卵^[1, 5]。

有关甲壳动物生殖的分子机制研究已有一些报道, 但主要集中在生殖转换方面的研究。隆线溞(*Daphnia carinata*)中的*dsx1*基因和蚤状溞(*Daphnia pulex*)中的*tra*基因在两性生殖雌性中的表达量均高于孤雌生殖雌性^[6, 7]。Li等^[8]还发现, *CSP2*和*CSP3*

基因在隆线溞两性生殖雌体的表达量高于孤雌生殖雌体。Zhu等^[9]发现, *MrFoxl2*基因可能在雌性和雄性罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的性腺发育中发挥作用。通过不同生活史阶段的转录组分析, Wang等^[10]筛选了中华拟同形溞与雄性偏向相关的基因(Male-biased genes)。上述研究关注了甲壳动物中雌雄转化或性别决定中一些特定基因的作用。但与甲壳动物生殖直接相关的基因研究较少。通常, 卵黄蛋白原(Vtg)是卵生动物卵黄蛋白的前体, 为卵生生物的胚胎发育提供能量储备, 在生殖和胚胎发育中起着十分重要作用^[11]。Schlotz等^[12]观察到, 大型溞生殖量的增加伴随着卵黄蛋白原(Vtg)基因表达量的增加。当大型溞暴露于邻苯二甲酸丁苄酯或聚氯乙烯微塑料后, 其体内卵黄蛋白基因的表达量降低, 相应的后代数量也减少^[13, 14]。此外, 另一些基因也参与了甲壳动物的生殖和胚胎发育。Zhao等^[15]认为*MnCatL*基因参与了日本沼虾

收稿日期: 2023-04-06; 修订日期: 2023-06-26

基金项目: 国家自然科学基金(31870451)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31870451)]

作者简介: 赵雅洁(1998—), 女, 硕士研究生; 主要研究枝角类分子进化。E-mail: 1624497865@qq.com

通信作者: 邓道贵(1969—), 男, 教授; 主要研究方向浮游生物生态学研究。E-mail: dengdg@chnu.edu.cn

(*Macrobrachium nipponense*)的卵巢成熟与胚胎发育。通过RNA干扰实验, Kato等^[16]发现, *Distal-less* (*Dll*)基因的沉默抑制了大型溞(*Daphnia magna*)的胚胎发育。Cho等^[17]研究发现, 对苯基苯酚能够影响大型溞生殖和发育基因(*EcR-A*、*EcR-B*、*Jhe*和*Vtg*)的表达。由此可见, 与溞属枝角类生殖相关的分子机理研究是十分不足的。

中华拟同形溞(*D. sinensis*)是一种常见的溞属枝角类, 广泛分布于长江中下游湖泊中^[18]。有研究显示, 在受到鱼类信息素胁迫时, 溞属枝角类性腺发育的加快导致了性成熟提前, 且首次怀卵数增加、后代体型变小^[19, 20]。在本研究中, 在鲮信息素的诱导下, 使用转录组测序和qPCR技术, 筛选了中华拟同形溞与生殖相关的候选基因, 并运用RNA干扰技术对2个候选基因的功能进行了分析, 我们的结果将为进一步研究枝角类生殖的分子机理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斜生四链藻(*Tetrademus obliquus*)购于中国科学院水生生物研究所, 置于温度为(25±1)℃、光照强度为2200 lx、光暗比为12h:12h的智能光照培养箱中培养(G70P-270D型, 宁波赛福), 培养基为BG-11培养基。当细胞达到指数生长期时收集, 浓缩后放于4℃冰箱中保存。

鲮(*Aristichthys nobilis*)1条, 来自1个小型渔业养殖湖泊, 其鲜重约为1 kg、体长约30 cm。在实验室水族箱中培养(培养液为20 L曝气48h以上的自来水), 每天更换培养液, 并投喂约1000只的中华拟同形溞, 共收集2d的鲮生活水用于后续实验, 鱼类生活水的收集参照Hahn等^[21]和Alkimi等^[22]的方法。鲮生活水首先用100目筛子(孔径为0.15 mm)过滤, 去除较大颗粒的杂质, 再使用0.45 μm的Whatman (GF/F)玻璃纤维滤膜过滤, 滤过液保存在-20℃冰箱中待用。

1.2 中华拟同形溞的培养与收集

中华拟同形溞来自安徽巢湖的休眠卵孵化, 培养在智能光照培养箱中。培养温度为(25±1)℃、光照强度为2200 lx、光暗比为12h:12h, 食物为20 mg/L湿重的斜生四链藻。

为了开展不同龄期中华拟同形溞的转录组分析, 雌性幼溞(JF)、成熟前1龄雌溞(BM)、第1成龄雌溞(MA)和第4成龄雌溞(RF)等4个龄期的中华拟同形溞样本被收集。每个雌性幼溞样本约500只, 其他3个龄期每个样本约60只。每个龄期收集3个

样本作为生物学重复, 进行转录组测序。实验时, 在每个50 mL烧杯中放入1只中华拟同形溞, 加入40 mL的培养液, 培养液为曝气48h以上的自来水, 2d更换1次培养液。约540只实验溞均来自同一中华拟同形溞克隆出生不超过6h的后代, 分四批培养, 分别收集4个不同龄期的中华拟同形溞样本。其中, 成熟前1龄雌溞、第1成龄雌溞和第4成龄雌溞等样本各需180只实验溞(即540只, 60×3×3); 另20只实验溞培养后, 用于收集1500只幼溞样本(即500×3), 幼溞均为产出后不超过6h的后代。每个烧杯中的食物均为20 mg/L湿重的斜生四链藻, 培养温度为(25±1)℃、光照强度为2200 lx、光暗比为12h:12h。将收集到的JF、BM、MA和RF样本分别放入含有RNA保存液的1.5 mL EP管中, 在4℃冰箱中过夜, 再放入-80℃冰箱中保存。

1.3 筛选中华拟同形溞与生殖相关基因的样本收集

根据孙雨琛^[23]的实验结果, 鲮信息素(鲮生活水)能够显著增大中华拟同形溞的生殖量。在本实验中, 设置3个鲮生活水浓度组, 即F0组(40 mL培养液)、F20组(8 mL鱼水+32 mL培养液)和F30组(12 mL鱼水+28 mL培养液)。实验时, 在每个50 mL烧杯中放入1只中华拟同形溞(出生时间<6h), 每天更换1次相应的鱼水和培养液。培养液为曝气48h以上的自来水。在实验期间记录中华拟同形溞的产幼溞数, 并收集第4成龄的中华拟同形溞作为检测其候选基因表达量的样本。统计分析显示, F20和F30组下第4成龄的中华拟同形溞产幼溞数均显著大于F0组($P<0.05$)。

1.4 中华拟同形溞转录组序列分析

RNA提取与检测、文库构建与质检 采用RNA试剂盒(TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit)提取中华拟同形溞中的总RNA, 而后对RNA样品进行严格质检, 在NEB Fragmentation Buffer中使用二价阳离子将得到的mRNA随机打断, 并按照NEB建库方式建库。再使用Qubit2.0 Fluorometer对文库进行初步定量, 随后使用Agilent 2100 bioanalyzer(Santa Clara, CA, USA)对文库的insert size进行检测, qRT-PCR对文库有效浓度进行准确定量, 最后由Illumina测序。

转录本的拼接与功能注释 对于无参考基因组的转录组测序, 获得clean reads后, 采用Trinity进行拼接^[24]。为了识别个别样品中低表达或者只检测到部分片段的基因, 对所有样品进行了合并组装。结合unigene序列, 在Nr、Nt、KOG、Swiss-prot、Uniprot、KEGG和GO等七大数据库中进行基因功能注释^[25]。

差异表达基因与富集分析 使用DEGseq2

对JF vs. BM、JF vs. MA、JF vs. RF、MA vs. RF、BM vs. MA和BM vs. RF等6个组合的差异表达基因进行分析, 筛选标准为 $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$ 和 $p_{\text{adj}} < 0.05$ 。采用diamond和clusterProfiler软件对差异表达基因进行GO功能富集分析、KEGG通路富集分析等。

与生殖相关的候选基因的筛选 在BM vs.

JF、MA vs. JF、RF vs. JF、RF vs. MA、MA vs. BM和RF vs. BM等6个组合中, 选择每个组合的前30个上调基因进行筛选, 一共筛选出163个差异表达基因。使用Beacon Designer软件设计引物, 内参基因为*GAPDH*(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)。*GAPDH*是一种多功能蛋白, 是糖代谢的关键酶, 在不同生物中具有高度保守性, 常作为内参基因用于基因表达定量的研究中^[26, 27]。qPCR使用LightCycler[®] 96 仪器, 反应程序为: 95℃预变性10min; 95℃变性 10s, 60℃退火30s, 40个循环, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。根据鱼类信息素胁迫实验结果, 收集鱼类信息素组与对照组第五成龄的中华拟同形蚤为样本进行qPCR实验, 根据其表达量的差异(F20与F30组的表达量显著高于F0, 且F20与F30无显著性差异)筛选出与生殖相关的候选基因。RNA提取试剂盒与反转录试剂均来自TaKaRa公司。

1.5 RNA干扰

dsRNA制备 根据qPCR结果, 选择Clus-

ter-13168.22885 (*Dsmapk*)和Cluster-13168.32243 (*Dsussp*)基因作为目的基因进行功能分析。目的质粒(质粒载体均为L4440)由通用生物公司构建, 将L4440空载、L4440-*EGFP*质粒和目的质粒转化进入HT115感受态细胞, 菌种在双抗培养基(四环素: 10 μg/mL, 氨苄青霉素: 100 μg/mL)中扩大培养至 $A_{600} \approx 0.8$, 而后使用IPTG(Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside)或乳糖诱导dsRNA^[28]。经凝胶电泳检测, 其中一号泳道(496 bp)和4号泳道(518 bp)为目的的条带(图 1)。L4440为空白对照, *EGFP*为阴性对照^[16]。

RNA干扰饲喂实验 实验设置2个食物浓

度, 即2%大肠杆菌浓度组(2%大肠杆菌 + 98%斜生四链藻)和5%大肠杆菌浓度组(5%大肠杆菌+95%斜生四链藻), 食物总生物量为20 mg/L。除含有L4440空载的大肠杆菌不需诱导外, 含有L4440-*Dsmapk*、L4440-*Dsussp*和*EGFP*质粒的大肠杆菌均需分别诱导出其dsRNA后再用于饲喂实验。在每个食物浓度组下, 分别培养15个中华拟同形蚤, 设3个平行, 共计45个实验蚤。实验蚤为中华拟同形蚤第

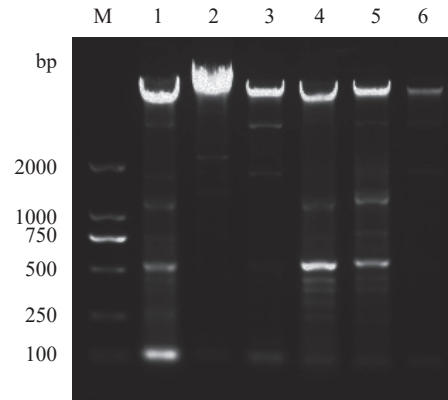


图 1 dsRNA诱导图

Fig. 1 The induction of double strand RNA

1. 乳糖诱导携带L4440-*Dsmapk*重组质粒的HT115菌株表达产物; 2. IPTG诱导携带L4440-*Dsmapk*重组质粒的HT115菌株表达产物; 3. 携带L4440-*Dsmapk*重组质粒的HT115菌株未诱导产物; 4. 乳糖诱导携带L4440-*Dsussp*重组质粒的HT115菌株表达产物; 5. IPTG诱导携带L4440-*Dsussp*重组质粒的HT115菌株表达产物; 6. 携带L4440-*Dsussp*重组质粒的HT115菌株未诱导产物

1. Lactose induces the expression product of HT115 strain carrying L4440-*Dsmapk* recombinant plasmid; 2. IPTG induces the expression product of HT115 strain carrying L4440-*Dsmapk* recombinant plasmid; 3. uninduced product of HT115 strain carrying L4440-*Dsmapk* recombinant plasmid; 4. Lactose induces the expression product of HT115 strain carrying L4440-*Dsussp* recombinant plasmid; 5. IPTG induces the expression product of HT115 strain carrying L4440-*Dsussp* recombinant plasmid; 6. uninduced product of HT115 strain carrying L4440-*Dsussp* recombinant plasmid

三代幼蚤(出生时间<6h)。实验时, 在每个50 mL烧杯中放入1只中华拟同形蚤, 加入40 mL培养液, 每天更换培养液, 实验持续10d, 实验蚤可生长到第7龄期。实验期间, 记录中华拟同形蚤的首次怀卵数、产幼蚤数。实验结束后收集样本, 使用qPCR检测RNA干扰后目的基因(*Dsussp*和*Dsmapk*)的表达量变化。目的基因的引物见表 1, *GAPDH*基因作为参照。

2 结果

2.1 中华拟同形蚤转录组的装配、注释及物种同源性分析

对中华拟同形蚤的JF、BM、MA和RF样本进行转录组测序, 获得105789条transcripts, 总长度238094433 bp, 平均长度2250.6 bp, N50长度4890 bp; 获得104071条unigenes, 总长度237614979 bp, 平均长度2283.2 bp, N50长度4898 bp(表 2)。结合BLASTX程序与Nr、KOG、Uniprot等数据库, 与获得的unigenes进行比对, Nr数据库注释到的最多(74586条, 占71.67%), 其次为Nt(20690条, 占19.88%; 表 3)。

表 1 引物名称及序列

Tab. 1 Names and sequences of primers used in the experiment

引物名称 Primer name	引物 Primer (5'—3')
<i>GAPDH</i>	TCGTCTCCAATGCTTCTT CGGTCCATCAACAGTCTT
<i>Dsussp</i>	CGCAGAGTTAGGACAGAT GGCTTCATTACATACACAT
<i>Dsmapk</i>	GTGTATGCGTGTAAATGATGT TGAGAAGGAGGCTTGATG

表 2 中华拟同形蚤的转录组装配分析

Tab. 2 Assembly analysis of transcriptome in *D. sinensis*

指标Index	转录本Transcript	基因Unigene
0—500 bp	34400	32713
500—1000 bp	14993	19292
1000—2000 bp	14992	14992
>2000 bp	37074	37074
总数量Total number	105789	104071
总长度Total length	238094433	237614979
平均长度Mean length	2250	2283
N50长度N50 length	4890	4898

表 3 中华拟同形蚤转录组unigenes功能注释与统计

Tab. 3 Summary statistics of function annotation of unigenes in *D. sinensis*

数据库 Database	基因数量 Number of gene	百分比 Percentage (%)
Nr	74586	71.60
Nt	20690	19.88
KEGG	46310	44.50
Swiss-Prot	55751	53.57
Uniprot	55712	53.53
KOG	50785	48.80
GO	33796	32.47

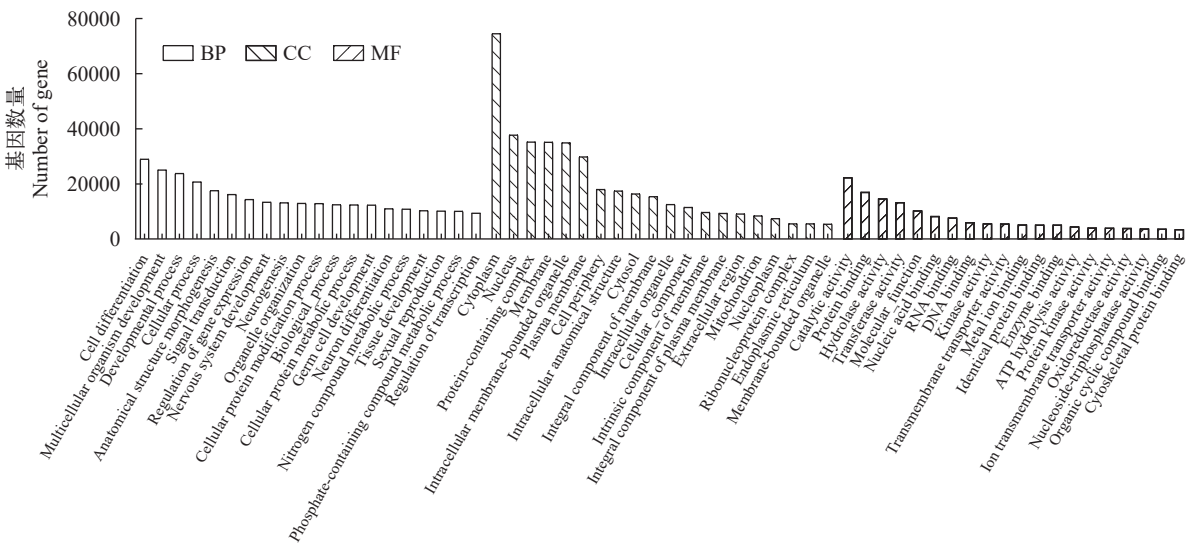


图 2 中华拟同形蚤unigenes的GO功能分类

Fig. 2 GO functional classificati on of unigenes in *D. sinensis*

将中华拟同形蚤unigenes在Nr数据库中进行相似序列匹配, 与其同源性序列比例较高的近缘物种分别为*D. magna*(76.37%)、other(14.88%)、*Diploscapter pachys*(3.22%)、*D. pulex*(3.11%)、*Ricinus communis*(1.3%)和*Beauveria bassiana* D1-5(1.12%)。

2.2 中华拟同形蚤不同龄期基因的差异表达分析

将JF、BM、MA和RF四个龄期测序所获得的基因进行两两比较, BM vs. MA的DEGs中有1248个上调基因、331个下调基因; BM vs. RF的DEGs中有184个上调基因、111个下调基因; JF vs. BM的DEGs中有750个上调基因、1441个下调基因; JF vs. MA的DEGs中有4650个上调基因、2496个下调基因; JF vs. RF的DEGs中有541个上调基因、755个下调基因; MA vs. RF的DEGs中有243个上调基因、1146个下调基因。

2.3 中华拟同形蚤基因的富集分析和功能注释

GO富集分析显示, 中华拟同形蚤的unigenes序列分为3大类, 60个小类, 其中1—20归入生物过程(Biological process), 21—40归入细胞组分(Cellular component), 41—60归入分子功能(Molecular function)。细胞分化(Cell differentiation)和多细胞生物发育(Multicellular organism development)在生物过程分类中占比较高, 细胞质(Cytoplasm)和细胞核(Nucleus)在细胞组分分类中占比较高, 而催化活性(Catalytic activity)和蛋白结合(Protein binding)在分子功能分类中占比较高(图 2)。

2.4 候选基因的筛选

在鱼类信息素胁迫下, 中华拟同形蚤在第4至第6成龄的产幼蚤数明显高于对照组(图 3), 且在第4、5和6成龄时F0组的产幼蚤数均显著小于F20和

F30组($P<0.05$), 而F20组的产幼蚤数与F30组则没有显著性差异。我们选取了第5成龄的中华拟同形

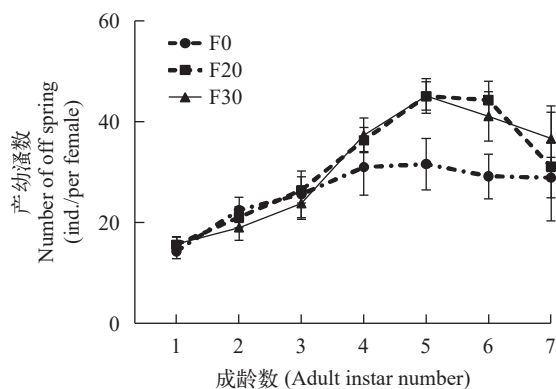


图3 不同鱼类信息素浓度下中华拟同形蚤的产幼蚤数

Fig. 3 Number of offspring of *D. sinensis* under different fish kairomone concentrations

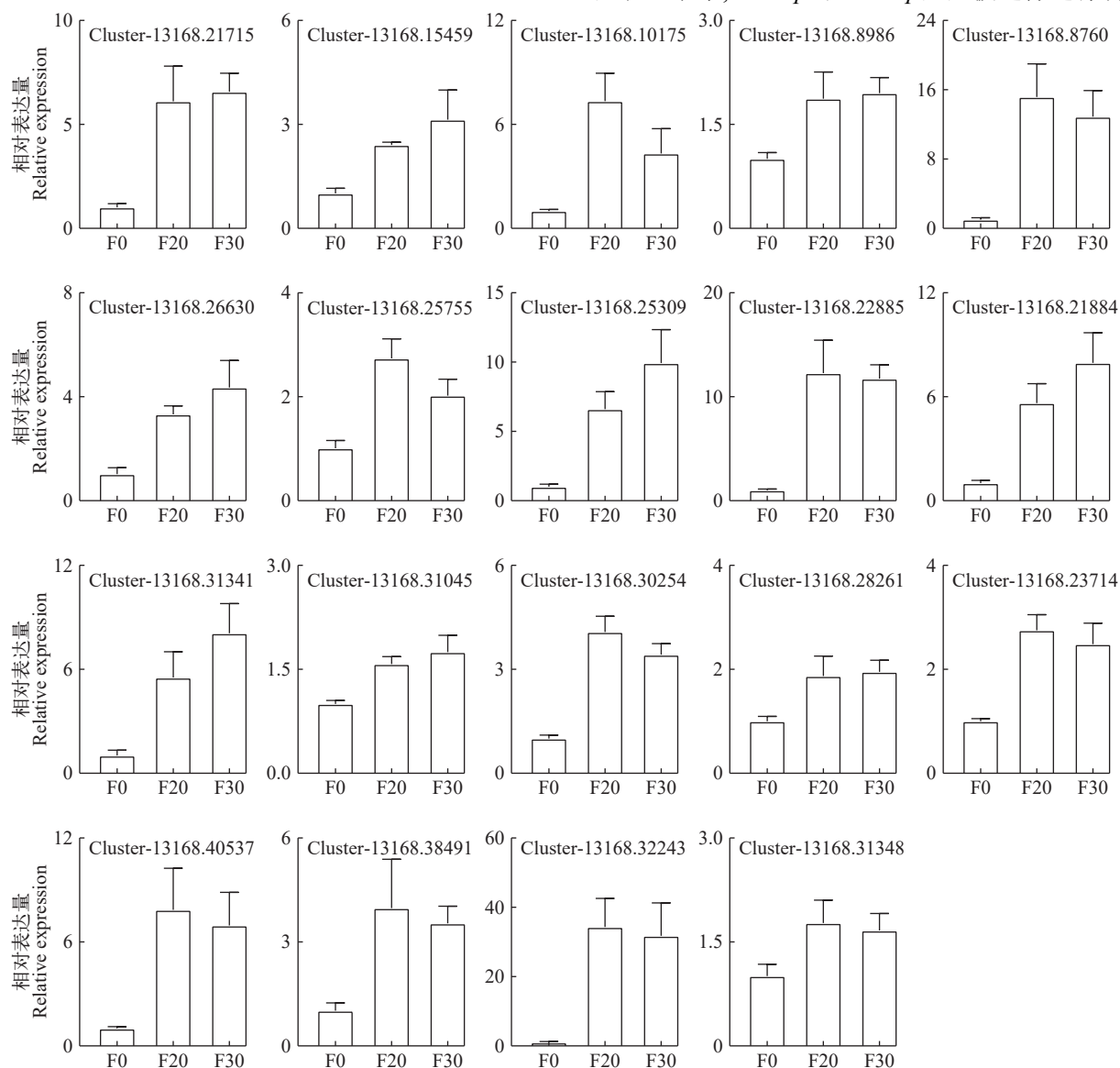


图4 与中华拟同形蚤生殖相关基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of mRNA of the genes related to reproduction of *D. sinensis*

蚤作为后续qPCR验证的实验样本。

分别在BM vs. JF、MA vs. JF、RF vs. JF、RF vs. MA、MA vs. BM、RF vs. BM组合中选择前30个上调基因, 共获得163个差异表达基因。再通过qPCR验证, 筛选出19个与中华拟同形蚤生殖相关的候选基因。这些基因在F0中的表达量均显著小于F20和F30($P<0.05$), 推测这些基因可能与中华拟同形蚤的生殖相关(图4和表4)。其中一些基因被注释为酶, 一些被注释为蛋白, 还有一些未被注释, Cluster-13169.30254基因在Nr中被注释为vitellogenin, 卵黄蛋白原在生殖和发育中起重要作用(表4)。

2.5 两个候选基因的功能分析

根据19个中华拟同形蚤与生殖相关的候选基因表达水平, *Dsmapk*和*Dsussp*基因被选择进行功能

表 4 19个与中华拟同形蚤生殖相关基因的功能注释

Tab. 4 Functional annotation of 19 genes related to reproduction in *D. sinensis*

基因号 Gene ID	Nr数据库注释 Nr Description	校正后 P值 P-value
Cluster-13168.28261	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5	0
Cluster-13168.32243	UV-stimulated scaffold protein A	1.2E-271
Cluster-13168.22885	Mitogen-activated protein kinase 15	0
Cluster-13168.8986	Mucin-5AC	0
Cluster-13168.30254	Vitellogenin	0
Cluster-13168.25309	Hypothetical protein	2.50E-144
Cluster-13168.10175	Uncharacterized proteinLOC116922765	0
Cluster-13168.8760	Uncharacterized proteinLOC116924262	0
Cluster-13168.23714	Larval cuticle protein	1.60E-65
Cluster-13168.21715	Uncharacterized proteinLOC116931189	4.70E-151
Cluster-13168.26630	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1	0
Cluster-13168.15459	Trypsin alpha-3	1.80E-124
Cluster-13168.38491	Calcium-transporting ATPase type 2C member 11	0
Cluster-13168.40537	Maltase 1	0
Cluster-13168.31341	Acyl-protein thioesterase 1	2.20E-120
Cluster-13168.31348	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5	0
Cluster-13168.21884	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	4.30E-241
Cluster-13168.25755	Membrane metallo-endopeptidase 1	0
Cluster-13168.31045	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	5.50E-72

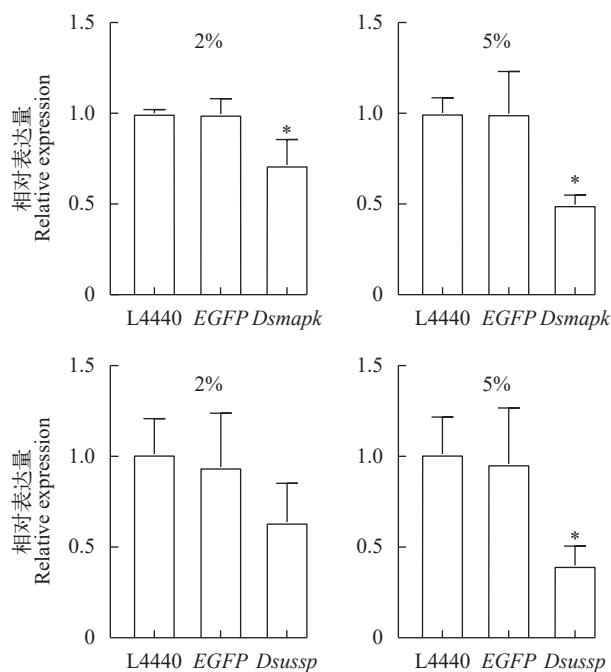
分析。在2%大肠杆菌浓度组,与EGFP组相比, *Dsmapk*和*Dsussp*基因的表达量分别下降了28.1%和32.3%;在5%大肠杆菌浓度组, *Dsmapk*和*Dsussp*基因的表达量与EGFP组相比分别下降了41.1%和55.6%。在2%和5%大肠杆菌浓度下, L4440组与EGFP组的表达量间均无显著差异。这些结果表明,较高浓度大肠杆菌的RNA干扰对中华拟同形蚤的*Dsmapk*和*Dsussp*基因的干扰效果更明显(图 5)。

在2%大肠杆菌浓度下, *Dsmapk*和*Dsussp*组的首次怀卵数均显著小于L4440组和EGFP组($P < 0.01$);在第5、第6和第7龄期, *Dsmapk*和*Dsussp*组的产幼蚤数均显著小于L4440组和EGFP组($P < 0.01$)。在5%大肠杆菌浓度下, *Dsussp*组的首次怀卵数显著小于L4440组($P = 0.017$);在第5、第6和第7龄期, *Dsmapk*和*Dsussp*组的产幼蚤数均显著小于L4440组和EGFP组($P < 0.01$; 图 6)。

3 讨论

枝角类生殖转换的分子机理一直是生物学家

研究的热点^[6, 10, 29]。Chen等^[6]通过RACE技术克隆了蚤状蚤*tra*基因的全长,并观察到在其雄性、两性生殖雌性、孤雌生殖雌性、休眠卵和雌性幼体中*tra*基因的表达量逐渐降低。Liu等^[30]研究发现,角质层蛋白(*CP*)在隆线蚤两性生殖雌性中的表达量高于孤雌生殖雌性,并认为这可能与卵鞍角质层的形成有关。*CSP2*和*CSP3*基因在隆线蚤两性生殖雌性中的表达量高于孤雌生殖雌性,且主要在卵巢、胸肢和第二触角处表达^[8],这暗示*CSP2*和*CSP3*可能与隆线蚤的生殖转换有关。此外, Zhang等^[7]发现, *Dsx1*基因在隆线蚤孤雌生殖雌性中的表达量明显小于两性生殖雌性,并认为*Dsx1*基因在隆线蚤生殖转换和性别分化过程中也可能发挥着重要作用。但是,与枝角类生殖相关基因的研究偏少。通常,卵黄蛋白原被认为与动物的生殖发育密切相关,它是雌性个体在卵子发生过程中对雌二醇正常周期的反应而产生的,并在卵母细胞内进行蛋白水解,形成积累的卵黄蛋白,其中最为常见的是脂蛋白和磷脂^[31, 32]。Gust等^[33]发现,1-甲基-3-硝基-1-硝基胍(MeNQ)会使蚤状蚤的后代数量减少,伴随着*vtg*-

图 5 RNA干扰后中华拟同形蚤*Dsmapk*和*Dsussp*基因的相对表达量Fig. 5 Relative expression mRNA of *Dsmapk* and *Dsussp* genes in *D. sinensis* after RNAi

2%代表2%大肠杆菌的浓度, 5%代表5%大肠杆菌的浓度; EGFP为对照组, L4440为阴性对照。*代表 $P < 0.05$

2% represents a concentration of 2% *E. coli*, and 5% represents a concentration of 5% *E. coli*; EGFP is the control group, and L4440 is the negative control group. *represents $P < 0.05$

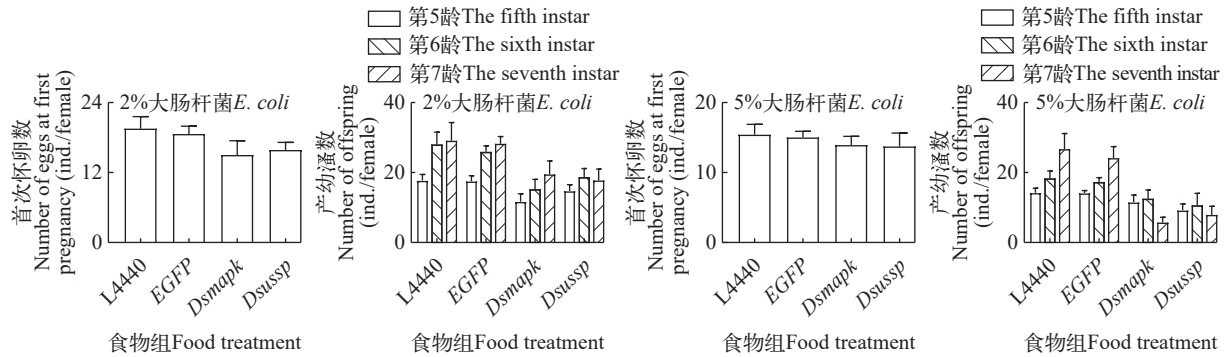


图6 RNA干扰后中华拟同形蚤的首次怀卵数及产幼蚤数变化

Fig. 6 Number of eggs at the first pregnancy and number of offspring of *D. sinensis* after RNAi

1前体的mRNA表达量降低,并认为卵黄蛋白原在蚤属的生殖中起着重要的作用,是卵母细胞大小及质量的关键指标。

在枝角类中,蚤状蚤的全基因组序列已被检测,包含至少30907个基因,其中扩增最多的基因家族是枝角类谱系特有的^[34],这为我们开展蚤属枝角类相关分子机理研究提供了基础。此外,由于RNA序列具有高度敏感性,科研工作者常用RNA-seq研究生态学和生物进化中的重要问题^[35-38]。Klumpen等^[39]研究发现,处于饥饿状态下的蚤状蚤的蛋白质生物合成基因表达量下调了,而碳水化合物代谢基因表达量上调了,这与动物在饥饿时先利用碳水化合物、而后利用脂质与蛋白质的机理相吻合。在本研究中,对中华拟同形蚤雌性幼蚤(JF)、成熟前1龄雌蚤(BM)、第1成龄雌蚤(MA)和第4成龄雌蚤(RF)等4个龄期样本进行转录组测序,通过qPCR分析,共筛选出19个与中华拟同形蚤生殖相关的候选基因。

RNAi技术已被广泛地应用在枝角类相关基因的功能分析上。Kato等^[11]发现,将*DII*基因的dsRNA注射到大型蚤的卵中,导致了大型蚤体内的*DII*-mRNA降解,并造成大型蚤的第二触角发生断裂。此外,将猩红直系同源体(*St*)基因的dsRNA注射到大型蚤的卵中,Ismail等^[40]观察到大型蚤胚胎的复眼和单眼中的黑色素均消失了。通过将蚤状蚤浸泡在*tra* dsRNA溶液中的实验,Guo等^[41]发现,蚤状蚤体内*tra*基因的表达量显著下降了。通过饲喂含有诱导的*CYP302A1* dsRNA的大肠杆菌,Qi等^[42]发现,中华拟同形蚤体内的*CYP302A1*基因表达量显著下降了。在本研究中,通过饲喂含有目的基因dsRNA的5%大肠杆菌,中华拟同形蚤体内目的基因(*Dsmapk*和*Dsussp*)的表达量均显著下降了。同时,与对照组(*EGFP*)相比,*Dsmapk*和*Dsussp*组中的中华拟同形蚤生殖量显著减少,且经过RNAi后实验母蚤产出的后代甚至出现发育不完全或畸形的

现象,这些结果均证实*Dsmapk*和*Dsussp*基因与中华拟同形蚤的生殖活动密切相关。此外,*Dsmapk*基因在2%和5%大肠杆菌浓度组的表达量分别下降了28.1%和41.1%,而*Dsussp*基因在2%和5%大肠杆菌浓度组的表达量分别下降了32.3%和55.6%,这暗示较高浓度的大肠杆菌对中华拟同形蚤目的基因的干扰效果更明显,同样的结果也出现在中华拟同形蚤与蜕皮相关的基因中^[42]。由此可见,本研究认为*Dsmapk*和*Dsussp*基因参与了中华拟同形蚤的生殖活动。本实验结果可为今后深入开展*Dsmapk*和*Dsussp*基因的功能研究提供参考。

参考文献:

- [1] Jiang X Z, Du N S. Fauna Sinica: Crustacean-Freshwater Cladocera [M]. Beijing: Science Press, 1979: 24-35, 75-77. [蒋燮志, 堵南山. 中国动物志·淡水枝角类 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 24-35, 75-77.]
- [2] Stollewerk A. The water flea *Daphnia*-a 'new' model system for ecology and evolution [J]? *Journal of Biology*, 2010, 9(2): 21.
- [3] Lu Z H, Yan B L, Yang J X. Advances in research on ecotoxicology in cladoceran [J]. *Journal of Water Ecology*, 2010, 31(2): 106-110. [陆正和, 阎斌伦, 杨家新. 枝角类生态毒理学研究进展 [J]. 水生态学杂志, 2010, 31(2): 106-110.]
- [4] Alwes F, Scholtz G. The early development of the onychopod cladoceran *Bythotrephes longimanus* (Crustacea, Branchiopoda) [J]. *Frontiers in Zoology*, 2014, 11(1): 10.
- [5] Allen W O, Gerald A L. The environmental-endocrine basis of gynandromorphism (intersex) in a crustacean [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2007, 3(2): 77-84.
- [6] Chen P, Xu S L, Zhou W, et al. Cloning and expression analysis of a transformer gene in *Daphnia pulex* during different reproduction stages [J]. *Animal Reproduction Science*, 2014, 146(3-4): 227-237.
- [7] Zhang M Q, Li H X, Liu A J, et al. Cloning, expression and cellular localization of the *Doublesex* gene in the wa-

- ter flea, *Daphnia carinata*, during different developmental stages [J]. *Gene*, 2014, **550**(2): 185-192.
- [8] Li H X, Yang Y, Xu G R, *et al.* Cloning, expression and localization of *DacaCSP2* and *DacaCSP3* during different reproductive stages in *Daphnia carinata* [J]. *Gene*, 2016, **582**(1): 59-68.
- [9] Zhu Y K, Chen H L, Zhang Q F, *et al.* Molecular cloning and expression patterns of a sex-biased transcriptional factor *Foxl2* in the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, **50**(4): 3581-3591.
- [10] Wang Z Y, Zhang F Y, Jin Q D, *et al.* Transcriptome analysis of different life-history stages and screening of male-biased genes in *Daphnia sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2022, **23**(1): 1-11.
- [11] Matozzo V, Gagné F, Marin M G, *et al.* Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review [J]. *Environment International*, 2008, **34**(4): 531-545.
- [12] Schlotz N, Sørensen J G, Martin-Creuzburg D. The potential of dietary polyunsaturated fatty acids to modulate eicosanoid synthesis and reproduction in *Daphnia magna*: a gene expression approach [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2012, **162**(4): 449-454.
- [13] Li J, Li H T, Lin D D, *et al.* Effects of butyl benzyl phthalate exposure on *Daphnia magna* growth, reproduction, embryonic development and transcriptomic responses [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, **404**(PB): 124030.
- [14] Liu Y, Zhang J L, Zhao H Y, *et al.* Effects of polyvinyl chloride microplastics on reproduction, oxidative stress and reproduction and detoxification-related genes in *Daphnia magna* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2022(254): 109269.
- [15] Zhao W, Chen L, Zhang F, *et al.* Molecular characterization of cathepsin L cDNA and its expression during oogenesis and embryogenesis in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* (Palaemonidae) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2013, **12**(4): 5215-5225.
- [16] Kato Y, Shiga Y, Kobayashi K, *et al.* Development of an RNA interference method in the cladoceran crustacean *Daphnia magna* [J]. *Development Genes and Evolution*, 2011, **220**(11-12): 337-345.
- [17] Cho H, Ryu C S, Lee S A, *et al.* Endocrine-disrupting potential and toxicological effect of *para*-phenylphenol on *Daphnia magna* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022(243): 113965.
- [18] Wu J X, Wang W P, Deng D G, *et al.* Genetic diversity and phylogeography of *Daphnia similoides sinensis* located in the middle and lower reaches of the Yangtze River [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(8): 4362-4372.
- [19] Chakri K, Touati L, Alfathan A H, *et al.* Effect of vertebrate and invertebrate kairomones on the life history of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Branchiopoda) [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2010, **333**(11-12): 836-840.
- [20] Macháček J. Inducibility of life history changes by fish kairomone in various developmental stages of *Daphnia* [J]. *Journal of Plankton Research*, 1995, **17**(7): 1513-1520.
- [21] Hahn M A, Effertz C, Bigler L, *et al.* 5 α -cyprinol sulfate, a bile salt from fish, induces diel vertical migration in *Daphnia* [J]. *Elife*, 2019(8): e44791.
- [22] Alkimi G D, Nunes B, Soares A M, *et al.* *Daphnia magna* responses to fish kairomone and chlorpromazine exposures [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2020(325): 109123.
- [23] Sun Y C. The combined effects of fish kairomone and *Microcystis aeruginosa* on the reproduction and body phenotype of *Daphnia similoides sinensis* [D]. Huaibei: Huaibei Normal University, 2020. [孙雨琛. 鱼类信息素与铜绿微囊藻协同作用对中华拟同形溞生殖和身体表型的影响 [D]. 淮北: 淮北师范大学, 2020.]
- [24] Zhang Z H, Jhaveri D J, Marshall V M, *et al.* A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e103207.
- [25] Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, **21**(18): 3674-3676.
- [26] Xue B, Zhang P, Li Z H, *et al.* Cloning, expression and stability analysis of the reference gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, **24**(5): 1003-1012. [薛蓓, 张培, 李志辉等. 脊尾白虾 GAPDH基因的克隆及其内参基因稳定性分析 [J]. 中国水产科学, 2017, **24**(5): 1003-1012.]
- [27] Ouyang X H, Xu W K, Liu L X, *et al.* Cloning and sequence analysis of *amGAPDH2* gene from *Apis mellifera* [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, **39**(2): 568-574. [欧阳霞辉, 徐文凯, 刘丽霞等. 意大利蜜蜂甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 $amGAPDH2$ 的cDNA克隆与序列分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, **39**(2): 568-574.]
- [28] Nwokeoji A O, Nwokeoji E A, Chou T, *et al.* A novel sustainable platform for scaled manufacturing of double-stranded RNA biopesticides [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2022(9): 107.
- [29] Xu S L, Zhou W, Chen P, *et al.* Identification and expression analysis of a *doublesex1* gene in *Daphnia pulex* during different reproductive stages [J]. *Development Genes and Evolution*, 2014(224): 147-157.
- [30] Liu A J, Zhang M Q, Kong L, *et al.* Cloning and expression profiling of a cuticular protein gene in *Daphnia carinata* [J]. *Development Genes and Evolution*, 2014(224): 129-135.
- [31] Wallace R A. Vitellogenesis and oocyte growth in non-

- mammalian vertebrates [J]. *Developmental Biology*, 1985(1): 127-177.
- [32] Denslow N D, Chow M C, Kroll K J, *et al.* Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics [J]. *Ecotoxicology*, 1999, **8**(5): 385-398.
- [33] Gust K A, Lotufo G R, Barker N D, *et al.* Mode of action evaluation for reduced reproduction in *Daphnia pulex* exposed to the insensitive munition, 1-methyl-3-nitro-1-nitroguanidine (MeNQ) [J]. *Ecotoxicology*, 2021, **30**(6): 1-13.
- [34] Colbourne J K, Pfrender M E, Gilbert D, *et al.* The ecoreponsive genome of *Daphnia pulex* [J]. *Science*, 2011, **331**(6017): 555-561.
- [35] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, **10**(1): 57-63.
- [36] Wilhelm B T, Landry J R. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing [J]. *Methods*, 2009, **48**(3): 249-257.
- [37] Costa V, Angelini C, De Feis I, *et al.* Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq [J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 853916.
- [38] Todd E V, Black M A, Gemmell N J. The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution [J]. *Molecular Ecology*, 2016, **25**(6): 1224-1241.
- [39] Klumpen E, Hoffschroer N, Schwalb A, *et al.* Metabolic adjustments during starvation in *Daphnia pulex* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021(255): 110591.
- [40] Ismail NIB, Kato Y, Matsuura T, *et al.* Generation of white-eyed *Daphnia magna* mutants lacking scarlet function [J]. *PLoS One*, 2019, **13**(11): e0205609.
- [41] Guo C Y, Chen P, Zhang M M, *et al.* Expression analysis of a transformer gene in *Daphnia pulex* after RNAi [J]. *Molecular Biology*, 2016, **50**(5): 748-754.
- [42] Qi H Y, Cao H J, Zhao Y J, *et al.* Cloning and functional analysis of the molting gene *CYP302A1* of *Daphnia sinensis* [J]. *Frontiers in Zoology*, 2023, **20**(1): 2.

SCREENING AND RNA INTERFERENCE STUDY OF TWO GENES RELATED TO REPRODUCTION IN *DAPHNIA SINENSIS*

ZHAO Ya-Jie, LI Guo-Qing, WANG Ye-Ping, JIN Qi-De and DENG Dao-Gui

(School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

Abstract: Reproductive biology of cladocera has been a research focus among ecologists, however, the molecular mechanism on the reproduction of cladocera remains unclear. In this paper, the genes related to reproduction of *Daphnia sinensis* were screened. *D. sinensis* at four growth stages (JF: Juvenile female, BM: the 1st instar female before maturity, MA: the 1st adult instar female, and RF: the 4th adult instar female) were selected for transcriptome sequencing. 6 combinations including BM vs. JF, MA vs. JF, RF vs. JF, RF vs. MA, MA vs. BM, RF vs. BM, were analyzed, and the top 30 upregulated genes from each combination were selected. This resulted in a total of 163 differentially expressed genes. To validate these genes, RT qPCR was performed on the fourth adult females of *D. sinensis* cultured with fish kairomones, leading to the identification of 19 candidate genes related to reproduction. Among these candidates, two genes (Cluster-13168.32243, *Dsussp* and Cluster-13168.22885, *Dsmapk*) were selected for functional analysis. Subsequently, RNAi was conducted, resulting in significantly lower expression levels of *Dsussp* and *Dsmapk* genes in *E. coli* containing their dsRNA compared to the control group (Enhanced Green Fluorescent Protein, *EGFP*). Compared with the *EGFP* group, the expression levels of *Dsmapk* and *Dsussp* genes decreased by 28.1% and 32.3% in the 2% *E. coli* concentration, and by 41.1% and 55.6% in the 5% *E. coli* concentration, respectively. Compared with the control group, the number of eggs and offspring of *D. sinensis* decreased in the *Dsmapk* and *Dsussp* groups after RNAi, particularly in the 5% *E. coli* concentration compared to the 2% *E. coli* concentration. The inhibitory effects on the number of eggs and offspring of *D. sinensis* were strengthened after RNAi. Therefore, the *Dsmapk* and *Dsussp* genes have been confirmed to play an important role in the reproductive development of *D. sinensis*.

Key words: RNA interference; Reproduction; Transcriptome sequencing; *Daphnia sinensis*