

Piwi 基因参与两性卤虫(*Artemia franciscana*)的生殖调控研究*

任翊卓 韩学凯^① 左佳俊 欧阳雪梅 段 虎 隋丽英^①

(亚洲区域卤虫参考中心 天津科技大学海洋与环境学院 天津 300457)

摘要 *Piwi* (P-element induced wimpy testis) 基因编码 *Piwi* 蛋白, 在生殖干细胞的自我更新、减数分裂过程、RNA 沉默和转录调控中起重要作用。为探究 *Piwi* 基因参与两性卤虫生殖发育的作用, 从两性卤虫 *Artemia franciscana* 转录组中筛选获得 *Piwi* 基因开放阅读框, 进行序列分析和结构域预测等生物信息学分析, 采用 qPCR 技术研究该基因在 *A. franciscana* 生殖腺发育不同时期表达特征, 并利用 RNAi 显微注射技术探究其功能。生物信息学分析表明, *A. franciscana* *Piwi* 基因的开放阅读框长 2 619 bp, 编码 872 个氨基酸; *Piwi* 基因编码的蛋白分子量为 98.11 kDa, 等电点为 9.50, 为碱性亲水性蛋白, 无信号肽和跨膜结构; 存在 *Piwi* 和 PAZ 结构域及 ArgoL1 结构域, 二级结构以 α -螺旋为主, 三级结构与之对应; 系统进化树显示 *A. franciscana* 与蚤状溞和大型溞的 *Piwi* 序列相似性最高。qPCR 结果表明, *Piwi* 基因在卵巢的卵黄发生晚期和晚期胚胎表达量最高, 显著高于卵黄发生早期和早期胚胎($P<0.01$); *Piwi* 基因在精巢的未成熟期表达量最高, 显著高于成熟早期、成熟中期和成熟晚期($P<0.01$)。RNAi 结果显示, 该方法能显著降低 *Piwi* 基因的表达水平($P<0.01$), 并导致 *A. franciscana* 所产后代均为休眠卵, 说明 *Piwi* 基因不但在 *A. franciscana* 生殖发育调控起重要作用, 而且可能在其繁殖方式决定过程中起关键作用。研究结果为两性卤虫 *Piwi*/piRNA 功能和分子机制调控的研究提供了基础信息, 将有助于揭示 *Piwi* 基因参与调控两性卤虫生殖发育机制。

关键词 *Artemia franciscana*; *Piwi* 基因; 生殖腺; 基因表达特征; RNAi

中图分类号 Q789; Q956; S966 **doi:** 10.11693/hyhz20210300069

Piwi (P-element induced wimpy testis) 蛋白属于 Argonaute 蛋白家族, 是 RNA 沉默通路中的主要蛋白。Argonaute 蛋白具有 PAZ 和 *Piwi* 两个主要结构域 (Höck *et al.*, 2008), 通过小 RNAs 介导基因调控从而在不同生理过程中促进细胞稳态 (Sheu-Gruttadauria *et al.*, 2017)。*Piwi* 基因在果蝇 (*Drosophila*) 生殖腺中被首次发现, 在生殖干细胞的自我更新中发挥着重要作用 (Cox *et al.*, 1998), 主要由 *Piwi* 蛋白与小 RNA (piRNAs) 相互关联形成复合体来实现其功能 (Ozata *et al.*, 2019)。研究发现 *Piwi* 蛋白在果蝇 (Marie *et al.*, 2017)、斑马鱼 (*Barchydanio rerio*) (Houwing *et al.*,

2007) 和小鼠 (*Mus musculus*) (Xu *et al.*, 2008) 生殖系转座子沉默中起关键作用, 是多种生物生殖系发育和干细胞自我更新过程的关键调控因子 (Ramat *et al.*, 2021)。*Piwi* 蛋白与 piRNAs 形成 piRNA 通路, 在生殖细胞发育、性别决定、剂量补偿等与有性生殖相关的发育过程中起着至关重要的作用 (Ramat *et al.*, 2021)。*Piwi* 或 *Piwi* 同源物基因的缺失会导致线虫 (*Caenorhabditis elegans*) (Wang *et al.*, 2008)、蝇类 (Li *et al.*, 2009) 及哺乳动物 (Kim *et al.*, 2012) 的生育能力严重受损。在甲壳动物中研究发现 *Piwi* 蛋白可在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 生殖细胞发育中发挥作用,

* 天津市自然科学基金项目, 18JCQNJC78500 号; 天津市科技支撑计划项目, 17ZXZYNC00060 号; 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目, IRT-17R81 号。任翊卓, 硕士研究生, E-mail: 15732620442@163.com

① 通信作者: 隋丽英, 博士, 教授, E-mail: suily@tust.edu.cn; 韩学凯, 博士, 助理研究员, E-mail: hanxk@tust.edu.cn

收稿日期: 2021-03-16, 收修改稿日期: 2021-04-29

PmPiwi1 可能参与了精子成熟的后期阶段(Sukthaworn *et al.*, 2020)。此外, *Piwi* 蛋白对 piRNAs 的生物合成(Czech *et al.*, 2016)、表观遗传调控(Huang *et al.*, 2013)以及癌细胞生存和转移(Halajzadeh *et al.*, 2020)都是至关重要的。

卤虫(*Artemia*)属小型甲壳动物, 广泛分布于世界各地沿海盐场和内陆盐湖高盐水体中, 是卤水生态系统食物链的重要组成部分和生物调节者(Dattilo *et al.*, 2005), 无节幼体是水产养殖育苗中重要的生物饵料(Lopes-dos-Santos *et al.*, 2019)。卤虫具有世代周期短、子代产量高和易于培养等优点, 是基础和应用生物学研究的良好实验动物(Manfra *et al.*, 2015)。按照生殖方式, 卤虫可以分为两性(Bisexual)卤虫和孤雌(Parthenogenetic)卤虫两种类型, 并且均具有卵生(Oviparity)和卵胎生(Oviviviparity)两种繁育方式, 而卤虫生殖和繁育方式的特殊性也逐渐成为研究者关注的热点。在卤虫生殖及性别决定方面, 鳞翅类性别决定基因 *Masc* 的同源基因已被证实是调控卤虫性别分化的途径之一(Li *et al.*, 2017); p90 RSK 被证实参与卤虫卵母细胞成熟及休眠胚胎细胞周期等过程(段如冰, 2014); 而小热休克蛋白 p26 影响卤虫的胚胎发育并在休眠生殖途径中发挥重要作用(King *et al.*, 2012)。*Piwi* 基因在生殖方面起着重要的作用, Dung 等(2019)在卤虫中发现了 *Piwi* 蛋白家族成员 Ago, 但未对其功能进行研究, 而关于 *Piwi* 基因在卤虫中的研究尚未见报道。本研究以两性卤虫为研究对象, 获得该基因的 ORF 序列并对其进行生物信息学分析, 运用 qPCR 检测生殖腺不同发育时期 *Piwi* 基因的表达特征, 利用 RNAi 技术探究其功能, 为揭示两性卤虫的生殖发育调控机制提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选取两性卤虫 *A. franciscana* (VinhChau strain), 在 28 °C 光照条件下(24L : 0D)孵化培养。选取 6 个 1L 锥形瓶, 每个锥形瓶饲养 200 只两性卤虫并投喂新鲜盐生杜氏藻 *Dunaliella salina*。根据孙瑜霞(2014)关于两性卤虫胚胎发育的描述, 收集雌性卤虫卵黄发生早期(孵化后约 16 d)、卵黄发生晚期(孵化后约 19 d)、早期胚胎(孵化后约 20 d)、晚期胚胎(孵化后约 25 d)各个时期的卵巢。通过观察雄性卤虫精巢的形态特征及成熟程度, 将雄虫分为未成熟期(孵化后约 8 d)、成熟早期(孵化后约 13 d)、成熟中期(孵

化后约 19 d)、成熟晚期(孵化后约 25 d)并收集各个时期的精巢, 将解剖后的组织迅速置于液氮中, 于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2 总 RNA 的提取及反转录

取两性卤虫卵巢和精巢组织, 采用 Trizol 法提取组织总 RNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度, 并用核酸蛋白测定仪(Eppendorf BioPhotometer plus)测定 RNA 浓度, 后置于 -80 °C 冰箱保存。选用 A_{260}/A_{280} 范围在 1.8—2.0 的 RNA 作为模板, 通过 TaKaRa 试剂盒进行反转录, 将得到的 cDNA 分别作为常规 PCR 和 qPCR 模板, 并存于 -20 °C 冰箱备用。

1.3 两性卤虫 *Piwi* 基因的获得及分析

从前期构建的两性卤虫 *A. franciscana* 转录组数据库中筛选获得 *Piwi* 基因片段, 该基因序列包括完整的开放阅读框(Open reading frame, ORF)。为保证基因序列的准确性, 利用 Primer Premier5 软件设计 3 对 *Piwi* 基因特异性引物(表 1), 拼接得到其完整 ORF 用于比对。本实验涉及的引物均由北京华大基因科技有限公司合成。以两性卤虫 cDNA 为模板进行扩增, PCR 体系(25 μ L): ddH₂O 10.5 μ L、Premix Ex Taq 12.5 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、cDNA 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 54 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测条带扩增结果, 将含有目的片段的 PCR 产物送到北京华大基因科技有限公司测序。

1.4 两性卤虫 *Piwi* 基因的生物信息学分析

通过在线软件(表 2)对两性卤虫 *Piwi* 基因进行生物信息学分析, 包括对测序拼接得到的序列进行 ORF、理化性质、亲/疏水性、信号肽以及亚细胞定位预测分析, 并进行跨膜结构、保守结构域、二级结构和三级结构预测; 采用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库对两性卤虫 *Piwi* 基因的氨基酸序列进行 BLAST 比对, 分析与其他物种的相似性; 利用 MEGA5.0 软件将不同物种的氨基酸序列进行多重比对, 构建系统进化树。

1.5 *Piwi* 基因在两性卤虫生殖腺不同发育时期的表达分析

根据测序得到的两性卤虫 *Piwi* 基因序列设计 qPCR 特异性引物 *Piwi*-F 和 *Piwi*-R (表 1), 以 *GAPDH* 作为内参基因对两性卤虫卵巢和精巢不同发育时期的 mRNA 表达量进行 qPCR 检测(美国伯乐 Bio-rad)。反应条件(20 μ L): TB Green Premix Ex Taq II 10 μ L、

表 1 引物信息
Tab.1 The primer information

引物名称	序列(5'—3')	退火温度(°C)	片段大小(bp)	用途
<i>Piwi</i> -F1	ATTCGGATGTTGAAGCAG	53	854	基因扩增
<i>Piwi</i> -R1	CCCGGCCATACCTCTAT			
<i>Piwi</i> -F2	GAAGAGTTATGGCGAAGAT	60	1 107	基因扩增
<i>Piwi</i> -R2	CGCAGGGTTTGGAGACA			
<i>Piwi</i> -F3	AAACCCTGCGCCTCCCA	63	927	基因扩增
<i>Piwi</i> -R3	AAGCCACTACAATCACCAGTACAAA			
<i>Piwi</i> -F	GCAGCACCGTTTCG TTC	60	114	qPCR
<i>Piwi</i> -R	CCCATTTCCGTTACCATT			
GAPDH-F	GGTCGTGACTTGACGGACTATCT	57	120	内参基因
GAPDH-R	AGCGGTTGCCATTTCTTGTT			
ds <i>Piwi</i> -F	T7-TTGTCTGCTCAGATTCTCTC	70	487	dsRNA 合成
ds <i>Piwi</i> -R	T7-GCCCTCATTTCTGTCAGT			
ds <i>EGFP</i> -F	T7-CAGTGCTTCAGCCGCTACCC	58	350	dsRNA 合成
ds <i>EGFP</i> -R	T7-AGTTCACCTTGATGCCGTTCTT			

表 2 生物信息学在线分析软件
Tab.2 Online analysis software in bioinformatics

在线软件	用途	网址
ORF Finder-NCBI	开放阅读框分析	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
ExPASy-ProtParam	理化性质分析	https://web.expasy.org/protparam/
ExPASy-ProtScale	亲水性/疏水性分析	https://web.expasy.org/protscale/
TMHMM Server V 2.0	跨膜结构预测	https://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
SignalP-5.0 Server	信号肽分析	https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
CDD	保守结构域预测	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html
PSORT II Prediction	亚细胞定位	https://psort.hgc.jp/form2.html
SOPMA	二级结构预测	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
SWISS-MODEL	三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/

上下游引物各 0.8 μL、ddH₂O 6.4 μL、cDNA 模板 2 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 退火 60 °C 30 s, 40 个循环。每个样本设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因在生殖腺不同发育时期的相对表达量, 通过 SPSS 25.0 软件对其进行单因素方差分析, *P*<0.05 为差异显著, *P*<0.01 为差异极显著。

1.6 dsRNA 的合成及显微注射 RNAi

利用 Primer Premier5 软件设计并合成 *Piwi* 基因 dsRNA 引物 ds*Piwi*-F 和 ds*Piwi*-R 及阴性对照增强型绿色荧光蛋白 *EGFP* 基因 dsRNA 引物 ds*EGFP*-F 和 ds*EGFP*-R (表 1), 引物的 5'端包含 T7 启动子序列(TAATACGACTCACTATAGGG)。通过 PCR 扩增 *Piwi* 基因的 ORF 片段并进行纯化回收, 获得的基因片段连接到 pGM-T 载体上并提取质粒, 使用 TranscriptAid

T7 High Yield Transcription Kit 体外转录试剂盒从质粒中体外转录 dsRNA, 纯化 dsRNA 并进行消化反应检测其质量(王志伟, 2017)。阴性对照 *EGFP* 基因 dsRNA 的合成同上。

分别设置对照组(ds*EGFP*)和干扰组(ds*Piwi*), 每组 60 只雌性卤虫, 采用显微注射(日本 Nikon NARISHIGE)对活力较好并处于卵黄发生早期的雌性卤虫进行注射, 注射部位为雌性卤虫外骨骼和肠道之间的开放循环体腔。将 dsRNA 溶于磷酸缓冲液中并与 0.1%酚红混合(1 : 1, 体积分数)得到 dsRNA 显微注射溶液, 每只雌性卤虫注射 1 μL 含 1 000 ng dsRNA 的溶液, 注射成功的雌性卤虫放入 50 mL 试管中单独培养并进行雌雄配对。待雌性卤虫发育到卵黄发生晚期、早期胚胎和晚期胚胎时分别收集卵囊, 每个时期设置 3 个平行, 每个平行收集 5 个卵囊, 利

用 qPCR 测定干扰效果。剩余的对照组和干扰组雌性卤虫各 15 只继续培养并观察产后代情况, 通过 SPSS 25.0 软件对数据进行卡方检验分析。

2 结果

2.1 两性卤虫 *Piwi* 基因 ORF 序列的扩增及测序

经 1.2%琼脂糖凝胶电泳对 *Piwi* 基因的 PCR 产物进行检测, 得到清晰单一的条带(图 1), 对测序结果进行拼接比对后, 发现得到的基因序列与预期目的基因片段大小一致, 验证后得到两性卤虫 *Piwi* 基因 ORF 大小为 2 619 bp, 编码 872 个氨基酸。

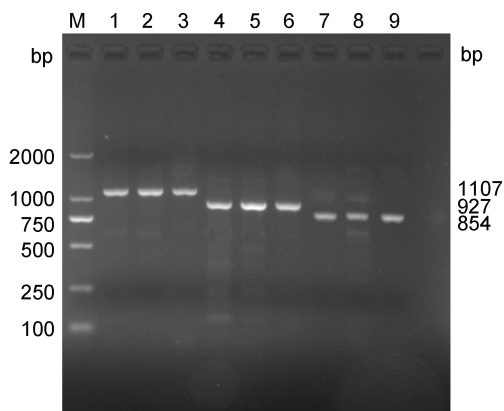


图 1 两性卤虫 *Piwi* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification of *Piwi* gene of *A. franciscana*

注: M. Marker DL 2000; 1—3. 引物 *Piwi*-F2/R2 的扩增条带; 4—6. 引物 *Piwi*-F3/R3 的扩增条带; 7—9. 引物 *Piwi*-F1/R1 的扩增条带

2.2 两性卤虫 *Piwi* 基因的相似性分析及系统进化树构建

两性卤虫 *Piwi* 基因氨基酸序列与昆虫纲、甲壳纲(节肢动物门)和双壳纲、瓣鳃纲(软体动物门)相关物种的 *Piwi* 基因氨基酸序列相对较近, 相似性范围为 41.05%—43.02% (表 3)。使用 MEGA5.0 软件构建 *Piwi* 基因系统进化树(图 2), 表明两性卤虫 *Piwi* 基因与蚤状溞和大型溞的 *Piwi* 序列相似性最高。

2.3 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白的理化性质预测分析

两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白的分子式为 $C_{4362}H_{6911}N_{1237}O_{1255}S_{42}$, 分子质量为 98.11 kDa, 氨基酸总数为 872, 含量最多的是甘氨酸 Gly (8.1%)和缬氨酸 Val(8.0%), 其次是精氨酸 Arg (7.2%)和亮氨酸 Leu (7.0%), 带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为 89, 带正电荷的残基总数(Arg+Lys)为 122, 总平均亲水性 (GRAVY)为−0.386, 理论等电点为 9.50, 不稳定指数为 33.97。

2.4 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白的信号肽、亲/疏水性及亚细胞定位预测分析

信号肽分析发现 *Piwi* 基因编码蛋白无信号肽(图 3a)。亲/疏水性分析得到 748 位点处的半胱氨酸(Cys)有最大值为 2.222, 115 位点处的天冬氨酸(Asp)有最小值为−2.844 (图 3b), 该蛋白为亲水性蛋白。亚细胞定位发现该蛋白在细胞质内分布最多(47.8%), 其次为细胞核(30.4%), 线粒体(13%)、细胞骨架(4.3%)和质膜(4.3%)分布最少。

表 3 *Piwi* 基因氨基酸序列的相似性比较
Tab.3 Comparison in amino acid sequence similarity of *Piwi* gene

序列号	物种名称	序列相似性
XP_022341466.1	美洲牡蛎(<i>Crassostrea virginica</i>)	43.02%
XP_031328334.1	萤火虫(<i>Photinus pyralis</i>)	42.99%
KXJ68137.1	白纹伊蚊(<i>Aedes albopictus</i>)	42.82%
XP_023703405.1	白蚁(<i>Cryptotermes secundus</i>)	42.76%
QID20005.1	果蝇(<i>Drosophila koepferae</i>)	42.39%
RVE42096.1	二化螟(<i>Chilo suppressalis</i>)	42.36%
AMN88361.1	紫贻贝(<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	42.26%
AFW04603.1	短翅鸣螽(<i>Gampsocleis gratiosa</i>)	42.03%
XP_028523889.1	中华蜜蜂(<i>Apis cerana</i>)	41.99%
QAW56456.1	马氏珠母贝(<i>Pinctada fucata</i>)	41.87%
EFX71843.1	蚤状溞(<i>Daphnia pulex</i>)	42.29%
RZF43882.1	灰飞虱(<i>Laodelphax striatellus</i>)	41.07%
KZS2095.1	大型溞(<i>Daphnia magna</i>)	41.05%

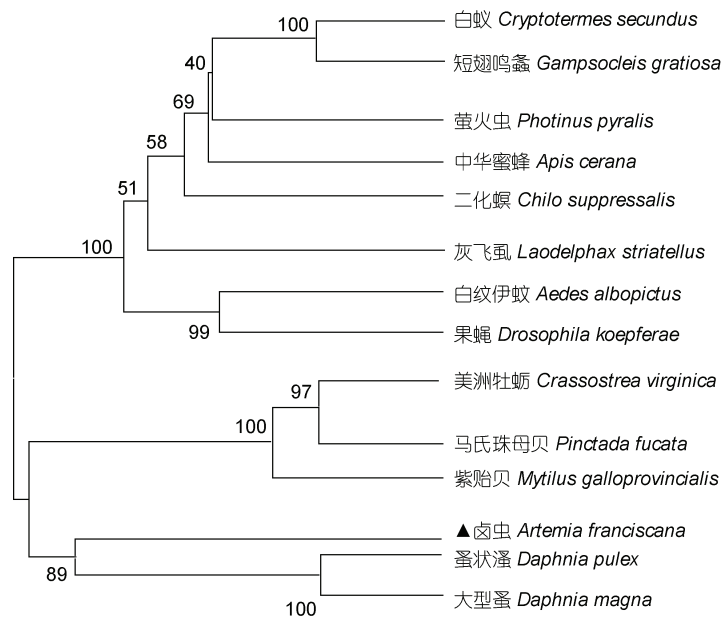


图 2 两性卤虫 *Piwi* 基因氨基酸系统进化树
Fig.2 Amino acid phylogenetic tree of *Piwi* gene of *A. franciscana*

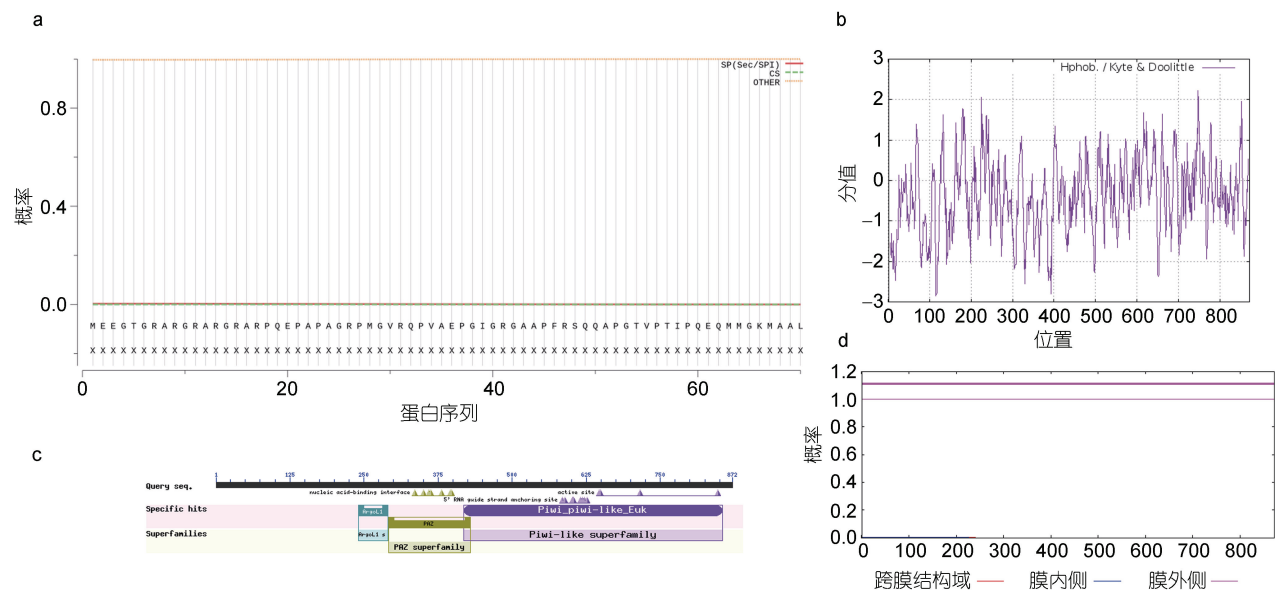


图 3 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白信号肽、亲水性、保守结构域、跨膜结构预测

Fig.3 Prediction of signal peptide, hydrophilicity, conserved domain, and transmembrane structure of the protein encoded by *Piwi* gene in *A. franciscana*
注: a. *Piwi* 蛋白信号肽分析; b. *Piwi* 蛋白亲水性分析; c. *Piwi* 蛋白保守结构域预测; d. *Piwi* 蛋白跨膜结构预测

2.5 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白的保守结构域与跨膜结构预测

对 *Piwi* 蛋白的保守结构域预测发现该蛋白共包含 3 个结构域, 其中第 241—291 位氨基酸为 Argol1 结构域, 第 292—430 位氨基酸为 PAZ 结构域, 第 418—855 位氨基酸为 *Piwi* 结构域(图 3c)。对跨膜结构域预测发现 *Piwi* 蛋白无跨膜结构域(图 3d)。

2.6 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白的高级结构预测

对 *Piwi* 蛋白的二级结构预测发现该蛋白主要由 4 种折叠方式构成, 282 个 α -螺旋占比 32.34%, 177 个延伸链占比 20.30%, 39 个 β -转角占比 4.47%, 374 个无规则卷占比 42.87%(图 4a)。蛋白的三级结构模型与二级结构预测相符, 无规则卷、 α -螺旋和延伸链是该蛋白结构的主体(图 4b)。

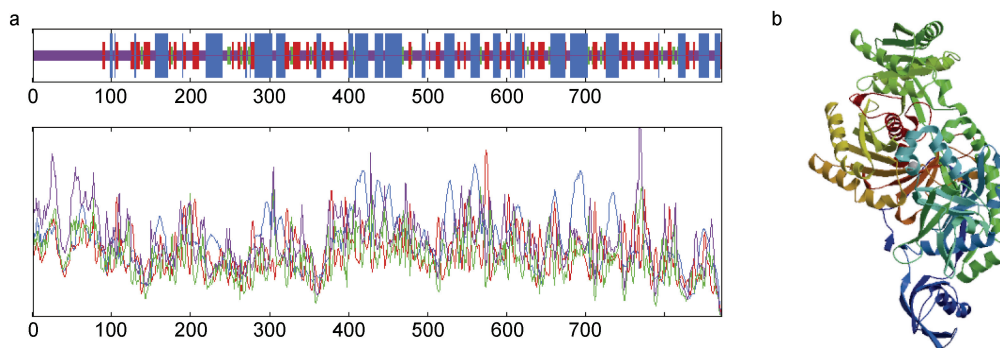


图 4 两性卤虫 *Piwi* 基因编码蛋白高级结构预测结果

Fig.4 The results of advanced structure prediction of the protein encoded by *Piwi* gene in *A. franciscana*

注: a. 两性卤虫 *Piwi* 蛋白二级结构预测; b. 两性卤虫 *Piwi* 蛋白三级结构预测

2.7 *Piwi* 基因在两性卤虫生殖腺不同发育时期的表达分析

通过 qPCR 检测 *Piwi* 基因在两性卤虫卵巢和精巢不同发育时期的表达量, 结果表明 *Piwi* 基因的表达普遍存在于卵巢和精巢中。在卵巢发育过程中,

Piwi 基因在卵黄发生晚期和晚期胚胎表达量最高, 显著高于卵黄发生早期和早期胚胎 ($P < 0.01$); 在精巢发育过程中, *Piwi* 基因在精巢未成熟期表达量最高, 显著高于精巢成熟早期、成熟中期和成熟晚期 ($P < 0.01$) (图 5)。

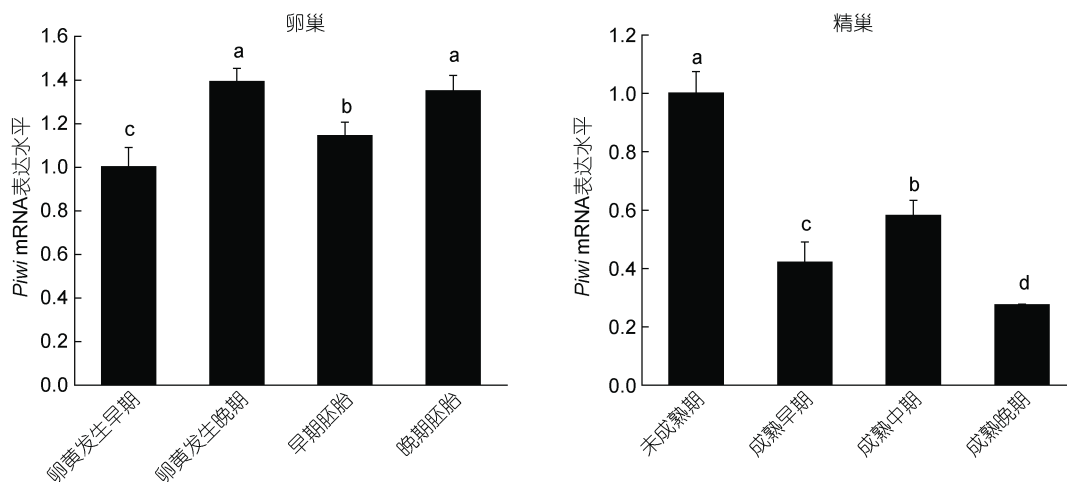


图 5 *Piwi* 基因在两性卤虫不同发育时期卵巢和精巢中的表达

Fig.5 Expression of *Piwi* gene in ovary and testis of *A. franciscana* at different developmental stages

注: 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$); 不同字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

2.8 RNAi 干扰后 *Piwi* 基因的表达及对后代的影响

与对照组 *dsEGFP* 相比, 雌性卤虫在注射 *dsPiwi* 后的卵黄发生晚期、早期胚胎、晚期胚胎均检测到 *Piwi* 基因的表达量极显著降低 ($P < 0.01$), 干扰效率分别为 91%、82%、92%, 说明显微注射实验是成功的 (图 6)。观察 RNAi 干扰后雌性卤虫产后代的情况, 发现显微注射后大约 10 d 对照组 (*dsEGFP*) 和干扰组 (*dsPiwi*) 均有后代产出。15 只注射 *dsPiwi* 的雌性卤虫中有 10 只雌性卤虫存活并全部产休眠卵; 15 只注射 *dsEGFP* 的雌性卤虫中有 11 只雌性卤虫存活, 其中 9

只产无节幼体, 2 只产休眠卵, 卡方检验显示对照组与干扰组产卵和产幼上存在极显著差异 ($P < 0.01$), 因此 *Piwi* 基因的敲降诱导两性卤虫产休眠卵。

3 讨论

本研究选取两性卤虫为研究对象, 得到了 *Piwi* 基因完整的 ORF 为 2 619 bp, 编码 872 个氨基酸, 与甲壳动物中的中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) (王敏, 2015) 以及昆虫中的家蚕 (*Bombyx mori*) (廖珍, 2009)、小菜蛾 (*Plutella xylostella*) (Hameed *et al.*, 2018) 等物

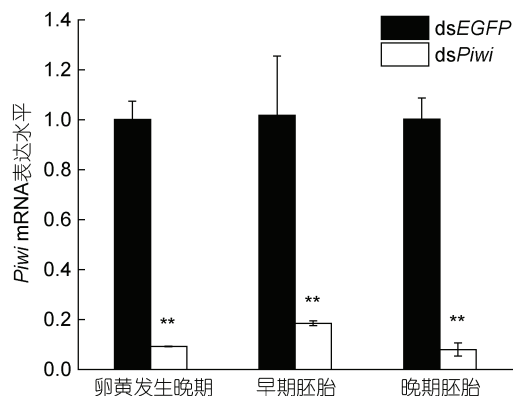


图6 显微注射后 *Piwi* 基因在两性卤虫不同时期卵巢中的表达

Fig.6 Expression of *Piwi* gene in ovary of *A. franciscana* at different developmental stages after microinjection

注: **表示与对照有极显著性差异($P < 0.01$)

种的 *Piwi* 基因序列长度相似。生物信息学分析显示, 两性卤虫 *Piwi* 蛋白分子质量为 98.11 kDa, 总平均亲水性(GRAVY)为-0.386, 推测该蛋白为亲水性蛋白, 与亲/疏水性预测结果一致; 正电荷残基总数(Arg+Lys)大于负电荷残基总数(Asp+Glu), 故该蛋白带正电荷; 理论等电点为 9.50, 为偏碱性蛋白; 不稳定指数为 33.97, 属于稳定蛋白, 故该蛋白属于稳定的碱性亲水性蛋白。两性卤虫 *Piwi* 蛋白含有保守的 PAZ 和 Piwi 结构域, 属于 Argonaute 蛋白家族, 这与 Dung 等(2019)关于两性卤虫 ArAgo 蛋白结构域的研究结果一致。在动物中, Argonaute 蛋白家族有 AGO 亚家族和 PIWI 亚家族两个分支, 其中 PIWI 亚家族由 N 端结构域、PAZ 结构域、MID 结构域和 Piwi 结构域组成, 而 PAZ 结构域和 Piwi 结构域是最保守的 (Sheu-Gruttadauria *et al*, 2017)。PAZ 结构域能够与 piRNA 的 3' 结合, Piwi 结构域中心有引导单链裂解的 RNaseH, 具有核酸内切酶活性(Kwon *et al*, 2014)。

piRNAs 是一类主要在动物生殖系中表达的非编码小 RNA, 与 *Piwi* 蛋白形成 piRNA 通路, 参与转座子沉默和基因表达调控, 在生物发育过程中发挥关键作用(Ramat *et al*, 2021)。该通路依赖 piRNAs 序列的特异性来识别转座子靶点, 参与转座子的转录后抑制和表观遗传来保护基因组的完整性; 通过 *Piwi* 蛋白提供效应功能, 在动物生殖细胞防御系统中发挥重要作用(Zhou *et al*, 2015)。*Piwi* 蛋白是生殖腺发育过程中 piRNA 合成以及转录和转录后调控所必需的, 该蛋白成员定位于不同的细胞区域(Tamtaji *et al*, 2020)。本研究通过生物信息学亚细胞定位预测, 发现

Piwi 蛋白主要分布在细胞质(47.8%)和细胞核(30.4%)中, 推测 *Piwi* 蛋白在细胞核和细胞质中发挥着重要作用。果蝇(Klattenhoff *et al*, 2008)和小鼠(Ishizu *et al*, 2012)的研究结论也证实了这一观点, 果蝇的 Argonaute 蛋白家族成员 Aubergine (Aub)蛋白和 Argonaute 3 (Ago3)蛋白位于细胞质和生殖细胞颗粒中, 它们在 piRNA 的产生中发挥着重要作用, 而 *Piwi* 蛋白主要在生殖细胞核的转录沉默中起作用。此外, 小鼠中含有三种 *Piwi* 蛋白, Mili 和 Miwi 在细胞质内参与 piRNA 合成, 调节细胞质转录后沉默, 而 Miwi2 位于细胞核, 在调控细胞核沉默中发挥作用。本研究通过相似性比对可知, *Piwi* 基因在昆虫中的保守性较高, 且两性卤虫与昆虫的 *Piwi* 基因氨基酸序列相对较近。Li 等(2017)的研究证实了鳞翅类性别决定基因 Masc 的同源基因是调控两性卤虫性别分化的途径之一, 也有报道称家蚕卵巢培养细胞系 BmN4 特异性表达两种 PIWI 亚家族蛋白 Siwi 和 BmAgo3 以及大量的 piRNAs (Kawaoka *et al*, 2009), 此后又有研究发现家蚕中 *Fem*、*Masc* 基因可与 *Piwi* 蛋白组成“乒乓”性别级联通路, 从而进一步完善了 piRNA 通路(Shoji *et al*, 2017), 这些结果表明两性卤虫中 *Piwi* 基因可能与家蚕中 *Piwi* 基因行使着相似的功能。

为了进一步研究 *Piwi* 基因对两性卤虫的调控功能, 本研究通过 qPCR 检测 *Piwi* 基因在两性卤虫生殖腺中不同发育时期的表达量, 结果显示 *Piwi* 基因在两性卤虫卵巢和精巢各个阶段均有表达, 但表达量有显著差异。在两性卤虫受精前, *Piwi* 基因在卵巢中的表达量逐渐上升, 到卵黄发生晚期 *Piwi* 基因表达量最高; 卵巢受精后, *Piwi* 基因表达量骤降, 在之后 4—5 d 的胚胎发育过程中, *Piwi* 基因表达量再次呈现上升的趋势, 这种表达趋势与家蚕和西方蜜蜂(*Apis mellifera*)卵巢发育中 *Piwi* 基因表达相似(廖珍, 2009)。在卵巢整个发育过程中, *Piwi* 基因在卵黄发生晚期与晚期胚胎表达量最高, 推测 *Piwi* 基因在两性卤虫准备受精的过程和胚胎发育即将进入不同生殖途径过程中发挥着重要作用。

目前没有雄性卤虫精巢相关的报道, 本研究首次完成了对雄性卤虫的生殖发育周期的探究。与虾蟹等甲壳动物不同, 卤虫发育周期短, 本研究根据精巢发育程度将精巢发育分为四个时期。雄性卤虫精巢从未成熟期到成熟期的发育过程中, *Piwi* 基因表达水平呈现逐渐下降的趋势, 且四个时期均存在极显著差异, 推测 *Piwi* 基因在雄性卤虫精巢发育前期起着重

要作用。相比于其他甲壳动物, *Piwi* 基因在中华绒螯蟹精巢中的表达与本研究结果相似, 即随着精巢的逐渐发育, *Piwi* 表达量降低(王敏, 2015)。而在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)中 *Piwi* 基因虽在精子细胞的不同发育阶段均有表达, 但其在精子细胞早期、中期和晚期的表达没有显著差异, 进一步研究发现 *Piwi* 蛋白主要分布在顶体小管和膜复合体上, 表明其可能在精子发生过程中发挥功能(Xiang *et al.*, 2014)。

piRNAs 和 *Piwi* 蛋白对于生殖系的形成和维持是必不可少的, piRNA 通路受损会导致转座子的过表达, 显著破坏基因组结构, 并导致生殖细胞死亡和不育(Tóth *et al.*, 2016)。斑马鱼的 *Ziwi* (Houwing *et al.*, 2007) 和 *Zili* (Houwing *et al.*, 2008) 两种 *Piwi* 蛋白对维持生殖系至关重要, *Ziwi* 在生殖细胞发育的有丝分裂和早期减数分裂阶段大量表达, *Ziwi* 缺失使幼鱼生殖细胞衰竭, 并导致成鱼生殖细胞异常凋亡。卤虫作为一种良好的实验动物, 其多种生物学机制如抗逆性和滞育(Liu *et al.*, 2009)、细胞分裂(Chen *et al.*, 2016)、发育分化(Copf *et al.*, 2004)和繁殖(Dai *et al.*, 2011)等方面研究已开展较多。本研究利用 RNAi 技术探究两性卤虫 *Piwi* 基因的功能, 对处于卵黄发生早期的雌性卤虫进行显微注射, 利用 qPCR 检测注射后雌性卤虫的干扰效率, 结果显示 *Piwi* 基因的干扰效率均在 90% 左右, 显微注射很成功。观察 RNAi 干扰后雌性卤虫产后代的情况, 发现对照组(dsEGFP)和干扰组(ds*Piwi*)胚胎发育周期都很正常, 然而干扰组由于 *Piwi* 基因的敲降导致两性卤虫胚胎滞育产生休眠卵。这说明 *Piwi* 基因的表达量减少可促使雌性卤虫胚胎发育进入卵生生殖途径, *Piwi* 基因在两性卤虫的生殖发育过程中起到了重要作用, 这可能与两性卤虫的生殖方式决定机制相关。而在斑节对虾中, *Piwi* 同源物 *PmPiwi1* (Sukthaworn *et al.*, 2019) 和 *PmPiwi2* (Sukthaworn *et al.*, 2020) 在斑节对虾雌雄生殖腺不同发育阶段均有表达, 且 *PmPiwi1* 或 *PmPiwi2* 的敲降都会导致精子数量的显著减少, 同样表明 *Piwi* 基因可能在斑节对虾生殖系发育中发挥重要作用。本研究为两性卤虫 *Piwi*/piRNA 分子机制和功能的后续研究以及两性卤虫生殖方式方面的研究提供了基础数据, 同时为甲壳动物生殖发育调控研究奠定了基础。

4 结论

本研究成功获得两性卤虫 *Piwi* 基因完整的开放阅读框, 其总长 2 619 bp, 编码 872 个氨基酸; 生物

信息学分析显示, *Piwi* 蛋白包含 PAZ 结构域、*Piwi* 结构域和 ArgoL1 结构域, 二级结构的主体为无规则卷、 α -螺旋和延伸链, 且该蛋白主要分布在细胞质和细胞核中; 进化树分析表明两性卤虫与大型蚤和蚤状蚤的 *Piwi* 序列相似性最高; qPCR 结果显示两性卤虫在生殖腺中均有表达且在发育不同阶段存在差异表达。注射 ds*Piwi* 后能够有效抑制两性卤虫 *Piwi* 基因的表达, 且与对照组相比干扰组后代均产休眠卵。说明 *Piwi* 基因在两性卤虫的生殖发育及生殖方式决定过程中起到重要作用。

参 考 文 献

- 王 敏, 2015. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)生殖相关基因的克隆及其表达模式研究. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 37—44
- 王志伟, 2017. 对虾 VEGF 信号通路在 WSSV 感染过程中的功能研究. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 77—79
- 孙瑜霞, 2014. 卤虫休眠胚胎形成过程中相关基因分子克隆及功能研究. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2—3
- 段如冰, 2014. 卤虫两种 p90 RSK 在调节减数分裂及有丝分裂停滞中功能的研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 39—44
- 廖 珍, 2009. 家蚕和蜜蜂中 *Piwi* 蛋白基因的克隆与表达谱分析. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 28—63
- Chen D F, Lin C, Wang H L *et al.*, 2016. An La-related protein controls cell cycle arrest by nuclear retrograde transport of tRNAs during diapause formation in *Artemia*. *BioMed Central Biology*, 14(1): 16
- Copf T, Schröder R, Averof M, 2004. Ancestral role of *caudal* genes in axis elongation and segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(51): 17711—17715
- Cox D N, Chao A, Baker J *et al.*, 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Development*, 12(23): 3715—3727
- Czech B, Hannon G J, 2016. One loop to rule them all: the Ping-Pong cycle and piRNA-guided silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4): 324—337
- Dai Z M, Li R, Dai L *et al.*, 2011. Determination in oocytes of the reproductive modes for the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Bioscience Reports*, 31(1): 17—30
- Dattilo A M, Bracchini L, Carlini L *et al.*, 2005. Estimate of the effects of ultraviolet radiation on the mortality of *Artemia franciscana* in naupliar and adult stages. *International Journal of Biometeorology*, 49(6): 388—395
- Dung N V, Christiaens O, Le Van Bao D *et al.*, 2019. Identification of RNAi-related genes and transgenerational efficiency of RNAi in *Artemia franciscana*. *Aquaculture*, 501: 285—292
- Halajzadeh J, Dana P M, Asemi Z *et al.*, 2020. An insight into the roles of piRNAs and PIWI proteins in the diagnosis and

- pathogenesis of oral, esophageal, and gastric cancer. *Pathology Research and Practice*, 216(10): 153112
- Hameed M S, Wang Z B, Vasseur L *et al*, 2018. Molecular characterization and the function of *Argonaute3* in RNAi pathway of *Plutella xylostella*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1249
- Höck J, Meister G, 2008. The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2): 210
- Houwing S, Berezikov E, Ketting R F, 2008. Zili is required for germ cell differentiation and meiosis in zebrafish. *European Molecular Biology Organization Journal*, 27(20): 2702—2711
- Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E *et al*, 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, 129(1): 69—82
- Huang X A, Yin H, Sweeney S *et al*, 2013. A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Developmental Cell*, 24(5): 502—516
- Ishizu H, Siomi H, Siomi M C, 2012. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development*, 26(21): 2361—2373
- Kawaoka S, Hayashi N, Suzuki Y *et al*, 2009. The *Bombyx* ovary-derived cell line endogenously expresses PIWI/PIWI-interacting RNA complexes. *RNA*, 15(7): 1258—1264
- Kim T H, Yun T W, Rengaraj D *et al*, 2012. Conserved functional characteristics of the PIWI family members in chicken germ cell lineage. *Theriogenology*, 78(9): 1948—1959
- King A M, MacRae T H, 2012. The small heat shock protein p26 aids development of encysting *Artemia* embryos, prevents spontaneous diapause termination and protects against stress. *PLoS One*, 7(8): e43723
- Klattenhoff C, Theurkauf W, 2008. Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development*, 135(1): 3—9
- Kwon C, Tak H, Rho M *et al*, 2014. Detection of PIWI and piRNAs in the mitochondria of mammalian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(1): 218—223
- Li C J, Vagin V V, Lee S *et al*, 2009. Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell*, 137(3): 509—521
- Li D R, Ye H L, Yang J S *et al*, 2017. Identification and characterization of a *Masculinizer (Masc)* gene involved in sex differentiation in *Artemia*. *Gene*, 614: 56—64
- Liu Y L, Zhao Y, Dai Z M *et al*, 2009. Formation of diapause cyst shell in brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*, and its resistance role in environmental stresses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25): 16931—16938
- Lopes-dos-Santos R M A, Groot R, Sui L Y *et al*, 2019. Halophilic bacteria as a food source for the brine shrimp *Artemia*. *Aquaculture*, 500: 631—639
- Manfra L, Savorelli F, Di Lorenzo B *et al*, 2015. Intercalibration of ecotoxicity testing protocols with *Artemia franciscana*. *Ecological Indicators*, 57: 41—47
- Marie P P, Ronsseray S, Boivin A, 2017. From embryo to adult: piRNA-mediated silencing throughout germline development in *Drosophila*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(2): 505—516
- Ozata D M, Gainetdinov I, Zoch A *et al*, 2019. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nature Reviews Genetics*, 20(2): 89—108
- Ramat A, Simonelig M, 2021. Functions of PIWI proteins in gene regulation: new arrows added to the piRNA quiver. *Trends in Genetics*, 37(2): 188—200
- Sheu-Gruttadauria J, MacRae I J, 2017. Structural foundations of RNA silencing by Argonaute. *Journal of Molecular Biology*, 429(17): 2619—2639
- Shoji K, Suzuki Y, Sugano S *et al*, 2017. Artificial “Ping-Pong” cascade of PIWI-interacting RNA in silkworm cells. *RNA*, 23(1): 86—97
- Sukthaworn S, Panyim S, Udomkit A, 2019. Functional characterization of a cDNA encoding Piwi protein in *Penaeus monodon* and its potential roles in controlling transposon expression and spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 229: 60—68
- Sukthaworn S, Panyim S, Udomkit A, 2020. Homologues of Piwi control transposable elements and development of male germline in *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 250: 110807
- Tamtaji O R, Behnam M, Pourattar M A *et al*, 2020. PIWI-interacting RNAs and PIWI proteins in glioma: molecular pathogenesis and role as biomarkers. *Cell Communication and Signaling*, 18(1): 168
- Tóth K F, Pezic D, Stuwe E *et al*, 2016. The piRNA pathway guards the germline genome against transposable elements. *Non-coding RNA and the Reproductive System, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 886: 51—77
- Wang G L, Reinke V, 2008. A *C. elegans* Piwi, PRG-1, regulates 21U-RNAs during spermatogenesis. *Current Biology*, 18(12): 861—867
- Xiang D F, Zhu J Q, Hou C C *et al*, 2014. Identification and expression pattern analysis of Piwi genes during the spermiogenesis of *Portunus trituberculatus*. *Gene*, 534(2): 240—248
- Xu M G, You Y, Hunsicker P *et al*, 2008. Mice deficient for a small cluster of Piwi-interacting RNAs implicate Piwi-interacting RNAs in transposon control. *Biology of Reproduction*, 79(1): 51—57
- Zhou X, Battistoni G, El Demerdash O *et al*, 2015. Dual functions of Macpiwil in transposon silencing and stem cell maintenance in the flatworm *Macrostomum lignano*. *RNA*, 21(11): 1885—1897

THE REPRODUCTIVE REGULATION OF *Piwi* IN BISEXUAL *ARTEMIA FRANCISCANA*

REN Yi-Zhuo, HAN Xue-Kai, ZUO Jia-Jun, OUYANG Xue-Mei, DUAN Hu, SUI Li-Ying
(Asia Regional Artemia Reference Center, College of Marine and Environmental Sciences, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract *Piwi* (P-element induced wimpy testis) encoded Piwi protein, and it plays an important role in self-renewal, meiosis, RNA silencing and transcriptional regulation of germ stem cells. To study the role of *Piwi* in the reproductive development of bisexual *Artemia*, the open reading frame (ORF) of *Piwi* was obtained from *Artemia franciscana* transcriptome, and bioinformatics including sequencing and domain prediction were analyzed. The expression of *Piwi* in different stages of gonad development of *A. franciscana* were characterized by qPCR, and its function was verified by microinjection RNAi technology. Results showed that the ORF length of *Piwi* was 2619 bp, encoding 872 amino acid with a predicted molecular weight of 98.11 kDa, and a theoretical isoelectric point of 9.50. Piwi protein was an alkaline hydrophilic protein containing no signal peptide and transmembrane structure, and included the Piwi and PAZ domains as well as the ArgoL1 domain. The secondary structure was mainly composed of α -helix, which is consistent with the tertiary structure. The phylogenetic tree demonstrated that the *Piwi* sequences of *A. franciscana* were the most similar to those of *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*. As shown in the qPCR analysis, the *Piwi* expression in the later oocytes and later embryos was significantly higher than those of early oocytes and early embryos in ovary ($P < 0.01$). The expression level of *Piwi* in testis was the highest in the immature stage, which was significantly higher than those in early, middle and late maturation stages ($P < 0.01$). In addition, applying RNAi (RNA interference) technology could significantly reduce the expression level of *Piwi* ($P < 0.01$) and all offsprings were cysts, suggesting that *Piwi* gene not only plays an important role in the regulation of reproductive development of *A. franciscana*, but also may play a key role in determining the reproductive modes of *A. franciscana*. This study provided basic information for analyses on Piwi/piRNA pathway functions and molecular mechanisms in bisexual *Artemia*, and will help to reveal the role of *Piwi* in regulating the reproductive mechanism in bisexual *Artemia*.

Key words *Artemia franciscana*; *Piwi* gene; gonad; gene expression character; RNAi