

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)*smu-1* 基因的筛选、表达及功能研究*

钱美睿¹ 郑春静² 刘 军¹ 王庆强¹

(1. 中国计量学院生命科学院 杭州 310018; 2. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012)

摘要 从热诱导下罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中枢神经的消减文库中,筛选到一种高温应激下表达水平显著上调的 *smu-1* 基因。该基因编码的氨基酸序列与其它物种的 *smu-1* 呈现较高的同源性,该蛋白的羧基端具有 WD-40 repeat 结构域,该区域含有 6 个重复的 WD 基元,因此属于 WD40-repeat 蛋白家族。采用荧光定量 PCR 方法,对不同环境因子诱导下 *smu-1* 基因的表达特征进行分析,结果表明,与正常组相比,冷热休克和重金属诱导下 *smu-1* 基因的相对表达水平显著上升 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),而在盐胁迫 *smu-1* 表达水平却有下调的趋势 ($P < 0.05$)。进一步采用 *smu-1* 双链 RNA 干扰技术,深入探究了该基因的功能与高温诱导之间的相互关系。本研究在一定程度上为养殖虾类耐热性优良品种的改良和筛选提供了重要理论依据,从而为降低高温对养殖虾类造成的重大经济损失提供广泛应用前景。

关键词 罗氏沼虾; *smu-1* 基因; WD40-repeat 蛋白家族; 高温诱导

中图分类号 Q74

WD40-重复蛋白(WD-repeat protein)是一类含有多个进化上高度保守的 WD 基元的蛋白质(段红英等, 2007),该基元约由 40 个氨基酸残基组成,具有保守的 GH 和 WD 二肽序列,又称为 WD40 或者 Trp-Asp(色氨酸-天冬氨酸)。该蛋白广泛存在于真核细胞中,由许多结构相关、功能不同的调控蛋白质组成,在蛋白运输、RNA 加工剪接、信号转导、囊泡运输、细胞凋亡,尤其是在染色体修饰和转录等过程中具有重要作用(Ritterhoff *et al*, 2010)。

目前,该蛋白的研究主要集中在脊椎动物(Sheng *et al*, 2010)、植物(陈章权等, 2002; Lee *et al*, 2010; 刘月等, 2011)以及极少数无脊椎动物[如:线虫(Zahler, 2005; Leung *et al*, 2012)]方面。尽管克隆出了一些编码 WD40 重复蛋白的基因序列,部分已证实了 WD-40 repeat 蛋白参与了动物的信号转导调控(林小涛等, 1999; Zhu *et al*, 2004)、植物的发育(Pang *et al*,

2009)以及与干旱、高温、盐等外界胁迫的相关性(Ananieva *et al*, 2008; Chinnusamy *et al*, 2009),但大部分 WD-40 repeat 蛋白在生物体中确切的调控机制和生物学功能尚不清楚。而对该蛋白在经济甲壳类生物中的基因信息以及功能研究更是鲜有报道。鉴于此,解析经济甲壳动物 WD-40 repeat 蛋白的基因信息、表达特征以及功能将有助于更加全面和系统地阐明该蛋白在该物种中所发挥的重要的生物学功能以及与环境因子胁迫之间的相互关系。

本研究通过双链特异性核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN)介导消减杂交技术构建了热应激下罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中枢神经组织的消减文库(Peng *et al*, 2008),经过大量测序和序列比对,从中筛选到一种热应激相关的 WD-40 repeat 蛋白家族成员 *smu-1*。通过实时定量 RT-PCR 技术分析了 *smu-1* 基因在不同温度、盐以及重金属胁迫下的表

* 国家 863 计划项目“海水养殖生物重要功能基因的发掘与研究”,SS2012AA10A400 号,虾类功能基因的研究开发,2012/01—2015/12。钱美睿,硕士, E-mail: mery354@yahoo.cn

通讯作者: 刘军,副教授, E-mail: liujuncjlu@163.com

收稿日期: 2012-05-19, 收修改稿日期: 2012-08-28

达特征(徐桂荣, 1997); 同时利用双链 RNA 干扰技术, 研究热应激与该基因功能之间的相互关系。本研究旨在探明经济甲壳动物中 *smu-1* 基因在环境因子, 尤其是高温胁迫下可能的生物学功能, 从而进一步丰富了水生生物的耐热性生物学机制, 为水生生物抗热应激的优良品种的筛选和改良提供重要的理论依据(林小涛等, 1999)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)数只, 购于杭州近江农贸市场, 体长 9.91—9.95cm, 体重 9.76—10.47g。买回后放入水循环和充氧鱼缸中, 水温 25℃ 左右, 投食喂养适应环境一周。

1.2 实验方法

1.2.1 消减文库 本研究分别选取正常组(25℃)和热应激组(35℃)(Liu *et al.*, 2004)罗氏沼虾中枢神经作为 Driver 和 Tester, 然后采用双链特异性核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN)介导的均一化消减杂交进行热诱导下差异基因筛选, 具体方案参考文献(Dai *et al.*, 2009)。首先采用 TRIzol(Invitrogen)法(马学军等, 2005)提取 Driver 和 Tester 总 RNA、逆转录成 cDNA; 采用引物 SP6T7 和 3AP 进行 Tester 和 Driver 双链 cDNA 合成反应; 采用 RiboMax™ Large Scale RNA Production System-SP6 (Promega)和 ScriptMAX™ Thermo T7 Transcription Kit(Toyobo)分别进行 Tester RNA 和 Driver RNA 的体外合成; 加入 DNase I 进行消化模板基因组, 然后采用 RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen)进行纯化; 之后进行 Tester 逆转录实验以及 Driver 和 Tester 杂交反应; 最后 DSN 酶切以及 PCR 富集表达 Tester cDNA (刘月等, 2011)。

1.2.2 序列生物学信息分析 使用 NCBI 数据库中 Blast 程序对筛选到序列进行比对分析(廖智等, 2010); 使用 DNAMAN 6.0 软件和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>)预测氨基酸序列、组成和蛋白质基本理化性质; DNASTAR 软件预测其蛋白分子质量和等电点; 采用 Motif Scan (<http://hits.isbsib.ch/cgi-bin/PFSCAN>)进行结构域预测; 使用 MEGA 5.2 软件构建系统发生树; 用 Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>)初步预测蛋白结构。

1.2.3 温度、盐、重金属诱导处理 温度处理: 分别做 3 个温度梯度, 15℃、25℃和 35℃ (Liu *et al.*, 2004), 诱导 2h 以上。在 3 个不同温度梯度下解剖取

肌肉和中枢神经。

盐处理: 分别做 3 个渗透压梯度, 低渗透压 NaCl 浓度为 4.29g/L(四分之一致死浓度), 高渗透压 NaCl 浓度为 8.58g/L(半数致死浓度)(Zhang *et al.*, 2009), 用不加 NaCl 的作为对照组。实验诱导 2h 以上, 解剖提取渗透压敏感组织腮。

重金属处理: 分别做 3 个浓度梯度。低浓度 Cu^{2+} 浓度为 0.2526mg/L(四分之一致死浓度), 高浓度 Cu^{2+} 浓度为 0.525mg/L(半数致死浓度)(Zhang *et al.*, 2009), 用不加 CuSO_4 对照组, 诱导处理 2h 以上, 解剖提取重金属易富集的肝胰腺组织。

每组采用 6 只沼虾(雌雄各半)进行温度胁迫实验, 上述诱导结束后, 每个实验组随机挑选 3 只状态良好的沼虾, 用冰麻痹, 解剖提取组织。所有组织从虾体中解剖出后立即经液氮速冻, 降低 RNA 酶活性。抽提后的 RNA 放入 -80℃ 超低温冰箱速冻保存备用。

1.2.4 荧光定量 RT-PCR 采用 TRIzol(Invitrogen)法分别提取 6 只罗氏沼虾的肝胰腺、肌肉、中枢神经和腮总 RNA(具体取材同上), 随机引物合成 cDNA 第一链。根据已获得的 *smu-1* 全长序列设计引物, 引物序列如下: *smu-1F*: 5' GTGACTTTGTGGCGTGTGTTGTTTC 3' 和 *smu-1R*: 5' GAGTTCTCTCCAGCTTTCC-TGTTG 3'(扩增片段长度为 111bp)。同时以 18S rRNA (GenBank: GQ131934.1)基因序列为内参设计引物 18S-F: 5' CTGCCTTATCATGCTGTGGATTGTAG 3' 和 18S-R: 5' CTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTC 3' (扩增片段长度为 115bp)来标准化 *smu-1* 的相对表达水平。使用 iQ5™ 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)检测 *smu-1* 在各诱导条件下的相对表达水平, 每个样本做 3 个平行检测。PCR 反应体系为 12.5μL, 扩增条件为 95℃, 1min; 95℃, 10s; 62℃, 25s (收集荧光), 40 个循环。采用 $2^{-(\text{Ct}_{\text{内参基因}} - \text{Ct}_{\text{目的基因}})}$ 法计算 *smu-1* 的相对表达量。以 SPSS 13.0 软件进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著水平, $P < 0.01$ 为极显著水平。用 Microsoft Office Excel 作图。

1.2.5 双链 RNA 干扰 根据 *smu-1* 序列, 在其开放阅读框中设计带酶切位点的引物。上游引物为: 5' ACGATTCATCCGTTTCCCACA 3', 下游引物为: 5' CAACAGAAGTAACACCTGCCAGAG 3'。按 Takaoka 等(2007)的方法制备对照和目的双链 RNA。OD₂₆₀ 测定浓度, 计算双链 RNA 浓度, -20℃ 保存。

选取健康的成熟的罗氏沼虾(25—40g)进行心脏注射。注射分为 3 组: 干扰组、对照组和正常组。干

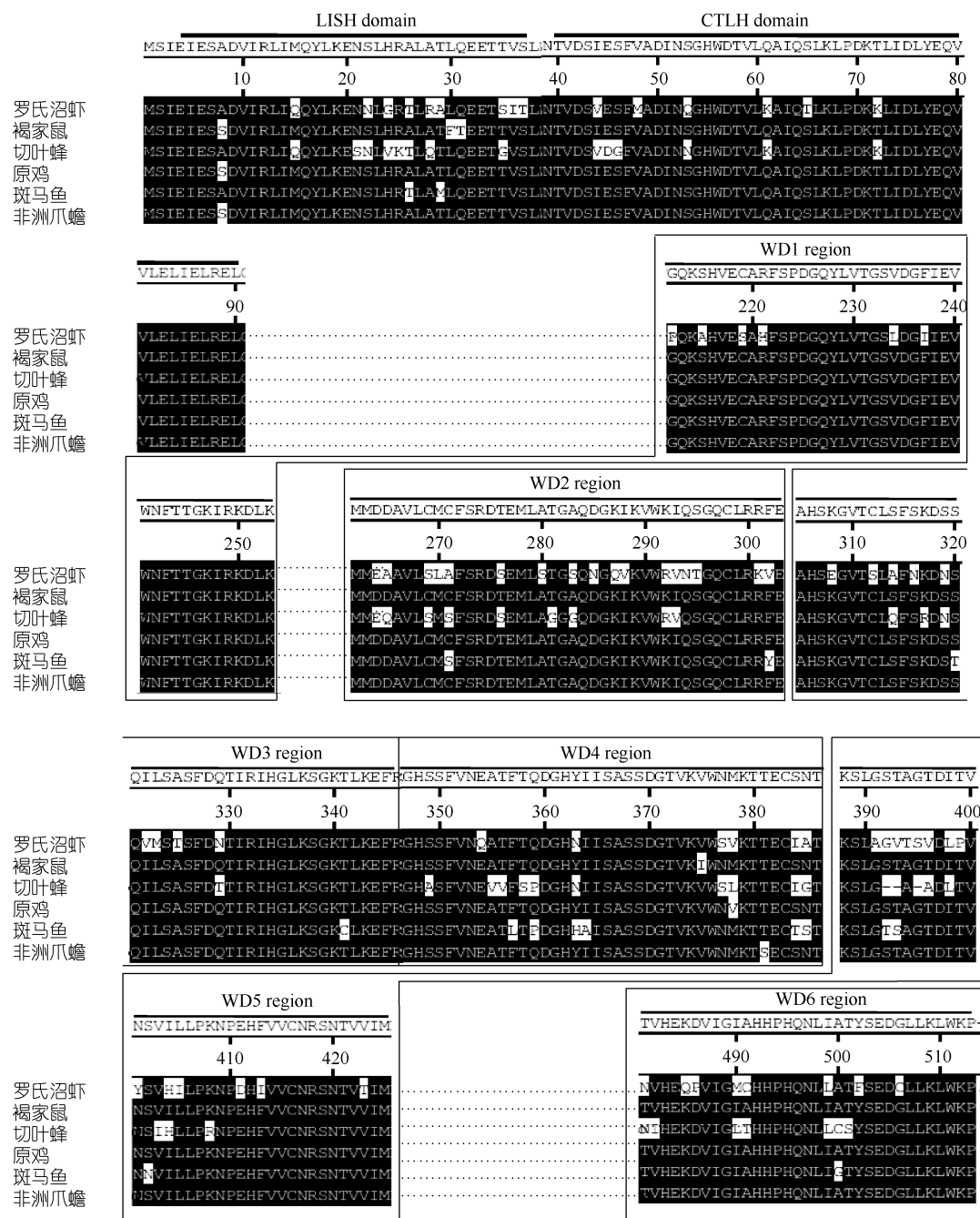


图2 不同物种的 SMU1 同源蛋白序列对比

Fig.2 Amino acids sequence alignment of SMU1 among different species

阴影区显示同源性的氨基酸。上横线表示 SMU1 氨基酸序列中的 LisH 结构域、CTLH 结构域; 方框表示 WD40-repeat 保守结构域, 一共有 6 个 WD 基元。Xenopus (*Silurana*) *tropicalis*: 非洲爪蟾(NP_989188.1); *Gallus gallus*: 原鸡(NP_001007980.1); *Danio rerio*: 斑马鱼(NP_956493.1); *Rattus norvegicus*: 褐家鼠(NP_476543.1); *Megachile rotundata*: 切叶蜂(XP_003701375.1)

513bp)。其中 WD40-repeat 结构域有 6 个重复的 WD 基元, 分别是 WD1(302—253bp)、WD2(262—330bp)、WD3(332—346bp)、WD4(347—386bp)、WD5(388—426bp)和 WD6(482—513bp)。每个基元都含有类似 GH-WD 的二肽序列, 并且氨基酸数目都在 40 个左右。

通过 Clustal W 比对了罗氏沼虾和其它物种 *smu-1* 基因的氨基酸序列, 结果表明其同源性高达 75%—80% (图 2)。这些物种的氨基酸序列也均具有类似 LISH、CTLH 以及 WD40-repeat 三个保守的结构域。

2.2 *smu-1* 基因系统进化树分析

通过 MEGA 5.2 软件采用 N-J 法构建了褐家鼠、熊蜂、原鸡、斑马鱼、牡蛎等物种的系统进化树。如图 3 所示, 罗氏沼虾 *smu-1* 基因单独在一个分支上, 与同为节肢动物门中的熊蜂和果蝇的亲缘关系比较接近, 而与其它物种的亲缘关系较远。由此表明, 该基因在物种的进化上比较保守。

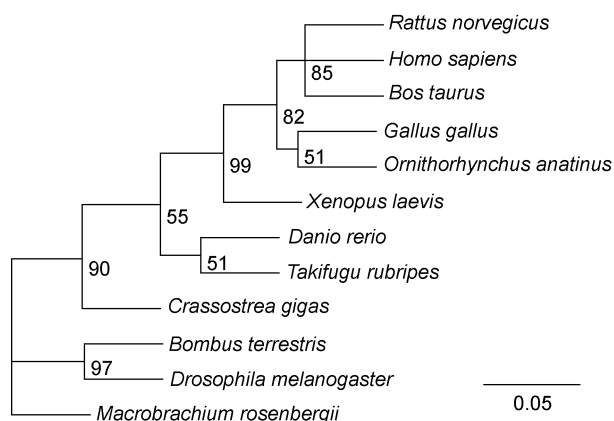


图 3 基于 *smu-1* 氨基酸序列绘制的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *smu-1* based on the homologous of the amino acid

Homo sapiens: 人类(AAI10655.1); *Rattus norvegicus*: 褐家鼠(NP_476543.1); *Bos taurus*: 牛(NP_001033662.1); *Gallus gallus*: 原鸡(NP_001007980.1); *Omithorhynchus anatinus*: 鸭嘴兽(XP_001515411.1); *Xenopus laevis*: 非洲爪蟾(NP_001084865.1); *Danio rerio*: 斑马鱼(NP_956493.1); *Takifugu rubripes*: 红鳍东方鲀(XP_003978154.1); *Crasostrea gigas*: 牡蛎(EKC37289.1); *Bombus terrestris*: 大黄蜂(XP_003401399.1); *Drosophila melanogaster*: 果蝇(NP_650766.1); *Macrobrachium rosenbergii*: 罗氏沼虾(KC832832)

2.3 *smu-1* 基因在温度、盐和重金属诱导下的表达特征分析

通过实时荧光定量 RT-PCR 对 *smu-1* 基因在冷休克(15℃)、热休克(35℃)、盐(4.29g/L, 8.58g/L)和重金属(0.2526mg/L, 0.525mg/L)诱导下, 敏感组织中的表达特征分析。结果表明(图 5), 相比正常组, 在冷热诱导下 *smu-1* 在中枢神经中的表达水平分别上调了 1.49 倍($P<0.05$)和 3.60 倍($P<0.05$); 在肌肉中分别上调了 1.66($P<0.05$)倍和 3.56 倍($P<0.05$)。与此相同的是, 重金属胁迫下 *smu-1* 在肝胰腺中的表达水平也出现了上调的趋势(图 7)。低浓度和高浓度 Cu^{2+} 诱导后分别上调了 2.02 倍($P<0.05$)和 2.44 倍($P<0.05$)。但是, 在盐胁迫下, 该基因在虾腮中的表达水平却出现了下调。低浓度和高浓度 Na^+ 诱导后分别下调了 3.35 倍

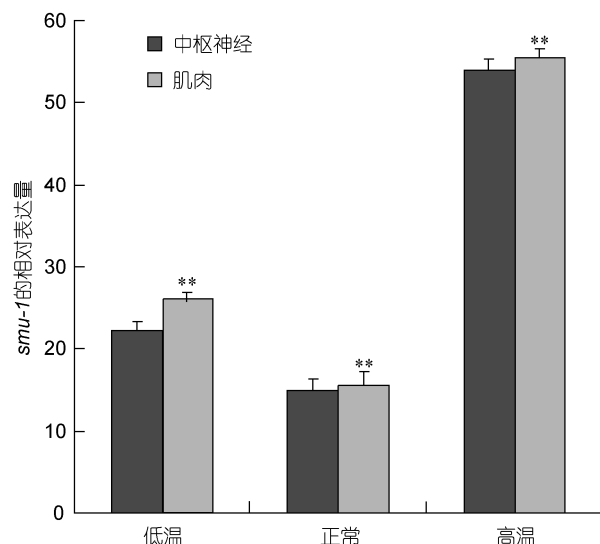


图 4 *smu-1* 在不同温度诱导下两种组织中的定量表达

Fig.4 Expression of *smu-1* mRNA detected by RT-PCR in different Temperature and two kinds of organizations (**表示 $P<0.01$, 存在极显著差异)

($P<0.05$)和 1.81 倍($P<0.05$)。结果表明, *smu-1* 与环境因子(尤其是高温胁迫)存在着一定的相关性。

2.4 热诱导下 *smu-1* 基因的功能研究

成熟的罗氏沼虾经心脏注射 *smu-1* 的双链 RNA 后, 提取中枢神经采用荧光定量 RT-PCR 检测干扰效率。结果显示: 双链 RNA 注射组中 *smu-1* 的 mRNA 水平明显下降, 其干扰效率可达到 75%—80%左右(图 8 所示)。证明本实验成功干扰了该基因的表达。

RNA 干扰后热诱导 2h, 对罗氏沼虾存活率进行统计。结果发现(图 9), 注射双链 RNA 后, 对比正常组(84%)和对照组(86%)的罗氏沼虾的存活率, 干扰组(52%)的存活率大大下降($P<0.05$)。

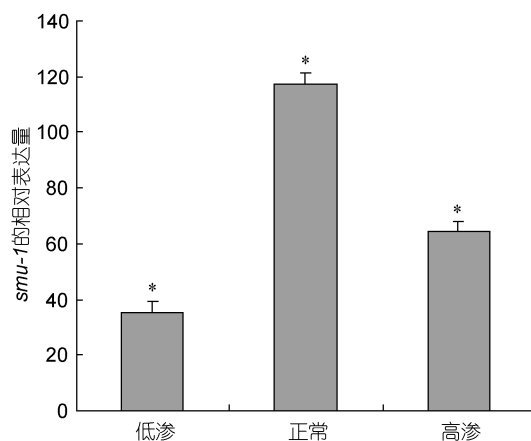


图 5 *smu-1* 在不同 Na^+ 浓度诱导下腮组织中的定量表达

Fig.5 Expression of *smu-1* mRNA in shrimp gill organizations detected by RT-PCR in different sodium chloride (*表示 $P<0.05$, 存在显著差异)

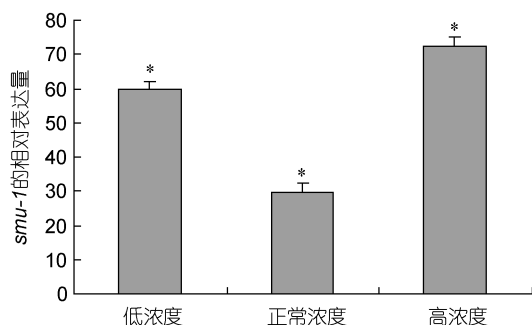


图6 *smu-1* 在不同 Cu^{2+} 浓度诱导下肝胰腺组织中的定量表达

Fig.6 Expression of *smu-1* mRNA in hepatopancreas organizations detected by RT-PCR in different cuprous ion concentration (*表示 $P < 0.05$, 存在显著差异)

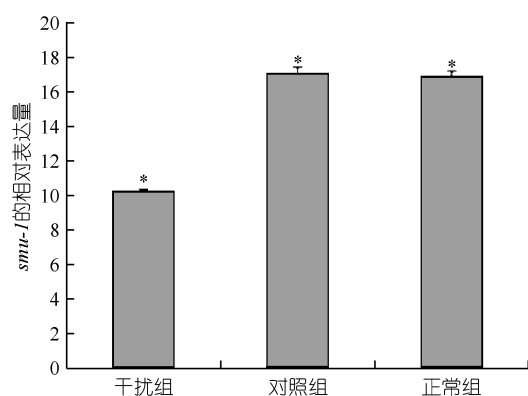


图7 *smu-1* 在 RNA 干扰后中枢神经中的定量表达

Fig.7 Expression of *smu-1* mRNA in central nerve detected by RT-PCR after RNA interference (*表示 $P < 0.05$, 存在显著差异)

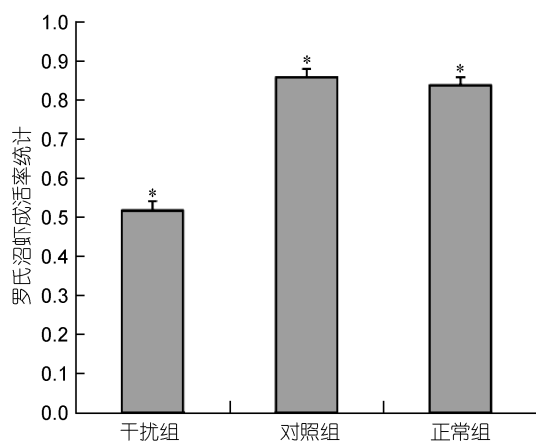


图8 RNA 干扰后 35°C 高温诱导下罗氏沼虾存活率差异

Fig.8 The survival rate of *M. rosenbergii* by RNA interference induced by 35°C heat shock (*表示 $P < 0.05$, 存在显著差异)

3 讨论

本研究成功构建了热诱导下的中枢神经均一化消减文库, 通过对序列大量的比对和筛选, 发现了一种在热应激下高表达的基因 *smu-1* (KC832832)。该基因的氨基酸序列与 GenBank 中其它物种的 *smu-1* 氨基酸序列比对呈现出较高的同源性, 同源率高达 70%—80%, 表明本实验成功获得了罗氏沼虾的 *smu-1* 的全长 cDNA 序列。

通过对 SMU1 蛋白结构域的预测发现, 该蛋白含有三个结构域, 分别是 LISH、CTLH 和 WD40-repeat 结构域, 属于 WD40 重复蛋白家族。其中 WD40-repeat 结构域的羧基端含有 6 个重复的 WD 基元, 这与在原鸡 (Caldwell *et al*, 2004)、非洲爪蟾 (Klein *et al*, 2002) 和褐家鼠 (Di Benedetto *et al*, 2001) 等物种中的 SMU1 蛋白结构类似, 并且每个 WD 基元都具有类似 GH-WD 的二肽结构。研究发现, 在非洲爪蟾中存在一种 Twa1 蛋白 (蔡雨奇, 2010)¹⁾, 这种蛋白具有 LisH 结构域 (Lis1 同源结构域) 和 CTLH 结构域 (LisH 羧基端结构域) 两大结构域, 其在胞核内外以及中心体上定位, 并与胞内的 Lis1/Dynein 相互作用, 起着调控细胞微管蛋白的迁移 (Yang *et al*, 2010)。然而在罗氏沼虾的 SMU1 蛋白中, 这两个结构域的确切功能现在还不是很清楚。

目前在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现, SMU1 的功能主要是通过编码一种反式作用因子, 对 pre-mRNA 进行选择剪接, 并确保 RNA 剪接位点的准确性, 从而形成多样化的功能蛋白参与生物体内复杂的调控机制 (Spike *et al*, 2001; Zahler, 2005; Sugaya *et al*, 2006; Dassah *et al*, 2009)。已报道的与环境胁迫相关的蛋白, 主要集中在 HSPs (Zhang *et al*, 2009)、铁蛋白以及硫蛋白等蛋白中。这些蛋白在各种环境因子的诱导下短暂地大量积累。在植物中, 高温诱导后的土豆周皮里也发现了一种与细胞增殖和分化相关的 WD-40 repeat 蛋白, MS12 (Ginzberg *et al*, 2009)。本研究通过荧光定量 RT-PCR 检测到罗氏沼虾的 *smu-1* 基因在热和重金属诱导下的表达水平出现明显上调。因此可以推测, 在罗氏沼虾中 *smu-1* 基因的高表达可能参与了环境胁迫, 尤其是高温应激的相关蛋白的选择性加工, 从而担负着生物抗环境应激的调控功能。

1) 蔡雨奇, 2010. Lis1/Dynein 通路上中心体相关蛋白 NudCL 和 Twa1 的功能研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 1—93

高温是影响养殖虾类的生长和繁殖的最重要的因素之一。本研究发现罗氏沼虾的 *smu-1* 基因在冷热休克和重金属诱导下的表达水平出现明显上调, 采用 RNA 干扰技术将 *smu-1* 基因干扰掉以后, 高温诱导下的罗氏沼虾呈现出较高的死亡率, 这表明 *smu-1* 基因的表达与高温应激之间存在着必然的联系, 这一结果为改良、提高以及筛选养殖虾耐热性的优良品种提供了重要的理论依据。

参 考 文 献

- 马学军, 舒跃龙, 颜子颖等, 2005. 精编分子生物学实验指南 (第四版)(译). 生物工程学报, 21(3): 488—488
- 刘 月, 杨红玉, 张学琴, 2011. 拟南芥 WDR 蛋白家族结构与功能的多样性. 江苏农业学报, 27(2): 437—442
- 陈章权, 彭世清, 陈守才, 2002. 植物 COP1 蛋白的结构与功能. 植物学通报, 19(5): 620—628
- 林小涛, 梁旭方, 吴 杰等, 1999. 温度对罗氏沼虾亲虾代谢的影响. 生态学杂志, 18(3): 15—18
- 段红英, 丁笑生, 孙富丛, 2007. WD2 重复蛋白. 中国生物化学与分子生物学报, 2: 101—105
- 徐桂荣, 1997. 盐度对罗氏沼虾幼虾生长的影响. 上海水产大学学报, 6(2): 124—127
- 廖 智, 刘 梅, 王日昕等, 2010. 厚壳贻贝抗菌肽 Mytilin 和 Myticin 的 cDNA 基因的克隆与序列分析. 水产学报, 34(7): 1025—1033
- Ananieva E A, Gillaspay G E, Ely A *et al*, 2008. Interaction of the WD40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. Plant Physiology, 148(4): 1868—1882
- Caldwell R B, Kierzek A M, Arakawa H *et al*, 2004. Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. Genome Biology, 6(1): R6
- Chinnusamy V, Zhu J-K, 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology, 12(2): 133—139
- Dai Z-M, Zhu X-J, Yang W-J, 2009. Full-length normalization subtractive hybridization: a novel method for generating differentially expressed cDNAs. Molecular Biotechnology, 43(3): 257—263
- Dassah M, Patzek S, Hunt V M *et al*, 2009. A genetic screen for suppressors of a mutated 5' splice site identifies factors associated with later steps of spliceosome assembly. Genetics, 182(3): 725—734
- Di Benedetto A J, Klick Stoddard J, Glavan B J, 2001. Cloning and molecular characterization of a novel gene encoding a WD-repeat protein expressed in restricted areas of adult rat brain. Gene, 271(1): 21—31
- Ginzberg I, Barel G, Ophir R *et al*, 2009. Transcriptomic profiling of heat-stress response in potato periderm. Journal of Experimental Botany, 60(15): 4411—4421
- Klein S L, Strausberg R L, Wagner L *et al*, 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. Developmental Dynamics, 225(4): 384—391
- Lee S, Lee J, Paek K-H *et al*, 2010. A novel WD40 protein, BnSWD1, is involved in salt stress in *Brassica napus*. Plant Biotechnology Reports, 4(2): 165—172
- Leung C K, Empinado H, Choe K P, 2012. Depletion of a nuclear protein activates xenobiotic detoxification genes in *Caenorhabditis elegans* via Nrf/SKN-1 and p53/CEP-1. Free Radical Biology and Medicine, 52(5): 937—950
- Liu J, Yang W-J, Zhu X-J *et al*, 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Cell Stress & Chaperones, 9(3): 313
- Pang Y, Wenger J P, Saathoff K *et al*, 2009. A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development. Plant Physiology, 151(3): 1114—1129
- Peng R-H, Xiong A-S, Xue Y *et al*, 2008. Kamchatka crab duplex-specific nuclease-mediated transcriptome subtraction method for identifying long cDNAs of differentially expressed genes. Analytical Biochemistry, 372(2): 148—155
- Ritterhoff S, Farah C M, Grabitzki J *et al*, 2010. The WD40-repeat protein Han11 functions as a scaffold protein to control HIPK2 and MEKK1 kinase functions. The EMBO Journal, 29(22): 3750—3761
- Sheng D, Qu D, Kwok K H H *et al*, 2010. Deletion of the WD40 domain of LRRK2 in Zebrafish causes Parkinsonism-like loss of neurons and locomotive defect. PLoS Genetics, 6(4): e1000914
- Spike C A, Shaw J E, Herman R K, 2001. Analysis of *smu-1*, a gene that regulates the alternative splicing of *unc-52* pre-mRNA in *Caenorhabditis elegans*. Molecular and Cellular Biology, 21(15): 4985—4995
- Sugaya K, Hongo E, Ishihara Y *et al*, 2006. The conserved role of Smu1 in splicing is characterized in its mammalian temperature-sensitive mutant. Journal of Cell Science, 119(23): 4944—4951
- Takaoka A, Wang Z, Choi M K *et al*, 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. Nature, 448(7152): 501—505
- Yang Y, Yan X, Cai Y *et al*, 2010. NudC-like protein 2 regulates the LIS1/dynein pathway by stabilizing LIS1 with Hsp90. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(8): 3499—3504
- Zahler A M, 2005. Alternative splicing in *C. elegans*. WormBook, 1551—8507
- Zhang X-Y, Zhang M-Z, Zheng C-J *et al*, 2009. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different

environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(4): 465—473

Zhu Y, Wang Y, Xia C *et al*, 2004. WDR26: A novel G β -like protein, suppresses MAPK signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(3): 579—587

SCREENING, EXPRESSION AND FUNCTION OF *smu-1* GENES FROM *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

QIAN Mei-Rui¹, ZHENG Chun-Jing², LIU Jun¹, WANG Qing-Qiang¹

(1. China Jiliang University College of Life Sciences, Hangzhou, 310018; 2. Ningbo Ocean & Fishery Institute, Ningbo, 315012)

Abstract Using subtractive hybridization library of central nervous system from *Macrobrachium rosenbergii*, *smu-1* gene was screened. The amino acids sequences of *smu-1* had high homology with other species, and the protein contained six WD regions at C-terminus of WD40-repeat motif, belonging to WD40-repeat protein family. Using the real-time PCR technology, we found that the expression of *smu-1* gene up-regulated significantly under heat or cold shock and mental stress ($P<0.05$, $P<0.01$) compared with that of control group. At high and low osmosis conditions, the *smu-1* expression showed down-regulated tendency ($P<0.05$). In addition, *smu-1* gene was interference by injecting *smu-1* double-stranded RNA *in vivo*. The results show that the survival rate of *M. rosenbergii* decreased obviously under heat shock. This study may provide a theoretical basis for screening the heat-resistant *M. rosenbergii*, and reduce economic losses in shrimp farming.

Key words *Macrobrachium rosenbergii*; *smu-1* gene; WD-40 repeat protein family; heat shock