

斑节对虾 *TSG101* 基因的克隆及表达分析

王芳^{1,2}, 范嗣刚², 赵超², 王鹏飞², 闫路路², 邱丽华^{2,3}, 闫喜武¹

(1. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 大连 116023; 2. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300; 3. 农业农村部水生动物基因组学重点实验室 北京 100141)

摘要: 为探究肿瘤易感基因 101(简称 *TSG101*)对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的免疫应答作用, 了解在细菌刺激下斑节对虾的机体发生的变化机制, 本研究以哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为实验组, 以磷酸缓冲液(PBS)为对照组, 通过荧光定量分析展开对斑节对虾对菌刺激的免疫应答作用。结果显示, 斑节对虾的 *TSG101* 在各组织中均有表达, 在肝胰腺中的表达量最高。在金黄色葡萄球菌刺激下, 斑节对虾的 *TSG101* 在肝胰腺中的表达量与对照组相比呈极显著上调($P<0.01$), 第 12 小时的 *TSG101* mRNA 的表达量达到最大(为对照组的 21.60 倍); 在鳃中的表达量与对照组相比呈极显著上调($P<0.01$), 第 6 小时斑节对虾 *TSG101* 的表达量达到最大值(为对照组的 3.64 倍)。在注射哈维弧菌第 9 小时, 肝胰腺中的 *PmTSG101* mRNA 表达量极显著上调($P<0.01$)且达到最大(为对照组的 2.50 倍)。实验结果初步表明, 斑节 *TSG101* 参与斑节对虾的先天免疫反应, 在金黄色葡萄球菌和哈维弧菌的刺激的情况下, 该基因 RNA 水平的表达情况发生明显变化。

关键词: 斑节对虾(*Penaeus monodon*); 肿瘤易感基因 101; 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*); 哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)

中图分类号: S917 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2019)07-0122-10

DOI: 10.11759/hyxx20190321001

肿瘤易感基因 101(Tumor susceptibility gene 101, *TSG101*)是一种肿瘤抑制基因, 首次在小鼠(*Mus musculus*)成纤维细胞中发现。*TSG101* 存在于细胞质和细胞核中。随着细胞周期的改变, *TSG101* 的相对含量和位置也相应地发生变化^[1]。*TSG101* 是细胞内体分选转运复合物(endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT)主要组成部分^[2], 含有一些能与其他分子相互作用的独特结构域。这些结构域为非活性泛素结构域(Ubiquitin E2 variant, UEV)、脯氨酸富集区(proline-rich region, PRR)、稳定框(steadiness box, SB)和卷曲结构域(coiled coil, CC)^[3]。UEV 能与被泛素标记的底物^[4]和病毒蛋白或是 ESCRT-0 中的肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, Hrs)^[5]相互结合。在细胞周期时, PRR 与中心体蛋白 55 相互作用, 运输 *TSG101* 到中间体^[6]。

TSG101 参与了脊椎动物生长和增殖^[7]等生物过程, 如肿瘤发生^[8, 9], 细胞生长和增殖^[10], 基因的表达和调控^[11]。抑制 *TSG101* 可激活表皮生长因子受体蛋白和 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号传导^[12, 13]。*TSG101* 可能与受体酪氨酸激酶信号传导的负调节有

关^[14, 15]。*TSG101* 的失活, 抑制了 EGF 受体向溶酶体的转运, 导致下游信号级联的诱导延长。*TSG101* 还与某些上皮肿瘤细胞中的肿瘤增强基因具有相反的作用^[16, 17]。如 Bieniasz^[18]等利用 Gag 蛋白中的两种晚期结构域 PTAP 和 YPLTSL 分别和 *TSG101* 和 ALG-2 互作蛋白 X(ALG-2 interacting protein X, Alix)相互作用进而启动 ESCRT 的相关分子帮助 HIV-1 完成组装和出芽过程。*TSG101* 还参与 DNA 病毒的虎纹蛙病毒(Tiger frog virus, TFV)和其他 RNA 病毒的甲型流感病毒(Influenza A virus, IAV)、马尔堡病毒(Marburg virus, MARV)、禽类肉瘤病毒(Avian sarcoma virus, ASV)等病毒的出芽过程。在甲壳动物中, 日本

收稿日期: 2019-03-21; 修回日期: 2019-05-07

基金项目: 国家自然科学基金应急管理项目(31741121); 院级基本科研业务费重点研究项目(2018HY-ZD0204); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2018163)

[Foundation: Natural Foundation Emergency Management Project of China, No.31741121; Key Research Project of Basic Scientific Research, No. 2018HY-ZD0204; Key Researched and Developed Plan of Hainan Province, No. ZDYF2018163]

作者简介: 王芳(1994-), 女, 硕士研究生, 贵州锦屏人, 主要从事海洋生物功能基因研究, 电话: 19909853031, E-mail: wangfang2017@163.com; 闫喜武, 通信作者, 教授, E-mail: yanxiwu2002@163.com

囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中的 *TSG101* 通过影响宿主细胞早期和晚期内体途径参与对虾白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)在宿主细胞内转运的过程,在 WSSV 感染晚期,日本囊对虾 *TSG101* 从细胞膜聚集状态转到细胞质附近,推测在 WSSV 感染宿主过程中日本囊对虾的 *TSG101* 能够协同 ESCRT 中某些能与其发生相互组分来完成自身病毒的转运与释放^[19]。*TSG101* 在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)中与 Hrs 相互作用形成 ESCRT, 并识别凝集溶酶体中多囊泡体(Multivesicular bodies, MVBs)途径降解的转运分子^[20], 表明克氏原螯虾中的 *TSG101* 是通过 Toll 途径参与克氏原螯虾的先天免疫^[2]。

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是中国重要的水产养殖物种。近年来,斑节对虾深受病害的侵袭,造成了严重的经济损失。研究斑节对虾先天免疫的分子机制对其病害防治有着重要的理论指导作用。哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)为革兰氏阴性菌,是海洋环境中广泛存在且能引起水生生物爆发大规模疾病的潜在弧菌之一^[21]。养殖对虾中哈维弧菌是最早引起养殖对虾爆发发光病的主要病原菌,不仅可以引发幼苗爆发疾病^[22],还能导致成虾死亡^[19];金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)属于葡萄球菌属(*Staphylococcus*),是一种革兰氏阳性菌,同样是海洋动物爆发疾病的重要病原之一。这两种细菌常用于对虾的先天免疫分子机制研究中^[20]。在斑节对虾中, *TSG101* 抵御外界病菌刺激下的免疫应激机制却没有相关的报道,其分子作用机制尚不明确。为探索 *TSG101* 在不同的免疫刺激下的不同的表达模式,本研究克隆了斑节对虾 *TSG101* 基因的全长 cDNA,用实时荧光定量 RT-PCR 研究了 *TSG101* mRNA 组织表达及其在细菌刺激下的表达情况,以期能解析斑节对虾细菌刺激下的免疫机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

从广州市黄沙水产市场购买 5 只斑节对虾(体质量 200 g±2 g)。在实验室暂养 3 d 后,剪取每只虾的鳃、胃、性腺、肝胰腺、脑、淋巴、肠、心等组织,液氮冷冻后保存,用于斑节对虾 *TSG101* 序列克隆和组织表达分析。

在南海水产研究所珠海基地做斑节对虾的菌液注射实验。从基地池塘捕捞 400 只斑节对虾(体质量

30 g±2 g),随后转移到水桶中暂养 3 d(海水盐度为 5,水温为 25±1℃)。每天更换 2/3 的水,及时清除池内的残留物,并投喂商业饲料(广东双湖饲料有限公司)。

1.2 细菌刺激实验

实验共有 9 组,分为实验组 1、2、3、4、5、6 和对照组 1、2、3,每组各有 30 只虾。实验组注射的哈维弧菌和金黄色葡萄球菌浓度都是 1×10^7 个/mL,实验组 1、2、3 里的每尾虾注射 50 μL 哈维弧菌悬液,实验组 4、5、6 里每尾虾注射 50 μL 金黄色葡萄球菌悬液,另对对照组 1、2、3 里的每尾虾注射同体积的磷酸缓冲液(PBS)。注射后的 0、6、9、12、24、48、72 h 每个时间点各取 5 尾虾的鳃和肝胰腺,液氮冷冻后移至-80℃冰箱中保存。另取 0 h 的样品作为空白对照组。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)提取上述样品的 RNA,按照说明书的试验步骤进行。RNA 溶于 DEPC 处理过的 ddH₂O 中。用 2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,用 NanoDrop 2000(美国)分光光度计对 RNA 浓度进行测定。以总 RNA(1 μg)为模板。脑等组织样品的 RNA 在反转录酶的 M-MLV 的作用下合成 cDNA 的第一条链, Oligo-dT 为反转录引物。1.2 中,鳃和肝胰腺的 RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit(Takara, 日本)进行逆转录,获得 cDNA,浓度稀释至 50 ng/μL 备用。

1.4 斑节对虾 *TSG101* 基因克隆和测序

从笔者实验室的斑节对虾转录组数据中(未发表)获得 *PmTSG101* 基因 cDNA 序列。针对 3'RACE 设计引物 TSG101-3race-F1 和 TSG101-3race-F2(表 1)的基因特异性,使用 SMART™RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, 美国)获得 *TSG101* cDNA 序列的 3'UTR。在 3'末端,用基因特异性引物 TSG101-3race-F1 和通用引物 UPM(UPX-long 和 UPX-short 的混合物,表 1)进行 RACE PCR 的降落 PCR 反应。PCR 程序如下进行: 94℃ 初始变性 3 min; 然后在进行 30 个循环的 94℃ 30 s, 60℃ 30 s 和 72℃ 3 min; 最后一个循环是在 72℃ 下延伸 10 min。随后以上一轮的 PCR 产物为模板进行半巢式 PCR, TSG101-3race-F2 和通用引物 NUP 扩增,程序为: 94℃ 3 min; 35 个循环的条件为 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 3 min; 72℃ 10 min。PCR 反应结束后将 PCR 反应产物连接到

pMD18-T 载体中、转化入大肠杆菌 DH5a 的感受态细胞, 含有 3'RACE 产物的重组质粒送广州擎科生物公司(广州, 中国)测序。

1.5 序列和系统发育分析

利用 ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找 TSG101 序列的开放阅读框; 使用 Computer pI/Mw(http://web.expasy.org/compute_pi)分析 TSG101 氨基酸序列的等电点和分子量; 用 SMART 4.0(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析蛋白结构; 使用 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org>)对蛋白三级结构进行预测; 核苷酸序列同源性和相似性用 MatGAT 2.01 进行分析; 序列多重比对可以利用 Clustal X 1.81 和 Bioedit 软件进行比对; 进化树用 MEGA 5.0 的邻接法(Neighbor-joining, NJ)进行构建。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Sequence of primers used in this study

引物名称	序列(5'-3')	用途
TSG101-F	ATGTCTCCTCAAACCATGAACAAGTCG	TSG101 cDNA 验证
TSG101-R	TCAGCCAGCCATGTTCCCCTTT	TSG101 cDNA 验证
TSG101-3race-F1	CGGCTGTAAGTGACCGTGTTTCG	3'RACE 扩增
TSG101-3race-F2	GCCACTCAGGATGCCATTTATT	3'RACE 扩增
TSG101-Qpcr-F	CCACTACATCCAGCGTCCCTA	实时荧光定量 PCR
TSG101-Qpcr-R	CTGCCGCAACACTGATACCTC	实时荧光定量 PCR
EF-1 α -F	AAGCCAGGTATGGTTGTCAACTTT	实时荧光定量 PCR
EF-1 α -R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	实时荧光定量 PCR

2 结果

2.1 *PmTSG101* 基因的生物信息学分析

本研究用 SMART RACE 技术克隆出了斑节对虾 *TSG101* 基因的 cDNA 全长 1 642 bp(GenBank 号为 MK069599)(图 1), 包括 57 bp 的 5'非编码区(UTR)、1 323 bp 的开放阅读框(ORF)和 262bp 的 3'非编码区(UTR), 编码 440 个氨基酸, 理论分子量约为 48.4 kda, 理论等电点为 8.85。斑节对虾 TSG101 蛋白分析显示, 斑节对虾 TSG101 蛋白主要含有 UEV 结构域、CC 结构域和 SB 结构域 3 个保守的功能结构域(图 1)。氨基酸序列比对, 结果显示斑节对虾 TSG101 序列与克氏原螯虾(AGZ84436.1)、麦茎蜂(*Cephus cinctus*, XP_015602525.1)、美洲蜚(*Limulus polyphemus*, XP_013789333.1)、内华达古白蚁(*Zootermopsis nevade-*

1.6 实时荧光定量 PCR 表达分析

用 PrimeScript™ RT reagent Kit(Takara, 日本)将提取好的 RNA 逆转录成 cDNA, 每个组织的 cDNA 设置 3 个重复, 并将浓度稀释至 50 ng/ μ L 备用。用引物 TSG101-qpcr-F 和 TSG101-qpcr-R(表 1)进行荧光定量 PCR, 以 EF-1 α 为内参基因。用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒并根据其说明书进行实时荧光定量 PCR, 每个组织的 cDNA 和内参均设置 5 个平行。数据分析处理采用相对 CT 法, 在 mRNA 水平上分析目的基因相对于内参基因的表达变化。

1.7 统计学分析

实验数据使用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析, 结果以“平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示, 当 $P < 0.05$ 时则认定为差异显著, $P < 0.01$ 则是极其显著的, 作图使用 SigmaPlot 软件。

nsis, XP_021914726.1)、干木白蚁(*Cryptotermes secundus*, XP_023702457.1)、海岱果蝇(*Drosophila hydei*, XP_023164137.1)、威利斯托尼果蝇(*Drosophila willistoni*, XP_002062519.1)、温室拟肥腹蛛(*Parasteatoda tepidariorum*, XP_015920331.1)的 TSG101 序列同源性分别为 82%、48%、53%、52%、53%、50%、50%、52%(图 2)。蛋白三级结构分析其单体由 7 个 α 折叠和 6 个无规则卷曲连接组成(图 3)。进化树结果表明, 斑节对虾与克氏原螯虾聚为一枝, 然后再与邻近的布氏果蝇(*Drosophila busckii*)在一起, 之后与龟壳攀鲈(*Anabas testudineus*)、大刺鲃(*Mastacembelus armatus*)、美妊丽鱼(*Astatotilapia calliptera*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、花斑溪鱗(*Kryptolebias marmoratus*)等硬骨鱼类聚在一起, 与两栖类和哺乳动物的亲缘关系比较远(图 4)。

2.2 斑节对虾 *TSG101* 组织分布的差异表达
实时荧光定量 PCR 结果表明 *PmTSG101* 基因在

斑节对虾的 9 个组织中均有表达, 表达量最高的是肝胰腺, 其次在胃和肠, 表达量最低的是性腺(图 5)。

```

1  AAAAAAGTCTGATGTTTTAGATGTCTTTTTAACATTTTACAAAGCTAAGGCCAAAA[ATG] 60
1  M 1
61  TCTCCTCAAACCATGAACAAGTCGTGACACAGGCGGTTATGAACAGATATGTGAATGTG 120
2  S P Q N H E Q V V T Q A V M N R Y V N V 21
121 GAGAAGACTAAACGTGACGTTTAAACAGCACTCCAACATTACCGTGGGCTAGGACCAAAG 180
22  E K T K R D V L T A L Q H Y R G L G P K 41
181 TTAGATAAAATTTGTATTCCGCAGTGGCACTTACAGCTACTTACTGTGTCTTGAAGGCACG 240
42  L D K F V F R S G T S R Y L L C L E G T 61
241 ATACCTGTTACATATAAAGGTGCCACATAACAATCCCAATATGCATCTGGCTCCTGGAC 300
62  I P V T Y K G A T Y N I P I C I W L L D 81
301 AACCATCCTTTGCTTTCGCCGATGGTGTATGTCAAGCCCACCCCGACATGCTTATAAAA 360
82  N H P L S S P M V Y V K P T P D M L I K 101
361 GCTTACGTCATGTGGATCAGAATGGGAAAGTGTATCTGCCTTACTTACATGAATGGAAC 420
102  A S R H V D Q N G K V Y L P Y L H E W N 121
421 CCAAATTCCTCAGATTTACCGGGCCTCATCCAGATTATGATAATGACCTTCAGTGAGATG 480
122  P N S S D L P G L I Q I M I M T F S E M 141
481 CCACCTGTCTACTCAAAGCCAAAGACTGCTCAGCCTCCTGGTGCAACGCCATAACCCACTA 540
142  P P V Y S K P K T A Q P P G A T P Y P L 161
541 CCATATCCAACAACTCTCCTGGTTACATGCCTATGCCAGGAGGACCAAATATGCCATAC 600
162  P Y P T N S P G Y M P M P G G P N M P Y 181
601 AGCCCAGCTCAAACCTGGTGCCAATACTGTGTACCCACCCTACCCAACACAACCTGGAGGC 660
182  S P A Q T G A N T V Y P P Y P T Q P G G 201
661 TATCCTCCATCAACCACGCCATACCCAGTGTATCCTCCAGCAAGTACAGCGGGCTACCCT 720
202  Y P P S T T P Y P V Y P P A S T A G Y P 221
721 CCCCCTCAGCCCCCACTTCATATCCGCCACCTTATCTGCTGGGGGCATAACATATCCT 780
222  P S Q P P T S Y P P P Y S A G G I T Y P 241
781 CCATACCCGTCCACTACATCCAGCGTCCCTACAGGGCAGGCTACAGAGACTAGTGGGGTG 840
242  P Y P S T T S S V P T G Q A T E T S G V 261
841 ACTGGAACAAGCACAACAAGTAGCACTGGCACAATCACAGAGGAACACATACGCGCATCC 900
262  T G T S T T T S T G T I T E E H I R A S 281
901 CTTATCTCGGCTGTAAGTGACCGTGTTCGAGCTAAACTTCGAGACAGCTATGGGGGCTCT 960
282  L I S A V S D R V R A K L R D S Y G G S 301
961 CAGGCAGAGGTATCAGTGTTCGCGCAGCAACAGGCAGACCTCAATCAAGGAAAAATCAAG 1020
302  Q A E V S V L R Q Q Q A D L N Q G K I K 321
1021 CTTGAGGGCCTTATCAGTAAATTGGAGCAAGAGCAAAGTGAATTAGATAAGAACATCAGG 1080
322  L E G L I S K L E Q E Q T E L D K N I R 341
1081 GTTTTACGTGATAAAGAGGGAGAAATCAAGAATGTGCTGTCACGTTTGTGCTGCTACG 1140
342  V L R D K E G E I K N V L S R L S S A T 361
1141 GAACCACTGAATGTAGATGAAGCCGTCCTACTACCCTGCACCCTTATAAACAGTGTG 1200
362  E P L N V D E A V T T T A P L Y K Q L L 381
1201 AATGCTTATGCTGAAGACCAGGCCACTCAGGATGCCATTTATTACCTTGGCGAAGCTCTG 1260
382  N A Y A E D Q A T Q D A I Y Y L G E A L 401
1251 CGGCGAGACGTGATTGACCTTGATTGCTTCTTGAAGCATGTCCGCTCTCTCTCACGAAG 1320
402  R R D V I D L D C F L K H V R S L S R K 421
1321 CAGTACCAGTTGCGAGCGACAATGATTAAGTGTGCGACAAAGGGGAACATGGCTGGC[TGA] 1380
422  Q Y Q L R A T M I K C R A K G N M A G * 440
1381 GATGTTGAATATGCAAGGATGGCTTGATTATGTTGTTGTTATAAAGTTGGATTAT 1440
1441 CAATACTGGCATGAACATAGGCATGCTAAAAGTGAATCACTATTAGGGTACTGGATATGA 1500
1501 GTTGGTAGGGTGAATTCATACTTTTGAATATGTGATCAGTGTAAAGTTATCTTGTGAA 1560
1561 ATCAGAATGGGTTGTAATGTATCATTCTCAATAGTGCAATCAATCTTAAAGGGCATTG 1620
1621 CTGAAATATCCATGTTTACAT 1642
    
```

图 1 斑节对虾 *TSG101* cDNA 序列及其氨基酸序列

Fig. 1 Complete cDNA sequence and predicted amino acid sequence of *TSG101*

起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG)用方框内; 灰色阴影表示 UEV 结构域; 波浪线表示 CC 结构域, 直线部分表示 SB 结构域
The start codon (ATG) and the stop codon (TGA) are marked in boxes; The UEV domain is shown in shadow; The CC domain is wavy underlined; The SB domain is underlined

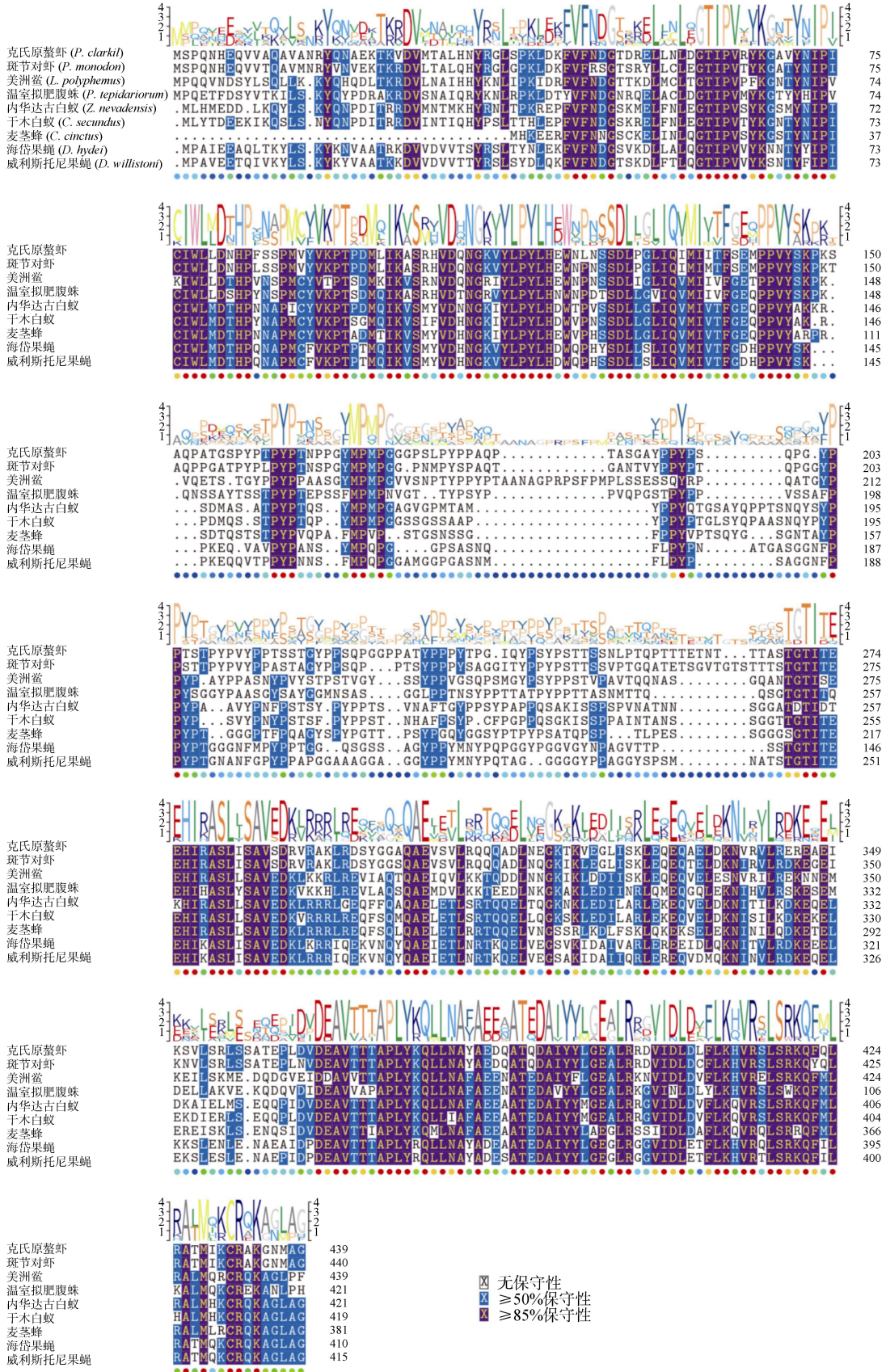


图2 斑节对虾 TSG101 氨基酸序列与其他物种 TSG101 氨基酸序列的比对结果

Fig. 2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of TSG101 from *P. monodon* and other species

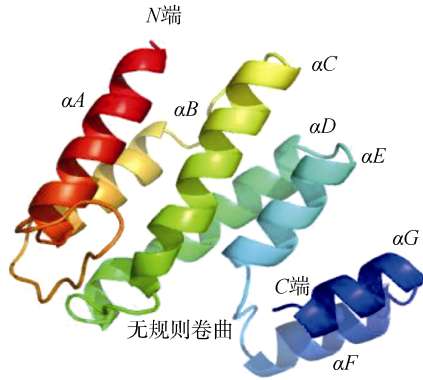


图3 斑节对虾 TSG101 蛋白三级结构预测

Fig. 3 Tertiary structure prediction of *P. monodon* TSG101

2.3 斑节对虾 TSG101 在金黄色葡萄球菌和哈维弧菌刺激下的表达变化

金黄色葡萄球菌和哈维弧菌刺激后, 另以 PBS 为对照组, 分别提取不同时间段(0、6、9、12、24、48、72 h)肝胰腺和鳃的 RNA, qPCR 检测斑节对虾 TSG101 在转录水平上的表达模式(图 6)。从结果分析可得, 在肝胰腺中, 斑节对虾 TSG101 在金黄色葡萄球菌刺激后的 6 h~48 h 表达水平都显著升高, 12 h 达到最高水平, 72 h 恢复正常; 在鳃中, 斑节对虾

TSG101 在细菌刺激后 6 h 和 48 h 表达水平都明显升高。另外, 在哈维弧菌的刺激对虾后, 肝胰腺中的斑节对虾 TSG101 仅在 9 h 表达水平明显上升; 而在鳃中, 斑节对虾 TSG101 的表达水平都为正常状态。

3 讨论

TSG101 是组成 ESCRT- I 的一个重要亚基, 参与膜蛋白分选和回收^[23], 细胞周期^[24]和自噬^[25]等过程。本研究首次在斑节对虾中克隆并鉴定了 TSG101 序列, 将其命名为斑节对虾 TSG101。TSG101 蛋白序列保守性较高, 不同物种的结构域组成大都相似, 由 UEV、脯氨酸富集区、CC 以及一个 SB 结构域组成, 根据蛋白结构预测分析斑节对虾 TSG101 蛋白主要存在着 UEV 结构域和 SB 结构域。TSG101 蛋白中的 UEV 结构域在克氏原螯虾和布氏果蝇等中都存在且保守性较强, 其中, UEV 结构域由扭曲的四股反平行的 β 折叠组成, 具有曲折的拓扑结构, 其中 4 个 α 螺旋聚集在 β 折叠的一个面上^[26]。UEV 结构域是泛素化结合酶 E2 的一个变体, 它不具有催化泛素转运的功能, 是因为在其功能位点上缺少一个半胱氨酸残基, 但是可与泛素分子结合^[26, 27]。

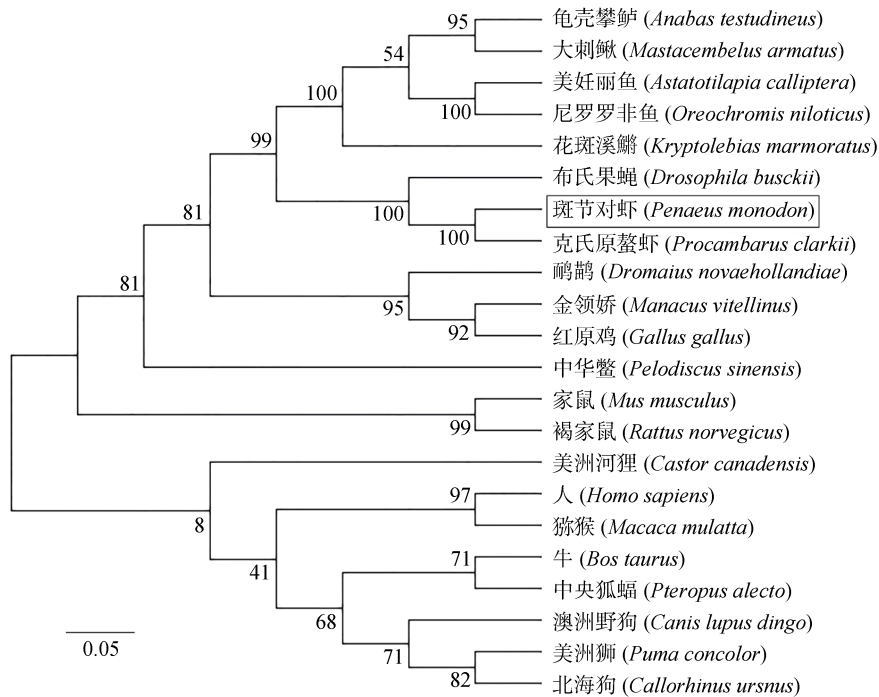


图4 基于斑节对虾 TSG101 氨基酸序列构建 NJ 系统进化树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree based on the amino acid sequence of TSG101

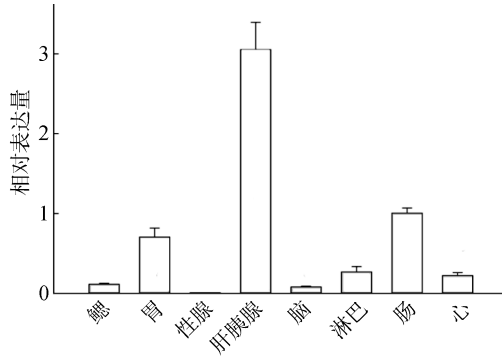


图 5 斑节对虾 *TSG101* 在各个组织中的相对表达
Fig. 5 Distribution of *TSG101* mRNA expression in different tissues

在无脊椎动物中, 先天免疫系统是抵御外界病原体的主要防御机制^[28]。本研究主要对斑节对虾 *TSG101* mRNA 在不同菌液刺激下的表达情况进行研究, 探讨斑节 *TSG101* 在斑节对虾中免疫应答的理论分子机制。斑节对虾 *TSG101* 在对虾中肝胰腺、肠、胃、淋巴、心、脑等均有表达, 但在肝胰腺中表达量最高, 表明 *TSG101* 参与了斑节对虾多个组织器官的转录调控作用; 克氏原螯虾^[7]的 *TSG101* 在肝胰腺中表达量最高; 日本囊对虾^[29]的 *TSG101* 在血细胞中表达量较高。研究表明, 肝胰腺和血细胞是对虾的非特异性免疫组织, 在机体受到应激反应时发挥重要的作用^[30, 31]。因此, 可以初步推断斑节对虾 *TSG101* 有着免疫功能作用。

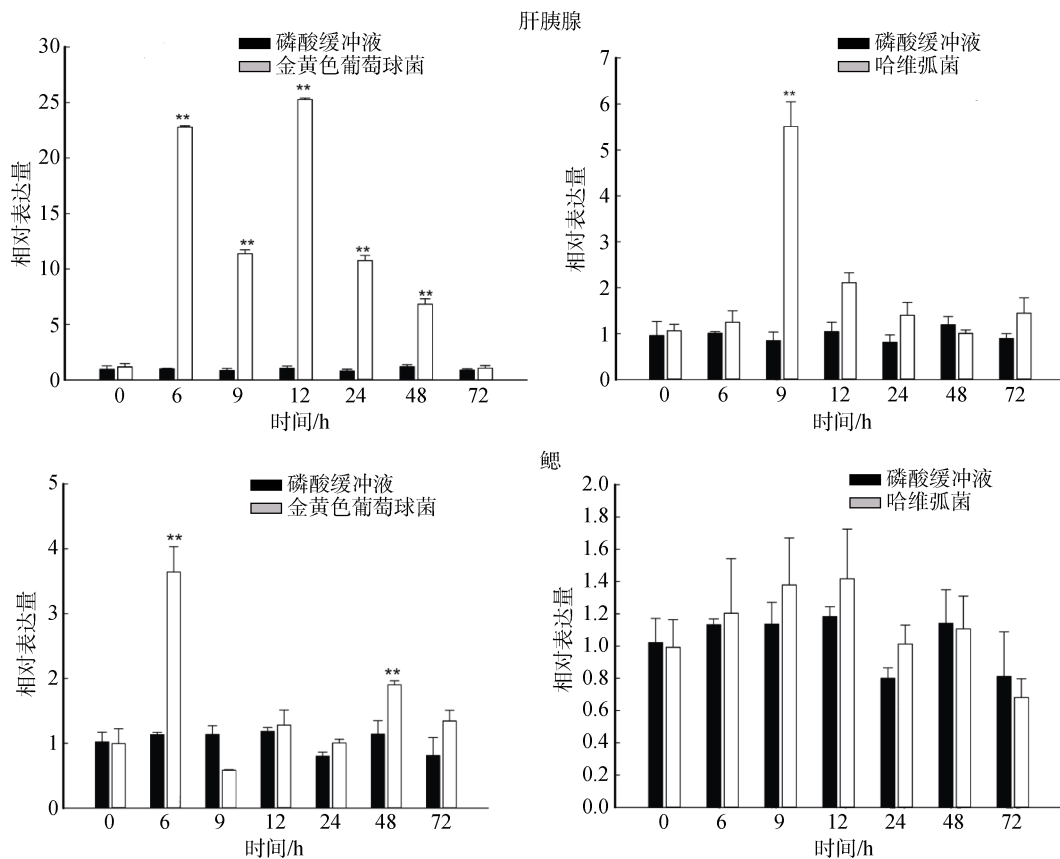


图 6 金黄色葡萄球菌和哈维弧菌刺激后斑节对虾 *TSG101* 在肝胰腺和鳃中的相对表达量
Fig. 6 Relative expression levels of *PmTSG101* in the hepatopancreas and gill after challenge with *S. aureus* and *V. harveyi*

“**”. 差异显著($P < 0.05$); “***”. 极显著差异($P < 0.01$)
“**”. significant difference at $P < 0.05$; “***”. highly significant difference at $P < 0.01$

病原体的侵袭会对机体造成显著影响^[32]。本研究将鳃和肝胰腺作为研究器官, 探讨在金黄色葡萄球菌和哈维弧菌刺激下斑节对虾 *TSG101* mRNA 表达的变化情况, 了解该基因在斑节对虾中的免疫应答分子机制。在哈维弧菌刺激对虾后, 斑节对虾 *TSG101* 仅在肝胰腺中显著升高($P > 0.01$)。在金黄色

葡萄球菌刺激后的 6、9、12、24、48 h, 斑节对虾 *TSG101* 在肝胰腺中的表达量显著升高($P < 0.01$), 在鳃中 6h 和 48h 表达量明显上升($P > 0.01$)。由此可知, 在菌液刺激下, 斑节对虾 *TSG101* 的表达量主要在肝胰腺有变化, 在鳃中的表达量和对照组大多无显著差异。另外, 在肝胰腺中, 金黄色葡萄球菌的刺激强

于哈维弧菌刺激, 斑节对虾 *TSG101* 表达量明显上升。金色葡萄球菌是革兰氏阳性菌。哈维弧菌是革兰氏阴性菌。阳性菌和阴性菌对生物体刺激后, 激活的分子免疫通路有差别。本研究结果说明 *TSG101* 基因参与了革兰氏阳性菌引发的免疫信号通路。在对虾属中, Toll 信号通路主要参与抗革兰氏阳性菌的免疫, IMD 信号通路主要参与革兰氏阴性菌的免疫。Sun^[7] 等发现, 将克氏原螯虾的 *TSG101* 进行 RNAi 后, Toll 信号通路中的一些基因(Crustin、ALF)表达量显著下降, 推测 *TSG101* 可能通过参与 Toll 信号通路参与了先天免疫过程。这说明斑节对虾 *TSG101* 可能也是通过 Toll 信号通路起作用, 不过这还需要进一步实验证明。

综上, 本研究克隆出了斑节对虾 *TSG101* 基因 cDNA 全长, 探讨了在哈维弧菌和金黄色葡萄球菌应激下斑节对虾 *TSG101* mRNA 表达模式。该研究发现在上述细菌刺激下, 斑节对虾 *TSG101* mRNA 表达量均出现不同程度的变化, 表明斑节对虾 *TSG101* 基因参与斑节对免疫应激反应, 为 *TSG101* 作为免疫功能基因提供了理论依据, 也为研究甲壳类动物的先天免疫应答奠定了基础。

参考文献:

- [1] Xie W, Li L, Cohen S N. Cell cycle-dependent subcellular localization of the *TSG101* protein and mitotic and nuclear abnormalities associated with *TSG101* deficiency[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(4): 1595-1600.
- [2] Lobert V H, Stenmark H. Cell polarity and migration: emerging role for the endosomal sorting machinery[J]. Physiology, 2011, 26(3): 171.
- [3] Li L, Liao J, Ruland J, et al. A *TSG101*/*MDM2* regulatory loop modulates *MDM2* degradation and *MDM2*/*p53* feedback control[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(4): 1619-1624.
- [4] Sundquist W I, Schubert H L, Kelly B N, et al. Ubiquitin recognition by the human *TSG101* protein[J]. Molecular Cell, 2004, 13(6): 783-789.
- [5] Bilodeau P S, Winistorfer S C, Kearney W R, et al. Vps27-Hsc70 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome[J]. Journal of Cell Biology, 2003, 163(2): 237-243.
- [6] Hyung Ho L, Natalie E, Rodolfo G, et al. Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55[J]. Science, 2008, 322(5901): 576-580.
- [7] Sun Y X, Tang L, Gao J, et al. A role of tumor susceptibility gene 101 (*TSG101*) in innate immune response of crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 76: 268-273.
- [8] Garrus J E, Schwedler U K, Von, Pornillos O W, et al. *TSG101* and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding[J]. Cell, 2001, 107(1): 55-65.
- [9] Jiang Y, Ou Y, Cheng X. Role of *TSG101* in cancer[J]. Frontiers in Bioscience, 2013, 18(1): 279-288.
- [10] Wagner K U, Krempler A, Qi Y, et al. *TSG101* is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(1): 150.
- [11] Sun Z, Pan J, Hope W Q X, et al. Tumor susceptibility gene 101 protein represses androgen receptor transactivation and interacts with p300[J]. Cancer, 2015, 86(4): 689-696.
- [12] Dobrowolski R, De Robertis E M. Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13(1): 53-60.
- [13] Matissek C, Teis D. The role of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) in tumorigenesis[J]. Molecular Membrane Biology, 2014, 31(4): 111-119.
- [14] Baldys A, Raymond J R. Critical role of ESCRT machinery in EGFR recycling[J]. Biochemistry, 2009, 48(40): 9321-9323.
- [15] Lu Q, Hope L W, Brasch M, et al. *TSG101* interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(13): 7626-7631.
- [16] Zhang Y, Song M, Cui Z S, et al. Down-regulation of *TSG101* by small interfering RNA inhibits the proliferation of breast cancer cells through the MAPK/ERK signal pathway[J]. Histology & Histopathology, 2011, 26(1): 87-94.
- [17] Zhu G, Gilchrist R, Borley N, et al. Reduction of *TSG101* protein has a negative impact on tumor cell growth[J]. International Journal of Cancer, 2004, 109(4): 541-547.
- [18] Bieniasz P D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release[J]. Virology, 2006, 344(1): 55-63.
- [19] 刘问, 钱冬, 杨国梁, 等. 南美白对虾虾苗淡化期间发光病原研究[J]. 集美大学学报(自然版), 2004, 9(4): 300-304.
- [20] Liu Wen, Qian Dong, Yang Guoliang, et al. A study on the pathogen of luminous bacterial disease of penaeus vannamei post-larvae during desalinization[J]. Journal of Jimei University Natural Science, 2004, 9(4): 300-304.
- [20] 许森. L 型凝集素和 Toll、IMD 信号通路关键因子在日本对虾先天免疫中的功能研究[D]. 济南: 山东大

- 学, 2014: 50.
- Xu Sen. Function of L type lectin and key components of Toll and IMD signaling pathways in innate immunity of *kuruma shrimp*[D]. Jinan: Shandong University, 2014: 50.
- [21] 王瑞旋, 耿玉静, 冯娟, 等. 杂色鲍哈维弧菌耐药质粒的鉴定和分析[J]. 南方水产科学, 2012, 8(2): 1-6.
Wang Ruixuan, Gen Yujing, Feng Juan, et al. Identification and analysis of resistant plasmid of pathogenic bacteria *Vibrio harveyi* isolated from *Haliotis diversicolor*[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(2): 1-6.
- [22] 陈月忠, 钟硕良, 周宸. 成虾发光病原体的分离鉴定及防治技术研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(s1): 218-223.
Chen Yuezhong, Zhong Shuoliang, Zhou Chen. Prevention and treatment of luminous disease of adult prawns[J]. Actaentiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000, 39(s1): 218-223.
- [23] Bishop N. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates[J]. The Journal of Cell Biology, 2002, 157(1): 91-102.
- [24] Hurley J H. ESCRTs are everywhere[J]. The EMBO Journal, 2015, 34(19): 2398-2407.
- [25] Gessica S, Daniele M, Alessandro A, et al. Role of chaperone-mediated autophagy dysfunctions in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2016, 9: 2623-27938
- [26] Pornillos O, Alam S L, Rich R L, et al. Structure and functional interactions of the *TSG101* UEV domain[J]. EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal, 2002, 21(10): 2397-2406.
- [27] Teo H, Veprintsev D B, Williams R L. Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(27): 28689-28696.
- [28] Zeng Xianglan, Ye Haihui, Yang Ya'nan, et al. Molecular cloning and functional analysis of the fatty acid-binding protein (*Sp-FABP*) gene in the *mud crab* (*Scylla paramamosain*)[J]. Genetics and Molecular Biology, 2013, 36(1): 140-147.
- [29] 高洁. 肿瘤易感基因 101 在白斑综合征病毒感染对虾过程中的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2018: 40.
Gao Jie. Tumor susceptibility gene 101 function in the process of WSSV infection of *Marsupenaeus japonicus*[D]. Jinan: Shandong University, 2018: 40.
- [30] Verri T, Mandal A, Zilli L, et al. D-glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology, 2001, 130(3): 585-606.
- [31] 史进选, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 GRP94 基因的克隆及其在不同应激条件下的表达与分析[J]. 南方水产科学, 2016, 12(5): 61-70.
Shi Jinxuan, Fu Mingjun, Zhao Chao, et al. Characterization and expression analysis of *GPP94* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) under different acute stresses[J]. South China Fisheries Science, 2016, 12(5): 61-70.
- [32] 朱鹏. 日本沼虾生长蜕皮期同类相残而受生物胁迫的 LC₅₀及鳃和肝胰腺的组织病理学研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2017: 15.
Zhu Peng. The research of LC₅₀ and histopathology of gill and hepato-pancreas tissue of *Macrobrachium nipponense* stressed by biogenic amines owing to cannibalism during ecdysis of growth[D]. Jinan: Shandong Agricultural University, 2017: 15.

Characterization and expression analysis of *TSG101* in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

WANG Fang^{1, 2}, FAN Si-gang², ZHAO Chao², WANG Peng-fei², YAN Lu-lu², QIU Li-hua^{2, 3}, YAN Xi-wu¹

(1. Liaoning Province Shellfish Breeding Engineering Technology Research Center, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China 3. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China)

Received: March 21, 2019

Key words: *Penaeus monodon*; *TSG101*; *Staphylococcus aureus*; *Vibrio harveyi*

Abstract: This study was conducted to explore the immune response of the tumor susceptibility gene 101 (*TSG101*) of *Penaeus monodon* and to understand the mechanism underlying the changes occurring in the body of *P. monodon* in response to bacterial stimulation. *Vibrio harveyi* and *Staphylococcus aureus* were used as the experimental group and phosphoric buffer solution was used as the control group. The immune response of *P. monodon* to bacterial stimulation was analyzed using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), which demonstrated that *PmTSG101* was ubiquitously expressed in all tested tissues, with the highest expression level being detected in the hepatopancreas. The expression pattern of *PmTSG101* in the hepatopancreas and gill was analyzed after challenge with *V. harveyi* and *S. aureus*. Results showed that with *S. aureus* challenge, the expression of *PmTSG101* in the hepatopancreas was significantly upregulated compared with that in the control group ($P < 0.01$), reaching the maximum at 12 h (21.6 times compared with that in the control group). The expression of *TSG101* was also significantly upregulated in the gill compared with that in the control group ($P < 0.01$), reaching the maximum at 6 h (3.64 times compared with that in the control group), after challenge with *S. aureus*. The expression of *PmTSG101* mRNA was especially upregulated ($P < 0.01$) in the hepatopancreas at 9 h after *V. harveyi* challenge. These results indicate that *PmTSG101* may play a vital role in the innate immune response of *P. monodon*. Challenge with *S. aureus* and *V. harveyi* resulted in significant changes in the mRNA expression of *PmTSG101*.

(本文编辑: 谭雪静)