

# 虾肝肠胞虫类泛素蛋白 EhUBL 的原核表达与亚细胞定位<sup>\*</sup>

谭念秋<sup>1</sup>, 魏春梅<sup>1</sup>, 文钰淞<sup>1</sup>, 范晓东<sup>1,2</sup>, 周泽扬<sup>1,2</sup>

(1. 重庆师范大学 生命科学院 动物生物学重庆市重点实验室, 重庆 401331;

2. 西南大学 微孢子虫感染与防控重庆市重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:**为明确虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)类泛素蛋白家族成员 EhUBL 的序列特征和定位情况,利用 ExPASy、WegoLoc、Interpro 等在线软件对 EhUBL 的序列特征和空间结构进行预测分析,通过对它的编码基因 *EhUBL* 进行克隆、原核表达以获得 EhUBL 重组蛋白(rEhUBL),并制备特异性多克隆抗体 anti-EhUBL,再通过免疫电镜探查 EhUBL 的亚细胞定位情况。结果显示:1) *EhUBL* 全长 873 bp,编码 292 个氨基酸;EhUBL 的预测相对分子质量为 31.38 kDa,该蛋白分子拥有 UBL(ubiquitin-like)-UBA(ubiquitin associated)结构域。2) EhUBL 与黄道蟹肠胞虫(*Enterospira canceri*)假定蛋白 ECANGBI\_154 和毕氏肠胞虫(*Enterocytozoon bienersi*)假定蛋白 EBI\_25559 的亲缘关系较近。3) 通过基因克隆和原核表达成功获得了 rEhUBL,并制备了 anti-EhUBL。4) EhUBL 主要分布在虾肝肠胞虫孢子的胞壁及细胞核中。上述结果为 EhUBL 的功能研究奠定基础,为虾肝肠胞虫的防控提供了新靶标。

**关键词:** 虾肝肠胞虫;泛素化;UBL(ubiquitin-like)-UBA(ubiquitin associated)结构域;原核表达;亚细胞定位

**中图分类号:** Q786;S917.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-6693(2024)06-0043-11

虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*)为微孢子虫门(Microsporidia)肠胞虫科(Enterocytozoonidae)肠胞虫属(*Enterocytozoon*)的一种微孢子虫,主要感染斑节对虾(*Penaeus monodon*)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)等虾类的肝胰腺并引发肝胰腺微孢子虫病<sup>[1-2]</sup>。宿主在感染虾肝肠胞虫初期并不表现出明显症状,但随着病程发展,宿主将会出现行动缓慢、伏底、摄食减少、肝胰腺萎缩等症状,宿主的生长因此而变得迟缓甚至停滞<sup>[3]</sup>。目前,已有不少研究者报道在泰国、印度、文莱、越南、委内瑞拉、马来西亚等国的养殖对虾体内发现了虾肝肠胞虫感染<sup>[4-5]</sup>,例如在印度安得拉邦内洛尔区养殖的凡纳滨对虾体内,虾肝肠胞虫感染阳性率甚至高达 92.5%<sup>[6]</sup>。2013 年以来,中国多地养殖的凡纳滨对虾先后出现虾肝肠胞虫感染,各地对虾养殖业因此遭受了极大的经济损失<sup>[7]</sup>。2022 年,因虾肝肠胞虫而引发的虾肝肠胞虫病在《中华人民共和国农业农村部公告第 573 号》<sup>[8]</sup>中被列入甲壳类动物二类疫病。

已有研究发现了参与虾肝肠胞虫侵染宿主的部分因子,如可以粘附宿主细胞的胞壁蛋白 EhSWP1<sup>[9]</sup>,但虾肝肠胞虫如何侵染宿主细胞并增殖的具体机制目前仍不清楚。类泛素蛋白因一般包含有 UBL(ubiquitin-like)-UBA(ubiquitin associated)结构域,故也被称为 UBL-UBA 穿梭蛋白;类泛素蛋白是一类被广泛研究的非蛋白酶体泛素受体家族,在物种间具有进化保守性<sup>[10-12]</sup>。DNA 损伤诱导蛋白 Ddi1、紫外线切除修复蛋白 Rad23 和类泛素蛋白 Dsk2 是目前研究最多的 UBL-UBA 穿梭蛋白<sup>[13]</sup>;Ddi1 对于 Ho 核酸内切酶的降解至关重要<sup>[14]</sup>,RAD23 和 DSK2 则参与了内质网相关蛋白的降解和蛋白 OLE-1 的诱导途径<sup>[15]</sup>。类泛素蛋白还在寄生类病原体的增殖发育过程中发挥着重要作用<sup>[16]</sup>。有研究发现,在敲除弓形虫(*Toxoplasma gondii*)的 3 个类泛素蛋白基因 *Ddi1*、*Rad23* 和 *Dsk2* 后,弓形虫的生长受到明显抑制,而且泛素化蛋白也因此而在弓形虫体内积累<sup>[17]</sup>;Bajaj 等人<sup>[18]</sup>发现,利什曼原虫(*Leishmania*)体内的类泛素蛋白 Myo21 中 2 个 UBA 结构域缺失会导致细胞分裂过程中

<sup>\*</sup> 收稿日期:2024-02-26 修回日期:2024-04-10 网络出版时间:2024-12-27T16:13

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 32372944);重庆市技术创新与应用示范项目(No. cstc2018jscx-msybX0313);重庆市教育委员会科学技术研究计划青年项目(No. KJQN201900516);重庆市教育委员会中小学创新人才培养工程项目(No. CY230503);重庆师范大学基金项目(No. 22XLB023)

第一作者简介:谭念秋,女,研究方向为病原微生物学,E-mail:2021110513035@stu.cqnu.edu.cn;通信作者:范晓东,男,讲师,博士,E-mail:fanxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20241227.1147.006

G2/M 期的延迟和细胞内囊泡转运的严重受损,致使细胞生长减慢。尽管类泛素蛋白在病原感染宿主中的功能引起了研究者的广泛关注,然而关于虾肝肠胞虫的类泛素蛋白的研究鲜有报道。

本研究鉴定了一个虾肝肠胞虫的类泛素蛋白家族成员 EhUBL,分析了 EhUBL 的序列特征并对它的编码基因 *EhUBL* 进行了克隆和原核表达,进而使用获得的 EhUBL 重组蛋白(rEhUBL)制备了对应的多克隆抗体 anti-EhBUL,最后通过免疫电镜分析了 EhUBL 的亚细胞定位,为进一步研究 EhUBL 的功能打下坚实基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用患病凡纳滨对虾取自重庆某对虾养殖场,利用基于孢子壁蛋白基因靶点的实时荧光定量 PCR 法<sup>[19]</sup>对它们进行检测,确认其中感染有大量虾肝肠胞虫后,取 100 只病虾的肝胰腺按照杨小娟等人<sup>[20]</sup>的方法对虾肝肠胞虫孢子进行纯化后备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 EhUBL 序列生物信息分析

从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 EhUBL 序列(登录号:No. OQS53980)信息,利用 Expasy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)的 Protparam、TMHMM 2.0、NetOGlyc 4.0、NetPhos 3.1 等软件进行蛋白质序列特征分析<sup>[21]</sup>;使用 WegoLoc(<http://www.btool.org/wegoloc/>)<sup>[22]</sup>和 Interpro(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/UniProt/>)<sup>[23]</sup>软件进行蛋白质亚细胞定位预测和保守结构域分析,使用 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)<sup>[24]</sup>软件进行蛋白质三级结构预测分析。此外,仍从 NCBI 网站下载 EhUBL 的同源蛋白序列信息,用 DNAMAN 9 软件<sup>[25]</sup>将 EhUBL 及它的同源蛋白进行序列比对,然后使用 MEGA 11 软件<sup>[26]</sup>并用邻接法来构建 EhUBL 的系统发育树。

#### 1.2.2 EhUBL 的克隆与原核表达

根据虾肝肠胞虫 *EhUBL* 序列设计上下游引物,即 *EhUBL*-F:5'-CGCGGATCCATGATTGTAAAAATTTCCATGAAAGAT-3'和 *EhUBL*-R:5'-CGCGTCGACTTTTTTAGTTAACTCTTCAATTGCTCC-3'。取  $8.65 \times 10^8$  个纯化的虾肝肠胞虫孢子,用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取虾肝肠胞虫的基因组,并以此作为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系包括:rTag 酶 12.5  $\mu\text{L}$ 、DNA 2.0  $\mu\text{L}$ 、上游引物 1.0  $\mu\text{L}$ 、下游引物 1.0  $\mu\text{L}$ 、双蒸水( $\text{ddH}_2\text{O}$ )9.0  $\mu\text{L}$ 。PCR 程序为:95  $^\circ\text{C}$  预变性 5 min;95  $^\circ\text{C}$  变性 30 s、59  $^\circ\text{C}$  退火 30 s、72  $^\circ\text{C}$  延伸 90 s,共 30 个循环;72  $^\circ\text{C}$  终延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳( $w_{\text{琼脂糖}} = 1\%$ )检测和分离,在美国 Bio-Rad 公司出品的 Gel Doc2000 凝胶成像仪下进行拍照记录,并用南京诺唯赞生物科技股份有限公司生产的 DC301 型胶回收试剂盒对目的片段进行回收,用赛默飞世尔科技公司(中国)出品的 Thermo Scientific NanoDrop 分光光度计检测回收片段的浓度,然后将含有目的片段溶液 and TaKaRa 公司(中国)出品的 pMD19-T 载体(货号:6013)溶液以 1:1 的体积比例混合,让目的片段和 pMD19-T 载体进行连接,再转入生工生物工程(上海)股份有限公司出品的大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  感受态细胞(货号:B528413),通过菌液 PCR、双酶切和测序筛选阳性克隆菌。用 BamH I 酶、Sal I 酶对阳性重组质粒与原核表达载体 pET-28a 进行双酶切,胶回收 *EhUBL* 片段后进行连接、转化、涂板实验,构建原核表达载体。通过菌液 PCR、质粒 PCR、双酶切对原核表达载体进行验证。

将验证正确的重组质粒 *EhUBL*-pET-28a 转入生工生物工程(上海)股份有限公司出品的大肠杆菌 Rosetta (DE3)(货号:B528414)表达菌株中,挑取单克隆到试管中培养过夜,扩大培养,当培养液在光波长为 600 nm 处的吸光度为 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)溶液,在 37  $^\circ\text{C}$  下诱导表达 4 h。以 12 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min,收集菌体并进行超声波破碎 5 min,并分别对上清与沉淀进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。

#### 1.2.3 EhUBL 的纯化与 anti-EhUBL 的制备

将获得的 rEhUBL 通过镍柱亲和层析进行纯化,并采用上海碧云天生物技术股份有限公司生产的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0011)测定纯化后的 rEhUBL 浓度。按照皮下免疫 400  $\mu\text{g} \cdot \text{次}^{-1}$  的剂量对 2 只购自江苏省农业科学院体质量为 2 kg 的新西兰白兔(*Oryctolagus cuniculus*)进行免疫,每 14 d 免疫 1 次,共进行 3 次免疫。通过间接酶联免疫吸附试验(ELISA)确定 3 次免疫完成后抗血清针对 rEhUBL 的效价,待效价超过

1:50 000 时,最终采血制备含 anti-EhUBL 的抗血清和纯化。

将 rEhUBL 与琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱,将所得抗血清与磷酸盐缓冲液(PBS)等量混合后缓慢上样,待抗体结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化的 anti-EhUBL,立即在 PBS 中于 4℃ 进行透析过夜,隔 1 日进行 anti-EhUBL 的纯度、浓度和效价测定。

将 rEhUBL 及虾肝肠胞虫孢子总蛋白通过 SDS-PAGE 来分离蛋白样品,然后将蛋白转到美国密理博公司出品的 IPFL00010 型 PVDF 膜上,使用脱脂奶粉液( $w_{\text{脱脂奶粉}} = 5\%$ )在 37℃ 下封闭 1 h 后再将 PVDF 膜放入稀释比为 1:2 000 的 anti-EhUBL 一抗中,于 37℃ 下孵育 1 h 后用含吐温-20 的 Tris-盐酸缓冲液(TBST)清洗。取出清洗后的 PVDF 膜加入稀释比为 1:5 000 经辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术股份有限公司生产,货号:A0208),于 37℃ 下孵育 1 h,用 TBST 溶液清洗后,使用增强型化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司生产,货号:P0018S)进行显色,然后观察拍照。

#### 1.2.4 EhUBL 的免疫电镜分析

EhUBL 的免疫电镜分析按照以下步骤与方法进行。

1) 样品包埋与切片制备。将纯化的虾肝肠胞虫孢子用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 清洗后,用免疫电镜固定液使样品于 4℃ 固定过夜,离心收集沉淀;用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的二甲砷酸钠溶液充分洗涤孢子,在 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 条件下离心 2 min,重复洗涤孢子 3 次后弃上清液;将孢子重悬于 pH 为 7.4、浓度为 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 PBS(其中含有质量分数分别为 0.1%、4% 的甘氨酸、蔗糖以及浓度为 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的二甲砷酸钠)中在 4℃ 下静置 30 min,然后以 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min,去除上清液;用 50 μL 琼脂糖溶液( $w_{\text{琼脂糖}} = 1\%$ )重悬孢子,以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,将冷却凝固的琼脂糖块切成体积为 1 mm<sup>3</sup> 的均匀小块;使用体积分数分别为 30%、50%、70%、80%、95%、100% 的乙醇溶液于 -20℃ 冰箱内进行梯度脱水,每个体积分数梯度脱水 30 min;将甲醇置于 -20℃ 预冷,过 0.22 μm 滤膜后,在通风橱中配制 LK4M 树脂与甲醇体积比分别为 1:1、1:2 和 1:3 的 3 种混合溶液,并各取 500 μL 在 -20℃ 下分别浸润处理样品 3、12、12 h;再用纯 LK4M 树脂,于 -20℃ 下处理样品 3 h,更换新的 LK4M 树脂溶液,再于 -20℃ 下静置浸泡 12 h。取 1 或 2 个琼脂块放入 PCR 管底部,并在通风橱中向 PCR 管内加满 LK4M 树脂,再将 PCR 管放置于紫外聚合仪中在 -20℃ 下聚合 48 h,将聚合好的包埋块切成厚度为 90 nm 的切片,并放置在镍网上。

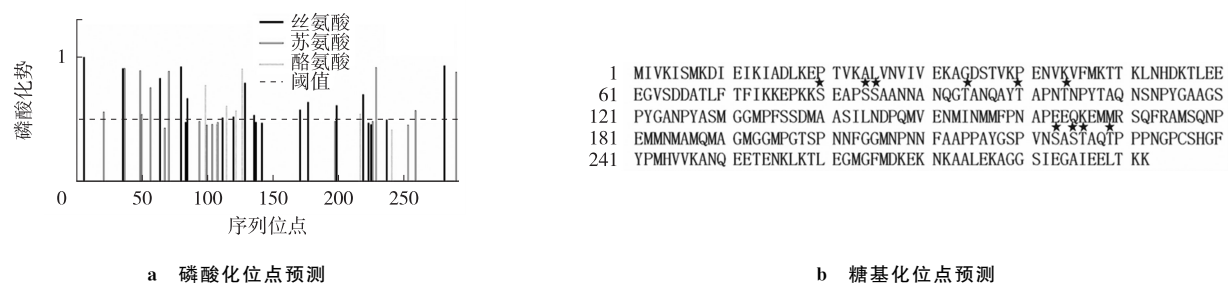
2) 免疫标记与观察。用过膜 ddH<sub>2</sub>O 清洗镍网上的样品切片 5 min,重复 3 次;用含山羊血清的封闭液( $\varphi_{\text{山羊血清}} = 1\%$ )室温封闭 1 h;用封闭液以 1:50 稀释比对制备的含 anti-EhUBL 抗血清进行稀释,并在 4℃ 下孵育过夜,同时以未免疫的兔血清为阴性对照进行孵育;然后用 PBS 清洗孵育后的血清 6 次,每次 3 min;再用封闭液以 1:50 稀释比对与胶体金颗粒偶联的山羊抗兔抗体进行稀释,在 37℃ 下孵育 1 h 后用 PBS 清洗 6 次,每次 3 min;用乙酸双氧铀溶液( $w_{\text{乙酸双氧铀}} = 1\%$ )染色 10 min,使用超纯水清洗 3 次,每次 5 min;再用柠檬酸铅溶液( $w_{\text{柠檬酸铅}} = 1\%$ )染色 5 min,然后使用超纯水清洗 3 次,每次 5 min;将染色清洗后的镍网烘干,用透射电子显微镜观察图像并拍照保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 EhUBL 的序列分析结果

通过 ExPASy 软件预测 EhUBL 的序列特征,结果显示:EhUBL 由 292 个氨基酸残基组成,分子式为 C<sub>1353</sub>H<sub>2143</sub>N<sub>367</sub>O<sub>439</sub>S<sub>25</sub>,相对分子质量为 31.38 kDa,理论等电点为 5.41;EhUBL 中带负电荷的残基(Asp+Glu)总数为 32 个,带正电荷的残基(Arg+Lys)总数为 27 个;EhUBL 的不稳定性指数(II)为 45.56,属于不稳定蛋白;EhUBL 的脂肪指数为 51.92,亲水性的平均值为 -0.586,故预测该蛋白为亲水性蛋白。磷酸化位点预测结果发现:EhUBL 存在不同程度的磷酸化修饰,有 26 个磷酸化位点,主要集中在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸这 3 种氨基酸上(图 1a)。糖基化位点预测结果显示:EhUBL 无 N-糖基化位点,有 10 个 O-糖基化位点(其中包含 5 个丝氨酸和 5 个苏氨酸位点)(图 1b)。

利用 Phyre2 在线软件预测了 EhUBL 的二级结构及三级结构,结果显示:该蛋白的二级结构元件中  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲所占比例分别为 39% 和 58%, $\beta$ -折叠链占比仅为 6%(图 2);对三级结构的预测结果显示该蛋白 N 端为 UBL 结构域、C 端为 UBA 结构域,这表明该蛋白属于 UBL-UBA 穿梭蛋白家族(图 3)。通过 WegoLoc 在线软件预测了 EhUBL 的亚细胞定位,结果显示该蛋白定位于细胞核。



注:图 b 中★为预测的糖基化位点。

图 1 EhUBL 磷酸化位点及糖基化位点预测  
Fig. 1 Phosphorylation and glycosylation sites of EhUBL

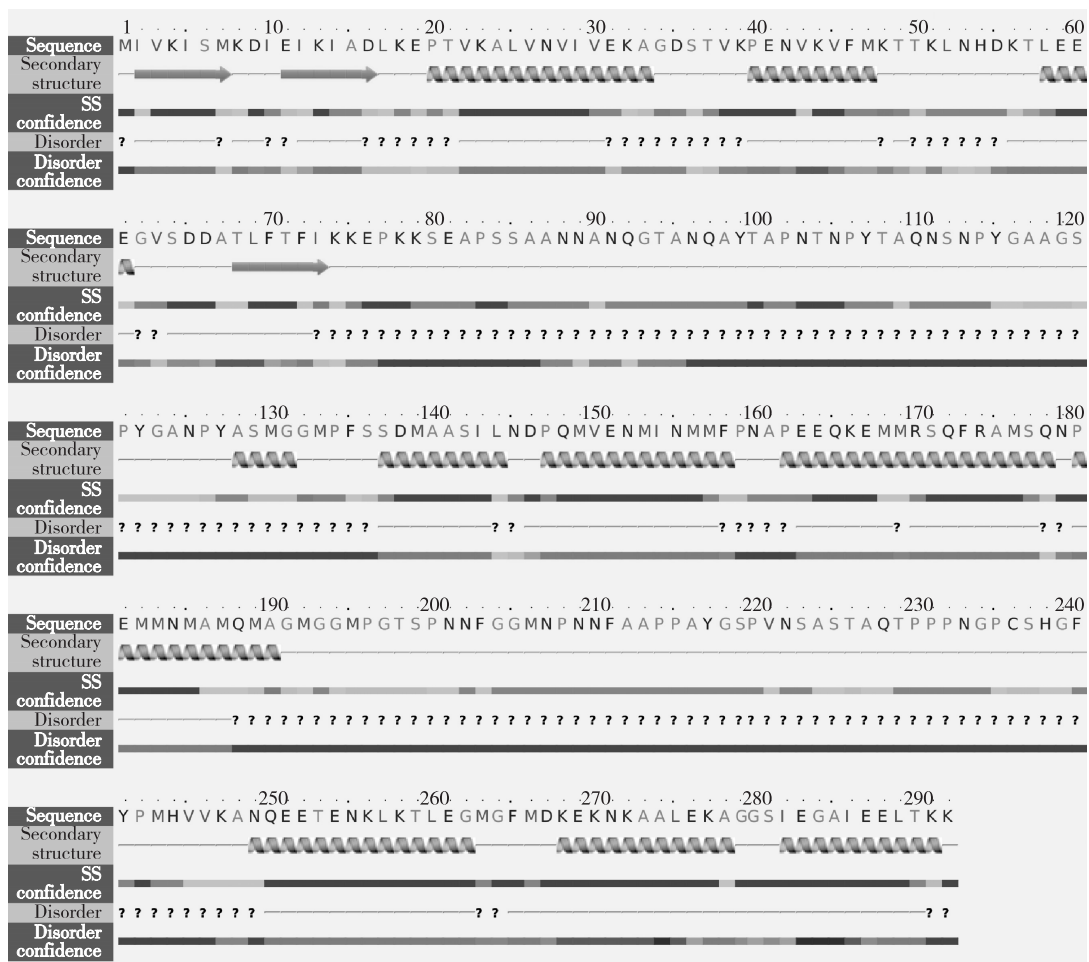


图 2 EhUBL 的二级结构预测  
Fig. 2 Prediction of secondary structure of EhUBL

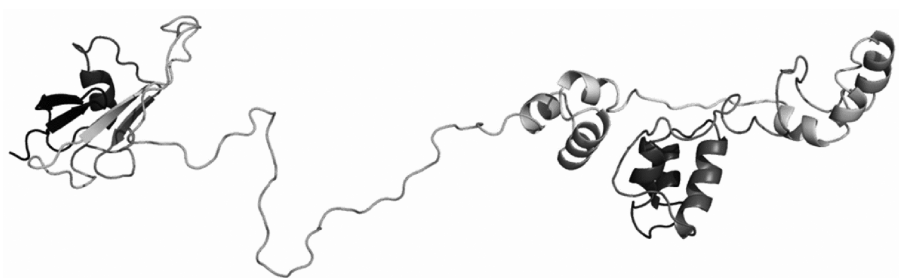


图 3 EhUBL 的三级结构预测  
Fig. 3 Prediction of tertiary structure of EhUBL

通过 NCBI 网站对 EhUBL 进行同源序列搜索,将 7 个微孢子虫的类泛素蛋白同源序列进行序列比对,结果显示 EhUBL 与黄道蟹肠胞虫(*Enterosporea cancri*)的假定蛋白 ECANGB1\_154 和毕氏肠胞虫(*Enterocytozoon bienewisi*)的假定蛋白 EBI\_25559 同源性最高,同源性分别为 42.86% 和 40.54%(图 4)。选取 EhUBL 的同源序列构建系统发育树,结果显示:多细胞的子囊菌门(Ascomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)、担子菌门(Basidiomycota)等分为 1 支,单细胞的微孢子虫门单独分为 1 枝,虾肝肠胞虫、黄道蟹肠胞虫和毕氏肠胞虫的亲缘关系最近(图 5)。

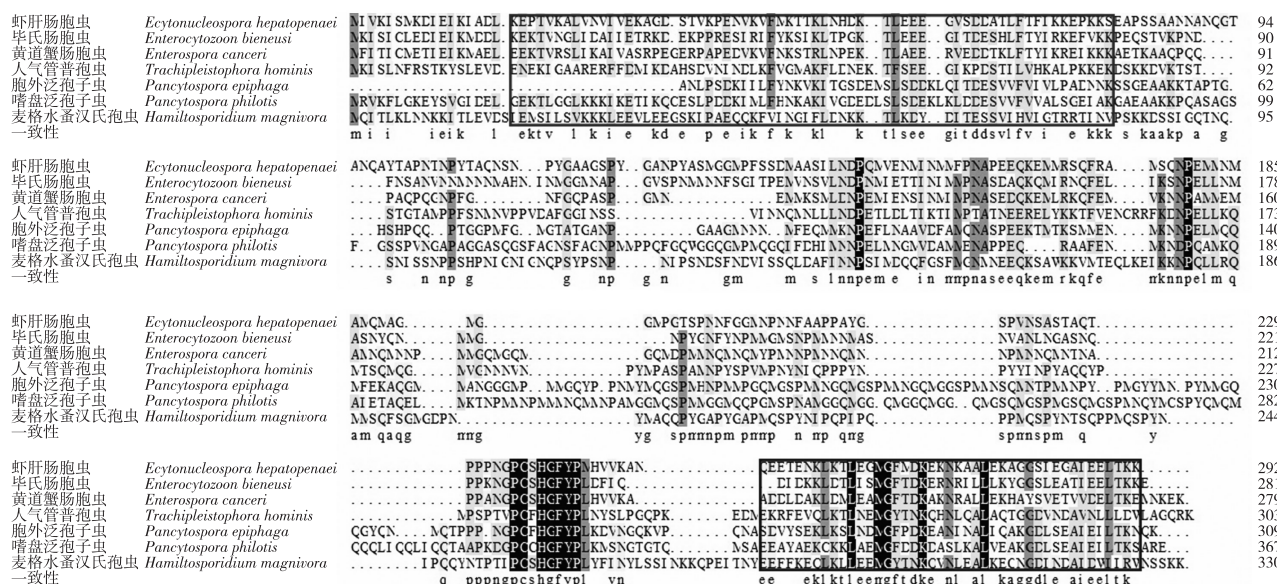


图 4 7 种微孢子虫类泛素蛋白序列比对分析

Fig. 4 Multiple sequence alignment analysis of seven ubiquitin-like proteins from microsporidium

## 2.2 EhUBL 的克隆与原核表达结果

用 CTAB 法提取虾肝肠胞虫基因组,进行核酸凝胶电泳检测后显示该基因组 DNA 条带单一、质量较优可用于后续实验(图 6a)。以虾肝肠胞虫基因组为模板,通过 PCR 反应扩增出 EhUBL 除终止密码子以外全长为 873 bp 的片段(图 6b);将 EhUBL 片段连接到 pMD19-T 载体上,通过菌液 PCR 及质粒双酶切初步筛选出阳性克隆菌,将阳性克隆菌送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

利用 BamHI 酶和 SalI 酶对阳性重组质粒与原核表达载体 pET-28a 进行酶切,之后将两者连接,成功构建 pET-28a-EhUBL 表达载体。将该表达载体成功转入大肠杆菌 Rosetta(DE3)表达菌株中以后进行扩大培养并加入 IPTG 诱导 rEhUBL 的表达,SDS-PAGE 检测结果显示在 40 kDa 处有特异条带,说明 rEhUBL 成功表达;同时该检测结果也显示 rEhUBL 主要存在于菌体裂解液的沉淀中,说明它的原核表达形式为包涵体表达(图 6c)。

## 2.3 rEhUBL 的纯化与 anti-EhUBL 的制备结果

将纯化后的 rEhUBL(图 7a)用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行浓度测定,结果证明纯化效果良好。然后用纯化 rEhUBL 免疫新西兰白兔,经 3 次免疫后,取少量兔血进行检测,通过 ELISA 检测评估其中抗体的效价,结果显示抗体有效效价达到 1:256 000,超过 1:50 000,进而进一步采集兔血制备抗血清并进行纯化;通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测纯化后的抗血清纯度,结果显示它的纯度较高,说明 anti-EhUBL 制备成功(图 7b)。通过免疫印迹(Western blot)分析对 anti-EhUBL 的特异性进行验证:当使用 anti-EhUBL 为一抗杂交 rEhUBL 时,在 40 kDa 左右处杂交到明显且单一的条带(图 8a);当使用 anti-EhUBL 与虾肝肠胞虫孢子总蛋白杂交时,在 32 kDa 处有明显条带(图 8b)。上述结果表明 anti-EhUBL 具有良好的特异性。

## 2.4 EhUBL 的亚定位分析

为探究 EhUBL 在孢子中的精细亚细胞定位情况,采用纯化后的虾肝肠胞虫成熟孢子进行固定、包埋、切片处理,制备虾肝肠胞虫超薄切片。然后使用制备的兔源特异性 anti-EhUBL 作为一抗,使用与胶体金偶联的山羊抗兔抗体作为二抗,进行免疫电镜分析。结果显示:anti-EhUBL 标记的金颗粒多数分布在虾肝肠胞虫孢子的

内壁和外壁,另有少量金颗粒分布在细胞核(图 9a);未经 anti-EhUBL 标记的金颗粒(阴性对照)则未出现在虾肝肠胞虫孢子中(图 9b)。该结果说明 EhUBL 主要分布在虾肝肠胞虫孢子的胞壁及细胞核中。



注:各物种拉丁学名后的编号为各物种与 EhUBL 相关的蛋白序列在 Genbank 数据库中的登录号。

图 5 EhUBL 的系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of EhUBL

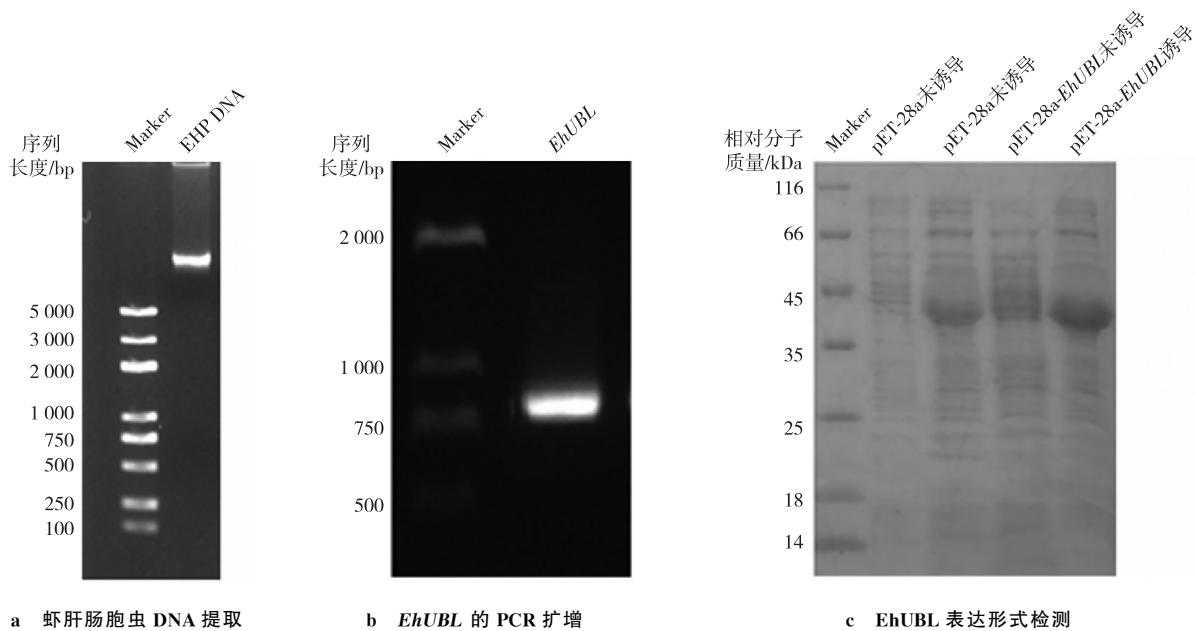


图 6 EhUBL 的克隆与原核表达

Fig. 6 Cloning and prokaryotic expression of the EhUBL

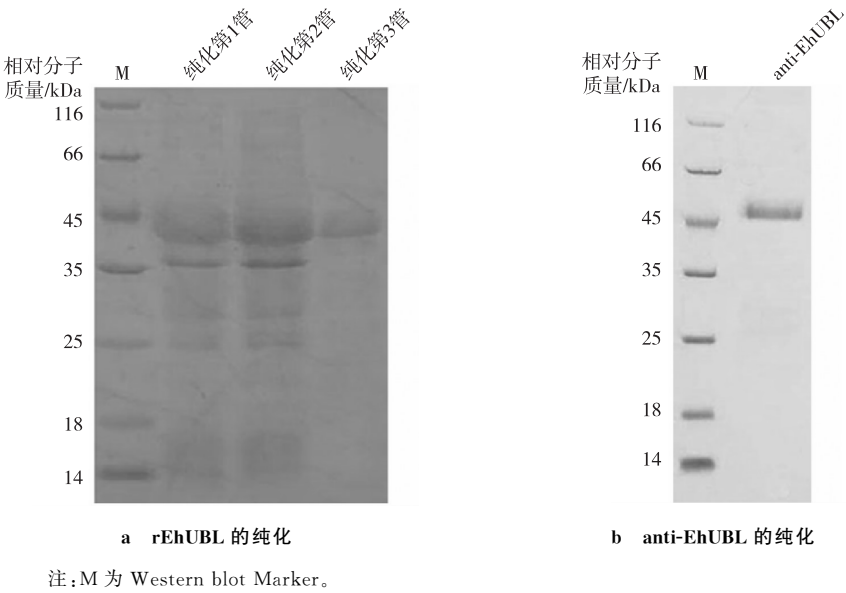


图 7 rEhUBL 和 anti-EhUBL 的纯化

Fig. 7 Purification of rEhUBL and anti-EhUBL

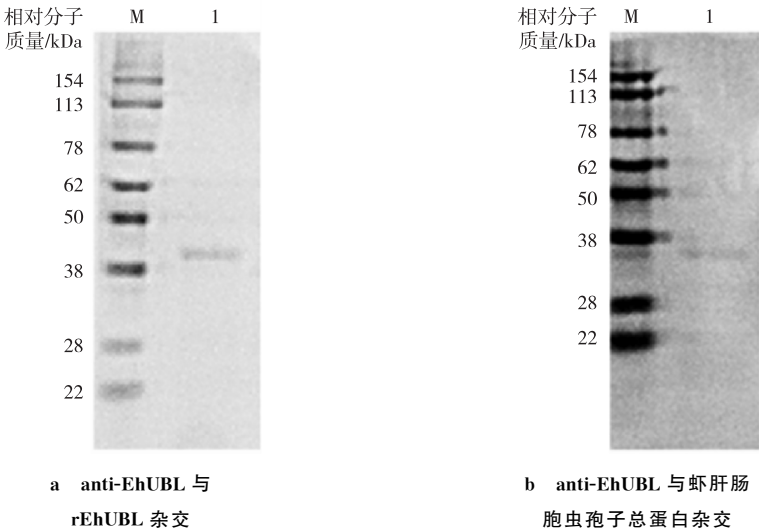


图 8 anti-EhUBL 的特异性检测

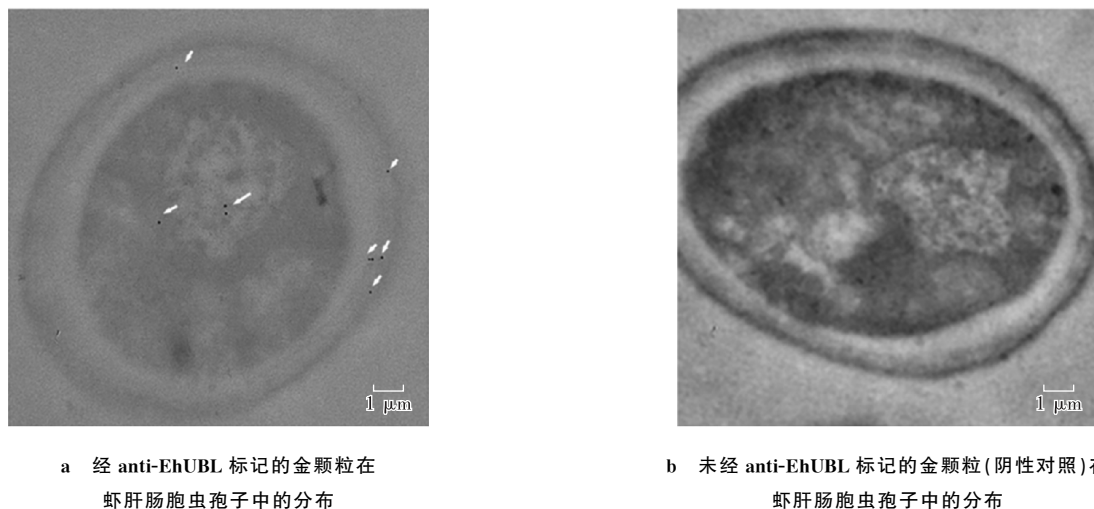
Fig. 8 Detection of the specificity of anti-EhUBL

3 讨论

虾肝肠胞虫是一种专性细胞内寄生的真核病原体。从虾肝肠胞虫于 1989 年首次在马来西亚养殖的斑节对虾体内被发现以来,全球对虾养殖业因该病原体引发的对虾病害而遭受了非常严重的经济损失<sup>[27-28]</sup>。然而至今人们对虾肝肠胞虫的侵染增殖机制尚不清楚。类泛素蛋白在病原体入侵宿主以及在宿主细胞增殖等过程中发挥着重要作用。本研究成功鉴定了一个虾肝肠胞虫的类泛素蛋白家族成员 EhUBL,该蛋白拥有 UBL 和 UBA 这 2 个类泛素蛋白的保守结构域,属于典型的穿梭蛋白家族;亚细胞定位预测分析预示 EhUBL 可能定位于细胞核;经过 *EhUBL* 的克隆、原核表达和 anti-EhUBL 的制备,并通过免疫电镜发现 EhUBL 主要定位在虾肝肠胞虫孢子的孢壁上和细胞核中,从而探明了 EhUBL 的精细亚细胞定位情况。

已有研究表明,孢壁蛋白是微孢子虫孢壁的组成成分,在与宿主细胞的黏附、能量传递、信号传导、酶促反应等方面发挥着重要作用<sup>[28-29]</sup>。有研究报道:家蚕微粒子虫(*Nosema bombycis*)的孢壁蛋白 NbSWP16 被抗体封

闭后,孢子对宿主细胞的黏附率可降低 20%<sup>[30]</sup>;分布于孢壁的水通道蛋白 NbAQP 对孢子的萌发至关重要<sup>[31]</sup>。虾肝肠胞虫的孢壁蛋白 EhSWP1 拥有肝素结构域,可与宿主细胞表面肝素相互作用,从而介导了对宿主的侵染过程<sup>[9]</sup>。本研究发现,EhUBL 主要定位在虾肝肠胞虫的孢壁上且在内壁和外壁均有分布,由此推测该蛋白在构建虾肝肠胞虫孢壁结构及虾肝肠胞虫孢子黏附宿主过程中可能发挥一定作用。同源序列分析也表明,EhUBL 是一种在物种间进化相对保守的类泛素蛋白。有研究者发现弓形虫中的 UBL-UBA 蛋白定位在细胞核和细胞质中,并影响细胞核中的泛素化蛋白选择性积累和 DNA 的异常复制<sup>[32]</sup>。本研究结果显示 EhUBL 在虾肝肠胞虫孢子的细胞核内也存在定位情况,与亚细胞定位预测结果一致。这说明 EhUBL 可能存在与弓形虫中 UBL-UBA 蛋白类似的功能,在虾肝肠胞虫的基因组复制或基因转录中发挥作用,但有待于在后续的研究中进行更加深入的探讨。



注:白色箭头所指黑点为金颗粒。

图 9 EhUBL 定位的免疫电镜分析

Fig. 9 Immunoelectron microscopy analysis of EhUBL localization

具有 UBL 和 UBA 结构域的类泛素蛋白是重要的功能蛋白家族,在细胞周期调控、信号转导、酶促相互作用等多种生命过程中发挥重要作用<sup>[33-34]</sup>,与生物体的泛素-蛋白酶体系统(ubiquitinproteasome system, UPS)和免疫系统关系密切。病原体在与宿主的长期拉锯竞争中进化出独特的分泌系统,可将自身分泌的蛋白注入宿主细胞中来调节宿主细胞的泛素化过程,从而帮助病原体的入侵以及在宿主细胞中增殖发育<sup>[35]</sup>。曲昱蓉等人<sup>[36]</sup>发现新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)感染 Hela 细胞后会使 Hela 细胞的 UPS 更加活跃,当使用蛋白酶体抑制剂和泛素连接酶抑制剂处理 Hela 细胞后,NDV 的增殖也明显被抑制。Green 等人<sup>[37]</sup>发现恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)从血细胞内寄生虫阶段向胞外裂殖子转变过程中细胞总体泛素化水平增加,说明泛素化在疟原虫的增殖过程中起着重要作用。而微孢子虫的基因组高度简化,缺乏线粒体和过氧化物酶体,许多重要的代谢途径丧失<sup>[38-39]</sup>,通过分泌蛋白与宿主线粒体相互作用并使宿主线粒体外膜蛋白泛素化而被蛋白酶体降解<sup>[40-41]</sup>,实现逃避宿主免疫并劫取能量维持自身的增殖。已有研究发现,海伦脑炎微孢子虫(*Encephalitozoon hellem*)和巴黎杀线虫微孢子虫(*Nematocida parisii*)可通过分泌蛋白调控宿主细胞 UPS<sup>[42]</sup>。在 Wu 等人<sup>[43]</sup>开展的转录组和蛋白质组学研究中,发现了包括 EhUBL 在内的大量虾肝肠胞虫 UPS 途径多个潜在基因的表达,说明 EhUBL 等 UPS 途径相关蛋白可能参与了虾肝肠胞虫的侵染增殖过程。本研究也发现 EhUBL 与其他微孢子虫的类泛素蛋白具有较高的同源性,由此可以推测 EhUBL 的生物学功能具有保守性。总之,进一步探明 EhUBL 等类泛素蛋白的生物学功能,将有利于阐明虾肝肠胞虫的侵染增殖机制,还有助于虾肝肠胞虫防治靶标和药物的筛选。

#### 参考文献:

[1] TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida; Enterocytozoonidae),

- a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): fine structure and phylogenetic relationships[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2009, 102(1): 21-29.
- [2] SPRAGUE V, BECNEL J J, HAZARD E I. Taxonomy of Phylum Microspora[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1992, 18(5/6): 285-395.
- [3] SANTHOSHKUMAR S, SIVAKUMAR S, VIMAL S, et al. Biochemical changes and tissue distribution of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in naturally and experimentally EHP-infected whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), in India[J]. Journal of Fish Diseases, 2016, 40(4): 529-539.
- [4] RAJENDRAN K V, SHIVAM S, PRAVEENA P E, et al. Emergence of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in farmed *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* in India[J]. Aquaculture, 2016, 454: 272-280.
- [5] TANG K F J, ARANGUREN L F, PIAMSOMBOON P, et al. Detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) and Taura syndrome virus in *Penaeus vannamei* cultured in Venezuela[J]. Aquaculture, 2017, 480: 17-21.
- [6] KUMMARI S, HARIDAS D V, HANDIQUE S, et al. Incidence of hepatopancreatic microsporidiosis, by *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in *Penaeus vannamei* culture in Nellore District, Andhra Pradesh, India and the role of management in its prevention and transmission[J]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2018, 7(2): 2125-2134.
- [7] 彭张明, 陈妃业, 蒲桂川. 对虾肝胰腺微孢子虫病与虾肝肠胞虫关系的研究进展[J]. 水产学杂志, 2020, 33(5): 74-81.
- PENG Z M, CHEN F Y, PU G C. Research progress on relationship between hepatopancreatic microsporidiosis and *Enterocytozoon hepatopenaei* in penaeid shrimp: a review[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2020, 33(5): 74-81.
- [8] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告 第 573 号[EB/OL]. (2022-08-30)[2024-02-26]. [http://www.moa.gov.cn/nybg/2022/202208/202208/t20220830\\_6408131.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2022/202208/202208/t20220830_6408131.htm).
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China (No. 573)[EB/OL]. (2022-08-30)[2024-02-26]. [http://www.moa.gov.cn/nybg/2022/202208/202208/t20220830\\_6408131.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2022/202208/202208/t20220830_6408131.htm).
- [9] JAROENLAK P, BOAKYE D W, VANICHVIRIYAKIT R, et al. Identification, characterization and heparin binding capacity of a spore-wall, virulence protein from the shrimp microsporidian, *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)[J]. Parasites & Vectors, 2018, 11(1): 177.
- [10] HUSNJAK K, DIKIC I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions[J]. Annual Review of Biochemistry, 2012, 81(1): 291-322.
- [11] SU V, LAU A F. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2009, 66(17): 2819-2833.
- [12] CHUANG K H, LIANG F S, HIGGINS R, et al. Ubiquitin/Dsk2 promotes inclusion body formation and vacuole (lysosome)-mediated disposal of mutated huntingtin[J]. Molecular Biology of the Cell, 2016, 27(13): 2025-2036.
- [13] JANTRAPIROM S, Lo PICCOLO L, YAMAGUCHI M. Non-proteasomal UbL-UbA family of proteins in neurodegeneration[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): 1893.
- [14] KAPLUN L, TZIRKIN R, BAKHRAT A, et al. The DNA damage-inducible UbL-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease[J]. Molecular and Cellular Biology, 2023, 25(13): 5355-5362.
- [15] HÄNZELMANN P, STINGELE J, HOFMANN K, et al. The yeast E4 ubiquitin ligase Ufd2 interacts with the ubiquitin-like domains of Rad23 and Dsk2 via a novel and distinct ubiquitin-like binding domain[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(26): 20390-20398.
- [16] ZHANG H, YANG X, YING Z, et al. *Toxoplasma gondii* UBL-UBA shuttle protein DSK2s are important for parasite *Intracellular Replication*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 7943.
- [17] ZHANG H, LIU J, YING Z, et al. *Toxoplasma gondii* UBL-UBA shuttle proteins contribute to the degradation of ubiquitylated proteins and are important for synchronous cell division and virulence[J]. The FASEB Journal, 2020, 34(10): 13711-13725.
- [18] BAJAJ R, AMBARU B, GUPTA C M. Deciphering the role of UBA-like domains in intraflagellar distribution and functions of myosin XXI in *Leishmania*[J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0232116.
- [19] JAROENLAK P, SANGUANRUT P, WILLIAMS B A P, et al. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166320.
- [20] 杨小娟, 陈洁, 魏春梅, 等. 两种分离纯化介质对虾肝肠胞虫孢子发芽率的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2020, 37

- (3):46-53.
- YANG X J, CHEN J, WEI C M, et al. The effect of two purification media on the germination rate of *Enterocytozoon hepatopenaei* spores[J]. Journal of Chongqing Normal Univeristy (Natural Science), 2020, 37(3):46-53.
- [21] DUVAUD S, GABELLA C, LISACEK F, et al. Expasy, the Swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1):W216-W227.
- [22] CHI S M, NAM D. WegoLoc: accurate prediction of protein subcellular localization using weighted gene ontology terms[J]. Bioinformatics, 2012, 28(7):1028-1030.
- [23] HUNTER S, APWEILER R, ATTWOOD T K, et al. InterPro: the integrative protein signature database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(1):D211-D215.
- [24] KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. Nature Protocols, 2015, 10(6):845-858.
- [25] EDWARDS D J, GRODEVANT N W, LEE P J, et al. DNA-MAN: dynamic natural attributes for synthetic military forces [C]//2007 IEEE Systems and Information Engineering Design Symposium, Charlottesville: IEEE, 2007:1-5.
- [26] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers[J]. Bioinformatics, 1994, 10(2):189-191.
- [27] WANG Y, CHEN J, NA Y, et al. *Ecytonucleospora hepatopenaei* n. gen. et comb. (Microsporidia: Enterocytozoonidae): a redescription of the *Enterocytozoon hepatopenaei* (Tourtip et al., 2009), a microsporidian infecting the widely cultivated shrimp *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2023, 201:107988.
- [28] ANDERSON I G, SHARIFF M, NASH G. A hepatopancreatic microsporidian in pond-reared tiger shrimp, *Penaeus monodon*, from Malaysia[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53(2):278-280.
- [29] WANG Y, ZHANG R Z, BARANDUN J, et al. Divergence of a tandem duplication of manganese superoxide dismutase in *Nosema bombycis*[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2017, 65(1):93-103.
- [30] SOUTHERN T R, JOLLY C E, LESTER M E, et al. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells *in vitro*[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(8):1354-1362.
- [31] WANG Y, DANG X Q, MA Q, et al. Characterization of a novel spore wall protein NbSWP16 with proline-rich tandem repeats from *Nosema bombycis* (Microsporidia)[J]. Parasitology, 2015, 142(4):534-542.
- [32] ZHANG H, XUE Y F, YANG X, et al. *Toxoplasma gondii* UBL-UBA shuttle proteins regulate several important cellular processes[J]. The FASEB Journal, 2021, 35(12):e21898.
- [33] SALIBA R S, PANGALOS M, MOSS S J. The ubiquitin-like protein Plic-1 enhances the membrane insertion of GABAA receptors by increasing their stability within the endoplasmic reticulum[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(27):18538-18544.
- [34] TANAKA K, FUNAKOSHI M, KOBAYASHI H. A Cdc2-sensitive interaction of the UbL domain of XDRP1S with cyclin B mediates the degradation of cyclin B in *Xenopus* egg extracts[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 350(3):774-782.
- [35] HICKS S W, GALÁN J E. Exploitation of eukaryotic subcellular targeting mechanisms by bacterial effectors[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(5):316-326.
- [36] 曲昱蓉, 詹媛, 仇旭升, 等. HeLa 细胞中泛素蛋白酶体系统对新城疫病毒复制的影响[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(2):13-19.
- QU Y R, ZHAN Y, QIU X S, et al. Effect of ubiquitin-proteasome system on newcastle disease virus replication in HeLa cells [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2014, 22(2):13-19.
- [37] GREEN J L, WU Y, ENCHEVA V, et al. Ubiquitin activation is essential for schizont maturation in *Plasmodium falciparum* blood-stage development[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(6):1008640.
- [38] KATINKA M D, DUPRAT S, CORNILLON E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*[J]. Nature, 2001, 414(6862):450-453.
- [39] HOCH G, SCHAFELLNER C, HENN M W, et al. Alterations in carbohydrate and fatty acid levels of *Lymantria dispar* larvae caused by a microsporidian infection and potential adverse effects on a co-occurring endoparasitoid, *Glyptapanteles liparidis* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2002, 50(3):109-120.
- [40] HACKER C, HOWELL M, BHELLA D, et al. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC[J].

Cellular Microbiology, 2014, 16(4): 565-579.

- [41] LUO J, XU J Z, XIE C L, et al. Microsporidia promote host mitochondrial fragmentation by modulating DRP1 phosphorylation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 7746.
- [42] BAKOWSKI M A, DESJARDINS C A, SMELKINSON M G, et al. Ubiquitin-mediated response to microsporidia and virus infection in *C. elegans* [J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(6): 1004200.
- [43] WU Y J, CHEN J, LIAO G L, et al. Down-regulation of lipid metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei* upon light and heavy infection of *Enterocytozoon hepatopenaei*: a comparative proteomic study [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11574.

## Molecular Biology and Bioinformatics

### Prokaryotic Expression and Subcellular Localization of the Ubiquitin-Like Protein EhUBL from *Enterocytozoon hepatopenaei*

TAN Nianqiu<sup>1</sup>, WEI Chunmei<sup>1</sup>, WEN Yusong<sup>1</sup>, FAN Xiaodong<sup>1,2</sup>, ZHOU Zeyang<sup>1,2</sup>

(1. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Chongqing Key Laboratory of Microsporidium Infection and Control, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** In order to clarify the sequence characterisation and localisation analysis of the ubiquitin-like protein in *Enterocytozoon hepatopenaei* (EhUBL), the sequence features and spatial structure of EhUBL were predicted and analysed using online websites such as Expasy, WegoLoc and Interpro, the recombinant EhUBL (rEhUBL) was obtained by cloning its coding gene *EhUBL* and prokaryotic expression and the specific polyclonal antibody (anti-EhUBL) was prepared, and then the subcellular localisation of EhUBL was probed by immunoelectron microscopy. The results showed that: 1) The length of *EhUBL* was 873 bp, it encoded 292 amino acids; the predicted relative molecular mass of EhUBL was 31.38 kDa, and the protein had the UBL (Ubiquitin-like)-UBA (Ubiquitin associated) domain. 2) EhUBL was closely related to the hypothetical protein ECANGBI\_154 of *Enterosporea cancris* and the hypothetical protein EBI\_25559 of *Enterocytozoon bieneusi*. 3) rEhUBL was successfully obtained by gene cloning and prokaryotic expression, and anti-EhUBL was also successfully prepared. 4) EhUBL was mainly distributed in the cell wall and nucleus of the spore of *E. hepatopenaei*. The results above laid a foundation for the functional study of EhUBL and provided a new target for the prevention and control of *E. hepatopenaei*.

**Keywords:** *Enterocytozoon hepatopenaei*; ubiquitination; UBL (ubiquitin-like)-UBA (ubiquitin associated) domain; prokaryotic expression; subcellular localization

(责任编辑 方 兴)