

虾肝肠胞虫 Septin 的生物信息学分析 及其在增殖中的潜在作用

张 晟¹, 乔 毅², 曹晓慧², 张雷霆³, 成 婕², 吴海龙¹, 沈 辉²

(1.江苏海洋大学海洋科学与水产学院,江苏 连云港 222000)

(2.江苏省海洋水产研究所,江苏 南通 226007)

(3.南京师范大学海洋科学与工程学院,江苏 南京 210023)

[摘要] 虾肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)是对虾养殖业的重要病原体之一,其裂殖增殖的分子机制尚不明确.本研究通过克隆和分析 EHP 裂殖期 Septin 蛋白 EhpSeptin 的基因序列、表达及定位,初步阐释了该基因在 EHP 裂殖中的潜在作用.结果表明,EhpSeptin 基因序列编码 265 个氨基酸的蛋白质,分子量约 30.4 kDa,等电点 4.75.构建 EhpSeptin 原核表达载体,获得高纯度表达蛋白. Western blotting 验证了表达蛋白与天然蛋白一致.此外,本研究建立了 EhpSeptin 基因显色原位杂交技术(chromogenic *in situ* hybridization, CISH),分析感染对虾样本中 EhpSeptin 的表达模式.结果显示,EhpSeptin 的表达水平随 EHP 感染强度增加而升高,表明其参与了 EHP 的裂殖过程.本研究首次报道了 EHP 裂殖相关蛋白 EhpSeptin 的克隆、表达、定位及其在 EHP 感染过程中的变化规律,为探究 EHP 裂殖分子机制和防治该病原体的感染提供了理论基础和技术手段.

[关键词] 虾肝肠胞虫,Septin,原核表达,显色原位杂交

[中图分类号] S945.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2025)01-0066-09

Bioinformatics Analysis of *Enterocytozoon hepatopenaei* Septin and Its Potential Role in Proliferation

Zhang Sheng¹, Qiao Yi², Cao Xiaohui², Zhang Leiting³, Cheng Jie², Wu Hailong¹, Shen Hui²

(1.School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China)

(2.Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China)

(3.School of Marine and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) is one of the significant pathogens in the shrimp aquaculture industry, but the molecular mechanisms of its division and proliferation remain unclear. This study aimed to elucidate the potential role of the EhpSeptin protein during EHP division by cloning and analyzing the gene sequence, expression, and localization of EhpSeptin during the division period of EHP. The results indicated that the EhpSeptin gene sequence encoded a protein with 265 amino acids, a molecular weight of approximately 30.4 kDa, and an isoelectric point of 4.75. An EhpSeptin prokaryotic expression vector was constructed, and high-purity expressed protein was obtained. Western blotting confirmed the consistency of the expressed protein with the native protein. Additionally, this study established chromogenic *in situ* hybridization (CISH) for the EhpSeptin gene to analyze its expression pattern in infected shrimp samples. The results demonstrated that the expression level of EhpSeptin increased with the intensity of EHP infection, suggesting its involvement in the EHP division process. This study is the first to report the cloning, expression, localization, and variations in the EhpSeptin protein during EHP infection, providing a theoretical foundation and technical means for exploring the molecular mechanisms of EHP division and preventing infection by this pathogen.

Key words: *Enterocytozoon hepatopenaei*, Septin, prokaryotic expression, chromogenic *in situ* hybridization

收稿日期:2023-09-08.

基金项目:江苏省“333”人才专项[(2022)]21、江苏海洋生物资源创新中心科研项目计划专项资金(2022YHTZZZ04)、江苏省渔业专项(2023-SJ-072).

通讯作者:吴海龙,副教授,研究方向:水产生态健康养殖. E-mail: hlwu@jou.edu.cn; 沈辉,研究员,研究方向:水产病害研究. E-mail: darkhui@163.com

虾肝肠胞虫(EHP)属于肠胞虫科、肠胞虫属^[1-2],主要侵染对虾肝胰腺上皮并迅速增殖,大量攫取宿主能量及营养物质,并影响对虾的免疫、能量及营养代谢,继而造成对虾生长缓慢症状,造成了对虾养殖业的巨大经济损失^[3-4]. 因此,控制其在宿主体内的增殖对于预防和治疗 EHP 感染至关重要.

在微孢子虫的侵染机制研究中,Septin 基因在家蚕微孢子虫中被报道,表明其在微孢子虫侵染过程中发挥着重要作用. Septin 是一种高度保守的 GTP 结合蛋白,在多种真核生物中广泛存在,参与了细胞增殖、纤毛形成以及病原侵染宿主等重要的生物学过程^[5]. 大量研究证实,Septin 蛋白在酵母、线虫、果蝇等多种模型生物的细胞分裂过程中发挥关键的调控作用. Chant 等在对芽殖酵母的研究中发现,4 种 Septin 成员均定位在酵母芽颈部位,它们之间的协同作用对维持正常的酵母细胞周期至关重要^[6]. 线虫中的两种 Septin 蛋白与卵裂沟高度相关,在细胞分裂末期集中于中间体,并在后期胞质分裂时起核心调控作用^[7-8]. 在对果蝇的研究中也证实,Septin 蛋白是细胞质分裂过程中必不可少的因子,在分裂间期分布于皮质层,分裂末期则迁移至卵裂沟完成定位^[9]. 在人类疾病方面,下调卵巢癌细胞中 Septin-9 的表达可明显抑制肿瘤的增殖和转移^[10]. 此外,昆虫寄生虫如家蚕微孢子虫在进行裂殖时,其 *NbSeptin* 基因会高度转录,表明 Septin 蛋白在该寄生虫的增殖中也起着关键作用^[11]. 由此表明,Septin 蛋白参与调控细胞增殖和分裂的功能高度保守. 研究推断,Septin 蛋白在 EHP 的增殖过程中扮演着重要的调控因子角色.

原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)技术能够在组织和细胞水平上准确检测和定位特定的核酸序列,已广泛应用于各类基因的时空表达模式研究^[12]. 在 EHP 的相关研究中,原位杂交也被采用为重要的辅助手段,用于确认组织切片和 PCR 结果中的病原体^[13-14]. 与传统原位杂交技术相比,显色原位杂交(CISH)通过采用染色底物实现结果的可视化,不仅能准确定位目标序列,还简化了结果分析流程^[15]. 尽管如此,显色原位杂交技术至今还未在 EHP 病原体的研究中应用. 本研究拟通过建立 EHP 显色原位杂交技术,以实现对该病原体的高灵敏性检测与定位,为 EHP 的诊断研究提供一种新的技术手段.

本研究基于 EHP 基因组信息,拟通过克隆和鉴定其 *Septin* 基因,并建立显色原位杂交技术平台,来研究 EhpSeptin 在 EHP 不同增殖阶段的表达模式,以期深入阐明 EhpSeptin 在 EHP 增殖中的潜在作用.

1 材料和方法

1.1 生物材料及试剂

原核表达菌、分子克隆感受态细胞菌株 DH5 α 、ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 购自南京 Vazyme 公司;海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;PCR、限制性核酸内切酶所用试剂购自 TaKaRa 公司;Percoll 试剂购自上海源叶生物科技有限公司;DiaSpin 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、辣根过氧化氢酶 DAB 显色试剂盒购自上海 Sangon Biotech 公司;Chromogenic *in situ* hybridization(CISH)Kit 购自广州 BersinBio 公司;其他试剂配制所需药品均为分析纯.

1.2 EhpSeptin 序列特征和系统发育分析

通过 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 对 EhpSeptin 的理化性质进行分析和预测;利用 SignalP 5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽;利用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 预测跨膜结构域;利用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点;利用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测糖基化位点;利用 NPS@ (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_seccons.html) 预测蛋白质二级结构;使用 DNAMAN 6.0 软件进行氨基酸序列比对,通过 Neighbor-Joining 方法构建进化树.

1.3 EHP 的分离与纯化

取 200 只患严重感染 EHP 的南美白对虾样品,取其肝胰腺组织充分研磨,加超纯水,纱布过滤,筛绢(200 目)过滤,再经 5 μ m 滤芯过滤,滤液在 25 $^{\circ}$ C、2 000 r/min 离心 5 min,9 000 r/min 离心 15 min,取沉淀,加超纯水定容将沉淀重悬,在 8 000 r/min 离心 15 min,经多次差速离心后得到粗提液. 粗提液采用细胞分离液 Percoll 进行密度梯度离心,4800 r/min 离心 40 min 进行进一步纯化. 纯化得到的 EHP 孢子经超纯水充分离心洗涤,最后收集底层白色沉淀即为 EHP 孢子,用超纯水悬浮,-80 $^{\circ}$ C 保存.

1.4 EHP 基因组 DNA 的提取

在 1.5 mL EP 管中加入 1 mL(10^9 个孢子/mL)纯化的 EHP 悬液以及适量氧化锆研磨珠,在研磨机中

6 m/s 研磨 5 次,每次 30 s;研磨间隔期使用液氮速冻处理. 研磨后用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 EHP 的基因组.

1.5 重组表达载体的构建

从本实验室获得的 EHP 基因组数据中挖掘到 EhpSeptin 蛋白基因序列(GenBank 登录号为 OQS55561.1),使用 Primer 5 软件筛选了 EhpSeptin 序列内切酶,利用 CE Design V1.04 软件根据 pET-28a(+) 质粒酶切位点设计引物,引物序列为:

上游引物:5' cagcaaatgggtcgcggatccATGGAAACTGATAGAAATGACGATGT 3';

下游引物:5' gtggtggtggtggtgctcgagTTACTTAATATCAAGCTTCTTTTTTCTCG 3'.

下划线处分别为 *Sac* I 和 *Nhe* I 的酶切位点. 并以 EHP 基因组 DNA 为模板对 EhpSeptin 蛋白基因进行 PCR 扩增. PCR 程序:98 °C 变性 30s;98 °C 变性 10s,60 °C 退火 5s,72 °C 延伸 1min,共 30 个循环;终延伸 10 min.

PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳和测序验证,扩增产物用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Nhe* I 进行双酶切,按照 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 操作说明进行连接反应,连接产物转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* Top 10 感受态细胞,取 100 μ L 已转化的感受态细胞涂布于含卡那霉素的 LB 琼脂固体培养基上,37 °C 过夜培养 16 h. 从平板上挑取单菌落接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中,摇床中 200 r/min 条件下 37 °C 培养 12 h,取 2 μ L 菌液进行 PCR 扩增,经 2% 琼脂糖凝胶电泳判定为阳性的菌液送至南京擎科生物公司进行测序.

1.6 重组蛋白的诱导表达与纯化

将测序正确的重组质粒 pET28a-EhpSeptin 转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞中,以 pET28a(+) 载体质粒作为阴性对照,涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上,37 °C 培养过夜;选择 PCR 鉴定阳性的菌落接种至含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 震荡培养至 OD600 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG,16 °C 培养箱中诱导培养 12 h,取 5 mL 菌液,通过离心收集菌体,用 1 \times PBS 洗涤 3 次,菌体用 200 μ L 1 \times PBS 重悬;冰上超声破碎,4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至新的离心管中,沉淀用 200 μ L 1 \times PBS 重悬;一部分蛋白样品加入 10 mL 20 mmol/L Binding buffer 混匀,按照磁珠法蛋白纯化说明书对重组 EhpSeptin 蛋白进行纯化,并通过 SDS-PAGE 对未纯化和纯化的蛋白进行鉴定.

1.7 多克隆抗体制备及 Western blotting 分析

将 EhpSeptin 蛋白序列提交给南京金斯瑞生物公司,并委托该公司设计抗原,使用蛋白序列中的 CVINGEDEKIKNING 多肽链来免疫新西兰兔,制备多克隆抗体. 取 10 μ L 未纯化的蛋白样品,经过 80 V 30 min、120 V 60 min 电泳分离后,以 80 V 120 min 的条件将电泳分离后的蛋白转移到 PVDF 膜上;将 PVDF 膜浸泡在含有 5% 脱脂奶粉的缓冲液中,在摇床上进行过夜孵育;洗膜后,使用 1:2 000 的 EhpSeptin 多抗(一抗)孵育 2 h;再使用 1:5 000 的兔抗(二抗)孵育 2 h;使用辣根过氧化物酶 DAB 显色试剂盒进行显色,并拍照记录结果.

1.8 组织切片

以人工回感第 1~6 d 的对虾肝胰腺组织为材料,进行组织切片实验,具体方法如下:取回感的对虾肝胰腺组织,将其置于 4% 多聚甲醛固定液中避光固定 24 h. 将固定组织放入包埋盒中,以 1 \times PBS 缓冲液浸泡 6 h,每 2 h 更换一次缓冲液. 之后将包埋盒依次放入 30%、50%、75%、85%、95%、100% 乙醇中进行脱水处理,每种浓度的乙醇各浸泡 40 min,接着依次放入 50% 和 100% 二甲苯溶液中进行透明,时间分别为 30 min 和 15 min. 再依次放入不同温度的切片石蜡中进行浸蜡. 浸蜡后将组织块进行包埋、切片并使用多聚赖氨酸处理的防脱载玻片捞取切片进行烘干,再将烘干的切片依次置于 100% 二甲苯 I、100% 二甲苯 II、100% 乙醇溶液 I、100% 乙醇溶液 II 中进行脱蜡处理,分别浸泡 10 min、10 min、5 min、5 min. 最后将切片依次置于 95% 乙醇溶液 I、95% 乙醇溶液 II、85% 乙醇溶液、75% 乙醇溶液以及 ddH₂O 中进行复水处理,分别浸泡 5 min、5 min、3 min、2 min、2 min.

1.9 CISH

将编码 EhpSeptin 蛋白的基因序列(GenBank 登录号为 OQS55561.1)发送给广州伯信生物科技公司,并委托公司设计合成杂交用探针,序列如表 1 所示.

表 1 CISH 探针合成用引物
Table 1 Primers for CISH probe synthesis

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	目标条带
EhpSeptin	Probe-F	AGGAGTAATGCAGAAAATTACATTTGT	221
	Probe-R	GATCAGATTGTTTTAGACCATATCC	

将已完成脱蜡、复水的组织切片,按照如下步骤进行 CISH 处理:首先需要对样品进行一系列预处理,即先用 3% 双氧水溶液处置样品切片 10 min,灭活组织中的内源性酶活性;然后用原位杂交 PBS 缓冲液洗涤切片,加入胃蛋白酶溶液 37 ℃ 消化 10 min,去除组织中的蛋白成分.经原位杂交、PBS 洗涤后,在 37 ℃ 的条件下进行 3 h 稳温预杂交,更换杂交反应液,75 ℃ 热变性 DNA 双链 5~10 min,迅速转移至 42 ℃ 恒温箱内杂交反应过夜.杂交反应结束后,依次用含甲酰胺和 NP-40 的 SSC 缓冲液洗涤样品切片,以去除非特异杂交产物.然后进行封闭、生物素化二抗反应、链霉亲和素-生物素复合物(SABC)反应、酶显色等步骤.最后用苏木素对细胞核进行染色,封片即可在光学显微镜下观察结果.

2 结果与讨论

2.1 EhpSeptin 蛋白序列分析

利用生物信息学相关软件对 EhpSeptin 进行分析和预测,结果显示该蛋白质由 265 个氨基酸组成,预测蛋白质分子质量为 30.4 kDa,等电点为 4.75,蛋白质的分子质量和等电点通常与其功能和结构密切相关. EhpSeptin 蛋白的平均亲水系数为-0.426,表明它可能具有一定的亲水性. EhpSeptin 蛋白缺乏信号肽和跨膜结构域,由此表明该蛋白可能主要存在于细胞内,而不在细胞膜上,这与一些细胞骨架蛋白或细胞内调节蛋白的性质相符. EhpSeptin 蛋白具有 23 个磷酸化位点,这可能意味着该蛋白在细胞信号传导和调节中扮演着重要的角色. 根据 NPS@ 预测, EhpSeptin 蛋白的二级结构主要由 α 螺旋 (28.68%)、延伸链 (19.25%) 和无规则卷曲 (52.08%) 组成,这些不同的二级结构元素可以影响蛋白的折叠和功能,可能反映了其多功能性.

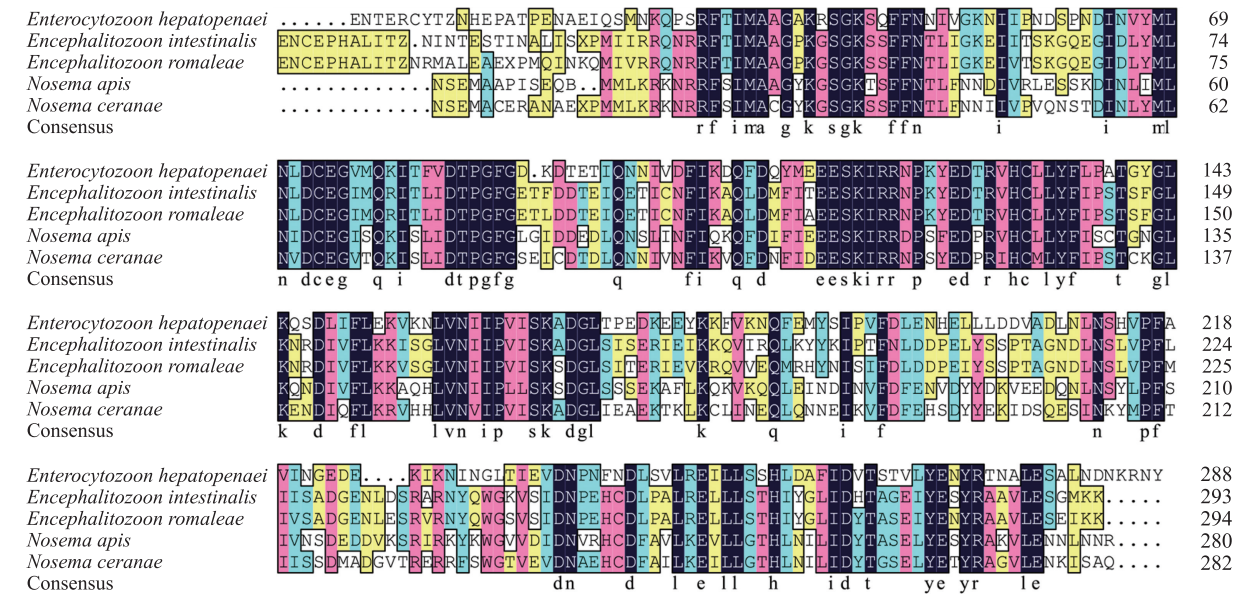


图 1 EhpSeptin 与其他微孢子虫同源蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of EhpSeptin from the *Enterocytozoon hepatopenaei* with homologous proteins from other microsporidians

多重序列比对分析发现, EhpSeptin 与大多数微孢子虫 Septin 序列的相似性超过了 34%, 表明 EhpSeptin 与其他微孢子虫的 Septin 蛋白具有相对较高的保守性,即它们在进化过程中保留了相似的基因序列^[16]. 值得关注的是, EhpSeptin 与肠脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon intestinalis*)、蛭蝓脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon romaleae*)、西方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema apis*) 和东方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*) 之间

的同源性较高,分别为 47.84%、45.85%、42.19% 和 40.86%。由此表明 EhpSeptin 与这些微孢子虫的 Septin 蛋白在基因水平上有较高的相似性,初步推论 EhpSeptin 在 EHP 中功能上与其他微孢子虫有相似之处。

系统发育分析结果显示(图 2),EHP 与 *Encephalitozoon* 属和 *Nosema* 属微孢子虫聚在同一支上。表明 EHP 与上述两属微孢子虫存在较近的进化关系和遗传亲缘性。从系统发育的角度看,三者可能具有一些共同的祖先或共有一定的同源基因,并在漫长的进化过程中保留了某些基本的遗传特征。因此,EHP 与脑炎微孢子虫属和小孢子虫属有着较近的系统发育关联性。

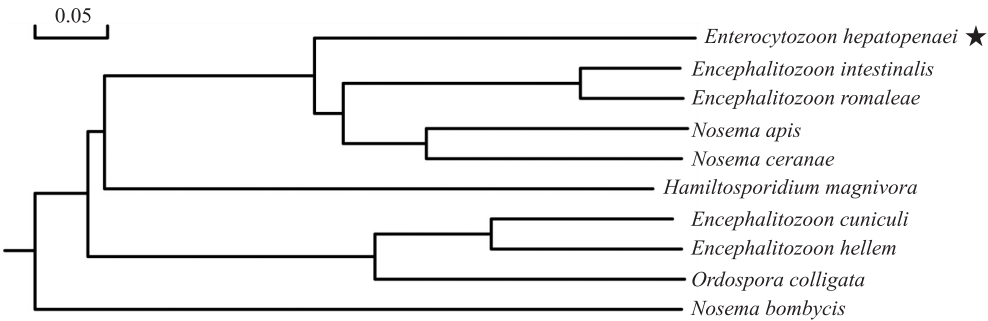
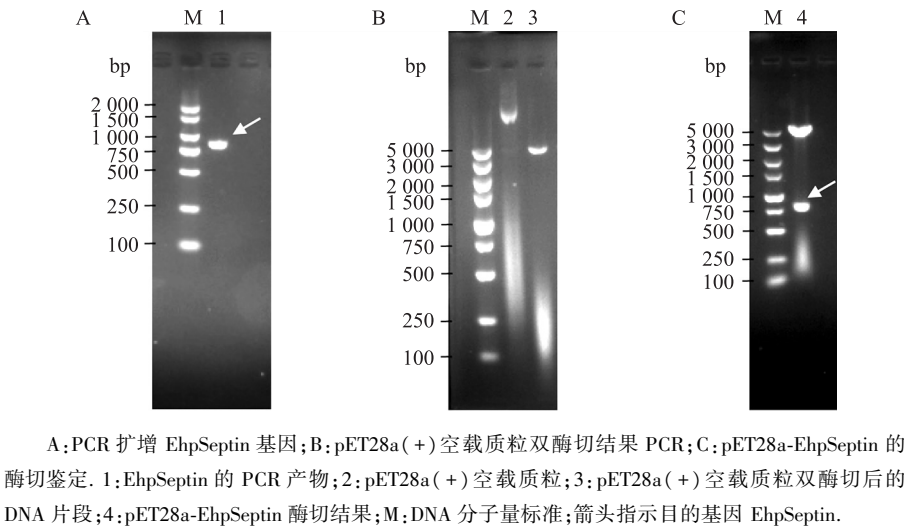


图 2 基于 EHP 与其他微孢子虫 Septin 蛋白氨基酸序列的系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of Septin proteins
from EHP and other microsporidian parasites

2.2 表达载体的构建和鉴定

PCR 扩增结果显示,从 EHP 基因组中成功扩增出了一段 EhpSeptin 基因片段,其长度约为 800 bp (图 3A)。序列分析发现,该片段包含一个完整的 798 bp 开放阅读框,与 NCBI 数据库中已知的 EhpSeptin 基因序列(OQS55561.1)高度一致,验证了所克隆片段的准确性。在重组表达载体的构建过程中,载体双酶切产物呈现两条明显的 DNA 片段,其大小与预期的 EhpSeptin 插入片段及载体片段大小一致(图 3C),这表明,EhpSeptin 基因已经成功插入表达载体并完成了重组载体的构建。



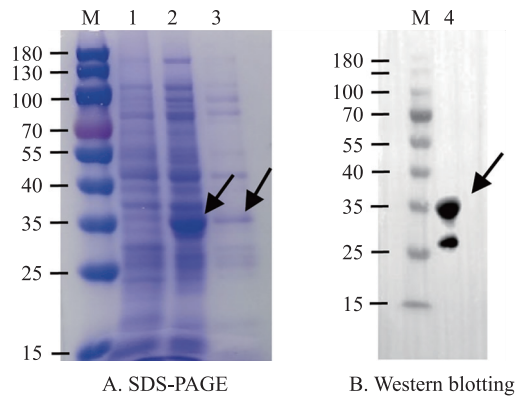
A:PCR 扩增 EhpSeptin 基因;B:pET28a(+)空载质粒双酶切结果 PCR;C:pET28a-EhpSeptin 的酶切鉴定。1:EhpSeptin 的 PCR 产物;2:pET28a(+)空载质粒;3:pET28a(+)空载质粒双酶切后的 DNA 片段;4:pET28a-EhpSeptin 酶切结果;M:DNA 分子量标准;箭头指示目的基因 EhpSeptin。

图 3 原核表达载体 pET28a-EhpSeptin 的构建

Fig.3 Identification of the prokaryotic expression vector pET28a-EhpSeptin

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

SDS-PAGE 检测结果显示,在 IPTG 诱导条件下,重组表达菌中出现一条相对分子质量约为 30 kDa 的明显增强蛋白带(图 4A 泳道 2 箭头所示),而非诱导状态下重组菌中没有此条增强带(图 4A 泳道 1)。纯化后的 EhpSeptin 蛋白在 SDS-PAGE 上的主要检测条带较单一(图 4A 泳道 3),符合纯化蛋白的预期,表明获得了相对纯净的重组蛋白样品。SDS-PAGE 结果验证了 EhpSeptin 重组蛋白的成功表达和纯化,为后续开展 EhpSeptin 的生化特征分析和功能研究奠定了基础。



1:转化 pET28a(+)的菌液蛋白;2,4:转化 pET28a-EhpSeptin 的菌液蛋白;3:转化 pET28a-EhpSeptin 的菌液蛋白经磁珠法纯化;M:蛋白质分子量标准;箭头指示目的蛋白 EhpSeptin.

图 4 重组蛋白 EhpSeptin 的 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant protein EhpSeptin by using SDS-PAGE and Western blotting

2.4 Western blotting

Western blotting 结果显示,所制备的抗 EhpSeptin 抗体能够识别约 30 kDa 的靶标蛋白(图 4B),该条带与 EhpSeptin 预测蛋白大小一致,验证了抗体的特异性.但同时,该抗体也与约 35 kDa 的非特异蛋白发生了交叉反应(图 4B).为了提高结果的可靠性,需要对抗 EhpSeptin 抗体的特异性进一步优化改进,或者调整免疫检测条件以最大限度减少非特异性背景.这对获得准确可信的 EhpSeptin 在组织和细胞内的定位信息至关重要.

2.5 CISH

对阳性和阴性样品的肝胰腺组织进行 CISH 分析结果显示,在阳性样品中,目的基因呈现为棕红色,而细胞核则呈现为深蓝色,这一效果在 40×10 的放大倍数下观察效果最佳,而在阴性样品中未观察到任何阳性信号(图 5).

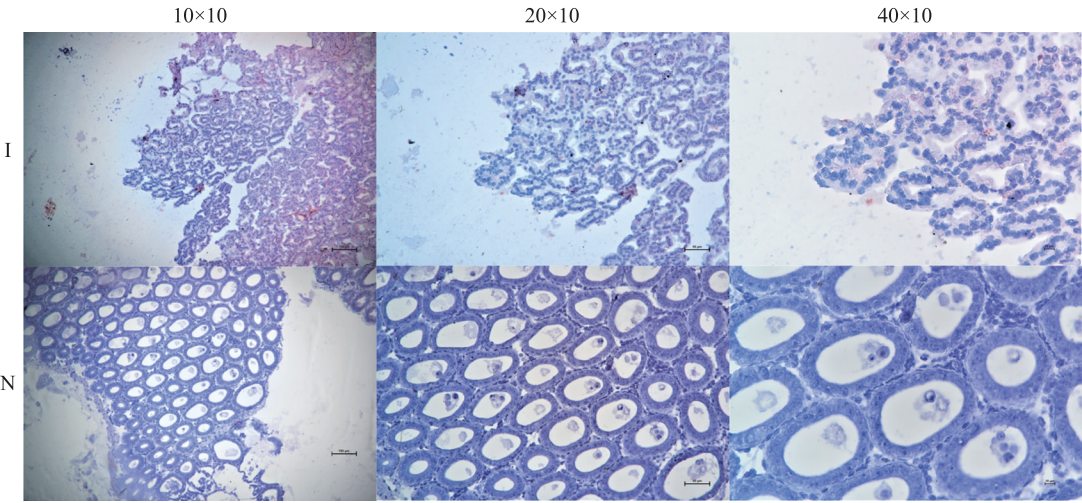
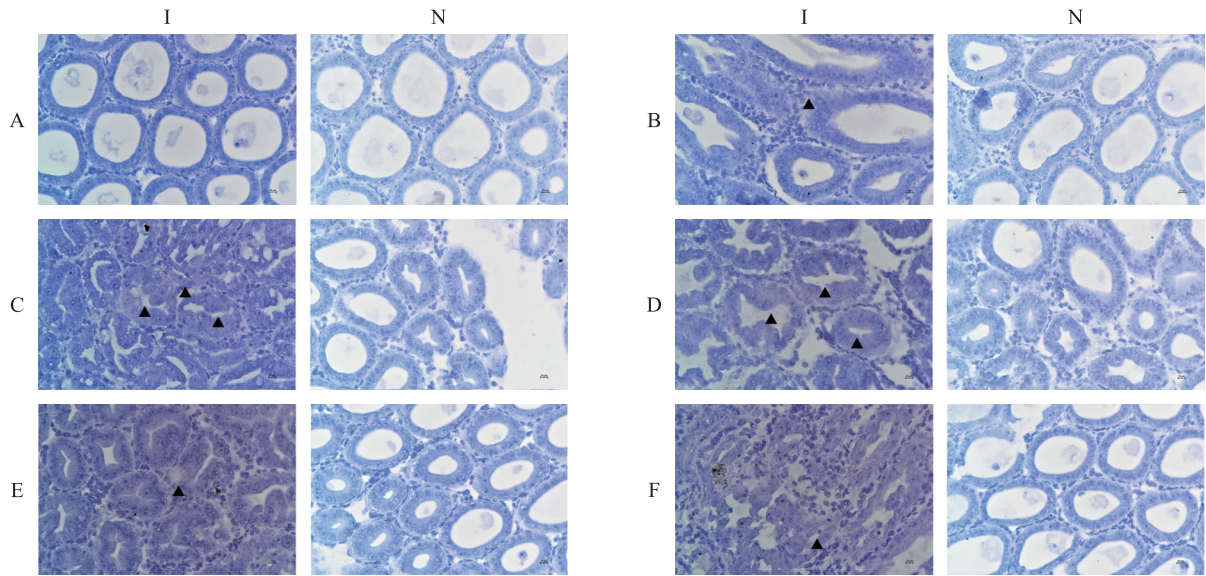


图 5 南美白对虾肝胰腺组织 CISH 结果

Fig. 5 CISH results of hepatopancreas of *Penaeus vannamei*

对回感 EHP 1~6 d 的对虾肝胰腺样品 CISH 分析结果显示,第 1 d 在组织样品中未显示出棕红色区域,这与阴性对照相似(图 6A);在第 2 d 的组织样品中开始出现棕红色区域(标注区域),并且与阳性对照(图 5-I-40×10)相比,判定为阳性信号(图 6B);第 3 d 和第 4 d 的组织样品中可以看到棕红色区域(标注区域)的颜色逐渐加深,同时在视野中覆盖的区域也逐渐增多(图 6C、D);第 5 d 的组织样品中棕红色区域已经占据了大部分视野,并且颜色进一步加深(图 6E);第 6 d 的组织样品出现了明显的病理变化,棕红色区域已经扩展到肝胰腺组织,结构细胞破碎(图 6F).



A、B、C、D、E、F: 第 1~6 d 回感样品;I: 回感组;N: 对照组

图 6 回感样品肝胰腺组织 CISH 结果

Fig. 6 CISH results of hepatopancreatic tissue of sample

2.6 讨论

为了探究 EhpSeptin 在 EHP 增殖中的潜在作用,克隆并预测了 EhpSeptin 的蛋白序列特征. 分析显示, EhpSeptin 蛋白的分子量约为 30kDa,等电点约为 6.4,平均亲水性指数为-0.426,提示其可能具有一定的亲水性. 这些关键的参数与 EhpSeptin 蛋白的功能和结构密切相关^[17]. EhpSeptin 缺乏信号肽序列和跨膜结构域,提示其可能主要定位于细胞内部而非细胞膜上. 既往研究表明,Septin 蛋白可在细胞内组装成丝状结构,并与多种细胞骨架和结构蛋白进行交互作用,在调控细胞形态和运动中发挥关键作用^[18]. 因此, EhpSeptin 作为一种细胞内蛋白,其特定的亲水性可能影响其空间构象以及与其他蛋白的相互作用,进而参与 EHP 的生长周期调控. 此外, EhpSeptin 蛋白序列中存在多处潜在的磷酸化位点,提示其活性可能受到磷酸化调控^[19]. 综上, EhpSeptin 的生物信息学分析为研究其在 EHP 增殖过程中的潜在功能奠定了基础,但其具体作用机制还需进一步的实验验证.

多重序列比对分析发现, EhpSeptin 与肠脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon intestinalis*)、蛭蝓脑炎微孢子虫 (*Encephalitozoon romaleae*)、西方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema apis*) 和东方蜜蜂微孢子虫 (*Nosema ceranae*) 之间的 Septin 蛋白同源性较高,提示 EhpSeptin 与这些微孢子虫的 Septin 蛋白在结构和功能上可能存在共性,可能参与调控类似的细胞骨架动力学过程和细胞周期事件,表示 EHP 与这两个微孢子虫属之间可能存在共同的进化史或共享一些基本的遗传特征.

本研究成功表达且纯化了重组 EhpSeptin 蛋白,并制备了相应抗体. 虽然该抗体存在一定的非特异性识别问题,但已经具备初步应用价值. EhpSeptin 作为 EHP 的特征性病原相关蛋白,其在 EHP 感染和传播过程中可能发挥重要作用,有望成为潜在的治疗或诊断靶点^[20]. 未来将优化 EhpSeptin 抗体的特异性,并利用该分子探针系统地研究 EhpSeptin 在 EHP 生命周期各阶段的表达模式、定位和功能,为开发针对 EHP 感染的新型防治策略提供理论依据和实验基础.

本文构建了以 EhpSeptin 基因片段为探针的 CISH 技术,并对回感 6 d 的肝胰腺样本用 CISH 技术探究 EhpSeptin 基因与 EHP 增殖的关系,结果发现 EhpSeptin 的表达与 EHP 感染后的不同时期相关. 具体而言,感染初期 EhpSeptin 阳性信号不明显,第 2 d 开始出现阳性信号,提示 EhpSeptin 的表达启动;第 3~4 d 阳性信号范围扩大且颜色加深, EhpSeptin 表达持续上调;第 5 d 阳性信号占据主要视野,表达量进一步增加;第 6 d 阳性信号广泛分布,肝胰腺组织结构损伤明显. 这表明 EhpSeptin 的表达水平随感染时间延长而逐步升高,并与 EHP 的增殖过程相关. 这与家蚕微孢子虫中 *Septins* 基因的表达类似, *NbSeptins* 在感染家蚕微孢子虫 1~4 d 的 S9 细胞中的转录特征分析显示其在裂殖增殖期高量转录,并且定位于家蚕微孢子虫的裂殖体膜,这表明这个过程中需要大量的 *NbSeptins* 协助家蚕微孢子虫进行增殖,推测其在家蚕微孢

子虫裂殖增殖中发挥功能^[11]。有报道称 *N. ceranae-PTP3* 和 *N. apis-Rpb1* 基因被证明是这些微孢子虫繁殖的有用工具, *PTP3* 基因表达与其他孢子特异性蛋白相似, 在兔脑炎孢子感染期间的孢子生殖后半期合成^[21-23]; 而 *Rpb1* 与细胞周期 S 期期间蛋白质编码基因的转录^[24] 以及非编码 RNA 的产生直接相关^[25]。研究结果也印证 EhpsSeptin 可能是 EHP 增殖的标志性基因之一。这一发现有助于理解 EHP 在宿主组织内的生长规律及病理效应, 未来研究可针对 EhpsSeptin 设计特异性的小分子抑制剂, 从而阻断 EHP 的增殖过程。这为开发基于 EhpsSeptin 的 EHP 治疗药物奠定了理论基础。在 EhpsSeptin 抑制剂药效评价的基础上, 可以系统优化其结构, 提高特异性和效果, 探索其应用于 EHP 感染治疗的可能性。

3 结论

本文克隆表达了 EHP 的 Septin 蛋白, 解析了其基本生物学特性, 并首次建立了一种以 EhpsSeptin 基因为探针的 CISH 技术, 为研究 EHP 的侵染机制建立了分析平台。结果显示, EhpsSeptin 蛋白由 265 个氨基酸组成, 预测蛋白质分子质量为 30.4 kDa, 等电点为 4.75, 蛋白质的分子质量和等电点通常与其功能和结构密切相关。随着 EHP 的增殖, EhpsSeptin 基因的表达量逐渐增加, 表明了其在裂殖增殖中发挥了重要作用。EhpsSeptin 基因的表达在时间推移中伴随着 EHP 的增殖而逐渐增加, 最终导致宿主组织结构的破坏。由于 EHP 感染过程中 EhpsSeptin 的表达水平持续上调并与 EHP 增殖密切相关, 因此 EhpsSeptin 可能成为 EHP 感染的潜在治疗靶点。

[参考文献]

- [1] TOURTIP S, WONGTRIPOP S, STENTIFORD G D, et al. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporidia: 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] BIJU N, SATHIYARAJ G, RAJ M, et al. High prevalence of *Enterocytozoon hepatopenaei* in shrimps *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* sampled from slow growth ponds in India[J]. Diseases of aquatic organisms, 2016, 120(3): 225-230.
- [4] 施慧, 许文军, 谢建军, 等. 舟山地区大棚凡纳滨对虾生长缓慢病因的调查分析[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 387.
- [5] NEUBAUER K, ZIEGER B. The mammalian septin interactome[J]. Frontiers in cell and developmental biology, 2017, 7(5): 3.
- [6] BYERS B, GOETSCH L. A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast[J]. The journal of cell biology, 1976, 69(3): 717-721.
- [7] NGUYEN T Q, SAWA H, OKANO H, et al. The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis[J]. Journal of cell science, 2000, 113(21): 3825-3837.
- [8] FINGER F P, KOPISH K R, WHITE J G. A role for septins in cellular and axonal migration in *C. elegans*[J]. Developmental biology, 2003, 261(1): 220-234.
- [9] NEUFELD T P, RUBIN G M. The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins[J]. Cell, 1994, 77(3): 371-379.
- [10] 臧晔. 细胞减灭术联合腹腔灌注热化疗对卵巢癌患者免疫功能及血浆 clusterin、septin-9 蛋白表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(3): 673-676.
- [11] 黄俊. 家蚕微孢子虫 NbSeptins 蛋白的鉴定及其特征分析[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [12] 钟筱波. 用荧光原位杂交技术构建高分辨率的 DNA 物理图谱[J]. 遗传, 1997(3): 44-48.
- [13] TANGPRASITTIPAP A, SRISALA J, CHOUWDEE S, et al. The microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*[J]. BMC veterinary research, 2013, 15(9): 1-10.
- [14] TANG K F J, PANTOJA C R, REDMAN R M, et al. Development of *in situ* hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp[J]. Journal of invertebrate pathology, 2015, 130: 37-41.

- [15] TANNER M, GANCBERG D, DI LEO A, et al. Chromogenic *in situ* hybridization; A practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect *HER-2/neu* oncogene amplification in archival breast cancer samples[J]. The American journal of pathology, 2000, 157(5): 1467–1472.
- [16] 唐玉荣. 生物信息学中的序列比对算法[J]. 计算机工程与应用, 2003, 39(29): 5–7.
- [17] PAL S K, PEON J, ZEWAİL A H. Ultrafast surface hydration dynamics and expression of protein functionality; α -Chymotrypsin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(24): 15297–15302.
- [18] MOSTOWY S, COSSART P. Septins; the fourth component of the cytoskeleton[J]. Nature reviews molecular cell biology, 2012, 13(3): 183–194.
- [19] 姜铮, 王芳, 何湘, 等. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 233–237.
- [20] HUANG J, CHEN J, LIU F, et al. Septin homologs cooperating in the proliferative stage of microsporidia *Nosema bombycis*[J]. Journal of invertebrate pathology, 2021, 183: 107600.
- [21] BROSSON D, KUHN L, DELBAC F, et al. Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages[J]. Proteomics, 2006, 6(12): 3625–3635.
- [22] TAUPIN V, METENIER G, DELBAC F, et al. Expression of two cell wall proteins during the intracellular development of *Encephalitozoon cuniculi*: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study with ultrathin frozen sections[J]. Parasitology, 2006, 132(6): 815–825.
- [23] GRISDALE C J, BOWERS L C, DIDIER E S, et al. Transcriptome analysis of the parasite *Encephalitozoon cuniculi*; an in-depth examination of pre-mRNA splicing in a reduced eukaryote[J]. BMC genomics, 2013, 14(1): 1–9.
- [24] 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.
- [25] CHYMKOWITCH P, ENSERINK J M. The cell cycle rallies the transcription cycle; Cdc28/Cdk1 is a cell cycle-regulated transcriptional CDK[J]. Transcription, 2013, 4(1): 3–6.

[责任编辑: 黄 敏]