

Characterization and Immunological Function of Tumor Suppressor Candidate 3 (TUSC3) in Crayfish *Procambarus clarkii*

Yu Xia, Die Liu, Qingqing Liu, Yuanna Cheng, Lin Tang, Baojian Zhu*

College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei Anhui
Email: *zhubaojian@ahau.edu.cn

Received: Nov. 1st, 2019; accepted: Nov. 14th, 2019; published: Nov. 21st, 2019

Abstract

In order to explore the biological function of tumor suppressor candidate 3 in *Procambarus clarkii*, a TUSC3 gene was cloned using PCR and real-time fluorescent quantitative PCR method was used to detect the expression patterns of TUSC3 in various tissues of *P. clarkii* as well as the effect of immune inducer LPS and Poly I:C on the TUSC3 expression level in gut, gill and hemocytes. This gene encoded 326 amino acids with a conserved OST3/OST6 domain and the predicted protein was highly homologous to that in *Penaeus vannamei* (93.25%). PCR test results show TUSC3 was extensively expressed in all examined tissues with the highest expression level in hemocytes and lowest in heart. The expression level of TUSC3 was significantly increased after lipopolysaccharide (LPS) or polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) induction. However, the expression patterns of TUSC3 differed in various tissues. These results suggested that TUSC3 played a role in immune response in *P. clarkii*.

Keywords

Procambarus clarkii, TUSC3, LPS, Poly I:C

克氏原螯虾TUSC3基因的鉴定与免疫功能分析

夏雨, 刘蝶, 刘晴晴, 程远娜, 唐琳, 朱保建*

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥
Email: *zhubaojian@ahau.edu.cn

*通讯作者。

收稿日期：2019年11月1日；录用日期：2019年11月14日；发布日期：2019年11月21日

摘要

为了探究TUSC3 (Tumor suppressor candidate 3)基因在克氏原螯虾中的生物学功能，本研究利用PCR法克隆获得了该基因序列，并采用实时荧光定量PCR技术分析了该基因在克氏原螯虾不同组织中的表达特征以及免疫诱导物(LPS和Poly I:C)对肠、腮和血淋巴细胞中TUSC3基因表达水平的影响。结果表明TUSC3基因编码326个氨基酸，预测蛋白与南美白对虾的TUSC3蛋白同源性较高(93.25%)，包含一个保守的OST3/OST6同源功能区。PCR检测结果显示该基因在被检各组织中均有表达，且在血细胞组织中表达量最高，心脏组织中最低。LPS和Poly I:C刺激后，TUSC3基因的表达量总体表现为上升趋势，但不同组织及不同诱导物之间存在差异。这些结果表明TUSC3基因在克氏原螯虾的免疫反应过程中具有一定功能。

关键词

克氏原螯虾，TUSC3，LPS，Poly I:C

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾，是我国重要的淡水经济养殖虾品种，具有良好的环境适应性和繁殖力强等突出优点[1]。然而由于养殖环境的恶化和水产病害等因素的影响，克氏原螯虾养殖业的发展受到一定程度的制约并导致可观的经济损失。因此，研究克氏原螯虾的免疫反应机制对于提高虾个体的免疫能力及抗病品种的选育等方面具有重要意义。

已有研究表明肿瘤抑制因子在人类癌症的发病机理中起到了关键作用[2]，而 TUSC3 (Tumor suppressor candidate 3)是子宫癌、前列腺癌以及胰腺癌的候选抑癌基因[3] [4] [5] [6]，TUSC3 基因的缺失会导致癌细胞数量增加[7] [8]。虽然肿瘤抑制因子在高等脊椎动物的功能已经得到了广泛研究，但该基因在甲壳类动物中的功能有待于进一步研究。

本实验旨在以克氏原螯虾为材料，克隆鉴定免疫相关基因 TUSC3 并采用荧光定量 PCR 技术研究该基因的组织表达特征和免疫应答模式，为今后进一步探讨克氏原螯虾的先天免疫机制及增强虾的抗病能力提供参考依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

克氏原螯虾(体长 6.0 ± 1.0 cm，体重 9.0 ± 1.0 g)购于合肥市琥珀市场，于室温下循环水系统中采用商业化饲料等暂养一周后再挑取具有活力且健康的个体进行实验[9]。所选个体随机分为三组，每组 21 只。第一组注射 20 μ g LPS (细菌脂多糖)；第二组注射 20 μ g poly I:C (双链 RNA 类似物)；第三组为对照组，注射同体积的 PBS。注射方式采用微量注射器进行腹部注射，注射剂量参考前期研究[10]并加以调整。注射 3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后，分别取血淋巴细胞、肠和鳃组织并提取总 RNA 用于实验分析。

2.2. cDNA 模板的制备

取 100 mg 组织样品放入预冷的研钵中, 加入液氮并迅速研磨成粉状, 利用 Trizol (Takara)法提取组织总 RNA。随后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性并通过核酸微量定量仪(Nanodrop 2000 Thermo Scientific, 美国)检测其浓度和纯度。最后使用 PrimeScriptTMRT Master Mix (Takara)试剂盒合成 cDNA [11]。

2.3. TUSC3 序列的解析

根据课题组之前获得的克氏原螯虾转录组信息[9], 利用 DNASTAR 软件设计特异性的 TUSC3 扩增引物(TUSC3-F1, TCTTGTGGACTTTGATGAGG; TUSC3-R1, GAGCATAGCAACAATGTAGGT), PCR 采用 20 μ l 反应体系, 扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 30 个循环(95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s); 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经纯化后送北京华大基因科技有限公司测序。测序结果采用 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)和 Clustal X [12]程序进行比对分析。

2.4. 实时荧光定量 PCR

运用 Primer premier 5.0 设计定量引物(TUSC3-F2, CAGATTCGTGTGTTCCGTCC; TUSC3-R2, GGCTTGGGTTTTCTGCAGAA), 同时选取 18S rRNA 基因(18S-F, CTGTGATGCCCTTAGATGTT; 18S-R, GCGAGGGGTAGAACATCCAA)作为内参。使用 SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa)试剂盒进行荧光定量 PCR 操作[9], 每个实验设置 3 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量[13]。数据处理采用学生 t 测验或单因素 ANOVA 检验方法, 数值以平均值 \pm 标准差表示, 当 $p \leq 0.05$ 时为差异显著。

3. 实验结果

3.1. TUSC3 序列分析

克氏原螯虾 TUSC3 基因含有一个 981 bp 的 ORF 框, 编码 326 个氨基酸。预测的蛋白大小为 36.76 kDa, 等电点为 6.58, 包含一个与 OST3/OST6 同源的结构功能域(31-321aa)。该 TUSC3 与其他无脊椎动物的 TUSC3 蛋白序列比对结果表明, 克氏原螯虾 TUSC3 与南美白对虾的 TUSC3 同源性最高, 达 93.25%, 其次为美洲钩虾(相似度 76.56%), 其中与其他昆虫的 TUSC3 蛋白序列相似度介于 67%~69%之间(见图 1)。这些结果表明, 克氏原螯虾 TUSC3 在进化上具有一定的保守性。

3.2. TUSC3 基因组织分布情况

取肠、鳃、心脏、肌肉、血细胞及肝胰腺组织, 利用实时荧光定量 PCR 检测 TUSC3 基因的表达特征。TUSC3 在各被检组织中均有表达, 其中在血细胞、肠和肌肉中的表达水平较高, 而在心脏和腮中的表达量较低(见图 2)。

3.3. LPS 刺激对 TUSC3 基因表达水平的影响

为了研究 TUSC3 在克氏原螯虾免疫刺激后的表达模式变化, 本实验采用 LPS 处理克氏原螯虾, 并以 PBS 处理对照组。结果表明(见图 3), LPS 刺激后 3 h 至 24 h 血细胞中 TUSC3 的 mRNA 表达水平显著上调, 其中 12 h 时最高(增加近 10 倍)。肠中 TUSC3 的转录水平在 3 h 至 6 h 时相对于对照无明显变化, 但 9 h 至 72 h 内显著上调。其中 9 h 达到最高(增加约 24 倍), 随后表达量逐渐下降。在鳃中, 9 h 至 72 h 内 TUSC3 的表达水平明显上调, 其中 24 h 达到最高(增加约 19 倍), 但在 3 h 至 6 h 时无明显变化, 与肠中的表达特点相似。以上数据都说明了 TUSC3 可能参与克氏原螯虾的免疫反应。

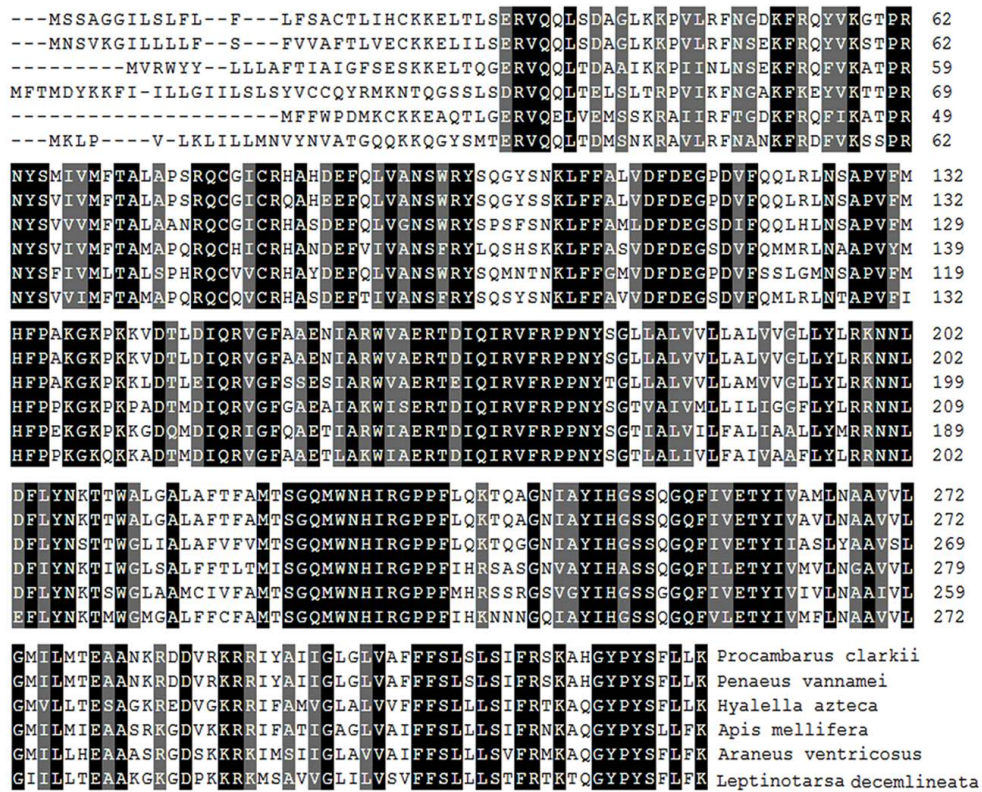


Figure 1. Sequence alignment of *P. clarkii* TUSC3 with other TUSC3 proteins. Identical amino acids were indicated by black and gray represented similar amino acids

图 1. 克氏原螯虾 TUSC3 蛋白序列的同源比对图。相同的氨基酸用黑色表示，相似的氨基酸用灰色表示

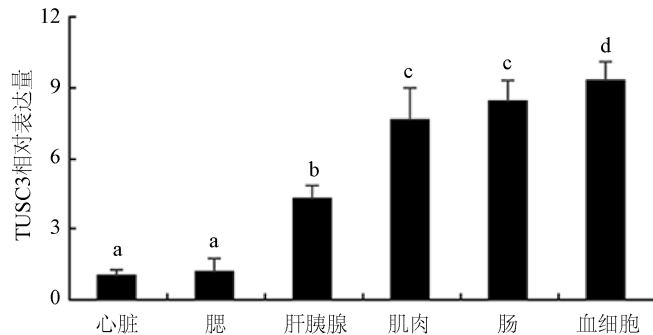
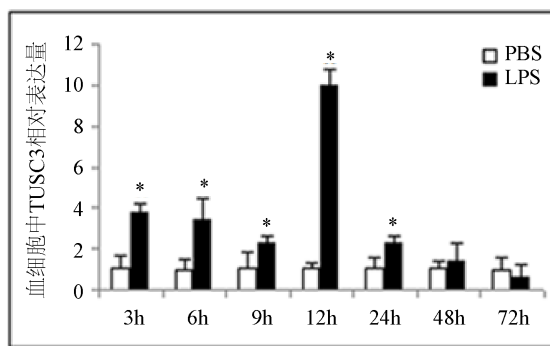


Figure 2. Expression level of *P. clarkii* TUSC3 in various tissues. Bars labeled with different letters are statistically significantly different ($p < 0.05$)

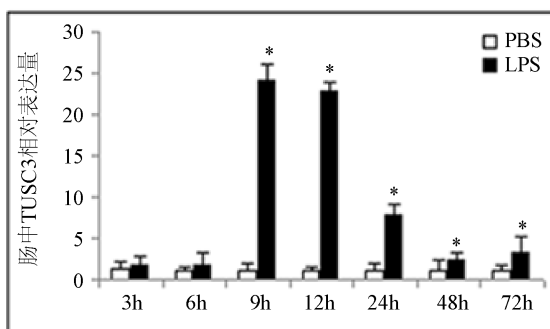
图 2. 克氏原螯虾 TUSC3 的组织表达情况图。不同字母表示不同组织中的表达量存在显著差异($p < 0.05$)

3.4. Poly I:C 刺激对 TUSC3 表达水平的影响

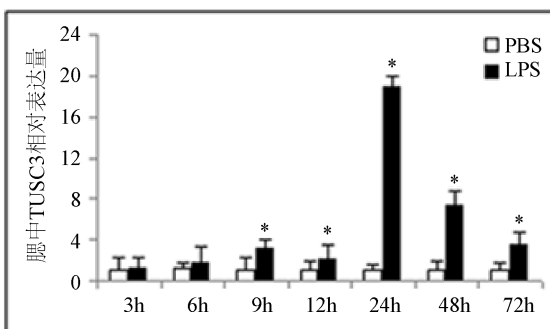
Poly I:C 刺激后 6 h 至 48 h 内血细胞中的 TUSC3 表达水平先升高再下降的趋势，但均高于对照组，其中 12 h 时达最高。在刺激后 3 h 至 12 h 内腮中 TUSC3 的表达量明显增加，其中 9 h 达到最高(增加约 20 倍)，但在 24 h 后明显下降。虽然肠中 TUSC3 表达在 3 h 时表现为上调，但其后发生了显著下降，直至 72 h 时与对照表达水平相近(见图 4)。



(a)



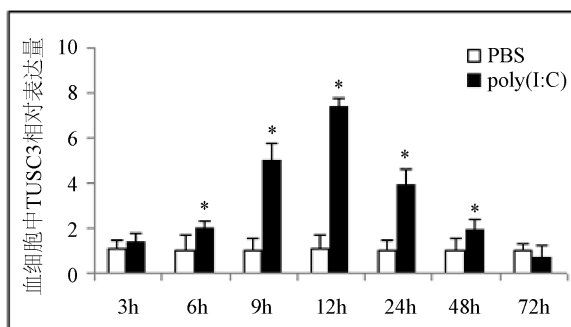
(b)



(c)

Figure 3. Expression pattern of TUSC3 in hemocytes (a), gut (b) and gill (c) stimulated by LPS Asterisks. (*) represent significant differences between control and experimental groups

图3. LPS刺激后TUSC3在血淋巴细胞(a)、肠(b)和腮(c)中的表达情况。星号(*)表示处理组与对照组相比存在差异显著



(a)

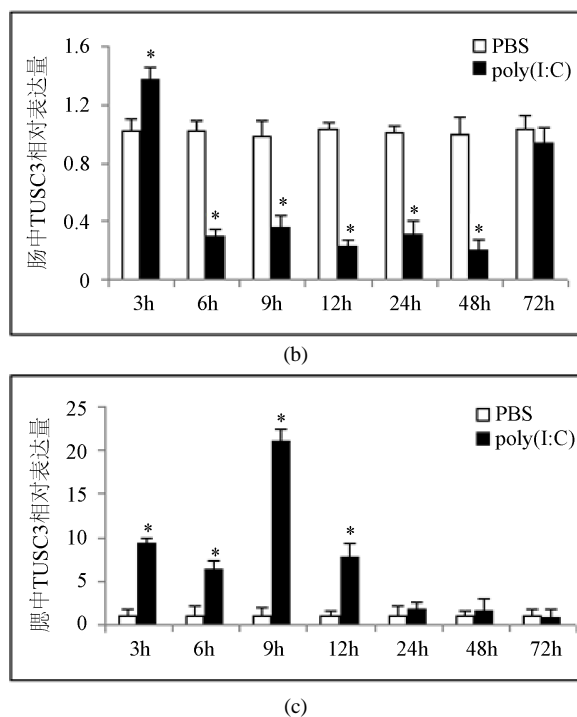


Figure 4. Expression of TUSC3 in hemocytes (a), gut (b) and gill (c) stimulated by poly(I:C). Asterisks (*) represent significant differences between the control and experimental groups

图 4. Poly(I:C)刺激后 TUSC3 在血淋巴细胞(a), 肠(b)和腮(c)中的表达情况。星号(*)表示处理组与对照组相比存在差异显著

4. 讨论

TUSC 基因参与了哺乳动物的细胞凋亡、细胞周期调控及各种蛋白质激酶活化等多种信号通路, 然而关于其在无脊椎动物中的具体生物学功能研究相对较少。本实验以克氏原螯虾为材料, 探讨了其在先天免疫中的功能。

克氏原螯虾 TUSC3 基因编码氨基酸序列与其他虾类和昆虫的 TUSC3 序列同源性较高, 尤其与甲壳类动物中的对虾和钩虾, 这与传统的分类学结果相一致。从 TUSC3 的表达模式上看, 该基因在血淋巴细胞和肠免疫组织中的表达量相对较高, 预示着该基因与克氏原螯虾的免疫应答过程有关。脂多糖(LPS)和聚肌胞苷酸(poly I:C)是重要的病原体模拟分子, 被广泛用于研究动物的免疫应答机理[14]。除 poly I:C 处理后的肠组织外, 处理后的其他组织中的 TUSC3 表达量均表现为上调趋势, 其中以肠和腮的表达量变化较大。相对而言, LPS 诱导的效果好于 poly I:C, 这可能与 TUSC3 参与的信号传导途径的差异有关。虽然 TUSC3 在克氏原螯虾先天免疫应答过程中具有功能, 但其分子激活机制有待阐明。

基金项目

2017 年省级大学生创新创业训练计划项目, 安徽省高校自然科学研究项目[KJ2017A145]。

参考文献

- [1] 余磊. 小龙虾的生物学特性及其主要养殖模式[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(17): 75-78.
- [2] Łukasz, W., Janikowski, T., Bodzek, P., Anita, O. and Urszula, M. (2016) Expression of Tumor Suppressor Genes Related to the Cell Cycle in Endometrial Cancer Patients. *Advances in Medical Sciences*, **61**, 317-324.

<https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.04.001>

- [3] Vašíčková, K., Horak, P. and Vaňhara, P. (2018) TUSC3: Functional Duality of a Cancer Gene. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **75**, 849-857. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2660-4>
- [4] Garshasbi, M., Kahrizi, K., Hosseini, M., Nouri Vahid, L., Falah, M., Hemmati, S., Hu, H., Tzschach, A., Ropers, H.H., Najmabadi, H. and Kuss, A.W. (2011) Clinical Report a Novel Nonsense Mutation in TUSC3 Is Responsible for Non-Syndromic Autosomal Recessive Mental Retardation in a Consanguineous Iranian Family. *American Journal of Medical Genetics*, **155**, 1976-1980. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34077>
- [5] Mohorko, E., Owen, R.L., Malojčić, G., Brozzo, M.S., Aebi, M. and Glock-shuber, R. (2014) Structural Basis of Substrate Specificity of Human Oligosaccharyl Transferase Subunit N33/Tusc3 and Its Role in Regulating Protein N-Glycosylation. *Structure*, **22**, 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.02.013>
- [6] Horak, P., Tomasich, E., Vaňhara, P., Kratochvílová, K., Anees, M., Marhold, M., Lemberger, C.E., Gerschpacher, M., Horvat, R., Sibilia, M., Pils, D. and Krainer, M. (2014) TUSC3 Loss Alters the ER Stress Response and Accelerates Prostate Cancer Growth *in Vivo*. *Scientific Reports*, **4**, Article No. 3739. <https://doi.org/10.1038/srep03739>
- [7] Cherepanova, N.A., Shrimal, S. and Gilmore, R. (2014) Oxidoreductase Activity Is Necessary for N-Glycosylation of Cysteine-Proximal Acceptor Sites in Glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*, **206**, 525-539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404083>
- [8] Lauc, G., Huffman, J.E., Pucic, M., *et al.* (2013) Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLOS Genetics*, **9**, e1003225.
- [9] Zhu, B.J., Tang, L., Yu, Y.Y., Yu, H.M., Wang, L., Qian, C., Wei, G.Q. and Liu, C.L. (2017) Identification of Ecdysteroid Receptor-Mediated Signaling Pathways in the Hepatopancreas of the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology*, **246**, 372-381. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.01.013>
- [10] Sun, Y.X., Tang, L., Gao, J., Feng, Y.Y., Peng, T., Yu, Y.Y., Yang, L.L., Sun, Y. and Zhu, B.J. (2017) A Role of Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101) in Innate Immune Response of Crayfish *Procambarus clarkii*. *Developmental & Comparative Immunology*, **76**, 268-273. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.06.016>
- [11] Feng, Y.Y., Ma, M.L., Zhang, X.J., Liu, D., Wang, L., Qian, C., Wei, G.Q. and Zhu, B.J. (2019) Characterization of Small GTPase Rac1 and Its Interaction with PAK1 in Crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish and Shellfish Immunology*, **87**, 178-183. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.013>
- [12] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- [13] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [14] Reimer, T., Brcic, M., Schweizer, M. and Jungi, T.W. (2008) Poly (I:C) and LPS Induce Distinct IRF3 and NF-Kappa B Signaling during Type-I IFN and TNF Responses in Human Macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, **83**, 1249. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607412>