

草鱼*TP53INP1*基因的克隆及微囊藻毒素对其表达的影响

刘林 周颖 阮记明 梁惜梅 林长高 何丽 隗黎丽

MOLECULAR CLONING OF *TP53INP1* IN GRASS CARP AND ITS EXPRESSION IN RESPONSE TO MICROCYSTINS

LIU Lin, ZHOU Ying, RUAN Ji-Ming, LIANG Xi-Mei, LIN Chang-Gao, HE Li, WEI Li-Li

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.101>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

草鱼*IRE1-like*基因的克隆、组织表达及其对微囊藻毒素-LR的响应

CLONING AND TISSUES EXPRESSION OF INOSITOL-REQUIRING ENZYME 1-LIKE (*IRE1-LIKE*) GENE IN GRASS CARP AND ITS RESPONSE TO MICROCYSTIN-LR

水生生物学报. 2020, 44(6): 1168–1173 <https://doi.org/10.7541/2020.135>

草鱼自噬相关基因*Beclin1*的克隆及其在MC-LR胁迫下的表达特征

CLONING OF *BECLIN1*, AN AUTOPHAGY GENE, AND IT'S EXPRESSION UNDER MICROCYSTIN-LR STRESS IN GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*)

水生生物学报. 2019, 43(3): 479–485 <https://doi.org/10.7541/2019.059>

草鱼和翘嘴*fgfrhl-1*基因的克隆和表达分析

CLONE AND EXPRESSING ANALYSIS OF *FGFRHL-1* IN *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* AND *CULTER ALBURNUS*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1182–1188 <https://doi.org/10.7541/2019.139>

草鱼*TRIM32*基因克隆表达及功能研究

THE PRELIMINARY STUDY ON CLONING, EXPRESSION PROFILES AND FUNCTION OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) *TRIM32*

水生生物学报. 2017, 41(4): 741–747 <https://doi.org/10.7541/2017.92>

草鱼*cadm2b*基因的克隆及在成体组织中的表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSING ANALYSIS OF *CADM2B* IN ADULT TISSUES OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

水生生物学报. 2017, 41(1): 9–17 <https://doi.org/10.7541/2017.2>

赤眼鳟*Mx1*基因的cDNA克隆及表达特性

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION CHARACTERISTICS OF *MX1* GENE IN *SQUALIOBARBUS CURRICULUS*

水生生物学报. 2020, 44(4): 756–763 <https://doi.org/10.7541/2020.091>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2021.2020.101

草鱼 *TP53INP1* 基因的克隆及微囊藻毒素对其表达的影响

刘林 周颖 阮记明 梁惜梅 林长高 何丽 隗黎丽

(江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045)

摘要: 为深入研究肿瘤蛋白p53诱导核蛋白1(Tumor protein 53-induced nuclear protein 1, *TP53INP1*)的结构及其在微囊藻毒素-LR(MC-LR)胁迫下的表达变化,以MC-LR诱导的草鱼(*Ctenopharygodon idella*)肝脏转录组测序获得的unigenes序列为基础,扩增获得了*TP53INP1*基因的cDNA序列(GenBank登录号: MG797689),其中开放阅读框(Open reading frame, ORF)为759 bp,编码252个氨基酸,属于 β 类型,具有4个PEST结构。氨基酸同源性分析结果表明,*TP53INP1*具有较高的保守性,其中与鳊鱼(*Anabarilius grahami*)相似性最高。系统进化分析结果表明其与鳊鱼(*Anabarilius grahami*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等鱼类聚为一大支。采用荧光定量PCR分析发现*TP53INP1*基因在草鱼各组织中广泛分布,其中,在肝脏和血液等组织中表达丰富,显著高于在头肾组织中的表达($P < 0.05$)。采用Western blot检测分析不同剂量(25、75和100 μg MC-LR/kg BW)MC-LR染毒96h后对草鱼肝脏*TP53INP1*蛋白的影响,结果发现草鱼在100 μg MC-LR/kg BW剂量组中染毒96h后表达显著下降($P < 0.05$),暗示*TP53INP1*可能在响应MC-LR胁迫中起着重要作用。研究为进一步了解*TP53INP1*的功能及为深入探讨*TP53INP1*在鱼类响应MC-LR胁迫后的作用机制提供了基础资料。

关键词: 草鱼; *TP53INP1*; 克隆; 表达; 微囊藻毒素-LR

中图分类号: Q786; S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)04-0722-06



肿瘤蛋白p53诱导核蛋白1(Tumor protein 53-induced nuclear protein 1, *TP53INP1*)是p53的靶基因,与肿瘤发生和进展有密切关系^[1]。*TP53INP1*在1990年末先后被3个不同的实验室独立鉴定并报道,最早是在小鼠胸腺中发现,当时命名为胸腺表达酸性蛋白(Thymus-expressed acidic protein, *TEAP*)^[2],随后Tomasini等^[3]在患胰腺炎的小鼠(*Mus musculus*)中发现该蛋白,并将其命名为应激诱导蛋白(Stress-induced protein, *SIP*),同年,Okamura等^[4]发现p53在细胞损伤反应中可诱导一种蛋白大量表达,并将其命名为p53依赖损伤诱导核蛋白1(p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1, *p53DINP1*)。2002年,人类基因组基因命名委员会提出将*TEAP*、*SIP*和*p53DINP1*统一命名为*TP53INP1*。

尽管鱼类*TP53INP1*基因序列在NCBI数据库中已有登录,但没有相关的文章对其分子结构、组织分布及多克隆抗体等进行研究,尤其是缺少环境污

染物对其表达影响的相关研究。微囊藻毒素(Microcystins, MCs)是淡水富营养化过程中最常见的蓝藻毒素,在中国、美国及其他许多国家的水体中都检测到不同水平的MCs污染^[5-7]。MCs结构的变体多达100余种,其中微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, MC-LR)是目前研究最多、毒性最强、危害最严重的一种MCs^[8]。目前,已有大量研究表明,MCs可能是潜在的致癌物^[9],越来越多的流行病学研究也表明,饮用水中MC-LR的污染与人类肝癌的发生密切相关^[10]。根据报道可知MCs促进肿瘤的机制与抑制蛋白磷酸酶(PP1和PP2A)有关^[11],而原癌基因的过表达和抑癌基因的抑制可能与肿瘤发生发展也有关^[9],*TP53INP1*作为一个与肿瘤的发生发展有密切关系的蛋白,研究MC-LR对*TP53INP1*蛋白表达的影响将有助于进一步提高对MC-LR毒性及其潜在的致癌性的认识^[12]。

本研究在前期对草鱼(*Ctenopharygodon idella*)

收稿日期: 2020-05-04; 修订日期: 2020-08-14

基金项目: 国家自然科学基金(31760764和31460146)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760764 and 31460146)]

作者简介: 刘林(1997—),女,在读研究生;研究方向为鱼类免疫学。E-mail: liulinlinjx@163.com

通信作者: 隗黎丽(1976—),女,博士;主要从事鱼类免疫学研究。E-mail: hbliliwei@163.com

转录组测序的基础上^[13], 采用cDNA末端快速克隆技术(RACE), 对草鱼 *TP53INP1* 基因进行克隆, 构建 pET32a-*TP53INP1* 原核表达载体, 表达 TP53INP1 融合蛋白, 同时, 制备了草鱼 TP53INP1 蛋白多克隆抗体, 并采用 Western blot 研究了草鱼 TP53INP1 蛋白在 MC-LR 胁迫下的表达变化, 以期为进一步研究 TP53INP1 蛋白在 MC-LR 致鱼类毒性机制中的作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

间氨基苯甲酸乙酯甲烷磺酸盐(MS-222)购于 Sigma 公司, RNA 提取试剂盒为 Invitrogen 公司产品, 用于 RACE 扩增的 cDNA 反转录试剂盒 Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 及进行 RACE 扩增的 SMARTTM cDNA Amplification Kit 试剂盒购于 Clontech 公司, 逆转录试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 及荧光定量 PCR 的 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 购于 Promega 公司, 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 购自 NEB 公司, 凝胶纯化回收试剂盒、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、*Maker* 等购自 TaKaRa 公司, Bradford 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 所需试剂及组织蛋白抽提试剂盒等购自北京索莱宝, PVDF 膜(0.22 μ m)为 Millipore 公司产品; HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自生工生物工程有限公司, GAPDH(兔抗)购于武汉赛维尔生物科技有限公司, 其他试剂如氯仿、无水乙醇和异丙醇等为中国国药分析纯产品。

1.2 方法

草鱼 *TP53INP1* 基因 cDNA 全长的克隆 根据转录组测序数据获得的草鱼 *TP53INP1* 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计中间片段扩增引物(*TP53INP1*-MF: 5'-ATGTTCCAGAGGTTTACC-3', *TP53INP1*-MR: 5'-TCAGTAGTTGTACTGCCT-3')。分离健康草鱼肝脏, 采用 Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA 模板, 随后用该模板进行 PCR 扩增, 进行胶回收和测序, 比对分析获得草鱼 *TP53INP1* 中间序列。再根据这一序列设计 5'RACE 扩增引物(RC5-1: 5'-GGCC TTCGCTAGATAA-3', RC5-2: 5'-GCCTTGCACC TAGATA-3', RC5-3: 5'-ATCCACTCATCGTCC TCC-3')和 3'RACE 扩增引物(RC3-1: 5'-GAGCAG ACCAAGAACGTCCGCC-3', RC3-2: 5'-CTGTC TCGCAACGCCCTTCGCC-3'), 按照 SMARTTM cDNA Amplification Kit 说明书推荐的反应体系及反应条件进行 5'RACE 和 3'RACE 扩增, 分别获得 5'和

3'末端序列, 再与中间序列拼接得到全长 cDNA 序列。

草鱼 *TP53INP1* 基因序列分析及系统发育树的构建 生物信息学在线工具分析草鱼 *TP53INP1* 基因。在 NCBI(ORF finder, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)上查找开放阅读框, 蛋白质理化性质在 <http://us.expasy.org/tools/protparam.html> 上进行分析, 信号肽预测和跨膜结构分别在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1> 和 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> 上进行分析, 结构域在 <http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search> 上进行分析, PEST 序列在 <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind> 上进行分析。系统发育树则采用 Mega7.0 软件的 NJ 法进行构建, 在建树之前氨基酸序列的比对用 ClustalW1.81 软件。

草鱼 *TP53INP1* 基因的组织表达特征分析 分别取 5 尾健康草鱼[体重: (650 $\pm$ 131.53) g; 体长: (38.24 $\pm$ 2.53) cm; 约 24 月龄], 通过尾静脉采血, 分离肝脏、脾脏、肠道、体肾、头肾、心脏、皮肤、肌肉、鳃和脑提取 RNA, 采用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录。根据获得的草鱼 *TP53INP1* 基因设计荧光定量引物(F: 5'-TCAAC GAGAAGGAGGAGGACGA-3', R: 5'-CAGAGAG GAGCAGGAGGAGCAG-3'), 使用 quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) 方法检测草鱼 *TP53INP1* 在不同组织中的表达水平。qRT-PCR 采用 CFX96 TouchTM Real-Time PCR Detection System, 15 μ L 反应体系包括: 7.5 μ L SYBR Green Real-time PCR Master Mix, 2.0 μ L cDNA 模板(10 倍稀释), 上下游引物各 0.3 μ L (10 μ mol/L) 和 4.9 μ L ddH₂O。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 3min; 95 $^{\circ}$ C 10s, 58 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。以草鱼 β -actin(F: 5'-CACTGTGC CCATCTACGA-3', R: 5'-CCATCTCCTGCTC GAAGTC-3')作为内参基因进行校正, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *TP53INP1* 基因的相对表达量。

草鱼 *TP53INP1* 原核表达载体构建及多克隆抗体制备 选择重组表达蛋白表达载体 pET-32a, 对载体和 *TP53INP1* 的序列的限制性酶切位点进行分析, 选择 *EcoR* I 和 *Xho* I 作为载体构建的连接位点, 在 *TP53INP1* 的 141—242aa 这段序列内设计添加 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点(下划线标出)的引物(F: 5'-CGGAATTCAGCCCTCGTCAACGAC CA-3', R: 5'-CCGCTCGAGGTAGTTGTACTGCC TCTG-3')。目的片段与 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 随机挑选菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。提取测序正确的 pMD18-T-*TP53INP1* 和 pET-32a 载体质粒, 分别用 *EcoR* I 和

Xho I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测, 酶切产物经纯化后, 将 *TP53INP1* 连接至 pET-32a 载体, 将连接产物 pET-32a-*TP53INP1* 转化至 BL21 中, 挑选阳性菌落再次测序验证, 获得 pET-32a-*TP53INP1* 原核表达载体。将测序正确的菌液继续培养, 加入 0.8 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 在 37℃ 诱导 4h, 将诱导完的菌液用超声波破碎, 分离上清与沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析, 然后将从上清获得的蛋白进行纯化。随后通过皮下注射纯化的重组蛋白免疫新西兰兔子, 共免疫 4 次 (分别于第 1、第 12、第 26 和第 40 天注射), 兔子于第一次免疫 76d 后采血获得抗血清, 抗血清用 pET-32a-*TP53INP1* 作为抗原亲和纯化, 随后将获得的抗体按 1:1000 稀释进行抗体特异性检测分析, 剩余的抗体置于 -80℃ 保存备用。

微囊藻毒素对草鱼 *TP53INP1* 蛋白的影响 购买的健康草鱼 [体重: (22.13±2.17) g; 体长: (12.09±1.33) cm, 约 5 月龄] 在实验室暂养 2 周后分组注射 MC-LR, 剂量分别为 25、75 和 100 μg MC-LR/kg BW, 对照组每尾草鱼经腹腔注射等量的 0.80% 的生理盐水。在注射 MC-LR 96h 后, 分别从实验组和对照组中各取 3 尾鱼分离肝脏提取蛋白。蛋白样品经 12% SDS-PAGE 电泳后, 采用电转移系统转移至 PVDF 膜 (Millipore) 上, 于 5% 的脱脂牛奶中封闭 2h。加入 1:1000 稀释的一抗 [上述制备的 *TP53INP1* 抗体或内参兔多抗 GAPDH (武汉博士德生物工程有限公司)], 4℃ 孵育过夜。次日将膜取出后, 用 TBST (武汉塞维尔生物科技有限公司) 洗涤 3 次 (每次 10min), 然后在 1:3000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗兔的二抗 (武汉塞维尔生物科技有限公司) 中孵育, 再次用 TBST 洗涤 3 次 (每次 10min), 采用 ELC (武汉塞维尔生物科技有限公司) 化学发光法检测并拍照。采用 AlphaEase FC 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.3 数据分析

实验数据均以平均值±标准差表示, 并采用 One-way ANOVA (SPSS 16.0) 进行分析, 统计学显著性水平设定 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 草鱼 *TP53INP1* 基因全长 cDNA 序列特征分析

克隆获得草鱼 *TP53INP1* 基因全长 1154 bp, 包括 5' 非编码区和 3' 非编码区, 分别为 179 和 216 bp, 开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 为 759 bp, 其在 GenBank 上的登录号为 MG797689。对其编码氨基酸序列预测分析, 发现草鱼 *TP53INP1* 编码 252 个氨基酸, 属于 β 类型, 分子量为 27.72 kD, 理论等电点为

5.13。采用 signalP4.1 和 InterPro 在线分析表明草鱼 *TP53INP1* 蛋白质没有信号肽和跨膜结构。使用 Epestfind 在线软件预测分析发现草鱼 *TP53INP1* 蛋白存在 4 个 PEST 结构 (Poor), 得分低于阈值 (5.0), 分别位于 14—39、53—79、101—125 和 125—142aa 处。

2.2 草鱼 *TP53INP1* 氨基酸同源性与系统进化分析

草鱼 *TP53INP1* 氨基酸序列与鲤形目鲤科的鳊浪白鱼 (*Anabarilius grahami*) 相似性和一致性分别达到了 99% 和 98%, 与斑马鱼 (*Danio rerio*) 的相似性和一致性分别达到了 93% 和 96%, 与人 (*Homo sapiens*) 和小鼠 *TP53INP1* α 型的相似性分别达到了 63% 和 58%、与 β 型的相似性分别为 59% 和 55%。

构建的系统进化树结果 (图 1) 显示, 草鱼 *TP53INP1* 与鱼类的 *TP53INP1* 的 β 类型聚为一大支, 哺乳动物 *TP53INP1* 的 α 和 β 类型聚为一支。其中, 草鱼 *TP53INP1* 蛋白与鳊浪白鱼的 *TP53INP1* 亲缘关系最近。

2.3 草鱼 *TP53INP1* 基因组织分布特征分析

qRT-PCR 分析发现 *TP53INP1* 基因在所有检测的组织中均有表达 (图 2), 在肝脏中的表达量最为丰富, 其次为血液和肠道等, 在头肾中表达量相对较低。 *TP53INP1* 基因在肝脏中的表达量相对于头肾表达量的倍数为 27.83, 显著高于在头肾中的表达量 ($P<0.05$), 此外, *TP53INP1* 基因在血液 (22.04 倍)、肠道 (20.81 倍)、心脏 (16.56 倍)、肌肉 (16.50 倍) 和鳃 (13.64 倍) 中的表达量也显著高于在头肾中的表达量 ($P<0.05$)。

2.4 草鱼 *TP53INP1* 融合蛋白的表达与纯化

SDS-PAGE 检测分析, 发现在 39 kD 左右位置产生目的蛋白条带 (图 3)。再通过可溶性分析, 发

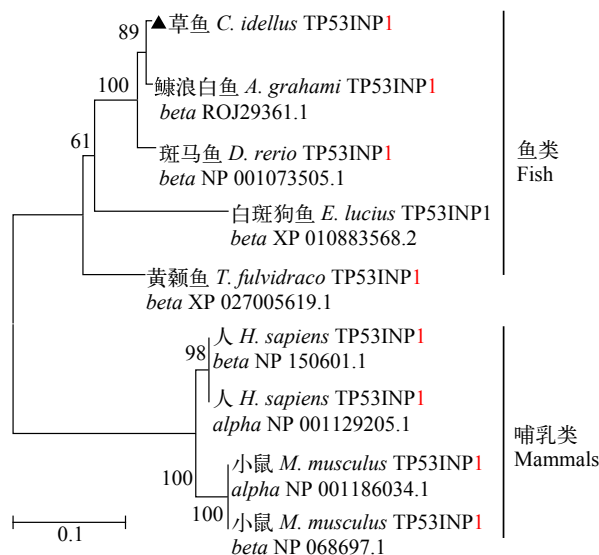


图 1 *TP53INP1* 的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *TP53INP1*

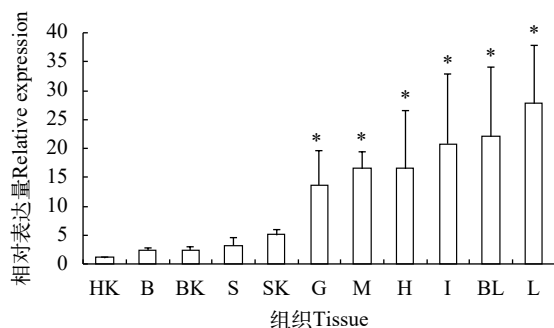


图2 草鱼TP53INP1基因在不同组织中的表达

Fig. 2 The expression of TP53INP1 gene in different tissues of grass carp

HK、B、BK、S、SK、G、M、H、I、BL和L分别代表头肾、脑、体肾、脾脏、皮肤、鳃、肌肉、心脏、肠道、血液和肝脏

HK, B, BK, S, SK, G, M, H, I, BL and L represent head kidney, brain, body kidney, spleen, skin, gill, muscle, heart, intestine, blood and liver, respectively

现该蛋白在上清中表达,也可以包涵体的形式存在。上清经过标签纯化后,获得的蛋白浓度为3 mg/mL。

2.5 草鱼TP53INP1多克隆抗体的免疫鉴定

采血收集血清,获得草鱼TP53INP1的多克隆抗体,进行Western blot分析,得到1条约39 kD的条带与预期蛋白大小一致,表明本研究获得的草鱼TP53INP1多克隆抗体具有一定的特异性(图4)。

2.6 微囊藻毒素-LR对草鱼肝脏TP53INP1蛋白表达的影响

Western blot检测发现草鱼TP53INP1蛋白在100 µg MC-LR/kg BW剂量组中显著抑制,其他剂量组也有不同程度的抑制(图5A)。以AlphaEase FC软件对蛋白条带进行分析发现,对照组、25 µg MC-LR/kg BW剂量组、75 µg MC-LR/kg BW剂量组和100 µg MC-LR/kg BW剂量组中TP53INP1蛋白相对于内参蛋白GAPDH的表达量分别为0.59倍、0.57倍、0.44倍和0.07倍,其中,TP53INP1蛋白在100 µg MC-LR/kg BW剂量组中的表达相对于对照组中的表达差异显著($P < 0.05$; 图5B)。

3 讨论

TP53INP1由Okamura等^[2]在小鼠的胸腺中首次发现并报道后,其他学者进一步研究发现,TP53INP1基因被选择性剪切后,有2种转录本,可编码2种不同蛋白异构体,分别为TP53INP1 α 和TP53INP1 β (分子量分别为18和27 kD)^[3]。根据结构和分子量分析可知,本研究获得的TP53INP1基因属于 β 类型。但有研究表明, α 和 β 类型TP53INP1在功能上差别不大^[14]。TP53INP1氨基末端部分包含

一个异常的PEST序列,具有短寿命的蛋白质的特征^[3,4]。PEST序列是指富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)残基。根据PEST序列假说,含有该序列的蛋白质在细胞内可能通过由蛋

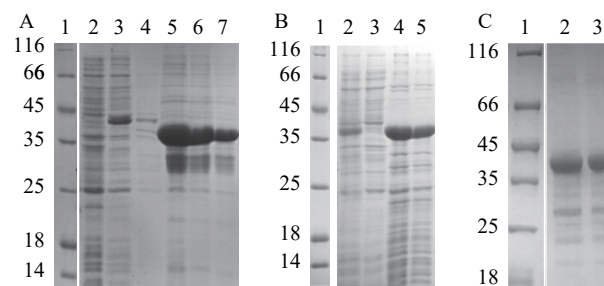


图3 草鱼TP53INP1重组蛋白的表达及纯化

Fig. 3 Expression and purification of the recombinant TP53INP1 in grass carp

A. 重组TP53INP1蛋白的表达; B. 重组TP53INP1蛋白上清液的表达和纯化; C. pET-32a-TP53INP1融合蛋白的亲纯化; 图A: 1. Marker; 2. pET-32a 空载体诱导表达; 3. 上清; 4. 上清(2 mol/L 尿素溶解包涵体); 5. 包涵体2倍稀释(8 mol/L尿素溶解包涵体); 6. 包涵体5倍稀释(8 mol/L尿素溶解包涵体); 7. 包涵体10倍稀释(8 mol/L尿素溶解包涵体); 图B: 1. Marker; 2. 上清; 3. 流穿液; 4. 2倍稀释的纯化上清重组蛋白; 5. 5倍稀释的纯化上清重组蛋白; 图C: 1. Marker; 2. 5倍稀释的pET-32a-TP53INP1; 3. 10倍稀释的pET-32a-TP53INP1

A. The expression of recombinant TP53INP1 protein; B. Expression and purification of recombinant TP53INP1 protein in the supernatant; C. The expression of recombinant pET-32a-TP53INP1 protein. Fig. A: 1. Marker; 2. induced expression of pET-32a; 3. Supernatant; 4. Supernatant (inclusion bodies after induction using 2 mol/L urea solutions); 5. Inclusion bodies diluted in two-folds using 8 mol/L urea solutions; 6. Inclusion bodies diluted in five-folds using 8 mol/L urea solutions; 7. Inclusion bodies diluted in ten-folds using 8 mol/L urea solutions. Fig. B: 1. Marker; 2. Supernatant; 3. Flow-through of liquid; 4. Purified supernatant diluted in two-folds; 5. Purified supernatant diluted in five-folds. Fig. C: 1. Marker; 2. Recombinant of pET-32a-TP53INP1 diluted in five-folds; 3. Recombinant of pET-32a-TP53INP1 diluted in ten-folds

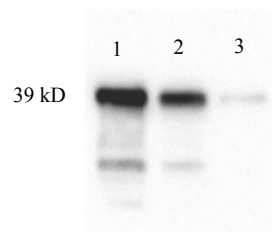


图4 Western blot检测草鱼TP53INP1多克隆抗体的特异性

Fig. 4 The specificity of anti-TP53INP1 polyclonal antibody by western blot

1、2和3分别为10、5和1 ng/mL的抗原,抗体稀释比例为1:1000
1, 2 and 3 lanes represent 10, 5 and 1 ng/mL antigen, respectively, and the antibody dilution ratio was 1:1000

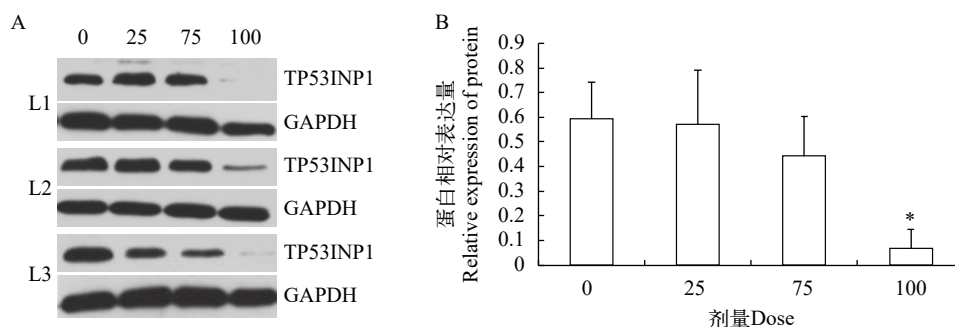


图5 微囊藻毒素-LR对草鱼肝脏TP53INP1蛋白表达的影响

Fig. 5 The effect of MC-LR on the expression of liver TP53INP1 protein from grass carp

A. 微囊藻毒素-LR诱导草鱼TP53INP1的Western blot分析, 其中L1、L2和L3分别代表第一、第二和第三条草鱼的肝脏, 0、25、75和100分别代表MC-LR的剂量($\mu\text{g MC-LR/kg BW}$); B. 采用AlphaEase FC软件对蛋白条带进行定量分析

A. Western blot of TP53INP1 induced by microcystin-LR. L1, L2 and L3 represent three different grass carp liver, and 0, 25, 75 and 100 represent the dose of MC-LR ($\mu\text{g MC-LR/kg BW}$). B. The proteins were quantified using AlphaEase FC software

白体或钙蛋白酶介导的途径进行降解, 因此胞内半衰期较短^[15]。采用Epestfind在线软件预测时, 有效的PEST结构依据分值高低可分为PEST motif (Symbols)、Potential(+++++)和Poor(00000)三类, 草鱼TP53INP1的PEST序列的预测结果显示其存在4个Poor PEST, 即不存在明显的PEST结构, 这与哺乳动物的TP53INP1的特征不太一致^[3, 4]。但与ExPASy在线序列分析工具(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)分析的结果比较吻合, 其预测结果显示TP53INP1在哺乳动物中的半衰期为30h, 在酵母和大肠杆菌中的半衰期分布大于20h和10h, 不稳定指数为66.33, 这说明TP53INP1在草鱼中具有稳定的胞内结构。

分析TP53INP1在不同组织中的分布特征发现, 该基因在草鱼中广泛表达, 在肝脏、血液、肠道、心脏、肌肉和鳃等组织中表达比较丰富, 而在头肾等其他组织中表达较低。这与TP53INP1在哺乳动物中的组织表达分布不太一致, Tomasini等^[3]研究发现TP53INP1基因在健康大鼠胸腺、心脏和睾丸表达丰富, 而在胰腺和胃中表达低, 这可能与不同的物种有关。

TP53INP1蛋白在肿瘤中的作用与肿瘤类型相关, 其既能促进肿瘤的发生发展, 也能抑制肿瘤细胞的增殖^[1]。但更多的研究证明TP53INP1是一个抑癌蛋白, 可抑制肿瘤的发展, 如有研究发现TP53INP1蛋白表达缺失可引起其他促肿瘤过程, 如肝脏细胞中诱导上皮细胞间质转型和肿瘤干细胞^[16], 因此, TP53INP1蛋白的表达在肿瘤细胞中可能发挥肿瘤抑制功能。TP53INP1蛋白在大多数肿瘤组织中表达会下调, 如在人类的食管癌^[17]和胃癌^[18]等中表达降低。最近有研究表明, TP53INP1蛋白在人类的肝癌组织中表达也明显下降, 并建议将

TP53INP1蛋白作为诊断肝癌的一个指标^[1]。在我们先前对斑马鱼的研究发现, TP53INP1蛋白在MC-LR染毒6h后, 其在肝脏中表达明显上调, 随着时间的延长, 其表达逐渐下降^[19]。本研究通过实验室制备的TP53INP1蛋白多克隆抗体, 采用Western blot检测分析经MC-LR诱导96h后的草鱼肝脏蛋白, 发现TP53INP1蛋白在25和75 $\mu\text{g MC-LR/kg BW}$ 剂量组表达变化不明显, 但在100 $\mu\text{g MC-LR/kg BW}$ 剂量组中的草鱼肝脏TP53INP1蛋白明显下调, 这与转录组测序的结果也是一致的(未发表数据), 但TP53INP1蛋白是否与MC-LR促进了肝癌的发生从而导致其表达下降还需要进一步的实验进行验证。研究抑癌基因表达的变化, 有助于提高对MC-LR毒性及其潜在的致癌性的认识^[12], 因此, 今后对TP53INP1蛋白与MC-LR诱导肿瘤产生的关系及调控机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Deng Y, Li A M, Zhao X M, *et al.* Downregulation of tumor protein 53-inducible nuclear protein 1 expression in hepatocellular carcinoma correlates with poor prognosis [J]. *Oncology Letters*, 2017, **13**(3): 1228-1234.
- [2] Carrier A, Nguyen C, Victorero G, *et al.* Differential gene expression in CD3 epsilon- and RAG1-deficient thymuses: definition of a set of genes potentially involved in thymocyte maturation [J]. *Immunogenetics*, 1999, **50**(5-6): 255-270.
- [3] Tomasini R, Samir A A, Vaccaro M I, *et al.* Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(47): 44185-44192.
- [4] Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, *et al.* p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis [J]. *Molecular Cell*, 2001, **8**(1): 85-94.

- [5] Cao Q, Steinman A D, Wan X, *et al.* Bioaccumulation of microcystin congeners in soil-plant system and human health risk assessment: a field study from Lake Taihu region of China [J]. *Environmental Pollution*, 2018(240): 44-50.
- [6] Beversdorf L J, Rude K, Weirich C A, *et al.* Analysis of cyanobacterial metabolites in surface and raw drinking waters reveals more than microcystin [J]. *Water Research*, 2018(140): 280-290.
- [7] Tokodi N, Drobac D, Meriluoto J, *et al.* Cyanobacterial effects in Lake Ludoš, Serbia-Is preservation of a degraded aquatic ecosystem justified [J]? *Science of the Total Environment*, 2018(635): 1047-1062.
- [8] Puddick J, Prinsep M R, Wood S A, *et al.* High levels of structural diversity observed in microcystins from Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners [J]. *Marine Drugs*, 2014, **12**(11): 5372-5395.
- [9] Svircev Z, Baltić V, Gantar M, *et al.* Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 2010, **28**(1): 39-59.
- [10] Zheng C, Zeng H, Lin H, *et al.* Serum microcystin levels positively linked with risk of hepatocellular carcinoma: A case-control study in southwest China [J]. *Hepatology*, 2017, **66**(5): 1519-1528.
- [11] Yoshizawa S, Matsushi R, Watanabe M F, *et al.* Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity [J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1990, **116**(6): 609-614.
- [12] Zegura B, Straser A, Filipič M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins-a review [J]. *Mutation Research*, 2011, **727**(1-2): 16-41.
- [13] Wei L L, Liu Y, Zhong S W, *et al.* Transcriptome analysis of grass carp provides insights into the immune-related genes and pathways in response to MC-LR induction [J]. *Aquaculture*, 2018(488): 207-216.
- [14] Saadi H, Seillier M, Carrier A. The stress protein $TP53INP1$ plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis [J]. *Biochimie*, 2015(118): 44-50.
- [15] Zhuang X, Northup J K, Ray K. Large putative PEST-like sequence motif at the carboxyl tail of human calcium receptor directs lysosomal degradation and regulates cell surface receptor level [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, **287**(6): 4165-4176.
- [16] Liu F, Kong X, Lü L, *et al.* TGF- β 1 acts through miR-155 to downregulate $TP53INP1$ in promoting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes [J]. *Cancer Letters*, 2015, **359**(2): 288-298.
- [17] Weng W, Yang Q, Huang M, *et al.* c-Myc inhibits $TP53INP1$ expression via promoter methylation in esophageal carcinoma [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, **405**(2): 278-284.
- [18] Jiang P H, Motoo Y, Garcia S, *et al.* Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, **12**(5): 691-696.
- [19] Wei L L, Hoole D, Sun B J. Identification of apoptosis-related genes and transcription variations in response to microcystin-LR in zebrafish liver [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2014, **30**(9): 777-784.

MOLECULAR CLONING OF $TP53INP1$ IN GRASS CARP AND ITS EXPRESSION IN RESPONSE TO MICROCYSTINS

LIU Lin, ZHOU Ying, RUAN Ji-Ming, LIANG Xi-Mei, LIN Chang-Gao, HE Li and WEI Li-Li

(College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to investigate its structure and expression changes induced by microcystin-LR (MC-LR), the cDNA sequence of $TP53INP1$ was amplified by using rapid-amplification of cDNA ends (RACE) (GenBank accession number: MG797689). $TP53INP1$ was 1154 bp in length, containing a 216 bp 3' untranslated region (UTR) and a 759 bp open reading frame that encodes a protein of 252 amino acids. $TP53INP1$ of grass carp belongs to the type β subgroup and possesses four PEST motifs. The maximum identity between the derived $TP53INP1$ of grass carp and *Anabarrilius graham* $TP53INP1$ was 98%, and the maximum identity with *Homo sapiens* $TP53INP1\alpha$ and $TP53INP1\beta$ were 58% and 55%, respectively. Phylogenetic analyses showed that $TP53INP1$ fell into well-supported clades with *Anabarrilius graham*, *Danio rerio* and other teleost. The results of qRT-PCR revealed that $TP53INP1$ gene was ubiquitously expressed in all examined tissues of healthy grass carp, and it was highly expressed in liver, blood and other tissues, and its relative expression was significantly higher than that in the head kidney ($P < 0.05$). The livers of grass carp injected with the dose of 25 μg MC-LR/kg BW, 75 μg MC-LR/kg BW and 100 μg MC-LR/kg BW were analyzed by Western blot. $TP53INP1$ protein was significantly down-regulated in the 100 μg MC-LR/kg BW group at 96h ($P < 0.05$) compared with control group with a fold change of 0.07. These results provide a basis for further research on the function of $TP53INP1$ and its mechanism in response to MC-LR.

Key words: Grass carp; $TP53INP1$; Cloning; Expression; Microcystin-LR