

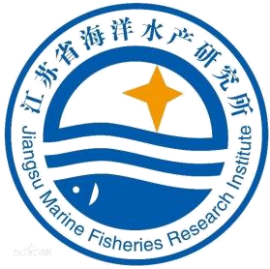
2022年中国水产学会青年学术年会



黑鲟冷诱导RNA结合蛋白的基因克隆及功能研究

卫明亮^{1,2}, 张志伟^{1,2}, 王月^{1,2}, 张志勇²

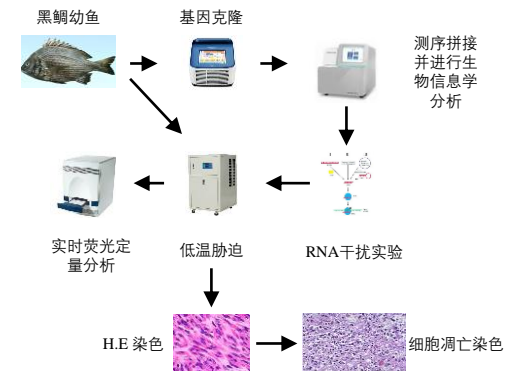
(1.水产科学国家级实验教学示范中心, 上海海洋大学, 上海 201306; 2. 江苏省海洋水产研究所, 南通 226007)



摘要

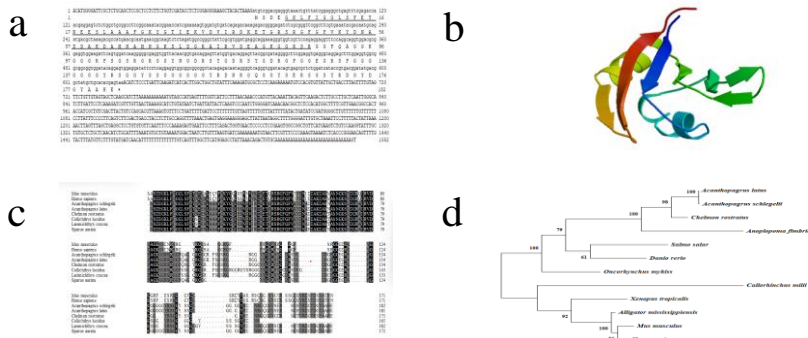
近年来, 黑鲟在中国的水产养殖业中越来越受欢迎。然而, 黑鲟在遗传育种过程中产生的不耐低温和自然越冬期的低存活率是限制商业养殖发展的主要问题。黑鲟低温响应机制目前仍是未知。冷诱导RNA结合蛋白(CIRBP)是在低温环境下生物机体响应的标志基因, 但关于它在鱼类低温反应机制中的分子特征、表达和功能的信息很少。本研究成功地从黑鲟中克隆出*cirbp*基因的cDNA全长序列(1552bp), 分别编码182个氨基酸的多肽。实时荧光定量PCR表明: *cirbp* 基因在黑鲟的肝脏中表达量最高, 在冷应激和冷驯化条件下有不同的调控模式。RNA干扰结果显示: 抑制黑鲟肝脏中*cirbp*基因的表达会导致黑鲟的肝脏在低温下的组织结构损伤和细胞凋亡现象加重。在细胞凋亡相关基因的研究中发现*cirbp*通过线粒体凋亡途径在低温下黑鲟的肝脏细胞凋亡中发挥重要作用。

方法



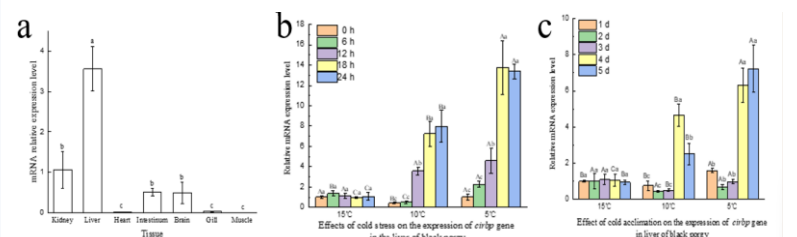
结果

1. *cirbp*基因的生物信息学分析



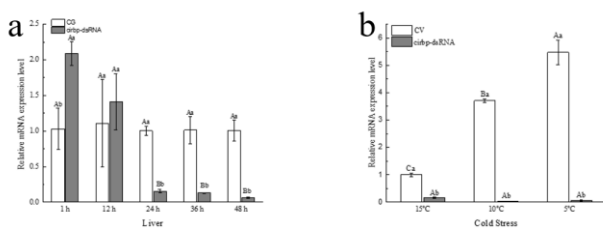
a.黑鲟*cirbp*基因的cDNA序列全长为1552 bp, 共编码182个氨基酸。b.SWISS-MODEL预测三维结构显示蛋白以无规则卷曲为主。c.序列比对显示: 包括黑鲟在内的各种鱼类CIRBP氨基酸序列具有较高的保守性。d.同源性分析显示: 黑鲟CIRBP氨基酸序列与黄鳍鲷相似度最高(79.39%)、与虹鳟相似度最低(48.25%)。

2. *cirbp*基因的时空表达分析



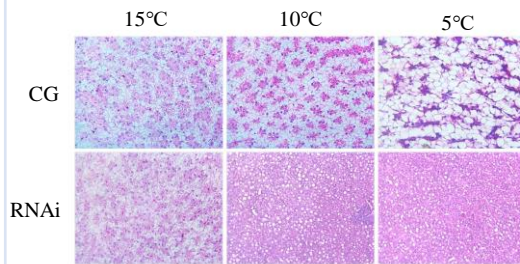
a.在正常生长水温下(15°C)下, *cirbp*基因在黑鲟的肝中表达量最高($P<0.05$)。b.冷应激下黑鲟肝脏的*cirbp*基因在10°C与5°C下均呈现出显著升高的趋势($P<0.05$)并在低温下6h后显著升高($P<0.05$)。c.冷驯化下的黑鲟肝脏的*cirbp*基因在10°C与5°C下均呈现出显著升高的趋势($P<0.05$)并在4d后才会显著升高($P<0.05$)。

3. 体外转录的*cirbp*-dsRNA对*cirbp*基因的影响



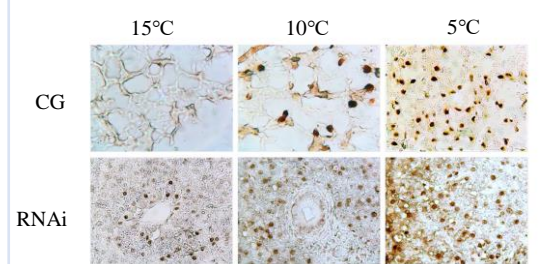
a. *cirbp*-dsRNA通过腹腔注射的方式在24h内可以显著抑制黑鲟肝脏中的*cirbp*基因的表达水平。b. 在冷应激实验中, *cirbp*-dsRNA对黑鲟肝脏的*cirbp*基因表达的抑制效果同样显著。

4. 抑制*cirbp*基因表达对肝脏组织结构的影响



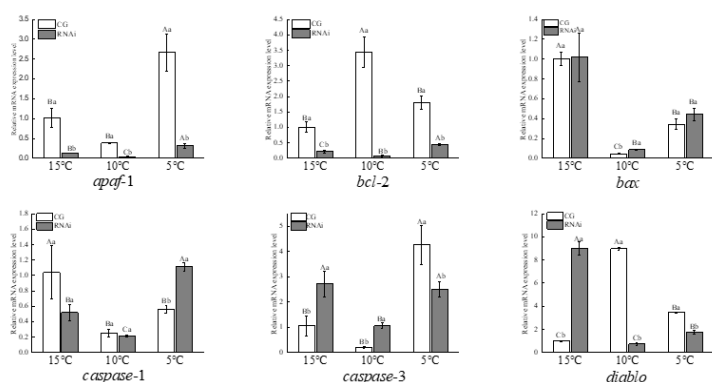
RNAi组的黑鲟肝细胞在低温下形状极其不规则, 空泡化现象加重; 炎症小体出现, 出现炎症。抑制*cirbp*基因的表达会导致黑鲟肝脏的组织结构在低温下更易出现损伤。

5. 抑制*cirbp*基因表达对肝脏细胞凋亡的影响



对照组与RNAi组的黑鲟肝脏随着温度的降低, 细胞凋亡愈发严重。抑制*cirbp*基因的表达导致黑鲟肝脏在低温下更易产生细胞凋亡现象。

6. 抑制*cirbp*基因的表达对细胞凋亡相关基因的影响



*cirbp*基因的表达被抑制后, 不同温度下*apaf-1*与*bcl-2*基因的表达量均显著下降($P<0.05$)。*cirbp*基因的表达以及抑制, 均会显著影响黑鲟肝脏中的细胞凋亡的线粒体凋亡通路。

结论

- cirbp*基因在黑鲟肝脏中显著表达, 并通过增加表达量的方式抵御低温损伤;
- 体外转录合成的*cirbp*-dsRNA能够有效的抑制黑鲟肝脏*cirbp*基因在不同温度下的表达;
- 抑制*cirbp*基因的表达后, 黑鲟在低温下肝脏组织结构更易损伤, 更易产生细胞凋亡现象;
- cirbp*基因能够调控黑鲟肝脏低温下线粒体凋亡途径的关键基因, 具有抗细胞凋亡作用。