

文章编号: 1000-0615(2019)12-2494-07

DOI: 10.11964/jfc.20180811406

## 红螯光壳螯虾细胞自噬过程中自噬体与微管相互作用

孟凡娟, 张广成, 尹文娟, 王丽燕\*, 孙金生\*

(天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

**摘要:** 昆虫方面研究提示自噬在病毒侵染增殖中发挥了重要作用, 而虾类自噬研究报道极少, 了解虾类细胞自噬将为虾病害免疫研究开辟新的思路。自噬相关蛋白LC3是自噬过程的标志性蛋白, 存在于自噬体膜上, 前期生物信息学分析发现, 红螯光壳螯虾自噬相关蛋白LC3(CqLC3)和微管蛋白 $\alpha$ -tubulin (Cq $\alpha$ -tubulin)具有互作关系。为深入揭示红螯光壳螯虾细胞自噬体的运输途径, 本实验通过体外重组构建了蛋白表达载体pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin, 并诱导表达, 利用亲和层析法分别纯化获得HIS和GST融合表达蛋白HIS-CqLC3和GST-Cq $\alpha$ -tubulin, 利用GST pull-down实验验证发现, CqLC3与Cq $\alpha$ -tubulin存在相互作用。微管抑制剂长春新碱解聚微管后, 利用MDC染色法检测自噬体发现, 红螯光壳螯虾细胞微管解聚破坏后自噬体积累增多, 细胞不能正常完成自噬反应, 因此可知, 红螯光壳螯虾细胞自噬体可通过CqLC3与微管相互作用, 微管在红螯光壳螯虾细胞自噬过程中对自噬体的运输具有重要作用。本文首次揭示了虾类细胞自噬反应中自噬体的运输途径, 研究结果为虾类细胞自噬的研究奠定了基础。

**关键词:** 红螯光壳螯虾; 自噬; 自噬体; 微管; 微管蛋白

**中图分类号:** S 945.1

**文献标志码:** A

近年来, 病害仍是虾类养殖的主要制约因素, 在众多病害中以病毒病最为严重, 给对虾养殖业造成重大经济损失。在昆虫等其他动物研究中发现, 自噬在病毒侵染增殖中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>, 而虾类研究中对于自噬的相关报道极少。

自噬是真核生物细胞中一种利用溶酶体进行降解的保护机制<sup>[2-3]</sup>, 其发生过程严格受相关基因调控。当自噬发生时, 先在细胞质中形成一个小的膜样结构, 然后不断向两边延伸成扁平状, 称为自噬前体, 在多种自噬相关蛋白共同参与下, 自噬前体不断延伸, 其中自噬相关蛋白LC3不断被募集到自噬前体上<sup>[4]</sup>, 延长的自噬前体包裹细胞中待降解的底物, 形成密闭的球状结构, 称为自噬体<sup>[5]</sup>, 自噬体再经过运输与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 最终由溶酶体内多种酶对包围的内容物进行消化降解。整个

自噬过程中LC3始终存在于自噬体和自噬溶酶体膜上, LC3的表达强度与自噬泡数量的多少呈正相关关系, 因此, 通常作为自噬发生的标志性分子<sup>[6-7]</sup>。目前, 自噬发生机制的研究相对较多, 但是关于自噬体是如何在胞内进行运输的研究却极其匮乏, 在虾类中更无相关报道。

前期, 我们利用生物信息学方法进行对虾蛋白互作分析发现, 对虾自噬相关蛋白LC3和微管蛋白 $\alpha$ -tubulin具有互作关系, 因此, 推测虾类细胞自噬体的胞内运输可能借助了细胞骨架——微管。本实验利用GST pull-down实验对红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)自噬相关蛋白LC3(CqLC3)和微管蛋白 $\alpha$ -tubulin(Cq $\alpha$ -tubulin)在体外的相互作用进行了研究, 并利用微管抑制剂长春新碱破坏微管后检测对自噬体的影响, 确定自噬体在红螯光壳螯虾细胞内的运输途径, 研究结果一

收稿日期: 2018-08-13 修回日期: 2019-01-04

资助项目: 天津市自然科学基金(17JCYBJC29700); 国家自然科学基金(31472299)

通信作者: 王丽燕, E-mail: wly712@163.com; 孙金生, E-mail: jinshsun@163.com

方面为红螯光壳螯虾的自噬机制研究奠定了基础, 另一方面也为虾类病毒与自噬相互作用的研究提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及试剂

实验所用红螯光壳螯虾购自苏州傲龙生态水产养殖有限公司; *EcoR* I限制酶、*Xho* I限制酶、*Nde* I限制酶、PMD18-T载体、pET28载体、T4 DNA连接酶等为TaKaRa公司产品; 大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21和DH5 $\alpha$ 为天根生化科技(北京)有限公司产品; 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; GST琼脂糖树脂购自BBI Life Sciences公司; HIS标签单克隆抗体和GST标签单克隆抗体购自Transgen公司; Thermo Chemiluminescent Substrate 显色液购自Thermo生物公司; 细胞培养基L-15、胶原酶等购自SIGMA公司; MDC自噬检测试剂盒、长春新碱购自索莱宝生物技术公司; tubulin抗体(小鼠单抗)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG购自上海碧云天生物技术有限公司; FITC标记的羊抗小鼠单克隆抗体购自proteintech公司; CqLC3抗体为华大基因制备; 其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

红螯光壳螯虾LC3基因(*CqLC3*)克隆与表达载体构建 根据本实验室扩增获得的*CqLC3* (GenBank: MH681880), 设计引物CqLC3-F-E和CqLC3-R-E(表1)扩增带有*EcoR* I和*Xho* I酶切位点的ORF全长*CqLC3*-E。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C, 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 60  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸 60 s, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收, 将回收产物与pET28载体

利用*EcoR* I和*Xho* I进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 2种胶回收产物利用T4 DNA连接酶进行连接, 取连接产物通过热激转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 筛选阳性克隆菌, 利用质粒提取试剂盒获得pET-HIS-CqLC3重组表达质粒, 双酶切进行鉴定。

红螯光壳螯虾微管蛋白 $\alpha$ -tubulin基因(*Cqa-tubulin*)克隆与表达载体构建 根据*Cqa-tubulin*基因序列(GenBank: HM345985.1)设计引物Cqa-tubulin-F-E和Cqa-tubulin-R-E(表1)扩增带有*Nde* I和*Xho* I酶切位点的ORF全长*Cqa-tubulin*-E, 以红螯光壳螯虾造血组织cDNA为模板进行PCR扩增。扩增条件: 94  $^{\circ}$ C预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸90 s, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C终延伸 10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收, 胶回收的方法参照试剂盒说明书进行, 并用NanoDrop 2000检测回收产物浓度。将回收产物与pET-GST载体利用*Nde* I和*Xho* I进行双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收, 2种胶回收产物利用T4 DNA连接酶进行连接, 取连接产物通过热激转化至DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 筛选阳性克隆菌, 利用质粒提取试剂盒获得pET-GST-Cqa-tubulin重组表达质粒, 双酶切进行鉴定。

HIS-CqLC3和GST-Cqa-tubulin蛋白表达与纯化 将pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cqa-tubulin 2种重组质粒分别转化至感受态细胞*E. coli* BL21, 筛选阳性克隆菌进行菌液扩大培养, 培养至OD<sub>600</sub>为0.4~0.6时, 加入IPTG至终浓度为1 mmol/L进行诱导表达6 h, 经4  $^{\circ}$ C, 10 000 r/min离心10 min收集诱导的菌体细胞, 参考杨威等<sup>[8]</sup>人的方法分离获得2种目的蛋白, 并将获得的2种蛋白经过蛋白层析柱进行纯化得到带HIS标签的HIS-CqLC3蛋白和带GST标签的GST-Cqa-tubulin蛋白,

表 1 实验所用引物序列信息

Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物 primer	引物序列(5'-3') sequence	酶切位点 restriction enzyme cutting site
CqLC3-F-E	CCG <b>GAATTC</b> ATGAAACTCTACGAGATGAAGTCTG	<i>EcoR</i> I
CqLC3-R-E	CCGCTCGAGTGTACAGACAGCCTTTACCCAA	<i>Xho</i> I
Cqa-tubulin-F-E	GGGAATTC <b>CA</b> TATGATGCGTGAGTGCATCTCCAT	<i>Nde</i> I
Cqa-tubulin-R-E	CCGCTCGAGTCAATATTCATCCCCATCTTC	<i>Xho</i> I

注: 加粗字体代表内切酶识别位点

Notes: bold font means the enzyme recognition site

通过尿素梯度复性透析获得复性蛋白, 分别取蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳, 检验蛋白纯化效果。

**HIS-CqLC3 和 GST-Cq $\alpha$ -tubulin蛋白体外互作研究** 取3只装有GST琼脂糖的离心管分别标记为阳性对照、阴性对照和实验组。首先, 阳性对照组中加入GST-Cq $\alpha$ -tubulin蛋白, 阴性对照组中加入HIS-CqLC3蛋白, 实验组加入GST-Cq $\alpha$ -tubulin蛋白, 置于4 °C培养箱中的振荡仪上缓慢颠倒使蛋白与琼脂糖充分混匀, 过夜振荡结合后, 4 °C, 3 000 r/min离心5 min, 弃上清液留沉淀, 分别用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)吹吸混匀沉淀后再次离心, 取阳性对照组与阴性对照组沉淀分别与蛋白上样缓冲液混合, 4 °C放置备用。另在实验组中再加入HIS-CqLC3蛋白, 于4 °C培养箱中的振荡仪上缓慢振荡结合3 h后, 4 °C, 3 000 r/min, 离心5 min, 弃上清液留沉淀, 用PBS吹吸混匀沉淀后再次离心, 取实验组沉淀与蛋白上样缓冲液混合备用。将3组备用样品煮沸10 min, SDS-PAGE电泳后进行Western Blot, 使用HIS标签鼠单克隆抗体和GST标签鼠单克隆抗体进行孵育, 在使用辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠抗体进行孵育, 通过Thermo Chemiluminescent Substrate 显色液, 使PVDF膜浸泡其中显色, BIO-RAD 凝胶成像仪扫描观察, 分析重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin与HIS-CqLC3的互作情况。

**微管抑制剂长春新碱抑制微管后微管及自噬小泡检测** 红螯光壳螯虾造血组织细胞体外培养方法参照已有方法<sup>[9]</sup>进行培养, 将胶原酶消化的红螯光壳螯虾造血组织细胞接种于已放置细胞爬片的24孔板中, 1×10<sup>5</sup>个/孔, 培养24 h细胞贴壁后用浓度为5 mg/mL长春新碱处理细胞, 对照组细胞不做处理, 置于23 °C, 2.5% CO<sub>2</sub>, 二氧化碳培养箱中处理72 h, 弃去长春新碱培养液终止培养, 用PBS洗1次, 加4%多聚甲醛溶液固定细胞, 室温放置10 min, PBS洗涤细胞3次, 0.5% Triton-X处理10 min, PBS洗1次, 加入tubulin小鼠单克隆抗体, 37 °C孵育2 h, PBS冲洗3次, 加入FITC标记的羊抗鼠荧光二抗, 在37 °C孵育30 min, 轻晃后去除孔板内的液体, 取细胞爬片置于载玻片上, 封片液封片, 荧光显微镜下观察长春新碱对微管的作用效果。

确定长春新碱可成功解聚微管后, 利用MDC自噬检测法对长春新碱处理后的细胞自噬小泡进行检测, 检测方法参照MDC自噬检测试剂盒说明书。

## 2 结果

### 2.1 pET-HIS-CqLC3 和 pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin 重组表达载体鉴定

构建的重组表达质粒pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin进行双酶切鉴定, 结果显示, 经双酶切后pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin可分别切出2条条带, 分别与所用载体及目的基因大小相符, 说明重组表达载体pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin构建成功(图1)。

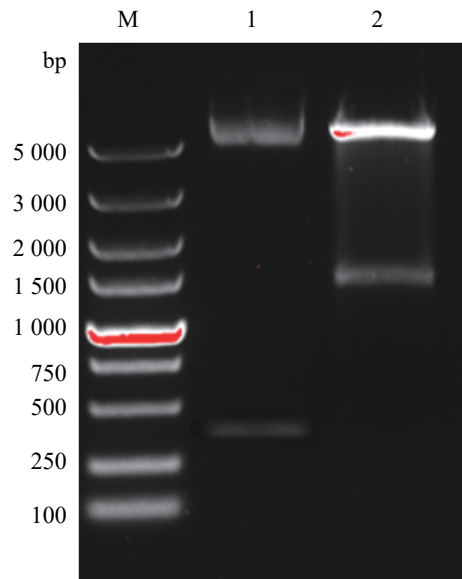


图1 重组质粒pET-HIS-CqLC3和pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin双酶切鉴定

M. 分子量标准DL 5000; 1. 重组质粒pET-HIS-CqLC3; 2. 重组质粒pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin

### Fig. 1 Restriction enzyme digestion identification of recombinant plasmids of pET-HIS-CqLC3 and pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin

M. DL 5000 DNA Marker; 1. recombinant plasmids of pET-HIS-CqLC3; 2. recombinant plasmids of pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin

### 2.2 HIS-CqLC3和GST-Cq $\alpha$ -tubulin蛋白的表达与纯化

重组表达质粒HIS-CqLC3和GST-Cq $\alpha$ -tubulin分别经热激转化感受态*E. coli* BL21细胞后, 在37 °C, IPTG诱导表达6 h, 菌液通过超声破碎, 上



清分别用GST、HIS标记亲和层析柱纯化得到纯化蛋白, SDS-PAGE凝胶电泳进行检测结果显示, HIS-CqLC3预测蛋白分子量约为18.00 ku, GST-Cq $\alpha$ -tubulin预测蛋白分子量为52.62 ku, 纯化蛋白条带大小与之相符, 说明蛋白均成功进行了表达与纯化(图2)。

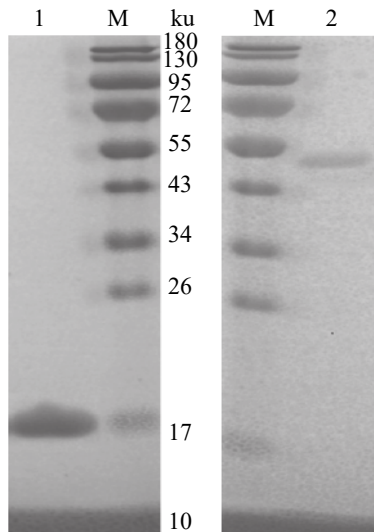


图2 重组蛋白 HIS-CqLC3和GST-Cq $\alpha$ -tubulin的 SDS-PAGE鉴定

1. 重组蛋白HIS-CqLC3; M. 蛋白分子量标准; 2. 重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin

Fig. 2 SDS-PAGE identification of recombinant protein GST-Cq $\alpha$ -tubulin and HIS-CqLC3

1. recombinant protein of HIS-CqLC3; M. protein marker; 2. recombinant protein GST-Cq $\alpha$ -tubulin

### 2.3 重组蛋白HIS-CqLC3和GST-Cq $\alpha$ -tubulin体外互作

利用GST pull-down方法对重组表达蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin和HIS-CqLC3的相互作用进行了研究, 结果显示, 重组蛋白HIS-CqLC3作为阴性对照无条带, 说明重组表达蛋白HIS-CqLC3不能与GST琼脂糖结合; 重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin作为阳性对照出现单一条带, 说明重组表达蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin与GST琼脂糖进行了结合; 实验组中出现2条条带, 说明GST琼脂糖首先与重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin结合后, 重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin再与HIS-CqLC3进行了结合, 重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin与HIS-CqLC3在体外具有互作关系(图3)。

### 2.4 长春新碱抑制微管后自噬小泡变化

长春新碱处理培养的红螯光壳螯虾造血细胞

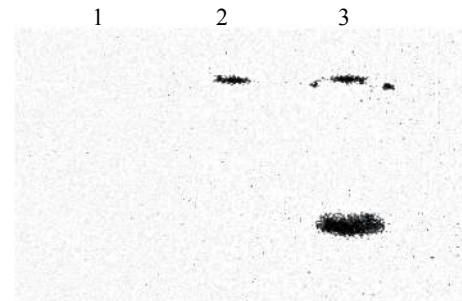


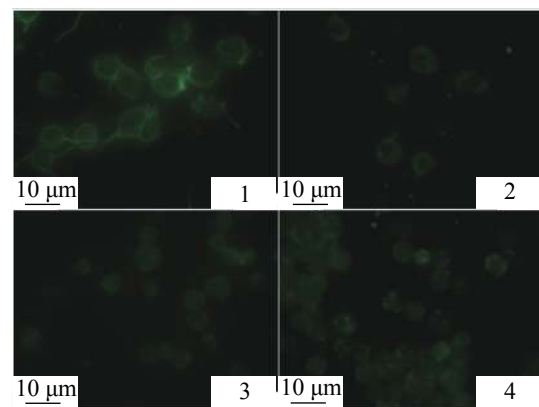
图3 GST pull-down验证重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin和HIS-CqLC3的相互作用

1. 阴性对照组(GST琼脂糖中添加重组蛋白HIS-CqLC3), 2. 阳性对照组(GST琼脂糖中添加重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin), 3. 实验组(GST琼脂糖中添加重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin与HIS-CqLC3)

Fig. 3 GST pull-down identification of protein interaction between recombinant protein GST-Cq $\alpha$ -tubulin and HIS-CqLC3

1. negative control (GST agarose with recombinant protein HIS-CqLC3), 2. positive control (GST agarose with recombinant protein GST-Cq $\alpha$ -tubulin), 3. experimental group (GST agarose with recombinant protein GST-Cq $\alpha$ -tubulin and HIS-CqLC3)

72 h后, tubulin抗体免疫荧光染色检测微管变化, 结果显示, 正常红螯光壳螯虾细胞微管可见明显荧光显示完整微管结构(图版-1), 长春新碱抑制后, 细胞微管免疫荧光强度与对照组相



图版 红螯光壳螯虾造血组织细胞微管及自噬体免疫荧光观察

1. 常规培养的细胞微管荧光观察, 2. 长春新碱作用72 h后的血细胞微管荧光观察, 3. 常规培养的细胞MDC染色, 4. 长春新碱作用72 h的细胞 MDC染色

Plate Immunofluorescent analysis of microtubules and autophagosome in hematopoietic tissue cell of *C. quadricarinatus*

1. fluorescent observation of microtubules in normal cultured cells, 2. fluorescent observation of microtubules in cells added with vincristine after 72 h, 3. MDC staining of normal cultured cells, 4. MDC staining of cells added with vincristine after 72 h

比明显降低,微管聚合程度明显减少(图版-2),说明长春新碱可对红螯光壳螯虾造血组织细胞微管成功进行解聚。解聚后的细胞,利用MDC法检测细胞自噬体的变化,结果显示,正常红螯光壳螯虾细胞中无明显荧光显示自噬体(图版-3),实验组微管破坏后的细胞内可见明显点状荧光的自噬体聚集(图版-4),说明微管解聚后有明显的自噬体堆积现象。

### 3 讨论

自噬作为真核细胞中重要的物质降解过程,其分子细胞机理和生理病理意义逐渐得到重视<sup>[10]</sup>。自噬相关蛋白LC3在自噬体膜的延长和融合中均发挥着重要作用,是自噬体形成的必需物质<sup>[5]</sup>,通常可作为自噬体检测的标志性分子。在细胞自噬过程中,自噬体经过运输与溶酶体融合形成自噬溶酶体<sup>[11]</sup>对待降解物进行消化降解<sup>[12]</sup>。有研究显示,自噬体形成之后运输至溶酶体进行降解的过程并非简单的扩散运动,而是通过细胞骨架微管网络系统的运输实现<sup>[13]</sup>。本研究前期利用生物信息学分析发现,虾自噬相关蛋白LC3和微管蛋白 $\alpha$ -tubulin具有互作关系,而 $\alpha$ -tubulin作为细胞骨架蛋白是微管的主要组成成分,同时对细胞的形状调节、运输、迁移和分化有着至关重要的作用<sup>[14]</sup>,因此推测虾类自噬体的胞内运输可能借助微管来完成。

为验证红螯光壳螯虾细胞自噬体与微管的相互作用,本文成功构建了重组表达载体pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin和pET-HIS-CqLC3,并分别在体外表达出重组蛋白GST-Cq $\alpha$ -tubulin和HIS-CqLC3,利用GST Pull-down方法对其相互作用进行了研究,结果显示,此2种蛋白在体外具有互作关系,表明自噬体很可能是通过其膜上的LC3蛋白与微管结构成分 $\alpha$ -tubulin蛋白进行相互作用而实现微管运输。

为进一步确定微管在自噬体运输过程中的作用,本实验利用微管解聚剂长春新碱对红螯光壳螯虾造血组织细胞微管结构进行解聚破坏,tubulin抗体免疫荧光检测发现长春新碱处理组的细胞微管结构明显破坏,其免疫荧光强度与正常组细胞相比明显降低,且聚合态微管较对照组明显减少,这一结论与郑霖等<sup>[15]</sup>报道一致,聚合态微管发生明显解聚可使微管的荧光强度减弱,说明长春新碱成功对红螯光壳螯虾

细胞微管进行了解聚破坏。利用MDC法检测微管解聚后的细胞自噬现象,结果发现,红螯光壳螯虾细胞内的自噬体积增多,细胞不能正常完成自噬反应,表明自噬反应过程需要借助微管的正常运输才能完成。Köchl等<sup>[13]</sup>利用诺考达唑和长春新碱2种微管解聚剂对微管进行破坏实验,发现完整的微管存在有利于促进自噬体与溶酶体融合,说明自噬体是通过细胞骨架微管网络进行运输,与本文结果一致。

目前,由各种病原造成的病害仍是限制虾类养殖产业可持续发展的重要因素,近年来研究表明,病毒感染过程与宿主细胞自噬密切相关,自噬在宿主免疫和感染中发挥了重要作用<sup>[16]</sup>。细胞自噬可以保护细胞免于病原微生物的侵害,但在与宿主细胞共同进化的过程中,许多病毒开发出多种策略用于破坏或操纵自噬途径,甚至一些病毒可以利用自噬机制的组成部分促进自身的复制。因此,病毒与自噬具有不同的、复杂的作用关系<sup>[17-18]</sup>,根据宿主细胞和病毒种类不同,自噬与病毒的作用方式亦不同,通常可分为3种情况<sup>[19-22]</sup>:(1)自噬阻止病毒复制;(2)病毒阻断自噬,或者介导不完全自噬发生从而避免自噬限制病毒自身复制;(3)病毒利用自噬促进自身复制<sup>[21-22]</sup>。据报道,对虾白斑综合征病毒(WSSV)感染凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)后,可通过激活宿主细胞的自噬PI3K-Akt-mTOR通路为病毒自身复制提供便利,并且调控对虾血淋巴细胞自噬水平明显上升<sup>[23]</sup>。He等<sup>[24]</sup>的研究发现,WSSV可以利用miRNA调控自噬以利于病毒增殖。鉴于病毒与自噬的关系,调控自噬的发生可以间接控制病毒的增殖,本实验室另有研究表明,抑制自噬发生可以控制WSSV的增殖,从而提高凡纳滨对虾存活率。因此,具体了解虾细胞自噬对于病毒的防控具有重要意义。

总之,本文利用GST pull-down方法发现,红螯螯虾细胞自噬相关标志蛋白CqLC3和微管蛋白Cq $\alpha$ -tubulin在体外能够相互作用,而 $\alpha$ -tubulin作为细胞骨架蛋白是微管的主要组成成分,利用长春新碱对微管进行解聚后发现有明显的自噬体累积现象,说明红螯光壳螯虾细胞自噬反应过程中自噬体需要借助微管骨架系统,才能运输到溶酶体,并与之合形成完整的自噬溶酶体完成自噬反应。本实验首次对虾类细胞自噬过程中自噬体与微管的相互作用进行了研究,

探讨了虾细胞自噬体的运输途径。此研究结果为红螯光壳螯虾自噬研究奠定了基础, 也为有效调控自噬从而控制病毒侵害提供了新的思路。

#### 参考文献:

- [1] Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(10): 767-777.
- [2] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27: 107-132.
- [3] Sir D, Ou J H J. Autophagy in viral replication and pathogenesis[J]. *Molecules and Cells*, 2010, 29(1): 1-7.
- [4] Yin Z Y, Pascual C, Klionsky D J. Autophagy: machinery and regulation[J]. *Microbial Cell*, 2016, 3(12): 588-596.
- [5] Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, *et al.* LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis[J]. *Developmental Cell*, 2011, 20(4): 444-454.
- [6] Wang A L, Boulton M E, Dunn D A Jr, *et al.* Using LC3 to monitor autophagy flux in the retinal pigment epithelium[J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1190-1193.
- [7] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [8] 杨威, 王海霞, 陈岩, 等. 鸡生长分化因子GDF-8 cDNA的克隆、表达及蛋白纯化[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(4): 460-462.  
Yang W, Wang H X, Chen Y, *et al.* Cloning, expression and purification of the chicken growth and differentiation factor-8[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(4): 460-462(in Chinese).
- [9] Lindenbach B D, Evans M J, Syder A J, *et al.* Complete replication of hepatitis c virus in cell culture[J]. *Science*, 2005, 309(5734): 623-626.
- [10] Kraft C, Peter M, Hofmann K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(9): 836-841.
- [11] Perera R M, Stoykova S, Nicolay B N, *et al.* Transcriptional control of the autophagy-lysosome system in pancreatic cancer[J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 361-365.
- [12] Kaushik S, Cuervo A M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world[J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(8): 407-417.
- [13] Köchl R, Hu X W, Chan E Y W, *et al.* Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes[J]. *Traffic*, 2006, 7(2): 129-145.
- [14] Assimos D G. Re: Altered calcium and vitamin d homeostasis in first-time calcium kidney stone-formers[J]. *The Journal of Urology*, 2016, 195(3): 658-659.
- [15] 郑霖, 张西联, 周军利, 等. 微管解聚与心肌细胞缺氧性损害的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(7): 617-620.  
Zheng J, Zhang X L, Zhou J L, *et al.* Effects of microtubule disassembly on hypoxic injury of cultured cardiomyocytes[J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2006, 28(7): 617-620(in Chinese).
- [16] Bingol B. Autophagy and lysosomal pathways in nervous system disorders[J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2018, 91: 167-208.
- [17] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.
- [18] Yordy B, Iwasaki A. Autophagy in the control and pathogenesis of viral infection[J]. *Current Opinion in Virology*, 2011, 1(3): 196-203.
- [19] Datan E, Roy S G, Germain G, *et al.* Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation[J]. *Cell Death & Disease*, 2016, 7: e2127.
- [20] Steele S, Brunton J, Kawula T. The role of autophagy in intracellular pathogen nutrient acquisition[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 51.
- [21] Sun M X, Huang L, Wang R, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces autophagy to promote virus replication[J]. *Autophagy*, 2012, 8(10): 1434-1447.
- [22] Heaton N S, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Cell Host & Microbe*, 2010, 8(5): 422-432.
- [23] Su M A, Huang Y T, Chen I T, *et al.* An invertebrate warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(6): e1004196.
- [24] He Y D, Sun Y C, Zhang X B. Noncoding miRNAs bridge virus infection and host autophagy in shrimp *in vivo*[J]. *FASEB Journal*, 2017, 31(7): 2854-2868.

## Study on interaction of autophagosome and microtubule during autophagy process in *Cherax quadricarinatus*

MENG Fanjuan, ZHANG Guangcheng, YIN Wenjuan, WANG Liyan\*, SUN Jinsheng\*

(Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China)

**Abstract:** Insect research suggests that autophagy plays an important role in virus infection and proliferation, while shrimp autophagy research reports are rare. Understanding the autophagy of shrimp cells will open up new ideas for shrimp disease immunity research. Autophagy related protein LC3 is a marker protein of autophagy, existing in the membrane of autophagosome during the whole autophagy process. Our bioinformatics analysis found that *Cherax quadricarinatus* LC3 (CqLC3) and  $\alpha$ -tubulin (Cq $\alpha$ -tubulin) had the interaction relations. To further reveal transport way of autophagosome during autophagy process, in this study, recombinant plasmids pET-HIS-CqLC3 and pET-GST-Cq $\alpha$ -tubulin were constructed and induced for protein expression in vitro. Then HIS and GST tagged fusion proteins HIS-CqLC3 and GST-Cq $\alpha$ -tubulin were purified by using affinity chromatography respectively. Recombinant proteins HIS-CqLC3 and GST-Cq $\alpha$ -tubulin were found binding each other by the GST pull-down assay. In order to further reveal the role of microtubules for autophagosome transport, *C. quadricarinatus* cell microtubules were depolymerized by vincristine which was a microtubule inhibitor, then the autophagosomes were detected by MDC staining. The results showed that autophagic reaction was incomplete, and autophagosomes increased after microtubule depolymerization. Therefore, the autophagosomes in *C. quadricarinatus* cells can interact with microtubules through CqLC3, and microtubules play an important role in autophagosome transport during autophagy process. This paper for the first time revealed the transport pathway of autophagosomes in shrimp autophagy, and the results laid the foundation for the study of autophagy in shrimp cells.

**Key words:** shrimp; autophagy; autophagosome; microtubule; tubulin

**Corresponding author:** WANG Liyan. E-mail: wly712@163.com ; SUN Jinsheng. E-mail: jinshsun@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472299); Natural Science Foundation of Tianjin (17JCYBJC29700)