

DOI: 10.12264/JFSC2024-0048

仿刺参硫酸软骨素合酶 1 基因克隆及灿烂弧菌感染后的表达特征模式分析

谭颜廷^{1, 2}, 葛建龙^{2, 3}, 廖梅杰^{2, 3}, 荣小军^{2, 3}, 王锦锦^{2, 3}, 李彬^{2, 3}, 赵岩峰²,
王印庚^{2, 3}, 王璐⁴

1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
4. 青岛市海洋管理保障中心, 山东 青岛 266071

摘要: 硫酸软骨素在生物体应对病毒和细菌感染中起着重要作用, 为研究硫酸软骨素合酶 1 (chondroitin sulfate synthase-1, ChSy-1)在仿刺参(*Apostichopus japonicus*)受到灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)感染后的作用, 本研究开展了仿刺参 *ChSy-1* 基因(*AjChSy-1*)全长序列克隆和结构及系统进化分析, 并采用荧光定量 PCR 技术测定了该基因在刺参不同组织中的表达差异及灿烂弧菌感染下的表达模式。结果显示, *AjChSy-1* 基因 cDNA 全长为 2756 bp, 其中, 5'-UTR 长度为 194 bp, 3'-UTR 为 228 bp, ORF 为 2334 bp, 编码 777 个氨基酸。*AjChSy-1* 基因编码的蛋白含有糖基转移酶保守性 DXD 基序、 β 3-糖基转移酶基序及 β 4-糖基转移酶基序等结构。刺参基因组比对发现在 chr13 染色体上存在 2 个 *AjChSy-1* 基因拷贝。系统进化分析表明, 刺参 *AjChSy-1* 编码蛋白与玉足海参(*Holothuria leucospilota*)和棘冠海星(*Acanthaster planci*)的蛋白亲缘关系较近, 与斑马鱼(*Danio rerio*)、智人(*Homo sapiens*)等脊椎动物的蛋白亲缘关系较远。荧光定量 PCR 显示, *AjChSy-1* 基因具有广泛的组织表达特性, 其中, 体腔细胞中表达量最高, 体壁、性腺(雄性和雌性)和纵肌次之。在响应灿烂弧菌侵染过程中, 随灿烂弧菌侵染时间增加, 体壁中 *AjChSy-1* 表达量呈现先上升后下降的趋势, 在第 3、6、9 天分别为对照组的 1.79、2.06、3.12 倍, 对发病期抗病群体和易感群体中该基因的检测结果表明, 易感群体体壁该基因表达量显著低于抗病群体($P<0.05$), 表达量降低 11.4%。推测该基因可能在刺参应对灿烂弧菌中发挥免疫防御作用, 相关研究结果为解析刺参 *AjChSy-1* 基因功能以及抗病分子调控机制提供了参考数据。

关键词: 仿刺参; *ChSy-1*; 基因克隆; 荧光定量 PCR; 基因表达; 灿烂弧菌

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)04-0488-12

硫酸软骨素合酶-1 (chondroitin sulfate synthase-1, ChSy-1)属于糖胺聚糖家族, 在硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)的生物合成中发挥着关键作用, 在智人(*Homo sapiens*)中以蛋白多糖的形式存在, 在大多数细胞表面和细胞外基质中表达, 可参与细胞增殖和识别、细胞外基质沉积

和形态发生等过程^[1], 同时在调节关节机能、抗凝血、清除自由基、增强免疫、抗病毒和抗肿瘤等方面发挥重要作用^[2-4]。目前, 已在智人中克隆鉴定了 6 种参与 CS 主链聚合的糖基转移酶, 包括 2 种软骨素合酶(ChSy-1、ChSy-3)、2 种软骨素聚合因子(CHPF、ChSy-2)和 2 种 CS N-乙酰半乳糖胺

收稿日期: 2024-01-31; 修订日期: 2024-02-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2400105); 山东省重点研发计划项目(2023LZGC019); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2023TD29).

作者简介: 谭颜廷(1999-), 女, 硕士, 研究方向为海洋生物学. E-mail: 2285871945@qq.com

通信作者: 葛建龙, 副研究员, 研究方向为刺参遗传育种及健康养殖. E-mail: gejl@ysfri.ac.cn

基转移酶(CSGalNAcT1、CSGalNAcT2)^[1,4-11]。CS 的合成受到 6 种酶的复杂调控, 其中 ChSy-1 起到最重要的作用。ChSy-1、ChSy-3、CHPF 和 ChSy-2 中任意两种糖基转移酶可以共表达出 CS 聚合活性, 而 ChSy-1 和 CHPF 的异源寡聚体复合物具有最强的聚合活性^[12-14]; 已有研究表明 *ChSy-1* 基因的功能缺失会导致个体出现轴前短指、趾骨异常、软骨发育不良以及生长迟缓等病症^[15-16]。在斑马鱼(*Danio rerio*)中敲除 *ChSy-1* 基因不仅会导致斑马鱼胚胎发育异常, 也会损害成鱼骨骼和胸鳍的发育^[17]。基因敲除实验表明, 只有 *ChSy-1* 影响 CS 核心蛋白的生物合成和糖链的延伸, 导致 CS 不能正常行使功能^[17]。由此可见, *ChSy-1* 基因在相关途径合成中起到最重要的作用。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)又名刺参, 属于棘皮动物门(Echinodermata), 海参纲(Holothuroidea), 楯手目(Aspidochirotida), 刺参科(Stichopodidae), 仿刺参属(*Apostichopus*)^[18], 其主要分布于西太平洋沿岸, 是常见的温带浅水区海水物种。刺参作为一种传统的保健品, 营养价值极高, 已成为我国重要的海水养殖品种之一。21 世纪以来, 随着养殖技术发展, 刺参养殖规模不断扩大, 养殖产量也逐年增加。但 2004 年以来, 以灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)为主要致病菌的“腐皮综合征”在全国大规模暴发, 严重危害刺参健康养殖^[18-19]。由于缺乏适应性免疫反应, 棘皮动物同其他无脊椎动物一样利用先天性免疫系统来抵御病原菌感染^[20]。迄今, 已在棘皮动物中鉴定和表征了凝集素、抗菌肽、溶菌酶、模式识别蛋白、Toll 受体、补体 C3 等免疫相关基因以及 miR-133、miR-137 和 miR2008 等免疫调节因子^[21-22]。本团队前期在刺参响应灿烂弧菌感染的转录组研究中筛选到 *ChSy-1* 基因表达量在病原组与对照组之间表达量差异显著, 启示该基因可能发挥着重要免疫作用^[23], 然而刺参 *ChSy-1* 基因的结构及其在灿烂弧菌感染下的具体表达模式尚未见相关报道。本研究在上述研究基础上, 采用 RACE 技术(rapid-amplification of cDNA ends)克隆了刺参

ChSy-1 基因全长序列, 预测了其编码蛋白结构及其理化性质, 分析了该基因在基因组的分布及结构, 测定了该基因在刺参不同各组织间的表达特征及相应灿烂弧菌感染下的表达差异, 以期为进一步研究 *ChSy-1* 基因的功能和解析刺参抗病机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验刺参苗种采集自山东青岛瑞滋集团有限公司, 苗种规格为(50.0±1.0) g/只, 选取活力良好、体质健康的个体置于砂滤海水中暂养 7 d 使其适应实验条件, 期间水温保持在(14.0±2.0) °C, 盐度为 28.0±0.5, 持续充气。菌株为本课题组病原库中保存的分离自刺参患病组织的灿烂弧菌菌株(AJ-Vb1801), 用胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)固体培养基复苏该菌株, 然后用 TSB 液体培养基扩大培养。

1.2 样品采集

攻毒实验参照本课题组构建的灿烂弧菌侵染方法^[24], 即挑选健康的刺参随机分为对照组和感染组, 每组设 3 个重复, 每个重复 30 只。对照组使用洁净的自然海水, 感染组在水体中添加灿烂弧菌菌液至终浓度 1×10^6 CFU/mL(该浓度为灿烂弧菌对刺参苗种的半致死浓度)。实验在 70 L 的方形塑料水槽, 每日换水 20 L, 虹吸去除水槽底部粪便, 感染组换水后补充灿烂弧菌悬液, 将浓度维持在 1×10^6 CFU/mL。攻毒实验开始后, 每天观察苗种状态, 潜伏期内每 3 d 随机取 3 只刺参进行样品采集(第 0、3、6、9 天), 至 12 d 出现化皮症状后采集感染组化皮个体(12dS)及同实验组的健康个体(12dH), 每组取 3~6 只。解剖采集体壁、呼吸树、肠道、性腺(雌性和雄性)、纵肌和体腔液等组织, 体腔液离心(4 °C, 5000 r/min, 10 min)后弃上清液得到体腔细胞, 所有样品置于液氮中速冻, 于-80 °C 超低温冰箱中保存。

1.3 刺参 *AjChSy-1* 全长 cDNA 克隆

参照试剂盒说明书(MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, TaKaRa)提取所保存组织的总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 用

NanoDrop 1000 分光光度计(Thermo, 美国)测定其浓度和纯度。质量合格的 RNA 按照 SMARTer RACE 5'/3' kit (TaKaRa)说明书合成 5'RACE 及 3'RACE cDNA。根据刺参转录组测序得到的 *AjChSy-1* 基因部分 cDNA 序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计序列特异性引物(表 1), 以刺参体壁组织 cDNA 为模板扩增基因的核心片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。按照上述获得

的核心片段序列设计 5' RACE 和 3' RACE 引物(表 1), 参照 SMARTer RACE 5'/3' kit (TaKaRa)试剂盒说明书, 进行 RACE 扩增。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 利用 SteadyPure DNA 凝胶回收试剂盒(AG, 中国)回收纯化, 并连接到 pMDTM19-T (TaKaRa)载体, 参照该载体说明书进行基因克隆实验, 筛选阳性克隆进行测序, 并对测序获得的核心序列、3'序列和 5'序列进行比对后拼接, 获得该基因的全长 mRNA 序列。

表 1 刺参 *AjChSy-1* 基因克隆及定量表达分析所用引物

Tab. 1 Primers for cloning and quantitative expression analysis of the *AjChSy-1* gene of *Apostichopus japonicus*

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	目的 purpose
AjChSy-1F	GCACTCTACCTTTCACGGGCA	ORF 扩增
AjChSy-1R	CGCACCTCCTGCAGCTGTTGGC	ORF amplification
AjChSy-1 3'GSP1	ACCTGCAGAGGGTCGGAGGGTGG	3'RACE, 1st
AjChSy-1 3'GSP2	GCCAAACAGCTGCAGGAGGTGCG	3'RACE, 2nd
AjChSy-1 5'GSP1	CGGGTGTGACCCTAAGTGGC	5'RACE, 1st
AjChSy-1 5'GSP2	TGCCCGTGAAAGGTAGAGTGC	5'RACE, 2nd
UPM Long primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCACCGCAGAGT	通用引物
UPM Short primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	universal primer
q-AjChSy-1F	TCCGTCCGTGTTCAAGTCAGT	RT-qPCR
q-AjChSy-1R	AGACACACGATCCGTACCCA	
Cyt b F	TGAGCCGCAACAGTAATC	内参基因
Cyt b R	AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG	reference gene

1.4 基因序列分析

利用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)和 DNAMAN 分析预测开放阅读区域, 预测所编码蛋白的氨基酸序列组成; 通过 NCBI 查找相关物种的氨基酸序列; 利用 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测蛋白的磷酸化位点; NetNGlyc-1.0 (<http://www.cbs./services/NetNGlyc/>) 在线软件进行 N 端-糖基化位点分析; 利用 ExPASy 软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测成熟蛋白分子量和等电点; 利用 SMART 软件 (<http://SMART.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白结构域; 利用软件 SignalP5.0Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析基因的信号肽; 利用 TMHMM V2.0c (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测蛋白质中的跨膜螺旋; 采用

SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的三级结构; 利用 prabi 进行蛋白质二级结构预测 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html); 使用 ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) 对预测蛋白和 NCBI 下载的代表性物种的 ChSy-1 序列进行氨基酸序列比对, 使用 ENDscript/ESPrift 网站 (<http://esprift.ibcp.fr/ESPrift/cgi-bin/ESPrift.cgi>) 对序列比对结果进行作图; 利用 MEGA11.0 软件进行同源序列比对, 采用邻接法构建系统进化树。通过与本课题组组装的刺参基因组(序列号 PRJNA901209)比对获得该基因在染色体的分布及位置, 用 TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>) 绘制染色体分布图。通过在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 展示基因外显子、内含子和 UTR 的具体位置。

1.5 刺参 *AjChSy-1* 基因的时空表达特征分析

按照试剂盒 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix (TaKaRa) 使用说明将组织总 RNA 反转录成 cDNA。基于刺参 *AjChSy-1* 基因 cDNA 序列设计荧光定量引物(表 1), 并以 Cyt b 为内参基因^[25], 采用两步法进行 RT-qPCR 扩增。定量 PCR 体系: 10 μL 2×TB Green Fast qPCR Mix (TaKaRa)、0.8 μL Forward Primer、0.8 μL Reverse Primer、2 μL cDNA 模板、6.4 μL 灭菌水。扩增条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 15 s, 共 40 个循环; 熔解曲线分析使用荧光定量设备(Eppendorf)默认程序。每个样本设置 3 个技术重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

1.6 数据分析

所有数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 用 Graphpad Prism 9 软件的单因素方差分析(one-way ANOVA)进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异显著性阈值。

2 结果与分析

2.1 刺参 *AjChSy-1* 的序列全长和结构特征

刺参 *AjChSy-1* 基因 cDNA 全长为 2756 bp, 其中编码区长度为 2334 bp, 编码 777 个氨基酸, 5'-UTR 长度为 194 bp, 3'-UTR 长度为 228 bp, 包含 3'末端 30 bp 的 polyA 尾巴。预测编码蛋白质分子量为 89.1 kD, 理论等电点为 7.62, 脂肪系数为 82.25, 不稳定系数为 43.77, 为不稳定蛋白; 平均亲水性 GRAVY 值为 -0.293, 为亲水蛋白。编码氨基酸在第 13~32 位存在跨膜螺旋, 为膜结合区域; 第 157~159 位和 610~612 位具有保守的 DXD 基序; 第 90、175、266 和 710 位存在 4 个潜在的 N-糖基化位点(图 1), 此外, 具有 11 个半胱氨酸残基, 预测到 38 个丝氨酸磷酸化位点、15 个苏氨酸磷酸化位点和 11 个酪氨酸磷酸化位点。蛋白质二级结构含 41.18% α 融合、3.60% β 转角、39.12% 无规则卷曲含量以及 16.09% 延伸链。三维空间结构显示, 刺参 *AjChSy-1* 蛋白与玉足海参 ChSy-1 结构更为相似, 比智人 ChSy-1 蛋白缺少 2 个顺式非脯氨酸、2 个顺式脯氨酸和 1 个扭曲的脯氨酸(图 2)。

通过与刺参基因组进行比对, 在刺参基因组获得了 2 个 *ChSy-1* 基因拷贝, 即 evm.model.chr 13.482 和 evm.model.chr13.478, 克隆获得的全长序列与基因组注释的序列的相似性分别为 100% 和 91.18%。evm.model.chr13.482 和 evm.model.chr 13.478 均分布于 chr13 染色体上, 相距 0.068Mb。基因结构分析显示, evm.model.chr13.482 和 evm.model.chr13.478 均有 2 个外显子和 1 个内含子(图 3)。

2.2 氨基酸序列比对与系统进化分析

同源性分析显示, *AjChSy-1* 蛋白序列与同为楯手目的玉足海参(*Holothuria leucospilota*)相似性最高, 为 82.37%, 其次是棘冠海星(*Acanthaster planci*), 为 54.57%, 与绿海龟(*Chelonia mydas*)的相似性最小, 为 43.24% (表 2)。多序列比对显示, *AjChSy-1* 具有糖基转移酶保守性 DXD 基序、 β 3-糖基转移酶基序以及 β 4-糖基转移酶基序等保守结构域, 半胱氨酸残基位置及 N-糖基化位点数量与智人等物种有一定差异(图 4)。系统进化分析表明, 刺参 *AjChSy-1* 与玉足海参 ChSy-1 先聚为一支, 亲缘关系最近, 再与棘冠海星 ChSy-1 聚为一支, 而斑马鱼、热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、智人等脊椎动物蛋白单独聚为一个分支, 与刺参等棘皮动物的亲缘关系较远(图 5)。

2.3 刺参 *AjChSy-1* 的组织表达特征

利用 RT-qPCR 对健康刺参各组织中 *AjChSy-1* 基因的表达检测结果见图 6, 通过检测结果可以看出, 该基因在刺参各组织中均有表达, 其中体腔细胞中表达量最高, 是体壁的 1.96 倍, 显著高于其他各组织($P < 0.05$); 其次为体壁、雄性性腺、雌性性腺、纵肌, 表达量依次降低, 但无显著性差异; 呼吸树和肠道中该基因的表达量显著低于体壁, 分别是体壁表达量的 65% 和 36%, 显著低于其他各组织($P < 0.05$)。

2.4 灿烂弧菌侵染不同时间刺参体壁 *AjChSy-1* 的表达模式

鉴于刺参体壁是腐皮综合征最直接的表现的组织, 因此, 本研究检测了灿烂弧菌侵染后, 体壁组织中该基因表达的差异, 结果表明, 在潜伏期(12 d 以内), 随灿烂弧菌侵染时间增加, 刺参体

gacatcgattaagttagtactgggtgttacccatggcgcgtacccatcagaagaagtgtgacatttgccgttcgaat
gtccagaatgcctacttagatcaacgtttggacgaaatcaaccaccaggtaacttcgtatccaaatgtatcgccggaaaagactaagaag
gagaacttgtcataATGTTCTGCACGGTCATCCGTCTGGATTCCGTATGTGCAGTTTGTTCACAGGGTAGTGTAGGCTCA
M F L R R S S V P G F R Y V A V L F T G I V L G F
CTCTACCAACATGGATACTACAGCACTTACGGTACCGGAGGGTCATATTCACTGGGCAAAATGCTCTGGACTTCA
T L A T W I L Q H L G H G G V I F S G Q K C S R M D F Q A D
GTGCCACTACAAGTACAGTAGATTCACTGGCAGGAAACTCTGATATTGCGGGGTATGACTGCAGCAAAGTATCTCCACAGTG
G A T T S T V D S V P S K N L I F V G V M T A A K Y L P T R
CTGTGCACTCAATGGCAGTGGCACAACATTCTGGCCAAGTACGGCATTTCTCAGCAGTCTCGAGGTACCCAGCAGACTGGA
A V A V N R T W A Q T I P G Q V A F F S S S S E V P A E W
ACCTACAGTAGTAAAGTACGGGTAGATTCACCCACAAAAGAAGTCATTATGATGCTGAAATACATGATGATAACT
N I P V V S I L H G V D D S Y P P Q K K S F M M I L K Y M H D N
TTATTGACAAGTATGAATGGTTATGAGGGCAGATGATGATGTTACATTAAAGGTCACAAATTAGAACCTTACGATCCCTTAATG
F I D K Y E W F M R A D D D V Y I K G Y K L E P F L R S L N
GGACTAAAGCGCCTCTACGTGGCCAAAGCAGGACTGGAAAAACAGAAAGAGAAAGGTCTCTGCATTACACATGGAGAGAACATT
G T K R L Y V G Q A G L G K T E E K G L L H L Q H G E N F C
TGGGTGGACCTGAAATGATTTAGTAGGGAAACCTTAAAGGATATTGACCCCCACATTAGTAGTACTGTCGAGAACCTTGGAGTGAC
M G G P G M I F S R E T L K S I A P H I S Y C L Q N L W S V
ATGAAGATGTAGAAGTGGAAAGATGTGTCGAAAGTTGCGAGACTGCGATTGACCTGTCCTATGAGATGCGAGCCTTTACCAA
H E D V E V G R C V R K F A E V D C T W S Y E M Q T L F Y Q
ACTACAGTAGTGGCACTCACCTTACGGCAATCTCACACACCAGAACATGGAGAGAACAACTCCACCCCAATCAAAGAAC
N Y S S G T L P F T G N L H T P E V W R A I T L H P I K R T
TTCACATGTACCGTTACATGCATACCTTGAATCTCACTATAGCCAGAAAGAGACTCAGATTCTACTACCGAGAACATTCA
L H M Y R L H A Y L E S Q Y I A E K R L Q I L S Y Y R E I Q
ACATGAAAGAACCTTCGACGGGACAAGTCGGAGAACCTGGTACCCACGAGACCCGGACATTAGGTACACCCGAGTCATGAAAT
D M K E L L H E D K S E N P G T H E T R H L G S H P S L M K
ACCGGGCCGATTCCAAAGACGTTACCGTGGAAAGTGTCTGGTACCGCTTACCTGTATCTCTATAACATGGACTCTCCAGCAGGGAT
Y R A D S F Q D V I P W K C F S R Y L Y L H N M D S P K Q G
TCACTAAACCCATCCAGGCCCGTACTGATGTTCTACAAGTAATGCAACTCATTAATTCCAATTCAAAGGGTAGGTAGAACAA
F T K P I Q A A V T D V V L Q V M Q L I N S N S K R V G R T
TAGAATTCAAAGAACATATGTTGCTTCAAGACTCATCCCACCGTACGGTGTGTTATTTGGATCTCTGTAGTTAACAGA
I E F K E I M Y G Y S R L I P P Y G V D Y I L D L L V V Y K
AACATCAGGGTCAAGTCGGACTCTCGTCCAGGCCACCGTACCTACACAGAGCTTGGTCGATGAGCTGATCGAACAGAAC
K H Q G S S R T L S V R R H T Y L H Q S F G R I E L I E D E
ATCTCCAGAACATTCAAGAGACTGAAATTACGGGACAAAGTCGAGTATTCAACAGACATGGTATATTAGCCTATTCTCAAGGATAGTGGTCA
Y L Q N S E E L K L S D E S R S I F S Q N S Y Y S K D S W F
TAAACAAATCAAAGGAGACGATACACTCATGCGCTGGGGCTGGTAGAGATTTCAGAACATTCAAGGATCTTGGAGAACATT
I N K S K E T I H F I M P L A G R L E I F Q R F M K N F E K
ATTGCCCTGGTCCGGCGATCGCTGAAACTGTTGGTAGTGTCTATTCAAACAAAGACATGATGATCACTGGAGCGATCGAACAGAAC
N C L V P G D S V K L L V V L F K Q D N D D Q S E A I E E T
TGATGAAATACGCAAGAACATACCCCTAATACGATTTACGCTCTCTCATGGCTGGAGAGACTTCAGAACAGGGCGCTCTGACCTAG
L M K Y A K Q Y P N Y D L R L L H G V G D F K R G A A L D L
GAGCGTCGCAGTCCCAAATCGGGCTGTATTTCTCGACCTTGATATCTGTCCTCCAGGGTTCTCTCGCGATGCGCTCTCA
G A S Q F P K S A L M F F V D V D M Y L S P G F L S R C R L
ACACAGCATTGGGAGTCAGGTTACTTCGTCGGTCTCAGTCAGTACAATCCGGATTGGCTACGGCCCGAAAGTCATCCGAGCA
N T A L G S Q V Y F P S V F S Q Y N P D F V Y G P E S H P S
GCCACGTGTCATCAACAGGAGCTGGCTTCTCCCAATTATGGTACGGGATGTCGTCCTCACAGAACAGACCTCGAGGGTCG
S Q L V I N K E A G F F R N Y G Y G I V C L Y N E D L Q R V
GAGGGTTGACTCTCCATCGTAGGATGGGGATTCGAGGATGTTGACTGTACCAAAATTGTCTCCAGAACATCACAAACTCCGAA
G G L D S S I V W G F E D V D L Y Q K F V S N I T L R
CGCACAGCCAGGCGTGTCCATTACCCGGTGGAGTGTGATGATGAACTGCTGGAGCCATAAGCAATACAGAGCTGATGGAGAAC
T P D P G L V H I Y H P V E C D V M L E P K Q Y Q M C M G T
AGGGCAACACATACGGGAGTAATATGCGTGGCAACACGTCAGGAGGTGGAGCTAAACTAGATGACGGAGCTGAGAACATT
K G N T Y G S N M Q L A K Q L Q E V R A K L D D G A R E L L
GGAAGTAAgtgtataatgtcagcttatcaaagatgttattgttgcgttgcgttatcaactgcgtgtgcgtgcgt
G K *

图 1 刺参 *AjChSy-1* 基因全长 cDNA 序列及推测的氨基酸序列

ORF 区用大写字母表示, 5'-UTR 和 3'-UTR 用小写字母表示, 起始密码子和终止密码子加框表示, 黄色阴影表示假定的跨膜结构域, 下划线表示保守 DxD 结构域.

Fig. 1 Full-length cDNA sequence and putative amino acid sequence of *AjChSy-1* gene in *Apostichopus japonicus*

ORF regions are indicated with uppercase letters, 5'-UTR and 3'-UTR in lowercase letters, start and stop codons are boxed, yellow shade indicates putative transmembrane structural domains, and underlining indicates conserved DDX structural domains.

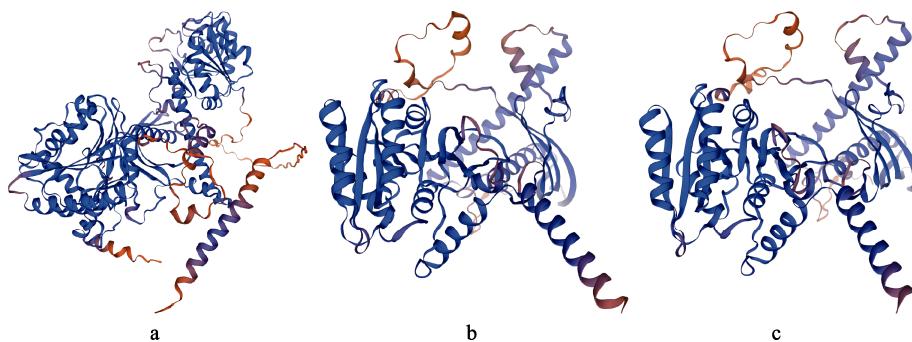


图2 刺参与玉足海参及智人ChSy-1蛋白的三维结构比较

a. 智人; b. 刺参; c. 玉足海参.

Fig. 2 Comparison of ChSy-1 protein three-dimensional structure between *Apostichopus japonicus*, *Holothuria leucospilota* and *Homo sapiens*
 a. *Homo sapiens*; b. *Apostichopus japonicus*; c. *Holothuria leucospilota*.

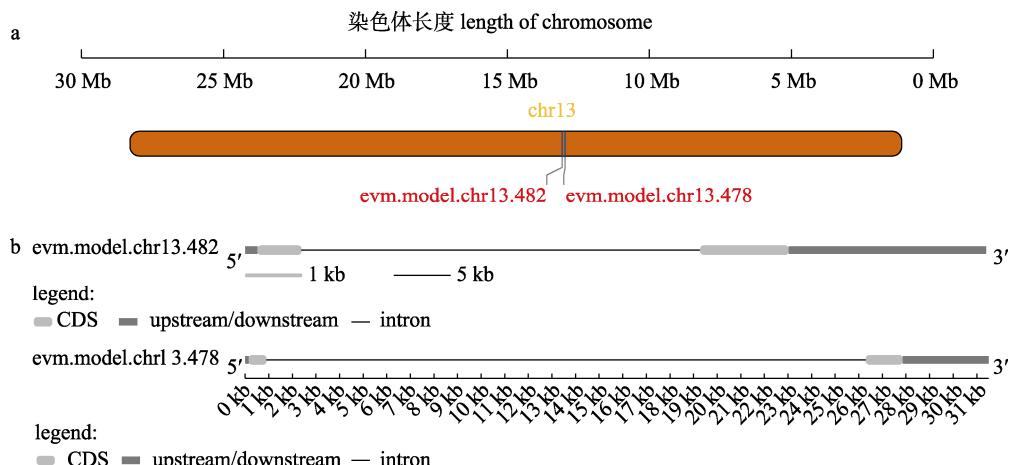
图3 刺参 *AjChSy-1* 在基因组的定位(a)及外显子-内含子结构(b)示意图Fig. 3 Localization in the genome (a) and exon-intron structure (b) of *AjChSy-1* in *Apostiopsis japonicus*

表2 刺参 AjChSy-1 蛋白与其他物种的氨基酸序列同源性分析

Tab. 2 Amino acid sequence homology analysis of AjChSy-1 protein with other species

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		0.19	0.58	0.75	0.75	0.77	0.79	0.77	0.77
2	82.37		0.57	0.73	0.73	0.76	0.76	0.75	0.76
3	54.57	55.24		0.76	0.75	0.76	0.76	0.75	0.76
4	43.50	44.89	42.01		0.06	0.14	0.26	0.13	0.17
5	43.63	44.63	41.89	93.52		0.11	0.24	0.09	0.16
6	42.73	43.99	42.5	86.13	88.9		0.24	0.09	0.16
7	42.73	43.73	40.89	76.03	76.78	77.55		0.23	0.25
8	43.24	44.12	41.89	86.63	89.63	89.66	78.00		0.13
9	42.47	44.37	41.89	81.65	84.54	84.49	76.28	86.50	

注: 1. 刺参; 2. 玉足海参; 3. 棘冠海星; 4. 小鼠; 5. 智人; 6. 原鸡; 7. 斑马鱼; 8. 绿海龟; 9. 热带爪蟾; 表格左下部分为相似性(%); 右上部分为遗传距离。

Note: 1. *Apostichopus japonicus*; 2. *Holothuria leucospilota* (KAJ8029970.1); 3. *Acanthaster planci* (XP_022110348.1); 4. *Mus musculus* (BAC98065.1); 5. *Homo sapiens* (AAQ88893.1); 6. *Gallus gallus* (XP_040535889.1); 7. *Danio rerio* (NP_997843.1); 8. *Chelonia mydas* (XP_007053572.3); 9. *Xenopus tropicalis* (XP_031753358.1). The lower left part of the table shows similarity (%); the upper right part shows genetic distance.

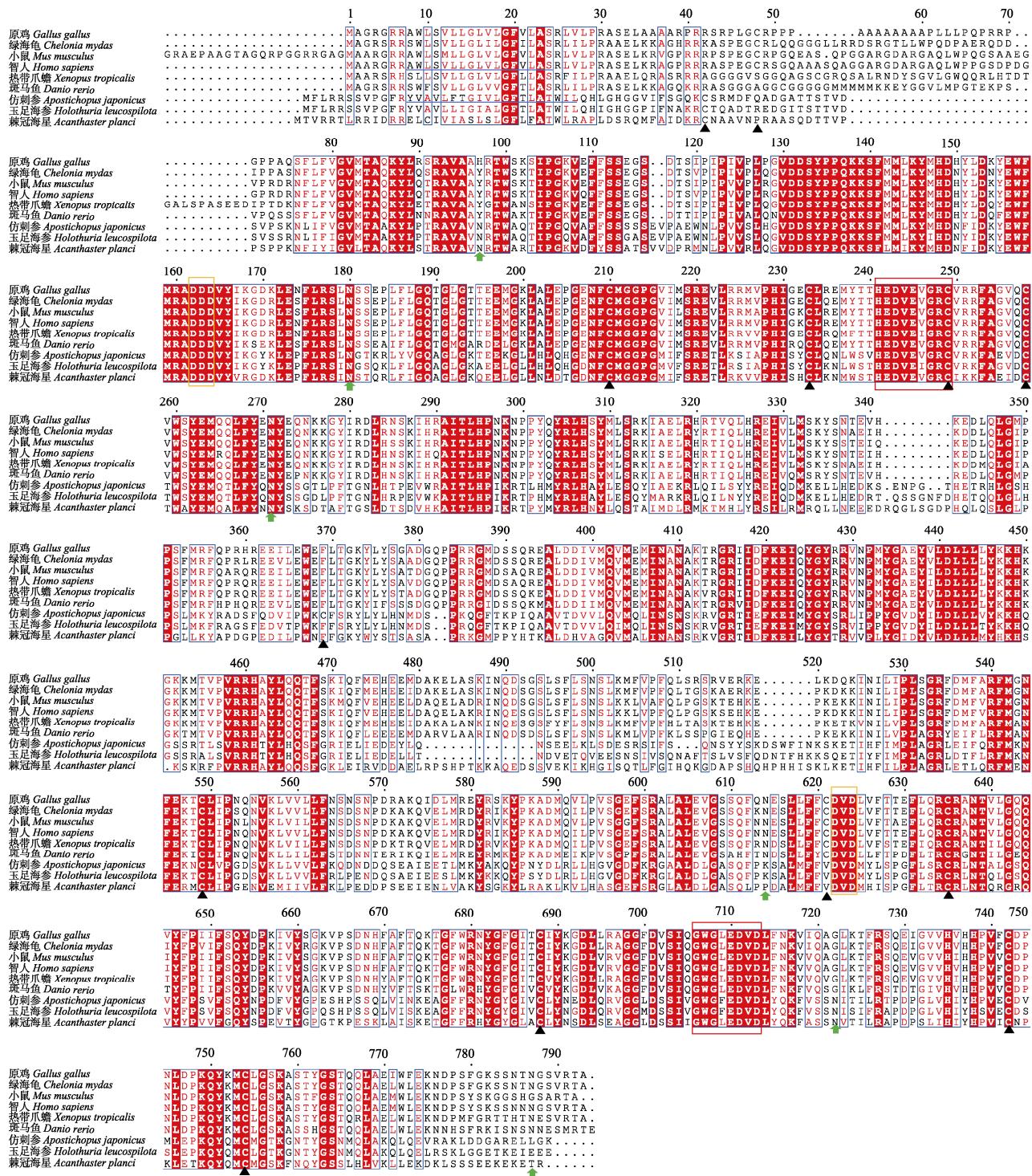


图 4 不同物种 ChSy-1 氨基酸序列比对分析

蓝色边框表示保守的氨基酸残基，其中 100% 相同的残基用红色阴影表示，≥75% 相同的残基用粉色字母表示；

假定的跨膜结构域用下划线标出，橙色框表示 DXD 基序，黑色箭头表示半胱氨酸残基的位置；

绿色箭头表示 N-糖基化位点位置，红色框表示 β3-/β4-糖基转移酶基序。

Fig. 4 Multiple sequence alignment of ChSy-1 with other species

Blue borders indicate conserved amino acid residues, residues that are 100% identical are shaded in red, residues that are ≥75% identical are indicated by pink letters. The putative transmembrane domains are underlined;

orange boxed lists indicate DXD motifs, black arrow indicate the position of cysteine residues,

green arrow indicate the position of N-glycosylation sites, and red boxes indicate β3-/β4-glycosyltransferase motifs.

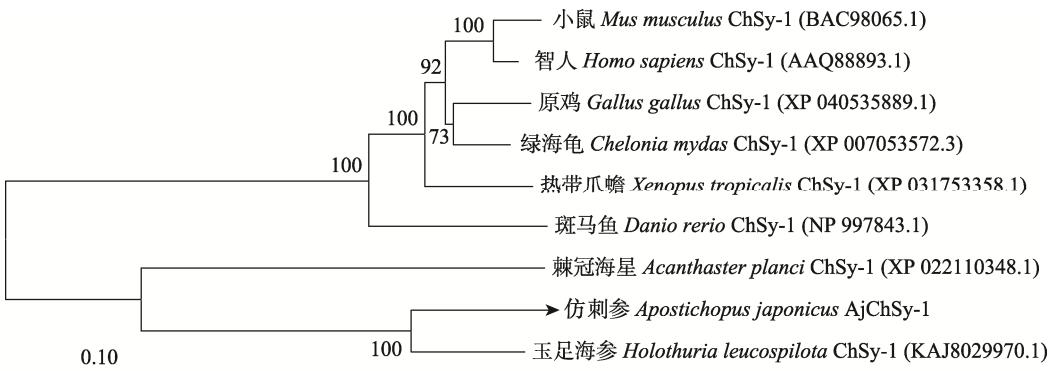
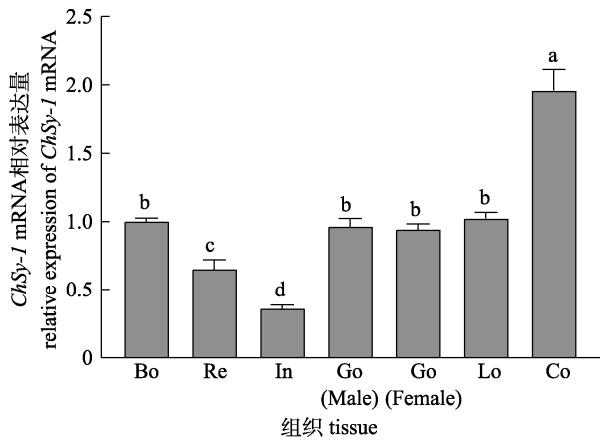


图 5 刺参 AjChSy-1 与其他物种氨基酸序列的系统进化树

采用邻接法构建系统进化树, 每个节点代表一个分类单元, 黑色箭头表示 AjChSy-1.

Fig. 5 Phylogenetic tree of AjChSy-1 with other ChSy-1s in other species

The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, each node represents a taxonomic unit, and black arrows indicate AjChSy-1.

图 6 刺参主要组织中 *AjChSy-1* 基因表达

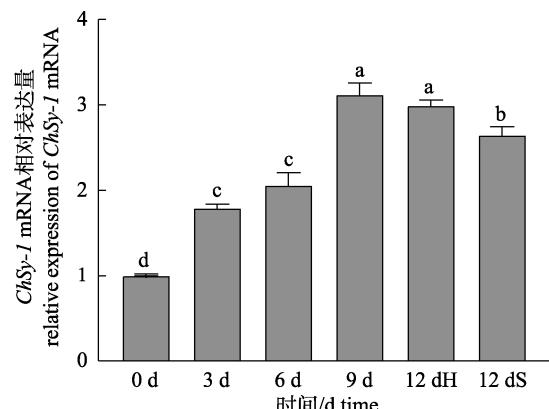
Bo: 体壁; Re: 呼吸树; In: 肠; Go: 性腺; Lo: 纵肌;
Co: 体腔细胞. 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 Expression of *AjChSy-1* gene in major tissues of *Apostichopus japonicus*

Bo: Body wall; Re: Respiratory tree; In: Intestine; Go: Gonad; Lo: Longitudinal muscle; Co: Coelomocytes. Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

壁中 *AjChSy-1* 转录水平呈现先上升后下降的趋势, 与对照组相比各时间点转录水平均显著上调。在灿烂弧菌侵染 3 d 后, 上升至对照组的 1.79 倍($P<0.05$), 6 d 时为对照组的 2.06 倍($P<0.05$), 9 d 时转录水平最高, 为对照组的 3.12 倍($P<0.05$)。至攻毒 12 d 以后为腐皮综合征的发病期, 通过对发病期健康个体(抗病群体)和发病个体(易感群体)体壁组织中该基因的表达差异检测结果表明, 抗病个体中该基因仍维持较高表达水平, 表达量为对照组的 2.99 倍($P<0.05$), 而在易感群体中表达

量为未攻毒组个体的组的 2.65 倍, 比攻毒组健康个体表达量低 11.4%, 差异显著($P<0.05$)(图 7)。

图 7 灿烂弧菌侵染后 *AjChSy-1* 基因的转录水平变化
12dH 和 12dS 分别表示灿烂弧菌侵染 12 d 后健康个体和发病个体. 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$).Fig. 7 Changes in transcript levels of *AjChSy-1* gene in response to *Vibrio splendidus* infection
12dH and 12dS indicate healthy individuals and sick individuals after 12 d of *Vibrio splendidus* infection, respectively. Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

3 讨论

本研究首次克隆获得了刺参 *AjChSy-1* 基因的全长 cDNA, 通过与脊椎动物 *ChSy-1* 序列比较, 发现其编码蛋白具有糖基转移酶保守性 DXD 基序、 β 3-糖基转移酶基序以及 β 4-糖基转移酶基序等结构。目前, 关于智人 *ChSy-1* 序列结构研究较

为明确,研究发现在大多数糖基转移酶中含有保守的 DXD 结构(天冬氨酸-X-天冬氨酸),是二价阳离子结合的关键序列^[26];智人 ChSy-1 在氨基端均有一个 β 3-糖基转移酶基序,在羧基端均有 β 4-糖基转移酶基序^[10]。刺参 AjChSy-1 氨基酸序列与智人 ChSy-1 均有 11 个半胱氨酸残基,其中有 9 个半胱氨酸残基位置具有良好的保守性,且均有一个相似的 II 型跨膜拓扑结构^[1,10]。与智人 ChSy-1 的 3 个潜在 N-糖基化位点相比,刺参 AjChSy-1 蛋白的 4 个潜在 N-糖基化位点中仅有 1 个是一致的^[1]。半胱氨酸残基可发生大量非酶或酶的催化修饰,从而快速、动态地调节蛋白质的结构和活性,继而影响蛋白质的功能^[27]。N-糖基化是一种广泛的共价修饰方式,在新生蛋白折叠与运输、受体识别以及宿主免疫系统逃避等机制中产生重要的作用^[28]。综上,刺参 AjChSy-1 基本具有智人等脊椎动物 ChSy-1 的结构特征,属于糖基转移酶家族的成员,其蛋白分子的结构与智人有一定差异,可能会与刺参 AjChSy-1 的功能差异有关。

本研究显示, *AjChSy-1* 在刺参体壁、呼吸树、肠道、性腺、纵肌以及体腔细胞等组织中广泛表达,这与基因在智人和马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*) 各组织中均有表达的结果一致^[1,29],暗示了 *AjChSy-1* 可能在机体中执行多种生理功能。刺参各组织 *AjChSy-1* 表达量有一定差异,其中,在体腔细胞中的表达量最高,这与体腔细胞是海参非特异性免疫的关键因子,具有重要防御功能有关^[30]。本研究与马氏珠母贝外套膜 *ChSy-1* 表达最高具有一定差异^[29],这可能与其未检测细胞免疫相关组织的表达量有关,不过,外套膜除了具有生物矿化功能外也发挥着免疫屏障作用, *ChSy-1* 在两种免疫相关组织中高表达的结果具有一致性。

在灿烂弧菌侵染下,体壁中 *AjChSy-1* 表达量随侵染时间增加呈现先上升后下降的趋势,这与 LPS 刺激后马氏珠母贝外套膜和消化腺组织中 *ChSy-1* 的表达趋势一致^[29]。在免疫调控前期, *AjChSy-1* 基因在体壁中上调以响应灿烂弧菌感染,后期受长期感染,免疫力受到严重影响,刺参状

态差且出现大量化皮现象,基因表达出现下降。据推测马氏珠母贝受到 LPS 刺激后可能通过 *ChSy-1* 调节硫酸软骨素的合成而参与贝类免疫反应^[29]。硫酸软骨素可以呈递细菌、病毒和寄生虫等病原体,引发宿主细胞内生化反应和免疫反应^[31-32];在骨关节炎中,硫酸软骨素具有减少软骨细胞和滑膜中的 NF- κ B (Nuclear factor- κ B) 活化和核转位的调节作用^[33];海参硫酸软骨素能够明显降低大鼠胃的出血情况和溃疡面积,保护黏膜细胞的完整性,减少炎症细胞的浸润^[34];鲟鱼硫酸软骨素能促进小鼠 T 淋巴细胞的活化,显著增强小鼠的免疫功能和抗炎抗过敏活性^[35]。因此, *AjChSy-1* 基因可能通过调节 CS 的合成,参与刺参免疫反应,并在刺参的免疫反应中发挥重要作用。此外,研究表明, *ChSy-1* 作为智人成纤维细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(CASP1)的调节因子间接参与伤口愈合^[36-37];马氏珠母贝 *ChSy-1* 基因通过参与生物矿化的 BMP 信号通路影响贝壳的修复过程^[38]。刺参在灿烂弧菌侵染下会发生化皮直至体壁大面积溃烂死亡,刺参化皮的发生发展是一个多基因调控的复杂过程,其病变体壁组织存在动态的基因表达模式^[39]。本研究发现刺参体壁中 *AjChSy-1* 表达量在受到灿烂弧菌侵染的条件下会表达上调,证明该基因参与相应灿烂弧菌侵染过程,而在发病期抗病群体该基因表达量显著高于易感群体中该基因表达量,进一步证实该基因对刺参抵御病原侵染有正相关作用。

本研究克隆了刺参 *AjChSy-1* 基因全长,对其序列结构以及灿烂弧菌感染下组织表达特征进行了分析,结果显示, *AjChSy-1* 在各组织中均有分布,在体腔细胞中的相对表达量最高。随灿烂弧菌侵染时间增加,该基因在体壁中呈现先上升后下降的表达模式,且在抗病群体中的表达量显著高于易感群体,表明该基因在刺参应对灿烂弧菌感染有着重要作用,研究结果可为刺参抗病机制研究和抗病品种的培育提供一定参考。

参考文献:

- [1] Kitagawa H, Uyama T, Sugahara K. Molecular cloning and expression of a human chondroitin synthase[J]. Journal of

- Biological Chemistry, 2001, 276(42): 38721-38726.
- [2] Sugahara K, Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2000, 10(5): 518-527.
- [3] Sugahara K, Mikami T, Uyama T, et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2003, 13(5): 612-620.
- [4] Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes[J]. Nature, 2000, 404(6779): 725-728.
- [5] Filipek-Górnio B, Holmborn K, Haitina T, et al. Expression of chondroitin/dermatan sulfate glycosyltransferases during early zebrafish development[J]. Developmental Dynamics, 2013, 242(8): 964-975.
- [6] Yada T, Gotoh M, Sato T, et al. Chondroitin sulfate synthase-2: Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32): 30235-30247.
- [7] Yada T, Sato T, Kaseyama H, et al. Chondroitin sulfate synthase-3: Molecular cloning and characterization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(41): 39711-39725.
- [8] Gotoh M, Yada T, Sato T, et al. Molecular cloning and characterization of a novel chondroitin sulfate glucuronyltransferase that transfers glucuronic acid to *N*-acetylgalactosamine[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(41): 38179-38188.
- [9] Kitagawa H, Izumikawa T, Uyama T, et al. Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(26): 23666-23671.
- [10] Uyama T, Kitagawa H, Tamura Ji J, et al. Molecular cloning and expression of human chondroitin *N*-acetylgalactosaminyltransferase: The key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(11): 8841-8846.
- [11] Uyama T, Kitagawa H, Tanaka J, et al. Molecular cloning and expression of a second chondroitin *N*-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(5): 3072-3078.
- [12] Izumikawa T, Uyama T, Okuura Y, et al. Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor[J]. Biochemical Journal, 2007, 403(3): 545-552.
- [13] Izumikawa T, Koike T, Shiozawa S, et al. Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: Chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(17): 11396-11406.
- [14] Ogawa H, Hatano S, Sugiura N, et al. Chondroitin sulfate synthase-2 is necessary for chain extension of chondroitin sulfate but not critical for skeletal development[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43806.
- [15] Sher G, Naeem M. A novel CHSY1 gene mutation underlies Temtamy preaxial brachydactyly syndrome in a Pakistani family[J]. European Journal of Medical Genetics, 2014, 57(1): 21-24.
- [16] Wilson D G, Phamluong K, Lin W Y, et al. Chondroitin sulfate synthase 1 (Chsy1) is required for bone development and digit patterning[J]. Developmental Biology, 2012, 363(2): 413-425.
- [17] Tian J, Ling L, Shboul M, et al. Loss of CHSY1, a secreted FRINGE enzyme, causes syndromic brachydactyly in humans via increased NOTCH signaling[J]. American Journal of Human Genetics, 2010, 87(6): 768-778.
- [18] Zhang C Y, Wang Y G, Rong X J. Isolation and identification of causative pathogen for skin ulcerative syndrome in *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 118-123. [张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.]
- [19] Wang Y G, Fang B, Zhang C Y, et al. Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 610-616. [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610-616.]
- [20] Meng F Y, Mai K S, Ma H M, et al. The evolution of echinoderm immunology[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(7): 803-809. [孟繁伊, 麦康森, 马洪明, 等. 棘皮动物免疫学研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(7): 803-809.]
- [21] Xue Z, Li H, Wang X L, et al. A review of the immune molecules in the sea cucumber[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 1-11.

- [22] Zhan Y Y, Liu L, Zhao T J, et al. MicroRNAs involved in innate immunity regulation in the sea cucumber: A review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 95: 297-304.
- [23] Chang M Y. miRNA analysis and ceRNA regulatory network of *Apostichopus japonicus* in response to *Vibrio splendidus* infection and high temperature stress[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022. [畅孟阳. 刺参响应灿烂弧菌侵染和高温胁迫的miRNA分析及ceRNA调控网络构建[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.]
- [24] Chang M Y, Li B, Rong X J et al. Identification of differential expression microRNAs and target genes analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in response to *Vibrio splendidus* infection[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(2): 107-117. [畅孟阳, 李彬, 荣小军, 等. 刺参响应灿烂弧菌侵染差异 microRNAs 鉴定及靶基因分析[J]. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 107-117.]
- [25] Wang L Q, Tian Y, Zhang Y P, et al. Quantitative expression analysis of manganese superoxide dismutase gene in different tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus* under lipopolysaccharide stimulation[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2017, 19(3): 123-130. [王立强, 田燚, 张宇鹏, 等. 刺参不同组织中 MnSOD 基因在脂多糖刺激下的定量表达分析[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(3): 123-130.]
- [26] Wiggins C A, Munro S. Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(14): 7945-7950.
- [27] Zhang X Q, Chen C, Fang C Y, et al. Progress of analytical methods for protein cysteine post-translational modifications [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(11): 1771-1779.
- [28] Vigerust D J, Shepherd V L. Virus glycosylation: Role in virulence and immune interactions[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(5): 211-218.
- [29] Zhang H, Yi X J, Guan Y Y, et al. The role of the chondroitin sulfate synthase-1 gene in the immune response of the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 86(3): 487-494.
- [30] Sun Y X, Wang J Q, Wang T T, et al. A review: Defense mechanism in sea cucumber[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(6): 358-361. [孙永欣, 王吉桥, 汪婷婷, 等. 海参防御机制的研究进展[J]. 水产科学, 2007, 26(6): 358-361.]
- [31] Uyama T, Ishida M, Izumikawa T, et al. Chondroitin 4-O-sulfotransferase-1 regulates E disaccharide expression of chondroitin sulfate required for herpes simplex virus infectivity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(50): 38668-38674.
- [32] Trowbridge J M, Gallo R L. Dermatan sulfate: New functions from an old glycosaminoglycan[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(9): 117R-125R.
- [33] Vallières M, du Souich P. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, 18(S1): S1-S6.
- [34] Liu Y Q, Li G Y, Gao Y, et al. Protective effect of chondroitin sulfate from sea cucumber against alcohol-induced gastric ulcer in rats[J]. *Food Science*, 2011, 32(19): 201-204. [刘艳青, 李国云, 高焱, 等. 海参硫酸软骨素对大鼠酒精性胃溃疡的保护作用[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 201-204.]
- [35] Huang S Y, Li J S, Guan R Z, et al. Study on the immune function and anti-inflammatory and anti-allergic effect of sturgeon chondroitin sulfate[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2012, 33(5): 540-543. [黄世玉, 李江森, 关瑞章, 等. 鲟鱼硫酸软骨素的免疫调节及抗炎抗过敏活性[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(5): 540-543.]
- [36] Au-Yeung G K C, Lu J, Moochhala S M, et al. Pathology of wound healing: chondroitin sulfate synthase 1 regulates the expression and activity of caspase 1[C]//Proceedings of the World Medical Conference. Singapore: National University of Singapore, 2011: 222-226.
- [37] Zou X H, Foong W C, Cao T, et al. Chondroitin sulfate in palatal wound healing[J]. *Journal of Dental Research*, 2004, 83(11): 880-885.
- [38] Yi X J, Zhang H, He M X. Biominerization function of *ChSy-1* in pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2017, 8(4): 377-382. [衣雪洁, 张华, 何毛贤. 马氏珠母贝硫酸软骨素合成酶1基因的生物矿化功能[J]. 热带生物学报, 2017, 8(4): 377-382.]
- [39] Yang A F, Zhou Z C, Gao S, et al. Identification of genes associated with skin ulceration syndrome in *Apostichopus japonicus* based on RNA sequencing[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(3): 475-484. [杨爱馥, 周遵春, 高杉, 等. 基于转录组测序挖掘刺参“化皮病”相关基因[J]. 中国水产科学, 2018, 25(3): 475-484.]

Cloning of the chondroitin sulfate synthase 1 gene and its expression pattern analysis under *Vibrio splendidus* infection in sea cucumber *Apostichopus japonicus*

TAN Yanting^{1,2}, GE Jianlong^{2,3}, LIAO Meijie^{2,3}, RONG Xiaojun^{2,3}, WANG Jinjin^{2,3}, LI Bin^{2,3}, ZHAO Yanfeng², WANG Yingeng^{2,3}, WANG Lu⁴

1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Key Laboratory of Sustainable and Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Process Laoshan Laboratory, Qingdao 266071, China;
4. Qingdao Marine Management and Support Center, Qingdao 266071, China

Abstract: Chondroitin sulfate synthase-1 (ChSy-1) is a crucial enzyme involved in the synthesis and elongation of chondroitin sulfate (CS), playing a vital role in combating bacterial and viral infections. The growing scale of aquaculture has led to the emergence of "rotting skin syndrome" caused mainly by *Vibrio splendidus*, posing a severe threat to the healthy cultivation of sea cucumbers. Our recent transcriptome study has found that *ChSy-1* may have an essential immune function in protecting sea cucumbers from pathogenic infection; however, there has been no prior research on chondroitin sulfate synthase in echinoderms. In the present study, we obtained the full-length cDNA sequence of *ChSy-1* using the RACE technique and analyzed its tissue expression characteristics in sea cucumbers using real-time fluorescence quantitative PCR. Furthermore, we also examined the expression characteristics of the body wall tissues under *Vibrio vulnificus* infiltration to investigate the possible physiological effects of *AjChSy-1* on pathogenic infection. The study found that the *AjChSy-1* gene has a full cDNA length of 2756 bp, with 5'-UTR length of 194 bp, 3'-UTR length of 228 bp, and ORF length of 2334 bp. The ORF encodes 777 amino acids, with a predicted molecular weight of the encoded protein of 89.1 kDa. The theoretical isoelectric point was 7.62, with a fat coefficient of 82.25 and an instability factor of 43.77. The protein sequence contains a type II transmembrane topology with 11 cysteine residues and four potential *N*-glycosylation sites. The three-dimensional spatial structure of the sea cucumbers *AjChSy-1* protein is similar to that of the *Holothuria leucospilota* ChSy-1, with some differences from *Homo sapiens*. The sea cucumbers genome contains two copies of the *AjChSy-1* gene, both of which are found on chromosome chr13. Gene structure analysis shows that both copies have two exons and one intron. Phylogenetic analysis showed that the protein encoded by *AjChSy-1* in sea cucumbers was closely related to that of *Holothuria leucospilota* and *Acanthaster planci*, with similarities of 82.37% and 54.57%, respectively. It was more distantly related to that of *Danio rerio*, *Homo sapiens*, and other vertebrates. The protein encoded by *AjChSy-1* contains structures such as a glycosyltransferase-conserved DXD motif, β 3-glycosyltransferase motif, and β 4-glycosyltransferase motif. Fluorescence quantitative PCR showed that the *AjChSy-1* gene has a wide range of tissue expression characteristics, with the highest expression in the coelomocytes, followed by the body wall, gonads (male and female), and longitudinal muscles. The expression of *AjChSy-1* in the body wall increased and then decreased with an increase in *Vibrio splendidus* stress duration. After 3 days of *Vibrio splendidus* imbibition, it increased sharply to 1.79 times of the control group and reached the highest transcript level of 3.12 times of the control group at 9 days. It then decreased starting from 12 days, and in diseased individuals, it decreased to 2.65 times of the control group. Upon analysis of the genes in both resistant and susceptible populations at the onset of the disease, it was revealed that the susceptible population had a markedly lower gene expression in their body wall compared to the resistant population ($P < 0.05$), with a difference of 11.4% in expression. According to the research findings, *AjChSy-1* gene could potentially contribute to the immune protection against *Vibrio splendidus* in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. This study has also provided crucial insights into the regulatory mechanism of disease resistance and functional analysis of the *AjChSy-1* gene in sea cucumbers.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *ChSy-1*; gene cloning; fluorescence quantitative PCR; gene expression; *Vibrio splendidus*

Corresponding author: GE Jianlong. E-mail: gejl@ysfri.ac.cn