

## 斑节对虾 *TRIAP1* 基因的克隆、表达分析以及调控其表达的 miRNAs 的筛选

刘恩瑞<sup>1,2</sup>, 赵超<sup>1</sup>, 王鹏飞<sup>1</sup>, 范嗣刚<sup>1</sup>, 闫路路<sup>1</sup>, 邱丽华<sup>1,3</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 3. 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 北京 100141)

**摘要:** 凋亡抑制因子 1 (tumor protein p53 regulated inhibitor of apoptosis 1, *TRIAP1*) 可以通过抑制细胞凋亡参与生物体内应激反应。为探究 *TRIAP1* 基因及调控其表达的 miRNAs 在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 应对哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激时的表达调控情况, 该研究通过 RACE 技术获得了斑节对虾 *TRIAP1* 基因 (*PmTRIAP1*) cDNA 全长序列, 并利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 对 *PmTRIAP1* 在斑节对虾不同组织中的表达分布模式, 以及哈氏弧菌刺激下 *PmTRIAP1* 与相关 miRNAs 的表达关联情况进行了探究。结果显示, *PmTRIAP1* cDNA 全长 2 522 bp, 包括 11 bp 的 5'非编码区 (UTR)、2 289 bp 的 3'UTR 和 222 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 73 个氨基酸。*PmTRIAP1* 基因在各组织中均有表达, 其中在血细胞中表达量最高; 哈氏弧菌刺激下, *PmTRIAP1* 表达量显著降低, 而 Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 表达量显著升高, 表明 *PmTRIAP1* 和 Pm-miR-145-3p、Pm-miR-454-3p 的表达量呈负相关关系; 双荧光素酶报告实验结果显示, Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 可通过结合 *PmTRIAP1* 3'UTR 降低荧光素酶活性, 表明 Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 均可靶向调控 *PmTRIAP1* 的表达。

**关键词:** 斑节对虾; *TRIAP1*; Pm-miR-145-3p; Pm-miR-454-3p; 哈氏弧菌

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Cloning, expression analysis of *TRIAP1* and its related miRNAs screening in *Penaeus monodon*

LIU Enrui<sup>1,2</sup>, ZHAO Chao<sup>1</sup>, WANG Pengfei<sup>1</sup>, FAN Sigang<sup>1</sup>, YAN Lulu<sup>1</sup>, QIU Lihua<sup>1,3</sup>

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China)

**Abstract:** *TRIAP1* can participate *in vivo* responses by inhibiting apoptosis. In order to analyze the expression regulation of *TRIAP1* and miRNAs that regulate *TRIAP1*'s expression under *Vibrio harveyi* challenge in *Penaeus monodon*, we obtained the

收稿日期: 2018-12-18; 修回日期: 2019-04-05

资助项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0900303); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2019TS11); 海南自然科学基金创新研究团队项目 (2017CXTD021); 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2018163); 广东省海洋渔业科技与产业发展专项 (A201701A04)

作者简介: 刘恩瑞 (1992—), 男, 硕士研究生, 从事海洋生物功能基因研究。E-mail: liuyi9241@yahoo.com.cn

通信作者: 邱丽华 (1971—), 女, 博士, 研究员, 从事海洋生物功能基因研究。E-mail: qiugroup\_bio@outlook.com

*P. monodon TRIAP1* gene (*PmTRIAP1*) cDNA by RACE, then detected the tissue distribution of *PmTRIAP1* by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and investigated the expression association between *PmTRIAP1* and its related miRNAs under *V. harveyi* challenge. The results show that the full-length *PmTRIAP1* cDNA sequence was 2 522 bp, containing an 11 bp 5' non-coding region (UTR), a 2 289 bp 3'-UTR and a 222 bp open reading frame encoding 73 amino acids. The qRT-PCR analysis shows that *PmTRIAP1* was ubiquitously expressed in all the tested tissues and the highest expression level was obtained in hemocyte. The expression of *PmTRIAP1* decreased significantly; however, the expressions of Pm-miR-145-3p and Pm-miR-454-3p increased significantly under *V. harveyi* challenge, which suggests that the expression levels of *PmTRIAP1* and Pm-miR-145-3p, Pm-miR-454-3p were negatively correlated. Dual luciferase reporter assay shows that Pm-miR-145-3p and Pm-miR-454-3p can bind *PmTRIAP1* 3'UTR to reduce luciferase activity. It is suggested that both Pm-miR-145-3p and Pm-miR-454-3p can target regulate the expression of *PmTRIAP1*.

**Key words:** *Penaeus monodon*; *TRIAP1*; Pm-miR-145-3p; Pm-miR-454-3p; *Vibrio harveyi*

肿瘤蛋白 p53 调控的凋亡抑制因子 1 (tumor protein p53 regulated inhibitor of apoptosis 1, *TRIAP1*) 是一类受 p53 靶向调控的功能型蛋白因子, 在细胞凋亡等程序性细胞死亡过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。研究表明, *TRIAP1* 主要通过热休克蛋白 70 (HSP70) 相互作用阻止凋亡酶激活因子 (APAF1) 和细胞色素 C 结合, 并抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 9 (Caspase9) 的激活, 从而参与调控细胞凋亡过程<sup>[1]</sup>。例如, 低水平的基因毒性物质刺激下, 生物机体内的 p53 可特异性结合 *TRIAP1* 基因第二外显子上的 p53 结合位点诱导 *TRIAP1* 产生, 进而抑制细胞凋亡并启动受损基因修复机制<sup>[1]</sup>; Fook-Alves 等<sup>[2]</sup> 对经特异性沉默 *TRIAP1* 基因后的多发性骨髓瘤细胞系进行研究时发现, *Caspase9* 和 *APAF1* 基因的表达量呈显著下降趋势, 晚期细胞凋亡率显著升高; Potting 等<sup>[3]</sup> 在 HeLa 细胞中也获得了类似的研究结果, 降低 *TRIAP1* 的表达会阻碍心磷脂 (CL) 累积、增加细胞色素 C 释放, 进而引发细胞凋亡的发生。近年来, *TRIAP1* 在高等动物凋亡相关的生理活动中的研究屡屡见诸报端, 但在低等水产养殖动物中却鲜有报道。

MicroRNA (miRNA) 是一类长约 18~25 个核苷酸的内源性非编码小 RNA 分子, 它可以依赖于自身与靶基因 2 种不同机制的互补性 (完全匹配或者种子序列匹配) 以类似 RNA 干扰的途径调控目的基因翻译或降解靶 mRNA 和新合成的多肽链<sup>[4-6]</sup>。成熟的 miRNA 与靶基因的 mRNA 非翻译区 (UTR) 结合的特异性主要由 miRNA 5'末端被称为种子序列的 2~8 个碱基决定<sup>[7-8]</sup>。现已证实, 无论是像甲壳动物、棘皮动物、软体动物等的低等无脊椎水产养殖动物, 还是像鱼类一样的高等脊椎水产养殖动物, miRNA 作为转录后调控的关键因子, 参与调控机体内多种重要的生命活动过程, 如生长发育、

生殖和免疫等<sup>[9-10]</sup>。近年来, 诸如 miR-15、miR-16 和 miR-29 等大批与细胞凋亡发生密切相关的 miRNA 被陆续鉴定出来<sup>[11-12]</sup>, 并已初步证实上述 miRNA 主要通过靶向调控细胞凋亡相关基因的表达介导细胞凋亡的发生。例如, Zhang 等<sup>[13]</sup> 在日本比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) 的研究中得出 miR-731 可以抑制 p53 的表达从而抑制细胞凋亡; Yi 等<sup>[14]</sup> 在日本囊对虾 (*Penaeus japonicus*) 的研究中发现过表达 miR-1000 可抑制 p53 的表达从而抑制细胞凋亡发生, 而沉默 miR-1000 则显著提高 p53 的表达从而促进细胞凋亡的发生。

斑节对虾 (*P. monodon*) 等无脊椎动物因缺乏脊椎动物特有的获得性免疫系统, 主要依赖先天性免疫系统抵御外界不良刺激。细胞凋亡属于对虾先天性免疫系统的血细胞防御系统中的重要一环, 在斑节对虾抵御外界不良刺激过程中起重要作用<sup>[15-16]</sup>。基于 *TRIAP1* 参与调控细胞凋亡的发生, 本研究克隆了斑节对虾 *TRIAP1* 基因 (*PmTRIAP1*), 通过实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术研究了其在不同组织中的表达分布规律以及哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 刺激下其在血细胞和肝胰腺中 mRNA 水平的变化情况; 并对 Pm-miR-145-3p、Pm-miR-454-3p 和 *PmTRIAP1* 的关联关系进行了探究。旨在通过对 *PmTRIAP1* 及调控其表达的 miRNAs 表达调控的研究, 为阐明 *PmTRIAP1* 在斑节对虾中抵御病菌入侵的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

斑节对虾来自中国水产科学研究院南海水产研究所珠海斗门实验基地, 体质量为 (15±3) g, 在 (25±1) °C、盐度 3 的海水中暂养 3 d。每天更换养殖池内 2/3 的海水并按时投喂常规商品化对虾饲

料, 实验前 24 h 停止喂食。

哈氏弧菌由中国水产科学研究院南海水产研究所渔业生物病害防治研究室馈赠。双荧光素酶报告实验质粒 (pMIR-REPORT) 由和元生物技术有限公司 (上海) 构建。

人胚肾 293T (HEK-293T) 细胞株来源于中科院细胞库, 细胞培养条件为 DMEM+10% FBS、37 °C、5% 二氧化碳 (CO<sub>2</sub>)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成** 随机选取 3 尾健康斑节对虾迅速解剖, 取心脏、淋巴、血细胞、肌肉、鳃、卵巢、脑、肠、胸神经、胃、肝胰脏 11 种组织速冻于液氮中。其中血细胞获取方法是: 使用 1 mL 注射器抽取血液, 转移至 2 mL 全新 EP 管中, 立即 4 °C、4000 g 离心 5 min, 倒掉上清, 取其沉淀。按照 Trizol (Invitrogen, 美国) 说明书提取上述样品的总 RNA, 溶于 DEPC 水中。用 NanoDrop-2000/2000c 分光光度计检测浓度, 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测质量。使用 PrimeScript<sup>TM</sup> 逆转录试剂盒 (TaKaRa) 将 RNA 逆转录为 cDNA。保存于 -80 °C。将 cDNA 样品工作液稀释至约 40 ng·μL<sup>-1</sup>, 并在 -20 °C 下储存以备后用。

**1.2.2 *PmTRIAP1* 全长扩增** 从实验室的斑节对虾转录组数据库中获得 *PmTRIAP1* 的部分 cDNA

序列。设计并合成特异性引物 TRIAP1-3GSP1/3GSP2 (表 1), 使用 SMARTer RACE 5'/3'试剂盒 (TaKaRa) 通过降落 PCR 和巢式 PCR 技术扩增目的基因 3'末端。使用引物 TRIAP1-F/R (表 1) 进行常规 PCR 验证 *PmTRIAP1* 基因 cDNA 的开放阅读框 (ORF) 的正确性。

**1.2.3 *PmTRIAP1* 的生物信息学分析** 使用 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 的 BLAST 程序分析 *PmTRIAP1* 的全长 cDNA 序列。用 ExPaSy 计算工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算多肽链的分子量、氨基酸含量和等电点。用 Clustal X 2.1 进行多重序列比对 (<http://www.clustal.org/>)。使用 MEGA 7.0 的邻接 (neighbor-joining, NJ) 方法构建进化树。所有 *TRIAP1* 比对序列信息均从 GenBank 数据库获得。

**1.2.4 *PmTRIAP1* 组织表达分析** 使用 qRT-PCR 检测 1.2.1 所述的斑节对虾 11 个组织中 *PmTRIAP1* 的表达。PCR 反应总体系为 12.5 μL, 其中 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 6.25 μL、cDNA 模板 1 μL、上游引物 qTRIAP1-F 和下游引物 qTRIAP1-R 各 0.5 μL、双蒸水补足至 12.5 μL。反应条件为 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 15 s, 59 °C 退火延伸 30 s, 40 个循环; 溶解温度从 65 °C 升至 95 °C; 40 °C 冷却 5 min。使用 Roche Light-Cycler

表1 实验所用引物

Tab.1 Sequences of primers used in this study

引物名称 primer name	序列 (5'-3') sequence	用途 application
TRIAP1-F	ATGAACAGTGTGAGCAAGGATT	开放阅读框验证
TRIAP1-R	CTATTCTTCGGCTTTTCTCCG	开放阅读框验证
TRIAP1-3GSP1	GGAGGAAGAAAACGCTGGCAGTGG	3' RACE 扩增
TRIAP1-3GSP2	TGCAGCTGAGCTTGAGACCCAAAA	3' RACE 扩增
qTRIAP1-F	TGAACAGTGTGAGCAAGGATT	<i>PmTRIAP1</i> RT-PCR
qTRIAP1-R	AGTGCTCTTGGACACAGCTTTGG	<i>PmTRIAP1</i> RT-PCR
EF-1α-F	AAGCCAGGTATGTTGTCAACTTT	RT-PCR 参照基因
EF-1α-R	CGTGGTGCATCTCCACAGACT	RT-PCR 参照基因
qmiR-145-F	GGATTCTGGAAATACTG	miR-145 RT-PCR
qmiR-454-F	TAGTGCAATATTGGCTA	miR-454 RT-PCR
qmiR-R	CAGTGCGTGTGCTGGAGT	miRNAs RT-PCR
U6-S	CTCGCTTCGGCAGCACA	RT-PCR 内参基因
U6-A	AACGCTCACGAATTTGCGT	RT-PCR 内参基因

480 II 实时定量 PCR 仪进行 PCR, 用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达量。结果用 SPSS 22.0 软件分析, 表示为“平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm SD$ )”, 并进行单因素方差 (One-Way ANOVA) 分析,  $P<0.05$  为差异显著。*PmTRIAP1* 基因特异性引物 (qTRIAP1-F, qTRIAP1-R)、内参基因 *EF-1a* 引物 (GenBank: DQ021452.1) 见表 1。

### 1.2.5 预测与 *PmTRIAP1*-3'UTR 结合的 miRNAs

结合实验室前期建立的斑节对虾小 RNA 文库 (尚未发表), 用软件 Mireap (<http://www.miRNA.org/miRNA/>)、MiRanda (<http://www.miRNA/miRNA.org>) 和 Targetscan (<http://genes.mit.edu/targetscan>) 从中筛选出与 *PmTRIAP1*-3'UTR 结合的 miRNAs。3 个软件预测出来的共有 miRNAs 为最终结果。Mireap 比较发夹前体结构和限制性位点的保守性、计算前体的折叠自由能来预测 miRNAs; MiRanda 评估 2 个序列 (靶基因和 miRNA) 的互补性, 通过计算自由能和进化保守度来过滤信息从而预测 miRNAs; TargetScan 根据靶基因与种子序列的最佳互补性评出最终得分预测 miRNAs。Mireap 和 Targetscan 中的参数是默认的, MiRanda 中的参数修改为  $S\geq 140$  和  $E\leq -14.0$ 。

### 1.2.6 斑节对虾哈氏弧菌刺激实验

使用哈氏弧菌对斑节对虾进行刺激, 并检测 *PmTRIAP1* 和预测的 miRNAs 的表达变化情况。在 2216E 培养基中培养哈氏弧菌, 持续摇动 ( $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 12 h。用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 制备得到  $1.0\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  的菌悬液。

本实验设置 1 个对照组和 1 个实验组, 每组随机选取 25 尾健康的斑节对虾, 分别饲养。稳定 3 d 后腹腔注射。对照组注射 100  $\mu\text{L}$  PBS 溶液, 实验组注射 100  $\mu\text{L}$   $1\times 10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$  的哈氏弧菌悬液。注射后分别于第 0、第 6、第 24、第 48、第 72 小时取样, 5 组重复。取其肝胰腺和血细胞储存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  备用。

按照 1.2.1 的方法提取 2 种组织的总 RNA 并合成 cDNA, *PmTRIAP1* 荧光定量的表达分析、反应体系、反应程序、内参基因和数据处理方法同 1.2.4。

miRNAs 荧光定量实验反应总体体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 ddH<sub>2</sub>O 9  $\mu\text{L}$ 、SYBR Advantage Premix (2 $\times$ ) (TaKaRa) 12.5  $\mu\text{L}$ 、ROX Dye (50 $\times$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 、上游引物 qmiR-145 或 454 和下

游引物 qmiR 各 0.5  $\mu\text{L}$ 。加好试剂后, 将荧光定量 PCR 孔板放入 Roche Light-Cycler 480 II 中, 进行以下程序: 94  $^\circ\text{C}$  变性 10 s; 94  $^\circ\text{C}$  5 s, 60  $^\circ\text{C}$  20 s, 40 个循环; 溶解曲线: 94  $^\circ\text{C}$  60 s, 55  $^\circ\text{C}$  30 s; 95  $^\circ\text{C}$  30 s。

所用引物 qmiR-145、qmiR-454、qmiR、内参基因引物 U6-S、U6-A 见表 1。数据处理方法同 1.2.4。

### 1.2.7 双荧光素酶报告基因检测 miRNAs

Pm-miR-454-3p 和 Pm-miR-145-3p 类似物 (agomir-454: 5'-TAGTGCAATATTGCTAATAGGCT-3'和 agomir-145: 5'-GGATTCCTGGAAATACTGTTCT-3') 及阴性对照 agomir NC (agomir NC: 5'-TGATTTTT CAGCGCCTTGAAAG-3') 委托上海和元生物技术有限公司合成。将 Pm-miR-145-3p 对应的靶基因 *PmTRIAP1* 3' UTR (1 816~1 837 bp, 5'-CAACAAAATC AACAGGAATCTG-3') 和 3' UTR 突变序列 (5'-CAACAAAATCAACGATGCGATG-3') 以及 Pm-miR-454-3p 对应的靶基因 *PmTRIAP1* 3' UTR (1 224~1 248 bp, 5'-CAAGGGTATACCATTTAT-TGCACTT-3') 和 3' UTR 突变序列 (5'-CAAGGGTATACCATTTAGCTAGACT-3') 分别连接到 *pmir-report* 荧光质粒, 从而构建含有 *PmTRIAP1* 3' UTR 的嗜凤梨果蝇野生型质粒 (miR-454-*PmTRIAP1* 3'UTR-WT 和 miR-145-*PmTRIAP1* 3'UTR-WT) 和突变型质粒 (miR-454-*PmTRIAP1* 3'UTR-MUT 和 miR-145-*PmTRIAP1* 3'UTR-MUT)。

质粒转染细胞。将 293T 细胞以 70% 的汇合度接种到 96 孔板中, 24 h 后转染萤光素酶报告基因质粒和 RNA, 每个样品设置 6 个复孔。96 孔板转染质粒时每孔比例为萤火虫萤光素酶载体 (Firefly): 海肾萤光素酶载体 (Renilla): 转染试剂=0.2  $\mu\text{g}$ : 0.01  $\mu\text{g}$ : 0.25  $\mu\text{L}$ 。配置 miRNA 和转染试剂稀释液, 最终 miRNA 浓度为 100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 转染试剂每孔 0.25  $\mu\text{L}$ , 常温孵育 5 min, 然后将稀释好的 DNA 和 miRNA 分别与转染试剂混匀, 常温孵育 20 min。每孔弃掉 50  $\mu\text{L}$  培养基, 将 25  $\mu\text{L}$  DNA 转染混合液和 25  $\mu\text{L}$  miRNA 转染混合液分别添加到每孔细胞样品中。转染 6 h 后更换新鲜完全培养基。

双报告基因检测。质粒共转染 48 h 后, 弃去培养基, 用 100  $\mu\text{L}$   $1\times 100$  PBS 洗涤 96 孔板, 吸干剩余的 PBS。5 $\times$ PLB (passive lysis buffer) 用去离子



水稀释成  $1 \times \text{PLB}$ , 使用前置于常温。每孔加  $50 \mu\text{L}$  稀释好的  $1 \times \text{PLB}$ , 摇床常温条件下摇  $15 \text{ min}$ , 进行裂解。白色不透光的 96 孔酶标板中每孔加入上述的  $10 \mu\text{L}$  上清液。在每个孔中加入  $100 \mu\text{L}$  预混合的 LAR II (用 Luciferase Assay Buffer 溶解冻干粉 Luciferase Assay substrate 存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $2 \text{ s}$  后测数据。每孔加入  $100 \mu\text{L}$  预混合的 Stop Glo & Reagent, 静止  $2 \text{ s}$  后测数据。

统计学分析。通过 GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software) 作图, 并进行双侧  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 *PmTRIAP1* 基因的分子特征和系统发育分析

通过 SMART RACE 技术, 克隆获得斑节对虾 *PmTRIAP1* 基因 cDNA 全长 (GenBank accession No. MK314973, 图 1)。*PmTRIAP1* cDNA 全长  $2522 \text{ bp}$ , 含有  $11 \text{ bp}$  的 5'UTR、 $2289 \text{ bp}$  的 3'UTR 和  $222 \text{ bp}$  的 ORF, 编码 71 个氨基酸, 理论分子量为  $8.6 \text{ kD}$ , 理论等电点 (PI) 为 4.9。

多重序列比对结果显示, *PmTRIAP1* 氨基酸序列与其他物种中的 TRIAP1 氨基酸序列相比有着较高的保守性。其中, *PmTRIAP1* 与柑橘木虱 (*Diaphorina citri*) TRIAP1 的相似度最高 (61%), 其他相似性较高的物种有墨西哥脂鲤 (*Astyanax mexicanus*) 56% 和家鸡 (*Gallus gallus*) 51% (图 2)。

NCBI 下载 13 个不同物种的 TRIAP1 序列与 *PmTRIAP1* 构建进化树, 结果显示斑节对虾单独聚为一支 (图 3)。

### 2.2 *PmTRIAP1* 的组织表达分析

qRT-PCR 测定 *PmTRIAP1* 在 11 种组织中的表达情况 (图 4)。结果显示 *PmTRIAP1* 在 11 种组织中均有表达。血细胞中表达量最高, 肝胰腺和肠中表达量较高, 胸神经中表达量最低。

### 2.3 哈氏弧菌刺激下 *PmTRIAP1* 的表达分析

在血细胞中, 哈氏弧菌刺激后, *PmTRIAP1* 表达量在前  $6 \text{ h}$  无显著变化, 第 24 小时显著降低, 第 48 小时降至最低水平, 第 72 小时有所回升但仍显著低于对照组水平 (图 5-A)。在肝胰腺中, 哈氏弧菌刺激后 *PmTRIAP1* 的表达水平一直低于磷酸缓冲盐组, 第 6 小时表达无显著变化, 第 24 小时表达显著降低, 第 48 小时降到最低, 第 72 小时明显回升, 与第 0 小时相比无显著差异 (图 5-B)。

### 2.4 初步筛选出靶向调节 *PmTRIAP1* 的 miRNAs

Targetscan、miRanda 和 Mireap 分别筛选靶向调控 *PmTRIAP1* 的 miRNAs。经 3 个软件联合预测、筛选, 获得 2 个潜在调控 *PmTRIAP1* 的 miRNAs (表 2)。

通过 1.2.6 的哈氏弧菌刺激实验检测了血细胞中感染哈氏弧菌后 2 种 miRNAs 的表达模式。qRT-PCR 结果显示 *Pm-miR-454-3p* 和 *Pm-miR-145-3p* 的表达水平在第 6、第 24、第 48、第 72 小时均显著上调 (图 6)。

### 2.5 双荧光素酶报告基因检测

为进一步验证 *Pm-miR-454-3p* 和 *Pm-miR-145-3p* 对 *PmTRIAP1* 的靶向调控作用, 分别根据预测的 *Pm-miR-454-3p* (图 7-A) 和 *Pm-miR-145-3p* (图 7-B) 的调控位点开展双荧光素报告实验。

双荧光素酶报告实验结果表明, 构建的野生型报告质粒 *miR-145-PmTRIAP1* 3'UTR-WT 的荧光素酶活性受到 *Pm-miR-145-3p* 类似物 (agomir-145) 的抑制作用, 活性大约为对照组 *miR-145-PmTRIAP1* 3'UTR-MUT+agomir NC 的 76% ( $P=0.0047$ ), 实验组 *miR-145-PmTRIAP1* 3'UTR-WT+agomir NC 和 *miR-145-PmTRIAP1* 3'UTR-MUT+agomir-145 均未检测到明显活性变化 (图 8-A)。构建的野生型报告质粒 *miR-454-PmTRIAP1* 3'UTR-WT 的荧光素酶活性受到 *Pm-miR-454-3p* 类似物 (agomir-454) 的抑制作用, 活性大约为对照组 *miR-454-PmTRIAP1* 3'UTR-MUT+agomir NC 的 43% ( $P=0.0426$ ), 实验组 *miR-454-PmTRIAP1* 3'UTR-WT+agomir NC 和 *miR-454-PmTRIAP1* 3'UTR-MUT+agomir-454 均未检测到明显的活性变化 (图 8-B)。

## 3 讨论

斑节对虾是华南和东南亚最具商业价值的水产养殖物种之一。目前, 弧菌等病害频发给对虾养殖产业造成了巨大的经济损失, 与抵御弧菌入侵相关的分子调控机制也尚未清晰。本研究拟通过对斑节对虾 *TRIAP1* 基因与弧菌刺激之间的关联性研究, 为解析斑节对虾抵御弧菌入侵的分子机制提供一定理论基础。

本研究成功克隆获得斑节对虾 *PmTRIAP1* cDNA 全长序列, 并对 *PmTRIAP1* 在斑节对虾各组织中的表达分布规律进行了探究。由于 *PmTRI-*

```

1 AACCATTTCCatgaacagtgtagcaaggattgccaaagactaaagtcactgtatgacaactgtttcaatcagtggtac 80
1 M N S V S K D C Q E L K S L Y D N C F N Q W Y 23
81 agtgaaaagttcctgagaggattctggacgactcc acgtgtgagccagtgttcaagcagtaccaaagctgtgtccaaga 160
24 S E K F L R G V L D D S T C E P V F K Q Y Q S C V Q E 50
161 agcactgaagaaactgaaaattgagattcccaaaatcgaggaattccttcggaagaaaagccgaaggaatagACACTTT 240
51 A L K K L K I E I P K I E E I P S E E K P K E * 73
241 AGGTTTGTCTTTTTCATTGGCAACAGAGGTTAACAAAGTAATATTGGTAAAAATGTTAAGTCCAATTCGCAAAGCCTTTT 320
321 CTAACGGTATCGACGTTATGAACTGAACACAGCCTTGACATGCTTGAACCAATGAGAAATGGCTATGAATGTTTTT 400
401 TTTCTGCAATATTTGGACTCATTACATACTCCTTATGCATATCTGCCTCACTATACTTCAACAATGTTGGCTTTCTT 480
481 TGGCATTATTGACATTGAGGAAGGATCTTAAGTTAATTTTTCTTGGTTTATAGGCATCAAAAGTGTGCTATGTTGTA 560
561 GATATCCAAAAGAATTATTATTTGTATTAGACTTTTGTATGTGATTTGTGAATTTTTCTGCTTCCTTTGTGGATGTT 640
641 TGTGTATTGTTACTGTTATTTTGTGCTTTTTAAAGAAATCATATAATTATACTTTACGCTGTTGTGGAATCTTAGCT 720
721 TTTGTTTTGTTGATTTTTTAAAGTAACACTCTTTGACAATGGCTTCTGAGCCCAAGGCA GTACAGGCTTAAGTGAACG 800
801 TGAGCAGCGTCAGTCTATAAAAGGAATGAAAAA AAGGTTGTGTAACAAACACATTAGAAAGTCCATTTTCTCTGATT 880
881 GGCCAGCA GTCAGTGATTATATTATGATTCCCTTAAGAAATCTATTACAGAAAGTTTTTCTGGCTTGAAGGCCCGAGT 960
961 AAACCCCATGGAAGAGTTACGAAATTAAGAAAGAAGAGAAAAATGCTTCTTAGAAGAGTATGAAAAGAAGATTCT 1 040
1 041 TAAAAATACTGATGCAGAAGCAAGTCAAAGAAGCCAGGAAAGGAAGGCTATGTCACACTTGGTAATGGGATACAATC 1 120
1 121 AAGTCATGAGGGCTTTGGAGAGAGATGAGATTGTTGCAGCTTGGCCAAGAAAAATGTTACGCCAGGATTTCTGGTCAAA 1 200
1 201 ACCTTCTTCTGGGTGTGCTAACAAAGGGTATACCATTTATGCACCTTATGGCCTTGACATAATTCTCCAGAGTGATGA 1 280
1 281 GACCTTGGCCTTAAACATCATTGTATGGTCATAGGACTAAGACCATCCGTGAAAGAGCCTTCTGTAGGTTAATCAGT 1 360
1 361 TGTATGTTGAAATGTGTAACGCTGTTCAACTGTTGAAAGGTGACATGGAGGAAGAAAACGCTGGCAGTGGAAATGAAGTA 1 440
1 441 GATGATAATGAAGATGATGAAATGGAAGTGAAGGACAAGAAAATAAGGCCAATACTCCAGCTCATTATCCACTTACAGA 1 520
1 521 AGAACAAATAGAGACGTATCACTTGAAGCGAAGTAACAAAAAGGAAAGGATATTTATTCCAGGACAGGGTGAAGAGACC 1 600
1 601 AGAAAACACAGGGAGTGAACGTTAATCTGACTTCCCTAAGTTTTGGTACCCTTGATGATGACCTTCAACAGATACAAAT 1 680
1 681 GAACTGCAGCTGAGCTTGAGACCCAAAATAGAAAAGACAAAAGAAAATTAGAGAGGAAAAGAAACCACCACAGGATTTACC 1 760
1 761 TCCTCCACAAGAAATTGATTTTGATAACATGTCCATATTGATGAAGAAGGAGATCAACAAAATCAACAGGAATCAGAGG 1 840
1 841 ACAATGTTCAAGTAAAACTGAACTGAAGATGTTATCAAAAAAGAGTGATAGAT GAATTAACAGAAGAAAATAAAAAAG 1 920
1 921 GAAGTGTGTAGAAAAAGGAAAAGATGAACCAAGAAAAAGAAAAAGGAAAAGTGGGTAAGAAAGTGGAGAGAC 2 000
2 001 AAGCATCATCCATATGTTTCTGCAAAGAAGAAGAGAATAAAGAATAATCCAAATAGAAAACAAAGTTGAACTTCAGAAC 2 080
2 081 TGAAGTCAAAGATTAAGAGGTAATACAGACATATCCATGATACAAGACATATATTAATTAATTGGTTCAATGTAGTTA 2 160
2 161 GAGAATTTTACCTTTCTTATTTTCATTGGCTTTTCATGTGTGCAACAGAGGGCATTGCAAATATAGAATTTTACA 2 240
2 241 ACAAGGATGTTGAAAAGTTGTTTGTGAGTGTGTTGGCTATGATTTTCACAATTCAGAATTTGATTTACACATACATC 2 320
2 321 ATTTATGGTAGACTTTACTTATGCTATTAAGCTTAAAAATTAAGTCATTACAAAAGATGAGCATTTTTTTGTACGTTT 2 400
2 401 CAAGATTTTATATTTATAGGTAATAGATTTACATATAATGTCATTTTCTCTACTTTTGTGTATTGTAGCAAATTTCTA 2 480
2 481 AATAAAGTATGTGTTGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2 522
    
```

图1 *PmTRIAP1*的核酸和氨基酸序列

上方为核苷酸序列, 下方为氨基酸序列; 起始密码子 (ATG) 和终止密码子 (TAG) 用方框标出; 倾斜加粗部分为加尾信号 (AATAAA)

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PmTRIAP1*

The nucleotide sequence is listed above, and the amino acid sequence is listed below. The initiation code (ATG) and the termination code (TAG) are boxed. The polyadenylation signal sequence (AATAAA) is in italic and bold.

*API* 在与斑节对虾生殖调控密切相关的卵巢组织、与免疫相关的血淋巴组织、与生长相关的肌肉组织等各待测组织中均有广泛表达, 预示该基因在斑节

对虾体内可能参与调控多种不同的生理过程。*PmTRIAP1* 的表达量在血细胞中最高, 肝胰腺中次之。已有研究表明血细胞在免疫中扮演重要角色,

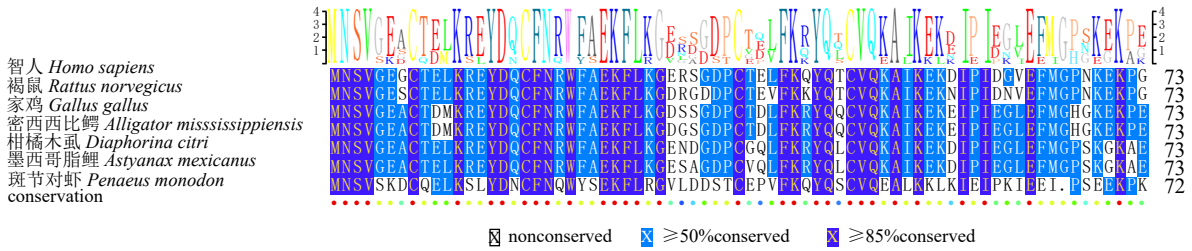


图2 PmTRIAP1和其他物种TRIAP1氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of TRIAP1 from *P. monodon* and other species

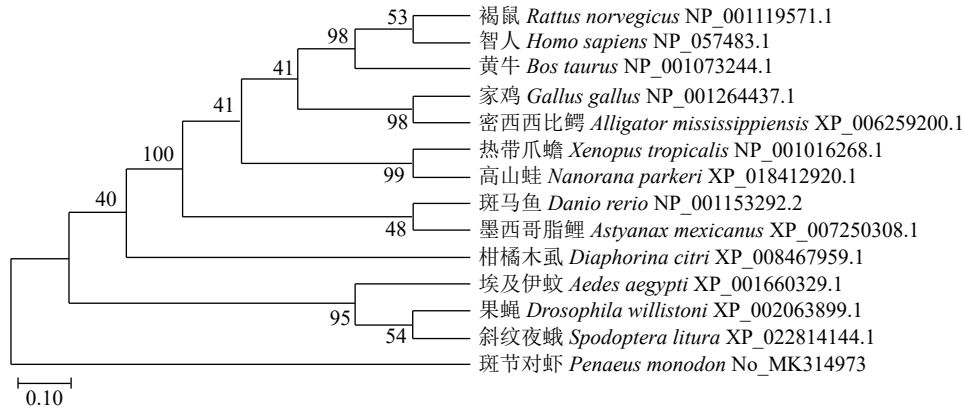


图3 基于PmTRIAP1氨基酸序列的NJ系统进化树

Fig.3 NJ phylogenetic tree based on PmTRIAP1 amino acid sequences

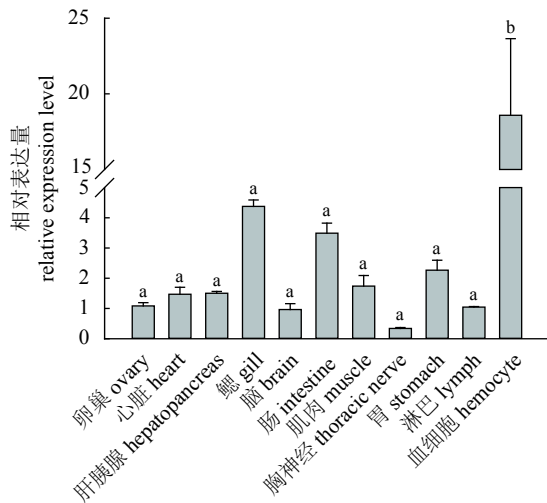


图4 *PmTRIAP1*在各个组织中的相对表达量

图中值为平均值±标准差 (n=3); 不同字母表示差异显著 (P<0.05)  
 Fig.4 Relative expression of *PmTRIAP1* in different tissues  
 Values are shown as  $\bar{X} \pm SD$  (n=3). Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05).

肝胰腺是对虾非特异性免疫组织,也是重要的解毒器官,在应激反应中发挥重要<sup>[17-18]</sup>,进而初步说明 *PmTRIAP1*可能参与了斑节对虾的免疫调控过程<sup>[19]</sup>。有鉴于此,本实验选取了肝胰腺和血细胞作

为研究对象,对哈氏弧菌刺激下 *PmTRIAP1* 以及可能调控 *PmTRIAP1* 的 miRNAs 的表达变化情况进行了探究。

哈氏弧菌是水产养殖中十分常见的条件致病菌,在海洋环境中广泛存在,能够引发水生动物大规模的疾病爆发<sup>[20]</sup>。研究表明哈氏弧菌感染能引发细胞凋亡,例如, Li 等<sup>[21]</sup>发现哈氏弧菌可导致日本牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 复发性疾病爆发并诱导宿主细胞凋亡。TRIAP1 作为一种细胞凋亡抑制因子, TRIAP1 基因的表达水平对于细胞凋亡的调控至关重要。例如, Potting 等<sup>[3]</sup>发现 TRIAP1 蛋白阻止细胞凋亡的发生; Fook-Alves 等<sup>[2]</sup>发现在鼻咽癌细胞中 TRIAP1 基因的沉默导致了细胞凋亡增加。本研究发现,在哈氏弧菌刺激下,肝胰腺中 *PmTRIAP1* 的表达量在前 6 h 内无明显变化,第 24 小时表达水平显著降低,而在第 72 小时 *PmTRIAP1* 表达量与对照组却没有明显差异(图 5-B);在血细胞中, *PmTRIAP1* 表达规律与在肝胰腺中的基本相似,不同的是,在第 72 小时 *PmTRIAP1* 的表达量仍然显著低于对照组(图 5-A)。本研究结果进一步证明了 *PmTRIAP1* 基因的表达水平与哈氏弧

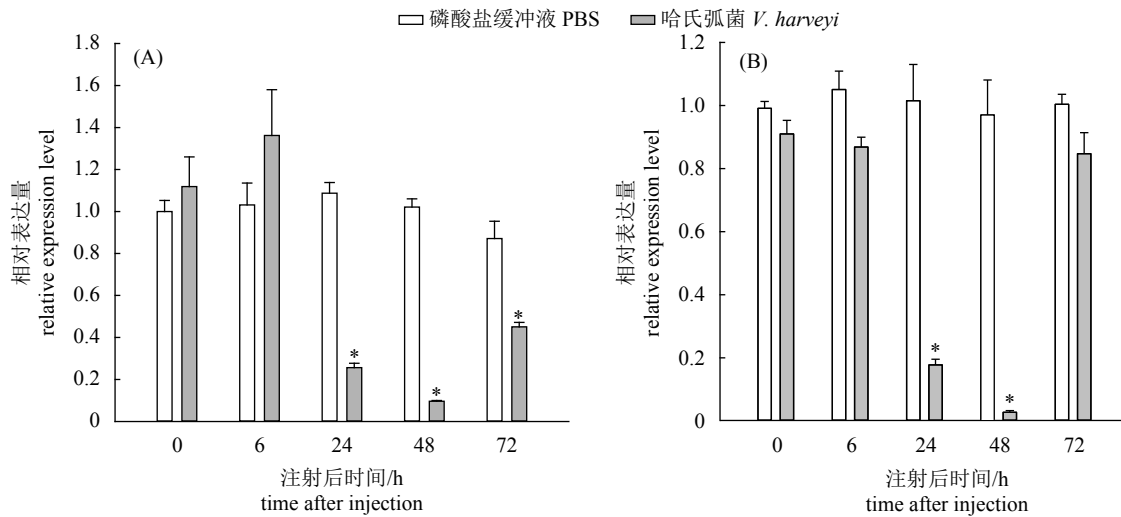


图5 哈氏弧菌注射后*PmTRIAP1*在血细胞 (A) 和肝胰腺 (B) 中的相对表达量

图中值为平均值±标准差 (n=3); \*. 显著性差异 (P<0.05); 图 6 同此

Fig.5 Relative expression levels of *PmTRIAP1* in hemocyte (A) and hepatopancreas (B) after *V. harveyi* challenge

Values are shown as  $\bar{X} \pm SD$  (n=3); \*. significant difference (P<0.05); the same case in Fig.6.

表2 Targetscan、miRanda和Mireap筛选出2个miRNAs

Tab.2 Two miRNAs screened by Targetscan, miRanda and Mireap

miRNA名称 miRNA name	序列 (5'-3') sequence
Pm-miR-145-3p	GGATTCCTGGAAATACTGTTCT
Pm-miR-454-3p	TAGTGCAATATTGCTAATAGGCT

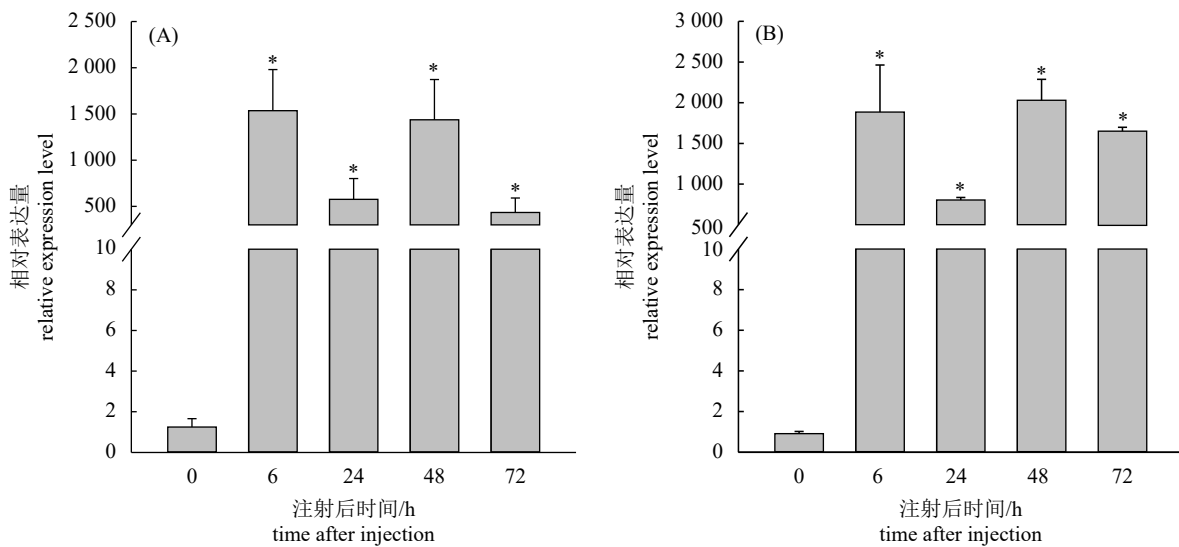


图6 哈氏弧菌注射后Pm-miR-145-3p (A) 和Pm-miR-454-3p (B) 在血细胞中的相对表达量

Fig.6 Relative expression level of Pm-miR-145-3p (A) and Pm-miR-454-3p (B) in hemocyte after *V. harveyi* challenge

菌感染之间存在显著的关联性, 并推断哈氏弧菌感染后, 斑节对虾能通过降低自身 *PmTRIAP1* 的表达来促进细胞凋亡的发生, 进而实现对哈氏弧菌的抵御功能。

生物体内, miRNA 通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 并根据互补程度的不同, 指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译。例如, Zhang 等<sup>[22]</sup> 研究发现在灿烂弧菌



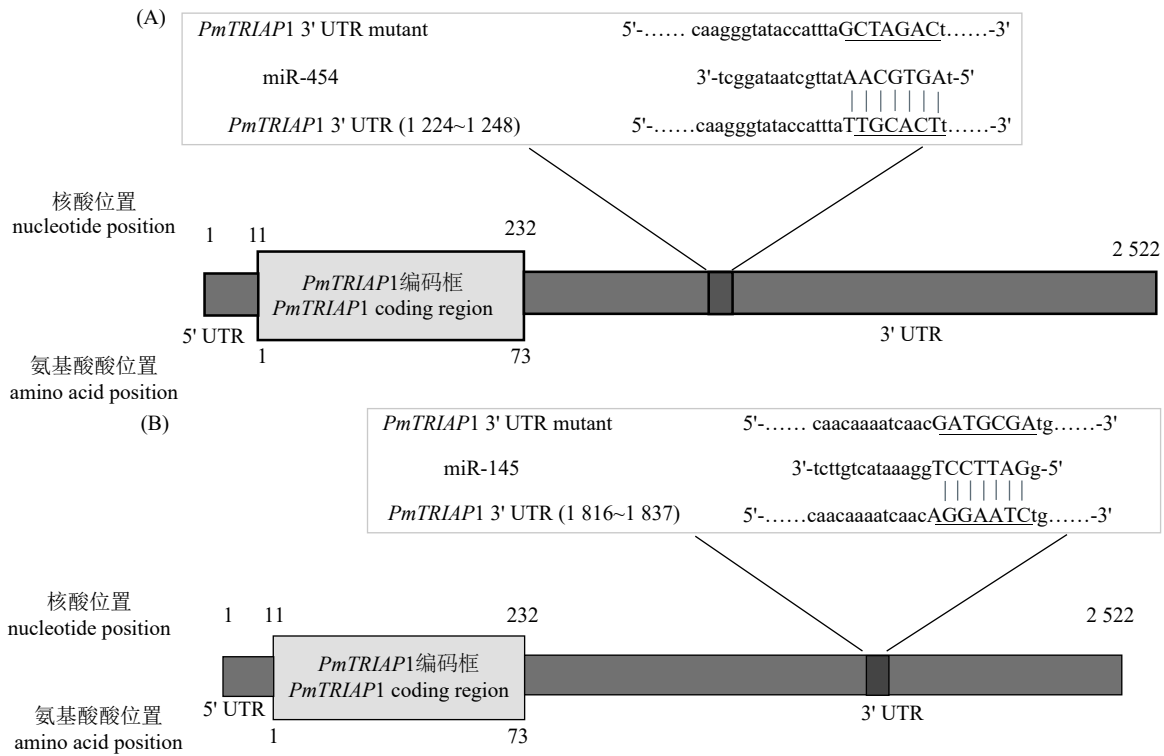


图7 Pm-miR-454-3p和Pm-miR-145-3p与靶基因*PmTRIAP1* 3'-UTR结合位点序列信息

A. *PmTRIAP1* 3'-UTR 和 Pm-miR-454-3p; B. *PmTRIAP1* 3'-UTR 和 Pm-miR-145-3p

Fig.7 Sequence information of binding and mutant sites of each miRNA at 3'-UTR of target genes

A. 3'-UTR of *PmTRIAP1* and Pm-miR-454-3p; B. 3'-UTR of *PmTRIAP1* and Pm-miR-145-3p

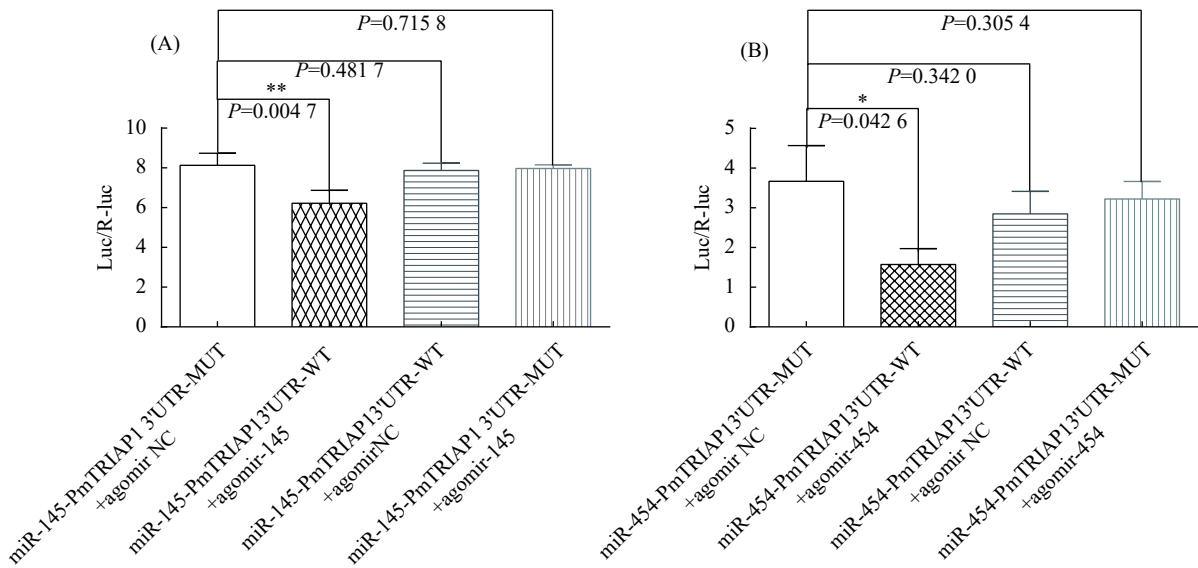


图8 miRNAs与靶基因*PmTRIAP1*间互作关系的双荧光素报告验证实验

A. *PmTRIAP1* 和 Pm-miR-145-3p 之间互作关系; B. *PmTRIAP1* 和 Pm-miR-454-3p 之间互作关系

Fig.8 Interaction between miRNAs and *PmTRIAP1* validated by dual-luciferase reporter assays

A. interaction of *PmTRIAP1* and Pm-miR-145-3p; B. interaction of *PmTRIAP1* and Pm-miR-454-3p

(*V. splendidus*) 感染仿刺参时, miR-137 呈现下调趋势, 而其靶基因 *AjBHMT* 呈现上调趋势; Huang

和 Zhang<sup>[23]</sup> 研究发现, 在对虾白斑综合症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 侵染对虾时, 机

体内 miR-7 显著上调, 而 WSSV 病毒的早期基因 *wsv-477* 显著下调; Li 等<sup>[24]</sup> 发现在鼻咽癌细胞中, miR-320b 的下调可介导 *TRIAP1* 过表达。本实验利用生物信息学软件分析筛选出了可能靶向调控 *PmTRIAP1* 的 2 个 miRNAs, 并研究了哈氏弧菌刺激后 2 个 miRNAs 的表达变化情况。结果表明, 在哈氏弧菌刺激 24 h 后, Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 表达量均显著升高 (图 6), 而 *PmTRIAP1* 表达量显著降低, 表明 *PmTRIAP1* 可能是 Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 的靶基因 (图 5)。为了进一步证明 Pm-miR-145-3p 与 Pm-miR-454-3p 可以靶向调控 *PmTRIAP1* 的表达, 对其进行了双荧光素酶报告检测实验。结果显示, Pm-miR-145-3p 显著降低了含有 *PmTRIAP1* 3'UTR 的荧光素酶活性, 表明 Pm-miR-145-3p 可以靶向调控 *PmTRIAP1*。

综上, 本研究克隆了 *PmTRIAP1* 基因 cDNA 全长, 探究了在哈氏弧菌刺激下 *PmTRIAP1* mRNA 和相关 miRNAs 的表达变化情况。在哈氏弧菌刺激下, *PmTRIAP1* mRNA 表达量显著降低, Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 表达量显著升高, 说明了 *PmTRIAP1* 基因、Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 都参与了斑节对虾抵御哈氏弧菌的应激反应。研究发现, *PmTRIAP1* 和 2 个 miRNAs 的表达变化规律呈负相关, 结合双荧光素酶报告实验, 进一步推测出 Pm-miR-145-3p 和 Pm-miR-454-3p 靶向调控 *PmTRIAP1*, 进而对哈氏弧菌刺激做出应答。本实验为深入探究斑节对虾在抵御细菌感染时, 先天免疫调节机制的激活提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] PARK W R, NAKAMURA Y. p53CSV, a novel p53-inducible gene involved in the p53-dependent cell-survival pathway[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(4): 1197-1206.
- [2] FOOK-ALVES V L, de OLIVEIRA M B, ZANATTA D B, et al. TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1 (TRIAP1) stable silencing increases late apoptosis by upregulation of caspase9 and APAF1 in RPMI8226 multiple myeloma cell line[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(6): 1105-1110.
- [3] POTTING C, TATSUTA T, KÖNIG T, et al. TRIAP1/PRELI complexes prevent apoptosis by mediating intramitochondrial transport of phosphatidic acid[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(2): 287-295.
- [4] OLIVIERI F, RIPPO M R, MONSURRÒ V, et al. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer[J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(4): 1056-1068.
- [5] BEITZINGER M, PETERS L, ZHU J Y, et al. Identification of human microRNA targets from isolated argonaute protein complexes[J]. *RNA Biol*, 2014, 4(2): 76-84.
- [6] OU J, LI Y, DING Z, et al. Transcriptome-wide identification and characterization of the *Procambarus clarkii* microRNAs potentially related to immunity against *Spiroplasma eriocheiris* infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35(2): 607-617.
- [7] KUHN D E, MARTIN M M, FELDMAN D S, et al. Experimental validation of miRNA targets[J]. *Methods*, 2008, 44(1): 47-54.
- [8] TAN T T, CHEN M, HARIKRISHNA J A, et al. Deep parallel sequencing reveals conserved and novel miRNAs in gill and hepatopancreas of giant freshwater prawn[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2013, 35(4): 1061-1069.
- [9] HE L, WANG Y L, LI Q, et al. Profiling microRNAs in the testis during sexual maturation stages in *Eriocheir sinensis*[J]. *Anim Reprod Sci*, 2015, 162: 52-61.
- [10] LI S, ZHU S, LI C, et al. Characterization of microRNAs in mud crab *Scylla paramamosain* under *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e73392.
- [11] CHEN Y, FU L, WEN X, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(8): 1177-1189.
- [12] AN F, GONG B, WANG H, et al. miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(7): 702-716.
- [13] ZHANG B C, ZHOU Z J, SUN L. pol-miR-731, a teleost miRNA upregulated by megalocytivirus, negatively regulates virus-induced type I interferon response, apoptosis, and cell cycle arrest[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28354.
- [14] GONG Y, JU C, ZHANG X. The miR-1000-p53 pathway regulates apoptosis and virus infection in shrimp[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2015, 46(2): 516-522.
- [15] IWANAGA S, LEE B L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals[J]. *BMB Rep*, 2005, 38(2): 128-150.
- [16] LITTLE T J, HULTMARK D, READ A F. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(7): 651.
- [17] 戴文婷, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 *CDK2* 基因全长 cDNA 克隆及表达分析 [J]. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 1-11.
- [18] 史进选, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾 *GRP94* 基因的克隆及其在不同应激条件下的表达与分析 [J]. *南方水产科学*, 2016, 12(5): 61-70.
- [19] 傅明骏, 赵超, 杨其彬, 等. 斑节对虾过氧化氢酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析 [J]. *南方水产科学*, 2015, 11(6): 107-113.
- [20] 王瑞旋, 耿玉静, 冯娟, 等. 杂色鲍哈维弧菌耐药质粒的鉴定和分析 [J]. *南方水产科学*, 2012, 8(2): 1-6.
- [21] LI M F, WANG C L, SUN L. A pathogenic *Vibrio harveyi* lineage causes recurrent disease outbreaks in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and induces apoptosis in host cells[J]. *Aquaculture*, 2011, 319(1/2): 30-36.
- [22] ZHANG P, LI C, ZHANG R, et al. The roles of two miRNAs in

- regulating the immune response of sea cucumber[J]. *Genetics*, 2015, 201(4): 1397-1410.
- [23] HUANG T, ZHANG X. Functional analysis of a crustacean microRNA in host-virus interaction[J]. *J Virol*, 2012, 86(23): 12997-13004.
- [24] LI Y, TANG X, HE Q, et al. Overexpression of mitochondria mediator gene *TRIAP1* by miR-320b loss is associated with progression in nasopharyngeal carcinoma[J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(7): e1006183.

## 《南方水产科学》正式加入 OSID 开放科学计划

《南方水产科学》已正式加入 OSID(Open Science Identity) 开放科学计划, 纸刊从 2019 年第 4 期起通过在文章上添加开放科学二维标识码 (OSID 码), 为读者和作者提供一个与业界同行和专家交流研究成果的途径, 提升论文的科研诚信。

OSID 开放科学计划, 是国家新闻出版署出版融合发展 (武汉) 重点实验室发起的一项促进学术交流, 推动科研诚信的计划。通过 OSID, 作者可以使用电脑或手机上传简短的语音、视频、文字介绍, 更加立体化地展示和传播科研成果, 弥补纸刊载体的局限性, 也可与本专业其他研究人员互动、交流, 提升论文的阅读量和下载量和引用率, 扩大论文和作者的影响力, 同时, 让科研过程可追溯, 提升了研究成果的诚信质量。

OSID 码包含以下内容:

①作者介绍论文的语音 (可上传 5 段语音, 每段不超过 10 分钟), 内容包括研究方向、研究目的、研究意义, 还可以介绍自己在研究前的准备工作、研究过程中的趣事等, 从而展现更多的研究细节;

②论文附加说明, 可上传论文的相关图片和视频, 使纸刊无法呈现的动态试验过程、模拟计算结果等, 以及附录等材料, 得到更直观的展示;

③作者与读者在线交流问答, 建立起论文的学术交流圈。

读者通过微信扫描论文上的 OSID 码, 即可看到作者对文章的介绍, 向作者提问, 或针对有探讨价值之处与作者进一步互动沟通。

科技期刊数字化是期刊发展的必经之路, 随着移动互联网的普及, 二维码作为纸质版和数字化产品的纽带, 为读者和作者提供了一个方便、快捷的交流通道以及更加丰富的内容表现形式。《南方水产科学》加入 OSID 计划, 一方面能给读者带来全新的阅读和讨论体验, 另一方面能使作者更严肃负责地对待所著论文, 促进优秀论文更好地传播, 具有双向的促进作用。

欢迎广大研究人员和作者积极响应参与, 为扩大学术影响力共同努力!

《南方水产科学》编辑部

2019 年 6 月 1 日