

# *BLOC1S1* 促进山羊精原干细胞增殖

万仕成<sup>1#</sup>, 张梦菲<sup>1#</sup>, 陈文博<sup>1</sup>, 韩苗<sup>1</sup>, 杨栋慧<sup>1</sup>, 王聪亮<sup>1</sup>, 吴文萍<sup>1</sup>,  
王瑜琪<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 朱海鲸<sup>2</sup>, Ahmed Hamed Arisha<sup>3</sup>, 华进联<sup>1\*</sup>

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

2 榆林学院 陕西省绒山羊工程技术研究中心, 陕西 榆林 719000

3 开罗班达尔大学兽医学院, 开罗 班达尔 11829

万仕成, 张梦菲, 陈文博, 韩苗, 杨栋慧, 王聪亮, 吴文萍, 王瑜琪, 李娜, 朱海鲸, Ahmed Hamed Arisha, 华进联.  
*BLOC1S1* 促进山羊精原干细胞增殖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4901-4914.

WAN Shicheng, ZHANG Mengfei, CHEN Wenbo, HAN Miao, YANG Donghui, WANG Congliang, WU Wenping, WANG Yuqi, LI Na, ZHU Haijing, Ahmed Hamed Arisha, HUA Jinlian. *BLOC1S1* promotes proliferation of goat spermatogonial stem cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4901-4914.

**摘要:** 随着基因编辑技术迅速发展, 研究精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)对精子发生及其调控机制研究、转基因动物研发、基因治疗和不孕不育症的治疗以及珍稀物种的保护均具有重要意义。溶酶体相关细胞器生物合成复合体1亚基1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1, *BLOC1S1*)具有抗布鲁氏菌的潜能, 研究 *BLOC1S1* 对山羊 SSCs 的影响不仅能探究 *BLOC1S1* 促进 SSCs 增殖的能力, 还能为其抗病育种研究提供细胞学基础。本研究通过同源重组构建 *BLOC1S1* 过表达载体, 通过慢病毒包装、转染与嘌呤霉素筛选成功构建了山羊精原干细胞 *BLOC1S1* 过表达细胞株。通过实时荧光定量 PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 *BLOC1S1* 的过表达效率为 18 倍, 同时细胞生长曲线、流式细胞术检测细胞周期、5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色等实验结果表明, *BLOC1S1* 能显著增加山羊 SSCs 的增殖活性。RT-qPCR、免疫荧光染色、Western blotting 结果显示与增殖相关的基因(*PCNA*、*CDK2*、*CCND1*)上调, 同时调控精原干细胞增殖的关键基因 *EIF2S3Y* 的表达量也上调。本研究成功构建了山羊精原干细胞 *BLOC1S1* 过表达细胞株, 提高其增殖能力, 并且这种促增殖能力可能是通过 *EIF2S3Y/ERK* 通路实现的。本研究为探究 *BLOC1S1* 对山羊精原干细胞的调控作用奠定了细胞学基础, 并为进一步研究 *BLOC1S1* 的生物学功能提供细胞平台, 为繁育 *BLOC1S1* 修饰抗病山羊奠定了基础。

**关键词:** 山羊; 溶酶体相关细胞器生物合成复合体1亚基1 (*BLOC1S1*); 精原干细胞; 增殖

资助项目: 国家自然科学基金(32072806); 国家重点研发计划(2022YFD1302201); 陕西省畜牧科技示范和畜牧专项项目(20221086, 20230978)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072806), the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1302201), and the Key Technologies Demonstration of Animal Husbandry and Livestock Special Project in Shaanxi Province (20221086, 20230978).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-29-87091117, E-mail: jinlianhua@nwsuaf.edu.cn

Received: 2023-08-15; Accepted: 2023-09-27; Published online: 2023-10-10

## ***BLOC1S1* promotes proliferation of goat spermatogonial stem cells**

WAN Shicheng<sup>1#</sup>, ZHANG Mengfei<sup>1#</sup>, CHEN Wenbo<sup>1</sup>, HAN Miao<sup>1</sup>, YANG Donghui<sup>1</sup>,  
WANG Congliang<sup>1</sup>, WU Wenping<sup>1</sup>, WANG Yuqi<sup>1</sup>, LI Na<sup>1</sup>, ZHU Haijing<sup>2</sup>,  
Ahmed Hamed Arisha<sup>3</sup>, HUA Jinlian<sup>1\*</sup>

1 Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 Shaanxi Province Engineering & Technology Research Center of Cashmere Goats, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China

3 Faculty School of Veterinary Medicine, Badr University in Cairo, Badr 11829, Cairo, Egypt

**Abstract:** With the rapid development of gene editing technology, the study of spermatogonial stem cells (SSCs) holds great significance in understanding spermatogenesis and its regulatory mechanism, developing transgenic animals, gene therapy, infertility treatment and protecting rare species. Biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1 (*BLOC1S1*) is believed to have anti-brucella potential. Exploring the impact of *BLOC1S1* on goat SSCs not only helps investigate the ability of *BLOC1S1* to promote SSCs proliferation, but also provides a cytological basis for disease-resistant breeding research. In this study, a *BLOC1S1* overexpression vector was constructed by homologous recombination. The *BLOC1S1* overexpression cell line of goat spermatogonial stem cells was successfully constructed by lentivirus packaging, transfection and puromycin screening. The overexpression efficiency of *BLOC1S1* was found to be 18 times higher using real time quantitative PCR (RT-qPCR). Furthermore, the results from cell growth curve analysis, flow cytometry for cell cycle detection, and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining showed that *BLOC1S1* significantly increased the proliferation activity of goat SSCs. The results of RT-qPCR, immunofluorescence staining and Western blotting analyses revealed up-regulation of proliferation-related genes (*PCNA*, *CDK2*, *CCND1*), and *EIF2S3Y*, a key gene regulating the proliferation of spermatogonial stem cells. These findings strongly suggest that the proliferative ability of goat SSCs can be enhanced through the EIF2S3Y/ERK pathway. In summary, this study successfully created a goat spermatogonial stem cell *BLOC1S1* overexpression cell line, which exhibited improved proliferation ability. This research laid the groundwork for exploring the regulatory role of *BLOC1S1* in goat spermatogonia and provided a cell platform for further study into the biological function of *BLOC1S1*. These findings also establish a foundation for breeding *BLOC1S1* overexpressing goats.

**Keywords:** goat; biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1 (*BLOC1S1*); spermatogonial stem cells; proliferation

山羊是重要的农业动物,可产肉、奶和绒毛等。另外,以奶山羊乳腺为生物反应器生产药物或者保健食品具有巨大的发展前景。羊布鲁氏菌病是一种由布鲁氏菌属细菌感染引起的疾病,主要引起成年母羊流产、产弱胎,公羊睾丸肿大、性功能降低。羊型布鲁氏菌还可感染人,导致间歇性发热、关节炎、睾丸肿痛等,对羊养殖和人类公共卫生安全可造成严重危害,故而将其列为二类动物疫病。通过基因编辑技术来快速选育山羊品系,对布鲁氏菌病防控具有重要意义。

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是一类通过自我更新保持其数量稳定并且能够分化变形为精子的一类原始生殖细胞<sup>[1]</sup>。以SSCs作为种子细胞开展羊的遗传育种以及转基因克隆是目前的研究热点。SSCs的自我更新与分化受到多种自身及内外环境因素的影响与调节,包括自身及内外环境因素、转录因子、miRNA、激素和小分子化合物等,这些物质通过影响SSCs的增殖、分化、凋亡和自噬等方面,维持SSCs不断增殖、分化,为雄性个体源源不断地生成精子提供保障。

溶酶体相关细胞器生物合成复合体1亚基1(biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 1, BLOC1S1)也称为BLOS1/GCN5L1,是构成溶酶体相关细胞器生物合成复合体1(BLOC-1)及其相关复合物(BLOC-1-related complex, BORC)的亚基<sup>[2]</sup>,在细胞内有多种功能,包括线粒体蛋白乙酰化<sup>[3]</sup>、代谢途径的调节、核内体-溶酶体的运输和融合<sup>[4]</sup>。在哺乳动物细胞中,BLOC1S1也是核酸外切酶活性(regulated IRE1-dependent decay, RIDD)的主要靶点<sup>[5-6]</sup>,布鲁氏菌感染细胞时产生的RIDD导致其表达量降低,是布鲁氏菌感染的关键基因<sup>[7]</sup>。因此,在山羊精原干细胞中过表达BLOC1S1可以为探究其生理功

能提供细胞生物学基础,并为进一步研究其拮抗布鲁氏菌的机制提供细胞模型和平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2023年在西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心完成。试验所用的细胞是实验室保存的293T细胞以及永生化的山羊精原干细胞(mGSCs-I-SB)<sup>[8]</sup>。

### 1.2 试验试剂

PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (TaKaRa); DNA Marker (TaKaRa); 快速限制性内切酶试剂盒(TaKaRa); HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (南京诺维赞生物科技股份有限公司); ChamQ SYBR qPCR Master Mix (南京诺维赞生物科技股份有限公司); 胎牛血清(Gibco); 非必需氨基酸(Gibco); RNAiso Plus (TaKaRa);  $\beta$ -巯基乙醇(Gibco); 胰蛋白酶(Gibco); Dulbecco改良的Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (Coring); Dulbecco改良Eagle培养基/Ham's F-12 (Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's F-12, DMEM/F12) (Coring); 其他化学试剂。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 山羊BLOC1S1过表达载体构建

解冻一支mGSCs-I-SB细胞,在培养皿内培养至第3代后,弃培养液,向培养皿内加入1 mL的RNAiso Plus,处理10 min后,转移至1.5 mL无RNA酶(RNase-free)离心管中,按照TRIzol法提取总RNA。用微量紫外分光光度仪检测RNA的浓度和纯度,将剩余的RNA进行反转录或-80 °C保存。

RNA的反转录使用的是从南京诺维赞生物科技股份有限公司购买的试剂盒,反转录步

骤如下。首先根据 1.3.1 测定的 RNA 浓度, 计算体积, 吸取 2  $\mu\text{g}$  RNA, 随后根据以下体系进行试验, 反转录反应体系 A (16  $\mu\text{L}$ ): RNA 2  $\mu\text{g}$ , 4 $\times$ g DNA wiper Mix 4  $\mu\text{L}$ , RNase-free ddH<sub>2</sub>O 加至 16  $\mu\text{L}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$  温育 2 min, 取出后放置在冰上, 向反应体系 A 中加入 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ HiScript III qRT SuperMix, 吹打混匀, 50  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min, 85  $^{\circ}\text{C}$  反应 5 s 使反转录酶失活, 最终得到的产物为 cDNA 样品, 最后存放于 -20  $^{\circ}\text{C}$  备用。

根据 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中山羊相关基因的 mRNA 预测序列, 使用 SnapGene 软件设计基因克隆引物(表 1)。利用 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)设计荧光定量 PCR 引物(表 1), 用于后续荧光定量试验。引物由北京擎科生物科技股份有限公司西安分公司合成。

将 100  $\mu\text{L}$  PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、4  $\mu\text{L}$  上游克隆引物、4  $\mu\text{L}$  下游克隆引物、4  $\mu\text{L}$  cDNA 和 88  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 混匀。按照以下程序进

行 PCR 反应: 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 16  $^{\circ}\text{C}$  保温。经凝胶电泳检测, 大小为 418 bp, 利用天根通用型 DNA 纯化回收试剂盒(DP214)进行切胶回收。

PTRIP-CAG-Puro (CAG)使用 *Bam*H I、*Eco*R I 进行双酶切, 30  $^{\circ}\text{C}$  酶切 10 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  酶切 15 min, 得到的酶切产物(12 630 bp)使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒进行体系回收。

利用 Novo 同源重组酶进行无缝克隆, 同源重组线性化载体和片段的同源序列, 体系为: 目的片段 7 ng, 线性化载体 100 ng, 5 $\times$ 反应缓冲液 4  $\mu\text{L}$ , NovoRec<sup>®</sup> Plus 重组酶 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 定容至 20  $\mu\text{L}$ 。50  $^{\circ}\text{C}$  反应 10 min, 得到连接产物。

利用高纯度质粒小提中量试剂盒提取质粒, 鉴定后进行下一步试验。

### 1.3.2 细胞培养和传代

取出冻存在液氮罐内的细胞, 立即在 37  $^{\circ}\text{C}$  温水中解冻, 然后加入 1 mL 培养液进行中和,

表 1 本试验所用引物

Table 1 The primers used in this experiment

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>BLOC1S1</i> -F	<b>AGCTGCAGATATCGAATTC</b> <u>GATGCTGTCCCGCTTGCTGAA</u>	40
<i>BLOC1S1</i> -R	<b>TTCACCGGCATCTGGATCC</b> <u>GCTAGGAGGGGGCCGACTGCA</u>	40
Q- <i>CCND1</i> -F	CACCTGTATGTTTCGTGGCCT	20
Q- <i>CCND1</i> -R	TGAACTTCACGTCTGTGGCA	20
Q- <i>CDK2</i> -F	TTTGCTGAGATGGTGACCCG	20
Q- <i>CDK2</i> -R	TAACTCCTGGCCAAACCACC	20
Q- <i>PCNA</i> -F	AGTGGAGAACTTGGAATGGAA	22
Q- <i>PCNA</i> -R	GAGACAGTGGAGTGGCTTTTGT	22
Q- <i>BLOC1S1</i> -F	AGGAAGCTTGACCATGAGGTG	21
Q- <i>BLOC1S1</i> -R	TCCTTGAGTGCCTGGTTGAAG	21
Q- $\beta$ - <i>ACTIN</i> -F	TGATATTGCTGCGCTCGT	18
Q- $\beta$ - <i>ACTIN</i> -R	CTTGAGGGTCAGGATGCC	19

F: 正向引物; R: 反向引物; Q: RT-qPCR 引物。下划线序列表示酶切位点, 加粗序列表示同源臂序列

F: Forward primer; R: Reverse primer; Q: Primer sequence for RT-qPCR. The underlined sequence indicates an enzyme cleavage site, and the bold sequence indicates a homologous arm sequence.

将细胞悬液转移到干净的 15 mL 免压离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加入 2 mL 培养液重悬细胞。轻轻吹打均匀, 接种到 60 mm 皿中, 再补加 2 mL 对应培养液, 摇晃培养皿, 镜检细胞分布均匀, 再将细胞置于 CO<sub>2</sub> 含量为 5%、温度为 37 °C 的细胞培养箱中培养。细胞培养一段时间后, 根据试验需要或者细胞密度进行传代培养, 吸去细胞上清培养液, 用干净的 PBS 清洗一次, 清洗时轻摇培养皿, 再吸去 PBS, 减少死细胞。再加入 2 mL 的 0.25% 胰蛋白酶, 37 °C 消化 3 min, 细胞部分漂起, 镜检变圆后, 加入等量含血清培养液中和, 然后轻轻吸取细胞悬液, 收集到干净的 15 mL 免压离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 添加相应的新鲜培养液吹打重悬细胞, 最后按 1:4 的比例接种到一个新 60 mm 皿中, 继续培养细胞。回收复苏后培养 3 代的细胞用于下一步试验。

不同的细胞使用对应的培养液进行培养, mGSCs-I-SB 使用 DMEM/F12 完全培养基, HEK293T (293T) 使用 DMEM 完全培养基。

### 1.3.3 稳转细胞株的构建

慢病毒毒液制备参考文献[9]的方法, 即: 解冻一支 293T 细胞, 在 60 mm 皿中培养, 待细胞状态稳定后, 通过传代培养将 293T 细胞密度调整到 80% 左右, 然后进行慢病毒包装试验。首先在 293T 细胞中加入 4 mL 无血清 DMEM, 血清饥饿 30 min。同时将 8 μg 质粒系统按照“目的质粒:PAX2:VSVG=4:3:2”的比例加入到 250 μL Opti-MEM 培养液中, 将 20 μL 聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 加入到另一份 250 μL Opti-MEM 培养液中, 静置 5 min 后, 将含质粒的 Opti-MEM 培养液加入到含有 PEI 的 Opti-MEM 培养液, 轻轻吹打 2 次, 室温静置 20 min。293T

细胞血清饥饿 30 min 结束后, 换 3.5 mL 的 DMEM 完全培养基, 再将混匀并静置后的 Opti-MEM 培养液加入, 轻轻摇晃, 在培养箱中培养 12 h 后, 将培养液更换为 4 mL 病毒包装液, 继续培养 2 d。培养期间不更换新鲜培养液, 48 h 后观察慢病毒包装效率, 并收集病毒。

取 293T 细胞的培养上清液, 2 000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 避免细胞残留。向毒液中加入 1:500 的聚凝胺 (polybrene, PB) 液, 吹打混匀后, 用 0.45 μm 的滤器过滤, 即用或 4 °C 保存。

将 mGSCs-I-SB 细胞密度调整到 30% 左右, 按照“毒液:DMEM/F12 完全培养基=1:1”的体积比加入到细胞中, 慢病毒感染 12 h 后更换培养液, 再增长 48 h 后加入 10 μg/mL 的嘌呤霉素 (puromycin, puro) 进行筛选, 并用一皿 mGSCs-I-SB 细胞作空白对照, 分别于 24、48、72 h 观察细胞死亡情况。观察期间每隔 24 h 换液, 每次都用相同浓度的培养液, 连续筛选 3 d, 待空白对照细胞全死亡后, 获得稳转细胞株。

按照 1.3.1 的方法进行总 RNA 提取并反转录为 cDNA。

使用南京诺维赞生物科技股份有限公司提供的定量试剂盒进行定量荧光 PCR 试验, 根据以下体系进行 PCR 反应: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 正向、反向引物混合物 (10 μmol/L) 1 μL, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 8 μL。

使用三步法反应程序进行 PCR 反应, 反应程序详见其说明书。试验结果通过 Bio-Rad CFX Manager 3.1 软件进行数据输出和分析。

### 1.3.4 细胞增殖检测

将细胞接种于 24 孔板, 细胞数为  $2 \times 10^4$  个/mL, 终体积为 1 mL, 每 24 h 消化 3 个孔进行细胞计数。

在细胞处于对数生长期时,用碧云天生产的细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(C1052)检测细胞周期,过300目网筛后,上机检测。

将细胞接种至48孔板,在细胞处于对数生长期时,利用锐博生物的Cell-Light EdU Apollo567 *In Vitro* Kit (C10310-1)进行5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)染色,染色后在倒置荧光显微镜下拍照记录结果。

### 1.3.5 实时荧光定量 PCR (real time-quantitative PCR, RT-qPCR)

在细胞处于对数生长期时,收取RNA样品,后续实验方法同1.3.3,提取RNA,反转录后进行定量检测。

### 1.3.6 细胞免疫荧光

将细胞接种至48孔板,在细胞处于对数生长期时,利用4%的多聚甲醛溶液(paraformaldehyde fix solution, PFA)常温固定细胞15 min,后用PBS在摇床上洗3次,每次5 min。之后用10%的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)4℃封闭1 h,用10%的FBS稀释抗体,比例为1:100,弃去FBS后,用稀释的抗体4℃孵育过夜。14 h后弃抗体, PBS洗3次,每次5 min,之后用10%的FBS稀释二抗(1:300),37℃孵育1 h。弃二抗, PBS洗3次,每次5 min,最后加入100 μL含4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)的抗荧光淬灭剂。染色结束后,在倒置荧光显微镜下拍照。所用抗体为:增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (abcam, ab29)、细胞周期蛋白依赖性激酶2 (cyclin dependent kinase 2, CDK2) (万类生物, WL02028)、G1/S-特异性周期蛋白-D1 (cyclin D1, CCND1) (万类生物, WL01435a)。

### 1.3.7 Western blotting

选择生长状态良好的细胞,待其生长密度达到70%后,弃培养液,并用PBS清洗细胞

2次,收集细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清,再加入1 mL PBS,重悬细胞收集浓缩到1.5 mL离心管中。4℃、2 000 r/min离心5 min,加入放射免疫沉淀法缓冲液(radio immunoprecipitation assay buffer, RIPA)、磷酸酶抑制剂和苯甲基磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)配制的裂解液,放置在冰上充分裂解30 min。期间每隔5 min吹打混匀一次。裂解完毕于4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清液。按照1:5的体积比加入5×SDS蛋白上样缓冲液,100℃金属浴10 min,最后得到清亮且没有沉淀的蛋白样品,分装后存于-80℃备用。利用SDS-PAGE快速制备试剂盒(10%) (翌圣生物, 20325ES62)配制蛋白电泳凝胶,进行电泳试验。转膜封闭后,加适量的一抗过夜孵育。本研究常用的抗体按照1:1 000比例稀释,如PCNA (abcam, ab29)、CDK2 (万类生物, WL02028)、EIF2G/EIF2S3 (abcam, ab225953)。β-ACTIN (ABclonal, A17910)按1:10 000比例稀释。孵育结束后,用TBST (Tris buffered saline with Tween-20)清洗3次,每次10 min。根据一抗的类型孵育二抗:鼠二抗(1:10 000)和兔二抗(1:10 000)。二抗在37℃温箱中孵育1 h,用TBST清洗3次,每次10 min。最后将蛋白膜置于凝胶成像系统中,滴加混匀的显色液A和B,拍照并分析结果。

## 1.4 统计和分析

RT-qPCR以β-ACTIN为内参,采用 $\Delta\Delta C_t$ 法分析。使用GraphPad Prism 9.0.0统计软件(GraphPad)进行单因素方差分析,以确定是否具有统计学意义的差异( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。除非另有说明,否则每组试验重复至少3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 BLOC1S1 生物学信息学特征

从NCBI下载人、鼠、山羊和绵羊等多物种

BLOC1S1 蛋白氨基酸序列, 进行建树分析, 发现山羊与人、牛的同源性最高, 与鸡、犬的同源性最低(图 1A)。同时对氨基酸序列进行了对比, 结果显示, 与小鼠氨基酸序列相比, 山羊 BLOC1S1 氨基酸序列第 29 位氨基酸由苏氨酸

(threonine, Thr)变为丙氨酸(alanine, Ala); 人 BLOC1S1 蛋白比山羊 BLOC1S1 蛋白多了 28 个氨基酸位点, 其余氨基酸序列相同(图 1B)。利用 PSIPRED 进行二级结构预测, 结果显示其具有一个  $\alpha$  螺旋结构域和一个卷曲螺旋(coiled-coil,

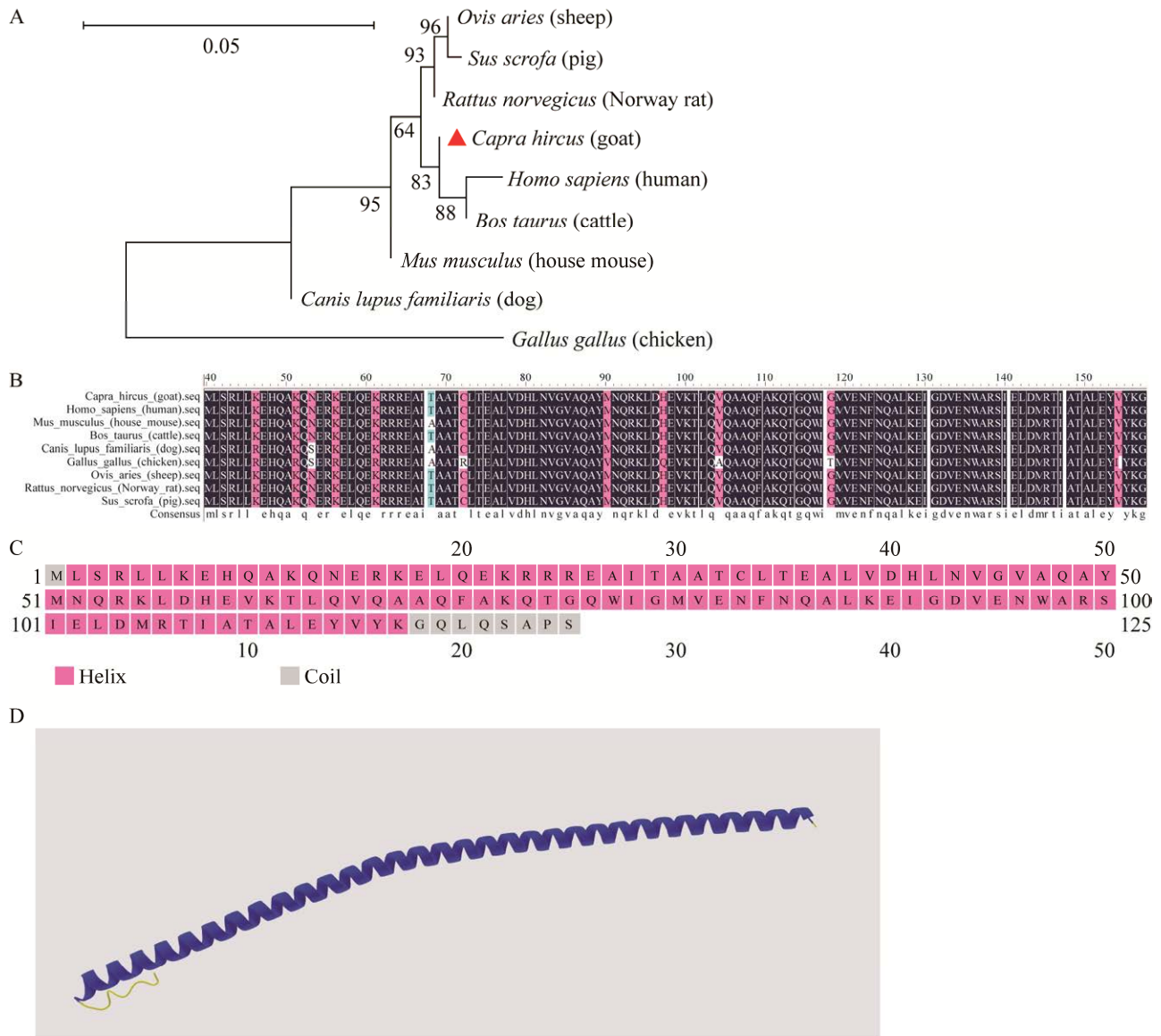


图 1 BLOC1S1 生物信息学特征 A: BLOC1S1 多物种进化树. B: 多物种 BLOC1S1 蛋白序列对比. C: BLOC1S1 蛋白二级结构预测. D: BLOC1S1 蛋白三级结构预测

Figure 1 Bioinformatics characteristics of BLOC1S1. A: Multi-species phylogenetic tree of BLOC1S1. B: Multi-species protein sequence comparison of BLOC1S1. C: The prediction of protein secondary structure of BLOC1S1. D: The prediction of protein tertiary structure of BLOC1S1.

CC)结构域(图 1C)。利用 ROBETTA 对其三级结构进行预测(图 1D),为短链状的蛋白三级结构,便于与其余亚基形成 BLOC-1 或 BORC 复合物发挥功能。

## 2.2 过表达 BLOC1S1 对 mGSCs-I-SB 增殖的促进作用

通过 NCBI 数据库预测的山羊 BLOC1S1 序列,设计 CAGG-oeBLOC1S1 过表达载体(图 2A),载体含嘌呤霉素抗性和氨苄青霉素抗性。两端分别添加 20 bp 大小的同源臂,目的条带约为 418 bp (图 2B)。载体测序正确后,利用 PAX2、VSVG 与目的载体进行三质粒体系慢病毒包装,再以慢病毒:DM/F12:PB=500:500:1 的体系进行攻毒实验,慢病毒滴度为  $1.25 \times 10^{6-7}$  TU/mL,靶细胞为永生化的山羊精原干细胞系(mGSCs-I-SB),经过嘌呤霉素筛选后得到对照组(CAG)和过表达组(oeBLOC1S1)细胞株(图 2C)。RT-qPCR 结果显示,BLOC1S1 的 mRNA 水平提高了 18 倍(图 2D)。

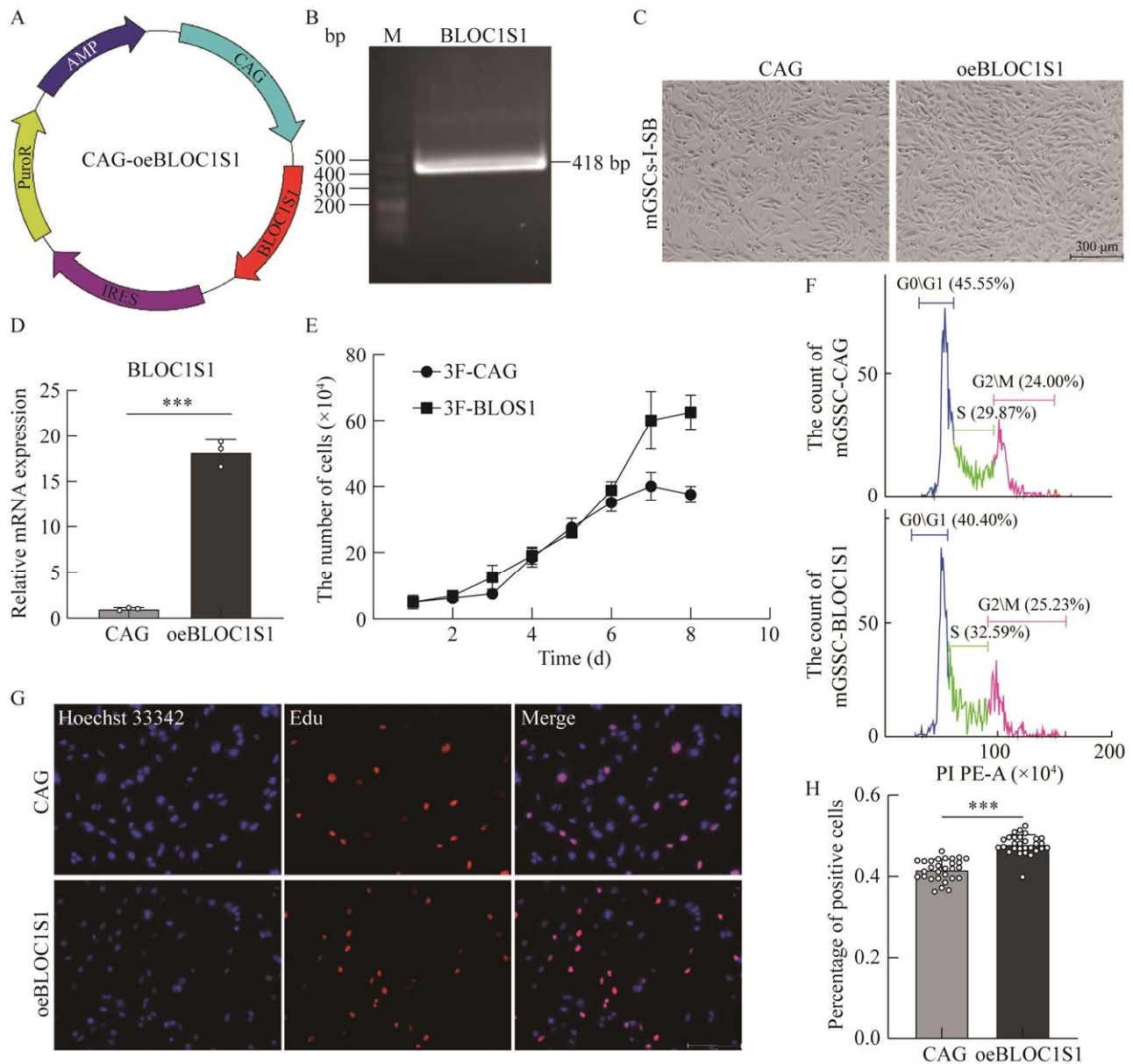
精原干细胞作为雄性动物精子发育的起始细胞,自我更新与增殖是其活性评估的重要指标之一。将  $5 \times 10^3$  个细胞接种至 24 孔板,每天相同时间随机选取 3 孔进行细胞计数,共计 8 d。根据计数结果绘制细胞生长曲线(图 2E),结果表明,与对照组相比,BLOC1S1 过表达组的平台期细胞数量更多,并且增长速率更快,说明过表达 BLOC1S1 能增强 mGSCs-I-SB 的增殖能力。同样,利用细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)对细胞进行了染色,再利用流式细胞术检测细胞时期。流式细胞术结果分析表明(图 2F),过表达 BLOC1S1 组的 G0/G1 期细胞比例减少,同时 S 期细胞增多,说明处于分裂期的细胞显著增高,同样表明了过表达 BLOC1S1 能增强

mGSCs-I-SB 的增殖能力。EdU 染色结果同样表明 mGSCs-I-SB-oeBLOC1S1 的增殖能力增强(图 2G),量化结果显示 EdU 阳性细胞占比提高大约 10% (图 2H)。

## 2.3 过表达 BLOC1S1 对增殖相关基因表达的促进作用

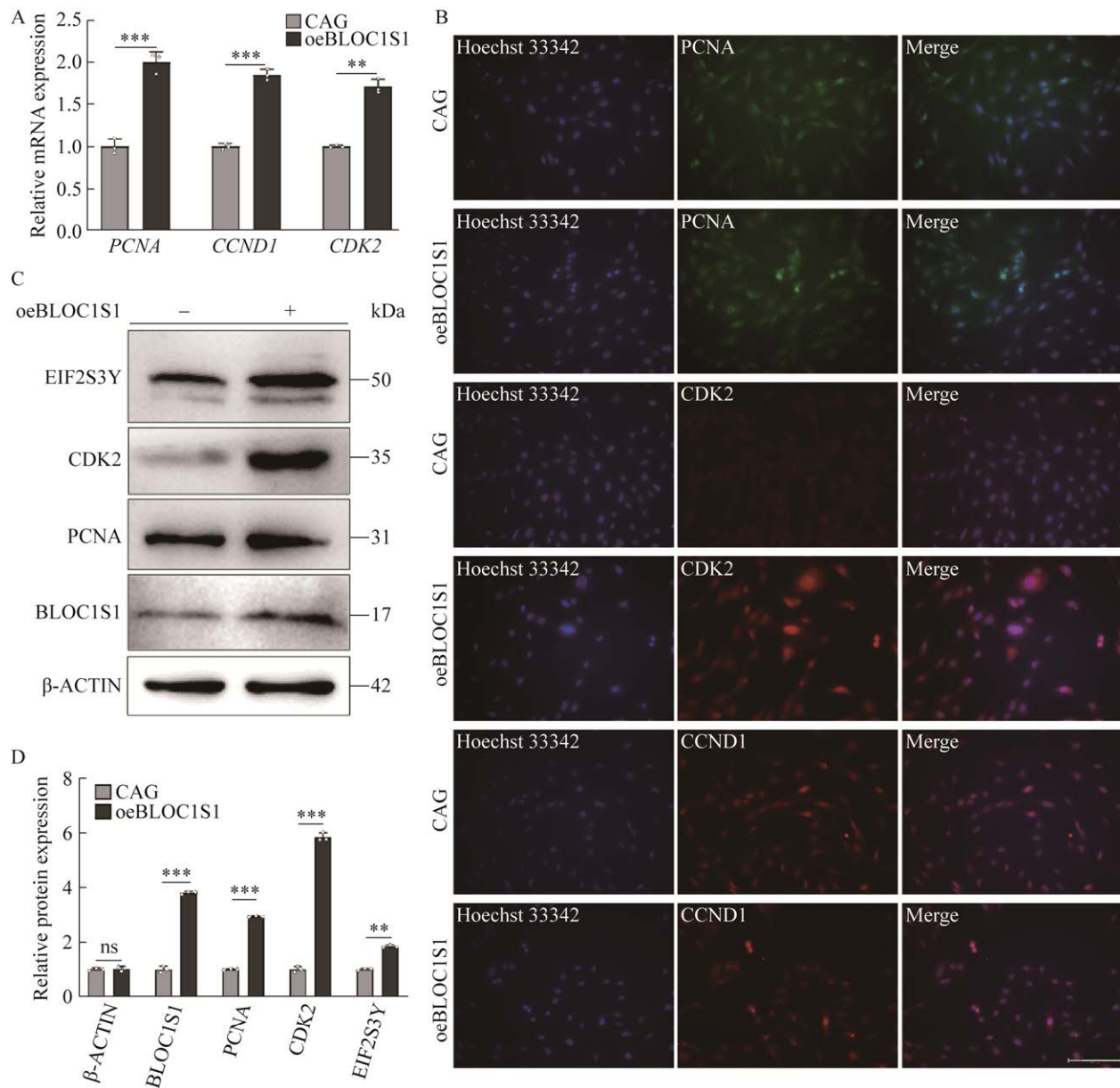
将  $5 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔板,在细胞生长至 60%左右时,弃培养液,加入 TRIzol,提取总 RNA。利用诺维赞反转录试剂盒进行反转录,诺维赞定量试剂盒进行 qRT-PCR 实验,以  $\beta$ -ACTIN 为内参,检测 PCNA、CCND1、CDK2 等基因的转录组水平变化,发现 3 种基因的转录水平均上升(图 3A)。将  $1 \times 10^3$  个细胞接种至 48 孔板,同样在对数生长期利用 4% PFA 固定细胞,固定后对 PCNA、CDK2、CCND1 染色,发现在过表达细胞株内 CDK2 着色明显增强,但是 PCNA、CCND1 变化不够明显,这可能是由于 PCNA 和 CCND1 本身表达量比较高,导致染色结果差异不明显(图 3B)。最后,将  $1 \times 10^5$  个细胞接种于 60 mm 皿,细胞生长至 70%左右时收样,提总蛋白后进行 Western blotting 检测,发现 BLOC1S1 的表达量显著上升,同时增殖相关的 marker 如 PCNA、CDK2 等蛋白的表达量也显著上升(图 3C)。*Eif2s3y* 被证明是促进精原干细胞增殖的关键基因,其可能通过 ERK1/2 信号通路来促进精原干细胞增殖<sup>[10]</sup>。在本试验中,过表达 BLOC1S1 同样会导致 EIF2S3Y 的表达量升高,说明过表达 BLOC1S1 可能会通过 EIF2S3Y/ERK 通路促进细胞增殖。综上所述,过表达 BLOC1S1 能提高山羊精原干细胞的增殖能力,并且这种促增殖能力可能是通过 EIF2S3Y/ERK 通路实现的。





**图2** 过表达 *BLOC1S1* 对 mGSCs-I-SB 增殖的促进作用 A: 载体图谱. B: *BLOC1S1* 基因克隆. C: 过表达 *BLOC1S1* 的稳转细胞株(标尺为 300  $\mu\text{m}$ ). D: 实时荧光定量 PCR 检测对照组和过表达 *BLOC1S1* 组 *BLOC1S1* 基因表达量. \*\*\*:  $P < 0.001$ . E: 细胞生长曲线. F: 细胞周期结果的量化. G: EdU 染色(标尺为 125  $\mu\text{m}$ ). H: EdU 染色结果的量化. \*\*\*:  $P < 0.001$

Figure 2 Overexpression of *BLOC1S1* promoted the proliferation of mGSCs-I-SB. A: Map of the carrier. B: The cloning of *BLOC1S1* gene. C: Stable cell lines with overexpressing *BLOC1S1* (the scale bar is 300  $\mu\text{m}$ ). D: Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of *BLOC1S1* in the control group and *BLOC1S1* overexpression group. \*\*\*:  $P < 0.001$ . E: Cellular culture curve. F: Quantification of cell cycle results. G: The cell staining of EdU (the scale bar is 125  $\mu\text{m}$ ). H: The quantification of EdU staining results. \*\*\*:  $P < 0.001$ .



**图3 过表达 BLOC1S1 对增殖相关基因表达的促进作用** A: 实时荧光定量 PCR 检测对照组和过表达 BLOC1S1 组增殖相关基因表达量. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . B: 免疫荧光染色检测对照组和 BLOC1S1 过表达组的增殖相关基因表达量(标尺为 125  $\mu\text{m}$ ). C: Western blotting 检测对照组和 BLOC1S1 过表达组的增殖相关基因表达量. D: Western blotting 结果的量化. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; ns:  $P > 0.05$ .  
**Figure 3** Overexpression of BLOC1S1 promoted the expression of proliferation-related genes. A: Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of proliferation-related genes in the control group and BLOC1S1 overexpression group. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . B: Immunofluorescence staining was used to detect the expression of proliferation-related genes in the control group and BLOC1S1 overexpression group (the scale bar is 125  $\mu\text{m}$ ). C: Western blotting was used to detect the expression of proliferation-related genes in the control group and BLOC1S1 overexpression group. D: Quantification of Western blotting results. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; ns:  $P > 0.05$ .

### 3 讨论

SSCs 是一类能通过自我更新来保持其数量稳定并能分化为精子的一类原始生殖细胞,是维持雄性生殖能力的基础细胞。山羊作为我国一种重要的经济性家畜,SSCs 增殖活性低下会大大限制其产业的发展。本团队前期工作发现多种基因能促进山羊 SSCs 的自我更新与增殖:TET1 通过与 HDAC1 形成复合体,调节组蛋白乙酰化状态,调控 SSCs 的表观修饰<sup>[11]</sup>; LIN28A 能结合 *NANOG* 的启动子区,并且能与 TET1 共定位,参与调控表观修饰,促进 *NANOG* 表达<sup>[12]</sup>; 过表达 E-CADHERIN 或 SIRT1 均会导致自我更新与增殖的相关基因 *PCNA*、*OCT4*、*PLZF* 表达上调,前者还能导致 *CD49F*、*GFR $\alpha$ 1* 表达上调<sup>[13]</sup>,后者能导致 *MYC*、*CCND1* 表达上调<sup>[14-15]</sup>。

本研究表明,BLOC1S1 能促进山羊精原干细胞增殖,并且过表达 BLOC1S1 能提高 EIF2S3Y 的表达。有研究表明 EIF2S3Y 可以激活 MEK-ERK1/2 通路来促进细胞的增殖<sup>[16]</sup>。MEK-ERK1/2 信号通路是一种经典的细胞信号通路,它在真核细胞内广泛存在,可以参与多种细胞类型的功能调控,包括调控细胞分化、细胞周期和增殖等<sup>[17]</sup>。MEK-ERK1/2 信号通路由 3 个保守信号网络组成:丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), MAPK 激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK)和 MAPKK 激酶(mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK),该途径介导多种生物学效应,包括细胞增殖、分化、转化、炎症和细胞凋亡<sup>[18-19]</sup>。

近年,我国奶山羊存栏量发展迅猛,2021 年末全国羊存栏 31 969.0 万只,比上年增加

1 314.2 万只,增长 4.3%,出栏 33 045.0 万只,创历史新高。陕西省 30 个奶山羊生产监测村和 20 个奶山羊生产监测场的相关数据表明,2021 年监测羊奶产量 1.98 万 t,较 2020 年产量增长 97.7%,增速明显。随着山羊产业的剧增,相应疫病防控以及提升种群抗病能力的需求也持续上升。据统计,2020 年布鲁氏菌感染一只羊会造成约 4 557 元的直接经济损失(不含奶山羊),各省份因布鲁氏菌感染羊造成损失为 1.8-20.4 亿元<sup>[20]</sup>。

本实验室前期研究发现 *Eif2s3y* 能通过抑制 *Adamts5* 进而抑制 TLR4/NF $\kappa$ B 通路缓解 LPS 引起的生殖细胞损伤,维持睾丸炎症稳态,防止因过量的炎症反应导致生殖损伤<sup>[10]</sup>。说明过表达 BLOC1S1 也有具有维持睾丸炎症稳态的潜能,以保证 SSC 的正常自我更新及正常生精功能。

此外,BLOC1S1 作为 BORC 的亚基之一,在溶酶体转运中发挥重要作用。溶酶体的主要功能是降解通过内吞作用、吞噬作用、自噬或生物合成运输传递的生物大分子,此外,溶酶体还参与各种其他细胞过程,包括微生物杀伤、抗原呈递、解毒、胆固醇稳态、细胞凋亡、代谢信号、外泌体释放、质膜修复、细胞迁移以及癌症侵袭和转移<sup>[21]</sup>。已观察到 2 个空间不同的溶酶体群:以微管组织中心(microtubule tissue center, MTOC)为中心的核囊泡和散布在整个细胞质中的外周囊泡。研究表明 BORC 能促进 Arl8-SKIP-微管马达蛋白依赖性溶酶体离心转运中的功能,抵消了 Rab7-RILP-动力蛋白-动力激活蛋白复合物介导溶酶体向心转运中的作用<sup>[22]</sup>。干扰 BORC 或该途径的其他成分会导致溶酶体群崩溃到中心粒周围区域。同时,这会导致细胞扩散和迁移减少,突出了 BORC 依

赖性的离心转运对溶酶体非降解功能的重要性。BLOC1S1 在此过程中不仅参与构成 BORC, 并且能够调控微管蛋白乙酰化, 促进溶酶体的运动<sup>[23]</sup>。

在线粒体内 BLOC1S1 作为乙酰转移酶发挥乙酰化线粒体蛋白的功能, 该作用已被证明依赖于乙酰辅酶 A 的生成或靶向乙酰辅酶 A 生成酶<sup>[24]</sup>。在小鼠成纤维细胞中敲除 BLOC1S1 显示出线粒体蛋白乙酰化减少, LC3-II 和 p62 的富集, 以及自噬体液泡中线粒体定位增加, 同时 PGC-1 $\alpha$  与 TFEB 表达量上升, 两者分别调控线粒体生物发生和线粒体自噬, 以拮抗由 BLOC1S1 耗尽而引起的线粒体自噬。BLOC1S1 减少对线粒体自噬和线粒体生物发生有非常明显的效应, 并且会影响线粒体周转和功能的调节。

布鲁氏菌通过避免含布鲁氏菌的液泡 (brucella-containing vacuole, BCV) 与溶酶体的相互作用来逃逸免疫。携带布鲁氏菌的 BCV 从吞噬小体 (endocytic compartments, eBCVs) 内化到液泡内的内含内质网标记的复制小室 (eplicative niche within vacuoles, rBCVs)<sup>[25]</sup>, 此外 BCV 还能形成具有自噬小体特征的 aBCVs<sup>[26]</sup>, 这构成了病原体细胞内生活的独特方式, 最终导致布鲁氏菌能在胞内复制<sup>[27]</sup>。

在感染过程中, 布鲁氏菌的 T4SS 分泌的布鲁氏菌效应分子诱导宿主细胞的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)-RIDD, 作为 RIDD 靶点的 BLOC1S1 mRNA 在其作用下降解, 抑制 BLOC1S1 的表达, 从而不能与其余 7 个亚基组装成 BORC, 发挥转运溶酶体的功能。这些事件驱动 BCV 运输到内质网核周积累, 减缓了 BCV 与溶酶体的融合, 并且限制 BCV 运输到细胞外周区域的溶酶体, 最终形成 rBCVs, 进行胞内复制。研究表明, 通过点位

突变 BLOC1S1, 改变其 RIDD 识别位点, 能在保证其 mRNA 不被降解的情况下, 参与组装 BORC, 转运溶酶体与 BCV 融合, 杀灭布鲁氏菌, 避免了 rBCVs 的形成<sup>[28]</sup>。

因此, 构建 mGSCs-I-SB-oeBLOC1S1 不仅能提高山羊精原干细胞的增殖活性, 还能研究 BLOC1S1 抗胞内菌感染的机制提供细胞平台和模型。

## 4 结论

本试验成功克隆了山羊 *BLOC1S1* 基因, 并分析了该基因编码氨基酸的特征信息和二级结构, 发现其仅有一个  $\alpha$  螺旋结构域和一个卷曲螺旋, 预测的三级结构为直链蛋白。过表达 *BLOC1S1* 能显著上调其增殖相关基因表达, 增加山羊精原干细胞的增殖活性。并且, *BLOC1S1* 能上调 *EIF2S3Y* 的表达, 说明 *BLOC1S1* 具有维持睾丸炎症稳态的潜能。这些结果为探究 *BLOC1S1* 对山羊精原干细胞的调控作用奠定了细胞学基础, 并为进一步研究 *BLOC1S1* 的生物学功能提供细胞平台, 为繁育 *BLOC1S1* 介导的抗病山羊奠定了生物学基础。

## REFERENCES

- [1] YU XW, LI TT, DU XM, SHEN QY, ZHANG MF, WEI YD, YANG DH, XU WJ, CHEN WB, BAI CL, LI XL, LI GP, LI N, PENG S, LIAO MZ, HUA JL. Single-cell RNA sequencing reveals atlas of dairy goat testis cells[J]. Zoological Research, 2021, 42(4): 401-405.
- [2] PU J, SCHINDLER C, JIA R, JARNIK M, BACKLUND P, BONIFACINO JS. BORC, a multisubunit complex that regulates lysosome positioning[J]. Developmental Cell, 2015, 33(2): 176-188.
- [3] GUARDIA CM, FARÍAS GG, JIA R, PU J, BONIFACINO JS. BORC functions upstream of kinesins 1 and 3 to coordinate regional movement of lysosomes along different microtubule tracks[J]. Cell

- Reports, 2016, 17(8): 1950-1961.
- [4] PU J, KEREN-KAPLAN T, BONIFACINO JS. A regulator-BORC interaction controls lysosome positioning in response to amino acid availability[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(12): 4183-4197.
- [5] BRIGHT MD, ITZHAK DN, WARDELL CP, MORGAN GJ, DAVIES FE. Cleavage of *BLOC1S1* mRNA by IRE1 is sequence specific, temporally separate from XBP1 splicing, and dispensable for cell viability under acute endoplasmic reticulum stress[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2015, 35(12): 2186-2202.
- [6] BAE D, MOORE KA, MELLA JM, HAYASHI SY, HOLLIEN J. Degradation of *Blos1* mRNA by IRE1 repositions lysosomes and protects cells from stress[J]. *Journal of Cell Biology*, 2019, 218(4): 1118-1127.
- [7] PANDEY A, LIN FR, CABELLO AL, Da COSTA LF, FENG XH, FENG HQ, ZHANG MZ, IWAWAKI T, RICE-FICHT A, FICHT TA, de FIGUEIREDO P, QIN QM. Activation of host IRE1 $\alpha$ -dependent signaling axis contributes the intracellular parasitism of *Brucella melitensis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 103.
- [8] 朱海鲸. CD49f 和 miR-302 对奶山羊雄性生殖干细胞体外培养生物学特性的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2014.
- ZHU HJ. Influences of CD49f and miR-302 on biological properties of dairy goat male germline stem cells cultured *in vitro*[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2014 (in Chinese).
- [9] ZHANG MF, WAN SC, CHEN WB, YANG DH, LIU WQ, LI BL, AIERKEN A, DU XM, LI YX, WU WP, YANG XC, WEI YD, LI N, PENG S, LI XL, LI GP, HUA JL. Transcription factor *Dmrt1* triggers the SPRY1-NF- $\kappa$ B pathway to maintain testicular immune homeostasis and male fertility[J]. *Zoological Research*, 2023, 44(3): 505-521.
- [10] 张梦菲. *Eif2s3y* 对奶山羊精原干细胞增殖的调控作用及机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
- ZHANG MF. The regulation and mechanism of *Eif2s3y* in the proliferation of dairy goat spermatogonial stem cells[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [11] 华进联, 郑丽明. 一种基于去甲基化促进生殖干细胞自我更新和增殖的载体及其应用: CN104630272A[P]. 2015-05-20.
- HUA JL, ZHEN LM. Vector based on demethylation to promote self-renewal and proliferation of germline stem cells and application: CN104630272A[P]. 2015-05-20 (in Chinese).
- [12] 马方琳. LIN28A 促进奶山羊精原干细胞自我更新和增殖的机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2019.
- MA FL. The Mechanism of LIN28A on promoting the self-renewal and proliferation of spermatogonial stem cells in dairy goats[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [13] 翟源心, 郑丽明, 华进联. E-cadherin 对奶山羊雄性生殖干细胞自我更新与增殖的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(9): 1439-1449.
- ZHAI YX, ZHENG LM, HUA JL. E-cadherin affects the self-renewal and proliferation in dairy goat (*Capra hircus*) male germline stem cells[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(9): 1439-1449 (in Chinese).
- [14] NIU BW, WU J, MU HL, LI B, WU CY, HE X, BAI CL, LI GP, HUA JL. MiR-204 regulates the proliferation of dairy goat spermatogonial stem cells *via* targeting to sirt1[J]. *Rejuvenation Research*, 2016, 19(2): 120-130.
- [15] 华进联, 吴江, 牛博文. 一种促进奶山羊精原干细胞的自我更新和增殖的载体及其应用: CN104404083B[P]. 2018-02-16.
- HUA JL, WU J, NIU BW. Vector capable of promoting self renewal and proliferation of spermatogonial stem cells of dairy goat and application of vector: CN104404083B[P]. 2018-02-16 (in Chinese).
- [16] HASEGAWA K, NAMEKAWA SH, SAGA Y. MEK/ERK signaling directly and indirectly contributes to the cyclical self-renewal of spermatogonial stem cells[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(11): 2517-2527.
- [17] WHITE J, STEAD E, FAAST R, CONN S, CARTWRIGHT P, DALTON S. Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle-regulated cyclin-dependent kinase activity during embryonic stem cell differentiation[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 2018-2027.
- [18] MOHAMED SK, AHMED AAE, ELMORSY EM, NOFAL S. ERK activation by zeranol has neuroprotective effect in cerebral ischemia reperfusion[J]. *Life Sciences*, 2019, 227: 137-144.
- [19] 高晟斌, 韦欣捷, 刘爱玲, 孙利凯, 王幼明. 羊布鲁氏菌病直接经济损失与防控成本效益分析方法构建及实证研究[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(7): 1-6.

- GAO SB, WEI XJ, LIU AL, SUN LK, WANG YM. Establishment of an analytical method for direct economic loss caused by sheep brucellosis and cost-effectiveness of its control with empirical research[J]. China Animal Health Inspection, 2022, 39(7): 1-6 (in Chinese).
- [20] LI YX, WU WP, XU WJ, WANG YQ, WAN SC, CHEN WB, YANG DH, ZHANG MF, WU XJ, YANG XC, DU XM, WANG CL, HAN M, CHENG YG, LI N, HUA JL. *Eif2s3y* alleviated LPS-induced damage to mouse testis and maintained spermatogenesis by negatively regulating *Adamts5*[J]. Theriogenology, 2023, 211: 65-75.
- [21] 许银丰, 王伟. 溶酶体的生物学功能与相关疾病研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(7): 1428-1436.
- XU YF, WAN W. Lysosome function and lysosome-related diseases[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2019, 41(7): 1428-1436 (in Chinese).
- [22] JIA R, GUARDIA CM, PU J, CHEN Y, BONIFACINO JS. BORC coordinates encounter and fusion of lysosomes with autophagosomes[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1648-1663.
- [23] WU KY, WANG LD, CHEN Y, PIROOZNIYA M, SINGH K, WÄLDE S, KEHLENBACH RH, SCOTT I, GUCEK M, SACK MN. GCN5L1 interacts with  $\alpha$ TAT1 and RanBP2 to regulate hepatic  $\alpha$ -tubulin acetylation and lysosome trafficking[J]. Journal of Cell Science, 2018, 131(22): jcs221036.
- [24] WU KY, SCOTT I, WANG LD, THAPA D, SACK MN. The emerging roles of GCN5L1 in mitochondrial and vacuolar organelle biology[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2021, 1864(2): 194598.
- [25] PIZARRO-CERDÁ J, MÉRESSE S, PARTON RG, van der GOOT G, SOLA-LANDA A, LOPEZ-GOÑI I, MORENO E, GORVEL JP. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(12): 5711-5724.
- [26] WU KY, SEYLANI A, WU J, WU XF, BLECK CKE, SACK MN. BLOC1S1/GCN5L1/BORCS1 is a critical mediator for the initiation of autolysosomal tubulation[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3707-3724.
- [27] STARR T, CHILD R, WEHRLY TD, HANSEN B, HWANG S, LÓPEZ-OTIN C, VIRGIN HW, CELLI J. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle[J]. Cell Host & Microbe, 2012, 11(1): 33-45.
- [28] WELLS KM, HE K, PANDEY A, CABELLO A, ZHANG DM, YANG J, GOMEZ G, LIU Y, CHANG HW, LI XQ, ZHANG H, FENG XH, Da COSTA LF, METZ R, JOHNSON CD, LEE MARTIN C, SKROBARCZYK J, BERGHMAN LR, PATRICK KL, LEIBOWITZ J, et al. *Brucella* activates the host RIDD pathway to subvert BLOS1-directed immune defense[J]. eLife, 2022, 11: 73625.

(本文责编 郝丽芳)