

## 猪囊尾蚴 RNA 聚合酶亚基基因的筛选及结构初探

骆学农, 郑亚东, 窦永喜, 侯俊琳, 景志忠, 才学鹏\*

**【摘要】** 目的 从构建的剪切引导序列(SL) cDNA 文库中筛选猪囊尾蚴相关基因。方法 提取猪囊尾蚴总 RNA, 利用 SL 特异序列和带有噬菌体 M13M4 的 olig(dT) 为引物, 反转录成 cDNA, 构建猪囊尾蚴 SL cDNA 文库。随机筛选并通过酶切、PCR 鉴定阳性克隆, 分析其同源性。结果 鉴定出一 332 bp 的插入片段, 含有 204 bp 的开放阅读框(ORF)和 3'端 20 bp 的 poly A 尾巴, 经核苷酸和氨基酸序列分析, 所克隆的基因的氨基酸序列与其他真核生物如人、秀丽隐杆线虫、果蝇及拟南芥等的 RNA 聚合酶亚基基因同源性均高达 71.6% 以上。结论 筛选鉴定的基因推测为猪囊尾蚴 RNA 聚合酶亚基基因, 而且在不同物种间很保守。

**【关键词】** 囊尾蚴; 剪接前导; 基因文库; DNA 指导的 RNA 聚合酶

中图分类号: R383.34

文献标识码: A

### Screening of cDNA Clone for Putative RNA Polymerase Subunit of *Cysticercus cellulosae*

LUO Xue-nong, ZHENG Ya-dong, DOU Yong-xi, HOU Jun-lin, JING Zhi-zhong, CAI Xue-peng\*  
(Lanzhou Veterinary Research Institute, CAAS, Lanzhou 730046, China)

**【Abstract】 Objective** To obtain related genes of *Cysticercus cellulosae* from spliced leader (SL) cDNA library. **Methods** Spliced leader library of *Cysticercus cellulosae* was constructed using SL specific primer and oligo (dT)15 with M13M4 primer, and positive clones were then screened randomly, identified with enzyme restriction, followed by sequencing and homologous analysis. **Results** The amino acid sequence, encoded by the positive clone with a poly (A)<sub>22</sub> tail and a complete open reading frame (ORF), was with homology of RNA polymerase subunit genes of human, *B. napus*, fission yeast, *A. thaliana*, *C. elegans* and fruit fly up to 71.6%. **Conclusion** The protein, RNA polymerase subunit encoded putatively by the clone, is high conservative in different species.

**【Key words】** *Cysticercus cellulosae*; RNA, Spliced Leader RNA; Gene Library; DNA-Directed RNA Polymerase

Supported by the National Basic Research Priorities Program (G1999011903)

\* Corresponding author, E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

剪切引导序列 (spliced leader, SL) 反式剪切 (trans-splicing) 是 mRNA 的一种加工机制, 在此过程中一个微型外显子 (mini-exon) 即 SL 被加到 mRNA 前体分子的 5' 端, 最终形成成熟 mRNA 的 5' 外显子。目前研究的所有例证都证明, SL 供体分子为小的非多聚腺苷酸化的核 RNA (SL-RNA), 其结构特征与传统顺式剪切中起作用的 snRNA 相似。目前 SL 反式剪切已在线虫纲、吸虫纲、涡虫纲、腔肠动物门、脊椎动物中被发现。通过对多房棘球绦虫基因调节机制的分析, 发现在绦虫组织中 SL 反式剪切也可用于基因表达。而且由 104 核苷酸 (nt) 非多聚腺苷酸化、带有三甲基鸟苷帽子结构的 SL-RNA 分子提供的 36nt 的 SL, 存在于多房棘球绦虫一个大的 mRNA 亚群中。相似的 SL-RNA 在狗细粒棘球绦虫中也表达<sup>[1]</sup>。反式剪切的 5' 非翻译区 (UTR) 很短, 大多数秀丽隐杆线虫 SL1 转录本有 0 ~ 40 个碱基, 位于引导序列和第一个 ATG 之

间, 推测 SL 与翻译的起始密切相关。由于许多 mRNA 5' 端 SL 序列的存在, 而 SL 在种间又很保守, 研究人员可利用有限的材料, 应用 SL 和 olig(dT) 引物方便地通过 PCR 扩增形成 cDNA, 进而构建 SL cDNA 文库, 筛选和鉴定带有 SL 序列的完整基因。同时还可以构建寄生虫的 SL 差异显示文库, 筛选阶段特异性基因<sup>[2]</sup>。

### 材料与方法

#### 1 菌株和试剂

JM109 菌种由本室保存, pGEM-Teasy, SV total RNA isolation system、T4DNA 连接酶、EcoRI 限制性内切酶、Taq 酶均购自北京 Promega 公司, 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷酶 (X-gal)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京华美公司; 引物由大连宝生物工程公司合成, PCR 试剂盒购自大连宝生物工程公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit, 核酸标志物购自北京经公司; 其他常规试剂均由国内生产。

基金项目: 国家重大基础研究发展规划“973”项目 (G1999011903)

作者单位: 中国农业科学院兰州兽医研究所畜禽病毒病重点实验室, 兰州 730046

\* 通讯作者 E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

## 2 猪囊尾蚴 RNA 的提取

从囊尾蚴病猪体剥离猪囊尾蚴,用生理盐水冲洗 3~4 次。吸水纸吸干虫体,称取 30 mg 置于研钵中,加入少量液氮后快速研磨至无可见组织块,加入 175  $\mu$ l SV RNA 裂解缓冲液,入微型匀浆器中迅速匀浆后转移至 Eppendorf 管中,加 350  $\mu$ l SV RNA 稀释缓冲液混合,70  $^{\circ}$ C 水浴 3 min,13 000 g,4  $^{\circ}$ C 离心 10 min,将上清液转至一新离心管中,加入 200  $\mu$ l 无水乙醇混合,再转移混合物至(Spin Column),13 000 g,4  $^{\circ}$ C 离心 1 min,于 Spin Column 上加入 SV RNA 洗涤缓冲液洗涤 2 次,用 50  $\mu$ l DNA 酶温育混合物在 20~25  $^{\circ}$ C 孵育 15 min,100  $\mu$ l 无核酸酶水洗脱 RNA,置 -70  $^{\circ}$ C 保存备用。

## 3 cDNA 的 PCR 扩增

根据猪囊尾蚴 SL 保守区序列和真核生物 mRNA 的特征,用 DNASTAR 软件设计如下引物:

上游引物(TSSL-UP): 5'-GGTCCCTTACCTTG-CAATTTTGT-3'

下游引物(TSSL-DOWN): 5'-TTTTTTTTTTTTTTT-TGCTGACTGGGAAAAC-3'

噬菌体 M13M4: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'

取 12  $\mu$ l 猪囊尾蚴总 RNA 为模板,以 TSSL-DOWN 为引物,75  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,冰浴冷却后,加入 2  $\mu$ l 反转录酶缓冲液,1  $\mu$ l RNA 酶抑制剂(30 U/ $\mu$ l)、1  $\mu$ l 禽成髓细胞瘤病毒(AMV)(3U/ $\mu$ l)和 2  $\mu$ l 脱氧核苷三磷酸(dNTP)混合物(2.5 mmol/L),补水至 20  $\mu$ l 后,42  $^{\circ}$ C 水浴反转录 1.5 h。65  $^{\circ}$ C 10 min 灭活反转录酶,取 10  $\mu$ l 反转录产物,加入 1  $\mu$ l(50 pmol) TSSL-UP 和 2.5  $\mu$ l(20 pmol) M4 引物,以及 4  $\mu$ l dNTP 和 0.5  $\mu$ l Taq 酶(5U/ $\mu$ l),按如下程序进行 PCR 扩增:95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 2.5 min,35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳观察。

## 4 SL cDNA 文库的构建

取 50  $\mu$ l PCR 产物补水至 200  $\mu$ l,加入 20  $\mu$ l 醋酸钠(3 mol/L)和 500  $\mu$ l 无水乙醇,置 -20  $^{\circ}$ C 沉淀 30 min,21 000 g 离心 10 min,70% 乙醇洗涤 2 次,置真空干燥仪干燥后,加入 10  $\mu$ l 灭菌水溶解。取上述浓缩的 PCR 产物 5  $\mu$ l 与 1  $\mu$ l pGEM-T easy 载体,1  $\mu$ l  $T_4$  连接酶(3U/ $\mu$ l)混合,在 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。取 10  $\mu$ l 连接产物无菌条件下加入已放置 12~24 h 用 CaCl<sub>2</sub> 制备的 JM109 感受态细胞中,冰浴放置 30 min。42  $^{\circ}$ C 热激 90 s,冰浴 3 min 冷却后,转移菌液至装有 800  $\mu$ l 预热的

SOC 培养液中,37  $^{\circ}$ C 150 rpm 振荡 1 h,9 000 g 离心 5 min,细胞沉淀均匀涂布于含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/ml)、16  $\mu$ l X-gal(20 mg/ml)、4  $\mu$ l IPTG(200 mg/ml)的 LB 琼脂平板上。倒置平皿于 37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 12~16 h 后,于 4  $^{\circ}$ C 放置使蓝斑充分显现。

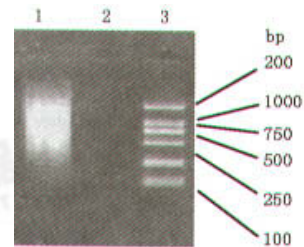
## 5 RNA 聚合酶亚基基因的筛选和鉴定

随机挑取白色菌落于 2  $\times$  YT 培养液中,250 rpm 振摇过夜。碱裂解法提取质粒 DNA,以每个质粒 DNA 为模板,TSSL-UP 和 M4 为上、下游引物按前述程序进行 PCR 扩增。PCR 阳性质粒再用 *Eco*RI 酶切鉴定。两次鉴定均为阳性的菌株培养增菌后,送大连宝生物工程有用双脱氧终止法测序。测序结果用 BLAST 软件比较其核苷酸与氨基酸的同源性,并用蛋白质专家系统(www.expasy.org)分析其编码蛋白的特征。

## 结 果

### 1 SL cDNA 的扩增

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)产物经琼脂糖电泳出现 150~2 500 bp 的弥散条带,表明猪囊尾蚴 RNA 的提取、引物的设计以及 RT-PCR 的程序均是可靠的(图 1)。



1 SL RT-PCR 产物 2 以水为模板的空白对照 3 DL 2000 标志物  
Lane 1 RT-PCR products of SL Lane 2 Control Lane 3 DNA DL2000 markers

图 1 SL RT-PCR 产物  
Fig. 1 RT-PCR products of SL

### 2 SL cDNA 文库的构建

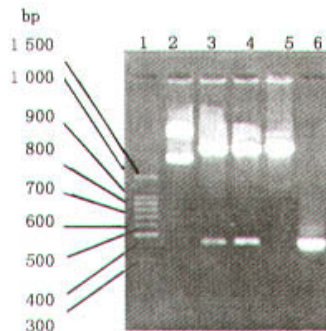
PCR 连接产物转化感受态细胞后,在 LB 平板上见 18 个白色菌落,提取的质粒 DNA 以 TSSL-UP 和 M4 为引物 PCR 鉴定,同时用蒸馏水为空白对照分析。其中 8 个克隆有插入片段,大小在 200~1 000 bp 左右。经测序有 4 个克隆具有完整的基因序列,其中开放阅读框(ORF)分别为 510,447 和 507 bp,均为未知功能的新基因(尚未登录 GenBank),含有 SL 引物序列、终止密码和

poly A 尾巴,其余 4 个克隆均为重复序列。说明 SL cDNA 文库有一定的库容量,同时也证明有一定数量的猪囊尾蚴 mRNA 是经过 SL 反式剪切而成熟的。

### 3 猪囊尾蚴 RNA 聚合酶亚基基因的鉴定及结构预测

经 PCR 扩增后出现 330 bp 片段的质粒 DNA, *EcoRI* 酶切释放相同大小的片段,证明插入片段约为 330 bp(图 2)。重组质粒测序显示该片段 N 端带有 SL 序列,而 C 端具有一定长度的 poly A 尾巴(20nt),在 poly A 尾巴前大约 20 bp 的位置有加尾信号 UGUAAA。其完整 ORF 为 204 bp(图 3),编码 68 个氨基酸残基,其中亮氨酸含量最高,占 16.4%。推测其相对分子质量为 77 900,等电点(PI)为 7.65。经 BLAST 软件分析,该基因核苷酸序列与 Brehm<sup>[4]</sup>自猪囊尾蚴 cDNA 文库中克隆的未知功能的基因序列一致。而其推测的氨基酸序列与果蝇的同源性最高达 86.6%,与人、秀丽隐杆的同源性分别为 83.6% 和 82.1%,而与拟南芥的同源性为最低(71.6%)。初步推测所克隆基因为猪囊尾蚴 RNA 聚合酶亚基(图 4)。

用 Netphos 2.0 分析该蛋白有 3 个磷酸化位点,分别位于第 9,41,61 位苏氨酸(Thr)上,Signalp V 1.1 预测 C 端疏水区太短,无糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定位点和 N 端信号肽。Psort II 预测蛋白定位于细胞浆内,无跨膜螺旋。虽然亮氨酸含量很高,但无亮氨酸拉链。



1 100 bp DNA 标志物 2 重组质粒 3,4 重组质粒 *EcoRI* 酶切 5 未重组质粒 *EcoRI* 酶切 6 重组质粒 PCR 扩增产物  
Lane 1 100 bp Ladder markers Lane 2 Recombinant plasmid Lanes 3,4 Recombinant plasmids digested by *EcoRI* Lane 5 Unrecombinant plasmid digested by *EcoRI* Lane 6 Amplified products from recombinant plasmid

图 2 重组质粒的鉴定  
Fig. 2 Identification of recombinant plasmids

```

GGTCCTTACCTTGCAATTTGTATGTTCCAAACACATGATAATTCGAATCCGCTGCTTACAGTGTGGCAAAGTTGTGGGT
GACAAATGGGAGTCTTACCTCGTCTCTTGCAGGCGGAGTACACAGAAGCCGATGCTCTGGATACCCTCGGCTCCGGCG
CTACTGCTGTCGGGCGATGATACTCTCTCACGTAGACCTTATCGAAAAATTTGCTCAACTACGCCCACTTCAGAAATGAC
GCTCCCCCATCGATTGTCAGTCTGCTGTAATGCAACGAGATATTTCTGGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

注:加下划线的部分为上游引物;带阴影的部分为 ORF;黑体部分为加尾信号  
Note: underlined bases for upper primer; lightly shaded for ORF; bolded for adding poly(A) tail signal

图 3 猪囊尾蚴 RNA 聚合酶亚基的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequences of RNA polymerase subunit of *Cysticercus cellulosae*

1	..V.....DA..D..LD.....N.....M.....NT...SDNS	B. napus
1	.....S.....D..D...T...EDN...E...K...Q.....I.....C.N..S.QKNL	F. yeast
1	..V.V.....D...E...D.A.....M.....NTM..SDPN	A. thaliana
1	.....D.....F..S..S.....R.....A.....H...	C. elegans
1	.....S.....K.....G.....	F. fly
1	..V.....IV...A.....K.....A.....	Human
1	.....V.D...S..V.....A...T...R.....I.S.....Q.	T. solium

注: B. napus 芸苔 F. yeast 裂殖酵母 A. thaliana 拟南芥 C. elegans 秀丽新杆线虫  
F. fly 果蝇 T. solium 猪带绦虫 T. solium 猪带绦虫

Note: B. napus Brassica napus F. yeast Fission yeast A. thaliana Arabidopsis thaliana  
C. elegans Caenohabditis elegans F. fly Fruit fly T. solium Taenia solium

图 4 几种生物 RNA 聚合酶亚基氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of amino acid sequences of RNA polymerase subunit from different species

## 讨论

Brehm 等<sup>[4]</sup>自构建的猪囊尾蚴 cDNA 文库中,应用猪囊尾蚴 SL 特异序列和 UNIZAP-XR 载体区 3' 端特异的 ZAP3-UP 为上、下游引物进行 PCR 扩增,验证了

SL 序列在 cDNA 文库中的存在情况。结果扩增片段为 300~2 500 bp,而且随机筛选出 30 多个阳性克隆,都具有 Poly(A) 尾巴和完整的 ORF,并且大部分克隆属于新发现的未知功能的基因。这表明在猪囊尾蚴有相当一部分 mRNA 分子是通过 SL 反式剪切变为成熟

的 mRNA。本实验用猪囊尾蚴 SL 特异序列与带有 M4 互补序列的 olig(dT) 为引物构建 SL cDNA 文库, 不仅提高了 PCR 扩增的特异性, 而且大大提高了 PCR 产物的量。筛选出的猪囊尾蚴 RNA 聚合酶基因与 Brehm 自 cDNA 文库中克隆的一未知功能的基因具有完全相同的 ORF, 说明用构建 SL cDNA 文库的方法可以获得带有 SL 的完整基因序列, 而且比构建传统 cDNA 文库更容易操作, 也更易获得全长 cDNA 克隆。

本研究筛选出 332 bp 片段, 其编码区所编码的氨基酸序列与人、果蝇、秀丽隐杆线虫、拟南芥、裂殖酵母的 RNA 聚合酶亚基的同源性分别达 83.6%、86.6%、82.1%、71.6%、76.1% 及 73.1%。推测该基因可能为猪囊尾蚴 RNA 聚合酶基因。而且其编码蛋白在不同物种间相当保守, 可能在研究生物进化方面具有重

要意义, 但线虫、人、果蝇、猪囊尾蚴在 C 端较其他物种少 4 个氨基酸, 而且它们之间的氨基酸差异主要集中在中间部分。

#### 参 考 文 献

- [1] Nilsen TW. Trans-splicing: an update[J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 73: 1-6.
- [2] Brehm K, Wolf M, Beland H, et al. Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display [J]. Int J Parasitol, 2003, 33:1145-1159.
- [3] Martin SAM, Thompson FJ, Devaney E. The construction of spliced leader cDNA libraries from the filarial nematode *Brugia pahangi* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 70: 241-245.
- [4] Brehm K, Hubert K, Sciuotto E, et al. Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 122: 105-110.

(收稿日期: 2003-12-01 编辑: 庄兆衣)

## “全国媒介生物学与控制高级研讨班”: 机遇与挑战 南京 2004 年 10 月 10 ~ 12 日

### 通 知

“全国媒介生物学与控制高级研讨班”将于 2004 年 10 月 10 ~ 12 日在南京举行。

本研讨班由南京医科大学校长陈琪教授、美国耶鲁大学医学院郑良彪博士和中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所所长汤林华研究员倡议, 由南京医科大学、中华预防医学会医学寄生虫学会联合举办。

美国耶鲁大学医学院副教授郑良彪博士, (以下按姓氏笔画排序) 伊利诺依 Urbana 分校病原生物学系副教授李建永博士、美国国立卫生院 (NIH) 疟原虫基因组研究室主任苏新专博士、Old Dominion 大学地球监测与空间信息研究中心主任周国青博士、纽约州立大学 Buffalo 分校生物科学系副教授阎桂云博士等一批长期旅美的国际知名媒介生物学专家和部分国外专家将莅临授课。本研讨班包括讲座和研讨等多种交流形式, 将是一个较系统深入地了解媒介生物学与控制研究进展, 与国际知名媒介生物学和寄生虫学专家共同研讨交流, 建立媒介生物学与控制研究网络和协作的良机。

本研讨班适合疾病预防和控制专业人员、医学院校教师和卫生管理决策人员等与医疗卫生服务有关的高级人员参加。

本研讨班规模拟 30 ~ 40 人, 会务费 500 元。参加者请于 2001 年 8 月 31 日前将回执寄回, 地址: 210029 南京市汉中中路 140 号, 南京医科大学病原生物学系。亦可通过电话、E-mail 报名。

联系人: 马磊 电话: 025-86862902, 传真: 025-86862887, E-mail: malei@njmu.edu.cn。

“全国媒介生物学与控制高级研讨班”组委会

2004 年 5 月 20 日