

阴道毛滴虫沉默信息调节因子 2 同源基因的原核表达载体构建及表达

张可浩¹, 黄丽霞¹, 傅玉才^{2*}, 章家新³

【摘要】 提取阴道毛滴虫 (*T.vaginalis*) LX006 细胞株传代培养细胞总 RNA, RT-PCR 扩增 Tv-Sir2-like 全长 cDNA 链, 扩增产物连接到 T-A 克隆载体并转化大肠埃希菌 (*E.coli*) JM109。提取重组克隆质粒, 并用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I 进行双酶切, 将目的基因定向克隆到原核表达载体 pET-41b, 并在 *E.coli* BL21 中经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。结果显示目的基因定向克隆于原核表达质粒 pET-41b 获得了表达重组子, IPTG 诱导该原核表达载体在 *E.coli* BL21 中表达相对分子质量(*Mr*)约为 59 000 的重组融合蛋白, 表达量占菌体总蛋白量的 30%。

【关键词】 阴道毛滴虫; 沉默信息调控因子2; 同源基因; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: R382.211

文献标识码: B

Construction of Prokaryotic Expression Vector for *Trichomonas vaginalis* Silent Information Regulator 2 and Its Expression

ZHANG Ke-hao¹, HUANG Li-xia¹, FU Yu-cai^{2*}, ZHANG Jia-xin³

(1 Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Taizhou 317000, China; 2 Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 3 Xianyue Hospital, Xiamen 361012, China)

【Abstract】 Total RNA was isolated from *Trichomonas vaginalis* and Tv-Sir2-like cDNA was amplified by RT-PCR and cloned into pGEM-T Easy plasmid. A fragment of Tv-Sir2-like cDNA was subcloned into the expression vector pET-41b and expressed in *E.coli* BL21 with induction of IPTG. The full-length of Tv-Sir2-like cDNA was cloned and sequenced. The prokaryotic expression system of pET-41b/Tv-Sir2-like was constructed. The fusion protein of Tv-Sir2-like was expressed in *E.coli* BL21, occupying 30% of the total bacterial protein after being induced by IPTG for 5 h. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was about *Mr* 59000. The recombinant protein of Tv-Sir2-like is efficiently expressed in *E.coli* BL21.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*; Sir2; homolog; Gene cloning; Prokaryotic expression

* Corresponding author, E-mail: ycfu@stu.edu.cn

细胞的寿命和衰老与某些基因的调节密切相关, 如沉默信息调控因子 2 (Silent information regulator 2, SIR2) 等^[1], 但其控制生物的寿命或衰老过程的作用机制尚不清楚。作者从阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) 中克隆了 Sir2 的同源基因 (Tv-Sir2-like) 全长 cDNA, 并将其克隆至原核表达载体 pET-41b 获得重组表达质粒, 重组子在大肠埃希菌 (*E.coli*) BL21 中高效表达 GST/Tv-SIR2-like 重组蛋白。

1 材料与方 法

1.1 阴道毛滴虫细胞株、质粒及菌株 *T.vaginalis* LX006 细胞株来自汕头大学医学院第一附属医院患者, 并传代培养保存。T-A 克隆载体 (pGEM-T Easy)、*E.coli* JM109 购于美国 Promega 公司。原核表达载体 (pET-41b)、*E.coli* BL21 (DE3) 购于德国 Norvagen 公司。

1.2 工具酶及主要试剂 RNA 抽提试剂盒、小量质粒提取试剂盒、凝胶电泳产物纯化试剂盒购于德国 Qiagen 公司; cDNA

文库构建试剂盒购于美国 Clontech 公司; PCR 扩增试剂盒购于美国 Invitrogen 公司; 各种限制性内切酶购于美国 Biolab 公司。
1.3 引物设计 本实验室已构建阴道毛滴虫的 cDNA 表达文库^[2], 克隆 Tv-Sir2-like 的 cDNA 3'端序列并登录 GenBank 核酸数据库^[3]。在 *T.vaginalis* 基因组的部分测序结果数据库 (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg>) 中查到 Tv-Sir2-like cDNA 5'端部分序列, 根据全长 cDNA 序列设计 PCR 引物。正、反向引物分别包括 Tv-Sir2-like 基因翻译起始密码子和终止密码子。正向引物: 5'-AATGCCCATGGAAGAACA-3', 反向引物: 5'-CAGCTAATTAAGGTCGTCACG-3', 由上海基康生物技术有限公司合成。

1.4 总 RNA 提取 取培养活力良好的阴道毛滴虫细胞培养液 100 ml, 300×g 离心 5 min, pH 7.2 的 PBS 洗涤 2 次并离心沉淀。取细胞沉淀并按照 RNA 抽提试剂盒方法提取总 RNA。

1.5 逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增及凝胶电泳分离及纯化 按照 cDNA 文库构建试剂盒方法合成 Tv-Sir2-like cDNA 第 1 链。按照 PCR 扩增试剂盒方法进行目的基因 Tv-Sir2-like 扩增。将 RT-PCR 扩增产物上样于 1% 琼脂糖凝胶电泳分离。在波长 600 nm 紫外光下, 切取目的基因所在琼脂糖凝胶块, 按照琼脂糖

作者单位: 1 温州医学院附属台州医院, 台州 317000; 2 汕头大学医学院, 汕头 515041; 3 厦门市仙岳医院, 厦门 361012

* 通讯作者, E-mail: ycfu@stu.edu.cn

凝胶电泳纯化试剂盒方法纯化。

1.6 *Tv-Sir2-like* 基因克隆及鉴定 在 T_4 连接酶的作用下, 将回收纯化目的基因片段与 T-A 克隆载体连接。连接产物转化感受态 *E. coli* JM109, 提取阳性克隆质粒并用限制性内切酶 *Not* I 酶切鉴定。挑选酶切鉴定正确的重组菌克隆, 少量培养提取质粒。由上海基康生物技术有限公司进行测序鉴定。

1.7 *Tv-Sir2-like* 原核表达载体构建及鉴定 分别将重组克隆质粒和原核表达载体 pET-41b 进行 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切。 T_4 连接酶连接, 构建 *Tv-Sir2-like* 原核表达重组子, 转化 *E. coli* BL21 (DE3)。提取阳性克隆菌落质粒, 用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切鉴定, 并由上海基康生物技术有限公司进行测序鉴定。

1.8 目的基因在 *E. coli* 中的表达 鉴定正确的重组表达质粒转化表达菌 *E. coli* BL21 (DE3)。阳性转化菌经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导培养 5 h, 取 1 ml 菌液 $10\ 000\times g$ 离心 1 min, 沉淀中加 $1\times$ 十二烷基磺酸钠 (SDS) 加样缓冲液 20 μ l, 煮沸 3 min, 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。考马斯亮蓝 G-250 染色 4~8 h, 10% 醋酸脱色 4 h, 观察电泳结果。

2 结果

2.1 RNA 质量 总 RNA 经紫外测定 $A_{260}/A_{280}=1.98$, 1% 琼脂糖变性凝胶电泳检测, 结果显示清晰的 28S、18S、5S 条带, 且 28S 条带的亮度约是 18S 条带的 2 倍, 反映所提取总 RNA 完整、质量高, 可满足后续实验要求。

2.2 *Tv-Sir2-like* cDNA RT-PCR 产物凝胶电泳结果 合成 *Tv-Sir2-like* cDNA 第 1 链后再进行 PCR 扩增。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 显示阳性扩增条带。

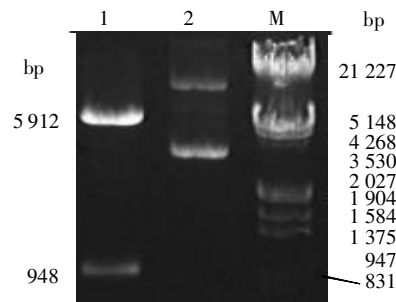
2.3 PCR 产物克隆及酶切结果 根据 pGEM-T Easy 载体多克隆位点中的 *Not* I 酶切位点, 使用 *Not* I 对重组子进行酶切。结果得到预期大小的酶切片段。

2.4 重组表达质粒构建和鉴定 将 *Tv-Sir2-like* 基因克隆入原核表达载体 pET-41b, 重组表达质粒经 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定后 (图 1), 进一步测序结果显示, 所插入的目的基因片段序列正确, 无碱基错配, 翻译读码框正确。

2.5 重组质粒在 *E. coli* BL21 中的表达 将鉴定正确的 pET-41b/*Tv-Sir2-like* 质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 1 mmol/L IPTG 诱导表达。所表达的重组蛋白为带有 GST 蛋白标签的融合蛋白质, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定, 其相对分子质量 (*Mr*) 约为 59 000, 与理论上推测的融合蛋白质相对分子质量大小相符, 所表达的蛋白约占总菌体蛋白的 30% (图 2)。

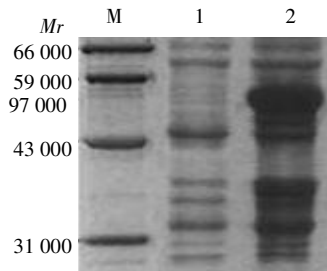
3 讨论

转录沉默是基因表达调控的重要方式。沉默信息调节因子 (silent information regulator, SIR) 家族在维持酵母基因的转录沉默及染色体的稳定中, 起着重要的作用。*Sir2* 参与细胞 DNA 损伤后的生理性修复及能量代谢过程^[4]。不同生物 SIR2p 的同源蛋白质在生物进化过程中有高度的序列保守性^[5], 具有依赖 NAD 的脱组蛋白乙酰基酶活性而使转录沉默^[6]。最近研究发现, SIR2p 沉默活性的激活, 可能通过负性调节 p53 的活性从而抑制细胞凋亡、延长细胞的寿命^[7]。



1: 表达重组子经 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切后的产物, 2: 表达重组子 pET-41b/*Tv-Sir2-like*, M: λ DNA(*Eco*R I+*Hind* III)Ladder。

图 1 pET-41b/*Tv-Sir2-like* 限制性内切酶酶切鉴定



M: 蛋白质标志物, 1: pET-41b/*Tv-Sir2-like* 质粒转化的 *E. coli* BL21 (DE3) 未经 IPTG 诱导的表达产物, 2: pET-41b/*Tv-Sir2-like* 质粒转化的 *E. coli* BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导 5 h 的表达产物。

图 2 pET-41b/*Tv-Sir2-like* 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳

大肠埃希菌表达系统是基因表达技术中应用广泛的原核表达系统。*E. coli* BL21 是水解蛋白酶缺陷型细菌, 细菌内表达的融合蛋白降解的危险性较低。本研究克隆了阴道毛滴虫 *Sir2* 基因的同源基因 *Tv-Sir2-like*, 基因重组后转化 *E. coli* BL21 进行原核表达。重组表达质粒在 *E. coli* BL21 中以胞内可溶性形式高效表达, 表达及纯化产物 *Mr* 59 000, 其中融合蛋白前体谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 为 *Mr* 24 200, 目的基因表达多肽为 *Mr* 34 700。融合蛋白质相对分子质量大小与预期结果一致。目的基因接入 pET-41b 质粒谷胱甘肽-S-转移酶基因下游, 所表达的融合蛋白利用 GSTrap FF 柱上的谷胱甘肽-S-转移酶的底物-谷胱甘肽为配基, 进行亲和层析纯化, 获得了较纯净的融合蛋白, 且不破坏蛋白质的天然构型, 为进一步研究 *Tv-SIR2-like* 蛋白的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] North BJ, Marshall BL, Borra MT, et al. The human *Sir2* ortholog, SIRT2, is a NAD⁺-dependent tubulin deacetylase[J]. Mol Cell, 2003, 11: 437-444.
- [2] Zhang JX, Fu YC, Zheng XH, et al. Construction and Identification of cDNA library of *Trichomonas vaginalis*[J]. J Shantou University Med College, 2003, 16: 198-200. (in Chinese) (章家新, 傅玉才, 郑晓虹, 等. 阴道毛滴虫 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. 汕头大学医学院学报, 2003, 16: 198-200.)
- [3] Zhang KH, Fu YC, Zhang JX, et al. Cloning and sequence analysis of *Trichomonas vaginalis* ageing-related gene *Tv-Sir2-like*[J]. J Shantou Univer Med College, 2004, 17: 132-235. (in Chinese) (张可浩, 傅玉才, 章家新, 等. 阴道毛滴虫衰老相关基因 *Tv-Sir2-like* 克隆与序列分析[J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17:132-135.)
- [4] Chang KT, Min KT. Regulation of lifespan by histone deacetylase

[J]. Ageing Res Rev, 2002, 1: 313-326.
 [5] Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic *Sir2-like* proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273: 793-798.
 [6] Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein *Sir2* is an NAD-dependent histone dea-

cetylase[J]. Nature, 2000, 403(6771): 795-800.
 [7] Smith J. Human *Sir2* and the 'silencing' of p53 activity[J]. Trends Cell Biol, 2002, 12: 404-406.
 (收稿日期:2005-09-05 编辑:盛慧锋)

(上接第 203 页)

微小按蚊 (*Anopheles minimus*) 是西太平洋地区和我国南方山区重要传疟媒介。微小按蚊是种复合体, 至少存在 A、C、E 等 3 个姐妹种^[1-3]。经杂交试验证明, 广西与云南微小按蚊存在部分生殖隔离^[7]。迄今, 对微小按蚊多线染色体的研究, 只有 Kanda 等^[4]描述的日本 ISG 株及泰国 KCH-1 和 KCH-2 株唾液腺多线染色体和石裕明等^[5]描述的广西微小按蚊卵巢营养细胞多线染色体谱。关于云南微小按蚊卵巢多线染色体的研究, 迄今几乎是空白。对于我国广西与云南微小按蚊多线染色体的差异情况, 还不清楚。本研究描述云南微小按蚊卵巢多线染色体图谱, 并与广西微小按蚊作相应比较, 旨在染色体水平上揭示这两种微小按蚊的差异及鉴别标志。

1 材料与方 法

1.1 微小按蚊采集与驯养 微小按蚊于 2000 年 7 月 26 日~8 月 1 日采自云南省元江县甘庄农场, 按文献^[6]的方法饲养, 建立实验室品系。

1.2 试剂 15%、45%乙酸固定液、2%乳酸醋酸地衣红染色液、聚苯乙烯封片剂等, 均为上海试剂一厂生产。

1.3 卵巢营养细胞多线染色体的制备与观察 取发育良好, 羽化 3 d 的雌蚊 500 只, 喂豚鼠血后在 26℃、相对湿度 80% 的条件下饲养 28~32 h (卵巢发育至克氏 III 期), 解剖分离卵巢营养细胞, 参照文献^[5]制备卵巢营养细胞多线染色体, 光学显微镜 (BH-2 型, 日本 OLYMPUS 公司) 下观察, 拍照记录各染色体图谱。参照文献^[4, 5]方法, 利用明显的暗带作为标志进行分段, 逐区段与文献^[5]报道的广西微小按蚊多线染色体图谱作比较。

2 结 果

共观察云南微小按蚊卵巢营养细胞多线性染色体标本 365 个, 其中有约 300 个染色体伸展良好、带型清晰、染色适中。云南微小按蚊的卵巢营养细胞多线性染色体也由 5 臂组成, 分区结果与广西微小按蚊相似。I 号染色体为 1 条具端着丝点的性染色体 (X 染色体), 仅见 1 臂; II 号为 1 对具亚中着丝点的常染色体, 分右臂 (2R) 和左臂 (2L), III 号为 1 对具中着丝点的常染色体, 含右臂 (3R) 和左臂 (3L)(图 1)。

3 讨 论

蚊类多线染色体观察是细胞遗传学研究的一项重要内容。多线染色体区带的不同, 在一定程度上反映出遗传基因上的差异。对蚊虫的分类具有参考意义。

广西(凌云)微小按蚊与云南(思茅)微小按蚊实验品系之间通过杂交试验已被证实为不同姐妹种^[7]。随后作者也对本研究中的云南(元江)和广西(凌云)微小按蚊进行了杂交试验, 结果证明是两个不同的种 (另文发表)。1990 年, 石裕明等^[5]描述了广西微小按蚊卵巢营养细胞多线染色体。而云南微小按蚊卵巢营养细胞多线染色体图谱迄今尚未见报道。作者按照参考文献^[5]方法制备卵巢营养细胞多线染色体标本, 并对染色体的每一区段进行比较观察。结果发现云南微小按蚊卵巢营养细胞多线染色体也是由 5 臂组成, 染色体上的各区段与广西微小按蚊相似, 这佐证了两者具有密切的亲缘关系。但经过对各区段的逐一比较, 发现 5 臂染色体在 1A、7A、16A、21C、24A、24B、29A、30B、31B、32A、37D 和 42A 等区段存在较明显的差异。尤其是, 1A: 云南微小按蚊为泡

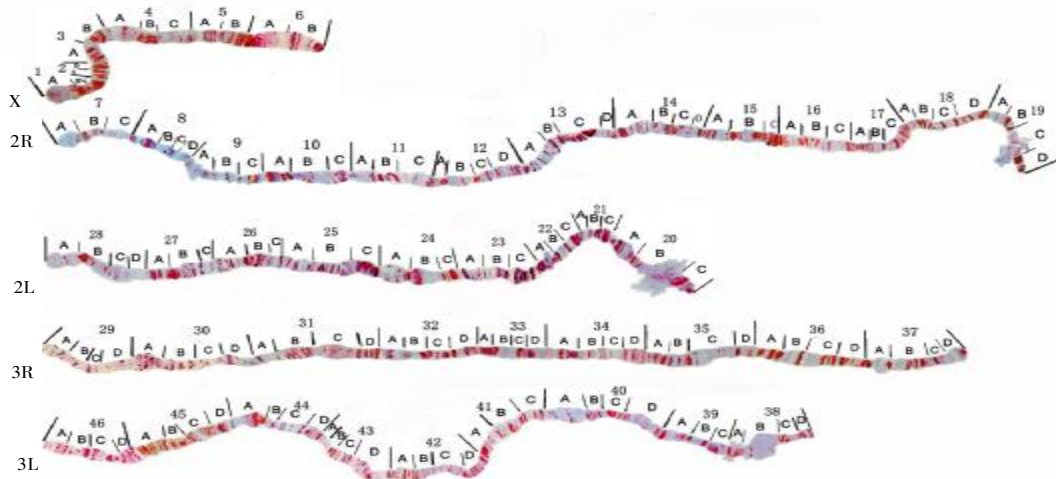


图 1 云南微小按蚊卵巢营养细胞多线染色体图谱