

【论著】

文章编号:1000-7423(2003)-01-0034-03

# 猪囊尾蚴线粒体 NADH 脱氢酶的基因克隆

张莉 刘殿武\*

**【摘要】** 目的 研究猪囊尾蚴线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 基因的结构特点。方法 提取猪囊尾蚴 mRNA, 反转录合成 cDNA, 构建 cDNA 文库。用兔抗囊尾蚴抗血清筛选文库, 得到阳性克隆, 将其亚克隆到 pBluescript SK 质粒中测序, 并与 GenBank 中核苷酸序列进行同源性分析。结果与结论 3 次筛选得到 1 个阳性克隆, 其长度为 1 082 bp。其中 1~578 bp 为开放阅读框, 编码猪囊尾蚴线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 的 192 个氨基酸残基, 579~1 082 bp 为 tRNA-Asn, tRNA-Ile 与 tRNA-Pro 的基因编码区。

**【关键词】** 猪囊尾蚴; cDNA 文库; NADH 脱氢酶

中图分类号: R383.34

文献标识码: A

## Cloning and Characterization of Mitochondrial NADH Dehydrogenase Gene of *Cysticercus cellulosae*

ZHANG Li, LIU Dian-wu\*

(Department of Epidemiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**【Abstract】 Objective** To clone and characterize the NADH1 gene of *Cysticercus cellulosae*. **Methods** A cDNA library was constructed from *Cysticercus cellulosae* and was immunoscreened by using rabbit anti-*Cysticercus cellulosae* polyclonal antibody. The gene structure and its possible function were analyzed by comparing with sequences available in the GenBank, after the insert of positive clone was subcloned and the nucleotide sequence of the insert was determined by dideoxynucleotide chain termination method. **Results and Conclusion** A cDNA clone (named TS5) with a length of 1 082 bp was isolated. The 5' terminal of cloned gene contained one open reading frame of 1-578 bp encoding 192 amino acid residues of mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1 and the 3' terminal contained three kinds of tRNA genes.

**【Key words】** *Cysticercus cellulosae*, cDNA library, NADH dehydrogenase

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. 397262)

\* Correspondence author, E-mail: liudianw@hebm. edu. cn

猪囊尾蚴病在世界范围内广泛流行。血清学调查结果显示: 河南省尉氏县居民囊尾蚴抗体阳性率为 1.02%<sup>[1]</sup>; 云南省为 11.28%, 而兰坪县猪带绦虫感染者则高达 61.03%<sup>[2]</sup>。神经型囊尾蚴病是继发性癫痫的主要诱因。目前 CT、MRI 等对该病的检查、确诊可靠性不高, 且操作程序繁琐, 价格昂贵。因此, 寻找简捷、准确、高效的诊断方法势在必行。孙树汉等<sup>[3]</sup>构建了猪囊尾蚴 cDNA 文库, 并从中筛选出可用于诊断的抗原基因。为从基因水平深入研究猪囊尾蚴特性, 本研究构建了猪囊尾蚴 cDNA 文库, 并从中克隆出线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 的基因。

### 材料与方 法

#### 1 猪囊尾蚴的采集

基金项目: 河北省自然科学基金(No. 397262)  
作者单位: 河北医科大学流行病学教研室, 石家庄 050017  
\* 通讯作者 E-mail: liudianw@hebm. edu. cn

从石家庄地区自然感染的猪肉组织中摘取囊尾蚴, 用灭菌的生理盐水和蒸馏水各洗两次, 液氮保存备用。

#### 2 cDNA 文库的构建和筛选

2.1 cDNA 文库的构建 用 Stratagene 公司的 cDNA 合成试剂盒, 以 Oligo (dT) 引物反转录合成构建 cDNA 文库<sup>[4]</sup>。

2.2 多克隆抗体的制备 自液氮中取猪囊尾蚴 150 mg, 加入 Tris-HCl 1.8 ml, 冰浴中匀浆, 15 000 g 4 ℃ 离心 30 min, 吸取上清测定蛋白含量<sup>[5]</sup>。取 2 ml (约 3.6 mg 抗原) 抗原溶液与适量福氏完全佐剂充分乳化, 皮下多点免疫纯种日本大耳白兔。2 wk 后加强免疫 1 次, 4 wk 后抽血测定抗体效价。颈总动脉放血, 分离血清作为多克隆抗体应用。

2.3 cDNA 文库的免疫筛选 取 10<sup>4</sup> pfu 噬菌体加入过夜培养大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 株中, 37 ℃ 孵育 15 min, 铺平板。42 ℃ 培养 3.5~4 h, 以浸有 10

mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG) 的醋酸纤维素滤膜铺于噬菌斑上, 37 °C 2 h 诱导大肠杆菌 β-半乳糖苷酶基因 (lacZ) 表达蛋白质。非对称标记后, 取下膜以 0.5% 脱脂奶粉-TBS 封闭 1 h, 加入第 1 抗体 (兔抗囊尾蚴多克隆抗体), 室温振荡过夜。次日, 以 0.05% 聚山梨酸 20-TBS 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的第 2 抗体 (羊抗兔抗体) 室温振荡 1 h, TBS 液洗膜后加 3 mg/ml 4-氯-1-萘酚甲醇底物显色。按上述过程再进行两次筛选。

### 3 阳性克隆噬菌体质粒的环化

取过夜培养 XL1-Blue MRF' (OD<sub>600nm</sub>=1.0) 200 μl 与阳性克隆噬菌体 (>10<sup>8</sup> pfu) 250 μl 和辅助噬菌体 (ExAssist helper phage) (>10<sup>8</sup> pfu) 1 μl 混匀, 37 °C 孵育 15 min, 加入 3 ml LB 液体培养基, 37 °C 强烈振荡 3 h, 转入 65~70 °C 水浴中 20 min, 之后室温 1 000 g 离心, 取上清 1 ml 适当稀释, 加入过夜新培养的大肠杆菌 SOLR 株 200 μl, 37 °C 孵育 15 min, 铺 LB-Amp 平板, 37 °C 过夜培养。

### 4 插入物的鉴定

4.1 酶切法 按小量碱裂解法提取重组质粒, 并分别以 *Kpn* I 与 *Bam*H I 分步酶切, 37 °C 保温 2 h, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 检测插入片段长度。

4.2 PCR 法 按 cDNA 插入片段上、下游通用引物序列合成的引物为:

Primer 1: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

Primer 2: 5'-GTAATACGACTCATAGGGC-3'

浓度为 10 pmol/L, 反应体系为 20 μl。94 °C 变性 5 min, 加入 Taq DNA 聚合酶, 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 28 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证插入片段长度。

### 5 cDNA 序列测定

应用上述上、下游通用引物, 以双脱氧核苷酸末端终止法利用 Taq DNA 聚合酶的双脱氧末端循环 (Taq dye deoxy terminator cycle) 测序试剂盒 (购自 Applied biosystems, Inc. CA) 测定 cDNA 核苷酸序列。采用 BLAST 程序与 GenBank 中登录的基因序列进行同源性分析。在 Macintosh LC630 微机上应用 GENETYX 软件分析 cDNA 编码核苷酸序列。

## 结 果

### 1 阳性克隆的免疫筛选

以自制兔抗猪囊尾蚴多克隆抗体为第 1 抗体, 辣

根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体为第 2 抗体, 对 cDNA 文库进行免疫筛选。经过 3 次筛选, 得到 1 个阳性克隆 (TS5)。

### 2 阳性重组子的鉴定

在 helper phage 的辅助下, 阳性克隆 cDNA 片段插入 pBluescript SK 质粒的 *Eco*R I 和 *Cho* I 位点之间。阳性克隆质粒 DNA 经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切处理后, 插入片段的长度约为 1 100 bp (图 1)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳可见在 1 100 bp 附近有特异性扩增条带 (图 2)。

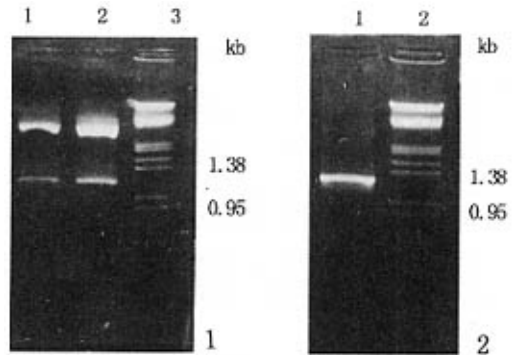


图 1 TS5 限制性酶切结果 1, 2 *Bam*H I、*Xho*I 双酶切结果 3 DNA 标志物 图 2 TS5 的 PCR 结果 1 试样 2 DNA 标志物

Fig. 1 Restriction analysis of TS5 1, 2 Restriction result of TS5 3 Marker Fig. 2 PCR amplified result of TS5 1 Sample 2 Marker

### 3 序列分析

测序结果表明, TS5 片段长度为 1 082 bp (图 3, 基因库登录号 AF338626), 经 GenBank 同源性检索提示, 其中 1~578 bp 的 578 个碱基为开放阅读框, 编码线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 的 192 个氨基酸残基; 579~1 082 bp 片段内相间排列有 tRNA-Asn、tRNA-Ile 和 tRNA-Pro 的基因。TS5 的 3' 端有 poly (A) 尾巴, 但未见 poly (A) 信号。

3.1 TS5 核苷酸序列同源性分析 采用 BLAST 程序将 TS5 在 GenBank 中进行同源性检索, 结果显示 75~545 bp 核苷酸序列与绦虫属线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 的基因序列存在高度同源性。与 *T. solium* (AJ239107)、*T. saginata* (AJ239106)、*T. multiceps* (AJ239104) 及 *T. ovis* (AJ239103) 的 2~365 bp 片段的同源性依次为 97%、86%、84% 及 86%。

3.2 TS5 氨基酸序列同源性分析 应用 GENETYX 软件推导出 TS5 cDNA 编码的氨基酸序列见图 3。将 75~545 bp 核苷酸序列所编码的 157 个氨基酸, 用 BLASTX 程序在 GenBank 中进行氨基酸同源性检索,

结果: 与 *T. solium*、*T. saginata*、*T. ovis* 及 *T. multiceps* 的同源性依次为 77%、71%、70% 及 68%。

```

CTTTTATATATAGGGGAACGTAAGATTTTGGGTATTCTCAATTTCTGAAGCGTCTA 60
FFILGERKILGYSQFRKGN
ATAAGTTGGTATTGAGGATTTACAAAGGTTTCTGATTTATTAAGTTGATAATTA 120
KVGIVGLLQRFSDLLKLIK
AGTTAAGAATTTGGATTTACAGAGCTAGTGACTGGTTGTTTCCGGTTATGTTGT 180
FKNCGFQSRSWVGLPGVMLL
TGCTTAGTTAGTTATTTATTCATTTGTATATGGTGGTTATTAAGCTATAGGTTTA 240
VSLVIYYSFVYGGYRYRFRN
ATTCCTCTCTTGTGTATGGTTTTGGTTATAACTAGATTTGTAGTTATTCGATATAT 300
SLSLLWFLVITRPFCSYSILC
GTACGGGTTGAGGTATTATAAAGTTATCGTTTTAAAGTTCAATTCGTTGCTTTTA 360
TGWGGSYKSYSLFSSIRCAFR
GGCTATAAGGTTGAGGCTGTTTTATCAGATTATAATATTTACTGCATTCGTTATT 420
SIRFEACFMSSIIFP T A L C Y C
GTAGATATAATTTGGTGGATTTTTTTATGACTGGTTGGTTGCTTTATAATTTTTCTT 480
RYNLVYDFMWSGWLSPFIIFPC
GTATTTAGTTATTTATCTCATATGTATATTTGGTGAACATAATGCTCCATTTGAT 540
ILVIYLCILCE T N R P F D Y
ATGGTGAGGCTGAGAGAGGTTAGTTAGTGGGATTTAAAGTTGACTATAAAGCTATAT 600
GEAERELVSGI*
TTTACGTTGTTGTTGGGTGGAATATAATAATATTTGTTTTTCATGATTAGGTATG 660
ATATTGATTTTGGTGGCGGCTTATTGGTAGTGTGTTTTTATCATTTTTGTTGATTTT 720
tRNA-Asn
TTTTATGTGGGCTCGGGCTACATTTGCCACGTGTTGCTATGATTAATTTTGAATTTTT 780
tRNA-Ile
TTGGGAAGTGTGTTGTTTTTGTGATTTTAAGGTTTTTTCTATCATAAAAAGTCTATA 840
TAGATTATTTTTAAATCGTGATCTGTTAACTTCAGCAAAATGGTTGTATACCAATTATAG 900
tRNA-Pro
CGAAGTGTATGTTCTTATCTAGTTTAATTAAGAATAAAGATTTTGGGATCTTTGG 960
TCTCAATTTGAGAGATTTAGAGTTAATAGGGCTGCATTAACAGGCTCACTTTGATATAG 1020
GAAATCGAATTTGATATTCGGTTAATATGATGTGTATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAA 1080
AA 1082

```

图 3 TS5 的核苷酸测序结果及推导出的氨基酸序列 \* 为终止密码 划底线为 tRNA 基因  
Fig. 3 The nucleotide sequence and its deduced amino acid sequence of TS5 \* Asterisk shows stop codon Underline: tRNA genes

### 讨 论

本研究克隆的基因全长为 1 082 bp, 经同源性检索, 1~578 bp 的核苷酸序列为猪囊尾蚴线粒体 NADH 脱氢酶亚单位 1 的基因片段, 其中 75~545 bp 片段与 *T. saginata*、*T. multiceps*、*T. ovis* 的 NADH 脱氢酶亚单位 1 相应片段存在高度同源性; 579 bp 下游序列为 tRNA-Asn、tRNA-Ile、tRNA-Pro 的基因编码区。

TS5 5' 端缺少转录起始密码子 ATG 或者 GTG (多见于寄生虫线粒体中)。因此, 认为 5' 端是不完整的。3' 端的终止密码子为 TAA。由于线粒体基因的突变速率较快, 其三联轴密码子往往有别于核基因组, 这在动物的线粒体中尤为突出。尽管多种动物蛋白基因以 TAG 为终止密码子, 但 TAA (或 TA、T) 在 *Taenia* 和 Mammalia、Echinodermata、*Drosophila*<sup>[6]</sup> 和 *Annelida*<sup>[7]</sup> 等动物线粒体蛋白基因中也有很高的使用频率。TS5 基因中 (A+T)% 高达 71.3%, 属 A-T

型, 许多关于动物 mtDNA 的研究中均有提及<sup>[6,7]</sup>。开放阅读框中 T 的高频出现, 对密码子的类型影响明显。分析 192 个氨基酸的序列, 至少含有两个 T 的密码子共 100 个, 占总数的 52%, 而 TTT (phe) 占氨基酸总数的 10.4% (20/192)。就氨基酸组成来看, 192 个氨基酸中疏水性氨基酸占绝大部分比例, 这与 Mahler (1974) 报道相符。TS5 的 724~763 bp、830~884 bp 和 944~1048 bp 与 *E. multilocularis* (NC-000928) 的 tRNA-Asn、tRNA-Ile、tRNA-Pro 基因的相似性分别为 87%、92% 和 85%, 且排列次序与其一致, 推断为猪囊尾蚴线粒体的 tRNA-Asn、tRNA-Ile、tRNA-Pro 基因。大量研究证明, 在多种生物线粒体基因中, tRNA 基因多成簇存在并与蛋白质编码基因相间排列<sup>[6-8]</sup>, mRNA 转录后的断裂即发生在这些基因的前方或后方。TS5 的 3' 末端有 poly (A) 尾巴, 但未发现 poly (A) 信号。

有关 NADH 脱氢酶亚单位 1 基因的特点, 国外已有报道, 但长度仅为 453 bp。TS5 虽然 5' 端不完整, 但根据与 *E. multilocularis* 的同源性比较结果推断, 所缺长度应该不会太长。本实验首次克隆得到了 1 082 bp 的包含 NADH 脱氢酶亚单位 1 和 3 个 tRNA 的基因序列, 为进一步获得猪囊尾蚴线粒体的全基因序列奠定了基础。

### 参 考 文 献

[1] 王中全, 马云祥, 崔晶, 等. 河南省尉氏县人群囊虫病血清流行病学调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12: 236-237.

[2] 王会珍, 张皓明, 张丽丽, 等. 云南普米族居民囊虫病血清流行病学调查[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997, 10: 306-309.

[3] 孙树汉, 王俊霞, 陈蕊雯, 等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15: 15-20.

[4] 张莉, 史宇晖, 刘殿武, 等. 猪囊尾蚴 cDNA 文库的构建[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13: 190-192.

[5] 赵巍, 苏川, 吴海玮, 等. 日本血吸虫(中国大陆株) 22.6 kDa 重组抗原的免疫原性研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(3): 24-27.

[6] de Bruijn MHL. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code[J]. Nature, 1983, 304: 234-241.

[7] Boore JL, Brown WM. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*[J]. Genetics, 1995, 141: 305-319.

[8] Jacobs HT, Elliott DJ, Math VB, et al. Nucleotide sequence and gene organization of sea urchin mitochondrial DNA[J]. J Mol Biol, 1988, 202: 185-217.

(收稿日期: 2002-01-30 编辑: 庄兆农)