

【研究简报】

文章编号: 1000-7423(2009)-01-0091-03

细粒棘球绦虫原头蚴和成虫发育调控基因 Ras GTPase 的克隆及序列分析

吕国栋, 王俊华, 卢晓梅, 温浩, 林仁勇*

【摘要】 应用 RT-PCR 方法分别从新疆株细粒棘球绦虫原头蚴和成虫中克隆出 Eg Ras GTPase 基因, 分别命名为 Eg Ras-pro (GenBank 登录号为 EU560397) 和 Eg Ras-adult (GenBank 登录号为 EU560398)。生物信息学分析表明两者 cDNA 长度均为 552 bp, 编码 184 个氨基酸, 等电点 (pI) 为 6.54, 彼此间仅有 2 个碱基和 1 个氨基酸的差别。同源性比对分析结果显示, Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 与多房棘球绦虫 Ras (EmRas) 基因的同源性分别高达 98.4% 和 98.9%; 与其他种类的寄生虫、酵母、果蝇及人类的 Ras GTPase 基因的同源性为 53.9%~78.8%。进化树分析发现 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 与 EmRas 和血吸虫 Ras (SmRas) 相聚。本研究首次从新疆株细粒棘球绦虫两个发育阶段 (原头蚴和成虫) 中克隆出 Eg Ras GTPase 基因, 其序列具有较高的保守性。

【关键词】 细粒棘球绦虫; Ras GTPase; 序列分析

中图分类号: R383.33 文献标识码: B

Molecular Cloning and Characterization of Ras-Homologues from Different Developing Stages of *Echinococcus granulosus*

LV Guo-dong, WANG Jun-hua, LU Xiao-mei, WEN Hao, LIN Ren-yong*

(Key Laboratory of Xinjiang Hydatid Institute, The First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 The Ras GTPase gene from protoscolex and adult worm of *Echinococcus granulosus* in Xinjiang were cloned by RT-PCR and named as Eg Ras-pro (GenBank No. EU560397) and Eg Ras-adult (GenBank No. EU560398). Sequence analysis showed that each gene had 552 bp, coding 184 aa with an pI of 6.54. Bioinformatics analysis revealed that Eg Ras-pro and Eg Ras-adult had 98.4% and 98.9% homology to *Echinococcus multilocularis* Ras and 53.9%~78.8% homology to other species. Phylogenetic analysis showed that Eg Ras-pro and Eg Ras-adult clustered with EmRas and SmRas. The data indicated that EgRas GTPase has been expressed from protoscolex and adult worm of *Echinococcus granulosus*, and both are highly conservative.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Ras GTPase; Sequence analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30760228, 30860253)

* Corresponding author, E-mail: renyongl@yahoo.com.cn

棘球蚴病 (俗称包虫病) 是棘球绦虫的幼虫寄生所致的一种严重的人兽共患寄生虫病。我国是棘球蚴病发病较高的国家之一, 该病严重影响我国西部农、牧民身体健康^[1]。棘球蚴病分为囊型棘球蚴病 (cystic echinococcosis, CE) 和泡型棘球蚴病 (alveolar echinococcosis, AE) 两种, 分别由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 和多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*, Em) 寄生于人体所致。细粒棘球绦虫和多房棘球绦虫在卵、原头蚴、成虫等各时期均具有较相似的形态结构, 但它们在中间宿主体内的生长发育模式及致病程度

却大不相同。

Ras 基因是一种生长发育调控基因, 属于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 由于在传递细胞生长分化信号方面起重要作用而广泛存在于滴虫^[2]、线虫^[3]、果蝇^[4]、哺乳动物^[5]等多种生物中。Spiliotis 等^[6-8]从多房棘球绦虫原头蚴中克隆出多种 MAPK 信号通路样基因, 如 Em Ras GTPase、EmMPK1、Em p38 等, 发现它们在多房棘球绦虫幼虫的发育过程中具有重要作用并可能成为治疗 AE 的药物作用靶点。由于细粒棘球绦虫与多房棘球绦虫在各方面均具有较大的相似性, 本研究从细粒棘球绦虫的不同发育阶段 (原头蚴和成虫) 中克隆 Ras GTPase 基因, 为进一步研究 Ras GTPase 在细粒棘球绦虫发育过程中的分子调控机制及判断其能否成为新的药物作用靶点奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30760228, 30860253)

作者单位: 新疆医科大学第一附属医院新疆包虫病基础医学重点实验室, 乌鲁木齐 830054

* 通讯作者, E-mail: renyongl@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 新疆株细粒棘球绦虫原头蚴及成虫由本室提供。引物由上海捷瑞生物有限公司合成。Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自美国 Promega 公司。克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶、DNA 标志物均购自日本 TaKaRa 公司。

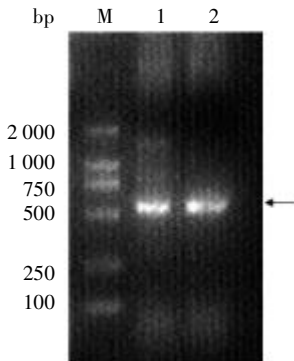
1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成 按照 Trizol 使用说明提取细粒棘球绦虫原头蚴和成虫总 RNA。以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 反应体系为: RNA 2 μg, Oligo (dT) 20 1 μl, 5×缓冲液 (Buffer) 2 μl, 10 mmol/L 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 1 μl, 反转录酶(reverse transcriptase) 0.5 μl, RNA 酶抑制剂 (RNase inhibit) 0.5 μl, 焦磷酸二乙酯 (DEPC) 水补齐至 10 μl, 42 °C 孵育 60 min 后, 99 °C 加热 5 min 终止反应, -20 °C 保存备用。

1.3 细粒棘球绦虫原头蚴和成虫 Ras 基因的克隆 参照文献 [7] 合成上下游引物 (Ras-5PR-mod: 5'-CTG CCT GAG TAC AAA CTC G-3', Ras-3PR-mod: 5'-GAG CAG ATG GCA TTT CCT CTT G-3'), 以细粒棘球绦虫不同发育阶段 (原头蚴和成虫) 的 cDNA 为模板, 扩增目的基因, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段, 克隆至 pMD18-T 载体, 经转化、酶切鉴定后, 送上海生工生物有限公司和上海捷瑞生物有限公司测序。

1.4 细粒棘球绦虫原头蚴和成虫 Ras 基因序列同源性分析及功能预测 利用 DNAMAN5.0 软件及 GenBank/BLAST 的序列局部比对查询工具 (Basic Local Alignment Search Tool), 网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 功能对序列进行生物信息学分析, 并与其他种类的寄生虫、酵母、果蝇及人类的 Ras GTPase 基因进行同源性比对和进化分析。

2 结果

2.1 细粒棘球绦虫原头蚴和成虫 Ras 基因的克隆及鉴定 从细粒棘球绦虫原头蚴和成虫中均扩增出约为 550 bp 的目的条带, 与预测结果一致 (图 1), 表明 Ras 基因在原头蚴和成虫中均有表达, 分别命名为 Eg Ras-pro 基因 (原头蚴阶段) 和 Eg Ras-adult 基因 (成虫阶段)。

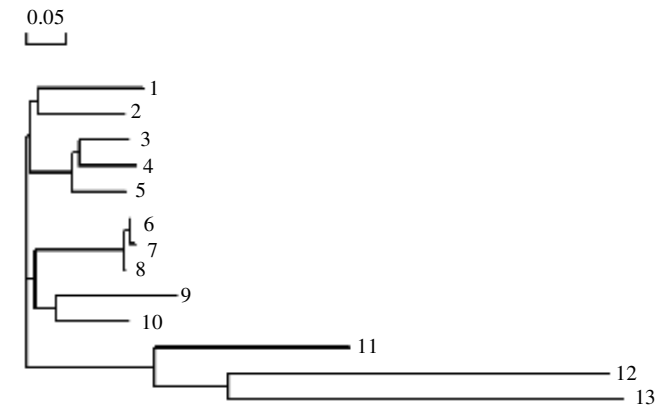


M: DNA 标志物 (DL 2000), 1: 原头蚴, 2: 成虫。

图 1 从细粒棘球绦虫原头蚴和成虫中 PCR 扩增 Ras GTPase 基因

2.2 细粒棘球绦虫原头蚴和成虫基因序列的测定及分析 测序结果显示 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 基因长度均为 552 bp, 编

码 184 个氨基酸, 蛋白质相对分子质量为 M_r 21 000, 等电点 (pI) 为 6.54, Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 间同源性高达 99.64%, 仅有 2 个碱基和 1 个氨基酸的差别。BLAST 结果表明 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 为两条新的 Ras 基因序列, GenBank 登录号分别为 EU560397 和 EU560398。同源性比对结果表明, Eg 的 Ras-pro 氨基酸序列与 EmRas 的同源性高达 98.4%, 仅有 10 个碱基和 3 个氨基酸的差别, 与曼氏血吸虫同源性为 78.8%, 与其他种类的寄生虫、线虫、酵母、果蝇和人类同源性为 53.9%~77.8%; Eg Ras-adult 与 EmRas 同源性高达 98.9%, 与曼氏血吸虫同源性为 79.9%, 与其他种类的寄生虫、酵母、果蝇和人类同源性为 54.4%~78.8%。生物信息学分析表明, Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 均具有小 GTP 结合蛋白家族所特有的一些高度保守的结构域, 包括 G-1 区 (负责结合 GTP 或 GDP 的 α 和 β 磷酸集团)、G-2 区 (感受 GTP 结合时构象的变化)、G-3 区 (结合 γ 磷酸集团和催化 Mg^{2+} 离子)、G-4 区 (结合鸟嘌呤环) 和 G-5 区 (负责 GTP 或 GDP 结合的稳定性)。Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 与其他种类的寄生虫、线虫、酵母、果蝇和人类的 G-1 区、G-2 区、G-3 区、G-4 区和 G-5 区氨基酸序列相似性分别为 84.6%~100%、100%、100%、62.5%~100% 和 66.7%~100%。从进化树结果可看出, Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 与寄生虫来源的 EmRas 和 SmRas (曼氏血吸虫) 相聚集 (图 2), 提示 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 序列高度保守。



1: 线虫, 2: 果蝇, 3: 人 H-Ras, 4: 人 K-Ras, 5: 人 N-Ras, 6: 细粒棘球绦虫成虫, 7: 细粒棘球绦虫原头蚴, 8: 多房棘球绦虫, 9: 日本血吸虫, 10: 曼氏血吸虫, 11: 酵母, 12: 阴道毛滴虫 C-ras, 13: 阴道毛滴虫 R-ras。

图 2 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 与血吸虫、线虫、果蝇、人类和酵母 Ras 亚家族的系统进化树

3 讨论

Ras 亚家族基因是 MAPK 信号通道的关键基因, 在真核细胞的增殖、发育和信号转导过程中起重要作用^[9], 线虫^[3]、果蝇^[4]、多房棘球绦虫^[6]、海胆^[10]和血吸虫^[11]等生物中均存在 Ras 亚家族蛋白。由于 Ras GTP 酶在多种生物模式系统里具有参与细胞信号传导的重要功能, 因此是研究细粒棘球绦虫成囊和成虫双向发育及其信号转导的很好的候选分子。

本研究首次从细粒棘球绦虫原头蚴和成虫两个发育阶段中克隆出 Ras 基因, 同源性分析发现 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult

基因与多房棘球绦虫的 Ras GTPase 基因 EmRas 同源性最高, 与血吸虫、线虫、果蝇和人类等物种来源的 Ras GTPase 也具有较高的同源性而与酵母来源的 Ras GTPase 相似性较低; 生物信息学分析显示 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 均具有 G1、G2、G3、G4 和 G5 的功能区域, 且功能区域序列差异较小, 氨基酸的变化多集中于其 C 端, Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 的 C 端有一个与 EmRas 相同的 canonical prenyl-group 结合域 (C181-HLL), 表明 Ras GTPase 基因是一个在进化上相当保守的基因, 本研究克隆到的 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 基因是 Ras 基因家族中的两个新成员。由于 Ras 家族成员与细胞有丝分裂、细胞骨架调控和发育调控均有关^[5], 并有证据显示 EmRas 可能参与了多房棘球绦虫的发育, 因此推测 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 基因可能参与细粒棘球绦虫的发育调控; 另外, 细粒棘球绦虫在中间宿主体内寄生于肝脏, 并发育成为囊型结构, 而在终末宿主体内发育为成虫, 显示出截然不同的发育模式和形态特征, 推测 Eg Ras-pro 和 Eg Ras-adult 也参与细粒棘球绦虫的成囊和成虫这两种不同的发育模式, 但其具体功能尚有待进一步研究。

致谢 本研究得到新疆医科大学第一附属医院医学研究中心李亮、贾海英、刘辉、王星、刘涛、纪静、段新宇等同志的大力帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- [1] Shi DZ. The geographical distribution of cystic echinococcosis in China[J]. End Dis Bull, 2000, 15(1): 74-75. (in Chinese)
(史大中. 中国囊性包虫病的地理分布[J]. 地方病通报, 2000, 15(1): 74-75.)
- [2] Xu MY, Fu YC, Liu JL, et al. Molecular cloning and characterization of a RRas homologue gene from *Trichomonas vaginalis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(3): 215-218. (in Chinese)
- [3] Moghal N, Sternberg PW. The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*[J]. Exp Cell Res, 2003, 284(1): 150-159.
- [4] Rebay I. Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*[J]. Dev Biol, 2002, 251(1): 1-17.
- [5] Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPase [J]. Sci STKE, 2004 (250): RE13.
- [6] Spiliotis M, Tappe D, Brückner S, et al. Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2005, 139(2): 225-237.
- [7] Spiliotis M, Konrad C, Gelmedin V, et al. Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor[J]. Int J Parasitol, 2006, 36 (10-11): 1097-1112.
- [8] Gelmedin V, Caballero-Gamiz R, Brehm K. Characterization and inhibition of a p38-like mitogen-activated protein kinase (MAPK) from *Echinococcus multilocularis*; Antiparasitic activities of p38-MAPK inhibitors[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(9): 1068-1081.
- [9] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen activated protein kinase signaling pathways[J]. Curr Opin Cell Biol, 1999, 11(2): 211-218.
- [10] Rottinger E, Besnardeau L, Lepage T. A Raf/MEK/ERK signaling pathway is required for development of the sea urchin embryo micromere lineage through phosphorylation of the transcription factor Ets[J]. Develop, 2004, 131(5): 1075-1087.
- [11] Kampkotter A, Ridgers I, Johnston DA, et al. *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of the Ras homologue[J]. Exp Parasitol, 1999, 91(3): 280-283.
(收稿日期: 2008-08-14 编辑: 高石)
- (上接第 90 页)
- [7] Li CP, Wu QW. The acaroid mites in house and storage foods [M]. Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1996; 1-326. (in Chinese)
(李朝品, 武前文. 房舍和储藏物粉螨[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1996; 1-326.)
- [8] Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, et al. Dust mite allergens and asthma; report of a second international workshop[J]. J Allergy Clin Immunol, 1992, 89(5): 1046-1060.
- [9] Li ZJ, Paeporn P, Srisurapat A, et al. Preliminary study of house-dust mite fauna in three cities in Guangxi[J]. Guangxi Prev Med, 1996, 2(5): 260-263. (in Chinese)
(李志军, Paeporn P, Srisurapat A, 等. 广西 3 市尘螨种群分布初步调查[J]. 广西预防医学, 1996, 2(5): 260-263.)
- [10] Tsai JJ, Wu HH, Shen HD, et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthmatic patients in Taiwan[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1998, 115(2): 144-149.
- [11] Arlian LG, Morgan MS, Neal JS. Dust mite allergens; Ecology and distribution[J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2002, 2(5): 401-411.
- [12] Pavlica TZ, Oosting AJ, Terreehorst I, et al. Differential effect of mattress covers on the level of Der p1 and Der f 1 in dust [J]. Clin Exp Allergy, 2004, 34(9): 1444-1447.
- [13] Suto C, Sakaki I, Itoh H, et al. Influence of floor levels on the prevalence of house-dust mites in apartments in Nagoya, Japan[J]. Jpn J Sanit Zool, 1992, 43(4): 307-318.
(收稿日期: 2008-04-28 编辑: 杨频)