

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0095-07

【论著】

华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基的组织 and 亚细胞定位

胡旭初¹, 周红娟^{1,2}, 胡凤玉¹, 马长玲^{1,3}, 赵俊红¹, 黄灿¹, 郑小凌¹, 徐劲¹, 余新炳^{1*}

【摘要】 目的 了解华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基 (CsATP-synt_B) 的虫体组织定位, 并以 HeLa 细胞为替代模型观察其亚细胞定位。方法 用 CsATP-synt_B 重组蛋白免疫 SD 大鼠, 取其抗血清对华支睾吸虫成虫石蜡切片进行间接免疫荧光染色, 观察 CsATP-synt_B 蛋白在华支睾吸虫成虫组织中的分布。根据生物信息学预测的 CsATP-synt_B 线粒体转运序列 (MTS 序列) 和核定位序列 (NLS 序列) 位置, 设计 4 组引物 [CsATP-synt_B 全长序列, 以及 3 个缺失突变体 (MTS-缺失线粒体转运序列、NLS-缺失核定位序列、MTS-NLS-线粒体-核定位双缺失) 引物], 扩增出全长基因和 3 个突变体基因, 构建重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰、pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰、pEGFP-N1-CsATP-synt_B^{(1-238) + (257-300)} 及 pEGFP-N1-CsATP-synt_B^{(30-238) + (257-300)}。将这些重组质粒用阳离子脂质体转染 HeLa 细胞, 48 h 后用激光共聚焦显微镜观察 CsATP-synt_B 全长基因和 3 个突变体在 HeLa 细胞的表达和亚细胞定位。结果 CsATP-synt_B 蛋白在华支睾吸虫成虫中分布较为广泛, 主要分布在腹吸盘、卵巢、卵黄腺和皮层。绿色荧光蛋白 GFP 表明 CsATP-synt_B 全长序列表达于线粒体或细胞核, 线粒体转运序列缺失突变体表达于细胞核, 核定位序列缺失突变体表达于线粒体, 双缺失突变体仅表达于胞浆。结论 CsATP-synt_B 蛋白在华支睾吸虫的分布与线粒体的分布一致, 主要集中在能量代谢较旺盛的组织部位。CsATP-synt_B 蛋白既可进入线粒体, 也可进入细胞核, 理论预测的定位序列得到证实。

【关键词】 华支睾吸虫; ATP 合酶 b 亚基; 免疫组织化学; 亚细胞定位; 靶向序列

中图分类号: R383.22 文献标识码: A

Tissular and Subcellular Localization of the ATP Synthase B Subunit in *Clonorchis sinensis*

HU Xu-chu¹, ZHOU Hong-juan^{1,2}, HU Feng-yu¹, MA Chang-ling^{1,3}, ZHAO Jun-hong¹, HUANG Can¹, ZHENG Xiao-ling¹, XU Jin¹, YU Xin-bing^{1*}

(1 Department of Parasitology, Zhongshan College of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China; 2 Rheumatology Immunology Nephrology Laboratory, Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou, 311121, China; 3 Department of Pathogenic Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182, China)

【Abstract】 **Objective** To illustrate the distribution of ATP synthase b subunit in the tissue of *Clonorchis sinensis* adult and its subcellular mimical localization in HeLa cells. **Methods** With the antiserum against recombinant CsATP-synt_B protein raised from SD rats as primary antibody, paraffin sections of the adult of *C. sinensis* were processed by the method of fluorescent immunohistochemistry to observe the distribution of CsATP-synt_B protein in adult worm. According to the prediction by bioinformatics of the definite mitochondrial targeting sequence (MTS) and probable Bipartite nuclear localization signals (NLS_BP) in CsATP-synt_B sequence, recombinant pEGFP-N1 plasmids containing the intact and three defective CsATP-synt_B sequence with single defect of MTS or NLS_BP or double defect respectively were constructed. The recombinant plasmids and the control plasmid-pEGFP-N1, pEYFP-Mito and H₂B-CFP, were transfected into the HeLa cells by Lipofectamine™ 2000 reagent and the subcellular location of the GFP fusion protein was observed with confocal microscopy. **Results** The CsATP-synt_B protein appeared to distribute all over the adult worm, especially abundant on the acetabulum, ovary, vitellarium and tegument. The intact CsATP-synt_B was definitely expressed in mitochondria and/or nucleus of infected HeLa cells, whereas the MTS-deleted mutant only in cytoplasm and nucleus, the NLS_BP-deleted mutant in mitochondria and cytoplasm, and the double defect mutant only in cytoplasm. **Conclusion** The distribution of CsATP-synt_B in adult is accord with that of mitochondria, and mainly exists in the organs

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (No. 2006AA02Z422); 广东省重大科技专项 (No. 2004A30801004); 广州市科技计划项目 (No. 2006Z3-E4011)

作者单位: 1 中山大学中山医学院寄生虫教研室, 广州 510080; 2 杭州市红十字会医院风湿免疫实验室, 杭州 310003; 3 广州医学院病原生物学教研室, 广州 510182

* 通讯作者, E-mail: yuhxteam@163.com

and the tissues of active energy metabolism. This study first predicted and confirmed that CsATP-synt_B can be expressed in the nucleus.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; ATP synthase b subunit; Immunohistochemistry; Subcellular localization; Target sequence

Supported by the Hi-tech Research and Development Program of China(No. 2006AA02Z422), the Key Science and Technology Project of Guangdong Province (No. 2004A30801004), and that of Guangzhou City (No. 2006Z3-E4011).

* Corresponding author, E-mail: yuhxteam@163.com

华支睾吸虫病是我国重点防治的人兽共患食源性寄生虫病之一。本实验室近年来从华支睾吸虫功能基因组学研究入手,系统地对华支睾吸虫基因进行鉴定和功能研究^[1],其中包括涉及华支睾吸虫物质和能量代谢方面的基因^[2-5]。已从华支睾吸虫成虫全长cDNA文库中克隆了1个ATP合酶b亚基(CsATP-synt_B)的全长编码基因,并通过生物信息学预测该蛋白具有典型的线粒体转运信号肽和可能的细胞核定位序列^[6]。本研究在对该基因进行原核重组表达并制备出特异性抗血清的基础上^[7],进一步研究CsATP-synt_B的虫体组织定位,并通过构建3个靶向序列缺失突变体基因(2个单缺失和1个双缺失)及完整基因与绿色荧光蛋白表达载体(pEGFP-N)的重组质粒,转染HeLa细胞,通过观察转染细胞荧光分布来模拟该蛋白在虫体的亚细胞定位,为进一步研究CsATP-synt_B在寄生虫能量代谢调控机制中的作用奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 文库、质粒、菌株、细胞株、抗血清来源 华支睾吸虫成虫cDNA文库由本室构建^[5]。质粒pEGFP-N1为美国Clontech公司产品。大肠埃希菌DH5α由本室保存。线粒体标志质粒pEYFP-Mito和细胞核标志质粒H₂B-CFP由美国NIH分子细胞生物学实验室刘伟博士惠赠。HeLa细胞由本室保存于极限必需培养基(DMEM)中[按常规配置含10%胎牛血清(FBS,杭州四季青公司产品)、100 U/ml青霉素、链霉素,置37℃、100%饱和湿度、5% CO₂条件培养,液氮保种]。CsATP-synt_B免疫SD大鼠的抗血清按照文献^[4]方法制备。

1.2 主要试剂 ExTaq 酶、BamH I、Xho I 和 Hind III 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶和 DNA 标志物(DL2000及DL15000)均购自日本TaKaRa公司。Alexa Fluor[®]555(橙红色荧光剂)标记羊抗大鼠IgG(H+L)(H为重链,L为轻链)为美国Molecular Probes公司产品,组织自发荧光淬灭剂(C1212)购自北京普利莱基因技术有限公司,高糖型DMEM干粉为美

国Gibco公司产品,4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)和二甲亚砜(DMSO)及胰酶均为美国Sigma公司产品。去内毒素的质粒提取试剂盒(PureLink[™] HiPure Plasmid DNA Purification Kit)、阳离子脂质体转染试剂(Lipofectamine[™] 2000)和转染液(Opti-MEM[®] I)均为美国Invitrogen公司产品。乙二胺四乙酸(EDTA)、NaCl、酚、三氯甲烷和异戊醇等均为国产分析纯。

2 方 法

2.1 间接免疫荧光法检测CsATP-synt_B在华支睾吸虫成虫组织的定位 用10%甲醛固定华支睾吸虫成虫,制作厚约4 μm石蜡切片,脱蜡,梯度乙醇逐级水化后,每张切片滴加100 μl组织自发荧光淬灭剂,室温静置30 min, PBS(pH 7.4)冲洗3次,5 min/次。10%牛血清白蛋白(BSA)-PBS 4℃封闭过夜, PBS冲洗3次,5 min/次。以抗CsATP-synt_B的免疫SD大鼠血清(1:200)为一抗, Alexa Fluor 555-羊抗大鼠IgG(H+L,1:400)为二抗,间接免疫荧光法检测抗原,倒置荧光显微镜观察并拍照。

2.2 真核细胞荧光重组质粒的构建

2.2.1 引物设计 根据生物信息学预测的CsATP-synt_B的线粒体转运序列(MTS序列)和核定位序列(NLS序列)位置^[6],设计4套引物,包括:CsATP-synt_B基因全长序列引物,以及3个缺失突变体(MTS-为缺失线粒体转运序列,NLS-为缺失核定位序列,MTS-NLS-为双缺失突变体)引物,均由上海英骏生物技术有限公司合成。引物设计示意图见图1。

CsATP-synt_B基因全长cDNA编码序列引物及3个突变体引物:

P¹: 5'-TAACTCGAGATGGCTTCGCTGTGTGGCC-3'

Xho I

P³⁰: 5'-GGACTCGAGATGCAGACAACCAGTTCAGC-3'

Xho I

P²³⁸: 5'-GGCAAGCTTGTGTACCGCACCATAAACCTG-3'

Hind III

P²⁵⁷: 5'-GGCAAGCTTACACACCTGATCAACTGGGTCC-3'

Hind III

P³⁰⁰: 5'-GAGGGATCCGAAGCGACAGCAGTACTTTTG-3'

BamH I

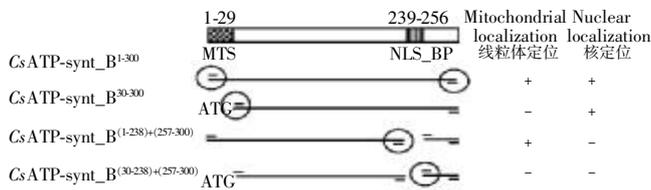


图 1 全长序列及各突变克隆对应引物设计示意图
Fig.1 Scheme of the primers for the corresponding intact or mutant sequences

2.2.2 PCR 扩增 CsATP-synt_B 全长序列和 3 个靶序列突变体片段 以华支睾吸虫成虫 cDNA 文库中 CsATP-synt_B 的克隆质粒 (Cs008f07) 为模板, 用引物 P¹ 和 P³⁰⁰ 扩增 CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 全长编码序列, 用引物 P³⁰ 和 P³⁰⁰ 扩增 MTS-缺失突变体 CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰, 用引物 P¹ 和 P²³⁸ 扩增 NLS-突变体的前 238 bp 的 CsATP-synt_B¹⁻²³⁸, 用引物 P³⁰ 和 P²³⁸ 扩增 MTS-NLS-双缺失突变体序列的前 209 bp 的 CsATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ (反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min)。用引物 P²⁵⁷ 和 P³⁰⁰ 扩增 MTS-缺失突变体和 MTS-NLS-双缺失突变体序列共有片段 CsATP-synt_B²⁵⁷⁻³⁰⁰ (反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 62 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min)。扩增产物均用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2.3 重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 和 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ 的构建 ① 将扩增产物 CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰、CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ 和 pEGFP-N1 载体分别用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 于 37 °C 水浴中反应 4 h, 回收纯化双酶切产物。② 纯化的双酶切产物和 pEGFP-N1 质粒按质量比 8:1 建立连接反应体系。于 16 °C 反应 18 h 后用于转化感受态大肠埃希菌 DH5 α , 涂布于卡那霉素抗性 LB 固体培养基平板, 于 37 °C 培养 12~16 h, 挑取单菌落加入 5 ml LB 培养液, 37 °C 280 r/min 振荡 12 h, 用质粒提取试剂盒抽提重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 和 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰。③ 鉴定阳性克隆, 是用相同的引物及反应条件对重组质粒进行 PCR 扩增; 用 PCR 扩增产物双酶切反应体系对重组质粒进行双酶切, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定; 以 pEGFP-N1 多克隆插入位点前的公用引物测序, 用全自动测序分析仪对重组质粒插入片段进行测序 (由上海英骏生物技术有限公司完成)。

2.2.4 重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾、pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 的构建 基本上同上述 2.2.3 的操作方法。即① 将扩增产物 CsATP-synt_B¹⁻²³⁸ 或 CsATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ 进行回收纯化后与 pEGFP-N1 载体用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切; ② 与 2.2.3

的②同法操作; ③ PCR 扩增及双酶切和测序鉴定重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻²³⁸、pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ 构建成功后, 再将 CsATP-synt_B²⁵⁷⁻³⁰⁰ 片段 PCR 扩增产物进行回收纯化, 经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切, 分别定向克隆入 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻²³⁸ 或 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ 重组质粒 3' 端, 然后按照 2.2.3 的②同法操作; ④ 与 2.2.3 的③同法鉴定重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾、pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾。

2.3 CsATP-synt_B 全长序列及 3 个突变体在 HeLa 细胞中的表达 将以上构建的重组质粒, 均按质粒提取试剂盒说明书操作, 提取无内毒素超纯质粒, 测定吸光度 (A_{260} 、 A_{280} 、 A_{260}/A_{280}) 及浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。

于转染前 12 h 向 24 孔细胞培养板培养孔中接种 HeLa 细胞, 细胞密度为 $4 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 个/ml, 于 37 °C 100% 饱和湿度及 5% CO₂ 条件下培养, 至 HeLa 细胞融合率为 80% 左右, 将其分为 7 组, 分别为转染 pEGFP-N1、pEYFP-Mito、H₂B-CFP 质粒组, 以及转染 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰、pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰、pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 和 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 等重组质粒组。

在无菌条件下, 于 1.5 ml EP 管中, 参照阳离子脂质体转染试剂说明书配制转染液 (A 液)。重组质粒 DNA 0.8 $\mu\text{g}/\text{管}$, 补充转染液至 50 μl , 室温静置 5 min。另取 A 液 2 μl , 加转染液 48 μl , 室温放置 5 min 后为 B 液。将 A 液与 B 液 (共 100 μl) 轻轻混匀, 室温放置 30 min, 以使质粒和脂质体形成 DNA-脂质体复合物。用无血清 DMEM 培养基漂洗 HeLa 细胞 3 次, 将 DNA-脂质体复合物加到相应培养孔中, 每孔再加转染液 400 μl , 轻轻摇动培养板混匀培养液, 于 37 °C、100% 饱和湿度、5% CO₂ 培养 4~6 h, 弃去转染液, 用无血清 DMEM 培养基漂洗 HeLa 细胞 2 次, 加入 DMEM 培养基 (10% FBS) 继续培养 24~48 h。用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

结 果

1 免疫组织化学定位

荧光显微镜观察到华支睾吸虫成虫经 ATP-synt_B 免疫血清荧光染色后, 整个虫体呈现橙红色荧光, 其中腹吸盘、卵巢、卵黄腺和体表部位荧光较强 (图 2)。

2 真核细胞重组质粒的构建

4 个真核细胞重组质粒 PCR 扩增及酶切鉴定结果 (图 3), 进一步以 pEGFP-N1 的通用测序引物对重组质粒测序。结果表明, 各插入序列 CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ (图

3A)、CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰(图 3B)、CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾(图 3C)、CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾(图 3D)正确无误, 4 个真核细胞重组质粒构建成功。

3 CsATP-synt_B 全长序列及 3 个突变体重组质粒在 HeLa 细胞中的表达

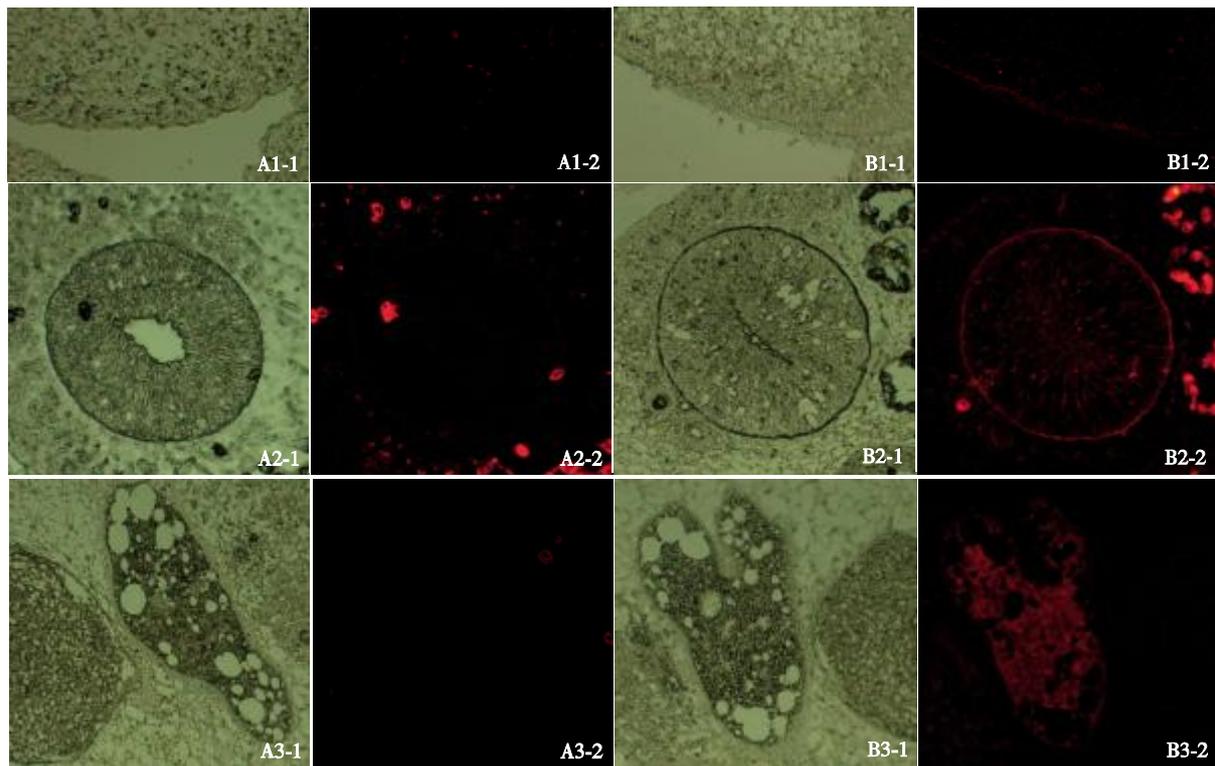
CsATP-synt_B 全长序列的重组质粒转染 HeLa 细胞后表达的融合蛋白在细胞内的分布见图 4。线粒体标志质粒 pEYFP-Mito, 转染细胞的胞质中呈现的点状黄色荧光, 显示了线粒体的形态和分布 (图 4A); 细胞核标志质粒 H₂B-CFP 转染细胞的细胞核中呈青色的荧光, 显示了细胞核的形态 (图 4B), 空载体 pEGFP-N1 表达的绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein) 较均匀地分布在 HeLa 细胞中 (图 4C)。pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 转染 HeLa 细胞后, 在线粒体 (图 4D~H) 和细胞核 (图 4F~G) 均有表达, 有的以在细胞核内表达为主 (图 4G)。

3 个突变体在 HeLa 细胞中的表达情况见图 5。其中 MTS-突变体 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ 在胞浆中分布较均匀, 有些细胞的细胞核见有致密的荧光, 有些细胞则无 (图 5A)。NLS-突变体 pEGFP-N1-

CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 在 HeLa 细胞中的表达情况与线粒体标志质粒 pEYFP-Mito 相似, 在细胞质中见点状荧光分布, 细胞核中未见荧光, 融合蛋白主要定位于线粒体(图 5B)。MTS-NLS-突变体 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 的表达情况与空载体 pEGFP-N1 相似, 整个细胞均见绿色荧光, 融合蛋白定位于胞浆 (图 5C)。

讨 论

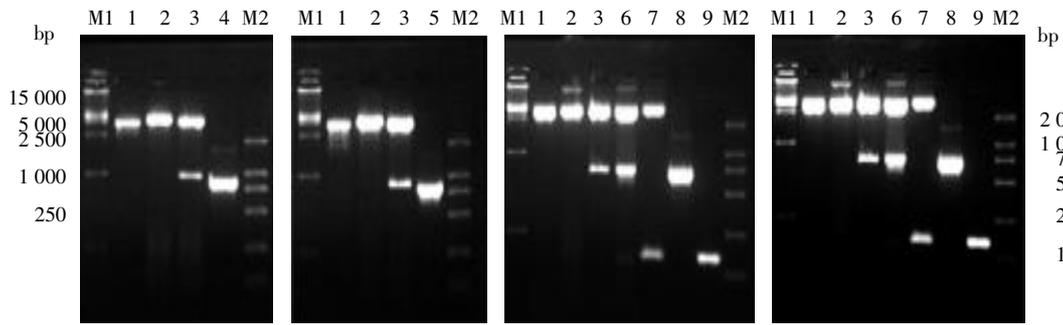
本研究从华支睾吸虫成虫全长 cDNA 文库克隆 ATP 合酶 b 亚基的同源基因, 通过生物信息学预测该蛋白的 N 端 29 个氨基酸残基是线粒体转运信号肽序列。除了满足 ATP 合酶 b 亚基完成其功能所需的 MTS 序列和跨膜序列外, 该蛋白序列中还有一段可能的核定位序列。而同时具有靶向线粒体和细胞核的信号序列的蛋白质除了牛疱疹病毒 1 壳皮蛋白 VP22^[8] 和人 uracil-DNA 转葡萄糖基酶^[9], 极少有报道和实验证实。而通过实验证实华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基是否具有核定位序列, 对于进一步了解其进入细胞核的条件和生物学意义, 深入认识华支睾吸虫能量代谢和调控方式具有重要意义。



A: SD 大鼠正常血清, B: SD 大鼠免疫血清; A1、B1: 皮层和卵黄腺, A2、B2: 吸盘, A3、B3: 卵巢; *-1: 普通光镜观察 (×100), *-2: 绿色激发光观察 (×100)。

A: Normal serum as control, B: CsATP-synt_B-specific antiserum; A1,B1: tegument and vitellarium, A2,B2: acetabulum, A3,B3: ovary; *-1 under white light (×100), *-2 excited by green light (×100) .

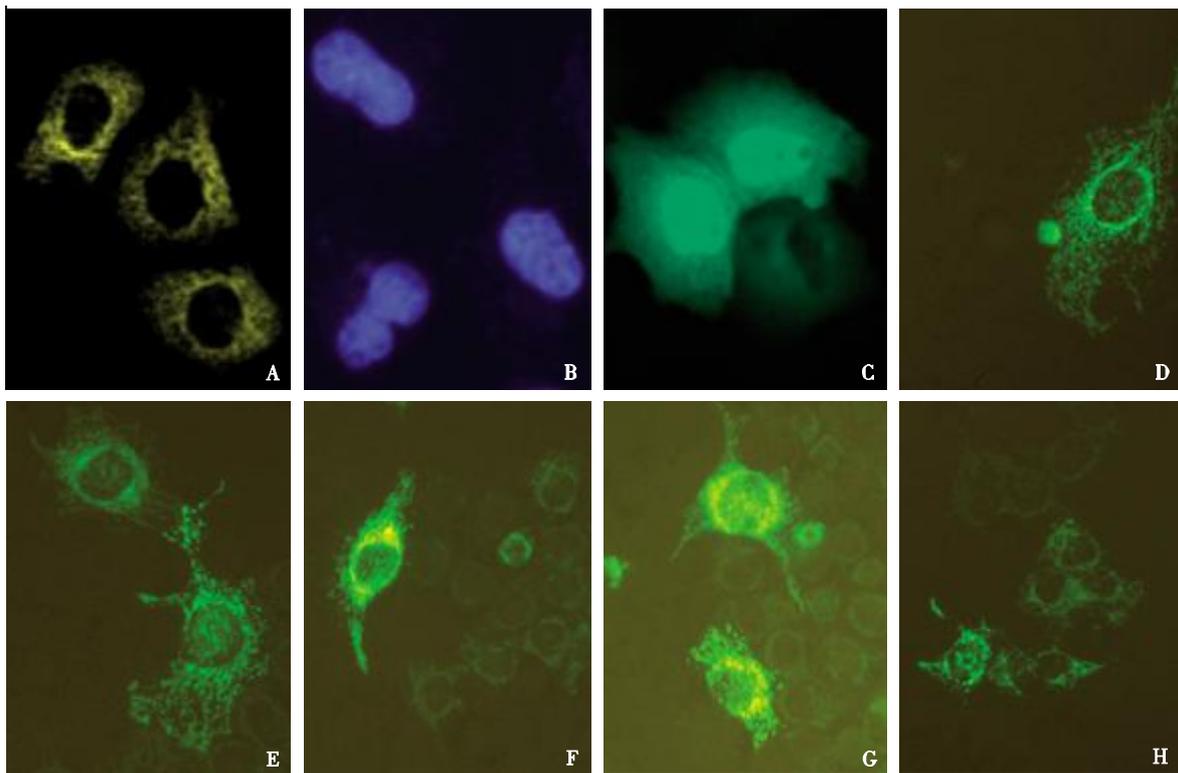
图 2 CsATP-synt_B 在华支睾吸虫成虫石蜡切片的免疫组织化学定位
Fig.2 Immunolocalization of CsATP-synt_B in the paraffin section of adult C. sinensis



A: 全长基因重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 酶切鉴定, B: MTS⁻重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ 酶切鉴定, C: NLS⁻重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 酶切鉴定, D: MTS-NLS⁻重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ 酶切鉴定; M1: DNA 标志物 (DL15000), M2: DNA 标志物 (DL2000), 1: pEGFP-N1 载体 *Xho* I 酶切, 2: 重组质粒 *Xho* I 酶切, 3: 重组质粒 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切, 4: *Cs*ATP-synt_B¹⁻³⁰⁰PCR 产物, 5: *Cs*ATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ PCR 产物, 6: 重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (C 图)或 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (D 图) *Xho* I 和 *Hind*III 酶切, 7: 重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (C 图)或 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (D 图) *Hind*III 和 *Bam*H I 酶切, 8: *Cs*ATP-synt_B¹⁻²³⁸ (C 图)或 *Cs*ATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ PCR 产物 (D 图), 9: *Cs*ATP-synt_B²⁵⁷⁻³⁰⁰ 的 PCR 产物。
 A: pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ digestion, B: MTS-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ recombinant plasmid digestion, C: NLS-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ recombinant plasmid digestion, D: MTS-NLS-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ recombinant plasmid digestion; M1: DNA marker DL15000; M2: DNA marker DL2000, 1: The vector pEGFP-N1 digested by *Xho* I, 2: Recombinant vectors digested by *Xho* I, 3: Recombinant vectors digested by *Xho* I and *Bam*H I, 4: *Cs*ATP-synt_B¹⁻³⁰⁰PCR product, 5: *Cs*ATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰ PCR product, 6: Recombinant vectors pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (C) or pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (D) digested by *Xho* I and *Hind*III, 7: Recombinant vectors pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (C) or pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁺⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾ (D) digested by *Hind*III and *Bam*H I, 8: PCR product of *Cs*ATP-synt_B¹⁻²³⁸ (C) or *Cs*ATP-synt_B³⁰⁻²³⁸ (D), 9: *Cs*ATP-synt_B²⁵⁷⁻³⁰⁰ PCR product.

图 3 华支睾吸虫 ATP 合酶 b 亚基全长及 3 种突变体基因的重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Identification of the intact and three mutant *Cs*ATP-synt_B recombinant vectors by endonucleases

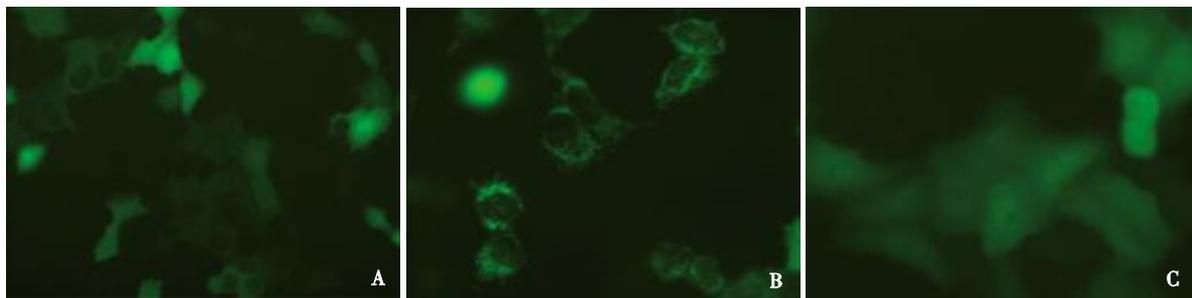


A: 线粒体标志质粒 pEYFP-Mito, B: 细胞核标志质粒 H₂B-CFP, C: 空载体质粒 pEGFP-N1, D~H: 重组质粒 pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 转染的 HeLa 细胞。

A: pEYFP-Mito mitochondrion marker control, B: H₂B-CFP nucleus marker control, C: HeLa cells transfected with A pEGFP-N1 vector, D~H: pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰.

图 4 *Cs*ATP-synt_B 全长序列在 HeLa 细胞中的荧光表达 (×400)

Fig.4 The green fluorescent pictures of the HeLa cells transfected by pEGFP-N1, H₂B-CFP or pEGFP-N1-CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ (×400)



A: MTS突变体 pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰, B: NLS突变体 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾, C: MTSNLS突变体 pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽³⁰⁻²³⁸⁾⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾。
A: MTSmutant pEGFP-N1-CsATP-synt_B³⁰⁻³⁰⁰, B: NLSmutant pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾, C: MTSNLSmutant pEGFP-N1-CsATP-synt_B⁽¹⁻²³⁸⁾⁽²⁵⁷⁻³⁰⁰⁾。

图 5 3 个突变体重组质粒在 HeLa 细胞中的表达 (×400)

Fig.5 Expression of the three mutant plasmids in HeLa cells (×400)

作者以往研究,通过克隆和原核表达 CsATP-synt_B 基因^[7],获得纯化的重组蛋白,制备了 SD 大鼠抗血清。本研究利用该抗血清对 CsATP-synt_B 在虫体的定位进行免疫组化分析,发现 CsATP-synt_B 蛋白在华支睾成虫体内分布较广泛,这与 CsATP-synt_B 的功能密切相关,因为 CsATP-synt_B 参与华支睾吸虫 ATP 的合成,有线粒体就该有 CsATP-synt_B。腹吸盘、卵巢、卵黄腺和皮层等部位显示荧光较强,表明这 4 个部位线粒体分布密集,能量代谢较旺盛。腹吸盘是虫体主要运动器官,在吸盘的肌纤维之间有充满线粒体的“动力细胞”,可能是肌肉运动能量的来源。成虫每天生成大量虫卵需要卵巢和卵黄腺不断生成和提供卵细胞和卵黄细胞,需要大量 ATP 能量,因此,线粒体和 ATP 合酶含量丰富。体表皮层细胞具有保护、吸收营养和感觉等功能,也含有丰富的线粒体^[10]。本研究免疫组织化学结果显示, CsATP-synt_B 主要分布在物质和能量代谢较旺盛的器官和组织,与线粒体的分布较一致。

生物信息学预测的 CsATP-synt_B 的线粒体转运序列 1~29 位氨基酸和细胞核定位序列 239~256 位氨基酸是否正确,这种截然不同的细胞内区室分布是否真实存在,以及如何实现?本研究在构建全长序列的 pEGFP-N1 重组质粒的同时还构建了缺失线粒体转运序列、核定位序列、及双缺失序列 3 个突变体与 pEGFP-N1 的重组质粒。并将其转染体外培养的 HeLa 细胞,观察细胞内荧光分布,来验证理论预测。

构建的重组质粒用去内毒素试剂盒提取后,用阳离子脂质体在无血清培养基中转染 HeLa 细胞取得成功,在共聚焦荧光显微镜下观察全长序列和 3 种突变序列在 HeLa 细胞中的表达情况,并与空载体质粒 pEGFP-N1、线粒体标志质粒 pEYFP-Mito 和细胞核标志质粒 H₂B-CFP 在 HeLa 细胞中的表达进行比较。结

果显示, CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 与 GFP 的融合蛋白在大部分细胞中呈分散的点状分布,与线粒体标志蛋白的分布相似,表明 CsATP-synt_B¹⁻³⁰⁰ 蛋白主要表达于线粒体;但也有部分细胞中荧光密集表达于细胞核内,与细胞核标志质粒 H₂B-CFP 在细胞中的分布相似,证实 CsATP-synt_B 除定位于线粒体外,还能进入细胞核。MTS-缺失突变体在细胞中的表达荧光蛋白在大部分细胞中较均匀地分布在胞质内,但在部分细胞中密集表达于细胞核中,证实了线粒体转运序列的预测完全正确,并提示融合蛋白在一定条件下可进入细胞核。NLS-突变体在 HeLa 细胞的表达分布与线粒体标志质粒非常相似,所有细胞的核内都不出现荧光,表明 CsATP-synt_B 进入细胞核确实是由 239~256 位的富含碱性氨基酸的核定位序列介导的。MTS-NLS-双缺失突变体在 HeLa 细胞中的表达与 pEGFP-N1 空质粒完全一致,均匀地分布在胞质中,进一步证实 1~29 和 239~256 位氨基酸分别是介导蛋白质进入线粒体和细胞核的靶向序列。本研究验证了生物信息学预测的正确性。

参 考 文 献

- [1] Xu J, Hu XC, Ying K, et al. Construction of full-length gene expression library of *Clonorchis sinensis* adults and establishment of the gene expression pattern[J]. Chin J Zoonoses, 2004, 20(5): 383-386. (in Chinese)
(徐劲, 胡旭初, 应康, 等. 华支睾吸虫成虫全长基因表达文库的构建和基因表达谱的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(5): 383-386.)
- [2] Zhang YL, Yu XB, Wu D, et al. Purification, enzyme activity and immunology study of recombinant protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Clonorchis sinensis* and functional analysis of the expressed protein[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(4): 231-235. (in Chinese)
(张咏莉, 余新炳, 吴德, 等. 华支睾吸虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶重组蛋白的纯化、酶学活性及免疫学研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 231-235.)
- [3] Xu J, Zheng NC, Yu XB, et al. Prokaryotic expression of gene encoding the mitochondrial malate dehydrogenase of *Clonorchis sin-*

ensis and the functional identification of the recombinant protein [J]. Chin J Zoonoses, 2005, 21(10): 863-866. (in Chinese)

(徐劲, 郑南才, 余新炳, 等. 华支睾吸虫线粒体苹果酸脱氢酶基因的原核表达及重组蛋白的功能鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(10): 863-866.)

[4] Yang G, Jing CX, Yu XB, et al. Molecular cloning and characterization of a novel lactate dehydrogenase gene from *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2006, 99(1): 55-64.

[5] Yang G, Yu XB, Wu ZD, et al. Molecular cloning and characterization of a novel adenylate kinase 3 gene from *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2005, 95(6): 406-412.

[6] Zhou HJ, Yu XB, Hu XC, et al. Bioinformatics analysis of the full-length *Clonorchis sinensis* ATP synthase B chain-like gene [J]. J Trop Med, 2007, 7(4): 315-318. (in Chinese)

(周红娟, 余新炳, 胡旭初, 等. 华支睾吸虫 ATP 合酶 B 亚单位全长基因的生物信息学分析[J]. 热带医学杂志. 2007, 7(4): 315-318.)

[7] Zhou HJ, Hu XC, Yu XB, et al. Cloning and expression of the FO₁-ATP synthase b chain of *Clonorchis sinensis* and immunogen-

icity identification of the recombinant protein [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(5): 85-88. (in Chinese)

(周红娟, 胡旭初, 余新炳, 等. 华支睾吸虫 FO-ATP 合酶 b 亚基基因的克隆表达和重组蛋白的免疫原性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(5): 85-88.)

[8] Zhu J, Qiu Z, Wiese C, et al. Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 16038-16044.

[9] Otterlei M, Haug T, Nagelhus TA, et al. Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively [J]. Nucl Acid Res, 1998, 26(20): 4611-4617.

[10] Wu GL. Human Parasitology [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 310-311. (in Chinese)

(吴观陵, 主编. 人体寄生虫学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 301-311.)

(收稿日期: 2008-07-14 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0101-01

【消息】

深切悼念顾以铭教授



顾以铭教授不幸于 2009 年 1 月 10 日在南京逝世, 享年 83 岁。噩耗传来, 医学寄生虫学界同仁无不惊哀、痛心。顾教授一生从事寄生虫学教学与研究工作, 矢志不渝, 成绩卓著。中国改革开放以来, 他不辞辛苦, 多次到贵州、云南等边远地区讲学并进行疾病防治研究, 贡献非凡, 多次荣获当地政府的嘉奖。

顾以铭教授生于 1927 年, 原籍江苏省太仓市。1937 年抗日战争爆发后, 随家人逃往湖南。之后, 独自流亡至四川, 历尽战乱的苦难, 进入国立二中, 衣食等费用全赖学校提供及同学的帮助, 在生活条件极端艰苦的环境下, 他坚持刻苦攻读, 学习成绩优异。1945 年抗战胜利不久, 他随学校到南京, 以突出成绩考入国立中央大学医本科 (六年制)。1950 年在校期间, 积极响应政府号召, 参加南京市赴部队进行血吸虫病的防治工作, 荣立三等功。1951 年参加南京市抗美援朝医疗队, 荣立三等功。随后, 服从组织分配, 进入中国卫生研究院华东分院主办的全国第一届医学寄生虫学高级师资班学习, 1953 年结业, 即参加天津医学院主办的俄文突击班学习。结业后主动要求到贵州参加祖国大西南的建设, 分配至贵阳医学院寄生虫学教研室工作; 1987 年晋升教授, 成为研究生导师。1989

年调入南京大学医学院, 任人体寄生虫学教研室主任。1993 年正式退休。

顾以铭教授热爱社会主义祖国, 热爱医学教学事业。他为人正直, 严于律己, 乐于助人, 勤恳敬业, 尊敬前辈老师, 孝敬父母, 对后辈及其弟妹也给予无条件的帮助。在教学上坚持言传身教, 教书育人, 培养了大批医学卫生和人体寄生虫学优秀人才, 许多学子已成为我国医学领域的中坚力量。在教学上, 他条理清晰, 生动有趣, 深受学生喜爱。在科研上, 他治学严谨, 辛勤奉献, 不计个人名利。曾多次受到贵州省省级模范表彰, 贵州和云南省优秀科技成果工作者奖励, 于 1992 年和 1993 年分别获国务院政府特殊津贴和中华国际医学交流基金会颁发的杨宗林医学教育奖。

顾以铭教授的主要成就: ① 培养了大批医学专业人才; ② 在蠕虫学和螨虫学方面的研究成绩斐然, 曾发现并记述医学吸虫和螨类新种 105 个, 新属 7 个, 新科 2 个; ③ 参加编写全国蠕志和主编贵州蠕类志; ④ 先后参加编写全国寄生虫学高级教材 (赵慰先主编) 和寄生虫文献目录 (毛守白主编) 等 21 种; ⑤ 发表和完成论文 145 篇。

顾以铭教授一生无私奉献于教学和科研工作, 生活简朴, 常以教研室为家, 经常深入贵州边远地区防病、治病, 与夫人王菊生教授相濡以沫, 共同进行教学、科研工作五十余载。

(南京大学医学院副院长, 人体寄生虫学教研室主任陈伟副教授提供资料)