

文章编号: 1000-7423(2012)-06-0438-04

【论著】

刚地弓形虫 14-3-3 蛋白真核表达载体的构建与表达

孙敏, 何深一*, 赵广会, 丛华, 周怀瑜, 赵群力, 孟敏

【摘要】 目的 构建并表达刚地弓形虫 RH 株 14-3-3 蛋白的真核表达载体。方法 用生物信息学方法对弓形虫 14-3-3 蛋白的理化性质和结构进行预测。以弓形虫 RH 株总 RNA 为模板, 逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增目的基因片段, 亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.0, 构建重组质粒 pcDNA3.0/14-3-3, 经 PCR、双酶切和测序鉴定正确后, 用脂质体法转染人宫颈癌 (HeLa) 细胞, 蛋白印迹 (Western blotting) 分析表达产物。结果 根据 14-3-3 蛋白基因片段序列和氨基酸序列预测, 该蛋白分子为酸性可溶性蛋白, 主要以同源或异源二聚体存在, 有 5 个氨基酸保守序列区。RT-PCR 的扩增产物约为 800 bp, 构建的真核表达质粒 pcDNA3.0/14-3-3 插入片段经测序, 片段长度为 801 bp, 与 GenBank 中刚地弓形虫 14-3-3 蛋白基因序列 (登录号为 AB012775.1) 同源性为 99%。Western blotting 分析结果显示, 在转染 pcDNA3.0/14-3-3 的细胞中, 有 14-3-3 蛋白表达, 相对分子质量 (M_r) 约为 30 000, 且表达量显著高于转染空质粒和未转染的细胞。结论 构建了真核表达载体 pcDNA3.0/14-3-3, 并能在真核细胞内表达。

【关键词】 刚地弓形虫; 14-3-3 蛋白; 真核表达; 生物信息学

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Construction and Expression of an Eukaryocyte Vector of 14-3-3 Protein in *Toxoplasma gondii*

SUN Min, HE Shen-yi*, ZHAO Guang-hui, CONG Hua,
ZHOU Huai-yu, ZHAO Qun-li, MENG Min

(Department of Pathogen Biology, Shandong University School of Medicine, Jinan 250012, China)

【Abstract】 **Objective** To construct and express the eukaryotic expression vector of 14-3-3 protein of *Toxoplasma gondii* RH strain. **Methods** The structure and physicochemical property of 14-3-3 protein were predicted by bioinformatics analysis tools. The desired gene fragment was amplified from total RNA in *T. gondii* RH strain by RT-PCR, and sub-cloned into pcDNA3.0 to construct recombinant plasmid pcDNA3.0/14-3-3. After PCR confirming, double restriction enzyme digestion and DNA sequencing, the eukaryotic expression vector pcDNA3.0/14-3-3 was transfected into HeLa cells and the target protein was detected by Western blotting. **Results** The prediction of its gene sequence and amino acid sequence suggested that the 14-3-3 protein was acid soluble protein with five conserved regions, existing as homo- or hetero-dimers. The amplified gene fragment was about 800 bp, and the inserted fragment in pcDNA3.0/14-3-3 was 801 bp by sequencing, which had 99% homology to the 14-3-3 gene sequence of *T. gondii* in GenBank (Accession No. AB012775.1). Western blotting showed that there was more 14-3-3 protein expressed in the pcDNA3.0/14-3-3-transfected HeLa cells than untransfected and mock transfected cells. Its relative molecular mass (M_r) was about 30 000. **Conclusion** The eukaryotic expression vector pcDNA3.0/14-3-3 is constructed and expressed in eukaryotic cells.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; 14-3-3 protein; Eukaryotic expression; Bioinformatics

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071373), the Natural Science Fund of Shandong Province (No. ZR2009CM079), and the Open Fund of the State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology (No. SKLVEB2011KFKT005)

* Corresponding author, E-mail: shenyihe@sdu.edu.cn

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种呈世界性分布的重要机会性致病原虫, 专性寄生细胞内, 人

和动物均能感染, 引起人兽共患弓形虫病^[1,2], 尤其在宿主免疫功能低下时, 可致严重后果^[3]。孕妇感染弓形虫可致流产、死产和早产, 存活者也常患有畸形和智力障碍等严重后遗症^[4,5]。近年来, 在真核细胞内信号传导通路研究中, 发现了一组关键信号蛋白 14-3-3 蛋白家族, 它参与很多细胞正常生命活动的调节。据

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81071373); 山东省自然科学基金 (No. ZR2009CM079); 家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金 (No. SKLVEB2011KFKT005)

作者单位: 山东大学医学院病原生物学研究所, 济南 250012

* 通讯作者, E-mail: shenyihe@sdu.edu.cn

资料推测, 14-3-3 蛋白也可能在弓形虫细胞信号转导中起重要的调节作用^[6], 但目前国内外对此方面的研究相对较少。本文预测了弓形虫 14-3-3 蛋白的结构和功能, 并成功构建 14-3-3 蛋白的真核表达载体, 为研究此蛋白的功能奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 弓形虫虫株、菌种与质粒 刚地弓形虫 RH 株为本实验室保存, 小鼠腹腔接种传代。大肠埃希菌 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司, 真核表达载体 pcDNA3.0 和人宫颈癌(HeLa)细胞分别由本校免疫所和电镜实验室惠赠。

1.2 逆转录 PCR (RT-PCR) 引物的设计与合成 根据 GenBank (登录号 AB012775.1) 中弓形虫 14-3-3 基因编码序列设计合成引物, 上、下游引物序列分别为 5'-AT GGA TCC ATG GCG GAG GAA ATC A-3' 和 5'-GCA CTC GAG TTA CTG ATC AGC TTG-3', 下划线部分为酶切位点。引物由上海博尚生物技术有限公司合成。

1.3 主要试剂 RNA 提取试剂盒和 2 \times TransTaqTM 高保真酶混合物 (2 \times TransTaqTM High Fidelity PCR SuperMix) 购自北京全式金生物技术有限公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒、限制性内切酶 BamH I、Xho I 和 T₄ DNA 连接酶均购自加拿大 Fermentas 公司; 脂质体 (LipofectamineTM 2000) 购自美国 Invitrogen 公司; DNA 纯化胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒均购自百泰克(北京)生物技术有限公司; 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析相关试剂均购自碧云天生物技术有限公司; 兔抗 14-3-3 蛋白多克隆抗体和小鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GADPH) 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 (HRP-IgG) 和山羊抗鼠 HRP-IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 生物信息学分析 弓形虫 14-3-3 基因和蛋白的 GenBank 登录号分别为 AB012775.1 和 BAA25996.1, 对其进行生物信息学分析。通过 protparam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析蛋白的理化参数; 采用 NCBI 的 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 InterPro 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) 进行检索, 寻找氨基酸序列的保守结构域和功能域, 了解目的序列可能的功能性质; 利用 NPS 的 SOPMA 服务器 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/>

[npsa_automat.pl?pag=npsa_Sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?pag=npsa_Sopma.html)) 对蛋白质的二级结构及折叠类型进行分析; 运用 <http://Psort.Nibb.ac.jp/form.html> 对亚细胞定位进行预测; 利用 TMHMM 和 ProtScale 预测氨基酸序列的跨膜区和亲疏水性; 用 Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) 和 VDM 软件预测其三维结构。

2.2 目的基因片段的扩增 弓形虫 RNA 的抽提按试剂盒说明进行。取 1 μ g RNA, 参照逆转录试剂盒说明合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用所设计的引物进行 PCR 扩增 14-3-3 基因。反应体系为: 模板 2 μ l, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, 2 \times TransTaqTM 高保真酶混合物 25 μ l, 加去离子水至 50 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2.3 真核表达载体的构建和鉴定 用 BamH I 和 Xho I 酶分别双酶切 pcDNA3.0 质粒和 PCR 产物, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切后的载体和目的片段, 用胶回收试剂盒回收酶切产物, 将酶切后的目的基因和载体在 T₄ DNA 连接酶作用下, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化入感受态 DH5 α , 均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取阳性克隆接种于含氨苄青霉素 (100 μ g/ml) 的 LB 液体培养基中大量扩增, 提取质粒。重组质粒经 PCR 扩增, 以及 BamH I 和 Xho I 双酶切初步鉴定后, 送上海博尚生物技术有限公司测序。

2.4 pcDNA3.0/14-3-3 转染细胞 HeLa 细胞在含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 饱和湿度下培养, 细胞生长至 70%~80% 融合时即按照 LipofectamineTM 2000 说明书进行转染。将转染空质粒的 HeLa 细胞作为对照组。

2.5 Western blotting 分析 14-3-3 蛋白表达 转染细胞 48 h 后裂解细胞提取总蛋白, 加入 SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 运行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 并转膜至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后分别用兔抗 14-3-3 蛋白多克隆抗体和小鼠抗 GADPH 单克隆抗体, 以及对应的二抗进行孵育, 最后采用增强化学发光法检测结果。

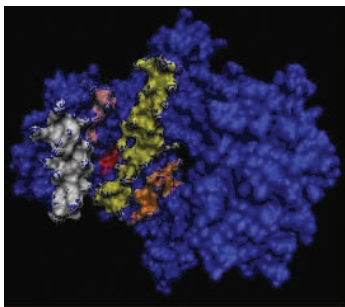
结 果

1 生物信息学分析

14-3-3 蛋白的预期相对分子质量 (M_r) 为 30 698.2, 理论等电点为 4.70, 该蛋白由 266 个氨基酸组成, 极性带正电荷氨基酸 (Arg+Lys) 数为 33, 极性带负电荷氨基酸 (Asp+Glu) 数为 51。不稳定系数为 55.60, 脂溶性系数为 75.30, 其平均亲水性系数为 -0.810,

因此推测该蛋白为可溶性蛋白。对该蛋白的亚细胞定位进行预测, 定位于细胞质、微体、线粒体基质和溶酶体的可能性分别为 45%、30%、10%和 10%。

用 Swiss-Model 软件匹配其同源性蛋白为人 14-3-3 epsilon (登录号为 NC_000017.10), 序列一致性为 62.71%, 得分-1.94。14-3-3 蛋白二级结构由 α 螺旋、延伸链和无规卷曲组成, 其组成比例分别为 69.92%、1.88%和 21.8%。三维结构预测结果显示, 14-3-3 蛋白主要以同源或异源二聚体形式存在, 形成一个 U 型结构。该结构内部包含高度保守的凹面两性沟, 是 14-3-3 蛋白与磷酸化和非磷酸化配基相互作用的位点。通过对 14-3-3 蛋白保守结构域的预测, 发现 5 大保守序列, 分别为 Ala16-Asp26、Leu49-Lys81、Leu120-Asp139、Thr178-Ile196 和 Glu223-Thr241, 其中 Ala16-Asp26 和 Leu49-Lys81 为 14-3-3 蛋白同源或异源二聚体结合处, Leu49-Lys81、Leu120-Asp139、Thr178-Ile196和 Glu223-Thr241 为肽结合位点, 形成 14-3-3 蛋白核心区域的凹槽, Arg-Arg-Tyr (RRY) 三联体在此处可形成磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸, 该序列具有 14-3-3 蛋白典型的功能域 (图 1)。



注: 蓝色代表 14-3-3 蛋白的空间结构模型; 橙色代表 Ala16-Asp26; 黄色代表 Leu49-Lys81; 红色代表 Leu120-Asp139; 粉红色代表 Thr178-Ile196; 白色代表 Glu223-Thr241。

Note: Blue for space model of 14-3-3 protein; Orange for Ala16-Asp26; Yellow for Leu49-Lys81; Red for Leu120-Asp139; Pink for Thr178-Ile196; White for Glu223-Thr241.

图 1 5 大保守序列区在 14-3-3 蛋白分子结构上的位置

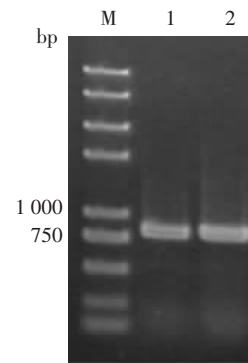
Fig.1 Location of the five conserved sequence regions in 14-3-3 protein molecule

2 目的基因的 PCR 扩增

以刚地弓形虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物片段大小约为 800 bp, 与预期值一致 (图 2)。

3 重组表达载体 pcDNA3.0/14-3-3 的鉴定

用小量质粒提取试剂盒提取克隆重组子后, 经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 以及 PCR 扩增鉴定, 目的片段均约为 800 bp (图 3)。测序结果表明, 其具有一个 801 bp 完整的开放阅读框, 与 GenBank 中



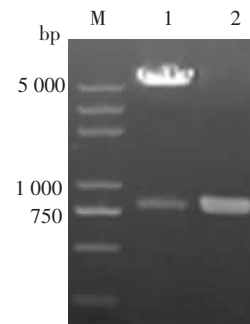
M: DNA 标志物; 1、2: 14-3-3 基因。

M: DNA marker; 1, 2: 14-3-3 gene.

图 2 14-3-3 基因 RT-PCR 产物

Fig.2 RT-PCR products of 14-3-3 gene

刚地弓形虫 14-3-3 蛋白基因序列 (登录号为 AB012775.1) 同源性为 99%。该片段序列中有一个碱基发生突变, 即第 522 位核苷酸 G→A, 相应密码子改变为 GTG→GTA, 但对应的氨基酸均为缬氨酸 (V)。



M: DNA 标志物; 1: pcDNA3.0/14-3-3 的双酶切产物; 2: pcDNA3.0/14-3-3 的 PCR 产物。

M: DNA marker; 1: Digestion product by *Bam*H I and *Xho* I; 2: PCR product.

图 3 重组质粒 pcDNA3.0/14-3-3 鉴定

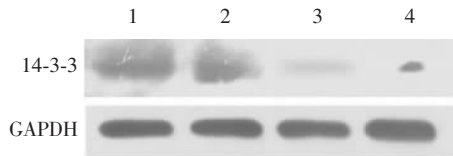
Fig.3 Identification of the recombinant plasmid pcDNA3.0/14-3-3

4 真核表达载体 pcDNA3.0/14-3-3 在细胞中的表达

通过脂质体介导的基因转染方法将构建的载体 pcDNA3.0/14-3-3 转染 HeLa 细胞, 用抗 14-3-3 抗体进行 Western blotting 分析。结果显示, 在转染真核表达载体 pcDNA3.0/14-3-3 的 HeLa 细胞中, 有 14-3-3 蛋白表达, M_r 约为 30 000, 且表达量显著高于转染空质粒和未转染的细胞 (图 4)。

讨 论

14-3-3 蛋白是一类在细胞生命活动中起到重要调节作用的高度保守的酸性蛋白质。本研究预测出 14-3-3 蛋白主要以同源或异源二聚体存在, 形成一个凹槽, 与 Yaffe 等^[7]结论相符。14-3-3 蛋白即通过此结构与含有磷酸化丝氨酸或苏氨酸的配体结合, 发挥其



1、2: 转染 pcDNA3.0/14-3-3 的细胞; 3: 转染空质粒的细胞; 4: 未转染细胞。GAPDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶。

1, 2: Cells transfected with pcDNA3.0/14-3-3; 3: Cells transfected with pcDNA3.0; 4: Cells without transfection.

图 4 Western blotting 检测 HeLa 细胞中 14-3-3 蛋白的表达
Fig. 4 Western blotting analysis of pcDNA3.0/14-3-3 expression in HeLa cells

生物学功能。在寄生虫中, 14-3-3 蛋白的功能主要体现在为调节虫体的增殖和发育^[6], 例如在血吸虫和棘球绦虫生活史的不同环节, 存在不同的 14-3-3 蛋白异构体调节与发育相关蛋白的活性^[8,9], 它们作为疫苗候选分子的应用前景也获得了肯定^[10,11]。Assossou 等^[12]用免疫组化法在刚地弓形虫中分离鉴定出 2 种 14-3-3 蛋白亚型, 其中 M_r 约 31 000 的亚型位于脂筏上。脂筏在胞吞胞饮、信号转导和运输胆固醇等方面具有重要功能^[13]。另外, 有证据表明 14-3-3 蛋白可能参与了多条信号通路的传导^[14-18]。

王维等^[19]已对弓形虫 14-3-3 蛋白进行了克隆及序列分析。都建等^[20,21]也对其进行了原核表达及免疫学诊断, 结果显示, 原核重组 14-3-3 蛋白具有免疫学诊断的价值。本实验构建了弓形虫 14-3-3 的真核表达系统, 所构建的重组质粒 pcDNA3.0/14-3-3 经 PCR、双酶切和序列分析表明, 载体上的 14-3-3 基因读码框完整, 插入方向正确, 并在两端成功插入了正确的起始和终止密码子, 保证了表达产物的正确性。通过脂质体介导的方法将 pcDNA3.0/14-3-3 载体转染 HeLa 细胞后, Western blotting 分析证实弓形虫 14-3-3 蛋白在真核细胞内高表达, 为下一步该蛋白功能的研究和分子疫苗的制备奠定基础。

参 考 文 献

[1] Li T, He S, Zhao H, *et al.* Major trends in human parasitic diseases in China[J]. Trends Parasitol, 2010, 126(5): 264-270.
[2] Iovu A, Györke A, Mircean V, *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania[J]. Vet Parasitol, 2012, 186(3/4): 470-474.
[3] Aydın OA, Karaosmanoglu HK, Korkusuz R, *et al.* *Toxoplasma gondii* IgG seroprevalence in HIV/AIDS patients [J]. Turkiye Parazit Derg, 2011, 35(2): 65-67.
[4] Hotop A, Hlobil H, Gross U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(11): 1545-1552.
[5] Qin W, Hu DC, Pang HL. Detection of the serum IgM and IgG specific for TORCH in 1 307 women in the period of prepregnancy and pregnancy[J]. Chin J Exp Clin Virol, 2011, 25(4): 292-294. (in Chinese)

(秦雯, 胡大春, 庞海丽. 1 307 例育龄妇女血清 TORCH 抗体定量检测结果分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(4): 292-294.)
[6] Siles-Lucas Mdel M, Gottstein B. The 14-3-3 protein; a key molecule in parasites as in other organisms[J]. Trends Parasitol, 2003, 19(12): 575-581.
[7] Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, *et al.* The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity [J]. Cell, 1997, 91(7): 961.
[8] Liu QZ, Shen JL, Wang XL. Immunolocalization of the signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(6): 330-332. (in Chinese)
(刘庆中, 沈继龙, 汪学龙. 日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 的虫体免疫定位 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(6): 330-332.)
[9] Pan D, Bera AK, De S, *et al.* Relative expression of the 14-3-3 gene in different morphotypes of cysts of *Echinococcus granulosus* isolated from the Indian buffalo [J]. J Helminthol, 2010, 84(4): 394-397.
[10] Schechtman D, Tarrab-Hazdai R, Arnon R. The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis [J]. Parasit Immunol, 2001, 23(4): 213-217.
[11] Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B. 14-3-3 proteins in *Echinococcus*: their role and potential as protective antigens [J]. Exp Parasitol, 2008, 119(4): 516-523.
[12] Assossou O, Besson F, Rouault JP, *et al.* Subcellular localization of 14-3-3 proteins in *Toxoplasma gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 224(2): 161-168.
[13] Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, *et al.* Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 5): 955-960.
[14] Mackintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes [J]. Biochem J, 2004, 381(Pt 2): 329-342.
[15] Wilker E, Yaffe MB. 14-3-3 proteins—a focus on cancer and human disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(3): 633-642.
[16] Chan HC, Wu WL, So SC, *et al.* Modulation of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel by 14-3-3 epsilon[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(2): 581-587.
[17] Kagan A, Melman YF, Krumerman A, *et al.* 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity [J]. EMBO J, 2002, 21(8): 1889-1898.
[18] Urschel S, Bassermann F, Bai RY, *et al.* Phosphorylation of grb10 regulates its interaction with 14-3-3 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 16987-16993.
[19] Wang W, Shen JL, Wang XL, *et al.* Cloning and identification of 14-3-3 signal transduction protein gene of *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Zoonoses, 2001, 17(3): 16-18. (in Chinese)
(王维, 沈继龙, 汪学龙, 等. 弓形虫 14-3-3 信号转导蛋白基因序列测定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(3): 16-18.)
[20] Du J, Shen JL, Wang XL, *et al.* Cloning and expression of the signaling protein 14-3-3 of *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(5): 279-281. (in Chinese)
(都建, 沈继龙, 汪学龙, 等. 弓形虫信号转导蛋白 14-3-3 基因的克隆与表达 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(5): 279-281.)
[21] Du J, Shen JL, Wang W, *et al.* High expression of protein 14-3-3 of *Toxoplasma gondii* and its application in immunological diagnosis[J]. Chin J Biological, 2005, 18(1): 12-15. (in Chinese)
(都建, 沈继龙, 王维, 等. 弓形虫信号转导蛋白 14-3-3 的高效表达及免疫学诊断初探[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(1): 12-15.)

(收稿日期: 2012-06-04 编辑: 瞿麟平)