【实验研究】

牛带绦虫 ATE基因功能预测及原核表达*

刘玉江, 戴佳琳, 黄江, 王宇

摘 要: 目的 分析和预测牛带绦虫成虫精氨酰 – tRNA转移酶 (arginyl-tRNA-protein transferase, ATE)基因及其编码蛋白的结构域特性,并进行原核表达。方法 利用在线生物信息学网站及工具对牛带绦虫精氨酰 – tRNA转移酶基因的功能进行预测并将其编码区序列克隆到原核表达载体 pET– 28a(+)上, 测序鉴定重组质粒。结果 该基因全长 1 476 bp,编码区为 141~ 1 617 bp,编码 491个氨基酸;该基因为全长基因,无跨膜区,具有多个磷酸化位点,蛋白的理化性质稳定,理论分子量为 56 436. 3Da,没有质体、线粒体定位序列;十二烷基 –聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS– PAGE)结果表明,目的基因在大肠埃希菌 BL21~DE3中表达成功。结论 筛选出牛带绦虫成虫精氨酰 – tRNA转移酶基因,成功构建重组原核表达质粒。

关键词: 牛带绦虫; 精氨酰 – tRNA转移酶; 生物信息学; 原核表达

中图分类号: R 532. 3; Q 786 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2011) 01-0073-02

Function and prokaryotic expression of arginyl-tRNA-protein transferase in *Teania. saginata* LIU Yu-jiang, DAI Jia-lin, HUANG Jiang, et al Department of Multipul Morphology, Guiyang Medical College (Guiyang 550004, China)

Abstract **Objective** To predict structural characteristics of arginyl-tRNA-protein transferase in Teania. saginata by bioinformatics and to detect its prokaryotic expression. **Methods** By online analysis with bioinformatics websites and software package, the function of arginyl-tRNA protein tranferase gene was predicted and the gene was inserted into the prokaryotic expression vectors pET-28a(+) and amplified with PCR and its sequence was determined. **Results** A novel cDNA sequence encoding arginyl-tRNA-protein transferase with a molecular weight of 56436. 3 was identified. The cDNA is 1476bp and codes 491 amino acids. PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing indicated that pET-28a(+) and arginyl-tRNA-protein transferase recombinant plasmid were successfully constructed. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) results showed that the gene expressed in Escherichia coli BL21/DE3. **Conclusion** A novel gene of Teania. saginata is successfully identified and expressed by prokaryotic vectors.

Key words: Teania. saginata; arginyl-tRNA-protein transferase; bioinformatics; prokaryotic expression

带绦虫是常见的人兽共患寄生虫,中国北部和西部地区是较严重的流行区。近年来,本课题组构建了 3种人体带绦虫成虫全长 cDNA质粒文库进行对比研究,以期研究 3种绦虫结构、生长发育、物质和能量代谢、侵袭和免疫调节[1-2]。本研究从牛带绦虫成虫 cDNA质粒文库中筛选出精氨酰 – tRNA转移酶基因的同源基因,并构建原核表达载体,为进一步研究其生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1. 1 材料

1. 1. 1 载体与菌株 牛带绦虫虫体标本采自广东省湛江市医院患者;原核表达质粒 (pET– 28a) (+)及大肠埃希菌 BL– 21/DE3(中山大学热带病防治教育部重点实验室惠赠)。

1. 1. 2 主要试剂和工具酶 TaKaRa Ex Taq TM 酶 (含 dNTP)、EcoR I、Hind III、DNA标准 (DL15000, DL2000) (大连宝生物工程公司); T4 DNA连接酶 (美国 promega公司); 质粒提取试剂盒 (广州东盛科技公司); DNA凝胶回收试剂盒 (广州铂尔生物科技公司)。

1. 2 方法

1. 2. 1 精氨酰 – tRNA转移酶基因的识别及扩增 将获得的牛带绦虫精氨酰 – tRNA转移酶基因进行 BLASTX分析[3] (http: //www. ncbi nlm. nih. gov/BLAST),判断该基因是否为全长基因,目的基因序列测序是否正确;再利用蛋白分析专家系统 Expasy预测蛋白质的理化性质、、一级结构、亚细胞定位序列、氨基酸序列的跨膜区和拓扑结构以及二级结构、分子的亲水性、溶液中的分子形态等。最后根据已获得的该基因全长编码序列的开放阅读框,利用软件设计引物 (引物由上海联合基因公司合成),分别带上 EcoR I和 Hind III的酶切位点进行 PCR反应。

1. 2. 2 重组原核表达质粒的构建及鉴定 PCR产物和 pET– 28a(+)载体分别用 EcoR I和 Hind III双酶切,回收、连接后转入大肠埃希菌 BL– 21/DE3感受态细胞,对阳性克隆依次进行质粒的提取、双酶切和 PCR鉴定,并进行重组质粒 DNA测序鉴定 (测序由英俊科技股份有限公司完成)。

2 结 果

2. 1 BLASTX分析 从分析结果看,该基因是精氨酰 – tRNA转移酶的同源基因,与小鼠的同源性较高,是较保守的基因。该基因全长 1 476 bp,编码区为 141~ 1 617 bp,编码 491个氨基酸,在 5′端和 3′端都有非翻译区。

2. 2 蛋白质的理化性质 牛带绦虫精氨酰 – tRNA转移酶基因的理论分子量为 56 436. 3 Da,当成熟肽 N端的一个氨基酸为蛋氨酸时,在哺乳动物网状红细胞体外表达的半衰期为 30 h,在酵母和大肠埃希菌中体内表达的半衰期分别大于 20和 10 h。在溶液中的不稳定指数为 48. 57,高于域值 40,在溶液中性质不很稳定。

2. 3 翻译后修饰与结构的特征性序列及拓扑结构预测 6个潜在的酪蛋白激酶Ⅱ (CK2)位点, 3个潜在 N – 肉豆蔻酰

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30760227);贵州省农业科技攻关〔黔科合 NY字 (2009– 3074) 〕;贵州省科技攻关 (2009– 3101);贵州省省长基金〔黔省专合字 (2009) 82号〕;贵阳市科技局社发攻关项目 (2009– 3005)

作者单位: 1. 贵阳医学院多媒体形态学、法医学、寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550004

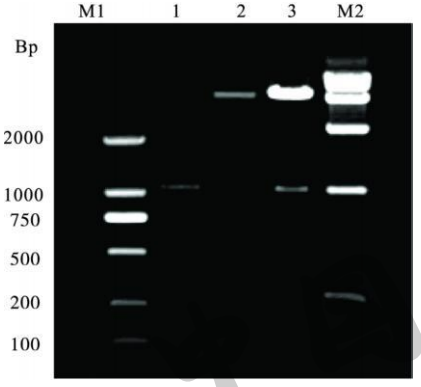
作者简介: 刘玉江 (1960–), 女, 贵州人, 讲师, 本科, 研究方向: 病原生物学。

通讯作者: 黄江, E-mail: mmm_h@ gmc. edu. cn

位点, 11个潜在的蛋白激酶磷酸化位点。拓扑结构预测牛带绦虫精氨酰 – tRNA 转移酶为非跨膜蛋白。未发现线粒体、过氧化酶体、溶酶体和细胞核等亚细胞定位序列。

2.4 一级结构中包含的结构和功能域特征序列 该氨基酸序列中含有 2个 ATE保守的催化位点基序。其结构域分为 N端和 C端两个部分。

2.5 原核重组载体的鉴定(图 1) 将重组质粒进行 PCR和双酶切鉴定, 产物行 10 g/L琼脂糖凝胶鉴定。第 1泳道为 PCR结果, 出现条带位置大约与目的基因 1 476 bp大致相符; 第 2泳道为双酶切结果, 可以看到质粒被切成两条带, 下边条带位置与目的基因相符。以上初步证明重组质粒构建成功。



注: M1: DNA标准 (DL2000); 1: PCR产物; 2重组质粒双酶切; 3质粒双酶切; M2: DNA 标准 (DL 15000)。

图 1 重组质粒的 **PCR**和双酶切鉴定

3 讨 论

构建 3种人体带绦虫成虫 cDNA质粒文库为研究绦虫的功能基因组学提供了丰富的资源, 同时也利于比较 3种绦虫的进化、遗传、致病等方面的研究。精氨酰 – tRNA 转移酶催化翻译后的特殊氨基酸蛋白结合到受体蛋白氨基末端这一反应, 其在真核生物可将不稳定的氨基酸结合到短寿命的蛋白中, 成为蛋白降解N末端规律途径的一个组成部分[4]。前期, 对亚洲带绦虫成虫精氨酰 – tRNA 转移酶基因进行了初步的探索, 并成功的构建了原核表达质粒。本次实验, 从牛带绦虫文库中也筛选出该基因, 补充了在带绦虫领域对这个控制蛋白质的降解基因更多的了解。

在进行实验验证之前, 生物信息学所获得的信息可以指导实验, 以避免实验的盲目性[5]。对牛带绦虫精氨酰 – tRNA 转移酶基因进行生物信息学分析, 通过 BLASTX 从牛带绦虫 cDNA文库中识别出了该基因的全长编码基因, 但是预测该基因与其他物种的精氨酰 – tRNA 转移酶基因同源性不是很高, 可以暗示该基因可以作为诊断的候选基因。蛋白质理化性质分析表明, 该蛋白在原核和真核表达系统及水溶液中的稳定性不高, 说明该蛋白不适宜于基因工程表达, 这就需要找寻另一条表达途径。

本研究在生物信息学预测牛带绦虫精氨酰 – tRNA 转移酶的结构和功能之外, 还成功构建了牛带绦虫该基因的原核表达载体。在下一步的实验中, 还可以对其进行诱导表达及免疫学功能的研究, 为掌握该酶在致病、免疫、代谢、生理等各方面的规律, 和寻找有开发价值的绦、囊虫诊断、疫苗以及药物靶标抗原基因提供更加完善的理论基础。

参考文献

〔1〕 黄江, 胡旭初, 徐劲, 等. 亚洲牛带绦虫 26kDa GST基因表达及免疫学分析[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(8): 970 – 972.

〔2〕 戴鹏, 戴佳琳, 黄江等, 亚洲牛带绦虫 TaCRISP基因的克隆、表达和序列分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(4): 398 – 400.

〔3〕 Vullo A, Frasconi P. Disulfide connectivity prediction using recursive neural networks and evolutionary information[J]. Bioinformatics, 2004, 20: 653 – 659.

〔4〕 Kwon YT, Kashina AS, Davydov IV, et al. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development[J]. Science, 2002, 297(5578): 96 – 99.

〔5〕 尚丹, 国强华, 景霞. 常用医学生物信息学[M]. 北京大学医学出版社, 2003: 148 – 258.

收稿日期: 2010-05-07 (蔡天德编辑 郭长胜校对)

【实验研究】

间歇性重度低氧对大鼠学习记忆影响*

王红阳[1,2], 杨林[2], 陈宝元[1]

摘 要: 目的 建立不同暴露时间点大鼠间歇重度低氧模型, 探讨间歇重度低氧对大鼠学习记忆功能的影响。方法 成年雄性 Wistar大鼠 48只分为对照组和间歇性低氧组; 采用低氧舱模拟 5%间歇低氧环境。在间歇低氧 2、4、6、8周采用 Morris水迷宫检测学习记忆功能, 苏木精 – 伊红(HE)染色观察海马区神经细胞形态变化。结果 与对照组比较, 间歇性低氧组中神经细胞形态结构损伤明显, 存活神经元密度(13.18 ± 2.18)随低氧时间延长降低($P < 0.05$); 低氧 2、4、6、8周大鼠逃避潜伏期时间分别为(49.17 ± 8.87)、(58.47 ± 6.98)、(65.15 ± 7.44)和(68.42 ± 7.91) s, 随低氧时间延长动物逃避潜伏期时间延长($P < 0.5$)。结论 间歇性低氧可造成神经细胞损伤、学习记忆功能障碍, 且随间歇性低氧时间延长而加重。

关键词: 间歇性重度低氧; 学习记忆功能; Morris水迷宫

中图分类号: R 766.7 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2011)01-0074-03

* 基金项目: 河北省重大科研课题资助项目(09276103D – 11)

作者单位: 1. 天津医科大学总医院呼吸科, 天津 300052; 2 华北煤炭医学院附属医院

作者简介: 王红阳(1958 –), 女, 辽宁人, 教授, 博士, 研究方向: 慢性缺氧与认知障碍。

通讯作者: 陈宝元, E-mail: cbynew@yahoo.com.cn