

刺激隐核虫 ADP/ATP 载体蛋白基因的克隆和分子特征分析

刘程, 倪炜, 郭果为, 原丽平, 陈金铃, 徐阳, 叶忠锋, 王正朝, 黄晓红

(福建师范大学 生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福建 福州 350108)

摘要: 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)是严重危害海水鱼类的寄生纤毛虫, 为了对其进行分子水平的研究, 采用 SMART 技术构建了刺激隐核虫滋养体期的 cDNA 文库, 并随机挑取克隆做 EST 测序, 获得大量克隆的基因。从中挑选 ATP/ADP 载体蛋白基因同源物(*CiAAC*)的克隆进一步测序获得全长的 cDNA 序列。该序列全长为 1029bp, 包含编码 287 个氨基酸的开放阅读框。用 RT-PCR 分析了其在刺激隐核虫各时期的表达情况, 并应用生物信息学分析方法, 对 *CiAAC* 基因进行不同物种的系统进化树分析、功能区分分析、物理性质分析、疏水性分析、跨膜结构域预测、亚细胞定位、二级结构预测等等。结果表明: *CiAAC* 蛋白在刺激隐核虫各时期均有表达; 据预测, 它为六次跨膜蛋白, 与卵形肠虫(*Nyctotherus ovalis*)的 ADP/ATP 载体蛋白的同源性最高, 相似性达 65%; 蛋白为疏水性, 并定位于刺激隐核虫的细胞质中。随后实验中通过对基因的定点诱变, 将纤毛虫的非通用密码进行改造后, 构建了 pGEX-4T-1/*CiAAC* 表达载体。以上实验为病原生物刺激隐核虫 *CiAAC* 载体蛋白的研究及应用提供了基础资料。

关键词: 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*); ATP/ADP 载体蛋白; 分子特征

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)01-0044-08

doi: 10.11759/hyhx20120629002

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)属纤毛虫类寄生虫, 于 1938 年由 Sikama 首次在日本报道^[1-4]。它在热带及亚热带区域可引起海水鱼的刺激隐核虫病, 俗称“白点病”, 可导致鱼的大量死亡^[1]。近年来, 随着中国东南沿海海水养殖业的快速发展, 刺激隐核虫病的爆发流行频发, 造成了重大的经济损失, 成为经济鱼类养殖业发展的瓶颈^[3], 因此, 刺激隐核虫是很重要的病原微生物, 但目前对该病原的生物学研究还不够深入, 特别是在分子层面上, 仅见几篇有关抑动抗原或表面抗原的报道。为了更好地认识该病原生物学的分子基础, 丰富刺激隐核虫病的理论知识, 以便为后继的防治工作提供指导, 本研究室开展了该病原生存和感染的分子基础的系列研究。

这一系列研究始于刺激隐核虫 cDNA 文库的构建: 提取滋养体及包囊时期的刺激隐核虫 mRNA 后, 首先用 SMART 技术 (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)以 λ TripIEx2(λ 噬菌体的 DNA)为载体, 构建了刺激隐核虫的全长 cDNA 文库。该文库是用噬菌体外壳蛋白包装的, 因此是以活的噬菌体形式存在的。基因的克隆是通过直接挑取 cDNA 文库形成的噬菌斑的方式进行的, 将噬菌斑里的噬菌体溶出, 转染入 BM25.8 细菌的菌株中, 由该细菌

内源性表达的重组酶(Cre 酶)对噬菌体的重组的 λ TripIEx2 进行切割形成重组质粒 pTripIEx2 DNA, 将重组质粒 DNA 的插入片段进行测序, 获得表达序列标签(EST)序列, 通过使用 NCBI 中的 BlastX 对 EST 序列进行在线同源性分析, 获得一系列的基因信息, 与其对应的克隆一起, 初步建立了 EST 文库。EST 文库中的 ATP/ADP 载体蛋白(简称 AAC)作为真核生物体线粒体膜上一种跨膜蛋白^[4], 介导线粒体与细胞质基质之间的 ADP/ATP 交换^[5], 在通过氧化磷酸化作用产生 ATP 给细胞提供能量的过程中起着中心的作用, 是保持细胞内能量平衡的关键成分。并且, 一些寄生生物在寄生宿主时 AAC 将自身的 ADP 与宿主细胞质内的 ATP 进行交换, 在摄取宿主能量过程中起关键作用^[6-8]。而且 AAC 作为负责能量分子传导的转运蛋白, 在细胞凋亡调控网络中也具有重要的作用^[9], 当细胞程序性死亡启动后, AAC 作为线粒体膜通透性转换孔复合物(mitochondrial per-

收稿日期: 2012-06-29; 收回日期: 2012-09-28

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2008J0004, 2010J01145); 国家自然科学基金项目(31040084); 福建省人才建设项目

作者: 刘程(1988.3), 女, 山东省聊城市人, 在读研究生, 主要从事病原分子生物学研究, E-mail: chengzi32551@126.com; 黄晓红, 通信作者, 研究员, E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn

meability transition pore complex, mtPTPC)的关键组分参与调节线粒体膜通透性转换孔的开放^[10, 11], 使线粒体外膜通透性增加, 细胞色素 c 释放到细胞质进一步促进细胞凋亡^[12, 13]。

综上所述, AAC 是生物体内能量产生与能量消耗的桥梁, 与细胞的发育、繁殖和凋亡密切相关。因此, 本研究根据刺激隐核虫 EST 文库中的序列信息, 挑取了含刺激隐核虫 AAC 基因(*CiAAC*)的细菌克隆(即含有 pTripIEx2/*CiAAC* 质粒), 对其进行亚克隆和特征分析, 以期能为进一步研究刺激隐核虫的能量代谢及其在生长、繁殖及细胞凋亡中的作用奠定基础, 为刺激隐核虫病原生物学提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 虫体样品

刺激隐核虫(XP7.2)采自福建省霞浦县溪南镇白沙角养殖区自然感染的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[14], 褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)购自福建马尾水产市场。

1.1.2 细菌与质粒

质粒 pGEX-4T-1、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、以及 BL21 菌株均由本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 *CiAAC* 基因的序列分析

根据 EST 序列信息, 找出其对应的细菌克隆后, 用载体 pTripIEx2 上的一对通用引物 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3'和 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'对 *CiAAC* 的全长基因进行了测序, 然后使用在线软件对 *CiAAC* 基因序列所推演的氨基酸序列进行物理性质、疏水性、跨膜结构域、亚细胞定位及二级结构等特性进行分析预测。并将 *CiAAC* 基因及其编码的多肽链序列提交 GenBank, 获得的登录号为: JX020705。

1.2.2 *CiAAC* 与其他物种的 AAC 的系统发育

检索 GenBank 数据库获得其他各类生物共 15 种 AAC 蛋白质的氨基酸序列, 其序列信息如表 1 所示。其中人类有 4 个同种异形体, 褐家鼠(*Rattus norvegicus*)有两个同种异形体。对 *CiAAC* 与这 15 种不同 AAC 蛋白质的氨基酸序列进行多重序列比对, 比对结果根据步长值中临近法构建系统发生树。

1.2.3 *CiAAC* 基因在不同发育时期的表达分析

分别用 TRIzol 试剂提取刺激隐核虫包囊、滋养体/包囊前体及幼虫各期的总 RNA(按照 TRIzol 试剂盒作逆转录 PCR, 简要地说, 就是分别在 10 μ L 逆转录 PCR(RT-PCR)反应液中, 加入 500 ng 的各期的总 RNA 为模板, 采用 oligodT-Adaptor primer 作为引物进行反转录, 反应条件为 30 $^{\circ}$ C, 10 min; 45 $^{\circ}$ C, 30 min; 95 $^{\circ}$ C, 5 min。分别获得滋养体/包囊前体、包囊和幼虫单链 cDNA。分别以这 3 种单链 cDNA 为模板, 以 5'-ACGGATCCGCAGTTTCAAAAAGCAGCA-3', 5'-ACGTCGACTCAGAATTTCCCTGGCTC-3'为引物对 *CiAAC* 基因进行 PCR, 反应进行 20 个循环。反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s 及 72 $^{\circ}$ C, 60 s。同时选取刺激隐核虫的肌动蛋白基因 (*CiActin*, GenBank 登录号: JN399999.1)为内参照, 取等体积 3 个单链 cDNA 为模板, 以引物(5'-ATGGCCGAAGACTAACAAGCAG-3'及 5'-TCAGAAGCATTTTCTGTGTACA-3')进行 PCR, 反应参数是 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 60 s, 20 个循环。反应结束后, 各个 PCR 产物分别取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 ImageJ 1.40 g 软件分别测出各自的光密度值, 然后获得各时期 *CiAAC* 基因与 *Actin* 基因 PCR 产物电泳后的光密度比值, 即为每个时期 *CiAAC* 基因的表达相对量, 各相对量之间采用 Two-way ANOVA 统计学方法进行分析。

1.2.4 *CiAAC* 基因的定向诱变

由于 *CiAAC* 的开放阅读框中具有一些纤毛虫等生物特有的遗传密码, 即用通用的终止密码子 TAA 和 TAG 编码谷氨酰胺, 所以它不能在细菌等常规的表达系统中表达。为了克服这一局限, 本实验拟将非通用编码改造成通用的, 即把 TAA 和 TAG 诱变成 CAA 和 CAG。

1.2.4.1 诱变引物的设计与合成

根据 *CiAAC* 开放阅读框去除信号肽编码区后的序列, 按照 GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System(Invitrogen)使用说明书设计表 1 所示诱变引物, 并由 Invitrogen 公司合成:

1.2.4.2 *CiAAC* 基因的定点诱变

首先按照 TIANprep Mini Plasmid Kit 的方法提取 pTripIEx2/*CiAAC* 质粒; 并按照 GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)说明书对第一位点进行 PCR 诱变; 简单地说, 就是先将 pTripIEx2/*CiAAC* 在 DNA 甲基化酶的作用下甲基化, 然后用相应的一对诱变引物进行 PCR, 形成诱变后

表 1 各诱变位点相应的诱变引物(下划线标注为诱变的碱基)

Tab.1 Mutagenic primers of the mutated sites (Mutated bases were labeled by underlines)

诱变位点	引物序列
100 th	5'-CGTGTC AAGCTCTTGTTA <u>CAGACA</u> CAAGA-3' 5'-TAACAAGAGCTTGACACGTTCTATTGGTG-3'
250 th	5'-CTTAGATACTTCCCAACCC <u>AAGCTT</u> AAAA-3' 5'-GGTTGGGAAGTATCTAAGAACATTGGCGA-3'
610 th	5'-AGACTCATT <u>TTTGGGAA</u> CAGAAAGCTT-3' 5'-TTCTCCAAAAATGAGTCTTCTTCCAGTG-3'
898 th	5'-GCTGTA <u>ACTGCCATGAGCC</u> AGGGAAAAAT-3' 5'-GCTCATGGCAGTTACAGCTCTGTGGAAT-3'

的线性的质粒分子。将 PCR 产物转化入细菌, 甲基化过的模板质粒 DNA 被 *McrBC* 内切酶酶切, 只剩下诱变好的线性质粒在细菌内环化。然后挑取单克隆摇菌送 Invitrogen 公司测序; 测序结果经 Bioedit 比对验证诱变是否成功。其余位点按照以上步骤逐一诱变。最终 *CiAAC* 基因开放阅读框内的 TAA 或 TAG(终止密码)被替换为 CAA 或 CAG(谷氨酰胺)。

1.2.5 *CiAAC* 基因的亚克隆载体构建及鉴定

1.2.5.1 引物的设计与合成

通过 Signal P 3.0 Server 软件分析 *CiAAC* 基因的信号肽位置, 从切割位点处设计加酶切位点的引物。Primer1: 5'-ACGGATCCGCGAGTTTCAAAGCAGCA-3', Primer2: 5'-ACGTCGACTCAGAATTTTCCCTGGCTC-3'下划线部分分别为 *BamH I* 及 *Sal I* 的识别位点。

1.2.5.2 *CiAAC* 基因的扩增及纯化

以诱变成功的序列为模板, Primer1 及 Primer2 为引物做 PCR。反应条件为 94℃下预变性 10 min, 随后在 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃下延伸 60 s, 共 35 个循环, 最后在 72℃下延伸 10 min。

使用酚氯仿方法(Phenol-chloroform-isoamylol 25:24:1, PH8.0)抽提上述 PCR 产物中 DNA, 使用无水乙醇沉淀, 70%乙醇漂洗, 弃上清, 室温干燥后溶于 20 μL 双蒸水, -20℃保存备用。

1.2.5.3 载体及目的基因的双酶切

使用 *BamH I* 和 *Sal I* 两种酶对 pGEX-4T-1 载体及纯化后的 *CiAAC* 基因进行双酶切, 然后进行琼脂糖凝胶电泳, 切胶后分别回收 pGEX-4T-1 载体及 *CiAAC* 基因, 回收产物溶于 20 μL 双蒸水, -20℃保存备用。

1.2.5.4 重组质粒的连接及转化

CiAAC 基因与 pGEX-4T-1 载体按照分子数为 3:1 加样, 加入 Solution I 混匀, 16℃连接过夜。连接产物转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞。涂布到含有氨

苄青霉素的 LB 平板培养基上, 37℃培养约 16 个小时。

1.2.5.5 重组质粒的鉴定

挑取单克隆菌落, 采用碱裂解法小量抽提重组质粒 DNA, 进行 PCR 及酶切检测, 并送公司测序。

2 结果及分析

2.1 *CiAAC* 基因的 cDNA 分子特征及其推导氨基酸的生物信息学分析

2.1.1 *CiAAC* 基因的 cDNA 分子特征

图 1 显示, 该基因全长 cDNA 为 1029 bp, 其开放阅读框为 912bp, 编码一个由 287 个氨基酸组成的多肽链, 据预测该氨基酸的 N 端具有由 16 个氨基酸组成的信号肽, 说明这是一个分泌性蛋白或膜蛋白, 该基因的开放阅读框中含 2 个 TAA 及 3 个 TAG。

采用 NCBI Blast 对上述序列进行保守区域分析, 结果如图 2 所示, 刺激隐核虫 AAC 含有 3 个线粒体载体蛋白(Mitochondrial carrier protein, Mito_carr)功能区域。

2.1.2 物理性质分析

对去除信号肽编码片段的 *CiAAC* 基因推演的氨基酸序列分析, 预测 *CiAAC* 成熟蛋白含 287 个氨基酸, 分子量约为 31.6 kDa; 理论等电点为 9.87; 在哺乳动物体外的半衰期为 4.4 h, 酵母体内的半衰期大于 20 h, 在大肠杆菌体内的半衰期大于 10 h; 预测 *CiAAC* 蛋白不稳定指数为 25.34, 归类为稳定蛋白。

2.1.3 疏水性分析

通过 ProtParam 在线预测该蛋白的疏水性, 蛋白质的总平均亲水性(GRAVY 值)为 0.038, 说明是疏水性蛋白。

2.1.4 跨膜区域及信号肽预测

使用在线软件 TMHMM2 预测 *CiAAC* 蛋白的跨膜区域, 结果发现, *CiAAC* 蛋白可能有 6 个跨膜区,

```

1  AAAATAAAAATAAAAATAAAAATCTTGATAAAAATGGGTGGTAACTTTTTAATTGATTCTTTGTAGGAGGTGTGTCAGCTGCAGTT
1  M G G N F L I D F F V G G V S A A V
86  TCAAAAGCAGCAGTTGCACCAATAGAACGTGTCAGCTCTTGTTA TAGACATAAGACGCTAACAAAGAAAATTCAGAGGGCAAA
19  S K A A V A P I E R V K L L L Q T Q D A N K K I Q E G K
170 GCCAAAAGGTATACCGGAATCATTGATTGCTTCAGCAGAGTTGCCAAGGAAGAAGGTGTAGGTGCTCTATGGAGAGGAAACTTC
47  A K R Y T G I I D C F S R V A K E E G V G A L W R G N F
254 GCCAATGTTCTTAGATACTTCCCAACC TAAAGCTTTAAACTTTGCTTTTAAGGATACTTACAAAAAGTACTTGTGCCCATTTAAT
75  A N V L R Y F P T Q A L N F A F K D T Y K K Y L C P F N
338 CCAAAAAGTGA AAAATTCAAATCTCTCTGGGGAATTTGGCATCTGGAGGTGCTGCAGGTGCCTCATCCCTTATGTTTGTATAT
103 P K T E K F K F F L G N L A S G G A A G A S S L M F V Y
422 CCTCTTGACTTTGCCAGAACTAGATTGGCTGCTGATATTGAAAGGGAGCCGGAGAGACAATTCATGGTTTAGGAGACTGT
131 P L D F A R T R L A A D I G K G A G E R Q F H G L G D C
506 ATTGGAAGATTTTCAAATCCGACGGACCCAAGGGTCTTTATCAAGGATTCTCCATTTCCAGTCTGGGCATTATTGTGTACAGA
159 I G K I F K S D G P K G L Y Q G F S I S V L G I I V Y R
590 GCATGCTATTTTCGGAGGATTCGACACTGGAAGAAGACTCATTTTTGGAGAA TAGAAAGCTTCGATTATCGGAAGATTTGTTTTT
187 A C Y F G G F D T G R R L I F G E Q K A S I I G R F V F
674 GCTCAATGCGTGACCGCTGTCTAGTGAATTATTAGCTATCCTCTTGATACTGTAAGGAGAAGACTTATGATGCAATCTGGAAGA
215 A Q C V T A V S G I I S Y P L D T V R R R L M M Q S G R
758 AAACAAATCTATATACTGGAACCATAGATTGCTTCCGAAAAATATATGCAAATGAAGGAGTTAAGTCCATTTTTCAAGGGA
243 K Q I L Y T G T I D C F R K I Y A N E G G L S P F F K G
842 GCCATGAGCAATGTATTCCAGAGGTGTTGGAGCAAGTTTAGTTTTGGTACTTTTGAAGAATCCACAGAGCTGTAACCTGCCATG
271 A M S N V F R G V G A S L V L V L Y E E F H R A V T A M
926 AGCTTAGGGAAAATTTCTGAAAACAATGAAAACTTTTTTTCATGGTTCAATATAATCAAAGACTTATTATAAAAGCCAAAAA
299 S Q G K F * 304
1010 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1029
    
```

图 1 *CiAAC* 的全长 cDNA 序列及其根据其编码区推定的氨基酸序列(下划线标记部分为信号肽, 加粗字体标记的为各诱变位点, 虚线下划线标记的为 PX(D/E)XX(K/R)序列, 双下划线标记的为 RRRLMM 序列)

Fig. 1 The overall cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *CiAAC* (Signal peptide was labeled by underline, every site was labeled by overstriking, PX(D/E)XX(K/R) sequence was labeled by broken underline, RRRLMM sequence was labeled by double underline)

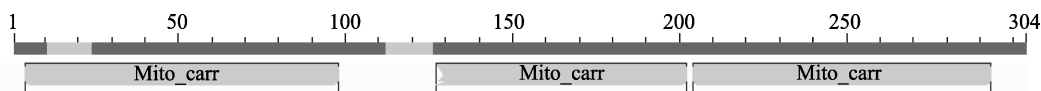


图 2 *CiAAC* 基因编码的氨基酸序列保守区域分析

Fig. 2 Conserved sequence analysis of *CiAAC* gene coded amino acid sequence

即 TM1~TM6, 其中 TM1、TM2、TM6 跨膜不明显, TM3、TM4、TM5 为明显跨膜区域。

2.1.5 二级结构预测

使用 PSA(Protein sequence analysis)在线分析蛋白质二级结构, 结果发现, *CiAAC* 蛋白二级结构由 α -螺旋(H)、 β -折叠(E)、 β -转角(T)和无规则卷曲(C)组成, 其组成比例分别是 34.7%、33.2%、18.8%、19.2%, 其二级结构以 α -螺旋为主。

2.2 *CiAAC* 基因的系统进化分析

本实验选择了表 2 中所示 15 种不同 AAC 蛋白的氨基酸序列与 *CiAAC* 构建的系统发生树(图 3)。

图 3 的进化树显示本实验所选的 16 种 AAC 蛋白被分成两个主要分支, 其中立克次氏体及沙眼衣原体为一分支, 其余真核生物为另一分支。从图中发现, 刺激隐核虫与卵形肠虫和游仆虫亲缘关系较近, 与原核生物亲缘性较远。

表 2 从 NCBI 数据库获得 15 种不同 AAC 蛋白质的氨基酸序列

Tab.2 15 different AAC protein sequences obtained from NCBI

AAC 简称	物种	学名	蛋白质序列号
HsAAC1	人	<i>Homo sapiens</i>	NP_001142.2
HsAAC2	人	<i>Homo sapiens</i>	NP_001143.2
HsAAC3	人	<i>Homo sapiens</i>	NP_001627.2
HsAAC4	人	<i>Homo sapiens</i>	NP_112581.1
CeAAC	秀丽小杆线虫	<i>Caenorhabditis elegans</i>	CAA53718.1
PtAAC	草履虫	<i>Paramecium tetraurelia</i>	XP_001455739.1
NoAAC	卵形肠虫	<i>Nyctotherus ovalis</i>	AAM97609.1
EsAAC	游仆虫	<i>Euplotes sp.</i>	AAM97613.1
RnAAC1	褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_445967.1
RnAAC2	褐家鼠	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_476443.1
OsAAC	水稻	<i>Oryza sativa</i>	P12857.2
TtAAC	小麦	<i>Triticum turgidum</i>	CAA56325.1
AtAAC	拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE85477.1
RrAAC	立克次氏体	<i>Rickettsia rickettsii</i>	CAD45265.1
CtAAC	沙眼衣原体	<i>Chlamydia trachomatis</i>	AAC68096.1

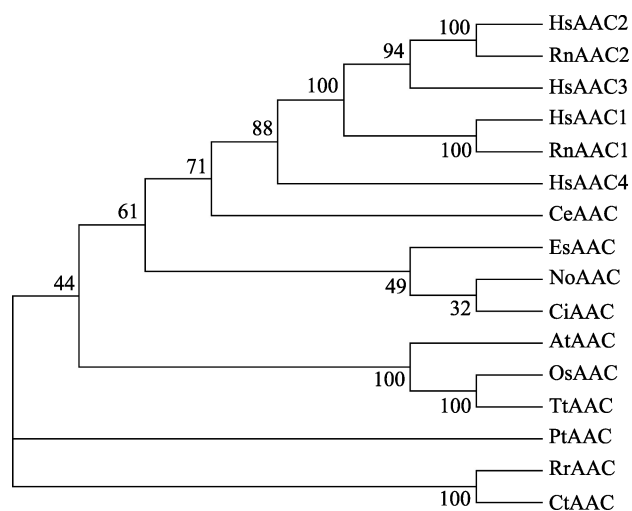


图 3 基于 16 种不同 AAC 蛋白核苷酸序列构建的 NJ 系统发生树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogeny tree of 16 AAC protein Sequences

2.3 *CiAAC* 基因在不同发育时期的表达分析

以刺激隐核虫生活史 3 个时期的 cDNA 为模板, 体外扩增 *CiAAC* 基因并进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 4 所示: 3 个时期均发现大小为 880bp 左右的基因片段, 与去除信号肽并以 Primer1 和 Primer2 为引物扩增的 *CiAAC* 的基因片段大小一致。ImageJ 1.40g 软件分别测出各自的光密度值, 然后获得各时期 *CiAAC* 基因与 *Actin* 基因 PCR 产物电泳后的光密度比值, 图中各期依次为 86.27%、87.82%、86.87%, 各

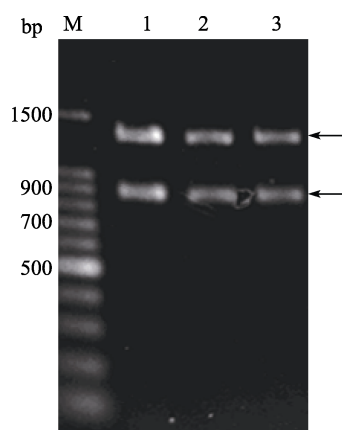


图 4 *CiAAC* 基因在不同发育期的 RT-PCR 结果

Fig. 4 The expression analysis of *CiAAC* gene in different stages

M. 标准分子量 DNA: 1. 幼虫期; 2. 滋养体期/包裹前体; 3. 包裹期
M. DNA ladder; 1. theont; 2. trophont/protomont; 3. tomont

相对量之间采用 Two-way ANOVA 统计学方法进行分析。结果发现 3 个时期 *CiAAC* 基因的表达量无显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4 *CiAAC* 的定点诱变及重组表达质粒 pGEX/*CiAAC* 的构建结果

CiAAC 的开放阅读框先后经过了 6 次 PCR 定点诱变, 每诱变一次后, 均测序验证, 再进行下一次的诱变。经 6 轮诱变后, 序列分析结果显示, 所有 6 个非通用编码已经诱变成通用的编码。将诱变后的编码成熟蛋白的序列插入表达载体 pGEX-4T-1, 获得重组质粒, 命名为 pGEX/*CiAAC*。

pGEX/CiAAC 经过 *Bam* HI 和 *Sal* I 双酶切后, 结果如图 5 所示, 得大小约为 880 bp 的片段。环状重组质粒与酶切后线性质粒电泳速度不同, 经测序后, 发现重组质粒中的插入片段的核苷酸序列与 *CiAAC* 的一致。

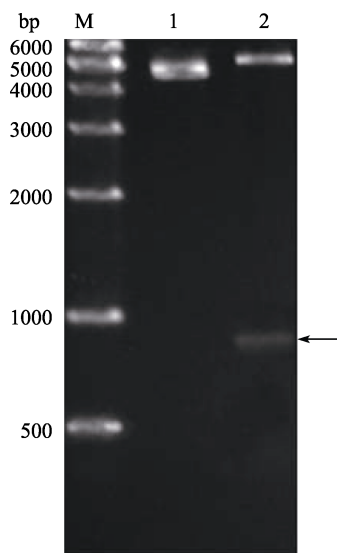


图 5 pGEX/CiAAC 重组质粒酶切鉴定和 *Sal* I 双酶切后的结果)
Fig. 5 The recombinant vector pGEX/CiAAC after digestion by *Eco*RV and *Nco*I

M. 标准分子量 DNA; 1. 超螺旋的重组质粒 pGEX/CiAAC; 2. pGEX/CiAAC 经 *Bam*HI

M. DNA ladder; 1. recombinant plasmid pGEX/CiAAC of Supercoiling ; 2. recombinant plasmid pGEX/CiAAC digested by both *Bam*HI and *Sal*I

3 讨论

AAC 催化胞质的 ADP 与线粒体基质内 ATP 的交换, 为真核细胞新陈代谢提供能量^[15]。ADP 与 ATP 的交换可以说是氧化磷酸化过程的最后一个步骤, 因此 AAC 的活性对细胞的生长及代谢具有十分重要的作用。

通过构建系统进化树分析发现, *CiAAC* 与一些原生生物类亲缘关系较近, 其次为真核生物, 与原核生物的亲缘关系最远, 与 *CiAAC* 来自原生生物刺激隐核虫的事实一致。研究发现, 不是所有的线粒体载体蛋白家族都定位在线粒体^[16, 17]。本实验中通过蛋白亚细胞定位预测发现刺激隐核虫的 AAC 也可能存在于细胞质基质。2003 年, Edmund R. S. Kunji 报导了酵母的 ADP/ATP 载体蛋白 3 的立体结构投影图^[18]。同时, Eva Pebay-Peyroula 等人利用 X-射线晶体学技术及其活性抑制剂胶苍朮苷对牛线粒体中的 AAC 结构进行了研究, 发现其有 6 个 α -螺旋跨膜结构^[19], 而其 N 端和 C 端分布在膜内^[20]。*CiAAC* 的跨膜结构预测结果与其他生物 AAC 蛋白类似。AAC 是已知的最小的功能转运元件^[21], 其多肽链中的 PX(D/E)

XX(K/R)序列是所有线粒体载体家族特有的一段序列, *CiAAC* 同样具有这段序列。不同于线粒体载体家族的其他蛋白^[22], 多种 AAC 蛋白都含一段 RRR-*MMM* 序列, 该序列位于 AAC 转运的重要位置, 吸引 ADP 结合到 AAC 蛋白上, 从而激发转运的发生, *CiAAC* 的氨基酸序列中相应的序列为 RRRLMM 序列, 与 RRRMMM 略有不同。因为, 在 RRRLMM 序列中起重要作用的是 3 个精氨酸, 而甲硫氨酸则由于其较大的分子结构作为塞子控制运输通道^[22], 所以一个甲硫氨酸改变为分子结构更大的亮氨酸影响不大。而且, 我们发现, 系统树构建中与刺激隐核虫亲缘关系最近的卵形肠虫(*Nyctotherus ovalis*)AAC 蛋白序列中也是 RRRLMM 序列。*CiAAC* 还含有 3 个线粒体载体蛋白功能区域。同时, ADP/ATP 转运活性还受到其他因素的影响, 包括物质结合能力及其环境, 还包括膜能力和膜两侧物质浓度。虽然有人对 AAC 的活性形式提出了质疑, 但更多的人认为 AAC 的转运活性必须以二聚体形式实现的^[16-17]。AAC 具有两种构象, 即 c-构象和 m-构象, 其中 TM2 螺旋的改变可能是构象转换的原因^[23]。AAC 对核苷酸的转运功能是两种构象转换的结果。但从上述跨膜区域预测结果发现, TM2 跨膜结构较不明显, 并且亚细胞定位发现, *CiAAC* 定位在线粒体的可能性不高, 更可能定位在细胞质, 这是一个令人感兴趣的结果。说明 *CiAAC* 属于线粒体载体家族, 但可能还有其他未知的功能。但也不排除 PSORT 数据库不够完善, 故需要进一步实验验证。

实验中虽然成功构建了原核表达载体 pGEX/*CiAAC*, 尝试诱导表达之后并没有检测到重组 *CiAAC* 蛋白, 通过对诱导与未诱导的重组菌株的生长情况的比较发现, 诱导后的大肠杆菌基本上没有增殖, 可能是由于 *CiAAC* 整合在大肠杆菌膜上并发挥转运活性^[24, 25]影响了细菌增殖, 也可能是 *CiAAC* 属于疏水蛋白表达后对宿主菌产生毒性所致^[25]。他人的研究也发现了同样的现象, 可能的解决方案是将一些残基进行突变以中和极性氨基酸^[27-29], 或者改变一些氨基酸的稀有密码子, 如编码精氨酸三联体(RRR)中精氨酸的密码子^[30], 采用特殊的只表达包涵体的载体^[24, 26]也可能是方法之一, 但目前仍无确定有效地方法, 因此这方面还有待于进一步研究。

AAC 的活性在生物体内并不是一成不变的。研究发现, AAC 活性在同种生物的不同生命时期显著不同, 位于老年鼠心脏的 AAC 活性是新生鼠的 5 倍。AAC

活性增加的原因部分是因为蛋白质含量的增加,更主要的原因是(ATP+ADP)腺苷酸池的增加^[31]。综上,AAC在生命过程中具有十分重要的作用。本实验对刺激隐核虫的AAC基因的初步研究,为进一步研究刺激隐核虫的生长、繁殖及能量代谢提供指导作用,并为刺激隐核虫病原生物学方面研究提供一定的基础资料。

参考文献:

- [1] Colorni A, Burgess P. Cryptocaryon irritans Brown 1951, the cause of white spot disease in marine fish: an update[J]. Aquar Sci Conserv, 1997, 1(4): 217-238.
- [2] 王昌各, 王月香. 大黄鱼刺激隐核虫病的防治[J]. 水产科技情报, 2002, 2: 48-49.
- [3] 郑尧兰. 闽东大黄鱼刺激隐核虫病发病原因及综合防治措施[J]. 内陆水产, 2003, 9: 3 0-31.
- [4] Kim Y H, Haidl G, Schaefer M, et al. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece[J]. Dev Biol, 2007, 302(2): 463-476.
- [5] Klingenberg M. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1778(10): 1978-2021.
- [6] Pereira C, Chaves S, Alves S, et al. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier[J]. Mol Microbiol, 2010, 76(6): 1398-1410.
- [7] 刘加彬, 潘国庆, 程道军, 等. 家蚕微孢子虫 cDNA 文库的构建及部分 EST 同源性分析[J]. 蚕业科学, 2004, 30(4): 363-366.
- [8] Chan K W, Slotboom D J, Cox S, et al. A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite Entamoeba histolytica [J]. Curr Biol, 2005, 15(8): 737-742.
- [9] Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 835-840.
- [10] Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, et al. Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(11): 1419-1425.
- [11] Gallerne C, Touat Z, Chen Z X, et al. The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(5): 623-629.
- [12] Pereira C, Camougrand N, Manon S, et al. ADP/ATP carrier is required for mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release in yeast apoptosis[J]. Mol Microbiol, 2007, 66(3): 571-582.
- [13] Pereira C, Chaves S, Alves S, et al. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier[J]. Mol Microbiol, 2010, 76(6): 1398-1410.
- [14] 孙志宇, 郑昌峰, 武晓燕, 等. 福建霞浦海区刺激隐核虫虫株鉴定及生活史观察[J]. 福建师范大学学报: (自然科学版), 2011, 2: 101-108.
- [15] Pfaff E, Klingenberg M. Adenine nucleotide translocation of mitochondria[J]. Eur J Biochem, 1968, 6(1): 66-79.
- [16] Kunji E R. The role and structure of mitochondrial carriers[J]. FEBS Lett, 2004, 564(3): 23 9-244.
- [17] 张积森, 黄金存, 叶冰莹, 等. 甘蔗 ADP/ATP 转运蛋白酶基因克隆及其序列的生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(20): 49-53.
- [18] Kunji E R S, Harding M. Projection structure of the atractyloside-inhibited mitochondrial ADP/ATP carrier of Saccharomyces cerevisiae[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(39): 36985-36988.
- [19] Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, et al. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside[J]. Nature, 2003, 426(6962): 39-44.
- [20] Trézéguet V, Le Saux A, David C, et al. A covalent tandem dimer of the mitochondrial AD P/ATP carrier is functional in vivo[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1457(1-2): 81-93.
- [21] Bamber L, Harding M, Monne M, et al. The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(26): 10830.
- [22] Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, et al. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside[J]. Nature, 2003, 426(6962): 39-44.
- [23] Kihira Y, Iwahashi A, Majima E, et al. Twisting of the second transmembrane alpha- helix of the mitochondrial ADP/ATP carrier during the transition between

- two carrier conformational states [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(48): 15204-15209.
- [24] Fiermonte G, Walker J, Palmieri F. Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria[J]. *Biochem J*, 1993, 294(Pt 1): 293.
- [25] Haferkamp I, Hackstein J H, Voncken F G, et al. Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269(13): 3172-3181.
- [26] Laage R, Langosch D. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins [J]. *Traffic*, 2001, 2(2): 99-104.
- [27] Heidkämper D, Müller V, Nelson D R, et al. Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on transport and the four ATP versus ADP exchange modes[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(50): 16144-16152.
- [28] Müller V, Heidkämper D, Nelson D R, et al. Mutagenesis of some positive and negative residues occurring in repeat triad residues in the ADP/ATP carrier from yeast[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(50): 16008-16018.
- [29] Müller V, Basset G, Nelson D R, et al. Probing the role of positive residues in the ADP/ATP carrier from yeast. The effect of six arginine mutations on oxidative phosphorylation and AAC expression[J]. *Biochemistry*, 1996, 35(50): 16132-16143.
- [30] Heimpel S, Basset G, Odoy S, et al. Expression of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15): 11499-11506.
- [31] Sch nfeld P, Schild L, Bohnensack R. Expression of the ADP/ATP carrier and expansion of the mitochondrial (ATP+ ADP) pool contribute to postnatal maturation of the rat heart[J]. *Eur J Biochem*, 1996, 241(3): 895-900.

Cloning and molecular characterization of ADP/ATP carrier from *Cryptocaryon irritans*

LIU Cheng, NI Wei, GUO Guo-wei, YUAN Li-ping, CHEN Jin-ling, XU Yang, YE Zhong-feng, WANG Zheng-chao, HUANG Xiao-hong

(Fujian Key Laboratory of Developmental Biology and Neuroscience, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Received: Jun., 29, 2012

Key words: *Cryptocaryon irritans*; ADP/ATP carrier; molecular characterization

Abstract: *Cryptocaryon irritans* is a ciliated protozoa parasiting on marine fishes, which results in severe economic loss in mariculture. ADP/ATP carrier (AAC) plays important roles in living organisms. In this study, a cDNA of AAC homolog (1029 bp) was isolated from a cDNA library of *Cryptocaryon irritans* (*CiAAC*). The open reading frame (ORF) of *CiAAC* was 864 bp encoding a protein of 287 aa. The functional region, physical properties, hydrophobicity, transmembrane domains, sub-cellular localization and protein secondary structure of the putative *CiAAC* protein were predicted by using the bioinformatics methods. Phylogenetic tree of 16 AAC proteins from different species was constructed. The transcription profiles at different stages of life cycle were analyzed. The results showed that the putative *CiAAC* protein was highly hydrophobic and contained six transmembrane domains. It was homologous to AAC from *Nyctotherus ovalis* with an identity of 65%. *CiAAC* is more likely located in the cytosol. *CiAAC* gene was expressed at all stages as detected by using reverse transcriptase PCR. After site-directed mutagenesis of the ORF by PCR, the gene was sub-cloned into pGEX-4T-1. As a result, pGEX/*CiAAC* expression vector was constructed. This study has provided basic information of *CiAAC* carrier protein for further researches.

(本文编辑: 谭雪静)