

刺激隐核虫甘油醛-3-磷酸脱氢酶的分子特征

付国良^{1,2}, 单金红¹, 胡燕红¹, 谢金珠¹, 晏燕花^{1,2}, 黄晓红¹

(1. 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 350117; 2. 江西省东乡县第一中学, 江西 东乡 331800)

摘要: 从刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)滋养体/包囊前体 cDNA 文库中筛选出了甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*CiGAPDH*), 定点诱变 *CiGAPDH* 基因开放阅读框内的非通用密码子后, 构建其原核表达载体 pGEX-4T-3/*CiGAPDH*, 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 用异丙基硫式-B-D-半乳糖苷诱导表达, 结果大肠杆菌成功表达了 r*CiGAPDH* 蛋白。用抗 r*CiGAPDH* 蛋白的鼠血清进行免疫印迹分析, 结果抗血清能够识别刺激隐核虫各期虫体的天然 *CiGAPDH* 蛋白, 其表观分子质量为 37.3 ku, 与根据氨基酸序列推算的理论值相符; 实验表明 r*CiGAPDH* 蛋白具有很好的免疫原性, 而且 *CiGAPDH* 在生活史的各阶段均有表达, 符合持家基因的特征。利用间接免疫荧光抗体实验(IFAT)检测天然 *CiGAPDH* 蛋白在刺激隐核虫幼虫上的定位, 结果表明天然 *CiGAPDH* 蛋白主要分布在幼虫的细胞质内, 且在胞口位置分布最多。对 *CiGAPDH* 的进一步研究可能为刺激隐核虫感染的药物靶点的寻找多条线索。

关键词: 刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 原核表达; 定位

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2016)02-0011-09

doi: 10.11759/hyhx20150412002

刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)是一种寄生于热带、亚热带海水鱼皮肤和鳃部的遍身性纤毛虫, 隶属于前口纲(Prostomatea)、前管目(Prorodontida)、隐核虫科(Cryptocaryonidae)、隐核虫属(*Cryptocaryon*)^[1]。刺激隐核虫最早于1937年由日本学者Sikama在海水观赏鱼身上发现^[2], 其生活史大致可分为滋养体(trophonts)、包囊前体(protomonts)、包囊(tomonts)和幼虫(theronts)等4个阶段^[3], 幼虫对鱼类血清和黏液有趋向性, 可主动寻找宿主^[4]。它的宿主范围广泛, 除莹斑篮子鱼(*Siganus oramin*)外, 几乎所有海水硬骨鱼类都是刺激隐核虫的易感宿主^[5-6]。刺激隐核虫病以病鱼皮肤、鳃和眼出现大量小白点为特征, 俗称“海水小瓜虫病”^[3, 7]或“白点病”^[3]。由于刺激隐核虫在适宜条件下, 完成一个生活史所需的时间很短(不到一周), 而且繁殖率又很高, 每轮生活史虫数可增加200多倍, 很容易在密度大的养殖鱼类中爆发流行, 造成鱼类的群体死亡, 给海水硬骨鱼的集约化养殖带来了巨大的经济损失。因此, 寻找有效的防治方法至关重要。目前, 由于对刺激隐核虫的病原生物学缺乏深入研究, 尚无有效且安全的预防和治疗方案。虽然采用物理和化学药物治疗^[8]及中草药治疗^[9]刺激隐核虫病, 能起到一定的效果, 但或多或少都存在一些不足, 如药物对鱼的毒性, 鱼体活力下降、停止摄

食、药物在鱼体内的残留等, 既不能彻底治愈刺激隐核虫病, 还会造成食品安全和环境污染隐患。随着基因重组和分子生物学技术的发展和运用, 从分子水平上研究刺激隐核虫的病原学, 进而寻找有效防治方法已成为人们关注的重点。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是维持生物生命活动的一个关键酶, 参与糖酵解、糖原异生以及卡尔文循环等能量代谢过程, 与ATP的合成密切相关^[10]。该酶参与细胞的基本代谢过程, 其编码基因被认为是持家基因^[11]。GAPDH几乎在所有组织中都高水平表达且通常在同种组织或细胞中表达量基本恒定, 所以被广泛作为抽提总RNA及蛋白质免疫印迹(Western blot)等操作的标准化依据^[12]; 其主要功能是在各组织细胞中以四聚体的形式催化3-磷酸甘油醛生成1, 3-二

收稿日期: 2015-07-07; 修回日期: 2015-10-11

基金项目: 福建省教育厅JK项目(JK2013008); 福建省自然科学基金项目(2014J01120); 福建省农业重大专项(2013NZ0002-5)

[Foundation: The work was supported by grants from JK project from Fujian Provincial Department of Education (JK2013008), Natural Science Foundation of Fujian Province (2014J01120), and Major Project in Agriculture of Fujian Province (2013NZ0002-5)]

作者简介: 付国良(1988-), 男, 江西九江人, 硕士, 主要从事病原分子生物学研究, E-mail: fu-guo-liang@163.com; 黄晓红, 通讯作者, 教授, E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn

磷酸甘油酸,是糖酵解反应的关键酶。随着对 GAPDH 功能的深入研究,人们发现 GAPDH 除了作为关键酶参与能量代谢外,还参与许多其他生理功能,如参与 DNA 复制和 DNA 损伤修复^[13-14]、促进细胞凋亡^[15]、参与膜融合和膜转运^[16]等,从而引起细胞功能的变化,因此 GAPDH 是一个多功能酶,与生物体内能量产生以及生命活动正常有序的进行密切相关。虽然目前针对 GAPDH 的研究报道很多,但有关刺激隐核虫甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*CiGAPDH*)基因的相关报道至今未见。作者根据刺激隐核虫 cDNA 文库中的 EST 序列信息,筛选得到含刺激隐核虫 *GAPDH* 基因(Genbank 登录号: KP662711)的克隆,构建了 pGEX-4T-3/*CiGAPDH* 的重组质粒,在 *E. coli* BL21(DE3)菌中进行重组蛋白的诱导表达,并对表达产物进行了亲和层析纯化和鉴定,以期为进一步研究 *CiGAPDH* 在刺激隐核虫的能量代谢及其在生长、发育中的作用奠定基础,为研究刺激隐核虫病原生物学提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

刺激隐核虫 XP7.2 虫株于 2009 年 7 月采自福建霞浦,并在本实验室传代培养。实验用宿主鱼是褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*),购自福建马尾海产批发市场,无特定病原(specific pathogen free, SPF)级昆明小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。刺激隐核虫 XP7.2 株的滋养体 cDNA 文库由本实验室构建。含重组质粒 pTripIEx2/*CiGAPDH* 的 *Escherichia coli* BM25.8、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、pGEX-4T-3 均由本实验室保存。

1.2 *CiGAPDH* 基因序列及其蛋白的分子进化分析

根据 EST 序列信息找出对应的细菌克隆后,再利用 pTripIEx2 上的一对通用引物(上游引物为 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3',下游引物 5'-TAA TACGACTCACTATAGGG-3')进行测序,将测序结果与 Genbank 中的已知基因进行比对,鉴定出这个基因为 GAPDH,然后使用在线软件找出 *CiGAPDH* 基因的开放阅读框及推导出其编码的氨基酸序列,并对氨基酸序列的结构域以及亚细胞定位进行预测,再利用 Mega4.0 软件以 NJ 法构建 *CiGAPDH* 基因的系统发生树。

1.3 反转录 PCR(RT-PCR)检测 *CiGAPDH* 基因的时空表达情况

首先根据 *CiGAPDH* 及 *CiActin* 基因的开放阅读框,分别设计 *CiGAPDH* 及 *CiActin* 基因的特异性引物。*CiGAPDH* 基因的上游引物序列:(CP1)5'-ACGGATCCATGGCTGATAAACATTAC-3';下游引物序列:(CP2)5'-ACCTCGAGTCAATGTAAATTCCATC-3',*CiActin* 基因的上游引物序列(AP1)5'-ATGGCCGAAGACTAACAAGCAG-3';下游引物:(AP2)5'-TCAGAAGCATTTTCTGTGTACA-3'。用 Trizol 试剂盒(Takara,大连)分别提取刺激隐核虫滋养体/前包囊、包囊、幼虫各期虫体总 RNA,用微量分光光度计检测提取的总 RNA 浓度。按照 RNA PCR 试剂盒(avian myeloblastosis virus, AMV)Ver.3.0(Takara,大连)的说明建立 10 μ L 反应体系,分别逆转录得到相应发育期虫体的单链 cDNA。反应条件为:30 $^{\circ}$ C 10 min、42 $^{\circ}$ C 30 min、95 $^{\circ}$ C 5 min、5 $^{\circ}$ C 5 min。以上述制备的各期虫体的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,分别加入引物 AP1、AP2 扩增 *CiGAPDH*,加入 AP1、AP2 扩增 *CiActin*,反应条件为:*CiGAPDH* 基因为(94 $^{\circ}$ C 30 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 10 s) \times 30 个循环。内参基因 *CiActin* 为(94 $^{\circ}$ C 30 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s) \times 30 个循环。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,检测 *CiGAPDH* 基因在刺激隐核虫各期虫体中的时空表达情况。

1.4 *CiGAPDH* 基因的定向诱变及原核表达载体的构建

CiGAPDH 基因的开放阅读框中含有 3 个非通用密码子(2 个 TAA 和 1 个 TAG),为了在大肠杆菌表达系统里成功表达,需要将它们诱变为 CAA 和 CAG,根据 *CiGAPDH* 的基因序列,按照 GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System 试剂盒(Invitrogen,加利福尼亚州,美国)说明书设计诱变引物(表 1)。按照质粒 DNA 小量提取试剂盒(Biospin Plasmid DNA Extraction Kit)(BioFlux,杭州)的操作说明,提取重组质粒 pTripIEx2/*CiGAPDH* 后进行质粒的甲基化反应,产物作为诱变 PCR 反应的模板,加入 142th 诱变引物,配制诱变反应液进行 PCR 反应,形成诱变后的线性质粒分子;将 PCR 产物转入到 *E. coli* DH5 α 细胞,甲基化过的模板质粒 DNA 被 *Mcr*BC 内切酶酶切,只剩下诱变好的线性质粒在细菌内环化。然后送往生工生物工程股份有限公司测序,用 BioEdit 进行

序列对比分析正确后,用同样的方法依次对 187th 和 919th 位点进行诱变。根据诱变后的 *CiGAPDH* 基因开放阅读框的序列,设计亚克隆引物,上游引物序列: 5'-ACGGATCCATGGCTGATAAACATTAC-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点); 下游引物序列 5'-ACCTCGAGTCAATGTAAATTTCCATC-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。以三次诱变成功后的重组质粒 pTripIEx2/*CiGAPDH* 为模板,加入亚克隆引物进行 PCR 反应,反应条件为: (94°C 30 s, 54°C 30 s, 72°C 1 min

10 s)×30 个循环。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收。用限制性核酸内切酶 *Bam*H I(Takara, 大连)和 *Xho* I(Takara, 大连)分别双酶切纯化的 PCR 产物和载体 pGEX-4T-3, 酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收并纯化,按 1:3 的摩尔比混合载体片断与目的基因片断,加入 T4 连接酶将回收的片段连接起来,目的基因片段重组至原核表达载体 pGEX-4T-3 上,将连接产物转化入 *E. coli* DH5 α , 挑取阳性克隆在生工生物工程有限公司测序鉴定。

表 1 *CiGAPDH* 基因各诱变位点的诱变引物
Tab. 1 Mutagenic primers of *CiGAPDH*

诱变位点	引物序列
142 th	5'-ATTGACTATATGACCTATCAATTCAAATAT-3' 5'-ATAGGTCATATAGTCAATATCCATAAATG-3'
187 th	5'-AACTGAAAGGAGAAGTCCAGAAAAAAGGC-3' 5'-GACTTCTCCTTTCCAGTTACCATGAATAG-3'
919 th	5'-GATGCAGCTGCAGGAATACAACCTAACAAA-3' 5'-TATTCTGCAGCTGCATCGAAAATAGAAG-3'

1.5 重组蛋白 rCiGAPDH 在大肠杆菌中的诱导表达

将测序正确的重组质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 细胞中,37°C 过夜培养,挑取单菌落于 LB 培养基(含氨苄青霉素 50 mg/L)中,37°C 200 r/min 振荡培养过夜后,培养物以 1:100 的比例稀释,继续振荡培养数小时至 A_{600} 约为 0.3~0.5,加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) (生工生物工程股份有限公司,上海)至终浓度为 0.5 mmol/L,28°C 180 r/min 诱导外源基因表达 4 h。随后 10000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 4°C 预冷的 TNE 缓冲液重悬菌体,加入溶菌酶至浓度 100 mg/L,放置 1~2 min 置于冰上进行超声破碎,4°C,10000 r/min 离心 20 min,收集上清和沉淀。取部分上清用谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GST)SefinoseTM Resin 纯化胶(GST SefinoseTM Resin) (生工生物工程股份有限公司,上海)纯化。将菌体沉淀、菌体上清、纯化后的 rCiGAPDH 蛋白和 GST 分别加入等体积的 2 倍浓度的样本缓冲液中,沸水中加热变性 5 min,进行 SDS-PAGE(浓缩胶为 3%,分离胶为 12%),最后用考马斯亮蓝 G250 染色,鉴定重组蛋白的表达,BCA 蛋白定量检测试剂盒(生工生物工程股份有限公司,上海)测定蛋白浓度。

1.6 抗 rCiGAPDH 和 GST 蛋白鼠血清的制备

将纯化的 rCiGAPDH 和 GST 蛋白(由于重组蛋白含有 GST 蛋白,所以免疫小鼠时用 GST 做对照)在 PBS 中透析并调节浓度后,分别与等体积的弗氏佐剂(Sigma, 上海)充分乳化后腹腔注射 6 周龄的 SPF 级雌性昆明小鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司,上海),抗原蛋白剂量为 80 μ g/鼠。随后加强免疫 2 次,每次免疫间隔时间为两周。其中第一次免疫用弗氏完全佐剂,加强免疫均用弗氏不完全佐剂。免疫完成 10 d 之后从免疫小鼠的心脏穿刺取血,分离抗 rCiGAPDH 和 GST 蛋白鼠血清,-30°C 保存备用。

1.7 免疫印迹试验(Western blotting)鉴定重组蛋白的表达

蛋白样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,电转印到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,电转结束后 PVDF 膜用 3%的脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h,加抗血清(1:100 稀释),37°C 孵育 1 h。用 PBS 振荡清洗膜 3 次后加作为第二抗体的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体(MP biomedical,加利福尼亚州,美国)(1:1000),37°C 孵育 1 h。邻苯二胺(DAB, 0.5 mg/mL)显色后,用灭菌去离子水终止显色反应。

1.8 间接免疫荧光抗体试验(Indirect Immunofluorescent Antibody Test, IFAT) 检测天然 CiGAPDH 蛋白在幼虫中的定位

收集刺激隐核虫幼虫用 0.5%的甲醛溶液固定 30 min, 离心(1500 r/min, 5 min), 弃上清, 取 100 只左右的幼虫制片, 加抗 rCiGAPDH 蛋白鼠血清(1:100 稀释于 IFAT 稀释液中), 对照组加抗 GST 鼠血清(1:100 稀释于 IFAT 稀释液中), 37°C 孵育 1 h。PBS 洗玻片 3 次后分别加入 Alexa 594 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(Invitrogen, 加利福尼亚州, 美国)(1:100 稀释于 IFAT 稀释液中), 37°C 孵育 1 h。4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染核, 抗荧光淬灭 PVP 封片液(碧云天, 上海)封片, 观察并拍照。

2 结果及分析

2.1 CiGAPDH 基因的生物信息学分析结果

该基因的 cDNA 全长是 1143 bp, 开放阅读框为 1035 bp, 可编码 344 个氨基酸, 序列信息详见图 1。

预测 CiGAPDH 蛋白的分子质量约为 37.3 ku, 理论等电点 pI 为 6.66。该基因的开放阅读框中含有 3 个非通用密码子, 两个 TAA 和一个 TAG。它们在其他大多数生物中为终止密码子。为了能在大肠杆菌表达系统里表达 CiGAPDH 基因, 需要将它们诱变为编码谷氨酰胺的通用密码子 CAA 和 CAG。CiGAPDH 蛋白含两个结构域, 即位于 N 端的辅酶 NAD⁺ 结合结构域和位于 C 端的催化结构域, 详见图 2。用在线软件 PSORT Prediction 对刺激隐核虫 CiGAPDH 蛋白的亚细胞定位预测发现 CiGAPDH 蛋白主要定位在细胞质中。通过构建系统发育树发现 CiGAPDH 和海水派金虫及四膜虫的 GAPDH 同属一个进化枝(图 3), 说明它们彼此的亲缘关系较近, 这与它们同属于纤毛虫这一生物学分类地位相符。

2.2 CiGAPDH 基因的时空表达情况分析结果

以刺激隐核虫滋养体/前包囊期、包囊和幼虫的单链 cDNA 为模板, CiGAPDH 基因的特异性引物(CP1, CP1)为引物, 体外扩增 CiGAPDH 基因后进行琼脂糖凝胶电泳(以 CiActin 基因作为内参基因), 大约在 1035bp 处均有条带(图 4), 与理论值相符。表明

```

1  GGATTTTGATATAAAAAATTTCTCAAAAAATGGCTGATAAACATTACAATTTAGGTATAAATAGATTTCGGAAGAATCGGAAGA
      1 M A D K H Y N L G I N G F G R I G R
83  TTAGTTTGCAGAGCTGCTATTGAAAGTGGAAATGCAAAAGTAGTTGCAGTAAATGATCCATTTATGGATATTGACTATATG
19  L V C R A A I E S G N A K V V A V N D P F M D I D Y M
164 ATCTATTAATCAAAATATGACTCTATTTCATGGTAACTGGAAAGGAGAAAGTCTAGAAAAAAGGCAATGATTTGATAATCAAT
46  T Y Q F K Y D S I H G N W K G E V Q K K G N D L I I N
245 GGCCACACTATCAAAGTTTTCAATGAAAAAGACCCTCAAAATATTAATGGGGTGAAGCAGGTGCAGAAATATGTATGTGAA
73  G H T I K V F N E K D P A N I K W G E A G A E Y V C E
326 TCCACAGGTGCTTTCACAAGTCAAGAAAAAGCTGCTTTACACATCAAAGGAGGATGCAAAAAGGTGATAATATCTGCCCA
100 S T G V F T S Q E K A A L H I K G G C K K V I I S A P
407 CCTAAAGATGATACTCCTATGTTTGTAAATGGGAGTCAACATAAAGATTATAAAAAAGATTTAACTVTTGTCTCAANATGCT
127 P K D T P M F V M G V N H K K D Y K K D L T V V S N A
488 TCATGCACAACCAATTTGTTGGCACTTTTGACCAAAGTTATTAACGATAAATTCGGACTTATTGAAGGTCTCATGTCTACA
154 S C T T N C L A P L T K V I N D K F G L I E G L M S T
569 GTTCATGCTACTACATCCACTCAACTCACTGTTGATGGTCCCTTCTAAAGGAGGTAAAGACTGGAGAGCTGGAAGAGCTGCA
181 V H A T T S T Q L T V D G P S K G G K D W R A G R A A
650 GCTATTAATGTGATCCCATCTCAACTGGTGGTGCAAAAGCTGTAGGAAAGGTTATCAAAGCTGTGGCTGGAAAATTAACA
208 A I N V I P S T T G A A K A V G K V I K A V A G E L T
731 GGAATGGCTTTTAGAGTACCTACCGTTGATGTTTCAGTTGTTGATCTTACATGCAGAATTGAAAAGCAGCCACATATGAA
235 G M A F R V P T V D V S V V D L T C R I E K A A T Y E
812 GAAATTTGCAAAGCTATCAAAGAAGCCTCAGAAGGAGAAGCTCAAGGGAATTTTGGGATATACTGATGAAGCTGTAGTGAGC
262 E I C K A I K E A S E G E L K G I L G Y T D E A V V S
893 AGTGATTTTCATTGATAGCAGATCTTCTATTTTCGATGCAGCTGCAGGAATATAAAGCTTAAACAAAAATTTTCGTTAAGTTA
289 S D F I Y D S R S S I F D A A A G I Q L N K N F V K L
974 GTCGCATGGTATGACAAATGAATGGGGATATTCAAATAGATTAGTAGATCTTGGAAAATACATGGCTGAAATGATGGAAT
316 V A W Y D N E W G Y S N R L V D L G K Y M A E I D G N
1055 TTACATTGAGAAATTAATAATTTTTTACAAAAGATAAAAAAATTAATTTGAAAAATGAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA
343 L H * 344
1136 AAAAAAA 1143
    
```

图 1 CiGAPDH 基因的开放阅读框及其编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 The full-length cDNA sequence of CiGAPDH and its deduced amino acid sequence

下划线标记的部分为各诱变位点

Mutation sites are underlined

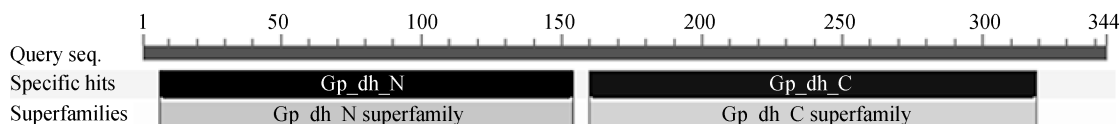


图 2 刺激隐核虫 CiGAPDH 蛋白的结构域预测

Fig. 2 The predicted conserved domain of CiGAPGH from *C. irritans*

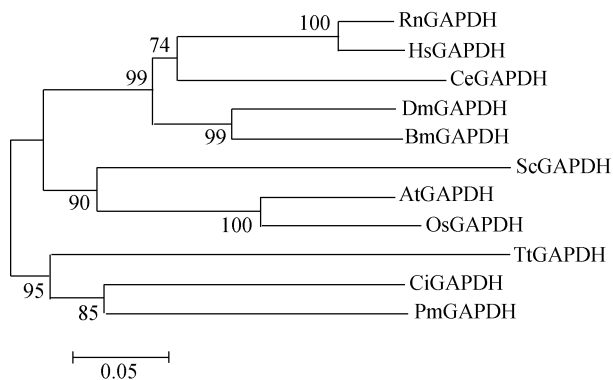


图 3 基于 11 种不同 GAPDH 蛋白氨基酸序列构建的 NJ 系统发生树

Fig. 3 Neighbor-joining phylogeny tree of 11 GAPDH proteins

RnGAPDH. 褐家鼠 GAPDH(*Rattus norvegicus*)GAPDH, NP_058704.1); HsGAPDH. 人类(*Homo sapiens*) GAPDH(NP_002037.2); CeGAPDH. 秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)GAPDH, (NP_508535.1); DmGAPDH. 果蝇(*Drosophila mojavensis*)GAPDH (XP_002005943.1); BmGAPDH. 家蚕(*Bombyx mori*)GAPDH (BAE96011.1); ScGAPDH. 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)GAPDH (EHN01682.1); AtGAPDH. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)GAPDH (NP_187062.1); OsGAPDH. 水稻(*Oryza sativa*) GAPDH (AAA82047.1); TiGAPDH. 四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)GAPDH(XP_001009203.1); PmGAPDH. 海水派金虫(*Perkinsus marinus*)GAPDH (XP_002788755.1)

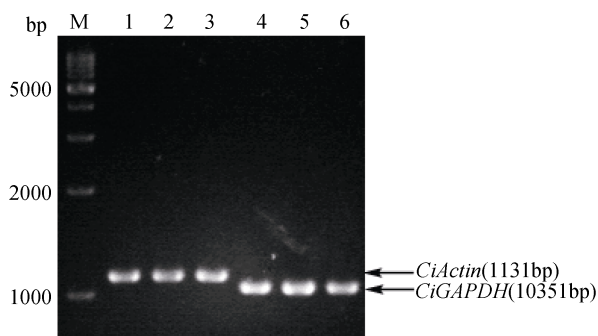


图 4 *CiGAPDH* 基因在刺激隐核虫不同发育期的表达情况

Fig. 4 *CiGAPDH* expression in *C. irritans* at different stages

M. 标准大小 DNA; 1, 4. 滋养体的 PCR 产物; 2, 5. 包裹的 PCR 产物; 3, 6. 幼虫的 PCR 产物

M. DNA 分子质量标准; 1, 4. PCR products of trophonts/protomonts; 2, 5. PCR products of tomonts; 3, 6. PCR products of theronts

CiGAPDH 基因在刺激隐核虫各发育阶段均有表达, 符合 *GAPDH* 基因为持家基因的性质。

2.3 *CiGAPDH* 基因的定向诱变

从刺激隐核虫的 cDNA 文库中筛选克隆的 *CiGAPDH* 基因依次进行 3 次定向诱变, 每次诱变后均对目标序列经过测序确认诱变结果。并利用 BioEdit 软件比对诱变前后序列, 结果表明所有需要诱变位点的 T 碱基都变成了 C 碱基。以诱变后的重组质粒 pTripIEx2/*CiGAPDH* 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 在约 1035bp 处出现目的条带(图 5), 与预期的基因长度值相符。

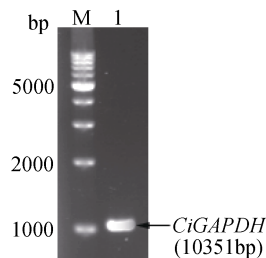


图 5 *CiGAPDH* 基因的扩增结果

Fig. 5 Amplification of the modified ORF of *CiGAPDH*

M. DNA 分子质量标准; 1. *CiGAPDH* 基因

M. DNA ladder; 1. *CiGAPDH*

2.4 原核表达载体的构建

上述 PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 与同样进行双酶切的 pGEX-4T-3 连接, 得到重组质粒 pGEX-4T-3/*CiGAPDH*, 转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中。随机挑取 3 个单菌落并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 酶切产物与预期大小一致(图 6)。提取初步鉴定成功的重组质粒进行测序, 结果显示插入基因与诱变后的 *CiGAPDH* 基因完全一致, 证明 *CiGAPDH* 基因被成功插入到 pGEX-4T-3 中, 即 pGEX-4T-3/*CiGAPDH* 构建成功。

2.5 重组蛋白 r*CiGAPDH* 的诱导表达

将重组质粒 pGEX-4T-3/*CiGAPDH* 转化入 *E. coli*

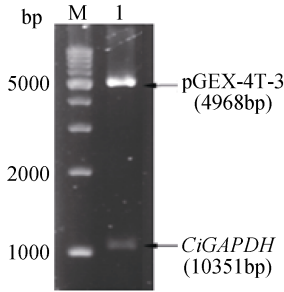


图 6 重组质粒 pGEX-4T-3/*CiGAPDH* 的双酶切鉴定
 Fig. 6 Identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/*CiGAPDH* by double restriction digestion
 M. DNA 分子质量标准; 1. 重组质粒经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后的结果
 M. DNA ladder; 1. The recombinant plasmid pGEX-4T-1/*CiGAPDH* was double digested with *Bam*HI and *Xho*I.

BL21(DE3)细胞中, 用 IPTG 诱导表达 4h 后, 超声破碎, 离心后收集上清和沉淀进行检测, 并用 GST 纯化胶对上清中的表达产物进行纯化。SDS-PAGE 结果显示: 在分子质量约为 63.3 ku 处有一明显条带, 与 GST-*CiGAPDH* 融合蛋白的预期大小一致 (*CiGAPDH* 的分子质量 37.3 ku, GST 为 26 ku), 在可溶相和不溶相中均有表达, 说明 *CiGAPDH* 基因在大肠杆菌中成功表达(图 7)。

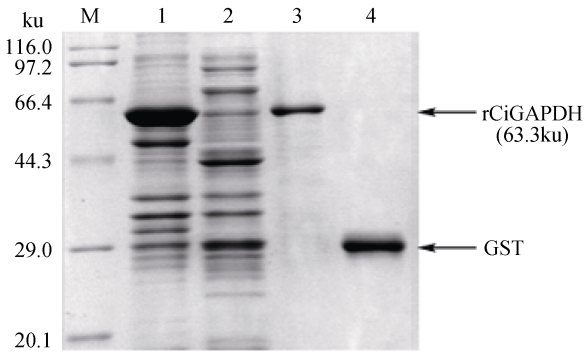


图 7 大肠杆菌表达重组蛋白 rCiGAPDH 的 SDS-PAGE 分析结果
 Fig. 7 Prokaryotic expression of recombinant *CiGAPDH* analyzed by SDS-PAGE
 M. 蛋白质分子质量标准; 1. 不溶性组分; 2. 可溶性组分; 3. 纯化后的重组蛋白; 4. GST
 M. Proteins with standard molecular mass: 1. Insoluble fractions, 2. Soluble fractions, 3. Purified r*CiGAPDH*, and 4. GST

2.6 重组蛋白 rCiGAPDH 的免疫印迹试验鉴定结果

刺激隐核虫滋养体/前包囊、包囊和幼虫全虫蛋白经 SDS-PAGE 后, 电转到 PVDF 膜上, 并以 GST 作对照, 用抗 r*CiGAPDH* 免疫鼠血清和抗 GST 免疫

鼠血清分别做第一抗体进行免疫印迹试验分析(图 8)。结果显示在分子质量约为 37.3 ku 处均有一条特异性反应条带, 说明刺激隐核虫内源性 *CiGAPDH* 的分子质量是 37.3 ku, 与理论预测值相符; 其次, *CiGAPDH* 蛋白在刺激隐核虫各期虫体内均有表达; 结果还表明 r*CiGAPDH* 蛋白具有很好的免疫原性。

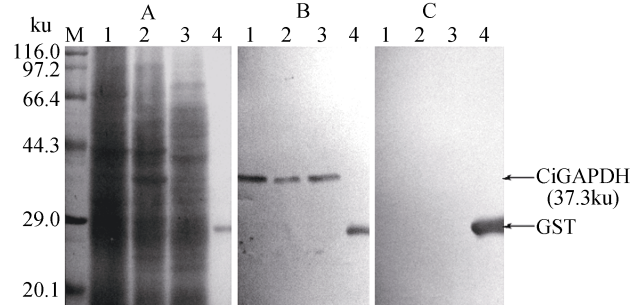


图 8 免疫印迹试验分析 r*CiGAPDH* 蛋白免疫鼠血清与刺激隐核虫天然 *CiGAPDH* 蛋白的抗原抗体反应
 Fig. 8 Western blot analysis of native *CiGAPDH* from *C. irritans* with mouse antiserum against r*CiGAPDH*
 A. 氨基黑 10B 染色; B. 一抗为 r*CiGAPDH* 免疫鼠血清; C. 一抗为 GST 免疫鼠血清
 M. 蛋白质分子质量标准; 1-3. 抗原分别为刺激隐核虫滋养体、包囊及幼虫裂解液; 4. 抗原为 GST
 A. Native *CiGAPDH* protein staining by amino black 10B, B. Native *CiGAPDH* reacted with antiserum against r*CiGAPDH*, C. Reaction with antiserum against GST
 M. markers: 1-3. Lysates of *C. irritans* trophonts, tomonts, and theronts, respectively, and 4. GST used as a control.

2.7 天然 CiGAPDH 蛋白在刺激隐核虫幼虫中的定位

以抗 r*CiGAPDH* 蛋白免疫鼠血清为第一抗体、Alexa 594 标记的羊抗鼠 IgG 抗体为第二抗体, 同时以抗 GST 鼠血清作对照, 运用 IFAT 法检测天然 *CiGAPDH* 蛋白在刺激隐核虫幼虫中的定位(图 9)。结果显示天然 *CiGAPDH* 蛋白主要分布在刺激隐核虫幼虫的细胞质内, 且在胞口位置分布最多, 这与 *CiGAPDH* 蛋白进行亚细胞定位预测的结果是一致的。

3 讨论

刺激隐核虫病严重危害我国东南沿海的经济鱼类养殖业, 被农业部列入二级动物疫病名录^[17-18], 对该病防治的重要性可见一斑。从分子生物学水平深入了解其病原生物学将对阻断该病的传播具有积极的意义。本实验通过对克隆自刺激隐核虫的 *GAPDH* 同源基因(*CiGAPDH*)的序列分析、对重组蛋

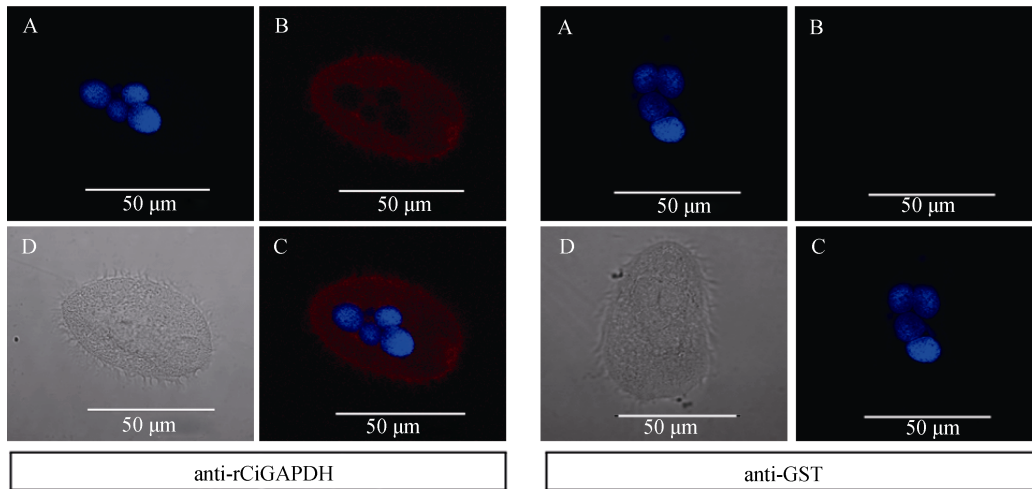


图9 天然 CiGAPDH 蛋白在刺激隐核虫幼虫中的免疫荧光定位结果

Fig. 9 Localization of native CiGAPDH in the theronts by IFAT

A. DAPI 染细胞核; B. 一抗为 rCiGAPDH 蛋白免疫鼠血清(左)或 GST 免疫鼠血清(右)的免疫荧光图; C. A 图与 B 图的叠加合并; D. 明场
A. Nucleus, B. Immunofluorescence figure with antiserum against rCiGAPDH (left) or GST (right), C. A merged image of Figs. A and B, D. Bright-field image

白的特征的分析、以及通过重组蛋白制备免疫血清,对刺激隐核虫各个发育期的内源蛋白的表达和定位的分析和检测,证实了该基因确属于 GAPDH 家族基因,具有如下特征: *CiGAPDH* 编码的多肽链中包含两个蛋白结构域,即位于 N 端的辅酶 NAD^+ 结合结构域和位于 C 端的催化结构域,这是该家族蛋白的显著特征;该多肽链与海水派金虫及四膜虫的 GAPDH 同属一个进化枝,彼此的亲缘关系较近,这与它们同属于纤毛虫这一生物学传统分类地位相符;从转录和翻译水平上都可以看出, *CiGAPDH* 在生活史各期均有表达,符合持家基因的性质;而且重组蛋白的表观分子量和内源蛋白的表观分子量均符合根据基因编码序列推测出的理论值; *CiGAPDH* 主要分布于细胞质中,这与 GAPDH 主要在细胞质内催化糖酵解反应这一功能相适应; *CiGAPDH* 基因还具有一些纤毛虫基因的特点: *CiGAPDH* 基因的开放阅读框中含有 3 个编码谷氨酰胺的非通用密码子(2 个 TAA 和 1 个 TAG, 它们在其他大多数生物中却为终止密码子)^[19]。

为了在大肠杆菌表达系统里成功表达这个带有非通用密码子的基因,本实验通过 PCR 定向诱变的方法,将它们诱变为编码谷氨酰胺的通用密码子 CAA 和 CAG,将诱变成功后的开放阅读框亚克隆到大肠杆菌中,将诱导表达出来的重组蛋白 rCiGAPDH 用来免疫 SPF 级雌性昆明小鼠,获得抗 rCiGAPDH 蛋白鼠血清,免疫印迹试验显示: rCiGAPDH 蛋白具有很好的免疫原性和反应原性,抗 rCiGAPDH 蛋白鼠

血清能够识别刺激隐核虫各期虫体的天然 CiGAPDH 蛋白。从而表明,通过基因诱变将纤毛虫的基因在常规的表达系统中表达是完全可行的。

GAPDH 是多功能的蛋白质,除了参与催化糖酵解为细胞提供能量外,还参与调控膜融合和膜转运过程^[20-25]等多种细胞过程,对 *CiGAPDH* 在刺激隐核虫的细胞生理以及感染方面的作用有待进一步研究,这些研究将为防治刺激隐核虫病药物靶点的发现提供理论基础。

参考文献:

- [1] Wright A D, Colorni A. Taxonomic re-assignment of *Cryptocaryon irritans*, a marine fish parasite. *European journal of protistology*[J]. 2002, 37(4): 375-378.
- [2] Sikama Y. Preliminary report on the white spot disease in marine fishes [J]. *Suisan-Gakukai-Ho*, 1937, 7: 149-160.
- [3] Colorni A, Burgess P. *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of white spot disease in marine fish: an update [J]. *Aquarium Sciences and Conservation*, 1997, 1(4): 217-238.
- [4] Luo X C, Xie M Q, Zhu X Q, et al. Some characteristics of host—parasite relationship for *Cryptocaryon irritans* isolated from South China [J]. *Parasitol Res*, 2008, 102 (6): 1269-1275.
- [5] Burgess P, Matthews R. Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) [J]. *Journal of fish biology*, 1995, 46(4): 727-729.
- [6] Diggles B K, Adlard R D. Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans* [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 1997, 44(1): 25-32.

- [7] Sikama Y. On a new species of Ichthyophthirius found in marine fishes [J]. Science Report of the Yokosuka City Museum, 1961, 6: 66-70.
- [8] Hirazawa N, Goto T, Shirasu K. Killing effect of various treatments on the monogenean Heterobothrium okamotoi eggs and oncomiracidia and the ciliate Cryptocaryon irritans cysts and theronts [J]. Aquaculture, 2003, 223(1-4): 1-13.
- [9] Kawano F, Hirazawa N. Antiparasitic effect of in-feed inhibitors of folic acid synthesis and dihydrofolate reductase against ciliate *Cryptocaryon irritans* infection in the red sea bream Pagrus major and against ciliate *Ichthyophthirius muhiifiliis* infection in black pop-eyed goldfish Carassius auratus [J]. Aquaculture, 2012, 330/331/332/333: 1-7.
- [10] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 74-75.
Wang Jingyan, Zhu Sengeng, Xu Changfa, et al. Biological Chemistry, 3rd ed[M]. Bei Jing: Higher Education Press, 2002: 74-75.
- [11] Viscogliosi E, Miiller M. Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates[J]. Mol Evol, 1998, 47(2): 190-199
- [12] Yan H, Lou M F, Fernando M R, et al. Thioredoxin, thioredoxin reductase, and alpha crystallin revive inactivated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human aged and cataract lens extracts[J]. Mol Vis, 2006, 12: 1153-1159.
- [13] Vollberg T M, Siegler K M, Cool B L, et al. Isolation and characterization of the human uracil DNA glycosylase gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(22): 8693-8697 .
- [14] Baxi M D, Vishwanatha J K. Uracil DNA-glycosylase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an Ap4A binding protein [J]. Biochemistry, 1995, 34(30): 9700-9707.
- [15] Tarze A, Deniaud A, Le Bras M et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization[J]. Oncogene, 2007, 26(18): 2606- 2620.
- [16] Morero R D, Vinals A L, Bloj B, et al. Fusion of phospholipid vesicles induced by muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the absence of calcium [J]. Biochemistry, 1985, 24(8): 1904-1909.
- [17] Yang T B, Chen A P, Chen W, et al. Parasitic diseases of cultured marine finfishes and their surveillance in China [J]. Parasitologia, 2007, 49(3): 193-199.
- [18] 苏跃中. 福建省主要养殖区海水网箱养殖鱼类刺激隐核虫病的调查及防控对策[J]. 水产科技情报, 2009, 36(1): 4-7.
Su Yuezhong. Prevention and cure of fish disease Surveys and control countermeasures of diseases of *Cryptocaryon irritans* in marine cage cultured fishes in the main cultured areas of Fujian province[J]. Fish Sci Technol Inform, 2009, 36 (1): 4-7.
- [19] Salim H M, Ring K L, Cavalcanti A R. Patterns of codon usage in two ciliates that reassign the genetic code: Tetrahymena thermophila and Paramecium tetraurelia [J]. Protist, 2008, 159(2): 283-298.
- [20] Morero R D, Vinals A L, Bloj B, et al. Fusion of phospholipid vesicles induced by muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the absence of calcium [J]. Biochemistry, 1985, 24(8): 1904-1909.
- [21] Robbins A R, Ward R D, Oliver C. A mutation in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells [J]. J Cell Biol, 1995, 130(5): 1093-1104.
- [22] Tisdale E J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway [J]. J Biol Chem, 2001, 276(4): 2480-2486.
- [23] Glaser P E, Han X, Gross R W. Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyzes membrane fusion: Implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(22): 14104-14109.
- [24] Bryksin A V, Laktionov P P. Role of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in vesicular transport from Golgi apparatus to endoplasmic reticulum [J]. Biochemistry-Moscow, 2008, 73(6): 619-625.
- [25] Tisdale E J, Kelly C, Artalejo C R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity [J]. J Biol Chem, 2004, 279(52): 54046-54052.

Molecular characterization of a Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Cryptocaryon irritans*

FU Guo-liang^{1,2}, SHAN Jin-hong¹, HU Yan-hong¹, XIE Jin-zhu¹, YAN Yan-hua^{1,2}, HUANG Xiao-hong¹

(1. Fujian Key Laboratory of Developmental and Neural biology, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China; 2. Dongxiang No.1 High School of Jiangxi, Dongxiang 331800, China)

Received: Jul., 7, 2015

Key words: *Cryptocaryon irritans*; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; prokaryotic expression; location

Abstract: A *GAPDH* gene (*CiGAPDH*) was cloned from the cDNA library of *Cryptocaryon irritans* trophonts. After modification, the non-universal genetic codons in the open reading frame (ORF) of *CiGAPDH* were inserted into plasmid pGEX-4T-3 to construct the prokaryotic expression plasmid pGEX-4T-3/*CiGAPDH*. The recombinant plasmids were transformed to *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells, which were then induced to express the foreign gene by the addition of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. SDS-PAGE results showed that r*CiGAPDH* was successfully expressed in *E. coli* cells. The results from Western blot analysis showed that antiserum against r*CiGAPDH* recognized the native *CiGAPDH* protein from different stages of *C. irritans*, the molecular mass of which was 37.3 ku, in agreement with the calculated mass. Localization of native *CiGAPDH* protein in theronts was detected using an indirect immunofluorescence cell imaging technique. The results showed that the native *CiGAPDH* protein was mainly distributed in the cytoplasm of *C. irritans* theronts, with notable accumulation around the cytostomes. Further study on the roles of *CiGAPDH* in the parasite development and infection is expected to provide important information to identify potential drug targets for control of cryptocaryosis.

(本文编辑: 梁德海)