

鲈鱼蛋白质感染因子蛋白基因的克隆和结构分析^①

张之文^② * ** 廖梅杰 * 杨官品^③ * 孙修勤 ** 邹桂伟 *** 危起伟 *** 汪登强 ***

(* 中国海洋大学 海洋生命学院 青岛 266003)

(** 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

(*** 中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000)

摘 要 采用 RT-PCR 方法分离了鲈鱼蛋白质感染因子蛋白编码基因序列,并进行了结构分析。研究证明,该感染因子蛋白由 507 个氨基酸组成,与红鳍东方、大西洋鲑蛋白质感染因子蛋白的平均相似性为 67.9%,预测分子量约 54kD,具有信号肽、短肽顺接重复、疏水区、糖基化位点、二硫键、糖基缩醛磷肌醇锚定位点等蛋白质感染因子蛋白的主要特征结构域。鲈鱼蛋白质感染因子蛋白编码基因序列的分离,为蛋白质感染因子的进化、功能研究以及可能存在的鱼类传染性海绵样脑病研究奠定了基础。

关键词 鲈鱼, 蛋白质感染因子蛋白, 传染性海绵样脑

0 引言

蛋白质感染因子 (proteinaceous infectious agent, prion), 是一种通过蛋白质本身诱发传染性海绵样脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSE) 的致病因子, 一般指鱼类、两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类动物及人等感染因子蛋白 (prion protein, PrP) 的凝聚体。PrP 由 *prnp* 及其同缘基因编码, 是一种与细胞膜结合而功能未知的糖蛋白^[1]。在一些目前还不清楚的情况下, PrP 可凝聚成 prion。唯蛋白复制假说认为 prion 能启动 PrP 凝聚成 prion, 新形成的 prion 进一步使更多的 PrP 凝聚成 prion^[2]。近年来, 人们也发现 RNA 等也可能与 prion 的复制有关^[3]。Prion 能在种内 (有时在种间) 传播、导致 TSE, 但 PrP 的生理功能、prion 形成原因与过程、prion 的结构等许多问题尚不清楚^[4,5]。鱼类、两栖类、爬行类、鸟类以及人类的 PrP 氨基酸序列变异非常大, 但都具有信号肽、顺接短肽重复、疏水区、糖基化位点、二硫键、糖基缩醛磷肌醇锚定位点等特征结构域^[6]。

鸟类、哺乳类和鱼类, 是三类最主要的食用脊椎动物。养殖鱼类有可能通过饲料中含 prion 的肉骨粉感染 TSE, 也可能通过鱼类加工下脚料或者低值鱼饲料蛋白形成鱼类 prion 和鱼类 TSE。从食品安全和可持续养殖角度考虑, 鱼类 prion 及其可能导致的鱼类 TSE 应引起我们的足够重视。另外, 鱼类

PrP 有助于理解 PrP 的进化、解析 PrP 结构与功能的关系, 也有助于研究鱼类对非鱼类 prion 的敏感性。

比较基因组学是分离鉴定新基因的重要途径^[7,8]。人们已鉴定出红鳍东方、大西洋鲑等的 PrP 编码基因的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST), 并进一步分离出完整的编码基因^[9,10]。但是, 决大多数鱼没有 EST 数据, 不能通过比较基因组学途径发现它们的 PrP 编码基因片段。考虑到同类生物 PrP 氨基酸序列存在一定的保守性, 本研究根据红鳍东方、大西洋鲑的 PrP 氨基酸序列设计了 PCR 引物, 采用 RT-PCR 方法克隆了鲈鱼的 *prnp* 同缘基因并进行了理论上的结构分析。鲈鱼养殖广泛, 是种类繁多的养殖鱼类的代表之一。鲈鱼 PrP 编码基因的克隆将为养殖鱼类可能存在的 prion 和 TSE 研究提供重要的基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

总 RNA 提取试剂盒购自上海生工。M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit、cDNA PCR Library Kit、TaKaRa Ex TaqTM HS 聚合酶、pMD18-T 载体等购自大连宝生物工程公司。鲈鱼活体购自青岛水产品市场。

1.2 方法

根据制造商提供的试剂盒使用指南提取鲈鱼脑

① 973 计划 (G1999012005)、农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题 (LFB20040503) 和国家自然科学基金 (40176028) 资助项目。

② 男, 1977 年生, 博士生, 研究方向: 分子生物学。

③ 联系人, E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn
(收稿日期: 2004-09-24)

组织总 RNA。经 1% 琼脂糖电泳,根据 28S 和 18S 核糖体 RNA 带的强弱和清晰度判断总 RNA 质量;根据酵母 tRNA 标准估计总 RNA 浓度。取约 10μg 总 RNA,组合使用 cDNA 合成、cDNA PCR 文库构建等试剂盒合成 cDNA 并加接头序列,在酵母 tRNA 的帮助下沉淀 cDNA,溶于 20μl 水,于 -20℃ 保存备用。

根据红鳍东方鲢、大西洋鲑 PrP 较保守的顺接短肽重复区和疏水区,设计简并 PCR 引物 stF:5'-GGG GGA(T) TAC(T) CCA AAC(T) CAG AAC(T) CC-3'和 stR:5'-CGA GGG AAA CGC CCA AGG(T) CCA(G) TA-3'。以 1μl cDNA 为模板,扩增鲈鱼 PrP 编码基因中间区段。PCR 条件为 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 2min 30 个循环,反应体系为 50μl。回收扩增产物,与 pMD18-T 载体连接,转化感受态大肠杆菌 JM109,用测序通用引物和设计的简并引物筛选克隆并测序。至少测定 4 个克隆的序列,以最后确定基因序列。

根据中间区段序列设计扩增鲈鱼 PrP 编码基因两端序列的引物 stF2:5'-GTC A(T) AC AGG TTT TGC CAA AAA AGC C-3'和 stR2:5'-ATC(T) CCA GCC ACA GCA CCG ACAA(G) C-3'。用 stF、stF2 和 RA 接头引物及 1μl cDNA 模板进行巢式 PCR,获得 3'端片段;用 stR、stR2 和 CA 接头引物,获得 5'端片段。片段回收、克隆、测序等,同中间片段。

用 DNASTar 软件确定鲈鱼 PrP 编码基因开放阅读框并翻译成氨基酸序列,预测二级结构和分子量、等电点等参数。用 SignalP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>),确定鲈鱼 PrP 信号肽区域。用 Big-PI Predictor (http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html),确定糖基缩醛磷脂醇(glycosyl phosphatidylinositol, GPI)锚定位点。用 DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/main-das.html>),确定跨膜结构区。用 DAMBE (<http://aixl.uottawa.ca/>)和 MEGA 2 V2.1 (<http://www.mega-software.net/>),进行氨基酸序列对位排列、系统树构建和序列相似性分析。

2 结果

根据基因序列推导的鲈鱼 PrP 由 507 个氨基酸组成,分子量约为 54kD,等电点约为 9.07。鲈鱼 PrP 编码基因序列已提交 GenBank(收录号:AY854951)。

鲈鱼 PrP 与红鳍东方鲢、大西洋鲑 PrP 氨基酸序列的相似性见表 1。与红鳍东方鲢的平均相似性

表 1 鱼类蛋白质感染因子氨基酸序列的相似性(%)

	1	2	3	4
1 红鳍东方鲢 1				
2 红鳍东方鲢 2	99.8			
3 大西洋鲑	60.1	61.2		
4 鲈鱼	72.1	72.9	61.7	

红鳍东方鲢 1 和 2 GenBank 收录号分别为 AF531159 和 AY141106 大西洋鲑为 AY141107 鲈鱼序列为本研究获得。

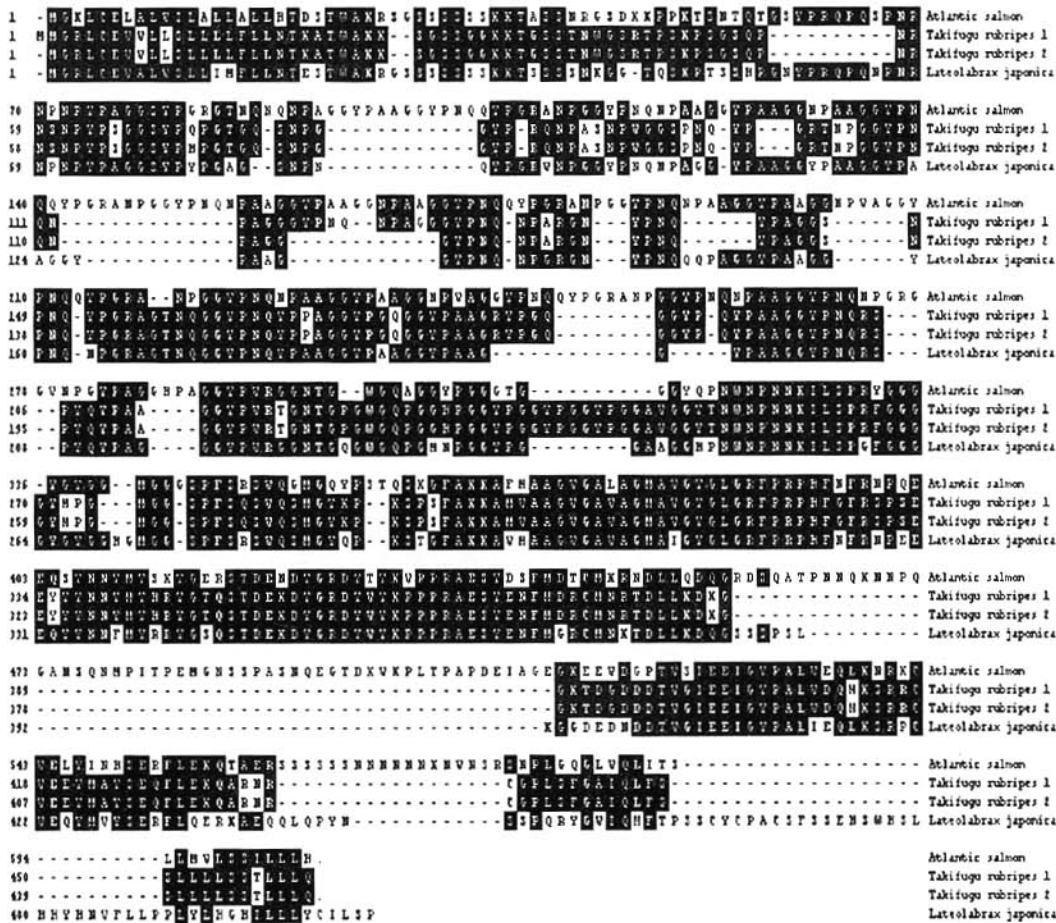
为 72.5%,与大西洋鲑的氨基酸序列的相似性为 61.7%,平均为 67.9%。红鳍东方鲢和大西洋鲑 PrP 的平均氨基酸序列相似性为 60.7%。鱼类 PrP 氨基酸序列比较见图 1。

图 2 为鲈鱼 PrP 蛋白结构及其与红鳍东方鲢、大西洋鲑 PrP 蛋白结构的比较。鲈鱼 PrP 有 3 个螺旋区和 4 个跨膜区,其 1~25 氨基酸为信号肽,26~37 位有赖氨酸串,98~240 位为顺接重复短肽区,297~315 为疏水区,在 374 和 421 位形成二硫键,376 位有糖基化(glycosylation)位点,476 位有糖基缩醛磷脂醇(GPI)位点,具备 prion 蛋白所具有的特征结构区域。尽管长度有些变化,但结构上鲈鱼 PrP 与红鳍东方鲢和大西洋鲑 PrP 相同。

图 3 是不同物种 PrP 氨基酸序列系统学分析结果。鱼类 PrP 明显地聚合成一个独立的分支。本研究分离的鲈鱼 PrP 与已知鱼类 PrP 亲缘关系比它与其他物种的亲缘关系近。

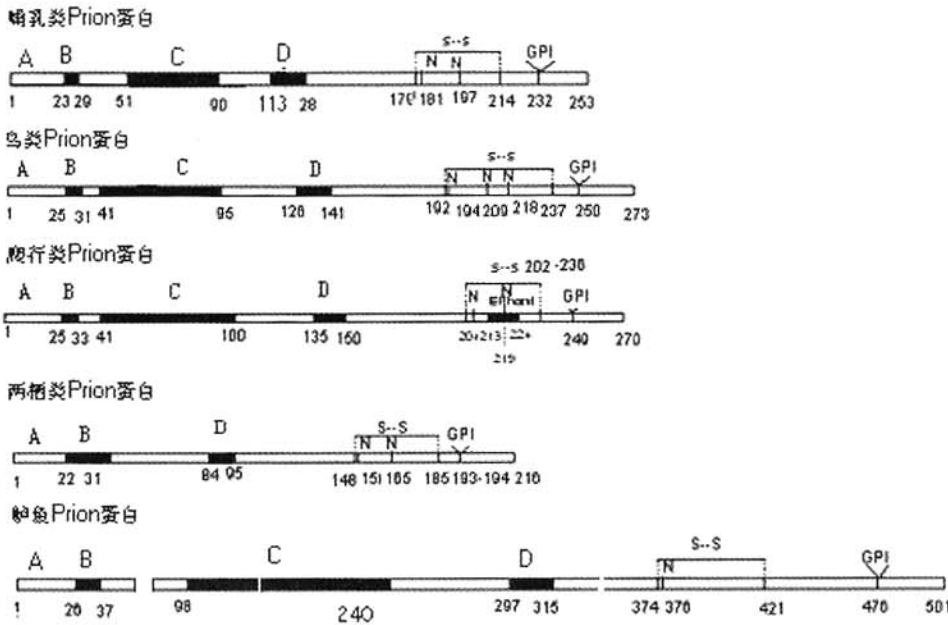
3 讨论

仓鼠 PrP 编码基因被克隆后,同为哺乳类的老鼠和人的同缘基因也很快用杂交筛选等传统方法被克隆出来^[11]。但是,利用这些方法分离非哺乳类的两栖类^[8]、爬行类^[12]、鸟类^[13] PrP 编码基因就困难得多。比较基因组学途径使我们能方便地了解特定基因在生物界的分布、追寻它们的序列变化和调节因子、理解它们的功能^[7,8]。鲢、斑马鱼、蟾蜍等生物的 PrP 或者类 PrP(PrP-like)编码基因序列就是通过比较基因组学途径分离的^[7-10]。但是,迄今为止具有基因组序列和大规模 EST 数据的鱼种很少,而通过小规模 EST 分析发现 PrP 编码基因 EST 的可能性又很小。因此,利用 RT-PCR 分离同类或相近生物类群的 PrP 编码基因是合理的技术选择。本研究根据已知鱼类 PrP 氨基酸序列相对保守的顺接短肽重复和疏水区,设计了鱼类简并引物,利用 RT-PCR 方法成功分离了鲈鱼 PrP 编码基因。因此,该方法是可行的。



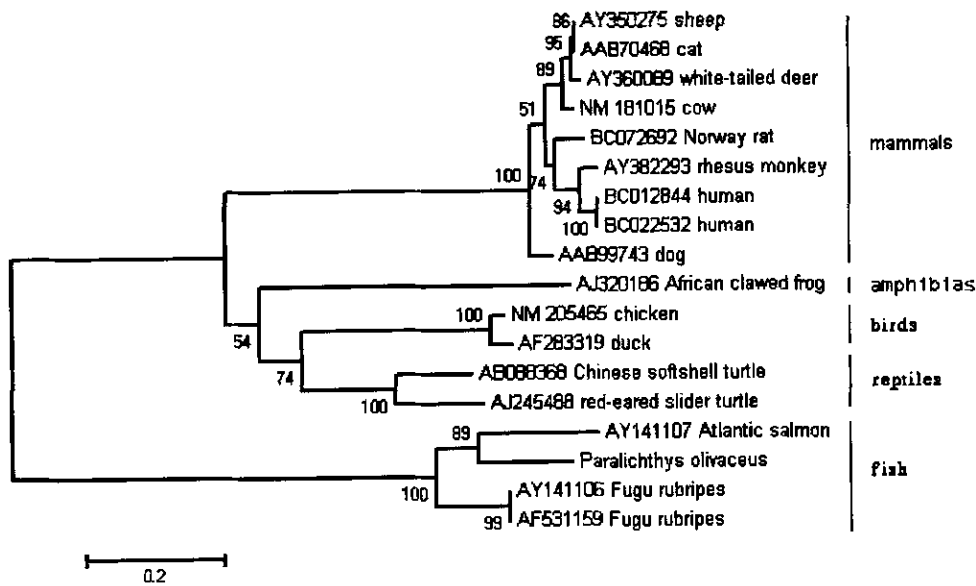
相同氨基酸残基置于黑色背景中。红鳍东方鲷 1 和 2 分别为 AF531159 和 AY141106 对应序列；大西洋鲱为 AY141107 对应序列 鲈鱼序列为本研究获得

图 1 鱼类蛋白质感染因子氨基酸序列的对位排列



A 为信号肽区 B 为基本序列区 C 为顺肽重复区(鲈鱼 C 区被间断,未按比例画出) D 为疏水区

图 2 不同生物蛋白质感染因子蛋白特征结构模式图



使用的序列有 羊 AY350275 ; 猫 AB70468 ; 鹿 AY360089 ; 牛 NM_181015 ; 狗 BC072692 ; 鼠 AY382293 ; 猴 BC012488 ; 人 BC022532, AAB99743 ; 蛙 AJ320186 ; 鸡 NM_205465 ; 龟 AB088368, AJ245488 ; 鲑 AY141107 ; 红鳍东方鲷 1 AY141106 ; 红鳍东方鲷 2 AF531159

图3 不同生物蛋白质感染因子蛋白系统学关系

鸟类、爬行类以及两栖类某些多肽的 NMR 研究^[14]发现,prion 的中间区域在空间结构上具有保守性。人、鸟类、爬行类、两栖类以及鱼类 PrP 的疏水区具有相似性,但其 N 端变化非常大。哺乳类 PrP 的 N 端具有顺接 8 肽重复,能结合 Cu^{2+} 离子,因结合的 Cu^{2+} 离子数目变化形成不同空间构像。鸟类 PrP 的 N 端具有不完整顺接 6 肽重复,也结合 Cu^{2+} 离子。PrP 由正常生理状态向致病状态的转变主要是通过 N 端构像变化完成的,N 端构像变化可暴露中间的疏水区域,使其由原来的 α 螺旋结构变成 β 折叠片,形成感染因子蛋白凝聚体。

PrP 只由 *prnp* 基因的一个外显子编码,而 *prnp* 存在假基因^[15,16]。PrP 氨基酸序列变异非常大。作者注意到鱼类 PrP 比其他生物的 PrP 长得多。这种长度变化主要体现在顺接短肽重复短肽长度和组成、该结构域排列的严谨程度和重复数以及疏水区长度、特征结构域间隔区序列和长度等方面。从低等生物到高等生物,PrP 氨基酸序列的进化可能存在一定规律:即长度缩短但保留特征结构域。鲈鱼 PrP 编码基因的分离为研究 PrP 进化、结构与功能关系以及可能存在的鱼类 TSE 提供了基础依据^[1]。

参考文献

[1] 杨官品,廖梅杰,张之文等. 蛋白质感染因子与水产养殖. 中国海洋大学学报,2004,34(3) 403

[2] Bolton D C, McKinley M P, Prusiner S B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 1982, 218 :1309

[3] Deleault N, Lucassen R W, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 2003, 425 :717

[4] Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology : One century of evolving concepts. *Cell*, 2004, 116 :313

[5] Wickner R B, Edskes H K, Ross E D. Prion genetics : new rules for a new kind of gene. *Annu Rev Genet*, 2004, 38 :681

[6] Suzuki T, Kurokawa T, Hashimoto H, et al. cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like : a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 294 :912

[7] Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, et al. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene*, 2003, 314 :89

[8] Strumbo B, Ronchi S, Bolis L C, et al. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Letters*, 2001, 508 :170

[9] Oidtman B, Simon D, Holtkamp N, et al. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologous to tetrapod prion proteins. *FEBS Letters*, 2003, 538 :96

[10] Rivera-Milla E, Stuermer C A O, Malaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease : identification of a fish prion mRNA. *TRENDS in Genetics*, 2003, 19(2) :72

[11] Oesch B, Westaway D, Waelchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 1985, 40 :735

[12] Simoine T, Duga S, Strumbo B, et al. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Letters*, 2000, 469 :33

[13] Harris D A, Falls D L, Johnson F A, et al. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 : 7664

[14] Calzolari L, Lysek D A, Pe 'rez D R. Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3) :651

[15] O 'Rourke K I, Spraker T R, Hamburg L K, et al. Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *Journal of General Virology*, 2004, 85 :1339

[16] Lee I Y, Westaway D, Smit A F A, et al. Complete genome sequence and analysis of the prion gene region from three mammalian species. *Genome Res*, 1998, 8 :1022

Cloning and characterization of the prion protein encoding gene of Japanese sea bass, *Lateolabrax japonicus*

Zhang Zhiwen * **, Liao Meijie * , Yang Guanpin * , Sun Xiuqin ** , Zou Guiwei *** , Wei Qiwei *** , Wang Dengqiang ***

(* College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(** The First Institute of Oceanography, National Oceanic Administration of China, Qingdao 266061)

(*** Changjiang Fishery Institute, Chinese Academy of Fishery, Jingzhou 434000)

Abstract

Complementary DNA (cDNA) sequence of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) prion protein (PrP) encoding gene was cloned and characterized through RT-PCR approach. The PrP of Japanese sea bass consists of 507 amino acid residues, weighing about 54 kilodaltons. The deduced amino acid sequence is 67.9% similar to that of Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) in average, and bears the structural signatures of PrP including a signal sequence, tandem repeats, a hydrophobic region, a glycosylation site, a disulphide bridge and a glycosyl phosphatidylinositol anchor site. The isolation of Japanese sea bass PrP encoding gene will support the exploration concerning the evolution and function of PrP and the transmissible spongiform encephalopathy (TSE) existing in fish possibly.

Key words : *Lateolabrax japonicus*, prion protein, transmissible spongiform encephalopathies (TSE)

作者: 张之文, 廖梅杰, 杨官品, 孙修勤, 邹桂伟, 危起伟, 汪登强, Zhang Zhiwen, Liao Meijie, Yang Guanpin, Sun Xiuqin, Zou Guiwei, Wei Qiwei, Wang Dengqiang

作者单位: 张之文, Zhang Zhiwen(中国海洋大学, 海洋生命学院, 青岛, 266003; 国家海洋局第一海洋研究所, 青岛, 266061), 廖梅杰, 杨官品, Liao Meijie, Yang Guanpin(中国海洋大学, 海洋生命学院, 青岛, 266003), 孙修勤, Sun Xiuqin(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛, 266061), 邹桂伟, 危起伟, 汪登强, Zou Guiwei, Wei Qiwei, Wang Dengqiang(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州, 434000)

刊名: 高技术通讯 ISTIC EI PKU

英文刊名: CHINESE HIGH TECHNOLOGY LETTERS

年, 卷(期): 2005, 15(9)

参考文献(16条)

1. [O' Rourke K I; Spraker T R; Hamburg L K Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer](#)[外文期刊] 2004

2. [Calzolari L; Lysek D A; Pe'rez D R Prion protein NMR structures of chickens turtles and frogs](#) 2005 (03)

3. [Harris D A; Falls D L; Johnson F A A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity](#) 1991

4. [Oidtmann B; Simon D; Holtkamp N Identification of cDNAs from Japanese pufferfish \(Fugu rubripes\) and Atlantic salmon \(Salmo salar\) coding for homologous to tetrapod prion proteins](#)[外文期刊] 2003 (1/3)

5. [Strumbo B; Ronchi S; Bolis L C Molecular cloning of the cDNA coding for Xenopus laevis prion protein](#) [外文期刊] 2001

6. [Premzl M; Sangiorgio L; Strumbo B Shadoo a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein](#) 2003

7. [Suzuki T; Kurokawa T; Hashimoto H cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs](#)[外文期刊] 2002

8. [Wickner R B; Edskes H K; Ross E D Prion genetics: new rules for a new kind of gene](#)[外文期刊] 2004 (0)

9. [Aguzzi A; Polymenidou M Mammalian prion biology: One century of evolving concepts](#)[外文期刊] 2004 (2)

10. [Deleault N; Lucassen R W; Supattapone S RNA molecules stimulate prion protein conversion](#)[外文期刊] 2003

11. [Bolton D C; McKinley M P; Prusiner S B Identification of a protein that purifies with the scrapie prion](#)[外文期刊] 1982

12. [Lee I Y; Westaway D; Smit A F A Complete genome sequence and analysis of the prion gene region from three mammalian species](#)[外文期刊] 1998 (10)

13. [Simoinc T; Duga S; Strumbo B cDNA cloning of turtle prion protein](#)[外文期刊] 2000 (1)

14. [Oesch B; Westaway D; Waelchli M A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein](#)[外文期刊] 1985

15. [Rivera-Milla E; Stuermer C A O; Malaga-Trillo E An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA](#)[外文期刊] 2003 (02)

16. 杨官品; 廖梅杰; 张之文 蛋白质感染因子与水产养殖[期刊论文]-中国海洋大学学报(自然科学版) 2004 (03)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gjstx98200509016.aspx