

牙鲆蛋白质感染因子蛋白基因的克隆和结构分析

廖梅杰¹, 张之文^{1,2}, 杨官品¹, 孙修勤², 邹桂伟³, 危起伟³, 汪登强³

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 3. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要:采用 RT-PCR 方法分离牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)蛋白质感染因子蛋白编码基因序列。推测的牙鲆蛋白质感染因子蛋白由 472 个氨基酸组成, 分子量约 49.6 kD, 具有信号肽、短肽顺接重复、疏水区、糖基化位点、二硫键、糖基缩醛磷酸酯锚定位点等蛋白质感染因子蛋白特征结构域, 与红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)和大西洋鲑(*Atlantic salmon*)蛋白质感染因子蛋白的相似性分别为 71.9% 和 66.4%。牙鲆蛋白质感染因子蛋白编码基因序列的获得为蛋白质感染因子进化与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:牙鲆; 蛋白质感染因子蛋白; 基因序列

中图分类号:Q959.486 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0801-06

蛋白质感染因子(proteinaceous infectious agent, 以下简称 prion)是导致传染性海绵样脑病(transmissible spongiform encephalopathies, 以下简称 TSE)的致病因子, 一般指鱼类、两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类动物以及人等感染因子蛋白(prion protein, 以下简称 PrP)的聚集体。PrP 由蛋白质感染因子蛋白基因(prnp)及其同源基因编码是一种与细胞膜结合而功能未知的糖蛋白^[1]。在一些目前还不完全清楚的情况下, PrP 可聚集成 prion。唯蛋白复制假说认为, prion 能启动 PrP 聚集成 prion, 新形成的 prion 进一步使更多的 PrP 聚集成 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、有时在种间传染, 导致 TSE 发生, 但 PrP 生理功能、prion 形成原因与过程、prion 结构等许多问题尚不清楚^[4]。虽然鱼类、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、糖基缩醛磷酸酯锚定位点等特征结构域^[5]。

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)属于硬骨鱼纲、鲽形目、鲽亚目、鲆科、牙鲆亚科、牙鲆属, 是海水养殖鱼类的代表品种之一, 近年来牙鲆的养殖业发展迅猛。牙鲆养殖的过程中, 需要添加鱼粉作为饲料。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价值鱼来源的饲料蛋白形成鱼类 prion 和鱼类 TSE。从食品安全和可持续养殖角度考虑应对鱼类 prion 及其可能导致

的鱼类 TSE 引起足够重视。另外, 鱼类 PrP 的分离与鉴定有助于理解 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。本研究根据红鳍东方鲀(*Fugu rubripes*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)的 PrP 氨基酸序列设计简并 PCR 引物, 采用 RT-PCR 方法克隆牙鲆的 prnp 同源基因并进行结构分析, 旨在为牙鲆乃至养殖鱼类可能存在的 prion 和 TSE 研究提供重要的科学依据。

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 Premix Taq™ 聚合酶、pMD18-T 载体等购自大连宝生物工程公司。牙鲆活体(体重 500 g 左右)购自青岛水产品市场。为克服个体变异影响, 基因克隆利用 1 条鱼进行。

1.2 方法

按照制造商提供的试剂盒使用指南, 提取牙鲆脑组织总 RNA, 经 1% 琼脂糖电泳, 根据 28S 和 18S 核糖体 RNA 带的强度和清晰度判断总 RNA 质量, 依酵母 tRNA 标准估计总 RNA 浓度。取约 10 μg 总 RNA, 组合使用 cDNA 合成、cDNA PCR 文库构建等试剂盒合成 cDNA 并加上接头序列, 在酵母 tRNA 的帮助下沉淀 cDNA, 溶于 20 μL 水, 于 -20℃ 保存备用。

收稿日期:2004-11-08; 修订日期:2005-01-25。

基金项目:国家自然科学基金(40176028); 国家 973 重点基础研究发展规划项目(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资助项目(LFB20040503)。

作者简介:廖梅杰(1981-), 女, 博士, 从事海洋生物学分子遗传学研究。E-mail:changablecat@yahoo.com.cn

通讯作者:杨官品。E-mail:ygsmpir@mail.ccit.edu.cn

根据红鳍东方鲀、大西洋鲑 PrP 较保守的顺接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 CCG CCA AGG(T) CCA(G) TA-3', 以 1 μ L cDNA 为模板, 扩增牙鲈 PrP 编码基因中间区段。PCR 条件为 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 个循环, 反应体系为 50 μ L。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牙鲈 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 ACA A(G) C-3'。用 stF、stF2 和 RA 接头引物和 1 μ L cDNA 模板进行半巢式 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 (图 1)。



图 1 基因克隆流程

Fig.1 Flow chart of PrP encoding gene cloning

用 DNASar 软件确定牙鲈 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/>) 确定牙鲈 PrP 信号肽区域。用 Big-PI Predictor (http://www.mendel.imp.univie.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html) 确

定糖基磷酸肌醇 (glycosyl phosphatidylinositol, GPI) 锚定位点。用 DAS (<http://www.sbc.su.se/~mikko/DAS/main.htm>) 确定跨膜结构区。用 ProtFun2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun>) 对其蛋白功能进行预测分析。用 DAMBE (<http://aind.uottawa.ca/>) 和 MEGA 2 V2.1 (<http://www.megasoftware.net/>) 进行氨基酸序列对比排列、系统树构建和序列相似性分析。

2 结果与分析

牙鲈 PrP 编码基因核苷酸序列和推测的蛋白质序列如图 2 所示。牙鲈 PrP 由 472 个氨基酸组成, 分子量为 49.6 kD, 等电点约为 9.54。牙鲈 PrP 编码基因序列 GenBank 收录号为 AY854950。蛋白功能预测结果表明, 该蛋白位于细胞表面, 具有信号传导和结合功能。牙鲈 PrP 与已报道的红鳍东方鲀 PrP 的相似性为 71.9%, 与大西洋鲑 PrP 的氨基酸序列的相似性为 66.4%, 而红鳍东方鲀和大西洋鲑 PrP 平均序列相似性为 63.7% (表 1)。鱼类 PrP 之间的相似性比不同类动物的 PrP 之间的序列相似性高得多 (数据未显示), 说明鱼类 PrP 具有一定的序列保守性。进一步分析发现, 鱼类 PrP 氨基酸序列存在一些保守区域 (图 3), 尤其是顺接重复区和疏水区, 这是设计简并引物。通过 RT-PCR 克隆鱼类 PrP 编码基因的基础, 本研究所用引物就是根据这两个区域设计的。牙鲈 PrP 有 3 个顺接区和 3 个跨膜区, 其 1~25 氨基酸为信号肽, 26~34 位有糖基化, 98~243 位为顺接重复短肽区, 297~315 位为疏水区, 在 374 位和 421 位形成二硫键, 376 位和 399 位有糖基化 (glycosylation) 位点, 448 位有糖基磷酸肌醇 (GPI) 位点。从序列相似性和特征结构两方面判断, 本实验所克隆的序列是牙鲈 PrP 编码基因 (图 4)。

同种生物的 PrP 氨基酸序列相对保守, 而不同种生物的 PrP 氨基酸序列差异却十分显著。系统学分析 (图 5) 表明, 鱼类 PrP 十分可靠地聚合成一个独立的分支。本研究分离的牙鲈 PrP 与已知的鱼类 PrP 关系近, 而与两栖类、爬行类、鸟类以及哺乳动物 PrP 亲缘关系远。

表 1 鱼类蛋白质感染因子氨基酸序列的相似性

Tab.1 Amino acid identities for fish prion proteins

	<i>S. salar</i> AY141107	<i>F. rubripes</i> AY141106	<i>F. rubripes</i> AF531159	<i>P. olivaceus</i>
AY141107 <i>S. salar</i>				
AY141106 <i>F. rubripes</i>	63.7			
AF531159 <i>F. rubripes</i>	63.7	99.8		
<i>P. olivaceus</i>	66.4	71.9	71.6	

注: 红鳍东方鲀 1 和 2 GenBank 收录号分别为 AF531159 和 AY141106; 大西洋鲑为 AY141107; 牙鲈序列为本研究获得。

Note: The accession numbers of No. 1 and No. 2 *F. rubripes* in GenBank are AF531159 and AY141106, and that of *S. salar* is AY141107.

The sequence of *P. olivaceus* was obtained by this study.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn



图3 鱼类蛋白质感染因子氨基酸序列的对位排列

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

Fig.3 Alignment of *Paralichthys olivaceus* prion amino acid sequence and those of other fish species

Note: Conserved amino acids are shaded. The accession numbers are AF531159 (*Fugu rubripes* 1), AY141106 (*Fugu rubripes* 2), AY141107 (*Salmo salar*) and AY854950 (*Paralichthys olivaceus*).

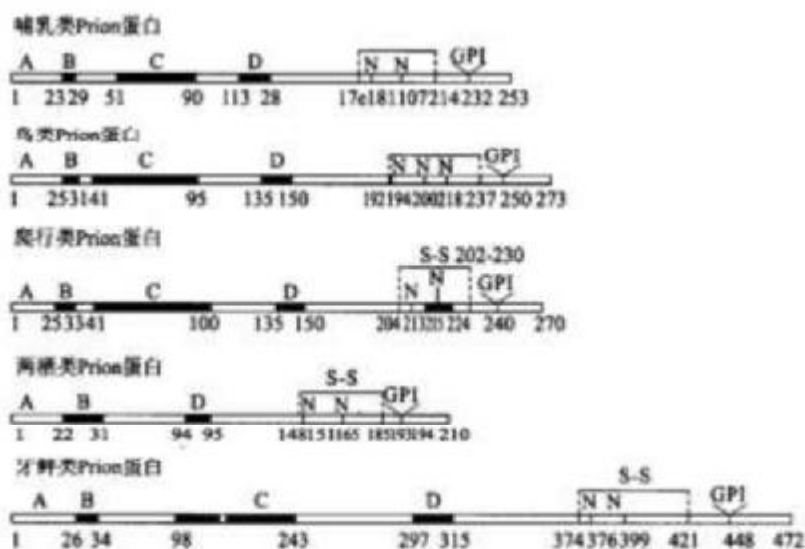


图4 不同生物蛋白质感染因子蛋白特征结构模式图

A 为信号肽区;B 为基本序列区;C 为串联肽重复区(牙鲆 C 区被中断,未按比例画出);D 为疏水区

Fig.4 Schematic representation of relevant prion features. Numbers refer to positions in amino acid sequences

Domains are represented by different boxes

A: Signal sequences, B: Basic domain, C: Tandem repeats, D: Hydrophobic region.

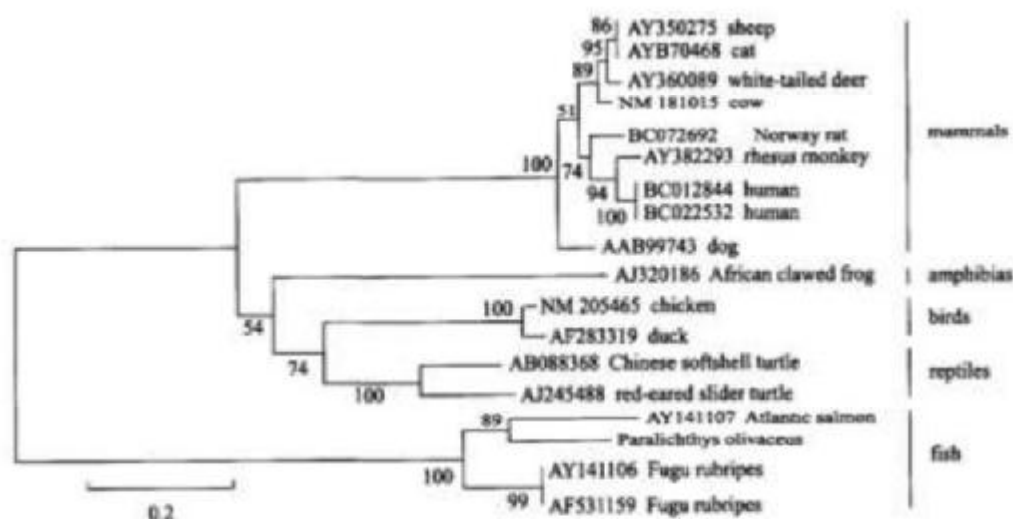


图5 不同生物蛋白质感染因子蛋白系统学关系

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

Fig. 5 Phylogenetic relationships among vertebrate prions

Sequences cited: sheep AY350275; cat AB70468; deer AY360089; cow NM_181015; dog BC072692; rat AY382293; monkey BC012488; human BC012488, AAB99743; frog AJ320186; chicken NM_205465; turtle AB088368, AJ245488; salmon AY141107; fugu1 AY141106; fugu2 AF531159.

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[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(3): 403-412.
- [2] Bolton D C, McKinley M P, Prusiner S B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion[J]. Science, 1982, 218: 1309-1311.
- [3] Delenault N, Lucassen R W, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion[J]. Nature, 2003, 425: 717-720.
- [4] Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: One century of evolving concepts[J]. Cell, 2004, 116: 313-327.
- [5] Sanuki 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 PrP^C[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 913-917.
- [6] Premal M, Sangiorio L, Strambo B, et al. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein[J]. Gene, 2003, 314: 89-102.
- [7] Strambo B, Ronchi S, Bolis L C, et al. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein[J]. FEBS Letters, 2001, 508: 170-174.
- [8] Odtmann 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[J]. FEBS Letters, 2003, 538: 96-100.
- [9] Rivera-Milla E, Stuermer C A O, Malaga-Trillo E. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA[J]. TRENDS in Genetics, 2003, 19(2): 72-75.
- [10] Oesch B, Westaway D, Waelchli M, et al. Tempst P, Tempst D B, Hood L E, Prusiner S B, Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein[J]. Cell, 1985, 40: 735-746.
- [11] Simoine T, Daga S, Strambo B, et al. cDNA cloning of turtle prion protein[J]. FEBS Letters, 2000, 469: 33-38.
- [12] 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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7664-7668.
- [13] Si K, Lindquist S, Kandel E R. A neuronal isoform of the *Aplysia* CPEB has prion-like properties[J]. Cell, 2003, 115: 879-891.
- [14] Si K, Giustetto M, Etkin A, et al. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *Aplysia*[J]. Cell, 2003, 115: 893-904.
- [15] Uptain S M, Lindquist S. Prions as preprotein-based genetic elements[J]. Annu Rev Microbiol, 2002, 56: 703-741.
- [16] O'Rourke K I, Sparker T R, Hamburg L K, et al. Polymer-

phisms in the prion precursor functional gene but not the pseudo-gene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer [J]. J Genet Virol, 2004, 85: 1 339 - 1 346.

[17] Lee I Y, Westaway D, Smeit A F A, et al. Complete genome sequence and analysis of the prion gene region from three mammalian species [J]. Genome Res, 1998, 8: 1 022 - 1 037.

Cloning and characterization of prion protein coding gene of bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*)

LIAO Mei-jie¹, ZHANG Zhi-wen^{1,2}, YANG Guan-pin¹, SUN Xiu-qin², ZOU Gui-wei³, WEI Qi-wei³, WANG Deng-qiang³

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. The First Institute of Oceanography, National Oceanic Administration of China, Qingdao 266061, China; 3. Changjiang Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Complementary DNA (cDNA) sequence of bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) prion protein (PrP) encoding gene was cloned and characterized through RT-PCR approach. The PrP of bastard halibut consists of 472 amino acid residues, weighing about 49.6 kD. The deduced amino acid sequence is 71.9% similar to that of Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and 66.4% similar to that of Atlantic salmon (*Salmo salar*), and bears the structural signatures of PrPs including a signal sequence, tandem repeats, a hydrophobic region, two glycosylation sites, a disulphide bridge and a glycosyl phosphatidylinositol anchor site. The isolation of the PrP encoding gene will support the exploration concerning the evolutionary structure and function of PrPs and the possibility of the transmissible spongiform encephalopathies (TSE) existing in fishes.

Key words: bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*); prion protein; gene sequence

Corresponding author: YANG Guan-pin. E-mail: yguanpin@mail.ouc.edu.cn

* This research was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 40176028), National Key R&D Program ("973" Program) of China (No. G199912005) and Cooperative Project of the Key Lab of Freshwater Germplasm and Biotechnology of Chinese Ministry of Agriculture (No. LFB20040503).