

刺激隐核虫小 GTP 酶 Ran 基因的克隆与表达

付国良^{1,2}, 黄玛娇¹, 谢金珠¹, 胡燕红¹, 晏燕花^{1,2}, 黄镇¹, 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: 对刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的小 GTP 酶 Ran 基因(*CiRan*)进行研究, 以期对刺激隐核虫病原生物学研究及其防治提供理论基础。从刺激隐核虫滋养体/包囊前期 cDNA 文库中筛选出 *CiRan* 基因的克隆, 利用生物信息学方法对 *CiRan* 基因及其编码的蛋白进行结构与功能的预测; 通过逆转录 PCR 检测 *CiRan* 的 mRNA。结果表明其在刺激隐核虫的各个发育阶段均有表达。对 *CiRan* 基因开放阅读框内的非通用密码子进行改造, 并构建重组质粒 pGEX-4T-1/*CiRan*, 将其转化到大肠杆菌(*E. coli*)后成功表达分子量为 51.3 kD 的重组融合蛋白 rCiRan。用 rCiRan 蛋白免疫鼠血清进行免疫印迹分析, 结果表明, 抗 rCiRan 血清能识别刺激隐核虫各期虫体的天然 CiRan 蛋白, 其表观分子量为 25.3 kD, 与根据编码基因序列推测出的理论值相符; 以 rCiRan 的抗血清做间接免疫荧光抗体实验, 结果表明天然 CiRan 蛋白在幼虫的细胞质和细胞核内均有分布, 且在核膜周围富集, 佐证了该分子潜在的功能。

关键词: 刺激隐核虫; 小 GTP 酶 Ran; 克隆; 表达; 分析

中图分类号: S941.5

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)03-0672-10

刺激隐核虫病, 俗称“白点病”, 其病原为刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)。该虫是隶属于纤毛虫纲的单细胞寄生原虫, 可寄生于除莹斑篮子鱼(*Siganus oramin*)以外的几乎所有海水硬骨鱼类皮肤、鳃和眼上, 造成炎症且刺激宿主大量分泌黏液, 引起鱼类宿主窒息或继发细菌感染, 甚至死亡^[1-4]。随着集约化养殖程度的提高, 刺激隐核虫病频频在中国东南沿海经济鱼类养殖区爆发, 造成巨大的经济损失。研究表明, 石斑鱼(*Epinephelus* spp.)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)被刺激隐核虫感染后的死亡率分别高达 50%、75%和 100%^[5]。因此该病于 2008 年被农业部列入二级动物疫病名录^[6]。然而目前尚无国家规定的水产化学药物可以治疗该病^[5]。随着基因工程和分子生物学的发展, 有必要在分子水平对该病的病原生物学进行深入研究, 以丰富其理论知识, 为探索安全有效

的防治方法奠定基础。

小 GTP 酶是一类分子量为 20~40 kD 的单体 GTP 结合蛋白, 具有高度保守的 GTP 结合结构域, 在真核生物中普遍存在^[7]。小 GTP 酶 Ran(Ras-related nuclear protein)就是这一家族中的一个成员, 其分子量约为 25 kD, 是细胞内含量最丰富的小 GTP 酶^[8]。自被证实具有 GTP 酶活性以来, Ran 越来越受到人们的关注, 近年来发现 Ran 参与调控细胞周期中的许多生命活动。首先, Ran 是核质运输的驱动蛋白^[9-10]。真核细胞中在空间分隔上普遍的原则是 DNA 复制和转录在核内进行, 而蛋白质翻译在细胞质中进行。这就需要大分子转运系统将相关物质转运进/出细胞核, 因此大分子的核质运输是细胞生理学和病理学的关键, 研究核质运输的调控及其与疾病相关的改变能揭示抗病的新方法^[9]。为核质运输提供能量来源的 Ran 系统的特征研究将有助于对蛋白的核质运输的调

收稿日期: 2015-06-21; 修订日期: 2015-10-08.

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); 福建省公务员局引进人才科研启动项目(2010-595); 福建省农业重大专项(2013NZ0002-5).

作者简介: 付国良(1988-), 男, 硕士, 专业方向为病原分子生物学. E-mail: fu-guo-liang@163.com

通信作者: 黄晓红(1963-), 女, 博士, 教授. E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn

控等的理解, 为寄生原虫病揭示新的药物靶点^[10]; 其次, Ran 对 DNA 复制起着调控作用^[11]; Ran 与有丝分裂过程中纺锤体的组装相关^[12], Ran-GTP 在空间上的浓度梯度及其与运动相关的马达蛋白的定位相互协调, 保证有效的纺锤体的形成^[13]; Ran 还与核膜重建有关^[14]; 新近的研究还认为 Ran 不光驱动核质运输, 还参与细胞间的物质运输^[15]。

在水生经济动物中 Ran 的研究近来也多有报导。比如, 研究显示 Ran 在大黄鱼感染病原体的时候上调, 它通过与肌球蛋白轻链的相互作用参与细胞吞噬, 认为 Ran 通过与细胞骨架蛋白相互作用, 调节宿主对病原的免疫反应^[16]。对虾的 Ran 蛋白是其抗病毒免疫反应所必须的, 通过免疫刺激物 IL-4 和溶血磷脂酰胆碱激活对虾 Ran 蛋白活性, 可以增强对虾抗白斑综合症病毒的细胞吞噬作用^[17]; 对银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) Ran 的初步研究显示该蛋白可能在生殖细胞的精核解凝中起重要的作用^[18]; 对软体动物九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 的 Ran 的序列和分子特征也有报道^[19]。

在模式生物嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 中的研究表明, 其 Ran1 在整个细胞中都有分布, 但核内的浓度更高, 这种核内高于核外浓度梯度的形成是 Ran 循环发挥生理功能的重要形式^[20]。过表达 Ran1 在大核的无丝分裂中, 不能集中分布在大核内, 因此可能是过表达 Ran1 破坏了 Ran1 正常细胞内的浓度梯度分布, 从而导致 Ran1 循环紊乱, 使得大核无丝分裂时核内微管不能正确组装, 导致核分裂异常 (不能完成伸长、缢缩和分开)^[21]。

刺激隐核虫与模式生物嗜热四膜虫同属原生生物门纤毛虫纲寡膜亚纲膜口目, 系统发育关系较近, 可能具有一些相似的生物学特性。因此我们建立了刺激隐核虫的 cDNA 文库, 从中克隆和表达刺激隐核虫的 Ran 基因, 对其分子特征进行初步研究, 为今后进一步探讨刺激隐核虫发育与繁殖的分子机理, 丰富刺激隐核虫病的病原分子生物学知识, 探寻抑制该虫繁殖的药物靶点, 或开发阻断其传播的疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用刺激隐核虫 XP7.2 虫株的滋养体/包囊前期构建的 cDNA 文库 (由本实验室构建)^[22]; 褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) (购自福建马尾水产市场); 刺激隐核虫 XP7.2 虫株 (采自霞浦溪南镇海水养殖区, 由本实验室传代培养); 含重组质粒 pTripIEx2/CiRan 的 *E. coli* BM25.8 菌株、*E. coli* DH5 α 菌株、表达载体 pGEX-4T-1 (均由本实验室保存); SPF 级昆明 (KM) 小鼠 (购自中科院上海斯莱克实验动物中心)。

1.2 不同生长时期刺激隐核虫虫体收集

1.2.1 滋养体/包囊前期的收集 当鱼体表出现大量肉眼可见的白点 (即滋养体), 剪下鳃片并刮下体表黏液, 放入装有灭菌海水的培养皿中, 待滋养体成熟自然脱落, 立即用移液枪挑取至干净培养皿中。

1.2.2 包囊的收集 将培养皿放入培养有褐菖鲉 (已感染刺激隐核虫) 的水族箱底部, 待培养皿中结有大量包囊后捞取, 刮下培养皿中的包囊, 用注射器吹散后挑取至干净培养皿中。

1.2.3 幼虫的收集 将清洗干净的包囊放入装有灭菌海水的小烧杯中, 置于 27℃ 恒温培养箱中培养, 待在显微镜下观察到大量幼虫孵出时, 吸取上清并加 0.5% 的甲醛, 固定幼虫半小时, 4℃ 条件下 1500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀即为幼虫。

各阶段虫体均用灭菌海水洗虫体数次至无肉眼可见固体杂质, 将虫体转移至 1.5 mL 离心管中, 立即置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.3 刺激隐核虫小 GTP 酶 Ran 基因的克隆及特征分析

用噬菌体 λ TriPEx2 DNA 为载体构建刺激隐核虫滋养体/包囊前期的 cDNA 文库。将含有重组子的噬菌体转导入 *E. coli* BM25.8 菌株, 利用该菌株细胞内产生的 Cre 重组酶将重组的 λ TriPEx2 DNA 环化为重组的质粒 pTriPEx2 DNA, 然后随机挑取克隆测序, 根据测序所得 EST 序列信息, 找出 Ran 基因同源序列对应的重组 *E. coli* BM25.8 菌株

的克隆培养, 提取质粒, 再利用 pTripIEx2 上的一对通用引物 (5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3' 和 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') 进行测序。将测序结果与 GenBank 中的同源基因进行比对, 进一步推测出这个基因为 Ran 家族基因, 将其命名为 *CiRan*。运用生物信息学软件找出 *CiRan* 基因的开放阅读框并推导出氨基酸序列, 并利用在线软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 和 <http://psort.hgc.jp/form.html>) 对 *CiRan* 基因编码的氨基酸序列的结构域以及亚细胞定位进行预测, 并通过 Mega4.0 以 NJ 法构建 *CiRan* 基因的系统发生树。

1.4 逆转录 PCR 检测 *CiRan* 基因在刺激隐核虫生活史中的表达情况

以褐菖鲉为实验室宿主, 对刺激隐核虫 XP7.2 虫株进行传代培养, 收集滋养体/包囊前期、包囊和幼虫等时期虫体。使用 RNeasy Mini Kit 分别提取各时期虫体的总 RNA, 并测定浓度。依照 RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0 试剂盒说明书进行逆转录, 反应条件为 30℃ 10 min, 42℃ 30 min, 95℃ 5 min, 5℃ 5 min 得到各期虫体的单链 cDNA。根据 *CiRan* 基因的开放阅读框, 设计特异性引物(上游引物: 5'-CTGAATTCATGGAGCCAACAAG-3', 下游引物: 5'-CGCTCGAGTCACTTAAATTCATCATC-3')。同时选取 *CiActin* 基因作为内参(上游引物: 5'-ATGGCCGAAGACTAACAAGCAG-3', 下游引物: 5'-TCAGAAGCATTTTCTGTGTACA-3')。以各时期虫体的单链 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应条件: 内参基因 *CiActin* 为 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 80 s, 30 个循环; *CiRan* 基因为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 41 s, 30 个循环。将 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 *CiRan* 基因的表达及鉴定

1.5.1 *CiRan* 基因的亚克隆 将 *CiRan* 基因的开放阅读框中编码谷氨酰胺的密码子 TAA 和 TAG(它们在通用遗传密码中是终止密码子)人为修改为 CAA 和 CAG(在通用遗传密码中编码谷氨酰胺)后送金斯瑞生物科技有限公司合成, 使其适

合在大肠杆菌表达系统中表达。以一对寡核苷酸, 即 5'-CTGAATTCATGGAGCCACAACAAG-3' 和 5'-CGCTCGAGTCACTTAAATTCATCATC-3' 为引物(下划线所示分别为 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点)做 PCR 扩增密码子改良过的 *CiRan* 基因的开放阅读框, 反应条件为 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 41 s, 30 个循环。电泳检验扩增结果, 并对 PCR 产物进行纯化。用 *EcoR* I 与 *Xho* I 分别对纯化后的 *CiRan* 基因和载体 pGEX-4T-1 进行双酶切, 胶回收酶切产物。用 DNA Ligation kit ver. 2.1 试剂盒在 16℃ 下将回收得到的酶切载体 pGEX-4T-1 和目的基因 *CiRan* 连接, 连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。从转化平板中挑取单菌落进行菌落 PCR 作初步鉴定, 摇菌并将菌液送往公司测序作进一步鉴定。

1.5.2 重组蛋白 GST-rCiRan 的表达、提取和纯化

将含重组质粒 pGEX-4-T-1/*CiRan* 的 *E. coli* 单菌落接种到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 200 r/min 过夜培养。次日扩大培养至 OD₆₀₀ 为 0.3~0.5 时加入 IPTG 诱导表达 4 h, 离心收集菌体, 4℃ 预冷 TNE buffer 重悬菌体。加入终浓度为 100 μ g/mL 的溶菌酶, 置于冰上超声破碎。加入终浓度为 1% 的 Triton X-100 孵育 30 min 后离心, 上清转移至一干净的离心管中, 利用 GST SefinoseTM Resin 试剂盒纯化上清中的 rCiRan 蛋白, 4℃ 保存备用。沉淀加入与上清等量的 TNE buffer 重悬并超声破碎, 4℃ 保存备用。通过 SDS-PAGE 分析裂解液的可溶相、不可溶相、纯化后的 rCiRan 蛋白以及 GST, 测量并估算蛋白的表观分子量。

1.6 抗血清的制备

将纯化后的 rCiRan 蛋白置于透析袋中, 用 PBS 溶液进行透析, 并按照 BCA 蛋白定量检测试剂盒的操作说明测定透析后 rCiRan 蛋白的浓度。对 5 只 6 周龄的 SPF 级雌性 KM 小鼠进行 3 次腹腔注射免疫, 时间间隔为两周 1 次, 每次抗原剂量为 80 μ g/鼠。第一次免疫时, 用作抗原的蛋白与等体积的福氏完全佐剂(200 μ L/鼠)乳化, 两次加强免疫均为同样剂量的蛋白与等体积的福氏

不完全佐剂充分乳化。第三次注射后 10 d, 对小鼠进行心脏穿刺取血, 离心获取抗 rCiRan 蛋白鼠血清, -30°C 保存备用。GST 用作阴性对照蛋白, 以上述相同的方式和剂量免疫另 5 只小鼠, 获取抗 GST 的鼠血清。

1.7 免疫印迹实验(Western blotting analysis)检测刺激隐核虫内源性 CiRan 蛋白的表达

分别收集刺激隐核虫幼虫期、滋养体/包囊前期及包囊期虫体。经超声粉碎后, 各期的裂解液分别加入上样缓冲液, 并经 SDS-PAGE 分离, 通过半干式转印机将蛋白转移到 PVDF 膜上, 根据转印条带位置切割 PVDF 膜, 含标准分子量的蛋白条带的 PVDF 膜用氨基黑染色后脱色, 其余 PVDF 膜先浸泡在含 3% 脱脂奶粉的 PBS 中, 37°C 封闭 1 h。再与 1:100 稀释的抗 rCiRan 鼠血清 37°C 孵育 1 h, 对照组则加 1:100 稀释的抗 GST 鼠血清, 随后经 3 次 PBS 振荡清洗, 再与 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体 37°C 孵育 1 h。PBS 振荡清洗 PVDF 膜后, 将 PVDF 膜浸泡在底物溶液(0.5 mg/mL DAB+0.03% H_2O_2)中进行显色, 灭菌去离子水终止显色反应, 膜晾干后避光保存。

1.8 间接免疫荧光抗体实验(IFAT)检测天然 CiRan 蛋白在幼虫中的定位

用 0.5% 的甲醛溶液固定刺激隐核虫幼虫 30 min, 离心 5 min, 弃上清, 灭菌蒸馏水洗 2~3 次。将幼虫制片并于室温风干。用终浓度为 0.1% 的 Triton X-100 处理虫体 10 min, 均匀滴加 1:100 稀释于 IFAT 稀释液(含 3% 胎牛血清的 PBS)的抗 rCiRan 蛋白免疫鼠血清于虫体上, 37°C 孵育 1 h, 对照组加 1:100 稀释的抗 GST 免疫鼠血清。均匀滴加 1:100 稀释于 IFAT 稀释液中的 Alexa 594 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 37°C 孵育 1 h。DAPI 1:4 稀释于 PBS 溶液后处理虫体 2 min。以上各步骤结束后均用 PBS 清洗虫体 3 次, 每次 5 min。用抗荧光淬灭 PVP 封片液封片, 置共聚焦显微镜下观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 CiRan 基因的生物信息学分析结果

2.1.1 CiRan 基因的开放阅读框及其编码蛋白的氨基酸序列 对从刺激隐核虫滋养体/包囊前期 cDNA 文库中获得的 CiRan 基因进行分析, 结果表明 CiRan 基因的全长 cDNA 为 771 bp, 其中开放阅读框为 654 bp, 编码 217 个氨基酸(图 1A)。该基因序列信息已提交 GenBank, 获得的登录号为 KP662712。该基因编码的 CiRan 蛋白理论分子量约为 25.3 kD, 理论等电点 pI 为 8.29。CiRan 基因的开放阅读框中含有 8 个编码谷氨酰胺的非通用密码子, 即 6 个 TAA 和 2 个 TAG (图 1A 中下划线标示处), 在其他大多数生物中 TAA 和 TAG 均为通用的终止密码子, 因此需将其诱变为 CAA 或 CAG, 才能在大肠杆菌等常用的表达系统中表达。

2.1.2 CiRan 蛋白的结构域预测 以往的研究表明, 小 GTP 酶家族蛋白均含有 1 个约 20 kD 的 GTP 结合结构域, 该结构域包含 5 个非常保守的环(G1~G5 环), 还有两个区域参与 GTP 的结合与水解过程中酶分子的结构变化的调节, 即与 G2 环有关的 Switch I 区域, 以及由 G3 环和部分 α 螺旋构成的 Switch II 区域^[23]。经对 CiRan 的推测氨基酸序列进行结构域分析, 表明 CiRan 蛋白只有 1 个结构域, 简称 Ran 结构域, 位于其氨基酸序列中的第 11~174 位, 其中第 17~153 位为 GTP/ Mg^{2+} 的结合位点, 第 30~50 位为 Switch I 区域, 第 67~87 位为 Switch II 区域, 第 17~26 位为 G1 环, 第 40~42 位为 G2 环, 第 65~70 位为 G3 环, 第 120~125 位为 G4 环, 第 148~152 位为 G5 环(图 1B)。CiRan 蛋白结构域的预测结果与小 GTP 酶家族的特征相符, 进一步表明 CiRan 蛋白是该家族蛋白中的一员。

2.1.3 CiRan 蛋白的亚细胞定位预测 用在线软件 PSORT Prediction 预测 CiRan 蛋白的亚细胞定位, 结果表明, CiRan 蛋白主要分布在一些细胞器中, 包括过氧化物酶体、溶酶体以及线粒体基质, 它们的概率分别为 44.3%、15.7%以及 10.0%, 此

外还有部分蛋白分布在细胞核中, 概率为 30.0%。

白及来自其他物种的 10 种不同 Ran 蛋白的氨基酸

2.1.4 CiRan 蛋白的分子进化分析 对 CiRan 蛋

白及来自其他物种的 10 种不同 Ran 蛋白的氨基酸

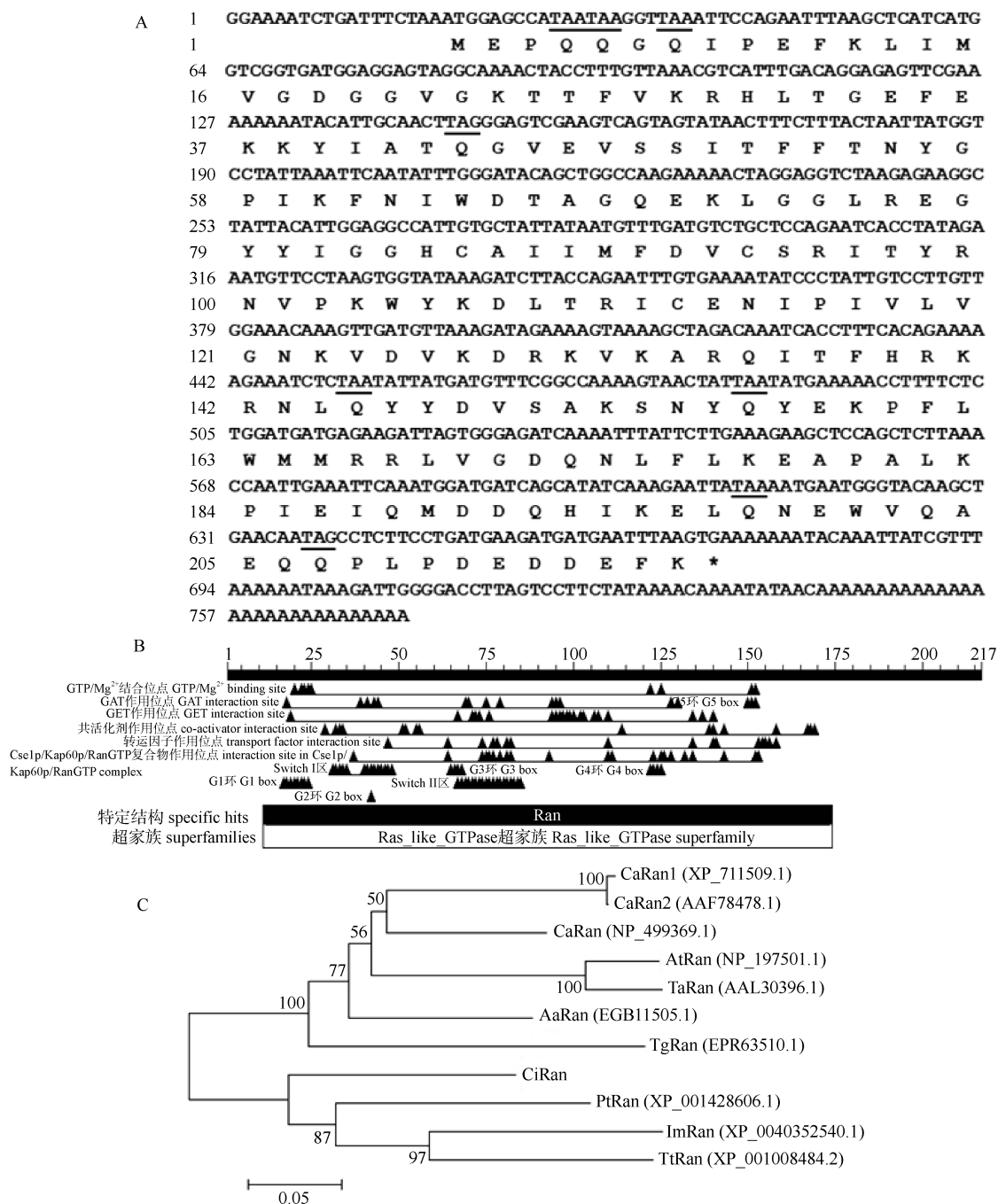


图 1 *CiRan* 基因的序列分析

A. *CiRan* 基因的全长 cDNA 及其开放阅读框编码蛋白的氨基酸序列; B. *CiRan* 蛋白的结构域; C. 基于 11 种不同 Ran 氨基酸序列构建的 NJ 系统发生树(CaRan1 和 CaRan2: 白色念珠菌 Ran1 和 Ran2; CeRan: 秀丽隐杆线虫 Ran; AtRan: 拟南芥 Ran; TaRan: 小麦 Ran; AaRan: 褐潮藻 Ran; TgRan: 刚地弓形虫 Ran; PtRan: 草履虫 Ran; ImRan: 小瓜虫 Ran; TtRan: 四膜虫 Ran)。

Fig. 1 Sequence analysis of *CiRan* gene

A. The full-length cDNA of *CiRan* and its deduced amino acid sequence; B. The conserved domain of *CiRan* protein; C. Neighbor-joining phylogeny tree of 11 Ran proteins (CaRan1 and CaRan2: *Candida albicans* Ran1 and Ran2; CeRan: *Caenorhabditis elegans* Ran; AtRan: *Arabidopsis thaliana* Ran; TaRan: *Triticum aestivum* Ran; AaRan: *Aureococcus anophagefferens* Ran; TgRan: *Toxoplasma gondii* Ran; PtRan: *Paramecium tetraurelia* Ran; ImRan: *Ichthyophthirius multifiliis* Ran; TtRan: *Tetrahymena thermophila* Ran)。

系统发育树, 结果表明, 这 11 种 Ran 蛋白可分为 2 个主要进化枝, 其中 CiRan 蛋白与 PtRan[草履虫(*paramoecium*)Ran]蛋白、ImRan[小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)Ran]及 TtRan[四膜虫(*Tetrahymena*)Ran]蛋白同属一个进化枝, 表明它们的亲缘关系较近, 与使用传统的分类学方法得出的结果相符(图 1C)。

2.2 *CiRan* 基因在生活史各期转录水平的表达

用逆转录 PCR 检测刺激隐核虫生活史各期的 *CiRan* 基因的 mRNA 水平的表达情况, 结果表明: 滋养体/包囊前期、包囊和幼虫等 cDNA 中扩增出来的产物约为 654 bp, 与 *CiRan* 的 ORF 长度相符, 而且 *CiRan* 基因在刺激隐核虫各发育阶段均有表达(图 2)。

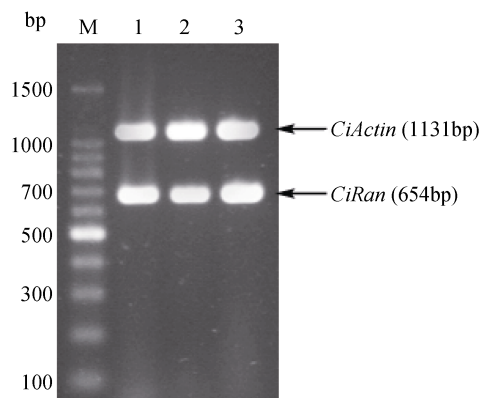


图 2 *CiRan* 基因在刺激隐核虫不同发育期的表达情况
M: 标准分子量 DNA; 1-3: 滋养体/包囊前期、包囊和幼虫的 PCR 产物。

Fig. 2 The expression of *CiRan* gene of *Cryptocaryon irritans* in different developmental stages

M: DNA ladder; 1-3: PCR products of trophont/protomont, tomont and theront.

2.3 *CiRan* 的表达及鉴定

2.3.1 重组子鉴定 *CiRan* 基因的 ORF 经过几个非通用密码子的修改并人工合成后作为模板, 扩增出的 DNA 与载体 DNA pGEX-4T-1 连接, 并转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。对转化子进行菌落 PCR 鉴定, 结果显示 PCR 产物大小约 654 bp, 与 *CiRan* 基因的 ORF 大小相符, 初步鉴定重组质粒构建成功。随后对重组质粒的插入基因部分测序, 结果显示插入基因与合成的 *CiRan* 基因完全一致, 说明 *CiRan* 基因被成功亚克隆到 pGEX-

4T-1 表达载体上, 可进一步在大肠杆菌表达系统中进行表达(图 3)。

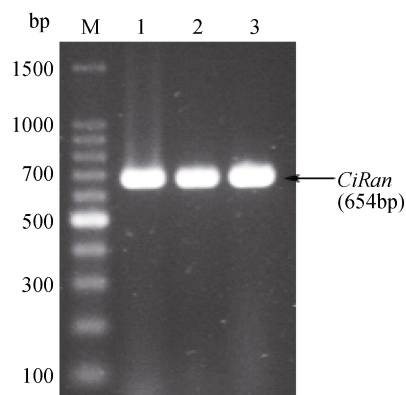


图 3 重组质粒 pGEX-4T-1/ *CiRan* 的 PCR 鉴定

M: 标准分子量 DNA; 1-3: 菌落 PCR 产物。

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/ *CiRan* by using PCR

M: DNA ladder; 1-3: PCR products respectively from 3 colonies.

2.3.2 重组蛋白 rCiRan 的表达 *CiRan* 蛋白的预测分子量为 25.3 kD, GST 的分子量为 26 kD, 则二者的融合蛋白 rCiRan 的分子量预测值应为 51.3 kD。对含重组质粒 pGEX-4T-1/*CiRan* 的大肠杆菌进行诱导表达, 结果显示在菌体裂解液的可溶相和不可溶相中均有重组蛋白 rCiRan 的表达, 并从可溶相中成功得到纯化的 rCiRan, 而且重组蛋白的表观分子量与理论预测值相符, 说明 *CiRan* 基因在大肠杆菌中成功表达(图 4)。本实验是通过修改 ORF 中的非通用密码子从而实现在大肠杆菌中表达的。该基因的 ORF 较短, 人工合成的成本不算很高。实际上, 刺激隐核虫中 TAA 和 TAG 编码谷氨酰胺的特点与模式生物嗜热四膜虫相同^[6], 若能用四膜虫表达, 可免去修改密码子的不便, 且能得到结构与刺激隐核虫内源蛋白结构相近的重组蛋白, 是今后值得尝试的方法。但由于目前尚无商品化的四膜虫表达系统, 且一些实验室使用的四膜虫表达系统需要重金属镉作为诱导剂, 大量使用可能破坏环境, 因此该系统还有待改良完善^[21]。而大肠杆菌表达系统已较成熟, 不仅操作简单, 表达量也大, 对于序列较短、非通用密码子含量较少, 且翻译后修饰与否对功能影响不大的刺激隐核虫的基因来说较为适用。

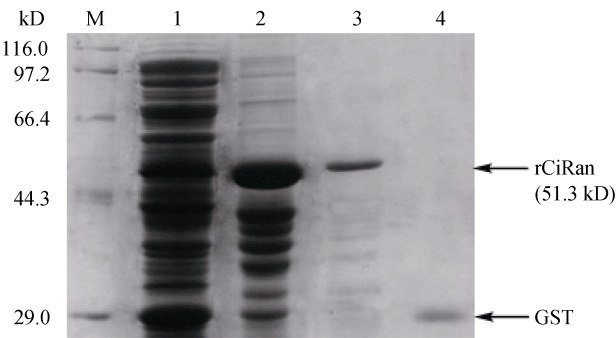


图 4 大肠杆菌表达重组蛋白 rCiRan 的 SDS-PAGE 分析结果

M: 标准分子量蛋白; 1: 可溶性组分; 2: 不溶性组分; 3: 纯化后的重组蛋白; 4: GST.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expression of rCiRan

Lane M: proteins with standard molecular masses; Lanes 1 and 2: soluble and insoluble fractions respectively from bacterial lysate; Lane 3: purified rCiRan; Lane 4: GST.

2.4 免疫印迹分析检测刺激隐核虫内源性 CiRan 蛋白的表达

以 rCiRan 免疫鼠血清和 GST 免疫鼠血清为一抗, 对刺激隐核虫 3 个时期全虫蛋白进行 Western blotting 分析, 结果显示: 抗 rCiRan 血清与刺激隐核虫各期虫体全蛋白均有一条特异性反应条带, 条带相应的表观分子量约为 25.3 kD, 与内源性 CiRan 蛋白的分子量理论值相符。而抗 GST 血清除与阴性对照蛋白 GST 有特异性反应外, 与刺激隐核虫各期蛋白均无特异性反应。以上结果一方面表明抗 rCiRan 血清能够识别刺激隐核虫各期虫体的内源性 CiRan 蛋白, 该蛋白的分子量是 25.3 kD; 也表明 rCiRan 蛋白具有很好的免疫原性, 且 CiRan 蛋白在刺激隐核虫各期虫体内均有表达(图 5)。

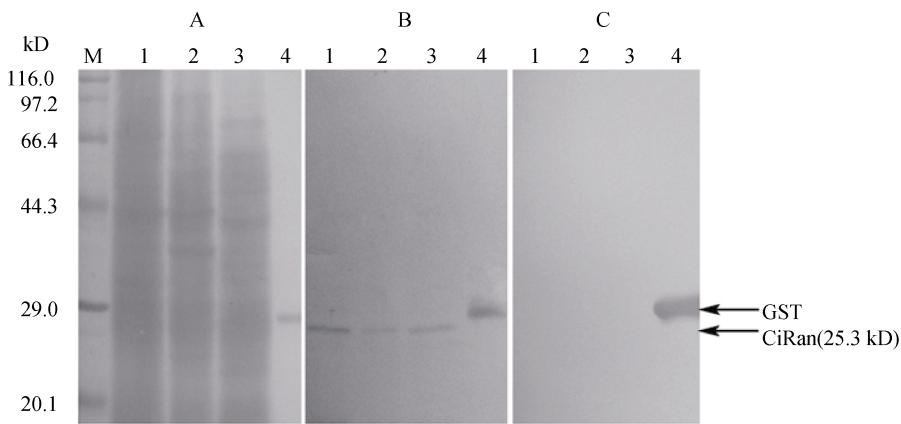


图 5 Western blotting 分析 rCiRan 蛋白免疫鼠血清与刺激隐核虫天然 CiRan 蛋白抗原抗体反应

A. 氨基黑 10B 染色; B. 一抗为 rCiRan 免疫鼠血清; C. 一抗为 GST 免疫鼠血清。M: 标准分子量蛋白; 1-3: 抗原分别为刺激隐核虫滋养体/包囊前期、包囊及幼虫裂解液; 4: 抗原为 GST.

Fig. 5 Reaction of native CiRan from *Cryptocaryon irritans* with mouse antiserum against rCiRan in western blotting analysis

A. Protein staining by amino black 10B; B. Reaction with antiserum against rCiRan; C. Reaction with antiserum against GST. M: proteins with standard molecular mass; 1-3: lysate of trophont/protomonts, tomonts and theronts, respectively; 4: GST used as a control.

2.5 内源性 CiRan 蛋白在刺激隐核虫幼虫中的定位

通过 IFAT 分析内源性 CiRan 蛋白在刺激隐核虫幼虫的分布并利用共聚焦显微镜进行观察与拍摄。结果显示实验组幼虫细胞质和细胞核内均呈现较强的红色荧光, 而在细胞核膜及其周围的荧光最强, 对照组幼虫未呈现红色荧光, 说明内源性 CiRan 蛋白在刺激隐核虫幼虫的细胞质和细胞核内均有分布, 尤以细胞核膜的分布最丰富。以

上结果与在线软件 PSORT Prediction 对刺激隐核虫 CiRan 蛋白进行亚细胞定位预测的结果一致(图 6)。该蛋白的分布也与其潜在的功能相呼应, 正如以往的研究证明的, Ran 参与核膜装配后, 在有丝分裂的末期和细胞间期就分布在核膜上^[24]。

3 讨论

刺激隐核虫是以不均等二分裂的方式进行繁

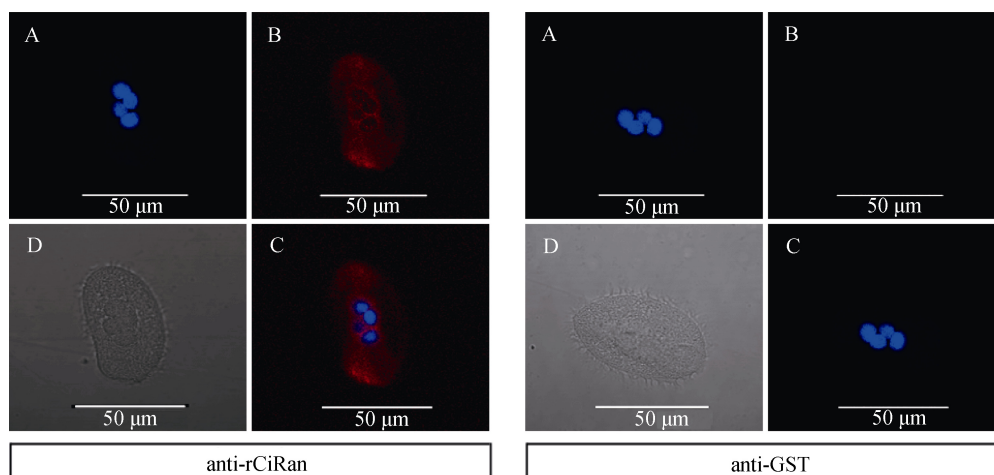


图 6 内源性 CiRan 蛋白在刺激隐核虫幼虫中的免疫荧光定位结果

A: DAPI 染核; B: 一抗为 rCiRan 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。

Fig. 6 Localization of the native CiRan in the theronts by using IFAT

Panel A: Nucleus; Panel B: Immunofluorescence figure with antiserum against rCiRan (left) or GST (right); Panel C: Merge of Panel A and Panel B; Panel D: Bright field.

殖的, 在适宜条件下一周之内就可完成一个生活史, 且虫数以 200 以上的指数形式增长^[4], 因此在鱼类养殖过程中一旦爆发感染往往来不及采取措施。如果能阐明影响其发育和繁殖的关键分子, 并以其作为靶标, 探讨抑制其繁殖的药物, 消灭或降低虫口密度, 甚至阻断感染, 将为该危害严重的鱼类疾病的控制奠定基础。作为小 GTP 酶家族成员的 Ran 是多功能蛋白, 在关键的几个细胞生理进程中起着重要的作用。人类寄生原虫的研究成果提示 Ran 有可能作为药物的靶标^[10], 在肿瘤研究中也暗示 Ran 是潜在的治疗靶标^[25]。在模式生物自由生活的纤毛虫——嗜热四膜虫的研究中也表明过表达 Ran1 可干扰细胞核的分裂^[21]。因此本研究利用建立 cDNA 文库并且通过对文库中克隆的表达序列标签测序的方法, 成功地克隆和重组表达了刺激隐核虫的 *Ran* 基因, 并对其分子特征进行分析, 就笔者所知, 这是迄今关于刺激隐核虫 *Ran* 基因的首次报道。本研究以生物信息学方法分析其基因序列, 并建立不同物种的 Ran 的系统发育树, 结果都说明 *CiRan* 及其编码的蛋白均具有 Ran 家族的典型特征, 与草履虫、多子小瓜虫、嗜热四膜虫等的 Ran 具有较近的亲缘关系, 与它们传统的分类地位相符。利用 RT-PCR 法和 western blotting 分析分别从转录和翻译水平对 *CiRan* 基因在刺激隐核虫生活史中表达情况检

测的结果显示, *CiRan* 的 mRNA 和蛋白质在刺激隐核虫的各个时期均有表达, 一定程度上说明该基因对各个发育阶段都是不可或缺的。刺激隐核虫与嗜热四膜虫一样在基因编码上与通用遗传密码的编码有所不同, 通用的终止密码子 UAA 和 UAG 被用来编码谷氨酰胺, *CiRan* 的开放阅读框中就具有 8 个这样的密码子, 这给用常规的原核和真核表达系统进行重组表达带来了困难, 本实验利用人工全基因合成的方法顺利地将这 8 个非通用密码子修改成 CAA 或 CAG(编码谷氨酰胺的通用密码子), 使其适于在常规的细菌、酵母、哺乳动物细胞中表达, 并在大肠杆菌中成功表达相应蛋白。用 *CiRan* 的重组蛋白免疫小鼠, 获得的多克隆抗体通过 western blotting 鉴定刺激隐核虫天然 *CiRan* 蛋白, 显示表观分子量为 25.3 kD, 与根据基因的开放阅读框计算的理论分子量相符。利用间接免疫荧光抗体实验技术检测天然 *CiRan* 蛋白在刺激隐核虫幼虫上的分布, 说明天然 *CiRan* 蛋白在刺激隐核虫幼虫的细胞质和细胞核内均有分布, 尤以细胞核膜的分布最丰富, 这种分布方式与其潜在的功能相对应。本实验通过对 *CiRan* 及其产物的初步研究, 为刺激隐核虫二分裂法繁殖分子机制的研究提供基础资料, 丰富了刺激隐核虫病原生物学知识, 为进一步探索安全

有效的刺激隐核虫感染的防治措施,以减少“白点病”的危害奠定了基础。

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] Burgess P, Matthews R. Fish host range of seven isolates of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora)[J]. *J Fish Biol*, 1995, 46(4): 727–729.
- [3] Wang F H, Xie M Q, Li A X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(1): 32–41.
- [4] Sun Z Y, Zheng C F, Wu X Y, et al. The strain and life-cycle of *Cryptocaryon irritans* isolated from *Pseudosciaena crocea* cultured in Xiapu, Fujian[J]. *Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition*, 2011, 27(2): 101–108. [孙志宇, 郑昌峰, 武晓燕, 等. 福建霞浦海区刺激隐核虫菌株鉴定及生活史观察[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2011, 27(2): 101–108.]
- [5] Chen A P, Jiang Y L, Qian D, et al. Cryptocaryoniasis[J]. *China Fisheries*, 2011(8): 39–40. [陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 刺激隐核虫病[J]. 中国水产, 2011(8): 39–40.]
- [6] Announcement No. 1125 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[R]. 2008.12.11. [中华人民共和国农业部公告第 1125 号[R]. 2008.12.11.]
- [7] Paduch M, Jelen F, Otlewski J. Structure of small G proteins and their regulators[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48(4): 829–850.
- [8] Clarke P R, Zhang C. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008 (9): 464–477.
- [9] Cautain B, Hill R, de Pedro N, et al. Components and regulation of nuclear transport processes[J]. *Fed Eur Biochem Soc*, 2015, 282(3): 445–462.
- [10] Frankel M B, Knoll L J. The ins and outs of nuclear trafficking: unusual aspects in apicomplexan parasites[J]. *DNA Cell Biol*, 2009, 28(6): 277–284.
- [11] Yamaguchi R, Newport J. A role for Ran-GTP and Crml in blocking re-replication[J]. *J Cell Sci*, 2003, 113: 115–125.
- [12] Weaver L N, Ems-McClung S C, Chen S H, et al. The Ran-GTP gradient spatially regulates XCTK2 in the spindle[J]. *Curr Biol*, 2015, 25(11): 1509–1514.
- [13] Yokoyama H, Koch B, Walczak R, et al. The nucleoporin MEL-28 promotes RanGTP-dependent γ -tubulin recruitment and microtubule nucleation in mitotic spindle formation[J]. *Nat Commun*, 2014(5): 3270.
- [14] Kiyomitsu T, Cheeseman I M. Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase[J]. *Cell*, 2013, 18; 154(2): 391–402.
- [15] Khuperkar D, Helen M, Magre I, et al. Inter-cellular transport of Ran GTPase[J]. *Plos ONE*, 2015, 10(4): 1–15.
- [16] Han F, Wang X, Wang Z. Characterization of myosin light chain gene up-regulated in the large yellow croaker immunity by interaction with RanGTPase[J]. *Gene*, 2013, 514(1): 54–61.
- [17] Zhao Z, Jiang C, Zhang X. Effects of immunostimulants targeting Ran GTPase on phagocytosis against virus infection in shrimp[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(6): 1013–1018.
- [18] Li C J, Liu J, Gui J F. cDNA cloning of *Ran* gene and analyses on its expression characterization and role in sperm nuclei decondensation *in vitro* in gibel carp, *Carassius auratus gibelio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(3): 297–304. [李常健, 刘军, 桂建芳. 银鲫 *Ran* 基因的 cDNA 克隆、表达特征及其在精核解凝中的作用[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 297–304.]
- [19] Wu L, Wu X, Du M. Identification and expression localization of a Ran homologue in mollusc abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 30(3): 986–991.
- [20] Liang H, Xu J, Zhao D. et al. Subcellular localization and role of Ran1 in *Tetrahymena thermophile* amitotic macronucleus[J]. *Fed Eur Biochem Soc*, 2012, 279(14): 2520–2533.
- [21] Liang H X, Xu J, Wang W. Overexpression of RAN1 inhibits macronuclear amitosis in *Tetrahymena thermophile*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29 (1): 42–48. [梁海霞, 许静, 王伟. RAN1 基因过表达抑制嗜热四膜虫大核无丝分裂[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29 (1): 42–48.]
- [22] Huang X, Xu Y, Guo G, et al. Molecular characterization of an actin depolymerizing factor from *Cryptocaryon irritans*[J]. *Parasitology*, 2013, 140(5): 561–568.
- [23] Scheffzek K, Klebe C, Fritz-Wolf K, et al. Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form[J]. *Nature*, 1995, 374: 378–381.
- [24] Bamba C, Bobinnec Y, Fukuda M, et al. The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly *in vivo*[J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 503–507.
- [25] Yuen H F, Chan K K, Grills C, et al. Ran is a potential therapeutic target for cancer cells with molecular changes associated with activation of the PI3K/Akt/mTORC1 and Ras/MEK/ERK pathways[J]. *Clin Can Res*, 2012, 18(2): 380–391.

Cloning and expression of a Ran-like small GTPase gene from *Cryptocaryon irritans*

FU Guoliang^{1,2}, HUANG Majiao¹, XIE Jinzhu¹, HU Yanhong¹, YAN Yanhua^{1,2}, HUANG Zhen¹, HUANG Xiaohong¹

1. Fujian Key Laboratory of Developmental and Neural Biology, College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China;

2. The First Middle School, Dongxiang County, Dongxiang 331800, China

Abstract: Ras-related nuclear proteins (Rans), a family of small monomeric G proteins, are important in many cell activities, participating in the regulation of eukaryotic nucleocytoplasmic transport, DNA replication, mitotic spindle assembly, nuclear envelope dynamics, etc. In this study, a *Ran* gene (designated *CiRan*) was cloned from a cDNA library of *Cryptocaryon irritans* trophonts and characterized. The full-length *CiRan* cDNA was 771 bp, and contained an open reading frame (ORF) of 654 bp, encoding a putative polypeptide of 217 amino acids. The ORF contained 6 TAAs and 2 TAGs, which encode glutamine in the ciliate rather than stop codons, as in the universal genetic code. The calculated molecular weight of the *CiRan* protein was 25.3 kD, with a pI of 8.9. The sequence information has been deposited in GenBank under accession number KP662712. A bioinformatic analysis predicted that the deduced *CiRan* protein contains a typical Ran domain, extending from residue 11 to residue 174. A GTP/Mg²⁺-binding site occurs at residues 17–153, a Switch I area at residues 30–50, a Switch II area at residues 67–87, a G1 ring at residues 17–26, a G2 ring at residues 40–42, a G3 ring at residues 65–70, a G4 ring at residues 120–125, and a G5 ring at residues 148–152. The predicted structural characteristics confirm that *CiRan* is a member of the Ran protein family. A phylogenetic tree of *CiRan* and 10 Ran proteins from other species revealed that *CiRan* is closely related to the Ran proteins of *Paramecium tetraurelia*, *Ichthyophthirius multifiliis*, and *Tetrahymena thermophila*. Reverse transcription-PCR showed that the *CiRan* gene is expressed in all the developmental stages of the *C. irritans* life cycle. After the non-universal codons, TAA and TAG, in the ORF of the *CiRan* cDNA were modified to CAA and CAG, respectively, and the ORF DNA was amplified and inserted into the *EcoR* I–*Xho* I restriction sites of the bacterial expression vector pGEX-4T-1, generating the recombinant plasmid pGEX-4T-1/*CiRan*, which was used to transform *Escherichia coli*. The transformed *E. coli* was induced with isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside to express the recombinant protein r*CiRan*, as a fusion protein with glutathione *S*-transferase (GST). After purification with glutathione Sepharose 4B, r*CiRan* was used to intraperitoneally immunize specific-pathogen-free Kunming mice to prepare a polyclonal antibody against r*CiRan*. Another group of mice was immunized with GST to prepare a polyclonal antibody against GST for the negative control. The results of a western blotting analysis showed that the polyclonal antibody against r*CiRan* recognized the native *CiRan* protein in lysates of different developmental stages of *C. irritans*. The molecular mass of native *CiRan* was 25.3 kD, which is consistent with the value calculated from the coding sequence. The native *CiRan* protein in *C. irritans* theronts was localized with an indirect immunofluorescent antibody assay with the antibody directed against r*CiRan*, showing that native *CiRan* was not only distributed in the cytoplasm of *C. irritans* theronts, but also in the nuclei. It was especially abundant around the nuclear membrane, implying that the protein has nuclear-membrane-related functions. This study extends our theoretical understanding of the biology of the pathogen *C. irritans*, and lays the foundation for future studies of the functions of *CiRan*, which may be important in the prevention of *C. irritans* infection and the control of cryptocaryonosis.

Key words: *Cryptocaryon irritans*; Ras-related nuclear protein; cloning; expression; analysis

Corresponding author: HUANG Xiaohong. E-mail: biohxh@fjnu.edu.cn