

·基础研究·

华支睾吸虫乙醛脱氢酶基因的克隆、表达和序列分析

吴 德, 吴忠道, 徐 进, 何东苟, 余新炳

(中山大学中山医学院病原生物学部, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】通过筛选华支睾吸虫成虫 cDNA 质粒文库,发现并识别新基因,将发现的新基因编码区克隆到原核表达质粒 pGEX-4T-1 并表达出融合蛋白。【方法】用文库通用引物对华支睾吸虫 cDNA 质粒文库进行 PCR 扩增,对产物为 500 bp 以上的质粒测序,结果在 NCBI 和 ExPasy 网站上进行序列分析,并应用 ORFfind、ClustalW、NCBI Conserved Domain Search 等程序对其进行开放阅读框(ORF)、进化树及结构域分析。根据载体多克隆位点及新基因 ORF 设计引物,PCR 扩增,产物克隆到目的载体上。筛选并鉴定出阳性克隆,对鉴定过的重组体进行诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 电泳鉴定。【结果】发现 *CsALDH* 基因,完整阅读框含 1467 个碱基,编码 489 个氨基酸,理论相对分子质量 $M_r \approx 52.564 \times 10^3$,理论 pI 为 5.43。序列分析表明,*CsALDH* 基因编码的氨基酸序列与其它物种有较高的同源性,*CsALDH* 与爪蛙属乙醛脱氢酶的同源性为 59%,具有乙醛脱氢酶保守功能域。构建的重组原核表达质粒经鉴定与目标基因相符。电泳显示表达产物在 $M_r \approx 78 \times 10^3$ 处有一条特异性条带。【结论】发现华支睾吸虫磷酸甘油醛脱氢酶基因,成功构建重组原核表达质粒并表达出融合蛋白。

关键词:华支睾吸虫;乙醛脱氢酶;克隆;分子;原核表达;序列分析

中图分类号:R383.2*2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)03-0241-04

Cloning, Expression and Sequence Analysis of Aldehyde Dehydrogenase Gene from *Clonorchis sinensis*

WU De, WU Zhong-dao, XU Jin, HE Dong-gou, YU Xin-bing

(Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To search and identify novel gene by screening the cDNA library of adult *Clonorchis sinensis*, clone the screened gene-Aldehyde dehydrogenase (ALDH) to the prokaryotic expression vectors and express included protein. 【Methods】The cDNA library of *C. sinensis* were screened by sequencing PCR products which length was over 500 bp. The sequencing results were analyzed using the software of ORFfind, ClustalW, NCBI Conserved Domain Search, etc. to seek the ORF, phylogenesis and conserved domain. Besides, a pair of specific oligonucleotide primers were designed and synthesized according to the ORF of ALDH gene. The ORF of ALDH gene was amplified by PCR and then cloned into the target vector. The recombinants were identified and expressed, the expressed products were identified by SDS-PAGE electrophoresis. 【Results】A novel cDNA sequence coding ALDH with a molecular mass of $M_r \approx 52.564 \times 10^3$, pI of 5.43, which is 1467 bp and encode 489 AA residues, was found from the cDNA library of *C. sinensis*. The recombinant plasmid pGEX-4T-1-ALDH was constructed and expressed fusion protein. 【Conclusion】Identified a novel gene coding ALDH of *C. sinensis*, constructed its prokaryotic expression vectors and expressed fusion protein successfully.

Key words: *Clonorchis sinensis*; aldehydedehydrogenase; cloning, molecular; prokaryotic expression; sequence analysis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(3): 241-244, 249]

收稿日期:2004-10-26

基金项目:广东省医学联合科技攻关基金资助项目(2002B31005);广东省科技厅社会发展攻关基金资助项目(2002B31005);广州市科技攻关基金资助项目(200223-E4022)

作者简介:吴 德(1968-),男,安徽芜湖人,博士生,讲师;余新炳,教授,通讯作者. E-mail:wuchexue0520@sina.com

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乙醛脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase ALDH) 在人肝脏鉴定出 4 种类型, 它们负责大部分乙醛的氧化^[1]。乙醛是肝脏中酶催化乙醇的第一个氧化代谢产物, 它比亲本化合物乙醇的毒性更大。在肝脏和其他的器官中, 乙醛的氧化是由 NAD^+ 依赖的 ALDH 催化的^[2]。许多 ALDH 同工酶是由不同的基因位点编码, 这些同工酶已经在人的组织和器官中得到检测, 它们的电场迁移率, 动力学特性和在细胞和组织中的分布都有不同^[3]。人的 ALDH 被分成 9 个主要的蛋白质家族, 第一家族的成员是细胞浆 ALDHs (ALDH1); 第二家族的成员主要是线粒体 ALDHs (ALDH2), ALDH2 的多态与食管癌和上呼吸道肿瘤关系密切; 第三家族的成员主要是由高 K_m 值的 ALDHs (ALDH3) 构成^[4]。ALDH1 在大鼠和小鼠的胃、肺、肝和人的胃、唾液和肝癌组织中都有发现^[5]。各种 ALDH 同工酶都能特异催化脂肪族和芳香族醛为底物的制剂^[6,7]。人肝脏中的同工酶主要是 ALDH1 和 ALDH2, 它们都是分子量相当的同工酶异源四聚体, 每个单体的相对分子质量 $M_r \approx 54 \times 10^3$ [8]。华支睾吸虫 ALDH 基因是第一次发现, 对其基因结构及蛋白质功能的研究有着非常重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 华支睾吸虫成虫 cDNA 质粒文库 华支睾吸虫成虫 cDNA 质粒文库由本室构建。克隆载体为 pBluescript II SK 的改造载体, 具体是将 *EcoR* I 和 *Not* I 之间的序列改造为 *Sfi* I A 和 *Sfi* I B 接头序列, 酶切后可定向插入 cDNA 片段 (*Sfi* I A → *Sfi* I B)。

1.1.2 载体和菌株 原核表达质粒 pGEX-4T-1 由本室保存。DH5 α 及 BL21 大肠埃希菌由本室保存。

1.1.3 PCR 引物 应用 PCR design 和 DNA club 软件对已知磷酸甘油醛脱氢酶基因序列分析, 根据载体结构图, 设计出一对在 5' 端分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的特异引物: ALDH1, ALDH2 引物由上海博亚公司合成, PAGE 纯化。

1.1.4 其它试剂 *EcoR* I、*Xho* I、dNTP、T4DNA 连接酶和 *Taq* 酶购自 TaKaRa (日本) 公司。IPTG 为上海博亚公司产品。粒抽提试剂盒购自 Qiagen (澳

大利亚) 公司。

1.2 方法

1.2.1 cDNA 文库的筛选 华支睾吸虫 cDNA 文库经转化 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 阳性克隆经 37 °C 14~16 h 培养后用 Qiagen 公司质粒抽提试剂盒提取质粒, 过柱脱盐、琼脂糖凝胶电泳检测定量后作为测序模板。按 DYE TERMINA2TOR 原理及 DYEnamic™ ET terminator kit (MegaBAC™) 提供的标准操作方法进行 96 孔板式测序 PCR 反应, PCR 反应产物在 500 bp 以上的质粒上 MegaBase1000 测序仪测序 (上海联众科技研究院)。

1.2.2 CsALDH 基因的识别与功能预测^[9] 登陆 NCBI 主页, 利用 ORFfind 软件将所得的目的基因序列进行开放阅读框 (ORF) 分析, 再利用 Blastx 软件对所得的 ORF 序列进行序列比对及保守区分析。登陆 ExPASy 主页, 用 NCBI 保守功能域等软件对目的片段进行蛋白质结构的预测和分析。将通过上述分析所得的同源的氨基酸序列进行编排, 用 ClustalW 软件进行系统发生树的绘制。

1.2.3 PCR 引物的设计 利用 DNA club 和 PCR design 软件, 参照 pGEX-4T-1 多克隆酶切位点和目的基因的酶切图谱设计两条 5' 端带有 *EcoR* I 和 3' 端带有 *Xho* I 的引物, 每条引物的 5' 端各加 3 个保护性碱基。

1.2.4 PCR 扩增 以质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系如下: 取质粒 DNA 1.0 μL , 10 \times PCR 缓冲液 5.0 μL , dNTP Mix (含 2.5 mmol/L 每种 dNTP) 5.0 μL , 引物 ALDH1、ALDH2 (10 pmol/ μL) 各 2 μL , *Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.25 μL , 灭菌蒸馏水 34.75 μL , 反应总体积 50 μL 。轻轻混合后点动离心, 常规 PCR 扩增条件如下: 95 °C 5 min, 3 步循环 (94 °C 1 min, 60 °C 1.5 min, 72 °C 2 min), 共 35 个循环, 最后 72 °C 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 pGEX-4T-1-ALDH 重组体的构建及鉴定 将 PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切后, 经琼脂糖凝胶回收, 定量后进行连接并转化到感受态 BL21 大肠杆菌, 挑取氨卞青霉素 LB 固体培养基平板上的菌落, 放入含

菌下青霉素 (50 mg/mL) LB 液体培养基中培养过夜, 提取质粒进行双酶切、PCR 和测序鉴定。

1.2.6 pGEX-4T-1-ALDH 重组体的诱导表达及融合蛋白的鉴定 取过夜培养的菌液 60 μL, 加入一含有 Amp 的 6 mL LB 培养基中, 37 °C、280 r/min 震荡 3 h, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/mL 诱导表达, 分别取 1、2、3、4 h 表达液 1.5 mL, 5 000 min 离心 3 min 收集菌体, 弃去上清液, 在沉淀中加入 1×SDS buffer 100 μL, 煮沸 3~5 min 裂解, 取裂解物 20 μL 进行 SDS-PAGE 分析。

2 结 果

2.1 CsALDH 的识别和序列分析

将筛选文库所获得阳性克隆的测序结果在 NC

BI 上进行 ORF 的寻找和 Blastx 分析, 从正反方向进行 ORF 分析, 共获得 8 个大小不一的 ORF, 其中最长的一个 ORF 有起始密码为 ATG, 终止密码 TAA, 阅读框含 1467 个碱基, 编码 489 个氨基酸, 理论相对分子质量 $M_r \approx 52.56 \times 10^3$, 理论 pI 为 5.43。经 Blastx 分析发现与其它物种的磷酸甘油醛脱氢酶基因所编码的氨基酸序列具有较高的同源性。推导的氨基酸多序列分析显示, *CsALDH* 基因编码氨基酸序列与 *Bostaurus*、爪蟾、人类、小鼠、*Anopheles gambiae* 磷酸甘油醛脱氢酶一致性(identity) 分别为 56% (276/485)、59% (288/488)、56% (273/485)、57% (278/485) 和 55% (269/484)。用 Clustal W 将 *CsALDH* 编码氨基酸序列与这 5 种物种的磷酸甘油醛脱氢酶序列进行比对(图 1)。系统进化树分析发现 *CsALDH* 与爪蟾亲源关系最为接近(图 2)。

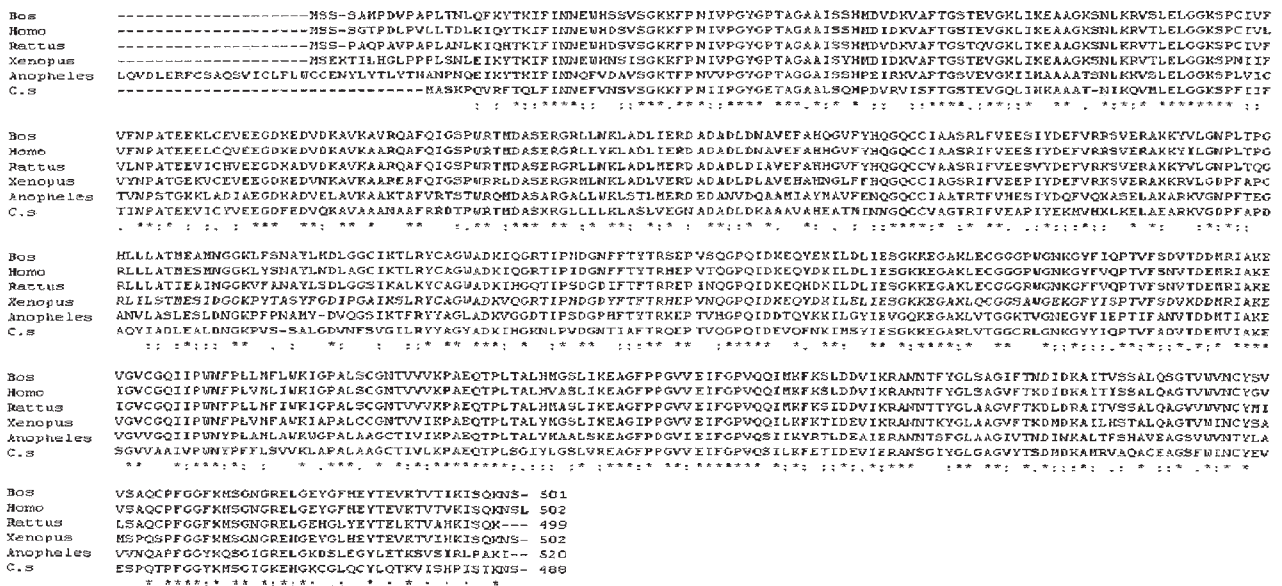


图 1 华支睾吸虫 ALDH 与其它物种的 ALDH 氨基酸序列的比较

Fig.1 Comparison of the *C. sinensis* ALDH amino-acid sequence with species ALDH sequences

*" indicate completes identity; "." indicates high identity; ":" indicates lower identity; "gap" indicates difference

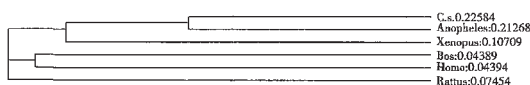


图 2 系统发生分析

Fig.2 Analysis of phylogeny

The numbers indicate evolution distance

bp 处显示一条清晰带, 与预计大小一致(图 3)。

2.3 原核表达载体的构建

将筛选后所得的菌落, 通过碱裂解法提取质粒 DNA, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶进行双酶切, 酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示一条与目的基因大小完全一致的条带(图 4), 重组质粒 pGEX-4T-1-ALDH 成功构建。

2.4 重组体表达产物的鉴定

取表达产物裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电

2.2 ALDH 基因的扩增

PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 约 1467

泳, 在相对分子质量 $M_r \approx 71 \times 10^3$ 处有一条与理论预测融合蛋白大小相一致的特异条带(图 5)。

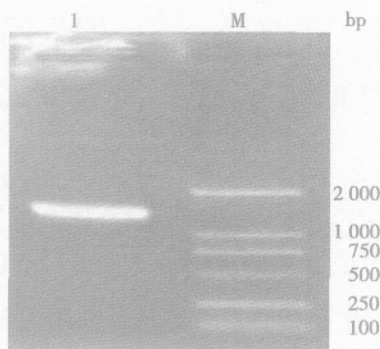


图 3 *ALDH* 基因的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of amplified product of *ALDH* gene (10 g/L agrose gel electrophoresis)

Lane 1: Amplified product of *ALDH* gene; Lane M: DNA standard markers

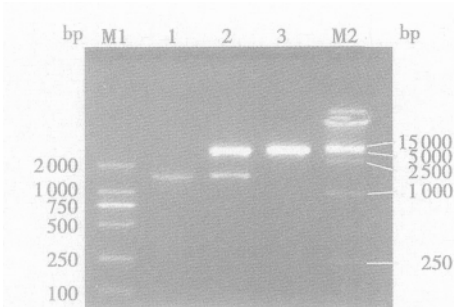


图 4 pGEX-4T-1-ALDH 重组体的双酶切鉴定

Fig.4 Identification of recombinat pGEX-4T-1-ALDH digested with *EcoR* I and *Xho* I (10 g/L agose gel electrophoresis)

M1: DL2 000 markers; M2: DL15 000 markers; Lane 1: Amplified product of *ALDH* gene; Lane 2: Recombinant pGEX-4T-1-ALDH digested with *EcoR* I and *Xho* I; Lane 3: pGEX-4T-1-ALDH digested with *EcoR* I

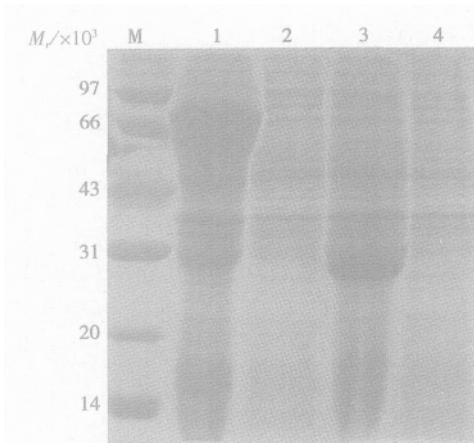


图 5 重组体 pGEX-4T-1-ALDH 表达产物的鉴定

Fig.5 Identification of expression product from recom-

binant pGEX-4T-1-ALDH (120 g/L polypropylene gel electrophoresis)

Lane M: The protein marker; Lane 1,2: Induced and uninduced recombinant pGEX-4T-1-ALDH for 4 h respectively; Lane 3,4: Induced and un-induced pGEX-4T-1 for 4 h respectively

3 讨论

筛选 cDNA 文库中是获得新基因的常用方法,在本次研究中,我们筛选的 cDNA 文库是一个质粒文库。该质粒文库为非表达文库,文库的筛选主要是先通过 PCR 扩增,再对一定长度 PCR 产物的质粒进行测序从而获得新基因。该文库适合于华支睾吸虫未知基因探索的首次研究,通过测序是获得新基因的主要手段。我们通过对该文库的筛选获得了一条开放阅读框为 1467 个碱基的 cDNA 序列,利用生物信息学的相关软件对该序列进行了识别,发现它与爪蛙属的乙醛脱氢酶的氨基酸序列长度一致,同源性高达 59%,同时具有与乙醛脱氢酶完整的保守功能阈。从生物进化树的研究来看,它又与爪蛙的亲源关系最近,拥有同一个进化祖先,而与人和鼠等脊椎动物的关系较远。

利用生物信息学对未知基因进行初步识别,为我们进一步的实验研究指明了方向,使我们能在较短的时间内获得可靠的实验结果,从而避免了不少弯路。目前,这一方法随着生物信息库的不断扩大,各种信息学分析软件的日趋完善,越来越受到科研工作者的重视,也越来越广泛地得到应用。值得注意的是该方法仍有许多不足之处,加以生物分子的千变万化,最终结果仍要在实验中得到验证。*ALDH* 是由单一基因编码的同源四聚体。本研究所获得的 *CsALDH* 的理论相对分子质量 $M_r = 52.56 \times 10^3$,等电点为 5.43,二级结构有 14 个 α 螺旋、21 个 β 折叠和 37 个转角构成。在第 25 个残基处有信号肽的剪切点,在 161-181 的区域有 20 个残基的跨膜结构。本文所获得的华支睾吸虫成虫乙醛脱氢酶属第 1 次报道。并构建了原核表达载体,表达出与日本血吸虫 *GST* ($M_r \approx 26 \times 10^3$) 融合的磷酸甘油醛脱氢酶 ($M_r \approx 71 \times 10^3$) 的融合蛋白,这为进一步的鉴别及其结构和功能研究奠定了基础。

(下转第 249 页 to page 249)

- [8] 陈家树,孙家钧,梁陆光. 五步蛇毒纤溶组分 II 的分离和若干药效学的特征[J]. 中国药理学通报,1993, 9(1):22-5.
- [9] Xiuxia Liang, Jiashu Chen, Yingna Zhou, *et al.* Purification and biochemical characterization of F II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom[J]. *Toxicon*, 2001, 39(8):1133-9.
- [10] 邱鹏新,黎明涛,苏兴文,等. 尖吻蝮蛇毒纤溶因子单克隆抗体的制备[J]. 中山医科大学学报,1999, 20(1):16-9.
- [11] Ouyang CH, Teng CM. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 420(2):298-308.
- [12] 钱小红,马立人,张庆宇. 尖吻蝮蛇毒纤维蛋白溶解活性组分的纤溶作用[J]. 中华血液学杂志,1993, 14(10):512-5.
- [13] Du XY, Pan H, Jin Y, *et al.* Purification, cDNA cloning and molecular characteristic of a fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon acutus*[J]. *J Nat Toxins*, 1998, 7(2):159-72.
- [14] Liu QD, Xu WH, Cheng X, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding hemorrhagic toxin acutolysin A from *Agkistrodon acutus*[J]. *Toxicon*, 1999, 37(11):1539-48.
- [15] Gong WM, Zhu XY, Liu SJ, *et al.* Crystal structure of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom *Agkistrodon acutus*[J]. *J Mol Biol*, 1998, 283(3):657-8.
- [16] 范春阳,钱友存,沈雁,等. 五步蛇毒血小板凝集抑制因子 cDNA 的克隆及表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5):531-6.

(编辑 黄小延)

(上接第 244 页 from page 244)

参考文献:

- [1] Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes[J]. *Pathol Biol*, 2001, 49(9): 703-9.
- [2] Helander A, Tottmar O. Effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the aldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes and leukocytes[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1988, 63(4): 262-5.
- [3] Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, *et al.* Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping [J]. *Pharmacogenetics*, 1999, 9(4): 421-34.
- [4] Yokoyama A, Maramata T, Ohmori T, *et al.* Multiple primary esophageal and concurrent upper aerodigestive tract cancer and the alcoholics[J]. *Cancer*, 1996, 77(10): 1986-90.
- [5] Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, *et al.* Alcohol dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the human pancreas[J]. *Dig Dis Sci*, 2003, 48(7): 1230-3.
- [6] Tottmar O. Assay of brain aldehyde dehydrogenase activity using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. *Anal Biochem*, 1986, 158(1): 6-11.
- [7] Cheung C, Davies NG, Hoog JO. Species variations in cutaneous alcohol dehydrogenases and aldehyde dehydrogenases may impact on toxicological assessments of alcohols and aldehydes[J]. *Toxicology*, 2003, 184(2-3): 97-112.
- [8] Maruyama K, Takahashi H, Matsushita S, *et al.* Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in relation to alcoholic chronic pancreatitis in Japan[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 1999, 23(4 Suppl): 85S-91S.

(编辑 张敏瑞)