

中国实验小型猪朊蛋白基因的克隆与序列分析

孟丽平 赵德明 王金秀 宁章勇 马李颖

(中国农业大学 动物医学院, 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100094)

摘要 根据已发表的猪朊蛋白基因(*PRNP*)序列设计特异性引物,进行 PCR 直接扩增,得到了中国实验小型猪(CEMP)的朊蛋白基因(*PRNP*),将其克隆到 pGEM-T Easy 载体中。序列分析表明上述 CEMP 的 *PRNP* 基因 ORF 区全长为 774 bp,编码 257 个氨基酸的前体蛋白,分子质量约为 28.3 ku,其 *PRNP* 序列与已发表的猪 *PRNP* 序列(L07623)差异微小,仅在第 4 位氨基酸残基处有变异(Ser → Asn);绘制 CEMP 与其他 15 种属动物朊蛋白的氨基酸序列进化树发现,CEMP 与多种哺乳动物朊蛋白的氨基酸序列遗传距离比较接近,与水貂最近,而与禽类朊蛋白氨基酸的遗传距离较远。

关键词 中国实验小型猪;朊蛋白;克隆;序列分析

中图分类号 S 851.695.7

文章编号 1007-4333(2005)05-0062-03

文献标识码 A

Cloning and sequencing of prion protein gene from China experimental minipig

Meng Liping, Zhao Deming, Wang Jinxiu, Ning Zhangyong, Ma Liying

(College of Veterinary Medicine, National Laboratory for Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE),
China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract As there was no sufficient genetic information of the prion protein gene (*PRNP*) of China Experimental Minipig (CEMP), the the ORF of the *PRNP* of CEMP was amplified from genomic DNA and was cloned into the pGEM-T Easy vector. By sequence analysis, the ORF of the *PRNP* of CEMP include 774 bp, which encodes a protein of 257 amino acids. Some minor variations were found and the variations led to only one amino acid variation (Ser → Asn) at codon 4 when compared with the published sequence of *PRNP* gene sequences (L07623). Phylogenetic tree of PrP aa sequence shows that the distance between avian and other mammals PrP aa sequences are far away, while the distance between CEMP and other mammals PrP aa sequences are near, and the distance between CEMP and mink are the most nearest.

Key words China Experimental Minipig(CEMP); prion; gene clone; sequence analysis

朊蛋白基因(*PRNP*)在正常情况下编码 1 种细胞表面的糖蛋白,通常称其为细胞型朊蛋白(PrPc),在未知的相关因子作用下 PrPc 通过构象转变,成为异常的朊蛋白(PrPSc),而 PrPSc 在体内的异常蓄积引发朊病毒病^[1]。朊病毒病(prion disease)或称为传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies, TSE)是一系列慢性、传染性、致死性的神经退行性疾病的总称,包括人的克-雅氏病(creutzfeldt-jakob disease, CJD)、羊瘙痒病(scrapie)及牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathies, BSE)等^[2]。

我国培育的中国实验小型猪(CEMP)因其在解剖学、生理学特性及营养代谢等方面与人类非常相似而在生物医学等领域广泛应用^[3],但包括朊病毒在内的可能微生物感染阻碍其应用。最近研究显示,猪能够通过多种非肠道途径感染疯牛病^[4],虽然至今没有报道猪自然发生朊病毒的病例,但其已经长期暴露于污染有朊病毒的肉骨粉之下。研究发现朊病毒病的发生与编码朊蛋白基因(*PRNP*)的序列变异密切相关,这已经在对人、羊和鼠等的研究中得到证实^[4-5]。本研究旨在研究中国实验小型猪(CEMP) *PRNP* 基因的遗传背景,对研究 CEMP 在

收稿日期: 2005-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371062, 30400325); 教育部博士点基金(20020019006) 专项基金资助项目

作者简介: 孟丽平, 博士研究生; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物传染性海绵状脑病研究, E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

自然和实验条件下的 TSE 易感性提供依据。

1 材料与方法

1) 血样。无菌条件下采取健康 CEMP 的抗凝血,以抗凝剂(100 mL 溶液中含 0.48 g 柠檬酸,1.32 g 柠檬酸钠,1.47 g 葡萄糖)抗凝,抗凝剂与血体积比为 1:5。

2) 试剂。基因组 DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒及 pGEM-T Easy 载体购于 Promega 公司;Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶 EcoR 及 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

3) CEMP 的 *PRNP* 基因的 PCR 扩增。按试剂盒的方法进行基因组总 DNA 提取。用已发表序列设计特异性引物(购自大连宝生物公司),扩增猪 *PRNP* 基因,引物序列如下,上游引物:5'-CATTTGATGCTGACCCCTCTTTA-3';下游引物:5'-ATGAGACACCACCTACA GGGCT-3'。

4) 原核克隆载体的构建与鉴定。将 PCR 扩增反应得到的目的产物进行纯化后与 pGEM-T Easy 载体连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 JM109,经蓝白斑筛选挑取白色菌落,经 PCR、酶切鉴定,得到正确克隆的 pGEM-pPrP。

5) 重组质粒的序列测定和序列分析。序列测定由 TaKaRa 公司基因组 DNA 测序仪完成,利用 DNAMAN 软件进行序列比较并绘制氨基酸序列系统进化树。

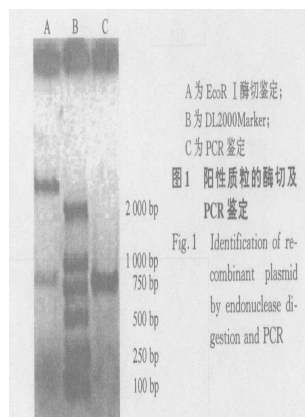
2 结果

2.1 CEMP 的 *PRNP* 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,透射紫外线下观察可见 PCR 扩增产物中出现特异条带,大小与预期相符,约 890 bp。

2.2 CEMP 的 *PRNP* 基因 PCR 产物的克隆鉴定

对阳性克隆 pGEM-pPrP 进行 PCR 鉴定结果显示,扩增片段约 890 bp,与所插入片段大小一致。利用限制性内切酶 EcoR 对扩增阳性质粒进行酶切鉴定(pGEM-T Easy 载体两端分别存在 1 个 EcoR 酶切位点),分别获得约 890 和 5 000 bp 的 2 条酶切片段,这与克隆所插入片段大小及 pGEM-T Easy 克隆载体质粒大小相符,表明所获克隆为含有目的基因片段的阳性克隆(图 1)。



A 为 EcoR I 酶切鉴定;
B 为 DL2000Marker;
C 为 PCR 鉴定

图 1 阳性质粒的酶切及 PCR 鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by endonuclease digestion and PCR

A 为 EcoR 酶切鉴定;
B 为 DL2000Marker;
C 为 PCR 鉴定

图 1 阳性质粒的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid by endonuclease digestion and PCR

2.3 CEMP 的 *PRNP* 基因片段的序列分析

经序列分析测定,克隆片段包含一个完整的开放读码框架,其片段为 774 bp,编码 257 个氨基酸,其 GenBank 登记号为 AY835631。通过与已发表的猪 PrP 基因序列(L07623)对比分析发现,二者序列同源性高达 99.83%,仅在 11(G→A),615(G→C),684(G→A)和 726(T→G)位核苷酸存在变异;核苷酸的变异导致其氨基酸序列在第 4 位残基处有 1 个氨基酸的改变(Ser→Asn)。

分析推导出的 CEMP 朊蛋白序列其蛋白结构为:N 端有 24 个氨基酸残基的信号肽,54-94 氨基酸残基是 1 个八肽重复区,其中第 1 个和最后 1 个重复为九肽,其序列为:PQGGGGWGQ-PHGGG-WGQ-PHGGGGWQ-PHGGGGWQ-PHGGGGWQ-PHGGGGWQ。接下来为结构较疏松的疏水区和结构紧密的球状区,在其 C 末端有 22 氨基酸残基的糖磷脂酰肌醇(GPI)信号肽。

根据 CEMP 与其他 15 种属动物的 PrP 氨基酸序列(其 GenBank 号分别为:AY835630(中国实验小型猪)、AY769957(绵羊)、AF117315(山羊)、AF003087(猫)、AY679696(鹿)、AY367641(牛)、AY327449(熊猫)、AF022714(犬)、S46825(水貂)、AY723285(骆驼)、M33958(中国金黄地鼠)、D00015(人)、AY382293(猴)、S69654(大鼠)、AY365065(孔雀)、AF283319(鸭))绘制序列进化树(图 2),从图中可以看出禽类与包括 CEMP 在内的多种哺乳动物的 PrP 氨基酸序列遗传距离较远,分别处于大的 2 个分支中;CEMP 与哺乳动物 PrP 氨基酸序列遗传距离较近,并同处在一个大的分支中,其中与水貂的遗传距离最近,同处在一个小分支中,其后与绵羊,山羊,猫,鹿,犬,牛,和熊猫 PrP 氨基酸序列的遗传距离都较近,而与啮齿类和灵长类动物的遗传距离稍远。

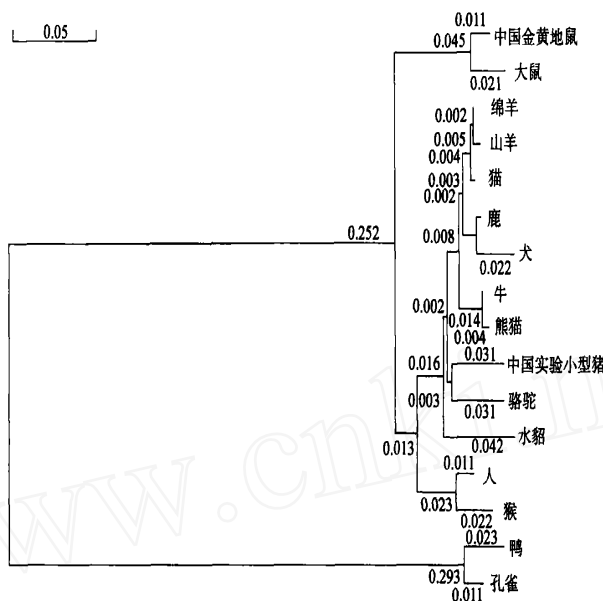


图2 CEMP与其他15种属动物朊蛋白氨基酸序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the PrP amino acid sequence of 16 species of animal

3 讨论

研究发现,影响动物对TSE疾病易感性的有2个关键因素,其一,该病的发生与否与朊病毒毒株的毒力和嗜性不同有关;其二,PRNP基因编码区的序列变异一定程度上影响该种动物对TSE的易感性或抗性。经研究发现,羊PRNP基因ORF区的136、154和171位点的序列多态性与羊对羊痒病的易感性和抗性密切相关,如具有Val/Val₁₃₆Arg/Arg₁₅₄Gln/Gln₁₇₁基因型的羊比较容易感染羊痒病,而具有Ala/Ala¹³⁶Arg/Arg₁₅₄Arg/Arg₁₇₁基因型的羊则对痒病因子具有较强的抗性^[5]。在对vCJD疾病的研究中发现,人129位的氨基酸残基与其对该病的易感性有很大联系,当该位的甲硫氨酸被缬氨酸取代时,其对vCJD的易感性就会大大增强^[6]。鉴于此,分析和研究CEMP的PrP核苷酸及氨基酸序列就显得尤为重要。

PRNP基因编码256个氨基酸的前体蛋白在细胞内随后的加工成熟过程中会切去其N端24个氨基酸的信号肽和C端22个氨基酸的信号肽,并最终在C端组装上一个脂多糖,称糖磷脂酰肌醇(GPI),锚定于神经膜上成为成熟的朊蛋白。国外科学家已经对13个品种猪的PRNP序列进行了分析,发现这些猪朊蛋白序列相当保守,所有测得的序列完全一致^[7-8]。本研究通过对中国实验小型猪(CEMP)的PRNP基因序列克隆分析发现,其核苷

酸序列与以往发表的猪序列有微小差异,这些变异仅导致了1个氨基酸(Ser→Asn)的改变,其他均为同义突变,而这个变异恰好落在了朊蛋白N端信号肽的区域内,所以可以判定其成熟朊蛋白序列并未发生改变。

参 考 文 献

- [1] Prusiner S B. Prions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13363-13383
- [2] Weissmann C. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies[J]. FEBS Lett, 1996, 389: 3-11
- [3] Logan J S. Prospects for xenotransplantation[J]. Cur Opin Immunol, 2000, 12: 563-568
- [4] Wells G A, Hawkins S A, Austin A R, et al. Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs[J]. J Gen Virol, 2003, 84: 1021-1031
- [5] Palmer M S, Dryden A J, Hughes J T, et al. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease[J]. Nature, 1991, 352: 340-342
- [6] Vaccari G, Conte M, Morelli L, et al. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep[J]. Mol Cell Probe, 2004, 18: 33-37
- [7] Martin T, Hughes S, Hughes K, et al. Direct sequencing of PCR amplified pig PrP genes[J]. Biochem Biophys Acta, 1995, 1270: 211-214
- [8] Lipp O, Ritzmann M, Kixmoller M, et al. Homogeneity of the prion protein gene in various European and asian pig breeds[J]. J Vet Med B, 2004, 51: 97-98