

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.03.004

犬弓首蛔虫 *abcg-5* 基因的克隆及序列分析^①

黄汉成, 江艾耘, 罗永莉, 杨晓迪,
李相兰, 胡志刚, 周荣琼

西南大学 动物科学学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 研究犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*, *T. canis*)腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporters, ABC)亚家族 G5 基因(*abcg-5*)的分子特征. 根据犬弓首蛔虫基因组数据库中的 *Tc-abcg-5* 基因序列设计引物, 通过 PCR 技术克隆 *Tc-abcg-5* 全长基因, 并进行多重序列比对和种系发育进化树分析. 结果表明: 该基因全长为 1 902 bp, 编码 633 个氨基酸. 功能结构域分析发现 *Tc*ABC5 蛋白包含 1 个 ABC 转运蛋白结构域和 6 个跨膜区, 同时发现了高度保守的 Walker A 和 Walker B 模体. GO 分析显示 ABCG5 具有 ATP 结合和 ATP 酶活性. 种系发育进化树分析显示 *Tc*ABC5 与猪蛔虫进化关系较近, 与哺乳动物进化关系较远.

关键词: 犬弓首蛔虫; *abcg-5* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S858.292

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)03-0023-07

犬弓首蛔虫病是由弓首科(Toxocaridae)弓首属(*Toxocara*)的犬弓首蛔虫(*T. canis*)寄生于犬及犬科动物的小肠而引起的一种人兽共患寄生虫病, 动物通过摄入其感染性虫卵或幼虫而感染. 当人体感染时, 幼虫通常在人体内不能发育为成虫, 而是移行到各个器官和组织中^[1], 引起内脏幼虫移行症(visceral larva migrans, VLM)、眼睛幼虫移行症(ocular larva migrans, OLM)、神经弓首蛔虫病(neurological toxocariasis, NT)和隐性弓首蛔虫病(covert toxocariasis, CT)等^[2], 造成组织和器官损害, 严重影响人类健康.

腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-Binding Cassette transporters, ABC 转运蛋白)是以 ATP 为驱动能的一类跨膜糖蛋白, 负责转运内源性和异源性的生物大分子及小分子化合物, 包括糖、氨基酸、多肽、细胞代谢产物、金属离子和药物等^[3]. ABC 转运蛋白在维持渗透压稳定、营养吸收、多药耐药、抗原加工、细胞分裂、孢子形成、繁殖等^[4-6]诸多生物学过程中发挥重要作用.

已报道的寄生虫 ABC 转运蛋白基因有 65 种^[7], 对其功能的研究主要集中在 ABC 转运蛋白的耐药性方面^[8], 尽管已经对蠕虫 ABC 转运蛋白的功能和分子特征进行了研究, 但是对犬弓首蛔虫 ABC 转运蛋白的研究还未见报道. 本研究拟对犬弓首蛔虫 ABC 转运蛋白全长基因(*Tc-abcg-5*)进行克隆及序列分析, 以为 ABCG5 转运蛋白的功能研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

T. canis 采自西南大学荣昌校区动物医院患病犬, 经形态学鉴定后用液氮速冻并保存.

① 收稿日期: 2018-03-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672541; 31172313); 中央高校基本科研业务项目(XDJK2016E087; XDJK2017D080).

作者简介: 黄汉成(1969-), 男, 讲师, 主要从事动物生物学研究.

通信作者: 周荣琼, 教授.

Taq DNA 聚合酶、pMD19-T (simple) Vector、PrimeScript™ 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; EasyPure © 胶回收试剂盒、DH5 α 购自 TransGen Biotech 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 *T. canis* 基因组数据(GenBank: KHN79547), 用 Primer Premier(Version5.0)软件设计引物, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 序列如表 1 所示。

表 1 *Tc-abcg-5* 基因 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Tc-abcg-5-1</i> F	ATGGTACAGGATGAATTTGCTGGTGAT
<i>Tc-abcg-5-1</i> R	GCATAACGGTATAAGTAAAAAGCGAGT
<i>Tc-abcg-5-2</i> F	CTCACTCGCTTTTACTTATACCGTTA
<i>Tc-abcg-5-2</i> R	TTATTTCCCTTTTGAATTTGTTCGTCCT

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

采用 Trizol 试剂提取 *T. canis* 成虫的总 RNA。采用核酸蛋白检测仪检测总 RNA 的浓度和纯度。以提取的 *T. canis* 总 RNA 为模板, 按反转录试剂盒说明合成 cDNA。

1.2.3 *Tc-abcg-5* 基因的 PCR 扩增

以合成的 *T. canis* cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增体系为 25 μ L: 10 \times PCR buffer(不含 Mg²⁺) 2.0 μ L、Mg²⁺ (25 mmol/L) 2.5 μ L、dNTPs(2.5 mmol/L) 2.0 μ L、上游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L、下游引物(10 μ mol/L) 0.5 μ L、cDNA 1.0 μ L、rTaq 酶 0.5 μ L、dd H₂O 16.0 μ L。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并按 DNA 胶回收试剂盒说明回收目的 PCR 产物。

1.2.4 *Tc-abcg-5* 基因的克隆

将回收的目的 PCR 产物与 pMD19-T(simple)Vector 载体连接, 将上述连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 Amp⁺ (100 mg/mL), X-Gal(20 mg/mL) 和 IPTG(24 mg/mL) 的 LB 琼脂平板中, 置恒温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12~14 h。

1.2.5 测序及序列分析

将经菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。将测得的序列利用 DNASTar 5.0 等软件, 分别从核酸和氨基酸水平对该基因进行生物学分析。利用 SMART 和 InterProScan (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测功能结构域。应用 MUSCLE, Clustal Omega 和 MAFFT 软件进行多重序列比对, 用 MEGA 5.0 软件中的邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)^[9] 构建系统进化树, 进化树的可靠性用 Bootstrap 进行分析, 共 1 000 个重复。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, *Tc-abcg-5-1* 在约 1 100 bp 处可见相应条带, *Tc-abcg-5-2* 在约 900 bp 处可见相应条带, 与理论大小相符; 阴性对照没有条带出现(图 1)。

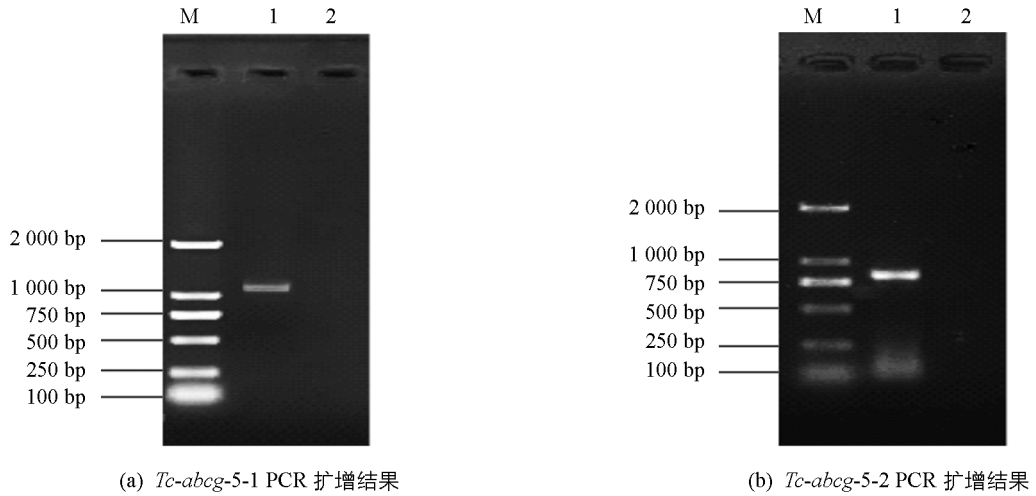
2.2 重组质粒的菌液 PCR 鉴定

阳性克隆的重组菌液经 PCR 扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示 *Tc-abcg-5-1* 在约 1 100 bp 处有特异目的条带, *Tc-abcg-5-2* 在约 900 bp 处有特异目的条带; 阴性对照没有条带出现(图 2)。

2.3 测序结果及分析

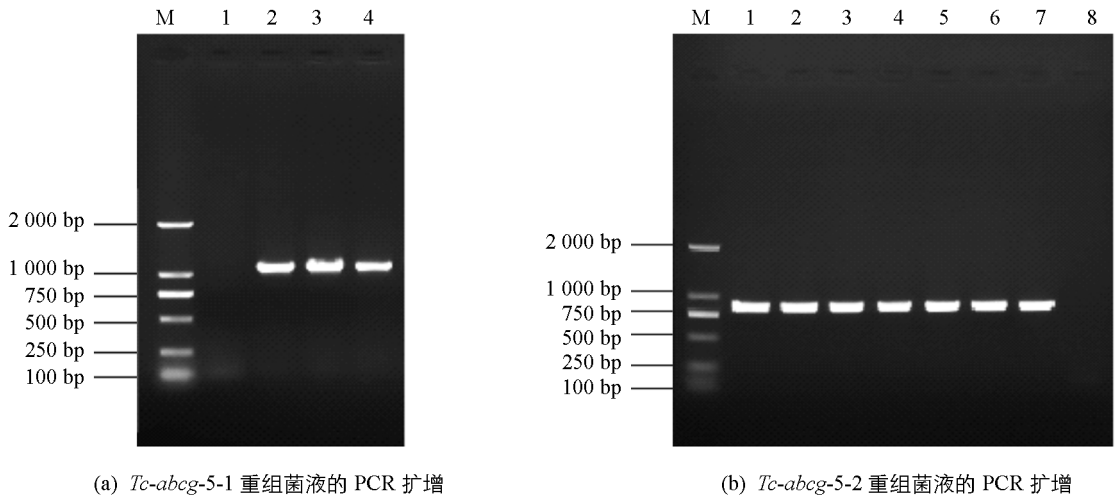
将经过菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列测定, 结果显示 *Tc-abcg-5* 基因的完整编码区序列为 1 902 bp, 编码 633 个氨基酸, 命名为 *Tc*ABC5 蛋白。利用 SMART

对 *Tc* ABCG5 蛋白的功能结构域分析发现, ABCG5 蛋白包含 1 个 ABC 转运蛋白结构域(第 43-188 位)和 6 个跨膜区(分别位于第 350-372 位, 第 387-409 位, 第 422-453 位, 第 468-490 位, 第 497-514 位, 第 600-622 位)(图 3), 同时还发现该蛋白含有高度保守的 Walker A 模体(特征氨基酸序列为 GxxxxGK[S/T], x 代表任意氨基酸)和 Walker B 模体(特征氨基酸序列为 hhhh[D/E], h 表示任意疏水性氨基酸残基)(图 3). GO 注释显示 ABCG5 具有 ATP 结合(GO: 0005524)和 ATP 酶活性(GO: 0016887).



M: 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照.

图 1 *Tc-abcg-5* 基因的 PCR 扩增结果



M: 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1. 阴性对照(左); 2-4. *Tc-abcg-5-1* 重组菌液 PCR 产物(左); 1-7. *Tc-abcg-5-2* 重组菌液 PCR 产物(右); 8. 阴性对照(右).

图 2 重组菌液的 PCR 鉴定

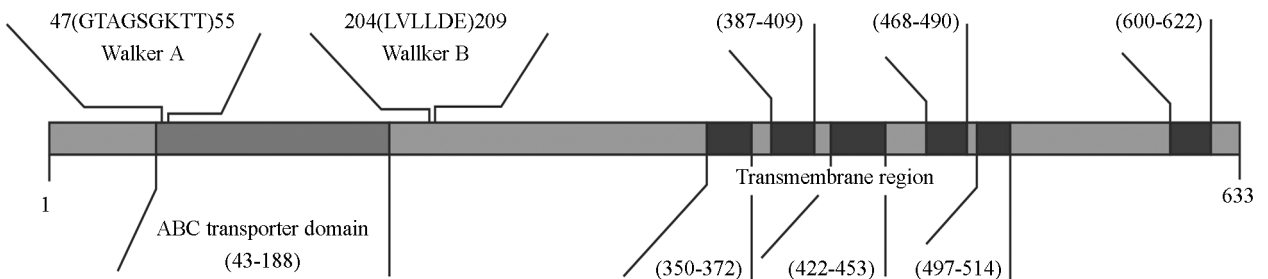


图 3 *Tc* ABCG5 蛋白的结构域预测图

2.4 多重序列比对及种系发育进化树分析

通过文献[10]检索,将 TcABCG5 蛋白氨基酸序列与 5 个线虫的 ABCG5 蛋白氨基酸序列进行多重序列比对,这些序列分别是秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans; 序列号: Y45F10C.6)、捻转血矛线虫(Haemonchus contortus; 序列号: HCOI02159200)、魏氏棘唇线虫(Acanthocheilonema viteae; 序列号: nAv.1.0.1.g04192)、单一异尖线虫(Anisakis simplex; 序列号: ASIM0001367001)和猪蛔虫(Ascaris suum; 序列号: ASU10742)。结果发现, TcABCG5 的 Walker A 和 Walker B 模体与这 5 个线虫的 Walker A 和 Walker B 模体高度保守(图 4)。

Table with 5 columns: Accession ID, Identity %, and Sequence alignment. It shows multiple sequence alignments for TcABCG5 against various nematode sequences, highlighting conserved regions like Walker A and Walker B motifs.

图 4 TcABCG5 序列多重比对

将 Tc-abcg-5 编码的氨基酸序列与 WormBase ParaSite 和 GenBank 中收录的秀丽隐杆线虫(C. elegans; 序列号: Y45F10C.6)、捻转血矛线虫(H. contortus; 序列号: HCOI02159200)、魏氏棘唇线虫(A. viteae; 序列号: nAv.1.0.1.g04192)、单一异尖线虫(A. simplex; 序列号: ASIM0001367001)、猪蛔虫(A. suum; 序列号: ASU10742)、人(Homo sapiens; GenBank No. NP071881)、褐家鼠(Rattus norvegicus; GenBank No. NP446206)、牛(Bos taurus; GenBank No. NP001019718)、绵羊(Ovis aries; GenBank No. XP004006039)、布氏鼠耳蝠(Myotis brandtii; 序列号: GenBank No. EPQ06843)、白眉猴(Cercocebus atys; GenBank No. XP011940294)、黑点青鳉(Oryzias melastigma; GenBank No. ALU63323)、柑橘木虱(Diaphorina citri; GenBank No. XP008469860)、柑橘凤蝶(Papilio xuthus; GenBank No. KPJ01587)、豌豆蚜(Acyrtosiphon pisum; GenBank No. XP001944095)、温带臭虫(Cimex lectularius; GenBank No.

XP014256986)、法老蚁(*Monomorium pharaonis*; GenBank No. XP012521951)和造纸胡蜂(*Polistes dominula*; GenBank No. XP015180257)进行多重序列比对后构建进化树. 结果显示 *Tc* ABCG5 与猪蛔虫(序列号: ASU10742)的 ABCG5 位于同一分支, 其进化关系较近, 与哺乳动物(牛、绵羊、布氏鼠耳蝠、人、白眉猴和褐家鼠)的进化关系较远(图 5).

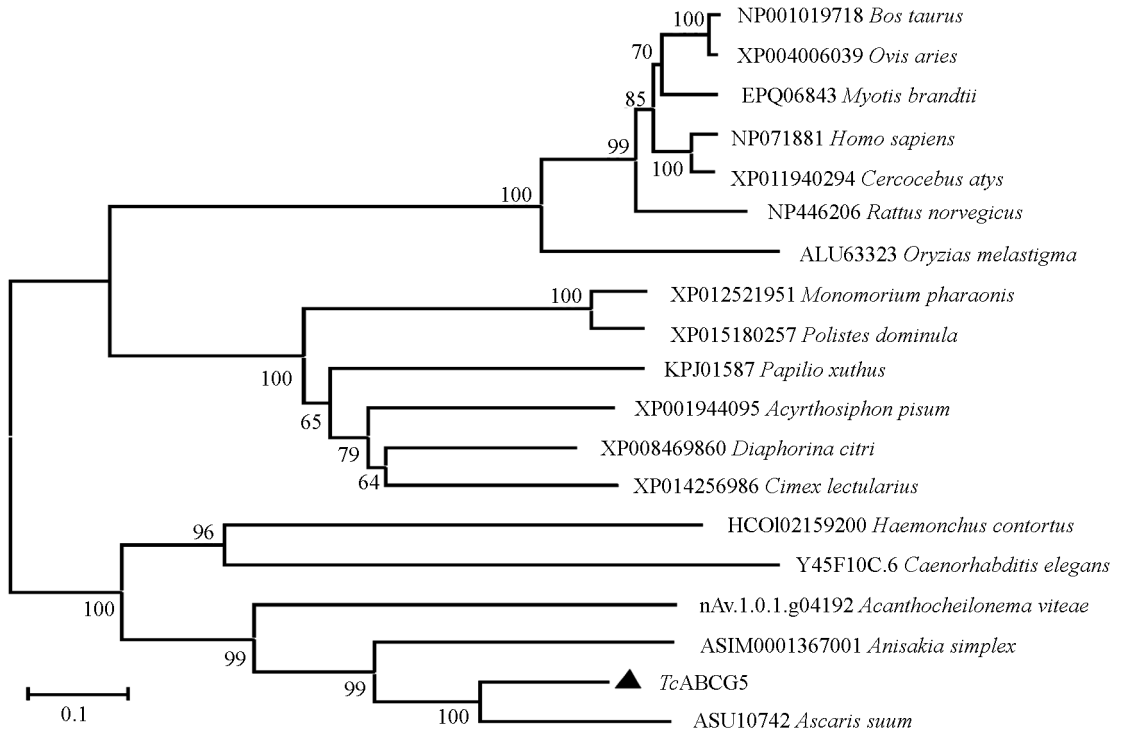


图 5 *Tc-abcg-5* 编码氨基酸序列的系统发育关系分析

3 讨论

典型的 ABC 转运蛋白结构包含高度疏水的跨膜结构域(transmembrane domains, TMD)和核苷酸结合域(nucleotide-binding domains, NBD)两部分. 根据这 2 个结构域数目的不同, ABC 转运蛋白又分为全转运子或半转运子. 全转运子的核心结构通常由 4 个结构域组成, 包括 2 个核苷酸结合域和 2 个跨膜结构域^[11], 而半转运子只含有 1 个核苷酸结合域和 1 个跨膜结构域. 本研究发现 *Tc* ABCG5 为半转运子, 其 2 个亚基的排列顺序为 NBD-TMD. NBD 由高度保守的 Walker A 和 Walker B 组成, 其具有结合和水解 ATP 的作用^[12]. 而 TMD 通常由 6 个 α 螺旋构成^[13], 它们形成 1 个跨膜通道以实现底物分子的跨膜运输, 同时还参与底物的识别过程^[14]. 从这些保守的结构域推测 *Tc* ABCG 蛋白同样具有转运底物的功能.

ABC 转运蛋白在原核和真核生物中高度保守, 根据 ABC 转运蛋白保守区序列的同源性, 将其分为 8 个亚型(ABCA-ABCH)^[15]. 研究发现存在于人类基因组中的 ABC 转运蛋白成员有 48 个^[16]; 在拟南芥基因组中有 129 个 ABC 转运蛋白基因, 而在水稻基因组中只有 128 个^[17]; 存在于寄生虫中的 ABC 转运蛋白有 65 种; 在原生动物嗜热四膜虫中鉴定出了 165 个 ABC 转运蛋白基因; 在大肠杆菌基因组中至少发现有 100 个 ABC 转运蛋白基因, 而白念珠菌只有 28 个; 在酵母菌中有 31 个 ABC 转运蛋白基因. ABC 转运蛋白主要负责转运各种生物大分子及小分子化合物, 广泛参与生物生命活动中的许多过程.

ABC 转运蛋白在代谢调节、维持渗透压稳定、多药耐药和繁殖等各种生物学过程中发挥着重要作用. 在哺乳动物中, ABCB1 参与保护细胞免受有毒物质的侵害; ABCG2 除了在维持细胞自身稳定及机体正常生理功能等方面起着重要的作用外, 还参与肿瘤干细胞多药抗性的形成^[18]. 植物 ABC 转运蛋白参与植物体内激素、脂质、金属离子、次生代谢物和外源物质的运输, 同时还参与植物体内离子通道的调控^[19]. 在微生物中, ABC 转运蛋白主要参与细菌耐药性的产生和次生代谢产物积累. 而在寄生虫 ABC 转运蛋白的

研究中,除了发现 ABC 转运蛋白在耐药性方面有重要作用外,还发现 ABC 转运蛋白在孢子形成和繁殖等生物学过程中发挥重要作用. Tran 等^[20]在对恶性疟原虫的研究中发现 ABC 转运蛋白 G 家族与恶性疟原虫雌性配子体的生殖过程有关; Kusel 等^[21]发现 ABC 转运蛋白在血吸虫的虫卵产生、代谢调节、药物和其他有毒物质的排泄、以及与宿主的相互作用中发挥重要作用. 而 *Tc*ABCG5 在 *T. canis* 的生长、发育、繁殖等生物学过程中是否也具有同样的生理功能,有待后续进一步的试验研究.

参考文献:

- [1] OVERGAAUW P A, VAN ZUTPHEN L, HOEK D, et al. Zoonotic Parasites in Fecal Samples and Fur from Dogs and Cats in The Netherlands [J]. *Veterinary Parasitology*, 2009, 163(1/2): 115-122.
- [2] MACPHERSON C N. The Epidemiology and Public Health Importance of Toxocariasis: a Zoonosis of Global Importance [J]. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43(12/13): 999-1008.
- [3] SCHMITT I, TAMPE R. Structure and Mechanism of ABC Transporters [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2002, 16(2): 754-760.
- [4] GREENBERG R M. Schistosome ABC Multidrug Transporters: from Pharmacology to Physiology [J]. *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 2014, 4(3): 301-309.
- [5] SEYFFER F, TAMPE R. ABC Transporters in Adaptive Immunity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1850(3): 449-460.
- [6] BLOISE E, ORTIGA-CARVALHO T M, REIS F M, et al. ATP-Binding Cassette Transporters in Reproduction: a New Frontier [J]. *Human Reproduction Update*, 2016, 22(2): 164-181.
- [7] JONES P M, GEORGE A M. Multidrug Resistance in Parasites: ABC Transporters, P-Glycoproteins and Molecular Modelling [J]. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35(5): 555-566.
- [8] ARDELLI B F. Transport Proteins of the ABC Systems Superfamily and their Role in Drug Action and Resistance in Nematodes [J]. *Parasitology International*, 2013, 62(6): 639-646.
- [9] 吴春太, 李维国, 高新生, 等. 植物 DNA 甲基转移酶的生物信息学分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2010, 32(4): 83-89.
- [10] HOWE K L, BOLT B J, SHAFIE M, et al. WormBase ParaSite—A Comprehensive Resource for Helminth Genomics [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2017, 215(7): 2-10.
- [11] HOPFNER K P. Invited Review: Architectures and Mechanisms of ATP Binding Cassette Proteins [J]. *Biopolymers*, 2016, 105(8): 492-504.
- [12] JONES P M, GEORGE A M. The ABC Transporter Structure and Mechanism: Perspectives on Recent Research [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2004, 61(6): 682-699.
- [13] CONSEIL G, DEELEY R G, COLE S P. Functional Importance of Three Basic Residues Clustered at the Cytosolic Interface of Transmembrane Helix 15 in the Multidrug and Organic Anion Transporter MRP1 (ABCC1) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(1): 43-50.
- [14] CHOI Y H, YU A M. ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(5): 793-807.
- [15] HONORAT M, FALSON P, TERREUX R, et al. Multidrug Resistance ABC Transporter Structure Predictions by Homology Modeling Approaches [J]. *Current Drug Metabolism*, 2011, 12(3): 268-277.
- [16] WENZEL J J, PIEHLER A, KAMINSKI W E. ABC A-Subclass Proteins: Gatekeepers of Cellular Phospho and Sphingolipid Transport [J]. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 2007, 12(5): 3177-3193.
- [17] SCHULZ B, KOLUKISA OGLU H U. Genomics of Plant ABC Transporters: the Alphabet of Photosynthetic Life forms or Just Holes in Membranes [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580(4): 1010-1016.
- [18] PATRAWALA L, CALHOUN T, SCHNEIDER-BROUSSARD R, et al. Side Population is Enriched in Tumorigenic, Stem-Like Cancer Cells, Whereas ABCG2⁺ and ABCG2⁻ Cancer Cells Are Similarly Tumorigenic [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(14): 6207-6219.

- [19] VERRIER P J, BIRD D, BURLA B, et al. Plant ABC Proteins-a Unified Nomenclature and Updated Inventory [J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4): 151-159.
- [20] TRAN P N, BROWN S H, MITCHELL T W, et al. A Female Gametocyte-Specific ABC Transporter Plays a Role in Lipid Metabolism in the Malaria Parasite [J]. Nature Communications, 2014, 5(9): 4773-5773.
- [21] KASINATHAN R S, MORGAN W M, GREENBERG R M. Genetic Knockdown and Pharmacological Inhibition of Parasite Multidrug Resistance Transporters Disrupts Egg Production in *Schistosoma mansoni* [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2011, 5(12): e1425.

Cloning and Sequence Analysis of the Full-Length *abcg-5* Gene of *Toxocara canis*

HUANG Han-cheng, JIANG Ai-yun, LUO Yong-li,
YANG Xiao-di, LI Xiang-lan, HU Zhi-gang, ZHOU Rong-qiong

College of Animal Science, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To study the molecular characteristics of ATP-binding cassette sub-family G member 5 (*abcg-5*) in *Toxocara canis*, the full-length coding sequence of *Tc-abcg-5* gene was amplified using PCR amplification, multiple sequence alignment (MSA) was made and a phylogenetic tree was constructed. The results showed that the entire sequence of *Tc-abcg-5* gene contained 1 902 bp, encoding a protein of 633 amino acids. *Tc* ABCG5 was found to contain one ABC transporter domain and six transmembrane regions. The highly conserved Walker A and Walker B motifs of the ABCG sub-family were also found. Gene ontology (GO) annotations showed that *Tc* ABCG5 had the molecular function of ATP binding and ATPase activity. Phylogenetic analysis indicated that *Tc* ABCG5 shared a high level of amino-acid sequence similarity with *Ascaris suum*, and shared a low level of amino-acid sequence similarity with mammals. This study is expected to lay a foundation for further functional researches of *Tc* ABCG5.

Key words: *Toxocara canis*; ATP-binding cassette subfamily G member 5 (*abcg-5*) gene; cloning; sequence analysis

责任编辑 夏娟

