

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.03.011

# 犬弓首蛔虫 *MUC-1* 基因的克隆及序列分析

江艾耘, 李 芳, 陈绍基, 周荣琼

西南大学 动物科学学院, 重庆 荣昌 402460

**摘要:** 为研究犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*, *T. canis*)黏蛋白 1 基因(*Tc-MUC-1*)的分子特征, 该试验根据犬弓首蛔虫基因组数据库中的 *Tc-MUC-1* 基因序列设计引物, 通过 PCR 技术克隆 *Tc-MUC-1* 全长基因, 并进行多重序列比对和种系发育进化树分析。结果发现该基因全长为 531 bp, 编码 176 个氨基酸。功能结构域分析发现 *Tc-MUC-1* 蛋白包含 1 个由 11 个 STSSSSA 重复序列构成的 Mucin 结构域和 2 个 ShKT 结构域; GO 分析显示具有蛋白质结合和金属离子结合功能; 多重序列比对发现 *Tc-MUC-1* 与 *T. canis* 的其余 4 个黏蛋白(*Tc-MUC-2-Tc-MUC-5*)均含有 2 个由 36 个氨基酸组成的 ShKT 结构域; 种系发育进化树分析显示 *Tc-MUC-1* 与双胃线虫(*Pristionchus pacificus*; GenBank No. PDM76930)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*; GenBank No. NP491509)进化关系较近。

**关键词:** 犬弓首蛔虫; *MUC-1* 基因; 克隆; 序列分析

**中图分类号:** S858.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2020)03-0081-07

弓首蛔虫病主要是弓首科(Toxocaridae)弓首属(*Toxocara*)犬弓首蛔虫(*T. canis*)寄生于人体及多种动物引起的一种重要的人兽共患病<sup>[1]</sup>。动物通过摄入其感染性虫卵或幼虫而感染。在终末宿主体内, *T. canis* 感染性幼虫经内脏移行最终在肠道发育为成虫。在人及其他非特异宿主体内, 感染性幼虫不能发育为成虫, 而是移行到宿主诸多器官, 如肝、肺、心、肾、眼睛、脑、肌肉等部位, 成为滞育的第 3 期幼虫。当人体感染后, 幼虫在移行期能够逃避宿主的免疫监视, 因而不会产生明显的病理变化; 而濒死和死亡的虫体则会诱发机体产生明显的病理免疫反应, 引起内脏幼虫移行症(visceral larva migrans, VLM)、眼睛幼虫移行症(ocular larvemigrans, OLM)、神经弓首蛔虫病(neurological toxocariasis, NT)和隐性弓首蛔虫病(covert toxocariasis, CT)等, 造成严重的病理综合征<sup>[2-3]</sup>。

黏蛋白(mucins, MUC)是一类由黏多糖组成的高分子量糖蛋白, 主要存在于上皮组织中, 具有 PTS 结构域, 即含有丰富的丝氨酸(serine, P)、苏氨酸(threonine, T)和脯氨酸(proline, S)残基, 这些残基都是高度氧糖基化, N 端和 C 端富含天冬酰胺和半胱氨酸。黏蛋白在细胞黏附、分化、免疫应答、肿瘤形成以及细胞信号传导过程中具有多样化的生物学功能<sup>[4]</sup>。黏蛋白可分为分泌型黏蛋白和膜结合黏蛋白, 分泌型黏蛋白(如 MUC-2, MUC-5AC, MUC-5B)被包装成分泌物进入囊泡参与胞内

收稿日期: 2019-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672541, 31172313)。

作者简介: 江艾耘(1992-), 男, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究。

通信作者: 周荣琼, 教授。

信号转导;膜结合黏蛋白的羧基末端具有一个跨膜结构域,能将自身连接到质膜(Plasma membrane)(如 MUC-1, MUC-3, MUC-4, MUC-16, MUC-17),促进细胞—细胞/蛋白质—蛋白质结合,以及信号转导和蛋白质稳定<sup>[5]</sup>.

在哺乳动物组织中,黏蛋白为上皮表面提供黏性和物理保护,并携带大量对细胞运输和黏附起作用的聚糖<sup>[6]</sup>.黏蛋白 1(MUC-1)是黏蛋白家族的重要成员,起着识别细胞、保护细胞以及维持黏性等作用<sup>[7]</sup>.*Tc*-MUC-1 是犬弓首蛔虫感染性幼虫分泌的一系列糖蛋白中的一种,参与机体免疫,对宿主免疫逃避发挥重要作用<sup>[8]</sup>.目前,国内外对 *Tc*-MUC-1 研究较少,本研究拟对犬弓首蛔虫黏蛋白 1 全长基因(*Tc-muc-1*)进行克隆及序列分析,以期对 *Tc*-MUC-1 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,保存于液氮罐中.

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 $\alpha$  购自 TransGen Biotech 公司; Trizol 试剂购自 Ambion 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: U39815),用 PrimerPremier(Version5.0)软件设计引物,引物序列信息为上游引物:5'-ATGCACGTCCTTACCGT-3';下游引物:5'-TTAACAGAAGCCGCACGT-3'.引物序列由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成.

#### 1.2.2 总 RNA 的提取与反转录

将成熟的 *T. canis* 雌虫卵巢解剖,收集虫卵,在 37 °C 培养箱中培养 3~4 周,采用 Trizol 试剂提取培养好的 2 期幼虫的总 RNA<sup>[9-10]</sup>.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* 幼虫总 RNA 为模板,按反转录试剂盒说明合成 cDNA.

#### 1.2.3 *Tc*-MUC-1 基因的 PCR 扩增

以合成的 *T. canis* 幼虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增.扩增体系为 25  $\mu$ L: 10 $\times$  PCR buffer(不含 Mg<sup>2+</sup>)2.0  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L)2.5  $\mu$ L, dNTPs(2.5 mmol/L)2.0  $\mu$ L、上游引物(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L、下游引物(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L、cDNA 1.0  $\mu$ L、rTaq 酶 0.5  $\mu$ L、dd H<sub>2</sub>O 16.0  $\mu$ L,以鸡异刺线虫 cDNA 为模板设置阴性对照. PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min. 扩增产物经 1% 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*-MUC-1 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 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含 Amp<sup>+</sup> (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 °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重庆擎科兴业生物技术有限公司测序.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)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-MUC-1* 在约 530 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

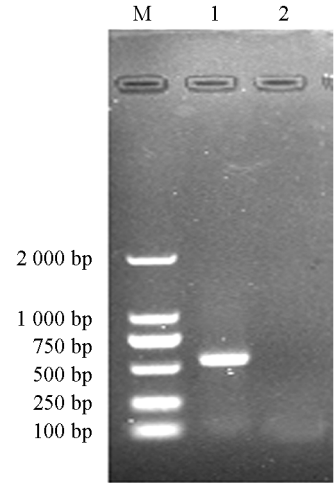
阳性克隆的重组菌液经 PCR 扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.结果显示 *Tc-MUC-1* 在约 530 bp 处有特异目的条带,阴性对照没有条带出现(图 2).

### 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重庆擎科兴业生物技术有限公司进行序列测定,结果显示 *Tc-MUC-1* 基因的完整编码区序列为 531 bp,编码 176 个氨基酸,命名为 *Tc-MUC-1* 蛋白.利用 SMART 对 *Tc-MUC-1* 蛋白的功能结构域进行分析发现,1-16 位为信号肽,22-105 位有低复杂度的黏蛋白结构域,106-141 位,142-176 位为 2 个重复的 ShKT 结构域(图 3).GO 注释显示 *Tc-MUC-1* 具有 Binding(结合)(GO: 0005488),Protein binding(蛋白质结合)(GO: 0005515)和 Metal ion binding(金属离子结合)(GO: 0046872)功能.

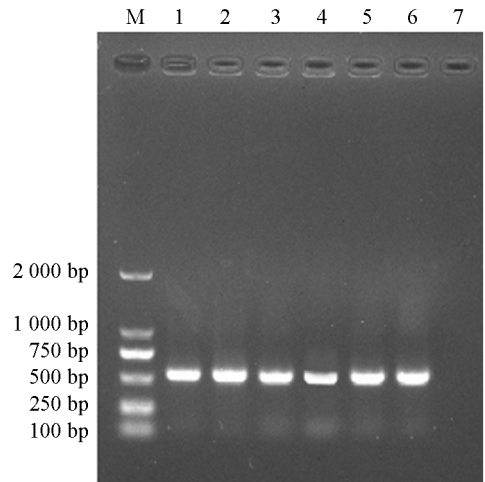
### 2.4 多重序列比对及种系发育进化树分析

从 GenBank 中检索到 *Tc-MUC-1* 氨基酸序列(GenBank No. AAB05820), *Tc-MUC-2* (GenBank No. AAD49339), *Tc-MUC-3* (No. AAD49340), *Tc-MUC-4* (GenBank No. AAD49341), *Tc-MUC-5* (GenBank No. AAD49342), 并进行多重序列比对.结果发现 5 个黏蛋白都是由 2 个不同模块构成,其中一个黏蛋白样富含 Ser/Thr 的黏蛋白结构域,可以充当 O-糖基化的位点,另一个是 36 个氨基酸组成的 ShKT 结构域.所有蛋白质都含有 C 末端配对的 ShKT 基序,而 *Tc-MUC-3* 和 *Tc-MUC-5* 在 N 末端同样含有 ShKT 基序(图 4).



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-MUC-1* 基因的 PCR 扩增结果



M: 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1-6: *Tc-MUC-1* 重组菌液 PCR 产物; 7: 阴性对照.

图 2 重组菌液的 PCR 鉴定

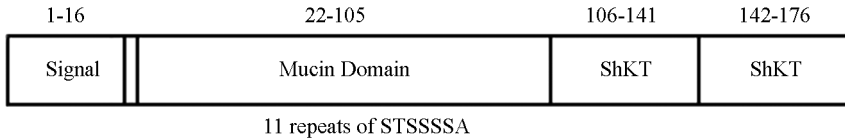


图 3 *Tc-MUC-1* 蛋白的结构域预测

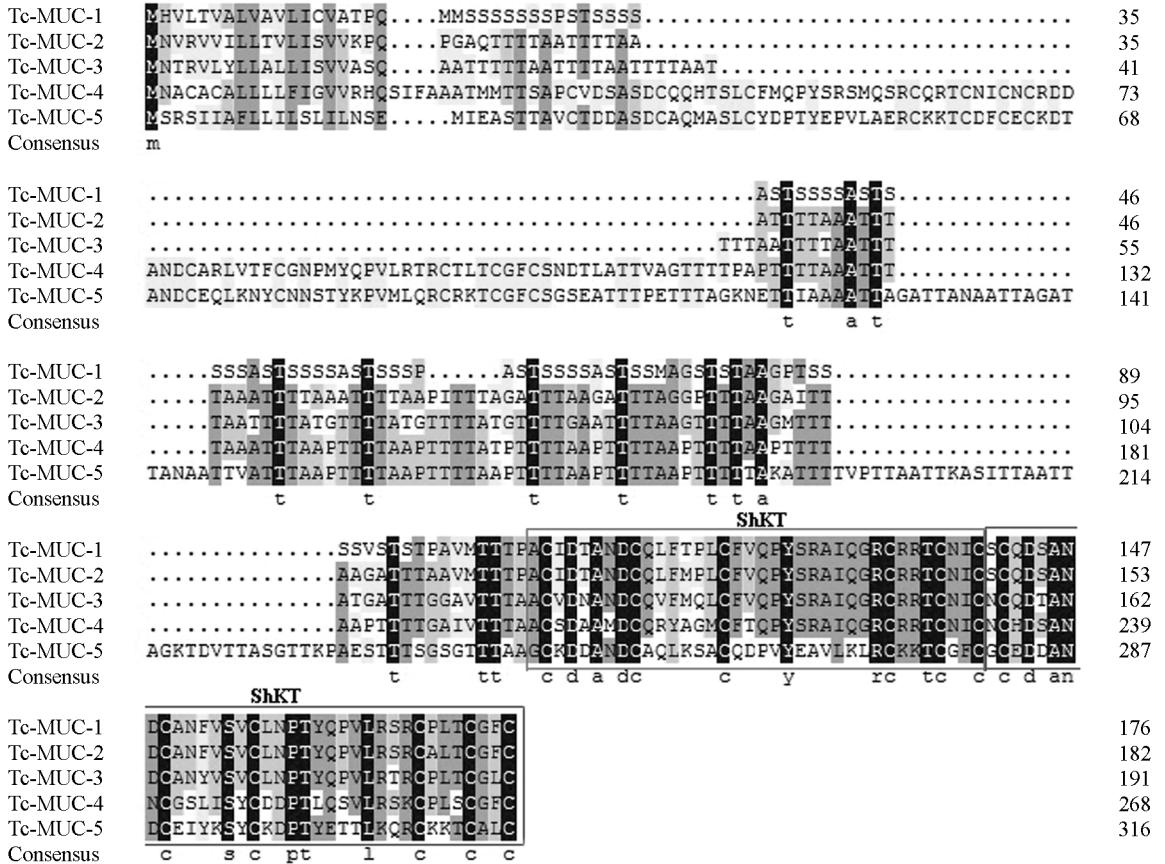


图 4 *Tc-MUC-1* 序列多重序列比对

将 *Tc-MUC-1* 氨基酸序列与 WormBaseParaSite<sup>[11]</sup> 和 GeneBank 收录的双胃线虫 (*Pristionchus pacificus*, GenBank No. PDM76930)、美丽筒线虫 (*Gongylonema pulchrum*, GenBank No. VDN19323)、雷曼尼线虫 (*Caenorhabditis remanei*, GenBank No. XP003113635)、布里格塞氏线虫 (*Caenorhabditis briggsae*, GenBank No. CAP37768)、类圆线虫 (*Strongyloides ratti*, GenBank No. XP024499385)、犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*, GenBank No. RCN39081)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, GenBank No. NP491509)、绵羊 (*Ovis aries*, GenBank No. NP001009224)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*, GenBank No. NP036734)、南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*, GenBank No. AVP26554)、智人 (*Homo sapiens*, GenBank No. AAD10856)、家鼠 (*Mus musculus*, GenBank No. NP038633)、新丝球菌 (*Neofusicoccum parvum*, GenBank No. EOD43899)、丝状褐藻 (*Ectocarpus siliculosus*, GenBank No. CBJ31544)、金丝熊 (*Mesocricetus auratus*, GenBank No. NP001268584) 进行多重序列比对并构建进化树。结果显示 *Tc-MUC-1* 与双胃线虫 (*Pristionchus pacificus*, GenBank No. PDM76930)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, GenBank No. NP491509) 形成一个单独的分支, 其进化关系较近 (图 5)。

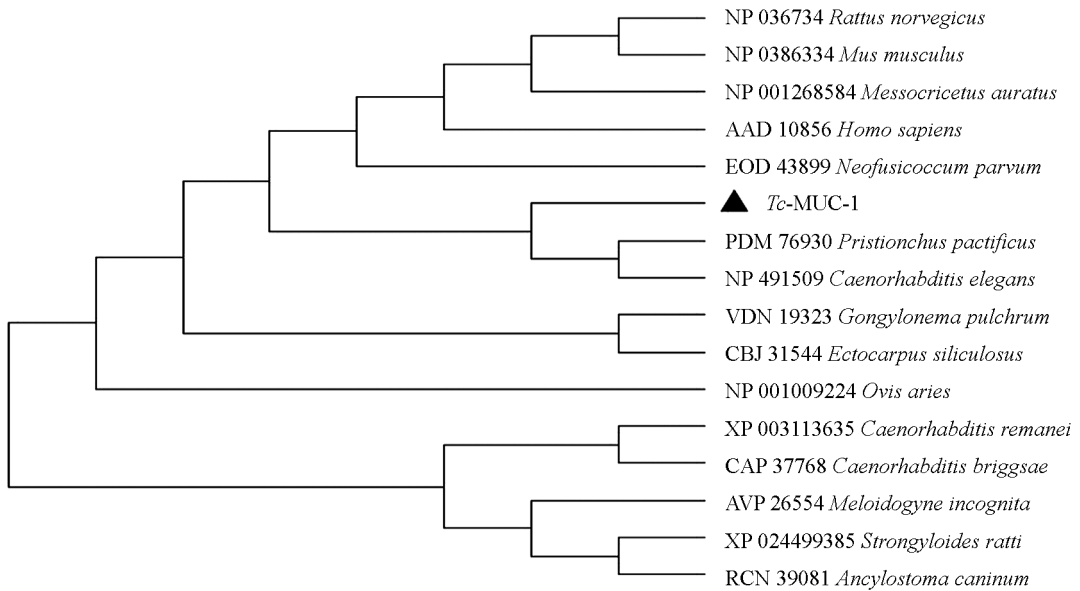


图 5 *Tc*-MUC-1 编码氨基酸序列的系统发育关系分析

### 3 讨论

黏蛋白(MUC)是高分子量的 O-糖蛋白, 主要表达于上皮细胞的顶端表面<sup>[12]</sup>. 该蛋白在人乳中首次鉴定出来, 几乎分布于所有呼吸腺体的上皮细胞表面、女性生殖道、胃肠道、中耳、唾液腺、乳腺、正常的胰脏内小叶导管等<sup>[4]</sup>. MUC 具有保护和润滑上皮细胞、维持上皮细胞特征、细胞黏附、分化和免疫的基本功能<sup>[12-14]</sup>. 在肿瘤发生和其他病理状态下, MUC 的表达发生显著变化<sup>[15-16]</sup>, 并可作为肿瘤诊断及(或)预后标志物.

本研究发现 *Tc*-MUC-1 结构包含黏蛋白结构域(Mucin domain)和 ShKT 结构域(ShKT domain)两部分. 该蛋白序列富含丝氨酸残基, 编码 176 个氨基酸且具有信号肽, 但无跨膜结构域. 多重序列比对显示 *Tc*-MUC-1, *Tc*-MUC-2, *Tc*-MUC-3, *Tc*-MUC-4, *Tc*-MUC-5 黏蛋白结构域的重复区域中 Ser/Thr 存在一定差异, 即 *Tc*-MUC-1 富含 Ser, 而其余的黏蛋白具有不同的重复单位 Thr, Gly, Pro 和 Ala, 均具有 Thr 的优势. 富含半胱氨酸的 ShKT 结构域具有高度的保守性, *Tc*-MUC-1, *Tc*-MUC-2, *Tc*-MUC-4 的 ShKT 结构域由 86%~97% 相同的氨基酸残基构成. Loukas 等<sup>[6]</sup>发现富含半胱氨酸残基的 ShKT 结构域能促进黏蛋白三级结构的聚合和形成, 表明该结构域在决定黏蛋白的功能中起重要作用.

MUC-1 是一种膜结合蛋白, 主要存在于上皮组织, 是上皮组织黏液屏障的重要成分<sup>[17]</sup>, 已证明在人类多种器官(乳腺、肺、结肠、胃、前列腺)的恶性肿瘤中异常表达<sup>[18-22]</sup>, 参与多种恶性肿瘤类型的转移和侵袭. Gillh 等<sup>[23]</sup>发现秀丽隐杆线虫黏蛋白 LET-653 在排泄管和孔细胞的发育中起作用, 并维持单细胞管型的完整性; Noya 等<sup>[24]</sup>发现肝片吸虫有一种黏蛋白样多肽, 它与脂多糖协同促进树突状细胞成熟, 并增强树突状细胞 Th1 极化能力, 参与免疫调节作用. Leon-Coria 等<sup>[25]</sup>发现宿主胃肠道分泌的 MUC-2 在单层上皮细胞和腔内容物之间形成屏障, 在先天防御溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*, *Eh*)和促炎反应中起重要作用. 而 *Tc*-MUC-1 是否参与宿主细胞黏附、免疫识别及逃避、机体屏障等生物学过程, 有待后续试验进一步研究.

### 参考文献:

- [1] ANDERSON J P, RASCOE L N, LEVERT K, et al. Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26 [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2015,

- 9(10): e0004168.
- [2] MA G X, HOLLAND C V, WANG T, et al. Human Toxocariasis [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2018, 18(1): 14-24.
- [3] MACPHERSON C N L. The Epidemiology and Public Health Importance of Toxocariasis: a Zoonosis of Global Importance [J]. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43(12/13): 999-1008.
- [4] JOSHI S, KUMAR S, CHOUDHURY A, et al. Altered Mucins (MUC) Trafficking in Benign and Malignant Conditions [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(17): 7272-7284.
- [5] SENAPATI S, DAS S, BATRA S K. Mucin-interacting Proteins: From Function to Therapeutics [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2010, 35(4): 236-245.
- [6] LOUKAS A, HINTZ M, LINDER D, et al. A Family of Secreted Mucins from the Parasitic Nematode *Toxocara canis* Bears Diverse Mucin Domains but Shares Similar Flanking Six-cysteine Repeat Motifs [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(50): 39600-39607.
- [7] HOU R, JIANG L, LIU D W, et al. Lewis(y) Antigen Promotes the Progression of Epithelial Ovarian Cancer by Stimulating MUC1 Expression [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(2): 293-302.
- [8] DOEDENS A, LOUKAS A, MAIZELS R M. A cDNA Encoding Tc-MUC-5, a Mucin from *Toxocara Canis* Larvae Identified by Expression Screening [J]. *Acta Tropica*, 2001, 79(3): 211-217.
- [9] 黄汉成, 江艾耘, 罗永莉, 等. 犬弓首蛔虫 *abcg-5* 基因的克隆及序列分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(3): 23-29.
- [10] DEUGOSZ E, WASYL K, KLOCKIEWICZ M, et al. *Toxocara Canis* Mucins among other Excretory-secretory Antigens Induce in Vitro Secretion of Cytokines by Mouse Splenocytes [J]. *Parasitology Research*, 2015, 114(9): 3365-3371.
- [11] 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: 2-10.
- [12] KAUR S, KUMAR S, MOMI N, et al. Mucins in Pancreatic Cancer and Its Microenvironment [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2013, 10(10): 607-620.
- [13] KUFER D W. Mucins in Cancer: Function, Prognosis and Therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(12): 874-885.
- [14] CHATURVEDI P, SINGH A P, BATRA S K. Structure, Evolution, and Biology of the MUC4 Mucin [J]. *The FASEB Journal*, 2008, 22(4): 966-981.
- [15] MUKHOPADHYAY P, LAKSHMANAN I, PONNUSAMY M P, et al. MUC4 Overexpression Augments Cell Migration and Metastasis through EGFR Family Proteins in Triple Negative Breast Cancer Cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e54455.
- [16] KAUR S, MOMI N, CHAKRABORTY S, et al. Altered Expression of Transmembrane Mucins, MUC1 and MUC4, in Bladder Cancer: Pathological Implications in Diagnosis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92742.
- [17] DAUPLAIS M, LECOQ A, SONG J, et al. On the Convergent Evolution of Animal Toxins. Conservation of a Diad of Functional Residues in Potassium Channel-blocking Toxins with Unrelated Structures [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(7): 4302-4309.
- [18] JING X, LIANG H P, HAO C H, et al. Overexpression of MUC1 Predicts Poor Prognosis in Patients with Breast Cancer [J]. *Oncology Reports*, 2019, 41(2): 801-810.
- [19] XUE M, TAO W M. Upregulation of MUC1 by Its Novel Activator 14-3-3 $\zeta$  Promotes Tumor Invasion and Indicates Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma [J]. *Oncology Reports*, 2017, 38(5): 2637-2646.
- [20] AL-KHAYAL K, ABDULLA M, AL-OBAID O, et al. Differential Expression of Mucins in Middle Eastern Patients with Colorectal Cancer [J]. *Oncology Letters*, 2016, 12(1): 393-400.
- [21] WANG X T, KONG F B, MAI W, et al. MUC1 Immunohistochemical Expression as a Prognostic Factor in Gastric Cancer: Meta-Analysis [J]. *Disease Markers*, 2016, 2016: 9421571.
- [22] GENITSCH V, ZLOBEC I, THALMANN G N, et al. MUC1 is Upregulated in Advanced Prostate Cancer and is an In-

dependent Prognostic Factor [J]. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2016, 19(3): 242-247.

- [23] GILLH K, COHEN J D, AYALA-FIGUEROA J, et al. Integrity of Narrow Epithelial Tubes in the *C. Elegans* Excretory System Requires a Transient Luminal Matrix [J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(8): e1006205.
- [24] NOYA V, BROSSARD N, RODRÍGUEZ E, et al. A Mucin-like Peptide from *Fasciola Hepatica* Instructs Dendritic Cells with Parasite Specific Th1-polarizing Activity [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40615.
- [25] LEON-CORIA A, KUMAR M, MOREAU F, et al. Defining Cooperative Roles for Colonic Microbiota and *Muc2* Mucin in Mediating Innate Host Defense Against *Entamoeba Histolytica* [J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(11): e1007466.

## Cloning and Sequence Analysis of the *MUC-1* Gene of *Toxocara canis*

JIANG Ai-yun, LI Fang, CHEN Shao-ji, ZHOU Rong-qiong

*School of Animal Science, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China*

**Abstract:** To study the molecular characteristics of the *muc-1* gene in *Toxocara canis*, the full-length coding sequencing of *Tc-muc-1* 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-MUC-1* gene was 531 bp in length, encoding a protein of 176 amino acids. In functional domains analysis, *Tc-MUC-1* was found to contain one mucin domain consisting of 11 STSSSSA repeats and two ShKT domains. Gene ontology (GO) annotations showed that *Tc-MUC-1* had the molecular function of protein binding and metal ion binding. Multiple sequence alignments revealed that *Tc-MUC-1* and the other four mucins (*Tc-MUC-2* to *Tc-MUC-5*) of *T. canis* all contained two ShKT domains composed of 36 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that *Tc-MUC-1* shared the highest levels of amino-acid sequence similarity with *Pristionchus pacificus* (*Pristionchus pacificus*; No. PDM76930) and *Caenorhabditis elegans* (*Caenorhabditis elegans*; No. NP491509). In conclusion, this study lays a foundation for further functional researches on *Tc-MUC-1*.

**Key words:** *Toxocara canis*; *MUC-1* gene; cloning; sequence analysis

责任编辑 夏娟