

甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *Dd-ace-1* 全长 cDNA 的克隆和序列分析

丁中¹, 彭德良², 高必达¹, 何琪¹

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.中国农业科学院 植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 利用反转录聚合酶链式反应, 结合快速扩增 cDNA 末端(RACE)技术, 克隆了甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 cDNA *Dd-ace-1*。该 cDNA 序列 5'端存在反式剪接引导序列 SL1, 全长 2 196 bp, 包含 1 个 1 908 bp 的开放阅读框(GenBank 登录号 EF583059); 在推导出的 635 个氨基酸残基的前体蛋白中, N 端的前 24 个氨基酸残基为信号肽, 随后的 611 个氨基酸残基是成熟的乙酰胆碱酯酶序列, 其预测的相对分子质量为 70 144.12。在一级结构中, 形成催化活性中心的 3 个氨基酸残基 (Ser223、Glu360 和 His483)、胆碱结合位点 Trp(106)以及在亚基内形成二硫键的 6 个半胱氨酸完全保守; 在电鳐(*Torpedo californica*)乙酰胆碱酯酶分子的催化功能域中存在 14 个保守的芳香族氨基酸残基, 其中 10 个在甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶中完全保守。该酶的氨基酸序列与南方根节线虫(*Meloidogyne incognita*)、胎生网尾线虫(*Dictyocaulus viviparus*)和秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)ACE-1 的同源性为 68.6%、67.2% 和 66.3%。与其他线虫乙酰胆碱酯酶的聚类分析显示, 该乙酰胆碱酯酶(Dd-ACE-1)与其他线虫乙酰胆碱酯酶 ACE-1 同属一个支系。

关键词: 甘薯茎线虫; 乙酰胆碱酯酶; cDNA; 克隆; 聚类分析

中图分类号: Q781 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0437-05

Molecular cloning and characterization of a new acetylcholinesterase gene *Dd-ace-1* from *Ditylenchus destructor*

DING Zhong¹, PENG De-liang², GAO Bi-da¹, HE Qi¹

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: A new gene, named *Dd-ace-1*, encoding an acetylcholinesterase (AChE, EC3.1.1.7) was cloned from the sweet potato stem nematode, *Ditylenchus destructor*. The full length cDNA, carrying the transspliced SL1 leader sequence, is 2 196 bp long with an open reading frame of 1 908 bp encoding 635 amino acid residues (GenBank accession no. EF583059). The complete amino acid sequence of AChE deduced from the cDNA consists of 24 residues for the putative signal peptide and 611 residues for the mature protein with a predicted molecular weight of 70 144.12. The conserved motifs involved in the catalytic triad, the choline binding site and 10 aromatic residues lining the catalytic gorge were present in the Dd-ACE-1 deduced protein. The predicted protein shared with strong homology with *Meloidogyne incognita* ACE-1, *Dictyocaulus viviparus* ACE-1 and *Caenorhabditis elegans* ACE-1. Phylogenetic analysis based on other nematodes and species AChEs showed that the deduced AChE formed a cluster with ACE-1s.

Key words: *Ditylenchus destructor*; acetylcholinesterase; cDNA; cloning; phylogenetic tree

乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE, EC3.1.1.7)是生物神经传导中的一种关键酶。该酶降

收稿日期: 2010-01-05

基金项目: 湖南省教育厅项目(08C421); 湖南农业大学人才科学基金项目(09WD23)

作者简介: 丁中(1969—), 男, 湖南永顺人, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理学研究, dingzx88@yahoo.com.cn

解乙酰胆碱,终止神经递质对突触后膜的兴奋作用,保证神经信号在生物体内的正常传递^[1]。近年来,以秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)为模式线虫,对AChE的相关基因进行了克隆和测序,发现线虫的AChE由多种基因所编码,遗传分析认为,编码AChE的有4种基因 $ace-1$ 、 $ace-2$ 、 $ace-3$ 和 $ace-4$,分别编码4种不同AChE类型^[2]。目前已对植物寄生性线虫,如南方根节线虫(*Meloidogyne incognita*)和爪哇根节线虫(*M. javanica*)的AChE进行了克隆^[3-4]。笔者亦对甘薯茎线虫(*Ditylenchus destructor*)的AChE的 $ace-2$ 和 $ace-3$ 基因进行了克隆和序列分析^[5-6]。为更深入地探讨甘薯茎线虫AChE的分子生物学特性,笔者采用同源克隆结合RACE法^[7]对甘薯茎线虫 $ace-1$ 基因进行克隆,并对所推导的AChE与其他线虫的AChE进行氨基酸序列比较分析,初步确定了该基因的类型。

1 材料与方法

1.1 材料

从河北省昌黎县田间采集病薯,室内分离线虫后,采用半裸镰刀菌(*Fusarium semitectum*)进行培养^[8-9]。待线虫在菌落上生长25 d后收集线虫。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态DH5 α ,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生化科技有限公司),EX Taq酶,3'-Full RACE Core Set Ver.2.0扩增试剂盒(TaKaRa公司);pGEM-T easy系统试剂盒(Promega);TRIzol试剂,SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System,5'RACE System for Rapid amplification of cDNA Ends,Version 2.0(Invitrogen)。

1.2 乙酰胆碱酯酶基因cDNA片段的克隆

采用TRIzol试剂提取甘薯茎线虫总RNA。cDNA第1链合成按Invitrogen SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System试剂盒操作方法进行。

根据已报道的线虫ACE-1氨基酸序列设计1对简并引物:cACE1-F(5'-GARGCNCNGGNAAY ATG-3'),cACE1-R(5'-GGNACCCANGGRAARTC -3')。以cDNA第一链为模板进行PCR反应,PCR产

物经1%的琼脂糖凝胶电泳后,将预期的DNA片段回收,连接于pGEM-T easy载体上,并转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。菌液经PCR检测后测序。根据测序结果设计特异性引物。

1.3 cDNA 3'端快速扩增

参照TaKaRa公司3'-Full RACE Core Set Ver.2.0扩增试剂盒说明书,采用套式PCR反应进行3'端cDNA的PCR扩增。根据cDNA片段序列信息设计的特异性引物分别为:3GSP1(5'-GTGAGCGTTCATTCATAC-3')和3GSP2(5'-AGCAACTCAACGACCACACATC-3')。

1.4 cDNA 5'端快速扩增

参照Invitrogen公司5'RACE System for Rapid amplification of cDNA Ends,Version 2.0试剂盒说明书进行5'端cDNA的PCR扩增。根据cDNA片段序列信息设计的特异性引物分别为:5GSP1(5'-AGGATGTGTGGTCGTTGAG-3'),5GSP2(5'-CCGCTCCAGCACTCTCACCAAAG-3')和5GSP3(5'-ATTGGGGTCACCGCCGAAAC-3')。

1.5 乙酰胆碱酯酶基因cDNA序列分析

分别使用DNASar和DNAMAN进行核苷酸序列的拼接、翻译和氨基酸序列的比对分析。使用在线工具(http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)进行蛋白质相对分子质量的预测,使用SignalP 3.0 Server在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测蛋白质前体信号肽,使用MEGA 4.1进行分子系统树的构建。使用在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)NetNGlyc程序对蛋白质序列中可能存在的N糖基化位点进行预测。

2 结果与分析

2.1 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因cDNA的克隆及序列分析

使用简并RT-PCR扩增出甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因cDNA片段(图1-A)。测序结果表明,该片段长427 bp,经BLAST查询,证实此片段与秀丽小

杆线虫乙酰胆碱酯酶ACE-1基因cDNA的部分高度同源。根据此片段设计基因特异引物,用RACE技术扩增到乙酰胆碱酯酶基因的3'和5'cDNA末端(图

1-B、C),将琼脂糖凝胶上的DNA带回收、克隆、PCR检测后测序。

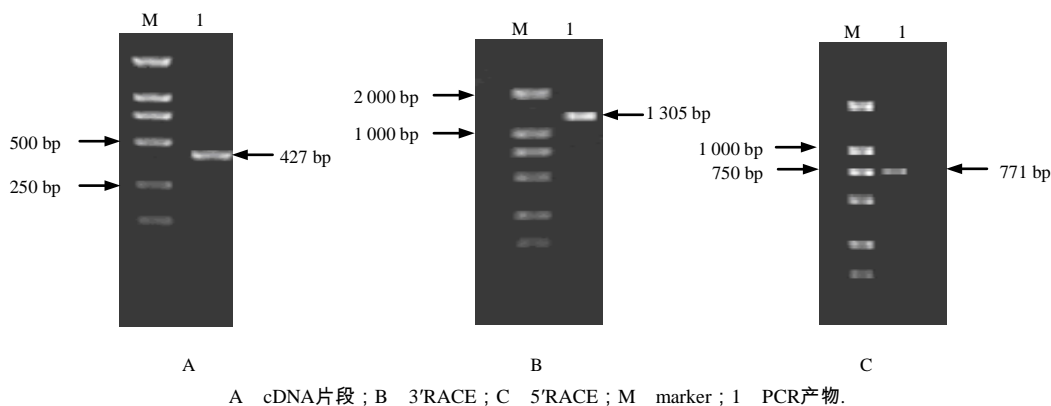


图1 RT-PCR产物琼脂糖电泳结果

Fig.1 Agrose electrophoresis of RT-PCR products

对测序所得到的5'RACE和3'RACE cDNA核苷酸序列进行拼接,得到甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因的全长cDNA,其长度为2 196 bp.在该cDNA序列的5'端存在92 bp的非翻译区(UTR),中间为1 908 bp的开放阅读框(ORF),3'端非翻译区长度为196 bp,其中包括17 bp的poly(A)尾巴.该序列在GenBank中的登录号为EF583059.

2.2 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶氨基酸序列分析

由核苷酸推导的甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶含有635个氨基酸,预测蛋白质前体信号肽,结果显示其信号肽最可能的剪切位点位于第24个和25个氨基酸,剪切位点的可能性为86.8%,信号肽的可能性为91.8%.该酶的相对分子质量和等电点分别为70 144.12和5.79.根据在线工具预测,该氨基酸序列存在4个潜在的N-糖基化位点,它们分别是位于第81~84位的NATS,第279~282位的NSTT,第303~306位的NATA和第551~554位的NLTV.

将甘薯茎线虫的乙酰胆碱酯酶与其他线虫的乙酰胆碱酯酶的氨基酸序列进行同源性比较,结果表明,该甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶与模式线虫秀丽小杆线虫Ce-ACE-1的同源性为66.3%,而与Ce-ACE-2、Ce-ACE-3和Ce-ACE-4的同源性仅分别为32.4%、31.3%和32.9%;与南方根节线虫Mi-ACE-1的同源性最高,达68.6%,与动物寄生线虫胎生网

尾线虫(*Dictyocaulus viviparus*)^[10] Dv-ACE-1的同源性为67.2%.从图2系统树显示的结果可见,甘薯茎线虫的乙酰胆碱酯酶与其他线虫的ACE-1及电鳗(*Torpedo californica*)、果蝇(*Drosophila melanogaster*)的ACE组成一个支系,表明它们的亲缘关系较近,因而将其编号为Dd-ACE-1.

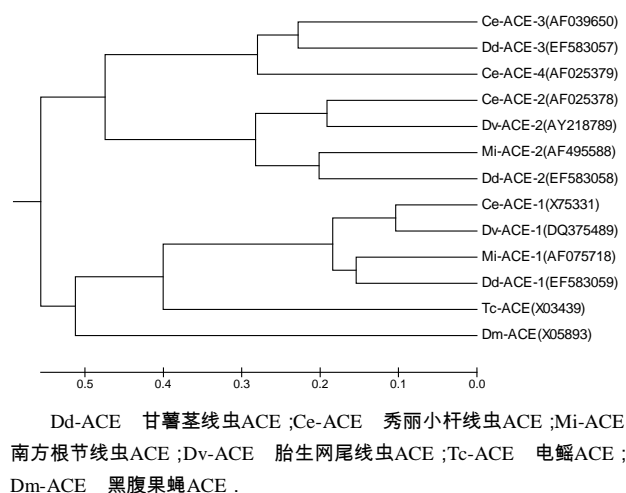


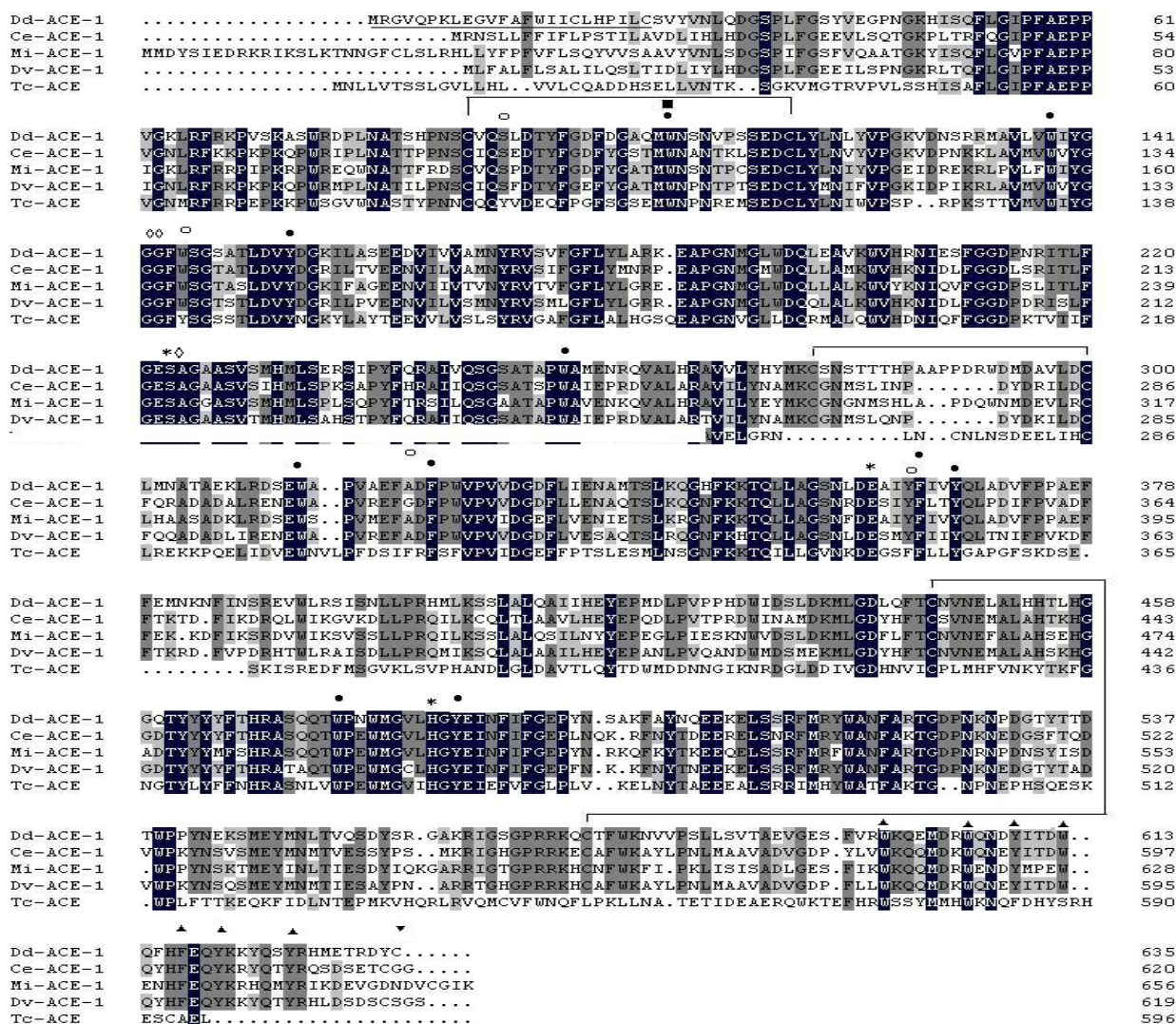
图2 基于UPGMA构建的13种不同乙酰胆碱酯酶的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic trees of AChEs based on the AChE amino acid sequence using UPGMA method

序列比对的结果(图3)表明,克隆得到的基因具有乙酰胆碱酯酶的特性,催化三联体S(223)、E(360)和H(483)以及胆碱结合位点W(106),包含S(223)位点的保守序列FGESAG,保守的氧阴离子洞G(142)、

G(143)和A(224)。在电鳐乙酰胆碱酯酶分子的催化功能域中存在14个保守的芳香族氨基酸残基,其中10个在甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶中完全保守,它们是W(106)、W(138)、Y(154)、W(256)、W(314)、F(323)、F(364)、Y(367)、W(475)和Y(485)。结果还表明,在甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶氨基酸中存在的

3对保守的半胱氨酸残基形成3对二硫键环,C(635)可能参与了链间二硫键的形成。此外,在C-末端,与秀丽小杆线虫ACE-1基因序列中有8个保守芳香族氨基酸残基相比较^[2],甘薯茎线虫有7个保守的芳香族氨基酸,这些特征与脊椎动物AChE(T)非常相似。



“●”表示保守氨基酸;“○”表示非保守氨基酸;“*”表示参与形成催化活性位点的氨基酸;“■”表示胆碱结合位点;“▼”表示C-末端参与了链间二硫键的形成的半胱氨酸;“▲”表示C-末端保守的芳香族氨基酸;“◇”表示组成阴离子洞的氨基酸;氨基酸的下划线表示信号肽序列,参与形成二硫键的半胱氨酸残基以线条相连;阴影表示相同的氨基酸。

图3 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶与其同源性基因比对分析

Fig.3 Alignment of *Dd-ace-1* deduced protein with other species

3 讨论

通过RT-PCR结合RACE技术,克隆了甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶的全长cDNA,通过核苷酸序列推导的氨基酸序列与秀丽小杆线虫的Ce-ACE-1、南方根结线虫的Mi-ACE-1、胎生网尾线虫的Dv-ACE-1

高度同源,而与秀丽小杆线虫的Ce-ACE-2、Ce-ACE-3和Ce-ACE-4同源性较低。电鳐乙酰胆碱酯酶一级结构中的绝大多数保守的氨基酸残基在甘薯茎线虫的乙酰胆碱酯酶中可以找到,因此可以推断该氨基酸序列为乙酰胆碱酯酶。

所有脊椎动物 *ace* 基因的活性丝氨酸残基均由 AGY 密码子所编码, 线虫 (*Caenorhabditis*) 和果蝇 (*Drosophila*) 等昆虫 *ace* 基因中的活性丝氨酸残基均为 TCN 密码子所编码^[11]。由于 TCN 和 AGY 不可能被单突变所互换, Brenner 曾推测昆虫等无脊椎动物的 AChEs 可能与脊椎动物的 AChEs 的起源是不同的^[12]。但后来的研究表明, 一些无脊椎动物, 如软体动物枪乌贼 (*Loligo*) 的 Ser200 由 AGT 所编码^[13], 扁虱 (*Boophilus*) 的由 AGC 所编码^[14], 根结线虫 *Meloidogyne* 的 ACE-1 和 ACE-2 分别由 AGC 和 AGT 所编码^[3-4]。笔者发现甘薯茎线虫的 ACE-1 和 ACE-3 由 AGT 所编码, 而 ACE-2 则由 TCT 所编码。由于 ACE-1、ACE-2 和 ACE-3 在线虫体内分布和功能的差异^[15], 而脊椎动物的 AChE 只能水解乙酰胆碱^[1], 从进化的角度考虑, 线虫作为低等动物, 不同类型的 AChE 在进化的过程中其功能可能也在趋向于专化性。

在 *ace-1*、*ace-2* 和 *ace-3* 序列中发现, 在核苷酸序列的 5' 端均存在反式剪接引导序列 (spliced leader, SL RNA) SL1: 5'-GGTTTAATTACCCAAGTTTGA G-3', 该序列为一段保守序列, 是一种基因表达进化上的古老模式^[16], 广泛存在于线虫 mRNA 5' 端^[17]。SL 提供了一个 5' 端的锚定, 它不仅可以合成 cDNA 第二链, 还可以确保分离得到全长 cDNA。在甘薯茎线虫中发现 SL1, 为研究该线虫的基因结构、基因调节、发育、进化以及防治研究提供了新的手段。

参考文献:

- [1] Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, et al. Molecular and cellular biology of cholinesterases[J]. Prog Neurobiol, 1993, 41: 31-91.
- [2] Combes D, Fedon Y, Grauso M, et al. Four genes encode acetylcholinesterases in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* cDNA sequences, genomic structures, mutations and in vivo expression[J]. J Mol Biol, 2000, 300: 727-742.
- [3] Piotte C, Arthaud L, Abad P, et al. Molecular cloning of an acetylcholinesterase gene from the plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1999, 99: 247-256.
- [4] Laffaire J B, Jaubert S, Abad P, et al. Molecular cloning and life stage expression pattern of a new acetylcholinesterase gene from the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Nematol, 2003, 5(2): 213-217.
- [5] 丁中, 彭德良, 黄文坤, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *ace-2* 全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 239-244.
- [6] 丁中, 彭德良, 高必达, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶基因 *ace-3* 全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2): 326-331.
- [7] 李伟, 孙文秀, 熊涛. 黄鳝抗菌肽 *hepcidin* 基因 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 304-308.
- [8] Young H K, Seung H O. In vitro culture and factors affecting population changes of *Ditylenchus destructor* of ginseng [J]. Kor J Plant Pathol, 1995, 11(1): 39-46.
- [9] 徐进军, 李世东, 杨之为. 马铃薯茎线虫的培养[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 77-80.
- [10] Matthews J B, Lazari O, Davidson A J, et al. A tryptophan amphiphilic tetramerization domain containing acetylcholinesterase from the bovine lungworm, *Dictyocaulus viviparus*[J]. Parasitol, 2006, 133: 381-387.
- [11] Sutherland D, McClellan J S, Milner D, et al. Two cholinesterases activities and genes are present in *Amphioxus* [J]. J Exp Zool, 1997, 277: 213-229.
- [12] Brenner S. The molecular evolution of genes and proteins: A tale of two serines [J]. Nature, 1988, 34: 528-530.
- [13] Talesa V, Grauso M, Arpagaus M, et al. Molecular cloning and expression of a full-length cDNA encoding acetylcholinesterase in optic lobes of the squid *Loligo opalescens*: A new member of the cholinesterase family resistant to diisopropyl fluorophosphates[J]. J Neurochem, 1999, 72: 1250-1258.
- [14] Baxter G D, Barker S C. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: Characterization and role in organophosphate resistance[J]. Insect Biochem Mol Biol, 1998, 28: 581-589.
- [15] Combes D, Fedon Y, Toutant J P, et al. Multiple *ace* genes encoding acetylcholinesterases of *Caenorhabditis elegans* have distinct tissue expression[J]. Eur J Neurosci, 2003, 18: 497-512.
- [16] Huang X Y, Hirsh D. A second trans-spliced RNA leader sequence in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 8640-8644.
- [17] Blaxter M, Liu L. Nematode spliced leader ubiquity, evolution and utility[J]. Int J Parasitol, 1996, 26: 1025-1033.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平