

文章编号:1674-7054(2011)01-0001-05

海南坡鹿 MD2 cDNA 的克隆及其生物信息学分析

杜丽, 谢少林, 成鹰, 张晓茹, 匡文华,
焦寒伟, 张冬琳, 郝永昌, 雷明, 刘涛, 王凤阳

(海南大学农学院, 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室(筹), 海口市动物基因工程重点实验室, 海南海口 570228)

摘要:以海南坡鹿外周血白细胞总 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 技术, 获得海南坡鹿 MD2 全长 cDNA, 并对其进行较系统的生物信息学分析, 内容包括序列特征分析、同源性分析、编码蛋白质理化性质及结构预测。结果表明:海南坡鹿 MD2 的 CDS 序列长度为 486 bp, 编码 160 个氨基酸, 与黄牛、人、欧洲兔、褐家鼠的核苷酸序列同源性分别为 98.55%, 77.43%, 78.47% 和 74.74%。该基因编码的蛋白质相对分子质量约为 19×10^3 , 理论等电点为 8.18。对编码蛋白的分子结构预测发现, 该蛋白为非跨膜蛋白, 其二级结构中, α -螺旋占 16.25%, β -折叠片占 38.13%, 无规则卷曲占 45.63%。

关键词:海南坡鹿; MD2; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

髓样分化蛋白-2(myeloid differential protein-2, MD2)表达于细胞表面,能赋予 Toll 样受体(Toll like receptors, TLRs)对细菌脂多糖(LPS)等病原微生物抗原的反应性。TLR 中的某些成员结合 MD2 及 CD14 形成 CD14/TLR-MD2 复合体,病原微生物抗原侵入时,这一复合体通过偶联信号转导并激活机体的免疫细胞,产生一系列的炎症反应,进而在抗感染免疫中发挥作用^[1-3]。海南坡鹿(*Cervus eldi hainanus*)是泽鹿的亚种之一,属国家 I 级保护动物^[4]。迄今,尚未见到海南坡鹿 MD2 基因的研究报道^[5-6],笔者采用 RT-PCR 技术,从海南坡鹿外周血白细胞中克隆 MD2 全长 cDNA,并通过生物信息学方法预测其结构与功能,旨在为进一步研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 海南坡鹿的外周血液冷冻样本由本实验室提供,血样采自海南省东方市大田国家级自然保护区。

1.1.2 试剂 血液总 RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;RNAsio、反转录酶 M-MLV、TaKaRa LA Taq 酶、随机引物 Random Hexamer Primer、琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自大连宝生物公司;pDM20-T 载体、T4 连接酶、质粒小量提取试剂盒、 $2 \times$ Taq PCR MasterMix(含染料)购自天根生化科技(北京)有限公司;宿主菌株 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存;其他试剂均为分析纯。

1.1.3 引物 引物合成及测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。引物序列为 P1: ATCATGTTTC-CATTTCTGC, P2: CTAATTGAAATCAGGGTAATGTATG。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 抽提 从 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 取 $1\ 000\ \mu\text{L}$ 经 RNAsio 预处理的血样在冰上解冻, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 2 min, 按试剂盒说明提取总 RNA, $w = 1\%$ 的变性琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性,并用核

收稿日期: 2011-01-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560021)

作者简介: 杜丽(1973-), 女, 山西阳高人, 海南大学农学院副教授, 硕士, 主要从事动物功能基因组学研究。

通信作者: 王凤阳(1970-), 男, 内蒙赤峰人, 教授, 博士, 博士生导师。E-mail: kychang2008@163.com

酸蛋白检测仪对所抽提的总 RNA 样品进行吸光度检测, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 反转录扩增 cDNA 以 $5\text{ }\mu\text{L}$ 总 RNA 为模板, 按试剂盒说明, 利用 M-MLV 反转录酶合成 cDNA, 反应完成后, 应用琼脂糖凝胶电泳检验 cDNA 的质量。反转录的程序为: $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min ; $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min ; $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min 灭活反转录酶。

1.2.3 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 以 $5\text{ }\mu\text{L}$ 上步反应液为模板, 用引物 P1 和引物 P2 进行降落 PCR 反应, 反应条件为: 第 1 个循环 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min ; 第 2 个循环开始采用降落 PCR 的方法, 退火温度从 $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 开始, 每个循环降低 $1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 变性延伸温度保持不变, 直至退火温度降到 $44\text{ }^{\circ}\text{C}$, 此过程共进行 14 个循环; 再按 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s 进行 25 个循环反应; 最后, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min 。反应结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 检验目的基因的质量。

1.2.4 回收纯化目的基因片段 将上步反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 利用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒, 回收纯化目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳检验回收目的片段的质量。

1.2.5 目的基因的连接与转化 取上步回收的 DNA $4.5\text{ }\mu\text{L}$, 利用 T4 连接酶, 将目的基因连接到 pMD20-T 载体上。反应条件: $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min 。取上述反应混合液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 加入到含 $200\text{ }\mu\text{L}$ 感受态细胞悬液的无菌离心管中, 冰浴 30 min , $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 90 s , 冰上放置冷却 $1\sim 2\text{ min}$ 后, 加入 $800\text{ }\mu\text{L}$ 的 LB 培养基, 转移到摇床, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 45 min , 然后 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min , 弃上清液后将剩余混合液 (约 $200\text{ }\mu\text{L}$) 均匀涂抹到氨苄抗性的 LB 培养板上, 恒温培养箱 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $12\sim 16\text{ h}$ 。

1.2.6 菌落 PCR 和酶切鉴定 菌落 PCR 的反应程序是: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 30 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min , $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 9 h 。反应结束后, 取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 菌落 PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳, 利用 *Sac* I 酶对菌落 PCR 产物进行酶切鉴定, 反应条件是 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h 。

1.2.7 提质粒进行酶切鉴定 将菌落 PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌, 接种到液体 LB 培养基中过夜培养 $12\sim 14\text{ h}$, 按照质粒小量提取试剂盒提取说明进行质粒的提取, 然后用 *Xba* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。

1.2.8 生物信息学分析 采用 DNAMAN, DNASTAR 等软件对 MD2 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行比较和分析; 并利用 TMHMM, NPSA, SWISS-MODEL 网站预测蛋白质的理化性质、亲水性轮廓、二级结构等。

2 结果与分析

2.1 海南坡鹿 MD2 基因 cDNA 的克隆 以海南坡鹿外周血白细胞总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 扩增出 MD2 片段, 并利用琼脂糖凝胶电泳回收纯化。琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

2.2 pMD20-MD2 酶切鉴定结果 取提取的质粒 $2\text{ }\mu\text{L}$, 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。酶切后琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, MD2 基因片段又从质粒中酶切出来, 与菌落 PCR 产物大小大致相同。

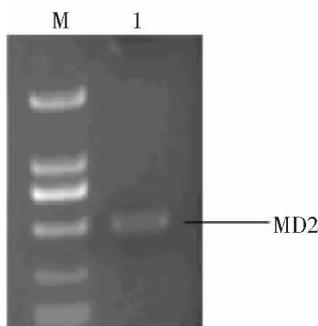


图 1 海南坡鹿 MD2 基因胶回收琼脂糖凝胶电泳结果
M: D2000 DNA Marker;
1: 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增的胶回收产物

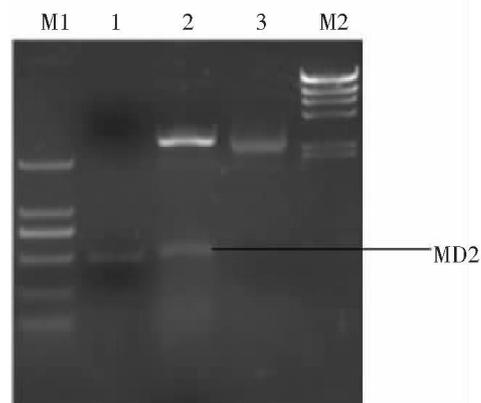


图 2 重组质粒酶切鉴定结果
M1: D2000 DNA Marker; 1: 菌落 PCR 产物; 2: 重组质粒 pMD20-MD2 经 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切产物; 3: 重组质粒 pMD20-MD2; M2: λ b/HindIII DNA Marker

2.3 海南坡鹿 MD2 基因的测序结果 海南坡鹿 MD2 基因的测序结果见图 3,本测序结果由上海生工生物工程技术有限公司完成。

2.4 海南坡鹿 MD2 基因 cDNA 及氨基酸的序列特征分析 海南坡鹿 MD2 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列见图 3。如图 3 所示:该 cDNA 序列编码区序列全长 486 bp,编码 160 个氨基酸。通过 http://www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool 网站,分析得到该蛋白理论等电点和分子质量分别为 8.18 和 19×10^3 。通过 DNAMAN 软件分析坡鹿 MD2 蛋白的氨基酸组成特性,发现该编码蛋白有 160 个氨基酸组成,20 种氨基酸中天冬氨酸(Asn)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、络氨酸(Tyr)、苏氨酸(Thr)、精氨酸(Arg)含量约为 62.7%,其中异亮氨酸和苯丙氨酸的含量最高;组氨酸(His)、谷氨酰胺(Gln)、蛋氨酸(Met)和色氨酸(Trp)含量不足 5%;组氨酸的含量最低,只有 0.62%。

```

1      ATCATGTTTCCATTTCTGCTTTTTTCCACCCTGTTTTCTTCCATATTTACTGAAACCTAGG
1      I M F P F L L F S T L F S S I F T E P R
61     GAGAAATCGTTGGGTCTGCAACTCCTCTGACGCCACCGTTTGGTACGACTACTGTGATAAC
21     E N R W V C N S S D A T V W Y D Y C D N
121    TTGAAATTTCTTATTTCAATACGTTCTGAGCCCTGTATAACATTGAAGGGGAAGCCGTGGA
41     L K F P I S I R S E P C I T L K G S R G
181    ATACTCTATCTCTACTACATTCCAAAGAGATATAAAGAGCCCTGTATTTCAATATCTAT
61     I L Y L Y Y I P R R D I K S L Y F N I Y
241    CTATCTACTAAGTCCATGAATTTCCCATTCGCGCAAGGAAGTTATTTGCCGAGGATATGAT
81     L S T K S M N F P L R K E V I C R G Y D
301    GATGATTTTTTCCTTTTGCAGAGCTCTGAAGGGAGAGACTGTGAACACAAACAATACAATTC
101    D D F S F C R A L K G E T V N T T I Q F
361    TCCTTCAGGGGAATACGATTTTCTAAGGGACAATACAACCTGCATTACAGAAGCCATCGAG
121    S F R G I R F S K G Q Y N C I T E A I E
421    GGGAACTGAAGAAAAGCTCTTTTGTCTGAACTTTACTATCATAACATTACCCTGATTTCC
141    G N T E E K L F C L N F T I I H Y P D F
481    AATTAG
161    N *

```

图 3 海南坡鹿 MD2 基因 cDNA 编码区序列及推导的氨基酸序列

2.5 海南坡鹿 MD2 基因生物信息学分析

2.5.1 海南坡鹿与其他动物 MD2 基因的同源性比较分析 应用 DNAMAN,通过对数据库的检索,将该基因 CDS 区及其推导的氨基酸序列与 GenBank 上公布的人(AB446498)、褐家鼠(AY963291)、欧洲兔(AY101395)、黄牛(DQ319076)的 MD2 基因的 CDS 序列同源性及其氨基酸序列同源性进行对比(见表 1,表 2)。结果表明:海南坡鹿 cDNA 编码区与黄牛的同源性最高,为 97.94%。氨基酸序列同源性对比结果也是与黄牛的最高,为 97.52%。从分析结果可以看出,坡鹿 MD2 和黄牛 MD2 的同源性最高。

表 1 海南坡鹿 MD2 与黄牛、人、褐家鼠和欧洲兔序列同源性比较结果 %

物种	黄牛	人	褐家鼠	欧洲兔
海南坡鹿	98.55	77.43	74.74	78.47

表 2 海南坡鹿与黄牛、人、褐家鼠和欧洲兔 MD2 氨基酸序列同源性比较结果 %

物种	黄牛	人	褐家鼠	欧洲兔
海南坡鹿	98.13	66.88	61.25	66.25

2.5.2 海南坡鹿 MD2 蛋白跨膜区、疏水性分析 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>网站对海南坡鹿 MD2 蛋白跨膜区进行分析表明,该序列无跨膜区,说明该蛋白不是跨膜蛋白。利用 <http://www.expasy.org/tools/protscale.html> 对其进行疏水性分析,结果如图 4 所示,坡鹿 MD2 分子的疏水性分值在 -2.211 ~ 2.278 之间,在氨基酸序列 5 ~ 10 和 145 ~ 155 两个区域出现了较高的疏水性,预示此处富含疏水性氨基酸。

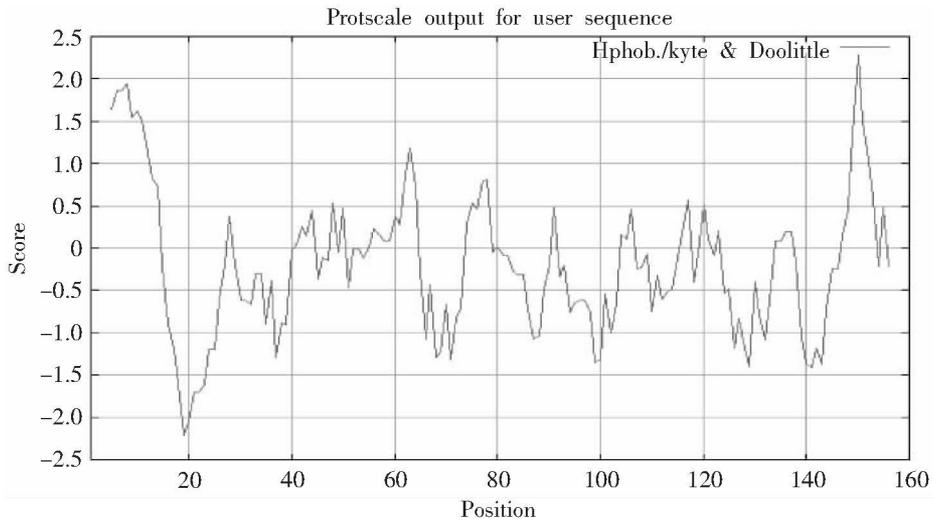


图4 海南坡鹿 MD2 蛋白亲/疏水性分析结果

2.5.3 海南坡鹿 MD2 蛋白质二级结构 进入 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html 网址,对 MD2 蛋白质序列进行二级结构预测,预测结果如图 5 所示。由图 5 可知,组成海南坡鹿蛋白的 160 个氨基酸中,有 26 个氨基酸可能形成 α -螺旋,61 个氨基酸可能形成 β -折叠片,73 个氨基酸可能形成无规则卷曲。

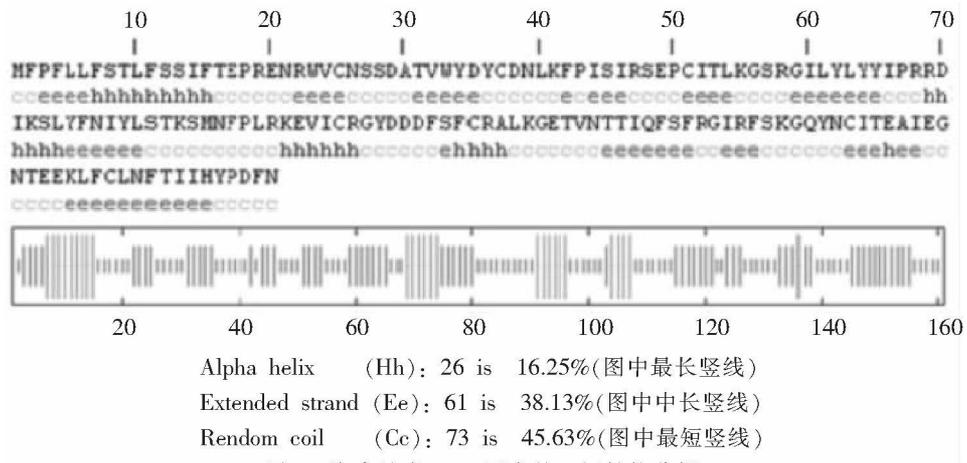


图5 海南坡鹿 MD2 蛋白的二级结构分析

3 讨论

MD2 在 TLR4 介导的内毒素识别和信号传导过程中发挥了重要的调控作用。MD2 既能调节 TLR4 的胞内分布,又能辅助 TLR4 识别 LPS。一部分 MD2 释放到血浆中,形成可溶性的 MD2(sMD2)。sMD2 在 CD14 参与下,能结合血浆中的 LPS,形成 LPS-sMD2 复合物,辅助只表达 TLR4 而不表达 MD2 的细胞识别 LPS,但过表达的 sMD2 又能抑制 LPS 信号^[7-8]。

笔者克隆的海南坡鹿 MD2 cDNA CDS 区大小为 486 bp,共编码 160 个氨基酸,相对分子质量为 19×10^3 。序列分析发现,MD2 CDS 序列与 GenBank 上登载的黄牛核苷酸序列同源性 98.55%,氨基酸序列同源性为 98.13%,说明本实验成功克隆了坡鹿 MD2 cDNA。其 CDS 序列与人、欧洲兔、褐家鼠等物种的核苷酸序列同源性在 70% 以上,具有相对较高的相似性,这说明 MD2 在生物进化过程中具有较强的保守性。笔者还对海南坡鹿 MD2 基因进行了蛋白质理化性质分析及结构预测,为进一步研究 MD2 基因在抗感染免疫中的作用提供了基础研究材料。

参考文献:

- [1] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. *Nature*, 2000, 406 (6797): 782 – 786.
- [2] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY C A J. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. *Nature*, 1997, 388 (6640): 394 – 397.
- [3] 钟田雨, 刘靖华, 姜勇. 髓样分化蛋白-2 在识别和转导内毒素信号中的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34 (5): 460 – 464.
- [4] 张琼, 曾治高, 孙丽风, 等. 海南坡鹿的起源、进化及保护[J]. *兽类学报*, 2009, 29 (4): 365 – 371.
- [5] 曾治高, 宋延龄. 海南坡鹿 (*Cervus eldi hainanus*) [J]. *动物学杂志*, 2003, 38(1): 7.
- [6] 申明霞, 刘涛, 杜丽, 等. 海南坡鹿外周血白细胞 cDNA 文库的构建[J]. *生物技术*, 2008, 18(2): 5 – 8.
- [7] VISINTIN A, MAZZONI A, SPITZER J A, et al. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor4[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(21): 12156 – 12161.
- [8] GRUBER A, MANCEK M, WAGNER H, et al. Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 28475 – 28482.

Cloning and Bioinformatics Analysis of MD2 cDNA from Hainan Eld's deer

DU Li, XIE Shao-lin, CHENG Ying, ZHANG Xiao-ru, KUANG Wen-hua, JIAO Han-wei,

ZHANG Dong-Lin, HAO Yong-chang, LEI Ming, LIU Tao, WANG Feng-yang

(College of Agriculture, Hainan University, Haina Key Lab of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Research

(Construction Period), Animal Genetic Engineering Key Lab of Haikou, Haikou 570228, China)

Abstract: Myeloid differential protein-2 (MD2) cDNA of Hainan Eld's deer (*Cervus eldi hainanus*) was amplified by RT-PCR and the sequences were analyzed. The bioinformatics analysis results indicated that MD2 cDNA ORF contained a 486 bp encoding 161 amino acids; compared to yellow cattle, human, rabbit and mouse, the nucleotide sequence homology of MD2 were 98.55%, 77.43%, 78.47% and 74.74%, respectively; relative molecular weight was 19 000, pI was 8.18. The molecular structure prediction results suggested that the protein was non-transmembrane protein, which contained 16.25% α -helix, 38.13% β -meander, 45.63% random coil.

Key words: *Cervus eldi hainanus*; MD2; cloning; bioinformatics analysis