

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620121152335

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

旋毛虫三种 SMAD 蛋白基因和二种 TGF- β
同源基因的克隆表达

Cloning and expression of three *smad* genes and two
homologous genes of TGF- β in *Trichinella spiralis*

刘燕

指导教师姓名: 杨玉荣 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要	I
Abstract.....	III
第一章 前 言	1
1.1 旋毛虫概况	1
1.1.1 旋毛虫形态特征.....	1
1.1.2 旋毛虫生活史.....	2
1.1.3 旋毛虫病的检测.....	3
1.2 旋毛虫基因组学研究现状	4
1.3 旋毛虫中 TGF- β 信号通路相关基因的研究	4
1.3.1 TGF- β 超家族.....	4
1.3.2 SMAD 蛋白超家族研究.....	8
1.3.3 TGF- β 超家族同源蛋白研究.....	11
1.4 本论文研究的目的及意义	13
第二章 材料和方法	15
2.1 材料、常用试剂与药品、物引	15
2.1.1 材料.....	15
2.1.2 常用试剂与药品.....	15
2.1.3 引物.....	16
2.2 常用溶液和培养基配制、实验仪器	16
2.2.1 各类缓冲液的配置.....	16
2.2.2 碱变性法提取质粒用液.....	17
2.2.3 培养基的配制.....	17
2.2.4 蛋白实验相关溶液.....	17
2.2.5 实验仪器.....	18
2.3 实验方法	18
2.3.1 各时期旋毛虫的收集.....	18
2.3.2 旋毛虫 DNA、总 RNA 的提取和 RNA 反转录.....	18
2.3.3 基因克隆和载体构建.....	19
2.3.4 原核表达载体的构建.....	21
2.3.5 重组蛋白的诱导表达.....	21
2.3.6 重组蛋白的纯化和抗体的制备.....	22
2.3.7 Real time PCR.....	22
2.3.8 Western blot.....	23
2.3.9 免疫荧光定位.....	24
2.3.10 Co-IP 实验.....	24
第三章 旋毛虫 SMAD 蛋白基因的研究.....	26
3.1 结果与分析	26

3.1.1 提取 DNA 与总 RNA	26
3.1.2 <i>smad-1</i> 基因的克隆、表达及定位研究	26
3.1.3 <i>smad-2</i> 基因的克隆、表达及定位研究	40
3.1.4 <i>smad-4</i> 基因的克隆、表达及定位研究	52
3.1.5 SMAD 蛋白间的相互作用	65
3.2 讨论	65
第四章 旋毛虫 TGF-β 同源基因的研究	68
4.1 结果与分析	68
4.1.1 <i>tgh-1</i> 表达、定位及功能的初步研究	68
4.1.2 <i>tgh-2</i> 表达、定位及功能的初步研究	80
4.2 讨论	94
总 结	96
参考文献	97
致 谢	105

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 <i>T. spiralis</i> Overview.....	1
1.1.1 <i>T. spiralis</i> morphology.....	1
1.1.2 <i>T. spiralis</i> life history.....	2
1.1.3 Clinical detection of <i>T. spiralis</i>	3
1.2 Genomics of <i>T. spiralis</i>	4
1.3 TGF-beta signaling pathway genes in <i>T. spiralis</i>	4
1.3.1 TGF-beta superfamily.....	4
1.3.2 SMAD protein superfamily.....	8
1.3.3 Homologous protein of TGF- β superfamily.....	11
1.4 Aims and significance of this dissertation.....	13
Chapter 2 Materials and Methods	15
2.1 Materials, reagents and primers.....	15
2.1.1 Materials	15
2.1.2 Chemicals and reagents.....	15
2.1.3 Primers	16
2.2 Preparation of solution and medium	16
2.2.1 Various types of buffers.....	16
2.2.2 Plasmids extract solutions.....	17
2.2.3 Preparation of the medium.....	17
2.2.4 Protein related solutions.....	17
2.2.5 Equipments	18
2.3 Experimental methods.....	18
2.3.1 Collection of different stages of <i>T. spiralis</i>	18
2.3.2 Extraction of genomic DNA and total RNA of <i>T. spiralis</i>	19
2.3.3 Cloning and sequences analysis.....	19
2.3.4 The construction of expression vector of each gene.....	20
2.3.5 The expression of recombinant proteins in <i>E. coli</i>	21
2.3.6 Purification of recombinant proteins and immunization	21
2.3.7 RT-PCR.....	22
2.3.8 Western blot.....	23
2.3.9 Immunofluorescence localization	23
2.3.10 Co-IP	24
Chapter 3 Studies on <i>smad</i> genes in <i>T. spiralis</i>	26

3.1 Results and analysis	26
3.1.1 Extraction of genomic DNA and total RNA.....	26
3.1.2 The molecular cloning, expression and characterization of <i>smad-1</i> ...	26
3.1.3 The molecular cloning, expression and characterization of <i>smad-2</i> ...	40
3.1.4 The molecular cloning, expression and characterization of <i>smad-4</i> ...	53
3.1.5 Cross-talking between SMAD proteins	65
3.2 Discussion.....	65
Chapter 4 Studies on two homologous genes of TGF-β in <i>Trichinella spiralis</i>.....	68
4.1 Results and analysis	68
4.1.1 The molecular cloning, expression and characterization of <i>tgh-1</i>	68
4.1.2 The molecular cloning, expression and characterization of <i>tgh-2</i>	80
4.2 Discussion.....	94
Conclusion	96
References.....	97
Acknowledgements	105

廈門大學博碩士論文

摘 要

旋毛虫是一种重要寄生虫,寄生于人、猪和鼠等多种动物体内产生致死性疾病。因旋毛虫病易感染,分布范围广泛和难治愈等特性,研究出能有效治疗旋毛虫病的制剂已成为全世界关注的热点。

哺乳动物中 TGF-beta 信号转导由 TGF- β 、Activin、inhibin、GDF、BMP 和 MIS 等组成, TGF-beta 参与细胞增殖分化、胚胎发育和骨形成的调控。在哺乳动物中 TGF-beta 信号途径的研究已经比较深入,但 TGF-beta 信号转导在旋毛虫中的报道还比较少。本文研究的 *smad-1* 和 *smad-2* 基因编码的蛋白是 SMAD 蛋白超家族中 R-SMAD 的成员; *smad-4* 基因编码的蛋白属于 SMAD 蛋白超家族的 Co-SMAD; *tgh-1* 和 *tgh-2* 基因是 TGF-beta 超家族成员的同源基因,编码的蛋白是 TGF-beta 超家族的同源物,这些功能基因均参与 TGF-beta 信号通路。

为了了解旋毛虫 *smad-1*、*smad-2*、*smad-4*、*tgh-1* 和 *tgh-2* 基因的功能,我们对旋毛虫的 *smad-1*、*smad-2*、*smad-4*、*tgh-1* 和 *tgh-2* 基因进行了克隆和表达鉴定。利用 PCR 技术对这些基因的 cDNA 扩增,成功获得的 cDNA 片段大小分别为 1557 bp (*smad-1*)、1476 bp (*smad-2*)、1314 bp (*smad-4*)、1578 bp (*tgh-1*) 和 1322 bp (*tgh-2*),并对这些基因的阳性质粒进行酶切和测序验证。将正确的目的片段构建到 PET-32a 上,再将构建成功的表达质粒转化到 BL21 (DE3) 中用适宜浓度的 IPTG 诱导表达,并运用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析重组质粒的表达结果,得到重组蛋白分子量大小分别为 66.8 kDa (SMAD-1)、67.2 kDa (SMAD-2)、55.5 kDa (SMAD-4)、76.2 kDa (TGH-1) 和 65.5 kDa (TGH-2),通过分离纯化重组蛋白和免疫小鼠获得相应的抗血清。

为了进一步研究这五种基因在 TGF-beta 信号转导中的功能,采用 RT-PCR 及 Western Blot 的方法检测了 *smad-1*、*smad-2*、*smad-4*、*tgh-1* 和 *tgh-2* 在旋毛虫的新生幼虫、肌肉幼虫、雌虫和雄虫中的表达情况。RT-PCR 结果显示: *smad-1*、*smad-2* 和 *smad-4* 基因均在雌虫中表达量最高, *smad-1* 基因在雄虫中表达略低外,在其他两个时期表达无显著差异; *smad-2* 和 *smad-4* 基因的表达情况基本一致,在雄虫中表达略高外,在其他两个时期表达无明显差异; *tgh-1* 和 *tgh-2* 表达情况类似,新生幼虫和肌肉幼虫的表达量明显高于雌虫和雄虫的表达量。Western Blot

结果显示这五种蛋白在新生幼虫、肌肉幼虫、雌虫和雄虫中均有表达，且不同时期的表达无显著差异。

免疫荧光定位发现这五种蛋白在旋毛虫体内都有广泛分布，SMAD-1 和 SMAD-2 主要存在于细胞质中；SMAD-4 在细胞质和细胞核中均有分布；在细胞质和细胞核都发现了 TGH-1 和 TGH-2。在蛋白相互作用的研究上发现 SMAD-1 和 SMAD-2 与 SMAD-4 之间存在一定的相互作用，表明旋毛虫体内的 TGF-beta 信号通路与典型的 SMAD 依赖型 TGF-beta 信号转导途径类似。

关键词：旋毛虫；TGF-beta；克隆；表达

Abstract

Trichinella spiralis is a zoonotic parasite which parasitize in human, pigs, rats and other animals. Heavy load can produce lethal disease. Trichinosis is susceptible to infection, wide distribution and refractory, vaccine development which devoted to cure and prevent trichinosis has drawn the world's attention.

TGF-beta signaling pathway consists of TGF- β , Activin, inhibin, GDF, BMP and MIS. TGF-beta plays an important role in cell proliferation, cell differentiation, embryonic development and bone formation in mammals. TGF-beta signaling pathway has been in-depth study in mammals, but the TGF-beta signaling pathway in *T. spiralis* remains unclear. Proteins encoded by *smad-1* and *smad-2* gene are belong to R-SMAD which is a member of SMAD protein superfamily, SMAD-4 encoded by *smad-4* is a Co-SMAD protein, TGH-1 and TGH-2 encoded by *tgh-1* and *tgh-2* are belong to members of TGF-beta superfamily, these functional genes are members of the TGF-beta signaling pathway.

In order to understand the function of TGF- β signaling pathway in *T. spiralis*, three *smad* genes (*smad-1*, *smad-2* and *smad-4*) and two TGF- β homologous genes (*tgh-1* and *tgh-2*) were cloned and expressed in *E. coli*. The fragments of these genes cDNA are about 1557 bp (*smad-1*), 1476 bp (*smad-2*), 1314 bp (*smad-4*), 1578 bp (*tgh-1*) and 1322 bp (*tgh-2*) respectively. The recombinant proteins were expressed and purified, the molecular weight of the recombinant proteins are 66.8 kDa (SMAD-1), 67.2 kDa (SMAD-2), 55.5 kDa (SMAD-4), 76.2 kDa (TGH-1) and 65.5 kDa (TGH-2) respectively. The purified recombinant proteins were immunized mice to obtain corresponding antibodies.

To further study these five genes' function in TGF-beta signaling pathway, we use RT-PCR and Western Blot to detect the expression of SMAD-1, SMAD-2, SMAD-4, TGH-1 and TGH-2 in newborn larvae, muscle larvae, female and male adult worm of *Trichinella spiralis*. RT-PCR results showed the mRNA expression

level of *smad-1*, *smad-2* and *smad-4* are the highest in the female adult worm. *smad-1* in the male adult worm is slightly lower, and it is not significant different from other two stages; the gene *smad-4* is consistent with the gene *smad-2* which is slightly higher in the male adult worm, and it is not significant different from other two stages; the mRNA level of *tgh-1* and *tgh-2* are similar in newborn larvae and muscle larval, but the expression level are higher than in the female and male adult worm. Western Blot results showed that the expression of these proteins are conserved expressed in the newborn larvae, muscle larvae, female and male adult worm.

Immunofluorescence localization of these five proteins revealed that they are widely distributed in the body of *Trichinella spiralis*, SMAD-1 and SMAD-2 are distributed in the cytoplasm; SMAD-4 and TGH-1, TGH-2 are distributed in the cytoplasm and the nucleus. The results of protein interactions suggested that SMAD-1 and SMAD-2 have interaction with SMAD-4, so TGF-beta signaling pathway is similar to typical SMAD-dependent pathway in *Trichinella spiralis*.

Key words: *Trichinella spiralis*; TGF-beta; cloning; expression

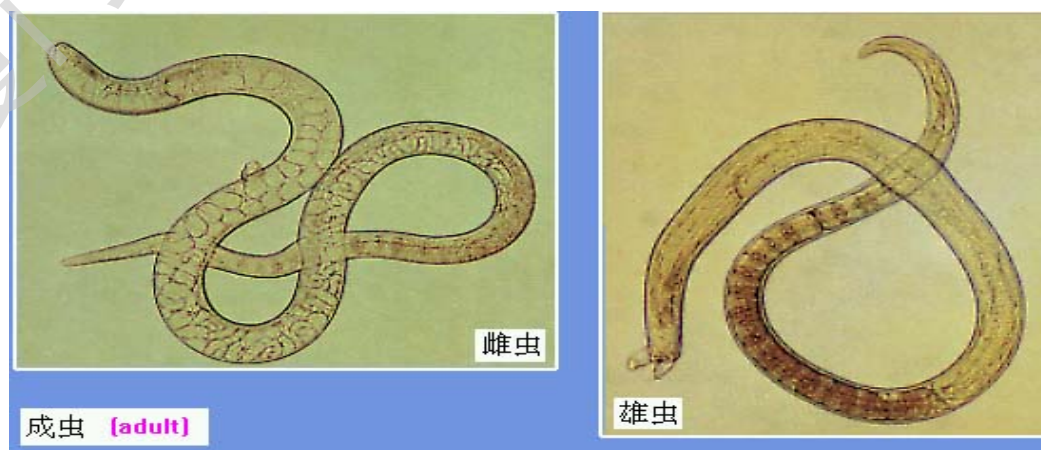
第一章 前言

1.1 旋毛虫概况

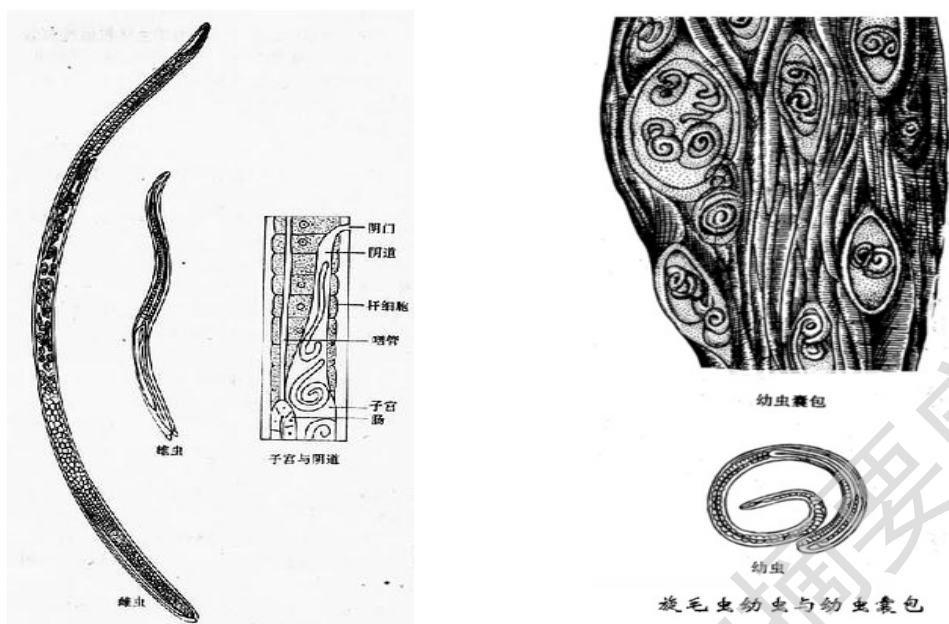
旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) 是一种能在 150 多种动物和人的骨骼肌中形成长期感染的食源性人兽共患病线虫。在高等动物或人体内存活时间长达数月至数年; 在啮齿动物体内可以从感染持续到宿主死亡^[1]。旋毛虫病最早出现在土耳其、苏联、法国和意大利等国家, 随后发现除了澳大利亚以外的世界各地都出现了旋毛虫病, 其中北美洲的发病率最为频繁。我国也是旋毛虫感染的国家之一, 首列旋毛虫病发现于 1881 年厦门, 我国旋毛虫病在河南和湖北等地区的发病率最高^[2]。

1.1.1 旋毛虫形态特征

旋毛虫是哺乳动物体内所有寄生虫中最小的线虫, 旋毛虫体型细小, 前端到后端渐粗。由单行细胞构成的食道占旋毛虫的 1/3~1/2, 肛门位于虫体尾部, 成虫有发达的单管型生殖器官, 且雌雄异体。雌虫长约 3~4mm, 其体长为雄虫的 1 倍以上, 雌虫和雄虫的宽度相当, 约 0.04~0.06mm; 幼虫大小比成虫较小, 约为 100 μ m \times 6 μ m。旋毛虫的幼虫和成虫寄生于同一宿主体内, 旋毛虫幼虫以囊包寄生于哺乳动物体内的横纹肌, 而成虫在宿主的空肠和十二指肠的前段内发育成熟并繁殖。



(引自: <http://www.trichinella.org/biology.htm>)



(引自: <http://www.trichinella.org/biology.htm>)

图 1-1 旋毛虫雌虫, 雄虫, 幼虫形态

Fig. 1-1 Morphology of female, male, larvae in *T. spiralis*

1.1.2 旋毛虫生活史

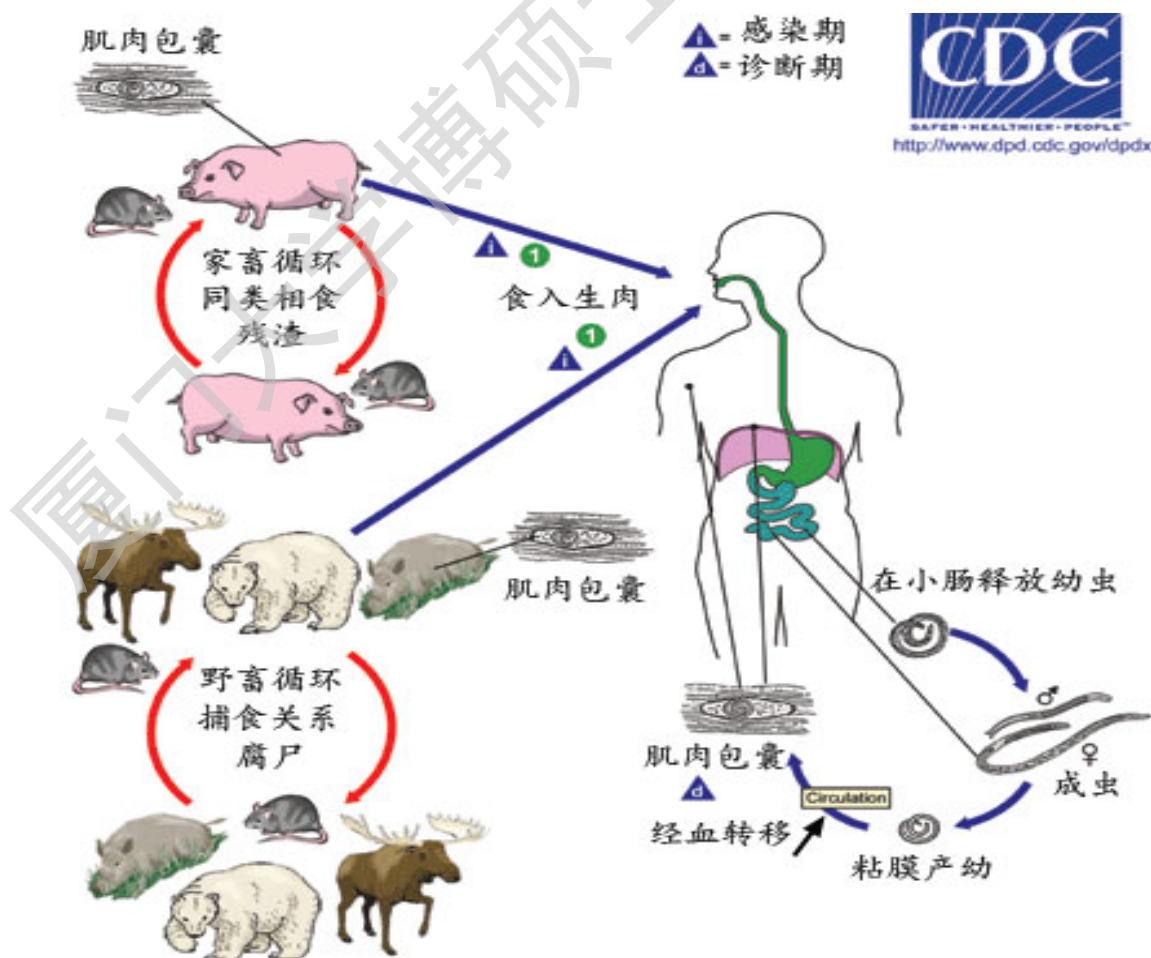


图 1-2 旋毛虫生活史

Fig. 1-2 Life cycle of *T. spiralis*(引自: http://www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm)

旋毛虫的生活史主要包括侵入期(1周)、幼虫移行期(2周~2月)和囊包形成期(数月)三个阶段。当宿主吞食含有活旋毛虫囊包的肉类之后,在数小时内,囊包在胃消化液的作用下释放出幼虫,幼虫进入空肠和十二指肠的粘膜,经过1.5~3天的四次蜕皮发育成熟,雌虫和雄虫交配后,大部分雄虫死亡经肠道排出体外,雌虫不断长大,雌虫头部侵入肠粘膜淋巴结或肠腺,感染后第5天,幼虫开始从雌虫体内逸出,每条雌虫可以产幼虫500~1500条。幼虫经过血液循环系统扩散到全身,当幼虫再次在骨骼肌内发育成成熟的肌肉幼虫时,则进入下一个生命周期。

1.1.3 旋毛虫病的检测

旋毛虫病(trichinosis)是因生食或未煮熟含有活的旋毛虫幼虫而感染。猪肉是旋毛虫病的主要传播途径^[2],同时马肉、狗肉、熊肉、美洲狮肉也能传播旋毛虫病^[3-6]。旋毛虫病之前主要采用活检法和消化法等病原诊断的方法进行检查,由于其阴性结果较多,现在主要利用免疫诊断的方法检查旋毛虫病^[7]。免疫诊断的检查法主要包括:皮内试验利用旋毛虫的幼虫抗原对旋毛虫患病者进行皮下检测,能够产生阳性结果而作为旋毛虫病检查的辅助方法;补体结合实验对旋毛虫病的诊断并不完全适用,因为补体不能固定所有的抗体;凝集反应是旋毛虫的可溶性抗原利用中间载体与血清中的抗体产生凝集现象来检测旋毛虫病,目前可以用于检测旋毛虫病的凝集试验包括IHA^[8](间接血凝试验)、BFT(灶土絮状凝集试验)、Co-A(应用协调凝集试验)和LAT(乳胶凝集试验)等;沉淀实验是通过有特异性抗体的血清对幼虫进行孵育,若发现虫体周围有颗粒状的沉淀物,则可以检测出旋毛虫病;ELISA(酶联免疫吸附试验)早已用于寄生虫感染血清、病毒和细菌等诊断,旋毛虫的ES抗原用ELISA检测灵敏度可达0.01条/0.01g肌肉^[9],主要是通过检测血清中的特异性抗体,其阳性率达90%以上^[10];IEST(免疫酶染色试验)利用感染旋毛虫的小鼠肌肉的冰冻切片为抗原,检查旋毛虫病患者血清中的抗体。

除病原诊断和免疫诊断方法之外，实验室通常采用旋毛虫 DNA 检测法来诊断旋毛虫病；根据旋毛虫幼虫的基因文库序列设计特异性引物，则可以利用 PCR 技术检测旋毛虫。

1.2 旋毛虫基因组学研究现状

由于人类基因组计划的发展，生物医学研究已从结构基因学转向功能基因组学，WHO 将寄生虫基因组计划改为寄生虫功能基因组计划。基因敲除、转基因技术、基因诱变技术、生物芯片技术、RNA 干扰技术、基因表达系列分析、抑制消减杂交技术、生物信息学和蛋白质组学技术等基因组学分析方法有利于发现旋毛虫的生物学特性以及旋毛虫与宿主之间的相互影响，同时还为诊断旋毛虫病提供新方法、为预防和控制旋毛虫病创造新途径和对筛选出新颖的、特异性的生物标记和药物靶点具有重要意义。目前，主要采用高通量测序并与相关物种的基因组分析比对来获取转录组学信息，对于旋毛虫高通量测序研究的相关报道还比较少，主要是通过序列表达标签（EST）获得转录组信息。

随着寄生虫基因组的发展，目前旋毛虫的全部基因组序列已完成，且基因组草图已绘制成功^[11]。旋毛虫基因组的核苷酸共有 64MB，预测其基因组的 26.6% 属于 15808 个可编码蛋白质的基因，其中 45% 蛋白质具有种属特异性，且 12% 已通过 EST 测序证实。同其他寄生虫基因组相比，旋毛虫的基因组较小，因此可预测的编码蛋白也相对较少。还发现旋毛虫可以通过 16 种特异的反式剪接前导序列完成反式剪接，并不存在线虫中经典的 SL1 和 SL2 反式剪接前导序列^[12]。

旋毛虫基因组中还发现大量表达糖类蛋白的基因，Guiliano 等^[13]利用生物信息学，发现旋毛虫 cDNA 序列包含编码潜在分泌蛋白的序列，在肌肉幼虫发现了 3 种分泌蛋白，都被分泌到了滋养细胞内发挥重塑骨骼肌的作用。

1.3 旋毛虫中 TGF-beta 信号通路相关基因的研究

1.3.1 TGF-beta 超家族

TGF-beta 是由 Assoian 等^[14]在 1983 年从人血小板中分离出的一类转化生长因子，具有多种生物学活性。TGF-beta 超家族是由一类结构、功能相关的多肽生长因子亚家族组成，其家族成员包括 TGF- β 、Activin（活化素）、inhibin（抑制素）、

GDF（生长分化因子）、BMP（骨形态发生蛋白）、MIS（缪勒氏管抑制物质）等。典型的TGF- β 包括TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3三种异构体^[15-17]，三种亚型的氨基酸序列之间约有64%~82%的同源性，高度一致性使三种异构体能与同一受体经过相同的信号途径发挥功能^[18, 19]。但三种异构体在生物学功能上存在一定差异，且基因表达也具有明显的组织和发育特异性：TGF- β 1由淋巴细胞和单核细胞产生，主要在内皮细胞、造血细胞及结缔组织的细胞中表达；TGF- β 2在大脑、骨细胞和肺细胞中产生，在上皮细胞和神经细胞中表达比较多；TGF- β 3在中枢神经系统中发育生成，其主要分布在间质细胞中。TGF- β 三种异构体中TGF- β 1所占比列达90%以上，且活力最强。TGF- β 种属间存在明显的序列同源，表明其介导的TGF- β 信号转导具有独特性和保守性。

TGF- β 超家族成员都是先合成较大的前体分子，其前体包括一个成熟TGF- β 和N端前体残基（LAP）^[20]。LAP通过高尔基体中的内源性蛋白酶在二元位点或RXXR位点裂解，分解可以产生约含110~140个氨基酸的成熟多肽即TGF- β 单体，每个成熟的TGF- β 单体亚单位中都含有7个高度保守的Cys，其中6个半胱氨酸残基形成3个分子内二硫键，使TGF- β 单体具有“半胱氨酸结”结构。其中2个二硫键形成环状结构，第3个二硫键则穿过其环状结构。第7个半胱氨酸残基参与形成链间二硫键，将两个TGF- β 单体连接成具有生物活性的二聚体^[20]（图1-3）。

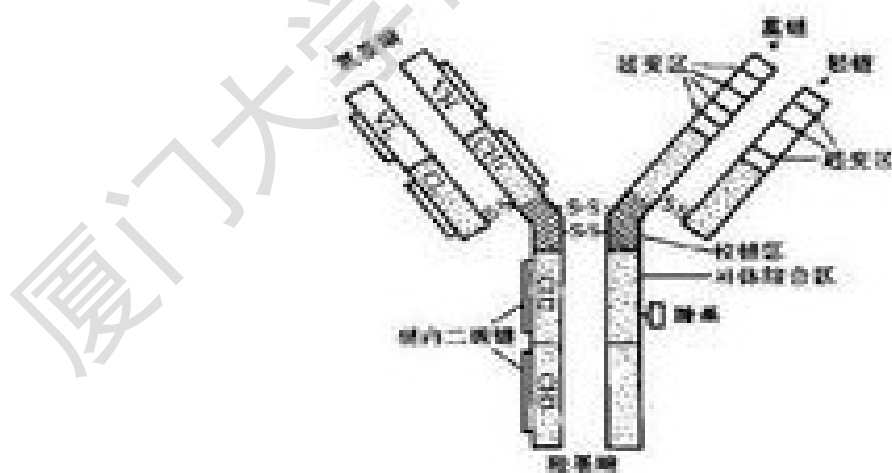


图 1-3 TGF- β 分子结构

Fig. 1-3 TGF- β molecular structure

（引自：http://www.yi7.com/com_anyan/sell/itemid-4394163.html）

细胞分泌的转化生长因子TGF- β 通过细胞间隙作用于邻近细胞膜上的T β R受体，进而激活邻近细胞内下游SMAD蛋白信号转导，产生局部反应；同时细胞分

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.