

氯离子通道蛋白 1 的缺失突变体 CLIC1(Δ49-51) 与 Sedlin 蛋白相互作用的研究

洪翠丽, 金振辉, 朱亮亮, 潘林鑫, 耿慧武, 刘晓颖

摘要 目的 探究胞内氯离子通道蛋白 1 (CLIC1) 的缺失突变体 CLIC1(Δ49-51) 在哺乳动物细胞中的表达、定位改变, 及与 Sedlin 蛋白在体内、体外相互作用的影响。方法 构建 CLIC1 的缺失突变体的真核表达质粒 pcDNA3.1-CLIC1(Δ49-51)-FLAG; 免疫荧光观察 CLIC1(Δ49-51) 与 Sedlin 在 COS7 细胞中的共定位; 在 HEK 293T 细胞中进行免疫共沉淀和 GST pull-down 实验, 研究 CLIC1(Δ49-51) 与 Sedlin 的相互作用。结果 CLIC1(Δ49-51) 在 COS7 细胞中主要定位于细胞质, 小部分定位于细胞核。相对于野生型 CLIC1 的细胞核定位, 缺失突变体的细胞内定位发生明显改变并且与 Sedlin 蛋白没有共定位。Western blot 结果显示 CLIC1(Δ49-51) 能在 HEK 293T 细胞中有效表达; 免疫共沉淀实验结果表明其与 Sedlin 在体内没有相互作用; GST pull-down 结果表明其与 Sedlin 在体外没有相互作用。结论 CLIC1 蛋白的第 49~51 位氨基酸序列 KRR 对 CLIC1 蛋白在细胞内的正确定位发挥重要作用; 其缺失突变后影响了 CLIC1 在细胞内的定位、表达及 CLIC1 与 Sedlin 的相互作用。

关键词 CLIC1 缺失突变体; 免疫荧光; 免疫共沉淀; GST pull-down

中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1690-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.008

氯离子通道蛋白 1 (chloride intracellular channel 1, CLIC1) 是氯离子通道家族中的一员。CLIC 家族中对 CLIC1 的研究较多, 其可以插入膜并形成氯离子通道。CLIC1 的膜结合形式中 N 末端是细胞膜结合位点, C 末端在膜内侧^[1-2]。CLIC1 的 C 末端与谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 具有很高的同源性^[3-4]; N 末端是高度保守区域, 含有硫氧还原蛋白区域, 可折叠成谷氧还原蛋白, 其中

CLIC1 中的 Trp35 (色氨酸残基) 被认为是 CLIC1 蛋白的跨膜结合位点^[5-6]。以往的研究^[7-8]表明 CLIC1 与神经性疾病、恶性肿瘤增殖相关。据报道 CLIC1 的第 49~51 位 3 个氨基酸是跨膜结构域中最重要的序列^[9]。在本课题组前期已经证实了 CLIC1 与 Sedlin (是 SEDL 基因的表达产物) 在哺乳动物细胞内存在相互作用^[10]的基础上, 构建第 49~51 位氨基酸的缺失突变体重组质粒 pcDNA3.1-CLIC1(Δ49-51)-FLAG, 进一步研究 CLIC1(Δ49-51) 与 Sedlin 在 HEK 293T 细胞中是否存在相互作用, 探究这 3 个氨基酸的缺失对其与 Sedlin 相互作用的影响, 为进一步揭示 CLIC1 在肿瘤中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株 载体 pcDNA3.1、pGEX-5X-3, 菌株 TG1、BL21、DH5α 等, 重组质粒 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 和 pcDNA3.1-CLIC1(Δ49-51)-FLAG 均为本实验室保存。COS7 细胞、HEK 293T 细胞等也为本实验室常用细胞。

1.1.2 主要试剂 PrimeSTAR 酶购自日本 TaKaRa 公司; BamH I、Xho I、EcoR I 等限制性内切酶; 质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 蛋白 Marker 购自美国 Thermo 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; LipofectamineTM 2000、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司; FLAG 抗体购自美国 Sigma 公司; 荧光封片胶购自丹麦 DAKO 公司; PVDF 膜购自加拿大 BioBasic 公司; SuperSignal West Pico 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司; 激光共聚焦显微镜由安徽医科大学大型仪器共享平台提供; 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和质粒转染 用 DMEM 高糖培养基 (其中含 5% 的胎牛血清和 100 U/ml 的青霉素和链霉素) 培养 COS7 细胞和 HEK 293T 细胞, 其中培养箱为 37℃、5% CO₂; 当细胞长满单层时传代, PBS

2018-06-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81772908、31702030、81201368); 安徽省高校自然科学基金项目 (编号: KJ2017A203)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系, 合肥 230032

作者简介: 洪翠丽, 女, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn

洗2次,胰酶消化至细胞变圆时,DMEM终止消化;离心后用PBS缓冲液重悬细胞清洗,并以适当密度接种到培养皿中,过夜培养;次日,将质粒(μg):脂质体(μl)按1:2.5的比例转染HEK 293T细胞,用于Western blot实验。而免疫荧光实验按1:1.5[质粒(μg):脂质体(μl)]的比例转染,转染4~6 h换新鲜的培养液(不含双抗)。

1.2.2 免疫荧光爬片 转染24 h后取出培养皿,用放置在4℃冰箱的PBS缓冲液洗3次;−20℃预冷的甲醇固定2 min,70%的乙醇固定5 min;1%脱脂奶粉(用TBST配制)封闭30 min;先用FLAG抗体孵育2 h,随后山羊抗小鼠IgG(TRITC标记的)孵育1 h;DAPI染核3 min后,PBS洗3次,每次5 min;荧光封片胶DAKO封片;次日观察并拍摄激光共聚焦照片。

1.2.3 GST pulldown实验 同上述转染方法,转染48 h后收细胞,弃去培养液,用PBS小心洗1次,弃去PBS,然后在培养皿中加入适量胰酶,胰酶消化1 min左右(显微镜下观察到细胞从壁上脱落下来),低速离心(1 500 r/min、2 min)收集细胞于1.5 ml EP管中,加入适量细胞裂解液(按细胞量的多少具体情况而定)4℃层析柜混旋仪上混悬40 min(收细胞的前1 d下午用预温的PBS清洗GST珠子3次,分别加入GST和GST-Sedlin融合蛋白混旋仪上过夜混悬)把裂解好的细胞裂解液取出40 μl 加入10 μl 的5×SDS混合,煮沸,冰浴,放于−20℃冰箱待电泳。把剩下的细胞裂解液分别加入到上述过夜混悬好的GST和GST-Sedlin融合蛋白(过夜混悬好结合缓冲液洗3次)里,再次混悬4 h。混悬结束后(结合缓冲液再次洗3次)加入等量的2×SDS,煮沸7 min,冰上5 min,下一步Western blot分析。

1.2.4 免疫共沉淀实验 同上述转染方法,转染48 h后收细胞,弃去培养液,用PBS小心洗1次,弃去PBS,然后在培养皿中加入适量胰酶,胰酶消化1 min左右(显微镜下观察到细胞从壁上脱落下来),低速离心(1 500 r/min、2 min)收集细胞于1.5 ml EP管中,加入适量细胞裂解液(按细胞量的多少具体情况而定)4℃层析柜混旋仪上混悬40 min,把裂解好的细胞裂解液分别取出40 μl 加入10 μl 的5×SDS混合,煮沸,冰浴,放于−20℃冰箱待电泳。把剩下的细胞裂解液分别加入适量的FLAG抗体再次混悬4 h,混悬结束后把混悬好的混合液加入到事先清洗好的琼脂糖珠子里(混悬快结束时用预温的PBS清洗琼脂糖珠子3次),再次混悬4 h,混悬结束

后用IP清洗液再次洗结合珠子3次(4℃、3 000 r/min 3 min)弃上清液,加入等量的2×SDS,煮沸7 min,冰上5 min,下一步Western blot分析。

1.2.5 Western blot分析 配制12%的分离胶和5%的浓缩胶,电泳先30 min 70 V后80 min 100 V。三明治装置湿转100 V、75 min。取出PVDF膜,封闭液(TBST+5%脱脂奶粉配制)封闭2 h,FLAG鼠抗(1:500)4℃孵育过夜,FLAG二抗(1:5 000)孵育1.5 h,显影。

1.2.6 核质分离实验 转染48 h后收细胞,胰酶消化2 min,将细胞收集到离心管中并加入5倍体积的CE buffer,同时冰上裂解6 min,间歇震荡裂解液。4℃、3 000 r/min离心5 min,收集上清液。加入相等量的2×SDS上样缓冲液于上清液中,沸水浴7 min,冰上冷却后,−20℃存放备用。用适量的CE buffer(不含NP-40)洗涤沉淀,4℃、3 000 r/min离心5 min,用同样的方法洗涤2~3次以确保除尽沉淀中的胞质蛋白。加入与之相等体积的NE buffer于剩余的沉淀中,冰上裂解11 min,间歇震荡裂解液。4℃、14 000 r/min离心6 min,收集上清液,加入适量5×SDS上样缓冲液,沸水浴7 min,冷却后,−20℃存放备用。

2 结果

2.1 CLIC1 缺失突变体的构建 对质粒pcDNA3.1-CLIC1($\Delta 49-51$)-FLAG进行双酶切(BamH I, Xho I),见图1。CLIC1缺失突变体被切成2条强带,与Marker对比,一条带大约在5 148 bp位置上,另一条位置不超过831 bp,相应的质粒送往通用生物有限公司进行测序,反馈的结果指示质粒构建成功。

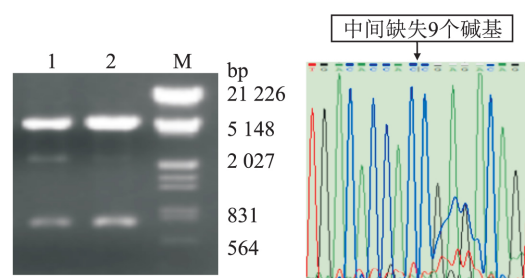


图1 重组质粒酶切鉴定图和测序图

M: DNA Marker; 1: pcDNA3.1-CLIC1-FLAG的酶切鉴定结果; 2: pcDNA3.1-CLIC1($\Delta 49-51$)-FLAG的酶切鉴定结果和测序图

2.2 CLIC1及其缺失突变体CLIC1($\Delta 49-51$)蛋白在HEK 293T细胞中的表达 Western blot结果显示

示,转染了表达质粒 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 和 pcDNA3.1-CLIC1(Δ 49-51)-FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液分别能检测到相应的条带。与预染蛋白 Marker 相比较其符合 CLIC1 蛋白和 CLIC1(Δ 49-51)蛋白的大小。CLIC1 蛋白大小为 27 ku,CLIC1(Δ 49-51)蛋白的分子量略低于 27 ku。见图 2。

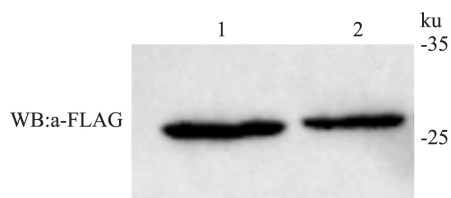


图2 Western blot 检测 CLIC1(Δ 49-51) 和 CLIC1 蛋白在哺乳动物细胞中的表达

1: 转染 pcDNA3.1-CLIC1(Δ 49-51)-FLAG 的细胞裂解液; 2: 转染 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的细胞裂解液

2.3 CLIC1(Δ 49-51) 蛋白在 COS7 细胞中的定位以及其与 Sedlin 蛋白的共定位 CLIC1(Δ 49-51) 蛋白在 COS7 细胞的细胞核和细胞质中均有明显的表达,且在细胞质表达量明显多于细胞核,见图 3A。图 3B 示 CLIC1 和 Sedlin 的共定位。CLIC1(Δ 49-51) 蛋白与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞的细胞核、细胞质中均不存在共定位现象,见图 3C。

2.4 CLIC1(Δ 49-51) 与 Sedlin 蛋白在体外不存在相互作用 分别对 CLIC1、CLIC1(Δ 49-51) 蛋白与

Sedlin 蛋白进行了 GST pulldown 实验,即对照组 [GST + CLIC1-FLAG/GST + CLIC1(Δ 49-51)-FLAG] 和实验组 [GST-Sedlin + CLIC1-FLAG/GST-Sedlin + CLIC1(Δ 49-51)-FLAG],收集谷胱甘肽珠子进行 Western blot 分析,见图 4A、4B。进行免疫印迹(用 FLAG 抗体)后,A 中 1 泳道细胞裂解液组和 3 泳道实验组均出现了明显条带,而 B 中 3 泳道实验组和 2 泳道对照组均未出现任何条带。并且 1、3 泳道的条带位置基本一致,与预染蛋白 Marker 27 ku 的条带横向比对后,其大小分别与 CLIC1(27 ku) 和 CLIC1(Δ 49-51)(27 ku) 的大小相符。同时,又对 A、B 中的 1、2、3 的样品进行 GST 抗体免疫印迹后,见图 4A、4B,对照组(2 泳道)和实验组(3 泳道)分别约在 Marker 的 20~30 ku 和 30~45 ku 之间的位置存在很强的蛋白条带,大小分别与 GST(26 ku) 和 GST-Sedlin(42 ku) 融合蛋白的大小相符。综上所述,CLIC1 蛋白与 Sedlin 蛋白在体外存在相互作用,而 CLIC1(Δ 49-51) 蛋白与 Sedlin 蛋白在体外不存在相互作用。

2.5 CLIC1(Δ 49-51) 与 Sedlin 蛋白不存在相互作用 在上述 GST pulldown 体外实验的基础上,进行了相应的免疫共沉淀实验: CLIC1-FLAG + GFP/CLIC1(Δ 49-51)-FLAG + GFP(对照组),CLIC1-FLAG + GFP-Sedlin/CLIC1(Δ 49-51)-FLAG + GFP-Sedlin(实验组),见图 5A、5B。进行免疫印迹(用

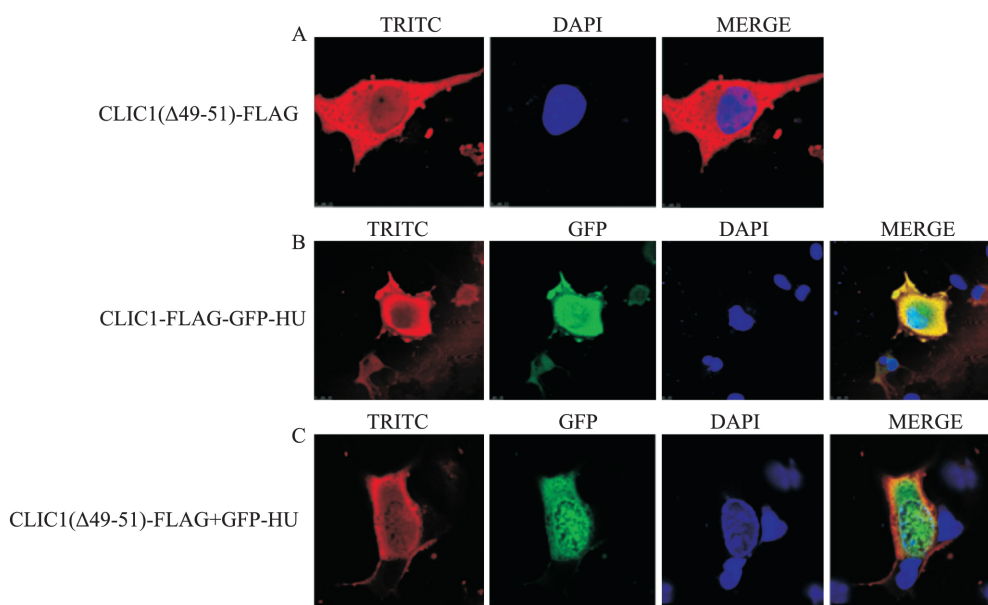


图3 CLIC1(Δ 49-51) 在 COS7 细胞中的定位及其与 Sedlin 蛋白的共定位

TRITC: FLAG 标签蛋白; DAPI: 示细胞核; GFP: GFP 标签蛋白; MERGE: 叠加效果; A: CLIC1(Δ 49-51) 蛋白在 COS7 细胞中的定位; B: CLIC1 与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中的共定位; C: CLIC1(Δ 49-51) 与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中的共定位

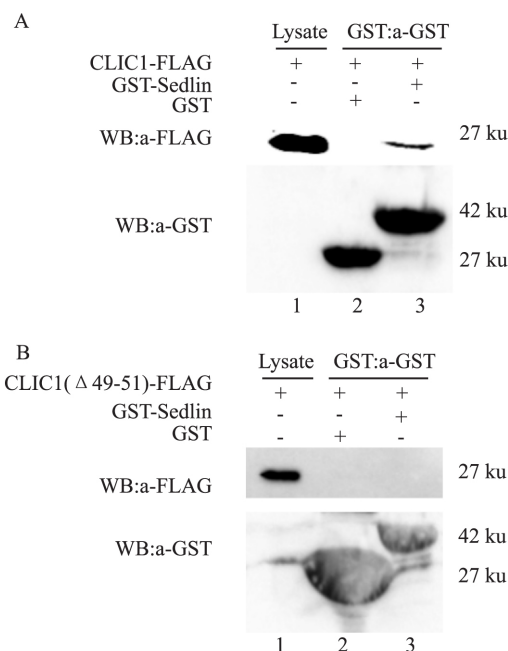


图4 CLIC1、CLIC1(Δ49-51)与Sedlin蛋白的GST pull-down实验

1: 单转 CLIC1-FLAG/CLIC1(Δ49-51)-FLAG 的细胞裂解液; 2: 谷胱甘肽珠子下拉 GST + CLIC1-FLAG/GST + CLIC1(Δ49-51)-FLAG 混合液; 3: 谷胱甘肽珠子下拉 GST-Sedlin + CLIC1/GST-Sedlin + CLIC1(Δ49-51)-FLAG 混合液

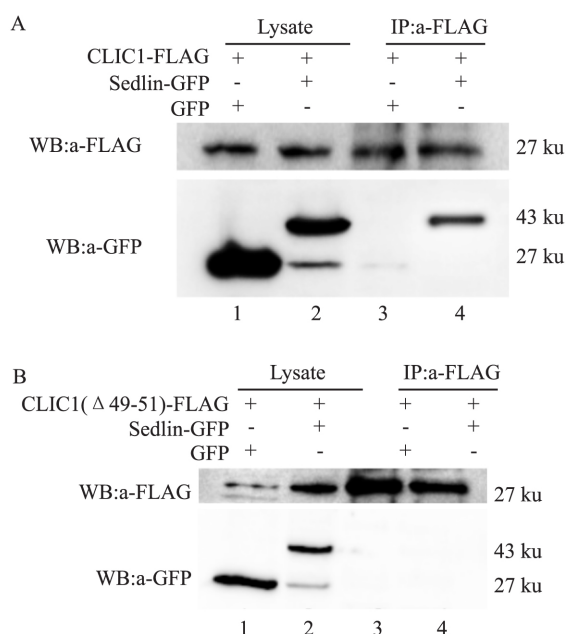


图5 CLIC1、CLIC1(Δ49-51)与Sedlin蛋白的免疫共沉淀实验

1: 共转 CLIC1-FLAG + GFP/CLIC1(Δ49-51)-FLAG + GFP 的细胞裂解液; 2: 共转 CLIC1-FLAG + Sedlin-GFP/CLIC1(Δ49-51)-FLAG + Sedlin-GFP 的细胞裂解液; 3: 用 FLAG 抗体免疫沉淀共转 CLIC1-FLAG + GFP/CLIC1(Δ49-51)-FLAG + GFP 的细胞裂解液; 4: 用 FLAG 抗体免疫沉淀共转 CLIC1-FLAG + GFP-Sedlin/CLIC1(Δ49-51) + Sedlin-GFP 的细胞裂解液

FLAG 抗体)后,对照组1、2泳道和实验组3、4泳道均出现了明显的条带,与预染 Marker 比对,目的条带在25~35 ku之间,1~4号泳道条带的大小与CLIC1及CLIC1(Δ49-51)(27 ku)的蛋白大小相符。免疫印迹(用GFP抗体)后,对照组1、2泳道和A中实验组4泳道均出现了明显条带,与预染 Marker 横向比对,各目的条带的分子量大小正确,而对照组3泳道和B中实验组4泳道未出现任何条带。该结果显示,在HEK 293T细胞中,CLIC1蛋白与Sedlin蛋白存在相互作用,而CLIC1(Δ49-51)蛋白与Sedlin蛋白不存在相互作用。

2.6 CLIC1(Δ49-51)蛋白与CLIC1蛋白在COS7细胞中表达存在差异 在上述实验的基础上,进行了CLIC1、CLIC1(Δ49-51)的核质分离实验,见图6,进行免疫印迹(FLAG抗体)后,1~4泳道均出现了明显的条带,与预染 Marker 比对,目的条带在25~35 ku之间,1~4号泳道条带的大小与CLIC1及CLIC1(Δ49-51)(27 ku)的蛋白大小相符。以Lamin抗体免疫印迹后,2泳道和4泳道均出现了明显条带,横向比对预染 Marker,各目的条带的分子量大小正确。以Tubulin抗体免疫印迹后,1泳道和3泳道均出现了明显条带,横向比对预染 Marker,各目的条带的分子量大小正确。该结果显示,在COS7细胞中,CLIC1缺失第49~51位氨基酸后,其在细胞中的定位也发生明显改变,即CLIC1在细胞质和细胞核中均有表达,表达量基本无差别,而CLIC1(Δ49-51)在细胞质和细胞中也均有表达,但细胞质中的表达量明显高于细胞核。

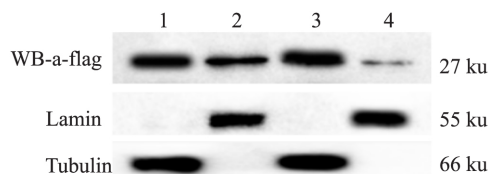


图6 CLIC1、CLIC1(Δ49-51)的核质分离实验

1: 单转 CLIC1-FLAG 分离的 CLIC1 细胞质的裂解液; 2: 单转 CLIC1-FLAG 分离的 CLIC1 细胞核的裂解液; 3: 单转 CLIC1(Δ49-51)-FLAG 分离的 CLIC1(Δ49-51)细胞质的裂解液; 4: 单转 CLIC1(Δ49-51)-FLAG 分离的 CLIC1(Δ49-51)细胞核的裂解液

3 讨论

CLIC1是真核细胞的重要阴离子通道。研究^[9]表明,保守的阳离子基团能增强CLIC1的膜结合能

力。把 CLIC1 跨膜结构域的氨基酸残基第 49 位的赖氨酸、50 位的精氨酸、51 位的精氨酸分别用 3 个连续带负电荷的谷氨酸代替后,即剔除 KRR 基序能够阻碍膜结合,中断静电相互作用。相反,带正电荷的 KRR 基序能够形成带正电的阳离子基团即正电元件,CLIC1 的跨膜结构域绑定和插入该正电元件,能进一步增强 CLIC1 的跨膜和插入。被带负电荷的氨基酸替代后,CLIC1 蛋白的二级、三级、四级结构发生了改变,减少了整体螺旋度,增加 Trp35 的极性,进而会影响其功能。

本研究构建了 CLIC1 第 49~51 位 3 个氨基酸的缺失突变体 CLIC1 ($\Delta 49-51$),初步探索其对 CLIC1 蛋白功能的影响。首先把重组质粒 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 ($\Delta 49-51$)-FLAG 分别转染至 HEK 293T 和 COS7 细胞中,比较 CLIC1 突变体相对于野生型的表达及定位改变;鉴于本课题组已经证实野生型 CLIC1 蛋白与 Sedlin 蛋白存在相互作用^[10],利用 Western blot、免疫荧光、GST pulldown 及免疫共沉淀实验,研究缺失突变体 CLIC1 ($\Delta 49-51$) 是否与 Sedlin 蛋白存在体内、体外的相互作用。结果显示,不同于 CLIC1 与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中存在共定位^[11],CLIC1 ($\Delta 49-51$) 与野生型 CLIC1 在细胞内定位、表达及与 Sedlin 相互作用方面均存在明显的差异。本研究结果显示,缺失突变体 CLIC1 ($\Delta 49-51$) 中带正电荷 KRR 基序的缺失,使其蛋白结构及活性位点的构象发生改变,以及该位点与周围氨基酸化学键的改变,进而也一定程度上改变了蛋白质的功能(图 7)。



图 7 CLIC1 氨基酸残基(23~57)

CLIC1 与肿瘤关系的研究比较多,有相关报道^[12-14]表明 CLIC1 在乳腺癌、胃癌、大肠癌、肝癌中的表达明显上调。CLIC1 通过参与内质网到高尔基体的蛋白运输进而影响其他调节蛋白的表达^[15],参与肿瘤细胞的增殖、分化以及凋亡过程。因此,研究 CLIC1 的功能及关键氨基酸位点,为进一步探寻临床肿瘤标志物或治疗靶点提供重要依据。

参考文献

- [1] Goodchild S C, Angstrom C N, Breit S N, et al. Transmembrane extension and oligomerization of the CLIC1 chloride intracellular channel protein upon membrane interaction [J]. Biochemistry, 2011, 50(50): 10887-97.
- [2] Warton K, Tonini R, Fairlie W D, et al. Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1 [J]. J Biol Chem 2002, 277(29): 26003-11.
- [3] Jones P M, Curmi P M, Valenzuela S M, et al. Computational analysis of the soluble form of the intracellular chloride ion channel protein CLIC1 [J]. Biomed Res Int 2013, 2013: 170586.
- [4] Harrop S J, DeMaere M Z, Fairlie W D, et al. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution [J]. J Biol Chem 2001, 276(48): 44993-5000.
- [5] Peter B, Ngubane N C, Fanucchi S, et al. Membrane mimetics induce helix formation and oligomerization of the chloride intracellular channel protein 1 transmembrane domain [J]. Biochemistry, 2013, 52(16): 2739-49.
- [6] Goodchild S C, Howell M W, Cordina N M, et al. Oxidation promotes insertion of the CLIC1 chloride intracellular channel into the membrane [J]. Eur Biophys J 2009, 39(1): 129-38.
- [7] Novarino G, Fabrizi C, Tonini R, et al. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity [J]. J Neurosci 2004, 24(23): 5322-30.
- [8] Saeki K, Yasugi E, Okuma E, et al. Proteomic analysis on insulin signaling in human hematopoietic cells: identification of CLIC1 and SRP20 as novel downstream effectors of insulin [J]. Am J Physiol Metab 2005, 289(3): E419-28.
- [9] Peter B, Fanucchi S, Dirr H W. A conserved cationic motif enhances membrane binding and insertion of the chloride intracellular channel protein 1 transmembrane domain [J]. Eur Biophys J, 2014, 43(8-9): 405-14.
- [10] Fan L, Yu W, Zhu X. Interaction of Sedlin with chloride intracellular channel proteins [J]. FEBS Lett 2003, 540(1-3): 77-80.
- [11] 沙启飞, 潘林鑫, 耿慧武, 等. CLIC1 及其点突变体与 Sedlin 蛋白的共定位研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(12): 1722-6.
- [12] Edwards J C, Kapadia S. Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase [J]. J Biol Chem 2000, 275(41): 31826-32.
- [13] 宋波, 唐建斌, 王波, 等. 基因芯片筛选小鼠肝癌淋巴道转移相关基因 [J]. 癌症, 2005, 24(7): 774-80.
- [14] Chen C D, Wang C S, Huang Y H, et al. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance [J]. Proteomics 2007, 7(1): 155-67.
- [15] Leanza L, Biasutto L, Managò A, et al. Intracellular ion channels and cancer [J]. Front Physiol 2013, 4: 227.

网络出版时间: 2018-9-25 14:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.009.html>

流行于我国的优势基因型弓形虫株毒力及其棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 蛋白序列差异分析

徐 婷^{1,2}, 王 聪², 罗庆礼², 沈继龙²

摘要 目的 分析流行于我国的优势基因型弓形虫株 (WH3 株和 WH6 株) 毒力差异以及棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 蛋白序列差异, 为研究其致病机制奠定基础。方法 使用弓形虫 WH3、WH6、RH 和 PRU 虫株分别感染 SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明鼠, 观察小鼠存活时间和存活率, 分析毒力强弱。同时 PCR 扩增 4 株弓形虫毒力相关效应分子棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 基因片段, 核苷酸测序后将其转换

为氨基酸序列, 在蛋白水平上比较其序列差异。结果 此 4 株弓形虫株中, WH3 和 RH 株对 BALB/c 小鼠和昆明鼠均有较强的毒性, 两种小鼠分别在感染后 5~7 d 和 9~12 d 均 100% 死亡; 而 WH6 和 PRU 株对 BALB/c 小鼠和昆明鼠的毒性均较弱, 两种小鼠在感染后 45 d 均 100% 存活, 且在脑内检出包囊。棒状体蛋白家族毒力相关分子 ROP5 和 ROP18 的氨基酸序列分析发现, Chinese 1 型虫株 WH3 和 Wh6 与 PRU 型虫株 (II 型虫株) 差异较小, 而与毒力较强的 RH 型虫株 (I 型虫株) 差异较大。结论 我国流行优势基因型弓形虫株的毒力相关分子 ROP5 和 ROP18, 与传统 I 型、II 型弓形虫株存在差异, 为我国弓形虫病的防治提供理论基础。

关键词 弓形虫; 毒力; ROP5 基因; ROP18 基因

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)11-1695-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.009

2018-06-20 接收

基金项目 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (编号: 2010CB530001); 国家自然科学基金 (编号: 81471983); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2017A920)

作者单位: ¹ 安徽卫生健康职业学院护理系, 池州 247099;

² 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室、安徽病原生物学省级实验室、安徽省人畜共患病重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 徐 婷, 女, 讲师, 硕士研究生;

沈继龙, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shen-jilong53@126.com;

罗庆礼, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: luqingli@ahmu.edu.cn

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种全球广泛传播的机会致病性原虫, 人类感染弓形虫主要通过经口食入未煮熟的含包囊 (cyst) 的动物肉类, 食

Interaction between deletion mutant CLIC1 (Δ49-51) and Sedlin

Hong Cuili, Jin Zhenhui, Zhu Liangliang, et al

(Dept of Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To study the expression and localization of CLIC1 (Δ49-51), an intracellular chloride ion channel 1 (CLIC1) deletion mutant, and its effect on the interaction with Sedlin in mammalian cells. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-CLIC1 (Δ49-51)-FLAG was constructed based on the wild type CLIC1 expression plasmid pcDNA3.1-CLIC1-FLAG. Immunofluorescence and nuclear separation experiment were performed to detect the expression and colocalization of CLIC1 (Δ49-51) with Sedlin in COS7 cells; co-immunoprecipitation and GST pulldown experiments in HEK 293T cells were conducted to investigate the interaction of CLIC1 (Δ49-51) with Sedlin *in vivo* and *in vitro*, respectively. **Results** CLIC1 (Δ49-51) mainly localized in the cytoplasm of COS7 cells and much less in the nucleus. Compared with wild-type CLIC1, its intracellular localization changed significantly, and it did not colocalize with Sedlin. The result of Western blot showed that CLIC1 (Δ49-51) could be efficiently expressed in HEK 293T and COS7 cells. Co-immunoprecipitation and GST pulldown assays showed that it had no interaction with Sedlin *in vivo* and *in vitro*, respectively. **Conclusion** KRR motif at position 49-51 of CLIC1 plays an important role in the correct localization of CLIC1 protein to the cell membrane. Its deletion mutation affects the localization and expression of CLIC1 in cells and may further affect its interaction with Sedlin.

Key words CLIC1 deletion mutant; immunofluorescence; co-immunoprecipitation; GST pulldown