

# 牛 *Tollip* 基因编码区克隆及功能分析

王兴平<sup>1,2,3</sup>, 罗仍卓么<sup>1,2,3</sup>

(1. 湖南文理学院 生命科学院, 湖南 常德 415000; 2. 动物学湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南 常德 415000; 3. 环洞庭湖生物资源保育与利用研究中心, 湖南 常德 415000)

**摘要:** 采用 RT-PCR 和测序相结合的方法克隆了牛 *Tollip* 基因, 并采用生物信息学方法分析了该基因及其所编码的蛋白质的结构和功能。结果表明: 获得了 2 619 bp 的 cDNA 序列, 其中第 52~873 bp 为编码区, 编码 273 个氨基酸, 其蛋白质的分子量为 30. 08 kD, 等电点为 5. 30, 含有 C2 结构域(51~151 aa)和 CUE 结构域(228~270 aa), 位于细胞核、细胞质、线粒体和内质网等多种细胞器上。牛 *Tollip* 蛋白与人、小鼠、大鼠、狗和鸡的 *Tollip* 蛋白的同源性分别为: 91%、93%、93%、94% 和 89%, 结构域部分高度保守。鉴于牛 *Tollip* 蛋白与人的高度同源, 推测牛 *Tollip* 在 TLRs 介导的细胞信号转导中起着重要的功能, 也可能是维持免疫细胞处于静止状态的重要分子。

**关键词:** 牛; *Tollip* 基因; 基因克隆; 生物信息学

**中图分类号:** S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)11-0136-04

## Cloning and Functional Analysis of the CDS of Cattle *Tollip* Gene

WANG Xing-ping<sup>1,2,3</sup>, LUOREN Zhuo-ma<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Life Science, Hunan University of Arts and Science, Changde 415000, China;

2. Key Laboratory of Zoology in Hunan Higher Education, Changde 415000, China;

3. Research Center for Conversation & Utilization of Biological Resources in Dongting Lake Basin, Changde 415000, China)

**Abstract:** In this study, the bovine *Tollip* gene was cloned by RT-PCR. Subsequent DNA sequencing showed that the length of the partial sequence is 2 619 bp, including the complete CDS (822 nt in length, from 52 to 873) encoding a protein of 273 aa. The molecular weight and isoelectric point of *Tollip* protein are 30. 08 kD and 5. 30, respectively. *Tollip* protein contained a C2 domain (51—151 aa) and a CUE domain (228—270 aa), located in many cell organs, such as cell nucleus, cytoplasm, mitochondria, and endoplasmic reticulum. The homologies of cattle *Tollip* protein with that of human, mice, rats, dogs and chick were 91%, 93%, 93%, 94% and 89%, respectively. This indicated that *Tollip* may be important for TLRs signal transduction and possibly maintain the immune cells to be stationary in the cattle.

**Key words:** Cattle; *Tollip* gene; Gene cloning; Bio-informatics

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)介导的信号转导通路, 可激活核因子表达, 在先天免疫和适应性免疫防御病原体中起着重要作用, 人和小鼠的

TLRs 信号通路研究结果已经证实: Toll 样蛋白相互作用蛋白(toll interacting protein, *Tollip*)为下游信号分子之一<sup>[1-2]</sup>。在静止细胞中, *Tollip* 和激

收稿日期: 2011-05-07

基金项目: 湖南省科技计划项目(2010NK3043); 湖南省自然科学基金项目(11JJ4020); 湖南省高校创新平台开放基金项目; 湖南文理学院博士启动项目(BSQD1002)

作者简介: 王兴平(1978-), 男, 陕西宝鸡人, 副教授, 博士, 主要从事动物基因表达调控研究。

E-mail: nwsuafwpxp@yahoo. com. cn

酶-IL-1R 相关激酶 (IL-1R-associated kinase, IRAKs) 家族成员形成复合体, 从而阻止核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 活化, 因而 Tollip 被认为是维持免疫细胞处于静止状态, 而且在炎症期和感染期终止 IL-1R/TLR 诱导的细胞信号转导<sup>[3-4]</sup>。鉴于 Tollip 在 TLRs 信号转到通路中的重要作用, 本试验克隆了牛 *Tollip* 基因, 并采用生物信息学方法分析了 *Tollip* 基因及其所编码蛋白的结构和功能, 为研究奶牛乳房炎等受病原体感染所致疾病的分子机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 组织采集及总 RNA 提取

采集牛的乳腺组织, 液氮快速冷冻, 带回实验室。用 Invitrogen(上海)生物公司的 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA, DEPC 处理水溶解, 紫外分光光度计检测纯度和含量, 稀释至 100 ng/ $\mu$ L, -20℃ 保存。

### 1.2 引物设计和 RT-PCR

以人 *Tollip* 基因的 mRNA 序列为信息探针, 采用 BLAST 工具 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 在 GenBank 中检索源性大于 80% 的牛的 ESTs 序列, 构建 ESTs 重叠群, 以重叠群作为设计引物的靶序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计了 2 对 RT-PCR 引物, 其扩增产物有部分重叠, 以便进行序列拼接, 引物序列为: F-1: 5'-GGTCGCGTCTCTGTCAGCT-GTC-3', R-1: 5'-CCGACAGGAAGCGGAAGAG-3'; F-

2: 5'-GGGATGCATGTGGTTTTGGTT-3', R-2: 5'-CTTACAATCGAAGAGGAACCTGG-3'。

用宝生物工程(大连)有限公司的反转录试剂盒, 按照产品说明书, 以总 RNA 模板, 扩增第 1 链 cDNA。然后, 以第 1 链 cDNA 为模板分别用上述 2 对特异性引物, 退火温度分别为 61℃ 和 58.5℃, 进行 RT-PCR, 分别扩增 *Tollip* 基因片段。扩增片段经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化回收后, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

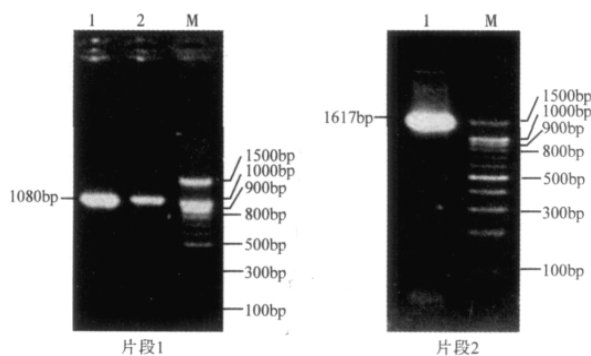
### 1.3 *Tollip* 基因序列的生物信息学分析

将 RT-PCR 所得的基因片段测序后, 用 DNA-Star 6.0 软件包中的 Seqman 程序进行序列拼接, 采用 BLAST 工具 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 和 DNASTar 6.0 软件包进行序列源性比对和 cDNA 序列分析。根据开放阅读框, 推导其编码的氨基酸序列, 采用网上在线工具 (http://www.expasy.org/, http://smart.embl-heidelberg.de/ 和 http://psort.nibb.ac.jp/form2.html) 进行分子量、等电点、结构域等蛋白质结构和特征分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Tollip* 基因 cDNA 的克隆

根据所设计的引物, 采用 LA 聚合酶和高 GC buffer, 进行 RT-PCR, 其结果通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 1)。经回收、克隆测序后, 其扩增的片段大小依次为: 1080 bp 和 1617 bp。



M, DNA Marker; 片段 1: 1-2. F-1/R-1 扩增片段; 片段 2: 1. F-2/R-2 扩增片段

图 1 *Tollip* 基因 RT-PCR 产物电泳图谱

### 2.2 *Tollip* 基因 cDNA 序列分析

采用 DNASTar 6.0 软件将回收、克隆、测序后得到的 2 个 cDNA 序列进行拼接, 得到的 cDNA 长 2619 bp。对开放阅读框架进行的分析结果表明, 该基因编码区为 822 bp (52~873 bp), 编码 273 个氨基酸, 分析其碱基含量, 发现 GC 含量较高, 为 67.05%。

将 cDNA 与牛的基因组 (NW\_001494549.1) 比对后发现, 该基因定位在牛的 29 号染色体上, 且含有 6 个外显子和 5 个内含子。

### 2.3 *Tollip* 基因的 cDNA 所推导的蛋白质特性分析

2.3.1 氨基酸组成 由克隆得到牛 *Tollip* 基因的 cDNA 开放阅读框架, 推导出该基因编码 273 个氨基

酸,分子量为 30.08kD,等电点(pI)为 5.30。对氨基酸组成分析结果显示,Val(缬氨酸)的含量最高,达到 9.52%;其次为 Gln(谷氨酰胺),占 8.42%;极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y)77 个,占 28.21%;疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V)89 个,占 32.60%。

2.3.2 结构域分析 采用网上在线工具(<http://smart.embl-heidelberg.de/>),分析了 Tollip 蛋白的结构域,结果表明,此蛋白包含 C2 结构域(Protein

kinase C conserved region2)(51~151aa)和 CUE 结构域(228~270aa)(图 2)。C2 结构域是在信号转导和跨膜运输的细胞蛋白上发现的,它可能与  $Ca^{2+}$  依赖的磷脂结合和膜的靶向作用有关;CUE 结构域由中度保守的 40 个氨基酸组成,能识别单泛素化,又能识别多泛素化,与蛋白质的降解有关<sup>[5]</sup>,而且该蛋白可能与 IRAKs 家族成员形成复合体,参与 TLRs 介导的信号通路<sup>[4]</sup>。



下划线表示蛋白的 C2 结构域;□表示 CUE 结构域;深色部分“atg”和“tag”分别表示起始密码子和终止密码子

图 2 牛 Tollip 基因及推导的氨基酸序列

2.3.3 Tollip 蛋白的亚细胞定位预测 采用网上在线工具(<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>),预测了牛 Tollip 蛋白的亚细胞定位情况,结果表明,该蛋白位于细胞质的概率为 60.9%,位于线粒体的概率为 17.4%,位于细胞核的概率为 17.4%,位于内质网的概率为 4.3%。

2.3.4 疏水性分析 利用网上在线工具(<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>),分析了 Tollip 蛋白的疏水性,结果表明,第 166~222 氨基酸表现为较强的疏水性。

2.4 Tollip 蛋白同源性分析

采用 NCBI 的 BLAST 工具将 Tollip 蛋白的氨

氨基酸序列与其他物种的 Tollip 蛋白的氨基酸序列比对,结果发现:牛的 Tollip 蛋白与人(NP\_061882)、小鼠(NP\_076253)、大鼠(NP\_001103138)、狗(XP\_540778)和鸡(NP\_001006471)

Tollip 蛋白的同源性分别为 91%、93%、93%、94%和 89%(图 3)。由比对结果可以看出,牛、人和其他物种之间的 Tollip 蛋白变异小,特别是结构域区域高度保守。

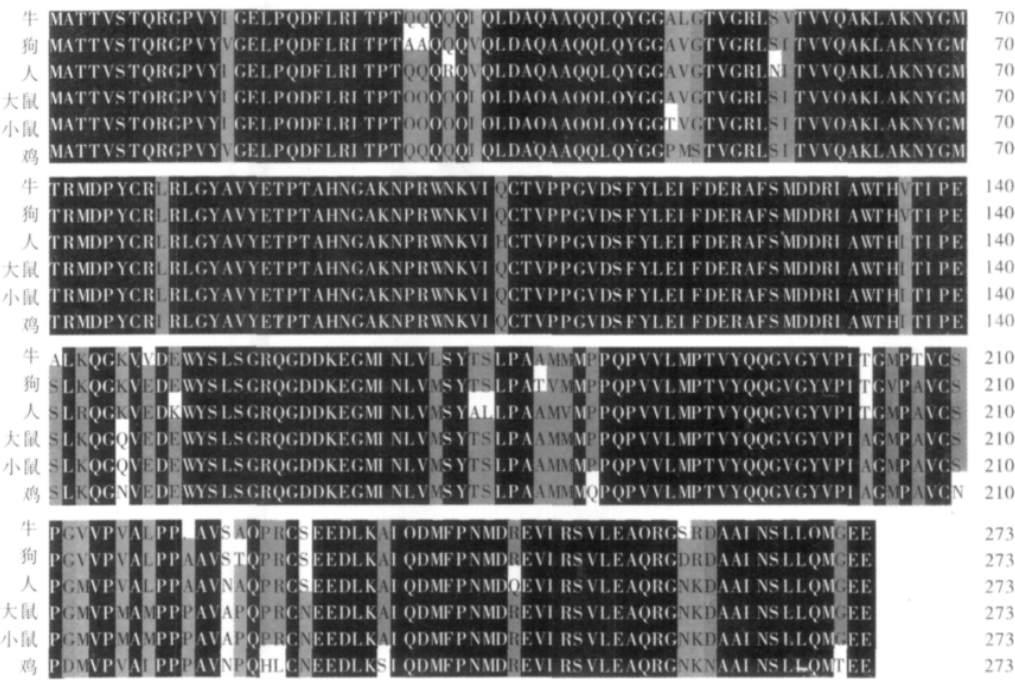


图 3 牛与其他物种 Tollip 蛋白的氨基酸多序列比对结果

3 讨论

人 Tollip 蛋白的相关研究表明,在细胞静止状态下,Tollip 蛋白与 MyD88 下游的 IRAKs 分子结合在一起,一旦 TLRs 与配体结合,招募接头分子,再招募 IRAKs 时,Tollip 就从二聚体上脱落下来,使 IRAKs 完成自动磷酸化,完成信号向下游的传递<sup>[3-4]</sup>。Tollip 也可以抑制 TLRs 激活后的 IRAKs 活性,对 TLRs 介导的细胞活化发挥负调控作用<sup>[3]</sup>。对 Tollip 蛋白的结构域分析结果表明,牛的 Tollip 的结构域与人的 Tollip 结构域相同,都包含 C2 结构域和 CUE 结构域。牛的 Tollip 蛋白与人的 Tollip 蛋白同源比对结果表明,二者的同源性达到 91%,属于高度保守的序列。

鉴于牛的 Tollip 蛋白与人的 Tollip 蛋白具有极高的同源性,结合它在人类免疫细胞信号转导中的重要功能,故推测牛的 Tollip 也具有与人 Tollip 蛋白相同的功能,在 TLRs 介导的细胞信号转导中

起着重要的作用,在维持免疫细胞处于静止状态中发挥重要的作用。

参考文献:

[1] Shizuo A, Kiyoshi T, Tsuneyasu K. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. Nature Immunology, 2001, 2: 675-680.

[2] Akira S. Toll-like receptor signaling [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(40): 38105-38108.

[3] Burns K, Clatworthy J, Martin L, et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2: 346-351.

[4] Zhang G, and Ghosh S. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated signaling by Tollip [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 7059-7065.

[5] Kang R S, Daniels C M, Francis S A, et al. Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding [J]. Cell, 2003, 113 (5): 621-630.