

文章编号: 1671-8836(2009)03-0329-06

虹鳟腺苷酸转移酶基因 2 (*ant2*) cDNA 克隆与蛋白结构分析

王家庆¹, 刘晓慧², 李代宗¹, 宋波澜¹, 王志平¹, 郭 冉¹

(1. 河北农业大学 海洋学院, 河北 秦皇岛 066003; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘 要: 腺苷酸转移酶(ANT)是位于线粒体内膜上参与能量分子传导的转运蛋白, 在细胞凋亡调控网络中发挥重要作用. 以虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)为研究材料, 使用 RT-PCR 和 RACE 法分离和克隆了虹鳟鱼 *ant2* 基因 cDNA 的全长序列(GenBank 登录号: FJ591153). 该序列全长 1 276 bp, 其中 5' 端非翻译区长 66 bp, 3' 端非翻译区长 316 bp, 开放性阅读框长 894 bp, 编码 297 个氨基酸. 该蛋白具有 3 个保守的线粒体穿膜功能结构域和 3 个转膜区. 通过与其他脊椎动物腺苷酸转移酶蛋白序列的比较, 发现该基因具有高度保守性. 氨基酸序列的同源性均在 90% 左右. 同源建模显示其与牛的线粒体 ADP/ATP 载体, chain A 蛋白有相同的孔洞(cavity)结构.

关键词: 虹鳟鱼; 腺苷酸转移酶基因 2; RT-PCR; cDNA 末端快速扩增
中图分类号: S 917 文献标识码: A

0 引言

腺苷酸转移酶(adenine nucleotide translocase, ANT)蛋白家族是真核生物线粒体内膜上最丰富的蛋白家族^[1-3], 约占细胞线粒体总蛋白的 1% ~ 10%^[4]. 其主要功能是催化细胞质 ADP 和线粒体内 ATP 之间的跨膜交换^[2], 它们在进化上高度保守, 是维持细胞内能量平衡的关键蛋白^[5]. 研究发现, ANT 在线粒体凋亡和线粒体内膜穿膜孔道的形成过程中发挥重要作用, ANT 催化生物体大约 1/3 ~ 1/2 的基本电子传递过程. 在被特定的激活物激活后, 可以引起线粒体膜的质子渗漏^[3]. 目前已从真菌、植物、昆虫、小鼠、牛和人等多种生物中克隆到其同源基因, 大多数真核生物具有多个不同的 *ant* 基因异构体(isoform)^[6-10].

在人类中, 发现了 3 个 *ant* 基因异构体, 即 *ant1*, *ant2*, 和 *ant3*, 每个异构体都有不同的染色体定位, 并且有各自的组织特异性表达^[11]. 在小鼠中仅发现了异构体 *ant1* 和 *ant2*, 它们分别和人类 *ant1* 和 *ant2* 基因有较高的同源性, 并且也定位于不同的染色体^[12]. 在河鲢(*T. rubripes*)中发现了 3 个 *ant*

基因异构体, 它们同样具有不同的染色体定位和表达模式^[13].

虹鳟鱼属于鲑形目, 鲑科, 鳟属, 俗称鳟鱼. 该鱼肉质鲜美、生长迅速、食用价值高、饲料利用率高、人工繁殖简便易行, 已成为联合国粮农组织向世界推广的高产、优质四大淡水养殖品种之一. 本研究克隆了虹鳟鱼 *ant2* 基因的 cDNA 全长序列, 并进一步分析了 *ant2* 基因编码蛋白的保守结构与功能, 对其三级结构进行了初步预测, 这将为研究鱼类腺苷酸转移酶介导的细胞质中 ADP 和线粒体内 ATP 间进行跨膜交换的分子机制奠定基础, 同时也为进一步研究鱼类细胞内的能量平衡提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料

虹鳟鱼购自海产品集贸市场, 运回后立即进行脑总 RNA 抽提.

1.2 试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen; AMV 反转录酶、RNaseH、*TdT* 酶、*Taq* 酶、pMD18-T 质粒载体、3' cDNA 末端快速扩增(RACE)试剂盒购自大连宝生

收稿日期: 2008-12-29

基金项目: 河北省科技厅科技计划项目(0624240011)

作者简介: 王家庆(1981-), 男, 讲师, 现从事海洋动物分子生物学及生物信息学研究. E-mail: jiaqing5212@163.com

物工程有限公司(Takara); 凝胶回收试剂盒, 连接酶购自上海生物工程有限公司。

1.3 引物

根据 GenBank 中登录的大西洋鲑鱼、斑马鱼、欧洲比目鱼和河鲀的 *ant2* 基因序列, 通过序列比对找到保守区, P1F: 5'-G TACTTCGCTGGCAACC-TGGCCT-3' 和 P1R: 5'-CATTGGACCAGGCTCC-CTTGAAG-3'。引物 P2: 5'-CACTGTCCGTCGT-CGTATGATG-3' 和 P3: 5'-TCGTATGATGATG-CAGTCTGGC-3' 是根据引物 P1F 和 P1R 克隆基因片段、使用软件 DNASTAR 设计的、用于 3' RACE 的特异引物; 引物 P4: 5'-CCTCATACCGTCAGACCCTGAAC-3' 和 P5: 5'-GTTGTACTCCCTCGCACCCAGCT-3' 及 P6: 5'-CGACATCAGCTCCAGACCGGT-3', 是根据 P1F 和 P1R 引物克隆基因片段设计的、用于 5' RACE 的特异引物。衔接头引物 AP: 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'。所有引物均由 Takara 公司合成。

1.4 总 RNA 的提取

取虹鳟鱼脑组织, 用 Trizol 试剂按说明书抽提总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.5 基因保守片段的克隆

取总 RNA 5 μ g, 以 OligodT-AP 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC(T)16-3' 为引物, 根据 AMV 反转录酶使用说明进行 RT-PCR 反应, 使用引物 P1F 和 P1R 扩增 *ant2* 基因 500 bp 左右的保守序列。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中含 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液, 2 μ mol/L 氯化镁, 200 μ mol/L dNTP, 引物各 0.1 μ mol/L, 0.125 U Taq 酶。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收, 采用 T-A 克隆法将其克隆至 pMD18-T vector 载体, 克隆并测序。根据测序结果设计特异的 3' RACE 和 5' RACE 引物, 扩增 *ant2* 的 3' 和 5' 端序列。

1.6 3' RACE 方法

取总 RNA 5 μ g, 以 oligodT-AP 为引物, 参照 AMV 反转录酶使用说明进行反转录反应, 以 AP(5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3') 和 3' RACE 特异引物 P2 进行 PCR, 反应体系按说明书进行。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。为提高扩增效率及特异性, 稀释上述 PCR 产物 10 倍后取 2 μ L 作为模板, 用引物

AP 和引物 P3 进行第二次扩增, PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收并克隆测序。

1.7 5' RACE 方法

取总 RNA 5 μ g, 以 P4 为引物, 反转录反应同 3' RACE, 然后加 RnaseH 分解 mRNA, 用 DNA 回收试剂盒回收 cDNA, 再用 *TdT* 酶在 cDNA 3' 端加 poly(A), 用试剂盒回收加 poly(A) 尾的 cDNA。以此为模板, 用 P5 及 oligodT-AP 为引物进行 PCR, 反应体系同 3' RACE。PCR 产物稀释 10 倍, 取 2 μ L 为模板, 用 P6 及 AP 引物, 进行 PCR, 反应体系组成同上, PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收并克隆测序。

1.8 序列拼接与生物信息学分析

用 CAP 软件对所得到的 RT-PCR 产物、3' RACE 产物和 5' RACE 产物进行组装。在线工具 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam> 预测蛋白质的基本理化性质与结构功能域; 利用 <http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2> 进行蛋白质序列的跨膜区分析; <http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/> 进行蛋白质的亚细胞定位分析; 并利用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp> 进行蛋白质结构功能域的分析与氨基酸序列同源性比对分析; 利用基于神经网络建模方法 CPHmodels 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>), 对 ANT2 蛋白的空间结构进行分析, RASMOL 软件显示预测的三维结构模型。

2 结果

2.1 *ant2* 基因保守片段的克隆

根据已知鱼类 *ant2* 的保守序列设计引物, RT-PCR 扩增得到约为 500 bp 的条带(图 1A), PCR 产物连接 T 载体转化大肠杆菌, 酶切鉴定后, 选择阳性质粒测序得到 497 bp 片段, 经 NCBI 的 Blastn 比对, 确定 P1F 和 P1R 的扩增产物即为虹鳟鱼 *ant2* 基因 cDNA 的部分片段。

2.2 3' RACE 与 5' RACE 结果

通过 3' RACE, 利用引物 P3 和 AP 扩增得到 500 bp 的一条带(图 1B), 将其转化 T 质粒载体, 双酶切, 将质粒测序, 得到 518 bp 片段。根据 5' RACE 操作流程, 最后获得 500 bp 左右的特异条带(图 1B), 转化 T 载体, 酶切鉴定后, 将阳性质粒测序。测序结果显示片段大小为 506 bp。

2.3 *ant2* 基因序列的拼接与分析

根据 3' RACE 和 5' RACE 的结果, 把 3' 和 5' 末

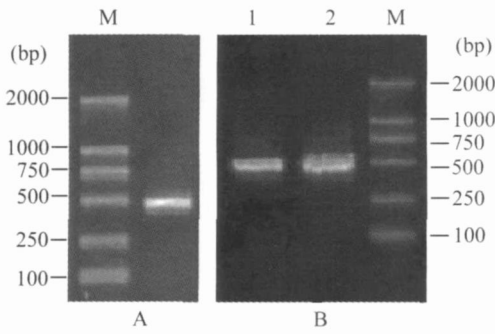


图 1 RT-PCR 与 RACE 产物琼脂糖电泳

A 为引物 P1F 与 P1R 扩增产物, B 为 RACE 的 PCR 扩增产物, M: DNA 分子量标记, DL2000 Marker. 1: 5' RACE 结果, 2: 3' RACE 结果

端序列进行拼接, 得到虹鳟鱼 *ant2* cDNA 全序列 (图 2), 结果显示虹鳟 *ant2* cDNA 全长共 1 276 bp, 其中 5' 端非翻译区 (5' UTR) 长 66 bp, 3' 端非翻译区 (3' UTR) 长 316 bp, 开放阅读框长 894 bp, 编码 297 个氨基酸. 预测的蛋白质分子质量为 32.654×10^3 , 理论等电点(pI)为 9.78. 本文所克隆的基因序列已提交 GenBank 数据库 (登录号: FJ591153).

2.4 虹鳟鱼 *ant2* 基因编码蛋白质 (ANT2) 序列分析

亚细胞定位分析显示 ANT2 蛋白位于线粒体中. 通过 TMHMM-2.0 软件分析得知, 虹鳟 ANT2 蛋白具有 3 个转膜区, 分别位于第 112 ~ 134 位、第 172 ~ 194 位和第 207 ~ 223 位 (图 3), 用 ExPasy 工具对其保守结构功能域进行分析, 发现该蛋白质具有 3 个线粒体穿膜结构域, 分别位于该蛋白序列的第 6 ~ 98 位、第 111 ~ 200 位和第 207 ~ 296 位 (图 2 中的下划线部分). 通过 NCBI 的 BLASTP 程序, 发现 ANT2 蛋白与已知的蛋白质结构功能域数据库中其他物种的腺苷酸转移酶具有相似的结构功能域.

2.5 虹鳟鱼与其他物种 ANT2 蛋白序列同源性分析

经 BLASTP 程序同源性比对, 发现虹鳟 ANT2 蛋白与大西洋鲑、红鳍东方鲀、斑马鱼、大鼠、小鼠、牛、人和家蚕的同源性分别为: 99%, 89%, 88%, 86%, 86%, 86%, 85% 和 78% (图 4).

```

GGTAGGCCATCGCGTGTGTCAGGGCAAGTGTCTTCTGTCTGCAAGTCAATTTATAACAT 60
CGCACAAATGAAATGAGACCGCAGTTTCATTTGCCAAGGATTTCTTGGCTGGTGGCATCTCC 120
M N E T A V S F A K D F L A G G I S 18
GCTGCCATCTCCAAACGGGGTCCGCCATCGAGAGTCAAGCTTCTCTCCAGGTGTC 180
A A I S K T A V A P I E R V K L L L Q V 38
CAACATGCCAGCAAGCAGATCAGCAAGAAATGCAGTACAAGGATATCATAGATTGTGTT 240
Q H A S K Q I S K E M Q Y K G I I D C V 58
ACCCGATTCCAAAGGAGCAGGGCTTCTTGCCTTCGGAGAGGTAACCTGGCTAATGTC 300
T R I P K E Q G F L A F W R G N L A N V 78
ATCAGATACTTCCACCAGGCCCTCAACTTTCTTCAAGACAAGTACAAGAGTGTGTC 360
I R Y F P T Q A L N F A F K D K Y K S V 98
TTCTTGACGGTGTAGACAAGCGAAGCAGTTCGGAGTACTTCGCTGGCAACCTGGCC 420
F L D G V D K R K Q F W R Y F A G N L A 118
TCTGGTGTGCTGCAGGACCTCCCTTTGCTTTGTCTATCTCTTTGATTTCGCCAGA 480
S G G A A G A T S L C F V Y P L D F A R 138
ACCCGCTCGGGAGCTGATGTCGGAAGAGCTGGTCCGAGCGAGTACAACGGTCTGGCAGAT 540
T R L G A D V G K A G A R E Y N G L A D 158
TGCTTGCCGAAGACGTTCAAGTCTGACGGTATGAGGGTCTGTACCAGGGCTTCGCAGTG 600
C L A K T F R S D G M R G L Y Q G F A V 178
TCTGTCCAGGCATCATCTACAGAGCTTCATACTTCGGAATTTATGACACAGCTAAA 660
S V Q G I I I Y R A S Y F G I Y D T A K 198
GGTATGCTGCCAGACTCAAGAACCTTCCATCTTAGTACGCTGGGCAATGCTCAGTCT 720
G M L P D S K N A S I L V S W A I A Q S 218
GTAACCTGCTGTGGCCGCTGACCTCTACCCCTTCGACACTGTCGCTGCTGATGATG 780
V T A V A G L T S Y P F D T V R R R M M 238
ATGCAGTCTGGCCGTAAGGAGCTGATATCATGTACTCTGGTACCATTGACTGCTGGAAG 840
M Q S G R K G A D I M Y S G T I D C W K 258
AAGATCGCTCGTGTATGAGGGTGGCAAGGCTTCTTCAAGGGAGCCTGGTCCAATGTTCTC 900
K I A R D E G G K A F F K G A W S N V L 278
AGAGGCATGGTGGTCCCTTTGTGCTGGTCTGTACGATGAGCTAAAGAAAGTCCCTTTAA 960
R G M G G A F V L V L Y D E L K K V L * 297
ATTATTGTTTITTTAACTCACTGTGAAATTTACATTAATGCTAAATGTAACAACCTTT 1020
CCACTCCTATGGATCCTGCATCTGCTCTAATTTATGTAACAGCTAGTGGTCTGCTACT 1080
AGTTGAGGGTGGCGCTGTAAAGTTGTGCATTTATCTTTTCAAACGTTCCATTTCAATTT 1140
ACCAATGTCAATCTGTATAAGAAACCTCAAATACTAACCCTGCTCCAGTGGGTATGT 1200
TTCTAAACCACCTTGAATTAATTATAATGACAAACCTAAAAAATTTTTTTTTTTTTT 1260
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1276

```

图 2 虹鳟 *ant2* cDNA 及其推导的氨基酸序列

起始密码子(ATG)与终止密码子(TAA)用方框表示; * 表示终止密码子位点; 3' 端加 Poly(A)信号(AATAAA)用斜体加粗表示; mRNA 不稳定模体(ATTTA)用加粗字母表示; 3 段下划线分别表示 3 个线粒体穿膜结构域

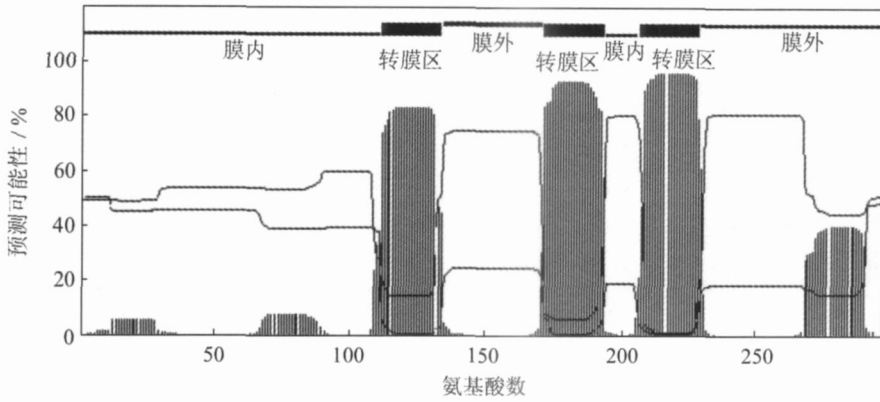


图 3 TMHMM 软件对 ANT2 蛋白序列转膜区预测

```

Onc  MN—ETAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQISKEMQYKGLIDCVTRIPKEQGFAPFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKSY
Sal  MN—ETAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQISKEMQYKGLIDCVTRIPKEQGFAPFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKSY
Rat  NT—DAAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Mus  NT—DAAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Bos  NT—DAAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Hom  NT—DAAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Tak  MN—ETAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Dan  MS—ETAVSF AKDFLAGGISA AISKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQITADKQYKGLIDCVVRIPKEQGVLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQI
Bom  MSNLADPVAF AKDFLAGGISA AVSKTAVAPIERVKLLLQVQHASKQIAADGRYKGLVDFVRIPKEQGLLSFWRGNLANVIRYFPTQALNFAFKDKYKQV
* . . . :*****: ** :*****:*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:
Onc  FLDGVDKRKQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLGADVKGAGAR—EYNGLADCLAKTFRSDGMRGLYQGFVAVSVQGIIIRASYFGIYDTA
Sal  FLDGVDKRKQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLGADVKGAGAR—EYNGLADCLAKTFRSDGMRGLYQGFVAVSVQGIIIRASYFGIYDTA
Rat  FLGGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGKGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Mus  FLGGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGKGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Bos  FLGGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGIRGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Hom  FLGGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGKGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Tak  FLDGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGIRGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Dan  FLDGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGIRGLYQGFVAVSVQGIIIRAAFGIYDTA
Bom  FLGGVDKRTQFWRYFAGNLSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVKGAGAREF KGLGDCLVKIYKSDGIRGLYQGFVAVSVQGIIIRASYFGIYDTA
* . . . :*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:
Onc  KGMLPDSKNASILVSWIAQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGADIMYSGTIDCWKRIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDELKVV
Sal  KGMLPDSKNTSILVSWIAQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGADIMYSGTIDCWKRIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDELKVV
Rat  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Mus  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Bos  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Hom  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Tak  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Dan  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
Bom  KGMLPDPKNTHTIFISWMIQSVTAVAGLTSYFPDTRRRMMMQS GRKGTDIMYTGILDCWRKIARDEGGKAPFKGANSNVLBGMGGAFVVLVLYDEIKKYT
* . . . :*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:

```

图 4 虹鳟鱼与其他物种的 ANT2 蛋白序列同源性比较

图中物种名称缩写、其所代表的物种和 GenBank 登录号如下: 虹鳟(Onc *O. mykiss*, J91153); 大西洋鲑(Sal *S. salar*, ACI66474); 红鳍东方鲀(Tak, *T. rubripes*, BAD86709); 斑马鱼(Dan, *D. rerio*, AAH53162); 大鼠(Rat, *R. norvegicus*, AAH59108); 小鼠(Mus *M. musculus*, NP_035181); 牛(Bos *B. taurus*, AAI02951); 人(Hom, *H. sapiens*, NP_037364); 家蚕(Bom, *B. mori*, AA032817)

2.6 ANT2 蛋白序列的三级结构分析

CHPmodels 软件运用了序表(profile)-序表比对,通过自动搜索 SWISS-PROT 数据库找到最佳匹配序列为牛的线粒体 ADP/ATP 载体, chain A 蛋白, PDB ID: 2C3E。目标蛋白 ANT2 与模板蛋白在建模区同源为 84.6%, CHPmodels 软件对于序列同源性大于 30% 的蛋白质序列已经能够模建出相当精确的结构模型。模建结果显示, ANT2 与牛的线粒体 ADP/ATP 载体, chain A 蛋白具有相同的孔洞结构,孔洞一面朝向线粒体内膜,另一面朝向线粒体基质(图 5)^[14]。

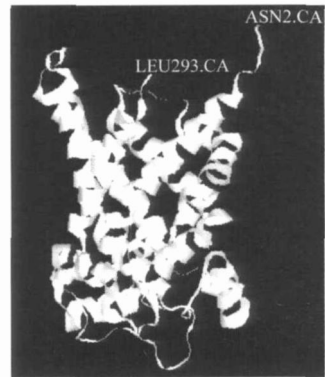


图 5 ANT2 蛋白三级结构

3 讨论

线粒体是真核细胞内能量(主要是 ATP)产生的中心,在细胞存活、信号转导和凋亡等生命活动中扮演着非常重要的角色。ANT 家族蛋白定位于线粒体内膜,是线粒体内膜上最为丰富的蛋白家族^[1,2],在牛心脏线粒体中,ANT 占到了内膜蛋白总量的 10%^[14]。由于 ANT 数量丰富,所以给提取和纯化工作提供了方便,目前从最简单的真核生物酵母到高等生物人类等在内的 ANT 家族蛋白均已被广泛地研究和鉴定^[15,16]。ANT 蛋白主要负责将 ADP 运输到线粒体内部,经过呼吸链的氧化磷酸化过程形成 ATP,再运出线粒体到胞浆。因此,ANT 在细胞新陈代谢中具有重要作用。

本研究采用同源克隆方法^[17],通过 RT-PCR 结合 RACE 方法成功地从虹鳟脑组织中分离到了 *ant2* 基因。由于密码子第 3 位碱基的简并性使 DNA 的编码存在冗余性,一般在 DNA 分子间需要 40% 以上的同源性,才认为它们具有生物学意义上的关联;而蛋白质分子间达到 25% 的同源性就可能提示功能的相似性,所以使用蛋白质序列进行直系同源分子间的分析显然更具有生物学意义^[10,18]。本研究中的虹鳟与其他物种 ANT2 蛋白序列同源性均在 80% 左右,提示 ANT2 在进化过程中是非常保守的,这与其在细胞内所执行的重要功能是相一致的。

本文对 ANT2 蛋白三级结构的同源建模,是基于目标蛋白(虹鳟 ANT2)和序列同源性高达 84.6% 的模板蛋白(牛线粒体 ADP/ATP 载体, chain A)基础之上的,因此预测的三维结构能准确反映虹鳟 ANT2 蛋白的真实结构。整体而言,ANT2 蛋白是由 12 个 alpha 螺旋围绕一周形成的中空孔洞(cavity)构成,孔洞可能形成能量分子传导的转运通道,催化细胞质中的 ADP 和线粒体内 ATP 进行跨膜交换。关于其转移 ADP 与 ATP 的机制,目前已提出两个模型,一个认为 2 个 ANT 单聚体分子的 12 个螺旋一起构成一个单通道,使 ADP 与 ATP 跨膜传送,另一个认为是两个单聚体各使用 6 个螺旋构成一个单通道^[4]。具体哪一个模型与实际情况相一致尚需要更多的实验数据支持。

参考文献:

[1] Riccio P, Aquila H, Klingenberg M. Purification of the Carboxy-Atractylate Binding Protein from Mitochondria[J]. *FEBS Lett*, 1975, **56**: 133-138.

[2] Bof M, Brandolin G, Satre M, *et al.* The Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator from *Dictyostelium Discoideum*, Functional Characterization and DNA Sequencing[J]. *Eur J Biochem*, 1999, **259**(3): 795-800.

[3] Martin D B, Julian L P, Augustine O, *et al.* The Basal Proton Conductance of Mitochondria Depends on Adenine Nucleotide Translocase Content[J]. *Biochem J*, 2005, **392**: 353-362.

[4] Monica S, Cecilia L, Cecilia S. The Evolution of the Adenine Nucleotide Translocase Family[J]. *Gene*, 2004, **333**: 51-59.

[5] Atlante A, Bobba A, Bari L, *et al.* Caspase-Dependent Alteration of the ADP/ATP Translocator Triggers the Mitochondrial Permeability Transition Which Is Not Required for the Low-Potassium-Dependent Apoptosis of Cerebellar Granule Cells[J]. *J Neurochem*, 2006, **97**(4): 1166-1181.

[6] O'Malley K, Pratt P, Robertson J, *et al.* Selection of the Nuclear Gene for the Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator by Genetic Complementation of the *Opl* Mutation in Yeast[J]. *J Biol Chem*, 1982, **257**: 2097-2103.

[7] Lawson J E, Douglas M G. Separate Genes Encode Functionally Equivalent ADP/ATP Carrier Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae* Isolation and Analysis of AAC2[J]. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 14812-14818.

[8] Graham B, Waymire K, Cottrell B, *et al.* A Mouse Model for Mitochondrial Myopathy and Cardiomyopathy Resulting from a Deficiency in the Heart/Skeletal Muscle Isoform of the Adenine Nucleotide Translocator[J]. *Nat Genet*, 1997, **16**: 226-234.

[9] 牛宝龙, 翁宏彪, 何丽华, 等. 棉铃虫腺苷酸转移酶基因的克隆与分析[J]. 遗传, 2008, **30**(1): 81-86.
Niu Baolong, Weng Hongbiao, He Lihua, *et al.* Cloning and Analysis of Adenine Nucleotide Translocase Gene in *Helicoverpa Armigera*[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2008, **30**(1): 81-86(Ch).

[10] 陈大福, 牛宝龙, 翁宏彪, 等. 利用 EST 库资源克隆家蚕腺苷酸转移酶基因[J]. 蚕业科学, 2004, **30**(2): 151-156.
Chen Dafu, Niu Baolong, Weng Hongbiao, *et al.* Cloning of Adenine Nucleotide Translocase Gene from *Bombyx Mori* Based on EST Database[J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, **30**(2): 151-156(Ch).

[11] Lunardi J, Hurko O, Engel W K, *et al.* The Multiple ADP/ATP Translocase Genes Are Differentially Expressed during Human Muscle Development[J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 15267-15270.

[12] Ellison J W, Li X, Francke U, *et al.* Rapid Evolution of

- Human Pseudoautosomal Genes and Their Mouse Homologs [J]. *Mamm Genome*, 1996, 7: 25-30.
- [13] Itoi S, Misaki R, Hirayama M, *et al.* Identification of Three Isoforms for Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator in the Pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Mitochondrion*, 2005, 5(3): 162-172.
- [14] Nury H, Dahout-Gonzalez C, Trézéguet V, *et al.* Structural basis for Lipid-Mediated Interactions between Mitochondrial ADP/ATP Carrier Monomers [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(27): 6031-6036.
- [15] Vignais P V, Block M R, Boulay F, *et al.* *Structure and Function of Cell Membranes* [M]. Boca Raton: CRC Press, 1985; 139-197.
- [16] Klingenberg M. Molecular Aspects of the Adenine Nucleotide Carrier from Mitochondria [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 270: 1-14.
- [17] 孙业盈, 张全启, 齐洁, 等. 半滑舌鳎 DMRT1 基因的克隆与表达分析 [J]. 武汉大学学报(理学版), 2008, 54(2): 221-226.
Sun Yeying, Zhang Quanqi, Qi Jie, *et al.* Cloning and Expression Analysis of DMRT1 Gene in *Cynoglossus semilaevis* [J]. *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, 54(2): 221-226 (Ch).
- [18] 张成岗, 贺福初. 生物信息学方法与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2002; 63-93.
Zhang Chenggang, He Fuchu. *Bioinformatics Methods and Practice* [M]. Beijing: Science Press, 2002; 63-93.

Cloning and Analysis of *ant2* Full-Length cDNA Derived from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

WANG Jiaqing¹, LIU Xiaohui², LI Daizong¹, SONG Bolan¹, WANG Zhiping¹, GUO Ran¹

(1. College of Ocean, Hebei Agriculture University, Qinhuangdao 066003, Hebei, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: The adenine nucleotide translocase (ANT) family of proteins are the most abundant inner membrane proteins of the mitochondrion. They are responsible for the transport of adenine nucleotides across the inner mitochondrial membrane, importing ADP for oxidative phosphorylation and exporting ATP to the cytosol. In this paper, RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods were used for the isolation of the whole cDNA of *ant2* gene (GenBank accession number: FJ591153) from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Sequence analysis reveals a 1 276 bp cDNA containing 66 bp 5'-UTR, 316 bp 3'-UTR and 894 bp ORF encoding 297 amino acids. It also has three conserved domains of mitochondrial carrier proteins and three transmembrane helices. ANT2 shows extensive similarities to the known ADP/ATP translocase polypeptides, and the similarity is about 90% between vertebrates. Homology modeling shows that rainbow trout ANT2 protein has the same cavity structure with the ADP/ATP carrier, chain A of cattle.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); *ant2*; RT-PCR; rapid amplification of cDNA ends (RACE)