

# 柔嫩艾美耳球虫多肽:N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 的基因表达及转录动态分析

刘晓丽<sup>1,2,3</sup>, 龚振兴<sup>2,3</sup>, 马雪婷<sup>2,3</sup>, 曲自刚<sup>2,3</sup>, 韩政岚<sup>2,3</sup>, 刘保红<sup>2,3</sup>,  
袁如意<sup>2,3</sup>, 杨孝朴<sup>1\*</sup>, 蔡建平<sup>2,3\*</sup>

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所/家畜疫病病原生物学国家重点实验室/甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046;  
3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009)

**摘要:** 蛋白质翻译后 O-糖基化修饰普遍存在于真核生物、细菌和古细菌, 多肽:N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 (polypeptide:N-acetylgalactosaminyltransferase 2, ppGalNAc-T2) 是 O-糖基化反应的限速酶。基因组数据分析揭示艾美耳球虫具有 O-糖基化反应途径。为研究柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 蛋白质翻译后糖基化修饰及其关键酶的药效效用, 对 *EtppGalNAc-T2* 基因进行了克隆, 并检测其在 *E. tenella* 不同发育阶段的表达动态。根据 EuPathDB 中所预测 *EtppGalNAc-T2* 基因序列设计引物, 以 RT-PCR 方法扩增获得 *EtppGalNAc-T2* 的 ORF, 插入酶切位点后连接到原核表达载体 pGEX-6p-1 进行诱导表达。提取 *E. tenella* 广东株未孢子化卵囊、孢子化 7 h 卵囊、孢子化卵囊、孢子和第二代裂殖子 5 个发育阶段的总 RNA, 以 qRT-PCR 法检测 *EtppGalNAc-T2* 转录水平的动态变化。结果表明, *EtppGalNAc-T2* 的全长 ORF 为 1 983 bp, 编码 660 个氨基酸, 在 *E. coli* Transetta (DE3) 可溶性表达。qRT-PCR 结果显示, *EtppGalNAc-T2* 转录水平随发育阶段不同而有显著差异, 孢子化阶段表达水平最高、而在孢子化卵囊则几近不能检出。结果为进一步研究 *EtppGalNAc-T2* 的功能提供了试验基础。

**关键词:** 柔嫩艾美耳球虫; ppGalNAc-T2; 基因克隆; 表达差异; qRT-PCR

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)11-2173-08

## Expression Profiling of Polypeptide:N-acetylgalactosaminyltransferase T2 during *Eimeria tenella* Developmental Cycle

LIU Xiao-li<sup>1,2,3</sup>, GONG Zhen-xing<sup>2,3</sup>, MA Xue-ting<sup>2,3</sup>, QU Zi-gang<sup>2,3</sup>, HAN Zheng-lan<sup>2,3</sup>,  
LIU Bao-hong<sup>2,3</sup>, YUAN Ru-yi<sup>2,3</sup>, YANG Xiao-pu<sup>1\*</sup>, CAI Jian-ping<sup>2,3\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;  
2. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;  
3. Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** O-linked glycosylation is a form of protein posttranslational modifications that occurs in the Golgi apparatus of eukaryotes, and archaea as well as bacteria. Polypeptide:N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (ppGalNAc-T2, EC 2.4.1.41) is the first key enzyme in the pathway of

收稿日期: 2017-05-22

基金项目: 国家自然科学基金(31272554); 中国农业科学院农业科技创新工程专项(2014-LVRI-09)

作者简介: 刘晓丽(1988-), 女, 甘肃会宁人, 硕士生, 主要从事球虫病研究, E-mail: liuxlil525@163.com

\* 通信作者: 蔡建平, 研究员, 博导, 主要从事球虫病和猪禽肠道健康研究, E-mail: caijianping@caas.cn; 杨孝朴, 教授, 硕导, 主要从事动物生物化学教学和研究, E-mail: yangxpu@gsau.edu.cn

O-glycan biosynthesis. Whole genome sequencing of *Eimeria* spp has ever revealed that these protozoa possess the pathways for O-glycan synthesis and O-linked glycosylation of proteins. For exploring the profiles of glycosylation in the global proteome of *Eimeria tenella* during developmental cycle, and the potential druggable target of EtpGalNAc-T2, we have cloned and recombinantly expressed the EtpGalNAc-T2 gene according to its predicted coding sequence deposited in EuPathDB, and evaluated its transcriptional profiling in different stages of life cycle using qRT-PCR method. The results showed that the ORF of EtpGalNAc-T2 is 1 983 bp in full length, and can be expressed in *E. coli* Transetta (DE3) with recombinant vector EtpGalNAc-T2-pGEX-6p-1. qRT-PCR results showed that the transcriptions of EtpGalNAc-T2 are significantly varied among different developmental stages, that is, the highest in *E. tenella* sporozoite, and nearly no-detectable transcription in sporulated oocyst. Briefly, these results confirmed O-glycan synthesis process, and may play roles in the regulation of developmental conversion in *E. tenella*.

**Key words:** *Eimeria tenella*; ppGalNAc-T2; gene cloning; expression profile; qRT-PCR

O-糖基化(O-linked glycosylation)修饰是蛋白质翻译后糖基化的主要形式,发生于真核生物的Golgi体,也存在于细菌和古细菌<sup>[1-2]</sup>。其反应过程是在糖基转移酶(glycosyltransferase)家族不同酶催化下,将参与反应的各种糖链,如O-N-乙酰半乳糖胺(O-N-acetylgalactosamine, O-GalNAc)、O-岩藻糖(O-fucose)、O-葡萄糖(O-glucose)、O-N-乙酰葡糖胺(O-N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)和O-甘露糖(O-mannose)等,转移到多肽链的丝、苏、酪、羟脯氨酸等残基上<sup>[3]</sup>,是保证细胞内相关功能蛋白质正确折叠、维持结构稳定性和亲水性、发挥作用(如细胞黏附、配体识别等)所必须的生化过程,也是病原体的重要毒力因子或致病分子,如普遍存在于细菌的O-GlcNAc和锥虫、利什曼原虫等的O-甘露糖化<sup>[1,4]</sup>。在真核生物,O-GalNAc糖基化修饰化最为普遍,是在多肽:N-乙酰半乳糖氨基转移酶(UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetyl-galactosaminyl-transferases, EC 2. 4. 1. 41, ppGalNAc-Ts)的催化下将O-GalNAc转移到蛋白质分子中的丝氨酸或苏氨酸残基上<sup>[5]</sup>。该酶是黏蛋白O-糖基化反应途径的起始酶,在绝大数已研究过的物种都存在2个以上的基因所编码的ppGalNAc-Ts同种型(isoform),如人类有20个,啮齿动物19个,果蝇14个,C. elegans有9个同种型<sup>[6-8]</sup>,这些同种型不仅其表达随发育阶段和组织分布有所差异,且在一级结构和空间构象上也有所差异,但在一级结构上都具有短的跨膜结构域、茎区、Gal/GalNAc结合区(包括GT1和Gal/GalNAc-T2个模体)、

Mn<sup>2+</sup>结合位点以及蓖麻毒蛋白样凝集素结构域的共同特征;各同种型催化GalNAc残基转移的酶动力学特征具有显著差异<sup>[9]</sup>,使O-糖基化修饰成为真核生物中最丰富的糖基化形式,并由此而赋予O-糖基化反应在组织和细胞中巨大的差异调节潜能,成为抗肿瘤药物、抗感染药物、人工合成抗体等的重要靶标分子<sup>[10]</sup>。

艾美耳球虫(*Eimeria* spp.)是兽医学上最重要的病原体之一,可导致禽、兔、猪、牛、羊等养殖业生产的重大经济损失。据估计,球虫病每年可给全球养鸡业造成30亿美元以上的经济损失<sup>[11]</sup>;而在我国,养鸡业因球虫病的经济损失高达60亿~70亿元,仅药物支出一项就高达12亿元以上<sup>[12]</sup>。现今,临床上鸡球虫病仍主要以药物防治为主,但鸡球虫对抗球虫药物的严重抗性及人们对动物性食品药物残留问题的日益关注<sup>[12-14]</sup>,迫切需要发现新的药靶和新型高效药物。ppGalNAc-Ts与其他代谢关键酶一样,作为病原体生存所必需分子及与其宿主同源物在结构或生化特性方面的显著差异而成为理想的药靶分子<sup>[15]</sup>。尽管基因组数据揭示球虫存在糖基化修饰代谢途径,但对其蛋白质糖基化修饰谱及其酶类的研究迄今尚鲜见报道。为研究柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)O-糖基化修饰对球虫发育的表观遗传调控效应及其酶类的药靶效应(druggable target),根据EuPathDB数据库中的预测基因序列,进行了EtpGalNAc-T2的基因克隆表达及其不同发育阶段的相对表达动态分析,为进一步研究球虫的O-GalNAc化修饰建立实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 虫株 *E. tenella* 广东株,本实验室分离、保存。

1.1.2 菌株与质粒 克隆载体 pMD-19 T Vector、*E. coli* Trans5 $\alpha$  和 *E. coli* Transetta (DE3) 购自北京金全生物技术有限公司;表达载体 pGEX-6p-1 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

### 1.2 主要试剂

Premix Ex Taq 聚合酶、SYBR Premix ExTaq<sup>TM</sup> II、EcoR I、BamH I、T4 DNA ligase、PrimerScrip<sup>TM</sup> 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 购自 TaKaRa 公司;E. Z. N. A 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒 I 购自 OMEGA 公司;脱氧胆酸盐和胰酶购自 Sigma 公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 EtpGalNAc-T2 基因的克隆和测序分析

1.3.1 引物设计与合成 检索 EuPathDB 数据库获得 EtpGalNAc-T2 的基因编码序列 (ETH\_00029115), 以在线工具 BLASTx (<http://www.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行比对、确认功能注释后<sup>[16]</sup>, 以此序列为模板, Primer 5.0 设计 PCR 引物 (EtpGalNAc-T2-F: ATg-gCCCCAgggAgAgCC; EtpGalNAc-T2-R: TTA-CATTCTTgCTTTCATgTAg), 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3.2 *E. tenella* 不同发育阶段总 RNA 的提取与基因克隆 纯化的子孢子 (SZ)、第二代裂殖子 (2<sup>nd</sup> MZ)、未孢子化卵囊 (USO)、孢子化 7 h 卵囊 (SO<sub>7h</sub>) 和孢子化卵囊 (SO) 液氮研磨后, 按 TRIzol 试剂盒方法分别提取总 RNA。提取的 *E. tenella* 各阶段 RNA 用 PrimerScrip<sup>TM</sup> 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit 反转录成第一链 cDNA, 与设计合成的上下游引物建立 PCR 反应体系 (Premix Ex Taq 25  $\mu$ L; 模板 1  $\mu$ L; 上下游引物各 1  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L), 按程序“94  $^{\circ}$ C 4 min $\rightarrow$ 35 次下列循环 (94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 30 s) $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 7 min $\rightarrow$ 4  $^{\circ}$ C”进行 PCR 扩增。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, *E. Z. N. A* 胶回收试剂盒回收, 与克隆载体 pMD-19 T 于 16  $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 *E. coli* Trans5 $\alpha$  感受态细胞后挑取阳性克隆测序鉴定。

1.3.3 EtpGalNAc-T2 编码蛋白质的序列分析 PCR 产物的测序结果以 DNASTar 7.0 与预测

基因 ETH\_00029115 进行序列比对; 以 NCBI DELTA-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行所编码蛋白质序列的比对和保守功能结构域分析; 比对结果导入 MEGA 6.0 以 MUSCLE 进行系统进化分析<sup>[17]</sup>, 截取 pp-GalNAc-T 功能结构域的比对结果导入 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 分析顶复门原虫间 ppGalNAc-T2 的氨基酸保守性<sup>[17-18]</sup>。

### 1.4 EtpGalNAc-T2 的重组表达与鉴定

1.4.1 EtpGalNAc-T2 的重组表达 以测序正确的阳性菌液为模板, 用表达引物 (EtpGalNAc-T2-F: CgCggATCCATggCCCCAgggAgAgCC; EtpGalNAc-T2-R: CCggAATTCTTACATTCTTg-CTTTCATgTAg。下划线分别为 BamH I 和 EcoR I 的酶切位点) 扩增目的基因, 同“1.3.2”的程序进行 PCR 扩增。将表达载体 pGEX-6p-1 和带酶切位点的 EtpGalNAc-T2 扩增产物分别以 BamH I、EcoR I 酶切, 16  $^{\circ}$ C 连接过夜构建重组表达质粒 EtpGalNAc-T2-pGEX-6p-1 并转化 *E. coli* Trans5 $\alpha$ , 挑取单菌落于 1 mL LB(AMP<sup>+</sup>) 中 37  $^{\circ}$ C 过夜; 菌液 PCR 鉴定后, 按 1 : 100 接种 100 mL 的 LB (AMP<sup>+</sup>) 37  $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.6~0.8 后加终浓度为 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 IPTG, 取诱导前和诱导后 4 h 菌液各 1 mL, 沸水浴 10 min, SDS-PAGE 电泳检测。离心收集诱导后 4 h 的菌体以 PBS 重悬超声破碎, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。按 ProteinIso GST Resin 纯化柱说明书分离纯化 rEtpGalNAc-T2。

1.4.2 重组表达 EtpGalNAc-T2 的鉴定 ProteinIso GST Resin 柱分离纯化的重组表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 切取蛋白质条带送上海中科新生命生物技术有限公司以 ABI 5800 MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪进行质谱鉴定。

### 1.5 荧光定量 PCR 检测

1.5.1 引物设计 根据 EtpGalNAc-T2 的 cDNA 和内参基因 Et18S rRNA 序列, 设计引物 (Et18S-F: ATCgCagTTggTTCTTTTgg, Et18S-R: CCT-gCTgCCTTCCTTAgATg; EtpGalNAc-T2-F: gCgT-TTCTTTTCAGTggTTTgTg, EtpGalNAc-T2-R: gg-ATgTgCTTgAAGTCgTggTC), 以 NCBI 的 Primer-BLAST 比对分析确定引物序列特异性。

1.5.2 目的基因的检测 首先以 SZ 阶段的 cDNA 为模板分别作 1 $\times$ 、4 $\times$ 、16 $\times$ 、126 $\times$  梯度稀释

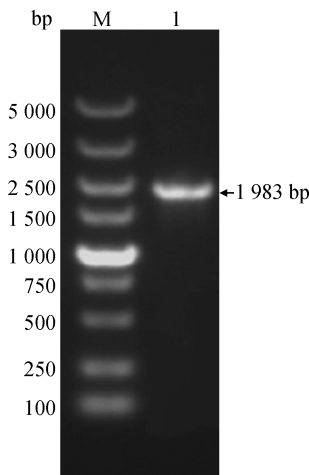
进行反应(各三个重复),以仪器自带 Mx3005p v4.10软件绘制标准曲线。以 18S rRNA 为内参, *E. tenella* USO、SO<sub>7h</sub>、SO、SZ 和 2<sup>nd</sup> MZ 等 5 个阶段虫体的 cDNA 为模板,进行 qPCR 反应检测目的基因转录水平,每组 3 个重复。反应程序:95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。反应结束后用 Mx3005p v4.10 分析扩增曲线和熔解曲线,获取其 *Ct* 值。

1.5.3 数据处理和统计分析 mRNA 相对表达量根据 K. J. Livak 等的 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法<sup>[19]</sup> 计算。ΔΔCt = 试验组 *Ct* 值(*Ct*<sub>目的基因</sub> - *Ct*<sub>内参基因</sub>) - 对照组 *Ct* 值(*Ct*<sub>目的基因</sub> - *Ct*<sub>内参基因</sub>)。

## 2 结果

### 2.1 *EtpGalNAc-T2* 基因的扩增和重组表达及纯化

以 *E. tenella* 子孢子 cDNA 为模板,用 RT-PCR 扩增获得约 2 000 bp 目的基因(图 1),回收后测序结果显示扩增产物长为 1 983 bp。重组表达载体 *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1 阳性菌液经 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 37 °C 诱导表达 4 h 后分别收集菌体超声破碎,产物进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明 *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1 在上清和包涵体中都有表达,重组蛋白质大小约 100 ku(图 2)。以 Proteinso GST Resin 纯化柱结合菌液上清后按最大洗脱量 GSH 浓度为 15 mmol · L<sup>-1</sup> 进行洗脱。纯化后的融合蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示在约 100 ku(图 2)处有明显条带,与预期结果相符。

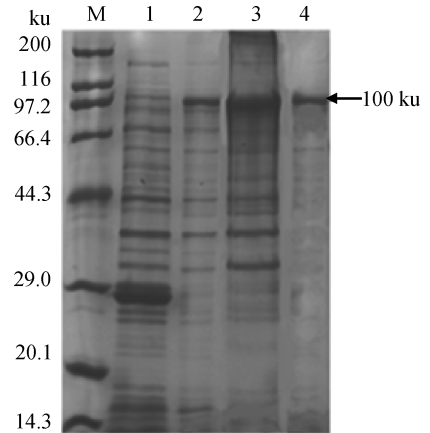


M. DL5000 DNA 相对分子质量标准; 1. *EtpGalNAc-T2* 基因 PCR 产物

M. DNA marker DL5000; 1. PCR product of *EtpGalNAc-T2*

图 1 *EtpGalNAc-T2* 基因 PCR 扩增

Fig. 1 Cloning of gene coding for *EtpGalNAc-T2*



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. pGEX-6p-1 空载体; 2. *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1 重组表达菌超声裂解上清液; 3. *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1 重组表达菌超声裂解沉淀; 4. *EtpGalNAc-T2*-GST 纯化后蛋白样品

M. Protein molecular weight marker; 1. Non-carrier vector pGEX-6p-1; 2. Lysate supernatant of recombinant *E. coli* for expressing *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1; 3. Lysate sediment of recombinant *E. coli* for expressing *EtpGalNAc-T2*-pGEX-6p-1; 4. Purified *EtpGalNAc-T2*-GST with proteinso GST resin

图 2 *EtpGalNAc-T2* 的重组表达结果

Fig. 2 Expressed recombinant *EtpGalNAc-T2* in *E. coli* DE3

MALDI-TOF/TOF 串联质谱仪鉴定结果表明,3 个酶解肽段分别与 UniProt 数据库中根据 *E. tenella* 基因组数据预测的 *EtpGalNAc-T2* (XP\_013229719.1) 的 R<sup>408</sup>-K<sup>426</sup>、K<sup>440</sup>-R<sup>458</sup> 和 R<sup>643</sup>-R<sup>664</sup> 片段完全匹配,三者均位于保守结构域区,匹配率 8.6%,在线比对分析指示重组表达产物为 *EtpGalNAc-T2*(图 3)。

### 2.2 *EtpGalNAc-T2* 蛋白质序列分析

DNASTar 7.0 软件翻译克隆的 *EtpGalNAc-T2*, 表明 *EtpGalNAc-T2* 由 660 AA 组成,相对分子质量为 75.14 ku。DELTA-BLAST 分析显示,其氨基酸顺序与 *E. acervulina*、*T. gondii*、*N. caninum* 的相似性分别为 99%、87% 和 87%,且含有完整的 pp-GalNAc-T 功能结构域。WebLogo 分析揭示 *EtpGalNAc-T2* 功能结构域 pp-GalNAc-T 中具有参与结合 UDP-Gal 的 GT1 模体特征性 DxH 基序,酶活性所必须的 D<sup>232</sup> 和 H<sup>234</sup> 在这些原虫及其他物种间极其保守;同样在催化半乳糖基转移的活性中心 Gal/GalNAc-T 模体中,也包含有进化上高度保守且功能所必须的 D<sup>319</sup> xxxxxWGGENxE<sup>331</sup> 基序。此外活性中心所必须的其他氨基酸如 F<sup>230</sup>、C<sup>235</sup>、Y<sup>318</sup>、G<sup>321</sup>、M<sup>322</sup> 等在艾美耳球虫亚目的原虫间也高度保守(图 4)。

ppGalNAc-T2 (Cover percent 8.6%)

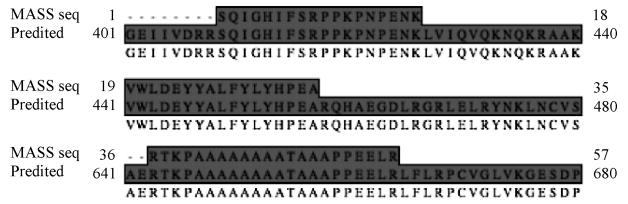
Peptide sequence

R.SQIGHIFSRPPKPNPENK.L

K.VWLDEYYALFYLYHPEAR.Q

K.VWLDEYYALFYLYHPEAR.Q + Dioxidation (W)

R.TKPAAAAAAAAATAAPPEELR.L

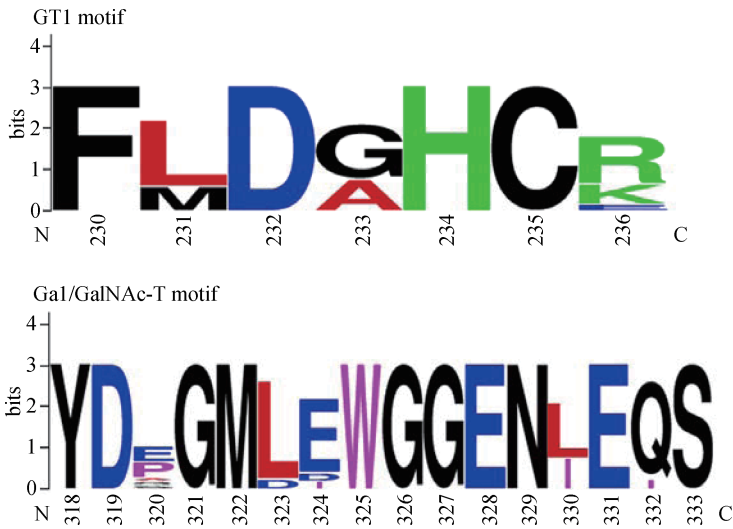


左图. 重组 EtpGalNAc-T2 酶解片段的质谱鉴定结果; 右图. 质谱鉴定肽段的比对结果

Left. MALDI-TOF/TOF sequencing of recombinant EtpGalNAc-T2; Right. Alignment of peptide sequences identified by MALDI-TOF/TOF against the predicted EtpGalNAc-T2 sequence in UniProt database

图 3 EtpGalNAc-T2 重组表达产物的质谱鉴定

Fig. 3 Confirmation of recombinant EtpGalNAc-T2 by MALDI-TOF/TOF analysis



图中氨基酸符号的字体大小代表其保守程度

The conservation of amino acid in the activity sites was displayed by the symbol size of specific amino acid

图 4 球虫亚目原虫 ppGalNAc-T2 功能结构域 AA 保守性分析

Fig. 4 WebLogo analysis of amino acid conservation within the ppGalNAc-T2 functional domain among Suborder Eimeriorina

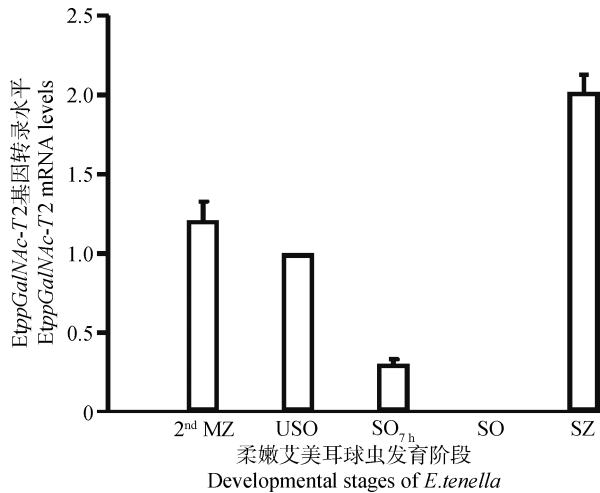
### 2.3 EtpGalNAc-T2 在 *E. tenella* 不同发育阶段的转录动态

qRT-PCR 法分析 *E. tenella* USO、SO<sub>7h</sub>、SO、SZ 和 2<sup>nd</sup> MZ 的 cDNA, 同时检测目的基因和参照基因, 试验数据用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各阶段的 *EtpGalNAc-T2* 基因转录的相对水平, 结果显示, *EtpGalNAc-T2* 基因在子孢子阶段转录水平最高, 总体上侵袭阶段高于卵囊阶段; 在孢子发育阶段则随着孢子化的进行逐渐降低, 至孢子化卵囊几近不能检出 (图 5)。

### 3 讨论

柔嫩艾美耳球虫的生活史复杂, 包括孢子生殖、裂殖生殖和配子生殖三个阶段。蛋白质翻译后的糖基化修饰作为一种重要的表观遗传调控方式, 对某些蛋白质的折叠成熟、分泌、功能发挥具有不可或缺

的作用, 从而影响球虫的入侵、发育和致病过程<sup>[20]</sup>, 但相关研究甚少报道。R. A. Walker 等<sup>[21]</sup> 曾对 *E. tenella* 配子发育和合子形成过程中参与糖链合成和糖基转移过程的 6 种酶 (葡糖胺: 果糖-6-磷酸氨基转移酶, EtGFAT; 葡糖胺-6-磷酸 N-乙酰转移酶, EtGNA; 磷酸乙酰葡糖胺变位酶, EtAGM; UDP-N-葡糖胺焦磷酸酶, EtUAP; UDP-N-葡糖胺 4-差向异构酶, EtUAE; 多肽: N-乙酰葡糖氨基转移酶, EtpGlcNAc-T 和 EtpGalNAc-T) 进行 qRT-PCR 检测, 表明 EtGFAT 尽管在大配子发育早期即有转录, 但 EtGFAT 仅在成熟大配子才可检测到; N-GalNAc 合成的 3 种酶基因 (EtAGM、EtUAP 和 EtUAN) 在大配子发育中也有转录水平上调, 使大配子中 N-GalNAc 水平显著升高, 与此同时 *EtpGalNAc-T* 的转录水平则主要在未孢子化卵囊阶段上调, 表明 O-糖基化在卵囊形成时大配子糖蛋白



2<sup>nd</sup> MZ. 第二代裂殖子; USO. 未孢子化卵囊; SO<sub>7h</sub>. 孢子化 7 h 卵囊; SO. 孢子化卵囊; SZ. 子孢子

2<sup>nd</sup> MZ. Second merozoite; USO. Unsporulated oocyst; SO<sub>7h</sub>. Oocyst sporulating for 7 h; SO. Sporulated oocyst; SZ. Sporozoite

图 5 *E. tenella* 不同发育阶段 *EtpGalNAc-T2* 的 mRNA 转录水平比较

Fig. 5 Comparison of mRNA levels for *EtpGalNAc-T2* among the different developmental stages of *E. tenella*

向卵囊壁的转移中具有重要作用。但作者并未对 *EtpGalNAc-T* 的同种型进行专门检测。从基因组数据分析看, *E. tenella* 具有 5 个 ppGalNAc-T 同种型编码基因, 他们各自在不同发育阶段的差异表达有待深入研究。我们的结果显示 *EtpGalNAc-T2* 基因在 SZ 阶段最高、2<sup>nd</sup> MZ 阶段次之, 随着孢子化的进行, 则逐渐降低到孢子化卵囊时期几近不能检测(图 5)。这提示 O-糖基化修饰随 *E. tenella* 生活史发育过程而表现显著动态改变。孢子化卵囊是代谢相对静息阶段, 而子孢子由于受胰酶、胆汁酸及其肠细胞信号刺激, 代谢极为活跃, 开始大量表达入侵所需要的糖蛋白(如 MIC2、MIC4、RON2 等)。已有报道证明糖缀合物是多种原虫和蠕虫入侵宿主细胞及与宿主相互作用过程所必须的, 如虫体入侵时黏附细胞所需要的凝集素样蛋白<sup>[22]</sup>。笔者实验室对 *E. tenella* 不同发育阶段 N-糖基化的定量修饰组分析表明, 子孢子阶段入侵相关蛋白(RONs、MICs、SAGs)和糖苷合成酶激酶(glycan synthesis kinases, GSKs)家族部分成员(如磷酸激酶 3, EtPK3)等 20 多种蛋白质的 N-糖基化水平显著升高(待发表数据)。但 O-糖基化质谱分析技术尚未成熟, 球虫蛋白质 O-糖基化修饰及其在不同发育阶段的动态变化有待后续研究。

ppGalNAc-Ts 在一级和高级结构上高度保守, 在催化区域都具有 GT1 和 Gal/GalNAc-T 模体<sup>[10, 23-26]</sup>。GT1 中包含 DxH 或者 DxH 基序, 在构象上类似于乳糖阻遏子(lactose repressor)的第一个结构域, 为酶活性所必须, 关键氨基酸突变会导致酶活性几乎完全丧失<sup>[24]</sup>; Gal/GalNAc-T 模体是半乳糖基转移酶活性中心, 系统发生分析表明所有物种间 ppGalNAc-T 及其各种同种型都具有 12 个氨基酸组成的 Dx<sub>xxxxx</sub>WGGENx<sub>E</sub> 特征性基序, 其 C-端的 D 和 N-端 EN<sub>x</sub>N 中的 E 发生突变也将导致酶活性丧失<sup>[27]</sup>。BLAST 和 WebLogo 分析表明, *EtpGalNAc-T2* 也存在 GT1(DxH, D<sup>232</sup>-H<sup>234</sup>)和 Gal/GalNAc-T(D<sup>319</sup> xxxxxWGGENx<sub>E</sub><sup>331</sup>) 功能基序(图 4), 且 230、232、234、235、318、319、321、322、325、326、327、328、329、331、333 位氨基酸在 *T. gondii*、*N. caninum* 和 7 种鸡球虫间及各自的同种型间高度保守, 提示 ppGalNAc-T 催化机制的同一性和 O-糖基化反应在这些原虫的普遍性。尽管笔者的克隆结果与 EuPathDB 的预测序列相比缺失了 ETH\_00029115 中的 382—453 bp 和 787—1 038 bp 2 个片段, 但所缺失片段均具有 GT<sub>xx</sub>-xxAG 真核生物内含子的序列特征, 表明预测基因序列存在错误拼接。笔者实验室近期完成的 *E. tenella* 基因组重测序结果(待发表数据)也与本试验克隆基因序列相一致。

## 4 结 论

本研究克隆表达了柔嫩艾美耳球虫的 *EtpGalNAc-T2* 基因, 序列分析表明其表达产物具有 ppGalNAc-T 家族酶分子的典型功能结构域和保守氨基酸, 其表达水平随 *E. tenella* 发育阶段不同而发生显著变化, 提示 *EtpGalNAc-T2* 结构和功能的保守性及其对球虫发育的潜在调控作用, 为进一步研究其酶动力学及作为新型抗球虫药的靶标有效性提供了试验基础。

## 参考文献 (References):

- [1] SPIRO R G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(4): 43R-56R.
- [2] STEPAN H, PABST M, ALTMANN F, et al. O-glycosylation of snails[J]. *Glycoconj J*, 2012, 29

- (4): 189-198.
- [3] VAN DEN STEEN P, RUDD P M, DWEK R A, et al. Concepts and principles of O-linked glycosylation[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1998, 33(3): 151-208.
- [4] LOMMEL M, STRAHL S. Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans[J]. *Glycobiology*, 2009, 19(8): 816-828.
- [5] TEN HAGEN K G, FRITZ T A, TABAK L A. All in the family: the UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases [J]. *Glycobiology*, 2003, 13(1): 1R-16R.
- [6] BENNETT E P, MANDEL U, CLAUSEN H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(6): 736-756.
- [7] WOJCZYK B S, STWORA-WOJCZYK M M, HAGEN F K, et al. cDNA cloning and expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase T1 from *Toxoplasma gondii*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 131(2): 93-107.
- [8] TAUS C, LUCINI C, SATO T, et al. Expression and characterization of the first snail-derived UDP-N- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase [J]. *Glycoconj J*, 2013, 30(9): 825-833.
- [9] RAMAN J, GUAN Y, PERRINE C L, et al. UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases: completion of the family tree[J]. *Glycobiology*, 2012, 22(6): 768-777.
- [10] JUNG S T, KANG T H, KELTON W, et al. Bypassing glycosylation: engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 858-867.
- [11] DALLOUL R A, LILLEHOJ H S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2006, 5(1): 143-163.
- [12] 范梅华, 徐步. 剖析鸡球虫病的流行特点及防控策略-访广东省农业科学院兽医研究所副所长蔡建平博士[J]. *中国禽业导刊*, 2005, 22(24): 20-23.  
FAN M H, XU B. Probing the epidemiological features of avian coccidiosis and strategies for its control in China [J]. *Guide to Chinese Poultry*, 2005, 22(24): 20-23. (in Chinese)
- [13] CHAPMAN H D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl[J]. *Avian Pathol*, 1997, 26(2): 221-244.
- [14] INNES E A, VERMEULEN A N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora* [J]. *Parasitology*, 2006, 133(S2): S145-S168.
- [15] STWORA-WOJCZYK M M, KISSINGER J C, SPITALNIK S L, et al. O-glycosylation in *Toxoplasma gondii*: identification and analysis of a family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases [J]. *Int J Parasitol*, 2004, 34(3): 309-322.
- [16] MARCHLER-BAUER A, DERBYSHIRE M K, GONZALES N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(D1): D222-D226.
- [17] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [18] CROOKS G E, HON G, CHANDONIA J M, et al. WebLogo: a sequence logo generator [J]. *Genome Res*, 2004, 14(6): 1188-1190.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] SCHNEIDER T D, STEPHENS R M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(20): 6097-6100.
- [21] WALKER R A, SLAPETOVA I, SLAPETA J, et al. The glycosylation pathway of *Eimeria tenella* is upregulated during gametocyte development and may play a role in oocyst wall formation [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9(1): 127-135.
- [22] 瓦尔基. 糖生物学基础[M]. 张树政, 朱正美, 王克夷, 译. 北京: 科学出版社, 2003: 495-507.  
VARKI A. Essentials of glycobiology[M]. ZHANG S Z, ZHU Z M, WANG K Y, Trans. Beijing: Science Press, 2003: 495-507. (in Chinese)
- [23] GASTINEL L N, CABBILLAU C, BOURNE Y. Crystal structures of the bovine  $\beta$ 4-galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose [J]. *EMBO J*, 1999, 18(13): 3546-3557.
- [24] WANDALL H H, IRAZOQUI F, TARP M A, et al. The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for

- GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-*O*-glycosylation[J]. *Glycobiology*, 2007, 17(14): 374-387.
- [25] RAMAN J, FRITZ T A, GERKEN T A, et al. The Catalytic and lectin domains of UDP-GalNAc: polypeptide  $\alpha$ -*N*-acetylgalactosaminyltransferase function in concert to direct glycosylation site selection[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 22942-22951.
- [26] GERKEN T A, REVOREDO L, THOME J J C, et al. The lectin domain of the Polypeptide GalNAc transferase family of glycosyltransferases (ppGalNAc Ts) acts as a switch directing glycopeptide substrate glycosylation in an N- or C-terminal direction, further controlling Mucin type *O*-glycosylation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(27): 19900-19914.
- [27] HAGEN F K, HAZES B, RAFFO R, et al. Structure-function analysis of the UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase: essential residues lie in a predicted active site cleft resembling a lactose repressor fold[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(10): 6797-6803.

(编辑 白永平)