

## 线粒体型蛋白 frataxin 在家蚕微孢子虫中的鉴定与分析

胡军华<sup>1</sup>, 潘国庆<sup>1</sup>, 许金山<sup>2</sup>, 芦琨<sup>1</sup>, 党晓群<sup>1</sup>, 吴正理<sup>1</sup>, 李艳红<sup>1</sup>, 周泽扬<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400716)

(<sup>2</sup>重庆师范大学生命科学学院, 重庆 400047)

**摘要:**【目的】Frataxin 是铁硫簇相关蛋白, 在线粒体代谢中起着重要作用。分析家蚕微孢子虫中该蛋白的结构特征, 系统进化关系以及在孢子体内的转录翻译活性。【方法】基于家蚕微孢子虫全基因组序列, 同源序列搜索获得该基因序列。进行蛋白二级结构比较, 近缘物种共线性特征分析及系统进化树构建。此外构建 pGEX-4T-1-Nbfra 原核重组表达载体, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 进行目的蛋白表达纯化, 以此为抗原免疫小鼠, 制备抗体, 并与家蚕微孢子虫总蛋白进行 Western 免疫杂交。【结果】Nbfra 蛋白缺乏进入线粒体的信号序列, 功能区缺乏部分  $\alpha$ -螺旋; frataxin 基因在不同微孢子虫基因组中的分布具有共线性特征, 表明其在基因组进化中非常保守。系统进化分析显示微孢子虫形成独立进化支, 并且与高等真核生物近缘, 说明微孢子虫在进化地位上比其它原虫更加高等, 支持了微孢子虫是真菌的姊妹枝的进化地位假说。【结论】免疫杂交结果表明 Nbfra 基因在家蚕微孢子虫中能正常表达与翻译。本研究为微孢子的分类地位及线体假说提供了重要的补充依据。

**关键词:** Frataxin; 共线性; 家蚕微孢子虫; 微孢子虫

中图分类号: S884.21 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0608-08

微孢子虫是普遍分布于自然界的细胞内专性寄生原虫, 广泛寄生于脊椎动物和无脊椎动物中, 是经济昆虫、鱼类、兔类、产毛动物、啮齿类及灵长类的常见病原。在微孢子虫发现后的 150 多年的历史中, 已报道的微孢子虫有 150 多个属的 1300 多个种<sup>[1]</sup>。近年来, 新发现有 7 个属的微孢子虫能机会性感染人类<sup>[2]</sup>, 这进一步扩展了人们对微孢子虫寄生宿主范围的认识, 引起学者们对微孢子虫研究的高度重视。关于微孢子的进化地位的研究一直是学者争论的焦点。早期 Vossbrinck 等根据微孢子核糖体缺少真核生物典型的 5.8s RNA, 并结合 SSUrDNA 系统进化分析, 认为微孢子是一类古老的真核生物<sup>[3]</sup>。之后研究者在蝗虫微孢子 (*Antonospora locustae*) 和 *Vairimorpha necatrix* 中找到线粒体型 HSP70 残基, 表明微孢子曾经

拥有线粒体, 进而推定它为较高等的真核生物<sup>[6,7]</sup>。最近几年, 研究者根据越来越多分子生物学与系统进化学的证据, 比如发现肌动蛋白基因、 $\beta$ -微管蛋白以及 RNA 聚合酶 II 大亚基等基因与真菌的接合菌 (*zygomycetes*) 门最为紧密, 提出微孢子更接近真菌, 是由真菌或真菌的类似物分化而来的新观点<sup>[8-12]</sup>。尽管如此, 关于微孢子虫分类地位仍然存在很多争议, 随着兔脑原虫的基因组和蝗虫微孢子虫的部分基因组序列相继被测序和报道<sup>[3,4]</sup>, 大量基于生物信息学方面的深入研究, 主要是从分子系统进化方面和线体 (mitosome) 存在上阐述微孢子虫的进化地位及微孢子虫的能量代谢特征<sup>[5-7]</sup>。

微孢子虫中关于线粒体代谢的相关基因还鲜有报道<sup>[8,9]</sup>。而关于核编码的 Frataxin 在微孢子虫中更是

基金项目: 国家“973 项目”——重大基础研究计划(2005CB121003); 重庆市重大科技攻关(CSTC, 2006AA5019); 国家茧丝绸发展风险基金(M012005-000Y-00070); 高等学校学科创新引智计划(B07045)

\*通讯作者。Tel: +86-23-68251088; Fax: +86-23-68251228; E-mail: zyzhou@cqnu.edu.cn

作者简介: 胡军华(1971-), 女, 新疆石河子人, 在职博士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: dhujh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-07-24; 修回日期: 2008-01-23

未见研究。Frataxin 是铁硫簇中的一个蛋白,由细胞核基因编码然后进入线粒体,并且研究发现了 Frataxin 在铁硫簇结构中具有重要作用,在细菌、植物和哺乳动物中的 frataxin 是高度保守的,基因结构没有明显差异,预示着在这些物种中的 frataxin 起着相似的作用<sup>[10-13]</sup>。在对 FRDA 病人的观察中发现 frataxin 的缺失能够改变铁的代谢,增加氧化的损害,而在线粒体中程序性的铁的积累,可损害铁硫簇的合成<sup>[14,15]</sup>。酵母的 frataxin 基因的突变株在线粒体呼吸上有缺陷,显示出缺乏 mtDNA,线粒体内的铁可以积累到很高的水平<sup>[16]</sup>。而体内和体外研究中也推导出了 IscU 和 frataxin 的直接的联系<sup>[17,18]</sup>。这些结果提供了强有力的证据支持了 frataxin 和铁硫簇蛋白的联系,但是这个过程中 frataxin 独立的角色还不清楚。目前的一些初步研究证据发现,frataxin 作为一种铁的伴侣是必须的,以一种合适的形态运输铁,允许其转入负责铁硫簇蛋白临时装配的 IscU 内<sup>[19]</sup>。另外报道说 frataxin 参与了能量保守和氧化磷酸化<sup>[20]</sup>。而且 Frataxin 缺失导致了线粒体铁流出的损坏,ATP 合成损失和抗氧化防御的缺失<sup>[21,22]</sup>。因此可见,线粒体中的 frataxin 的一些功能已经有所描述,但它的特殊功能还不清楚。Frataxin 的许多内容以哺乳动物和酵母为基础研究的<sup>[12]</sup>,在兔脑原微孢子基因组和蝗虫微孢子 EST 库中发现的相关序列信息之外,来自其他微孢子的 frataxin 的研究未见报道。

家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 是微孢子属的典型种,可专性寄生于经济昆虫家蚕而引发家蚕微孢子病,该病是家蚕的毁灭性病害之一,严重威胁着世界的养蚕业。家蚕微孢子虫基因组大小大约 15.3 Mb,包括 18 条染色体<sup>[23]</sup>,本研究室基于全基因组鸟枪法测序,测得了家蚕微孢子虫的 200000 条全基因组 reads 序列,初步组装获得了全基因组序列图。由于 frataxin 在兔脑原虫微孢子中被认为是“线体”重要组成基因,与铁代谢相关,因此我们推测在 *N.bombycis* 中可能存在相似的细胞器“线体”及其铁代谢途径。由此,我们基于全基因组数据,在家蚕微孢子虫中发现了部分线粒体相关基因,首次报道了一个线粒体型的 frataxin 蛋白基因,命名为 Nbfra (*N.bombycis* frataxin),并从基因特征,基因排列方式和进化关系上对其进行了详细深入的分析。进一步将该基因进行克隆,原核表达和初步免疫组化分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源:**家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 由西南大学蚕学与生物系统生物学研究所分离,保存于中国兽医微生物菌种保藏管理中心 (CVCC),保藏号为 CVCC102059。家蚕微孢子虫全基因组数据由西南大学蚕学与生物系统研究所提供。真菌、原动物和原核生物等物种的 frataxin 序列由 GenBank 数据库获得。

**1.1.2 主要试剂与仪器:**限制酶, T<sub>4</sub>DNA 连接酶和 Taq 酶购于 TAKARA 公司, Western blot 所需二抗(兔抗鼠抗体)购于上海生工生物工程技术有限公司,引物由上海博亚生物公司合成。

### 1.2 家蚕微孢子虫的纯化

取 10<sup>8</sup> 个/mL 家蚕微孢子虫均匀涂布于桑叶上,自然晾干后添食家蚕三龄起蚕。于五龄的第 4~5 天收集丝腺,用匀浆器研磨,加 0.85% 的生理盐水,4 层纱布过滤,收集滤液。将滤液在 4℃ 采用 300 r/min 和 1000 r/min 差速离心,得到粗孢子。粗孢子经 Percoll 30000 r/min 密度梯度,40 min 离心进行精制纯化,收集底层沉淀即为纯化的成熟家蚕微孢子虫。

### 1.3 微孢子基因组 DNA 提取

将纯化好的家蚕微孢子进行体外发芽处理,即浸泡于 0.1 mol/L KOH、27℃ 处理 60 min 后,再用 TEK 缓冲液 (0.17 mol/L KCl, 1 mmol/L Tris-Cl, 10 mmol/L EDTA) 27℃ 处理 60 min 后立即提取基因组 DNA<sup>[24]</sup>。

### 1.4 pGEX-4T-1-Nbfra 表达重组质粒构建

根据家蚕微孢子虫全基因组序列信息分析,发现目的片段 frataxin 的信息。采用引物设计软件 Primer premier 5.0 设计一对引物,上游引物为:5'-CCGGAATTCATGCCTCCCCTCACAAAAC-3',划线部分为 *EcoR* 酶切位点;下游引物为:5'-CCGCTCG-AGTTAAATACTATTTATTTTATTG-3',划线部分为 *Xho* 酶切位点。以家蚕微孢子虫基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。将 PCR 回收产物与 pMD18-T vector kit (TaKaRa) 进行连接、转化后上样 ABI Prism 3100 遗传分析仪进行核酸测序后,将该基因片段与原核表达载体 pGEX-4T-1 连接,转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  表达菌,筛选阳性克隆。

### 1.5 基因的诱导表达与蛋白质的纯化

将重组质粒 pGEX-fra 转化入 *E. coli* BL21 (DE3)。带有重组质粒的表达菌在 5 mL 含 100 mg/L

氨苄青霉素的 LB 液体培养基中进行过夜培养, 然后按 1:100 的体积比转接到 500 mL 上述液体培养基中继续培养至  $OD_{600}=0.5$ , 加入 0.05 mmol/L 的 IPTG 于 37 °C 继续培养 5 h, 4 8000 r/min 离心 15 min, 收集细胞后将细胞在含有 50 mmol/L Tris-HCl 和 50 mmol/L NaCl 的缓冲液 (pH8.0) 中重悬, 然后超声处理以使细胞壁破裂. 将裂解液 10000 r/min 离心 30 min 后弃去上清液, 沉淀经 6 mol/L 尿素溶解后继续过谷胱甘肽亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 蛋白电泳检测。

### 1.6 抗体的制备

约 1 mg 纯化的重组蛋白免疫 2 只普通小鼠, 取部分血清检测所产生抗体的滴度, 3 次加强后, 取全部血清制备和纯化 IgG。

### 1.7 Western blot 分析

将  $1.0 \times 10^9$  家蚕微孢子采用液氮研磨提取家蚕微孢子的总蛋白, 经 15% 的 SDS-PAGE 分离, 然后转移到 PVDF 膜上, 用 1:5000 稀释的重组抗体为一抗, 和 HRP 标记的兔抗鼠抗体作为二抗。用 ECL 显影方法鉴定免疫识别的蛋白质。

### 1.8 序列分析与系统发育分析

*Frataxin* 蛋白的多重序列比对采用 CLUSTALX 进行, 采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/html>) 和 Tmpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 在线软件分别对其结构域进行分析, 并通过 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其信号肽。利用 MEGA3.0 软件, 采用邻接法 (Neighbor-Joining) [25] 构建 *frataxin* 系统进化树, Bootstrap (1000 个重复) 进行评价。

采用本地化 NCBI-blast2.4 软件鉴定家蚕微孢子虫和兔脑原虫基因组之间的同源性基因, 鉴定 *frataxin* 所在的家蚕微孢子 scaffold 序列上的共线性特征。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR、克隆和测序

通过 PCR 克隆和测序, 我们得到了 *frataxin* 基因完整序列, 为 306 bp。将测序的结果与我们从基因组中预测的片段进行比对, 结果显示这个克隆片段与我们的预测完全一致。将其登录到 GenBank 中 (接收号为: EU046589)。

### 2.2 pGEX-fra 表达载体的构建以及重组蛋白的表达和纯化

构建好的重组质粒 pGEX-fra 经 PCR 扩增分析, 并进行 DNA 测序证明, 结果显示, 克隆的 *frataxin* 基因

与预期产物一致。表明重组质粒构建正确。pGEX-fra 表达载体转化至 BL21 菌株中, 在 1 mmol/L IPTG 的诱导下表达重组蛋白质。该重组蛋白质大部分形成包涵体, 经过 6 mol/L 尿素溶解后过谷胱甘肽亲和层析柱纯化, 得到的蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定出一条约 36.5 kDa 条带, 其表观分子量与理论预测的分子量相符, 表明 *frataxin* 蛋白经谷胱甘肽亲和层析柱已纯化 (图 1)。

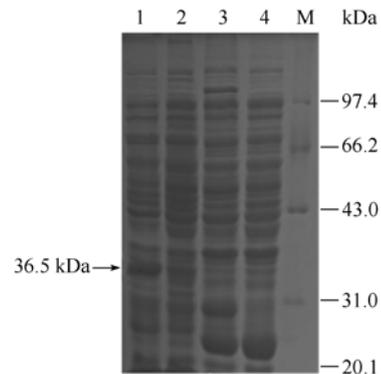


图 1 家蚕微孢子虫 *frataxin* 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of induced recombination protein of *frataxin* of *Nosema bombycis*. 1. pGEX-fra recombinant protein induced by IPTG; 2. pGEX-fra recombinant protein without IPTG; 3. BL21-PGEX induced by IPTG 4. BL21-PGEX without IPTG; M. Protein marker.

### 2.3 Western blot 分析

Western blot 结果显示, 微孢子总蛋白中存在 *frataxin* 蛋白, 和总蛋白杂交只出现了单带, 说明总蛋白中仅存在 *frataxin* 蛋白的一种形式, 不存在蛋白的前体。而且, 条带非常微弱, 说明在微孢子中成熟微孢子中能够表达 *frataxin* 蛋白, 但其表达丰度不高 (图 2)。

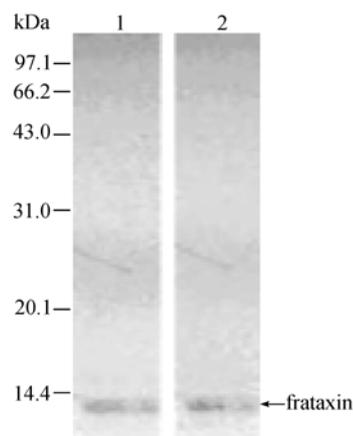


图 2 Western blot 分析家蚕微孢子成熟孢子里的蛋白质  
Fig. 2 Western blot analysis of mature spore protein from *Nosema bombycis*. M. Protein marker; 1. Mature spore protein exposed to an anti-*frataxin* antibody; 2. Spore protein cultured in the sf21 cell line exposed to an anti-*frataxin* antibody.

## 2.4 frataxin 基因序列分析

Nbfra 序列编码 101 个氨基酸残基, 比典型的真核生物和哺乳动物的 frataxin 要短。序列比较发现 frataxin 在家蚕微孢子虫和其他近缘物种之间的同源性比较低, 在蛋白的中部和 C-端区域同源性相对较高。如与 *E.cuniculi*、*C.albicans*、*C.neoformans*、*S.cerevisiae* 蛋白的同源性分别为 32%、32%、为 30% 和 36%。

分别利用在线软件 SignalP、TMPred 及 SMART 对兔脑孢虫、蝗虫微孢子和家蚕微孢子的 frataxin 基因进行信号肽、信号锚定区域、跨膜结构域进行预测。结果显示家蚕微孢子的 frataxin 和兔脑孢虫的一样, 均无任何跨膜结构及信号肽, 仅有一个保守结构域存在, 显示 frataxin 属于 Frataxin2 蛋白家族。

利用 DNASTar 的 protean module 程序分析, 发现家蚕微孢子在 frataxin-like domain 区存在 3 个  $\alpha$  螺旋

和 1 个  $\beta$  折叠, 这 3 个  $\alpha$  螺旋的位置分别位于蛋白质的 N 端, 中间及 C 端, 在二级结构上高度保守,  $\beta$  折叠的位置也非常得保守(图 3), 推测这些结构在行使蛋白的功能上是必须的。与原核生物相比较, 微孢子的 frataxin 缺乏 52~65 位置的  $\alpha$  螺旋, 与酵母相比较, 缺乏 40~45, 61~66 位置的  $\alpha$  螺旋, 推测 61~66 位置的  $\alpha$  螺旋和蛋白在细胞质中的定位有关, 而 40~45 位置的  $\alpha$  螺旋正和蛋白在线粒体中的定位有关。从这点上看出微孢子线粒体蛋白与典型的真核生物的线粒体蛋白不同, 前者缺乏定位信号或者说定位的信息高度减缩, 或者非常不同。利用 PRORT program 或者 MITOPROTII 对 Nbfra 进行预测分析, 没有发现与线粒体定位相关的区段。Nbfra 在 100 的位置上有一个 Arg, 这点与其它植物和酵母中的一样, 也和细菌型 CyaY 类似物一样<sup>[26]</sup>。在人类的 frataxin 中, 在这个位置上发现了一个和铁结合的 His 残基<sup>[27]</sup>。

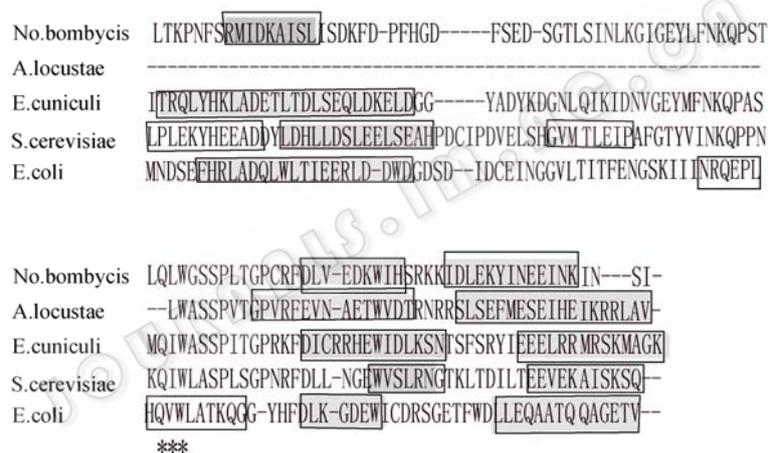


图 3 家蚕微孢子虫、兔脑孢虫、蝗虫微孢子、大肠杆菌及酵母的 frataxin 的氨基酸比较

Fig. 3 Amino acid alignment of frataxin of *N.bombycis*, *E.cuniculi*, *A.locustae*, *E.coli* and *S.cerevisiae*.  $\alpha$ -helices are indicated by squares. Conserved  $\alpha$ -helices known to be essential for transient frataxin are indicated by gray squares. An asterisk (\*) indicated a highly conserved  $\beta$ -conformations among all species.

## 2.5 frataxin 的系统进化分析

为了研究家蚕微孢子虫的系统发生及其进化地位, 将家蚕微孢子虫 frataxin 的氨基酸序列与 GenBank 中的真菌、原核生物和原生动物等物种的 frataxin 的氨基酸序列进行聚类分析。用 Bootstrap (1000 个重复) 进行可靠性检验, NJ, MP, ME 3 种方法均能得到稳定的树形图。系统进化结果显示: 家蚕微孢子虫、兔脑孢虫和蝗虫微孢子具有相同的进

化地位, 聚成一类, 与典型的具有线粒体的高等真核生物进化关系最为接近, 与原生动物次之, 而与原核生物最远(图 4)。这表明微孢子的 frataxin 蛋白与高等真核生物线粒体型的 frataxin 蛋白最为相似, 预示微孢子可能具有线粒体类似的细胞器及其具有线粒体的部分功能。另外, 与原生动物的进化关系次之, 这一结果辅证了微孢子虫是真菌的姊妹枝假说<sup>[28,29]</sup>。

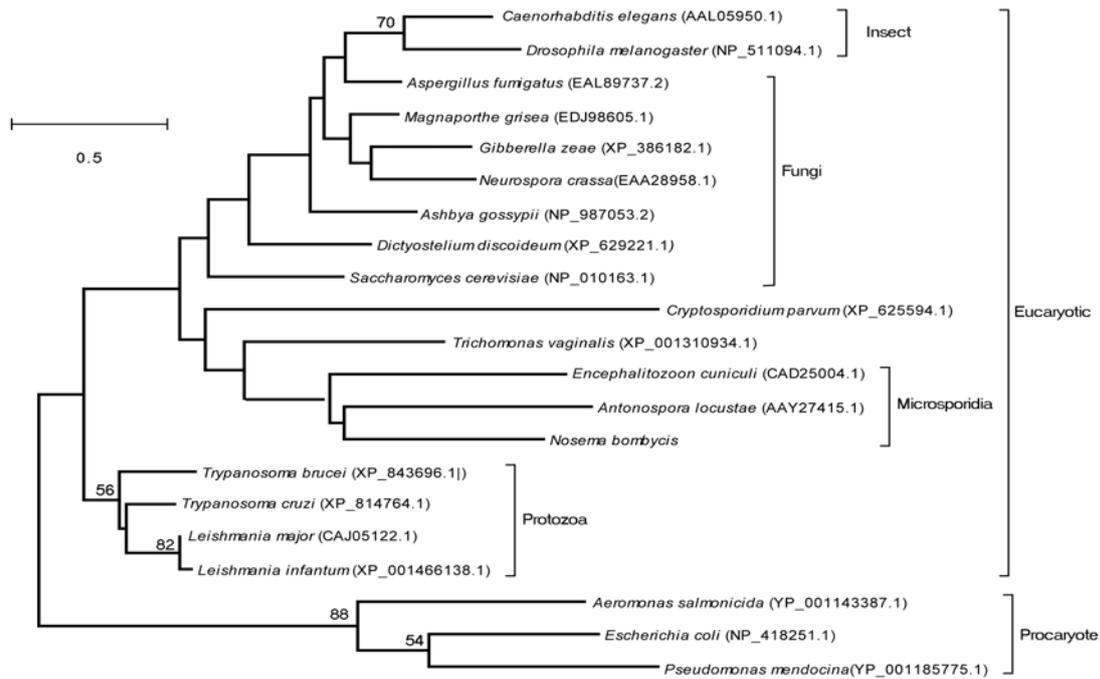


图4 frataxin 氨基酸序列多重序列比对及聚类分析

Fig. 4 The multi-alignment and clustering analysis of frataxin. The tree obtained by the Neighbor-Joining analysis of protein phylogeny using the MEGA3.0 program is shown. The horizontal length of each branch is proportional to the estimated number of substitutions. Bootstrap proportions are attached to the internal branches; The scale bar indicates estimated sequence divergence per unit branch length. The accession numbers for the sequences used are to the right of the species name.

## 2.6 frataxin 基因的共线性分析

根据兔脑孢虫和家蚕微孢子虫的基因组信息,找出 *frataxin* 所在染色体或基因组大片段 scaffold,对其相邻的基因进行同源性比对分析。结果显示这二个物种之间在包含 *frataxin* 的短片段内,基因的排布呈现

高度的共线性关系(图5)。在该区段内基因之间不存在基因的插入、缺失及颠换等基因组重排现象,而在微孢子虫与酵母菌之间并没有发现这种基因的共线性现象。表明 *frataxin* 在微孢子里基因组里排列位置比较稳定,其基因组进化保守。



图5 家蚕微孢子和兔脑孢虫 *frataxin* 基因的共线性分布比较

Fig. 5 Comparison of arrangement of Frataxin and its flanking genes between *N. bombycis* and *E. cuniculi*.

## 3 讨论

本文以家蚕微孢子虫为材料,充分利用家蚕微孢子虫的部分基因组信息,通过比较分析,首次报道了在家蚕微孢子虫中与铁运输过程相关的 *frataxin* 基因信息,并进行了鉴定与分析。这个推定来自于家蚕微孢子虫的 *frataxin* 类似物有一个编码 101 个氨基酸的 306 bp 的 ORF。

通过与兔脑孢虫的相关蛋白的比较分析,家蚕微

孢子虫的 *frataxin* 与其具有一定的同源性。家蚕微孢子虫和兔脑孢虫的 *frataxin* 蛋白的氨基酸长度一样,与典型的模式生物酵母菌的 *frataxin* 蛋白不一样,其 N 端缺乏一个线粒体靶信号。从结构域上分析,它们都具有一个完整的功能结构域。依据序列相似性, *frataxin* 属于 Frataxin2 蛋白质家族。此家族中蛋白的 C-端与 Friedreich's ataxia 中突变的 Frataxin 蛋白的一个保守区相连。此保守区在细菌蛋白的一个家族中发现,其功能还不清楚。家蚕微孢子与兔脑孢虫、蝗

虫微孢子一样,其3个 $\alpha$ 螺旋和1个 $\beta$ 折叠的位点在其它典型的真核生物及原核生物是相同的,说明这3个 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠在行使蛋白的功能上是必须的。与原核生物和酵母相比较,微孢子的 frataxin 缺乏部分 $\alpha$ 螺旋,或许这些 $\alpha$ 螺旋正和此蛋白在线粒体蛋白的定位有关。从这点上看出微孢子线粒体蛋白与典型的真核生物的线粒体蛋白不同,前者缺乏定位信号或者说定位的信息高度减缩,或者非常不同。已发现人和细菌 frataxin 的三维结构中有一种新型折叠,其表面带高度保守的负电荷,而这类似于阴离子表面,后者参与了铁蛋白的铁贮藏机制<sup>[30]</sup>。

利用 frataxin 的蛋白序列进行系统进化分析,发现家蚕微孢子虫和兔脑原虫具有相同的进化地位,聚成一大类,与传统的高等真核生物位于同一分枝。这一结果与微孢子虫是真菌的姊妹枝假说一致。这可能是由于微孢子虫基因组的特异性引起的,即微孢子虫基因的快速分化与基因组的稳定性之间的矛盾<sup>[31]</sup>,且不同的基因的进化速率不同。微孢子虫的进化地位一直存在争议,要对其下一个合理的结论还有待更多更深入的研究。微孢子的 frataxin 基因聚合形成一类,表明它们起源于共同祖先。有研究认为同一时期的 a-proteobacteria 和线粒体起源于同一个祖先<sup>[32]</sup>,具有共同起源的核编码的微孢子 frataxin 基因可能同样起源于一个古代的 a-proteobacterial 基因。

frataxin 基因的共线性分析发现,两种微孢子虫 *E.cuniculi* 和 *N.bombycis* 在短片段内基因的分布及排列上具有高度的保守性,不存在基因的插入、缺失或颠换。说明 frataxin 在基因组上的进化程度比较保守,相对而言,frataxin 基因的变异程度则比较保守。高度分化的几个物种中具有大量的基因共线性关系,这可能与微孢子虫基因组的高度压缩和紧密有关<sup>[31]</sup>。同时也说明了微孢子虫的基因进化速度与基因组的进化速度不一致,微孢子虫的基因组并不按照分子钟形式在进化。由于兔脑原虫基因组中没有发现转座子的存在,有人认为这种基因的共线性是因为基因组缺乏重排机制引起的<sup>[31]</sup>,但在家蚕微孢子虫的基因组中发现了大量反转座子的存在<sup>[33]</sup>,显然与该理论存在一定的矛盾。微孢子虫与模式生物酵母菌之间没有发现 frataxin 基因的共线性关系,由于家蚕微孢子虫基因组数据片段较短,我们还不能从整个基因组水平来考查微孢子虫基因的共线性现象,这种基因的共线性是由于微孢子虫物种的特异性引起的还是因为其他的

原因还有待进一步的研究。

Western blot 结果显示,成熟微孢子总蛋白中存在 frataxin 蛋白,但其表达丰度不高。总蛋白中仅存在 frataxin 蛋白的一种形式,不存在蛋白的前体,因而推测此蛋白缺乏细胞质蛋白进入线粒体时蛋白质的剪切过程,可能预示着家蚕微孢子线粒体的导向信号和典型真核生物的不同,可能存在不同的通道或者不一样的剪切过程。

因为是唯一的体外阶段,在微孢子的生活史中孢子是非常重要的阶段,负责抵御外界不良环境和侵染新的宿主。孢子通常具有传染性。许多孢子在外界环境中保存一年还具有活性。条件适宜时,孢子能被激活,在宿主细胞中感染非常快。因此孢子内必须包含所有必需的组分,在休眠的孢子遇到宿主时才能够快速被激活。然而,在复杂的孢子里面识别线粒体是非常困难的。Frataxin 蛋白在孢子中的存在说明至少这个蛋白是线粒体生化途径的一部分,在孢子中是存在的,具有潜在的活性,或许与孢子生存和活力需要的铁代谢及能量有关。

## 参 考 文 献

- [1] Wittner M. Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In: Wittner M, Weiss LM, editors. The microsporidia and microsporidiosis. Washington: ASM Press, 1999: 1-6.
- [2] Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, et al. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7: 426-461.
- [3] Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 2001, 414: 450-453.
- [4] Claudio HS, Naomi MF, Joyce SL, et al. Genome Compaction and Stability in Microsporidian Intracellular Parasites. *Current Biology*, 2004, 14: 891-896.
- [5] Keeling PJ. Congruent evidence from  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet*, 2003; 38: 298-309.
- [6] Germot A, Philippe H, Guyader HL. Evidence for loss of mitochondria in microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol*, 1997, 87: 159-168.
- [7] Hirt RP, Healy B, Vossbrinch CR, et al. A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr Biol*, 1997, 7: 995-998.

- [8] Bryony APW, Patrick JK. Microsporidian mitochondrial proteins: expression in *Antonospora locustae* spores and identification of genes coding for two further proteins. *J Eukaryot Microbiol*, 2005, 52(3): 271–276
- [9] Lena Burri, Bryony APW, Dejan Bursac, *et al.* Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *PNAS*, 2006, 103(43): 15916–15920.
- [10] Gibson J, Muhlenhoff U, Lill R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO*, 1996, Rep.9, 906–911.
- [11] Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, *et al.* Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, 1997, 6: 1771–1780.
- [12] Koutnikova H, Campuzano V, Foury F, *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicated a mitochondrial function for frataxin. *Nat Genet*, 1997, 16: 345–351.
- [13] Huynen Martijn A, Snel Berend, Bork Peer *et al.* The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Human Molecular Genetics*, 2001 10(21): 2463–2468.
- [14] Cossee M, Puccio H, Ganamuller A, *et al.* Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 1219–1226.
- [15] Foury F. Low iron concentration and sconiase deficiency in a yeast frataxin homologue deficient strain. *FEBS Lett*, 1999, 6: 281–284.
- [16] Babcock M, de Silva D, Oaks R, *et al.* Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, 1997, 276: 1709–1712.
- [17] Yoon T, Cowan JA. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISCU-type proteins. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 6078–6084.
- [18] Ramazzotti A, Vanmansart V, Foury F. Mitochondrial functional interactions between frataxin and isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2004, 557: 215–220.
- [19] Agar JN, Krebs C, Frazzon J, *et al.* IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry*, 2000, 39, 7856–7862.
- [20] Ristow M, Pfister M F, Yee A J, *et al.* Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, USA 97, 12239–12243.
- [21] Lill R and Kispal G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25, 352–356
- [22] Jauslin ML, Meier T, Smith RA, Murphy MP. Mitochondria-targeted antioxidants protect Friedreich Ataxia fibroblasts from endogenous oxidative stress more effectively than untargeted antioxidants. *FASEB J*, 2003 Oct; 17 (13): 1972–1974.
- [23] Kawakami Y, Inoue T, Ito K, *et al.* Comparison of chromosomal DNA from four microsporidia pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology*, 1994, 29: 120–123.
- [24] 潘敏慧, 万永继, 鲁成. 不同种类微孢子虫 DNA 制备方法的研究. 西南农业大学学报(*Journal of Southwest Agricultural University*). 2001, 23: 111–113.
- [25] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150–163.
- [26] Cho S, Lee M, Yang J, *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* YfhJ protein, a member of the ISC machinery involved in assembly of iron-sulfur clusters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 8932–8937.
- [27] Dhe-Paganon S, Shigeta R, Chi Y, *et al.* Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2000, 275: 30753–30756.
- [28] Peyretailade E, Broussolle V, Peyret P, *et al.* Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary origin. *Mol Biol Evol* 1998, 15: 683–689.
- [29] Hirt RP, Logsdon Jr JM, Healy B, *et al.* Microsporidia are related to fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase and other proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 580–585.
- [30] Margie Nair, Salvatore Adinolfi, Chiara Pastore, *et al.* Solution structure of the bacterial frataxin ortholog, cyay: Mapping the iron binding sites. *Structure*, 2004, 12: 2037–2048.
- [31] Slamovits C H, Fast N M, Law J S, *et al.* Genome Compaction and stability in Microsporidian Intracellular parasites. *Current Biology*, 2004, 14, 891–896
- [32] Andersson S G E, Zomorodipour A, Andersson J O, *et al.* The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 1998, 396: 133–140.
- [33] Xu J, Pan G, Fan L, *et al.* The varying microsporidian genome: existence of LTR retrotransposon in domesticated silkworm parasite *Nosema bombycis*. *Int J Parasitol*, 2006, 36: 1049–1056.

## Characterization and analysis of mitochondrial protein frataxin in *Nosema bombycis*

Junhua Hu<sup>1</sup>, Guoqing Pan<sup>1</sup>, Jingshan Xu<sup>2</sup>, Kun Lu<sup>1</sup>, Xiaoqun Dang<sup>1</sup>,  
Zhengli Wu<sup>1</sup>, Yanhong Li<sup>1</sup>, Zeyang Zhou<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Sericulture of Agricultural Ministry, Southwest University, Chongqing 400716, China)

(<sup>2</sup> College of Bioscience of Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

**Abstract:** [Aim] Frataxin protein is a component of Fe-S clusters and closely related to metabolism of mitochondria. We identified an integrity mitochondrial protein frataxin gene (Nbfra), analyzed its phylogenetic relationship, and confirmed the transcriptase activity of Nbfra in *N. bombycis*. [Methods] We analyzed the sequence of the second structure, gene location in genome and construction of NJ phylogenetic tree through various bioinformatics software. We constructed recombinant vector pGEX-4T-1-Nbfra, expressed the 36.5kDa recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3), and then used the protein as antigen to produce its polyanitbody in mice. [Results] Nbfra was lack of targeting signal into mitochondria and part of alpha helices in functional domain, and had a synteny character between *N. bombycis* and *E. cuniculi*. Phylogenetic trees of Nbfra suggested that the evolutionary position of microsporidia was closely related to that of higher eukaryote, rather than that of other protozoa. The result of western blot suggested the expression and transcription of Nbfra gene in *N. bombycis*. [Conclusions] Our results offered the new evidence to analysis the conservation of Nbfra and evolutionary position of *N. bombycis*, and would support the hypothesis of mitosome in microsporidia.

**Keywords:** frataxin; synteny; *Nosema bombycis*; microsporidia

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB121003), the Chongqing Key Scientific and Technological Break-through Project (CSTC, 2006AA5019), the State Development Fund at Risk of Callus Silk (M012005-000Y-00070) and the Fund for Foreign Scholars in University Research and Teaching Programs (B07045)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68251088; Fax: +86-23-68251228; E-mail: zyzhou@cqu.edu.cn

Received: 24 July 2007/ Revised: 23 January 2008

### 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介(2008-03)

现代微生物学(第二版)

刘志恒 主编; 978-7-03-020047-1; ¥99.00; 2008年3月17日出版

本书作为研究生教科书,在内容和结构上仍然采用基础科学与应用科学相结合,以基础科学为主的编排处理。结合本书出版五年来被教学、科研及相关领域的师生、学者使用中的意见,为适应微生物学研究领域的快速发展,特别是分子生物学技术在微生物学中的广泛应用所引起的许多领域的突破、新的生长点的形成,及时充分反映微生物学新的理论和技术成果,对该书进行内容的更新和调整。内容涵盖原核生物、极端微生物和古菌、真菌、病毒,以及他们的生态、生理、生化代谢、遗传、免疫等。书中介绍细菌和真菌分子系统学、病毒学、极端微生物学、分子生态学、微生物生理学、微生物生物化学、微生物分子遗传学、免疫学等。

新版将本着删旧增新的原则,对原版文图进行调整,更能满足读者的需求。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目