

## 日本蟾蜍皮肤 *claudin-4* cDNA 的克隆与序列分析

阮佳佳, 袁进强, 杨仙玉

(浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 为研究日本蟾蜍 *Bufo japonicus formosus* 皮肤中多肽类有效成分, 通过菌落聚合酶链式反应(PCR)对日本蟾蜍皮肤 cDNA 质粒文库进行筛选, 克隆到 2 条 *claudin-4* 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号为 JX481975 和 JX481976), 并对它们进行生物信息学分析。日本蟾蜍 *claudin-4* 的 2 条 cDNA 全长分别为 1 707 bp 和 1 697 bp, 开放阅读框均为 630 bp, 其中虽有 5 个碱基不同, 但编码的 209 个氨基酸完全相同。两者的 5' 端非翻译区域序列长度不同, 前者为 50 bp, 后者为 41 bp, 3' 端非翻译区域则分别为 1 027 bp 和 1 026 bp。氨基酸序列同源性分析显示, 日本蟾蜍 *claudin-4* 与非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 的同源性最高, 为 88%, 与其他 7 种动物的同源性介于 65%~72%。克隆到 2 条日本蟾蜍 *claudin-4* 基因的 cDNA 序列, 为今后研究日本蟾蜍 Claudin-4 生物学功能奠定了基础。图 5 参 21

**关键词:** 动物学; 日本蟾蜍; *claudin-4*; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: Q959.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2013)04-0561-06

## Cloning and sequence analysis of *claudin-4* cDNA from *Bufo japonicus formosus*

RUAN Jiajia, YUAN Jinqiang, YANG Xianyu

(School of Agricultural and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** To clone the genes encoding the bioactive polypeptides included in *Bufo* skin and its secretions, the skin plasmid cDNA library of the adult Japanese toad *Bufo japonicus formosus* was screened by colony DNA polymerase chain reaction followed by a homologous analysis. Results revealed two full length cDNAs of *claudin-4*. The transcripts were 1 707 bp and 1 697 bp (GenBank: JX481975 and JX481976, respectively), both containing an open reading frame (ORF) of 630 bp. The same polypeptides consisting of 209 amino acid residues were encoded, although five nucleotides were different in the ORF. The 5' untranslated region (UTR) for the two cDNAs was 50 bp and 41 bp, in that order, while the 3' UTR was 1 027 bp and 1 026 bp, respectively. The homologous analysis indicated that Claudin-4 in *B. japonicus formosus* had an 88% similarity with *Xenopus laevis* and 65%–72% similarity with other species including *Taeniopygia guttata*, *Anolis carolinensis*, *Danio rerio*, *Ornithorhynchus anatinus*, *Macaca mulatta*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*. This study will become the basis for further studies on biological functions of Claudin-4 in *B. japonicus formosus* and the drug development for tumor therapeutics.[Ch, 5 fig. 21 ref.]

**Key words:** zoology; *Bufo japonicus formosus*; *claudin-4*; cDNA cloning; sequence analysis

Claudin-4 属于 Claudin 家族成员, 是一种膜蛋白, 是细胞紧密连接的重要成分之一<sup>[1]</sup>, 参与细胞间离子和溶质的渗透。同时 Claudin-4 还是产气荚膜梭菌肠毒素 *Clostridium perfringens enterotoxin* (CPE) 的受体<sup>[2-3]</sup>。Claudin 分布于皮肤、脑、神经系统、内脏组织中, 具有组织表达分布特异性<sup>[4]</sup>。机体的多种病变常伴随有 Claudin 蛋白的异常表达, 尤其是在癌组织中<sup>[4]</sup>。Claudin-4 在某些肿瘤中表达下调, 如胃

收稿日期: 2012-08-26; 修回日期: 2012-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071181); 浙江省科技创新活动计划项目(2011R412042)

作者简介: 阮佳佳, 从事生物技术等研究。E-mail: yuen\_115@foxmail.com。通信作者: 杨仙玉, 教授, 博士, 从事原生动物的发育学、中药材多肽类有效成分的基因克隆与研发。E-mail: xianyu\_yang@hotmail.com

癌<sup>[5]</sup>、胰腺导管腺癌<sup>[6]</sup>；但在某些肿瘤中表达上调，如卵巢癌<sup>[7]</sup>、乳腺癌<sup>[8]</sup>、胰腺癌<sup>[9]</sup>，增强癌细胞的扩散和转移<sup>[10]</sup>。因此，Claudin-4可作为检测和诊断肿瘤的生物标记之一<sup>[5]</sup>，成为近年来肿瘤治疗研究的新热点之一。近年来，蟾蜍制剂抗肿瘤作用受到人们的关注<sup>[11]</sup>。本研究利用菌落DNA聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)从蟾蜍皮肤cDNA质粒文库中筛选具有完整开放阅读框的全长cDNA序列，以探索蟾蜍皮肤中含有的可能与肿瘤发生及扩散相关的多肽类有效成分。本研究获得了2个日本蟾蜍*Bufo japonicus formosus*编码Claudin-4全长cDNA序列(已登录GenBank: JX481975和JX481976)，并运用多种软件对其进行了生物信息学分析，为进一步研究Claudin-4的生物学功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

日本蟾蜍皮肤cDNA质粒文库通过材料转让协议日本产业技术总合研究所(AIST, Tsukuba, Japan)授权浙江农林大学使用(作者杨仙玉在日本AIST博士后工作期间制备)。该文库使用的载体为pSD64TR(3 250 bp)，克隆位点分别为EcoR I和Xho I，载体上游、下游引物为SP6(5'-ATTTAGGTGACACTATA-GAA-3')和S.D.A.(5'-TTATGTAGCTTAGAGACTC-3')，cDNA的长度介于500~2 000 bp。

大肠埃希菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5 $\alpha$ ，聚合酶链式反应(PCR)反应试剂盒，2 $\times$ PCR预混试剂等购自天根生化科技有限公司，DNA Ladder和质粒小量抽提试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。引物合成与DNA测序委托上海生工生物技术有限公司或上海桑尼生物科技有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 日本蟾蜍皮肤cDNA质粒文库转化 将cDNA质粒文库0.2  $\mu$ L电击转化到*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中(40.0  $\mu$ L)，然后迅速加入37  $^{\circ}$ C预热的160.0  $\mu$ L LB培养液，37  $^{\circ}$ C恒温振荡复苏45 min，取2.0  $\mu$ L转化液均匀涂布于LB平板(含Amp<sup>+</sup> 100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)，并在37  $^{\circ}$ C恒温培养12~15 h。

1.2.2 全长cDNA筛选 从平板上随机挑取单菌落接种于10.0  $\mu$ L的LB液体培养基中，以此菌液为模板进行菌落PCR。引物是载体上游引物SP6和自行设计的含poly(T)的cDNA下游引物XhoTT(5'-A-GATCTCTCGAGTTTTTTTTTTT-3')。反应体系：菌液0.5  $\mu$ L，2 $\times$ PCR预混试剂5.0  $\mu$ L，SP6和XhoTT引物(2  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>)各1.0  $\mu$ L，加灭菌超纯水至10.0  $\mu$ L，在反应体系中补加矿物油10.0  $\mu$ L。反应条件为：94  $^{\circ}$ C/5 min，(94  $^{\circ}$ C/30 s，50  $^{\circ}$ C/30 s，72  $^{\circ}$ C/120 s) $\times$ 30循环，72  $^{\circ}$ C/8 min，4  $^{\circ}$ C/ $\infty$ 。PCR结束后，取5.0  $\mu$ L PCR产物经10.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳分析，将扩增出介于500~2 000 bp的PCR产物的菌落确定为阳性。

1.2.3 质粒回收、DNA测序与序列分析 将通过菌落PCR确定为阳性克隆的菌液0.2  $\mu$ L接种于3.5 mL LB培养液中(含Amp<sup>+</sup> 100 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>)，37  $^{\circ}$ C恒温振荡培养12~15 h，然后使用试剂盒进行质粒回收<sup>[12]</sup>并进行EcoR I和Xho I限制性内切酶消化(酶切)，进一步确定阳性克隆及质粒浓度。首先委托公司将阳性克隆质粒使用载体上游引物(SP6)对cDNA进行正向测序。对具有合理开放阅读框的克隆继续委托公司使用载体下游引物(S.D.A.)进行反向测序。

1.2.4 序列分析 利用DNASTar寻找开放阅读框(open reading frame, ORF)，推导其编码蛋白的氨基酸序列并分析其理化性质，运用生物序列分析中心(CBS)的在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)预测其结构功能域和潜在的磷酸化位点，运用ClustalX 2.0和MEGA 5.1软件进行同源性分析，构建系统进化树。

## 2 结果

### 2.1 cDNA的筛选

将日本蟾蜍皮肤cDNA质粒文库转化*E. coli*感受态细胞DH5 $\alpha$ 获得的菌落，以SP6和XhoTT为引物实施菌落PCR。PCR产物经10.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳分析显示，有2个菌落PCR产物大小在1 700 bp左右(图1A)。将此菌液进行扩大培养、质粒回收及其EcoR I和Xho I双酶切和10.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳。结果显示除约3 200 bp载体的条带外，得到长度约为1 400 bp和300 bp的2个条带(图1B)，两者之和与菌落PCR产物大小吻合，表明目的基因片段应该含有EcoR I或Xho I识别位点。将此质粒委托DNA测序公司进行正、反双向测序。结果表明：在目的cDNA的322 bp处确有一个EcoR I识别位

点(图2中方框示出)。

## 2.2 序列分析

### 2.2.1 测序结果分析及其编码蛋白的理化性质

DNA 测序结果表明: 克隆 I 序列全长为 1 707 bp, 含 50 bp 的 5' 端非翻译区域 UTR (untranslated region), 1 027 bp 的 3'UTR 和 630 bp 的开放阅读框(图 2)。克隆 II 序列全长为 1 697 bp, 含 41 bp 的 5' UTR, 1 026 bp 的 3'UTR 和 630 bp 的开放阅读框(图 3)。两者在 3'UTR 均有 4 个 mRNA 不稳定信号 ATTTA 和 1 个 mRNA polyA 加尾信号 AATAAA。除了克隆 I 比克隆 II 在 5'UTR 多 9 个碱基外, 两者之间还有 11 处不同(图 3)。开放阅读框中有 5 个碱基不同, 但都位于密码子的第 3 位, 属于同义突变, 没有影响编码的氨基酸, 因此, 2 个 cDNA 克隆编码完全相同的蛋白质。在 5'UTR 和 3'UTR 各有 1 个和 5 个碱基不同。

根据该 cDNA 编码蛋白的推导氨基酸序列在 GenBank blast 同源性分析表明, 与其他物种的 Claudin-4 具有同源性, 故将这 2 条 cDNA 克隆定为日本蟾蜍 *claudin-4* 全长 cDNA 并进行 GenBank 登录(登录号: JX481975 和 JX481976)。日本蟾蜍 Claudin-4 的分子量为 22.35 kD, 等电点为 8.38, 其中正电荷氨基酸残基(K, R) 13 个, 负电荷氨基酸残基(D, E) 10 个, 疏水性氨基酸(A, I, L, F, W, V) 95 个, 极性氨基酸残基(N, C, Q, S, Y) 54 个。

```

GAAATACAGCATCTTCTCATACATTCAGCTGAACAAGAAAAAACAAGCAATGGCTTCATGGGTCTTCAAGTCCTGGGCATTACCCCTTTCCTCATAGGC TGGTGGGC 110
M A S M G L Q V L G I T L S L I G W L G
TCTATCGTCTGCTGCGCTCTCCCAATGTGGAGAGTAAGTCTTTCATCGGTAACAACATTGTGGTGGCCCAATCATGTGGGAAGGACTATGGATGAAGTGTGCTGCA 220
S I V C C A L P M W R V T A F I G N N I V V A Q I M W E G L W M N C V V Q
AAGCACTGGACAGATGCAAGATCTACGACTCCTTGCTTGCCCTGGCCCGAGGATCTCCAGGCAGCCAGAGCCCTGATGTGTCATCGCCATCGTGTGGGCAATTCG 330
S T G Q M Q C K I Y D S L L A L P Q D L Q A A R A L I V I A I V V G T L
GAGTTGATGTCATTATTTGGAGGCAAGTGCACCAACTGCGTCGAAGATGAGTCTCTCAAAAGCCAAGATCATGATCGTCAGTGAATGTCTTCATCGTTCGTTGGAATC 440
G V M M S I I G G K C T N C V E D E S S K A K I M I V S G I V F I V A G I
CTTACTTGTATCCCTGTCTCTGGTCTGCAACAACATAATCAGGGACTTCTACAACCCACTGGTGTGGAAGCACAGAAGAGAGAGCTGGGAGCATCGCTGTACGTTGG 550
L T L I P V S W S A N N I I R D F Y N P L V V E A Q K R E L G A S L Y V G
ATGGGGTGCAGCTGCTTGTCTTCTAGGTGGTGCCATGCTGTGCTGCAACTGCCACCAAGGATCAGAAACCTTACTCTGCGCAATATTCGGCTGCACGATCCGGAC 660
W G A A A L F L L G G A M L C C N C P P R D Q K P Y S A K Y S A A R S G
CAGCCAGCAACTCGTTTATGAGTTAATATTGGCCACTAAGGACTAAAGACATTGAACATTATTCATCCATTTTCTTTCCCTCATATATGGACAAGACTGTATCA 770
P A S N Y V
TGGGTACCCCCAGAGTCCAGCCCTGATTTTGTGCTTTTTCATCAAGGCTACACAAGCTTGTCAAGAAACACTTTTGTCTGTCCAGAGAGGCGCTGTAA 880
CTCACCAAGCAGATACCAAGAGATGTGAACAGTGAACATATATCTCGGGTGAAGCGTGCAGTGTGGCTTTTAGTGGGAAAGTGTAAAGCATATATACAAATATTGGC 990
TTTATAGGTGCATGCAGGCAGTGTGCCATCCTTACTCTGTGGGGGTGCATATGCAACATGCGAAGATCAGAAATGATGCAAAATCTGTGTGATGTGCTTAGAAGGG 100
ACTCAGGGAGCAGAAATTTTCAGGTGAATACATTGAATCAAAAAGACAGGGGTGGGAAATGAGACCTACTTGAGATTTATGTTATAGTATATATATGAGA 210
TCAAAGGTGTAAATTTTCAGTATTTTCATATTTTTCATGGTGAAGACCCACTTTTGCCTTAACTGAATGCAACTCCCATCAGTGGTTTAAAGAACCTGTAGGCGTTG 320
TAGTTTCAGTTACAAGGCTTTCC TGCCAAATCAAAATGTGAGATGTGCAAAATCTGGCTTCTTAGAATGATTTTTAACACTTCATGCTCTATTAGGAAATACATACCAT 430
AGCTGGTCAGTACATGACCTTATAGTATGTCTCTATCATTCTTTCGCCCTCTCTTACAGTTTACAGTATAAGGTGATCAGATTTCCCTCTGGGCTTTTTCACAAA 540
GCCGTCTCGTGCAGTGAAGACATATAATGTATATTGTGTCTTTTAACTTTTATTTTGTATGTTGTTACAAATGTTTGTGCTATTCACATTTTGAATCTGTCTCT 650
AATAATAAATTGTGCGTTTTAACCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1707

```

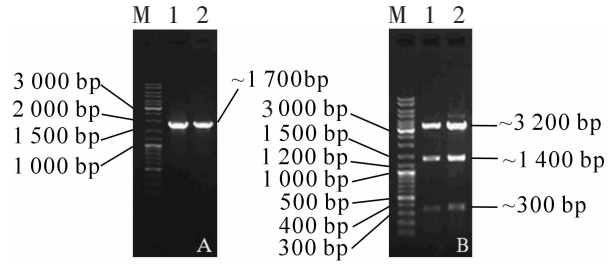
• 终止密码子; \_ 不稳定信号; =poly A 尾添加信号; □EcoR I 识别位点

图 2 日本蟾蜍 *claudin-4* 克隆 I 的 cDNA 序列及其推导氨基酸序列

Figure 2 cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of the clone I of *claudin-4* of *Bufo japonicus formosus*

2.2.2 结构预测 TMHMM 2.0 工具预测日本蟾蜍皮肤 Claudin-4 具有 4 个跨膜螺旋区 (5~27, 83~102, 117~139 和 160~182), 1 个胞内侧环(103~116)和 2 个长度不等的胞外侧环(28~82 和 140~159), 与人同源蛋白结构相似。第 1 个细胞外环含 55 个氨基酸; 第 2 个细胞外环含 20 个氨基酸; NetPhos 2.0 工具预测其含 4 个潜在的磷酸化位点: Ser-112, Ser-137, Ser-194 和 Tyr-208, 与人同源蛋白比对具有保守性。

2.2.3 氨基酸序列同源性分析和邻近相连法构建进化树 日本蟾蜍 Claudin4 氨基酸序列在 NCBI 中同源性分析发现, 与非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (NP\_001089583.1) 的相似性最高, 为 88%; 与斑胸草雀 *Taeniopygia guttata* (XP\_002188519.1), 安乐蜥 *Anolis carolinensis* (XP\_003227219.1), 斑马鱼 *Danio rerio* (NP\_571838.1), 鸭嘴兽 *Ornithorhynchus anatinus* XP\_001510834.1), 猕猴 *Macaca mulatta* (NP\_001181493.1), 小鼠 *Mus musculus* (NP\_034033.1) 和人 *Homo sapiens* (NP\_001296.1) 7 种动物的同源性为 65%~72%(图 4)。通过 MEGA 5.1 软件构建氨基酸序列系统进化树(图 5), 发现日本蟾蜍与同属两



M. 标准DNA; A. 1和2为2个菌落PCR产物; B. 1和2为2个重组质粒的EcoRI和XhoI双酶切产物

图 1 菌落 PCR 产物(A)和重组质粒酶切产物(B)的琼脂糖凝胶电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of colony PCR products (A) and enzyme digestion products of recombinant plasmid (B)



克	II	GAATACAGCATCTTCTCATACTTTCAGCTGAACAAGAAAAA	1	CAAGCAATGGCTTCCATGGGCTTCAAGTCTGGG	2	ATTACCCCTTT	90
克	II	CCCCATAGGCTGGTGGGCTCT	3	ATCGTCTGCTGCGCTCTCCCAATGGAGAGTA	4	CTGCTTTCATCGGTAACAACATTTG	81
克	II	AAATCATGTGGGAAGGACTATGGATGA	5	CTGTCTGCTG	6	CAAAAGCCTGGACAGATG	180
克	II	CCAGGATCTCCAGGCAGCAGAGCCCTGATTGT	7	CATCGCCATCGTTGTGGGAATTCTGGGAGTTATGAT	8	GTCCATTATTTGGAGGCAAGT	171
克	II	GCACCAACTGCGTCGAAGATGAGTCCTCAAAGGCCAAGATCATGATCGTCAGTGGAA	9	TTGCTTTCATCGTTGCTGGAATCCTTACTTTGA			270
克	II	TCCTGTCTCTGGTCTGCAACAACATAATACGG	10	GACTTCTACAAACCCTGGTGGTGGAA	11	GCAGACAGAGAGGCTGGGAGCATGCG	261
克	II	TGTGCTTGGATGGGGTG	12	CAGCTGCCTTGTCTTCTAGGTGGTGC	13	ATGCTGTGCAACTGCCCAAGGGATCAGAAACCTACT	360
克	II	CTGCCAAATATTGGCTGCAGATCCGGACCGACGCAACTACGTTTAA	14	TAGTAAATATTGGCCCAT	15	AAGGACTAAAGGACATTGAAC	351
克	II	ATTTATCCATCCATTTTTTCTTCCCTCATATATGGACAAGACTGATCATGGGT	16	CACCCGAGAGAGTCCAGCCCTGATTTTGTGCTT			450
克	II	CTTCACTCAAGGCTACACAAGCTTGTCAAAGAAACACTTTTTTGT	17	CCTGTCAGCAGAGGGCGCTGTA	18	ACTCACCAGCAGATACCGAA	441
克	II	AGATGTGAACAGTGAACATATATCTCGGGTGGAAAGCGTG	19	CAGTTGGGCTTTTAGTGGGAAAGT	20	TTAAGCGATATATACAAATATTGGGC	540
克	II	TTTATAGGTGCATGCAGGCGAGTGGCCATCCTTACTCTGTGGGGGGT	21	CATATGCAACATGCGAAGAA	22	TCCAAGAAATGATGCAAAATCTGT	531
克	II	GTGTGATGTCATTAGAAGGACTCAGGGAGCAGAAAATGTT	23	CAGGTGAATACATTGAATCAAAAAAGACAGGGGTGGGAAAAATGAGAC			630
克	II	CTACTTGAGATTTATGTTATAGTGATTTATAATTATGAGATCAAAGGTTG	24	TAATTTTTCAGTATTTTTCATATTTTTCATGGTGGAAACCCC			621
克	II	ACTTTGCTCTTAACTGAAATGCAACTCCCATCAGTGGTTTAAAGAACCTGATAGGCGT	25	TGTGATTCAGTTACAAAGGCTTCTCTGCCAAA			720
克	II	TCAAAATGTGAGATGTGCAAAATCTGGCTTCTTAGAATGATTTTTTAA	26	CACTTATGCTCATTATAGGAATTACATACCATAGCTGGTCA			711
克	II	GTACATGACCCCTATTAGTAGTGTCTTATTCATTCTCTTGGCCCTCTTCTTACAGT	27	CAGTATAAAGGTGATCAGATTTCCCCCTGGGGCT			810
克	II	TTTTCCCAAAGCGCTCTGCTGCTGAGTGAAGAACTATAAATG	28	TATGTTGTTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			801
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	29	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			900
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	30	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			891
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	31	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			981
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	32	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1080
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	33	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1071
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	34	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1170
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	35	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1161
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	36	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1260
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	37	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1251
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	38	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1350
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	39	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1341
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	40	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1439
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	41	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1431
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	42	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1529
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	43	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1521
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	44	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1619
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	45	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1611
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	46	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1707
克	II	TTATGCTATTACATTTTAGAATCTGTTTCTAAATAAAAAATTTGCG	47	TTTTTAACTTTTATTTTTTGTATGTTGTACAAATGT			1697

“□”：缺失碱基，“.”：相同碱基，■：不同碱基

图3 2个蟾蜍 *claudin-4* cDNA 克隆的比较

Figure 3 Comparision of two *claudin-4* cDNA clones of *Bufo japonicus formosus*

栖类的非洲爪蟾处于1个分支内，与鸟类汇于1个分支，人和猕猴处于1分支，与鸭嘴兽的同源性比小鼠高，鱼类和爬行类各占1个分支。

<i>Bufo japonicus formosus</i>	MASMEGLQVIGITLSLIGWLGSIVCCALPMWRVTAFTFGNNIVVAQIINWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Xenopus laevis</i>	MASMEGLQVIGIALSVIIGWLGVLCCLPMWRVTAFTFGNNIVVAQIINWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Danio rerio</i>	MASGTGQVIGIALAVIGWIGVILCCALPMWRVTAFTFGNNIVTSQTSWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALSS	75
<i>Anolis carolinensis</i>	MGSMGQVIGIGIALSVLIGWLGAIILOCLPMWRVTAFTFGNSNIVVAQIINWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Homo sapiens</i>	MASMEGLQVMGIALAVIGWLAVMLCCALPMWRVTAFTFGNSIVTSQTIWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Macaca mulatta</i>	MASMEGLQVIGIALAVIGWLAVMLCCALPMWRVTAFTFGNSIVTSQTIWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Taeniopygia guttata</i>	MASMGQVIGIALSVIIGWLASILCCALPMWRVTAFTFGNNIVVAQIINWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	M-----GLQVMGVALAVLIGWLGVMLCCALPMWRVSAFTGSSIVTAQTIWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	72
<i>Mus musculus</i>	MASMEGLQVIGISTAVLIGWLIGLILCCALPMWRVTAFTFGNSIVTACTSWEGWMMCCVVCSTGQMCCQKYDSSLALPQ	75
<i>Bufo japonicus formosus</i>	DLQAARALIVIAIVVIGILGVMSIISGGKCTNCEDESSKAKIMIVSGVIVIVAGILTLIPVSWANNIIRDFYNP	150
<i>Xenopus laevis</i>	DLQAARALIVIAIVVIGILGLFSISGGKCTNCEDESSKAKVIIIVSGVIVIVAGILTLIPVSWANNIIRDFYNP	150
<i>Danio rerio</i>	DHQAARALIVISIVVIGMILSMGGKCTNCEDESSKAKVGIITAGVIGIISGVLCVLPVSWDPAIIRDFYNP	150
<i>Anolis carolinensis</i>	DLQAARALVVISITILLAVVGLGFSVILGGKCTNCEDEATKAKIRIVIAAGVVFISGVLLIPLCWTAHNVIRDFYNP	150
<i>Homo sapiens</i>	DLQAARALVVISITIAAALGVLLSVGGKCTNCEDESSAKAKMIVAGVVFLLAGLMVIVPVSWSAHNIIRDFYNP	150
<i>Macaca mulatta</i>	DLQAARALVVISITIAAALGVLLSVGGKCTNCEDESSAKAKMIVAGVVFLLAGLMVIVPVSWSAHNIIRDFYNP	150
<i>Taeniopygia guttata</i>	DLQAARAVVVAIVLAILGITLLAVVGGKCTNCEDDTAKAKVMILSGIILIVAGILVLIPIPSWSANSIIRDFYNP	150
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	DLQAARALVVICIVVAALAVLLAVVGGKCTNCEDEAAKAKTIVAGVVFLLAGVLAIIPVSWANNIIRDFYNP	147
<i>Mus musculus</i>	DLQAARALMVISITIVGALGMLLSVGGKCTNCEDETVAKAKMITAGVIVIVASMLIMVPSWTAHNVIRDFYNP	150
<i>Bufo japonicus formosus</i>	LVVERAKRELGLASYLGWGAARILLIGGALLCCNCFPRD-KRFYSAKYSAPAR-----SSFA-SNVV	209
<i>Xenopus laevis</i>	LVVERAKRELGLASYLGWGAARILLIGGALLCCNCFPRD-KRFYSAKYTPAR-----SGAT-SNVV	209
<i>Danio rerio</i>	LVVQAQKRELGLASYLGWGAASPLIIGGSLCCCPCKSDSGKYIAKNAIPRSEASFGSGNWS	215
<i>Anolis carolinensis</i>	MVVESQKREFGLASYLGWASVGLIFIGGALLCCNCFPRN-EKFPYSAKYTPAR-----SMFA-SNVV	209
<i>Homo sapiens</i>	LVASGQKREMGASYLGWGAASGLLLIGGGLCCNCFPRT-DKFPYSAKYSAPAR-----SAAA-SNVV	209
<i>Macaca mulatta</i>	LVASGQKREMGASYLGWGAASGLLLIGGGLCCNCFPRT-DKFPYSAKYSAPAR-----SAAA-SNVV	209
<i>Taeniopygia guttata</i>	LVSDSQKRLDGLASYLGWGAASPLIIGGGLCCNCFPRG-EKFPYSAKYTPAR-----SLFP-SNVV	209
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	TVSQGQKREMGASYLGWGAASGLLLIGGGLCCNCFPRR-DKFPYSAKYSAPAR-----SAPT-TNVV	206
<i>Mus musculus</i>	MVBSGQKREMGASYLGWGAASGLLLIGGGLCCNCFPRNSDKFPYSAKYSAPAR-----SVFA-SNVV	210

图4 日本蟾蜍与其他物种 Claudin-4 氨基酸序列的比对

Figure 4 Alignment of Claudin-4 amino acid sequences between *Bufo japonicus formosus* and 8 other species

### 3 讨论

本研究通过菌落 PCR 从日本蟾蜍皮肤 cDNA 质粒文库中克隆到 2 条 *claudin-4* 全长 cDNA 序列, 虽

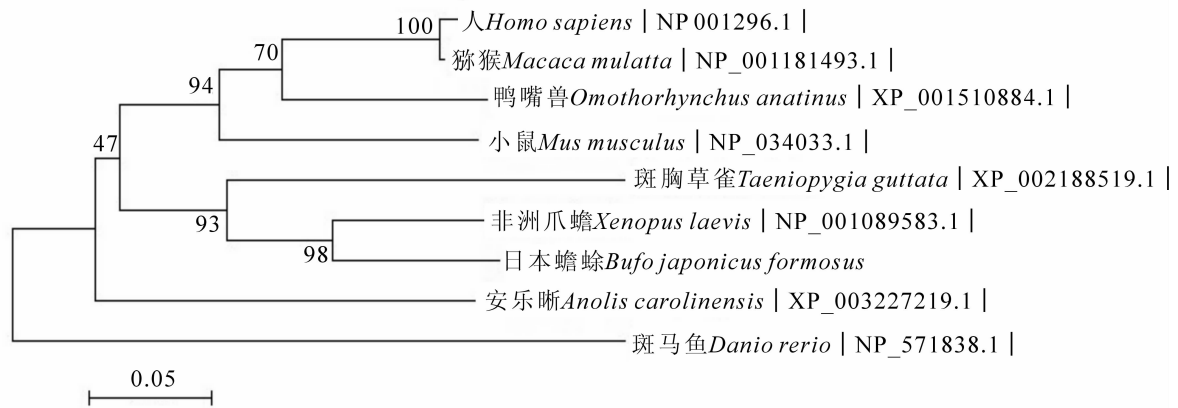


图 5 日本蟾蜍与其他 8 种动物 Claudin-4 系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of Claudin-4 among *Bufo japonicus formosus* and 8 other species

然两者编码蛋白的氨基酸序列完全相同,但存在 4 处碱基缺失和 8 处碱基替换(图 2, 3)。同源性分析表明,日本蟾蜍 Claudin-4 含有 4 个跨膜螺旋区和 2 个胞外环,在第 1 个胞外环(28~82)上的 W-30, W-47, C-54 和 C-64,第 2 个胞外环(140~159)上的 N-149,以及 Ser-112, Ser-137, Ser-194 和 Tyr-208 等 4 个磷酸化位点在不同物种间高度保守(图 4)。这些说明日本蟾蜍 Claudin-4 与人类同源蛋白可能具有类似的生物活性。

Claudin-4 除了作为细胞紧密连接复合物的主要成分之一,第 1 个胞外环上的这些氨基酸位点参与细胞离子转运;第 2 个胞外环上的 N-149 与 CPE 结合,参与细胞凋亡的调节<sup>[2]</sup>;2 个磷酸化位点能与一些蛋白的特殊结构域相互作用,从而参与信号转导<sup>[13]</sup>。此外, Claudin-4 的表达上调与多种肿瘤的发生、发展联系密切<sup>[14]</sup>。有研究表明,在 Claudin-4 表达上调的癌组织中,产气荚膜梭菌肠毒素 CPE 对癌细胞的毒性与剂量有关<sup>[14]</sup>。CPE 含有 2 个功能结构域, C 端结构域可以与 Claudin-4 结合,阻断它介导的细胞间紧密连接,从而增强药物的吸收,可作为调节药物吸收的靶点,但它不具有细胞毒性,不能杀死癌细胞<sup>[15]</sup>; N 端结构域不与 Claudin-4 结合,但可以使细胞膜上产生小孔导致细胞凋亡<sup>[16]</sup>。因此,利用 Claudin-4 的特性可能为人类治疗肿瘤提供有效方法。

那么,在日本蟾蜍中 2 种 *claudin-4* cDNA 的存在是否是在实验操作过程中的一些人为因素导致的呢?实际上,编码同一蛋白的基因呈现多样性的现象在两栖类及爬行类中均有报道<sup>[17-20]</sup>。首先,本研究使用的质粒文库在制备过程的反转录阶段对 mRNA 进行了高温变性处理,以消除其可能形成的二级结构。其次,在 cDNA 筛选过程中,PCR 只是筛选阳性菌落的手段,其产物没有用于后续 cDNA 的克隆。第三,上述 2 个序列都进行了正向、反向测序,并确认 2 条链是完全互补的。此外,在上述 8 处碱基替换中,5 处位于开放阅读框,但均发生于密码子的第 3 位,没有引起对应编码氨基酸的改变,没有引起与 Claudin-4 生物学功能密切相关的氨基酸残基发生变异,属于同义突变,这与编码蛋白质的基因密码子第 3 位点进化最快,第 2 位点最保守的规律相一致<sup>[21]</sup>。上述这些分析结果均支持 *claudin-4* cDNA 多样性的客观存在,该多样性很可能是两栖类在复杂多变生活环境中长期适应进化的结果。

## 4 结论

本研究首次克隆日本蟾蜍 *claudin-4* cDNA,其编码的蛋白质具有与人类同源蛋白相似的结构特征。为以蟾蜍为基原的蟾酥、蟾衣、蟾皮等中药材用于癌症的治疗提供理论依据,为进一步研究 Claudin-4 的生物学功能及其治疗肿瘤的药物研发提供参考。

## 参考文献:

- [1] TURKSEN K, TROY T C. Barriers built on claudins [J]. *Cell Sci*, 2004, **117**(12): 2435 – 2447.
- [2] van ITALLIE C M, ANDERSON J M. Claudins and epithelial paracellular transport [J]. *Annu Rev Physiol*, 2006, **68**: 403 – 429.

- [3] MORITA K, FURUSE M, FUJIMOTO K, *et al.* Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands [J]. *PNAS*, 1999, **96**(2): 511 – 516.
- [4] PATRICE J, MORIN P J. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(21): 9603 – 9606.
- [5] OHTANI S, TERASHIMA M, SATOH J, *et al.* Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: down regulation of *claudin-4* correlates with tumor aggressiveness and survival [J]. *Gastric Cancer*, 2009, **12**(1): 43 – 51.
- [6] TSUTSUMI K, SATO N, TANABE R, *et al.* Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, **19**(3): 491 – 499.
- [7] RANGEL L B, SHERMAN-BAUST C A, WERNYJ R P, *et al.* Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts(HOSTs) identified by serial analysis of gene expression [J]. *Oncogene*, 2003, **22**(46): 7225 – 7232.
- [8] KOMINSKY S L, VALI M, KORZ D, *et al.* Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4 [J]. *Am J Pathol*, 2004, **164**(5): 1627 – 1633.
- [9] NICHOLS L S, ASHFAQ R, IACOBUZIO-DONAHUE C A. Claudin 4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target [J]. *Am J Clin Pathol*, 2004, **121**(2): 226 – 230.
- [10] AGARWAL R, D'SOUZA T, MORIN P J. Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(16): 7378 – 7385.
- [11] 曾欢, 宋兴福, 董自强. 蟾蜍制剂诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2012, **20**(4): 865 – 867.
- ZENG Huan, SONG Xingfu, DONG Ziqiang. Research progress of toad preparations induced tumor cell apoptosis [J]. *Mod Oncol*, 2012, **20**(4): 865 – 867.
- [12] 徐跃, 宋敏国, 杨仙玉, 等. 中华大蟾蜍皮肤 *galectin-3* cDNA 分子多样性及氨基酸变异分析[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(4): 574 – 580.
- XU Yue, SONG Minguo, YANG Xianyu, *et al.* The *galectin-3* cDNA diversity and amino acid variation of *Bufo gargarizans* skin tissue [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2012, **29**(4): 574 – 580.
- [13] ITOH M, FURUSE M, MORITA K, *et al.* Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins [J]. *J Cell Biol*, 1999, **147**(6): 1351 – 1363.
- [14] NEESSE A, GRIESMANN H, GRESS T M, *et al.* Claudin-4 as therapeutic target in cancer [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, **524**(1): 64 – 70.
- [15] SAEKI R, KONDOH M, KAKUTANI H, *et al.* A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, **76**(4): 918 – 926.
- [16] HANNA P C, WIECKOWSKI E U, MIETZNER T A, *et al.* Mapping of functional regions of clostridium perfringens type A enterotoxin [J]. *Infect Immun*, 1992, **60**(5): 2110 – 2114.
- [17] ZASLOFF M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1987, **84**(15): 5449 – 5453.
- [18] GAO B, SHERMAN P, LUO L, *et al.* Structural and functional characterization of two genetically related meucien peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides [J]. *FASEB J*, 2009, **23**: 1231 – 1245.
- [19] ZHU Shunyi, PEIGNEUR S T, GAO Bin, *et al.* Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, **10**(2): 1 – 11.
- [20] LI Ping, ZHU Shunyi. Mutational analysis of the analgesic peptide DrTx (1-42) revealing a functional role of the amino-terminal turn [J]. *Plos One*, 2012, **7**: 1 – 8.
- [21] IRWIN D M, KOEHER T D, WILSON A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals [J]. *J Mol Evol*, 1991, **32**(2): 128 – 144.