论文

ABC 转运蛋白提升四膜虫对 DDT 的耐受能力

宁应之^①, 党怀^①, 刘光龙^①, 熊杰^②, 袁冬霞^②, 冯立芳^{③*}, 缪炜^{②*}^① 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070;^② 中国科学院水生生物研究所, 水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072;^③ 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310018

* 联系人, E-mail: miaowei@ihb.ac.cn; fenglifang@mail.zjgsu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-07; 接受日期: 2014-05-05

国家自然科学基金(批准号: 91231118)资助项目

doi: 10.1360/N052014-00090

摘要 世界卫生组织允许 DDT 在部分国家和地区使用. 大规模频繁使用杀虫剂造成了蚊子的抗药性, 大大降低了 DDT 的防治效果. 目前对于 DDT 的耐受主要集中在蚊子, 但对于喷洒的 DDT 进入水生态系统后, 造成食物链底层水生生物体对 DDT 耐受还未见报道. 本研究对 DDT 胁迫下的四膜虫全基因组中筛选出一个 ATP 结合盒转运蛋白基因(*abcb15*), 它能够识别 DDT 作为其转运的底物. 绿色荧光蛋白标记显示 ABCB15 蛋白定位于细胞膜上, 是一个细胞膜泵蛋白. 基因敲降技术造成的 *abcb15* 基因敲降株在 DDT 胁迫下表现出更低的生长速率, 这表明 ABCB15 膜泵蛋白能够将进入细胞内的 DDT 转运至细胞膜外, 藉以提高四膜虫对 DDT 的耐受能力, 以减轻 DDT 对细胞的损伤.

关键词

四膜虫

DDT

ABC 转运蛋白

耐受能力

有机氯农药滴滴涕(dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT)在杀蚊除虱方面具有药效维持时间长和杀虫范围广的特点, 曾于 20 世纪 40~60 年代在全球范围内大面积使用. DDT 能与活生物体内的脂肪紧密结合, 形成稳定的状态, 故 DDT 容易通过食物链在高等生物体内蓄积并呈现生物放大效应, 这会对野生动物、甚至人类造成长久且严重的危害. 许多研究表明, DDT 及其代谢产物滴滴伊(dichlorodiphenyldichloroethylene, DDE)对人体健康造成广泛的负面影响, 包括乳腺癌、糖尿病、低精子质量、自发性流产、儿童神经系统发育受损等^[1]. 许多国家自 20 世纪 70 年代开始相继禁止使用 DDT, 2001 年联合国环境大会将 DDT 列为亟待控制的 12 种持久性有机污染物(persistent organic pollutant, POPs)之一. 然而,

DDT 禁用后, 疟疾在部分非洲国家又卷土重来; 2006 年 9 月, 世界卫生组织宣布正式解除对 DDT 的禁令, 允许部分地区重新使用这种杀虫剂^[2]. 目前, 含有 DDT 杀虫剂的使用和海洋持续释放几十年前未分解的 DDT 等现状, 进一步加剧了环境中的 DDT 污染问题^[3].

杀虫剂 DDT 控制疟疾、登革热、丝虫病等人类疾病是通过阻断传播的媒介——蚊子来实现的. 但是, 大规模频繁使用杀虫剂造成了蚊子的抗药性, 大大降低了 DDT 的防治效果. 蚊子对 DDT 的耐受主要有两个方面: 代谢耐受和靶标耐受, 代谢耐受主要由细胞 I 相解毒酶——细胞色素 P450 单加氧酶(P450s)和细胞 II 相解毒酶——谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferases, GST)发挥作用, 靶标位点

引用格式: 宁应之, 党怀, 刘光龙, 等. ABC 转运蛋白提升四膜虫对 DDT 的耐受能力. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1133–1141

英文版见: Ning Y Z, Dang H, Liu G L, et al. ATP-binding cassette transporter enhances *Tetrahymena* tolerance to DDT. Sci China Life Sci, 2014, 57: in press, doi: 10.1007/s11427-014-4743-x

耐受则是由于 DDT 的靶标——电压门控性钠离子通道(voltage-gated sodium channel)的突变而导致蚊子耐药性的提高^[4]。喷洒的 DDT 会经由地表径流或大气沉降等多种途径进入水生态系统^[5], 处于食物链底层水生生物体内的 DDT 通过食物链最终会在高等生物体内蓄积^[6]; 因此, 分析水生生物对 DDT 的耐受机制, 有助于将 DDT 控制在食物链底层和探索科学正确的治理 DDT 污染问题, 从而保护野生动物和人类的健康。

四膜虫(*Tetrahymena*)是一种分布于全球各地淡水环境中的营自由生活纤毛虫, 它具有高等真核生物所共有的保守基因和基础代谢通路^[7]。作为模式生物, 四膜虫的遗传背景清晰, 并已建立起一套成熟的分子生物学操作技术、基因组和转录组数据库等资源^[8-10]。本课题组之前采用 microarray 技术在四膜虫内筛选出一批 DDT 胁迫下的差异表达基因, 预测其中的一个腺苷三磷酸结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABCB)B 家族的 15 号成员(ABCB15)在保护四膜虫免受 DDT 毒害以提高其耐受能力方面可能扮演着重要的角色^[11]。基于此, 本研究对 ABCB15 蛋白的编码基因 *abcb15* 的功能进行分析, 以阐明四膜虫对 DDT 的耐受机制。

1 材料与方法

1.1 四膜虫培养和 DDT 处理

嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)SB210 株和 CU428 株由美国加州大学圣巴巴拉分校 Eduardo Orias 教授惠赠。四膜虫的超级胨蛋白胨(super proteose peptone, SPP)培养基组分: 2%蛋白胨(Difco, 美国)、0.1%酵母提取物(Oxide, 英国)、0.2%葡萄糖(国药集团, 北京)、0.003%柠檬酸铁(Sigma, 美国), 溶于双蒸水, 经 103 kPa、120℃灭菌 20 min 后冷却至室温。DDT 与二噁英(2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD, Sigma)母液的制备参考本课题组之前的报道^[11,12]。四膜虫 30℃无菌培养至对数前期(密度约为 3×10^5 细胞/mL), 根据预实验结果, 选择不会对四膜虫生长速率产生影响的最高浓度为暴露浓度, 分别为: DDT 4 mg/L, TCDD 1 μg/L, 对照组加入等体积的毒物助溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma), 诱导 4 h 和 24 h。

1.2 RNA 提取、cDNA 合成、mRNA 纯化、SMART cDNA 文库构建、5'和 3'RACE 及产物克隆测序

对步骤 1.1 中处理后的四膜虫进行离心以收集细胞, 用 Qiashredder spin column 匀浆, 按照操作手册用 RNeasy Protect Cell Mini Kit (Qiagen, 德国)抽提总 RNA, 分光光度计(Malcom, 日本)和琼脂糖凝胶电泳分别检测总 RNA 浓度和质量。总 RNA 反转录成 cDNA 的方法参见文献^[13]。

将 5 mL 四膜虫在 4 mg/L 的 DDT 中处理 24 h 后提取总 RNA, 接着以 PolyAtract[®] mRNA 纯化系统(Promega, 美国)按照使用说明进行磁珠法纯化, 纯化后的 mRNA 使用 SMART(switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) cDNA 文库构建试剂盒(Clontech, 美国)扩增合成 cDNA 文库^[14]。

根据鉴定得到的嗜热四膜虫 *abcb15* 基因序列^[15], 设计扩增 *abcb15* 基因的实时荧光定量 PCR 引物(*abcb15*_f+*abcb15*_r); 根据 SMART cDNA 文库构建试剂盒提供的接头全长序列设计一对通用引物(5'UT_f+3'UT_r)(表 1)。用正向通用引物(5'UT_f)与 *abcb15* 基因反向引物(*abcb15*_r)扩增 *abcb15* 基因的 5'RACE(rapid-amplification of cDNA ends)序列, 用反向通用引物(3'UT_r)与 *abcb15* 基因正向引物(*abcb15*_f)扩增 *abcb15* 基因 3'RACE 序列: 2.5 μL 10×缓冲液, 0.5 μL 10 mmol/L dNTP(Fermentas, 立陶宛), 0.4 μmol/L 引物, 1 U Taq 酶(BD advantage, 美国)混合, 0.5 μL 文库 cDNA 模板, 最后用双蒸水配成 25 μL RACE 反应体系; RACE 反应按照下列程序进行: 94℃ 10 min 预变性, 94℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min 共 35 个循环反应, 最后于 72℃延伸 10 min。

PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳后, 特异 DNA 片段用 glass milk 胶回收试剂盒(Biostar, 杭州)回收, 产物连接到 pGEM-T 载体(Promega)多克隆位点, 之后转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞液中, 涂平板挑斑。筛选出的阳性克隆菌液交由上海联合基因研究院测序。

1.3 ABCB15 蛋白在四膜虫内的定位

(1) 软件预测。对于注释得到的蛋白质, 利用在线软件 WoLF PSORT (<http://wolffpsort.org/>)^[16]和 TargetP 1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)^[17]进行亚细胞定位预测。

表 1 本实验所使用的引物

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
abcb15_f	AGAATACAAATGTGAAGTAAGCCTAAG	扩增 <i>abcb15</i> 基因 3'端 RACE 序列; 实时定量 PCR 扩增
abcb15_r	GTACCCACTGAAAGGATAACAAACTC	扩增 <i>abcb15</i> 基因 5'端 RACE 序列; 实时定量 PCR 扩增
5'UT_f	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTG	5'RACE 通用引物
3'UT_r	GGCGGCCGACATGTTTTTTT	3'RACE 通用引物
18s	CCTGGGAAGGTACGGGTAAT	内参基因引物
18s	AAGGTTACACGACCATTTCG	内参基因引物
TOPO_ABCB15_f	<u>CACCT</u> AAAAAATGGAAGAAAAGTCATTATA	ABCB15 蛋白定位, 下画线为 pENTR™/D-TOPO®载体定向接头序列, 粗体 ATG 为启动子; PICC_ABCB15 转化子的鉴定
TOPO_ABCB15_r	GCAATTCTAATTTTAACTTTCCTGC	ABCB15 蛋白定位
GFP_r	ATGTGGCTCCTTATCTTACCCTA	PICC_ABCB15 转化子的鉴定
abcb15_5f	TTATTAAAGTTATGATTGTCCTGCTA	扩增 <i>abcb15</i> 基因 5'旁侧区
abcb15neo_5r	<u>GTGTATT</u> TAATAAAGGAGTTATTCTCTGAAAC CCATTAGTCAAAGTAG	扩增 <i>abcb15</i> 基因 5'旁侧区, 下画线为 <i>neo4</i> 基因搭桥部分
abcb15neo_3f	<u>CAAATTTT</u> TAAGGAAAAATGCATGGAAAAATGG CAACATAGTCG	扩增 <i>abcb15</i> 基因 3'旁侧区, 下画线为 <i>neo4</i> 基因搭桥部分
abcb15_3r	ACTTAAACCAAGCTCAAAAGACAG	扩增 <i>abcb15</i> 基因 3'旁侧区
neo4_f	GAATAACTCCTTTAATTTAAATACAC	扩增 <i>neo4</i> 基因
neo4_r	GCATTTTCCAGTAAAAATTTG	扩增 <i>neo4</i> 基因
abcb15nest_f	AAAGTTATGATTGTCCTGCTATTA	连接 <i>abcb15</i> 基因 5'旁侧区、3'旁侧区和 <i>neo4</i> 基因这 3 个片段
abcb15nest_r	TAAAACCAAGCTCAAAAGACAG	连接 <i>abcb15</i> 基因 5'旁侧区、3'旁侧区和 <i>neo4</i> 基因这 3 个片段

(2) GFP 标记. 根据嗜热四膜虫 *abcb15* 基因序列, 设计用于 pENTR™/D-TOPO®定向克隆载体 (Invitrogen, 美国)连接的引物(TOPO_ABCB15_f+TOPO_ABCB15_r). 以上述步骤 1.2 中制备的四膜虫 cDNA 为模板, 用超保真 DNA 聚合酶 Phusion(NEB, 美国)扩增, 反应体系: 5×H 缓冲液 5 μL, 引物 (TOPO_ABCB15_f+TOPO_ABCB15_r) 0.32 μmol/L, 10 mmol/L dNTP 0.8 μL, 模板 1 μL, Phusion DNA Polymerase 0.2 μL, 补双蒸水至 25 μL, 反应条件: 98℃ 30 s, 中间 35 个循环的 98℃ 7 s, 55℃ 25 s, 72℃ 45 s, 最后 72℃ 10 min 延伸. PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化目的 DNA 片段, 之后将回收 DNA 片段与 pENTR™/D-TOPO®定向克隆载体进行连接. 连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞液中, 涂平板挑斑. 从筛选出的阳性克隆菌液中提取质粒并命名为 pENTR_ABCB15, 将之与 PICC 质粒(美国华盛顿大学 Chalker D L 教授馈赠, 含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, *gfp*)基因进行同源重组^[18], 反应体系为: pENTR_ABCB15 质粒 3 μL, PICC 1 μL, Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 1 μL (Invitrogen), 室温放置 1 h, 所得重组产物为 PICC_A-

BCB15, 重组示意过程见图 1.

用 Endo-free Plasmid Mini Kit II (OMEGA, 美国)去内毒素质粒抽提试剂盒提取质粒 PICC_ABCB15, 然后经电穿孔技术(Bio-Rad, 美国)转染进接合生殖时期四膜虫内^[19]. 在巴龙霉素药物筛选条件下, 选用引物 TOPO_ABCB15_f+GFP_r, 对转染后的细胞进行 Whole Cell PCR 扩增, 挑选 *abcb15* 基因与 *gfp* 基因融合的纯转化子. 培养转染成功的四膜虫至密度为 3×10⁵ 细胞/mL, 添加 CdCl₂ 至终浓度 5 μg/mL, 处理 3 h. 离心富集四膜虫, 经 2% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, 上海)固定, 并添加染料 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich, 美国)至终浓度 1 μg/mL, 最后用 ZEISS 荧光倒置显微镜(德国)在蓝色激发光下对诱导的四膜虫进行荧光观察, 并用 ZEISS 显微镜配套的数码成像系统拍照记录.

1.4 四膜虫内 *abcb15* 基因的敲降

以嗜热四膜虫 SB210 株基因组 DNA 或 *neo4* 质粒(奥地利科学院分子技术研究所 Mochizuki 教授馈赠)^[20]为模板, PCR 分别扩增 *abcb15* 基因的 5'旁侧区、3'旁侧区及 *neo4* 基因盒, PCR 反应体系: 10×PCR 缓冲

图1 *abcb15* 基因通过 Gateway 同源重组系统快速替换到表达载体 PICC 中

在重组酶作用下, pENTR_ABCB15 载体的 *abcb15* 基因片段与 PICC 载体的 *ccdB* 致死基因片段之间发生同源重组。在含有氨苄青霉素的培养基上, pENTR_ABCB15 质粒和所得副产物 BP Clonase 质粒只有卡那霉素抗性基因, 但缺乏氨苄抗性基因, 因此它们无法存活; PICC 质粒因含有 *ccdB* 致死基因也无法存活; 仅 PICC_ABCB15 质粒具有氨苄抗性基因, 同时不含有 *ccdB* 致死基因, 因此该质粒能够存活下来

液 0.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.4 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物 1 μ L, 模板 0.3 μ L, Taq 酶 (Promega) 1 U, DNA 1 μ L, 补水至 25 μ L; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}C$ 10 min, 中间 35 个循环的 94 $^{\circ}C$ 30 s, 50 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 2 min, 最后 72 $^{\circ}C$ 10 min 延伸。

以 PCR 产物的 *abcb15* 基因 5'旁侧区、*abcb15* 基因 3'旁侧区及 *neo4* 基因盒这 3 个片段为模板, 用巢式引物(*abcb15nest_f*+*abcb15nest_r*)经 PCR 搭桥法将这 3 个片段拼接起来, PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR 缓冲液 0.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.4 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L, 10 μ mol/L 引物 1 μ L, 模板 0.3 μ L, Taq 酶 (Promega) 1 U, 补水至 25 μ L; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}C$ 10 min, 中间 35 个循环的 94 $^{\circ}C$ 30 s, 50 $^{\circ}C$ 1 min, 72 $^{\circ}C$ 5 min, 最后 72 $^{\circ}C$ 10 min 延伸。

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化目的 DNA 片段, 之后将回收 DNA 片段用高压气体基因枪(新芝生物科技有限公司, 宁波)转染进饥饿时期的嗜热四膜虫 B2086 株中, 转化子用巴龙霉素药物进行筛选^[21]。在 1 μ g/mL $CdCl_2$ 诱导条件下, 四膜虫大核染色体上 45 个拷贝的 *abcb15* 基因被 *neo4* 基因部分替换, 得到 *abcb15* 基因的敲降株(knock-down

strain), 命名为 *abcb15*-KD 细胞株, 基因敲降示意图见图 2。

野生型四膜虫和 *abcb15*-KD 细胞株在 4 mg/L 浓度的 DDT 中胁迫 24 h, 然后提取 RNA 并分别反转录成 cDNA; 以此 2 种 cDNA 为模板, 用表 1 的 *abcb15_f*+*abcb15_r* 引物分别进行实时荧光定量 PCR 扩增, 内参基因选择嗜热四膜虫 18S rRNA 基因, 实时荧光定量 PCR 的反应体系、反应条件及数据分析参考文献[13], 对其中 *abcb15* 基因表达水平最低的细胞株作为下游实验的对象。

1.5 四膜虫生长速率分析

野生型嗜热四膜虫 B2086 株和 *abcb15*-KD 株均培养至早对数生长期($\sim 3 \times 10^5$ 细胞/mL), 然后分别转接到 20 mL 新的 SPP 培养基中, 调整细胞密度至约 1×10^4 细胞/mL, 并随即添加 DDT 母液至终浓度 256 mg/L 和 $CdCl_2$ 至浓度为 0.05 μ g/mL。细胞在 30 $^{\circ}C$, 90 $\times g$ 离心 1 min 条件振荡培养, 然后分别于 0, 3, 4.5, 8, 10.5 或 14.5 h 后取样 200 μ L, 用细胞计数仪进行计数, 计算生长模型^[22]。四膜虫刚转接至新的培养基中, 会出现一个生长延滞时期, 时间长度约为 0~3 h,

图 2 *abcb15* 基因的敲降过程

此时的生长模型计算公式为: $N_B = N_A \times \exp(k \times t)$, 其中: N_B 表示在 B 时间点的细胞密度, N_A 表示在 A 时间点的细胞密度, k 表示生长速率参数(h^{-1}), t 表示特定的一个时间点. 一旦四膜虫的生长激活, 细胞随即会进入指数型增长方式, 对应的生长模型计算公式为 $N_C = N_B \times 2^{t/G}$, 其中: G 表示传代时间(h), N_C 表示在 C 时间点的细胞密度.

2 结果

2.1 四膜虫 *abcb15* 基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

四膜虫 *abcb15* 基因的全长为 4937 bp, 包括 9 个外显子、8 个内含子. 其转录的 mRNA 全长 4157 bp; 其中 5', 3'非翻译区分别为 49, 151 bp, 开放阅读框包含 3957 bp, 编码氨基酸 1318 个; 在 3'非编码区发现纤毛虫特有终止信号 AATTAA^[23].

基于 ABC 转运蛋白结构域的特征^[24], 可知 ABCB15 氨基酸序列包含 2 个高度疏水的跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)和 2 个核酸结合结构域(nucleotide-binding domain, NBD), 即其结构域组成形式为: TMD-NBD-TMD-NBD, 其中的 NBD 部分还含有 Wakler-A, C-loop 及 Walker-B 这 3 个高度保守的特征性结构基序(图 3).

2.2 四膜虫 *abcb15* 基因对 DDT 响应特异而灵敏

在 4 mg/L 浓度的 DDT 胁迫下, 用 microarray 技术从四膜虫中筛选出一批差异表达基因, 其中表达水平上调 2 倍以上的基因有 75 个, 包括已报道直接参与 DDT 解毒代谢相关的基因 ABC 转运蛋白

(ATP-binding cassette transporter)^[11]. 结合本课题组之前对嗜热四膜虫生长、饥饿、接合这 3 个重要生理时期的 microarray 结果^[8], 发现 *abcb15* 基因(TTHERM_00240450)在 DDT 胁迫条件下具有最高的表达水平(图 4).

2.3 四膜虫 ABCB15 蛋白为膜蛋白

首先用软件 WoLF PSORT 和 TargetP 1.1 对 ABCB15 蛋白的亚细胞定位进行预测, 发现该蛋白定位于细胞膜上, 预测为膜蛋白. 进而用 GFP 标记到 ABCB15 蛋白的 C 端, 观察活细胞内融合蛋白 ABCB15-GFP 的分布情况. 在荧光显微镜下观察到该融合蛋白主要分布在细胞周围, 与预测的 ABCB15 定位细胞膜上一致(图 5), 这说明, ABCB15 蛋白是一个膜蛋白.

2.4 四膜虫 *abcb15* 基因敲降株表现为更弱的抗 DDT 胁迫能力

采用 *neo4* 基因替换四膜虫大核染色体上约 45 个拷贝的 *abcb15* 基因, 得到 *abcb15* 基因的敲降株 *abcb15*-KD. 在 4 mg/L 浓度的 DDT 胁迫 4 或 24 h 后, 实时荧光定量 PCR 结果显示, *abcb15*-KD 细胞株内的 *abcb15* 基因表达水平是相同处理条件下野生型四膜虫内的 0.052 或 0.133 倍(图 6), 这说明, *abcb15*-KD 细胞株内的 *abcb15* 基因被 *neo4* 基因有效敲降了.

在 4 mg/L 浓度的 DDT 胁迫条件下, *abcb15*-KD 细胞株的生长速率慢于野生型, 它们的传代时间在 14.5 h 内分别为 2.7 和 3.5 h($P < 0.05$), 这说明, *abcb15*-KD 细胞株的生长速率在 DDT 胁迫条件下受到了抑制.

	GAATAGCTTAAACATATATAATCGATTAACTGAAACATATATAAAAA	-1	T Q S R L A S Q S S Q T L N T E Q E F L	
	ATGGAAGAAAGTCATTATAAACTAGAAAAACCACTTAAATTTAGAAATTAAGAA	60	AATGAAGCAGGAAGTAAAAATTAGAAATGCTAAAAATTGATTAGCAATTTAAAAACT	2520
	M E E K S L Q N L E K P T Q N Y E D Q E		M K Q E S Q N Q N C Q K L I Q Q F Q N L	
	GTGCGACATGGTAAATACCATTTTGGCATCTATTTAACTAGCATGAAACTGATATC	120	GAATAATATAAAGAAGAAGATGATGATAATGATGATGAAGAAGCTAAAAAAGCAAT	2580
	V A D G K I P F W H L F K L A S K T D I		N N I K E E D D D D N D D E E A Q N K A I	
	ATTTTAGTTGTTTAGGAAGCTTAGCTTCTGTTATAAATGGTGTCTGTAGCCACTTTT	180	AAGAAGTCTTTTAGCAGCTAAACTAAAAACCCCAAAACAAATAGAGATAGAGAATA	2640
	I L V V L G S L A S V I N G C L Q P L F		R S S F S S Q T Q N T P K Q I E I V E Q	
	GGTCTACTATTTGGTGAATGGCATAAAATTTAGCCCTGGATATAGCGCGATGCGATT	240	AAATATTATTGATTTATAGATAATTTAGAATACAATGTGAAGTAGAGCTAAGAAAAGAC	2700
	G L L F P G E M A Q K F S P G Y S A D A V		N I I D L Q N I Q N T N V K Q A Q E K T	
	GTGGATAACTGCAGGACTATTGCATTATGGTTTGTGGAATTGGAGCAAgtaatttttt	300	AAACGATTAGGTATTATGAAAAGACTTTTCTTTATAATAGAAATAAACCACTAATTA	2760
	V D N C R T I A L W F V G I G A I		N D Q G I M K R L F S Y N E K Q T I N Y	
	ttagtttgaattttgatctcatcataaaggtagagataaagaataatgcctaca	360	TGTGCTTGTTTCTTTTGTCTATTGGCAATGGAGCTTGTATCTCTTCAGTGGGTACGT	2820
	tcttttaataaattttgtaagtatataatcaaaccttttaacttttttataattaagaatATCA	420	V L G F L F A I G N G V C Y P F S G Y V	
	S		GCTTGGTAAATCAGTGAATGTTGCTTATAGAACAGAAAGTATTTAGAGAACAAAG	2880
	TTTATACCTTCAATCTTATGATGACTTTTGGATCAGCGTGGTTAGAGATAGGCAATA	480	L G K I S D V L L D R T R S D P R E Q S	
	F I L S I F M M Y F W I S V G Q R Q A I		CAATTGTAAAGTCTTATTTTGTATTGGGTTTAGCAAACTCTGCATGCTACTTT	2940
	AAATTTAGTTAGTACTTAAAGTCTTGTCTCAATAAGAAAGTAGTATTATTGATTAA	540	N L Q S L Y F L I L G L A Q L L T C T F	
	K F R L E Y F K S L L K Q E V G Y F D Q		CTAATTTACTCTCTCGAGAGTAGCTGAATACTGAATCAAGTCTAAGAGAGTCT	3000
	ATTTAGGCAATGAGCTTTCATCAAGATCTACTGATGCTTCAAAATATAGTCAGCA	600	Q F Y F F S R V A E Q L T F K L R K D L	
	I Q A N E L S S K V S I E C P K I Q S A		CTTTAAAAATATTGAAATGCTCTATTCTGTGGTTGATCACCCCTATAACTCTCTGG	3060
	TGGGAGAAAAACATGCATCTTATTTATTTCATTGAGTATGTTTATGGTAGCTTTATA	660	F Q K Y L K M P I S W F D H P H N T P G	
	L G E K T C I F I Y S L S M F I G S L I		ATCACTTACAAAAATTATCAACTGATGCCAGCTGTCATTAATGTAGCAGGCTTAC	3120
	ATAGCCTTTATTAGGGATGGCAATGCTCTTGGCAATTGCTGTAAACACCCTTATA	720	S L T Q K L S T D C Q A V N N M T S Q	
	I A F I R G W Q I A L V A I A V T P L I		TCTTGGAAATTAAGtaataataataaattttgtatagatagatttaataagaataattt	3180
	GCTTCAGCAGGCTACTTTGACTAATGGGTTTCAGAGGAATTTGAAAAAGACAGCTCA	780	L G I Q	
	A S A G Y F D Q W W V S E G I V K K T S S		aattttttcaataaagCTTCTTAATGTAAGCTCTTTGGTCAGTGCTTTAGCTTGGCTT	3240
	GCCATTACTCTCGAGGAGTATCTGAGTAGGCCATAAGCCGTATTAGAACAGTAAAA	840	L S N V S S L V S A L A L A F	
	A Y S S A G G I S E Q A I S A I R T V K		TTTCAGCAGATTGGAGAACCCCTAGTGGTTTAGCTTATGCTTGTAGTGGTTTGA	3300
	GGTTTAAATGGTTAGATTTCGAATAAAATAATATTAACGATGATCAGAAAGCATTC	900	S A D W R T T L V G L S L M P L M V L S	
	G L N G Q D F E Q N K Y Q S M I K K A F		GTTAGGCTTGGTATATGAGCAGAAATGGAGGCTTTGGAGAAAAAACTGATGCCGATTA	3360
	TAAGTCTCTTTAAAGTTTCTATCTATGAAGGTGGTGGATTAGtaaatcatttaattt	960	Q A W Y M S R M E G F G E K T D A A F R	
	Q V S L K F S I V E G V G L G		GGGATTCACCAATATGATAAATGAAGCTGCTTGTAAATTAAGAACCCTGACTAGTTTG	3420
	ttatcttactcaataaataataaaaaatacacacagaaaaattgtatacaaataggttat	1020	D S T N M I N E A A C N I R T V T S F G	
	tagttattttttgatgtaagtcaataaattgaaactatttttatatttaccaaaagattt	1080	GAACAATTAGCAATTAGTCCAAATTTTACATAAATTTAGATAAAAAATATCAAGAGA	3480
	ttaaactaaataattttgaataattctctttacttaaaagGACTTTAAAATATGATGTT	1140	N N Q Q L Y Q N F T Q I L D K N I K E I	
	L Q N M M F		TAAAAAACTGCTCTGGAGCAGGCTTGCTATAGCATGCACAAATTCATTTTGTGTG	3540
	TTTCTTGAATTTGCTTTGACTTTTGGGTAGGATCAAAATTTATGAAGCAGAGTTTA	1200	K K S A L E A G L A I A C T N F I L F A	
	F D F A L T F W V G S K F I E D E V Y		gtaatttcttaatacaaatataaaaaataataaataaattttatttctttatctagCTA	3600
	TAATCATATAAAGAAGAAGCTATATTTTCTGATGATTAAGTGCATTTTATGCAAT	1260	I	
	N H N Q G R S Y N F S D V L T A F L A I		TCTATGGTACAATCTTTTATGCAGGATCTACTTTTATAGGGATTATGATCTTCGATTG	3660
	TATGATGAGCAGCTCGAATTAGGCTAAGCTATGAACCTCTATTAAGGCTTCTCACTCAGC	1320	Y G T I F Y A G S T F H R D Y D L S I V	
	M M S S F E L G Q A M N S I K A F T Q A		TTGATATGTTATTCTTCTAATTATGCGCTAATGTTTGTGCTATTGCTATAGtaataat	3720
	TGCTCAGCTGGATTACATGTTTAAgtataaataatagccagtttaattgattttttta	1380	D M F I S I Q C L M F A A I G I G	
	R Q A G F N M M F Q		aagatcatttttttagatgtcttaataagaatttttagatcacatttttaatttttagtattc	3780
	aaatagatgtttaaatttttgcctacaactcaaattaatttttaataattgcttaaaatta	1440	gaaattatctllttacaaataattacaaataacaaagGCTCAACAGCTCAATTATTTGGGA	3840
	ccattcaaatatttaaaattttttcaataaataaataaaaaagATATTAAATAGAAAATCTA	1500	S N S H Y L G	
	I L N R K S K		GATGTAGGTACTCTATAAAATGCTGCAAGGGTATTTTCTAGGTTCTTGATAGTGAAC	3900
	AAGTAGATTAAATGAGAAGCGTATTGACTTAACATAAAAAATAAATCAATGGAGAAATTA	1560	D V G T S Q N A A K G I F Q V L D S V D	
	V D L N E N G I D L T K K Q I N G E I K		GAAATCAATTGAATATTTAAATTTGCAATAACCAAGATATCACGGAGAGAAATAAATT	3960
	AAITTGAAATGTAGATTTCCTTACCCACTCATCTTGATACAAGATTCTGAAAAATT	1620	E N Q L N I L N F D N Q D I H G E I Q F	
	F E N V D F S Y P T H L D T K I L K N L		AAGAAGTACTTTTAAATACCAAAAGAGATTAGATTATCTTAAAGAGTGTCTTTT	4020
	TAATATCTCAATATAAAGCTCACAATAAAAGCAGCTTTTGTAGGTGAACAGGAAGgtatt	1680	K N V T F K Y P Q R D Q I I L K D V S F	
	N I S I Q P H K K T A F V G E S G S		ACCATTCTCGAGATGAGAAAGTGTCTTGTGGACCTCTCGAGCAGGCAATCTCTCT	4080
	ttacttaattctcttcaaaataggatgtatttaaaattttatttttttcaaaatttagTGG	1740	T I P A G Q K V A F V P S G A G K S S	
	U		ATTATCAATTGATATAAGATTTTATGATACTACTAGGAGAAATTTTATTAGATGGT	4140
	AAAATCAACTATAGTTTAGCTATAGAGAGATTTTATGACCCATAATTTGGCAATATTTA	1800	I I Q L I Q R F Y D N Y Q G E I L L D G	
	K S T I V Q L I E R F Y D P Q F G N I Y		GTTGATATAAAGAACTATGATTTGTGAAATACCGTCTCAAAATTTGAGATTATGCTAA	4200
	TTTGGATGGTGTCAATCAAGGACTTTAAATTAACCTCTCTCGTTAAATCTATCGGATA	1860	V D I K N Y D L L K Y R S K F G V V S Q	
	L D G V N L K D F K L T S L R Q S I G Y		GAGCCAACTTTTACGGGAACATCAAGAAAAATATAATTACAATCTAGAAATGTA	4260
	TGTAGATAGAACCUGTCTTTTGTGCTACTACTATTAGAGAAAAATCTATATATGATA	1920	E P T L F T G T I K E N I I Y N T E N V	
	V G Q E P V L F A T T I R E N L L Y G K		AATGAATAATAAATAGAAATCCATACTAAATAAGTAAATGCCTATGATTTCTACTAAT	4320
	AAGAGATGCAACTGAAGACAAATGATTGAAGCTCTCAAAATAGGCAACCGCTTGGTAATT	1980	N E Q Q I E S I T K Q V N A Y D F I T N	
	R D A T E E Q M I E A L K Q A N A W Q F		TATTCAAAAAgtaagcttttttttctatttaatactctttatttaataatattttttttta	4380
	TATTGAAAAATTAGAGAAAGTTAGATACTTATGTTGGTACACTGCTGCTTAATTCTC	2040	Y S K N	
	I E K L E K G L D T Y Y G T S G A Q F S		aaagATGGCTTAATGGATTGATAGATAAGTGGTTGAAAGGAAATTAATTAAGTGGT	4440
	AGGAGGCTAAAAGTAGCTATTAGCATGCAAGAGCTATTTTAAAAATCCAAAAATCT	2100	G V N G F D R Q V G L K G N Q L S G	
	G G Q K Q R I S I A R A I L K N P K I U		GGATAGAAATAAAGAATTGCTATTTGTAGAGCTATGATTAAATAACCAAAATTAAGCTA	4500
	TTTGCTTGATGAAGCTACTAGTGCTTTAGACCGTAAAAATGAAGCTCAAAATTAAGCAC	2160	G Q K Q R I A I C R A M I K Q P K M U	
	L L D B A T S A L D R K N E A Q I Q S T		CTAGATGAGCAACAGTCTTTAGATTCACAAAATGAAAAATAGTCTAGAAATCCCTA	4560
	TTTAGCTCTGTTCTAAAGGATTACAAACCATCGTTGAGCCACAGACTATCAACAAT	2220	L D B A T S A L D S Q N E K I V Q E S L	
	L D S V S K G L T T I V V A H R L S T I		AACGAAGCAATGAAACAAAAAAGTATTGTTGGGCCACAGAAATATCTACTATTAAA	4620
	ACAAATTCAGATGAATAATTGTTTAGATAAAGGAGTAGTCGTTGAAAGAGGAACCTCA	2280	N E A M K Q K T S I C V A H R I S T I K	
	Q N S D E I I V L D K G V V V E R G T H		GATTGAGATATGATCTATGTGTGAGAAAATGGCAACATAGTCGACGACGAAAAATGAT	4680
	TGATGATTATTAAAAACAATGGTCTTATTTTAAATTTGTAGAAAAATAAAAAATAAT	2340	D S D M I Y V M E N G N I V E Q G K Y D	
	D D L L K N N G A Y F K F V E K Q K I I		TAATTGATGAATTAATAAATAATTCTATAAATACAGTTAGGTAGTCTTAAATGAATG	4740
	AGAAAAAGAGCAGAAAAATAAGCTGCTCATAAACATAAAACTTTATGTTGCTGGGAGA	2400	Q L M N L K N N F Y K L Q L G S Q *	
	E K E Q E K Q A A H N N K T L C L L G E		AATGAAGAATGCTATAAAAAAATTTAGCATACAAAAATTAATTTTAAATTTCTTG	4800
	AACATATCAGATTAGCATCTTAGTCTCTTAAACTCTAAATCAGACAAAGAAATTTT	2460	TAAAAATATTATTATACATCACTATTATGATTTTAATTTCAAGTTATCTTTTAATA	4860
			TAAATTTAATTAATATTTAAAAATTC	4888

图3 四膜虫 *abcb15* 基因的 cDNA 序列及推到的氨基酸序列

实心下画线表示预测的跨膜结构域, 浪线下画波表示预测的核酸结合结构域, 小写字母表示内含子, 方框标记的氨基酸序列表示预测的 Wakler-A, C-loop 及 Walker-B 等结构域, 3'非翻译区用实心下画线标记了可能的转录终止信号

图 4 *abcb15* 基因在四膜虫 3 个生理时期及 DMSO, DDT 及 TCDD 处理条件下的 microarray 表达谱

生长时期的 1 个时间点 L 对应约 1×10^6 细胞/mL; 饥饿时期的 3 个时间点 S0, S9, S24 分别对应约 2×10^5 细胞/mL 四膜虫在 10 mmol/L pH7.5 Tris 缓冲液中饥饿了 0, 9, 24 h; 接合生殖时期的 3 个时间点 C0, C10, C18 分别对应相同体积的 B2086 与 CU428 细胞混合了 0, 10, 18 h (TGED, <http://tged.ihb.ac.cn/>)

图 5 ABCB15 蛋白的亚细胞定位

A: 荧光显微镜下观察 ABCB15 的 C 端用 GFP 标记所制备的融合蛋白在四膜虫体内的亚细胞定位情况, 融合蛋白构建示意图见其上方; B: 普通光学显微镜下观察四膜虫的形态; C: 荧光显微镜下观察四膜虫经 DAPI 染色后的大小核

图 6 野生型与敲降株内 *abcb15* 基因表达水平的比较

WT: 野生株; KD: *abcb15* 基因敲降株. WT 和 KD 在 256 mg/L 浓度的 DDT 处理 4 和 24 h 后, 用实时荧光定量 PCR 检测 WT 和 KD 内的 *abcb15* 基因表达水平. 每个样品均独立重复 3 次, *: $P < 0.05$

3 讨论

3.1 DDT 是四膜虫 ABCB15 蛋白的结合底物

ATP 结合盒转运蛋白超家族属于最高度保守的

基因家族之一, 在细菌、古细菌、真菌、原生动物、植物、动物内均广泛分布, 它几乎能泵送所有跨膜物质, 如离子、糖、氨基酸、多肽、代谢毒物或外源有毒化合物、药物等^[25]. ABCB15 的蛋白质结构域为 TMD-NBD-TMD-NBD, TMD 提供了转运底物结合的位点, NBD 上含有结合核苷酸的“Walker A”、在 ATP 结合状态下与核苷酸接触的“C-loop”、以保守的谷氨酸残基藉由水分子对 ATP 进行亲核攻击的“Walker B”等结构域^[24]; 上述结构使 ABCB15 成为一个 ABC 全转运蛋白(full transporter).

人体内的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是一个 ABC 转运蛋白, 它是肿瘤治疗过程中常见的对化疗药物产生耐药导致临床化疗失败及生存预后差的主要原因. 当一种药物作用于肿瘤细胞后, 诱导 P-gp 表达使肿瘤细胞产生耐受能力, 并造成该肿瘤细胞对未接触过的、结构无关、作用靶点不同和机制各异

的其它抗肿瘤药物也具有耐受性,产生交叉耐药,ABC 转运蛋白在人体内也称为多药耐药蛋白(multi-drug resistance, MDR)^[26]. P-gp 在人体内由 *mdr1* 基因和 *mdr2/3* 两个基因编码,在啮齿类中由 *mdr1*, *mdr2*, *mdr3* 这 3 个基因编码,仅人的 *mdr1* 与啮齿类的 *mdr1*, *mdr3* 能赋予细胞多药耐药的性状^[27]. 本研究中,四膜虫 *abcb15* 基因与人的 *mdr1* 均属于 ABCB 家族,二者间的氨基酸一致性达 32.3%,高于酵母 STE6 与人的 26.2%^[28],由此推测: ABCB15 蛋白也很可能具有与 P-gp 一样的功能来泵送外源化合物.

在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DDT 处理条件下,编码人肝癌细胞 HepG2 的 *mdr1* 基因表达水平较对照组提高了 2~3 倍,进一步用罗丹明(rhodamine)染色可观察到 DDT 是 P-gp 的底物;在 HeLa 细胞中用相同浓度 DDT 处理也可诱导 *mdr1* 基因的表达水平上升 2 倍,但编码另外 3 种 ABC 转运蛋白的基因(*bcrp*, *mrp1*, *mrp2*)表达水平却没有发生变化^[29]. 证明人细胞内部分 ABC 转运蛋白如 P-gp 可识别 DDT 作为底物来泵送至胞外,起到保护细胞的作用. 在本研究中, microarray 结果显示,四膜虫 *abcb15* 基因仅对 DDT 具有响应能力,而在四膜虫 3 个重要的生理阶段——生长、饥饿、接合生殖,以及化合物 TCDD 胁迫下均不表达,这说明四膜虫 ABCB15 能够识别 DDT 作为其转运的底物.

3.2 四膜虫 ABCB15 蛋白是一个膜泵蛋白

ABC 转运蛋白作为跨膜运输的重要蛋白,分布于细胞的质膜及各种细胞器膜上,如酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)内的全部 11 个 ABC 转运蛋白用 GFP 标记后发现它们分别位于细胞膜(2)、液泡膜(4)、线粒体膜(2)、内质网膜(2)、胞饮体和高尔基体膜(1)^[30]. 首先采用软件 WoLF PSORT 和 TargetP 1.1 对于四膜虫 ABCB15 的亚细胞定位情况进行预测,发现 2 种软件预测结果一致: 该蛋白定位于细胞膜上.

为验证该预测信息,将 *abcb15* 基因置于 *mtt1* 基因启动子和 *gfp* 基因中间,所得连接片段通过 Gateway 同源重组系统快速替换掉 PICC 载体上的致死基因 *ccdB*^[18],很方便地得到了 ABCB15 蛋白 C 端用 GFP 标记的表达载体. 在 Cd^{2+} 存在条件下, *mtt1* 基因启动子驱动 ABCB15-GFP 融合蛋白的表达,四膜

虫细胞周围产生绿色荧光(图 5),这与之前有研究者在酵母(*S. pombe*)中对布雷菲德菌素 A (Brefeldin A)耐受的 ABC 转运蛋白 Bfr1p 用 GFP 标记后所得的现象一致^[30];该结果证实, ABCB15 定位于四膜虫细胞膜上,为细胞膜泵蛋白. 由此推测,膜泵蛋白 ABCB15 能够将进入细胞内的 DDT 转运至细胞膜外,藉以提高四膜虫对 DDT 的耐受能力.

3.3 膜泵蛋白 ABCB15 有助于提高四膜虫对 DDT 的耐受能力

野生型四膜虫体内有 2 个细胞核: 小核是生殖核,有 5 对染色体,在生长时不表达;大核是营养核,有约 225 条染色体,每个基因拷贝数约为 45 倍,在生长期表达活跃^[10]. *neo4* 基因表达盒两侧连接上 *abcb15* 基因的 5'旁侧区和 3'旁侧区,所得连接片段转染进野生型四膜虫后,在巴龙霉素药物筛选压力下通过同源重组能替换掉大核染色体上的部分 *abcb15* 基因拷贝,从而获得 *abcb15* 基因的敲降株 *abcb15-KD*.

在 4 mg/L 浓度的 DDT 胁迫条件下, *abcb15-KD* 细胞株和野生型的传代时间分别为 2.7 和 3.5 h,即 *abcb15* 基因表达的降低减弱了四膜虫对 DDT 的耐受能力. 同样在小鼠(*Mus musculus*)中,将编码 P-gp 蛋白的基因敲除后,发现抗抑郁药物阿米曲替林(amitriptyline)更容易透过小鼠的血脑屏障,药物在小鼠敲除株脑部中的浓度要显著高于对照组^[31]. 人体 ABC 转运蛋白 P-gp 介导细胞耐药的机制主要为: (i) 药物扩散进入细胞后,与 P-gp 上的 TMD 结合,同时 NBD 结合 ATP 并使之水解释放能量,将药物从胞内排出,导致细胞内药物浓度不断下降,药物对细胞的毒性作用因而减弱; (ii) 许多亲脂性抗癌药物穿过细胞膜所需的时间较长,在脂质双分子层之间便足以与 P-gp 上的 TMD 相结合,导致药物未进入细胞内就被排出^[32,33]. 四膜虫体内的 ABCB15 膜泵蛋白可能与肿瘤细胞内 P-gp 或与小鼠脑细胞内介导细胞耐药相类似的方式来实现四膜虫对 DDT 的耐受能力,而 *abcb15* 基因的敲降所造成的在 DDT 胁迫下相应四膜虫敲降株生长速率的降低,则进一步反映出 ABCB15 膜泵蛋白对 DDT 的外泵能力是非常强烈的,并通过这种外泵机制保护了细胞,减轻了 DDT 对细胞的损伤.

参考文献

- 1 Eskenazi B, Chevrier J, Rosas L G, et al. The Pine River statement: human health consequences of DDT use. *Environ Health Perspect*, 2009, 117: 1359–1367
- 2 Mandavilli A. Health agency backs use of DDT against malaria. *Nature*, 2006, 443: 250–251
- 3 Lovett R A. Oceans release DDT from decades ago. *Nature*, 2010[2010-01-07]. doi: 10.1038/news.2010.4.html
- 4 Hemingway J, Hawkes N J, McCarroll L, et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol*, 2004, 34: 653–665
- 5 Hoff R M, Strachan W M J, Sweet C W, et al. Atmospheric deposition of toxic chemicals to the Great Lakes: a review of data through 1994. *Atmos Environ*, 1996, 30: 3505–3527
- 6 ATSDR. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2002
- 7 Eisen J A, Coyne R S, Wu M, et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol*, 2006, 4: 1620–1642
- 8 Miao W, Xiong J, Bowen J, et al. Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS One*, 2009, 4: e4429
- 9 熊杰, 陆星亦, 陆钰明, 等. 四膜虫基因表达数据库: 四膜虫全基因组基因表达芯片和协同表达分析的数据资源. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 1087–1089
- 10 缪炜. 原生动四膜虫“小材”有“大用”. *生物学通报*, 2010, 45: 1–4
- 11 畅悦, 冯立芳, 缪炜. 有机污染物二氯二苯三氯乙烷、三丁基锡和 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英暴露下的四膜虫毒理基因组学研究. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41: 502–511
- 12 Miao W, Yu T, Orias E, et al. Identification of differentially expressed genes in *Tetrahymena thermophila* in response to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by suppression subtractive hybridization. *Environ Microbiol*, 2006, 8: 1122–1129
- 13 Feng L F, Miao W, Wu Y X. Differentially expressed genes of *Tetrahymena thermophila* in response to tributyltin (TBT) identified by suppression subtractive hybridization and real time quantitative PCR. *Aquat Toxicol*, 2007, 81: 99–105
- 14 郭利娜, 俞婷, 冯立芳, 等. 四膜虫 *omc* 基因的克隆及在滴滴涕(DDT)暴露下的表达分析. *应用与环境生物学报*, 2010, 16: 216–221
- 15 Xiong J, Feng L, Yuan D, et al. Genome-wide identification and evolution of ATP-binding cassette transporters in the ciliate *Tetrahymena thermophila*: a case of functional divergence in a multigene family. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 330
- 16 Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: W585–W587
- 17 Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, 2000, 300: 1005–1016
- 18 Yao M C, Yao C H, Halasz L M, et al. Identification of novel chromatin-associated proteins involved in programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1978–1989
- 19 Gaertig J, Kapler G. Transient and stable DNA transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation. *Methods Cell Biol*, 2000, 62: 485–500
- 20 Mochizuki K. High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. *Gene*, 2008, 425: 79–83
- 21 Bruns P J, Cassidy-Hanley D. Biolistic transformation of macro- and micronuclei. *Methods Cell Biol*, 2000, 62: 501–512
- 22 Whiting R C. Microbial modeling in foods. *Crit Rev Food Sci*, 1995, 35: 464–494
- 23 Boldrin F, Santovito G, Negrisolo E, et al. Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa*: evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist*, 2003, 154: 431–442
- 24 Hollenstein K, Dawson R J, Locher K P. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 412–418
- 25 Holland I B, Blight M A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*, 1999, 293: 381–399
- 26 Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem*, 2006, 13: 1859–1876
- 27 Borst P, Elferink R O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 537–592
- 28 McGrath J P, Varshavsky A. The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, 1989, 340: 400–404
- 29 Shabbir A, DiStasio S, Zhao J, et al. Differential effects of the organochlorine pesticide DDT and its metabolite *p,p'*-DDE on p-glycoprotein activity and expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 203: 91–98
- 30 Iwaki T, Giga-Hama Y, Takegawa K. A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenine biosynthetic mutant. *Microbiology*, 2006, 152: 2309–2321
- 31 Uhr M, Grauer M T, Yassouridis A, et al. Blood-brain barrier penetration and pharmacokinetics of amitriptyline and its metabolites in p-glycoprotein (abcb1ab) knock-out mice and controls. *J Psychiatr Res*, 2007, 41: 179–188
- 32 Baguley B C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*, 2010, 46: 308–316
- 33 Borowski E, Bontemps-Gracz M M, Piwkowska A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52: 609–627