

长角血蜱保护性抗原基因 $P_{27/30}$ 的克隆和原核表达

杨彩明, 杨光友*, 张晓谦, 贾小勇, 余增莹

(四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘要: 采用 RT-PCR 技术首次从孤雌生殖长角血蜱四川株克隆到 $P_{27/30}$ 基因, 扩增序列全长 670 bp, 包含完整的开放阅读框, 编码 201 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量为 23.38 ku。同源性分析表明孤雌生殖长角血蜱中国株与日本株 $P_{27/30}$ 基因同源性高达 99.85%。经 RT-PCR 检测分析, 该基因在孤雌生殖长角血蜱的卵、幼蜱、若蜱、饥饿成蜱和饱血成蜱这几个阶段均有表达。将该基因亚克隆后连接到 pET32a(+) 原核表达载体, 转化 BL₂₁(DE₃) 宿主菌, 经 IPTG 诱导可成功进行表达。表达的目的蛋白大小为 24 ku 左右, 与预期大小一致; Western-blot 显示兔抗长角血蜱全虫抗体能够识别该重组表达蛋白。

关键词: 孤雌生殖; 长角血蜱; $P_{27/30}$ 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: S852.746; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)10-1406-05

Cloning and Prokaryotic Expression of $P_{27/30}$ Gene of Parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*

YANG Cai-ming, YANG Guang-you*, ZHANG Xiao-qian, JIA Xiao-yong, YU Zeng-ying
(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: With reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), $P_{27/30}$ gene was cloned from parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis* of China. The length of $P_{27/30}$ gene was 670 bp, it included complete ORF and encoded 201 amino acid residues, the deduced mass was 23.38 kDa. Its nucleotide sequence exhibited 99.85% similarity to that of the $P_{27/30}$ gene from Japan parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*. Results of RT-PCR analysis showed that the $P_{27/30}$ gene could express in the eggs, larvae, nymphs, fame adult ticks and engorgement adult ticks. After subcloned into expressing vector pET32a(+), it could express in *E. coli* BL₂₁(DE₃). The recombinant protein was about 24 kDa. With Western-blot analysis, the recombination express protein was approved to be able to recognize antibody of *Haemaphysalis longicornis*.

Key words: parthenogenesis; *Haemaphysalis longicornis*; $P_{27/30}$ gene; clone; prokaryotic expression

长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)为动物体表的专性吸血昆虫,其宿主种类多、地域分布广^[1-2],目前已在我国 17 个省区的多种动物体上发现该蜱^[3]。长角血蜱的生殖方式有两性生殖和孤雌生殖两种^[1],两性生殖较为常见,在日本和我国的上海、四川等已发现孤雌生殖种群^[4-9]。该种蜱的刺吮不仅给宿主动物带来瘙痒、皮炎、贫血和消瘦等直接

危害,还可传播多种病原体(细菌、病毒及瑟氏泰勒虫、牛卵圆巴贝斯虫和犬吉氏巴贝斯虫等血液原虫),是严重危害我国畜牧业的重要蜱种之一。

抗蜱免疫被认为是目前控制蜱与蜱传疾病最有潜力的方法之一^[6-8],但在我国有关长角血蜱保护性抗原基因与抗蜱疫苗尚无研究报道。作者在完成孤雌生殖长角血蜱各期虫体形态学研究的基础上^[9],

收稿日期:2007-10-15

基金项目:四川省学术带头人培养基金资助(55035)

作者简介:杨彩明(1982-),硕士,从事动物寄生虫病学研究

* 通讯作者:杨光友(1964-),博士,教授,从事动物寄生虫病学研究, E-mail:guangyou1963@yahoo.com.cn

开展了孤雌生殖长角血蜱四川株保护性抗原基因 $P_{27/30}$ 的克隆与原核表达研究,为抗长角血蜱基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 长角血蜱

孤雌生殖长角血蜱的卵、幼蜱、若蜱和成蜱由本实验室保存并提供。

1.2 实验动物

体质量约 2 kg 的新西兰大耳白兔 2 只,由四川农业大学实验动物中心提供。

1.3 主要试剂与载体

RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DL2000 Marker、T-14 Marker、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、 T_4 DNA 连接酶等购自大连宝生物公司;PCR 扩增试剂盒(SK1492r)和 UNIQ-10DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司;GoldView 和 Loading Buffer 购自北京天为时代公司;感受态细胞 DH5 α 和 BL₂₁ (DE₃)、pMD18-T 载体和 pET32a (+)载体购自 Invitrogen 公司。

1.4 蜱总 RNA 的抽提

用 RNA 抽提试剂盒提取 RNA。取数只活的长角血蜱饥饿成蜱,加入 1 mL RNAiso Reagent 在研钵中研磨后离心,取上清液用氯仿分离,异丙醇沉淀,用 1 mL 75% 的乙醇洗涤后,室温干燥,用 RNase-free 水溶解提取的 RNA,最后用分光光度计测 OD 值,将 OD₂₆₀/OD₂₈₀>1.8 的 RNA 保留,存于 -70 °C。

1.5 引物设计与保护性抗原基因 $P_{27/30}$ 的扩增

根据 YOU 等在 GenBank 上登载的 $P_{27/30}$ 基因序列(AB051079),设计并合成 1 对引物:上游引物 5'-CAGGCTCCCGAAACATCAGA ACT-3';下游引物 5'-GCCTCGTTGTTTATTCCTCGTTCT-3',引物由上海生物工程公司合成。

根据 RT-PCR 试剂盒说明,以长角血蜱饥饿成蜱的总 RNA 为模板,Random 9 mers 为引物,合成 cDNA。然后以合成的 cDNA 为模板,用设计的特异性上、下游引物对目的基因进行 PCR 扩增。扩增程序:预变性 94 °C 2 min;变性 94 °C 30 s,退火 55 °C 30 s,延伸 72 °C 50 s,35 个循环;于 72 °C 延伸 10 min。扩增结束后取 5 μ L PCR 反应液用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查结果。

1.6 $P_{27/30}$ 基因的克隆与测序

将 UNIQ-10 DNA 胶回收试剂盒回收的 PCR 产物连接在 pMD18-T 载体上,然后转化 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆后,抽提阳性菌质粒进行 PCR 扩增检验。将扩增检验为阳性的重组菌送上海英骏生物技术有限公司测序。所得序列在 NCBI 上进行比对,并用 DNASTAR 进行序列分析。

1.7 $P_{27/30}$ 基因在长角血蜱不同发育阶段的表达分析

分别提取长角血蜱卵、幼蜱、若蜱、饥饿成蜱、饱血成蜱和兔白细胞的 RNA,合成相应的 cDNA。分别以长角血蜱这几个阶段的 cDNA 为模板,用阳性重组质粒作阳性对照,兔白细胞作阴性对照,用前面设计的 $P_{27/30}$ 基因的特异性引物进行 RT-PCR 扩增,分析 $P_{27/30}$ 基因在这几个阶段的表达情况。PCR 反应条件同 1.5。

1.8 $P_{27/30}$ 基因的亚克隆和原核表达

设计分别含 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的上、下游引物,上游引物 5'-CGGAATTCATGGGAGACGAGGAGAAGAG-3';下游引物 5'-GGGTTCGAATTGCCTCGTTGTTTATTCCT-3',引物由上海生物工程公司合成。

以测序正确的阳性克隆质粒为模板进行 PCR 扩增,回收目的片段,进行 TA 克隆。用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别对阳性重组质粒和表达载体 pET32a (+)进行双酶切,获得含黏性末端的片段和线状载体。16 °C 条件下用 T_4 DNA 连接酶连接 12~16 h 后,转化感受态细胞 DH5 α 。抽提阳性菌质粒,转化到表达菌 BL₂₁ (DE₃)中,取 PCR 扩增检验和双酶切鉴定为阳性的重组菌,测序验证。

取处于对数生长期的阳性质粒转化菌和空质粒转化菌,以 1:100 接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 220 r/min 培养 3~6 h,至 OD₆₀₀ 达 0.6 左右。然后将菌液分为 2 组。一组加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,剧烈振荡培养 1、3、5、7、12 h;另一组分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1、0.5、1、2 mmol/L,剧烈振荡培养 3 h。设空载体对照和阳性重组表达菌未加 IPTG 诱导的阴性对照。然后取细菌培养液 1 mL,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.9 $P_{27/30}$ 基因重组表达蛋白抗原性检测

1.9.1 全虫高免血清的制备 将数只饥饿成蜱加 PBS 研磨,离心后取上清,滤菌处理后测定蛋白含量。取兔 2 只,免疫前采兔血分离血清,做阴性对

照。一免:将蛋白含量为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的上清液与弗氏完全佐剂以 1:1 充分乳化后,取 3 mL 于兔皮下多点注射。二免:15 d 时将 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的上清液与弗氏不完全佐剂以 1:1 充分乳化后取 2 mL 注射兔。三免:25 d 时进行,方法同二免。32 d 时采集兔血清分离血清。经琼扩检测确定高免血清制备的效果。

1.9.2 Western-blot 检测重组表达蛋白抗原性以 Trx(空载体蛋白)为对照,将重组表达菌初提物做 SDS-PAGE 电泳,将分离蛋白转印到硝酸纤维膜上,用兔抗长角血蜱全虫的抗体做一抗(1:100 稀释),健康兔血清作为阴性对照,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:200 稀释)做二抗,DAB 显色 10 s,去离子水终止显色反应。

2 结果

2.1 $P_{27/30}$ 基因的克隆与鉴定

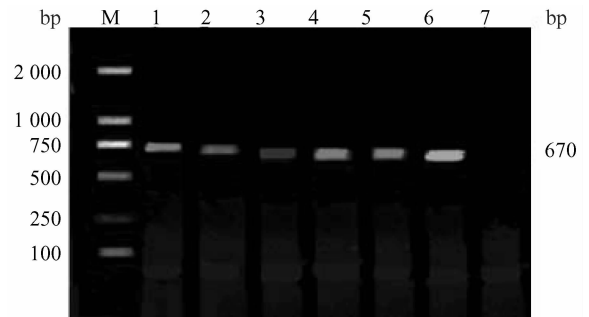
1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果表明,以饥饿成蜱 RNA 为模板,RT-PCR 扩增出与预期大小相符的约 670 bp 特异片段。回收后,成功连接到 pMD18-T 载体,并转化到感受态细胞 DH α 中。测序结果表明本次克隆的基因序列全长 670 bp,ORF 有 603 bp,编码 201 个氨基酸。与 YOU 等登陆到 GenBank 上的 $P_{27/30}$ 基因同段序列(AB051079)进行比较,同源性高达 99.85%。只在第 239 位碱基出现了 A \rightarrow G 颠换,软件预测相应氨基酸没有发生改变。测序结果已登录到 GenBank,登录号为 EF088685。

2.2 RT-PCR 分析 $P_{27/30}$ 基因在长角血蜱不同发育阶段的表达情况

以长角血蜱卵、幼蜱、若蜱、饥饿成蜱、饱血成蜱 cDNA 为模板扩增,均扩增出大小约为 700 bp 左右的特异条带,与阳性对照大小一致,而兔白细胞 cDNA 在对应位置没有见到扩增条带(图 1)。排除了长角血蜱 $P_{27/30}$ 基因受宿主污染的可能性,说明 $P_{27/30}$ 基因在长角血蜱这几个发育阶段均有表达。

2.3 $P_{27/30}$ 基因的原核表达

用含 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的特异性上、下游引物对鉴定正确的阳性克隆质粒进行扩增,得到了与预期相符的约 620 bp 片段,将该片段亚克隆后连接表达载体 pET32a(+).用内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 对重组表达质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,电泳结果表明在 620 bp 左右见到目的条带。经测序鉴定, $P_{27/30}$ 基因在预期位置正确插入,并且从



M. DNA 相对分子质量标准;1、2、3、4、5、7. 长角血蜱卵、幼蜱、若蜱、饥饿成蜱、饱血成蜱、兔白细胞的 cDNA;6. 重组质粒 DNA

M. DNA marker(DL2000);1,2,3,4,5,7. cDNA of eggs, larvae, nymph, female adult ticks, engorgement adult ticks, rabbit leukocytes;6. Recombinant plasmid DNA

图 1 $P_{27/30}$ 基因在长角血蜱不同发育阶段的表达情况
Fig. 1 Expression of $P_{27/30}$ in different development stages of *H. longicornis*

起始密码子到终止密码子碱基序列没有出现移码与基因突变,表明表达质粒构建成功。

2.4 重组表达质粒的 SDS-PAGE 电泳

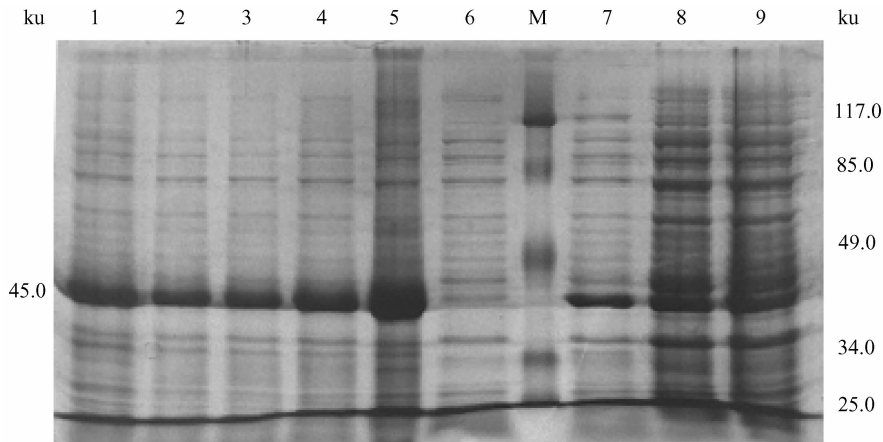
在 $P_{27/30}$ 基因重组表达菌中加入 1 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 下分别取诱导 1、3、5、7、12 h 的表达产物进行 SDS-PAGE 电泳检测。SDS-PAGE 电泳结果显示在约 45 ku 处有一明显的诱导条带。而空载体对照与阴性诱导对照在相应位置没有出现条带。PAGE 电泳结果显示与理论预测值一致,证明诱导表达成功。随着时间延长目的蛋白表达量逐渐增多,经过 12 h 的培养,目的蛋白表达量达到最大。37 $^{\circ}\text{C}$ 在不同 IPTG 诱导剂量下培养 3 h,取菌液进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果显示随着 IPTG 浓度的增加目的蛋白表达量有轻微的增加(图 2)。

2.5 Western-blot 抗原性检测

Western-blot 显色结果表明(图略),重组表达蛋白可被兔抗长角血蜱全虫抗体特异识别,而阴性对照在其预期位置无识别信号,初步判断该重组蛋白有反应原性。

3 讨论

3.1 $P_{27/30}$ 基因是 You 等用经长角血蜱反复叮咬的家兔的阳性血清,从日本株孤雌生殖长角血蜱卵的 mRNA 构建的 cDNA 表达文库中筛选出的一个基因^[10]。天然的该蛋白属于隐蔽抗原,而且有 2 种亚



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 1 mmol/L IPTG 诱导 1 h; 2. 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h; 3. 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h; 4. 1 mmol/L IPTG 诱导 7 h; 5. 1 mmol/L IPTG 诱导 12 h; 6. 阴性对照; 7. 0.1 mmol/L IPTG(3 h); 8. 0.5 mmol/L IPTG(3 h); 9. 2 mmol/L IPTG(3 h)

1. Induction for 1 h (1 mmol/L IPTG); 2. Induction for 3 h (1 mmol/L IPTG); 3. Induction for 5 h (1 mmol/L IPTG); 4. Induction for 7 h (1 mmol/L IPTG); 5. Induction for 12 h (1 mmol/L IPTG); 6. Expressing negative control; 7. IPTG induction at 0.1 mmol/L(3 h); 8. IPTG induction at 0.5 mmol/L(3 h); 9. IPTG induction at 2 mmol/L(3 h)

图 2 重组表达质粒诱导表达的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 2 SDS-PAGE of the expression of fusion protein

型,大小分别为 27 和 30 ku,在长角血蜱成蜱体内分布广泛,包括肌肉、表皮、中肠、唾液腺和脑等,在肌肉中尤其丰富,试验证明 2 种亚型蛋白抗原性无差异。由隐藏抗原诱导的宿主免疫应答可防止蜱的免疫逃避,对蜱造成更大的免疫损害^[10]。作者通过动物试验证明,用原核表达载体 pGEMX-2 表达的 $P_{27/30}$ 基因的重组蛋白免疫兔和小鼠后,宿主对幼蜱、若蜱、成蜱均产生抵抗力,吸血蜱出现损伤^[11-13]。

3.2 本试验在我国长角血蜱保护性抗原基因研究尚为空白的基础上,对四川首次发现的孤雌生殖长角血蜱进行了 $P_{27/30}$ 基因的扩增,扩增结果说明四川株孤雌生殖长角血蜱存在 $P_{27/30}$ 基因,而且与 You 等扩增的日本株长角血蜱序列只存在 1 个碱基的差异,同源性非常高^[10]。由于该碱基是对应密码子的第 3 位,所以软件预测相应氨基酸没有发生改变。通过 RT-PCR 扩增结果表明 $P_{27/30}$ 基因在长角血蜱卵、幼蜱、若蜱、饥饿成蜱、饱血成蜱各个阶段都有表达,说明该天然蛋白的表达在长角血蜱各个阶段较为稳定。

3.3 由于 $P_{27/30}$ 基因起始密码子前没有信号肽,本试验也采用了原核表达,表达载体为 pET32a(+). 经 IPTG 刺激,SDS-PAGE 电泳图中见到了大小正确的重组目的蛋白条带。Western-blot 方法分析表

明,兔抗长角血蜱全虫抗体能特异性识别重组表达蛋白,初步显示该重组蛋白有反应原性,为进一步研究抗长角血蜱疫苗打下了基础。

不同地域、不同生殖方式的长角血蜱该基因是否存在较大差异,以及其它蜱种是否存在该基因,是重组表达蛋白能否产生广泛保护性的关键因素,目前还在进一步研究中。

参考文献:

- [1] 邓国藩. 中国经济昆虫志[M]. 北京:科学出版社, 1978:69-71.
- [2] 颜忠诚,李春林. 长角血蜱产卵的研究[J]. 首都师范大学学报, 2000,21(1): 51-55.
- [3] 张舒林,姜在阶. 长角血蜱蜕皮激素分泌部位的研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 1997,33(4): 523-528.
- [4] 周金林,周勇志,龚海燕,等. 我国长角血蜱孤雌生殖种群的发现和生物学特性的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004,15(3):173-174.
- [5] 白 启,刘光远,韩根凤. 卵形巴贝斯虫在长角血蜱饱血雌虫及其卵内的发育形态观察[J]. 中国农业科学, 1996,29(1):89-92.
- [6] 高志华,刘敬泽. 蜱类防治研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2003,10(4):251-256.
- [7] DALTON J P,陈斌译. 寄生虫疫苗的现况与未来

- [J]. 信阳农业高等专科学校报, 2002, 12(4): 35-40.
- [8] 高金亮, 殷宏, 罗建勋. 蜱的免疫学防制研究现状[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(10): 39-44.
- [9] 杨彩明, 杨光友, 谢幼新, 等. 孤雌生殖长角血蜱各期形态的扫描电镜观察[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2007, 14(2): 104-109.
- [10] YOU M J, XUAN X, TSUJI N, et al. Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 32(1): 67-73.
- [11] SPARAGANO O. New approach in the vaccination against the tick-borne diseases: The vaccine against the ticks using internal antigens[J]. Epidemiologie et Sante Animale, 2002, 42: 95-98.
- [12] YOU M J. Immunization effect of recombinant P_{27/30} protein expressed in *Escherichia coli* against the hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) in rabbits[J]. The Korean Journal of Parasitology, 2004, 42(4): 195-200.
- [13] YOU M J. Immunization of mice with recombinant P_{27/30} protein confers protection against hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) infestation[J]. Journal of Veterinary Science, 2005, 6(1): 47-51.

动物疫情速递

老挝发生高致病性禽流感

2008年9月14日,老挝 Khambounheuang Bounkhouang 博士向 OIE 通报了高致病性禽流感疫情。疫情始于2008年8月27日,于9月4日确诊。此次疫情是临床发病,病原是 H5N1 高致病性禽流感病毒,依靠实验室检测作出诊断。疫区位于琅勃拉邦 Nambak 的 Fa 村,易感动物是鸭,共有 5 422 只,病例 247 例,死亡 197 例,销毁 5 225 只。这些鸭购于 2008 年 8 月 20 日,8 月 27 日开始死亡(死亡率每天 4%,随后增至 10%),经追溯,来源养殖场位于乌多姆赛 Xay 的 Nalae 村,该场有易感动物 1 170 只,病例 23 例,死亡 23 例。感染来源:非法的动物移运、合法的动物移运和引入新动物。老挝采取的控制措施:扑杀、国内限制移运、筛查、染疫场区消毒,并且禁止免疫,未对动物进行治疗。老挝上一次发生高致病性禽流感是 2008 年 2 月。

多哥发生高致病性禽流感

2008年9月18日,多哥向 OIE 通报了高致病性禽流感疫情。疫情始于 2008 年 9 月 9 日,于 9 月 16 日确诊。此次疫情是临床发病,病原是 H5N1 高致病性禽流感病毒,依靠临床和实验室检测(高级)作出诊断。加纳 Laboratoire vétérinaire d'Accra 实验室的 RT-PCR 和意大利 OIE 参考实验室的测序结果均为阳性。疫区位于滨海区 Agata-Dague 的 3 个现代化养殖场,易感动物是禽,共有 6 500 只,病例 4 131 例,死亡 4 131 例,销毁 2 369 只。感染来源尚不清楚。多哥采取的控制措施有扑杀、检疫、染疫场区消毒,并且禁止免疫,未对动物进行治疗。多哥上一次发生高致病性禽流感是 2007 年 12 月 31 日。

秘鲁发生鸡传染性喉气管炎

2008年9月13日,秘鲁向 OIE 报告了鸡传染性喉气管炎疫情。疫情始于 2008 年 8 月 11 日,于当日确诊。病原是传染性喉气管炎病毒。本次疫情属于临床病例,依靠怀疑、临床诊断、实验室检测和剖检作出诊断。疫区位于利马 San Luis 区的养殖场,易感动物是斗鸡和后院家禽,共有疑似禽 42 只,病例 26 例,死亡 26 例,销毁 3 例。秘鲁国家农业卫生部(SENASA)采取了以下措施:①在疫区及其附近进行筛查;②主动监测程序还将扩大到人口稠密区(如伊卡、利马、拉利伯塔德省、阿雷基帕及塔克纳),将在规模化和后院养殖场进行临床评价;③将在后院养殖场和斗鸡群采集血清学样品和气管拭子。④召开所有国家农业卫生部官员的国家级电话会议,以便指导控制疫情。⑤与秘鲁家禽协会一道开展国内和官方的官方交流。⑥同时,按照秘鲁家禽健康体系的规定,养殖户被引导实行生物安全、清洁、消毒、流行病控制和环境卫生良好规范,同时实行用于蛋品运输的包装材料的良好规范。⑦评估了对症治疗的应用,目前还不允许免疫。⑧应该按照筛查结果、控制和根除的技术基础完成官方行动计划。⑨继续各种层次的监控、培训和交流。⑩9月13日将在利马举行关于传染性喉气管炎的研讨会。⑪秘鲁兽医机构将就此事通报贸易伙伴。具体控制措施:国内限制移运、区域化、染疫场区消毒、浸洗/喷雾及改良扑杀。对斗鸡进行了抗体治疗。感染来源还不清楚,可能来自引进新动物。这是秘鲁首次发生鸡传染性喉气管炎。

(摘译自 OIE 网站)