

鸡柔嫩艾美耳球虫 ZJ 株 5401 基因在大肠杆菌中的表达

杜爱芳¹, 王素华¹, 索 勋²

(1. 浙江大学动物预防医学研究所, 杭州 310029; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘 要: 根据 *E. tenella* 孢子表面抗原 5401 基因序列设计合成特异性引物, 引物两端分别加上 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点及保护碱基, 用 RT-PCR 方法从 *E. tenella* 孢子化卵囊扩增出 881 bp 的片段。将重组克隆质粒 pGEM-T-5401 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 电泳回收目的片段, 克隆到同样经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切的表达载体 pET-30a 中, 得到重组表达质粒 pET-30a-5401, 把重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导, 表达出了 His-5401 融合蛋白。Western 印迹结果表明表达产物为大约 66.2 ku 的蛋白。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; 5401 基因; 表达

中图分类号: S852.72⁺ 3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)02-0187-04

鸡球虫病是由柔嫩艾美耳球虫引起的一种全球性寄生虫病, 严重危害家禽的生长发育^[1]。随着球虫抗药性的继续增加以及新药研制费用的不断上涨, 使得药物防治家禽球虫病陷入困境^[2,3]。20 世纪 80 年代末至 90 年代初, 基因工程亚单位疫苗作为新型预防家禽艾美耳球虫病的措施逐渐受到青睐^[4-6]。例如欧共体资助了 1994—1999 年的主要致力于研制隶属于艾美耳属等数种具有重要经济意义的寄生原虫重组疫苗的 5 年计划(COST820)^[7]。球虫孢子的侵袭导致机体发病, 造成肠黏膜脱落, 导致较高的死亡率。5401 抗原是球虫孢子表面的一种微线蛋白, 在孢子锚定到宿主肠上皮细胞的过程中起重要作用, 阻断孢子入侵宿主细胞不失为抑制球虫病的较为理想的途径^[8]。本文选择柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*) 浙江株孢子表面微线抗原 5401 为亚单位疫苗候选抗原, 克隆 5401 基因后, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达了该抗原, 表达产物为大约 66.2 ku 蛋白。

1 材料和方法

1.1 球虫、菌株、质粒载体和抗体

1.1.1 球虫 *E. tenella* ZJ 株孢子化卵囊为本实验室传代后收集到的新鲜卵囊。

1.1.2 大肠杆菌 BL21 为本实验室保存。

1.1.3 质粒 pGEM-T 克隆载体、pET-30a 表达载体均购自 Promega 公司。

1.1.4 一抗: 鼠 Anti-His 抗体, 购自 Novagen 公司; 二抗: 羊抗鼠 IgG-HRP, 购自上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 工具酶及化学试剂

限制性内切酶 *Sal* I、*EcoR* I、*Bam*H I 为 TaKaRa(大连)有限公司产品。

1.3 试剂盒

总 RNA 提取试剂盒、通用 RT-PCR 试剂盒、DNA 片段玻璃奶纯化回收试剂盒、高效感受态 DH5- α 试剂盒等均为北京博大泰克生物技术公司产品。克隆载体连接试剂盒为 Promega 公司产品, 表达载体连接试剂盒 DNA Ligation 为 TaKaRa 公司产品。Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒为 Novagen 公司产品。

1.4 其他试剂

酚、胰蛋白胨、酵母粉、琼脂粉、Tris 碱为上海 Sangon 有限公司产品, 丙烯酰胺和 N,N'-甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、十二烷基硫酸钠为上海申能博彩生物科技有限公司产品。氯仿、异戊醇、乙醇、异丙醇、醋酸钠等试剂均为国产分析纯, 为杭州化学试剂厂产品。

1.5 *E. tenella* ZJ 5401 基因的克隆

1.5.1 引物设计 按照 Danforth 等发表的序列, 根据其阅读框的序列特点, 两端分别加上 *Sal* I 和 *EcoR* I 酶切位点及保护碱基设计引物:

5401up: 5' TCGAATCCATGGGCCAAAC-

收稿日期: 2003-11-05

基金项目: 杭州市科委重大科研项目(2001112B14)

作者简介: 杜爱芳(1963-), 女, 浙江东阳人, 硕士, 副教授, 主要从事动物预防医学研究

CGGAGAGGAG 3'

5401lp: 5' GCCGTCGACCTACTGCTACTG-
GATGTCACCACTGTCTG 3'

引物由 TaKaRa (大连) 有限公司合成。

1.5.2 5401 基因的扩增 按照常规的方法进行 RT-PCR, 具体方法参见北京博大泰克生物基因技术公司 RT-PCR 试剂盒说明书。

1.5.3 PCR 产物的克隆 参照萨姆布鲁克等^[9]方法进行, 把 PCR 产物与 pGEM-T 克隆载体连接, 转化 DH5- α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 酶切鉴定, 获得 5401 基因阳性克隆, 命名为 pGEM-T-5401。

1.6 表达载体的构建及鉴定

Sal I 和 EcoR I 双酶切质粒 pGEM-T-5401, 玻璃奶试剂盒回收纯化目的片段 5401, 估计其含量。Sal I 和 EcoR I 双酶切表达载体质粒 pET-30a, 玻璃奶试剂盒回收纯化目的片段, 估计其含量。用 TaKaRa 公司的连接试剂盒定向连接 5401 基因和表达载体 pET-30a, 得到重组质粒 pET-30a-5401。把 pET-30a-5401 转化 BL21 感受态细胞。在含有卡那霉素的 LB 平板培养基上铺板, 37 °C 培养过夜后, 挑取单菌落接种到含有 Kan 的 3 mL LB 液体培养基中 37 °C 摇床培养过夜。碱法质粒小抽提, Sal I 和 EcoR I 双酶切质粒, 质粒 PCR 鉴定, 琼脂糖电泳检测其片段大小, 以确定是否为阳性重组。

1.7 5401 融合蛋白的表达

1.7.1 5401 基因的诱导表达^[9] 菌种活化后, 取 150 μ L 阳性菌接种到 3 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 摇床中以 220 r/min 剧烈振荡, 至菌液的 OD 值约为 0.5 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 继续振荡 3~4 h, 收集菌液。用 50 μ L 0.1 mol/L 的 PBS 悬浮细菌, 再加入等体积的 2 倍上样缓冲液, 95 °C 煮沸裂解 5 min, 4 °C, 12 000 g 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7.2 表达蛋白检测^[10] 用鼠 AntiHis 抗体作为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 作为二抗对表达的蛋白进行 Westernblot 分析。一抗的工作浓度为 0.2 ng/mL, 二抗稀释 1 000 倍之后使用。

2 结果

2.1 E. tenella ZJ 株 5401 基因的 RT-PCR

用总 RNA 为模板, 反转录出单链 cDNA, 经 PCR 扩增, 获得与预计大小(881bp)一致的扩增片

段(图 1)。

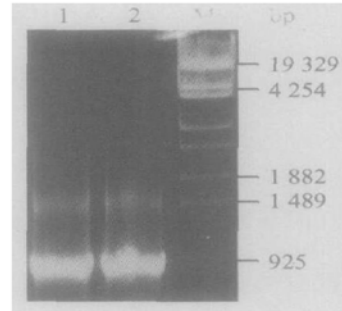


图 1 柔嫩艾美耳球虫浙江株孢子 5401 基因 PCR 扩增电泳图谱

Fig. 1 PCR amplification of 5401 gene from *Eimeria tenella* Zhejiang Strain sporozoites

1, 2. PCR 产物; M. λ EcoT14 I 标准分子量
1, 2. PCR products; M. λ EcoT14 I molecular weight marker

2.2 E. tenella ZJ 株 5401 基因的克隆及酶切分析

选取 5401 基因片段内部存在的酶切位点和引物两端的酶切位点即: BamH I、EcoR I、Sal I 进行酶切, 鉴定重组质粒 pGEM-T-5401, 酶切图谱见图 2。

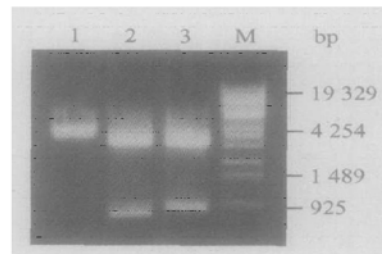


图 2 重组质粒 pGEM-T-5401 的限制性内切酶酶切分析

Fig. 2 Characterization of pGEM-T-5401 by restriction enzyme analysis

1. EcoR I 单酶切; 2. EcoR I + Sal I 双酶切;
3. Sal I + BamH I 双酶切; M. λ EcoT14 I 标准分子量
1. pGEM-T-5401(EcoR I); 2. pGEM-T-5401(EcoR I + Sal I); 3. pGEM-T-5401(Sal I + BamH I)
M. λ EcoT14 I molecular weight marker

2.3 表达载体的筛选和鉴定

表达载体的阳性菌过夜培养后, 分别用 EcoR I, Sal I + BamH I, Sal I + EcoR I 酶切鉴定, 酶切图谱见图 3。阳性菌送往上海申能博彩生物技术有限公司测序, 测序结果表明 5401 基因正向插入到 pET-30a 表达载体中, 没有发生碱基的移位。

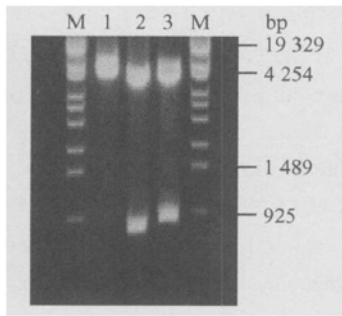


图 3 重组质粒 pET-30 α -5401 的限制性内切酶酶切分析

Fig. 3 Analysis of pET-30 α -5401 by restriction enzyme

1. *Eco*R I 单酶切; 2. *Eco*R I + *Sal* I 双酶切;
3. *Sal* I + *Bam*H I 双酶切; M. λ EcoT 14 I 标准分子量
1. pET-30 α -5401(*Eco*R I); 2. pET-30 α -5401 (*Sal* I + *Eco*R I); 3. pET-30 α -5401(*Sal* I + *Bam*H I); M. λ EcoT 14 I molecular weight marker

2.4 5401 基因在大肠杆菌中的表达与鉴定

取加入诱导剂 IPTG 后 2、4、6 h 的表达菌, 煮沸处理后, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 电泳结果如图 4。Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒对 His-5401 融合蛋白进行纯化, Ni-NTA 可以与融合蛋白两端的 His 标签特异性结合, 纯化结果证实了 66.2 ku 处的条带是目的蛋白, 如图 5。Western blot 检测结果如图 6。

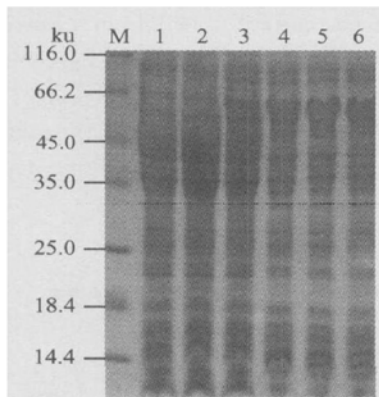


图 4 SDS-PAGE 分析 pET-30 α -5401 重组菌的融合表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the fused protein of the recombinant *E. coli* with pET-30 α -5401

1. 不含 pET-30 α -5401 重组质粒的大肠杆菌空对照;
2. 含有空载体 pET-30 α 的大肠杆菌对照;
3. 未加 IPTG 诱导的 pET-30 α -5401 重组菌;
- 4~ 6. 加入 IPTG 诱导 2、4、6 h 后的 pET-30 α -5401 重组表达菌; M. 蛋白标准分子量
1. Control *E. coli* without recombinant plasmid;
2. Control *E. coli* with plasmid pET-30 α ;
3. The expressed *E. coli* with plasmid pET-30 α -5401 that hadn't been induced by IPTG;
- 4~ 6. The expressed *E. coli* with plasmid pET-30 α -5401 that has been induced by IPTG for 2, 4 and 6 h;
- M. Protein molecular weight markers

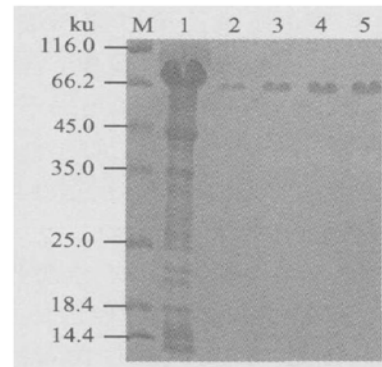


图 5 Ni-NTA 试剂盒纯化 His-5401 融合蛋白鉴定

Fig. 5 Identification of the fusion protein His-5401 by Ni-NTA reagent through purifying process

1. 表达菌裂解产物; 2~ 5. 吸附到 Ni-NTA 试剂上的目的蛋白溶解后的产物; M. 标准分子量
1. The production of expressed *E. coli*; 2~ 5. The solvent production of the aim protein absorbed by Ni-NTA reagent; M. Protein molecular markers

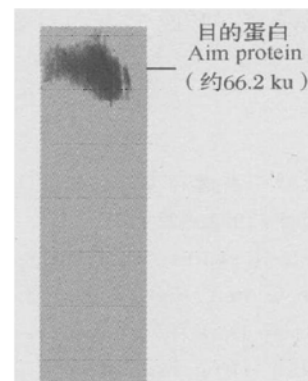


图 6 Western-blot 分析 5401 基因在大肠杆菌中的表达

Fig. 6 Western-blot analysis of 5401 gene expressed in *E. coli*

3 讨论

5401 抗原是球孢子表面的一种微线抗原, 即 EtMIC4, 其基因全长 6 567 bp, 编码 2 189 个氨基酸^[11]。Danforth 等 1989 年试验证实, 口服感染 *E. tenella* 时, 该蛋白的 C-末端编码区可以对球虫感染产生部分保护力。本文选取此保护性抗原部分进行研究, 编码该段抗原的核苷酸序列长 864 bp, 由 287 个氨基酸残基组成, 蛋白约为 31 ku。5401 抗原的一个显著特点是, 287 个氨基酸残基中的 19 - 120 位由 5 个亲水性的重复序列组成; 165 - 194 位富含脯氨酸残基, 含有 4 个重复的 Glu-Thr-Pro 序列; 209 - 237 位富含亲水性氨基酸残基。这种现象在链球菌和疟原虫也有报道。应用协同进化理论

的基因转换和不等交换也许可以解释细菌和寄生原虫抗原中大量存在重复序列的现象,当细菌和寄生原虫面临免疫选择时它们可以将其用于产生抗原多样性,从而逃避宿主的攻击。而抗原中富含脯氨酸序列,则可能与寄生原虫和细菌在宿主细胞表面的锚定作用有关^[12]。

本研究将从 *E. tenella* ZJ 株分离出来的 5401 基因插入到 pET-30a 表达载体中,构建了 pET-30a-5401 表达载体,转化 BL21 大肠杆菌,经 IPTG 诱导后,5401 抗原得到高效表达。

按理论推测,此融合蛋白应该由 5401 基因开放阅读框架的 31 ku 和 pET-30a 载体编码的 7.85 ku 两部分组成,其融合蛋白共为 38.85 ku。作者在 BL21 大肠杆菌中表达的融合蛋白,经 SDS-PAGE 以及 Western blot 检测,其分子量约为 66.2 ku 大小,与 Danforth 报道的结果相一致。其原因可能是由于 5401 抗原表面含有不止一个抗原决定簇,也可能与蛋白的折叠有关,形成了蛋白二聚体,其原因尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 左仰贤. 球虫学—畜禽和人体的球虫与球虫病[M]. 北京: 科技出版社, 1991. 12~ 18.
- [2] McDougald L R. Anticoccidia drug resistance in the southeastern United States: polyether, ionophorous drugs [J]. Avian Dis, 1981, 25: 600~ 609.
- [3] Chapman H D. Drug resistance in avian coccidia (review) [J]. Vet Parasitol, 1984, 15: 11~ 27.
- [4] Brothers V M, Kuhn I, Paul L S, et al. Characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* sporozoites and synthesis from a cloned cDNA in *Escherichia coli* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 107(1): 91~ 102.
- [5] Danforth H D, Augustine P C, Ruff M D, et al. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasite [J]. Poultry Sci, 1989, 68: 1643~ 1652.
- [6] Crane M S, Pellefrino R M, Goggin B, et al. Vaccination against coccidiosis with recombinant antigens [A]. Yvone P. Coccidia and intestinal coccidiomorphs, Proceedings of the Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France): INRA [C]. Paris, 1989. 649~ 654.
- [7] Shirley M W. Coccidiosis research—COST effective [J]. Parasitology Today, 1995, 11(3): 89~ 91.
- [8] 彼得 L 朗. 球虫生物学 [M]. 蒋金书, 译. 广西: 广西科学技术出版社, 1987. 89~ 90.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 16~ 455.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Tomley F M, Billington K J, Bumstead J M, et al. BE-TMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type I repeats [J]. International Journal for Parasitology, 2001, 31: 1303~ 1310.
- [12] 索勋, 李国清. 鸡球虫病 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.

Expression of 5401 gene of *Eimeria tenella* ZJ Strain in *E. coli* BL21

DU Aifang¹, WANG Suhua¹, SUO Xun²

(1. Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The specific primers were designed and produced according to *E. tenella* sporozoite surface antigen 5401 gene sequence. *EcoR* I and *Sal* I restriction enzyme cut sites and protective bases were added at the two ends of the primer respectively. A fragment of 881bp was cloned by RT-PCR from the *E. tenella* sporulated oocysts. The recombinant plasmid pGEM-T-5401 was identified with *EcoR* I and *Sal* I restriction enzyme, the fragments were collected by agarose gel fraction method. After purification the fragment was ligated to the pET-30a express vector, the recombinant pET-30a-5401 express plasmid was constructed. After transformation, the engineered strain *E. coli* BL21/ 6×His-5401 was expressed by the induction of IPTG in a form of dimer protein. The specific approximate 66.2 ku band was obtained by analysis of SDS-PAGE and Western-blotting. The result indicated that *E. tenella* 5401 protein had been expressed successfully in *E. coli* expressing system.

Key words: *E. tenella*; 5401 gene; expression