

## 微小牛蜱磷酸丙糖异构酶基因片段的克隆与原核表达

梁怡琳, 高攀, 柯泽楷, 罗新萍\*, 刘志刚

**【摘要】** 为克隆和表达微小牛蜱磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, Tim) 编码基因, 提取微小牛蜱成虫总 RNA, 采用 RT-PCR 方法扩增目的基因, 将其连入 pMD-18T 载体, 经酶切和测序鉴定后, 将正确的目的基因与 pET-28a 表达载体连接, 并转入大肠埃希菌 (*E. coli*) Rosetta (DE3) 中, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达后, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定分析。结果发现, 克隆所得的微小牛蜱成虫 *tim* 基因片段长度为 750 bp (登录号为 JX112888), 其中开放阅读框为 750 bp, 编码 249 个氨基酸, 与微小牛蜱胚胎中克隆出的 *tim* 基因序列的同源性为 99%。SDS-PAGE 结果显示, 重组蛋白 Tim 相对分子质量 ( $M_r$ ) 约为 27 000。

**【关键词】** 微小牛蜱; 磷酸丙糖异构酶; 克隆; 表达

中图分类号: R384.41 文献标识码: B

## Cloning and Expression of Triosephosphate Isomerase Gene of *Boophilus microplus*

LIANG Yi-lin, GAO Pan, KE Ze-kai, LUO Xin-ping\*, LIU Zhi-gang

(School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

**【Abstract】** Total RNA was extracted from adult *Boophilus microplus*. RT-PCR was used to amplify the gene and the fragment was subcloned into the expression vector pET-28a. The cloned gene was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3), induced by IPTG, and identified by SDS-PAGE. The results showed that the triosephosphate isomerase (*tim*) gene of *B. microplus* has 750bp and encodes 249 amino acids (GenBank No. JX112888). The cloned *tim* gene shares 99% homology with that in tick embryos. The relative molecular weight ( $M_r$ ) of the expressed recombinant protein is about 27 000.

**【Key words】** *Boophilus microplus*; Triosephosphate isomerase; Cloning; Expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39660073), Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2003A3080502), and the Innovation of Scientific Research Team Fund of Shenzhen University (No. 200904)

\* Corresponding author, E-mail: lxp2005@yahoo.cn

微小牛蜱 (*Boophilus microplus*) 呈世界性分布, 它不仅直接吸血影响动物生理功能, 还可传播 Q 热、森林脑炎和莱姆病等人兽共患传染病<sup>[1]</sup>。近年来, 中国陆续有被蜱虫叮咬后感染疾病并致死的病例报告<sup>[2]</sup>。因此, 对蜱体内各种功能蛋白的研究将在蜱虫的防制及在农牧业和公共卫生方面具有重大意义。

磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, Tim) 在糖酵解中具有重要作用, 对于有效的能量生成是必不可少的。Tim 被发现存在于众多的生物体中, 包括哺乳动物、昆虫、真菌和植物等。目前, 国内从分子水平对蜱虫 *tim* 基因的研究报道较少, 本研究拟克隆和表达微小牛蜱 *tim* 基因, 为其后续功能研究提供可靠的理论基础。

### 1 材料与方法

1.1 虫株、菌株与质粒 冻存的微小牛蜱成虫来自中国科学

院昆明动物研究所。原核表达载体 pET-28a、大肠埃希菌 (*E. coli*) Top 10 克隆菌和 *E. coli* Rosetta(DE3) 均购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司, AMV 逆转录试剂盒购自美国 BBI 公司, pMD18-T simple 载体、*Ex-Taq* 酶、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 和 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物的设计 根据 NCBI 数据库中微小牛蜱 *tim* 基因的核酸序列 (登录号为 EF014474), 使用 CLUSTAL W 程序比对序列的同源性, 设计特异性引物, 上、下游引物序列分别为 *tim*F 5'-CGAATTCATGGCCGACGC-3' 和 *tim*R 5'-GCTCGAGCTAACCTGCATAGCATT-3'。

1.4 微小牛蜱成虫 *tim* 基因的克隆和表达 取微小牛蜱成虫, 解剖后用含 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 的蒸馏水充分洗涤去除宿主血液, 置滤纸吸干后取 100 mg 于液氮中充分研磨, 按照试剂盒说明书提取蜱虫总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, 并进行 RT-PCR 反应, 回收纯化产物, 与载体 pMD-18T 连接后, 转入 *E. coli* Top10 克隆菌中, 通过抗氨苄筛选, 提取质粒并进行双酶切鉴定, 阳性菌落送上海生工生物工程技术有限公司测序。将所测序列与 GenBank 中的序列进行比对, 利用

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 39660073); 广东省科技重点专项 (No. 2003A3080502); 深圳大学校创新科研团队基金 (No. 200904)

**作者单位:** 深圳大学过敏反应与免疫学研究所, 深圳 518060

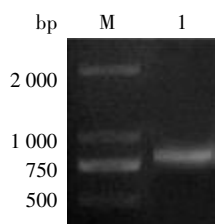
\* 通讯作者, E-mail: lxp2005@yahoo.cn

在线软件 ([http://www.pro-teomics.com.cn/proteomics/pi\\_tool.asp](http://www.pro-teomics.com.cn/proteomics/pi_tool.asp)) 进行生物信息学分析。

测序正确的重组阳性质粒和 pET-28a 质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后进行连接, 构建表达载体。提取阳性菌落质粒, 进行双酶切鉴定并送上海生工生物工程技术有限公司测序。将测序正确的阳性克隆转入感受态 *E. coli* Rosetta (DE3) 中, 30 °C 经 1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 4 h 后, 取菌体煮沸通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证诱导条件并进行结果分析。

## 2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 PCR 扩增产物, 经琼脂糖凝胶电泳 (图 1), 在约 750 bp 处有一亮带, 片段大小与理论预计值相符。

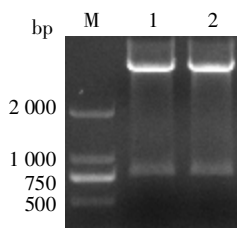


M: DNA 标志物; 1: RT-PCR 产物。

图 1 微小牛蜱 *tim* 基因片段的 RT-PCR 产物

2.2 生物信息学分析 测序结果显示, 微小牛蜱成虫 *tim* 基因片段长度为 750 bp, 其中开放读框为 750 bp, 编码 249 个氨基酸。软件预测该蛋白的相对蛋白分子质量 ( $M_r$ ) 为 27 750, 等电点为 8.08, GenBank 登录号为 JX112888。本实验获得的微小牛蜱成虫 *tim* 基因与已知的微小牛蜱胚胎中克隆的 *tim* 基因<sup>[3]</sup>(登录号为 EF014474) 序列的同源性为 99%, 与褐蜱 (*Cran-gon crangon*) *tim* 基因 (登录号为 FJ462738) 同源性为 63%。

2.3 表达载体的构建与酶切鉴定 重组表达质粒 pET-28a/*Tim* 经双酶切和测序鉴定结果均证实, 表明该基因的原核表达载体构建成功 (图 2)。



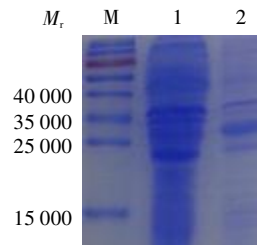
M: DNA 标志物; 1, 2: 重组表达质粒 pET28a/*Tim*。

图 2 微小牛蜱 *tim* 基因片段重组表达质粒双酶切鉴定结果

2.4 重组基因的表达 30 °C 经 IPTG 诱导 4 h 后, 收集菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色显示, 在  $M_r$  27 000 处有蛋白表达条带, 与预期结果相符 (图 3)。

## 3 讨论

蜱虫为多种脊椎动物体表的暂时性寄生虫, 是某些人兽共患病的传播媒介和储存宿主。目前对蜱虫的防控措施仍以化学防治为主, 杀蜱药物的使用多借鉴了有害昆虫的防治方法, 但



M: 蛋白质标志物; 1: pET28a/*Tim* 诱导前; 2: 诱导后未纯化的重组蛋白。

图 3 蜱虫 *Tim* 蛋白诱导表达

尚无专门针对蜱的化学杀虫剂, 且化学防治存在着污染环境和耐药性等诸多问题, 而免疫预防越来越受到人们的关注, 寻找蜱体内相关的功能蛋白, 作为抗蜱疫苗的候选基因, 对于控制蜱及蜱传疾病具有重要意义。

*tim* 基因编码的磷酸丙糖异构酶是一种糖酵解酶, 催化磷酸二羟丙酮转化成 3-磷酸甘油醛, 进入糖酵解途径<sup>[4]</sup>。蜱虫 *tim* 基因能否成为蜱虫免疫防治的候选疫苗基因以及化学防治的药物作用靶点仍需探讨。

*tim* 基因在血吸虫病疫苗研究中受到极大关注<sup>[5]</sup>。在蓝氏贾第鞭毛虫 *tim* 基因的研究中, 有研究者认为该虫的 *tim* 基因有着极高的特异性, 可作为其特异性检测的目标基因<sup>[6]</sup>, 同时由于它与人类 *tim* 蛋白存在差异, 可作为药物作用的靶点<sup>[7]</sup>。本实验从微小牛蜱成虫中克隆和表达了 *tim* 基因片段序列, 其将为蜱虫防治候选疫苗基因的筛选及化学药物作用靶点的研究提供理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] Li YL. Human Parasitology [M]. 7th ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2008: 242-247. (in Chinese) (李雍龙. 人体寄生虫学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 242-247.)
- [2] Yu L, Cai WL, Wang FG, et al. Prevention and control of human and animal anaplasmosis [J]. China Anim Hlth, 2010, (11): 4-7. (in Chinese) (宇凌, 蔡文莉, 吴风光, 等. 人兽共患粒细胞无形体病的防治 [J]. 中国动物保健, 2010, (11): 4-7.)
- [3] Moraes J, Arreola R, Cabrera N, et al. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2011, 41(6): 400-409.
- [4] Noltmann EA. The Enzyme [M]. Vol. VI. New York: Academic Press, 1972: 326-340.
- [5] Reis EA, Mauadi Carmo TA, Athanzio R, et al. *Schistosoma mansoni* triose phosphate isomerase peptide MAP4 is able to trigger naïve donor immune response towards a type-I cytokine profile [J]. Scand J Immunol, 2008, 68(2): 169-176.
- [6] Ding HP, Lu SQ, Rong Y, et al. PCR detection of *Giardia lamblia* by *tim* gene amplification [J]. Acta Parasitol Med Entomol Sin, 2002, 9(2): 65-69. (in Chinese) (丁慧萍, 卢思奇, 戎煜, 等. 用 PCR 扩增 *tim* 基因检测蓝氏贾第鞭毛虫 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002, 9(2): 65-69.)
- [7] Jiménez L, Fernández-Velasco DA, Willms K, et al. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa* [J]. J Parasitol, 2003, 89(2): 209-214.

(收稿日期: 2011-10-24 编辑: 瞿麟平)