

# 柔嫩艾美耳球虫 *Serp* 基因的原核表达及其免疫保护效果研究

李文超<sup>1,2</sup>, 顾有方<sup>2</sup>, 杜玲<sup>1</sup>, 宫鹏涛<sup>1</sup>, 李建华<sup>1</sup>, 张西臣<sup>1\*</sup>

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 安徽科技学院 动物科学学院, 凤阳 233100)

**摘要:** 为评价 *Serp* 基因重组表达产物对预防鸡柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*, *E. tenella*) 感染的效果, 克隆和表达 *E. tenella Serpin* 基因, 对表达产物进行初步纯化和复性, 制备免疫原。设计了重组蛋白肌肉注射组、重组蛋白口服组、重组蛋白滴鼻组 3 个试验组以及红、白对照组。分别于 7、14 和 28 日龄对雏鸡进行 3 次免疫, 35 日龄时用  $3 \times 10^4$  个 *E. tenella* 孢子化卵囊攻虫, 第 7 天末宰杀, 对各组的存活率、相对增重率、卵囊减少率、ACI 等指标进行统计分析。结果表明, 各免疫组的平均增重与红对照组相比均有显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其中以重组蛋白肌肉注射组增重最多, 相对增重率为 66.73%, 优于其他免疫组; 各免疫组卵囊产量较红对照组均有显著的下降, 其中重组蛋白肌肉注射组卵囊减少率最高, 为 30.01%; 各免疫组 ACI 均明显高于红对照组, 其中以重组蛋白口服组最高, 但仍低于 160, 暗示 *Serp* 蛋白并不是一个理想的球虫疫苗保护性抗原。

**关键词:** 柔嫩艾美耳球虫; *Serp*; 免疫保护效果

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)02-0270-06

## Immunoprotection of Chickens against *Eimeria tenella* by Recombinant *Serp* Protein Expressed in *E. coli*

LI Wen-chao<sup>1,2</sup>, GU You-fang<sup>2</sup>, DU Ling<sup>1</sup>, GONG Peng-tao<sup>1</sup>, LI Jian-hua<sup>1</sup>, ZHANG Xi-chen<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**Abstract:** To assess the immunoefficacy of recombinant *Serp* against *E. tenella* infection in chickens, *Serp* gene of *E. tenella* was cloned and expressed, subsequently, the recombinant *Serp* was purified and refolded. Three experimental groups i. e. intramuscular injection, oral administration and intranasal administration groups were designed. At the same time, the challenged and unchallenged groups were also designed as positive and negative control, respectively. Seven-day old chickens were immunized with the recombinant *Serp* protein, and boosted with the same method at 14 and 28 days of age. All chickens were orally challenged with sporulated oocysts at 35 days of age and killed at day 7 post challenge. Survival rate, relative weight gain, oocyst decrease ratio and anticoccidial index were used as the main criteria for the assessment of the protective effect. The results showed the weight gains of the immunized chickens were significantly higher than that of the positive control group ( $P < 0.05$ ). The oocyst outputs in immunized chickens dropped significantly when compared with the positive control. In comparison with the positive control, the ACI in immunized groups were significantly higher, and the ACI of group immunized orally with recombinant antigen was the highest, the results that the ACI of all immu-

收稿日期: 2012-08-02

基金项目: “863”(2011AA10A215); 安徽省教育厅优秀青年人才基金项目(2011SQRL120); 安徽科技学院重点学科建设项目(AKXK20101-2)

作者简介: 李文超(1979-), 男, 汉族, 河南南阳人, 讲师, 博士生, 主要从事动物寄生虫病研究, E-mail: liwen303@126.com

\* 通信作者: 张西臣, Tel: 0431-87981351, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

nized group were below 160 implied that the Serpin protein is not an ideal coccidiosis vaccines candidate antigen.

**Key words:** *Eimeria tenella*; Serpin; immune protective effect

鸡球虫病是严重危害养鸡业的重要原虫病,目前其防治主要以在饲料中添加抗球虫药物预防为主,但是随着球虫耐药性问题的日趋严重以及人们对食品安全的日益关注,人们希望用更安全有效的方法来替代使用抗球虫药物,因此免疫预防越来越受到人们的关注。球虫疫苗研究中,基因工程疫苗一直是研究的热点,而保护性抗原的鉴别是基因工程疫苗进一步发展的基础。

目前,球虫保护性抗原的研究主要集中在球虫生活史的无性生殖阶段(如子孢子和裂殖子阶段),尤其是与细胞入侵及顶膜复合物有关的蛋白是研究的重点<sup>[1]</sup>。丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serine Protease Inhibitor, Serpin)是广泛存在于动、植物和微生物体内的一类对丝氨酸蛋白水解有抑制活性的蛋白质,参与调节机体众多蛋白酶依赖的生理功能<sup>[2]</sup>。对寄生虫而言, Serpin 在抑制凝血、凝血溶解和炎症反应中发挥着重要的作用。原虫的 Serpin 发现较晚,其通过抑制宿主丝氨酸蛋白酶活性,使虫体在入侵过程中免受宿主蛋白酶的降解得以逃避宿主的防御体系<sup>[3]</sup>,从而参与原虫细胞入侵过程,因而其不仅可以作为原虫疫苗研制的候选分子<sup>[4]</sup>,而且是研制抗抗原虫药物的良好靶标<sup>[5-6]</sup>。故对 *Serpin* 基因及其编码蛋白的特性及功能的研究意义重大。本研究拟将 *E. tenella Serpin* 基因(EtSerpin)在大肠杆菌中进行表达,并分析重组蛋白对鸡的免疫保护效果,为进一步探索球虫 Serpin 的功能及在鸡球虫病免疫预防中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 虫株、质粒及宿主菌

柔嫩艾美耳球虫长春株为本室保存。重组质粒 pMD18-T-Serpin 由本室构建,宿主菌 Rosetta (DE3),表达载体 pET-28a(+ )由本实验室保存。

### 1.2 实验动物

4 周龄 BALB/c 小鼠 8 只,雌性,18~22 g,购自长春生物制品研究所实验动物中心,饲养于严格消毒的鼠笼中,鼠料经高温处理。

1 日龄海兰小公雏 120 只,购自长春市农业科学院,饲养于严格消毒无球虫的铁丝笼中。饲料自

行配制,未添加任何抗生素及抗球虫药,饲喂前经 80 ℃ 烘烤 2 h。

### 1.3 主要试剂

*Bam*H I、*Xho* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DL2000 Marker 均为 TaKaRa 公司产品;HRP 标记的羊抗鼠 IgG, DAB 显色试剂盒为武汉博士德公司产品;质粒小量提取试剂盒为 Biospin 公司产品;蛋白质 Marker MP102 为 TIANGEN 公司产品;Amp、Kan、IPTG、TEMED 为 Promega 公司产品;其他常用试剂均为分析纯。

### 1.4 目的片段的 PCR 扩增

根据本室构建的重组质粒 pMD18-T-Serpin 测序结果,对 *Serpin* 基因开放阅读框除去信号肽序列设计表达引物,引物序列上加上利于克隆入表达载体的酶切位点(*Bam*H I 和 *Xho* I),引物序列, P1: 5'-GCG-GATCC ATGGAGCGTTCAACAATCACC-3', P2: 5'-GCCTCGAGCTTGCCTCCTGTTTGCTTGTAG-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以重组质粒 pMD18-T-Serpin 为模板,PCR 扩增目的产物,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

### 1.5 重组原核表达质粒的构建

PCR 扩增产物及 pET-28a(+ )质粒分别用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切,回收和连接,通过 Kan 抗性、PCR 及 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切筛选阳性质粒,命名为 pET-28a(+ )-Serpin,将筛选到的阳性质粒送华大基因有限公司测序以进一步确认。

### 1.6 重组蛋白的诱导表达及鉴定

将阳性重组质粒 pET-28a-Serpin 转化 Rosetta (DE3)感受态细胞,同时用空载体 pET-28a(+ )同步转化 Rosetta(DE3)感受态细胞作对照。将阳性重组表达菌过夜培养后,经不同浓度 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 电泳分析,并用凝胶薄层扫描确定表达量。将诱导后重组菌在冰浴中进行超声波裂解,取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析,以确定重组蛋白主要以何种形式存在。

### 1.7 抗柔嫩艾美耳球虫阳性血清的制备

阳性血清的制备参照 Q. Wang 等<sup>[7]</sup>的方法进行,间接 ELISA 检测血清抗体效价, -20 ℃ 保存备用。

## 1.8 表达产物的 Western blotting 鉴定

重组阳性菌和空载体转化菌裂解物经 SDS-PAGE 电泳,转移至 NC 膜,按常规方法进行 Western blotting 分析,其中一抗为鼠抗 *E. tenella* 阳性血清(1:500 稀释),二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:2 000 稀释)。

## 1.9 重组蛋白的复性及浓度测定

参照 M. M. Carrio 等<sup>[8]</sup>的方法进行,用紫外分光光度计法进行重组蛋白浓度测定。

## 1.10 免疫保护性试验设计

试验共分为 5 组,每组 20 只鸡,试验分组、免疫

剂量、程序以及攻虫日龄、剂量等见表 1。

## 1.11 免疫保护评价指标

攻虫前,各组鸡编号并逐只称重,攻虫后每天观察鸡的精神、食欲、粪便与发病情况,收集第 5 天至宰杀前各组全部粪便,麦氏计数法进行卵囊计数,每个粪样计数 3 次。攻虫后第 7 天末所有鸡称重剖杀。相关评价指标包括存活率、平均增重、相对增重率、卵囊产量、卵囊减少率、病变记分、病变记分减少率和抗球虫指数 ACI。数据用 SPSS 软件进行统计处理。

表 1 试验设计与免疫程序

Table 1 Experimental design and immune program

组别 Group	免疫佐剂及剂量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$ ) Immune adjuvant and dose	免疫日龄/d Days of immunization	免疫途径 Immune route	攻虫日龄/d Days of challenge	攻虫剂量/ ( $\text{个} \cdot \text{只}^{-1}$ ) Dose of challenge
重组蛋白肌肉注射组 Group immunized intramuscularly with recombinant antigen	100	7、14、28	肌肉注射	35	$3 \times 10^4$
重组蛋白口服组 Group immunized orally with recombinant antigen	100	7、14、28	口服	35	$3 \times 10^4$
重组蛋白滴鼻组 Group immunized intranasally with recombinant antigen	100	7、14、28	滴鼻	35	$3 \times 10^4$
红对照组 Positive control	0(PBS)	7、14、28	-	35	$3 \times 10^4$
白对照组 Negative control	0(PBS)	7、14、28	-	35	-

## 2 结果

### 2.1 PCR 结果

以重组质粒 PMD18-T-serpin 为模板,扩增 Serpin ORF 中除去信号肽部分片段,琼脂糖凝胶电泳显示,在 1 164 bp 附近有一清晰条带,与预计大小相符(图 1)。

### 2.2 重组原核表达质粒的构建

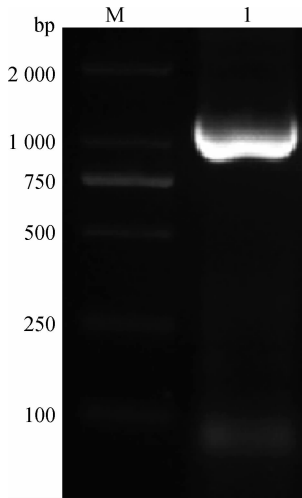
用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切 PCR 产物获得 *Serpin* 基因片段,与酶切质粒 pET-28a(+ )得到的片段连接构建成重组质粒 pET-28a(+)-Serpin。该质粒

用 PCR 鉴定时扩增出 1 164 bp 的目的片段,*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,出现约 5 300 bp 的载体片段和 1 164 bp 的目的条带,测序结果进一步证实正确构建了重组表达质粒。

### 2.3 原核表达与鉴定

将重组质粒转化表达菌 Rosetta(DE3),经不同浓度 IPTG 诱导 4 h 后,SDS-PAGE 分析表明,在约 46 ku 处有一浓染的特异条带,与预期的重组蛋白大小相符,且以  $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG 诱导 4 h 表达量最高,薄层扫描显示表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 38.15%。可溶性分析表明目的蛋白主要以包涵体形式存在(图 2)。免疫印迹分析显示,在

46 ku 处出现特异性蛋白质条带(图 3),表明表达的重组蛋白能与特异性的鼠抗 *E. tenella* 阳性血清结合,具有一定的免疫原性。

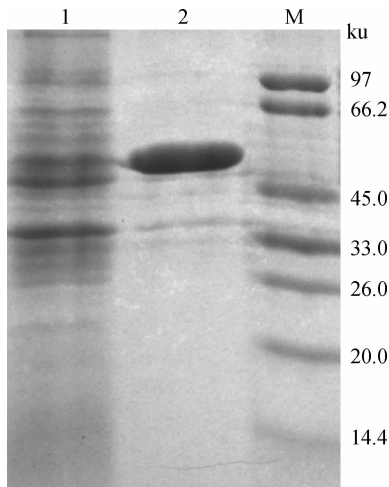


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. *Serpin* 的 PCR 产物

M. DL2000 DNA marker; 1. PCR product of *Serpin*

图 1 *Serpin* PCR 扩增结果

Fig. 1 The PCR amplification result of *Serpin*



1. 上清; 2. 沉淀; M. 蛋白质相对分子质量标准

1. The supernatant; 2. The sediment; M. Protein marker

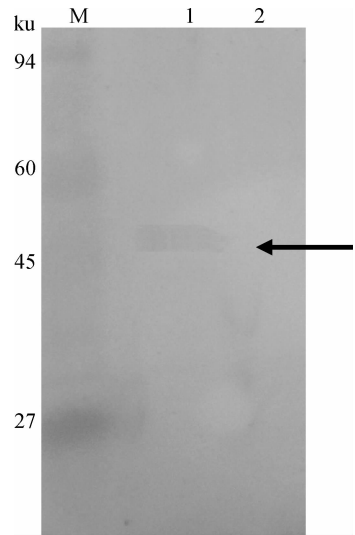
图 2 重组 *Serpin* 蛋白的可溶性分析

Fig. 2 Solubility analysis of the recombinant *Serpin* protein

## 2.4 重组蛋白的免疫保护效果

2.4.1 临床观察结果 各攻虫组鸡在攻虫后第 4 天时出现食欲不振、精神萎靡、缩脖呆立、排便便等症状,严重者死亡。就血粪而言,红对照组最为严重,重组蛋白肌肉注射组、重组蛋白口服组排少量血

便,差异不明显。白对照组试验鸡在整个试验期间均正常,无临床症状和血便。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. IPTG 诱导的含 pET-28a(+)-*Serpin* 的细菌; 2. IPTG 诱导的含 pET-28a(+)

的细菌

M. Protein marker; 1. pET-28a(+)-*Serpin* induced by IPTG; 2. pET28a (+) induced by IPTG

图 3 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of expression products

2.4.2 存活率 从攻虫后 5 d 开始,部分攻虫组鸡开始陆续出现死亡,试验结束时各组的存活率见表 2。由表 2 可知,重组蛋白口服组、白对照组无死亡鸡,存活率均为 100%,红对照组存活率最低,为 70%,而重组蛋白肌肉注射组和重组蛋白滴鼻组存活率分别为 95%和 90%。

2.4.3 增重情况 各组增重情况见表 2。与红对照组相比,各免疫组的平均增重均有显著的增加 ( $P < 0.05$ )。其中,重组蛋白肌肉注射组增重最多,相对增重率为 66.73%,优于其它各免疫组,重组蛋白滴鼻组平均增重最低,相对增重率仅为 50.37%。各免疫组之间,除重组蛋白肌肉注射组与重组蛋白口服组直接平均增重差异不显著 ( $P > 0.05$ ) 外,其余各组之间平均增重均差异显著 ( $P < 0.05$ )。各免疫组的平均增重与白对照组之间均差异显著 ( $P > 0.05$ ),表明重组蛋白免疫不能完全消除攻虫对体重的影响。

2.4.4 卵囊产量及卵囊减少率 由表 2 可知,各攻虫组在攻虫后均有不同数量的卵囊排出,其中以红对照组排出量最多,攻虫后第 5 天到第 7 天末粪便中卵囊以及扑杀时盲肠中卵囊总数平均为  $10.03 \times 10^7$ ,

其他各免疫组卵囊产量与红对照组相比均显著下降,其中重组蛋白肌肉注射组卵囊减少率最高,为

30.01%,而重组蛋白滴鼻组卵囊减少率最低,仅为24.73%。

表 2 各试验组增重、病变记分、卵囊产量和抗球虫指数

Table 2 The weight gain, score of cecum lesion, oocyst output and anticoccidial index in each group post challenge

组别 Group	平均增重/g Average weight gain	相对增重率/% Relative weight gain	卵囊产量 ( $\times 10^7$ ) Oocyst output ( $\times 10^7$ )	卵囊减少率/% Oocyst decrease ratio	平均病变记分 Mean lesion score	病变记分减少率/% Reduction lesion score	存活率/% Survival rate	抗球虫指数(ACI) Anticoccidial index
重组蛋白肌肉注射组 Group immunized intramuscularly with recombinant antigen	53.32 ± 9.41 <sup>a</sup>	66.73	7.02 ± 0.06 <sup>a</sup>	30.01	2.36 ± 0.15 <sup>b</sup>	17.19	95	137.13
重组蛋白口服组 Group immunized orally with recombinant antigen	52.14 ± 6.31 <sup>a</sup>	65.25	7.52 ± 0.28 <sup>a</sup>	25.02	2.21 ± 0.33 <sup>b</sup>	22.46	100	142.15
重组蛋白滴鼻组 Group immunized intranasally with recombinant antigen	40.25 ± 7.65 <sup>b</sup>	50.37	7.55 ± 0.32 <sup>a</sup>	24.73	2.70 ± 0.42 <sup>b</sup>	5.26	90	112.37
红对照组 Positive control	28.69 ± 6.39 <sup>c</sup>	35.90	10.03 ± 0.68 <sup>b</sup>	0.00	2.85 ± 0.32 <sup>b</sup>	100.00	70	97.40
白对照组 Negative control	79.91 ± 10.50 <sup>d</sup>	100	0 <sup>c</sup>	100.00	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0	100	200.00

同列中不同字母肩注表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); 相同字母肩注表示平均值差异不显著 ( $P > 0.05$ )

In the same column, the different capital letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ); The same capital letter means no difference ( $P > 0.05$ )

2.4.5 病变记分与病变记分减少率 从表 2 可以看出,各免疫组的平均病变记分虽有不同程度的降低,但与红对照组相比,差异均不显著 ( $P > 0.05$ ),病变记分减少率以重组蛋白口服组最高,其次是重组蛋白肌肉注射组。

2.4.6 抗球虫指数 ACI 从表 2 可以看出,虽然各免疫组 ACI 并不高,但均明显高于红对照组,其中其中以重组蛋白口服组最高,但仍低于 160。

### 3 讨论

大量研究证实,蛋白水解酶在原虫的生活史或致病过程中发挥着重大的作用,包括诸如原虫侵入宿主细胞过程中的宿主或寄生虫表面蛋白的递呈、宿主营养蛋白的消化和宿主免疫介导的灭活等<sup>[9-11]</sup>。在原虫已知的蛋白酶中,丝氨酸蛋白酶是

一类最有特色的酶家族,其与原虫内源的 Serpin 相互作用,形成一个动态平衡,从而起到调控作用,调节原虫体内许多重要的生命活动,是维持体内环境稳定的重要因素,其对原虫在宿主体内的定居、虫体的发育中均发挥着重要的作用,因而丝氨酸蛋白酶及 Serpin 均可作为新药开发的作用靶标和新型疫苗的候选抗原,逐渐引起了人们的重视。

早期在研究 *E. tenella* 不同发育阶段的 cDNA 文库时,鉴别了一些与 Serpin 有高度同源性的基因<sup>[12-13]</sup>,L. Jiang 等<sup>[3]</sup>克隆了 *E. tenella* 的 Serpin 基因,发现该基因编码蛋白在子孢子入侵宿主细胞以及子孢子在宿主体内的存活过程中发挥作用。本研究中,首先利用带 His 标签的 pET-28a(+) 表达质粒对 Serpin 基因进行原核表达,结果显示在大肠杆菌中获得了高效的表达,目的蛋白占菌体总蛋白的 38.15%,但主要以包涵体形式存在,而且获得的

rSerpin 蛋白可以被抗 *E. tenella* 子孢子的多抗血清识别,表明该重组蛋白具有很好的抗原性。

在对球虫疫苗免疫保护效果进行评价时,增重是最重要的评价指标之一。增重指标表明,各免疫组的平均增重与红对照组相比均有显著的增加( $P < 0.05$ ),表明 rSerpin 蛋白免疫具有一定的保护作用。其中,重组蛋白肌肉注射组要好于重组蛋白口服组,重组蛋白滴鼻组最差,提示在进行球虫疫苗免疫时要选择合适的免疫途径。

球虫疫苗效果评价的另一重要指标是卵囊产量。与红对照组相比,各免疫组卵囊产量均有显著的下降,其中,重组蛋白肌肉注射组卵囊减少率最高,为 30.01%。

ACI 是全面评价抗球虫效果的一个综合指标。本试验中,虽然各免疫组 ACI 并不高,但均明显高于红对照组,表明 rSerpin 蛋白免疫可以产生对球虫感染的部分免疫保护力,但各免疫组 ACI 值均低于 160 的事实也暗示 Serpin 蛋白并不是一个理想的球虫疫苗保护性抗原。

#### 参考文献:

- [1] SHARMAN P A, SMITH N C, WALLACH M G, et al. Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis[J]. *Parasite Immunol*, 2010, 32: 590-598.
- [2] YE S, GOLDSMITH E J. Serpins and other covalent protease inhibitors[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(6):740-745.
- [3] JIANG L, LIN J, HAN H, et al. Identification and partial characterization of a serine protease inhibitor (serpin) of *Eimeria tenella*[J]. *Parasitol Res*, 2012, 110(2):865-874.
- [4] CUPPARI A F, SANCHEZ V, LEDESMA B, et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is

a novel vaccine candidate against toxoplasmosis[J]. *Vaccine*, 2008, 26(39):5040-5045.

- [5] KNOX D P. Proteinase inhibitors and helminth parasite infections[J]. *Parasite Immunol*, 2007, 29: 57-71.
- [6] MCKERROW J H, ROSENTHAL P J, SWENERTON R, et al. Development of protease inhibitors for protozoan infections[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(6): 668-672.
- [7] WANG Q, LI J, ZHANG X, et al. Protective immunity of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing rhomboid gene against *Eimeria tenella* challenge[J]. *Vet Parasitol*, 2009, 160(3-4): 198-203.
- [8] CARRIO M M, CUBARSI R, VILLAVERDE A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies [J]. *FEBS Lett*, 2000, 471:7-11.
- [9] KIM K. Role of host protease in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa[J]. *Acta Tropica*, 2004, 91(1): 69-81.
- [10] O'DONNELL R A, BLACKMAN M J. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(4): 422-427.
- [11] MCKERROW J H, ROSENTHAL P J, SWENERTON R, et al. Development of protease inhibitors for protozoan infections [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008, 21(6):668-672.
- [12] SZU-TING N G, JANGI M S, SHIRELY M W, et al. Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual stages of *Eimeria tenella*[J]. *Exp Parasitol*, 2002, 101(2-3): 168-173.
- [13] MISKA K B, FETTERER R H, BARFIELD R C. Analysis of transcripts expressed by *Eimeria tenella* oocysts using subtractive hybridization[J]. *J Parasitol*, 2004, 90(6): 1245-1252.

(编辑 白永平)