

犬新孢子虫 NcSRS2 基因真核表达质粒的构建

赵占中, 刘群*, 汪明

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 根据犬新孢子虫 NcSRS2 基因序列, 设计了 1 对含有 Kozak 序列 *Pst* I 和 *Xba* I 酶切位点的引物, 以含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 为模板, 经 PCR 扩增获得 NcSRS2 ORF 基因片段, 用 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切该片段, 回收得到含有以上 2 个酶切位点黏端的 NcSRS2 ORF 基因, 将此基因片段克隆至相同酶切回收后的 pcDNA3.1(+) 真核表达载体中, 获得重组质粒 pcNCSRS2。经 PCR 鉴定、限制性内切酶分析和克隆片段序列测定、比较, 证实了重组质粒的正确性。

关键词: 犬新孢子虫; 聚合酶链反应; NcSRS2 基因; 真核表达载体 pcDNA3.1(+)

中图分类号: S852.72⁺ 3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)08-0819-04

犬新孢子虫是多种哺乳动物共患的一种寄生原虫, 属于顶复门、孢子虫纲、球虫亚纲、真球虫目。Dubey 等^[1]首次从一只下肢瘫痪的犬体内分离到该虫体, 并且将其命名为犬新孢子虫 (*Neospora caninum*)。犬新孢子虫是一种细胞内专性寄生虫, 其中间宿主的范围很广, 能寄生于多种哺乳动物的多种有核细胞内, 在中间宿主体内呈现两种形态: 速殖子和包囊形式的缓殖子。*N. caninum* 的生活史尚未完全清楚, McAllister 等^[2]和 Lindsay 等^[3]研究证明犬可以作为新孢子虫的终末宿主。其生活史过程中出现的几种形态和某些生物学特征与粪地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 极为相似, 因此它的分类地位在很长一段时间里一直是人们讨论的问题, 现在它的分类地位已经得到公认。犬新孢子虫对多种哺乳动物都可以造成危害, 主要引起母畜流产或死胎, 以及新生动物的运动障碍和神经系统疾病, 其中对牛的危害最为严重, 牛新孢子虫病(病原为犬新孢子虫)已经在多个国家和地区暴发和流行, 给养牛业造成了相当严重的经济损失^[4]。

细胞内寄生原虫的表面蛋白主要是用来介导虫体黏附和入侵宿主细胞。早期研究表明犬新孢子虫与宿主细胞膜的物理性接触是由一种受体-配体系

统介导的, 该系统极有可能建立在蛋白-蛋白相互作用的基础上^[5]。近年来, 在犬新孢子虫分子生物学研究中发现了一些有价值的蛋白分子, 其中 NcSRS2 基因编码的犬新孢子虫表面蛋白 NcSRS2 可在致密颗粒和棒状体内以及速殖子的表面发现^[5-8], 它可以介导虫体黏附和入侵宿主细胞^[7-9]。研究发现它是 ELISA 试验中一种有效的抗原成分^[10,11]和研制新孢子虫疫苗的一种潜在候选抗原^[12,13]。本研究中利用真核表达载体 pcDNA3.1(+) 可以在哺乳动物细胞中表达的特性, 构建了新孢子虫 NcSRS2 基因真核表达质粒, 目的在于将体外表达的蛋白作为诊断抗原或免疫原, 为进一步建立特异性新孢子虫病 ELISA 诊断试剂盒、研制新孢子虫抗 NcSRS2 单克隆抗体以及 NcSRS2 基因疫苗的探索研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和载体

含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 由日本动物原虫病研究所惠赠; 真核表达载体 pcDNA3.1(+) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 菌株及细胞系

大肠杆菌 DH5 α 由中国农业大学动物医学院寄生虫学实验室保存, 感受态细胞为本实验室制备。

1.3 工具酶与主要试剂

核酸内切酶 *Pst* I、*Xba* I、T₄DNA 连接酶、TaqTM DNA 聚合酶、dNTP 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 快速纯化回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物

收稿日期: 2004-05-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371080); 北京市自然科学基金资助项目(6042016)

作者简介: 赵占中(1979-), 男, 山东聊城人, 硕士生, 主要从事兽医寄生虫学研究

* 通讯作者: 刘群, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医寄生虫学研究和教学工作, E-mail: qunliu@cau.edu.cn, Tel: 010-62732807

基因技术公司;其余试剂均为进口或国产分析试剂。

1.4 NcSRS2 基因的真核表达载体的构建

1.4.1 NcSRS2 基因的 PCR 扩增 根据质粒 P43 中 NcSRS2 基因的序列和 pcDNA3.1(+) 载体多克隆位点的序列,设计了 1 对引物,在上游引物中加入了 *Pst* I 酶切位点和 Kozak 序列,下游引物加入了 *Xba* I 酶切位点。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物的序列及引入的酶切位点如下:

上游引物: 5'-GTT CTGCAG GCCGCCA
Pst I Kozak 序列
 CCATGGCGACGCATGCTTGT-3'

下游引物: 5'-GC TCTAGA GTCGACCCGG-
Xba I
 GAATTCTCAGTACGCA-3'

合成的引物用灭菌 ddH₂O 稀释至工作浓度 50 pmol/μL, -20℃ 保存备用。

取质粒 P43 5 μL, 加入 10×PCR 缓冲液 5 μL, 2 mmol/L 上下游引物各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, 最后以灭菌 ddH₂O 将终体积调至 50 μL, 混匀, 于 PCR 仪上进行扩增, 同时设置不加质粒 P43 的阴性对照。反应条件: 94℃ 预变性 8 min; 再以 94℃ 1 min, 63℃ 1 min, 72℃ 1 min, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增完毕后, 取 PCR 产物 5 μL 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 观察结果, 并按博大泰克公司 PCR 产物回收试剂盒说明书进行回收, 回收后取 1 μL 电泳。

1.4.2 PCR 回收产物及表达载体双酶切 回收的 PCR 产物经 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切, 同时载体 pcDNA3.1(+) 也进行双酶切。酶切后的产物均用博大泰克公司的 DNA 回收试剂盒进行回收, 回收后各取 1 μL 电泳, 4℃ 保存备用。

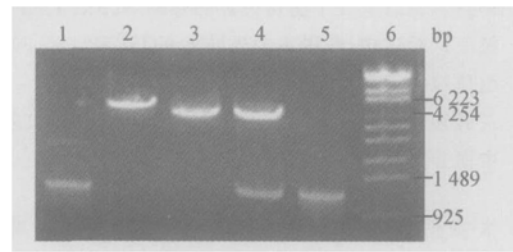
1.4.3 目的基因与载体的连接/转化 参照分子克隆实验指南^[14], 分别将酶切的目的基因与载体按 3:1 的体积比混合, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下 16℃ 过夜, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞并涂布平板, 挑选单个白色菌落提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定。命名初步鉴定的阳性重组质粒为 pcNcSRS2。

1.4.4 目的基因的序列测定与鉴定 将经过初步鉴定的重组质粒 pcNcSRS2 送宝生物工程(大连)有限公司进行序列测定, 获得目的基因序列后, 借助分析软件 DNASTar, 将目的基因与事先测定质粒 P43 中该基因序列进行核苷酸和氨基酸的同源性比较。

2 结果

2.1 NcSRS2 基因真核表达质粒的构建

以含有 NcSRS2 基因的质粒 P43 为模板, 用所设计的引物进行 PCR 扩增, 对扩增产物酶切后, 连接到 pcDNA3.1(+), 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑取疑为阳性的菌落提取质粒, 经酶切和 PCR 鉴定得到阳性重组体 pcNcSRS2, 结果见图 1。



1. 质粒 P43 PCR 产物; 2. pcNcSRS2 *Pst* I 酶切;
 3. pcDNA(+) 3.1/ *Pst* I; 4. pcNcSRS2 *Pst* I
 和 *Xba* I 双酶切; 5. 重组质粒 pcNcSRS2 PCR
 扩增产物; 6. Marker

1. PCR products of plasmid P43; 2. pcNcSRS2 / *Pst* I ;
 3. pcDNA(+) 3.1/ *Pst* I ; 4. pcNcSRS2 / *Pst* I + *Xba* I ;
 5. PCR product of recombinant pcNcSRS2 ; 6. Marker

图 1 重组质粒 pcNcSRS2 酶切和 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pcNcSRS2 by PCR and digestion

由电泳结果可看出, 对重组体进行 PCR 扩增, 可以得到 1 条 1 206 bp 的特异性条带, 重组质粒双酶切后可获得相同大小的线性 DNA 条带和 1 条约 5 kb 的载体带。说明 pcNcSRS2 含有按设计所要求的 NcSRS2 基因。

2.2 目的基因的测序鉴定

测序结果与 Hemphill 等报道的该基因 ORF 的序列完全一致^[5], 说明目的基因已经从重组质粒 P43 亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+), 成功地构建了 NcSRS2 基因的真核表达载体 pcNcSRS2。

3 讨论

从 pcDNA3.1(+) 的物理图谱可知, 载体 pcDNA3.1(+) 有巨细胞病毒强启动子(Pcmv) 序列确保目的基因的高水平表达; 多克隆位点的正向和反向都可以插入外源基因并且有利于克隆; 多克隆位点前有 T7 启动子/引物序列, 有利于目的基因的

体内转录和插入片段的体外表达分析; 多克隆位点下游有牛生长激素基因的多聚腺苷酰化信号, 可以促进有效转录的终止和 mRNA 的多聚腺苷酰化, 增强转录后 RNA 的稳定性; 载体中有双重选择标记和复制序列, 有利于在原核细胞中转化和在哺乳动物细胞中稳定转染的筛选, 以及在新霉素抗性基因后 SV40 多聚腺苷酰化信号, 可促进有效转录的终止和 mRNA 的多聚腺苷酰化; 载体 pcDNA3.1(+) 较其它病毒载体相比染色体随机整合效应小。因此, pcDNA3.1(+) 载体更方便与目的基因重组和筛选, 更能有效地在真核细胞中表达。

考虑到重组质粒最终要在哺乳动物细胞中进行表达, 且为了便于克隆, 在设计引物时, 上下游引物 5' 端分别加有 *Pst* I 酶切位点和 Kozak 序列^[15, 16]、*Xba* I 酶切位点, 其中上游引物包含了起始密码子 ATG, 下游引物位于终止密码子下游, 扩增产物包含了完整的基因阅读框。Kozak 序列的引入使载体 pcDNA3.1(+) 插入了一个内含子, 满足了用做 DNA 疫苗的质粒都需要有一个内含子或插入一个内含子的要求, 可增强哺乳动物基因的表达。

自从 1988 年 Dubey 首次分离犬新孢子虫以来, 对其的研究取得了长足的发展, 一些重要的功能基因得到了克隆, 如 NcP36^[17]、NcP43^[5] (NcSRS2) 等。这些功能基因的发现有助于了解犬新孢子虫的细胞生物学特性和制定相应的诊断、预防措施。其中 NcSRS2 基因的 ORF 大小为 1 206 bp, 编码 402 氨基酸, 表达的蛋白相对分子质量为 43 ku, 并且在其 N 端含有 53 个氨基酸大小的信号肽。其作用是介导虫体入侵宿主细胞, 抗 NcSRS2 的单克隆抗体能够阻断这一作用。NcSRS2 基因已经成功在昆虫杆状病毒系统中得到表达, 并且证实 NcSRS2 是一种含有糖基磷脂酰肌醇锚 (glycosylphosphatidylinositol anchor) 的跨膜蛋白, 可用于诊断和疫苗的免疫原^[18]。并且 NcSRS2 基因在 *T. gondii* 上不存在^[19], 因此以该基因编码的蛋白作为诊断原与 *T. gondii* 不发生交叉反应, 提高了诊断的特异性。Gottstein^[20] 等指出重组抗原 ELISA 能够把新孢子虫感染的牛与未感染的牛鉴别开来, 并且这些重组抗原不会与来自 *T. gondii* 或 *Sarcocystis* 感染的血清发生交叉反应, 这种方法适合于新孢子虫的常规检查。

重组质粒 pcNcSRS2 在体外细胞中的表达产物可作为诊断抗原, 进行新孢子虫的免疫学和血清学

特异性诊断方法的建立, 进而研制低成本、高特异性的诊断试剂盒。

重组质粒 pcNcSRS2 可作为免疫原, 制备对应的单克隆抗体, 此种方法具有常规方法不可匹敌的优势: 抗原容易纯化、用量少; 可通过基因工程的手段, 根据需要设计抗原、获得所需要的外源基因片段; DNA 质粒可以通过基因工程菌体外培养、提纯的方法获得, 且易于保存和运输; DNA 免疫可诱导机体的全面免疫反应, 且持续时间长, 避免了多次免疫的重复, 节省了人力物力。

重组质粒 pcNcSRS2 有直接免疫动物机体, 作为 DNA 疫苗应用于动物的潜力。Nishikawa 等^[12] 构建了含有 NcSRS2 基因的痘苗病毒, 免疫 BALB/c 小鼠取得了满意的效果。

因此, 本研究所构建的重组质粒 pcNcSRS2 为奶牛新孢子虫病的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Dubey J P, Carpenter J L, Speer A, et al. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs[J]. J Am Vet Med Assoc, 1998, 198: 1 269~ 1 285.
- [2] McAllister M M, Dubey J P, Lindsay D S, et al. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum* [J]. Int J Parasitol, 1998, 28: 1 473~ 1 478.
- [3] Lindsay D S, Dubey J P, Duncan R B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum* [J]. Vet Parasitol, 1999, 82: 327~ 333.
- [4] Gerard C, Kelton O, Duffield T F, et al. *Neospora caninum* serotatus and culling of Holstein cattle[J]. J Am Vet Med Assoc, 2002, 221: 1 165~ 1 168.
- [5] Hemphill A. Subcellular localization and functional characterization of Nc p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein[J]. Infect Immun, 1996, 64: 4 279~ 4 287.
- [6] Hemphill A, Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites[J]. Parasitology Res, 1996, 82: 497~ 504.
- [7] Hemphill A, Felleisen R, Connolly B, et al. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein[J]. Parasitology, 1997, 115: 581~ 590.
- [8] Howe D K, Crawford A C, Lindsay D, et al. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*[J]. Infect Immun

- nol, 1998, 66: 5 322~ 5 328.
- [9] Manger I D, Hehl A B, Boothroyd J C . The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1[J]. Infect Immun, 1998, 66: 2 237~ 2 244.
- [10] Schares G, Rauser M, Sondgen P, et al. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis[J]. Int J Parasitol, 2000, 30 (10) : 1 123~ 1 130.
- [11] Nishikawa Y, Kousaka Y, Tragoolpua K, et al. Characterization of *Neospora caninum* surface protein NcSRS2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *Neospora* infection[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10) : 3 987~ 3 991.
- [12] Nishikawa Y, Inoue N, Xuan X, et al . Protective efficacy of vaccination by recombinant vaccinia virus against *Neospora caninum* infection[J]. Vaccine, 2001, 19: 1 381~ 1 390.
- [13] Nishikawa Y, Xuan X, Nagasawa H, et al. Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene[J]. Vaccine, 2001, 19: 1 710~ 1 716.
- [14] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 68~ 71.
- [15] Kozak M. An analysis of 5'-Noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15: 8 125~ 8 148.
- [16] Kozak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA , 1990, 87: 8 301 ~ 8 305.
- [17] Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, et al. Identification and partial characterization of a 36kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites [J]. Parasitology, 1997, 115: 371~ 380.
- [18] Nishikawa Y, Tragoolpua K, Makala L, et al. *Neospora caninum* NcSRS2 is transmembrane protein that contains a glycosylphosphatidylinositol anchor insect cells[J]. Vet Parasitol, 2002, 109: 191~ 201.
- [19] Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, et al. The antigenic composition of *Neospora caninum* [J]. International Journal of Parasitology, 1999, 29: 1 175~ 1 188.
- [20] Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, et al. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland [J]. International Journal of Parasitology, 1998, 28: 679~ 691.

Construction of an Eukaryotic Expression Plasmid for NcSRS2 Gene of *Neospora caninum*

ZHAO Zhan-zhong, LIU Qun^{*}, WANG Ming

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Based on the NcSRS2 gene sequence of *Neospora caninum*, a pair of primers containing Kozak sequence, *Pst* I and *Xba* I enzyme digestion sites were designed . Using the plasmid P43 which contains NcSRS2 gene as template, the ORF region of NcSRS2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), then the PCR product was digested with *Pst* I and *Xba* I , and the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) was also done , then the gene was cloned into the vector. Finally a recombinant plasmid named pcNcSRS2 was obtained, and was identified by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing.

Key words: *Neospora caninum*; PCR; NcSRS2 gene ; eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)

* Corresponding author