

青海血蜱 cDNA 表达文库的构建

高金亮, 关贵全, 马米玲, 刘志杰, 党志胜, 刘爱红, 李文卉, 任巧云, 罗建勋, 殷宏*
(中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

摘要: 在无 RNA 酶污染的环境下摘取半饱血青海血蜱唾液腺、马氏管和卵巢等器官, 从中提取 RNA, 进而纯化 mRNA, 采用 oligo(dT) 引物合成双链 cDNA, 并在其两端加 *EcoRI*/*HindIII* 定向接头。将所产生的 cDNA 分子定向克隆到具有 *EcoRI*/*HindIII* 黏性末端的 λ SCREEN 载体的两臂之间。用 PhageMaker extract 对以上连接产物进行体外包装以形成完整的噬菌体, 并用之转染大肠杆菌 ER1647, 从而构建成青海血蜱的 cDNA 表达文库。经测定, 所构建青海血蜱 cDNA 文库的库容量约为 2×10^6 PFU/mL, 重组率为 100%, 扩增后文库的滴度为 8×10^9 PFU/mL。通过对该文库的免疫学筛选, 获得一个编码青海血蜱肌球蛋白碱性轻链的全长 cDNA 序列。所有结果显示, 青海血蜱 cDNA 表达文库已成功构建。

关键词: 青海血蜱; cDNA 表达文库; 构建

中图分类号: S852.74⁺6; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)11-1187-05

青海血蜱 (*H. aemaphysalis qinghaiensis*) 是我国特有的蜱种, 已发现该蜱能传播多种血液原虫病, 严重威胁着我国畜牧业的发展。目前对蜱的防治主要以化学药物防治为主。但随着蜱耐药性的产生以及环境污染和药物残留等严重公共卫生问题的出现迫使人们寻求新的防治途径。在众多控制蜱的方法中, 免疫学防治方法的前景最为诱人。国外以 Bm86 为抗原成分的抗微小牛蜱基因工程疫苗 TickGARDTM 和 GavacTM 开辟了人类利用疫苗免疫来成功防治外寄生虫的先河^[1,2]。基因工程疫苗的开发首先在于保护性抗原基因的选择, 本研究利用 λ SCREEN 载体成功构建了青海血蜱的 cDNA 表达文库, 以便进一步从中筛选功能性抗原基因, 为开发抗青海血蜱基因工程疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 青海血蜱 未感染血液原虫的青海血蜱由兰州兽医研究所蜱和蜱传病组传代培养提供。

1.1.2 试验动物 家兔, 兰州兽医研究所动物场提

供。

1.1.3 兔抗青海血蜱差异蛋白阳性血清 由本室制备。

1.1.4 试剂 TRIZOL Reagent (Invitrogen); mRNA Purification Kit (Amersham); DEPC (SIGMA); OrientExpressTM Oligo(dT) cDNA Synthesis Kit (Novagen); λ SCREENTM-1 *EcoRI*/*HindIII* Arms plus PhageMaker Kit (Novagen); *EcoRI*/*HindIII* End Modification Kit (Novagen); DNA Ligation Kit (Novagen); Mini Column Fractionation Kit (Novagen); DNA Marker DL2000 (TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 取材 采用 Tsuda 等^[3]的方法, 将半饱血青海血蜱成蜱在含 1% DEPC 的蒸馏水中充分洗涤后置滤纸吸干, 用速干胶水粘在塑料板上。在解剖镜下摘取蜱的唾液腺、马氏管和卵巢等器官并迅速放入 RNA 提取试剂 TRIZOL 中, -70℃ 保存备用。整个过程应严格无 RNase 操作。

1.2.2 总 RNA 的提取 在冰浴中将约 100 mg 青海血蜱唾液腺、马氏管和卵巢等器官在 1 mL TRIZOL 中充分研磨。将研磨物转入离心管, 在 4℃ 以 $12\,000 \times g$ 离心 10 min, 将上清转入干净离心管。水相的分离和 RNA 的沉淀、洗涤及溶解完全按相应说明书进行。取少量所提 RNA 用微量核酸蛋白检测仪测定 RNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 的纯度及含量, 并对其进行凝胶快速分析。其余 RNA 置 -70℃ 保存备用。

1.2.3 mRNA 的纯化 采用 mRNA Purification

收稿日期: 2004-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(30270992); 国家高新技术研究发展计划(863 计划)(2001AA249081)

作者简介: 高金亮(1976-), 男, 内蒙古鄂尔多斯人, 硕士, 主要从事蜱和蜱传病的研究

* 通讯作者: 殷宏, Tel: 0931-8342515; Fax: 0931-8342515;

E-mail: yinhong@public.lz.gs.cn

Kit, 将所提取的 RNA 适量溶解于 1 mL TE buffer 中, 利用 Oligo(dT)-Cellulose 柱纯化 mRNA, 操作完全按说明书进行。将所纯化 mRNA 沉淀重新溶于无 RNase 水中, 用微量核酸蛋白检测仪检测 mRNA 的纯度及含量, 并对 mRNA 进行凝胶快速分析, 其余 -70 °C 保存备用。

1.2.4 cDNA 的合成 在无菌无 RNase 环境下以 8 µg mRNA 为模板, Oligo(dT) 为引物, 在 MMLV RT 反转录酶作用下合成第一链 cDNA; 加入甲基化 dNTP 混合物、DNA 聚合酶 I 和 RNase H 以合成第二链 cDNA。取 2 µL 所合成的 cDNA 用于琼脂糖凝胶电泳检测, 其余进行末端修饰。

1.2.5 末端修饰 在 T₄ DNA 聚合酶作用下补平 cDNA 的末端后, 在其两端连接 EcoR I/Hind III 定向接头, 并用 EcoR I/Hind III 对接头进行酶切, 得到 5' 端为 EcoR I 3' 端为 Hind III 酶切位点的双黏性末端 cDNA, 便于与载体连接。

1.2.6 柱层析选择大片段 cDNA 将双链 cDNA 通过凝胶过滤树脂柱层析以除去多余的接头和长度小于 300 bp 的 cDNA 片段。琼脂糖凝胶电泳监测所收集洗脱液中 cDNA 片段大小。收集大片段 cDNA 用于与载体连接。

1.2.7 cDNA 与载体的连接 将 4 µL cDNA 与 0.5 µg λSCREEN 载体在 16 °C 过夜连接, 同时设大插入片段对照 (control insert) 和空白对照 (no insert) 两种连接体系。

1.2.8 重组 λ噬菌体的体外包装 将以上 3 组连接产物及 PhageMaker Control DNA 对照各适量分别与 10 µL PhageMaker extract 混匀 22 °C 水浴孵育 2 h 进行体外包装。向各包装反应管中加 SM 到各管终体积为 0.5 mL 以终止反应, 加 25 µL 无菌氯仿颠倒混匀, 4 °C 保存。

1.2.9 cDNA 文库的鉴定

1.2.9.1 cDNA 文库库容量的测定: 取上述包装产物各 5 µL 用 SM 溶液作梯度稀释后转染宿主菌 ER1647 (其中 PhageMaker Control DNA 包装产物转染宿主菌 LE392), 将这些噬菌体/细菌混合物与顶层琼脂糖凝胶混匀, 铺 LB 平板 37 °C 过夜培养。记数平板上噬斑数目, 计算 cDNA 文库的基础库容量。

1.2.9.2 噬菌体文库的扩增: 文库基础库容量测定后将 0.45 mL 噬菌体与 2.5 mL 宿主菌 ER1647 混匀, 37 °C 静止孵育 15 min。加 10 mL 融化的顶层琼脂糖铺于直径为 150 mm 的 H agar 平板上, 当噬

斑长到肉眼可见但不互相接触时, 用 10 mL SM 洗脱噬菌体。收集平板中所有 SM 到一无菌管中, 加 0.5 mL 氯仿摇匀。3 000 r/min 离心 5 min 去除琼脂糖残渣, 将上清移到一干净管中 (氯仿留于管底), 取 5 µL 测定扩增后噬菌体滴度。其余加 DMSO 到终浓度为 7%, 每管 200 µL 分装, -70 °C 保存。

1.2.9.3 cDNA 文库重组率的测定: 从测定库容量的平板上随机挑取单噬斑 50 个, 分别溶于 25 µL SM 溶液中, 室温洗脱 1 h。99 °C 加热处理 5 min。分别取 5 µL 作为模板, 用 λSCREEN-1 载体 SP6 启动子和 T7 终止子特异性引物进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 6 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小及重组率。

1.2.9.4 cDNA 文库的免疫学筛选及阳性克隆序列分析: 取少量青海血蜱 cDNA 表达文库感染宿主菌 BL21(DE3) pLysE, 将平板上的噬斑转印到 NC 膜上。用兔抗青海血蜱差异蛋白阳性血清对文库进行免疫学筛选。二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG。用筛选所得阳性噬菌体转染宿主菌 BM25.8 使之自动亚克隆为重组质粒, 用此亚克隆质粒转化宿主菌 JM109 并从中提取重组质粒, 完成插入片段的测序, 并与 GenBank 中的序列进行比较。

2 结果

2.1 RNA 和 mRNA

试验所提取 RNA 和 mRNA 经微量核酸蛋白检测仪测定, RNA 浓度为 450 µg/mL, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.982; mRNA 浓度为 308 µg/mL, OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 2.034。琼脂糖凝胶电泳分析图谱见图 1。

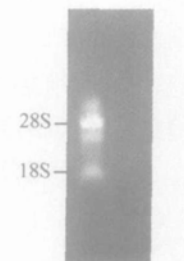


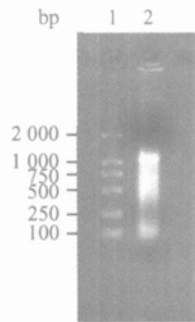
图 1 青海血蜱总 RNA 快速凝胶电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis pattern for quick gel analysis of total RNA of *H. qinghaiensis* tick

2.2 双链 cDNA 检测结果

将所合成的双链 cDNA 进行琼脂糖凝胶电泳

检测, 结果见图 2, 由图可见所合成 cDNA 呈集中于 100~ 2 000 bp 的瀑布状。



1. DL2000 Marker; 2. cDNA of *H. qinghaiensis* tick

图 2 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Electrophoretic analysis of synthesized cDNA by agarose gel

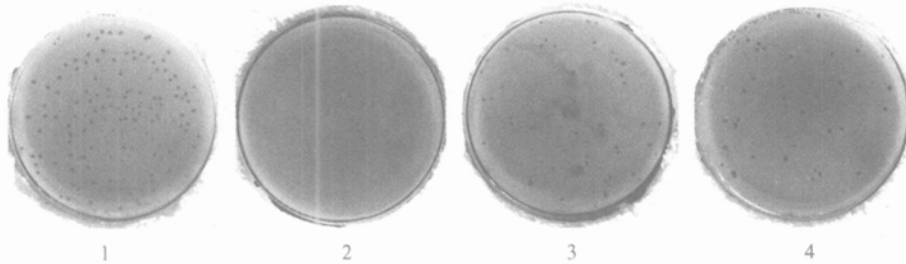
2.3 大片段 cDNA 的选择

对所收集的 cDNA 层析洗脱液用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 初始 200 μ L 洗脱液中无

cDNA, 其后加入 250 μ L X Column Buffer 所收集的 4 管洗脱液中均有 cDNA 出现(每管中约为 60 μ L)。因第 4 管 cDNA 片段较小, 故只将前 3 管中的 cDNA 片段合并到一管中抽提, 进行与载体的连接反应。

2.4 cDNA 文库的鉴定

2.4.1 基础库容量和扩增文库库容量 当 cDNA 文库稀释度为 10^{-3} 时, 板上噬斑约为 200 个, 则所构建青海血蜱 cDNA 表达文库基础库容量约为 2×10^6 PFU/mL。而稀释度为 10^{-3} 的空白对照包装产物板上无噬斑生长, 说明载体臂未发生自连; 稀释度为 10^{-3} 的大插入片段对照包装产物板上有大量噬斑生长, 说明 λ SCREEN 载体能与插入片段进行有效连接; 稀释度为 10^{-5} 的 PhageMaker Control DNA 包装产物板上的大量噬斑则说明, 此包装反应效率极高(图 3)。扩增后的库容量约为 8×10^9 PFU/mL。



1. cDNA 文库; 2. 空白对照; 3. 大插入片段对照; 4. PhageMaker DNA 对照

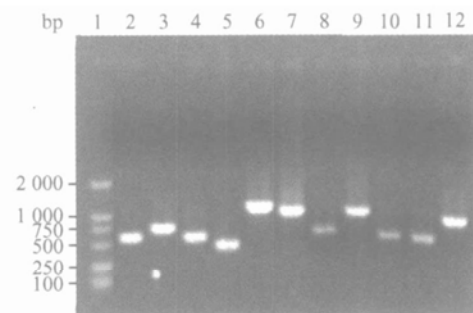
1. cDNA library; 2. Blank (no insert); 3. Control insert; 4. PhageMaker Control DNA

图 3 青海血蜱 cDNA 文库基础库容量的测定

Fig. 3 Determination of primary phage titer of cDNA library of *H. qinghaiensis* tick

2.4.2 cDNA 文库重组率的测定 对随机挑取的 50 个噬菌斑进行 PCR 鉴定, 发现此文库的重组率为 100%, 且大多数插入片段在 0.5~ 2 kb 之间(图 4)。

2.4.3 cDNA 文库的免疫学筛选结果 通过对 cDNA 文库的免疫学筛选, 得到一个肌球蛋白碱性轻链的 cDNA 全序列。将该基因预测氨基酸序列与 GenBank 中序列进行 blast 同源性比较, 发现与阿皮斯蜜蜂(XP_393544)和黑腹果蝇(AAL48594)的肌球蛋白碱性轻链的同源性分别为 59% 和 51%, 所获得的青海血蜱肌球蛋白碱性轻链的 cDNA 序列已登录 GenBank 数据库, 编号为 AY626788, 目前正在对该基因进行进一步研究。



1. DL2000 标准分子量蛋白, 2~ 12. 从文库中随机挑取的 cDNA 克隆

1. DL2000 Marker; 2~ 12. Random clones from the primary library

图 4 文库中随机挑取的克隆中插入片段的 PCR 扩增结果
Fig. 4 The PCR production of cDNA clones picked randomly from the cDNA library

3 讨论

蜱唾液在调节蜱吸附到宿主、吸血和传播血液原虫等方面起着至关重要的作用,于是蜱唾液腺也常常被视为抗蜱疫苗抗原存在的潜在器官^[4-7]。也有报道提示一些功能性抗原存在于蜱的唾液腺、马氏管、卵巢等器官^[8,9]。然而,要直接从蜱的这些器官中大量纯化出天然的某种特异性蛋白用作抗蜱疫苗抗原几乎无法实现。如果能分离到表达这些特异性蛋白的基因并用之表达重组蛋白,以上的困难则会迎刃而解。因此笔者构建了青海血蜱的 cDNA 表达文库,并准备从中筛选免疫原基因。Gill 等^[10]的研究表明当小亚璃眼蜱在兔体饲喂时,随着时间的推移,唾液腺中蛋白的种类和浓度也在逐渐增加。当饲喂到 96h 时,蛋白的种类和浓度达到最高峰。受这些研究报道的启发,再考虑到真核生物 mRNA 有时空特异性这一特点,本研究以在兔体饲喂约 96h 的干净青海血蜱的唾液腺、马氏管和卵巢等器官为材料制备 mRNA 制剂用以合成 cDNA。目的就是为了使某些特异性的低丰度 mRNA 得到富集,使得筛选免疫原基因的工作变得更加方便可靠。

cDNA 表达文库质量高低直接影响着对目的基因筛选的成败。一般情况下,当一个 cDNA 文库的容量为 $4.6 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^5$ PFU 时,得到目的克隆的概率为 99%,从而可筛选出各种目的 cDNA 基因片段。本研究所构建的青海血蜱 cDNA 文库的库容量、扩增库的滴度、重组率的测定结果以及各试验对照板上的噬斑生长情况均证实了所构建的 cDNA 文库质量很高。对文库中随机挑取克隆的 PCR 扩增结果显示,绝大多数 cDNA 插入片段大小在 500 bp 以上。这些结果表明笔者已成功构建了青海血蜱的 cDNA 文库。通过对文库的免疫学筛选得到了一个编码青海血蜱肌球蛋白碱性轻链的全长 cDNA 序列,这表明本研究已成功构筑了可以进一步研究青海血蜱的平台。

青海血蜱是我国特有的蜱种,已证实是羊泰勒虫 (*Theileria* sp.) 和中华泰勒虫 (*Theileria sinense*) 以及羊巴贝斯虫未定种 (*Babesia* sp.) 的传播媒介^[11-15]。但对其分子生物学研究,国内外均未见报道。本研究首次报道了青海血蜱 cDNA 文库,该文库的构建将为从中筛选抗蜱基因工程疫苗候选分子,以及发现一些其它有重要生物学意义的分子奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] Willadsen P, Bird P, Cobon G S, et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus* [J]. *Parasitology*, 1995, 110: S43~ S50.
- [2] Rodriguez M, Penichet M L, Mouris A E, et al. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation [J]. *Vet Parasitol*, 1995, 57: 339~ 349.
- [3] Tsuda A, Mulenga A, Sugimoto C, et al. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva protein [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 4 287~ 4 296.
- [4] Ribeiro J M. Role of tick saliva in blood feeding by arthropods [J]. *Annu Rev Entomol*, 1987, 32: 463~ 478.
- [5] Sauer J R, McSwain J L, Bowman A S, et al. Tick salivary gland physiology [J]. *Annu Rev Entomol*, 1995, 40: 245~ 267.
- [6] Wikel S K. Host immunity to ticks [J]. *Annu Rev Entomol*, 1996, 41: 1~ 22.
- [7] Wikel S K, Bergman D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities [J]. *Parasitol Today*, 1997, 13(10): 383~ 389.
- [8] Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, et al. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29 kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits [J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(4): 1 652~ 1 658.
- [9] McKenna R V, Riding G A, Jarmey J M, et al. Vaccination of cattle against the *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein [J]. *Parasite Immunology*, 1998, 20: 325~ 336.
- [10] Gill H S, Boid R, Ross C A. Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum* [J]. *Parasite Immunology*, 1986, 8: 11~ 25.
- [11] Guan G Q, Yin H, Luo J X, et al. Transmission of *Babesia* sp to sheep with field-collected *Haemaphysalis qinghaiensis* [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88: S22~ S24.
- [12] Yin H, Luo J, Guan G, et al. Experiments on transmission of an unidentified *Theileria* sp. to small ruminants with *Haemaphysalis qinghaiensis* and *Hyalomma anatolicum anatolicum* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2002, 108: 21~ 30.
- [13] Yin H, Luo J, Guan G, et al. Transmission of an unidentified *Theileria* species to small ruminants by *Haemaphysalis qinghaiensis* ticks collected in the field

- [J]. Parasitol Res, 2002, 88: S25~ S27.
- [14] Yin H, Luo J, Schnitger L, et al. Phylogenetic analysis of *Theileria* species transmitted by *Haemaphysalis qinghaiensis* [J]. Parasitol Res, 2004, 92: 36~ 42.
- [15] Yin H, Guan G, Ma M, et al. *Haemaphysalis qinghaiensis* ticks transmit at least two different *Theileria* species: one is infective to yaks, one is infective to sheep [J]. Veterinary Parasitology, 2002, 107: 29~ 35.

Construction of cDNA Expression Library of *Haemaphysalis qinghaiensis*

GAO Jin-liang, GUAN Gu-qian, MA Ming, LIU Zhijie, DANG Zhi-sheng,
LIU Aihong, LI Wenhui, REN Qiaoyun, LUO Jianxun, YIN Hong*

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Total RNA were isolated from organs such as salivary glands, Malpighian tubules, ovaries dissected from partially engorged *H. aemaphysalis qinghaiensis*. Subsequently mRNA were purified. A library of oligo(dT)-primed cDNA with added directional *EcoRI/HindIII* linkers was constructed from the purified mRNA. The constructed cDNA was ligated to the *EcoRI/HindIII* arms of the λ SCREEN vector. The recombinant phage DNA was packaged by using PhageMaker packaging extracts, resulting in a primary cDNA library with a size of 2.0×10^6 PFU. Data showed 100% of the library were recombinant and the titer of the amplified library was 8×10^9 PFU. A full-length cDNA encoding myosin light chain alkali of *H. aemaphysalis qinghaiensis* was screened from the expression library using rabbit anti-*H. aemaphysalis qinghaiensis* differential proteins serum. The results suggested that the cDNA expression library was constructed successfully.

Key words: *H. aemaphysalis qinghaiensis*; cDNA expression library; construction

* Corresponding author

动物疫情速递

4. 土耳其发生禽流感

2005年10月8日土耳其向OIE报告该国西部巴勒克埃西尔基济萨的一个农场暴发禽流感。病原属A型流感病毒,H5亚型(致病力和神经氨酸酶仍未知)。疫情始于2005年10月1日,于10月6日确认。诊断包括临床诊断和实验室检验(血清学)。共计有1800只疑似火鸡,其中病例1700只,死亡1700只,销毁100只。感染来源未知。采取的措施:扑杀、检疫和消毒。

此前未有有关火鸡高致病力禽流感的报道。

5. 巴西发生口蹄疫

2005年10月9日巴西向OIE报告其国内暴发口蹄疫。疫情发生在巴西南部南马托格罗索州的Eldorado地区。病原为O型口蹄疫病毒。2005年9月26日开始暴发,10月8日确认。诊断包括临床诊断和实验室检验。590头疑似动物中有582头牛和8头猪,其中有153头牛为病例,未发现死亡。疫情来源尚不清楚。已采取的控制措施:检疫、消毒、隔离、封锁、区域化、国内限制移动、流行病学调查。Eldorado及4个周边市已封锁,设立了检查点防止动物来源于FMD疑似动物的动物产品及副产品运出这些地区。在暴发地周围25 km设立了安全带,包括暴发地周围半径3 km范围的感染区、感染区周围7 km范围的管制区和管制区周围15 km范围的缓冲区。经检查:感染区内5个养殖场的8215头牛、200只羊和54头猪未发现病例;管制区内75个养殖场的27884头牛、1525只羊和276头猪未发现病例。拟采取扑杀措施,前期工作已在进行。

6. 伊朗发现大批野鸟死亡

2005年10月12日伊朗向OIE报告该国西Azorbaijan省Arras沿岸的Poldasht自2005年10月2日开始发生野生水禽(野鸭)大批死亡。至报告时死亡野鸭已达3673只,未发现病原体,死禽剖检也未发现病变,虚弱和死亡是唯一的症状。疫情来源尚不清楚。采取的控制措施:检疫、国内限制转移、筛选、区域化和疫区消毒。

摘译自OIE网