

柔嫩艾美耳球虫子孢子 cDNA 表达文库的构建

林青^{1,2}, 才学鹏^{2*}, 窦永喜², 翟军军^{1,2}, 闫鸿斌², 张彦明¹, 田广孚², 景志忠²

(1. 西北农林科技大学 动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所
家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 在无 RNase 污染的环境下, 提取柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 子孢子 RNA, 进而纯化 mRNA, 采用 Oligo(dT) 引物反转录合成 cDNA 第一链和第二链, 并在其两端加 *EcoR* I / *Hind* III 定向接头。将所产生的 cDNA 分子定向克隆到具有 *EcoR* I / *Hind* III 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, 形成完整的噬菌体, 并用该噬菌体转染大肠杆菌 ER1647, 进行文库容量测定和扩增。以扩增文库的 DNA 为模板, 利用已知基因引物克隆 *E. tenella* 3-1E 基因, 并进行测序。结果表明, 成功构建了 *E. tenella* 孢子化卵囊子孢子的 cDNA 文库, 文库原始库容量约为 4×10^6 pfu/mL, 插入片段约 100~3 000 bp, 扩增得到特定的 *E. tenella* 3-1E 基因, 说明文库质量高、代表性强, 为进一步从文库中筛选相关基因提供了有效的工具。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; 孢子化卵囊; 子孢子; cDNA 表达文库; 构建

中图分类号: S852.72⁺3; Q785

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)09-0999-04

Construction of cDNA Expression Library of *Eimeria tenella* Sporozoites

LIN Qing^{1,2}, CAI Xue-peng^{2*}, DOU Yong-xi², ZHAI Jun-jun^{1,2}, YAN Hong-bin²,
ZHANG Yan-ming¹, TIAN Guang-fu², JING Zhi-zhong²

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Total RNA and subsequent mRNA were isolated from *E. tenella* sporozoites. A library of Oligo(dT)-primed cDNA with added directional *EcoR* I / *Hind* III linkers was constructed and ligated to the *EcoR* I / *Hind* III arms of the screen vector, the recombinant phage DNA was packaged by using PhageMaker packaging extracts, resulting in a primary cDNA library. The library was proved to be a good quality by the control tests. The cloning efficiency was evaluated and the length of the cDNA fragment was assayed by PCR. Using the amplified library as template DNA, a pair of primers were designed according to the sequence of the *E. tenella* 3-1E, then the gene was amplified by PCR. The results showed that the cDNA expression library of *E. tenella* sporozoites was constructed and the 3-1E gene was amplified successfully. The capacity of the cDNA library was 4×10^6 pfu/mL and the length of inserts was about 100—3 000 bp. It is helpful in the further study on screening related genes.

Key words: *Eimeria tenella*; sporulated oocysts; sporozoites; cDNA expression library; construction

收稿日期: 2006-11-28

基金项目: 科技部社会公益研究专项项目“畜禽重大疫病监测与控制系统研究”(2001DIA10006)

作者简介: 林青(1972-), 男, 陕西吴起人, 讲师, 博士, 主要从事兽医寄生虫学、寄生虫免疫与分子生物学方面的教学与研究工作

* 通讯作者: 才学鹏(1958-), 男, 黑龙江省鸡西市人, 研究员, 博士生导师, 主要从事预防兽医学研究

鸡球虫病是由艾美耳球虫(*Eimeria*)引起的一种严重危害鸡生长发育的寄生原虫病。全球每年因鸡球虫病造成的损失十分巨大^[1~4]。用疫苗来预防鸡球虫病是今后的必然趋势,但在鸡球虫新疫苗的研究工作中仍然存在许多亟待解决的问题。尽可能多地筛选不同虫种、不同发育阶段的保护性抗原,联合制成多价疫苗^[5],这是当前乃至今后一段时间内球虫病疫苗研究的发展方向。核酸疫苗、基因工程疫苗的研究开发首先在于保护性抗原基因的选择。由于鸡球虫属于真核生物,基因组庞大,不同发育阶段的免疫原性和抗原构成都有差异,很难直接从中分离到目的基因片段。

构建 cDNA 文库筛选基因是获取候选基因常用的有效方法之一。本研究旨在构建高质量的柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)孢子化卵囊孢子的 cDNA 表达文库,为从中筛选和克隆功能性基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊

E. tenella 杨凌株(YL)孢子化卵囊用文献^[6]的方法分离、克隆并增殖的 *E. tenella* 杨凌株(YL)。将该虫株置于 28 °C 温箱中通气培养,至卵囊孢子化后记数,然后置 4 °C 冰箱内短期保存备用。

1.2 试剂

TRIZOL[®] Reagent 购自(Invitrogen 公司); PolyAtract mRNA Isolation System 购自 Promega 公司; DEPC 购自 Sigma 公司; OrientExpress[™] Oligo (dT) cDNA library Construction System (λ Screen) 购自 Novagen 公司; DNA Marker DL 2000 (TaKaRa); pMD-18T 载体、*Xho* I、*Eco*R I、*Hind* III 均为 TaKaRa(大连宝生物)有限公司产品; DNA 片段凝胶纯化回收试剂盒购自安徽优品生物工程公司; T4DNA 连接酶、RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 孢子化卵囊的准备

取分离纯化好的 *E. tenella* YL 株的孢子化卵囊,用含 1% DEPC 的蒸馏水离心洗涤孢子化卵囊,去除重铬酸钾,并用 1% DEPC 的蒸馏水垂悬。

1.4 cDNA 文库的构建

用 Trizol Reagent 提取 *E. tenella* YL 株的孢子总 RNA,总 RNA 中加入 RNase 抑制剂,用生物素化的 Oligo(dT) 亲和层析法分离纯化 mRNA。

按 Orient Express Oligo (dT) cDNA library Construction System 试剂盒说明进行文库构建:以纯化的 mRNA 为模板反转录合成 cDNA 第一链,然后 PCR 扩增为双链 cDNA。用 T4DNA 聚合酶补平 cDNA 末端,与 *Eco*R I / *Hind* III 定向接头连接后,再分别用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切消化,凝胶过滤法除去多余的接头和小于 300 bp 的 cDNA 片段。乙醇沉淀法回收大于 300 bp 的 cDNA 片段,用 T4DNA 连接酶与载体 λ Screen 16 °C 连接过夜,然后将连接产物体外包装为具有感染性的 λ 噬菌体颗粒。

1.5 cDNA 文库容量的测定与扩增

用 SM 将 100 μ L 包装产物分别稀释到 10^{-3} 和 10^{-4} ,取 100 μ L 稀释的噬菌体溶液和 100 μ L 过夜培养的宿主菌 ER1647,37 °C 静置吸附 20 min 后,将该宿主菌/噬菌体混合物迅速与 3 mL 融化的顶层琼脂糖(不高于 47 °C)混匀,立即倾倒到预热至 37 °C 的 LB 平板上,37 °C 倒置过夜培养,观察统计噬菌斑数,计算文库容量,公式为文库滴度(pfu/mL) = 噬菌斑数 \times 稀释倍数 $\times 10$ 。

文库扩增时,用 1×10^5 原始文库噬菌体克隆数在 150 mm H agar 平板上铺板,37 °C 培养至各噬斑几乎互相融合(5~7 h),加入 10 mL SM 洗液 4 °C 过夜,收集所有洗脱液,氯仿抽提,收集上清,测定文库滴度,加 DMSO 至终浓度为 7%,分装后,-70 °C 保存备用。

1.6 文库中 cDNA 片段长度的 PCR 鉴定

根据 λ SCREEN 载体多克隆位点两端序列设计一对通用引物(Novagen 公司推荐):上游引物(SiTag primer): 5'-CGA ACG CCA GCA CAT GGA CA-3';下游引物(T7 terminator primer): 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'。由上海生物工程技术有限公司合成。

建立如下 PCR 反应体系:10 \times PCR buffer 5 μ L; MgSO₄ (25 mmol/L) 3 μ L; dNTPs (100 mmol/L) 1 μ L; 上、下游引物各 0.5 μ L; *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L; 文库模板 1 μ L; 灭菌水加至 50 μ L。反应条件:95 °C 预变性 5 min; 94 °C 50 s, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后,取扩增产物 5 μ L 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,初步鉴定文库中所插入 cDNA 片段的大小。

1.7 文库中特定目的基因的克隆与鉴定

参照 GenBank 中堆型艾美耳球虫 (*E. acervulina*) 美国株 (US) 3-1E 基因序列^[7] (序列号 A F113613), 用 DNASTar 软件设计一对引物, 其中上游引物为 5'-GGCACGAGTCTTCATTGT-3', 下游引物为 5'-TCAAGCCATATTAAGAAAAGC-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系: 10× PCR buffer 5 μL; MgSO₄ (25 mmol/L) 5 μL; dNTPs (100 mmol/L) 1 μL; 上、下游引物各 0.5 μL; TaqDNA 聚合酶 0.5 μL; 文库模板 5 μL; 灭菌水加至 50 μL。反应条件: 98℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 DNA 片段, 与 pMD-18T 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 涂布于含有 X-gal 和 IPTG 的 Amp⁺ LB 平板上。过夜培养, 挑白色菌斑, 接种于 LB 培养基中。提取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行酶切和 PCR 鉴定后, 送上海生工生物工程技术有限公司测序。

2 结 果

2.1 总 RNA 提取和 mRNA 分离

试验所提取的总 RNA 和分离的 mRNA 经微量核酸蛋白检测仪测定, 其含量及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 如下:

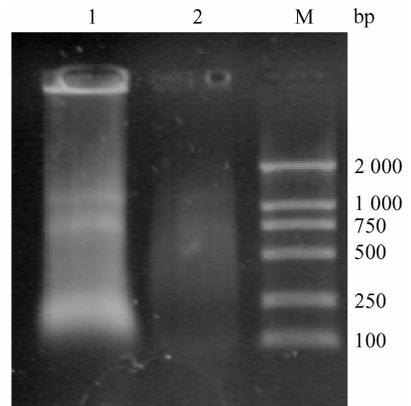
总 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.890, 浓度为 989.0 μg/mL; mRNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 2.060, 浓度为 37.5 μg/mL。表明所提取的总 RNA 和分离的 mRNA 含量大, 纯度高。琼脂糖凝胶电泳分析图谱见图 1。

2.2 cDNA 表达文库容量及插入片段长度分析

经 10⁻³ 稀释的包装产物 100 μL 转染宿主菌 ER1647, 计算得出原始文库容量约为 4 × 10⁶ pfu/mL。用通用引物扩增鉴定 cDNA 表达文库插入 cDNA 片段电泳结果表明, 插入片段集中在 100 ~ 3 000 bp 间 (图 2)。

2.3 目的基因的克隆、鉴定与序列分析

以 *E. tenella* YL 孢子 cDNA 表达文库为模板 PCR 扩增后, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在约 500 bp 处有一条特异 DNA 条带, 其大小与文献报道的 3-1E 基因相符。回收的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接所构建的重组质粒 pMD-3-1E 用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定, 结果在约 500 bp 处有特异 DNA 条带出现, 说明扩增的 DNA 片段成

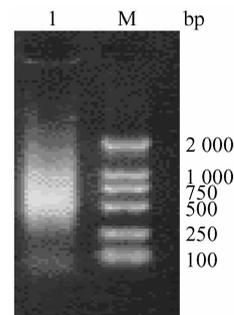


1. *E. tenella* 总 RNA; 2. *E. tenella* mRNA; M. DNA 标准 DL2000

1. *E. tenella* total RNA; 2. *E. tenella* mRNA; M. DNA marker DL2000

图 1 *E. tenella* YL 株总 RNA 和 mRNA 快速凝胶分析电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis pattern for quick gel analysis of total RNA and mRNA of *E. tenella* YL strain



1. 通用引物扩增条带; M. DL2000 DNA 标准

1. The amplified results with common primer; M. DNA marker DL2000

图 2 通用引物 PCR 扩增 cDNA 表达文库电泳结果
Fig. 2 Electrophoretic analysis of cDNA expression library amplified by PCR with common primer

功地插入了 pMD-18T 载体。进一步 DNA 测序结果表明, 该基因的 ORF 长为 513 个碱基, 共编码 170 个氨基酸。将报道的 *E. tenella* GS、*E. acervulina* US 及本试验克隆的 *E. tenella* YL 3-1E 基因用 DNASTar 软件进行序列比对分析后发现, *E. tenella* YL 和 *E. tenella* GS 3-1E 基因 ORF 区序列相似性为 99.8%, 仅第 447 位核苷酸不同, *E. tenella* YL 3-1E 为 T, 而 *E. tenella* GS 3-1E 为 G, 两者推导的氨基酸序列相似性为 99.4%, 第 149 位的 1 个氨基酸不同; *E. tenella* YL 与 *E. acervulina* US 3-1E 基因 ORF 序列相似性为 98.8%, 第

292、441、447 位 3 个核苷酸不同,推导的氨基酸序列分别在 98 位和 149 位的 2 个氨基酸发生变异,氨基酸相似性为 98.8%。证明所克隆基因为全长的 *E. tenella* 3-1E 基因 cDNA。

3 讨论

3.1 孢子化卵囊和子孢子的质量问题

要得到高质量的 *E. tenella* YL 株子孢子 cDNA 表达文库,首先要有高纯度的 *E. tenella* YL 株孢子化卵囊。由于卵囊是在鸡的粪便或盲肠内容物中获得的,所以要尽量去除杂质,避免细菌污染。同时还要注意在操作和贮存过程中引起卵囊活力下降的因素导致卵囊质量下降,如卵囊收集和处理时间不宜过久,孢子化卵囊贮存时间也不宜过久,在可能的情况下,时间越短越好。在用玻璃砂破卵囊时,时间要掌握好,时间太短,不能达到要求,时间太长,则会破坏子孢子,有 80% 左右的卵囊被打破即可。根据笔者试验中所观察到的结果来看,涡旋振荡 5 min 比较合适。

3.2 cDNA 文库的容量、插入外源片段的全长性和方向性

cDNA 文库的容量、插入外源片段的全长性和方向性,是衡量 cDNA 表达文库质量的重要参数。笔者选用的 Novagen 公司的 cDNA 表达文库构建试剂盒具有快速、高效、定向构建文库的性能,其文库主要适用于免疫学和核酸探针杂交高通量筛选,同时也适于 PCR 技术克隆扩增。一般来说,当一个 cDNA 文库的容量为 $4.6 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^5$ 时,能得到目的克隆的概率可达 99%,从而能筛选出低丰度的 cDNA 分子^[8,9]。本研究所构建的文库容量为 4×10^6 ,且插入的片段主要在 100~3 000 bp,在理论上完全满足克隆任何全长功能性基因的需要。笔者用已知 *E. tenella* 3-1E 基因的引物,从构建的 cDNA 表达文库中成功地克隆到目的片段,测序分析表明,得到了全长的 *E. tenella* 3-1E 基因,证明该

表达文库质量高,具有一定代表性和多样性,为从文库中高通量地筛选和发现未知功能性基因或其他相关分子奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bhogal B S, Miller G A, Anderson A C. Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1992, 31(3-4): 323~335.
- [2] Allen P C, Fetterer R H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(1): 58~65.
- [3] Williams R B. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(8): 1 209~1 229.
- [4] 索 勋, 蔡建平. 禽球虫病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [5] 韩红玉, 黄 兵. 鸡球虫重组疫苗的研究进展[J]. 生物技术通报, 2000, (6): 18~23.
- [6] 林 青, 于三科, 陈秀荔, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫单卵囊分离技术的构建及致病性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(3): 35~37.
- [7] Lillehoj H S, Choi K D, Jenkins M C. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis[J]. Avian, 2000, 44(2): 379~389.
- [8] 景志忠, 郭爱疆, 海 岗, 等. 猪带绦虫六钩蚴 cDNA 表达文库的构建及免疫原基因的筛选与克隆[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 391~396.
- [9] 高金亮, 关贵全, 张米玲, 等. 青海血蜱 cDNA 表达文库的构建[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(11): 1 187~1 191.