

# 伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA 的克隆及其在 *E. coli* 中的表达

刘全, 王祥生

(解放军军需大学军事兽医研究所, 长春 130062)

**摘要:** 根据引物设计的一般原则, 参照伊氏锥虫 HGPRT 基因的核苷酸序列设计、合成一对引物, PCR 扩增伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA。低熔点琼脂糖回收 PCR 产物, 并将其克隆至 pGEM-T Easy 载体中, 经酶切、PCR 鉴定和序列分析, 获得重组中间质粒 pGEM/HGPRT。重组中间质粒 pGEM/HGPRT 经 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切, 回收目的片段 HGPRT, 以非融合形式插入原核表达质粒 pBV220 构建表达质粒 pBV/HGPRT, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 42 °C 诱导表达, 聚丙烯酰胺凝胶电泳和薄层扫描分析, 表达产物 HGPRT 的分子量约为 23 kD, 与理论推算值相符, 表达率占总菌体蛋白的 19%, 经间接 ELISA 检测, 表达产物能被伊氏锥虫阳性血清所识别。

**关键词:** 伊氏锥虫; HGPRT; 克隆; 表达

中图分类号: S852.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)06-0597-03

伊氏锥虫是一种寄主范围广泛的血液原虫, 由于其容易产生抗药性和抗原变异, 目前仍无特效药和理想疫苗。伊氏锥虫不能从头合成嘌呤环, 但能利用宿主体内现存的嘌呤, 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)是伊氏锥虫外源途径合成 DNA 的重要工具酶, 并在其生长、代谢过程中发挥重要作用, HGPRT 已被作为抗锥虫的药物靶标<sup>[1,2]</sup>。HGPRT 底物类似物或 HGPRT 的抑制剂可以阻断伊氏锥虫外源途径合成 DNA, 从而达到防治伊氏锥虫病的目的<sup>[3]</sup>。本研究参照伊氏锥虫 HGPRT 基因的核苷酸序列设计合成一对引物, 运用 RT-PCR 扩增和克隆了伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA, 并在大肠杆菌中表达, 以期得到重组 HGPRT, 为伊氏锥虫病的治疗提供新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 虫株与菌株: 伊氏锥虫湖北水牛株、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均由本实验室保存。

1.1.2 质粒与试剂: pBV220 本室保存; pGEM-T Easy Vector 为 Promega 公司产品; RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶 *Eco*RI、*Sal*I、*Nco*I 和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物的设计与合成: 根据伊氏锥虫 HGPRT

基因的核苷酸序列设计一对引物<sup>[4]</sup>, 为了便于操作, 在引物的 5' 分别加上酶切位点 *Nco*I 和 *Sal*I, 预期扩增片段为 630 bp, 引物由大连宝生物工程公司合成。

P1: 5' - CCATGGAACCAGCTTGCAAATACG - 3'

P2: 5' - GTCGACTTACCGCTTGGCTTCTCCAG - 3'

### 1.2 方法

1.2.1 伊氏锥虫的复苏与纯化: 参照文献进行<sup>[5]</sup>。

1.2.2 伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA 的扩增: 总 RNA 的提取、RT-PCR 参照试剂盒说明进行。

1.2.3 重组质粒 pGEM/HGPRT 的构建: 将适量 PCR 产物与 pGEM-T 载体通过 T4DNA 连接酶连接即得质粒 pGEM/HGPRT, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取质粒进行 PCR 酶切鉴定及序列测定。

1.2.4 表达质粒 pBV/HGPRT 的构建: 将质粒 pGEM/HGPRT 用 *Nco*I 酶切, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段末端补平, 再用 *Sal*I 酶切, 低熔点琼脂糖回收 HGPRT 片段; 将载体 pBV220 用 *Eco*RI 酶切, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段末端补平, 再用 *Sal*I 酶切, 回收目的大片段, 与 HGPRT 片段连接即得表达质粒 pBV/HGPRT。

1.2.5 表达质粒 pBV/HGPRT 的转化及诱导表达: 将表达质粒 pBV/HGPRT 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经 PCR 和酶切鉴定后, 挑取单个菌落接种 3 ml 含 AMP 的 LB 培养基中, 30 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达 0.6 ~ 0.8 后转入 42 °C 诱导表达。

1.2.6 表达产物的 SDS-PAGE 电泳: 于 12% 的

收稿日期: 2002-09-06

作者简介: 刘全(1973-), 男, 四川蓬溪县人, 在读博士, 助研, 现从事分子寄生虫方面的研究。

SDS- PAGE 中进行电泳分析,用薄层扫描仪测定表达蛋白的相对含量。

1.2.7 表达产物的免疫活性测定:用间接 ELISA 法测定表达产物与伊氏锥虫阳性血清免疫反应性。

## 2 结果

### 2.1 伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA 的扩增结果

利用 RT- PCR 技术获得伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA,扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳(图 1),从图中可以看出,在标准分子量 500 bp 和 750 bp 之间有一大约 630 bp 的条带,与实验设计一致。

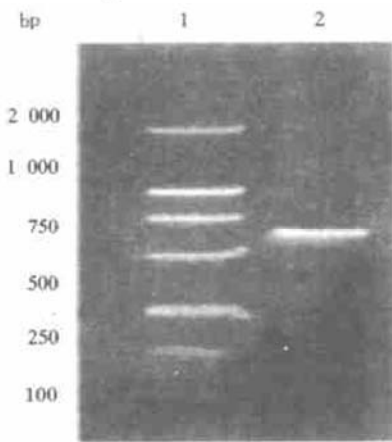


图 1 RT-PCR 扩增产物的电泳结果  
1.DL2000 标准分子量; 2.RT-PCR 扩增产物  
Fig.1 The result of RT-PCR product

### 2.2 重组中间质粒 pGEM/ HGPRT 鉴定结果

PCR 产物与 T-载体连接后,获得重组中间质粒 pGEM/HGPRT,经 PCR 酶切鉴定(图 2)及序列测定,序列测定结果与文献报道的一致<sup>[4]</sup>。

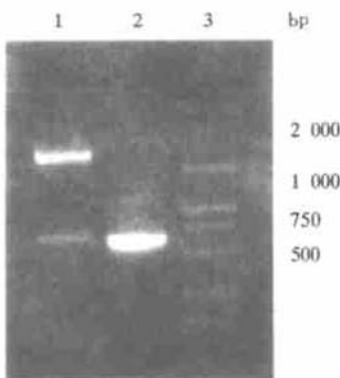


图 2 质粒 pGEM/HGPRT 鉴定结果  
1.质粒 pGEM/ HGPRT *Nco* I / *Sal* I 双酶切; 2.质粒 pGEM/HGPRT 的 PCR 扩增结果; 3.DL2000 标准分子量  
Fig.2 The result of identification of recombinant plasmid pGEM/HGPRT

2.3 重组表达质粒 pBV/ HGPRT 的鉴定结果 重组表达质粒 pBV/ HGPRT 经酶切和 PCR 鉴定结果如图 3 所示。重组表达质粒 pBV/ HGPRT 经 *Sal* I 酶切后其分子量(4.2 kb)比质粒 pBV220 经 *Sal* I 酶切后的分子量(3.6 kb)大,说明该质粒中含有外源基因,PCR 鉴定能得到 630 bp 大小的片段,进一步证实质粒 pBV/ HGPRT 含有伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA。

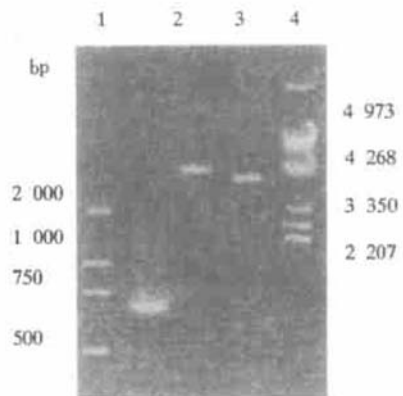


图 3 质粒 pBV/HGPRT 的鉴定结果  
1.DL2000 标准分子量; 2.表达质粒 pBV/ HGPRT PCR 鉴定结果; 3.质粒 pBV/ HGPRT *Sal* I 酶切结果; 4.质粒 pBV220*Sal* I 酶切结果; 5.λDNA(*Eco*R I + *Hind* III)  
Fig.3 The result of identification of recombinant plasmid pBV/HGPRT

### 2.4 pBV/ HGPRT 在 *E. coli* 中的表达与鉴定

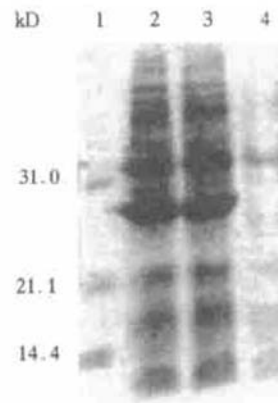


图 4 表达产物 SDS-PAGE 电泳结果  
1.Markers; 2.DH5α(pBV/ HGPRT) 诱导 4h; 3.DH5α (pBV/HGPRT)诱导 4h; 4.DH5α(pBV220)诱导 5h  
Fig.4 The expression products of the plasmids pBV/ HGPRT in *E.coli* DH5 α analysed by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis

pBV/ HGPRT 的阳性转化子经诱导表达后, SDS- PAGE 电泳,在 23 kD 处出现明显的特异蛋白条带(图 4)。薄层扫描结果表明表达蛋白最高可占菌体

总蛋白的 19%。

**2.5 表达产物的免疫活性测定结果** 经 ELISA 检测, 表达蛋白能够被伊氏锥虫阳性血清所识别。

### 3 讨论

伊氏锥虫是主要危害马属动物、水牛、黄牛及骆驼等动物的一种血液原虫。近年来, 我国有水牛感染伊氏锥虫后发生大批死亡的现象, 同时又有鹿、犬、猪、老虎等动物发生伊氏锥虫病的报道, 说明我国受该病危害的家畜在不断增多。由于伊氏锥虫容易产生抗原变异而逃避宿主对其的免疫作用, 因此至今尚无理想疫苗<sup>[6~8]</sup>。

伊氏锥虫与其所寄生的宿主在生理、生化及物质代谢间存在明显的差异, 主要表现在嘌呤核苷酸的合成途径上, 伊氏锥虫不能从头合成嘌呤环, 必须通过外源途径利用宿主体内现存的嘌呤。HGPRT 是伊氏锥虫外源途径合成 DNA 的重要工具酶, 它在锥虫的生长、代谢过程中发挥重要作用, 并与抗锥虫、利什曼原虫的药物在细胞内的代谢有关<sup>[9]</sup>, HGPRT 已被作为研究设计新型抗锥虫药的理想靶。HGPRT 底物类似物或 HGPRT 的抑制剂可以阻断伊氏锥虫外源途径合成 DNA, 从而达到防治目的<sup>[2]</sup>。本研究在大肠杆菌成功地表达了伊氏锥虫 HGPRT 基因 cDNA, 表达产物能够被伊氏锥虫阳性血清所识别。大量重组 HGPRT 的获得为设计新的 HGPRT 底物类似物或抑制剂奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Ullman B, Carter D. Hypoxanthine- guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections[J]. *Infect Agents Dis*, 1995, 4(1): 29~ 40.
- [2] Somoza J R, Skillman A G Jr, Munagala N R, Oshiro C M, et al. Rational design of novel antimicrobials: blocking purine salvage in a parasitic protozoan[J]. *Biochemistry*, 1998, 21; 37(16): 5344~ 5348.
- [3] Aronov A M, Munagala N R, Ortiz De Montellano P R, et al. Rational design of selective submicromolar inhibitors of *Trichomonas foetus* hypoxanthine- guanine- xanthine phosphoribosyltransferase[J]. *Biochemistry*, 2000, 25; 39(16): 4684~ 4691.
- [4] 刘全, 王祥生, 王德昭, 等. 伊氏锥虫 HGPRT 基因的 RT-PCR 扩增与克隆[J]. *中国兽医学报*, 2000, 20(3): 254~ 256.
- [5] 方元, 叶万祥, 聂海洋, 等. 用 DEAE-纤维素柱分离伊氏锥虫[J]. *兽医大学学报*, 1987, 7(4): 376~ 381.
- [6] Barry J D, McCulloch R. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite[J]. *Adv Parasitol*, 2001, 49: 1~ 70.
- [7] Rei S A. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia[J]. *Trends Parasitol*, 2002, 18(5): 219~ 224.
- [8] Rayah I E, Kaminsky R, Schmid C, Malik K H. Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*[J]. *Vet Parasitol*, 1999, 28; 80(4): 281~ 287.
- [9] Hwang H Y, Ullman B. Genetic analysis of purine metabolism in *Leishmania donovani*[J]. *J Biol Chem*, 1997, 1; 272(31): 19488~ 19496.

## Cloning and Expression of HGPRT cDNA of *Trypanosoma evansi*

LIU Quan, WANG Xiang-sheng

(The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

**Abstract:** A pair of PCR primer was designed referring to the HGPRT gene of *Trypanosoma evansi* and PCR was proceeded to get the HGPRT gene of *T. evansi*. The result that there was a bright band between 500bp and 750bp of DL 2000 Marker conformed to theoretical value. The PCR product was regained by the low melting point agarose and cloned into pGEM-T Easy vector. The plasmid, pGEM/HGPRT was constructed by inserting the HGPRT cDNA into pGEM-T Easy vector. By analysis of restriction endonucleases, PCR and nucleotide sequencing, the plasmid contained HGPRT cDNA. The target gene was recovered from the recombinant of pGEM/HGPRT and subcloned into expression vector pBV220, resulting in recombinant pBV/HGPRT, and transformed *E. coli* DH5 $\alpha$ . It was verified that the HGPRT cDNA have integrated in the proper position and correct orientation with the methods of restriction endonucleases digestion and PCR. The host cells, containing pBV/HGPRT were induced by 42 °C for 4h. Analysed by SDS-PAGE, the target protein was shown to be about 23kD, similar to the putative MW, SDS-PAGE intense scanning showed that the target protein accounted for 19% of the total amount of the bacterial protein, and could be recognized by the *T. evansi* positive serum by indirect ELISA.

**Key words:** *Trypanosoma evansi*; HGPRT; Cloning; Expression