

长角血蜱卵 cDNA 表达文库的构建

刘光远, 田占成, 才学鹏, 李知新, 谢俊仁, 王 路, 张 林, 龚真莉

(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: 【目的】以长角血蜱卵为材料构建高质量的长角血蜱卵 cDNA 表达文库, 为进一步筛选克隆目的基因奠定基础。【方法】在无 RNA 酶污染的环境下从长角血蜱卵中提取 RNA, 进而纯化 mRNA, 采取 oligo (dT) 引物合成双链 cDNA, 定向克隆到 λ SCREEN 载体。用 PhageMaker extract 对其进行体外包装以形成完整的噬菌体, 转染大肠杆菌 ER1647, 测定库容量。并用构建的 cDNA 文库克隆已知的长角血蜱促卵泡激素基因。【结果】所构建长角血蜱卵 cDNA 表达文库的基础库容量约为 1.38×10^6 PFU, 重组率为 100%, 扩增后文库的滴度为 2×10^9 PFU·ml⁻¹。获得了目的基因, 其序列与 GenBank 中的长角血蜱促卵泡激素 (DQ248886) 的核苷酸序列的同源性为 97.8%。【结论】成功构建了长角血蜱卵 cDNA 表达文库。

关键词: 长角血蜱; 卵; cDNA 表达文库; 构建

Construction of cDNA Expression Library from Eggs of *Haemaphysalis longicornis*

LIU Guang-yuan, TIAN Zhan-cheng, CAI Xue-peng, LI Zhi-xin, XIE Jun-ren, WANG Lu, ZHANG Lin, GONG Zhen-li

(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)

Abstract: 【Objective】cDNA expression library from eggs of *Haemaphysalis longicornis* was constructed for further screening and cloning of the potential candidate antigenic genes. 【Method】Total RNA was isolated from eggs of *H. longicornis*, mRNA were purified, and cDNAs were synthesized and ligated to λ SCREEN vector. The recombinant phage DNA was packaged by using Phagemark packaging extracts and then transfected to *E. coli* ER1647 to obtain the cDNA expression library. 【Result】The size of the primary cDNA library was 1.38×10^6 PFU with titer of the amplified cDNA library of 2×10^9 PFU·ml⁻¹. A full length cDNA encoding follistatin-related protein was cloned from the cDNA library by PCR. 【Conclusion】The cDNA expression library from eggs of *H. longicornis* was successfully constructed.

Key words: *Haemaphysalis longicornis*; Eggs; cDNA expression library; Construction

0 引言

【研究意义】蜱在摄食过程中, 不仅给宿主造成直接损害, 而且传播多种病原体。由蜱传播的新老疾病在对畜牧业生产造成巨大经济损失的同时, 也引发了严重的公共卫生问题。因而, 对蜱的控制非常必要^[1]。传统的控蜱方法主要是使用杀虫剂, 但由于长期使用

某些杀虫剂会使蜱产生抗药性, 加之杀虫剂的使用对畜产品和环境所造成污染等问题, 因而抗蜱疫苗的研制显示出较好的应用前景^[2]。为寻找高效、广谱的抗蜱疫苗候选分子、描述蜱与宿主的免疫生物学特性, 必须对蜱吸血、病原传播及蜱与宿主之间的相互作用有更加深入的了解^[3]。长角血蜱 (*Haemaphysalis longicornis*) 主要分布在中国东北、华北、西北等广

收稿日期: 2006-11-22; 接受日期: 2007-06-12

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (2005DKA21205-3); 国家高新技术研究发展计划 (“863”) 项目 (2006AA10A207); 甘肃省自然科学基金项目 (32S041-A25-035)

作者简介: 刘光远 (1963-), 男, 甘肃镇原人, 副研究员, 博士, 研究方向为预防兽医学。Tel: 0931-8311181; Fax: 0931-8340977; E-mail: liuguangyuan2002@sina.com。通讯作者才学鹏 (1958-), 男, 黑龙江鸡西人, 研究员, 硕士, 研究方向为预防兽医学。Tel: 0931-8342535; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

大地区, 是流行最广泛和最重要的蜱种之一^[4], 可传播牛、羊泰勒属 (*Theileria*) 和巴贝斯属 (*Babesia*) 的多种病原, 防控长角血蜱具有重要的流行病学意义。

【前人研究进展】在过去的 30 年, 研究蜱与宿主相互作用的免疫生物学技术取得了很大进步。根据宿主对蜱叮咬获得先天性或特异性免疫反应的机制, 集中研究了相当多的单个蜱对宿主免疫系统的影响^[5,6]。利用功能基因组和蛋白组学技术加速了对蜱、宿主、病原相互作用的研究步伐^[7]。目前通过多种手段已经发现许多蜱的免疫相关因子^[8~13], 但最成功且已商业应用的保护性抗原仅有抗微小牛蜱的 Bm86^[14]。【本研究切入点】蜱在不同发育阶段及不同的组织, 其表达的功能性抗原不尽相同, 故以蜱的不同发育阶段及其不同组织为材料构建的 cDNA 文库为基础, 筛选蜱的免疫候选基因成为近期的研究热点^[15,16]。目前的研究主要集中于蜱的唾液腺、中肠等组织, 对蜱卵的基因研究较少。而卵是蜱发育的主要环节, 同时卵也是蜱传性病原在媒介蜱体内发育和传递的重要阶段。与蜱生殖、发育循环相关分子可能成为蜱控制疫苗的候选抗原。【拟解决的关键问题】本研究选择了以长角血蜱卵为材料, 构建高质量的 cDNA 表达文库, 为进一步筛选克隆目的基因及蜱的生物学防治奠定基础。真核生物 mRNA 表达具有时空特异性, 因此如何选择长角血蜱卵的适当发育时间, 成为文库构建的基础; 文库中插入的外源片段的长度及完整性、所克隆的 cDNA 是否是来源于所构建的物种、在构建过程中是否是被污染等, 是确保文库质量的关键。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 长角血蜱 多代培育的未感染血液原虫的洁净蜱, 由兰州兽医研究所虫种资源课题组传代培养, 将饱血雌蜱产后 3 周的卵用作试验材料。

1.1.2 实验动物 家兔, 兰州兽医研究所动物场提供。

1.1.3 试剂 Trizol 试剂 (Invitrogen); mRNA 纯化试剂合 (Amersham); DEPC (Sigma); 定向表达寡脱氧胸腺核苷酸 [Orientexpress Oligo (dT)] cDNA 合成试剂盒 (Novagen); λ screen-1 EcoR I /HindIII 载体臂及噬菌体蛋白包装产物试剂盒 (Novagen); EcoR I /HindIII 末端修饰试剂盒 (Novagen); DNA 连接试剂盒 (Novagen); 柱层析片段纯化试剂盒 (Novagen); DNA 标准分子量 (DL2000, Takara)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 冰浴状态下将约 100 mg 长角血蜱卵在 1 ml Trizol 中充分研磨。研磨物转入离心管, 在 4℃ 以 12 000×g 离心 10 min, 上清移入干净离心管。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, 并对其凝胶快速分析。其余 RNA 置 -70℃ 保存备用。

1.2.2 mRNA 的纯化 采用 mRNA 纯化试剂盒, 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 沉淀重新溶解于无 RNase 的溶液中, 用微量核酸蛋白检测仪检测 mRNA 的纯度及含量并进行凝胶快速分析, 其余 -70℃ 保存备用。

1.2.3 cDNA 的合成 在无菌、无 RNase 环境下, 以 8 μ g 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 μ l cDNA 用于琼脂糖凝胶电泳检测, 其余进行末端修饰。

1.2.4 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。

1.2.5 柱层析选择大片段 cDNA 及与载体的连接 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, 收集大片段 cDNA, 将 4 μ l cDNA 与 0.5 μ g λ SCREEN 载体在 16℃ 过夜连接, 同时空白对照连接体系。

1.2.6 重组 λ 噬菌体的体外包装 将以上 2 组连接产物各适量分别与 10 μ l PhageMaker extract 混匀 22℃ 水浴孵育 2 h 进行体外包装。向各包装反应管中加入 SM, 使各管终体积为 0.5 ml 以终止反应, 加 25 μ l 无菌氯仿颠倒混匀, 4℃ 保存。

1.2.7 cDNA 文库的鉴定

1.2.7.1 cDNA 文库基础库容量的测定 取上述包装产物各 1 μ l 用 SM 溶液作梯度稀释后转染宿主菌 ER1647, 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℃ 过夜培养。计数平板上噬斑数目, 计算 cDNA 文库的基础库容量。

1.2.7.2 噬菌体文库的扩增 文库基础库容量测定

后将 0.45 ml 噬菌体和 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互相不接触时, 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 分钟取出琼脂糖残渣, 将上清移入干净管中 (氯仿留于管底), 取 1 μ l 测定扩增后噬菌体滴度。其余加 DMSO 到终浓度为 7%, 每管 200 μ l 分装, -70°C 保存。

1.2.7.3 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 μ l SM 溶液中, 室温洗脱 1 h, 99°C 加热处理 5 min。分别取 5 μ l 作为模板, 用 λ SCREEN-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。

1.2.7.4 文库中特定目的基因的克隆与鉴定 长角血蜱促卵毒素基因引物根据 GenBank 中该基因 (DQ248886) 序列参考设计, 引物序列为: 上游引物 5' CGG TGC CGT TTA AAG ACG AC 3', 下游引物 5' TTA ATC CGA AAT ATT GTT GTT C 3'; PCR 反应体系同前。扩增参数: 94°C 预变性 3 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 35 个循环后 72°C 延伸 6 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 pGEM-T-Easy 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 涂布于有 X-gal 和 IPTG 的 Amp⁺LB 平板上, 过夜培养, 挑白色菌落, 接种于 LB 培养基中。经 PCR 鉴定后, 测序。

2 结果与分析

2.1 RNA 和 mRNA

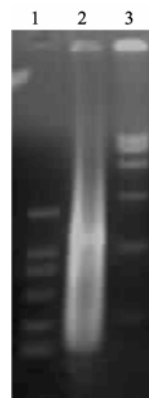
试验所提取 RNA 和 mRNA 经微量核酸蛋白检测仪测定, RNA 浓度为 405 μ g·ml⁻¹, OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.859; mRNA 浓度为 297 μ g·ml⁻¹, OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.983。

2.2 双链 cDNA 检测

将所合成的双链 cDNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1, 所合成 cDNA 呈集中于 100~2 000 bp 的瀑布状。

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 \times Column buffer 所收集的 4 管洗脱液



1. DL2000 marker; 2. cDNA of *H. longicornis*; 3. DL15000 marker

图 1 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳分析

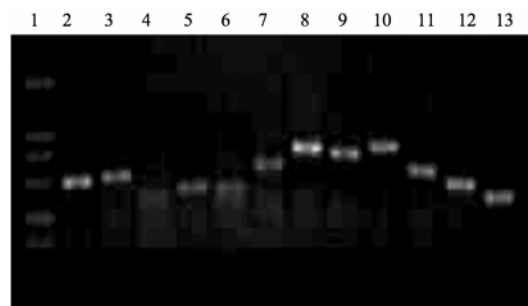
Fig. 1 Electrophoretic analysis of synthesized cDNA by agarose gel

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 138 个, 则所构成长角血蜱卵 cDNA 表达文库基础库容量约为 1.38 \times 10⁶ PFU。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; 扩增后的文库滴度为 2 \times 10⁹ PFU·ml⁻¹。

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 0.5~2.5 kb 之间, 见图 2。



1. DL2000 标准分子量蛋白; 2~13. 从文库中随机挑取的 cDNA 克隆
1. DL2000 marker; 2-13. Random clones from the primary library

图 2 文库中随机挑取的克隆中插入片段的 PCR 扩增

Fig. 2 The PCR production of cDNA clones from the primary library

2.4.3 目的基因的克隆、鉴定和序列分析 用新构建的 cDNA 文库克隆已知的长角血蜱促卵泡激素基因, 将其重组到 pGEM-T-Easy 载体上, 得到了与目的基因大小一致的片段。初步证明克隆得到了目的基因, 进一步进行 DNA 测序, 经 DNASTar 分析, 促卵泡激素基因的开放阅读框为 815 bp, 与 GenBank 上登录的促卵泡激素 cDNA (DQ248886) 序列相比较^[6], 发现其同源率为 97.8%, 推断的氨基酸同源率为 99%。其中 6 处 T 变为 C, 5 处 G 变为 A, 3 处 A 变为 G, 3 处 C 变为 T, 1 处 G 变为 T。证明所克隆基因为全长的促卵泡激素基因 cDNA。

3 讨论

理解蜱的发育过程对于研究蜱的生态、行为、蜱-病原的相互作用、媒介生物学、蜱-宿主相互作用机制以及蜱传病预防和控制来说是重要的。如卵黄形成和蜕皮进化是蜱完成生殖、发育循环的主要方式, 有证据表明节肢动物生殖的成功主要依赖于激素调控下的卵黄形成, 卵黄蛋白是胚胎发育的主要营养源以及蜕皮相关分子^[17], 有预防病原入侵, 调控蜱中肠内腔形成的围食膜^[18]和蜱吸血、蜕皮时期的其它必要功能的作用, 故与蜱生殖, 发育循环相关分子可能成为蜱控制疫苗的候选抗原。真核生物 mRNA 表达具有时空特异性, 因此随着时间的推移, 长角血蜱卵快要成熟时其表达的蛋白种类及浓度达到最高峰。利用这一点可使一些低丰度的 mRNA 得到富集, 使得筛选免疫基因的工作变得顺利。

一个文库的质量如何, 主要看其所插入的外源片段的长度及其完整性以及所克隆的 cDNA 是否是构建物种来源的。如果该文库在构建过程中被污染, 则合成的 cDNA 质量差, 直接导致文库库容量高, 但其所插入的外源基因却并不是需要的。为此, 本试验在严格无菌的条件下提取长角血蜱卵总 mRNA, 继而合成 cDNA。进一步对所构建好的文库作了相关数据的检测, 以确保文库的高质量。

cDNA 表达文库质量直接影响对目的基因筛选的成败。理论上, cDNA 文库的容量为 $4.6 \times 10^4 \sim 4.6 \times 10^5$ PFU·ml⁻¹ 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。本研究所构建的长角血蜱卵 cDNA 文库, 经对库容量、重组率及其插入片段长度进行的检测, 构建的文库的库容量为 1.38×10^6 PFU, 扩增后文库的滴度分别为 2×10^9 PFU·ml⁻¹, 插入的片段长度在 500~2 500 bp 之间, 且 blank (no

insert)、Control Insert 及 PhageMaker Control DNA 等对照板上的噬斑生长情况也证实了所构建的 cDNA 文库质量很高, 在理论上完全满足构建文库的要求。

用已知长角血蜱基因的引物, 从构建的 cDNA 表达文库中成功地克隆到长角血蜱促卵泡激素基因完整阅读框, 表明该文库质量高, 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新基因奠定了基础。

4 结论

本研究以长角血蜱卵为材料构建了高质量的 cDNA 表达文库。经测定, 基础库容量约为 1.38×10^6 PFU, 重组率为 100%, 扩增后文库的滴度为 2×10^9 PFU·ml⁻¹。对文库用已知的促卵泡激素引物进行扩增, 得到长角血蜱促卵泡激素全长 cDNA 序列。结果表明: 长角血蜱卵 cDNA 表达文库已成功构建, 适合于进一步筛选具有免疫学功能的新基因。

References

- [1] Sonenshine D E. *Biology of Ticks*. (vol. 2), New York: Oxford University Press, 1993.
- [2] Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infection*, 2000, 2(11): 1353-1361.
- [3] Opdebeeck J P. Vaccines against blood-sucking arthropods. *Veterinary Parasitology*, 1994, 54(1-3): 205-222.
- [4] 邓国藩, 姜在阶. 中国经济昆虫志, 第 39 册, 蜱螨亚纲硬蜱科. 北京: 科学出版社, 1991: 34-43.
Deng G F, Jiang Z J. *Economic Insect Fauna of China: Acari: Ixodidae. Fasc 39*. Beijing: Science Press, 1991: 34-43. (in Chinese)
- [5] Nuttall P A. Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology*, 1998, 116(Suppl.): 65-72.
- [6] 赵忠芳, 孔繁瑶, 杨汉春, 纪炳纯. 动物对长角血蜱幼虫感染的免疫应答. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2000, 7(1): 50-56.
Zhao Z F, Kong F Y, Yang H C, Ji B C. Immunity reaction against the hard tick *Haemaphysalis longicornis* larva infection. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 2000, 7(1): 50-56. (in Chinese)
- [7] Narasimhan S, Montgomery R R, DePonte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson J F, Sauer J R, Cappello M, Kantor F S, Fikrig E. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(5): 1141-1146.

- [8] Tsuda A, Mulenga A, Sugimoto C, Nakajima M, Ohashi K, Onuma M. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine*, 2001, 20, 19(30): 4287-4296.
- [9] Miyoshi T, Tsuji N, Islam M K, Kamio T, Fujisaki K. Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(8): 799-808.
- [10] Karim S, Ramakrishnan V G, Tucker J S. *Amblyomma americanum* salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE2 stimulated protein secretion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34(4): 407-413.
- [11] Willadsen P, Bird P, Cobon G S, Hungerford J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 1995, 110(Suppl.): S43-S50.
- [12] Wang H, Nuttall P A. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology*, 1994, 109(4): 525-530.
- [13] Wang H, Nuttall P A. Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite Immunology*, 1995, 17(10): 517-24.
- [14] Willadsen P, Smith D, Cobon G, McKenna R V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology*, 1996, 18(5): 241-246.
- [15] Mulenga A, Sugimoto C, Sako Y, Ohashi K, Musoke A, Shubash M, Onuma M. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Insect Immunology*, 1999, 67(4): 1652-1658.
- [16] Mulenga A, Sugimoto C, Ohashi K, Onuma M. Characterization of an 84kDa protein inducing an immediate hypersensitivity reaction in rabbits sensitized to *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Biochimica Biophysica Acta*, 2000, 15, 1501(2-3): 219-226.
- [17] Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius J W R, Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase P W, Rincon M, Kantor F S, Fikrig E. Salp 15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4 + T cell activation. *Immunity*, 2002, 16: 849-859.
- [18] You M, Xuan X, Tsuji N, Kamio T, Taylor D, Suzuki N, Fujisaki K. Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Biology Chemistry*, 2003, 7; 278(10): 8556-8563.

(责任编辑 林鉴非)