

文章编号:1000-7423(2003)-02-0087-03

# 大鼠感染血清免疫筛选弓形虫速殖子 cDNA 文库

蒋立平 吴翔 蔡力汀 王丹静 舒衡平\*

**【摘要】** 目的 为弓形虫病疫苗的研制提供新的抗原分子。方法 用弓形虫 RH 株速殖子感染大鼠,分离其血清作为探针筛选弓形虫 cDNA 文库,对阳性克隆的插入片段分别进行 PCR 扩增及 DNA 序列测定。结果 从 cDNA 文库  $4 \times 10^5$  个噬菌斑中筛选出 13 个阳性克隆,其插入片段大小分别为 0.45~2.4 kb。对 L1、L2、L4 和 L5 四个克隆进行测序,将所得序列查询基因库,结果,克隆 L2 与弓形虫 P24 主要抗原基因序列相同,L4 与蔗糖丙酮酸磷酸激酶具有同源性,L1 无任何相匹配的序列,为未曾报告过的新基因(GenBank 登录号为 AY180109),命名为 T.g-R1。T.g-R1 编码 134 个氨基酸的非跨膜蛋白。PROSCAN 分析显示 T.g-R1 含有 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,1 个肉豆蔻酰化位点,1 个微体细胞 C 端靶信号。L5 为一小片段,无完整编码读框。结论 阳性克隆的筛选和鉴定为抗弓形虫病疫苗的研制提供又一途径。

**【关键词】** 弓形虫;cDNA 文库;免疫筛选;大鼠

中图分类号:R382.5

文献标识码:A

## Immunological Screening of *Toxoplasma* Tachyzoite cDNA Expression Libraries with Serum from Infected Rats

JIANG Li-ping, WU Xiang, CAI Li-ting, WANG Dan-jing, SHU Heng-ping\*  
(Department of Parasitology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078)

**【Abstract】 Objective** To screen and identify the potential candidates for the development of toxoplasmosis vaccine.

**Methods** Rats were infected with *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) RH strain and their sera were used as a probe to screen *T. gondii* tachyzoite cDNA expression libraries. The positive clones were analyzed by PCR amplification and DNA sequencing.

**Results** Thirteen positive clones were obtained from about  $4 \times 10^5$  phage plaques after three rounds of screening. The size of the inserts ranged from 0.45 kb to 2.4 kb. A BLAST search of all available sequence databases using the partial sequences from four positive clones (L1, L2, L4, L5) showed that the sequence of L2 clone was identical with *T. gondii* P24 major antigen gene (TgP24). Clone L4 had a high homology with Saccharum officinarum pyruvate orthophosphate dikinase. There is no significant hit of any sequences to clone L1, suggesting that L1 could be a novel gene(GenBank accession number AY180109), named T.g-R1, which encodes a non-transmembrane protein with 134 amino acid open reading frame. PROSCAN analysis of the T.g-R1 amino acid sequence showed that this gene product contains two protein kinase C phosphorylation site, two casein kinase II phosphorylation site, one N-myristoylation site and one microbodies C-terminal targeting signal. Clone L5 was a small partial fragment. **Conclusion** The identification of positive clones provides a possible way for the development of toxoplasmosis vaccine.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*, cDNA library, immunoscreening, rat

\* Corresponding author, E-mail: hengpingshu@hotmail.com

Remington 等(1958)发现以弓形虫(*Toxoplasma gondii*, T.g)强毒株感染大鼠未见明显症状,表明大鼠对弓形虫具有较强的抵抗力<sup>[1]</sup>。胸腺功能正常的大鼠对弓形虫有抵抗力<sup>[2]</sup>,而免疫减弱的大鼠(如裸大鼠)对弓形虫高度易感。为探讨大鼠抗弓形虫感染的分子机制,寻找新的弓形虫病疫苗的候选分子,本文用弓形虫 RH 株速殖子感染大鼠血清作为探针,对 T.g 速殖子 cDNA 文库进行了免疫筛选。

### 材料与方 法

#### 1 T.g 速殖子 cDNA 文库

由美国伊利诺伊大学罗树红博士馈赠,构建于

$\lambda$ ZAP II /XL1-Blue 系统<sup>[3]</sup>,滴度为  $2 \times 10^9$  pfu/ml。

#### 2 菌种和弓形虫虫株

大肠杆菌 XL1-Blue, SOLR, 辅助噬菌体 ExAssist helper phage(滴度为  $10^9$ )均由罗树红博士馈赠。弓形虫 RH 株由上海第二医科大学杨惠珍教授赠送。

#### 3 试剂

T3 primer (5' AAT TAA CCC TCA CTA CTA AAG GG3')。T7 primer (5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C3')由上海申友生物公司合成。Taq 酶、异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷(IPTG)和 dNTP 为 Promega 公司产品,HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 为武汉博士德公司产品,其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

作者单位:中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室,长沙 410078

\* 通讯作者, E-mail: hengpingshu@hotmail.com

#### 4 弓形虫感染大鼠血清及抗体探针的制备

SD 大鼠购自本校实验动物中心,雌性,鼠龄 20 d, 80~120 g。每鼠腹腔接种速殖子约  $1 \times 10^7$  个,每隔 10 d 感染 1 次,感染后第 70 天断颈取眼球血分离血清。间接 ELISA 和斑点 ELISA 测血清中抗弓形虫速殖子虫体抗原的 IgG 分别为 1:51 200 和 1:400。将大鼠血清混合后经大肠杆菌裂解液,4 ℃ 吸附过夜,以除去其大肠杆菌抗体,4 ℃、1 200 g 离心 15 min 后,收集上清 -20 ℃ 保存备用。

#### 5 cDNA 文库的免疫筛选

cDNA 文库按 1:10 000 稀释,每 10  $\mu$ l 稀释文库液加入 200  $\mu$ l 新鲜的大肠杆菌 XL1-Blue, 37 ℃ 孵育 20 min,加入 4 ml 含四环素的 LB 顶层琼脂,迅速混匀后铺于 LB 固体培养基上,37 ℃ 培养 4~5 h,覆盖经 10 mmol/L IPTG 浸泡的 NC 膜,37 ℃ 继续培养 5 h,标记位置后取膜。置于含有 5% 脱脂奶粉的 PBST 中,室温下封闭 2 h, PBST 洗涤后,转置于 1:200 稀释并经预吸收的感染大鼠血清中,37 ℃ 温育 2 h,洗涤后 NC 膜放入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的兔抗大鼠 IgG 中,37 ℃ 反应 2 h,洗涤后用 DAB 显色 10~15 min。将与膜上棕色斑点对应的噬菌斑琼脂取下,再悬浮于 0.5 ml SM 缓冲液中,进行复筛,经 3 轮筛选至全板皆为阳性噬斑。

#### 6 辅助噬菌体 ExAssist helper phage 体内剪接

挑单个阳性噬菌斑至 500  $\mu$ l SM 液中,取噬菌体 250  $\mu$ l,加 200  $\mu$ l XL1-Blue,加入 1  $\mu$ l 辅助噬菌体 Ex-Assist helper phage,37 ℃ 温育 2 h,再加入 3 ml LB 培养基,37 ℃ 孵育 2.5~3 h,65 ℃~70 ℃ 加热 30 min,4 ℃ 4 000 g 离心 30 min。剪切后的阳性克隆上清液各取 10  $\mu$ l,分别加入 200  $\mu$ l 新鲜 SOLR,37 ℃ 孵育 15 min,取 200  $\mu$ l 涂布在含氨苄青霉素的 LB 平板上,置 37 ℃ 培养过夜。

#### 7 PCR 扩增鉴定阳性克隆

挑取单个菌落的一半为模板进行 PCR 扩增。PCR 总体积为 100  $\mu$ l: 10 $\times$ buffer 10  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ l, dNTP 1.5  $\mu$ l, T3 primer 4  $\mu$ l, T7 primer 4  $\mu$ l, Taq 酶 1  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 68.5  $\mu$ l, 菌落半个。每管再加 50  $\mu$ l 灭菌甘油,混匀。反应参数:94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 80 s,51 ℃ 退火 80 s,72 ℃ 延伸 110 s 共 35 个循环。最后 1 个循环 72 ℃ 延伸 8 min。反应在 DNA 扩增仪 (Hema 480) 上进行,各取扩增产物 3  $\mu$ l,用 1.0 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

#### 8 序列分析

测序试剂盒为 AB Applied Biosystems 公司产品 (ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Ready Cycles Sequencing Kit)。反应总体积 20  $\mu$ l: Mix 8  $\mu$ l, primer (1 pmol) 4  $\mu$ l, DNA 模板 400 ng, 加无菌蒸馏水至 20  $\mu$ l。反应参数:95 ℃ 变性 2 min,96 ℃ 变性 10 s,50 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 4 min 共 25 个循环。反应产物用乙醇沉淀,测序胶电泳,用 DNA 序列自动分析仪读取序列。所有操作严格按照试剂盒说明书进行。通过互联网将获得的序列送入 NCBI GenBank,用 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 程序进行核苷酸同源性比较;根据 Score 值确定所测序列是已知基因或未知的新基因,同时在弓形虫数据库进行了检索 (<http://www.toxodb.org/ToxoDB.shtml>)。并用蛋白质分析软件对新基因编码的蛋白质结构与功能进行预测。

### 结 果

#### 1 cDNA 文库的筛选

共对 20 个平板进行初筛,在约  $4 \times 10^5$  个噬菌斑中,16 个有不同强弱的阳性信号,两次复筛后仍有 13 个表现出良好的反应信号,分别命名为 L1~L13。

#### 2 体内剪接

经辅助噬菌体 ExAssist helper phage 剪接过的上清液感染 SOLR 菌后,在含氨苄青霉素的培养基上长出菌落表明剪接成功,其中即含有质粒的大肠杆菌菌落,而未转化的 SOLR 不能在 LB-AMP 板上生长。

#### 3 PCR 鉴定阳性克隆插入片段

所有阳性克隆均扩增出特异性条带,插入的弓形虫速殖子 cDNA 片段大小分别为 0.45~2.4 kb,其中 0.55 和 1.1 kb 各 3 个,0.45、0.7、0.75、0.9、1.9、2.1 和 2.4 kb 各 1 个 (图 1)。

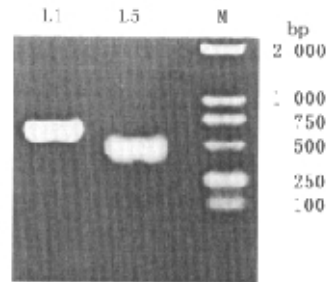


图 1 阳性克隆 PCR 产物电泳鉴定  
Fig.1 Identification of positive clones by PCR amplification

#### 4 cDNA 序列的初步分析

选取 L1、L2、L4、L5 进行测序。L2 与弓形虫 P24 主要抗原基因序列相同。L4 长为 593 bp, 与蔗糖丙酮酸磷酸激酶的同源性很高, Score 值为 995。L1 长为 539 bp, 与 GenBank 中其它已知基因无明显同源性 (Score 值小于 50), 为弓形虫的新基因序列 (GenBank 中的登录号为 AY180109)。ORF 分析含有一个编码框, 起始密码子 ATG 位于第 14 核苷酸, 终止密码子 TGA 位于第 418 核苷酸, 3' 端含 polyA 尾, 将其命名为 T.g-R1 (图 2)。L5 经初步测序获长为 460 bp 的片段序列, 经同源性搜索无显著性相似序列 (Score 值小于 50), 也无完整的编码框, 故有待继续测序以获取 cDNA 全长。

```
ggcacgagaagaantggccaaagggcaagagcaagacagctcaacactcgttctttt
M V Q G G E Q G Q A Q P L R S F
cgacaaggcagccatagacaagctgcttgcgcacatcccccaagctcgtgtgatacccc
R Q G D L R Q A A C R H P Q G S S D H P
gcacactgtctcgaaagactgaagtgaaagcgttcgctgcgcgtcaatcgota
A H C L R K T E G C V A G A S G H P L
cctcaaggaccaggctgatacaagatgttgcgcagacacacacactccagatcota
P Q G P R P D Q D C R R A P P L P V H L
caccagaaaccagtgccaaagtgacgtttctctcggggagcaactcctctgacac
H Q K H Q C L K V D V S S R E Q L L C D
ttgccggcgatccctgactctcgtgtttctcctctgacatacaagtaicgatgca
L P R R S L D S R W F R P V H T R M H A
tctgtgggttaagttgagtgatgcggctcggggcgaacaggggagcagatgagca
S V G L S V D V R L R G E Q G S R V
gacactcagacaattggcgaggtaaccgggtctcctctcgtcggcagttctccgatg
tctctgaaactaacttttggtaagttcttttcgagtaaaaaaaasasasasasaa
```

图 2 T.g-R1 基因的核苷酸及编码的氨基酸序列  
Fig. 2 The nucleotide and deduced amino acid sequences of T.g-R1

#### 5 T.g-R1 编码蛋白质的结构与功能预测

T.g-R1 编码 134 个氨基酸, 该蛋白理论分子量为 15.5 kDa, 等电点为 9.18。TmPred 软件分析亲、疏水性预测 T.g-R1 编码蛋白为非跨膜蛋白, 不与其它已知蛋白同源。PROSCAN 分析显示 T.g-R1 编码蛋白含有 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (15~17 和 88~90 位氨基酸), 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (43~46 和 88~91 位氨基酸), 1 个肉豆蔻酰化位点 (4~9 位氨基酸), 1 个微体细胞 C 端靶信号 (132~134 位氨基酸)。SOPMA 二级结构预测, 该蛋白富含随机卷曲 (61.19%),  $\alpha$ -螺旋、延伸链和  $\beta$ 转角的含量分别为 17.16%、14.93% 和 6.72%。

### 讨 论

筛选 cDNA 文库的方法包括两类: 利用核酸杂交分离目的基因和基于基因编码蛋白的检测筛选 cDNA 表达文库。利用各种来源的血清可以识别针对血清特异的基因编码的蛋白, 从而筛选到目的基因。而且用抗体筛选 cDNA 文库在研究特定细胞中基因组的表达状态以及表达基因的功能鉴定方面具有特殊的优势。利用有效的免疫动物血清、感染血清、阳性病人血清筛选 cDNA 文库, 是获取疫苗候选分子的途径之一。

其中以确定有保护性的抗血清筛选 cDNA 文库, 所获得的阳性克隆的表达蛋白可初步确定其保护性。王庆林等<sup>[4]</sup>利用对血吸虫具有先天抗性的东方田鼠感染血清筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库, 共获得了 12 个阳性克隆, 其中 3 个为日本血吸虫新基因。周东明等<sup>[5]</sup>用大鼠感染血清筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库, 也获得了 12 个阳性克隆, 其中 4 个可能为日本血吸虫新基因片段。大鼠对弓形虫具有较强的自然抵抗力, 这种自然抵抗力与大鼠的年龄<sup>[6]</sup>、大鼠巨噬细胞的活性有重要的关系<sup>[7]</sup>。本实验用弓形虫 RH 株速殖子腹腔接种 5 只 SD 大鼠, 每只为  $1 \times 10^7$  个, 70 d 后无一发病及死亡。而昆明小鼠每只腹腔接种  $2 \times 10^5$  个 RH 株速殖子, 4~7 d 全部死亡。由此可见, SD 大鼠确实对弓形虫具有天然抵抗力。本研究采用弓形虫感染大鼠血清筛选 cDNA 文库, 可望筛选出具有天然抗性的抗原分子, 以探讨大鼠抗弓形虫的分子机制, 并为弓形虫病的疫苗研制、免疫诊断的应用等提供一条有效途径。

本实验显示: 大鼠感染血清中确实存在抗弓形虫的特异性抗体。经过 3 轮免疫筛选, 我们共获得了 13 个阳性克隆, 插入的片段大小为 0.45~2.4 kb。测序分析显示, L2 与弓形虫 P24 主要抗原基因序列相同, L4 与蔗糖丙酮酸磷酸激酶同源性很高。L1 为新基因序列 (GenBank 登录号为 AY180109), 经计算机分析该基因编码 134 个氨基酸组成的非跨膜蛋白, 含有 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 1 个肉豆蔻酰化位点。预示 T.g-R1 编码蛋白可能受磷酸化激活调控。阳性克隆的体外表达及保护性实验正在进行中。

#### 参 考 文 献

- [1] 李允鹤主编. 寄生虫病免疫学和免疫诊断学[M]. 第 1 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991: 115.
- [2] Jacobs L. Propagation, morphology and biology of *Toxoplasma* [J]. Ann N Y Acad Sci, 1956, 64: 154-159.
- [3] Luo S, Vieira M, Graves J, et al. A plasma membrane-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase co-localizes with a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase to acidocalcisomes of *Toxoplasma gondii* [J]. The EMBO Journal, 2001, 20(1-2): 55-64.
- [4] 王庆林, 易新元, 曾宪芳, 等. 东方田鼠感染血清免疫筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17: 547-551.
- [5] 周东明, 易新元, 曾宪芳, 等. 大鼠抗感染血清筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 55-57.
- [6] Guerrero OM, Chinchilla M, Castro A, et al. Age influence in the natural resistance of white rat and mice to the protozoan *Toxoplasma gondii* [J]. Rev Biol Trop, 1995, 43 (1-3): 27-30.
- [7] Chinchilla M, Portilla E, Guerrero OM. Rat macrophage activity against *Toxoplasma gondii* studied by electron microscopy [J]. Rev Biol Trop, 1986, 34: 83-88.

(收稿日期: 2002-12-10 编辑: 庄兆农)