

鸡柔嫩艾美耳球虫表面抗原基因 *sag* 10 在毕赤酵母中的表达及鉴定^{*}

韩德强^{1,3} 丁宏标^{1**} 乔宇¹ 索勋² 郝永清³

(1. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094;

3. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要 *sag* 基因家族是制备基因工程疫苗重要的候选基因。本研究通过在毕赤酵母 *Pichia pastoris* 中表达柔嫩艾美耳球虫 *Eimeria tenella* 表面抗原基因 *sag* 10, 来探讨 *sag* 10 表达后的生物学活性。本文首先提取柔嫩艾美耳球虫北京株第 2 代裂殖子总 RNA, 根据 GenBank 报道序列 (AJ 586552) 设计引物, 应用 RT-PCR 技术扩增得到鸡球虫表面抗原 *sag* 10 基因。然后将 *sag* 10 与真核表达载体 pPIC9K 连接, 构建了 pDQ052 分泌型真核表达质粒, 并转化毕赤酵母 GS115, 利用 G418 抗性筛选多拷贝重组菌株, 进行优化表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测表达结果, 在 43 kDa 处有明显的免疫印迹条带, 表明目的蛋白得到表达, 而且能被特异性抗体所识别, 说明表达的 SAG10 蛋白具有生物学活性。

关键词 柔嫩艾美耳球虫; *sag* 10; 表达; 毕赤酵母

鸡柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 主要寄生在宿主盲肠, 引起出血性肠炎, 致病力最强, 严重影响养殖业健康发展 (Williams, 1999)。该虫种生活史复杂, 与其他虫种间几乎无交叉反应 (Vermeulen *et al.*, 2001)。目前使用抗球虫药是防治肉仔鸡病的主要手段, 但抗药性和药物残留等问题限制了球虫药物的广泛应用。分子生物学技术的迅猛发展为寄生虫疫苗的研发开辟了新的思路。从 1987 年 Fites 等克隆第 1 个鸡球虫抗原基因开始, 对球虫基因亚单位疫苗研究日益受到关注。

抗原的免疫原性决定着疫苗保护作用的强弱, 对保护性抗原进行分离和鉴定是免疫预防研究工作的重点。球虫表面抗原蛋白是一种球虫入侵相关蛋白 (Invasion Related Protein), 在触发宿主免疫应答过程中具有重要作用 (Jenkins *et al.*, 1990)。许多研究者认为艾美耳球虫感染后, 入侵阶段虫体的表面抗原可引起保护性免疫应答, 能保护健康鸡的肠上皮细胞免受虫体的入侵。一般认为子孢子入侵和裂殖子生殖阶段是球虫最危险的阶段 (Lillehoj, 1998)。表面抗原基因 *sag* 10 是通过建立 *Eimeria tenella* cDNA 文库, 筛选而得

到的保护性抗原基因, 在子孢子入侵和裂殖子生殖阶段均有表达 (Susana *et al.*, 2003), 因此该抗原具有潜在应用价值。

本试验从感染 *Eimeria tenella* 鸡盲肠分离纯化第 2 代裂殖子后提取其总 RNA, 通过 RT-PCR 技术克隆 *Eimeria tenella* 表面抗原基因 *sag* 10 并转入甲醇营养型毕赤酵母进行表达, Western blot 鉴定表达的蛋白具有生物学活性。

1 材料与方法

1.1 虫种、菌株和质粒

柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 北京株由中国农业大学索勋教授惠赠。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本室保存; 毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 (*his* 4, *Met*⁺) 和 pPIC9K 分泌型表达载体购自 Invitrogen 公司; 质粒 pGEMT Vector 购自 Promega 公司。

1.2 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子表面抗原基因 *sag* 10 的获得

1.2.1 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子分离纯化: 健康 1 日龄鸡 50 只, 购自北京华都肉鸡公司,

收稿日期: 2006-05-08

^{*} 基金项目: 国家“863”计划课题 (2003AA241160); 中国-丹麦政府间国际合作项目

^{**} 通讯作者: E-mail: dinghongbiao@mail.caas.net.cn

在消毒鸡舍中饲养，饲料与水中不含抗球虫药物。饲喂至 14 日龄，按 5 000 个/羽经口接种 *Eimeria tenella* 孢子化卵囊，于感染后 120 h 杀鸡取盲肠组织，参见文献（蒋建林和蒋金书，1996）方法分离纯化第 2 代裂殖子。

1.2.2 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增：参照总 RNA 提取试剂盒（购自天根公司，货号 DP406-01）说明书提取 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子总 RNA。以 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子总 RNA 为模板，用 OligodT 引物进行反转录，合成 cDNA 第 1 链。反应体系如下：7 μ L 总 RNA，加入 3 μ L OligodT，于 70 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min 后，冰上放置 5 min，依次加入 4.0 μ L 5 \times AMV 反转录酶 buffer，5.0 μ L dNTP（10 mmol/L），0.5 μ L RNA 酶抑制剂（40 U/ μ L），0.5 μ L AMV 反转录酶（购自 Invitrogen 公司，货号 18064-022），42 $^{\circ}$ C 延伸 1 h，95 $^{\circ}$ C 灭活 AMV 反转录酶。反转录产物置 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 引物设计与 *sag* 10 基因 PCR 扩增：根据 GenBank 报道的 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子表面抗原序列（AJ 586552），利用 DNAMAN 生物软件设计引物，由上海生工生物技术有限公司合成。上游引物 SagF 引入 *Eco*RI 酶切位点且去除了信号肽，下游引物 SagR 引入 *Nde*I 酶切位点。引物序列如下：SagF：5'-CGGAATTCCAAGAA-CTGAAGAAACAG-3'；SagR：5'-CGCGGCCGCTAA-AGTCATAATGC-3'。

以 SagF、SagR 为引物，以反转录产物 10 倍稀释液为模板进行 PCR，反应体系如下：反转录产物模板 1 μ L，引物 SagF、SagR（10 mmol/L）各 1.5 μ L，dNTP（10 mmol/L）6 μ L，10 \times PCR 缓冲液 5 μ L，*Bfu* 聚合酶 0.5 μ L，加灭菌去离子水至 50 μ L。反应条件：94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后，94 $^{\circ}$ C 变性 50 s，59 $^{\circ}$ C 退火 50 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，进行 30 个循环；然后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，然后经 DNA 回收试剂盒回收，连接到 pGEMT Vector 上构建克隆载体 pDQ051，转化大肠杆菌 DH5 α ，进行 PCR 鉴定，酶切鉴定筛选获得阳性克隆送北京三博远志生物技术有限公司测序。

1.3 *sag* 10 基因转染毕赤酵母及鉴定

1.3.1 表达载体的构建与鉴定：将连有 *sag* 10 基因编码序列的 pDQ051 进行 *Eco*RI 和 *Nde*I 双酶切回收后插入到相同酶切毕赤酵母表达载体

pHC9K 中，插入序列位于 α -因子信号肽序列的下游，得到重组质粒 pDQ052，并对该质粒进行限制性酶切鉴定、PCR 鉴定及测序鉴定。

1.3.2 毕赤酵母的聚乙二醇（PEG）法转化（*Hichia pastoris* EasyCompTM Transformation Kit 1730 购自 Invitrogen 公司）：接毕赤酵母菌株单克隆 GS115 于 10 mL YPD（酵母提取物 10 g/L，蛋白胨 20 g/L，葡萄糖 20 g/L）中 30 $^{\circ}$ C，250~300 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0；离心收集菌体后，用 10 mL Solution I 重悬细胞，再次离心收集菌体并用 1 mL Solution I 重悬细胞，此时细胞为感受态。取 80 μ L 菌液，加入 3 μ L 经限制性内切酶 *Bgl* II 线性化的重组质粒 pDQ052，加入 1 mL Solution II，充分混匀，30 $^{\circ}$ C 水浴 1 h，每 15 min 旋涡震荡 1 次，42 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，4 000 r/min 离心收集菌体，加入 1 mL Solution III，离心去上清，最后加入 100~150 μ L Solution III 重悬细胞，菌液涂布于 RDB（YNB 13.4 g/L，葡萄糖 20 g/L，生物素 4 \times 10⁻⁴ g/L，琼脂粉 20 g/L，山梨醇 186 g/L）平板上，30 $^{\circ}$ C 培养 2~4 天直至转化子出现。

1.3.3 毕赤酵母重组子的平板筛选：用灭菌牙签挑取转化子分别点种到筛选培养基 MM 平板（无氨基酸酵母氮源 YNB 13.4 g/L，甲醇 5 mL/L，生物素 4 \times 10⁻⁴ g/L，琼脂粉 20 g/L）和 MD 平板（YNB 13.4 g/L，葡萄糖 20 g/L，生物素 4 \times 10⁻⁴ g/L，琼脂粉 20 g/L）上，30 $^{\circ}$ C 培养 2~4 天。挑取转化子，点种于含 600 μ g/mL G418 的 YPD 平板上，以筛选多拷贝转化子并进行编号。

1.3.4 毕赤酵母重组子基因组 PCR 鉴定：重组毕赤酵母基因组 DNA 的提取参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册，以所提基因组为模板，以 SagF、SagR 为引物，pHC9K 转化重组酵母（编号 S0）作为对照进行 PCR 鉴定。

1.4 重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达

挑取多拷贝的毕赤酵母重组工程菌株分别接种于 10 mL BMGY（酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、无氨基酸酵母氮源（YNB）13.4 g/L、生物素 4 \times 10⁻⁴ g/L、甘油 10 mL、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.0）培养基中，30 $^{\circ}$ C，220 r/min 培养 48 h 后，6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体，转入 8 mL BMMY（酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 20 g/L、无氨基酸酵母氮源（YNB）13.4 g/L、生物素 4 \times 10⁻⁴ g/L、甲醇 5 mL/L、0.1 mol/L 磷酸盐

缓冲液 (pH 6.0) 培养基中继续培养, 每 24h 补加甲醇至终浓度 0.5%。每 12h 取样, 将诱导液 5 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。Bradford 法 (张龙翔等, 1997) 测定上清液的总蛋白量。

1.5 表达产物 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测

取分泌总蛋白量最高的菌株 S7 上清液 100 μ L, 加入上样 Buffer (0.5 ml/L Tris-HCL (pH 6.8)、20 ml/L 甘油、SDS 20%、10 ml/L 2-巯基乙醇、0.1%溴酚蓝) 100 μ L 进行 SDS-PAGE (分离胶 12.5%, 浓缩胶浓度 5%), 14 mA 电泳至分离胶, 16 mA 电泳至溴酚蓝到底, 同时设 S0 菌株诱导上清作对照。切割一半胶在半干转移电泳槽转入 NC 膜, 牛血清白蛋白 (3 g/L) 封闭过夜, 一抗为鸡抗球虫的高免血清, 二抗为碱性磷酸酶标记羊抗鸡 IGY (购自 Promega 公司, 货号 G115A), 使用 BCIP/NBT 底物显色试剂盒 (购自天根公司, 货号 PA111) 进行显色。

2 结果

2.1 基因全编码序列的克隆及毕赤酵母表达载体的构建

2.1.1 总 RNA 提取: 经测定 RNA 样品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.901, 总 RNA 质量较好。琼脂糖电泳可观察到 18S 和 28S 两条带 (图 1)。

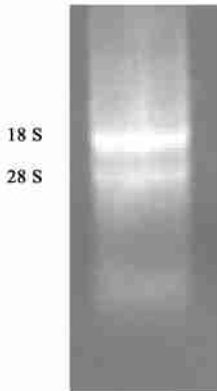


图 1 *Eimeria tenella* 第 2 代裂殖子总 RNA

Fig. 1 The total RNA of the second generation merozoites

2.1.2 表面抗原基因编码序列的克隆: 以反转录产物为模板, *SagF*、*SagR* 为引物进行 PCR, 扩增出 *sag*¹⁰ 编码序列, 加入 SYBR Green 荧光染料的 1.0% 琼脂糖凝胶观测结果, 大小约为 700 bp, 与预期大小相符 (图 2)。将该基因克隆到 pGEMT Vector 中, 序列测定结果与报道序列比

对, 序列同源性的 99.01%。共有 7 个核苷酸差异, 引起 4 个氨基酸有不同。

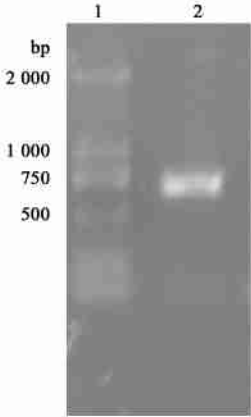


图 2 *sag*¹⁰ 编码序列的 PCR 克隆

Fig. 2 Cloning of the complete encoding sequence of *sag*¹⁰ gene

1: DL2000 标准分子量; 2: *sag*¹⁰ 基因 PCR 产物

1: DL2000; 2: PCR product

2.1.3 表达载体的构建: 将含有 *sag*¹⁰ 基因全编码序列的 pDQ051 进行 *EcoRI* 和 *NciI* 双酶切, 回收后插入到相同酶切毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中, 并位于 α -因子信号肽序列下游, 获得重组质粒 pDQ052, 进行酶切鉴定, *EcoRI* 单酶切、*Bgl* II 单酶切、*Hind* III 单酶切、*SacI* 单酶切、*EcoRI* 和 *NciI* 双酶切得到的电泳结果与预期结果相符 (图 3)。测序结果表明插入片段在 pPIC9K 中有正确的阅读框。

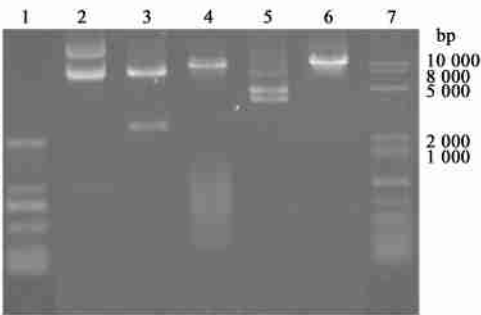


图 3 重组质粒 pDQ052 的酶切分析

Fig. 3 Restriction analysis of the recombinant plasmid pDQ052

1: DL2000 标准分子量; 2: pDQ052 质粒; 3: *Bgl* II 酶切 pDQ052; 4: *EcoRI* 和 *NciI* 双酶切 pDQ052; 5: *Hind* III 酶切 pDQ052; 6: *SacI* 酶切 pDQ052; 7: DNA 分子量标准

1: DL2000; 2: plasmid pDQ052; 3: pDQ052 digested with *Bgl* II; 4: pDQ052 digested with *EcoRI* and *NciI*; 5: pDQ052 digested with *Hind* III; 6: pDQ052 digested with *SacI*; 7: 1 kb DNA Ladder.

2.2 毕赤酵母重组子的筛选和鉴定

在MM 和 MD 筛选培养基上筛选 50 个阳性转化子，结果在 MM 平板有 11 个转化子生长良好，表型为甲醇利用快型，其余 39 个为甲醇利用慢型。点种于含有 600 μg/mL G418 的 YPD 平板上，筛选获得了 35 个阳性转化子，编号为S1~S35。提取重组工程菌菌株基因组 DNA，用特异引物SagF、SagR 进行PCR 鉴定，结果有特异条带，由于 *Pichia pastoris* 没有稳定的附加体质粒，pPIC9K 为整合型表达载体而且转化之前进行线性化，因此表明sag¹⁰ 基因编码序列已整合到毕赤酵母的基因组中（图 4）。

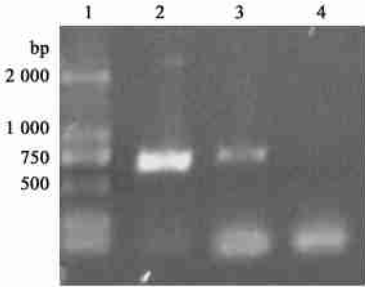


图 4 重组酵母基因组 DNA 的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of genome DNA of recombinant *P. pastoris* by PCR

1: DL2000 标准分子量；2: 重组菌株S7 PCR 产物；3: 重组菌株S32 PCR 产物；4: S0 菌株PCR 结果
1: DL2000; 2: PCR product of recombinant *P. pastoris* S7; 3: PCR product of recombinant *P. pastoris* S32; 4: PCR product of S0

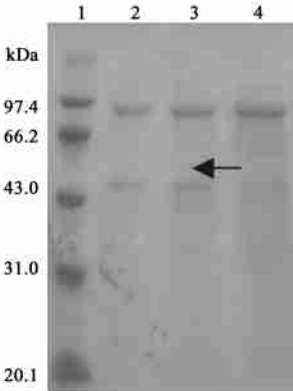


图 5 重组酵母上清SDS-PAGE 蛋白电泳分析

Fig. 5 Analysis of supernatant of recombinant strain by SDS PAGE

1: SDS PAGE 低分子量标准蛋白质；2: 诱导 60h 上清液；3: 诱导 72h 上清液；4: S0 阴性对照
1: Standard protein molecular weight; 2: Induction for 60 h by methanol; 3: Induction for 72 h by methanol; 4: S0 negative control

2.3 毕赤酵母重组子的诱导表达及产物检测

对不同重组酵母菌株进行甲醇诱导，每 24h 补加甲醇至终浓度 0.5%。每 12h 取样，测定上清液的总蛋白量。结果重组酵母S7 表达量在诱导培养 72h 最高。SDS-PAGE 电泳分析上清液，有少量杂带（图 5）。Western blot 结果（图 6）显示，在 43kDa 出现 1 条明显的条带，但表达产物相对分子量比预测的 25 kDa 大；而转化空载体的重组菌株无任何显色条带。说明该球虫表面抗原成功表达，推测分子量变大原因可能发生了糖基化。



图 6 sag¹⁰ 基因在毕赤酵母中的表达上清液的 Western blot 分析

Fig. 6 Western blot analysis of sag¹⁰ gene expression in *Pichia pastoris*

1: 诱导 72h 上清液；2: S0 上清液阴性对照
1: Supernatant induced by methanol for 72h; 2: S0 negative control

3 讨论

球虫侵入宿主细胞的过程中，其子孢子和裂殖子表面蛋白在识别宿主细胞和介导黏附等过程中发挥关键作用。目前已经发现许多具有免疫潜能的球虫表面抗原，有些基因已被克隆和表达，有些经免疫检测效果显著。如 *λ*mp5-7 是 Binger 等 1993 年用兔抗 *Eimeria tenella* 表面抗原的抗体从 *Eimeria tenella* 裂殖子cDNA 文库中筛选出的一个 945 bp 的 DNA 片段，该基因已在痘病毒 (Binger *et al.*, 1993) 及大肠杆菌 (格日勒图等, 2005) 中成功表达。球虫表面基因 54Q、cSZ1 已分别在大肠杆菌 (杜爱芳等, 2005)、减毒沙门氏菌 (覃宗华等, 2005) 成功表达，并具有一定的免疫效果。

在毕赤酵母中表达球虫表面抗原基因还未见报道。毕赤酵母表达系统是近年来发展迅速、应用广泛的一种真核表达系统。它具有完整的蛋白表达、加工和修饰功能，而且可以分泌表达外源蛋白。酵母菌对外源基因的表达和外源基因密码子的选用有关（赵翔等，2000），将 *sag*¹⁰ 基因序列与毕赤酵母偏爱密码子进行了比较，毕赤酵母偏爱密码子在目的基因中的使用频率为 53.81%，具备在毕赤酵母表达的内在条件。本研究根据 GenBank 报道序列（登录号 AJ 586552）设计引物，利用 RT-PCR 技术克隆鸡柔嫩艾美耳球虫北京株 *sag*¹⁰ 基因，测序结果表明 *sag*¹⁰ 全长 708bp，编码 236 个氨基酸，其中共有 7 个核苷酸与报道序列有差异，引起 4 个氨基酸的变化，重复测序结果相同，因此推测为株间差异。将其转入甲醇营养型毕赤酵母诱导表达，通过 G418 抗性筛选多拷贝重组子，同时在不同 pH 值条件下进行诱导，摸索出 pH 6.0 为最佳诱导条件。本研究通过外源重组技术实现了 *Eimeria tenella* 表面抗原基因 *sag*¹⁰ 在 *Pichia pastoris* 中的表达，为下一步进行免疫保护研究提供了材料。

参考文献

- 杜爱芳，王素华，索勋. 2005. 鸡柔嫩艾美耳球虫 ZJ 株 5401 基因在大肠杆菌中的表达. 畜牧兽医学报，36（2）：187～190.
- 张龙翔，张庭芳，李令媛. 1997. 生化实验方法和技术（第 2

- 版）. 北京：高等教育出版社，138～139.
- 赵翔，霍克克，李育阳. 2000. 毕赤酵母的密码子用法分析. 生物工程学报，16（3）：308～311.
- 格日勒图，严若峰，徐立新. 2005. 鸡柔嫩艾美耳球虫第 2 代裂殖子表面抗原 MZ 5-7 基因的克隆、表位分析及原核表达. 寄生虫与医学昆虫学报，12（4）：193～198.
- 蒋建林，蒋金书. 1996. 柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法的改进. 中国农业大学学报，1（5）：99～102.
- 覃宗华，谢明权，蔡建平. 2005. 堆型艾美耳球虫 cSZ1 基因在减毒沙门氏菌的表达及免疫保护效果研究. 寄生虫与医学昆虫学报，12（1）：6～13.
- Binger, M. H., D. Hug, G. Weber et al. 1993 Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus. Mol. Biochem. Parasitol., 61（2）：179～187.
- Jenkins, M. C., H. S. Lillehoj, J. R. Barta et al. 1990 *Eimeria acervulina*: cloning of a cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry proteins. Exp. Parasitol., 70（3）：353～362.
- Lillehoj, H. S. 1998 Role of lymphocytes and cytokines in coccidiosis. Int. J. Parasitol., 28: 1 071～1 081.
- Susana, R., G. M. Fabienne, B. Christiane et al. 2003 Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. Vet. Parasitol., 113: 19～23.
- Vermeulen, A. N., D. C. P. Schaap and M. S. Chetters 2001 Control of coccidiosis in chickens by vaccination. Vet. Parasitol., 100: 13～20.
- Williams, R. B. 1999 A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. Int. J. Parasitol., 29: 1 209～1 229.

EXPRESSION OF *EIMERIA TENELLA* SURFACE ANTIGEN GENE *SAG*¹⁰ IN *PICHA PASTORIS*

HAN De-Qiang^{1,3} DING Hong-Bao¹ QIAO Yu¹ SUO Xun² HAO Yong-Qing³

(1. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094;

3. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract Total RNA was extracted from the Beijing strain of *Eimeria tenella* and used as the template for the cloning of the *sag*¹⁰ gene by RT-PCR with specific primers designed according to the reported sequence in GenBank. The expression plasmid pDQ052 was constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115. Multi-copy *Pichia pastoris* strains were screened by G418. The selected strain was cultured in 100 mL flasks and the supernatant was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The results indicated that the *SAG*¹⁰ protein was successfully expressed and secreted in a soluble form with a molecular weight of approximately 43 kDa in recombinant *Pichia pastoris* when induced by 0.5% methanol.

Key words *Eimeria tenella*; *Sag*¹⁰; Expression; *Pichia pastoris*