

有齿食道口线虫 *msp* 基因的克隆与表达

林瑞庆, 庄瑞宏, 张 雪, 林肖玲, 宋慧群, 朱兴全

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以有齿食道口线虫为研究对象,扩增出其雄虫的 *msp* 基因,克隆至质粒载体 pTrcHis-B 中,构建了 *msp* 基因重组原核表达载体. 经测序表明,目的基因 *msp* 已以正确的阅读框架整合至表达质粒中. 应用大肠杆菌 Top10 为宿主菌,通过 IPTG 诱导方法,表达包含 *msp* 基因产物的融合蛋白,经 SDS-PAGE 分析,表明表达蛋白大小正确,表达量高.

关键词:有齿食道口线虫; *msp* 基因; 克隆; 表达

中图分类号:S852.73;Q78

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2007)04-0091-04

Cloning and Expression of Major Sperm Protein Gene from *Oesophagostomum dentatum*

LIN Rui-qing, ZHUANG Rui-hong, ZHANG Xue, LIN Xiao-ling, SONG Hui-qun, ZHU Xing-quan

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The major sperm protein (MSP) gene of *Oesophagostomum dentatum* was amplified by PCR and subsequently inserted into the expression vector pTrcHis-B. The *msp* gene was sequenced and compared with other published *msp* gene sequences. Sequence analysis revealed that the reading frame of the *msp* gene inserted was correct. The MSP fusion protein was expressed in *Escherichia coli* (Top10) after induction with IPTG. SDS-PAGE analysis showed that the *msp* fusion protein was expressed efficiently.

Key words: *Oesophagostomum dentatum*; *msp* gene; clone; expression

食道口线虫病是由食道口属 *Oesophagostomum* 的多种线虫寄生于动物肠道引起,虽然通常只在反刍动物、猪和猴子上发现,但也有感染人的报道,特别是在非洲的多哥和加纳等地区,有很高的感染率^[1-2]. 猪的食道口线虫病呈全球流行,在国内也普遍存在,造成较大的经济损失;国内调查表明,感染猪的食道口线虫主要是有齿食道口线虫 *Oesophagostomum dentatum* 和四棘食道口线虫 *O. quadrispinulatum*^[3-5]. 药物防治是目前寄生虫病防治的主要手段,但由于长期以及不适当的用药,耐药性、药物残留以及环境污染日益严重;寄生虫疫苗的研制也遇到困难. 寄生虫的抗原十分复杂,不同的发育阶段抗原不同,而且存在着抗原变异、抗原伪装等现象,其功能抗原的确定很困难,且寄生虫生活史复杂,较难人工

培养,靠传统抗原提纯技术难以实现寄生虫抗原的批量生产,现有寄生虫疫苗大多数只能产生不完全的保护作用^[6-7]. 由于这些问题的存在,科学家们一直在寻找有效防治寄生线虫的新途径,通过阻断或干扰线虫的某个或几个生殖发育阶段可能是防治线虫感染的新途径^[8]. 线虫中第一个被鉴定的性别特异表达蛋白是主要精子蛋白家族(MSPs). 主要精子蛋白相对分子质量较小(约14 000),是线虫特异性细胞骨架蛋白,占整个精子细胞总蛋白的10%~15%,在推动细胞向前运动方面起到重要作用. 基于主要精子蛋白对线虫生殖的重要性,本试验从猪的有齿食道口线虫基因组中扩增出主要精子蛋白基因,并进行克隆、鉴定与表达,为猪食道口线虫病重组疫苗的研制及性别控制研究打下基础.

收稿日期:2006-12-21

作者简介:林瑞庆(1973—),男,助理研究员,在职博士研究生; 通讯作者:朱兴全(1963—),男,教授,博士,E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

基金项目:国家杰出青年科学基金(30225033);教育部优秀青年教师资助计划项目(教人司[2002]350号)

1 材料与方 法

1.1 虫体样品

编号为 OdYJ6 δ ①的有齿食道口线虫雄虫样品,来自广东阳江,宿主为猪,体积分数为 70% 的酒精保存。

1.2 质粒和工程菌

pGEM-T Easy 载体试剂盒为 Promega 公司产品; pTrcHis-B 表达质粒为 Invitrogen 公司产品; Top10 表达宿主菌为华南农业大学兽医寄生虫学研究室保存。

1.3 主要试剂

DNA 提取试剂盒 WizardTM DNA Clean-Up System 为 Promega 公司产品, PCR 试剂 (Ex Taq、Buffer、MgCl₂、dNTPs) 为大连宝生物公司产品, T4DNA 连接酶为 Promega 公司产品。

1.4 虫体 DNA 提取

取单个雄性成虫,用蒸馏水反复吹打冲洗 3~4 次后,置于一干净的 1.5 mL 的离心管中,加入 SDS 裂解缓冲液 280 μ L 和 25 μ g/ μ L 的蛋白酶 K 20 μ L。混匀后,放于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中消化 12~48 h。消化好的虫体悬液按 Promega 试剂盒 WizardTM DNA Clean-Up System 使用说明提取虫体 DNA。

1.5 引物的设计与合成

参照基因库已发表的有齿食道口线虫 MSPs 基因序列,设计 1 对兼并引物: OMSPIF: 5'-ATGGC-TACCGTWCCACC-3'; MSP1R: 5'-TCAARGATTG-TAYTCGATGGG-3'。

将扩增出的主要精子蛋白基因片段连接到 pGEM-T Easy 载体,得到重组质粒 pGEM-*msp*,测序后根据序列针对 *msp* 基因片段重新设计 1 对引物,上游引物加 EcoR I 酶切位点,下游引物加 Hind III 酶切位点,5'端均加 3 个保护性碱基,引物由上海英峻生物技术有限公司合成,引物序列如下: OdmSPF: 5'-AATGAATTCATGGCTACCGTTCCACC -3'; OdmSPR: 5'-CTAAAGCTTTCAAGGATTGTACTCG -3'。

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,之后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s 共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。同时设不加 DNA 模板的阴性对照。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,于紫外透射仪上观察。

1.6 重组表达载体的构建

msp 基因片段的 PCR 产物纯化后,以 EcoR I 和 Hind III 双酶切并与已同样酶切后的 pTrcHis-B 载体连接,重组表达载体标记为 pTrcHis-*msp*。

1.7 *msp* 基因序列比较及表达产物的鉴定

重组质粒 pTrcHis-*msp* 转化至表达宿主菌 Top10,

经菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定后,送上海英峻生物技术有限公司测序,所得 *msp* 基因序列以 DNASTAR 软件(5.01 版)与网上发表的有齿食道口线虫 *msp* 基因进行序列比较。在 30 $^{\circ}$ C 条件下转化有 pTrcHis-*msp* 的宿主菌,以 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h,产物经 SDS-PAGE 蛋白电泳分析,蛋白相对分子质量预期大小约为 21 000。

2 结果

2.1 *msp* 基因的 PCR 扩增

以提取的有齿食道口线虫 OdYJ6 δ ①基因组为模板,用引物 OMSPIF 和 MSP1R 进行 PCR 扩增,产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见 2 条约 400 bp 的条带(图 1)。

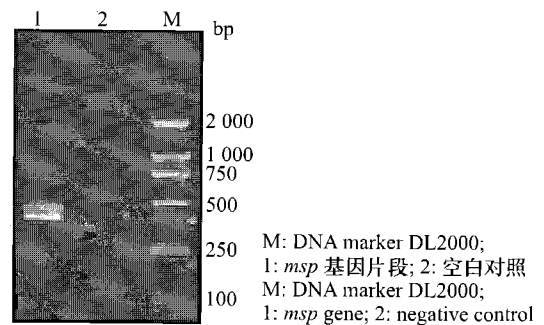


图 1 引物 OMSPI 和 MSP1R 扩增产物琼脂糖电泳分析
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product amplified with primers OMSPI and MSP1R

PCR 产物纯化后连接至 pGEM-T Easy 载体,转化感受态细胞 JM109,获得重组质粒,PCR 鉴定和酶切鉴定(图略)显示所得序列片段有大小不同的 2 种,测序结果显示为含内含子的 *msp* 基因序列以及不含内含子的 *msp* 基因序列。以不含内含子的 *msp* 基因获得的重组质粒 pGEM-*msp* 为模板,以 OdmSPF 和 OdmSPR 为引物,扩增用于构建原核表达的 *msp* 基因片段,PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见 1 条约 400 bp 条带,与预期一致(图 2)。

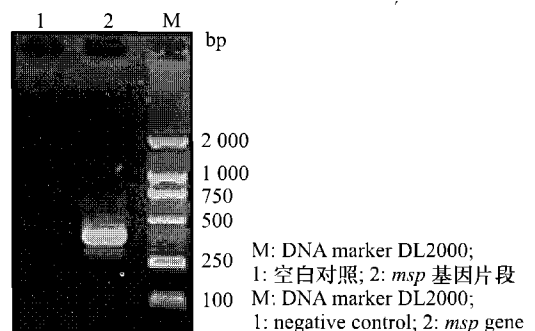
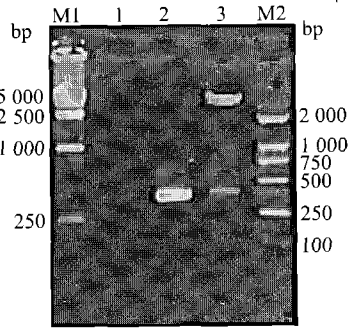


图 2 *msp* 基因扩增产物琼脂糖电泳分析
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product of *msp* gene

2.2 *msp* 基因的原核重组质粒的构建与鉴定

msp 基因片段的扩增产物经纯化后以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切回收,质粒 pTrcHis-B 同样经双酶切回收,两者以合适的浓度进行连接. 连接产物转化后,经菌落 PCR 鉴定,电泳得 1 条约 400 bp 的特异性条带;提取重组质粒 pTrcHis-*msp* 以 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,电泳可得目的基因(约 400 bp)及载体(约 4 500 bp),见图 3,结果均与预期一致.



M1: DNA marker DL15000; M2: DNA marker DL2000; 1: 空白对照; 2: 重组质粒 PCR 鉴定; 3: 重组质粒双酶切
M1: DNA marker DL15000; M1: DNA marker DL2000; 1: negative control; 2: PCR identification of recombinant plasmids; 3: digestion of pTrcHis-*msp* PCR products with *EcoR* I and *Hind* III

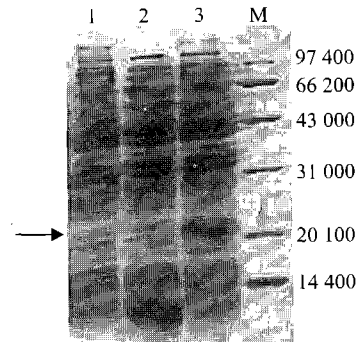
图3 重组质粒 pTrcHis-*msp* 的 PCR 和酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmids by PCR amplification and restriction digestion

2.3 重组质粒 pTrcHis-*msp* 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

转化重组质粒后的 Top10 菌株以 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h,取表达宿主菌处理后进行 SDS-

PAGE 分析,考马斯亮蓝染色,可观察到约在蛋白相对分子质量 21 000 处有明显的表达产物条带,条带大小与预期相符,未经诱导的 pTrcHis-*msp* 重组菌和诱导表达的空质粒重组菌对照均不见该条带(图 4).



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 未诱导表达的 pTrcHis-*msp*; 2: IPTG 诱导表达的 pTrcHis; 3: IPTG 诱导表达的 pTrcHis-*msp*
M: relative molecular mass of protein marker; 1: pTrcHis-*msp* without IPTG induction; 2: pTrcHis induced with IPTG; 3: pTrcHis-*msp* induced with IPTG

图4 pTrcHis-*msp* 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expressed products

2.4 *msp* 基因片段的核苷酸和氨基酸的序列分析与比较

经序列测定,证实插入表达载体 pTrcHis-*msp* 的 *msp* 基因阅读框架正确,*msp* 基因序列全长为 381 bp,表达 126 个氨基酸,其核苷酸序列及推导的氨基酸序列组成见图 5. 将本实验所获得的 *msp* 基因序列与 GenBank 发表的代表性 *msp* 基因进行比较,结果见表 1.

```

ATGGCTACCGTTCCACCAGGTGACATCCACACCCAGCCCGGATCCAAGGTCGTCTTCAATGCTCC      ←65bp
ATATGATGACAAGCACACCTACCACATCAAGATCACCAACGCGTCTGGCCGTCGTATCGGATGGG      ←130bp
CCATCAAGACCACCAACATGAGGCGTCTTGGTGTGACACCCCGCTGCGGTGTCTCGACCCCAAG      ←195bp
GAAACCACCTTATGGCTGTGTCCTGCGATACCTTCGACTATGGCCGTGAGGACACCAACGA      ←260bp
CCGTATCACCGTCGAAATGGTGCAACACCCCGAAGTGCCGCCAAGCAGTTCCTCGTGAATGGT      ←325bp
TCCAGGGTGACGGTATGGTCCGCAGAAAGAACTCCCATCGAGTACAATCCTTGA      ←381bp
MATVPPGDIHTQPGSKVVENAPYDDKHTYHIKLTNASGRRIGWAIKTTNMRRLGVDPAAGVLDPK      ←65
ETTLMAVSCDTFDYGREDTNNDRI TVEWCNTP EGAAKQFRREW FQGDGMVRRKNLEIEYNP.      ←126
    
```

图5 有齿食道口线虫 *msp* 基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列(阴影部分)

Fig.5 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence(shadowed) of *msp* gene of *O. dentatum*

表1 不同的 *msp* 基因编码的核苷酸序列及推导的氨基酸序列相似性比较

Tab.1 Comparison of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of *msp* genes

虫种 species	基因库代码 GenBank accession number	核苷酸相似性 similarity of nucleotide sequences/%	氨基酸相似性 similarity of deduced amino acid sequences /%
有齿食道口线虫 <i>O. dentatum</i>	AJ627869	95.8	96.9
有齿食道口线虫 <i>O. dentatum</i>	AJ627870	96.9	98.4
有齿食道口线虫 <i>O. dentatum</i>	AJ627872	95.0	97.6
有齿食道口线虫 <i>O. dentatum</i>	AJ627873	94.2	96.1
猪蛔虫 <i>Ascaris suum</i>	AY305390	76.1	82.7
秀丽新杆线虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	NM_062487	76.6	80.3

3 讨论

中国的养猪业,包括集约化的养猪场仍然普遍受到寄生虫的威胁,由于多数的寄生虫感染无明显的临床症状,所以容易被人们忽视.但国内的一些调查显示,寄生虫感染给养猪生产造成的经济损失是相当严重的^[5].由于药物防治以及常规疫苗存在的一些问题,随着分子生物学技术在寄生虫学研究领域的应用,目前很多学者除了加快寄生虫基因工程疫苗研制外,也加强了对寄生虫生殖发育的分子机制的研究,寻求通过生殖或发育控制来防治寄生虫的新途径.

msp 基因具雄性特异性,它的调控对寄生线虫的生殖有重要作用.目前国外对于 *msp* 基因的文献报道已逐渐增多,大多是关于基因的克隆及序列分析^[9-11],而国内此方面的研究较少.本研究结果显示,具有亲缘和远缘关系的线虫,通常其推测的 *msp* 蛋白序列具有很高的相似性;营寄生生活的有齿食道口线虫与营自由生活的秀丽新杆线虫其 *msp* 基因推导的氨基酸相似性达 80.3%,说明 *msp* 基因相对保守.一般来说,*msp* 基因是一个家族,大多数寄生虫性线虫有 5~13 个 *msp* 基因,营自由生活的线虫有 15~50 个 *msp* 基因^[8].GenBank 上已报道有齿食道口线虫 4 种不同的 *msp* 基因,为从 cDNA 文库和基因组文库获得的^[12].本试验从国内有齿食道口线虫扩增出的 *msp* 基因既发现有不含内含子的 *msp* 基因,也发现有含内含子的 *msp* 基因,不含内含子的 *msp* 基因序列分析显示为 *msp* 基因家族的新成员.

本试验以国内有齿食道口线虫为研究对象,以 pTrcHis-B 为表达载体成功表达 *msp* 融合蛋白.pTrcHis 为融合蛋白高效表达载体,采用 trc 强启动子,表达的融合蛋白带 6 个组氨酸,方便纯化.载体通过柔性氨基酸与目的蛋白相连,由于其结构较短且在生理条件下不带电荷,所以基本上不影响蛋白的结构和功能,而且融合部分可用肠激酶(EK)简单切去^[12].

本试验构建的重组质粒 pTrcHis-*msp* 通过序列测定证明阅读框架正确;以 IPTG 诱导,在大肠杆菌中过量表达后,通过 SDS-PAGE 电泳,显示获得目的蛋白质,从而为构建食道口线虫基因重组疫苗以及

性别控制奠定了基础并提供了材料.

参考文献:

- [1] LEGESSE M, ERKO B. Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia [J]. *Acta Trop*, 2004, 90:231-236.
- [2] POLDERMAN A M, ANEMANA S D, ASIGRI V. Human oesophagostomiasis: A regional public health problem in Africa [J]. *Parasitol Today*, 1999, 15:129-130.
- [3] 汤明, 聂奎, 吴庆东, 等. 重庆市畜禽寄生虫区系调查一 [J]. *中国兽医寄生虫病*, 2003, 11(1): 25-30.
- [4] BOES J, WILLINGHAM III A L, SHI F H, et al. Prevalence and distribution of pig helminthes in the Dongting Lake Region (Hunan Province) of the People's Republic of China [J]. *J Helminthol*, 2000, 74:45-52.
- [5] WENG Y B, Hu Y J, Li Y, et al. Survey of intestinal parasites from intensive pig farms in Guangdong Province, People's Republic of China [J]. *Vet Parasitol*, 2005, 127:333-336.
- [6] EMERY D M. Vaccination against worm parasites of animals [J]. *Vet Parasitol*, 1996, 64:31-45.
- [7] LIGHTOWLERS M W, COLEBROOK A L, GAUCI C G, et al. Vaccination against cestode parasites: Anti-helminth vaccines that work and why [J]. *Vet Parasitol*, 2003, 115:83-123.
- [8] 邹丰才, 吴绍强, 黄翠琴, 等. 寄生线虫性别特异表达基因研究进展 [J]. *中国寄生虫学和寄生虫病杂志*, 2005, 23(54): 246-249.
- [9] SHIM Y H. *Elt-1*, a gene encoding a *Caenorhabditis elegans* GATA transcription factor, is highly expressed in the germ lines with *msp* genes as the potential targets [J]. *Dev Biol*, 1999, 9: 535-541.
- [10] SCOTT A L, DINMAN J, SUSSMAN D, et al. Major sperm protein and actin genes in free-living and parasitic nematodes [J]. *Parasitology*, 1989, 98: 471-478.
- [11] COTTEE P A, NISBET A J, BOAG P R, et al. Characterization of major sperm protein genes and their expression in *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda: Strongylida) [J]. *Parasitology*, 2004, 129:479-490.
- [12] 张新芳, 李益民, 张俭, 等. HCV 核心区全基因片段的表达及产物抗活性分析 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2003, 16(4): 197-200.

【责任编辑 柴 焰】