

柔嫩艾美耳球虫 *HSP* 基因的克隆、表达及鉴定

颜彦, 韩红玉, 黄兵, 赵其平, 董辉, 姜连连, 李玉剑, 樊玉娟, 姚倩

中国农业科学院上海兽医研究所 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200241

摘要: 为研究柔嫩艾美耳球虫热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)的生物学特性, 应用 RACE 和 RT-PCR 技术, 从柔嫩艾美耳球虫子孢子中首次克隆获得了 *EtHSP* 的全长 cDNA(GenBank Accession No. FJ911605)。*EtHSP* 包含一个 1455 bp 的开放阅读框, 编码 484 个氨基酸, 预测表达蛋白的分子量大小为 53.5 kD。应用 Real-time PCR 对柔嫩艾美耳球虫不同发育阶段(未孢子化卵囊、孢子化卵囊、子孢子和裂殖子)表达量进行分析, 发现该基因在子孢子阶段的表达明显高于其他阶段。同时, 构建了原核表达重组质粒 pET28a(+)-*EtHSP*, 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经 IPTG 诱导表达后, 对表达产物进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析。结果显示, 重组质粒 pET28a(+)-*EtHSP* 在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 经 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后的表达量最高, 该蛋白可被抗柔嫩艾美耳球虫的多克隆抗血清识别, 表明该蛋白具有较好的反应原性。本研究结果为进一步研究该基因的生物学功能奠定了基础。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫, 热激蛋白, 发育阶段, 免疫原性

Cloning, expression and characterization of *HSP* gene from *Eimeria tenella*

Yan Yan, Hongyu Han, Bing Huang, Qiping Zhao, Hui Dong, Lianlian Jiang, Yujian Li, Yujuan Fan, and Qian Yao

Key Laboratory of Animal Parasitology of Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

Abstract: In order to study the functions of the HSPs (Heat shock proteins) of *Eimeria tenella*, we cloned a novel gene (which designated *EtHSP*) coding HSP of *Eimeria tenella* by RT-PCR and RACE (Rapid-amplification of cDNA ends). The full-length cDNA sequence of *EtHSP* was 1802 bp, containing a 1455 bp ORF (Open reading frame) (GenBank Accession No. FJ911605) encoding a deduced protein of 484 amino acids. Real-time PCR revealed that the mRNA level of *EtHSP* was much higher in sporozoites of *E. tenella* than other developmental stages (unsporulated oocysts, sporulated oocysts and merozoites). We constructed the recombinant plasmids pET28a(+)-*EtHSP*, then transformed it into *E. coli* BL21(DE3) for expression. SDS-PAGE indicated that the fusion protein was expressed in included bodies, with peak expression 6 h after induction by IPTG. Western blotting revealed that the protein was specifically recognized by polyclonal antibodies against *E. tenella*, showing that the fusion protein was native antigen.

Keywords: *Eimeria tenella*, HSPs, development stages, immunogenicity

Received: March 23, 2009; **Accepted:** May 27, 2009

Supported by: National Natural Technology Resource Sharing Platform (No. 2005DKA21205-4), National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2006AA10A207-1).

Corresponding author: Bing Huang. Tel: +86-21-34293464; Fax: +86-21-34293464; E-mail: huangbing232@163.com

国家自然科学基金资源共享平台项目(No. 2005DKA21205-4), 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA10A207-1)资助。

柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)是鸡的一种最常见、致病性最强、危害最为严重的球虫,寄生在绒毛上皮和盲肠的粘膜下,引起出血性肠炎,可导致死亡,特别对雏鸡危害最大。热激蛋白(Heat shock proteins, HSPs)是指所有原核生物和真核生物在生长发育或受到不同理化及病理因素刺激时,机体内新合成的或表达量增加的一组蛋白质家族,属非分泌型蛋白质。HSPs 是物种种系发生中结构和功能最为保守的一类蛋白质,同时也是分子伴侣(Molecular chaperone)中最重要的一类。HSPs 的生物学功能主要是帮助蛋白质的折叠(Folding)、移位(Translocation)、复性(Renaturation)和降解(Degradation)。

首次有关 HSPs 研究的报道是在 1974 年, Tissières 等^[1]研究发现高温能使果蝇的蛋白质合成发生改变,正常的蛋白质合成受到抑制,同时启动了一套新的蛋白质合成,利用 SDS-PAGE 分离获得果蝇受热激反应时产生的一组新蛋白质,称这种由高温诱导合成的蛋白质为“热激蛋白”(HSPs)。此后对 HSPs 的研究普遍展开,到上世纪 80 年代后期研究内容已进入分子水平。在寄生虫感染宿主过程中,一方面虫体的 HSPs 保护其在入侵宿主体时逃避宿主的免疫作用,参与寄生虫的分化并能增强寄生虫毒力;另一方面宿主 T 细胞因受寄生虫 HSPs 的刺激而分化,寄生虫 HSPs 成为宿主体液免疫和细胞免疫应答的靶蛋白^[2]。多数寄生虫的 HSPs 可作为免疫优势抗原,诱导宿主产生抗体。近年来对寄生虫 HSPs 的研究热点主要集中在原虫^[3-6]、线虫^[7-9]、吸虫^[10-12]等的 HSP90、HSP70、HSP60 和 sHSP 上^[13]。

本实验室利用抑制性消减杂交技术和 cDNA 微阵列技术筛选获得 *E. tenella* 子孢子表达基因上调的 EST,经序列分析发现与其他生物的 HSP 高度同源(基因克隆号:ZB2-D07)^[14]。本研究利用 RACE 技术克隆获得了含一个完整开放阅读框的 HSP cDNA 序列,且只在 *E. tenella* 子孢子阶段高表达,对其进一步研究,将有助于分析不同的 HSP 在 *E. tenella* 整个生活史过程中发挥的作用,为防治球虫病的新疫苗和新药物的研究提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

AA 雏鸡购自上海市南汇区某鸡场。新西兰大白兔(健康,雄性,约 2 kg)购自上海松联实验动物场。

1.1.2 虫株

柔嫩艾美耳球虫纯种(编号:CAAS21111601),由中国农业科学院上海兽医研究所动物寄生虫病研究室保存提供。

1.1.3 菌种和表达载体

大肠杆菌 TOP10、BL21(DE3)购自上海天根生物技术有限公司,表达载体 pET28a(+)由本实验室保存。

1.1.4 主要试剂

pGEM-T-easy vector 购自 Promega 公司, Trizol、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司, RNeasy® Mini Kit、QIAquick® PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司, TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 和限制性内切酶 *Bam*H I、*Not* I 购自宝生物工程(大连)有限公司, Agarose 购自 Promega 公司, 卡那霉素、IPTG 购自华美生物工程有限公司, DNA Marker 购自上海美季生物技术有限公司, DEPC、X-Gal、*Taq*Plus I DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司, Bacto-yeast extract、Agar A、Bacto-tryptone 为 OXOID 公司产品, 质粒小抽提试剂盒 Go3S SpinHigh Pure Plasmid Kit 购自上海申能博彩生物科技有限公司, High-affinity Ni-NTA Resin 购自 GenScript Corporation, Freund's Adjuvant Complete 和 Freund's Adjuvant Incomplete 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取

以纯化的子孢子为材料按 Trizol 说明书操作,提取 *E. tenella* 子孢子阶段虫体的 Total RNA,紫外分光光度计测定其浓度并分析其纯度,符合要求后用于分离 mRNA,最后反转录合成 cDNA 第一链。

1.2.2 引物设计

1) RACE 引物:对进行 RACE 扩增的 EST 序列 ZB2-D07,先与 *E. tenella* 基因组测序网站(<http://>

www.Sanger.ac.uk/projects/E_tenella/OmniBLAST) 进行同源性搜索比对, 确定 EST 的 3'端和 5'端, 再根据序列设计 3'端和 5'端的 RACE 扩增引物。RACE 引物如下, 3' Primer: 5'-TCAGACTGGACATGGTGG AATATCAA-3'; 3' Nested Primer: 5'-AGCGTGGTG BTTGTTTCGACGAAGT-3'; 5' Primer: 5'-CTTCACT GCTCGGTCTTGTCCAACA-3'; 5' Nested Primer: 5'-CGCGAGACTTCGTCTTCCGTCATT-3'。所有引物均由上海赛百盛生物有限公司合成。

2) 全长 cDNA 扩增的引物: 将获得的 3'-RACE 和 5'-RACE PCR 扩增产物纯化回收后与 pGEM-T-easy vector 连接, 转化 TOP10 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 对 PCR 鉴定的阳性菌落进行测序。利用 DNASTAR 软件查找 3'-RACE 和 5'-RACE PCR 扩增产物的序列与原 EST 序列的重叠部分, 将 3 段序列拼接为全长 cDNA 序列, 根据拼接的全长 cDNA 序列, 设计上下游引物进行 RT-PCR 扩增全长 cDNA, 引物引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Not* I, 上游引物序列为 5'-AGGGATCCCCTTCCAGAACATCGT CGTG-3', 下游引物序列为 5'-TTGCGGCCGCTTC CTCACCTTGTCTCTCCGCTTTC-3'。

1.2.3 *EtHSP* 全长基因的克隆及测序

1) *EtHSP* 全长基因 3'端和 5'端的扩增及测序: 首先对提取的 *E. tenella* 孢子的总 RNA 进行反转录, 然后采用 GeneRacer™ Kit (Invitrogen 公司) 进行 3'端和 5'端的扩增。PCR 扩增体系含模板 1 μL, 上、下游引物各 50 pmol/L, 总体积为 20 μL, 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 1 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 若有特异性条带, 则回收; 若无特异性条带, 则继续进行 Nested PCR, 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 回收特异性条带与 pGEM-T-easy vector 连接, 连接产物转化 TOP10 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选, 挑选白斑菌落过夜培养后, 进行 PCR 鉴定。经鉴定分子量大小与预期一致的阳性菌落, 送上海桑尼生物技术有限公司进行

测序。

2) *EtHSP* 全长基因的克隆及测序: 利用 DNASTAR 软件查找 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增产物的序列与原 EST 序列 ZB2-D07 的重叠部分, 将 3 段序列拼接为全长 cDNA 序列。根据拼接的全长 cDNA 序列, 利用 Oligo 软件设计两端引物(引物引入酶切位点 *Bam*H I、*Not* I), 以 3'RACE 和 5'RACE 扩增时 mRNA 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 体系含模板 1 μL, 上、下游引物各 50 pmol/L, 总体积为 20 μL。反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后取 5 μL 进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析。回收的特异性 PCR 产物同 3'RACE 和 5'RACE 产物一样连接转化, 经鉴定正确后测序。

1.2.4 *EtHSP* cDNA 序列期别表达差异分析

选择 *E. tenella* 的 18S rRNA 基因作为内参, 分别提取 *E. tenella* 未孢子化卵囊、孢子化卵囊、孢子、第 2 代裂殖子的总 RNA, 去除基因组 DNA 后, 利用随机引物合成 cDNA 第一链。以这 4 个不同发育阶段的 cDNA 第一链为模板, 利用实时定量 PCR 法检测 ZB2-D07 序列在 *E. tenella* 不同发育阶段虫体中的表达情况。分别设计不同引物, 扩增 ZB2-D07 序列的引物为 D02-S: 5'-GCTGGCAACGAGAAGG AC-3', D02-As: 5'-GACCTGCGGCTTGAA GTAG-3', 扩增片段长度为 168 bp; 扩增 18S rRNA 引物为 18S FP: 5'-TGTAGTGGAGTCTTGGTGATT C-3', 18S RP: 5'-CCTGCTGCCTTCCTTAGATG-3', 扩增片段长度为 207 bp。采用 SYBR Green I 荧光染料进行实时定量 PCR, 反应体系 20 μL: 10 μmol/L 上游引物 0.8 μL, 10 μmol/L 下游引物 0.8 μL, 25×SYBR Green I 10 μL, Easy dilutiobn 8.2 μL, 模板(cDNA)1.0 μL。反应参数为: 95 °C 90 s; 95 °C 5 s, 58 °C 30 s, 80 °C 10 s, 40 个循环, 其中 58 °C 30 s 结束时间点为荧光信号检测点。虫体的每个发育阶段做 3 个样本重复, 每个样本做 3 次技术重复。

1.2.5 *EtHSP* 基因的生物信息学分析

利用在线软件 ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析获得的新基因全长 cDNA 序列, 找出编码框。应用 ExpASy 中的 Translate 程序将该新基因的核苷酸序列翻译蛋白质序列, 通过

ProtParam 分析该蛋白的理化参数。蛋白的跨膜区预测利用 Tmpred 软件(www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), 信号肽预测利用 SignalP 软件(www.cbs.dtu.dk/services/SignalP), 利用 ProtScale 在线分析软件(www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl)分析编码蛋白的疏水性。采用 Interpro 程序(http://www.ebi.ac.uk/Interproscan)对 SWISS-PROT 数据库进行检索, 寻找氨基酸序列的功能结构域, 了解目的蛋白可能的功能。BLASTp 软件(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)以及 FASTA 软件(http://www.ebi.ac.uk/fasta33)用于同源蛋白的搜索, 并将同源蛋白构建进化树进行分析。采用 NCBI 服务器中的 CDD(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/cdd.shtml)程序对氨基酸序列进行功能保守功能域分析, 判断该蛋白是否具有完整的保守结构域。

1.2.6 *EtHSP* 基因原核表达质粒的构建

对克隆出的全长基因 *EtHSP* 用 *Bam*H I/*Not* I 双酶切后与同样双酶切的 pET28a(+)连接, 构建重组表达质粒(记为 pET28a(+)-*EtHSP*)。转化 TOP10 感受态细胞, 挑取单个菌落接种入 4 mL 含卡那霉素抗性的 LB 培养基中进行培养过夜, 用质粒小抽提试剂盒 Go3S SpinHigh Pure Plasmid Kit 进行质粒小抽提。对所抽提质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定, 筛选出重组表达质粒(pET28a(+)-*EtHSP*), 确认正确后用于原核表达。

1.2.7 *EtHSP* 基因的原核表达

将鉴定正确的重组表达质粒(pET28a(+)-*EtHSP*)转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取单克隆过夜培养后在 1 mmol/L IPTG 诱导下进行时相表达, 取不同表达时段的样品进行 SDS-PAGE 分析, 确定最佳表达时间。离心收集经 IPTG 诱导最佳表达时间表达的大肠杆菌, 除去上清, 加入预冷的 PBS 悬浮沉淀。超声裂解表达菌, 将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以确定其表达形式。并按 His 柱纯化蛋白方法纯化 pET28a(+)-*EtHSP* 重组蛋白。

1.2.8 兔抗 *E. tenella* 抗血清的制备

用 pH 7.4 的 PBS 将纯化好的柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊调整到 2×10^7 个/mL, 置于 -70°C 和 38°C 中反复冻融 5 次, 冰浴条件下超声裂解卵囊 20 min, 10 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液作为柔嫩艾美

耳球虫可溶性抗原。用弗氏完全佐剂和柔嫩艾美耳球虫可溶性抗原按 1:1 的比例完全乳化, 于兔子皮内多点注射, 进行一免, 蛋白剂量共为 3 mg; 2 周二免, 剂量为共 3.5 mg, 佐剂为弗氏不完全佐剂, 皮内注射; 二免后 2 周进行三免, 直接皮内注射柔嫩艾美耳球虫可溶性抗原 8 mg。三免 2 周后采血, 按常规方法分离血清, 将收集到的血清 -20°C 冻存备用。

1.2.9 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

将 *E. tenella* pET28a(+)-*EtHSP* 重组蛋白进行 SDS-PAGE, 然后转印到 PVDF 膜上, 采用封闭液封闭后移入含一抗(兔抗 *E. tenella* 抗血清)的 PBS 中, 室温平缓摇动 2 h, 用 PBS 清洗 PVDF 膜; 然后移入含有二抗(HRP 标记羊抗兔 IgG)的 PBS 中, 室温平缓摇动 1 h, PBS 清洗后加底物 DAB 显色。

2 结果

2.1 *EtHSP* 全长基因的扩增

利用 DNASTar 软件查找 3'RACE 和 5'RACE PCR 扩增产物的序列与原 EST 序列 ZB2-D07 的重叠部分, 将 3 段序列拼接为全长 cDNA 序列。根据拼接的全长 cDNA 序列, 利用合成的引物以 *E. tenella* 孢子子的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 1802 bp 处有特异性的单一条带(图 1), 与预期大小一致。

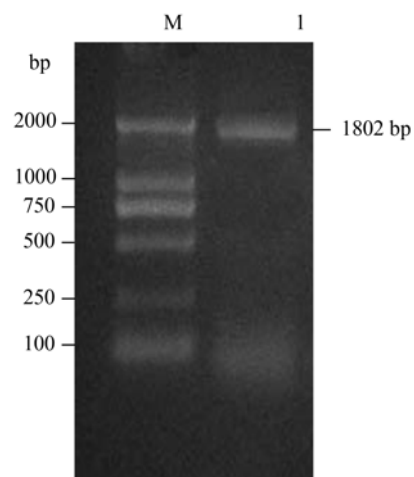


图 1 *E. tenella* 孢子子 *EtHSP* 全长 cDNA 的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 RT-PCR products of *EtHSP* from sporozoite of *E. tenella*. M: DNA marker; 1: *EtHSP*.

2.2 EtHSP cDNA 序列期别表达差异分析

分别提取 *E. tenella* 未孢子化卵囊、孢子化卵囊、子孢子和第 2 代裂殖子 4 个发育阶段的虫体总 RNA, 选择 18S rRNA 作为内参, 利用荧光定量 PCR 验证该基因在 *E. tenella* 不同发育阶段虫体中的表达情况 (图 2)。实验结果表明, 该基因在子孢子发育阶段的转录拷贝数最高。

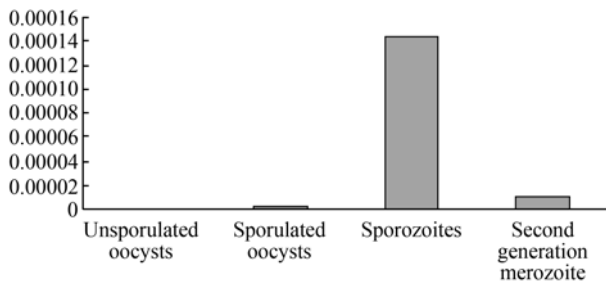


图 2 实时定量 PCR 检测 EtHSP 基因在 *E. tenella* 不同发育阶段的表达

Fig. 2 Differential expression stage of EtHSP in *E. tenella* by real-time PCR.

2.3 EtHSP 基因的生物信息学分析

2.3.1 序列分析

该基因全长 1802 bp 含一个 1455 bp 的完整 ORF, 由 484 个氨基酸残基组成, 理论分子量为 53 513.3 D, 理论等电点为 8.57。氨基酸序列分析结果表明, EtHSP 蛋白的 N 端不具有信号肽, 也不存在跨膜区结构。在溶液中的不稳定指数为 41.86, 高于域值 40, 在溶液中性质不稳定。脂肪族指数 90.68, 总亲水性 -0.430, 蛋白质总体疏水性较高 (图 3)。该蛋白具有多个抗原位点, 显示其具有良好的免疫原性。氨基酸序列的功能结构域, 发现该蛋白含有 AAA 功能域 (ATPases associated with a wide variety of cellular activities) 和 ATP 结合位点 (ATP binding site), 与 AAA+ 超家族中的热激蛋白 HSP 的特点相符合^[15], 推测其属于 HSP 家族。利用 NCBI 的 CDD 程序对该基因编码的氨基酸的保守结构域进行搜索, 结果显示该基因编码的氨基酸具有一个 HSPs 家族 ClpB 的保守结构域 (ClpB_D2-small) (图 4), 并且该基因编码的氨基酸有 ATP 结合位点 (ATP binding site), 故其可能在 ATP 酶的水解过程中起到了重要作用^[16], 有分子伴侣的功能。将测得的核苷酸序列结果与 *E.*

tenella 基因组测序网站 (http://www.Sanger.ac.uk/projects/E_tenella/OmniBLAST) 进行同源性搜索比对, 发现该基因与 *E. tenella* 基因组的 HSP 基因有高度同源性。在 GenBank 中进行 Blast 搜索, 未发现与之匹配的 *E. tenella* 基因序列, 表明该基因是 *E. tenella* 的新基因, 将其命名为 EtHSP 基因。

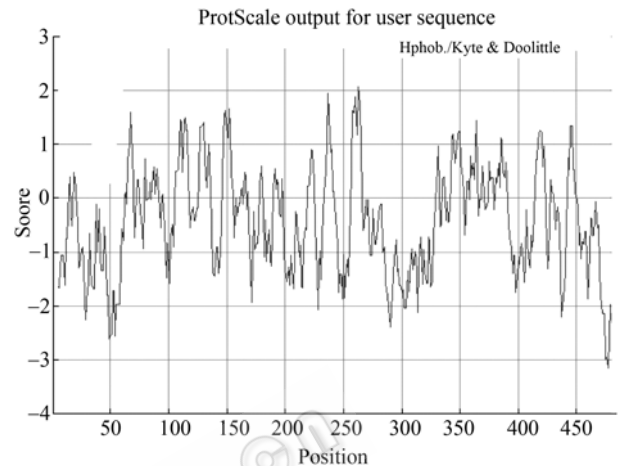


图 3 EtHSP60 编码蛋白的疏水性分析

Fig. 3 Analysis of the hydrophobicity region about EtHSP60 protein.

2.3.2 进化树的构建

本研究克隆的 EtHSP 基因, 其蛋白的分子量为 53.5 kD, 按照分类标准, 该蛋白属于 HSP60 家族。选取人 *Homo* (GenBank Accession No. AAF66640)、小鼠 *Mus musculus* (GenBank Accession No. NP_034607)、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (GenBank Accession No. CAB65903)、光滑爪蟾 *Xenopus laevis* (GenBank Accession No. NP_001080453)、印度野牛 *Bos taurus* (GenBank Accession No. NP_001068616)、人隐孢子虫 *Cryptosporidium hominis* (GenBank Accession No. XP_667723)、微小隐孢子虫 *Cryptosporidium parvum* (GenBank Accession No. XP_627821)、蜜蜂 *Apis mellifera* (GenBank Accession No. XP_392899)、边缘微粒孢子虫 *Anaplasma marginale* (GenBank Accession No. YP_002563816)、恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum* (GenBank Accession No. XP_001347438)、布氏锥虫 *Trypanosoma brucei* (GenBank Accession No. XP_845527)、刚地弓

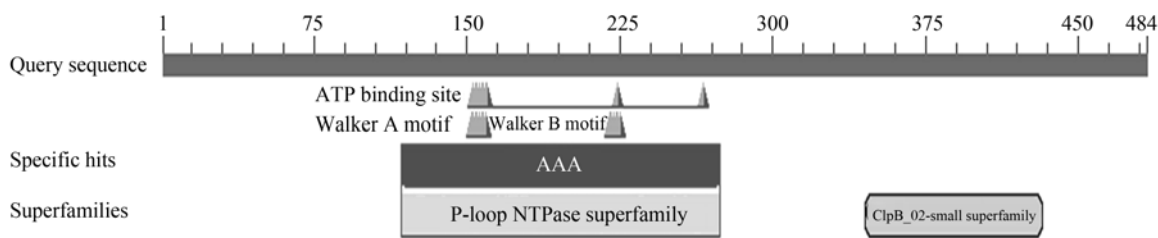


图 4 氨基酸序列保守域分析结果

Fig. 4 Conserved domain of *EtHSP*.

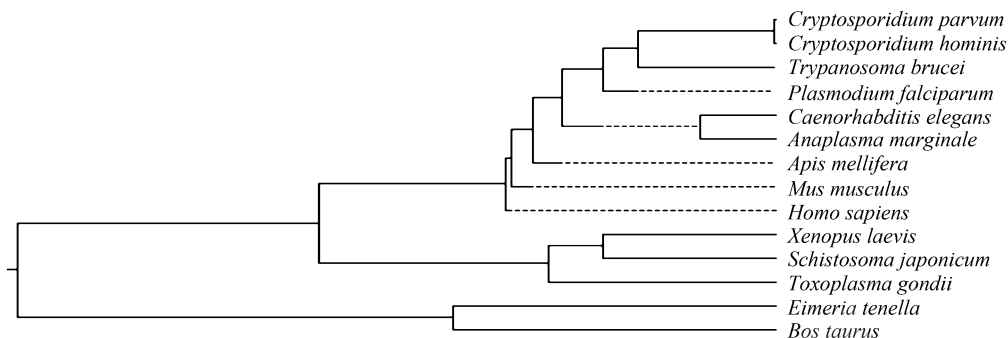


图 5 HSP60 蛋白分子进化树

Fig. 5 Evolutionary tree of HSP60 .

形虫 *Toxoplasma gondii*(GenBank Accession No. EEB04897)、日本血吸虫 *Schistosoma japonicum* (GenBank Accession No. AAW25551)等 13 个物种的 HSP60 蛋白进行进化树分析(图 5), 结果显示 *E. tenella* HSP60 蛋白在进化上与脊椎动物更接近。这种现象的存在, 可能与球虫适应在脊椎动物中的寄生生活相关。

2.4 *EtHSP* 重组表达质粒的构建

鉴定的阳性克隆质粒 *EtHSP* 经 *BamH* I 和 *Not* I 双酶切, 并与经同样双酶切的 pET28a(+)表达载体连接, 将连接产物转化 TOP10 感受态细胞, 选取阳性菌落经 PCR 鉴定以及酶切鉴定后, 获得了正确的重组表达质粒(pET28a(+)-*EtHSP*)(图 6)。

2.5 *EtHSP* 重组蛋白的表达

重组表达质粒 (pET28a(+)-*EtHSP*) 和空质粒 pET28a(+)转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 结果表明重组质粒 pET28a(+)-*EtHSP* 表达的融合蛋白分子量为 57.0 kD, 与预期分析的大小基本一致, 表明该基因可以在原核系统中表达。为了确定最佳表达条件, 本实验进行了时相表达, 结果表明, 转化菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后, 0~10 h 内融合蛋白的表达呈递增趋势, 6 h 后

融合蛋白的表达水平基本稳定, 不再上升(图 7)。因此, 把最佳诱导表达时间选定在 6 h, 经鉴定表达的蛋白为包涵体形式存在, 变性复性后用镍亲和层析柱进行纯化, 获得了纯化的重组蛋白(图 8)。

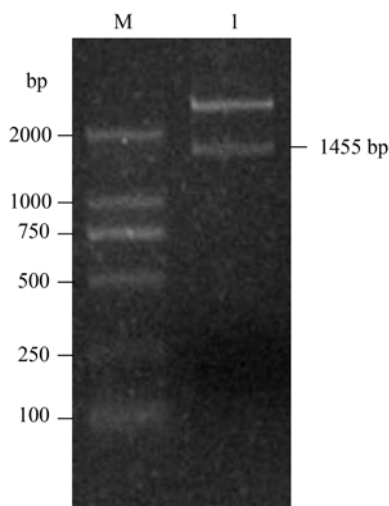


图 6 重组质粒 pET28a(+)-*EtHSP* 双酶切鉴定

Fig. 6 Identification of recombinant plasmid pET28a(+)-*EtHSP* digested with *BamH* I and *Not* I. M: DNA marker ; 1: pET28a(+)-*EtHSP* digested with *BamH* I and *Not* I.

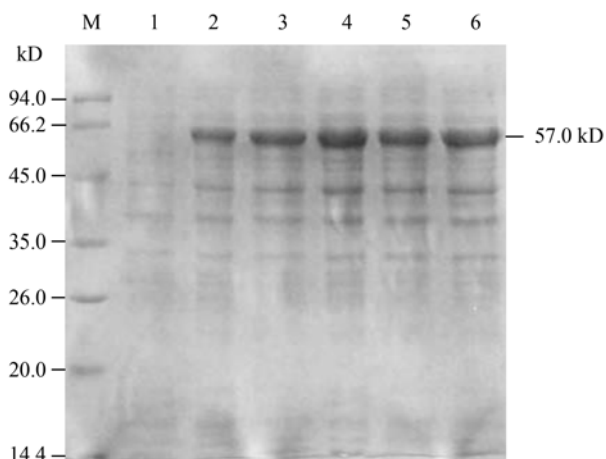


图 7 SDS-PAGE 分析 pET28a(+)-*EtHSP* 不同时相的表达蛋白

Fig.7 SDS-PAGE analysis of the expression product of pET28a(+)-*EtHSP*/BL21(DE3) in *E. coli*. M: protein marker; 1-6. pET28a(+)-*EtHSP* /BL21(DE3) induced with 1 mmol/L IPTG for 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h.

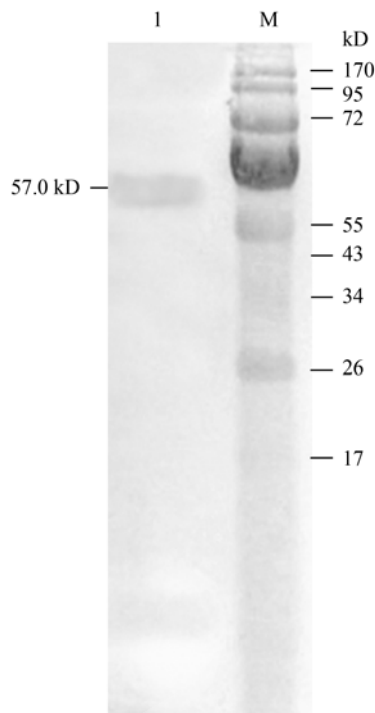


图 9 pET28a(+)-*EtHSP* 重组蛋白的 Western blotting 分析
Fig. 9 Western blotting analysis of *EtHSP* purified recombinant proteins. M: prestained protein ladder; 1: *EtHSP* purified recombinant protein.

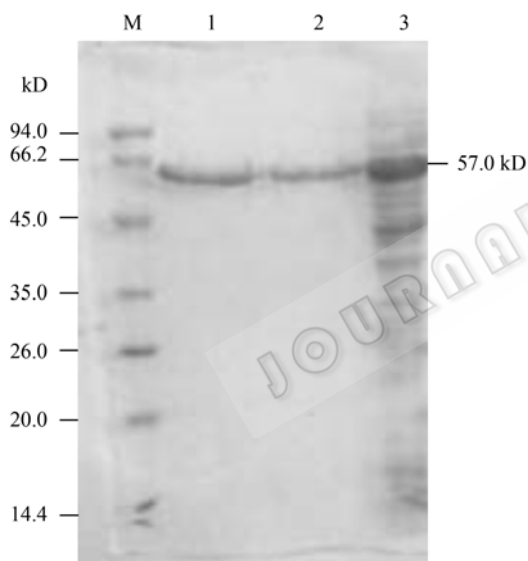


图 8 SDS-PAGE 分析纯化的 *EtHSP* 重组蛋白

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of purified recombinant *EtHSP* protein. M: protein marker; 1, 2: purified fusion protein; 3: pET28a(+)-*EtHSP* /BL21(DE3) induced with 1 mmol/L IPTG for 6 h.

2.6 *EtHSP* 重组蛋白抗原性的鉴定

将纯化的重组蛋白进行 Western blotting 分析, 结果如图 9 所示, *E. tenella* 抗血清能特异识别 *EtHSP* 重组蛋白, 在 57.0 kD 处有一条特异性条带, 表明该重组蛋白具有良好的抗原性。

3 讨论

HSPs 是一组糖蛋白, 种类多, 分子量从 7 kD 到 110 kD 或更高, 定位于多种细胞器, 目前描述的 HSPs 主要是在 SDS-PAGE 电泳上表现的分子量。HSPs 根据同源程度和分子量大小分为 6 个家族: HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、小分子量 HSP 以及泛素。本研究克隆的 *EtHSP* 基因, 其蛋白的分子量为 53.5 kD, 按照分子量划分, 该蛋白属于 HSP60 家族。HSP60 作为一种分子伴侣, 其重要的生物功能已日益引起人们的重视。HSP60 家族存在于所有的原核与真核生物中, 是细胞最保守的保护机制之一。当机体受到胁迫时, HSPs 大量合成, 以恢复变性蛋白或凝聚蛋白的天然构象。而对病原体的侵入, HSP60 会充当免疫抗原来激活免疫系统。HSP60 在细胞生命活动中具有重要的功能, 在保护免疫应答的特异性靶标上起重要作用; 另外, HSP60 在真菌、线粒体、叶绿体中协同 HSP10 共同参与蛋白的折叠并将其转运到其他细胞器中^[3]。

Sanchez等^[3]克隆并分析了约氏疟原虫的HSP60基因(*PyHSP60*), *PyHSP60*是一种单拷贝基因, 位于第9、10或11号染色体上, *PyHSP60*的cDNA序列含大小为1737 bp的开放阅读框, 编码579个氨基酸, 同恶性疟原虫HSP60氨基酸的同源性为93%。*PyHSP60*基因能编码一种可由热诱导的、细胞内的蛋白, 此种蛋白在约氏疟原虫的不同发育阶段均有表达。Wu等^[7]用人HSP60伴侣素重组抗体对旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*, 盘尾丝虫)cDNA文库进行筛选, 获得一个64.3 kD编码cDNA全长序列的蛋白, 与秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)、人、酵母和大肠杆菌的HSP60基因的同源性分别为72%、69%、53%和50%, 显示不同物种的HSP60有高度保守性。HSP70和HSP60都具有高度的物种保守性, HSP70和HSP60作为热休克蛋白的2个重要家族, HSP70已被深入研究, 而HSP60的研究却相对较少, 尤其在寄生虫领域国内还未对其进行系统的研究。HSPs尤其是HSP60在免疫炎症反应中起着重要的作用, 它不仅可介导天然免疫反应, 而且可介导获得性免疫, 这在天然免疫反应与获得性免疫之间架起了一道桥梁。同时发现HSP60与许多重要的自身免疫性疾病有明显关系, HSP60在免疫炎症反应中起重要的作用。HSP60与HSP70作用类似, 具有ATPase活性, 对ATP具有高度亲和力。与HSP70相比, HSP60只能恢复部分折叠或凝聚多肽的天然构象, 但作用于蛋白质的时间要迟于HSP70。HSP60作为热激蛋白的重要家族, 已成为研究的热点, 正常状态下HSP60以稳定状态存在于细胞质和线粒体基质中, 胁迫条件下HSP60在胞质中HSP70的作用下迅速从胞质转移到线粒体基质中, 以修复线粒体基质中的变性蛋白。综合观察, HSP60在许多病原体传染过程中都是一种免疫优势抗原, 因此未来的研究有可能会阐明HSP60在自身免疫发展中的作用, 以及以HSP60为基础的免疫治疗发展中的作用^[17]。

HSPs的许多特性, 如其良好的免疫原性、高度的保守性、所具有分子伴侣功能等, 显示其具有广阔的应用前景, 如HSP70可以作为一个潜在的亚

单位疫苗佐剂协同对抗疟原虫的感染。非完整片段的HSP70与完整片段的HSP70比较, 两者显示相同的疫苗佐剂特性, 将前者与疟疾抗原EB200构建成融合蛋白, 用该融合蛋白免疫机体能产生强烈的Th1免疫应答。同时, 发现恶性疟原虫HSP90与植物HSPs相似、同源性高, 这可能为预防、治疗疟疾提供一个极好的候选疫苗^[18]。

热激蛋白在鸡球虫的生长发育过程中起重要作用。del Cacho等^[4]对*E. tenella* HSP70的研究发现, 在球虫的发育、成熟和入侵过程中, 孢子生殖阶段的HSP70表达量呈递增水平。通过免疫组化等技术对HSP70的特异性单克隆抗体进行了分析, 结果显示, HSP70表达于子孢子形成阶段, 但在子孢子形成后的孢子化卵囊中未发现。HSP70出现在早期感染阶段可能与虫体在宿主体内受到的应激有关, 也可能与子孢子的形成有关。近期的研究还发现HSP70与虫株的毒力相关。del Cacho等^[5]对柔嫩艾美耳球虫的野生株和2种早熟株的子孢子阶段HSP70表达研究发现, 随着虫株毒力减弱, 其子孢子阶段的HSP70表达水平呈显著递减, 表明HSP70在柔嫩艾美耳球虫孢子中的表达与其致病性相关。

另外, 研究发现*E. tenella* HSP90(*EtHSP90*)的转录发生在虫体的所有阶段, 与其他低等或高等生物的HSP90有很高的同源性^[19]。Péroval等^[6]发现*EtHSP90*在虫体入侵宿主细胞的过程中表达量增加, 而使用特异性抗体和格尔德霉素(Geldanamycin, GA)抑制*EtHSP90*的功能之后, 虫体入侵宿主细胞和其生长发育均受阻。在*E. tenella*入侵宿主细胞过程中, 虫体在宿主细胞内定居和发育同时受到宿主细胞内环境的应激, HSP90在这过程中起到重要作用^[20]。本研究克隆获得的*EtHSP*基因经Real-time PCR鉴定只在子孢子阶段高表达, 与本实验室前期研究结果一致^[14], 该蛋白很可能与子孢子入侵宿主细胞有关。且获得的重组蛋白能被*E. tenella*免疫血清识别, 说明该蛋白具有一定的抗原性。所以进一步深入研究*EtHSP*基因以及编码蛋白的生物学功能, 对筛选*E. tenella*基因工程疫苗候选抗原和药物作用靶点具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol*, 1974, **84**(3): 389–392.
- [2] Maresca B, Kobayashi GS. Hsp70 in parasites: as an inducible protective protein and as an antigen. *Experientia*, 1994, **50**: 1067–1074.
- [3] Sanchez GI, Carucci DJ, Sacci JJ, et al. *Plasmodium yoelii*: cloning and characterization of the gene encoding for the mitochondrial heat shock protein 60. *Exp Parasitol*, 1999, **93**(4): 181–190.
- [4] del Cacho E, Gallego M, Pereboom D, et al. *Eimeria tenella*: hsp70 expression during sporogony. *J Parasitol*, 2001, **87**(5): 946–950.
- [5] del Cacho E, Gallego M, López-Bernad F, et al. Differences in hsp70 expression in the sporozoites of the original strain and precocious lines of *Eimeria tenella*. *J Parasitol*, 2005, **91**(5): 1127–1131.
- [6] Péroval M, Péry P, Labbé M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. *Int J Parasitol*, 2006, **36**(10/11): 1205–1215.
- [7] Wu Y, Egerton G, Ball A, et al. Characterization of the heat-shock protein 60 chaperonin from *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, **107**(2): 155–168.
- [8] Ravi V, Kubofcik J, Bandopathyaya S, et al. *Wuchereria bancrofti*: cloning and characterization of heat shock protein 70 from the human lymphatic filarial parasite. *Exp Parasitol*, 2004, **106**(1-2): 1–10.
- [9] Lillibridge CD, Rudin W, Philipp MT. *Dirofilaria immitis*: ultrastructural localization, molecular characterization, and analysis of the expression of p27, a small heat shock protein homolog of nematodes. *Exp Parasitol*, 1996, **83**(1): 30–45.
- [10] Neumann S, Ziv E, Lantner F, et al. Regulation of Hsp70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem*, 1993, **212**(2): 589–596.
- [11] Yuckenberg PD, Poupin F, Mansour TE. *Schistosoma mansoni*: protein composition and synthesis during early development; evidence for early synthesis of heat shock proteins. *Exp Parasitol*, 1987, **63**(3): 301–311.
- [12] Kanamura HY, Hancock K, Rodrigues V, et al. *Schistosoma mansoni* heat shock protein 70 elicits an early humoral immune response in *S. mansoni* infected baboons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002, **97**(5): 711–716.
- [13] Yan Y, Han HY, Huang B. Progress on study of heat shock proteins for parasites. *Biotechnol Bull*, 2009, (2): 29–33. 颜彦, 韩红玉, 黄兵. 热激蛋白及其在寄生虫的研究进展. *生物技术通报*, 2009, (2): 29–33.
- [14] Han HY, Lin JJ, Zhao QP, et al. Construction of subtractive cDNA libraries of the sporogony stage of *Eimeria tenella* by suppression subtractive hybridization. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(6): 1005–1010. 韩红玉, 林娇娇, 赵其平, 等. 柔嫩艾美耳球虫孢子发育阶段虫体抑制性消减文库的构建. *生物工程学报*, 2007, **23**(6): 1005–1010.
- [15] Mogk A, Bukau B. Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr Biol*, 2004, **14**(2): 78–80.
- [16] Ogura T, Wilkinson AJ. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells*, 2001, **6**(7): 75–597.
- [17] Gong XG, Yu H. Recent advances in heat shock protein 60. *Chin J Pathophysiol*, 2004, **20**(11): 2151–2154. 龚兴国, 于红. 热休克蛋白 60 的研究进展. *中国病理生理杂志*, 2004, **20**(11): 2151–2154.
- [18] Qazi KR, Wikman M, Vasconcelos NM, et al. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of plasmodium falciparum malarial antigen gene fused with a fragment of HSP70 gene. *Vaccine*, 2005, **23**(9): 1114–1125.
- [19] Miska KB, Fetterer RH, Min W, et al. Heat shock protein 90 genes of two species of poultry *Eimeria*: expression and evolutionary analysis. *J Parasitol*, 2005, **91**(2): 300–306.
- [20] Maresca B, Carratù L. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today*, 1992, **8**(8): 260–266.