

研究报告

柔嫩艾美耳球虫基因在丝状体蓝藻中的克隆*

张欣萍¹ 王春凤^{1,2} 孙哲¹ 何召庆¹ 张莉¹
黄瑜¹ 徐镔蕊 秦泽荣¹

(中国农业大学动物医学院 北京 100094)¹

(吉林农业大学动物科技学院 长春 130118)²

摘要: 以纯化的柔嫩艾美耳球虫的孢子化卵囊为模板, 根据已知的序列设计一对引物, 用 RT-PCR 方法扩增出球虫的 *SO7* 基因, 通过三亲接合转移、新霉素筛选、序列分析等方法得到了转球虫基因工程蓝藻。这为球虫基因在蓝藻中表达奠定了基础。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫 *SO7* 基因, 丝状体蓝藻, 克隆

中图分类号: S852.65, Q78 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2001) 03-0001-06

CLONING THE *EIMERIA TENELLA* *SO7* GENE IN *CYANOBACTERIUM*

ZHANG Xin-Ping¹ WANG Chun-Feng^{1,2} SUN Zhe¹ HE Zhao-Qing¹

ZHANG Li¹ HUANG Yu¹ XI Bin-Ruei QIN Ze-Rong¹

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)¹

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)²

Abstract: using total RNA from 7h sporulating coccysts of *E. tenella* as template, *SO7* gene of *E. tenella* was amplified by RT-PCR technique with a pair of primers designed according to sequence of *SO7* gene published. Triparental conjugate transfer was applied for transforming *SO7* gene into cyanobacterial cells. Ne-screening and sequencing analysis were used for the identification of transgenic cyanobacterium positive clones. This provided a good foundation for the *E. tenella* *SO7* gene expression in cyanobacterium.

Key words: *Eimeria tenella* *SO7* gene, *Cyanobacterium*, Cloning

球虫病是危害畜牧业生产最严重的疾病之一。据估计, 我国每年仅鸡球虫病所造成的损失就达 10 亿元人民币, 每年用于防治鸡球虫病的药费达近 5 亿元人民币。柔嫩艾美耳球虫是鸡球虫病中危害极烈的一种球虫, 作为防制球虫病主要方法的药物防制和免疫预防都具有很大的局限性。因此寻求一种简单易行的新手段防治球虫病显得尤为必要, 将基因工程技术和绿色植物蓝藻相结合有望解决这些问题。

蓝藻是极为多样性的具有植物型放养光合作用的原核生物, 兼有植物和细菌的一些特性(故又称蓝细菌), 种类多, 分布广, 具有耐盐, 耐极端温度和 pH 的能力, 因而适应性强。从营养学角度讲, 蓝藻富含蛋白质、氨基酸、胡萝卜素、多糖、不饱和脂肪酸等生物活性物质。开展蓝藻遗传转化研究, 不仅具有材料上的便利条件, 而且

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39880040)

Projection Granted by Chinese National Natural Science fund. (No. 39880040)

收稿日期: 2000-02-07, 修回日期: 2000-11-30

具有重要意义。自70年代以来,蓝藻的分子遗传学及基因工程已取得一些可喜的成果,如将芽孢杆菌的杀虫毒素基因导入蓝藻中试图以此工程藻对水体蚊幼虫进行生物防治^[1-4]。本实验的目的就是将球虫保护性抗原基因SO7通过三亲接合转移法在丝状体蓝藻穿梭质粒载体pRL-439中进行克隆、筛选鉴定,从而为球虫基因在蓝藻中表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 球虫、菌株和质粒载体

柔嫩艾美耳球虫 *E. tenella* BJ株纯种孢子化卵囊为中国农大动物医学院寄生虫教研组保存。大肠杆菌 HB101、质粒 pRL-439、RP4 + pRL 542、pUC19、pDC-8、鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 本室保存。

1.2 球虫的增殖

E. tenella BJ株纯种孢子化卵囊接种200只14日龄无球虫雏鸡,120h后剖杀,按蒋建林、蒋金书^[2]的方法收集纯化球虫卵囊,将纯化的卵囊孢子化至7h。

1.3 球虫总RNA的提取

按 promega gents® Total RNA Isolation System 说明书进行,1%甲醛电泳。

1.4 SO7基因的RT-PCR

1.4.1 引物设计:根据 Brothers^[5]发表的序列设计:上游引物:5' GAATCTCTCGCC-CAACTTTTTCC3',下游引物:5' GAATTCCTCTCCCGCTGCTGTG3',由上海生工生物工程公司合成。

1.4.2 *E. tenella* 株 cDNA 的合成:取 *E. tenella* 总 RNA 2 μ L,加入 ddH₂O 9.0 μ L,70℃ 变性 10min,立即置于冰上冷却。然后依次向反应体系中加入 5X 缓冲液 2.0 μ L, dNTP (10mol/L) 2 μ L, RNasin 抑制物 1.0 μ L, 0.1mol/L DTT 2.0 μ L, 反转录酶 1.0 μ L, 上游引物 1.0 μ L (终浓度 200pmol/L) 混匀,低速瞬时离心,甩下管壁上的液滴,42℃ 水浴 1h, 95℃, 5min 灭活反转录酶。

1.4.3 SO7 基因的扩增:取球虫 cDNA 2.0 μ L, 上下游引物各 1.5 μ L (终浓度 200pmol/L), 10X 反应缓冲液 2.5 μ L, dNTP (10mmol/L) 2.0 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, Taq Plus I DNA 聚合酶 1.0 μ L (5units), 混和后进行扩增。

循环参数:95℃ 变性 5min, 94℃ 30s, 57℃, 1min, 72℃, 2min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。循环反应完毕后,取 2 μ L 扩增反应物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,用柱回收纯化试剂盒进行。

1.5 含 *E. tenella* SO7 基因的蓝藻穿梭表达载体构建

1.5.1 PCR 产物与载体 pUC-19 的连接得到 PUC-SO7:将 PCR 产物与 PUC19 均用 *Eco*RI 限制性内切酶酶切,回收连接转化,筛选阳性克隆。

1.5.2 pUC-SO7 与 pRL-439 连接:大量制备 pUC-SO7 和 pRL-439 质粒 DNA, 分别用 *Eco*RI 酶切,琼脂糖电泳并回收 pRL-439 的约 2.7kb 大片段和 pUC-SO7 的约 0.8kb 的 SO7 片段,用 T4DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 HB101 感受态细胞。在含有氨苄青霉素的 LB 培养基上筛选阳性克隆,提取质粒鉴定,挑选 pRL-439 的大片段和 SO7 连接的质粒命名为 pRL-SO7。

1.5.3 穿梭表达载体的构建:质粒 pDC-8 约 11kb, 是穿梭表达载体 pRL-25c 的衍生物,由来自大肠杆菌质粒和蓝藻质粒的两部分 DNA 组成,是杂合质粒。既有可在蓝藻中起作用的复制起始区 pDU1, 又有可在大肠杆菌中起作用的复制起点。它还含有三亲接合

转移的驱动识别位点 *bom* 和新霉素磷酸转移酶基因, 在大肠杆菌 HB101 中适合用卡那霉素筛选, 在蓝藻中适合用新霉素筛选。pDC-8 载体上有几个常用的酶切位点, 可供外源基因插入。提取质粒 pDC-8、pRL-SO7, 将两者分别用 *Sal*I 酶酶切, 电泳回收线性的质粒 pRL-SO7 和 pDC-8 的大片段, 去磷酸化并连接转化大肠杆菌 HB101 中。筛选阳性克隆鉴定并命名 pDC-SO7。

1.6 三亲接合转移与筛选

含穿梭表达载体和辅助载体的大肠杆菌 HB101 菌各 40mL, 在对数生长期离心, 收集菌体并洗涤后, 两者混合后悬浮于 400 μ L LB 培养基中; 40mL 蓝藻同样处理后, 悬浮于体积尽可能小的 BG-11 培养基中, 作不同浓度稀释后各取 1 μ L 与 100 μ L HB101 菌混匀, 涂布在无菌的 NC 膜上, 再贴于含 0.8% 琼脂的 BG-11 培养基表面, 26 $^{\circ}$ C 弱光培养 24h 后, 每隔 3d 分别将滤膜转移到含有新霉素的 BG-11 培养基上。继续温育培养, 挑选抗药性藻落。

1.6.1 转基因蓝藻的纯化及蓝藻质粒的提取^[6]: 将单藻落转移到含适量新霉素的 BG-11 培养液中, 离心收集生长 2 周左右的单藻落, 以 SE Buffer 洗沉淀 1 次, 再离心收集藻细胞。加入 1% sarkosyl 溶液洗 1 次。细胞重悬于 1mL GTE 中, 加入 10 μ g/mL 的溶菌酶 500 μ L, 充分混合, 37 $^{\circ}$ C 温育 1~1.5h。再转入两个 1.5mL 离心管中, 每管分别加入新配制的碱裂解液 250 μ L, 轻轻反转几次, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h, 再加入 5mol/L 的 NaCl 溶液 200 μ L, 轻轻混合, 4 $^{\circ}$ C 过夜。15000r/min 离心 20min, 弃沉淀, 上清转入一个 1.5mL 离心管中, 用酚、氯仿各抽提 1 次。乙醇沉淀, 用 70% 乙醇洗涤, 干燥, 溶于 50 μ L TE 中。

1.6.2 转基因蓝藻中 *E. tenella* SO7 基因的测序: 将转 *E. tenella* SO7 基因阳性的蓝藻按上述方法提取质粒, 由大连宝生物公司进行测序。测序结果用 DNASTar 软件进行分析。

2 结果

2.1 *E. tenella* 球虫总 RNA 鉴定

本实验采用一步法从 7h 孢子化 *E. tenella* 卵囊提取总 RNA。用甲醛凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 可见有清晰的 18S rRNA 和 28S rRNA 条带, 说明 RNA 未降解, 质量较好。结果见图 1。

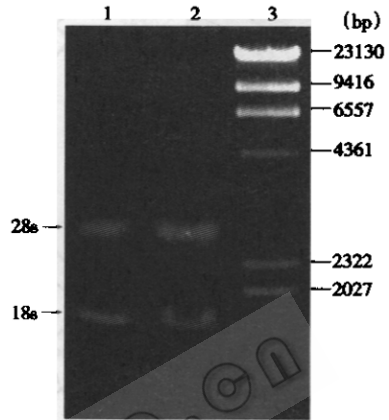


图 1 *E. tenella* 7h 孢子化卵囊总 RNA 甲醛变性电泳
1, 2 *E. tenella* 球虫的总 RNA, 3 λ DNA/*Hind* III marker

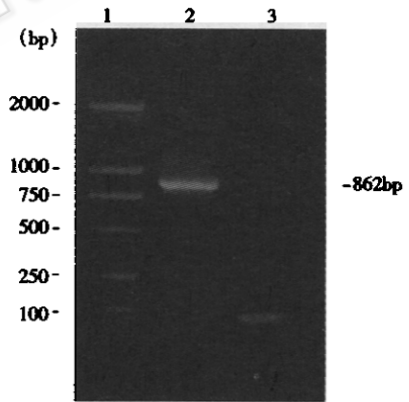


图 2 *E. tenella* SO7 基因的 RT-PCR 扩增
1 DL 2,000 DNA marker, 2 SO7 基因 RT-PCR 产物,
3 阴性对照

2.2 *E. tenella* SO7 基因的 RT-PCR

用 *E. tenella* BJ 株 7h 孢子化卵囊的总 RNA 为模板，反转录合成单链 cDNA，再通过 PCR 扩增 SO7 基因，结果获得的条带与预期大小相符为 862bps 片段，结果见图 2。

2.3 穿梭表达载体 pDC-SO7 的构建流程图

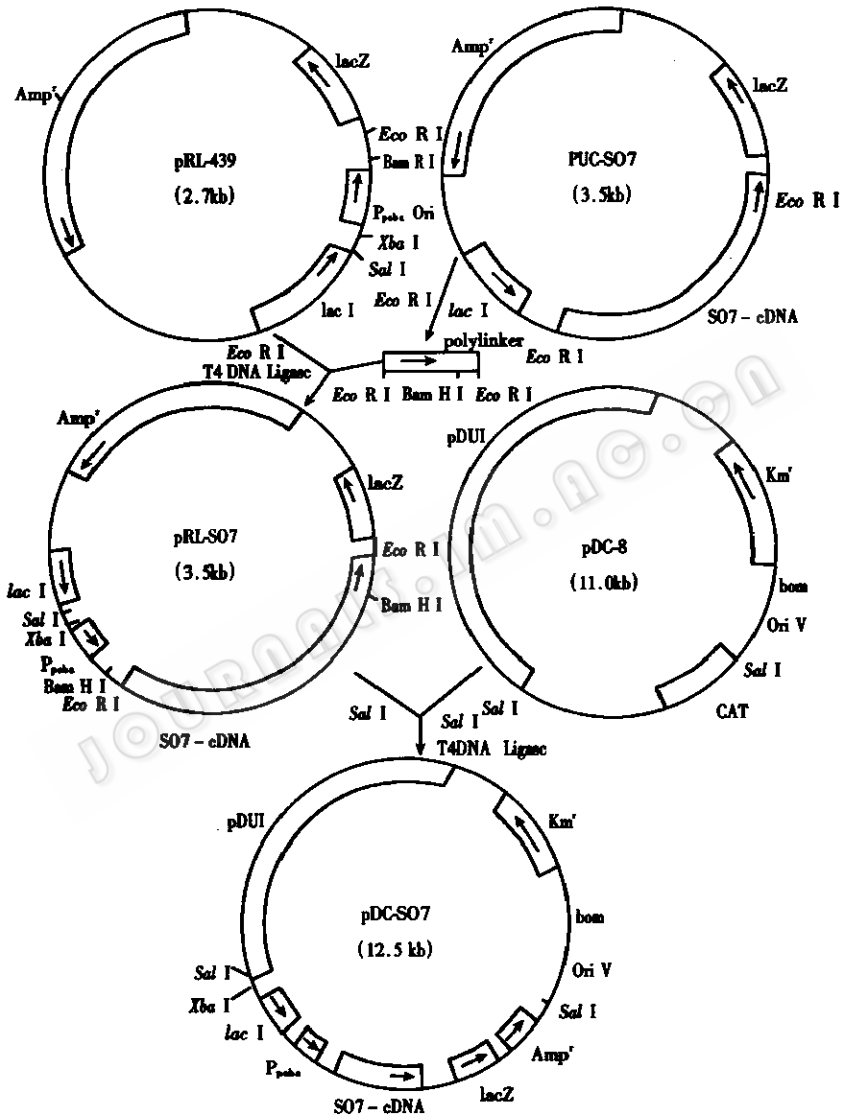


图 3 穿梭表达载体 pDC-SO7 的构建

2.3.1 质粒 pUC19-SO7 和 pRL-439 用 *EcoRI* 酶切后的 0.86% 琼脂糖电泳：见图 4。

2.3.2 pRL-SO7 的酶切鉴定琼脂糖电泳：见图 5。用 *EcoRI* 酶切载体 pRL-SO7，应得两条片段，约为 2.7kb 和 0.86kb，结果与预期相符。

2.3.3 pDC-SO7 的酶切鉴定琼脂糖电泳：用限制性内切酶 *SalI* 酶切载体 pDC-SO7，应得大片段约为 9.0kb，小片段约为 3.5kb，结果与预期相符，见图 6。

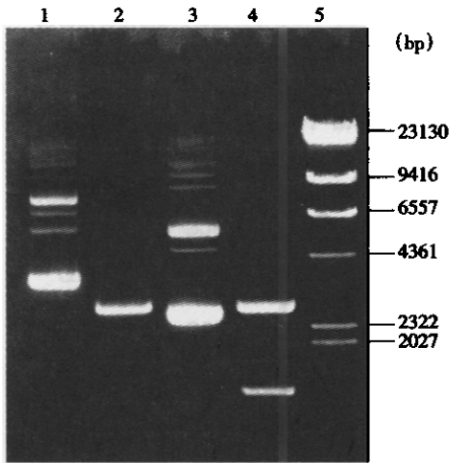


图4 pUC19-S07和pRL-439用EcoRI酶切鉴定
1 pRL-439, 2 用EcoRI酶切pRL-439, 3 pUC-S07,
4 用EcoRI酶切pUC-S07, 5 λ DNA/*Hind* III Marker

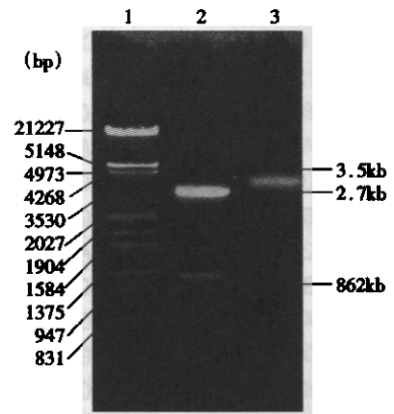


图5 pRLS07的酶切鉴定电泳图

1 λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III Marker,
2 用EcoRI酶切pRLS07, 3 pRLS07

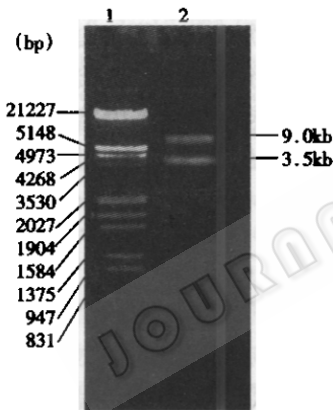


图6 用SalI酶切pDC-S07琼脂糖电泳图

1 λ DNA/*EcoRI* + *Hind* III Marker, 2 用SalI酶切pDC-S07

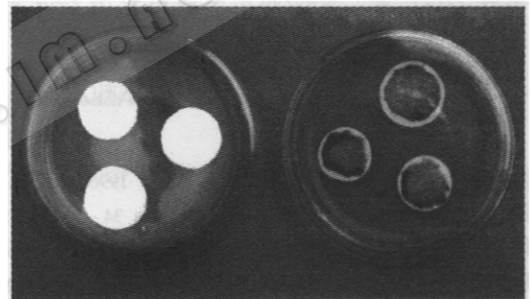


图7 转球虫基因蓝藻PCC7120的新霉素平板筛选

1 对照组野生型菌落, 2 转球虫基因的阳性菌落

2.4 转球虫基因蓝藻的筛选

转球虫基因阳性的蓝藻在含有新霉素 (Neo) 25 μ g/mL的平板培养基上筛选两周后的三亲接合转移结果, 见图7。

2.5 球虫S07基因序列测定与分析

将从蓝藻中提取的含有球虫基因的质粒进行S07基因测序, 结果全长为862bp个核苷酸, 有一个含216个密码子的开放阅读框, 可以编码分子量约为22.4kD的多肽。与前人的报道结果比较, 同源率为99%, 突变的6个核苷酸中, 1个为有义突变, 使其推测氨基酸由Gly变为Cys。这与李安兴测得的结果完全一样。这说明球虫S07基因确实转化入蓝藻中了。这为下一步S07基因在蓝藻中表达奠定了必要的基础。S07核苷酸序列见图8。

3 小结

以往关于柔嫩艾美耳球虫基因的表达均是在大肠杆菌等原核表达系统中进行的。这就要求将表达产物进行处理再给鸡进行免疫。由于鸡球虫的保护性抗原成分较复杂,

```

1 TCTCGCCCA ACTTTTTCC CCGCGCCCG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG
61 CAAAATGCA GACCTCTTCA GGGACTCGT GGGCGCGTC GTCGGCGCTG TTGCTGCAGC
121 AGATTGCGT GCGAGGGCG ABAGGGCCCG CCGCCCGCC CCGGCACTG CCTGGACTTG
181 CTGCTGCAGC AAACTGCAAG AAGGGGCCCG CGAGCTGGAG TGTTTTGTGC AGCAGCTGAG
241 TTTTGTGCA GGAAGCTGG CTTGCTGCCT GCGGGTGGGG GCGGAGCAGC TGGCGCGTG
301 CGCTGCGGAG GGGCGGCTGC CCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGTGTCTGCG CGCTGCTGCA
361 GCTCGAGAAG CAGGACCTGG AGCAGAGCCT CGAGGCCGGC AAGCAGGGCG GGGAGTGCCT
421 CTTGAGGAGC AGCAAAGTGG CCCTCGAGGC CCTCCTCGAG GGGGCCCGCG TTGCAGCAAC
481 GCGGGTTTG CTGCTGTCG ABAGCAGCAA AGACACGGTG CTGCGCAGCA TTCCCACAC
541 CCAGGAGAAG CTGGCTCAGG CCTACAGTTC TTTCTGCGG GGCTACCAGG GGGCAGCAGC
601 GGGAGGTCT CTGGGCTACG GGGCCCTGC TGTGCTTAC GGCAGCAGC AGCAGCCAG
661 CAGCTAGGG GCGCCCCCG CCTCGAGCA GCAGCCCTCG GCTTCTTCT GGTAGCCCTG
721 CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCGGGCGC GGCAGCCGCG GCGGGCCCGG
781 GCGCGCGTG CAGCAACAGC AGCAGCCGCG GCGGCTAGCG CCGGGAGCA CTCGAGGGA
841 ACTCGACAGG CAGCGGAGA GA

```

图8 S07基因编码区核苷酸序列

所以每一种抗原只能起到部分保护作用。而藻类养殖业每年为我国人民提供近两百万吨的高蛋白食品和饲料，如果能将蓝藻改造成具有生物预防功能的饲料食品，其开发前景将十分广阔。本实验仅以球虫基因S07为例，探索性地将其通过三亲接合转移技术转化进蓝藻中，并筛选阳性克隆、序列分析，从而获得了转球虫S07基因蓝藻，这为球虫基因及其它功能基因在蓝藻中表达和发挥转基因工程蓝藻的生物学功能奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 蒋建林, 蒋金书. 中国农业大学学报, 1996, 1 (5): 99~102.
- [2] 秦松, 曾呈奎. 海洋科学, 1993, 1: 34~37, 2: 24~29.
- [3] 秦松, 张健. 海洋与湖沼, 1994, 25 (4): 353~355.
- [4] 郭祥学, 赵晖, 施定基, 等. 植物学报, 1998, 40 (4): 320~324.
- [5] Brother V M, Kuhn I, Paul L S, *et al.* Molecular and Biochemical Parapsychology, 1988, 28: 235~248.
- [6] Goyal D. J. Microbiol Methods, 1992, 15: 7~15.