

柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊 cDNA 文库的构建

韩红玉 黄 兵* 赵其平

(中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232)

摘 要 用建立表达性文库的方法,构建了 *Eimeria tenella* 孢子化卵囊噬菌体 ZAP 表达性 cDNA 文库。首先用 TRIzol 试剂盒从 *E. tenella* 孢子化卵囊中提取总 RNA,再用 Oligo(dT)₁₂-纤维素柱从总 RNA 中分离 mRNA,以 mRNA 为模板, Oligo(dT)₁₈ Linker-Primer 为引物,反转录合成 cDNA 第一链,再在 DNA 聚合酶 I 作用下置换合成第二链 cDNA。cDNA 第二链合成后用 Pfu DNA 聚合酶补平 *Xho* I 位点,再与 *Eco* R I Adapters 连接,经 *Xho* I 酶切后,凝胶电泳回收 500bp ~ 4.0kp 之间的 cDNA 片段,纯化后的双链 cDNA 与载体 ZAP Express vector 连接。体外包装后得到 *E. tenella* 孢子化卵囊的 cDNA 表达性文库,经测定该文库的容量为 6×10^6 ,扩增后文库的滴度为 1×10^{11} Pfu/mL,经 PCR 测定,该文库的重组率为 96%。

关键词 柔嫩艾美耳球虫, 孢子化卵囊, cDNA 文库

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0669-04

鸡球虫病是由艾美耳球虫所引起的一种危害极其严重的全球性寄生虫病,严重危害家禽的生长发育,全世界每年因球虫病造成的经济损失约为 20 亿美元^[1]。目前,控制球虫病仍然以药物为主,但由于耐药虫株的普遍产生以及化学药物的残留等问题,使得抗球虫药的研制受到极大的限制,因此,人们期望用更好的手段来取代,免疫预防是控制球虫病的理想方法,因为利用鸡球虫疫苗防治鸡球虫病不仅能彻底解决鸡球虫的耐药性问题,而且对于将来生产绿色食品,保证肉蛋质量是一个不可缺少的大前提。但目前应用的一些活疫苗,对鸡具有一定的潜在致病力,使用也受到一定的限制。自从 80 年代末至 90 年代初,国外就开始从分子生物学方面研究鸡球虫基因,采取遗传工程技术获得的重组疫苗逐渐受到青睐。然而要获得重组疫苗,首先必须筛选出具有保护性的抗原基因。构建 cDNA 文库是一种获得目的基因并进一步进行基因重组,基因克隆的重要方法。为了进一步从分子生物学方面对鸡球虫特异性基因进行研究,筛选出具有保护性抗原的基因,我们构建了 *E. tenella* 孢子化卵囊 ZAP 表达文库,为从分子水平深入研究 *E. tenella* 基因提供了物质基础。

1 材料及方法

1.1 主要材料与试剂

球虫:柔嫩艾美耳球虫是由上海家畜寄生虫病研究所第三研究室保存提供。试剂:TRIzol 试剂盒自上海华舜生物工程有限公司,mRNA 纯化试剂盒购自 Pharmacia Biotech 公司,ZAP Express[®] cDNA Synthesis Kit 和 Gigapack[®] Gold Packaging Extract 购自 Stratagene 公司,Qiaquick gel Extraction Kit 购自 QIAGEN 公司,T7 和 T3 Promotor Primer 购自上海生物工程技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊的收集:用单卵囊繁殖的 *E. tenella* 孢子化卵囊,按每羽 3×10^4 接种 14 日龄无球虫雏鸡,感染 7d 后,收取卵囊至 2.5% 的重铬酸钾中培养,待孢子化后,收集纯化孢子化卵囊迅速冻存于液氮中,以备提取总 RNA。

1.2.2 柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊总 RNA 的提取和 mRNA 的分离:

将冻存于液氮中的 *E. tenella* 孢子化卵囊迅速从液氮中取出,按 10mL/g 的卵囊加入 Trizol 试剂,置于电动匀浆器中匀浆后,再按 Trizol 试剂说明书操

收稿日期:2001-05-14;修回日期:2001-08-20。

基金项目:“九五”国家科技攻关项目基金资助(96-005-02-01-05)。

* 通讯作者。 Tel:86-021-54081089; Fax:86-021-54080044; E-mail:caassp@public.sta.net.cn

作。异丙醇沉淀后,取小部分离心,DEPC 水溶解后进行甲醛变性电泳检测总 RNA 的质量,紫外检测总 RNA 的纯度和浓度,其余的用 75% 乙醇沉淀后,用 mRNA 纯化试剂盒中的 Elution buffer 溶解,再按 mRNA 纯化试剂盒说明书操作。mRNA 分离后,取小部分用甲醛变性电泳检测。

1.2.3 cDNA 的合成:基本按照 Stratgene 的 ZAP Express[®] cDNA synthesis kit 说明书操作。本文以 mRNA 为模板,Oligo (dT) 18-*Xho* I 为引物,在 MMLV 反转录酶作用下合成第一链 cDNA,再在 DNA 聚合酶 I 作用下置换合成第二链 cDNA。cDNA 第二链合成后,用 Pfu DNA 聚合酶将 cDNA 末端 *Xho* I 位点补平,再用 T4 DNA 连接酶连接补平的 cDNA 和 *Eco* R I Adapters,经 T4 Polynucleotide Kinase 磷酸化 *Eco* R I 末端后,再用 *Xho* I 限制酶消化,得到两端分别为 *Eco* R I 和 *Xho* I 的粘性末端。

1.2.4 cDNA 的纯化与定量:将消化后的双链 cDNA,经电泳后,切下含 500bp ~ 4kb DNA 片段的胶,其余步骤按 Qiaquick gel Extraction 试剂盒操作手册进行,洗脱出的双链 cDNA 加 1/10 体积的 3mol/L NaAc,2 倍体积的冰乙醇,-20℃ 沉淀过夜后,4℃ 下 13000r/min 离心 60min,去上清,用 75% 的乙醇洗 1 次,室温干燥后,加 8μL dd H₂O 溶解。取 1μL 用于定量电泳,以 30ng/μL 的 λDNA 作定量标准。

1.2.5 cDNA 片段的克隆和体外包装:本文采用 ZAP Express vector,它是一种用 *Eco* R I 和 *Xho* I 预切好并去磷酸化的载体,这样可以大大减少载体自连,也可以定向克隆 cDNA。取纯化回收的 cDNA(约 30ng)与 ZAP Express vector 4℃ 连接 2d,再取连接反应液 3μL 用 Gigapack[®] III Extract 进行体外包装,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.6 cDNA 文库的鉴定:

(1)cDNA 文库容量的测定:

取包装好的反应液 5μL 作 1:10,1:100,1:1000,1:10000 稀释,然后各取 5μL 稀释液加入到 200μL 对数生长期的 XLI-Blue MRF⁻ 细菌液中,混合后,37℃,吸附 20min,再加入 3mL NZY Top agar(大约 48℃)混匀铺平板,37℃ 培养过夜,第二天计算平板上的清亮噬菌斑。

(2)cDNA 文库的扩增和滴度的测定:

文库容量测定后,按 5×10^4 pfu/板将剩余的噬菌体 cDNA 包装反应物全部铺板扩增,37℃ 培养 6 ~ 8h 后,每板加 10mL SM buffer,4℃ 浸泡过夜,收集洗脱液,再用 2mL SM buffer 冲洗,将收集的全部洗脱

液加 5% (V/V) 的氯仿,混匀,室温放置 15min,500g 离心,去除沉淀,收集上清,取小部分加 0.3% 的氯仿,混匀后保存于 4℃,其余的加 7% 的 DMSO (V/V) 于 -80℃ 保存,取 4℃ 保存的 cDNA 文库 10μL,按梯度稀释后铺板,测定扩增后文库的滴度。

(3)cDNA 文库重组比的测定:

在测容量的平板上,随机挑取 50 个清亮噬菌斑,置于 0.5mL 的离心管中,再分别加入 50μL SM buffer 和 2μL 氯仿,混匀后 4℃ 放置过夜。分别取 5μL 做模板,同时取 4℃ 保存的 cDNA 文库 5μL 做模板,用 T7 和 T3 为引物进行 PCR,PCR 的条件为 94℃ 变性 5min;94℃ 30s,55℃ 40s,72℃ 2min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *E. tenella* 孢子化卵囊总 RNA 的提取和 mRNA 的分离

用 Trizol 试剂从 *E. tenella* 孢子化卵囊中提取的总 RNA,经紫外分光光度计测定其 $OD_{260}/OD_{280} = 1.9$,满足纯度要求。在甲醛变性电泳凝胶上,可见明显的 28S,18S 条带(如图 1 所示),说明提取的总 RNA 没有降解。经 Oligo(dT)纤维素柱 2 次纯化后,得到的 mRNA 经甲醛变性电泳检测也无降解现象(如图 2 所示),可用于 cDNA 文库的构建。



图 1 *E. tenella* 孢子化卵囊的总 RNA 的提取

Fig.1 Isolation of total RNA from *E. tenella* sporulated oocysts



图 2 mRNA 的分离

Fig.2 Isolation mRNA from total RNA

2.2 cDNA 的合成

双链 cDNA 电泳显示,合成的 cDNA 大小分布在 0.2~6.0kb 之间,大部分集中在 0.5~2kb 之间(如图 3 所示),这一结果与合成的 cDNA 双链用碱性电泳后放射性自显影法检测的 cDNA 长度一致,符合 cDNA 合成的分布规律。

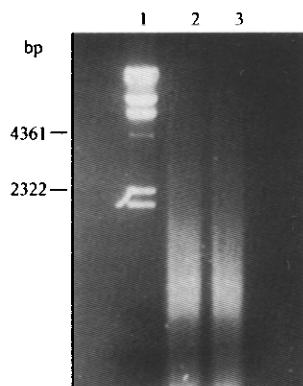


图 3 *E. tenella* 孢子化卵囊双链 cDNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 1% agarose gel electrophoresis of the double-strand cDNA

from *E. tenella* sporulated oocysts

1. λ DNA/*Hind* III markers; 2~3. The double-strand cDNA

2.3 cDNA 文库的构建及鉴定

双链 cDNA 与 ZAP Express Vector 连接包装后,测得的文库容量为 6×10^6 ,扩增后文库的滴度为 1×10^{11} Pfu/mL,经 PCR 扩增后,推算出文库的重组率为 96%,扩增出的片段主要集中在 0.6~3.5kb 之间(如图 4 所示)。

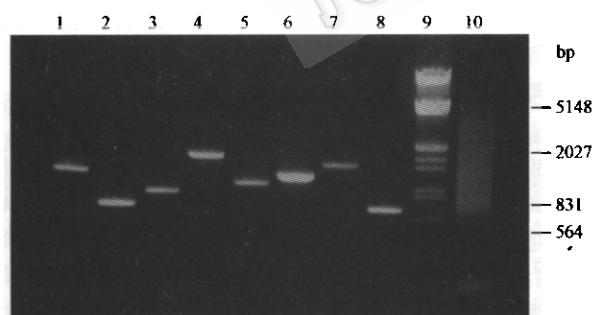


图 4 *E. tenella* 孢子化卵囊 cDNA 文库的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of cDNA library from *E. tenella*

sporulated oocysts by PCR

1~8. PCR products of using the single clone as template;

9. λ DNA/*Eco*RI + *Hind* III markers;

10. PCR products of using the cDNA library as template

3 讨 论

大多数高等真核生物的 rRNA 为 28S、18S、5S 等几类 RNA, *E. tenella* 的 rRNA 和 mRNA 具有真核生物的特性^[1],其 rRNA 也具有 28S、18S 和 5S。但 mR-

NA 经甲醛变性电泳显示:有几条明显的条带,可能原因是由于这一位置有高丰度的 mRNA,因为 *E. tenella* 在孢子化过程中,其 mRNA 的含量是变化的。鸡球虫在孢子化过程中,基因组 DNA 的合成没有变化,基因组 DNA 在孢子化过程中不进行复制,其孢子所需的全部 DNA 在合子发育阶段就已合成^[3],但 RNA 的合成是有变化的。Ellis 等^[4]用体外翻译和 DNA 杂交技术研究表明 *E. tenella*, *E. maxima* 在孢子化过程中, mRNA 的丰度是变化的,在孢子化的后期阶段,有一些基因是高表达的,这些基因的转录物 mRNA 丰度也增加。

目前,我国鸡球虫研究着重集中于生物学、免疫学、以及药物防治等传统领域,分子水平的研究仍处于起步阶段。国外在鸡球虫分子生物学方面的研究是始于 80 年代末,到目前,已建立了鸡球虫不同生活史阶段的 cDNA 文库和基因组文库,如未孢子化卵囊的 cDNA 文库^[5],孢子化卵囊的 cDNA 文库^[6],第一代裂殖体 cDNA 文库^[7],第二代裂殖体 cDNA 文库^[8],大配子体 cDNA 文库^[9], *E. tenella* 子孢子基因组文库^[10]等。我们采用构建表达文库的方法,成功构建了 *E. tenella* 孢子化卵囊的 ZAP 表达性文库,为从分子水平深入研究 *E. tenella* 特异性基因提供了物质基础,目前我们正着手进一步筛选保护性抗原基因。

致 谢 本文得到了本研究所蔡幼民研究员,中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫研究员以及上海市肿瘤研究所周筱梅老师、李宏年老师的大力帮助,在此表示感谢。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bhogal B S, Miller G A, Anderson A C *et al.* Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1992, 31: 323 ~ 335
- [2] Pasternak J, Winkfein R, Fernando M A. Ribosomal and translatable messenger RNA of *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1981, 3: 133 ~ 142
- [3] Wang C C, Stotish R L. Changes of nucleic acids and proteins in the oocysts of *Eimeria tenella* during sporulation. *The Journal of Protozoology*, 1975, 22(3): 438 ~ 443
- [4] Ellis J, Thurlby T. Changes in the messenger RNA population during sporulation of *Eimeria maxima*. *Parasitology*, 1991, 102: 1 ~ 8
- [5] Herbert R G, Pasternak J J, Fernando M A. Characterization of *Eimeria tenella* unsporulated oocyst-specific cDNA clones. *The Journal of Parasitology*, 1992, 78(6): 1011 ~ 1018
- [6] Laurent F, Bourdieu C, Kaga M *et al.* Cloning and characterization of an *Eimeria acervulina* sporozoite gene homologous to aspartyl proteinase-

- es. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 62(2): 303 ~ 312
- [7] Quarzane M, Labbe M, Pery P. *Eimeria tenella*: cloning and characterization of cDNA encoding a S3a ribosomal protein. *Gene*, 1998, 225: 125 ~ 130
- [8] Binger M H, Hug D, Weber G *et al*. Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1993, 61(2): 179 ~ 187
- [9] Fried M, Mencher D, Sar-Shalom O, Wallach M. Developmental gene expression of a 230-kilodalton macrogamete-specific protein of the avian coccidial parasite, *Eimeria maxima*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1992, 51(2): 251 ~ 262
- [10] Ellis J, Bumstead J. *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitology*, 1990, 101: 1 ~ 6

Construction of cDNA Library of *Eimeria tenella* Sporulated Oocysts

HAN Hong-Yu HUANG Bing* ZHAO Qi-Ping

(Key Laboratory for Animal Parasitology of Ministry of Agriculture, Shanghai Institute of Animal Parasitology, CAAS, Shanghai 200232, China)

Abstract A lambda ZAP express cDNA library was constructed using mRNA from *Eimeria tenella* sporulated oocysts. Total RNA was isolated by the TRIzol from *Eimeria tenella* sporulated oocysts, mRNA was further purified through oligo(dT)-cellulose columns. The first-strand cDNA was synthesized by using MMLV reverse transcriptase with oligo(dT)₁₈ primers containing *Xho* I restriction site. After the second strand cDNA replacement synthesized, the uneven termini of the double-stranded cDNA were filled in with cloned Pfu DNA polymerase and *Eco*R I adapters were ligated to the blunt ends. Then the double-strand cDNA was digested with *Xho* I restriction enzyme. The fragments of 0.5 kb ~ 4 kb were collected by agarose gel fraction method. After ligation of the cDNA with the lambda ZAP Express vector, the cDNA library was packaged using Gigapack III Gold Packaging extract. According to the phage plaques bright selection, the cDNA library contained 6×10^6 clones and the titer of the amplified library was 1×10^{11} pfu/mL. By using PCR identification, the cDNA library contained approximately 96% recombinant phages.

Key words *Eimeria tenella*, sporulated oocysts, cDNA library

Received: May 14, 2001

This work was supported by Grand from the Key Technologies Research and Development Programme of the Ninth Five-Year Plan(96-005-02-01-05).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54081089; Fax: 86-21-54080044; E-mail: caassp@public.sta.net.cn

生物固氮研究新进展

生物固氮是生物科学基础研究与应用研究的重大课题,许多国家对它的研究颇为活跃。近有三方面研究取得新进展。

一、一种海洋的蓝细菌(*Cyanobacterium*)即束毛藻(*Trichodesmium*)具固氮能力。这是一属光能自养型原核生物,如同自生固氮细菌一样,只不过它在海洋行自生固氮(N_2)作用,为海洋提供一大部分氮素营养。它的固氮过程与海洋富含铁元素无关,而与海洋磷的浓度密切相关(Sanudo-Wilhelmy S A 等, 2001)。此项研究成果是美国与英国研究人员合作完成的;我国研究人员发现一种红色束毛藻(血红色,能使海水变红,是赤潮藻之一)也具固氮作用,它们的活动给海洋经济不会带来正面效益。

二、共生固氮根瘤菌的多功能。法国一家研究所研究人员发现两种固氮根瘤菌:一是与南非豆科植物共生的根瘤菌;二是与法属圭亚那豆科植物共生的根瘤菌。这两类豆科均属热带植物,它们的共生根瘤菌与目前所有根瘤菌及其共生体在结构方面有所不同;在功能方面,除行共生固氮之外,还对某些污染物有很强的降解力。这两种根瘤菌分别命名为伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.),系 β -亚组成员,和蛋白质菌(*Proteobacterium*),系 α -亚组成员。它们与豆科植物建立共生固氮体系的意义在于构成一个天然的“活体除污库”,使受污染的土壤重新恢复活力(2001)。至于这两种专性共生固氮根瘤菌是否有严格的寄主专一性,需要做进一步实验研究以证实。

三、白蚁肠道内有固氮(N_2)微生物存在。可以说,这是一种“联合共生固氮形式”在动物界出现,在植物界较为常见。研究者在白蚁肠道内找到螺旋菌,为其宿主提供氮素营养,表明这种细菌具有固氮能力。此螺旋菌在水生栖息地较为常见,在白蚁肠道内也是如此。也就是说,不论是自生或是共生条件下,菌体内均含有固氮酶,且受其基因控制,是否通过基因工程技术切割固氮酶基因?从根本上改造固氮螺旋菌,使其失去固氮能力,进而使白蚁失去氮素营养(2001),以达到减轻白蚁对木材的破坏力,此其一;其次,白蚁的联合共生固氮的建立有可能为更高级的动物建立自主固氮的新模式,以达到自主制造所需要的蛋白质,有希望,但需要做更深入的探究。

总之,生物固氮扩大新的领域,有利亦有弊,控制其向有利方面发展也是值得注意的动向。

(柯 为)