

DOI:10.13350/j.cjpb.220610

• 论著 •

柔嫩艾美尔球虫 14-3-3 基因的原核表达与鉴定*

程淑琴, 宫鹏涛, 张楠, 李建华, 王晓岑, 李新, 张西臣**

(吉林大学动物医学学院人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林长春 130062)

【摘要】 目的 对柔嫩艾美尔球虫(*E. tenella*)14-3-3 基因进行克隆表达,对其表达产物进行鉴定及反应原性分析,旨在探索其作为鸡球虫基因工程疫苗候选抗原的可行性。方法 以柔嫩艾美尔球虫 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增 14-3-3 基因,连接至 pET-32a(+)载体,构建重组质粒 pET-32a(+)-14-3-3,转化感受态细胞 BL21(DE3)后经 IPTG 诱导表达,利用 His 标签镍离子蛋白纯化柱对表达产物进行纯化,采用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定重组蛋白的表达及反应原性。结果 经双酶切和测序鉴定,重组质粒 pET-32a(+)-14-3-3 构建正确。SDS-PAGE 检测重组蛋白 14-3-3 在原核表达系统中主要以可溶性形式表达,融合蛋白的分子质量约为 50ku,表达的重组蛋白 14-3-3 能被相应抗体识别。结论 成功构建重组质粒 pET-32a(+)-14-3-3,表达的重组蛋白 14-3-3 具有反应原性,为该蛋白的生物学功能研究奠定了基础。

【关键词】 柔嫩艾美尔球虫;14-3-3;原核表达;蛋白纯化

【中图分类号】 R378.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0671-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jun. ;17(6):671-674, 681.]

Prokaryotic expression and identification of 14-3-3 gene of *Eimeria tenella*

CHENG Shu-qin, GONG Peng-tao, ZHANG Nan, LI Jian-hua, WANG Xiao-cen, LI Xin, ZHANG Xi-chen (Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

【Abstract】 **Objective** This experiment explored the of the 14-3-3 gene of *Eimeria tenella* as a candidate antigen for a ally against chicken *coccidia* through the process of cloning and expressing the 14-3-3 gene, identifying the expression produce and analyzing the reactogenicity. **Methods** The recombinant plasmid pET-32a(+)-14-3-3 was constructed through amplifying the 14-3-3 gene by RT-PCR using *Eimeria tenella* RNA as template and ligating it into the pET-32a(+) vector. Recombinant plasmid was transformed into competent cells BL21(DE3), and its expression product was induced with 1mol/L IPTG. The 14-3-3 fusion protein was expressed and purified SDS-PAGE and Western-blot were used to identify the protein and analyze its reactogenicity. **Results** 1% agarose gel electrophoresis and sequencing results indicated that the 14-3-3 gene was successfully amplified. Double restriction enzymes identification and sequencing verified that the recombinant plasmid pET-32a(+)-14-3-3 was successfully constructed. 12% SDS-PAGE indicated that the 14-3-3 recombinant protein was mainly expressed in supernatant and the molecular weight was about 50ku. Western-blot indicated that the 14-3-3 recombinant protein was ed by the corresponding antibody. **Conclusion** All the results showed that the recombinant plasmid pET-32a(+)-14-3-3 was constructed and the 14-3-3 fusion protein was expressed and purified, its reactogenicity was certified by Western-blot assay, which laid the foundation for the biological function study of 14-3-3 protein.

【Key words】 *Eimeria tenella*; 14-3-3; prokaryotic expression; protein purification

***鸡球虫病(Coccidiosis)是一种或多种球虫混合感染而引起以肠道病变为主要特征的细胞内寄生原虫病,呈世界性分布。在世界公认的 7 种鸡球虫病原中,柔嫩艾美尔球虫(*E. tenella*)主要寄生于盲肠,危害尤为严重,造成的经济损失更大。研究表明,柔嫩艾美尔球虫保护性抗原主要有 SO7、Rhomboid、TA4 等,而鲜有关于针对端粒酶互作蛋白 14-3-3 抗原的研究报道。赵娜等^[1]以 *E. tenella* 端粒酶逆转录酶(TERT)为诱饵蛋白,从酵母双杂交 cDNA 文库中筛选出互作蛋白 14-3-3。该蛋白是一类在真核细胞中高度保守并广泛

表达的酸性蛋白家族,其与真核生物的蛋白磷酸化和细胞周期密切相关,在细胞增殖、分化、衰老和凋亡过程中扮演着重要角色^[2]。该蛋白能够自由地往返穿梭

* **【基金项目】** 吉林省科技发展计划项目(No. 20190301089NY)。

** **【通讯作者】** 张西臣, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

【作者简介】 程淑琴(1978-),女,河北保定人,博士研究生,副教授。主要研究方向:兽医寄生虫病学。
E-mail: 752635997@qq.com

于细胞质和细胞核之间,且丰富的蛋白互作位点使其具有更大的蛋白相互作用潜力,从而发挥生物学功能^[3]。但是柔嫩艾美尔球虫 14-3-3 蛋白是否能作为一种潜在抗原用于开发鸡球虫病基因工程疫苗尚不清楚。

本研究通过 PCR 扩增该基因,同时进行原核表达与鉴定,并对目的蛋白的免疫反应性进行分析,为 14-3-3 蛋白生物学功能的研究和基因工程疫苗的研发奠定基础。

材料与方 法

1 材 料

1.1 载体、菌株与虫株 *E. tenella* 孢子化卵囊和原核表达载体 pET32a(+)均由吉林大学寄生虫实验室保存;pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司;大肠埃希菌 DH5 α 、BL21 (DE3)购自长春宝泰克生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 DNA Marker,限制性内切酶 BamH I、XhoI,rTaq 酶及 T4 连接酶均购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;DNA 回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;His 标签蛋白纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;HRP 标记 6 \times His 标签抗体购自美国 Proteintech 公司;氨苄青霉素和 IPTG 购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方 法

2.1 目的基因的克隆

2.1.1 引物设计与合成 根据 GenBank 中公布的 14-3-3 基因序列(GenBank 登录号:AF055715.1),利用软件 Oligo7.0 设计引物。引物 14-3-3-F:5'-GGATCCATGATTGAGGACATCAAGACTC-3'(下划线处为 BamH I 酶切位点);14-3-3-R:5'-CTC-GAGCTGTTGCTCAGTAGCCTCCACC-3'(下划线处为 Xho I 酶切位点)。引物由吉林省库美生物科技有限公司合成。

2.1.2 目的基因 PCR 扩增与连接 用 Trizol 法提取柔嫩艾美尔球虫总 RNA,以此为模板合成 cDNA。以反转录合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。反应体系(50 μ l):灭菌水 37.5 μ l,10 \times Buffer 5 μ l,dNTP 4 μ l,上、下游引物(10 μ mol/L)和模板各 1 μ l,rTaq 酶 0.5 μ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,通过 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。用 DNA 胶回收试剂盒将目的片段回收后与克隆载体 pMD18-T 4 $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物 pMD18-T-14-3-3 转化至 DH5 α 大肠埃希菌感受态。挑取阳性单克隆菌落于液体 LB

培养基中培养,提取质粒进行酶切鉴定并委托库美生物公司测序。

2.2 生物信息学分析 利用在线网站 ExPasy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 14-3-3 蛋白理化性质;利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 进行跨膜区预测;登陆 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 分析蛋白质的信号肽;利用 DNASTar 8.0 分析蛋白质的二级结构;利用 Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/Interactive>)分析 14-3-3 蛋白的三维同源模型。

2.3 重组质粒 pET32a(+)-14-3-3 的构建 用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 对 pET32a(+)和鉴定正确的重组质粒 pMD18-T-14-3-3 进行双酶切,并回收产物,使用 T4 DNA 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化感受态 BL21(DE3)于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h,挑取单克隆菌落进行培养,提取质粒进行酶切鉴定,鉴定阳性的重组质粒送库美生物公司测序。

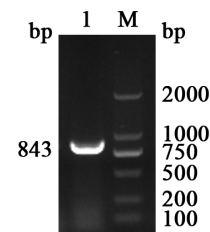
2.4 重组蛋白的诱导表达与鉴定 接种 6 μ l 重组表达菌于含氨苄青霉素的 6 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 1~2 h 至 A₆₀₀ 值约为 0.6 时加入终浓度为 1 mol/L 的 IPTG,16 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h,收集菌体,超声破碎后分别取菌体和上清制样进行 12% SDS-PAGE 分析。蛋白成功表达后进行大量扩增,裂解菌体,用 Ni²⁺ 亲和柱对目的蛋白进行纯化。

2.5 14-3-3 蛋白反应原性检测 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,5% BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后以一抗为鼠抗 His 标签单抗为一抗,以 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot,检测 14-3-3 蛋白的反应原性。

结 果

1 14-3-3 基因的 PCR 扩增

以柔嫩艾美尔球虫 cDNA 为模板 PCR 扩增得到 834 bp 的目的基因片段,与预期大小一致(图 1),且测序结果正确。



M DNA 标志物(DL2000) 1 14-3-3 基因 PCR 产物

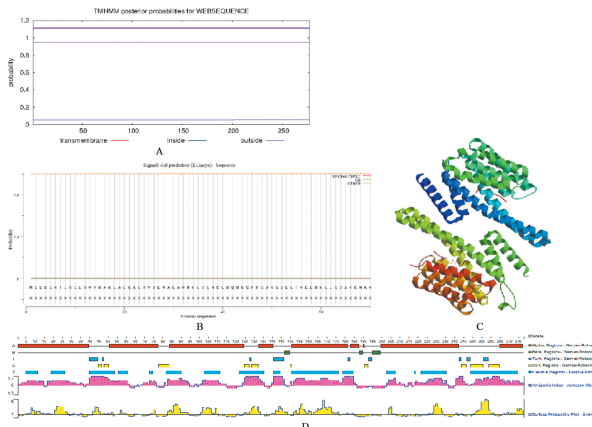
图 1 14-3-3 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DL2000 Marker 1 14-3-3 gene

Fig. 1 Identification of the 14-3-3 gene by PCR

2 14-3-3 蛋白的生物信息学分析

利用在线网站分析 14-3-3 蛋白含有 277 个氨基酸,相对分子质量为 31.66 ku,理论等电点为 4.83。亲水性总平均值为-0.746(>0 表示疏水性,<0 表示亲水性),表明该蛋白为亲水性蛋白。14-3-3 蛋白无信号肽(图 2A),无跨膜区域(图 2B)。14-3-3 蛋白与 PDB 数据库中的 2npn.1.A 序列相似性为 64.58% (图 2C)。DNASTar8.0 预测 14-3-3 蛋白的二级结构主要以 α -螺旋为主(75.10%),分别位于 1-39、51-77、84-124、151-181、200-242、265-277 氨基酸区域; β 折叠区较少; β -转角主要分布于 40-44、141-146、256-258 位氨基酸区域;较长的无规则卷曲集中于 78-83、129-132、249-255、259-264。该蛋白具有多个 B 细胞抗原表位,其中 5 个优势抗原表位分别位于氨基酸序列第 40-57、83-97、155-164、223-233、249-273 位(图 2D)。



A TMHMM 分析图 B SignalP-5.0 分析图 C 14-3-3 三维结构同源模型 D 二级结构与 B 细胞抗原表位分析

图 2 14-3-3 基因生物信息学分析

A TMHMM analysis graphics B SignalP-5.0 analysis graphics C Three-dimensional model of 14-3-3 D Analysis of the secondary structure and B cell epitopes

Fig. 2 Bioinformatics analysis of 14-3-3 gene

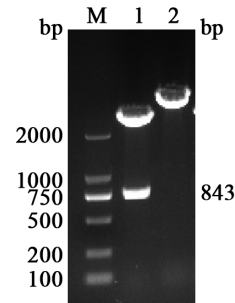
3 pET-32a(+)-14-3-3 重组载体的构建及鉴定

将胶回收的目的基因片段与 pMD-18T 载体连接后转化 DH5 α 。提取质粒,用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 进行双酶切,得到约 2 500 bp 的载体片段和 834 bp 目的片段(图 3)。分别酶切 pET-32a(+)-空载体质粒和重组质粒 pMD-18T-14-3-3,回收后用 T4 连接酶进行连接,然后转化 DH5 α 进行培养。提取质粒,双酶切鉴定正确后转化 BL21 (DE3)感受态细胞进行培养。提取重组质粒,酶切获得 5 900 bp 的载体片段和 834 bp 的目的基因片段(图 4),与预期相符。

4 重组蛋白的诱导表达与鉴定

将 pET-32a(+)-14-3-3 菌液于 16 $^{\circ}$ C 培养至 A₆₀₀ 值为 0.6 左右时加入 1 mol/L IPTG 诱导表达 10 h,收集菌体进行超声破碎,分别取上清和沉淀用 12% SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况,结果见图 5。

重组蛋白 14-3-3 蛋白分子质量约 50 ku,且在上清和沉淀中均有表达。重组蛋白经 His 标签镍离子亲和层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 6A,为单一 50 ku 蛋白条带。

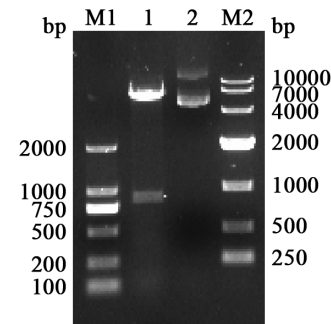


M DNA 标志物(DL2000) 1 pMD-18T-14-3-3 双酶切产物 2 pMD-18T-14-3-3 未酶切产物

图 3 pMD-18T-14-3-3 酶切鉴定

M DL2000 marker 1 Double digestion of pMD-18T-14-3-3 2 Undigestion of pMD-18T-14-3-3

Fig. 3 Digestion identification of pMD-18T-14-3-3

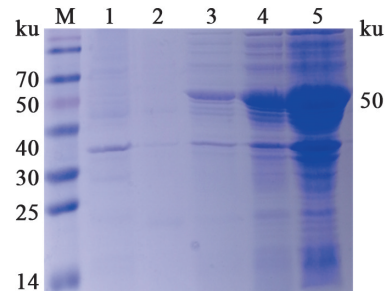


M1 DNA 标志物(DL2000) M2 DNA 标志物(DL10000) 1 pET-32a(+)-14-3-3 双酶切产物 2 pET-32a(+)-14-3-3 未酶切产物

图 4 pET-32a(+)-14-3-3 双酶切鉴定

M1 DL2000 Marker M2 DL10000 Marker 1 Double digestion of pET-32a(+)-14-3-3 2 Undigestion of pET-32a(+)-14-3-3

Fig. 4 Double digestion identification of pET-32a(+)-14-3-3

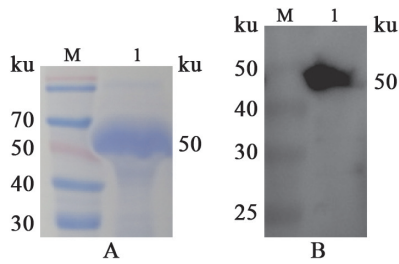


M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导空载体 pET-32a(+)-空载体 pET-32a(+)-未诱导 3 IPTG 诱导 pET-32a(+)-14-3-3 全菌蛋白 4 IPTG 诱导 pET-32a(+)-14-3-3 全菌超声破碎上清 5 IPTG 诱导 pET-32a(+)-14-3-3 全菌超声破碎沉淀

图 5 14-3-3 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

M Protein Marker 1 pET-32a(+)-induced with IPTG 2 pET-32a(+)-uninduced with IPTG 3 pET-32a(+)-14-3-3 induced with IPTG 4 The supernatant protein of pET-32a(+)-14-3-3 induced with IPTG 5 The bacterial protein pET-32a(+)-14-3-3 induced with IPTG

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant protein 14-3-3



M 蛋白分子质量标准 1 纯化的重组蛋白 14-3-3
图 6 纯化重组 14-3-3 蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析
M Protein Marker 1 Purified recombinant protein 14-3-3
Fig. 6 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of purified recombinant protein 14-3-3

5 纯化重组蛋白的 Western blot 分析

纯化的重组 14-3-3 蛋白经 SDS-PAGE 后转膜,以鼠抗 His 标签单抗为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blot,结果见图 6B。重组 14-3-3 蛋白能被鼠抗 His 标签单抗识别,即具有反应原性。

讨论

14-3-3 蛋白广泛存在于多个物种,可在所有真核细胞中表达,以自发形成的磷酸丝氨酸-色氨酸结合二聚体形式存在,主要分布于神经组织内,也有少数存在于细胞膜、细胞核,以及高尔基体、叶绿体、线粒体等细胞器中,但含量不高。该蛋白能够结合大量多功能的细胞信号转导蛋白,所以 14-3-3 蛋白家族能够在神经发育、细胞生长、细胞信号转导和凋亡等过程中发挥调节作用^[4]。原虫类寄生虫为单细胞寄生虫,结构较简单,且许多为细胞内寄生,被鉴定的 14-3-3 基因和蛋白的数目也较多细胞类寄生虫少。在顶复门寄生虫中,14-3-3 蛋白早已在几种疟原虫(*Plasmodium*)、弓形虫(*Toxoplasma*)、艾美球虫(*Eimeria*)和新孢子虫(*Neospora*)中被分离和测序。14-3-3 蛋白是存在于真核生物中的一个高度保守蛋白,因此该蛋白能否成为基因工程疫苗的潜在抗原已引起高度重视。目前寄生虫 14-3-3 基因工程苗主要有亚单位疫苗、DNA 疫苗和活载体疫苗,且已有在弓形虫、细粒棘球绦虫、日本血吸虫、旋毛虫及肝片吸虫等的研究和应用报道。王帅^[5]用人工感染的抗弓形虫的鸡血清作为抗体,通过 Western blot 检测弓形虫重组蛋白 *rTg* 14-3-3,能够产生特异性反应条带,证明 14-3-3 蛋白具有免疫原性。Zong 等^[6]用大肠埃希菌 BL21 表达 Eg14-3-3 蛋白,分离纯化后按重组蛋白:弗氏完全佐剂为 1:1 的比例用 50 μg 蛋白免疫小鼠,于第 2、4 周用 50 μg 蛋白加等体积弗氏不完全佐剂作加强免疫,末次免疫 6 周后用 2 000 个 Eg 原头蚴攻击,攻击后 6 个月免疫组小鼠血清 IgG1、IgG2a 水平显著高于对照组,且获得 84.47% 的保护率。钱春艳等^[7]报道抗日本血吸虫 14-3-3

单克隆抗体可与体外表达的日本血吸虫 14-3-3 蛋白特异性结合,同时也能与日本血吸虫虫卵和成虫中天然 14-3-3 蛋白特异性反应。以上研究表明不同物种的 14-3-3 蛋白均可作为一种比较保守的抗原刺激动物机体产生特异性抗体,由此推测柔嫩艾美耳球虫 14-3-3 基因经诱导表达的蛋白也可刺激机体产生体液免疫。

目前针对艾美耳球虫其他虫种 14-3-3 蛋白的报道较少,Liberator 等^[8]的研究发现柔嫩艾美耳球虫 14-3-3 蛋白参与甘露醇循环代谢途径的调控,此途径被认为是柔嫩艾美耳球虫孢子形成时必不可少的能量来源,故 14-3-3 蛋白是一个能够阻断其生活史的潜在分子,推测如果将其作为抗原免疫雏鸡,可刺激机体产生抗体继而影响柔嫩艾美耳球虫生活史以控制鸡球虫病的爆发。刘亭岐^[9]报道巨型艾美耳球虫 14-3-3 蛋白对于巨型艾美耳球虫感染具有一定的免疫保护作用。通过对免疫鸡血清中抗体、细胞因子水平,以及脾脏中 CD4⁺CD8⁺ T 细胞百分含量等指标的检测,证明 Em14-3-3 蛋白免疫可诱导雏鸡产生细胞免疫和体液免疫应答。本研究成功克隆了柔嫩艾美耳球虫 14-3-3 基因,序列比对显示其核苷酸序列与毒害艾美耳球虫、和缓艾美耳球虫、堆型艾美耳球虫和巨型艾美耳球虫 14-3-3 基因同源性分别为 97%、86%、85% 和 84%。通过生物学信息软件和在线网站对柔嫩艾美耳球虫 14-3-3 基因编码蛋白的理化性质、二级结构、跨膜区、信号肽及可能存在的 B 细胞抗原表位进行了预测和分析。结果显示,该蛋白的二级结构以 α-螺旋为主,存在于蛋白质内部且不易变形,有利于维持蛋白的稳定性^[10]。β-转角和无规则卷曲常盘旋、扭曲并在蛋白表面展示,易与抗体嵌合并参与 B 细胞抗原表位的形成^[11]。14-3-3 蛋白为亲水性蛋白,有利于对其进行重组表达进而获得活性重组蛋白。重组菌经 IPTG 诱导表达的蛋白以可溶性形式为主,经 Western blot 鉴定其具有反应原性,该蛋白能否作为鸡球虫病基因工程疫苗的候选抗原还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Zhao N, Gong P, Cheng B, et al. *Eimeria tenella*: 14-3-3 protein interacts with telomerase[J]. Parasitol Res, 2014(113): 3885-3889.
[2] 罗波,李想,周必英. 寄生虫 14-3-3 蛋白的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(2): 178-183.
[3] Mhawech P. 14-3-3 proteins-lan update [J]. Cell Res, 2005, 15(4): 228-236.
[4] Siles-Lucas Mdel M, Gotstein B. The 14-3-3 protein: a key molecule in parasites as in other organisms[J]. Trends Parasitol, 2003, 19(12): 575-581.

(下转 681 页)

