

牛源犬新孢子虫 *IMP1* 基因的克隆与序列分析

张蕾, 贾立军, 鲁承* (延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133002)

摘要 [目的] 为了解牛源犬新孢子虫 *IMP1* 基因生物学特性, 分析牛源犬新孢子虫 *IMP1* 基因的克隆与序列。[方法] 应用 PCR 技术扩增 *IMP1* 基因, 将纯化的 PCR 产物和 pMD18-T Simple Vector 连接, 构建 pMD18-*IMP1* 重组克隆质粒, 进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 将鉴定为阳性的质粒进行测序分析。[结果] PCR 扩增犬新孢子虫 *IMP1* 基因大小为 762 bp, 克隆质粒经测序分析与 GenBank (XM_003879531.1) 中 *IMP1* 基因的同源性为 99.9%。[结论] 该试验为犬新孢子虫 *IMP1* 基因的表达及后续研究奠定了基础。

关键词 犬新孢子虫; *IMP1* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)15-04566-03

Cloning and Sequence Analysis of Bovine *Neospora caninum* *IMP1* Gene

ZHANG Lei, LU Cheng et al (Agricultural School of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract [Objective] In order to understand *IMP1* genitival biological characteristics, analyze cloning and sequence of bovine *Neospora caninum* *IMP1* gene. [Method] PCR technology was applied for amplification of *IMP1* genes. The products of purified PCR were connected with pMD18-T Simple Vector to construct the pMD18-*IMP1* cloned plasmid, then PCR identification and enzyme digestion identification of recombinant plasmid were conducted. The positive plasmid was identified by sequencing analysis. [Result] *Neospora caninum* *IMP1* amplified by PCR is 762 bp, the analysis of sequencing results shows that the GenBank (XM_003879531.1) *IMP1* is 99% in gene homology. [Conclusion] The method laid a foundation for expression and subsequent research of *Neospora caninum* *IMP1* gene.

Key words *Neospora caninum*; *IMP1* gene; Clone; Sequential analysis

新孢子虫病 (Neosporiasis) 是由犬新孢子虫引起的多种家畜的一种原虫病, 该病可引起孕畜的流产、死胎, 以及新生胎儿的运动障碍和神经系统疾病^[1]。1988 年 Dubey 等从瘫痪后肢的犬体分离了虫体, 将其命名为犬新孢子虫^[2]。犬新孢子虫为专性细胞内寄生原虫, 隶属于复顶亚门原生动物门新孢子虫亚纲孢子虫纲新孢子虫属。新孢子虫病分布于世界各地, 瑞士、挪威、芬兰、哥斯达黎加、爱尔兰、菲律宾、越南、泰国、以色列、俄罗斯、古巴等国都有因为新孢子虫病引发母牛流产的事件^[3]。该病给畜牧业造成了巨大的经济损失, 严重危害了养殖业的健康发展^[4-5]。*IMP1* 是 2011 年在巨型艾美耳球虫内发现的一类具有免疫保护性的蛋白, 但该蛋白的来源和功能尚不明确。Cui 等对犬新孢子虫 *IMP1* 基因蛋白进行了鉴定和定位的初步研究^[6]。为了解牛源犬新孢子虫 *IMP1* 基因的生物学特性, 笔者对 *IMP1* 基因进行克隆与序列分析, 旨在为 *IMP1* 基因的表达及后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与虫株。*E. coli*. DH5 α 菌株、犬新孢子虫吉林株和感受态, 均来自延边大学预防兽医学实验室。

1.1.2 主要试剂。DNA Marker2000、pMD18-T Simple Vector、*Xho*I、*Eco*RI 和 *ExTaq* DNA 聚合酶, 购自宝生物工程公司 (大连); 质粒提取试剂盒、蛋白酶 K、溶菌酶和 DNA 凝胶回收试剂盒, 购自 OMEGA 公司; 其他试剂均为国产分析纯级,

市售。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成。应用 Primer Premier5.0 及 Oligo6.0 软件设计了一对引物 P1、P2, 引物由上海英骏生物技术公司合成。(P1) 上游: 5'CGGGATCCATCGGGAGCGCTT-GCTCTAA 3'; (P2) 下游: 5'CGGAATTCITCAATGCCGGT-CAGAAGC 3'。

1.2.2 *IMP1* 基因的 PCR 扩增与鉴定。以犬新孢子虫吉林株基因组 DNA 为模板, PCR 反应总体积为 25 μ l: 2 μ l dNTP, 模板 DNA 5 μ l, 上下游引物各 1 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, 2.5 μ l 10 \times PCR Buffer, ddH₂O 13.25 μ l。优化 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 条件下延伸 10 min。PCR 反应结束后, 将其产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 *IMP1* 基因的克隆。用 pMD18-T Simple Vector 与纯化回收的 *IMP1* 片段进行连接, 转入 *E. coli*. DH5 α 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基上 (含有 Amp 抗性) 筛选阳性菌落。

1.2.4 重组质粒的 PCR 鉴定与酶切鉴定。提取重组质粒 DNA, 应用 P1、P2 进行 PCR 鉴定; 应用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 进行双酶切鉴定。

1.2.5 *IMP1* 基因片段的序列测定与分析。将鉴定正确的阳性克隆质粒送往上海英俊生物技术公司进行测序, 并使用分子生物学软件 DNASTAR 系统对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因的扩增 以提取的犬新孢子虫吉林株基因组 DNA 为模板, P1、P2 为引物, 扩增出片段长度为 762 bp 的 *IMP1* 基因片段 (图 1)。

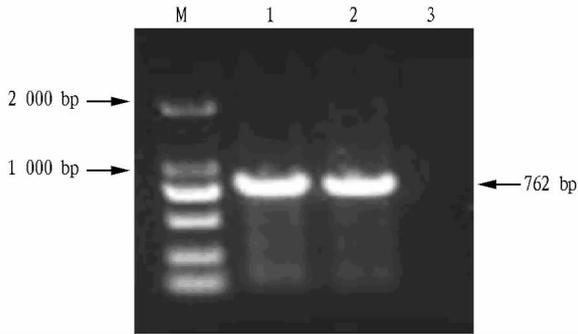
2.2 重组质粒 pMD18-*IMP1* 的鉴定 将 *IMP1* 基因与 pMD18-T Simple Vector 质粒连接, 从而获得重组克隆质粒

基金项目 国家自然科学基金 (31160501; 31360605); 吉林省重点科技攻关项目 (20140204078NY); 吉林省青年科研基金 (2012010176)。

作者简介 张蕾 (1991 -), 女, 吉林镇赉人, 硕士研究生, 研究方向: 分子免疫学。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事分子生物学研究。

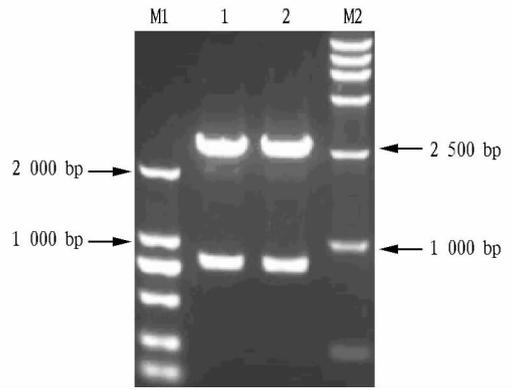
收稿日期 2014-04-29

pMD18-IMP1, 进行 PCR 扩增, 得到与目的基因片段大小一致条带, 说明重组质粒中含有 *IMP1* 基因。经 *EcoRI* 和 *BamHI* 双酶切鉴定, 得到 762 bp 的目的片段和 2 692 bp 的载体片段(图 2), 说明 *IMP1* 基因成功克隆到 pMD18-T Simple Vector 上。



注: M: DNA Marker DL2000; 1 ~ 2: *IMP1* 基因 PCR 扩增产物; 3: 水对照。

图 1 目的基因 PCR 扩增结果



注: M1、M2: DNA Marker DL2000、DL15000; 1 ~ 2: pMD18-IMP1 重组质粒的酶切产物。

图 2 重组质粒 pMD18-IMP1 的酶切鉴定结果

2.3 重组质粒 pMD18-IMP1 的序列测定 测序结果表明, 克隆得到的 *IMP1* 基因核苷酸长度为 762 bp, 编码 243 个氨基酸。核苷酸序列 197 位上测序为 A, 而 NCBI 中为 T, 与 Gen

Query	1	ATGGGAGGCGTTTGCTCTAAAAGCACAGCGGATTCATCCAAGGGTCGTAACAGTGAGTCCG	60
Sbjct	337105	ATGGGAGGCGTTTGCTCTAAAAGCACAGCGGATTCATCCAAGGGTCGTAACAGTGAGTCCG	337046
Query	61	AAAGCAACCGAGGCTGAGCGGGCGGTTGCAGTGGCGGAGGGTCTTCAAACCGCGCAGAAA	120
Sbjct	337045	AAAGCAACCGAGGCTGAGCGGGCGGTTGCAGTGGCGGAGGGTCTTCAAACCGCGCAGAAA	336986
Query	121	ATTGAGGCTGTGACAGGCGCTCCCGCCGCTGTTACCGAGGACGGAGACGTTATCGTGGCC	180
Sbjct	336985	ATTGAGGCTGTGACAGGCGCTCCCGCCGCTGTTACCGAGGACGGAGACGTTATCGTGGCC	336926
Query	181	GTAGACGAAGAAGATATGAAATCGATAAAGGGCGAAAAACGAACATTGTTGACGAAGCA	240
Sbjct	336925	GTAGACGAAGAAGATAAAGAAATCGATAAAGGGCGAAAAACGAACATTGTTGACGAAGCA	336866
Query	241	GCAGCTGCTGTGGTCTCACGTTCTCCCGAACCGGCTGCGGTGATTTCGCAAAGAAGAGGTC	300
Sbjct	336865	GCAGCTGCTGTGGTCTCACGTTCTCCCGAACCGGCTGCGGTGATTTCGCAAAGAAGAGGTC	336806
Query	301	GTCACAGAAGAAGGCAAAAATGGAGACACCCGAGTCCACGTATCTGTTGTGGAAGCAGTG	360
Sbjct	336805	GTCACAGAAGAAGGCAAAAATGGAGACACCCGAGTCCACGTATCTGTTGTGGAAGCAGTG	336746
Query	361	ATCAGTAGCGATCTGGCTGATCTTCCTGAACAAGTCGAGCATGTTTCGCCACGGGATTTG	420
Sbjct	336745	ATCAGTAGCGATCTGGCTGATCTTCCTGAACAAGTCGAGCATGTTTCGCCACGGGATTTG	336686
Query	421	GAAGTCTTCGGCAGGCTCGCGAGCAGGTGAAGGCGACTGGGGGACCCGTTATTACGGAT	480
Sbjct	336685	GAAGTCTTCGGCAGGCTCGCGAGCAGGTGAAGGCGACTGGGGGACCCGTTATTACGGAT	336626
Query	481	GTCACAAACTCAGATGGGCAAAACCGCCGAGAGTACAAACCGAGGGCTTCGGCTTACGGG	540
Sbjct	336625	GTCACAAACTCAGATGGGCAAAACCGCCGAGAGTACAAACCGAGGGCTTCGGCTTACGGG	336566
Query	541	TACCTTCTGTACGTGCCTGACAAGGGCGGAAGCCTGATCCTCCTTTGGTTGAAGCAAGAG	600
Sbjct	336565	TACCTTCTGTACGTGCCTGACAAGGGCGGAAGCCTGATCCTCCTTTGGTTGAAGCAAGAG	336506
Query	601	CCTTCTCCTGAGGAGGAGGAGAAAGCTGGCAAAATCCTTGTGTCTTTTCGTCCTGCTCTC	660
Sbjct	336505	CCTTCTCCTGAGGAGGAGGAGAAAGCTGGCAAAATCCTTGTGTCTTTTCGTCCTGCTCTC	336446
Query	661	CATAAAAGCGTCCCCGGATGAAGTACGAACAGAAGGGTGGGAAGACGGAGCTTCTGACC	720
Sbjct	336445	CATAAAAGCGTCCCCGGATGAAGTACGAACAGAAGGGTGGGAAGACGGAGCTTCTGACC	336386
Query	721	GGCATTGAAGTAAGCCCGCTCACACATATCTTCCAGAAGTTT 762	
Sbjct	336385	GGCATTGAAGTAAGCCCGCTCACACATATCTTCCAGAAGTTT 336344	

图 3 *IMP1* 基因序列与 GenBank 上(XM_003879531.1)序列同源性比较

Query	1	MGGVCSKSTADSSKGRNSES KATEAERAVAVA EAGLQTAQKIEAVTGAPAAVTE DGDVIVA	60
Sbjct	1	MGGVCSKSTADSSKGRNSES KATEAERAVAVA EAGLQTAQKIEAVTGAPAAVTE DGDVIVA	60
Query	61	VDEEDMKS IKGEKTNIVDEAAA AVVSRSP EAAVIRKEEVVTEEGKNGDTRVHVSVVEAV	120
Sbjct	61	VDEEDMKS IKGEKTNIVDEAAA AVVSRSP EAAVIRKEEVVTEEGKNGDTRVHVSVVEAV	120
Query	121	ISSDLADLPEQVEHVSPRDLELLRQAREQVKATGGPVITDVTNSD GQNRREYKPRASAYG	180
Sbjct	121	ISSDLADLPEQVEHVSPRDLELLRQAREQVKATGGPVITDVTNSD GQNRREYKPRASAYG	180
Query	181	YLLYVPDKGSSLILLWLKQELSPEEEEEKAGKILVSFVPALHKSVP RMYEQKGGKTELLT	240
Sbjct	181	YLLYVPDKGSSLILLWLKQELSPEEEEEKAGKILVSFVPALHKSVP RMYEQKGGKTELLT	240
Query	241	GIE 243	
		GIE	
Sbjct	241	GIE 243	

图4 IMP1 基因编码氨基酸序列的同源性比较

Bank (XM_003879531.1) 中 *IMP1* 基因核苷酸的同源性为 99.9% (图 3)。而氨基酸 66 位编码的赖氨酸, 突变之后编码甲硫氨酸, 氨基酸同源性为 99.6% (图 4)。

3 讨论

禹海杰通过间接免疫荧光技术对弓形虫速殖子不同时期 *IMP1* 蛋白的表达特性研究发现, 在游离、吸附于细胞表面、入侵中、入侵后及纳虫空泡中的速殖子 *IMP1* 均有表达, 均被定位于虫体表面, 且在有些虫体的顶端表达更为强烈^[7]。Cui 等对犬新孢子虫 *IMP1* 基因蛋白研究表明, *IMP1* 基因蛋白编码 1 182 bp 的开放阅读框, 编码 393 个氨基酸, 编码的蛋白约 42.9 kDa, 该氨基酸序列没有信号肽和跨膜区, 但有 9 个酰基化位点和 14 个磷酸化位点。试验选择 *IMP1* 开放阅读框内基因片段进行扩增与克隆, 目的是为 *IMP1* 基因的表达和生物学特性的研究奠定基础。

试验对构建的 *IMP1* 基因重组质粒进行测序, 得到的 *IMP1* 基因核苷酸长度为 762 bp, 编码 243 个氨基酸。核苷酸序列 197 位上测序为 A, 而 NCBI 中为 T, 与 GenBank (XM_003879531.1) 中 *IMP1* 基因核苷酸的同源性为 99.9%; 氨基

酸 66 位编码的赖氨酸突变为甲硫氨酸, 氨基酸同源性为 99.6%, 该突变是否对蛋白的表达及其他特性造成影响还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] BJERKAS I, MOHN S F, PRESTHUS J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs [J]. Zeitschr Parasitenkunde, 1984, 70(2): 271-274.
- [2] DUBEY J P, CARPENTER J L, SPEER C A, et al. A newly recognized fatal protozoan disease of dogs [J]. J Am Vet Med Assoc, 1988, 192(9): 1269-1285.
- [3] OOI H K, H UANG C C, YANG C H, et al. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Tai-wan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle [J]. Veterinary Parasitology, 2000, 90: 47-55.
- [4] 邓冲, 张维, 刘群, 等. 乳牛流产胎儿中新孢子虫的鉴定 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(1): 16-19.
- [5] 张守发, 丁德, 鞠玉琳, 等. 胶体金免疫层析法与 ELISA 法对牛的新孢子虫血清抗体检测结果的比较 [J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(8): 54-55.
- [6] CUI X, LEI T, YANG D Y, et al. Identification and characterization of a novel *Neospora caninum* immune mapped protein 1 [J]. Parasitology, 2012, 139(8): 998-1004.
- [7] 禹海杰. 弓形虫疫苗候选抗原 *IMP1* 生物学特性及其免疫原性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.

(上接第 4565 页)

根据极差分析的结果, 在试验范围内, 对试验指标影响最大的因素是水浴温度 (C), 其次是离心时间 (D), 再其次是 $V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}$ (A), 最后是 NaCl 浓度 (B), 最佳处理组合为: $C_3D_1A_3B_3$ 和 $C_3D_1A_3B_4$ 。

根据对浓度 1% 琼脂糖凝胶电泳检测的结果打分, 结合微量紫外分光光度计对 DNA 的浓度与纯度进行检测的结果, 处理组合 10 ($C_3D_1A_3B_2$)、组合 16 ($C_3D_2A_4B_4$) 所提 DNA 量大、污染少, 其中以处理组合 10 ($C_3D_1A_3B_2$) 最佳, 这与极差分析的结果基本一致。大多数处理组合所提 DNA 溶液的 OD_{260}/OD_{280} 值大于 1.9, 表明存在 RNA 的污染。所以, 在以后的研究中可以考虑加入 RNase, 去除 RNA, 这样, 所得的 DNA 不仅量大而且所含杂质少, 有利于后续研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 7 卷) [M]. 北京:

科学出版社, 1978: 255-259.

- [2] 金振洲, 彭鉴. 云南松 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004: 6-332.
- [3] 吴丽圆. 4 种思茅松总 DNA 提取方法比较 [J]. 福建林学院学报, 2004, 24(3): 237-240.
- [4] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 467.
- [5] 何正文, 刘运生, 陈立华, 等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件 [J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [6] 周诗捷, 曹福祥. 华南五针松成熟针叶基因组 DNA 的提取方法 [J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(5): 97-100.
- [7] 闫庆祥, 黄东益, 李开棉, 等. 利用改良 CTAB 法提取木薯基因组 DNA [J]. 中国农学通报, 2010, 26(4): 30-32.
- [8] 马明, 杨克强, 郭起荣. 改良 CTAB 法提取林木树种基因组 DNA 的研究 [J]. 生物技术, 2007, 17(3): 36-38.
- [9] 黄真池, 余秋梅, 欧阳乐军, 等. 一种木本植物 RNA 和 DNA 的简捷提取方法 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(4): 773-774.
- [10] 杨传平, 王艳敏, 魏志刚. 利用正交设计优化白桦的 SSR-PCR 反应体系 [J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(6): 1-3.
- [11] 续九如, 黄智慧. 林业试验设计 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 65-79.