

简并 PCR 扩增小瓜虫抑动抗原基因的 ORF

杨金先¹, 陈强², 刘晓东¹, 林天龙¹, Theodore G. Clark³

(1. 福建省农业科学院 畜牧兽医研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农业科学院 地热研究所, 福建 福州 350003; 3. Department of Microbiology and Immunology College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York 14853, U. S. A)

摘要:抑动蛋白是小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)体表纤毛的主要构成部分,也是宿主免疫系统发挥抗虫免疫时的主要识别抗原。根据已经报道的3种抑动蛋白N端及C端保守的多肽片断,设计了一对简并引物P6/P7,以小瓜虫分离株IchFJ9的基因组为模板,成功扩增了抑动蛋白编码区(ORF)的全长基因序列。扩增的*iagFJ9*基因全长1398 bp,编码466个氨基酸,包含18个非标准密码子TAA(Glu, Q)推导的氨基酸序列包含6个以CPXGT为起始的串联重复单位,具有抑动蛋白的特征性结构。同源比较分析显示,扩增的*iagFJ9*基因与已知的小瓜虫抑动蛋白基因*IAG52A*基因具有88%同源率。证实了*iagFJ9*是一个新发现的抑动蛋白基因,用简并PCR技术去发现小瓜虫抑动蛋白基因家族新基因是可行的。

关键词:小瓜虫;抑动蛋白;抗原;简并PCR

中图分类号:S941.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)02-0135-04

以多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)为病原的小瓜虫病是淡水鱼类最严重的疾病之一,可以感染几乎所有的鱼类并导致大量死亡。经过治疗康复鱼获得抗虫免疫,可以抵抗小瓜虫的再次感染,血清抗体能在体外凝集小瓜虫裂殖体(幼体),抑制裂殖体的游动。进而证实小瓜虫体表大量存在的抑动蛋白与凝集反应密切相关, Lin等^[1]提纯了抑动蛋白并制备了小瓜虫单克隆抗体(抑动单抗),根据单抗对虫体的抑动试验,将美国分离的小瓜虫分成5个血清型, SDS-PAGE电泳显示,不同血清型小瓜虫的抑动蛋白为1~2条、分子量在40~60 kD的多肽分子。抑动单抗腹腔注射的被动免疫保护试验^[2]和用纯化的抑动蛋白弗氏完全佐剂疫苗的免疫保护试验^[3]明确了抑动蛋白是小瓜虫的重要保护性抗原。Clark^[4]和 Lin等^[5]应用cDNA文库筛选结合cDNA末端快速扩增技术(Rapid Amplification cDNA Ends, RACE)从G1、G5两株小瓜虫(分别属A、D血清型)克隆了3个不同抑动蛋白的对应基因全序列(*IAG48*、*IAG52A*、*IAG52B*分别对应 GenBank AF140273、AF324424、AF405431),并对其结构和功能进行了详细的分析讨论。

但传统的基因克隆方法耗时费力,简并PCR基于氨基酸序列保守区域设计简并引物,使得扩增同一基因家族的其他成员的过程简便而高效。本实验根据以上3个抑动蛋白氨基酸序列的N端与C端存在高度的保守序列,合成一对简并引物^[6-7],用于扩增国内小瓜虫分离株的抑动抗原的全长读码框架(ORF)。为从分子水平研究小瓜虫的保护性抗原提供了一个简易可行的新方法。

1 材料与方法

1.1 小瓜虫虫株的分离、培养与基因组DNA的提取

小瓜虫IchFJ9株分离自福州市连江欧洲鳗养殖场,在实验室的水族箱内通过无感染史的欧洲鳗传代保种,当鳗鱼体表出现大量“小白点”时,收集滋养体(成虫)备用。

基因组DNA的提取方法按Clark^[4]稍加修改,用作PCR反应模板。离心沉淀的小瓜虫虫体用2倍体积56℃预热的HET重悬(0.01 mol·L⁻¹ Tris-buffer, 0.5 mol·L⁻¹ EDTA, 1% SDS, pH 9.5)。加入蛋白酶K(PK)至终质量浓度200 μg·mL⁻¹,

收稿日期:2003-07-16; 修订日期:2003-11-17.

资助项目:福建省科技厅国际合作项目(2000I012).

作者简介:杨金先(1971-),男,助理研究员,从事水产养殖动物病害研究. E-mail: yjxgh@public. fz. fj. cn

通讯作者:林天龙. E-mail: lint@pub3. fz. fj. cn

56 ℃温浴3 h。补加1/2体积0.1 × SSC溶液(含0.15 mol · L⁻¹ NaCl, 1.5 mmol · L⁻¹ 乙酸钠, pH 7.0)。经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, 体积比)及氯仿:异戊醇(24:1, 体积比)抽提并用2体积无水乙醇沉淀, 70%乙醇洗涤后以500 μL含1 mmol · L⁻¹ EDTA的2 × SSC重悬DNA, 加入终质量浓度200 μg · mL⁻¹的Rnase A (Promega) 37 ℃消化1 h去除RNA。氯仿:异戊醇(24:1, 体积比)重新抽提1次并用2体积无水乙醇沉淀DNA, 经70%乙醇洗涤后100 μL TE (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 8.0)溶解DNA, 定量到50~100 μg · mL⁻¹。-20 ℃冻存备用。

1.2 试剂材料与引物

E. coli DH5α菌株由福建省卫生防疫站艾滋病重点实验室惠赠。Taq酶、dNTP、GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI公司产品), DNA凝胶回收试剂盒、氨苄青霉素(上海生工公司产品), LB培养基(Sigma公司产品)。限制性内切酶EcoRI、X-gal、IPTG、pGEM-T easy Vector试剂盒(Promega公司产品), PCR引物由上海生工公司合成。

引物P6: 5' - ATGAAA (T/A) (A/T) TA-ATATTTTA (A/G/T) TAAT (T/A) TT (G/A) AT-TATTTTC -3'

引物P7: 5' - CAA (T/G) AAATA (G/A) (A/T) AAGAAAT (A/C) AATA (A/T) TAAGG -3'

1.3 PCR扩增与产物鉴定

1.3.1 PCR扩增 PCR反应在Touchgene gradient PCR仪上进行, 反应总体积为30 μL, 混合物中含有模板10~100 ng, 10 × Buffer(含MgCl₂ 15 mmol · L⁻¹) 3 μL, dNTP 0.2 mmol · L⁻¹, 引物P6/P7各300 nmol · L⁻¹, Taq DNA聚合酶2 U。反应参数为94 ℃预变性5 min; 94 ℃变性1 min; 52 ℃引物结合1 min; 72 ℃引物延伸2 min; 反应循环30次, 72 ℃补加延伸10 min后终止反应。

1.3.2 PCR产物克隆与鉴定 PCR扩增产物1%琼脂糖凝胶电泳分析, 按DNA凝胶回收试剂盒使用说明纯化后。按pGEM-T Easy Vector试剂盒使用说明, 连接到pGEM-T Easy Vector上, 并转化大肠杆菌*E. coli* DH5α, 将大肠杆菌涂布在含IPTG、X-gal及100 μg · mL⁻¹氨苄青霉素的LB平板上, 筛选白色菌落, 提取质粒, 重组质粒命名为: pGEM-T iagFJ9。经PCR及EcoRI酶切后1% agarose凝胶电泳分析表明扩增条带合乎预期大小, 由上海生工

公司对重组质粒中的目的基因片段测序。

1.4 扩增产物的序列分析及推导的氨基酸序列比较

用计算机软件DNASIS(V7.00)及CLUSTAL W (1.82) Multiple Sequence Alignments将iagFJ9基因与已知的小瓜虫抑动抗原基因IAG48、IAG52A、IAG52B进行同源分析。并对推导的氨基酸序列作一级结构分析。

2 结果

PCR扩增产物经1%琼脂糖电泳得到大小约1.4 kb的单一一条带, 如图3所示。DNA序列测定结果显示iagFJ9基因共1398 bp见图1, G/C含量35.2%, 是一个完整ORF(不包括TGA终止密码子), 共有18个特殊密码子TAA编码谷氨酰胺(Gln, Q), 而非通用的终止密码子^[9]。基因共编码466氨基酸, 推导的分子量为48.089 kD, 其中氨基酸序列与已知的抑动蛋白具有类似的特征性结构变化, 包含6个结构相似的串联重复单位: 每个重复都以CPXGT为开始, 包含C - - X_{19,20} - - C - X₂ - C - - X₁₇₋₁₉ - - C - X₂ - C - - X_{21,22} - - C - X₃结构, N端与C端为保守的疏水氨基酸序列见图2。与已知的小瓜虫抑动蛋白基因ORF同源比较结果显示iagFJ9与IAG52A具有较高的同源率(基因水平88%, 氨基酸水平79%), 具体结果如表1所示。

表1 抑动蛋白基因及氨基酸同源率比较
Table 1 Homology comparison of *Ich. i-antigen*

基因 Gene	碱基数/bp bp number	同源率/% Homology	aa	同源率/% Homology
iagFJ9	1398		466	
IAG48	1326	51	442	42
IAG52A	1398	88	466	79
IAG52B	1380	62	460	38

3 讨论

简并PCR技术就是基于已知的氨基酸序列设计引物, 用于扩增同一基因家族的其他成员以及根据部分氨基酸序列“钓取”蛋白质的编码基因。自Lee^[10]采用该技术成功克隆了尿酸氧化酶基因以来, 这方面的研究报道越来越多, 先后发现了新的水稻、小麦的抗病基因、小菜蛾酯酶基因等。也出现了有关简并引物设计方法与技巧的专述文章^[6-7], 王洪波^[11]在前人的基础上对简并PCR技术的进展以

而简并 PCR 技术为克隆其他血清型小瓜虫的抑动抗原基因提供了捷径。

参考文献:

- [1] Lin Tian-Long, Dickerson H W. Purification and Partial Characterization of Immobilization Antigens from *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. J Protozoal, 1992, 39(4): 457-463.
- [2] Lin Tian-Long, Clark T G, Dickerson H W. Passive Immunization of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) against the Ciliated Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by Use of Murine Monoclonal Antibodies [J]. Infection and Immunity, 1996, 64(10): 4 085-4 090.
- [3] Wang Xu-Ting, Clark T G, Jane Noe, et al. Immunisation of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* Immobilisation antigens elicits serotype-specific protection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 337-350.
- [4] Clark T G, Lin Tian-Long, Jackwood D A, et al. The gene for an abundant parasite coat protein predicts tandemly repetitive mental binding domains [J]. Gene, 1999, 229: 91-100.
- [5] Lin Yuan-Kai, Lin Tian-Long, Wang Chia-Cheng, et al. Variation in primary sequence and tandem repeat copy number among I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Molecul Biochem Parasitol, 2002, 120: 93-106.
- [6] Michael Koelle. Degenerate PCR. 1996, http://www.dartmouth.edu/artsci/bio/umbros/protocols/other/koelle/degenerate_PCR.html.
- [7] Coyne V E, James M D, Reid S J, et al. PCR primer design and reaction optimization, Mole-cular Biology Techniques Manual (Third Edition), 2001, <http://www.mcb.uct.ac.za/manual/pcroptim.htm>.
- [8] Dickerson H W, Clark T G. Immune response of fish to ciliates [J]. Annu Rev of Fish Dis, 1996, 6: 107-120.
- [9] Prescott D M. The DNA of Ciliated Protozoa [J]. Microbiol Rev, 1994, 58: 233-267.
- [10] Lee C C, Wu X, Gibbs R A, et al. Generation of cDNA probes directed by amino acid sequence: Cloning of urate oxidase [J]. Science, 1988, 239: 1 288-1 291.
- [11] 王洪波, 周晓霞, 宋朝霞, 等. 简并 PCR 技术及其在基因克隆中的应用 [J]. 遗传, 2003, 25(2): 201-204.
- [12] Lin Yuankai, Lin Tian-Long, Wang Chia-Cheng, et al. Variation in primary sequence and tandem repeat copy number among i-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* [J]. Molecul Biochem Parasitol, 2002, 120: 93-106.

Amplification of immobilization antigen from *Ichthyophthirius multifiliis* by degenerate PCR

YANG Jin-xian¹, CHEN Qiang², LIU Xiao-dong¹, LIN Tian-long¹, Theodore G. Clark³

(1. Animal Husbandry & Veterinary Medicine Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 2. Geothermic Utilization Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China; 3. Department of Microbiology and Immunology College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York 14853, U. S. A)

Abstract: The immobilization antigen (i-ag) is a predominant component of the *Ichthyophthirius multifiliis* cilia and is the most important antigen recognized by host immune system. Based on the hydrophobic conserved peptide at the N & C terminal of i-ag protein sequences of three *Ichthyophthirius multifiliis* isolates, a pair of degenerate PCR primers P6/P7 were designed and used to amplify the i-ag gene from the parasite isolate IchFJ9 genomic DNA. The amplified gene is 1 398 bp long with an open-reading-frame (ORF) without TGA stop codon. Sequence analysis showed the amplified gene *iagFJ9* had typical i-ag structure with 18 TAA encoding Glutamine (Q), instead of stop codon. The deduced amino acids had 466 aa with six tandem repeats all initiated with CPXGT amino acid residues. Homology analysis indicated that the amplified gene had 88% homology with *IAG52A* gene. All these prove that the gene is the new discovered i-ag gene and the degenerate PCR is one of the useful tool for searching and discovering the other members of i-ag gene family.

Key words: *Ichthyophthirius multifiliis*, immobilization protein, antigen, degenerate PCR

Corresponding author: LIN Tian-long. E-mail: lint@pub3.fz.fj.cn

* This study is supported by the International Cooperation Project of Science and Technology Department of Fujian Province.