



EGFP 标记柔嫩艾美耳球虫重组卡介苗的构建及其在鸡体内的分布

王秋悦^①, 任科研^②, 李建华^{①*}, 张西臣^{①*}, 宫鹏涛^①

① 吉林大学农学部畜牧兽医学院, 长春 130062;

② 吉林省兽医科学研究所, 长春 130062

* 联系人, E-mail: zhangxic@public.cc.jl.cn; jianhua Li7207@163.com

收稿日期: 2008-08-27; 接受日期: 2008-09-16

吉林省科技发展规划(批准号: 20050211-2)资助项目

摘要 鸡球虫病给禽类养殖业带来重大经济影响. 本实验利用 DNA 重组技术将柔嫩艾美耳球虫保护性抗原基因 *rhomboid* 和增强型绿色荧光蛋白 *EGFP* 基因串连, 将其克隆到 BCG 中, 构建 *EGFP* 标记柔嫩艾美耳球虫重组卡介苗 pMV361-Rho/EGFP. 将 rBCG 口服免疫 6 日龄雏鸡, 一周后剖杀, 取肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官制作冰冻切片, 激光共聚焦显微镜观察各组织器官 *rhomboid* 表达情况. 另分别于免疫后 7, 14, 21, 28 天提取肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官总 RNA, 实时定量 RT-PCR 方法检测 *rhomboid* 目的基因转录情况, 比较各时期组织器官 *rhomboid* 基因表达量. 结果显示, 免疫一周后, 用激光共聚焦显微镜观察到在肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官中均有 *EGFP* 表达. 实时定量 RT-PCR 结果显示, 免疫 14 天后 *rhomboid* 基因表达量达到高峰, 随后开始下降, 至 28 天后消失. 本研究为重组卡介苗疫苗作为抗球虫疫苗的研究奠定基础.

关键词

球虫病
rBCG
EGFP
rhomboid 基因
激光共聚焦显微镜
实时定量 RT-PCR

鸡球虫病是由寄生于肠道的艾美耳属(*Eimeria*)原虫引起的危害禽类养殖业发展的重要疾病, 严重影响了饲料的利用率和鸡的生长^[1,2]. 目前本病防治主要依赖于药物和活虫苗^[3,4], 但随着近年来耐药虫株的频繁出现, 研制开发新药成本高, 加之普遍存在的球虫免疫程序复杂等问题, 生产安全有效的球虫疫苗已成为当务之急^[5,6].

有研究^[7]报道, 作为递呈异源抗原的活病毒和细菌载体能够减少免疫的剂量. 卡介苗(bacille calmette-guérin, BCG)是一种减毒的牛型结核分枝杆菌, 是表达重组外源基因的一种非常理想的活菌疫苗载体^[8,9]. 它本身是一种强免疫佐剂和非特异性免疫增强剂, 能诱导对异源抗原的体液免疫和细胞免疫应

答, 并且热稳定性强, 副作用小, 易于生产, 最重要的是单次接种即能诱导机体产生完全持久的免疫反应^[10,11]. BCG 能有效地诱导不同抗原的获得性免疫应答, 已在多种病原体表达的重组卡介苗(rBCG)中得以证实, 但在 BCG 内表达鸡球虫抗原基因, 国内外研究报道很少.

本实验将柔嫩艾美耳球虫保护性抗原基因 *rhomboid* 和增强型绿色荧光蛋白 *EGFP* 基因进行串连, 克隆到大肠杆菌一分枝杆菌整合表达载体 pMV361 中构建球虫重组卡介苗, 将表达增强型绿色荧光蛋白的 rBCG 通过口服免疫雏鸡, 观察其在鸡体内各组织器官中的分布及其稳定性和消长规律, 为卡介苗作为鸡球虫病疫苗抗原递送载体及其在鸡体

内免疫机理的研究提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 实验动物. 60 只 1 日龄海兰小公雏, 购自长春市种鸡厂, 实验动物饲料未添加任何抗生素及抗球虫药, 并经 80℃ 烘烤 2 h 以上.

(2) 菌种、质粒. *rhomboid* 基因从本实验室所构建的 *E.tenella* cDNA 表达文库中筛选, 宿主菌 DH5 α 、pEGFP-N1 质粒、pMD-18T 质粒(购于 TaKaRa 公司), 大肠杆菌-分枝杆菌质粒整合表达载体 pMV361 (Stover 博士构建^[13])由本室保存, 预防用卡介苗购于长春生物制品研究所.

(3) 虫株. *E.tenella* 孢子化卵囊, 吉林大学畜牧兽医学院寄生虫研究室培育并保存.

(4) 主要试剂. 卡介苗培养基 Middlebrook 7H9 购自美国 Difco 公司; 各种限制酶、AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶、蛋白质 Marker、DNA marker 均购于 TaKaRa 公司; 2 $\times$ Taq PCR MasterMix、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购于北京天根生化科技有限公司; 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)均为 Promega 产品, TRIzol 购自 Invitrogen 公司.

1.2 方法

(1) *rhomboid*, *EGFP* 基因的扩增与克隆. 根据 GenBank 中 *E.tenella rhomboid* 基因(DQ323509)DNA 序列及整合载体 pMV361 物理图谱采用 Primer5.0 软件设计特异性引物并引入酶切位点.

Rho 上游 QF: 5'-CTGACAGCTGATGTCGGA CATCGAATCCCAGAG-3'; 下游 QR: 5'-GACTCTCGAGTGCGCATCCCATGGCAAAGGAA-3'; EGFP 上游 GF: 5'-GATCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCG-3'; 下游 GR: 5'-CGCATCGATTTACTTGTACAGCTC GTCC-3'.

引物由大连宝生物工程有限公司合成. PCR 产物经纯化后, 分别与 pMD18-T 载体连接, 转化至感受态 *E.coli* DH5 α 中. 通过酶切分析、PCR 扩增鉴定重组克隆, 并送大连 TaKaRa 公司测序.

(2) 重组整合表达载体 pMV361-Rho/EGFP 的构

建. 将纯化的质粒 pMV361 用 *Pvu* II/*Cla* I 酶进行消化, PCR 产物 *rhomboid*, *EGFP* 基因测序鉴定正确后进行双酶切反应并回收目的片段, pMV361 与 *rhomboid*, *EGFP* 基因片段以 2:3:3 物质的量比混合, 16℃ 连接过夜, 连接产物转化 *E.coli* DH5 α 后筛选阳性重组质粒. 将重组质粒命名为 pMV361-Rho/EGFP(图 1).

(3) BCG 感受态的制备及电转化. 参照文献[12~14], 将 BCG 接种于 7H9ADC 液体培养基中, 37℃ 培养至对数生长期(3~4 周), 4000 $\times g$ 离心收集菌体, 沉淀用 10%甘油洗涤 3 次, 最后重悬于 1 mL 10%甘油中, -80℃ 保存用于电转化. 取 60~80 μ L 菌液加入 0.1 μ g 重组质粒 pMV361-Rho/EGFP 置于电转杯中. 电转条件为: 电压 2.5 kV, 电容 25 μ F, 电阻 1000 Ω . 转化后立即加入 7H9ADC 培养基中, 37℃ 培养 2 天后涂布于含 Kan 7H9ADC 培养基平板.

(4) SDS-PAGE 和 Western 印迹. 从含有 Kan 的 7H9ADC 培养基平板上挑取 BCG 重组子, 接种于液体培养基(含 Kan), 37℃ 培养至对数生长期, PCR 鉴定含有 *rhomboid*, *EGFP* 基因后, 45℃ 水浴中诱导 2 h, 离心收集菌体, 加入分枝杆菌裂解缓冲液以重悬沉淀, 并加入终浓度为 1%SDS, 100 μ g/mL 溶菌酶, 37℃ 作用 15 min. 超声处理后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色, 观察融合蛋白表达情况. SDS-PAGE 后, 切出含待转移蛋白的凝胶, 电转到尼龙膜上. 电转移结束后, 加封闭液(5%脱脂奶粉溶于 PBST 中), 4℃ 封闭过夜, 加入自制 *E.tenella* 阳性血清(ELISA 效价为 1:12800)用封闭液 1:1000 稀释, 37℃ 作用 2 h. 洗涤缓冲液洗膜后, 加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体反应(1:500). 最后用 DAB 显色液显色.

(5) 动物实验. 将购买的 1 日龄海兰小公雏, 饲养于严格消毒无球虫的铁丝笼中. 自由采食, 自由饮水. 6 日龄时, 将鸡只随机分成两组, 实验组口服 200 μ L rBCG pMV361-Rho/EGFP(10^7 单位/只), 对照组口服 200 μ L 生理盐水.

(6) 激光共聚焦显微镜观察. 免疫一周后对鸡只进行剖杀, 无菌取出肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官, OCT 包埋后移入 -20℃ 冰冻切片机中, 切片厚度 8~12 μ m, 平铺于预先高温烘烤处理过的载玻片上,

丙酮固定后树胶封片, 激光共聚焦显微镜下观察各组织器官 *EGFP* 表达情况。

(7) 抗体水平检测. 分别于免疫后 1, 2, 3, 4 周用 ELISA 方法对抗体水平进行检测. *E. tenella* 子孢子抗原(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, BSA 室温封闭 1 h 后, 加入 100 μL 血清室温作用 2 h, 最后加入酶标兔抗鸡 IgG 抗体(1:1000), 洗涤后加入 OPD 显色反应 10 min. 分光光度计检测吸光值 $A_{490\text{ nm}}$.

(8) 实时定量 RT-PCR. 分别于免疫后 7, 14, 21, 28 天随机选取 4 只雏鸡进行剖杀, 取肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官, 按照 TRIzol 说明书提供的方法提取各组织器官总 RNA. RNA 沉淀最终溶于灭菌 DEPC 水中, DU650 分光光度计检测其含量, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。

以提取的总 RNA 为模板, Oligo-dT 为引物进行反转录反应. 反应体系 20 μL : RNA 1 μL , 5 $\times$ AMV

缓冲液 4 μL , dNTP 混合物(10 mmol/L) 3 μL ; RNase 抑制剂(40 U/ μL) 1 μL ; Oligo-dT (10 pmol/ μL) 1 μL ; AMV 反转录酶(5 U/ μL) 0.5 μL ; 无 RNase 蒸馏水 9.5 μL . RT 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$, 55 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min. 反应产物保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$. 以 RT 产物为模板, 再进行 PCR 反应, 所用引物及探针如表 1.

PCR 反应体系 20 μL , 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min. 每个样品重复 3 遍, ABI Prism 7000 SDS 软件进行数据分析. 结果显示为 *rhomoid* 和 *GAPDH* mRNA 的比值。

2 结果

2.1 重组质粒 pMV361-Rho/EGFP 的鉴定

以筛选的阳性克隆质粒为模板, 分别以 *QF*, *QR* 和 *GF*, *GR* 为引物进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶

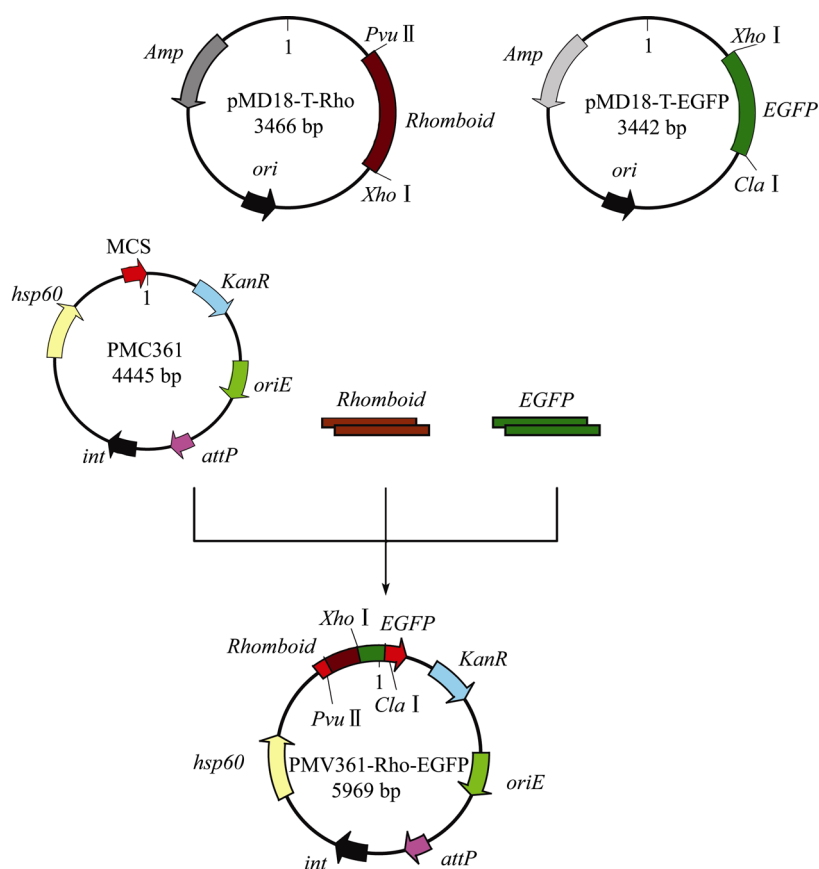


图 1 重组载体 pMV361-Rho/EGFP 构建流程

表 1 实时定量 RT-PCR 引物及探针序列

基因	引物及探针
<i>rhomboid</i>	正向引物 5'-GAGCGCGTCTTGTAACCAAT-3'
	反向引物 5'-AATGCCGACATGAAGGAAA-3'
	探针 5'-FAM-CCTGGGATACGGCACCTCCAA GC-ECLIPSE-3'
<i>GAPDH</i>	正向引物 5'-AGCGACTCGGAAGAAGAACAAG-3'
	反向引物 5'-CTCACTCCTTGGATGCCATGT-3'
	探针 5'-FAM-ATACAGCAACCGTGTGTGGACTTGATGGT-ECLIPSE-3'

电泳检测在 770 bp 和 750 bp 处出现清晰的阳性扩增带(图 2); 将重组质粒 pMV361-Rho/EGFP 分别用 *Pvu* II +*Xho* I 和 *Xho* I +*Cla* I 进行双酶切鉴定, 电泳后均可见目的条带, 与预期结果一致, 证明重组质粒构建成功(图 3).

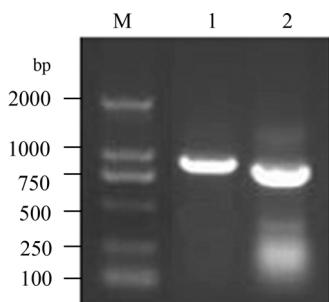


图 2 重组质粒 pMV361-Rho/EGFP 的 PCR 鉴定
M: DL2000 Marker; 1, *rhomboid* 基因 PCR 扩增产物;
2, *EGFP* 基因 PCR 扩增产物

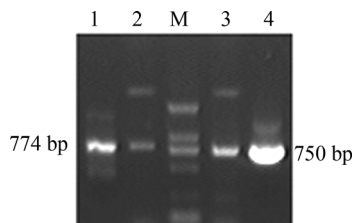


图 3 重组质粒 pMV361-Rho/EGFP 的酶切鉴定
M: DL2000 Marker; 1, *rhomboid* 基因; 2, pMV361-Rho/EGFP 用 *Pvu* II 和 *Xho* I 酶切; 3, *EGFP* 基因; 4, pMV361-Rho/EGFP 用 *Cla* I 和 *Xho* I 酶切

2.2 重组蛋白 SDS-PAGE 及 Western 印迹检测

将处于对数生长期的 pMV361-Rho/EGFP 重组卡介苗 45℃ 诱导 2 h 后, 经 12% SDS-PAGE 电泳检测, 结果表达出的融合蛋白的相对分子质量为 50 kD 左右, 与预期结果一致(图 4), 表明 Rho/EGFP 成功地在 rBCG 中表达.

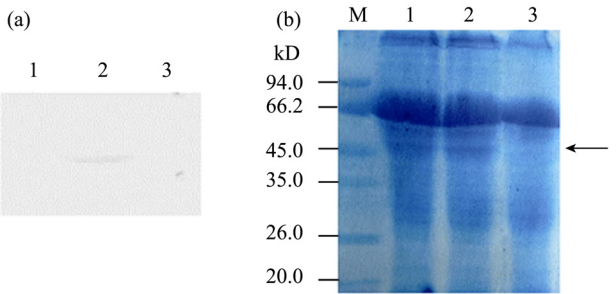


图 4 rBCG pMV361-Rho/EGFP SDS-PAGE 及 Western 印迹检测
(a) 1, BCG; 2, rBCG pMV361-Rho/EGFP; 3, rBCG pMV361
(b) M: Marker; 1, 2, rBCG pMV361-Rho/EGFP; 3, BCG

2.3 重组卡介苗在鸡体内各组织器官的分布

将进行免疫重组卡介苗 pMV361-Rho/EGFP 的鸡于一周后进行剖杀, 取肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官做冰冻切片, 使用激光共聚焦显微镜观察并拍照, 结果如图 5. 从图中可看出, 口服免疫重组卡介苗 pMV361-Rho/EGFP 后, 在肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官中均有 EGFP 蛋白表达, 而阴性对照中无此荧光蛋白显示.

2.4 抗体水平检测

实验组和对照组鸡只体液免疫水平 ELISA 检测结果见图 6. 在不同的时间点每组随机选取 5 只鸡进行心脏采血, 收集血清. rBCG 免疫 1 周后并未检测到抗体水平, 实验组在免疫 3~4 周后组均显示一定的抗体效价, 而且不断升高, 与阴性对照组差异显著.

2.5 *rhomboid* 基因表达量的 RT-PCR 检测

实时定量 RT-PCR 方法检测 *rhomboid* 目的基因在不同时期各组织器官的基因表达量. 结果显示如图 7, rBCG 免疫雏鸡 7 天后能在肝、脾、肺、肾、盲肠各组织器官中检测到 *rhomboid* 基因的表达, 并在免

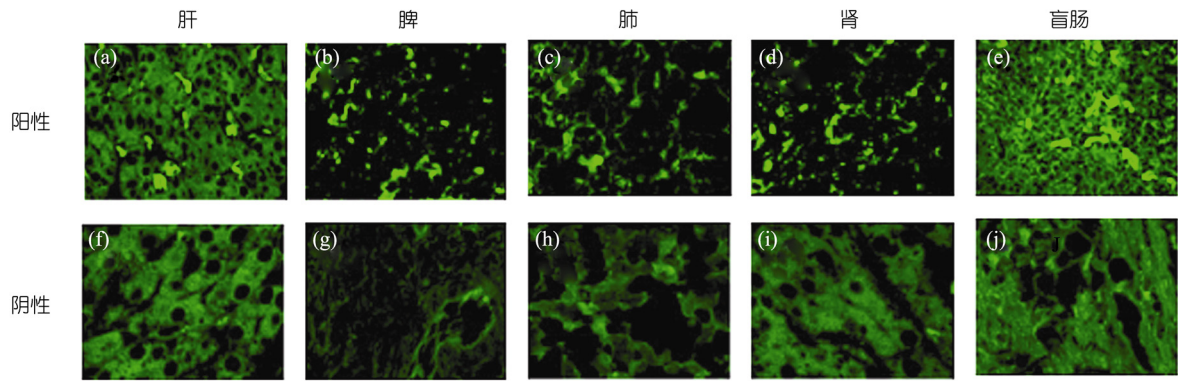


图5 重组卡介苗在鸡只体内各组织器官的分布($\times 600$)

(a) 肝, $\times 600$; (b) 脾, $\times 600$; (c) 肺, $\times 600$; (d) 肾, $\times 600$; (e) 盲肠, $\times 600$;
(f)~(j) 分别为阴性对照的肝、脾、肺、肾、盲肠, $\times 600$

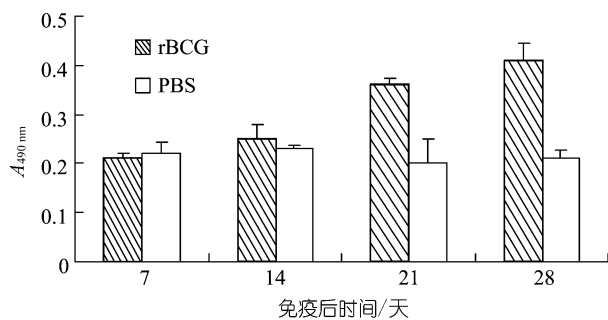


图6 ELISA 检测各组鸡抗体效价变化

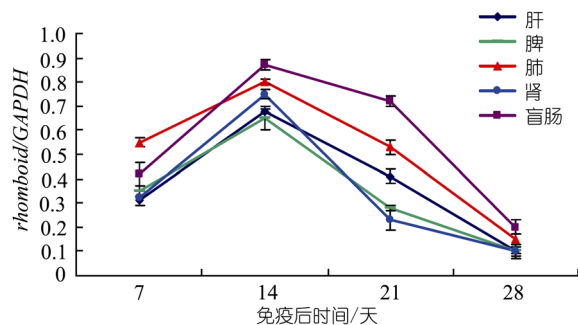


图7 免疫不同时间各器官 *rhomboid* 基因表达量的 RT-PCR 检测

疫 14 天后 *rhomboid* 基因表达量显著增加达到最高, 之后开始逐渐降低, 第 28 天 *rhomboid* 基因表达消失.

3 讨论

选择合适的抗原和表达载体是影响球虫疫苗诱导有效免疫应答的两个重要因素. 研究表明原虫

rhomboid 蛋白是一类膜内丝氨酸蛋白酶, 它在侵入宿主细胞过程中, 对水解微线蛋白具有重要作用^[15,16]. *rhomboid* 蛋白作为优秀的球虫疫苗候选抗原已在本实验组先前的研究中得到了证实^[17,18]. 在目前所有活疫苗中卡介苗热稳定性最好, 生产成本低, 易于保存和运输, 而且是世界上应用最广泛、最安全的疫苗, 为推广应用提供可靠保证. 此外, 从疫苗的安全性和诱导特异性免疫反应的角度出发, 卡介苗亦是异源抗原免疫的优良载体. 鉴于卡介苗在球虫重组疫苗研究中的优点, 本研究选用了 BCG 作为球虫保护性抗原基因的表达宿主, 在 BCG 中进行了 *rhomboid* 蛋白和 *EGFP* 的融合表达. pMV361 表达载体含有从分枝杆菌噬菌体 L5 获得的整合基因, 重组质粒 pMV361- Rho/*EGFP* 能够通过特异性位点整合到 BCG 基因组. Western 印迹结果证实 *rhomboid* 和 *EGFP* 成功在 BCG 中克隆和表达.

黏膜免疫被认为是优于其他位点的能够在黏膜感染疾病中诱导保护性免疫应答的有效免疫方式^[19~21]. 因此, 本实验采用了口服方式进行 rBCG 免疫, rBCG 能够通过鸡的消化道, 并且抵抗胃酸和一些酶的消化, 然后被肠道的细胞吸收, 激活有效的免疫保护.

实时定量 RT-PCR 结果显示, 在实验鸡各组织器官中均检测到了 *rhomboid* 的转录产物, 说明实验所用 rBCG 菌可侵入鸡的肝、脾、肺、肾、盲肠各组织细胞表达异源抗原, 这样不仅能激发鸡体对结核杆菌本身的免疫反应, 使 BCG 作为免疫增强剂发挥

很好的作用, 而且能够激发出针对柔嫩艾美耳球虫抗原的特异性免疫应答, 将外源性球虫 *rhomboid* 基因表达的保护性蛋白通过黏膜免疫系统传递给机体的抗原递呈细胞, 通过体液免疫和细胞免疫产生抗球虫抗体, 从而发挥其抗球虫的功能。

从表达动态上来看, 雏鸡免疫 rBCG 后 7 天即可检测到 *rhomboid* 的转录产物, 说明本实验所构建的 rBCG 疫苗基因在体内很快得到转录和表达, 而且结

核杆菌在鸡体内有一个积累的过程, 在第 28 天几乎检测不到目的基因转录产物, 可能的原因是基因的表达在一定时间后受到抑制或者疫苗 rBCG 逐渐被机体清除。这种现象有利也有弊, 有利的一面是可以防止因基因无限表达而产生免疫耐受或免疫过敏的现象, 弊端是由于表达时间的限制很可能诱导的免疫应答强度不够而起不到免疫保护效果, 但后者可能通过增加免疫次数和加强免疫剂量而得到改善。

参考文献

- Ding X, Lillehoj H S, Quiroz M A, et al. Protective immunity against *Eimeria acervulina* following *in ovo* immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. *Infect Immun*, 2004, 12: 6939—6944[DOI]
- Allen P C, Fetterer R H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15: 58—65[DOI]
- Chapman H D, Cherry T E, Danforth H D, et al. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int J Parasitol*, 2002, 32: 617—629 [DOI]
- Lillehoj H S. Host immunity and vaccine development to coccidian and salmonella infections in chickens. *J Poult Sci*, 2003, 40: 151—193[DOI]
- Vermeulen A N, Schaap D C, Schetters T P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet Parasitol*, 2001, 100: 13—20
- Lillehoj H S, Lillehoj E P. Avian coccidiosis: a review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis*, 2000, 44: 408—425[DOI]
- Kotton C N, Hohmann E L. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun*, 2004, 72: 5535—5547[DOI]
- Abolhassani M, Lagaderie M, Chavarot, et al. Mycobacterium bovis BCG induces similar immune responses and protection by rectal and parenteral immunization routes. *Infect Immun*, 2000, 68: 5657—5662[DOI]
- Seixas F K, da Silva E F, Hartwig D D, et al. Recombinant mycobacterium bovis BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*, 2007, 26: 88—95[DOI]
- Nascimento I P, Dias W O, Mazzantini R P, et al. Recombinant mycobacterium bovis BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live bordetella pertusis in mice. *Infect Immun*, 2000, 9: 4877—4883[DOI]
- Ohara N, Yamada T. Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*, 2001, 19: 4089—4098[DOI]
- Varaldo P B, Leite L C, Dias W O, et al. Recombinant mycobacterium bovis BCG expressing the Sm14 antigen of *schistosoma mansoni* protects mice from cercarial challenge. *Infect Immun*, 2004, 72: 3336—3343[DOI]
- Stover C K, de la Cruz V F, Fuerst T R, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 1991, 351: 456—460[DOI]
- Wang H F, Liu Q, Liu K Y, et al. Immune response induced by recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int*, 2007, 56: 263—268[DOI]
- Dowse T J, Soldati D. Rhomboid-like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends Parasitol*, 2005, 21: 254—258 [DOI]
- Brossier F, Jewett T J, Sibley L D, et al. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 4146—4151[DOI]
- Yang G, Li J, Zhang X, et al. *Eimeria tenella*: construction of a recombinant fowlpox virus expressing rhomboid gene and its protective efficacy against homologous infection. *Exp Parasitol*, 2008, 119: 30—36[DOI]
- Li J, Zhang X, Liu Q, et al. *Eimeria tenella*: cloning of a novel *Eimeria tenella* cDNA encoding a protein related to rhomboid family from F2 hybrid strain. *Exp Parasitol*, 2006, 113: 215—220[DOI]
- Medina E, Guzman C A. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitation. *Vaccine*, 2001, 19: 1573—1580[DOI]
- Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, et al. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun*, 2001, 69: 1547—1553[DOI]
- Scheppler L, Vogel M, Zuercher A W, et al. Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 2002, 20: 2913—2920[DOI]