

弓形虫 *GRA3* 基因真核表达质粒的构建与鉴定

薛书江, 张守发, 栾 杨
(延边大学 农学院, 吉林 龙井 133400)

摘要: 以 pGEX-*GRA3* 为模板, 经 PCR 扩增获得弓形虫 *GRA3* 基因, 克隆于 pMD-18T simple 载体上。重组质粒经 PCR 鉴定、*Pst*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定后测序分析, 再将其定向插入真核表达载体 pVAX I, 构建真核表达重组质粒 pVAX-*GRA3*。经 PCR 和酶切鉴定后, 将重组质粒 pVAX-*GRA3* 转染 HeLa 细胞, 然后进行 RT-PCR 检测。RT-PCR 结果表明, 检测到了目的基因的存在, 说明 pVAX-*GRA3* 成功转入 HeLa 细胞。

关键词: 弓形虫; *GRA3* 基因; 真核表达; 鉴定

中图分类号: S852.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)06-0132-04

Construction and Identification of the Eukaryotic Expression Plasmid Containing *GRA3* Gene of *Toxoplasma gondii*

XUE Shu-jiang, ZHANG Shou-fa, LUAN Yang
(Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: The *GRA3* gene of *Toxoplasma gondii* was amplified from plasmid pGEX-*GRA3* by PCR and ligated into pMD-18T simple vector for DNA sequencing. Then, the PCR products were inserted into pVAX I vector to construct a recombinant plasmid named as pVAX-*GRA3* and characterized by PCR and restriction-endonuclease *Pst*I and *Xho*I digestion. HeLa cells were transfected by plasmid pVAX-*GRA3* with lipofection strategy and the expression of *GRA3* gene were detected by RT-PCR. The results showed that we have successfully constructed a recombinant plasmid of *GRA3* gene of *Toxoplasma gondii*, which established a base for further study of vaccines using the *GRA3* gene.

Key words: *Toxoplasma gondii*; *GRA3* gene; Eukaryotic expression; Identification

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种细胞内的专性寄生原虫, 可引起人畜共患性弓形虫病。该虫可感染包括人类在内的 190 多种哺乳类动物, 传染源主要是猫科动物^[1,2]。全世界约有 1/3 的成年人感染, 我国人群的感染率为 5%~20%, 家畜感染率为 10%~50%。预防和控制弓形虫病的发生, 对保障人类健康和发展畜牧业具有重大意义。目前, 国内外学者对弓形虫病的研究不断深入, 在该病的病原学和诊断技术等方面取得了一定进展。在国外, 弓形虫核酸疫苗已被广泛研制和应用, 并显示出良好的保护作用, 而国内弓形虫核酸疫苗的研制尚处

于起步阶段^[3-5]。弓形虫 *GRA3* 基因能被抗弓形虫单克隆抗体 2H11 识别, 可以刺激机体产生 B 细胞免疫应答, 可用于弓形虫病诊断和作为疫苗的候选分子^[6]。因此, 本研究应用基因工程技术构建弓形虫 *GRA3* 基因的真核表达载体, 旨在为弓形虫疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒及宿主菌

pGEX-*GRA3* 由延边大学预防兽医实验室构建, 大肠埃希氏菌 DH5 α 和 HeLa 细胞为延边大学预

收稿日期: 2010-01-28

基金项目: 延边大学青年科研基金项目(延大科合字(2008)第12号)

作者简介: 薛书江(1982-), 男, 吉林东丰人, 助理实验师, 主要从事动物疫病分子免疫学研究。E-mail: 20010306@ybu.edu.cn

防兽医实验室保存。

1.2 试剂及工具酶

总 RNA 抽提试剂盒、Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、DNA 凝胶回收试剂盒、pMD-18T simple Vector、限制性内切酶 *Pst* I、*Xho* I、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTP 和 DNA 分子量标准购自大连宝生物工程公司; pVAX I vector 购于 Invitrogen 公司; 质粒大量抽提试剂盒购于碧云天生物技术研究; 其他试剂为进口或国产分析纯。

1.3 引物设计与合成

根据已构建的 pGEX-*GRA3* 质粒基因序列, 设计 1 对引物。在上游引物的 5' 端引入 Kozak 序列、起始密码子、限制性内切酶识别序列和保护性碱基。在下游引物的 5' 端引入终止密码子、限制性内切酶识别序列和保护性碱基。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为: 上游引物 P1: 5'-CGCTGCAGGCCACCATGGACCGTACCATATGTCCT-3', 下游引物 P2: 5'-CGCTCGAGTTATCAGGTTTGTTTCTTGAGGC-3'。

1.4 目的基因 *GRA3* 片段的扩增及纯化

以 pGEX-*GRA3* 为模板, 在 PCR 管中, 依次加入 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 上游引物 (10 pmol/L) 0.5 μL, 下游引物 (10 pmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA 2.5 μL, Taq plus DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, 补加 ddH₂O 至 25 μL。反应条件为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 57℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 最后于 72℃延伸 7 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 纯化的 PCR 产物储存于 -20℃。

1.5 目的基因的克隆及 pMD18-*GRA3* 重组质粒的鉴定

将纯化的 PCR 产物与 pMD-18T simple 载体于 16℃连接过夜, 按常规方法转化至感受态大肠埃希氏菌 DH_{5α}, 将其涂布于预先铺有 (0.1 mol/L) IPTG 和 X-Gal 的含 Amp 的 LB 平板上, 37℃培养过夜。挑取 10 个白色单菌落, 将其接种于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养液中, 37℃剧烈振荡培养 8 h, 按碱裂解法提取质粒。重组质粒经 PCR 和 *Pst* I、*Xho* I 双酶切鉴定。

1.6 DNA 序列测定及分析

将 PCR 和酶切鉴定均为阳性的克隆送往上海生工生物工程技术有限公司测序。用 DNAMAN

软件对测序结果进行分析。

1.7 pVAX-*GRA3* 重组质粒的构建

按常规方法提取阳性克隆和表达载体 pVAX I 的质粒 DNA, 将二者分别用 *Pst* I 和 *Xho* I 双酶切。分别回收 *GRA3* 目的基因片段和线性载体, 用 T4 DNA 连接酶按常规方法进行连接, 转化至感受态大肠埃希氏菌 DH_{5α}。按碱裂解法提取质粒, 进行 PCR 和双酶切鉴定。将鉴定为阳性的克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.8 转染 HeLa 细胞

转染前 48 h, 用胰酶消化生长状态良好的 HeLa 细胞, 显微镜下计数, 按 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 个/孔转至 24 孔板, 以使次日转染时细胞达到 90%~95% 丰度。转染在无血清无抗生素的 DMEM 培养基中进行。分别取应用质粒大量抽提试剂盒提取的 pVAX-*GRA3* 质粒 DNA (试验组) 和 pVAX I 质粒 DNA (对照组) 0.8~1.0 μg, 与 50 μL 双无 DMEM 培养基混合; 再取 2 μL Cellfectamine™ 2000, 用 50 μL 双无 DMEM 培养基稀释, 室温孵育 5 min。将质粒 DNA 溶液与 Cellfectamine™ 2000 溶液轻轻混合, 室温下放置 5 min, 以形成 DNA-脂质体复合物。同时, 用双无 DMEM 培养基洗细胞 3 次, 每孔再加入 100 μL 的双无 DMEM 培养基。复合物形成后, 将其加入孔内, 轻轻晃动培养板使分布均匀。37℃孵育 4~6 h 后, 将转染液移去, 加 DMEM 完全培养基 2 mL, 于 37℃、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 48 h。

1.9 RT-PCR 检测重组质粒的表达

将转染 pVAX-*GRA3* 重组质粒细胞组、转染 pVAX I 空质粒细胞对照组、未转染细胞对照组, 用总 RNA 抽提试剂盒分别提取总 RNA, 以下游引物 P2 为反转录引物, 用 Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 进行反转录, 然后迅速冰浴, 利用设计的特异性引物对 cDNA 进行 PCR 反应。

2 结果与分析

2.1 pMD18-*GRA3* 重组质粒的鉴定

以初步鉴定为阳性的重组克隆质粒为模板进行 PCR 扩增, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 扩增出的 DNA 片段大小与 *GRA3* 基因片段大小一致, 说明重组质粒含有目的基因。用 *Pst* I 和 *Xho* I 对初步筛选为阳性的重组克隆质粒进行酶切鉴定, 酶切产物于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳。结果显示, 经 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切, 得到了约 694 bp 的目的片段, 与预期的片段大小相符 (图 1), 说明目的基因片段

究却未见报道。有研究发现, *GRA 3* 基因为单拷贝, 其 cDNA 在 N-末端编码 2 个蛋氨酸, 相邻有 1 个开放阅读框, 富含脯氨酸, 不含内含子, 在体内的转录水平很高^[6], 可用于弓形虫病的诊断和作为疫苗的候选分子。这就为 *GRA 3* 基因的克隆表达提供了有力的理论基础。因此, 本研究选择了 *GRA 3* 作为目的基因。

在引物设计时, 去除了 *GRA 3* 基因的 5' 非编码区, 从它的第 1 个翻译起始点开始设计, 这样就扩增了几乎整个 *GRA 3* 基因。并且根据 pVAX I 载体序列与真核表达引物设计要求, 在设计引物时, 上游引物 5' 端加入 *Pst* I 酶切位点、Kozak 序列, 下游引物 5' 端加入 *Xho* I 酶切位点与终止密码子 TAA。Kozak 序列的引入使载体 pVAX I 插入了一个内含子, 满足了用作 DNA 疫苗的质粒都需要有一个内含子或插入一个内含子的要求, 可增强哺乳动物基因的表达。

外源基因蛋白质表达常用的表达系统有原核细胞和真核细胞。原核细胞表达系统主要使用大肠杆菌, 真核细胞表达系统主要有哺乳动物细胞和昆虫细胞。2 种外源基因表达系统都有各自的优点, 应根据需要加以选择。本研究的目的是探讨弓形虫 *GRA 3* 基因在核酸疫苗中的应用价值, 因此, 选择了应用 pVAX I 表达载体的真核表达。在真核表达中, 有 2 点需要引起注意, 一是质粒 DNA 的纯度。质粒 DNA 的纯度影响转染的成败和转染率的高低。本试验选用质粒提取试剂盒来提取质粒 DNA, 保证了质粒的纯度。二是细胞转染的效果。在真核细胞的表达中, 细胞转染是一个关键步骤, 目前常用的方法有电穿孔法、基因枪法(又叫微粒轰击技术)、磷酸钙共沉淀法、脂质体法、DEAE-葡聚糖转染技术、病毒感染法、抗体转染法等。在这些方法中, DNA 转染的效率、机制、可重复性及使用的方便性都存在差异。本研究选用了阳离子脂质体 CellfectamineTM 2000 进行转染, 结果表明, 脂质体/质粒 DNA 转染系统在病原因子如寄生虫基因的真核表达有较好的应用效果。

分析弓形虫 *GRA 3* 基因在真核细胞中的表达,

对于深入研究其生物学功能有着重要意义。本研究成功建立了真核表达质粒 pVAX-*GRA 3*, 并采用阳离子脂质体将 pVAX-*GRA 3* 质粒 DNA 转入 Hela 细胞。RT-PCR 检测结果显示, *GRA 3* 基因在 Hela 细胞中得到有效转录, 表明阳离子脂质体成功地将 pVAX-*GRA 3* 转入靶细胞。而 *GRA 3* 基因的表达蛋白是否具有较好的反应原性和免疫原性, 还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 许青华. 弓形虫病的流行病学研究概况[J]. 现代农业科技, 2006(9): 147-148.
- [2] 张东林, 惠煜, 周艳琴. 应用细胞培养方法分离猪源弓形虫虫株[J]. 河南农业科学, 2009(3): 103-105.
- [3] 张晓文, 惠清法. 弓形虫疫苗的研究进展[J]. 延安大学学报: 自然科学版, 2007, 26(4): 72-75.
- [4] 杨翠萍, 万红娇, 蔡长春. 弓形虫疫苗研究的现状与展望[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(3): 232.
- [5] 李文殊, 陆惠民. 弓形虫病核酸疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(5): 436.
- [6] Cha D Y, Song I K, Lee G S, et al. Effects of specific mortodonal antibodies to granular proteins on invasion of *Toxoplasma gondii* in vitro and vivo[J]. Korean J Parasitol, 2001, 39(3): 233.
- [7] Supply P, Sutton P, Coughlan S N, et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*[J]. Vaccine, 1999, 17: 705.
- [8] Lecordier L, Mercier C, Torpiar G, et al. Molecular structure of a *Toxoplasma gondii* dense granule antigen(GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 59(1): 143-153.
- [9] Lecordier L. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated with to the network of the parasitophorous vacuole[J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 70(1/2): 85-94.
- [10] Fischer H G, Stachelhaus S, Sabra M, et al. GRA7, an excretory 29kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells[J]. Mol Biochem Parasitol, 1998, 91(2): 251-262.