

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.01.003

犬弓首蛔虫卵黄原蛋白 DUF1943 结构域的克隆及原核表达^①

罗永莉, 朱宏宏, 江艾耘,
罗永芳, 旷策嫣, 周荣琼

西南大学 动物科学学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为克隆犬弓首蛔虫 *Toxocara canis*, *T. canis* 卵黄原蛋白 DUF1943 结构域(The domain of unknown function 1943, DUF1943)(*Tc-duf1943*), 构建其原核表达载体 pET-28a(+)/*duf1943*, 并检测重组蛋白在大肠杆菌 *Escherichia coli*, *E. coli* 中的表达形式. 该文根据 *T. canis* 的转录组数据, 以 *T. canis* 雌、雄虫 cDNA 为模板扩增 *Tc-duf1943*, 然后与表达载体 pET-28a(+)-连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导, 对目的蛋白的原核表达形式和蛋白质纯化进行鉴定. 结果显示 *Tc-duf1943* 序列长度为 864 bp, 含有一个完整的开放阅读框, 编码 288 个氨基酸; SDS-PAGE 电泳结果表明, 重组蛋白以包涵体形式存在, 相对分子质量大小约为 3.5×10^4 ; 对表达条件进行优化后, 以 0.4 mmol/L IPTG, 于 37 °C 诱导 4 h 时可获得大量目的蛋白; 利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化可以获得具有较高纯度的目的蛋白. 该试验成功构建了 pET-28a(+)/*duf1943* 原核表达载体, 为进一步研究 *Tc*DUF1943 的生物学功能奠定了基础.

关键词: 犬弓首蛔虫; DUF1943; 克隆; 原核表达

中图分类号: S858.292

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)01-0015-06

犬弓首蛔虫 *Toxocara canis*, *T. canis* 是犬常见的胃肠道寄生线虫, 其感染性幼虫可以感染人和多种动物^[1], 是引起弓首蛔虫病的主要病原. 该病的流行和分布极为广泛, 据资料报道其感染率为 1.4%~64.7%^[2-3]. *T. canis* 感染人和其他非特异性宿主可引起内脏幼虫移行症(Visceral larva migrans, VLM)、眼睛幼虫移行症(Ocular larva migrans, OLM)和神经幼虫移行症(Neurological larva migrans, NLM), 造成严重的病理综合征^[4-7].

卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)是脂质转运蛋白家族的成员之一^[8-9], 普遍存在于卵生非哺乳动物体内^[10]. 不同来源的卵黄原蛋白具有 3 个保守功能结构域: 位于 N 端的功能结构域(Vitellogenin, LPD_N)、未知结构域(domain of unknown function, DUF1943)和位于 C 端的 vWD 结构域(von-Willebrand factor type D domain, vWD)^[11-13]. Vg 主要是在卵巢外组织中合成, 分泌进入循环系统到达卵巢, 通过受体介导的内吞作用进入卵母细胞, 为正在发育的胚胎或幼虫提供营养物质^[14-15]. 此外, Vg 还具有免疫防御、粒子载体、抗氧化活性、筛选内分泌干扰物、调查环境毒理和污染等^[16-19]作用. 目前, 对于昆虫、甲壳动物和脊椎动物的 Vg 研究较多^[20-21], 但对于寄生虫卵黄原蛋白基因的研究相对较少.

本研究拟运用分子生物学技术, 克隆犬弓首蛔虫 *Tc-duf1943*, 构建 pET-28a(+)/*duf1943* 原核表

① 收稿日期: 2017-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172313); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2016E087).

作者简介: 罗永莉(1992-), 女, 重庆綦江人, 硕士, 主要从事传染病学与寄生虫病学研究.

通信作者: 周荣琼, 教授.

达载体,以期能在大肠杆菌 *E. coli* 中得到表达,优化其表达条件,为进一步研究 *TcDUF1943* 的生物学功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

T. canis 采自西南大学荣昌校区动物医院某患病犬,由本实验室分离鉴定,液氮速冻并保存.

胶回收试剂盒、M-MLV 反转录酶、SYBR® Premix Ex Taq TM II、原核表达载体 pET-28a(+) 及限制性内切酶 *Bam* H I、*Hind* III 均购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 *T. canis* 的转录组数据(GenBank: JPKZ01002217),使用软件 Primer premier(Version 5.0)分别对 *Tc-duf1943* 及 18S rRNA 基因进行引物设计(表 1),并由南京金斯瑞生物科技有限公司合成.下划线分别为限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 的识别位点.

表 1 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>Tc-duf1943</i>	CGCGGATCCATGAGCAAATTCATGCATAGGAC	CCCAAGCTTTTAAGTTTGTATCAACAGGATCT
18S rRNA	AATTGTTGGTCTTCAACGAGGA	AAAGGGCAGGGACGTAGTCAA

1.2.2 总 RNA 的提取与反转录

采用 Trizol 试剂分别对 *T. canis* 雌虫和雄虫成虫、雌虫生殖道、肠道、体壁及雄虫生殖道、肠道、体壁的总 RNA 进行提取,采用核酸测定仪检测总 RNA 的浓度和纯度,以提取的 *T. canis* 总 RNA 为模板,按 M-MLV 反转录试剂盒说明合成 cDNA.

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增.反应条件为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 40 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min. 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,用凝胶成像系统扫描并记录结果.

1.2.4 PCR 产物的克隆

利用 TransGen Biotech 公司的 DNA 胶回收试剂盒切胶回收 PCR 产物,按体系将目的片段与 pMD™ 19-T 载体进行连接:在 0.2 mL 离心管中加入 5 μL 的 Ligation Solution I, 3 μL 的 PCR 纯化产物, 1 μL 的 pMD™ 19-T Vector, 1 μL 的 ddH₂O, 16 °C 连接 4 h. 将上述连接产物转化至 30 μL 的 DH5a 感受态细胞,涂布于含 IPTG(24 mg/mL)和 X-gal(20 mg/mL)的 LB/Amp 琼脂平板中,于 37 °C 恒温培养箱正置 30 min,再倒置培养 12~16 h.

1.2.5 原核表达载体的构建

将测序正确的重组质粒与 pET-28a(+) 表达载体经限制性内切酶 *Bam* H I、*Hind* III 双酶切,回收酶切过后的目的基因与 pET-28a(+) 质粒,于反应体系中进行连接,重组表达载体经热激法转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,经 LB/ Kan 平板初筛,挑取单菌落于 LB/ Kan 液体培养基中,220 r/min 振荡培养 12 h,提取质粒,进行 PCR、双酶切及测序鉴定.

1.2.6 诱导表达和 SDS-PAGE 分析

提取重组质粒,转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,挑取单菌落接种于 LB/ Kan 液体培养基,37 °C 220 r/min 振荡培养,当 OD₆₀₀ 值达到 0.6~1.0 时,加入 0.4 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h,将菌液于 4 °C, 8 000 r/min 进行离心,收集菌体,超声波破碎,分离上清和沉淀,并进行 SDS-PAGE 电泳检测,鉴定重组蛋白的相对分子质量、表达形式及表达量.检测到目的蛋白后,再分别进行 IPTG 浓度梯度和时间梯度的优化.

1.2.7 重组蛋白的纯化

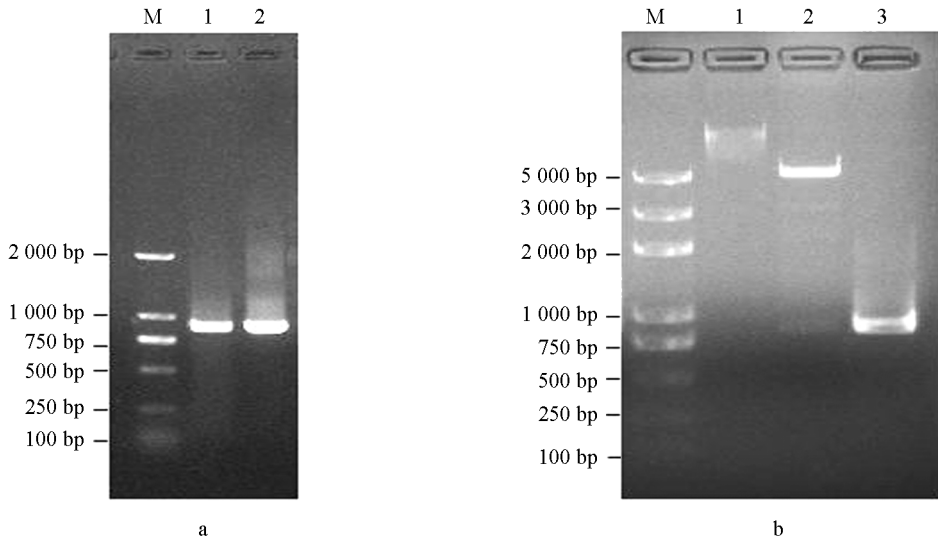
取大量诱导表达后的菌液,4 °C 6 000 r/min 离心 20 min,收集菌体,超声波破碎,离心收集目的蛋

白, 用 8 M 尿素溶解包涵体, 4 °C 8 000 r/min 离心 30 min, 上清经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, SDS-PAGE 检测纯化效果, -80 °C 保存备用。

2 试验结果

2.1 *Tc-duf1943* 克隆及原核表达载体的构建

经 PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示在 850 bp 左右处可见清晰的条带, 大小与预期的目的片段相符(图 1a)。将 *Tc-duf1943* 亚克隆到 pET-28a(+) 载体, 经双酶切鉴定, 结果表明目的片段成功连接到 pET-28a(+) 载体上(图 1b)。



M. Marker;

1. 雄虫 *Tc-duf1943* PCR 产物;

2. 雌虫 *Tc-duf1943* PCR 产物。

M. Marker; 1. pET-28a(+)/*duf1943* 重组质粒的提取;

2. pET-28a(+)/*duf1943* 重组质粒的双酶切;

3. *Tc-duf1943* 目的基因。

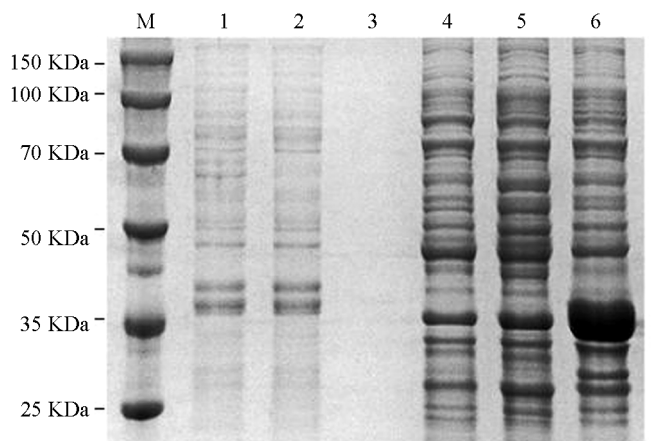
图 1 *Tc-duf1943* PCR 扩增及重组质粒 pET-28a(+)/*duf1943* 酶切

2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

将阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 体外诱导表达, 产物以包涵体的形式存在, 大小约为 3.5×10^4 , 与理论预测值相符(图 2); 对诱导条件进行优化, 结果表明 37 °C, IPTG 浓度为 0.4 mmol/L, 诱导 4 h 时, 重组蛋白的表达量最高(图 3); 融合蛋白经 Ni-NTA 纯化, 纯化后的蛋白具有较高的纯度(图 4)。

3 讨论

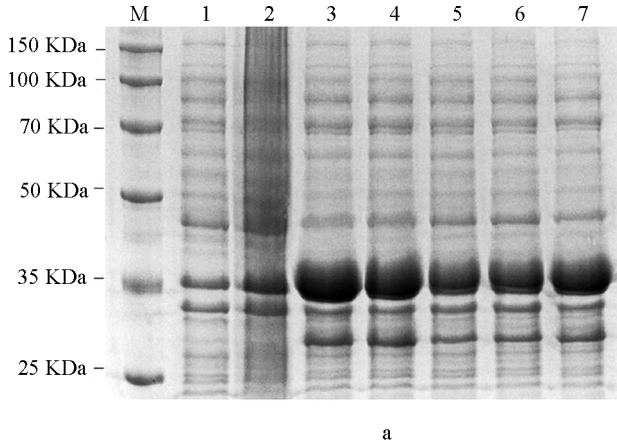
卵黄原蛋白是一种高分子质量的磷酸脂糖蛋白(Lipophosphoglycoprotein), 在雌激素作用下, 可以在除卵巢以外的其他组织中(如昆虫脂肪体、鱼类肝脏、甲壳动物肝胰腺、线虫肠细胞、海胆消化道细胞等)合成, 随后分泌进入循环系统, 到达卵巢, 经卵黄原蛋白受体(Vitellogenin receptor, VgR)介导的内吞作用进入卵母细胞, 分解为卵黄脂磷蛋白(Lipovitellin, Lv)、卵黄蛋



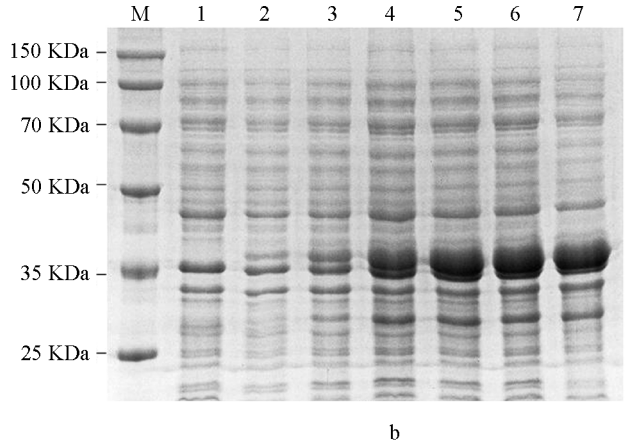
M. Marker; 1. pET-28a(+) 诱导上清; 2. pET-28a(+)/*duf1943* 未诱导上清; 3. pET-28a(+)/*duf1943* 诱导上清; 4. pET-28a(+) 诱导沉淀; 5. pET-28a(+)/*duf1943* 未诱导沉淀; 6. pET-28a(+)/*duf1943* 诱导沉淀。

图 2 *TcDUF1943* 的表达形式

白(Yolk glycoprotein, YP)和卵黄高磷蛋白(Phosvitin, Pv)等,为正在发育的胚胎提供氨基酸、脂肪、碳水化合物、磷和硫等营养物质^[16, 22-25]。



不同IPTG浓度诱导表达[M. Marker; 1. 空载体pET-28a(+); 2~7. IPTG诱导浓度依次为0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L].

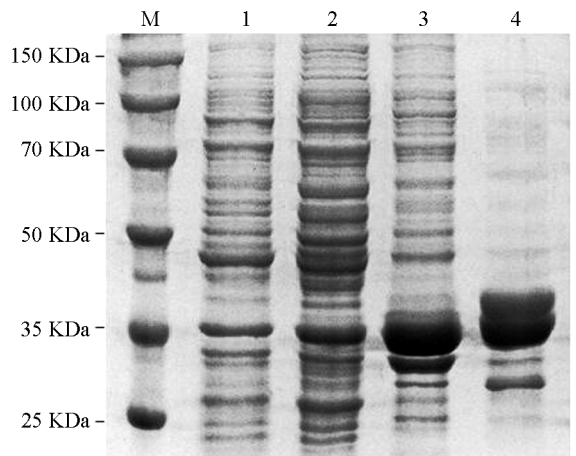


不同诱导时间诱导表达[M. Marker; 1. 空载体pET-28a(+); 2~7. 浓度为0.4 mmol/L时IPTG诱导时间0, 1, 2, 4, 6, 8 h].

图 3 *TcDUF1943* 表达条件的优化

重组蛋白表达系统主要有大肠杆菌表达系统、枯草芽孢杆菌表达系统、酵母表达系统、昆虫表达系统、哺乳动物细胞表达系统及植物病毒系统等。其中大肠杆菌表达系统是目前最为成熟的原核表达系统,其对应的表达载体之一 pET-28a(+),具有组氨酸融合表达标签,该标签相对分子质量较小,对外源蛋白的空间结构和活性影响较小,能使外源目的蛋白实现融合表达;pET系统的另一个重要优点是在非诱导条件下,外源蛋白处于沉默状态而不表达^[26]。试验中诱导表达的菌株是 *E. coli* BL21 菌株,该菌株缺少 *lon* 和 *ompT* 基因,是具有 T7 RNA 聚合酶基因的蛋白酶缺陷株,能减少重组蛋白的降解^[27],因此 *E. coli* 系统被广泛应用于生物学领域。

卵黄原蛋白功能结构域 DUF1943 能与微生物的保守组件即病原相关模式分子(Pathogen associated molecular patterns, PAMPs)相结合,发挥免疫活性作用。Li 等^[28-29]报道 Vg 的 2 个功能结构域 DUF1943 和 vWD 均能与 PAMPs 相结合,例如革兰氏阴性菌的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、革兰氏阴性/阳性菌的肽聚糖(Peptidoglycan, PGN)、革兰氏阳性菌的脂磷壁酸(Lipoteichoic acid, LTA)和真菌的葡聚糖(Glucan)^[30]等结合。Du 等^[31]发现后生动物大榔头珊瑚 *Euphyllia ancora*, *E. ancora* 的功能结构域 Vitellogenin_N, DUF1943 和 vWD 也可作为模式识别受体。而犬弓首蛔虫 DUF1943 是否具有同样的免疫活性作用,还需后续进一步的试验研究。



M. Marker; 1. pET-28a(+)-空载体诱导沉淀; 2. pET-28a(+)/*duf1943* 未诱导沉淀; 3. pET-28a(+)/*duf1943* 超声裂解上清; 4. pET-28a(+)/*duf1943* 超声裂解沉淀; 5. 亲和层析纯化后的 pET-28a(+)/*duf1943*。

图 4 *TcDUF1943* 纯化

参考文献:

- [1] SMITH H, HOLLAND C, TAYLOR M, et al. How Common is Human Toxocarasis? Towards Standardizing Our Knowledge [J]. Trends Parasitol, 2009, 25(4): 182-188.
- [2] SCHNIEDER T, LAABS E M, WELZ C. Larval Development of *Toxocara canis* in Dogs [J]. Vet Parasitol, 2011, 175(3/4): 193-206.
- [3] DAI R S, LI Z Y, LI F, et al. Severe Infection of Adult Dogs with Helminths in Hunan Province, China Poses Signifi-

- cant Public Health Concerns [J]. *Vet Parasitol*, 2009, 160(3/4): 348–350.
- [4] AKUTHOTA P, WELLER P F. Eosinophilic Pneumonias [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2012, 25(4): 649–660.
- [5] VIDAL J E, SZTAJNBOK J, SEGURO A C. Eosinophilic Meningoencephalitis Due to *Toxocara canis*: Case Report and Review of the Literature [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, 69(3): 341–343.
- [6] WIŚNIEWSKA-LIGIER M, WOŹNIAKOWSKA-GESICKA T, SOBOLEWSKA-DRYJA ŃSKA J, et al. Analysis of the Course and Treatment of Toxocariasis in Children—a Long-Term Observation [J]. *Parasitol Res*, 2012, 110(6): 2363–2371.
- [7] CHEN J, XU M J, ZHOU D H, et al. Canine and Feline Parasitic Zoonoses in China [J]. *Parasit Vectors*, 2012, 5(1): 152–160.
- [8] SMOLENAARS M M, MADSEN O, RODENBURG K W, et al. Molecular Diversity and Evolution of the Large Lipid Transfer Protein Superfamily [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(3): 489–502.
- [9] BABIN P J, GIBBONS G F. The Evolution of Plasma Cholesterol: Direct Utility or a “Spandrel” of Hepatic Lipid Metabolism? [J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(2): 73–91.
- [10] WANG H, YAN T, TAN J T, et al. A Zebrafish Vitellogenin Gene (vg3) Encodes a Novel Vitellogenin Without a Phosvitin Domain and May Represent a Primitive Vertebrate Vitellogenin Gene [J]. *Gene*, 2000, 256(1/2): 303–310.
- [11] AVARRE J C, LUBZENS E, BABIN P J. Apolipoprotein, Formerly Vitellogenin, is the Major Egg Yolk Precursor Protein in Decapod Crustaceans and is Homologous to Insect Apolipoprotein II/I and Vertebrate Apolipoprotein B [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7(1): 3–13.
- [12] TUFAIL M, TAKEDA M. Insect Vitellogenin/Lipoprotein Receptors: Molecular Structures, Role in Oogenesis, and Regulatory Mechanisms [J]. *J Insect Physiol*, 2009, 55(2): 87–103.
- [13] SAWAGUCHI S, KOYA Y, YOSHIKAWA N, et al. Multiple Vitellogenins (Vgs) in Mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and Characterization of Three Functional Vg Genes and Their Circulating and Yolk Protein Products [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(4): 1045–1060.
- [14] ARUKWE A, GOKSØYR A. Eggshell and Egg Yolk Proteins in Fish: Hepatic Proteins for the Next Generation: Oogenetic, Population, and Evolutionary Implications of Endocrine Disruption [J]. *Comp Hepatol*, 2003, 2(1): 4–24.
- [15] REITH M, MUNHOLLAND J, KELLY J, et al. Lipovitellins Derived from Two Forms of Vitellogenin Are Differentially Processed During Oocyte Maturation in Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. *J Exp Zool*, 2001, 291(1): 58–67.
- [16] SEEHUUS S C, NORBERG K, GIMSA U, et al. Reproductive Protein Protects Functionally Sterile Honey Bee Workers from Oxidative Stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 962–967.
- [17] GERBRON M, GERAUDIE P, XUEREB B, et al. In vitro and in Vivo Studies of the Endocrine Disrupting Potency of Cadmium in Roach (*Rutilus rutilus*) liver [J]. *Mar Pollut Bull*, 2015, 95(2): 582–589.
- [18] SERRANO M L, LUQUE M E, SÁNCHEZ S S. Xepac Protein and IP_3/Ca^{2+} Pathway Implication During *Xenopus laevis* Vitellogenesis [J]. *Zygote*, 2015, 23(1): 99–110.
- [19] ZHANG S, WANG S, LI H, et al. Vitellogenin, a Multivalent Sensor and an Antimicrobial Effector [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(3): 303–305.
- [20] JEON J M, LEE S O, KIM K S, et al. Characterization of Two Vitellogenin cDNAs from a Pandalus Shrimp (*Pandalopsis japonica*): Expression in Hepatopancreas is Down-Regulated by Endosulfan Exposure [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2010, 157(1): 102–112.
- [21] JIA X, CHEN Y, ZOU Z, et al. Characterization and Expression Profile of Vitellogenin Gene from *Scylla paramamosain* [J]. *Gene*, 2013, 520(2): 119–130.
- [22] FINN R N, FYHN H J. Requirement for Amino Acids in Ontogeny of Fish [J]. *Aquacult Res*, 2010, 41(5): 684–716.
- [23] PIULACHS M D, GUIDUGLI K R, BARCHUK A R, et al. The Vitellogenin of the Honey Bee, *Apis mellifera*: Structural Analysis of the cDNA and Expression Studies [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(4): 459–465.
- [24] MATOZZO V, GAGNÉ F, MARIN M G, et al. Vitellogenin as a Biomarker of Exposure to Estrogenic Compounds in Aquatic Invertebrates: a Review [J]. *Environ Int*, 2008, 34(4): 531–545.
- [25] KANG B J, JUNG J H, LEE J M, et al. Structural and Expression Analyses of Two Vitellogenin Genes in the Carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007, 148(4): 445–453.

- [26] 马 鑫, 王 斌, 胡雨晴, 等. 梁平柚葡萄糖基转移酶基因的克隆及原核表达 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(8): 63–67.
- [27] STUDIER W F, ROSENBERG A H, DUNN J J, et al. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes [J]. *Methods Enzymol*, 1990, 185(1): 60–89.
- [28] LI Z J, ZHANG S C, LIU Q H. Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1940.
- [29] LI Z, ZHANG S, ZHANG J, et al. Vitellogenin is a Cidal Factor Capable of Killing Bacteria via Interaction with Lipopolysaccharide and Lipoteichoic Acid [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(16): 3232–3239.
- [30] KHALIL S M S, DONOHUE K V, THOMPSON D M, et al. Full-Length Sequence, Regulation and Developmental Studies of a Second Vitellogenin Gene from the American Dog Tick, *Dermacentor Variabilis* [J]. *Insect Physiol*, 2011, 57(3): 400–408.
- [31] DU X Y, WANG X, WANG S, et al. Functional Characterization of Vitellogenin_N Domain, Domain of Unknown Function 1943, and von Willebrand Factor Type D Domain in Vitellogenin of the Non-Bilateria Coral *Euphyllia ancora*: Implications for Emergence of Immune Activity of Vitellogenin in Basal Metazoan [J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 67(2): 485–494.

Cloning and Prokaryotic Expression of the DUF1943 Domain of *Toxocara canis* Vitellogenin

LUO Yong-li, ZHU Hong-hong, JIANG Ai-yun,
LUO Yong-fang, KUANG Ce-yan, ZHOU Rong-qiong

College of Animal Science, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To clone the DUF1943 (the domain of unknown function 1943) of vitellogenin in *Toxocara canis*, the prokaryotic expression vector pET-28a (+) /*duf1943* of *Tc-duf1943* was constructed and its expression form in *Escherichia coli* was detected. According to the transcriptome data about *T. canis*, and using the cDNA of female and male as templates, *Tc-duf1943* was cloned successfully. Then the target gene was connected with the prokaryotic expression vector pET-28a(+) (pET-28a(+)/*duf1943*), *E. coli* BL21 (DE3) was transformed and the prokaryotic expression and purification of the protein was identified. The results showed that *Tc-duf1943* was 864 bp in length, with a complete open reading frame, encoding 288 amino acids, and SDS-PAGE indicated that the recombinant protein was expressed in inclusion bodies, with a molecular weight of about 3.5×10^4 . The optimal condition of prokaryotic expression was induced by 0.4 mmol/L IPTG for 4 hours at 37 °C. Purified with Ni-NTA affinity chromatography, target protein with high purity was obtained. In conclusion, this experiment successfully constructed the prokaryotic expression vector of pET-28a(+)/*duf1943*, which laid a foundation for further biological function study of *TcDUF1943*.

Key words: *Toxocara canis*; DUF1943; clone; prokaryotic expression

