

梅氏新贝尼登虫(*Neobenedenia melleni*)卵黄铁蛋白的 cDNA 克隆、原核表达及抗血清制备*

牛 禾 陈 炯 史雨红 李星云

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

提要 从 cDNA 文库中获得了梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白(NmYF)的编码序列。序列全长 739 个核苷酸, 3'-末端具有 polyA 尾, 单一大开放阅读框编码一个由 226 个氨基酸组成的分子量为 26.1kDa 的蛋白。序列比较表明, NmYF 与卫氏并殖吸虫卵黄铁蛋白最相似, 氨基酸序列同源性为 23.7%。系统进化树分析表明, NmYF、卫氏并殖吸虫卵黄铁蛋白和鳞头槽绦虫卵黄铁蛋白形成了一个小的进化簇, 而体铁蛋白序列形成了一个大的进化簇, 揭示了卵黄铁蛋白和体铁蛋白间的差异以及进化上的相关性。这是梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白基因序列的首次报道。随后, 构建了插入有全长 NmYF 基因开放阅读框序列的原核表达质粒 pET-22b-NmYF, 转化大肠杆菌 BL21 pLys E 菌株, 经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 检测表明预期大小的目的蛋白大量表达。随后制备了目的蛋白的多克隆抗血清, 它能与目的蛋白起强的特异性反应, 但与细菌自身蛋白不起反应, 可用于后续研究。

关键词 梅氏新贝尼登虫, 卵黄铁蛋白, 序列分析, 原核表达, 抗血清制备

中图分类号 Q18

梅氏新贝尼登虫(*Neobenedenia melleni*)隶属单殖目、分室科、新贝尼登虫属, 在世界范围内广泛分布, 它主要寄生于重要海水养殖鱼类, 如大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、鲢鱼(*Miichthys miiuy*)、石斑鱼(*Epinephelus awoara*)、真鲷(*Pagrosomus major*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等鱼类体表、鳍和鳃丝等部位。虫体破坏宿主黏液组织, 吸取宿主的血液或吞食体表组织, 引起宿主皮肤搔痒而不停摩擦养殖网箱, 进而导致皮肤溃疡糜烂和体表组织大面积创伤脱落, 病鱼烦躁不安, 食欲降低、厌食或拒食, 容易因衰竭而死亡(杨文川等, 2001a, b; Leong *et al*, 2002; 黄艳平等, 2003)。近年来, 由于养殖生态环境变化及高密度养殖等原因, 该病害在我国浙江、福建和广东沿海一带重要海水养殖地区频繁爆发, 鱼群自然感染率平均为 52.14%, 最高感染率达 100%(杨文川等, 2004), 严重地影响我国沿海水产养殖业的发展。寄生虫病害的严

重程度与养殖水体中虫卵数量密切相关(陈辉等, 2005), 因此, 快速准确地检测水体中梅氏新贝尼登虫虫卵对于监控病害发生有重要的意义。

卵黄铁蛋白(Yolk ferritin)是一种对生物体内铁的新陈代谢起到重要作用的胞内蛋白(Yi *et al*, 2006), 其编码基因的表达具有性别和组织特异性, 在雌虫性成熟和产卵的过程中起重要作用(Dietzel *et al*, 1992)。卵黄铁蛋白的分子量一般为 24—30kDa, 而体铁蛋白(Soma ferritin)的分子量为 19—22kDa, 并且卵黄铁蛋白与体铁蛋白的序列同源性很低(VonDarl *et al*, 1994)。因此, 本文拟采用文库随机测序方法, 获得梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白全长基因, 并原核表达制备抗血清, 为进一步建立虫卵的血清学快速检测技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pET-22b(+)购自 Novagen 公司, 大

* 国家高技术研究与发展计划(863 计划)项目, 2006AA020701 号; 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目, NCET-08-0928 号; 浙江省科技厅重点项目, 2008C22049 号。牛 禾, E-mail: niuhe1226@163.com

通讯作者: 陈 炯, E-mail: jchen1975@163.com

收稿日期: 2008-11-16, 收修改稿日期: 2009-01-23

肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 pLys E 菌株购自 Promega 公司, QIAquick Gel Extraction 购自 QIAGEN 公司, SDS-PAGE 低分子量蛋白标准购自中国科学院上海生物化学研究所, cDNA Library Construction Kit, RNAiso Reagent, Ex Taq DNA 聚合酶、pMD19-T Simple Vector、T₄ DNA 连接酶、Nde 和 BamH 等均购自 TaKaRa 公司, 羊抗鼠 IgG(碱性磷酸酶共价结合)购自 Sigama 公司, 其余药品试剂均为进口分析纯。用淡水浸泡法自浙江省宁波市象山黄避香港湾水产养殖育苗中心养殖的大黄鱼体表分离梅氏新贝尼登虫成虫, 暂养于海水中至肠道内含物排空后, 用无菌双蒸水反复冲洗虫体后 -70 保存备用。

1.2 总 RNA 抽提和 cDNA 文库构建

用 RNAiso 试剂提取梅氏新贝尼登虫总 RNA, 用 Oligotex-dT30 super 纯化 mRNA, 以其为模板, pBluescript SK II(+) 为载体, 采用 cDNA Library Construction Kit 构建 cDNA 文库, 方法参照厂家说明。

1.3 卵黄铁蛋白基因的克隆及序列分析

随机挑选 192 个克隆, 部分测序并经 BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析, 测通与已知物种卵黄铁蛋白相似的插入片段。多重序列比对采用 ClustalW 程序 (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>), 系统进化树分析采用 MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)。

1.4 原核表达质粒的构建和诱导表达

设计引物对 NmYF(+) (5'-GCATATGGAATCTACC CGTATCAAC-3') 和 NmYF(-) (5'-GGGATCCTATTCCAAG TTCTTCAAGTCG-3')(下画线为添加的限制性内切酶 Nde 和 BamH 的识别序列), 以前所鉴定的梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白(NmYF) 基因克隆为模板, 扩增梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白基因的全长阅读框序列, 扩增产物经 1%(W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 QIAquick Gel Extraction 纯化。纯化产物用 Nde 和 BamH 双酶切后, 插入到同样双酶切的原核表达载体 pET-22b(+) 中, 获得质粒 pET-22b-NmYF。pET-22b-NmYF 转化大肠杆菌

BL21 pLys E 菌株, IPTG 诱导表达, 细菌裂解产物经 SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色检测表达情况。

1.5 抗血清的制备和 Western blot 分析

能正确表达外源基因的大肠杆菌经裂解后用 12% SDS-PAGE 和 5%—20% 的梯度胶二次分离, 0.25mol/L KCl 染色后, 切下目的蛋白条带免疫小鼠, 制备抗血清。Western blot 检测抗血清特异性, 二抗为羊抗小鼠 IgG(碱性磷酸酶共价结合), BCIP/NBT 显色, 方法参照文献(Sambrook *et al.*, 1989)描述。

2 结果与分析

2.1 NmYF 基因 cDNA 序列分析

192 个随机挑选的克隆测序结果分析表明, 共有 3 条序列与已测定的物种卵黄铁蛋白具有一定的同源性, 这些序列彼此间同源性>99%。测通了最长插入片段的克隆 pBS-NmYF-1。NmYF 基因 cDNA 序列 (EMBL 登录号 FM863702) 长 739 个核苷酸, 3'-末端具有 poly(A) 尾, 计算机分析表明, 该序列含一个大的开放阅读框, 起始于第 6—8 位的一个 ATG 起始密码子, 终止于第 684—686 位的一个 TAG 终止密码子, 编码一个由 226 个氨基酸组成的分子量为 26.1kDa 的蛋白, N-端无信号肽序列(图 1)。

氨基酸序列比对表明, NmYF 与卫氏并殖吸虫

	CCCAA	5
ATGGAATCTACCCGTATCAACTACAGCAACGAATGTGAGGTGAAGGTGAACGACCTCATTGTGAAGTTGCTCGGCGGTGAG		86
M E S T R I N Y S N E C E V K V N D L I V K L L G G E		27
CAGACCTATAACCACTCGCCACTTGTGCTTACCAGAGAAGGTGAACATGTTCAACATGGGCGCTATTTGCAACAGTGT		167
Q T Y T N L A H L C F T E K V N M F N M G A Y F E Q C		54
GGTTTGAGAATCGCTGTCTGGCCGACAAAATGATGCGCTACCAATGCATCCGTGGAGGTATTGTGCGATTACCCGAGGTG		248
G L R M R C L A D K M M R Y Q C I R G G I V R F T E V		81
AACAACCTTCTCACTGTCTACCGTCAACGAGATCTTACCAACATCCCCATCAAGAAGCTCATCAGCATCGCCTTCGAC		329
N N L F T C P T V N E I F T N I P I K K L I S I A F D		108
AGTGAGAAGATTATTGAGCAGACTCTCCGTGAGTTGAACACTTTGGCTCGCAAAACAAAATGACTGTGTGACTGGCGAAATC		410
S E K I I E Q T L R E L N T L A R K Q N D C V T G E I		135
ACCGAGGCAAGCTCATGCAACACCAGCTCTACATGCTCACCATGCTCAAGAAGCAGATGAACACCTTGGAGCAATTTCGAG		491
T E G K L M Q H Q L Y M L T M L K K H M N T L E Q F E		162
GTCGAGCACAACCAACGAAAGACCCCTTGAACGGCTCTACACTTTGACCCGATTGTGATGCCACCGAAGTGCAA		572
V E H N T N G K T P L N G V Y T F D R I V M P T E V Q		189
CGCCTCATCGAGCTCATATCCAACACTTTGGAATGAACAAGATCAACATGACCGTTGGCAAGACCTGTGATACTTTGTGC		653
R L I E L I S N Y F G M N K I N M T V G K T C D T L C		216
ACCGAGTTTTGCACTTGAAGAACTTGAATAGATTTTATCAACCCCAAACATCATAATATAAACTATTATTGTAAATAT		734
T G V F D L K N L E *		226
CGATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		760

图 1 梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白(NmYF)基因 cDNA 序列

Fig.1 Nucleotide sequences of yolk ferritin gene from *N. melleni*

(*Paragonimus westermani*) 卵黄铁蛋白同源性最高, 为 23.7%, 不同物种的卵黄铁蛋白分子量相似, 但同源性很低, 仅 17.2%—23.7%; 相对的, 不同物种的体铁蛋白同源性却很高, 达 42.9%—97.7%, 这和之前所报道的卵黄铁蛋白与体铁蛋白的区别吻合 (VonDarl *et al.*, 1994)。系统进化树分析表明, NmYF、卫氏并殖吸虫卵黄铁蛋白和鳞头槽绦虫(*Bothriocephalus acheilognathi*)卵黄铁蛋白形成了一个小的进化簇, 而其它低等动物的体铁蛋白形成了一个大的进化簇, 这两个簇间进化关系较远(图 2)。

2.2 原核表达和抗血清制备

以 pBS-NmYF-1 为模板, 用引物对 NmYF(+)/

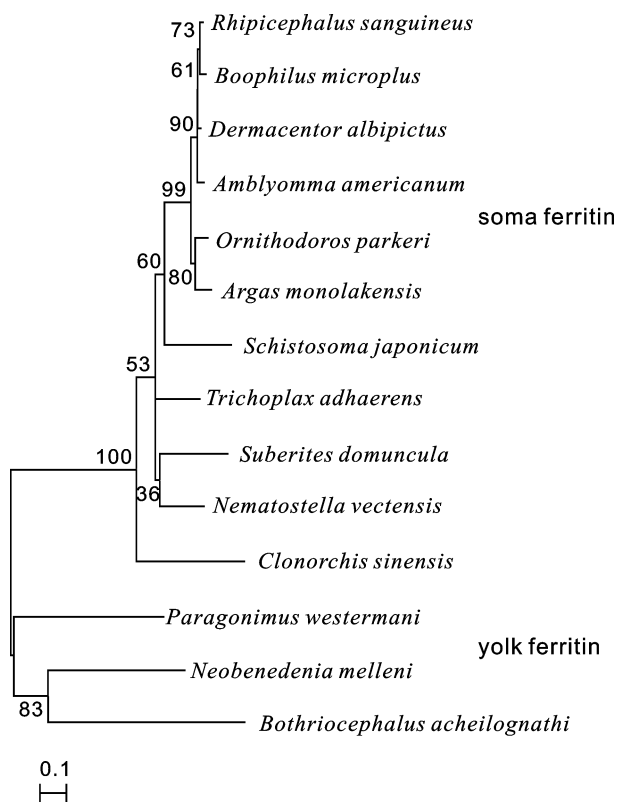


图 2 采用 Neighbor-Joining 方法分析低等动物卵黄铁蛋白及体铁蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic analysis on amino acid sequences of animal yolk ferritin using neighbor-joining method

注: 分叉上的数值表示 1000 次成树中该簇出现的次数百分比, 仅数值>60%的显示。标尺长度表明每个碱基发生 0.1 次置换。使用的卵黄铁蛋白和体铁蛋白序列登录号如下: 血红扁头蜱 AY277907; 微小牛蜱 AY277902; 白纹革蜱 AY277903; 美洲钝眼蜱 AY277900; 钝缘蜱 EF633872; 锐缘蜱 DQ886716; 日本血吸虫 AF040385; 丝盘虫 XM002112140; 寄居蟹皮海绵 AJ306615; 海葵 XM001631961; 华支睾吸虫 AY520542; 卫氏并殖吸虫 AF367368; 梅氏新贝尼登虫 FM863702; 鳞头槽绦虫 AY362873

NmYF(-)成功扩增到 681bp 大小的预期片段。原核表达质粒 pET-22b-NmYF 经测序验证, 插入无误, 且具有正确的开放阅读框。质粒在大肠杆菌 BL21 pLys E 中经 IPTG 诱导表达后, 通过 SDS-PAGE 分离, 出现一条高表达的诱导蛋白带, 分子量为 26.1kDa 左右 (图 3 左列), 与 NmYF 预测的分子量大小一致。该片段切胶纯化后免疫小鼠, 制备抗血清。

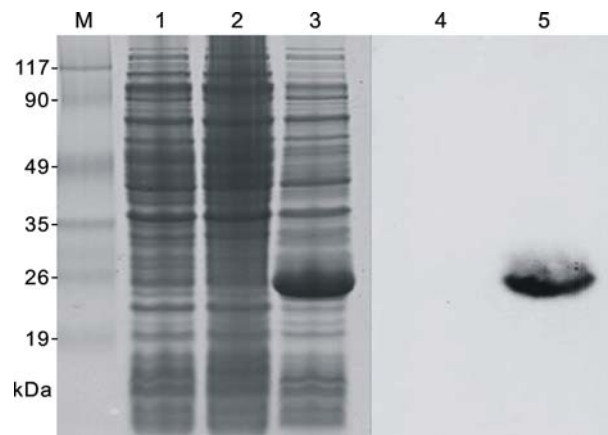


图 3 梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白基因原核表达产物 SDS-PAGE 分析及 Western blot 检测

Fig.3 Analysis in prokaryotic expression of yolk ferritin gene from *N. melleni*

注: a. SDS-PAGE 分析; b. Western blot 检测。M 为蛋白质分子量标准, 大小(kDa)在图左标示; 1: pET-22b(+)载体转化的 BL21 pLysE 菌, 未经 IPTG 诱导的裂解物; 2、4: pET-22b-NmYF 转化的 BL21 pLysE 菌, 未经 IPTG 诱导的裂解物; 3、5: pET-22b-NmYF 转化的 BL21 pLysE 菌, 经 IPTG 诱导后的裂解物

2.3 Western blot 检测

Western blot 检测表明, 制备的抗血清能与转化有 pET-22b-NmYF 质粒的 BL21 pLysE 裂解物起强特异性反应, 且杂交条带分子量为 26.1kDa 左右(图 3 右列), 与 pET-22b(+)载体空转的 BL21 pLysE 裂解物不起反应。

3 讨论

在本研究中, 作者测定了梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白基因的 cDNA 序列, 序列长 739 个核苷酸, 单一开放阅读框编码一个由 226 个氨基酸组成的蛋白, N-端无信号肽序列。氨基酸序列比对和系统进化树分析均表明, NmYF 与已报道的卫氏并殖吸虫卵黄铁蛋白和鳞头槽绦虫卵黄铁蛋白相似, 与已报道的低等动物体铁蛋白差异明显, 这是梅氏新贝尼登虫

卵黄铁蛋白序列的首次报道。

梅氏新贝尼登虫成虫的常规防治技术已有一些研究报道,例如,采用淡水浸泡法,2min后虫体可全部从寄主脱落死亡(Kanekoll *et al*, 1988),但该操作强度大,鱼体易受伤,处理的鱼在一周左右又会被寄生虫重新感染,同时水体环境盐度变化也会导致鱼体应激反应,甚至死亡。实验室条件下,使用福尔马林、高锰酸钾、敌百虫及乐果等药物也能有效杀灭贝尼登虫(Dyer *et al*, 1992),然而这类物质在开放水域的大量使用将导致生态环境破坏,危及消费者人身安全,并且这些方法大都在病害爆发后才能使用。

梅氏新贝尼登虫每只成虫可产卵数百枚,卵孵化成钩毛蚴后再度侵袭鱼体,整个生活史在15—22天(杨文川等,2002)。研究表明,养殖水体中寄生虫卵的数量,与相关病害发生的严重程度紧密相关(陈辉等,2005),因此,快速准确地检测水体梅氏新贝尼登虫虫卵对于监控该病害发生有重要的意义。然而,目前对于梅氏新贝尼登虫的分子生物学研究报道很少,因此,何种抗原可用于水体环境中虫卵的免疫诊断尚不得而知。本研究表明,NmYF与其它物种相似蛋白的序列同源性很低。从血清学诊断的观点来看,这种序列的低相似性将使得它能有更好的抗原特异性,例如卫氏并殖吸虫重组卵黄铁蛋白已作为抗原用于该病原的免疫诊断(Kim *et al*, 2002)。梅氏新贝尼登虫卵黄铁蛋白基因的克隆、原核表达及抗血清制备,为进一步研究卵黄铁蛋白的结构、功能创造了条件,同时也为今后研究该蛋白是否可作为梅氏新贝尼登虫特异的免疫诊断抗原奠定了基础。

参 考 文 献

杨文川,李立伟,王彦海,2004.福建海水养殖鱼类本尼登虫病研究.海洋科学,28(7):36—39
 杨文川,李立伟,石磊等,2001a.福建海水养殖鱼类寄生贝尼登虫病原学研究.台湾海峡,20(2):205—209

杨文川,李立伟,石磊等,2001b.厦门养殖石斑鱼两种贝尼登单殖吸虫记述.厦门大学学报(自然科学版),40(5):1133—1137
 杨文川,李立伟,石磊等,2002.新本尼登虫(单殖目:多室科)的发育.动物学报,48(1):75—79
 陈辉,杨鸾劫,秦桂祥等,2005.集约化养殖暗纹东方纯常见寄生虫流行病学调查及防治研究.中国兽医寄生虫病,13(2):58—62
 黄艳平,杨先乐,湛嘉等,2003.贝尼登虫及其危害的研究进展.海洋渔业,(2):58—61
 Dietzel J, Hirschmann J, Preis D *et al*, 1992. Ferritin of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms. Molecular and Biochemical Parasitology, 50(2): 245—254
 Dyer W G, Williams E H J, Bunkley W L, 1992. *Neobenedenia parguraensis* n. sp. (Monogenea: Capsalidae) from the red hind, *Epinephelus guttatus*, and comments about *Neobenedenia melleni*. The Journal of Parasitology, 78(3): 399—401
 Kanekoll J J, Yamada R, Brock J A *et al*, 1988. Infection of tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Trewavas), by a marine monogenean, *Neobenedenia melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963 in Kaneohe Bay, Hawaii, USA, and its treatment. Journal of Fish Diseases, 11(4): 295—300
 Kim T Y, Joo I J, Kang S Y *et al*, 2002. Recombinant *Paragonimus westermani* yolk ferritin is a useful serodiagnostic antigen. Journal of Infectious Diseases, 185(9): 1373—1375
 Leong T S, Colorni A, 2002. Infection diseases of warm water fish in marine and brackish waters. London, UK: Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture, 193—230
 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular cloning—A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 352—356
 Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596—1599
 VonDarl M, Harrison P M, Bottke W, 1994. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of two ferritins: soma ferritin and yolk ferritin, from the snail *Lymnaea stagnalis* L. European Journal of Biochemistry, 222(2): 353—366
 Yi T, Pyo Y C, Tae I K *et al*, 2006. *Clonorchis sinensis*: Molecular cloning, enzymatic activity, and localization of yolk ferritin. Journal of Parasitology, 92(6): 1275—1280

YOLK FERRITIN FROM *NEOBENEDENIA MELLENI*: cDNA CLONING, PROKARYOTIC EXPRESSION AND ANTISERUM PREPARATION

NIU He, CHEN Jiong, SHI Yu-Hong, LI Ming-Yun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract A full-length cDNA clone of yolk ferritin gene was isolated from the cDNA library of *Neobenedenia melleni* and tentatively named as NmYF, which was the first report of yolk ferritin gene from *N. melleni*. It was 739bp long and contained a large open reading frame (ORF) encoding a 26.1kDa protein. The NmYF was very similar to yolk ferritin of *Paragonimus westermani* in the sequence, and formed a small cluster of phylogenetic tree with yolk ferritins of *P. westermani* and *Bothriocephalus acheilognathi*, while soma ferritins formed another big cluster, showing distinct difference between yolk ferritin and soma ferritin. Furthermore, the prokaryotic expression plasmid pET-22b-NmYF containing the intact ORF was constructed and the aim protein was induced by IPTG. The SDS-PAGE analysis showed that the aim protein could be highly expressed in the expected size. A polyclonal antiserum raised to the aim protein reacted strongly with itself by western blot.

Key words *Neobenedenia melleni*, Yolk ferritin, Sequence analysis, Prokaryotic expression, Antiserum preparation