

代艳艳,廖秋萍,贾桂珍,等. 新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因克隆及鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):24-26.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.007

新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因克隆及鉴定

代艳艳,廖秋萍,贾桂珍,周桐,罗福江,周玉琴,王帅,赵丽,刘永宏

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘要:为了克隆及鉴定新疆南疆地区微小牛蜱 *Bm86* 基因,参照 GenBank 登录的微小牛蜱 *Bm86* 基因序列,设计了可以扩增 *Bm86* 基因完整阅读框架的引物,对微小牛蜱进行总 RNA 提取、RT-PCR、克隆、测序、序列分析。结果表明,获得的 *Bm86* 基因长 1 953 bp,与 GenBank 中登录号为 M29321、HQ014398 的微小牛蜱 *Bm86* 基因核苷酸同源性分别为 99%、97%,且为一个完整的开放阅读框架。本研究获得的微小牛蜱 *Bm86* 基因,为获得基因工程疫苗的候选抗原及中国抗微小牛蜱疫苗制备奠定了基础。

关键词:南疆;微小牛蜱;*Bm86* 基因;克隆

中图分类号: S852.74*6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0024-03

微小牛蜱为典型的一宿主蜱,是我国分布最广的一个种^[1],属于蜱类最常见、危害最大的硬蜱科扇头蜱亚科扇头蜱属^[2]。该蜱主要生活于农区,在新疆喀什及周边地区多见。该蜱主要寄生于牛,也常寄生于其他家畜和野生动物,也侵袭人类。可引起动物贫血、消瘦、发育不良、产乳量下降或肢体麻痹,更重要的是感染动物免疫抑制,使蜱更易于存活或传播疾病。在我国,微小牛蜱是其他许多寄生虫的传播媒介和传播者,也能自然感染一些人畜共患病等^[3]。因此做好微

小牛蜱及其蜱传病的防治工作,对新疆乃至全国畜牧业健康发展意义重大。

微小牛蜱 *Bm86* 是 Willadsen 等^[4-5]从半饱血微小牛蜱雌蜱肠道分离的一种膜结合糖蛋白,是一种较好的保护性抗原。Penichet 等证实,*Bm86* 抗原在不同株的微小牛蜱肠道细胞膜上均存在,重组 *Bm86* 表达产物对抗药性微小牛蜱也有免疫抵抗作用^[6]。García - García 等研究发现,在大肠杆菌中 *Bm86* 基因表达的产物为融合蛋白包涵体,用该包涵体免疫的牛对微小牛蜱具有明显的抵抗力^[7]。李文卉等将 *Bm86* 基因进行真核表达获得了其重组蛋白^[8];樊瑞泉等^[9]、马米玲等^[10]将 *Bm86* 基因克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1,转化大肠杆菌后得到能被兔抗微小牛蜱全蜱阳性血清所识别的包涵体。

蜱的防治已成为国内外畜牧业发展迫切须要解决的课题,传统蜱防治方法造成的环境污染、食品安全、药物残留、抗药性等问题日趋严重。免疫防治可使宿主增强免疫力,针对

收稿日期:2014-02-21

基金项目:新疆生产建设兵团博士资金(编号:2012BB023);塔里木大学大学生创新创业训练计划(编号:2013107570030)。

作者简介:代艳艳(1994—),女,河南鹿邑人,研究方向为动物传染病与免疫病理学。E-mail:2275781936@qq.com。

通信作者:赵丽,博士,副教授,主要从事动物疫病研究。E-mail:zhaolidky@126.com。

[7]侯维海,孙鹏,陈全家,等. 地黄实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 中国农学通报,2011,27(17):76-82.

[8]孙鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄 *RgPR-10* 基因的克隆与表达[J]. 西北农业学报,2009,18(1):300-304.

[9]Yang Y H, Chen X J, Chen J Y, et al. Identification of novel and conserved microRNAs in *Rehmannia glutinosa* L. by solexa sequencing [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(4): 986-996.

[10]侯维海. 地黄 ABA、GA 和部分寡糖合成代谢关键酶基因克隆与表达分析[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2011.

[11]臧亚超,孙鹏,杨太新,等. 地黄扩展蛋白基因 *RgExpA1* 的克隆与表达分析[J]. 生物技术通报,2012(4):69-73.

[12]周延清,姚换灵,段红英,等. 怀地黄基因片段及其中转座酶基因的克隆与序列分析[J]. 河南农业科学,2012,41(1):106-109.

[13]周延清,张永华,陈艳梅,等. 怀地黄液泡质子泵焦磷酸水解酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 河南农业科学,2013,42(3):107-111,114.

[14]周延清,张永华,张喻,等. 怀地黄 3-酮酯酰 CoA-硫解酶基因的克隆、序列特征和时空表达分析[J]. 中草药,2013,44(1):

76-84.

[15]Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.

[16]Manning K, Wood D A. Production and regulation of extracellular endocellulase by *Agaricus bisporus* [J]. Microbiol, 1983, 129(6): 1839-1847.

[17]张智俊,杨洋,何沙娥,等. 毛竹纤维素合成酶基因 *PeCesA* 的克隆及组织表达谱分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1485-1492.

[18]田志坚,易蓉,陈建荣,等. 苧麻纤维素合成酶基因 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 作物学报,2008,34(1):76-83.

[19]张永华. 地黄基因 *RgVP*、*RgIKAT* 与 *RghBNG* 的克隆和表达[D]. 新乡:河南师范大学,2013.

[20]Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences[J]. BioTechniques, 2007, 43(5): 649-650, 652, 654.

性地消灭特定蝇种,污染极低,有利于环境保护和人类健康,最主要的是可使易感动物具有一定抵抗力,有助于蝇种群和蝇传病的控制^[11-12],是有效防治蝇及蝇传病的一个研究方向。抗蝇疫苗在蝇类防治中具有很大的潜力,比传统化学防治更有应用前景。目前,以基因工程手段研制疫苗是抗蝇疫苗的主要方向^[13]。抗蝇疫苗的成功研制,首先在于调节其生理作用的有效功能性抗原的鉴定、识别及作为高效重组体的表达。本研究针对新疆南疆地区优势蝇种微小牛蝇,对其 *Bm86* 基因完整阅读框架进行克隆,以期为后续该基因的表达、免疫抗原制备和抗微小牛蝇疫苗的研制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 微小牛蝇 采自喀什地区牛和阿克苏地区羊。

1.1.2 菌种和主要试剂 宿主菌 *E. coli* DH5 α 由笔者所在实验室保存。Trizol invitrogenTM (Code No.: 15596-026), 购自 Invitrogen 生物工程有限公司; TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Code No.: DRR019A), Premix TaqTM Version 2.0 (Code No.: D331A) 购自宝生物工程(大连)有限公司; TIANgel Midi Purification Kit (Code No.: DP209)、TIANprep Mini Plasmid Kit (Code No.: DP103)、pGM-T 克隆试剂盒 (Code No.: VT202)、D2000 DNA Marker (Code No.: MD114) 均购自天根生化科技(北京)有限公司; IPTG、X-Gal、Gold view、6 \times Loading Buffer、氨苄青霉素、无水氯化钙、氯仿、无水乙醇等试剂,均购自北京金泰博达生物科技有限公司。

1.1.3 引物 按照引物设计原则,利用 Primer Premier 5.0 分子生物学软件,以 GenBank 数据库中微小牛蝇 *Bm86* 基因全序列为模板,设计扩增 *Bm86* 基因完整阅读框架的特异性引物, P1: 5' - ATGCGTGGCATCGCTTTGTTCG - 3', P2: 5' - TTACAACGATGCTGCGGTGACTG - 3', 预期扩增大小为 1 953 bp,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.1.4 仪器 PCR 仪 (TC-5000, Bibby scientific Ltd)、小型高速冷冻离心机 (R134a, Hermetically sealed refrigeration system)、电泳仪 (DYY-12, 北京市六一仪器厂)、紫外分析仪 (JY02S, 北京君意东方电泳设备有限公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 以微小牛蝇为材料,按 Trizol invitrogenTM 试剂盒说明书提取总 RNA。

1.2.2 RT-PCR 反应 总 RNA 按照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 试剂盒,利用已设计的特异性引物 P1、P2 扩增 *Bm86* 基因,退火温度 58 $^{\circ}$ C。

1.2.3 PCR 产物纯化回收 取 *Bm86* 基因 RT-PCR 扩增产物电泳切胶后,按照 TIANgel Midi Purification Kit 试剂盒说明进行回收纯化。

1.2.4 纯化产物连接 T 载体 胶回收纯化的目的 *Bm86* 基因产物,按照 pGM-T 克隆试剂盒说明操作与 pGM-T 载体连接。

1.2.5 DH5 α 感受态细胞制备 DH5 α 受体菌,37 $^{\circ}$ C 培养收集菌液,采用 CaCl₂ 法制备 DH5 α 感受态细胞,新鲜即可使用,或 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.6 转化 DH5 α 感受态细胞、鉴定、摇菌提取质粒及测序

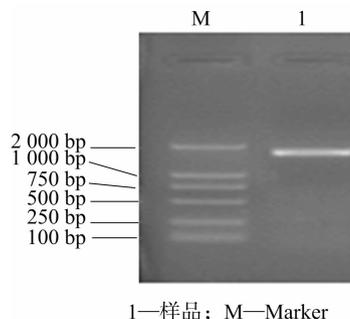
将连接产物转化自制的 DH5 α 感受态细胞进行蓝白斑筛选。白色菌落按照 Premix TaqTM Version 2.0 试剂盒说明,利用自行设计的 P1、P2 引物进行菌落 PCR 鉴定;挑取 PCR 阳性菌落接种液体培养基摇菌,按照 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒说明提取质粒 DNA,标记后送生工生物工程(上海)有限公司测序,测序引物为 T7。保存阳性菌和质粒。

1.2.7 序列分析 测序结果用 BLAST 在线平台分析与其核苷酸同源性最高的序列。

2 结果与分析

2.1 *Bm86* 基因 RT-PCR 扩增

以微小牛蝇为材料提取总 RNA,一步法 RT-PCR 反应,扩增出大小约 1 953 bp 的特异性条带,与预期结果一致(图 1)。

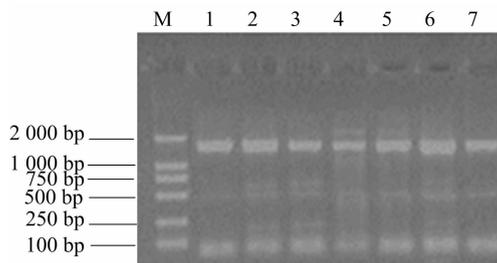


1—样品; M—Marker

图1 *Bm86* 基因 RT-PCR 扩增结果

2.2 菌落 PCR 鉴定

挑取 7 个白色菌落,利用 P1、P2 引物进行 PCR 鉴定,结果均为阳性(图 2)。



1~7—菌落; M—Marker

图2 菌落 PCR 的电泳结果

2.3 测序分析

将微小牛蝇经 RT-PCR、克隆、测序所得 *Bm86* 基因序列,长度为 1 953 bp。利用 BLAST 在线平台分析,显示与其核苷酸同源性较高的前 2 个序列 GenBank 登录号为 M29321、HQ014398,核苷酸同源性分别是 99% (1 926/1 953 bp)、97% (1 901 bp/1 953 bp),已登录的这 2 个序列基因均来源于微小牛蝇。本研究测序得到的序列为一个完整开放阅读框架。测得 *Bm86* 基因序列见图 3。

3 结论与讨论

微小牛蝇 *Bm86* 是 Willadsen 等^[4-5] 从半饱小微牛蝇雌蝇肠道分离的一种膜结合糖蛋白,是一种较好的保护性抗原。当微小牛蝇吸食其免疫的牛血液时,血液中的抗体与蝇肠道表面相应糖蛋白结合,从而使蝇肠道受到严重损伤,当牛血

ATGCGTGGCATCGCTTTGTTCTGTCGCCGCTGTTTCACTGATTGTAGAGGGCACAGCAGAATCATCCATTTGCTCTGACTTTGGGAAC
 GAGTTCCTGTCGCAACGCTGAATGCGAAGTGGTGCCTGGTGCAGAGGATAATTCGTGTGCAAATGTCGCGAGATAACATGTACTT
 CAATGCTGCTGAAAAACATGCGAATATAAAGACACGTGCAAGACAAGGGAGTGCAGCTATGGACGTTGCGTTGAAAGTAACCC
 GAGCAAAGGTAGCTGCGTCTGCGAAGCATCGGACGATTAACGCTACAATGCAACATTAACAATGACTTCGCAACTGACTGTCAA
 AATCGAGGTGGTACTGCTAAGTTGCGCACGGATGGGTTTATTGGCGCAACGTGTGACTGCGGTGAATGGGGCGCGATGAACATGA
 CCACCCGGAAGTGTGTCCTACCAGTGTCTTCGTCCCGACTTGACCTGCAAAGACCTCTGCGAGAAAAACCTGCTTCAAAGGGAT
 TCTCGTTGTTGCCAGGGGTGGAACACAGCAAAGTGTTCAGCCGCTCCTCCAGCTGACTCCTATTGCTCTCTGGGAGCCCCAAAGG
 ACCGGACGGACAGTGTATAAATGCTTGCAGACGAAAGAAGCTGGGTTTGTCTGCAAGCATGGATGCAGGTGACCCGGCAAGGCCG
 TACGAGTGCACGTGCCCGAGTGGCTACCGTCGCCGAAGATGGCATTACCTGCAAAAGTATTTGCGACACAGTCAGCTGCAGTGC
 TGAGCAAAAACAGACCTGCCGCCCAACCGAAGACTGTCTGTGTCACAAAGGAAGTGTGTTGTGTGAGTGCCTGGTGAATCAACAT
 CTAGTGGGGGACACGTGCATAAGTGATTGCGTGCACAAGAAATGCCACGAAAGAAATTTATGGACTGTGGCGTATATATGAATCGAC
 AAAGCTGCTATTGTCATGGAATCAAGGAAGCCGGGCCAAATGTCAACATCAATGAATGCCTACTGAATGAGTATTACTACAC
 GGTGTCATTCACCCAAACATATCTTGTATTCTGATCATTGCGACTGGTATGAGGATCGTGTGTTTGGAAAGCGGTACGGACCAGTA
 TTGAAAAAGAAGTTTTAAAGGTTGAGATACTTAAGTGCACGACGAGGACATTAAGGCAAGACTCATAGCAGAGAAACCACTGTCAA
 ACACGTGCTCAGAAAACATAAAGCATGCGAGCATCCAATCGCGCAATGGTGCATGATGATCCTCGAAGTTGCTGATCAAGAAAAAC
 TCTGCAACAGAAATCGAAGAAGAGAACCTTTGCGACAGTCTGCTCAAGGATCAGGAAGCTGCCTACAAAGGTCAAAAACAAATGCG
 TCAAGGTCGACAACCTCTTCTGGTTCCAGTGCCTGATGGTTACACAACAACCTTACGAGATGACACGAGGTGCGCTACGCCGCTCC
 GTGTGTAAGGCTGGAGTTTCTTGAACGAAAACGAGCAGTTGGAGTGTGCTAACAAAGGGCAAAATTTGTTTACGAAAACGGCA
 AAGCGAATTGCCAATGCCACCAGACACTAAAACCTGGGGAGATTGGCTGCATTGAGCGTACCACATGCAACCCATAAAGAAATACA
 AGAATGCCAAGACAAGAAGCTCGAGTGCCTTACAAAAACATAAAGCAGAATGCGAGTGCCTGATGATCAGAGTGTACAGG
 GAGCTGCCAAAGACTCTTGCAGTGAAGGATAAATGTTAAATGTCACAAAGCAGTGGCGACGCTGTGTGTAATAGAAAACGGAAAG
 GCTGTTTGAAGGAAAAGTCTGATGCAACAACAGCTGCGACTACAACAACGAAAGCGAAAGACAAGAATCCAGATCCTGAAAAG
 TCAAGTGTGCAGCAGTATCAGCTACTGGGCTCTGTTACTGCTCGCAGCTACTTCAGTCCACCGCAGCATCGTTGTAA

图3 *Bm86* 基因序列

液渗入蜱血淋巴后,能进一步引起蜱的大规模死亡以及繁殖、生存能力下降等。本研究从新疆南疆地区微小牛蜱体内成功克隆了 *Bm86* 基因,长度为 1 953 bp,与预期一致,为一个完整的开放阅读框架,其核苷酸序列与 GenBank 中登录号为 M29321、HQ014398 的微小牛蜱 *Bm86* 基因核苷酸同源性分别为 99%、97%,说明该基因也存在于我国微小牛蜱体内。

虽然已证实 *Bm86* 基因对微小牛蜱免疫保护作用良好,但天然 *Bm86* 基因抗原在微小牛蜱体内含量少,难以获得,所以 *Bm86* 基因重组蛋白的获得及其是否具备免疫原性至关重要。国内外许多学者利用原核表达和真核表达系统对其进行表达^[7-10]。但基因表达水平与许多因素有关,笔者拟用含有 CMV 强启动子和增强子的 pVAX1 高效真核表达载体对其进行表达,构建 DNA 疫苗。因此,获得一个完整阅读框架的 *Bm86* 基因至关重要,本研究中 *Bm86* 基因的获得、测序、鉴定工作已完成,且基因变异小,序列保守,适合作为基因工程疫苗的候选抗原,对制备抗微小牛蜱疫苗具有重要价值。

参考文献:

- [1] 邓国藩,姜在阶. 中国经济昆虫志[M]. 北京:科学出版社,1991: 345-349.
- [2] 陈泽,杨晓军,刘敬泽. 蜱类分类系统的变更[J]. 昆虫知识, 2009,46(2):323-326.
- [3] 马腾. 镰形扇头蜱肌钙蛋白 I 基因的克隆及表达[D]. 北京: 中国农业科学院,2006.
- [4] Willadsen P, Riding G A, McKenna R V, et al. Immunologic control of a parasitic arthropod: identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*[J]. The Journal of Immunology, 1989, 143(4): 1346-1351.
- [5] Willadsen P, Bird P, Cobon G S, et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*[J]. Parasitology, 1995, 110:43-50.
- [6] Penichet M, Rodriguez M, Castellano O, et al. Detection of *Bm86* antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant *Bm86*[J]. Parasite Immunology, 1994, 16(9):493-500.
- [7] García - García J C, Montero C, Rodríguez M, et al. Control of ticks resistant to immunization with *Bm86* in cattle vaccinated with the recombinant antigen *Bm95* isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*[J]. Vaccine, 2000, 18(21):2275-2287.
- [8] 李文卉, 罗建勋, 殷宏, 等. 微小牛蜱 *Bm86* 基因的真核表达[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(9):718-722.
- [9] 樊瑞泉, 罗建勋, 杨孝朴, 等. 微小牛蜱 *Bm86* 基因的克隆与原核表达[J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42(1):15-19.
- [10] 马米玲, 关贵全, 李有全, 等. 微小牛蜱 *Bm86* 基因的原核表达与表达条件的优化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(6):531-533.
- [11] Vargas M, Montero C, Sanchez D, et al. Two initial vaccinations with the *Bm86* - based Gavac (plus) vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions[J]. BMC Veterinary Research, 2010, 6:43.
- [12] José de La Fuente, Almazán C, Canales M, et al. A ten - year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle[J]. Animal Health Research Reviews, 2007, 8(1):23-28.
- [13] Knox D P, Redmond D L. Parasite vaccines - recent progress and problems associated with their development - Overview[J]. Parasitology, 2006, 133:S1-S8.