

# 柔嫩艾美耳球虫地克株利抗药株与敏感株孢子化卵囊的蛋白质差异分析 Comparison of the Proteome of the Sporulated Oocysts of *Eimeria tenella* Diclazuril Sensitive Strain with Diclazuril Resistant Strain

姜连连\*, 黄 兵, 韩红玉, 赵其平, 董 辉, 陈兆国

JIANG Lian-Lian\*, HUANG Bing, HAN Hong-Yu, ZHAO Qi-Ping, DONG Hui and CHEN Zhao-Guo

中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200232

Laboratory for Animal Parasitology of Ministry of Agriculture, Shanghai Institute of Animal Parasitology, CAAS, Shanghai 200232, China

**摘 要** 利用双向电泳技术, 对本实验室诱导保存的柔嫩艾美耳球虫地克株利抗药株与敏感株的蛋白质表达图谱进行差异比较和分析, 发现两者之间差异有 5 个蛋白质斑点, 利用 MALDI-TOF-TOF 质谱技术对其中 4 个差异明显的蛋白质斑点进行分析鉴定, 获得 4 个明确的肽质量指纹图谱, 通过在 NCBI 数据库中检索分析, 确定了其中 2 个蛋白质分别为球虫孢子表面抗原 TA4 和热休克蛋白 Hsp70, 另外两种为真核细胞的功能蛋白。上述蛋白的鉴定将对球虫的抗药性产生机理和柔嫩艾美耳球虫地克株利抗药株的分子标志物提供了研究方向。

**关键词** 柔嫩艾美耳球虫, 抗药性, 地克株利, 蛋白质组

**中图分类号** Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0435-05

**Abstract** Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was employed to compare the proteome of Diclazuril-resistance *Eimeria tenella* with that of sensitive strains for identifying unique proteins of these stains. 5 protein spots were found to express differentially. Four spots which remarkably were measured by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). The data obtained from peptide mass fingerprinting were used in NCBI database search, two protein spots in gel were identified as *Eimeria tenella* sporulated oocyst TA4 antigen protein, Heat shock 70kD protein, two protein spots were functional proteins of Eukaryote. These proteins are potentially basic work for finding molecular mechanism about drug-resistance of *Eimeria tenella* and new marker in the detection of resistance of *Eimeria tenella*.

**Key words** *Eimeria tenella*, drug-resistance, Diclazuril, proteome

鸡球虫病是由艾美耳球虫引起的一种危害极其严重的肠道寄生虫病, 严重危害家禽生长发育, 给养鸡业造成巨大的经济损失。柔嫩艾美耳球虫 (*E. tenella*) 是 9 种鸡球虫中致病力最强的一个种, 对 1 月龄的雏鸡危害严重, 其发病率为 50% ~ 70%, 死亡率为 20% ~ 30%。目前, 球虫病的控制主要依赖

于药物预防, 地克株利是一种非携带离子型化学合成抗球虫药, 具有高效广谱的抗球虫作用, 对球虫的无性生殖阶段和有性生殖阶段都起作用。然而, 近年来人们已陆续分离或诱导获得了地克株利抗药虫株。国外, Chapman<sup>[1]</sup> 在实验室诱导了 *E. tenella* 对地克株利的抗药株, 国内也陆续诱导了 *E. tenella* 对

Received: December 9, 2004; Accepted: March 4, 2005.

This work was supported by a grant from the National Science Foundation of Shanghai (No. 02ZC14111).

\* Corresponding author. Tel: 86-21-54110455; E-mail: zqsalian@hotmail.com

上海市自然科学基金项目 (No. 02ZC14111).

地克株利的抗药株<sup>[2-4]</sup>。可见球虫的抗药性问题已成为困扰养鸡业的一个重大问题。

近年来,各国的科学家对抗药性的产生机理进行了大量的研究调查,但至今均未能阐明鸡球虫抗药性的产生过程。Grief 等<sup>[5]</sup>,于咏兰等<sup>[6]</sup>分别对地克株利抗药株进行了 RAPD 分析,利用不同引物分别扩增出一些可能与抗药性相关的特异性条带;甘德培等<sup>[7]</sup>利用同工酶技术对地克株利抗药株进行研究,发现了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶比其同母源敏感株多了一条特异的 G6PD-5 带。但目前尚没有球虫抗药性与虫体本身分子水平上变化的直接证据。

蛋白质组学是合并双向电泳(2-DE)分离和质谱分析技术,并应用生物信息学阐明生物体全部蛋白质的表达模式和功能模式的研究方式。它在药物方面一个重要应用是抗药性研究。蛋白质组学能够从整体角度研究抗药虫种的蛋白变化,而过去的耐受性研究仅仅是专注于个别酶的变化,而不是整体的反应。刘文江等<sup>[8]</sup>利用 2-DE 比较了柔嫩艾美耳球虫抗药株与敏感株第二代裂殖子的蛋白质组,发现了抗药株与敏感株之间有一些表达差异的蛋白质斑点。本文以 *E. tenella* 地克株利抗药株为研究对象,从蛋白质组方面初步探索鸡球虫抗药性产生和发展原因,确定与此相关的蛋白质。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 虫株及试剂:**柔嫩艾美耳球虫地克株利抗药株和敏感株均由本实验室分离保存。Tris, 尿素, CHAPS, 二硫苏糖醇(DTT), 四甲基乙二胺(TEMED), 碘乙酰胺(IAA), 甘氨酸, SDS, 丙烯酰胺, N,N 亚双丙烯酰胺, 过硫酸铵, 购自 Sigma 公司, pH3 ~ 10L 干胶条, pH3 ~ 10L Buffer, 胶条覆盖油, 甘油, 低熔点琼脂糖, 购自 Pharmacia Biotech 公司。AEBSF 购自 Novagen 公司。

**1.1.2 主要仪器设备:**2K15 高速低温台式离心机, Sigma 公司生产, IPGphor™ 等电聚焦仪, Ettan™ DALT six 大型垂直电泳系统、附件及循环水浴系统, 图像扫描仪, Imagemaster Elite 2-DE, Amersham Biosciences 公司生产。HP8452 自动紫外分光光度计, 美国惠普公司生产。基质辅助激光解析电离串联飞行时间质谱仪 4700 TOF-TOF, 美国应用生物系统公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 孢子化卵囊的收集:**将 *E. tenella* 地克株利

抗药株和敏感株的孢子化卵囊, 分别人工接种 14 日龄无球虫雏鸡, 接种量为 5 万个/羽, 8d 后剖杀取盲肠, 收集未孢子化卵囊, 置于 29℃ 恒温培养箱中, 进行孢子化。待卵囊完全孢子化后, 用次氯酸钠氧化杂质, 重复几次, 直至卵囊干净为止, 收集卵囊, 贮存于 -70℃ 备用。

**1.2.2 孢子化卵囊双向电泳蛋白样品的制备:**利用 Sigma 的蛋白样品抽提试剂盒对两个虫株的孢子化卵囊的总蛋白进行抽提。用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的含量, 小剂量分装后, -70℃ 冻存。

**1.2.3 双向凝胶电泳:**第一向——固相 pH 梯度等电聚焦凝胶电泳, 采用低电压胶内泡胀法。将 *E. tenella* 孢子化卵囊的总蛋白样品 200μg 与适量重泡胀液(8mol/L 尿素, 2% CHAPS, 2.8% DTT, 0.5% IPG 缓冲液, 少量溴酚蓝)混匀, 使总体积为 350μL, 将 IPG 干胶条(18cm, pH3 ~ 10L 线性)加入胶条槽。随后用胶条覆盖油覆盖胶条槽, 置于 IPGphor 水平电泳仪上, 重泡胀和等电聚焦均在 20℃ 条件下自动进行。聚焦条件为: 30V 重泡胀 13h, 200V, 1h; 500V, 1h; 3500V, 0.5h; 8000V, 8000Vh。电泳结束后, 将胶条于 10mL 平衡缓冲液(1.5mol/L Tris, 6mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 少量溴酚蓝)中, 平衡 15min × 2。其中第一次加入 100mg DTT, 第二次以 400mg 碘乙酰胺取代 DTT。第二向——SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 将平衡好的胶条转移至 12% 凝胶的上端, 先以 5W/胶条开始电泳, 40 min 后, 改为 20W/胶条, 直至溴酚蓝前沿距玻璃顶端约 0.5cm 停止电泳, 取下凝胶固定, 按照文献[9]方法进行银染。

**1.2.4 凝胶图像的分析:**凝胶用 UMAX 图像扫描仪扫描, 选择 *E. tenella* 敏感株总蛋白凝胶图像作为参考胶, *E. tenella* 地克株利抗药株总蛋白凝胶图像与之进行配比。

**1.2.5 MALDI-TOF-TOF 肽指纹图谱分析:**分别在球虫敏感株和抗药株孢子化卵囊的差异蛋白中选取 2-DE 胶上目的蛋白斑点, 置于样品管中, 加入 200μL 脱色液(30nmol/L 铁氰化钾与 100mmol/L 硫代硫酸钠溶液按体积比 1:1 混合后形成)放置 5 ~ 10 min; 移去其中的溶液, 加入 200μL 水, 放置 20 min 洗涤, 重复 2 次; 加入 100% 乙腈 100μL, 干胶 10 min; 移去其中的乙腈, 然后放入 37℃ 烘箱中 5 ~ 10 min; 加入 5μL ~ 10μL 浓度为 12.5ng/μL 的 trypsin 酶溶液酶解, 4℃ 冰箱中约 30 min, 取出后在 37℃ 烘箱中酶解过夜; 加入 50% 乙腈 + 0.1% TFA 60μL 进行肽段提取, 30 ~ 40 min 后, 将溶液转移到 96 孔板内。重复 2 ~ 3

次;将肽段溶液在  $N_2$  流下吹干浓缩,将上述样品重新溶解在  $0.8\mu\text{L}$  含  $5\text{mg/mL}$  之  $\alpha$ -氰-4-羟肉桂酸(CHCA)的  $50\%$  乙腈 +  $0.1\%$  TFA 中,点样,待自然风干后用 ABI4700TOF-TOF 仪上进行 MALDI-TOF-MS 肽指纹图谱分析。

**1.2.6 蛋白质序列数据库检索:**应用 Mascot 软件在真核细胞蛋白质公共数据库 NCBI 中搜索,搜索参数如下:肽质量指纹图谱中的肽片段质量耐量为  $0.2\text{D}$ , MSMS 耐量为  $0.6\text{D}$ , 肽片段质量选择在  $700 \sim 3200\text{D}$ , 每个肽段允许有一个不完全裂解位点。结果的可信度根据 mascot 的评分 ( $P < 0.05$ ) 标准判断,蛋白评分大于 71 分为及格结果。

## 2 结果

### 2.1 孢子化卵囊双向电泳蛋白样品的含量

*E. tenella* 地克株利抗药株和敏感株的含量为:敏感株  $1.22\text{mg/mL}$ 、地克株利抗药株  $1.842\text{mg/mL}$ 。

### 2.2 敏感株和地克株利抗药株的蛋白质组图谱

敏感株与地克株利抗药株孢子化卵囊的总蛋白双向电泳各重复 3 次,我们构建了高分辨率和重复性好的双向电泳图谱,如图 1 所示。图谱经斑点检测后,进行凝胶匹配。经软件分析,地克株利抗药株与敏感株均检测到约 200 个点。

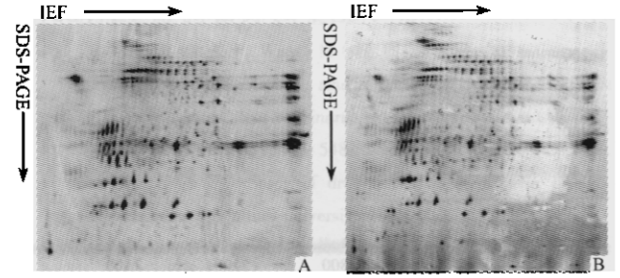


图 1 柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊总蛋白的双向电泳  
Fig. 1 Two dimensional electrophoretic(2-DE) maps of *Eimeria tenella* Diclazuril Susceptible Strain (A) and Diclazuril Resistant Strain (B)

### 2.3 敏感株和地克株利抗药株的差异蛋白

利用 ImageMaster 2D platinum 软件对两张 2-DE 图谱进行比对分析,两者差异的斑点为 5 个,其中 S1 在地克株利耐药株中出现明显下调, D1、D2、D3、D4 为地克株利耐药株中的特异性新增点,见图 2。

### 2.4 MALDI-TOF-TOF 质谱分析及数据库检索

对地克株利抗药株和敏感株的差异明显蛋白质斑点 S1、D1、D2、D3 进行了肽质量指纹图谱的测定(图 3,表 1)。根据谱图的参数,利用数据库进一步对目标蛋白进行了鉴定。另外, S1、D3 蛋白质斑点的肽指纹图谱未能与数据库很好匹配,又选取其中的一个肽段进行串联质谱分析,结果表明 2 个蛋白分

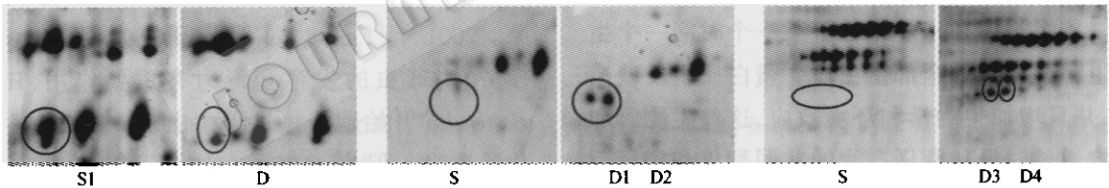


图 2 利用质谱鉴定分析的差异蛋白的电泳局部放大图谱

Fig. 2 Close up images of the region on the gels showing differentially expressed proteins in *Eimeria tenella* Diclazuril susceptible strain and diclazuril resistant strain that were identified by MALDI-TOF-MS

表 1 MALDI-TOF-MS 鉴定差异表达蛋白

Table 1 Differentially expressed protein between *Eimeria tenella* Diclazuril Susceptible Strain and Diclazuril Resistant Strain identified by MALDI-TOF-MS

Spot index <sup>(a)</sup>	Protein name	Accession No.	Mr(kD)		PI		Species	Functional clustering <sup>(d)</sup>
			Theor. <sup>(b)</sup>	Obsv. <sup>(c)</sup>	Theor. <sup>(b)</sup>	Obsv. <sup>(c)</sup>		
S1	Sporulated oocyst antigen TA4 precursor	gi1627043	24.6	25	4.79	4.8	<i>Eimeria tenella</i>	Surface antigen
D1	GTP binding protein YPTC5	Q39573	23.1	24.5	5.73	4.0	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Protein transport
D2	GH02089p	gi120976812	24.2	24.0	6.11	4.16	<i>Drosophila melanogaster</i>	Regulation of transcription
D3	Heat shock 70kD protein(HSP70)	gi1123598	74.2	65.0	5.51	5.58	<i>Eimeria tenella</i>	Repetitive antigen

(a) Index from Fig2.S, Diclazuril Susceptible Strain; D, Diclazuril Resistant Strain; (b) Calculated from the database entry without any processing; (c) Calculated from ImageMaster 2D platinum software; (d) The functions were cited from Database remarks.

别为: S1, *E. tenella* 子孢子的表面抗原 TA4; D3, 热休克蛋白 70(Hsp70)。

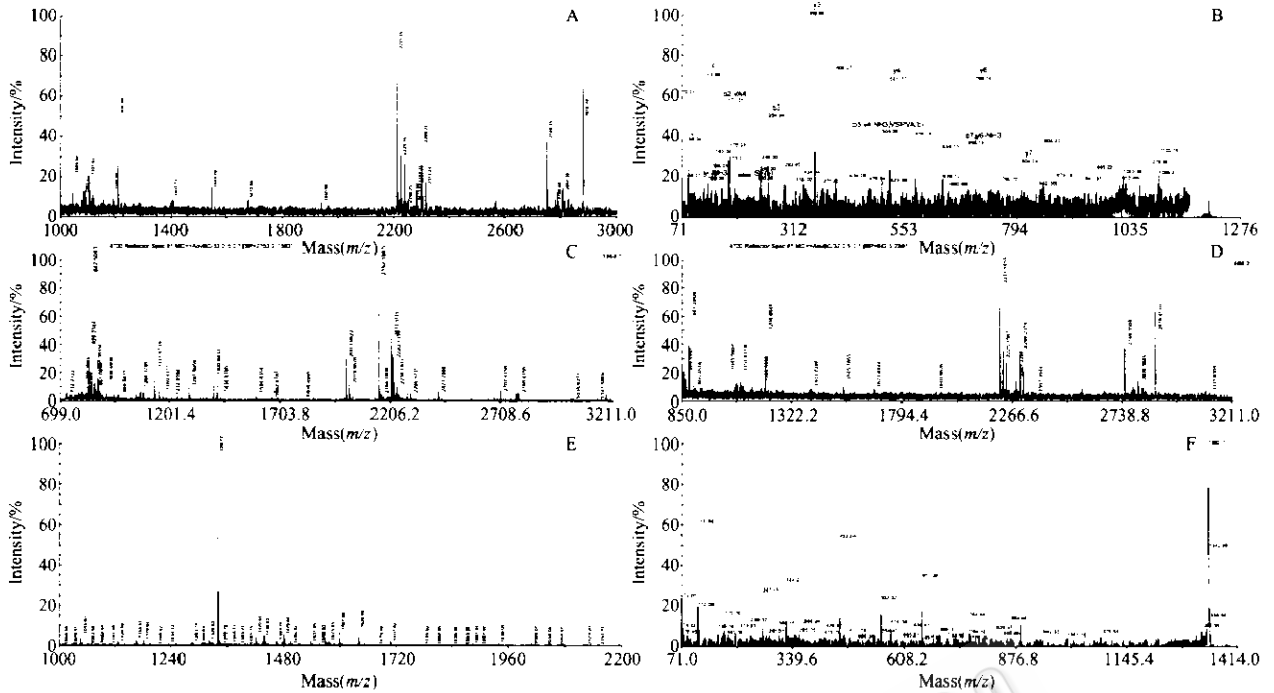


图3 肽指纹图谱鉴定差异蛋白斑点

Fig.3 PMF identification of differently shown spots

A: PMF of spot S1; B: the peptide of 1208.59 chosen from the PMF for spot S1 was sequenced by MS/MS; C: PMF of spot D1; D: PMF of spot D2; E: PMF of spot D3; F: The peptide of 1339.77 chosen from the PMF for spot D3 was sequenced by MS/MS.

### 3 讨论

蛋白质组是指在一定条件下某一个时间一个生物或者生物学部分的全部蛋白质。蛋白质组反映遗传信息,并且增加生物学和环境效应,这些生物学和环境影响通过对最初翻译产物的共同翻译和翻译后的蛋白质修饰导致蛋白质的多样化。此外,一个开放阅读框(ORF)由于前信使RNA不同剪接的结果,可以产生一个以上蛋白质种类。蛋白质组分析可研究蛋白质组分或者蛋白质的丰度方面全局变化。球虫抗药性是控制鸡球虫面临的重大难题。对抗药性产生机制的理解将有助于改善当前的抗球虫药的效能和开发新型的药物。蛋白质组学通过对球虫蛋白整体变化分析,有助于阐明球虫抗药分子机制。本研究运用蛋白质组学的技术,得到了4个与*E. tenella*地克株利抗药株相关的蛋白质。

热休克蛋白(Hsp):又称应激蛋白,在体内具有分子伴侣(chaperones)的活性,帮助蛋白质折叠成正确构象或参与基因修饰。主要作用是:a提高细胞的应激能力,特别是热耐受能力;b调节 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , ATP酶的活性;c促进细胞内糖原异生和糖原生成,使细胞内糖原储量增加,从而提高适应能力;d提高

对各种损伤的抵抗能力,抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Hsp70是分子量为70kD的柔嫩艾美耳球虫孢子阶段抗原。2001年,Emilio del等<sup>[11]</sup>研究发现*E. tenella*的Hsp70对球虫的发育和毒力有重要作用,Hsp70在*E. tenella*开始孢子化过程中出现,在球虫完全孢子化后消失。但当孢子在体内开始脱囊时再次出现,这可能是球虫为了适应宿主的内环境的变化及参与孢子的形成而产生。并有报道称Hsp70可以通过直接与AIF(apoptosis inducing factor)相互作用,抑制细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

A4表面抗原:*E. tenella*子孢子的表面糖蛋白,分子量大约为2.5kD,蛋白的生成始于卵囊开始孢子化后第16~20h。试验发现,抗TA4蛋白的单克隆抗体能够抑制孢子侵入细胞,这说明TA4蛋白可能与虫体侵入宿主细胞有关<sup>[13]</sup>。而在本实验中抗药株的表达量出现下调,这说明球虫的致病因子有多种,因此球虫的抗药性产生是多个蛋白联合作用的结果。

其余两种蛋白一般存在于真核细胞中,是否与球虫的抗药性有关有待于进一步研究。

在本研究中*E. tenella*地克株利抗药株孢子化卵囊中Hsp70仍然存在,并与巨型艾美耳球虫的

Hsp70 具有很高的同源性,说明 Hsp70 在 *E. tenella* 对抗球虫药地克株利产生抗药性起重要作用。而 TA4 蛋白在地克株利抗药株中表达量出现下调,同时我们也证明了 TA4 蛋白在马杜拉霉素抗药株中表达量也出现下调,这一现象能否作为抗药性产生的分子标志,还有待于进一步研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Chapman HD. *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*: studies on the development of resistance to Diclazuril mother anticoccidial drugs in the chicken. *Parasitology*, 1989, **99**: 189 - 193
- [2] Gan DP (甘德培), Wang M (汪明), Wu ZG (吴志光) *et al.* *Eimeria tenella*: experimental studies on the development of resistance to Diclazuril and Clopidol. *Acta veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 2001, **32**(3): 253 - 258
- [3] Li Anxing, Xie Mingquan, Cai Jianping *et al.* Rapid development of drug-resistant strains of *Eimeria tenella* to Diclazuril and Halofugenonein laboratory. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis*. 2001, **40**(1): 77 - 80
- [4] Han HY (韩红玉), Zhao QP (赵其平), Chen ZG (陈兆国) *et al.* Experimental induction of drug-resistant strains of *Eimeria tenella* to Diclazuril and Maduramycin. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报), 2004, **24**(2): 138 - 140
- [5] Greif G, Stephan B, Haberkorn A. Intraspecific polymorphisms of *Eimeria* species due to resistance against anticoccidial drugs. *Parasitology Research*. 1996, **82**: 706 - 714
- [6] Yu YL (于咏兰), Wang M (汪明). Study of intraspecific polymorphisms of *Eimeria tenella* due to resistance against anticoccidial drugs. *Acta veterinaria et Zootechnica Sinica* (畜牧兽医学报), 2001, **32**(6): 544 - 548
- [7] Gan DP (甘德培). Study of drug-resistance of *Eimeria tenella*. Beijing: China agriculture university. 1998
- [8] Liu WJ (刘文江), Huang B (黄兵), Ouyang WQ (欧阳五庆) *et al.* Analysis of different expressed proteins of second generation merozoites of *Eimeria tenella* drug-resistance strains by two-dimensional electrophoresis. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology* (中国兽医科技), 2004, **34**(3): 21 - 25
- [9] Guo YJ (郭尧君). Protein Electrophoresis Experimental Technology. Beijing: Science Press. 1999, pp. 141 - 143
- [10] Zugel U, Kaufmann SHE. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(1): 19 - 39
- [11] Emilio del Cacho, Maegarita Gallego, Desire Pereboom *et al.* *Eimeria tenella*: Hsp70 expression during sporogony. *J Parasitol*, 2001, **87**(5): 946 - 950
- [12] Nau GJ, Richmond JFL, Schlesinger A *et al.* Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Immunology*, 2002, **99**(3): 1503 - 1508
- [13] Wu DM (吴德铭), Bi YZ (毕英佐), Yu KZ (于康震) *et al.* Advances in genetic engineering vaccine against coccidiosis. *Progress in Veterinary Medicine* (动物医学进展), 2004, **25**(1): 57 - 60