

日本血吸虫中国大陆株 22.6kD 膜相关蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的高效表达*

蔡学忠¹ 林矫矫¹ 杨冠珍² 施福恢¹ 沈 纬¹ 蔡幼民¹ 吴祥甫²

(¹ 中国农科院上海家畜寄生虫病研究所 上海 200232)

(² 中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

摘 要 以日本血吸虫 mRNA 为模板,用 RT-PCR 法快速克隆到一大约 600bp 的 DNA 片段, DNA 序列分析证实,所扩增到的 DNA 片段中含有日本血吸虫 22.6 膜相关蛋白(Sj-22.6 (Ch))基因,将该基因重组到表达型质粒 pGEX-4T 中,表达的 GST 融合蛋白分子量约 48kD,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化的重组蛋白不仅纯度好,而且得率高,纯化产量可达 40mg/L 培养物,免疫试验结果表明该重组蛋白具有良好的抗原性,为其在血吸虫病抗感染中的免疫作用研究创造了条件。

关键词 22.6kD 膜蛋白,日本血吸虫,基因克隆,基因表达,免疫作用

分类号 Q522 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0011-16

血吸虫病是一种重要的寄生虫病,在世界范围内广泛分布,国内流行株为日本血吸虫中国大陆株,该虫株不仅感染牛羊等动物,而且也给人类的健康造成危害。一方面,在血吸虫生活周期中,表膜分子是虫体细胞膜的组成部分,对虫体结构的维持和寄生生活起重要作用;另一方面,由于虫体以表膜和寄生宿主直接相互接触,最容易受到宿主的免疫攻击。用识别血吸虫表膜的单克隆抗体做被动转移试验,可提供 30%~50% 的保护力^[1],因此这一类分子在抗血吸虫疫苗研究时倍受研究者关注。

血吸虫表膜相关分子中已鉴定的主要有 22.6kD、23kD、25kD、32kD、37kD、40kD 等分子^[2~5],除此之外,丙糖异构酶(TPI)、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)等酶类分子被研究发现也分布于表膜上^[5]。在这些分子中,曼氏血吸虫和日本血吸虫的 22.6kD 及 23kD 等膜类分子的基因已被克隆和表达^[6,7],且重组的 Sm23 膜蛋白可使小鼠获得 40%~50% 的保护力^[8]。本研究旨在采用 RT-PCR 法快速克隆日本血吸虫 22.6kD 膜相关蛋白基因,并对其在大肠杆菌中的表达产物的抗原性加以研究,为评估其表达产物在日本血吸虫病抗感染免疫过程中所起的作用提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌(*E. coli*)TG1 和 TB1,质粒 pGEX-4T,噬菌粒 pSK(+),

* 国家生物高新技术研究发展计划项目(No. 102-07-04-03)和总理专项基金(No. 94-Y-40)部分经费资助。

收稿日期:1997-12-26,修回日期:1998-09-09。

辅助性噬菌体 M13KO7 均为上海生物化学研究所保存。

1.1.2 日本血吸虫中国大陆株成虫：由中国农科院上海家畜寄生虫病研究所钉螺室维持的日本血吸虫中国大陆株安徽品系尾蚴感染新西兰大白兔，6 周后剖杀冲虫所得。

1.1.3 主要酶类及其它生化试剂：各种 DNA 限制酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶、低熔点琼脂糖、Trizol 和 RNA 反转录试剂购自 GIBCO 公司，硝酸纤维素膜(NC 膜)是四青生化材料厂产品，辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG，谷胱甘肽琼脂糖凝胶和还原型谷胱甘肽是 Sigma 公司产品，PCR 系列试剂购自 Promega 公司，T7 DNA 测试试剂盒为 USB 公司产品。

1.1.4 PCR 引物：根据现已发表的日本血吸虫 22.6kD 膜蛋白(Sj-22.6(Au))DNA 序列^[7]设计引物。引物 1：5'-CAGAATTCATGGCAACTACTGAGTAC-3'，相对应于 Sj-22.6 ORF 中的 1~18bp；引物 2 为 5'-CGAAGCTTTTACGAAGACGGTGTTCG-3'，对应于 Sj-22.6 ORF 中 558~576bp。为了便于 PCR 产物的克隆，在引物 1 和引物 2 的两端分别设计了一个 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点，由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

1.2 方法

1.2.1 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)：取新鲜冻存的日本血吸虫成虫 100mg，用 Trizol 试剂抽提总 RNA，反转录成 cDNA，取 2 μ L cDNA 进行 PCR，PCR 反应条件为 93℃ 45s，+55℃ 45s，+72℃ 60s，共 35 个循环，循环结束后自动延伸 20min。

1.2.2 PCR 产物的克隆和鉴定：利用 PCR 产物两端的 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点，参照文献[9]中介绍的方法将其克隆到 pSK(+)质粒上，按 USB T7 测序试剂盒说明书操作，测定其核苷酸序列，与 Sj-22.6 膜蛋白(Sj-22.6(Au))的 DNA 序列相比较进行鉴定。

1.2.3 Sj-22.6 膜蛋白基因在大肠杆菌中的表达：按常规方法，将经序列分析鉴定的 pSK(+)Sj-22.6 质粒中 Sj-22.6 基因片段用 *EcoR* V 和 *Sal* I 切出，Klenow 酶补平并克隆到经 *Sma* I 线性化的表达型质粒 pGEX-4T 中，选择正向重组子，转化宿主菌 TB1 中。取 50 μ L 转化菌过夜培养物接种 5mL 2 \times YT 培养基，37℃ 250r/min 培养 3h，加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，继续培养。在诱导表达(加入 IPTG)0h、1h、2h、3h、4h、5h、6h 和 7h 分别取等量培养物，离心收集菌体，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，观察时相表达的变化。

1.2.4 pGEX/Sj-22.6 的大肠杆菌表达产物的纯化：pGEX/Sj-22.6 重组表达产物为 Sj-22.6 与载体 pGEX 中 26kD GST 的融合蛋白，所以可用载体上的 GST 进行亲和纯化。以 100mL 2 \times YT 培养物诱导表达 5h，参照文献[10]方法，用谷胱甘肽琼脂糖亲和层析一步纯化表达产物。纯化表达产物分别用 SDS-PAGE 凝胶电泳和紫外分光光度法确定其纯度和表达量。

1.2.5 表达产物和日本血吸虫成虫粗抗原免疫小鼠血清的反应性测定：将日本血吸虫成虫粗抗原免疫小鼠血清用 pGEX-4T 表达产物充分吸附，直到 Dot-ELISA 检测抗 26kD GST 抗体为阴性止，然后用吸附血清与重组表达产物作 Western blot 反应，检查重组表达产物是否具有抗原性。

2 结 果

2.1 Sj-22.6 膜蛋白基因的克隆鉴定© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

以日本血吸虫中国大陆株成虫 mRNA 为模板 ,参照 Sj-22.6 基因序列设计引物 ,用 PCR 方法扩增出一段大小约 600bp 左右的 DNA 片段 ,将其克隆到 pSK(+)上(见图 1)。通过序列分析证实该扩增片段中含有日本血吸虫 22.6kD 膜蛋白基因(Sj-22.6) ,该基因 ORF 为 576bp(见图 2) ,编码 191 个氨基酸 相应的蛋白分子量为 22.6kD。日本血吸虫粗抗原免疫血清与重组表达产物的 Western blot 试验结果也证实了重组表达产物与日本血吸虫抗原的一致性 (见图 3)。

2.2 Sj-22.6 在大肠杆菌中的表达及表达产物的纯化

重组表达质粒 pGEX/Sj-22.6 在大肠杆菌 TB1 中经 IPTG 诱导呈高效表达 ,表达产物的大小为 48kD ,其中 pGEX 载体部分为 26kD ,Sj-22.6 膜蛋白为 22.6kD ,为了确定最佳表达条件 ,我们进行了表达时相的分析(见图 4) ,结果表明 ,在 2 × YT 培养基中 ,转化菌经 IPTG 诱导后 ,0 ~ 5h 内融合蛋白的表达量呈递增趋势 ,5h 后融合蛋白的水平基本稳定 ,不再上升 ,故我们把诱导表达时间选定在 5h。

表达产物用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和纯化后 ,所得到的产物在 SDS-PAGE 图谱上呈现为一条清晰的条带(见图 5) ,据紫外分光光度法 A_{280} 值计算 ,重组表达产物的纯化表达量为 40mg/L 大肠杆菌培养物 ,由此可以看出 ,用这种亲和纯化的方法所得到的产物不仅具有良好的纯度 ,而且表达产物的纯化得率也高 ,为今后动物免疫试验提供了保证。

2.3 表达产物的抗原性测定

以重组表达产物作为抗原进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 ,并转移到 N. C. 膜上 ,用经 pGEX 表达产物吸附的日本血吸虫粗抗原免疫血清进行检测 ,显色后在 48kD 处有一明显的杂交条带(见图 3) ,显示了重组蛋白具有良好的抗原性 ,可用于对其免疫学特性的进一

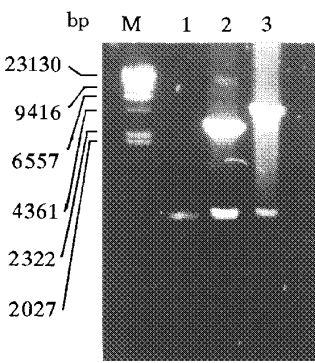


图 1 pSK(+)Sj-22.6 和 pGEX/Sj-22.6 限制酶分析
Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of pSK(+)Sj-22.6 and pGEX/Sj-22.6

M. λ DNA/*Hind* III ;1. Sj-22.6 PCR product ;2. pSK(+)Sj-22.6/*EcoR* I + *Hind* III ;3. pGEX/Sj-22.6/*EcoR* I

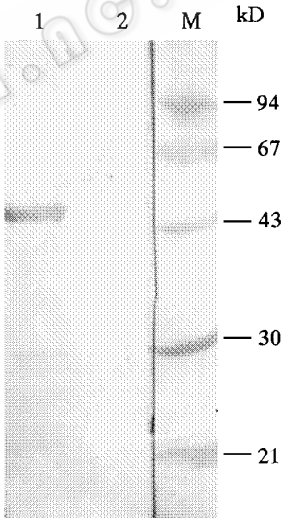


图 3 免疫印渍转移试验 ,示日本血吸虫成虫抗原免疫血清识别纯化的 r-Sj-22.6 抗原
Fig. 3 Western blot analysis of purified r-Sj-22.6 by the serum immunized with Sj worm antigens
M. marker ;1. pGEX/Sj-22.6/TB1 2. pGEX/TB1

步研究,确定它与抗日本血吸虫感染之间的关系。

Sjc 22.6(Ch)	ATGGCAACTA CTGAGTACAG ATTAAGTTTA ATGGAACAAT TTATTAGAGC ATTCATAGAA	60
Sjc 22.6(Au)	-----	60
Sm 22.6	-----C* **---ACG-A -----CA-----G-G- -----G-- ---TT-----	60
Sjc 22.6(Ch)	ATAGATAAAG ATAATAATGA ATTGATTGAT AAACAAGAAC TAACGAAATA TTGTCAACAG	120
Sjc 22.6(Au)	-----	120
Sm 22.6	-----GC--- ---G----- -A----- -----T ---TT----- -----A-A	120
Sjc 22.6(Ch)	AATCAAATGG ATATGAAACA AATAGATCCA TGGATTGCAA GGTTTGATAC TGATAAAGAT	180
Sjc 22.6(Au)	-----	180
Sm 22.6	T-C-GTT--- -----TT G-C----- -----A----- G-----	180
Sjc 22.6(Ch)	GGTAAAGTCA GTTTAGAGGA GTTTTGTCGT GGATTCCGTC TAAAGGTTTG GGAAGTCCGT	240
Sjc 22.6(Au)	-----	240
Sm 22.6	AA---A--- -A---A--- -C----- ---T---T ---A---A-C A---A-T---A	240
Sjc 22.6(Ch)	CGTGAAAAGG AAGAATTAAA GAAAGACAAG GAAGGCAAAG TATCCACACT TCCACTGGAT	300
Sjc 22.6(Au)	----- -G-----	300
Sm 22.6	-----A- -T----- A---A-GA -T-----T -TC-T-AG--- -----C-A--	300
Sjc 22.6(Ch)	ATTCAAATTA TCGCGGCAAC CATGTCAAAA GCTAAGCAAT ATAACATATG TTGTAAATTT	360
Sjc 22.6(Au)	-----	360
Sm 22.6	---G----- -T-A----- -----C--- A-A----- -G-A----- ---C-----	360
Sjc 22.6(Ch)	AAAGAACTTC TCGATAAAAC TAGTCGAACT GGTGATGAAG TAAGAGCGGT GGCAAATGAC	420
Sjc 22.6(Au)	----- -T-----	420
Sm 22.6	-----GTA-G -T-----T-- -----A ---A---CA -G---A--- A-----A-A	420
Sjc 22.6(Ch)	TTAAAAGCAT TTTTGGATTC TGAATATGGT CGTGTATGGC AAGTGATATAT ACTAACTGGT	480
Sjc 22.6(Au)	----- -----C-----	480
Sm 22.6	A-G---T--- -A-----AA CAC----- -----AG-C- -----	480
Sjc 22.6(Ch)	TCATATTGGA TGAATTTTTC ACATGAACCA TTTTATCAAA TGCAGTTTAA GTACAGTAAT	540
Sjc 22.6(Au)	-----	540
Sm 22.6	----- -----A----- -----A-----	540
Sjc 22.6(Ch)	TATGTTTGTC TATTGTGGCG AACACCGTCT TCGTAA	600
Sjc 22.6(Au)	-----	600
Sm 22.6	-----C---T ---GCA---A- -----A--- CAA---	600

图2 Sjc 22.6(Ch)、Sm22.6(Am)和 Sjc22.6(Au) DNA 序列比较

Fig.2 Comparison of the sequence of Sjc 22.6(Ch) with those of Sm 22.6 and 22.6(Au)

The position where the nucleotides were missing were indicated by *

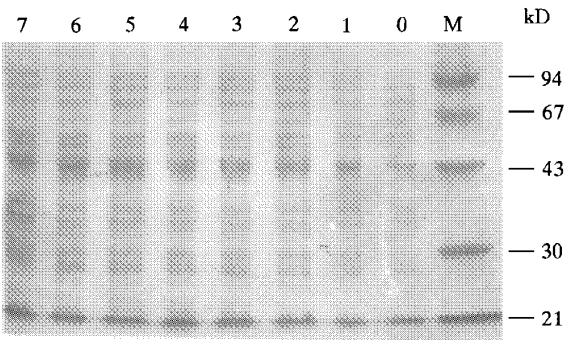


图 4 SDS-PAGE 凝胶电泳 ,显示 IPTG 不同诱导时间的表达产物

Fig.4 SDS-PAGE pattern of the induction time with IPTG
0 1 2 3 4 5 6 7 :Induction hours ;M. Protein marker.

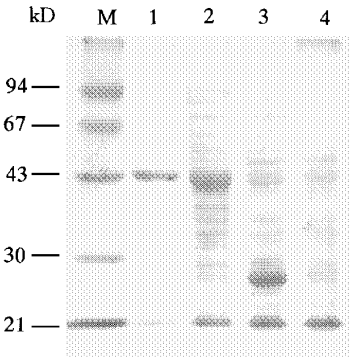


图 5 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig.5 SDS-PAGE of purified r-Sj-22.6
M Protein marker. 1. Purified r-Sj-22.6/TBI ;
2. pGEX/Sj-22.6/TBI 3. pGEX-2T/TBI 4. TBI.

3 讨 论

近年来 ,日本血吸虫基因工程疫苗的研究在候选抗原基因的克隆和表达方面取得了不少进展^[8 ,11~14] ,候选抗原基因主要分为三类 :膜蛋白类、肌蛋白类和酶类分子 ,在膜蛋白分子中重组的 23kD 抗原具有一定的保护力 ,但至今尚无有关 Sj-22.6 重组蛋白的抗原性及其与日本血吸虫病抗感染关系的报道。本研究是在参照已报道的 Sj-22.6 膜蛋白基因(Sj-22.6 Au)序列的基础上^[9] ,用 PCR 法克隆而得到 Sj-22.6 Ch 基因 ,该基因在大肠杆菌中的表达产物的 Western blot 试验结果表明了其良好的抗原性。

我们克隆的 Sj-22.6 Ch 基因序列与 Sm-22.6 cDNA 相比^[6] ,同源性的 78 % ,相应的氨基酸的同源性为 71 % 和 Wayne 克隆的 Sj-22.6 Au 基因相比^[7] ,N-端和 C-端较保守 ,变异主要分布于中间区域 ,在其 ORF 中有 4 个碱基的差异 :他们发表的序列中在 263bp 处为 G ,我们测得该处为 A ,即 G→A(Arg→Lys) ,372 处 T→C(氨基酸不变) ,这些差别可能反映了地理品系之间的差异。

Wayne 曾报道 Sj-22.6 Au 在 E. coli 中的表达研究 ,表达量为 20mg/L 培养物 ,而我们的克隆株 Sj-22.6 Ch 纯化后的得量为 40mg/L 培养物 ,获得高的表达量对未来的疫苗生产更具有实际应用价值。虽然未能得到 Sj-22.6 Au 抗原 ,难以就 Sj-22.6 Au 和 Sj-22.6 Ch 的抗原性进行比较 ,但本试验结果证实了重组的 Sj-22.6 Ch 具有良好的抗原性 ,为该抗原的应用提供了前提保证。

致 谢 本研究得到了中国科学院上海生化所潘 华博士 ,中国农科院上海家畜寄生虫病研究所叶 萍、刘金明、李 浩和傅志强等同志的帮助 ,在此表示感谢 !

参 考 文 献

[1] M. A. Smith J. A. Clegg D. Snary et al. Parasitology 1982 84: 83-91

- [2] M. V. Rogers ,K. M. Davern J. A. Smythe *et al.* *Mol. Biochem. Parasitol.* ,1988 **29** :77~88.
- [3] M. Knight ,C. Kelly ,V. Rodrigues *et al.* *Parasitol. Res.* ,1989 **75** :280~286.
- [4] D. Colette ,D. Claude ,A. Capron. *Mol. Biochem. Parasitol.* ,1981 **3** :215~225.
- [5] M. D. Wright ,K. M. Davern ,G. F. Mitchell. *Parasitol. Today.* ,1991 **7** (2) :56~58.
- [6] D. S. Lincoln ,R. D. John. *Mol. Biochem. Parasitol.* ,1986 **20** :254~264.
- [7] G. J. Waine ,M. M. Becker *et al.* *Gene.* ,1994 **142** :259~263.
- [8] N. R. Bergquist ,B. F. Hall ,S. James. *The Immunologist.* ,1994 **2** (4) :131~134.
- [9] J. Sambrook ,E. F. Frith ,T. Maniatis. *Molecular cloning :A Laboratory Manual* , 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Lab. Press ,1989.
- [10] 田 镠、杨冠珍、蔡幼民等. *动物学报* ,1996 **42** (4) :421~427.
- [11] 林矫矫 ,M. C. Huggins ,M. G. Taylor. *中国兽医科技* ,1995 **25** (6) :19~20.
- [12] M. C. Huggins ,J. Gibbs ,N. A. Moloney. *Mol. Biochem. Parasitol.* ,1995 **71** :81~87.
- [13] M. M. Becker ,J. Grzych ,R. J. Pierce. *Acta Tropica.* ,1995 **59** :143~147.
- [14] 蔡学忠、田 镠、杨冠珍等. *生物化学与生物物理学报* ,1998 **30** (2) :203~206.
- [15] D. W. Dunne ,A. E. Butterworth ,A. J. C. Fulford *et al.* *Eur. J. Immunol.* ,1992 **22** :1483~1489.

Cloning of *Schistosoma japonicum* Chinese Strain 22.6kD Membrane-associated Protein (Sj-22.6) Gene and Its Overproduction in *Escherichia coli* *

Cai Xuezhong¹ Lin Jiaojiao¹ Yang Guanzhen² Shi Fuhui¹

Shen Wei¹ Cai Youmin¹ Wu Xiangfu²

¹(Shanghai Institute of Animal Parasitology ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Shanghai 200232)

²(Shanghai Institute of Biochemistry ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031)

Abstract A 576bp DNA fragment was amplified by RT-PCR ,from *Schistosoma japonicum* adult worm mRNA. Sequence analysis revealed that this fragment contained *S. japonicum* Chinese strain membrane-associated protein (Sj-22.6) gene. Then this gene was cloned into the expression vector pGEX-4T and subsequently expressed in *Escherichia coli* . The recombinant GST-fusion protein was purified by glutathione agarose affinity chromatography. Its molecular weight was about 48kD. The yield of expression was around 40mg/L *E. coli* culture. The immunological test suggested that the recombinant protein had good antigenity ,which could make a good basis for the research of its immunological function in Schistosomiasis.

Key words 22.6 membrane-associated protein ,*Schistosoma japonicum* gene cloning gene expression immunological function

* Supported by Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development(No. 102-07-04-03)and Premier Special Program(No. 94-Y-40) .