

# 弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的融合表达、纯化及抗原性分析

李越希<sup>1\*</sup> 张锦海<sup>1</sup> 陶开华<sup>1</sup> 黄培堂<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(南京军区军事医学研究所,南京 210002)

<sup>2</sup>(军事医学科学院,北京 100071)

**摘 要** 利用基因工程技术制备抗原性好的弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的融合蛋白,并用作抗原检测弓形虫抗体。根据弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的氨基酸序列,通过计算机分析,筛选出其中较强的抗原决定簇。用 PCR 方法分别扩增含抗原决定簇的基因片段。将这两个基因片段克隆至同一质粒 pET28a(+ )内,表达一个融合蛋白。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选表达该融合蛋白的工程菌。纯化表达的融合蛋白,用已知的 6 份抗弓形虫 IgM 阳性血清和大量正常人血清,ELISA 法检测纯化融合蛋白的抗原性和特异性。获得了高效表达含弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白抗原表位的工程菌,表达的融合蛋白约占菌体蛋白总量的 25%。纯化获得了表达的融合蛋白,该蛋白有较好的抗原性和特异性。表达的弓形虫 GRA6 和 P30 融合蛋白可用做抗原检测弓形虫抗体,用于临床及孕妇检测,对优生优育有较大意义。

**关键词** 弓形虫, GRA6, P30, 融合蛋白, 基因表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)06-0674-06

弓形虫病是一种人兽共患寄生虫病,弓形虫的整个生活史发育过程需两个宿主。人体感染一般为隐性感染,仅少数人发病。虫体可侵犯多种脏器与组织,轻者为隐性感染,重者可表现为多器官的严重损害。被弓形体感染的孕妇,常可通过胎盘将弓形虫传给胎儿,影响胎儿的发育,造成胎儿严重畸形,甚至死亡,亦可发生流产、死产。感染发生得越早,胎儿受损越严重。在妊娠前 3 个月感染,多会引起流产、死产、或出生的婴儿发育缺陷无生活能力。可见弓形虫对人类危害极大,尤其是孕妇。因此,防治弓形虫病的重点对象应为育龄期妇女。建立弓形虫感染的快速检测方法对育龄期妇女进行检测,对优生优育有重要意义。

多种弓形虫蛋白可刺激机体产生相应的抗体。研制弓形虫特异的抗体检测试剂,应选用抗原性强、特异性好的蛋白抗原。国外的研究证实,弓形虫的 GRA6 蛋白<sup>[1]</sup>和 P30 蛋白<sup>[2]</sup>具有较强的抗原性,在弓形虫感染者的血清中其相应的抗体检出率较高。根据 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的氨基酸序列,通过计算机分析,我们选出较强的抗原决定簇,用 PCR 方法分别扩增了 GRA6 蛋白和 P30 蛋白内含抗原决定簇的基因片段,将两个基因片段串联克隆至同一质粒

表达载体,构建成功了高效表达含两者抗原表位的融合蛋白的工程菌,建立了表达蛋白的纯化方法,获得了高纯度的融合蛋白,并用作抗原检测弓形虫抗体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌种与质粒:**宿主菌 BL21(DE3)及表达载体 pET28a(+ )为美国 Novagen 公司产品。

**1.1.2 分子生物学试剂:**限制酶 *Nco* I、*Bam*HI、*Eco*RI、及 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。质粒纯化试剂盒及从琼脂糖凝胶内回收 DNA 片段的试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品。DEAE-SepharoseFF 阴离子凝胶为 Pharmacia 公司产品,IPTG、DTT 为 Promega 公司产品。其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

**1.1.3 抗弓形虫 IgM 阴、阳性血清:**由南京军区总医院等单位提供。

**1.1.4 酶联反应材料** 酶联板为深圳产 96 孔板,辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗人  $\mu$  链单克隆抗体为 Sigma 公司产品。其它材料为酶联反应的常规材料。

### 1.2 方 法

**1.2.1 PCR 引物的合成:**由大连 TaKaRa 公司帮助

合成。

**1.2.2 弓形虫 DNA 的纯化:**取小鼠培养的弓形虫 100 $\mu$ L(南京农业大学提供),离心,收集沉淀虫体,用 200 $\mu$ L TE 溶液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.0、0.5 mmol/L EDTA)悬浮,加 100 $\mu$ L 蛋白酶 K(10mg/mL),置 56 $^{\circ}$ C 水浴 4h。用酚/氯仿法纯化弓形虫 DNA,将获得的弓形虫 DNA 溶于 20 $\mu$ L 去离子水内,置 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

**1.2.3 基因克隆方法:**DNA 的酶切、连接、电泳;质粒的提取、转化;蛋白的 SDS-PAGE 分析等一般分子克隆方法按常规方法进行。其它按试剂盒说明书进行操作。

**1.2.4 DNA 序列分析:**用 QIAGEN 公司质粒纯化试剂盒纯化质粒,用 DNA 全自动测序仪测序。

**1.2.5 表达弓形虫融合蛋白工程菌的超声裂解:**将培养的表表达弓形虫融合蛋白的工程菌离心(8000r/min,10min,4 $^{\circ}$ C),弃上清,菌体重悬于原培养液 1/10 体积的裂解液(50mmol/L Tris-HCl pH8.0、10mmol/L EDTA、10mmol/L DTT、5% 甘油)内,冰浴超声破菌 10min,离心(12000r/min、20min、4 $^{\circ}$ C)收集沉淀包涵体。

**1.2.6 包涵体的溶解:**包涵体用 0.5% 十二烷基肌苷酸钠(SKL,用 50 mmol/L Tris-HCl pH8.14、0.5 mmol/L EDTA、0.25mmol/L DTT 平衡液配制)溶液悬浮,室温溶解包涵体 1h,离心(12000 r/min、20 min、4 $^{\circ}$ C),收集上清,装入透析袋内对 1000mL 平衡液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.14、0.5 mmol/L EDTA、0.25mmol/L DTT)透析。4 $^{\circ}$ C 透析过夜,次日换透析液 2 次,每次 1000 mL。离心(8000 r/min、20 min、4 $^{\circ}$ C),收集上清上 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱纯化。

**1.2.7 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱纯化:**将 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱连接至常压层析系统,先用平衡液(50 mmol/L Tris-HCl pH8.14、0.5 mmol/L EDTA、0.25 mmol/L DTT)冲洗平衡,然后将上步获得的溶解上清液上样,流速为 1.5mL/min。收集穿过峰。上样后用平衡液冲洗,然后依次用含 50、100、200、300、1000 mmol/L NaCl 的平衡液洗脱蛋白,收集各洗脱峰蛋白。用 12% SDS-PAGE 检测穿过峰和各洗脱峰蛋白,确定哪个组份内含有融合蛋白。

**1.2.8 ELISA 试验:**采用间接 ELISA 检测血清中的 IgM 抗体。基本步骤为:用 50mmol/L 碳酸盐溶液(pH9.6)稀释重组蛋白包被酶联板,每孔 100 $\mu$ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用封闭液(10mmol/L 磷酸盐缓冲液、

pH7.4,10% 山羊血清,20% 小牛血清,0.05% 硫磺汞)封闭,每孔 130 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 1h(或 4 $^{\circ}$ C 过夜)。将待测的抗弓形虫 IgM 阴、阳性血清用样本稀释液(10mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.4,10% 山羊血清,20% 小牛血清,0.05% 硫磺汞)1:100 稀释后,分别加至封闭后的酶联板孔内,每孔 100 $\mu$ L,每个样本加 2 孔,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,用 PBST 液(10mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.4,0.5% 吐温-20)洗 5 遍后,加 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗人  $\mu$  链单抗,每孔 100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,用 PBST 洗 5 遍,加底物 TMB 溶液 100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min,加 50 $\mu$ L 2mol/L 硫酸混匀终止反应,用酶联仪测定  $A_{450}$  值。

## 2 结果

### 2.1 弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白抗原表位的筛选

利用 ANTHEWIN 等软件,通过计算机分析弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的全部氨基酸序列,筛选出弓形虫 GRA6 蛋白内的强抗原表位位于第 43 个氨基酸到第 152 个氨基酸(图 1),P30 蛋白内的强抗原表位位于第 56 个氨基酸到第 313 个氨基酸(图 2)。

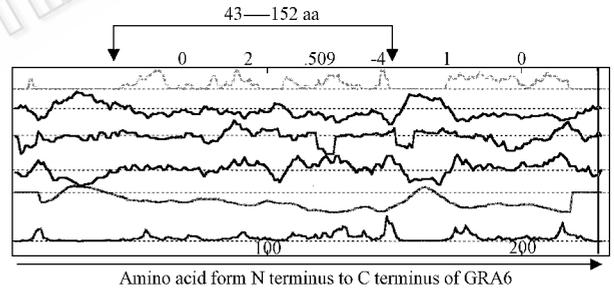


图 1 利用 ANTHEWIN 软件分析的弓形虫 GRA6 蛋白内的抗原表位

Fig. 1 Antigenic domains of Dense Granule Antigen GRA6 of *Toxoplasma gondii* screened with ANTHEWIN software

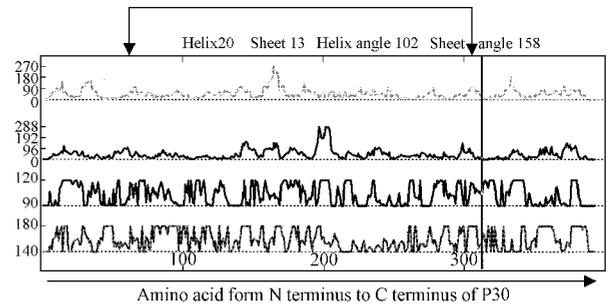


图 2 利用 ANTHEWIN 软件分析的弓形虫 P30 蛋白内的抗原表位

Fig. 2 Antigenic domains of major surface protein of *Toxoplasma gondii* screened with ANTHEWIN software

## 2.2 弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白抗原表位的基因片段克隆

在弓形虫 GRA6 蛋白抗原表位的 DNA 序列的两侧设计 PCR 引物。上游引物为 GRA6P1(547 – 565bp): 5'-GCGAGTCACCATGGCAGCAGACACGCGT-GGTG-3'; 下游引物为 GRA6P2(856 – 876bp): 5'-CGC GGATCCTCTGTGGCGTTTCTGTGTTCC-3'。在上游引物上增加了 *Nco* I 酶切位点(下画线部分),并在 5' 端增加了 8 个保护碱基,以利于 *Nco* I 酶切割。在下游引物上增加 *Bam* H I 酶切位点(下画线部分)。

在弓形虫 P30 蛋白抗原表位的 DNA 序列的两侧选择设计 PCR 引物。设计上游引物为 P30P3(166 – 184bp): 5'-CTGGGATCCCAAGTTGTCACCTGCCCA-3'; 下游引物为 P30P4(922 – 939bp): 5'-GTCGAAT-TC TTATCCCGCAGCCGATTTTGC-3'。在上游引物上增加了 *Bam* H I 酶切位点(下画线部分),并在 5' 短增加了 3 个保护碱基,以利于 *Bam* H I 酶切割。在下游引物上增加 *Eco* R I 酶切位点(下画线部分)及终止密码子(斜体)。

以提纯的弓形虫 DNA 为模板,分别用 GRA6P1、GRA6P2 及 P30P3、P30P4 引物对 PCR 扩增 GRA6 和 P30 蛋白的抗原表位的基因片段。反应浓度为:弓形虫 DNA 为模板 2 $\mu$ L,引物 P1、P2 各 1 $\mu$ L,10x buffer 5.0 $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP 4.0 $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L(2.5 U),去离子水 36.5 $\mu$ L,总体积 50 $\mu$ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 30s,65 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 60s,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。各取 PCR 产物 5 $\mu$ L,用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果扩增出了 352 bp 的 GRA6 基因片段和 795 bp 的 P30 基因片段(图 3)。电泳回收、纯化扩增的基因片段,溶于 20 $\mu$ L 去离子水内,置 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

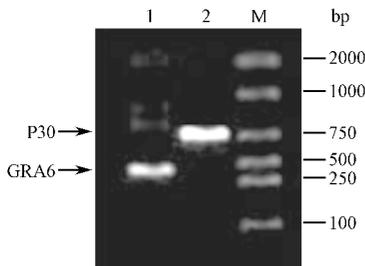


图 3 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果

Fig.3 Electrophoresis of the PCR products by 1.2% agarose

1. GRA6 gene fragment of 352 bp;
2. P30 gene fragment of 795 bp;
- M. DNA markers(TaKaRa DL2000)

## 2.3 表达融合蛋白重组质粒的构建

用 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切质粒 pET28a(+),*Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切 GRA6 基因片段,*Eco* R I 和 *Bam* H I 双酶切 P30 蛋白基因片段,电泳后回收酶切的质粒大片段及目的基因片段,分别溶于 20 $\mu$ L 去离子水内。取上述三种酶切的 DNA 片段,按等摩尔浓度混匀,在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接(16 $^{\circ}$ C 过夜),使 GRA6 基因片段与 P30 基因片段串联插入到载体 pET28a(+ )内的 *Nco* I 和 *Eco* R I 位点之间(构建流程见图 4),两者翻译框架一致,表达一个融合蛋白。

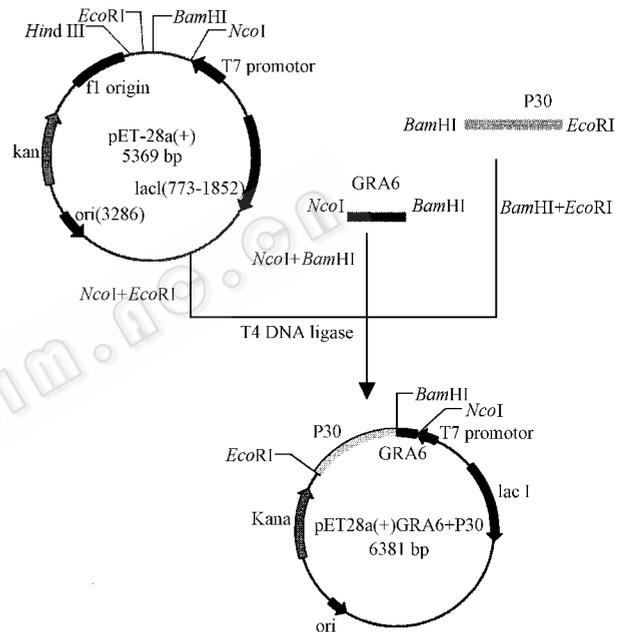


图 4 表达弓形虫 GRA6 和 P30 融合蛋白的重组质粒构建流程图

Fig.4 Construction of the recombinant plasmid expressing the chimeric protein of GRA6 and P30

## 2.4 重组质粒的筛选

将上步连接的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 将转化产物涂布含卡那霉素(60 $\mu$ g/mL)的固体 LB 培养基上,置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日随机挑选 6 个转化子菌落和一个含有质粒 pET28a(+ )的对照菌,分别接种到含 4 mL 液体 LB 培养基(含卡那霉素 60 $\mu$ g/mL)的试管内,置 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 6 h,取菌液 1 mL,离心收菌。分别用 50 $\mu$ L 去离子水悬浮菌体,沸水煮 5 min,离心(4 $^{\circ}$ C,12000 r/min)5 min,取上清(内有质粒)2 $\mu$ L 用作 PCR 模板。用引物 GRA6P1 和引物 P30P4 组成引物对,以提取的质粒为模板进行 PCR 鉴定,含有弓形虫 GRA6 基因片段与 P30 蛋白基因片段串联基因的重组质粒,应扩增出一条

1132bp 基因片段。

取 PCR 扩增产物 5 $\mu$ L,用 1.2% 的 Agarose 凝胶电泳检测,结果,6 个转化子中有 4 个(第 1、2、4、6 号重组子)扩增出 1132bp 的目的基因片段(见图 5),2 个转化子(第 3、5 号重组子)和含质粒 pET28a(+) 的对照菌没有扩增出该基因片段。初步证实,其中 4 个转化子含有串联的弓形虫 GRA6 基因片段与 P30 蛋白基因片段。

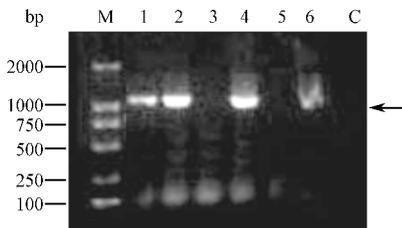


图 5 PCR 扩增鉴定 6 个重组子

Fig.5 Identification of the 6 recombinants with PCR

1~6.6 recombinant ;

C. Control plasmid pET28a(+) ;

M. DNA markers( TaKaRa , DL2000 )

## 2.5 表达融合蛋白工程菌的筛选鉴定

将上述 6 个转化子,分别接种至含 3 mL LB 培养基(含卡那霉素 60 $\mu$ g/mL)的试管内,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h,加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,继续振荡培养诱导 6 h,离心收集菌体进行 SDS-PAGE 检测。电泳检测显示(图 6)4 个 PCR 鉴定阳性的重组子均表达相对分子量约为 39000 的融合蛋白,表达量约为 25%,而对照菌和 2 个 PCR 鉴定阴性的重组子均无此蛋白带。证实获得了高表达弓形虫 GRA6 基因片段与 P30 蛋白基因片段融合蛋白的工程菌。

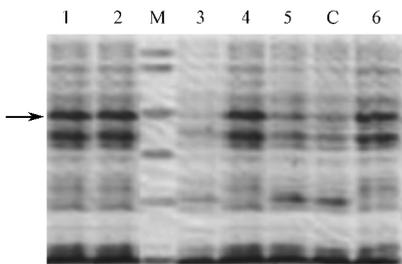


图 6 表达弓形虫 GRA6 和 P30 融合蛋白重组菌的 12% SDS-PAGE 分析结果

Fig.6 Analysis of the 6 recombinants by 12% SDS-PAGE

1~6.No.1 , No.2 , no.4 , and No.6 recombinants expressed the chimeric protein (39kD);No.3 and No.5 recombinants

expressed no the chimeric protein

C. control *E. coli* BL21( DE3 )

## 2.6 DNA 序列分析结果

将表达目的蛋白的 1 号转化子,提取质粒进行

DNA 序列测定,重组质粒内的 GRA6 基因片段与 P30 基因片段的 DNA 序列完全正确,结果如下:

ATG GCA GCA GAC AGC GGT GGT GTT AAG CAG ACC CCT  
TCG GAA ACC GGT TCG AGC GGT GGA CAG CAA GAA GCA  
GTG GGG ACC ACT GAA GAC TAT GTC AAC TCT TCG GCG  
ATG GGC GGT GGC CAA GGC GAC TCG TTA GCT GAA GAT  
GAT ACA ACC TCC GAA GCG GCG GAG GGC GAC GTT GAC  
CCT TTT CCC GTG CTG GCG AAT GAG GGG AAG TCG GAG  
GCG CGT GGC CCG TCG CTC GAG GAA AGA ATC GAA GAA  
CAG GGC ACA AGA CGA CGT TAC TCC TCT GTT CAA GAA  
CCA CAA GCG AAG GTG CCT AGC AAA CGA ACA CAG AAA  
CGC CAC AGA GGA TCC CAA GTT GTC ACC TGC CCA CAT  
AAA AAA TCG ACA GCC GCG GTC ATT CTC ACA CCG ACG  
GAG AAC CAC TTC ACT CTC AAG TGC CCT AAA ACA GCG  
CTC ACA GAG CCT CCC ACT CTT GCG TAC TCA CCC AAC  
AGG CAA ATC TGC CCA GCG GGT ACT ACA AGT AGC TGT  
ACA TCA AAG GCT GTA ACA TTG AGC TCC TTG ATT CCT  
GAA GCA GAA GAT AGC TGG TGG ACG GGG GAT TCT GCT  
AGT CTG GAC ACG GCA GGC ATC AAA CTC ACA GTT CCA  
ATC GAG AAG TTC CCC GTG ACA ACG CAG ACG TTT GTG  
GTC GGT TGC ATC AAG GGA GAC GAC GCA CAG AGC TGT  
ATG GTC ACG GAG ACA GTA CAA GCC AGA GCC TCA TCG  
GTC GTC AAT AAT GTC GCA AGG TGC TCC TAC GGT GCA  
GAC AGC ACT CTT GGT CCT GTC AAG GTG TCT GCG GAA  
GAA CCC ACT ACA ATG ACC CTC GTG TGC GGG AAA GAT  
GGA GTC AAA GTT CCT CAA GAC AAC AAT CAG TAC TGT  
TCC GGG ACG ACG CTG ACT GGT TGC AAC GAG AAA TCG  
TTC AAA GAT ATT TTG CCA AAA TTA ACT GAG AAC CCG  
TGG CAG GGT AAC GCT TCG AGT GAT AAG GGT GCC ACG  
CTA ACG ATC AAG AAG GAA GCA TTT CCA GCC GAG TCA  
AAA AGC GTC ATT ATT GGA TGC ACA GGG GGA TCG CCT  
GAG AAG CAT CAC TGT ACC GTG AAA CTG GAG TTT GCC  
GGG GCT GCA GGG TCA GCA AAA TCG GCT GCG GGA TAA

## 2.7 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱纯化弓形虫融合蛋白

将 DEAE-Sepharose FF 阴离子柱穿过峰及不同浓度 NaCl 洗脱的各峰蛋白进行 SDS-PAGE 分析显示,弓形虫融合蛋白(分子量 39000)主要存在于 300 mmol/L NaCl 洗脱峰内(见图 7),有较高的纯度;在 200mmol/L NaCl 洗脱峰内亦有弓形虫融合蛋白,但含有其它杂蛋白;其它浓度 NaCl 洗脱峰内无此蛋白带。

## 2.8 间接 ELISA 检测血清中的弓形虫 IgM 抗体

将纯化的融合蛋白与已知不同浓度的牛血清白蛋白(第五部分)共同电泳、显色后比较,确定纯化的重组融合蛋白浓度约为 2mg/mL。将纯化的弓形虫 GRA6 与 P30 融合蛋白 1:500~1:8000 倍比稀释包被酶联板,检测已知的一份抗弓形虫 IgM 阳性血清

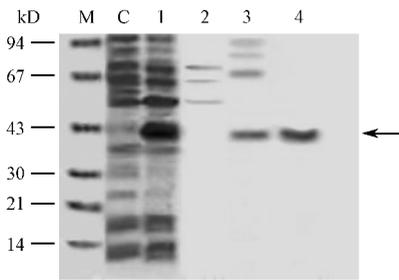


图7 纯化弓形虫 GRA6 和 P30 融合蛋白的  
12% SDS-PAGE 分析结果

Fig.7 Analysis of purified chimeric protein by 12% SDS-PAGE

M. Protein markers, C. Control *E. coli* BL21(DE3)

1. The engineered *E. coli* expressing chimeric protein

2. Eluted protein with 100 mmol/L NaCl

3. Eluted protein with 200 mmol/L NaCl

4. Eluted protein with 300 mmol/L NaCl

和 1 份正常人血清 结果显示(见表 1), 融合蛋白能与抗弓形虫 IgM 阳性血清反应, 不与正常人血清反应, 初步说明该融合蛋白有较好的抗原性和特异性。

表 1 融合蛋白的 ELISA 实验结果( $A_{450}$  值)

Table 1 ELISA results of detection of  
Anti-*Toxoplasma gondii* IgM

Coated chimeric protein	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	1.632	1.216	0.970	0.541	0.216
IgM positive serum					
Human normal serum	0.120	0.052	0.036	0.022	0.027

用 50mmol/L 碳酸盐溶液 (pH9.6) 1:1000 稀释纯化的重组融合蛋白, 包被酶联板 检测已知 6 份抗弓形虫阴性血清和 6 份抗弓形虫阳性血清。结果显示 6 份抗弓形虫 IgM 阴性血清均不显色, 6 份抗弓形虫 IgM 阳性血清均出现显色反应, 说明该融合蛋白有较好的抗原性和特异性。用酶联仪测定各孔样本的  $A_{450}$  值(见表 2)。另外检测了实验室保存的 184 份正常人血清, 它们的  $A_{450}$  值均小于 0.05, 进一步证实了该融合蛋白有较好的特异性。

表 2 纯化融合蛋白 ELISA 实验结果( $A_{450}$ )<sup>\*</sup>

Table 2 ELISA results of detection of Anti-*Toxoplasma gondii* IgM ( $A_{450}$  value)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.051	0.043	0.028	0.036	0.039	0.034	0.703	0.805	0.949	0.698	1.319	1.207
0.048	0.050	0.030	0.040	0.037	0.031	0.730	0.814	0.930	0.718	1.401	1.216

\* : 1~6 : 6 anti-*Toxoplasma gondii* IgM negative sera, 7~12 : 6 anti-*Toxoplasma gondii* IgM positive sera

### 3 讨论

弓形虫感染的实验室检测方法主要包括活体组织检查和动物接种、PCR 检测弓形虫基因、ELISA 检测弓形虫抗体。第一种方法成功率低、耗时长。PCR 检测法在临床及孕妇等检测时不实用。目前国内应用较多的是 ELISA 法检测特异的抗弓形虫 IgG 与 IgM。血清内的弓形虫特异的 IgM 阳性说明近期感染了弓形虫, 如果是孕妇则最好终止怀孕。

目前我国使用的弓形虫蛋白抗原多是培养病原提取物, 含有多个蛋白产物, 抗原特异性不强, 易产生假阳性。利用基因工程制备弓形虫特异性的抗原受到国内外的重视, 国外已克隆表达了多个重组弓形虫抗原, 并对它们的抗原性进行了鉴定, 用重组表达的弓形虫 B10 蛋白作抗原, 免疫印迹和酶联免疫方法检测人血清内的抗弓形虫抗体, 均显示该蛋白有很好的抗原性<sup>[3]</sup>。Nockemann<sup>[4]</sup>的研究证实, 重组表达的 P35 抗原不仅有较好的抗原性, 而且可区分是新近感染还是既往感染, 血清内检测出此抗原的抗体, 提示病人是新近感染, 所以该蛋白亦有较好的

应用前途。另外表达的两种重组弓形虫蛋白 NTP 酶<sup>[5]</sup>和 P24 抗原<sup>[6]</sup>, 其抗原性和特异性尚有待鉴定, 能否用作抗原检测病人血清内的抗弓形虫抗体尚不能确定。相比之下, 弓形虫的 GRA6 蛋白和 P30 蛋白具有较强的抗原性, 在弓形虫感染者的血清中其相应的抗体检出率较高, 但是用全长 GRA6 蛋白和 P30 蛋白作抗原检测弓形虫抗体有两个缺点: 一是会出现假阳性; 二是要调整使用两种抗原的比例, 实验较繁琐; 三是用捕获法检测抗弓形虫抗体时, 需标记 GRA6 蛋白和 P30 蛋白两个蛋白。

我们分别选择弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白内的抗原性强、特异性好的部分片段, 利用基因工程技术表达两者的融合蛋白, 表达的 GRA6 蛋白和 P30 蛋白的融合蛋白, 有较多优点: 1) 这两个蛋白作抗原检测抗弓形虫 IgM 血清时, 不再需要分别制备这两种蛋白, 也不需要调整两个抗原的使用比例, 因此应用方便且成本较低。2) 当用捕获法检测抗弓形虫 IgM 时, 只需酶标记这一种融合蛋白, 不再需要分别标记两个蛋白。因此, 当检测抗体需要多个蛋白抗原时, 制备多价融合蛋白抗原, 是理想的发展方向之

一。3) 构建的表达弓形虫 GRA6 蛋白和 P30 蛋白融合蛋白的工程菌, 表达量可达菌体蛋白的 25%, 主要以包涵体形式存在( 菌体裂解上清内有少量可溶性目的蛋白), 可大量纯化制备该融合蛋白。目前国内未见表达该融合蛋白的报道。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Lecordier L, Fourmaux MP, Mercier C *et al.* Enzyme-Linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7**(4): 607 – 611
- [ 2 ] Nam HW, Im KS, Baek EJ *et al.* Analysis of antigenic domain of GST fused major surface protein( p30 ) fragments of *Toxoplasma gondii*. *Korean J Parasitol*, 1996, **34**(2): 135 – 141
- [ 3 ] Nockemann S, Dlugonska H, Henrich B *et al.* Expression, characterization and serological reactivity of a 41 kDa excreted-secreted antigen( ESA ) from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998, **97**(1 – 2): 109 – 121
- [ 4 ] Li S, Maine G, Suzuki Y *et al.* Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(1): 179 – 184
- [ 5 ] Johnson AM, Illana S, McDonald PJ *et al.* Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. *Gene*, 1989, **85**(1): 215 – 220
- [ 6 ] Tanaka T, Xuan X, Kato M *et al.* Expression of recombinant *Toxoplasma gondii* P24. *J Vet Med Sci*, 1999, **61**(11): 1235 – 1239

## Expression, Purification and Serological Reactivity of a Chimeric Antigen of GRA6 with P30 from *Toxoplasma gondii*

LI Yue-Xi\* ZHANG Jin-Hai<sup>1</sup> TAO Kai-Hua<sup>1</sup> HUANG Pei-Tang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( East-China Institute of Medical Biotechniques, Nanjing 210002 )

<sup>2</sup>( Beijing Biotechnology Institute, Beijing 100071 )

**Abstract** Major surface protein( p30 ) and Dense Granule Antigen GRA6 of *Toxoplasma gondii* have good antigenicity, and could be used for detection of IgM against *Toxoplasma gondii*. GRA6 may complement P30 to reach more high sensitivity for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*, so, we try to express the chimeric protein of GRA6 and P30 by genetic engineering, identify its antigenicity and use for developing diagnosis reagent.

Antigenic domains of p30 and GRA6 of *Toxoplasma gondii* were screened by analyzing their sequences using the software ANTHEWIN. Two DNA fragments encoding respectively antigenic domains of p30 and GRA6 were cloned, they were inserted into the same expression vector pET28a( + ) and expressed as a chimeric protein in *Escherichia coli*. BL21( DE3 ), the expressed chimeric protein of p30 with GRA6 in a form of inclusion body was about 25% of total proteins of *E. coli*. BL21( DE3 ). The inclusion body was washed once with 0.5% Triton X-100 and dissolved with 0.5% SKL, after renaturation by gradient dialysis, the recombinant protein was purified by DEAE-Sepharose FF cation column and then detected with 12% SDS-PAGE, it exists mainly in the eluted peak with 300 mmol/L NaCl and has high purity.

By using enzyme-linked immunosorbent assay( ELISA ), the recombinant protein was examined for reactivity with immunoglobulin M( IgM ) antibodies in 6 sera from patients infected with *Toxoplasma gondii*. It was reactive with all the 6 sera but not with sera from normal people, these results showed that the recombinant chimeric antigen has good antigenicity and specificity and could be used for detection of IgM against *Toxoplasma gondii*. The expressed chimeric protein could be used for epidemic investigation of *Toxoplasma gondii*, blood donor screening, especially for detection of pregnant women, and is of great significance in prevention of *Toxoplasma gondii* infection.

**Key words** *Toxoplasma gondii*, p30, GRA6, expression and purification, ELISA