

内蒙古羊源细粒棘球蚴 *Eg95* 基因原核表达及蛋白鉴定

李志伟¹, 王志钢¹, 湛奎¹, 陈献威¹, 杨军², 李洁¹

(1. 内蒙古大学 生命科学学院 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021;

2. 内蒙古呼和浩特市环境科学研究所, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 在克隆内蒙古羊源细粒棘球蚴疫苗候选基因 *Eg95* 的基础上, 构建原核表达载体 pET-*Eg95* 并转化 *E. coli* BL21(DE3), 优化表达体系, 获得 *Eg95* 纯化蛋白。将 *Eg95* 基因从克隆质粒 pMD19-T-*Eg95* 亚克隆到原核表达载体 pET44a(+) 上, 构建原核表达载体 pET-*Eg95*, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 诱导表达, 优化表达条件。纯化的 *Eg95* 融合蛋白经 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定其正确性和免疫学活性。原核表达载体 pET-*Eg95* 在大肠杆菌中高效表达, 优化的原核表达条件为: 当菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 振荡培养 5 h。纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定为目的蛋白并具有生物学活性。原核表达载体 pET-*Eg95* 构建正确并可高效表达可溶性 Nus-*Eg95* 融合蛋白, 可作为特异性抗原应用于免疫印迹法检测血清抗体。

关键词: 细粒棘球蚴; *Eg95*; 原核表达; 蛋白纯化; 生物活性

中图分类号: S826; S852.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0057-04

Prokaryotic Expression and Identification of *Eg95* Gene from *Echinococcus granulosus* in Sheep

LI Zhi-wei¹, WANG Zhi-gang¹, ZHAN Kui¹, CHEN Xian-wei¹, YANG Jun², LI Jie¹

(1. College of Life Science, Inner Mongolia University, the Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Huhhot 010021, China; 2. Institute of Environmental Sciences, Huhhot, Inner Mongolia, Huhhot 010030, China)

Abstract: Constructing prokaryotic expression vector of *Eg95* gene from *Echinococcus granulosus* and expressing fusion protein in *E. coli* BL21(DE3) followed by gained purified protein. *Eg95* gene was subcloned into pET-44a(+) from clone vector pMD19-T-*Eg95* to construct the prokaryotic expression vector pET-*Eg95*. Nus-*Eg95* fusion protein was expressed successfully in *E. coli* BL21(DE3) at an optimized expression condition and then was purified after identification by SDS-PAGE and western blot. Prokaryotic expression vector pET-*Eg95* expressed efficiently in *E. coli* BL21(DE3). A high expression level was achieved by inducing the bacteria with 0.1 mmol/L IPTG at 0.6 of OD₆₀₀ value for 5 h at 37℃. Purified soluble fusion protein was identified to be the correct target protein by SDS-PAGE and western blot with favorable biological activity. The prokaryotic expression vector pET-*Eg95* was constructed successfully and expressed at a high level under the optimized expression condition. The fusion protein can be used to immunoblot assay as a specific antigen react with the antibodies in serum.

Key words: *Echinococcus granulosus*; *Eg95*; Prokaryotic expression; Protein purification; Biological activity

细粒棘球蚴病(*Echinococcosis*) 又称囊性包虫病(Cystic echinococcosis, CE), 是由细粒棘球绦虫的续绦期幼虫寄生于动物体内引起的一类重要的、具

有地方流行性的家畜寄生虫病。细粒棘球蚴寄生于动物的肝、肺、腹腔等内脏器官, 发育至一定程度对组织、器官形成机械性压迫, 造成不同程度的组织损

收稿日期: 2010-07-12

基金项目: 国家基础科学人才培养基金资助项目(J0730648); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目((NJ03122)

作者简介: 李志伟(1979-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 主要从事哺乳动物生殖生物学与生物技术研究。

通讯作者: 王志钢(1962-), 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 博士, 主要从事哺乳动物生殖生物学与生物技术研究。

伤和功能障碍,严重影响家畜的生长发育。

CE 呈全球性分布,畜牧业发达的地方往往是此病的流行区。我国 CE 主要分布于西部和北部的内蒙古、新疆、甘肃、宁夏、青海、四川和西藏等地^[1]。2000 年召开的我国西部地区寄生虫病专业会议上,CE 被确认为危害西部地区发展、人民健康和畜牧经济最严重的寄生虫病。免疫保护是阻断传染病、寄生虫病流行的有效手段。对中间宿主接种疫苗可控制包虫病的流行。因此,通过免疫预防途径控制和消灭包虫病是一项有效的措施和较为理想的途径。Eg95 是目前已知的具有较好免疫保护性的抗原。

Lightowlers 等^[2,3]从羊细粒棘球绦虫(新西兰株)六钩蚴 cDNA 文库中筛选得到 Eg95 cDNA,用含编码 Eg95 抗原 cDNA 的重组融合蛋白进行免疫试验,可诱导 96% 的保护力。Chow 等^[4]研究表明,来源于不同地域、不同宿主的 Eg95 基因间存在着差异,是一个基因家族,该基因家族至少包括 7 个成员^[5]。内蒙古羊源细粒棘球蚴 Eg95 基因与国内外其他来源 Eg95 基因同源性在 93% ~ 100%^[6],提示克隆细粒棘球蚴本地株的 Eg95 基因对制备基因工程疫苗,预防细粒棘球蚴病的流行十分必要。我们在已克隆到内蒙古羊源细粒棘球蚴 Eg95 基因的基础上,原核表达 Eg95 抗原,为制备包虫病亚单位疫苗创造条件。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种

克隆质粒 pMD19-T-Eg95,菌株 *E. coli*. DH5 α 和 BL21(DE3) 由本实验室保存。原核表达载体 pET-44a(+) 由本院侯鑫博士惠赠。

1.2 主要酶和生化试剂

限制性内切酶(*EcoR* I 和 *Hind* III)、T4 DNA 连接酶、DL2000 和 λ -*Eco*T14 I DNA Marker 及蛋白标准分子量 Protein Molecular Weight Marker (High) 购自宝生物工程(大连) 有限公司;质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 AXYGEN 公司;预染蛋白 Marker PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus 购自 Fermentas 公司;蛋白纯化试剂盒(TALON PurificationKit) 购自 Clontech 公司, Anti-His Antibody、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 购自天根生化科技(北京) 有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司;DAB 购自 Biottech 公司;确诊包虫病人血清由内蒙古医学院张莉博士惠赠,健康人血清采自内蒙古自治区医院体检健康人群;常规试剂均为国产分析纯。

1.3 原核表达载体 pET-Eg95 的构建

用 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切克隆质粒 pMD19-T-Eg95,所获得的小片段与经相同酶切的原核表达载体 pET-44a(+) 大片段连接,构建重组质粒 pET-Eg95 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。转化后的细胞涂布于预先加入 IPTG(24 mg/mL)、X-gal(20 mg/mL) 和 Amp(50 mg/mL) 的转化用 LB 固体平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。经蓝、白菌落筛选阳性克隆,增菌培养后,用质粒小量抽提试剂盒提取质粒。重组质粒经 *EcoR* I 单酶切、*EcoR* I + *Hind* III 双酶切及 PCR 鉴定正确后送上海生工生物技术有限公司测序。

1.4 表达条件优化

采用单因子法进行表达条件的优化,每项优化结果用于后续试验。重组质粒 pET-Eg95 转化 *E. coli*. BL21(DE3) 感受态细胞,挑取阳性克隆接种于 5 mL LB 培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素,0.2% 葡萄糖) 中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日按 1:100 接种到新鲜 LB 培养基中,诱导表达。表达条件优化包括诱导前 OD₆₀₀ 值、IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度等因素。诱导表达后,离心收集菌体,超声破碎细胞提取总蛋白,离心,取上清,10% SDS-PAGE 电泳分析表达结果。

1.5 可溶性分析

在优化的表达条件下,离心收集菌体,超声裂解后 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 15 min,10% SDS-PAGE 电泳检测上清和沉淀中的目的蛋白含量。

1.6 融合蛋白的纯化

采用 TALON Purification Kit 纯化融合蛋白。诱导表达后离心收集菌体,加入终浓度为 0.75 mg/mL 的溶菌酶,超声波破碎菌体。离心分离上清和沉淀,将上清与树脂充分结合。按试剂盒操作程序纯化目的蛋白,10% SDS-PAGE 检测。

1.7 Western Blot 鉴定

纯化蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离、转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 TBST 室温封闭 1 h。6 \times His 标签检测以鼠源 His-单抗(1:2 500) 为一抗,以羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗。AgB8/2 蛋白检测分别以病人血清(1:200) 和健康人血清(1:200) 为一抗,羊抗人 IgG-HRP 为二抗。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pET-Eg95 构建

克隆质粒 pMD19-T-Eg95 和原核表达载体 pET44a(+) 经 *EcoR* I + *Hind* III 双酶切,所获得的

Eg95 基因片段 (493 bp) 和 pET44a(+) 载体大片经 T4 DNA 连接酶作用, 构建重组质粒 pET-Eg95 (图 1), 经酶切和 PCR 鉴定正确 (图 2)。测序表明基因与载体连接正确。

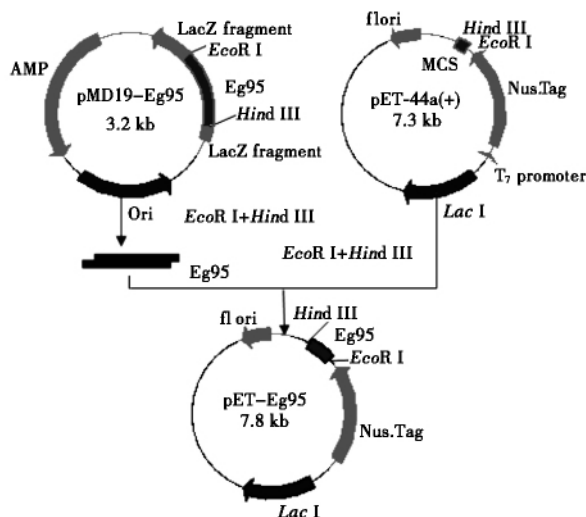
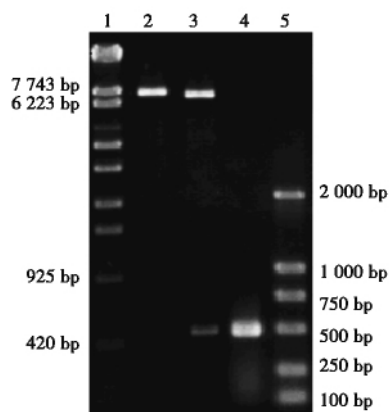


图 1 重组质粒 pET-Eg95 的构建

Fig. 1 Strategy for construction of recombinant plasmids pET-Eg95



1. λ EcoT14 I DNA Marker; 2. pET-Eg95/EcoRI 单酶切; 3. pET-Eg95/EcoRI + HindIII 双酶切; 4. 以 pET-Eg95 质粒为模板的 PCR 产物; 5. DL2000 DNA Marker.

1. DNA Marker (λ -EcoT14 I); 2. The recombinant pET-Eg95 digested by EcoRI; 3. The recombinant pET-Eg95 digested by EcoRI and HindIII; 4. PCR product of pET-Eg95 recombinant plasmid; 5: DNA Marker (DL2000).

图 2 pET-Eg95 重组质粒的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET-Eg95

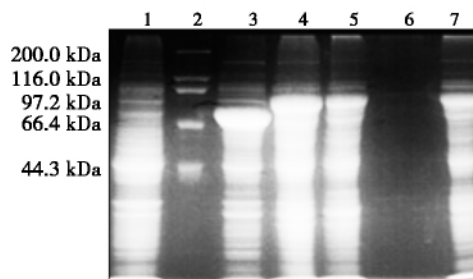
2.2 表达条件优化

pET-Eg95 中, NusA 及其他标签蛋白分子量约为 66.4 kDa, *Eg95* 基因编码包含 156 个氨基酸残基组成的蛋白, 分子量约为 17.1 kDa, 预期融合蛋白分子量约为 83.5 kDa。SDS-PAGE 结果显示, 在预期位置获得了一条特异性条带 (图 3)。通过对诱导前 OD₆₀₀、诱导时间、IPTG 浓度和温度的优化, SDS-PAGE 检测表明最佳表达条件为: 当菌液 OD₆₀₀ 值为 0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 振

荡培养 5 h。在优化的表达条件下, 诱导融合蛋白表达, 获得了可溶性蛋白的高表达 (图 3)。

2.3 可溶性分析及蛋白纯化

在大肠杆菌表达系统中外源蛋白通常以可溶性和包涵体两种形式存在。SDS-PAGE 分析表明, *Eg95* 融合蛋白在大肠杆菌体内主要以可溶的形式表达 (图 3)。获得的纯化蛋白 (图 4) 杂带基本去除, 可以用于血清学检测。

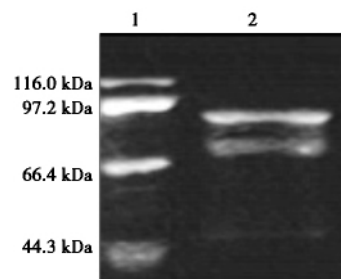


1. BL21 菌体总蛋白; 2. 蛋白标准分子量 Protein Molecular Weight Marker (High); 3. BL21/pET-44a(+) 菌体总蛋白; 4. BL21/pET-Eg95 菌体总蛋白; 5, 7. BL21/pET-Eg95 可溶性蛋白; 6. BL21/pET-Eg95 非可溶性蛋白。

1. The total protein of BL21; 2. Standard protein marker (Protein Molecular Weight Marker); 3. The total protein of BL21/pET-44a(+); 4. The total protein of BL21/pET-Eg95; 5, 7. The soluble protein of BL21/pET-Eg95; 6. The inclusion body protein of BL21/pET-Eg95.

图 3 可溶性蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the soluble protein

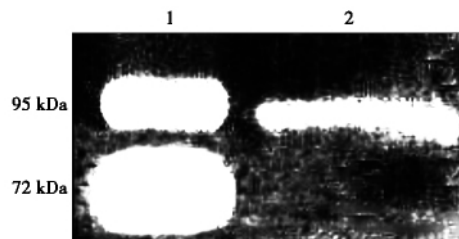


1. 蛋白标准分子量 Protein Molecular Weight Marker (High); 2. 纯化的可溶性蛋白。

1. Standard protein marker (Protein Molecular Weight Marker); 2. The purified soluble protein.

图 4 纯化的融合蛋白 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified fusion protein



1. 蛋白标准分子量 PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; 2. 纯化的融合蛋白。

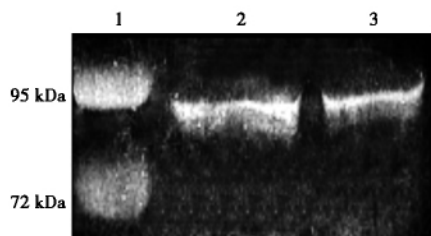
1. Standard protein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus); 2. The fusion protein after purification.

图 5 融合蛋白 His 单抗 Western Blot 分析

Fig. 5 Western Blot analysis of the fusion protein with Anti-His antibody

2.4 Western Blot 检测

纯化的 Eg95 融合蛋白带有 2 个 6 × His 标签, 以 Anti-His 单克隆抗体检测表明可与融合蛋白特异性结合(图 5)。用确诊包虫病人手术前血清和健康人血清分别作为一抗, Western Blot 检测表明, Nus-Eg95 融合蛋白可特异性识别病人血清(图 6), 而不能识别健康人血清。证明得到了纯化的 Eg95 蛋白。



1. 蛋白标准分子量 PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; 2 3. 纯化的融合蛋白。
1. Standard protein marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus); 2 3. The fusion protein after purification.

图 6 确诊包虫病人血清为一抗的 Western Blot 分析
Fig. 6 Western Blot analysis of recombinant protein with the serum of a Cystic Echinococcosis patient

3 讨论

CE 是一种广泛流行、致病性强且难以防治的寄生虫病, 目前尚无有效的预防性疫苗。国内外的研究表明, Eg95 是具有较好应用前景的免疫抗原。研究表明, 巨噬细胞和补体均可在体外杀伤细粒棘球蚴原头蚴^[7], 感染细粒棘球蚴的犬淋巴结细胞增殖反应明显增强, 血 IgG、IgE 和 IgA 显著升高^[8, 9]。Rigano 等^[10]发现人感染细粒棘球蚴后, 周围血单核细胞产生的 IFN 和 IL 显著升高。表明宿主在防御细粒棘球蚴感染过程中不仅有体液免疫应答, 而且有非特异性反应参与, 这为研制细粒棘球蚴病疫苗提供了理论依据。但是, 由于细粒棘球蚴抗原成分复杂且很难成批供应大量灭活虫体, 因而用其免疫接种在实际工作中受到限制。利用细粒棘球蚴一些具有保护性表位的抗原分子, 应用基因工程方法研制有效的细粒棘球蚴疫苗十分必要。

细菌生长速率严重影响外源蛋白的表达, 生长过度或过速都会加重细菌合成系统的负担, 导致形成包涵体。在原核表达体系中对接种菌量、诱导时间和诱导后细菌密度进行优化是保证获得大量可溶性蛋白的必要条件。本试验选择了 pET-44a(+) 构建重组表达载体 pET-Eg95, 通过对诱导时间、IPTG 浓度、诱导前菌液 OD₆₀₀ 和诱导温度进行梯度优化, 大大提高了融合蛋白的可溶性表达。用囊性包虫病人血清和健康人血清对纯化的 Eg95 融合蛋白进行 Western Blot 检测表明该蛋白可特异性地识别包虫病人血清中的抗体, 确定了表达蛋白的正确性。这一结果表明, 表达出的 Eg95 蛋白具有天然蛋白的结构和功能, 可进一步用于研制重组疫苗和包虫病的免疫预防。

参考文献:

- [1] 蒋次鹏. 我国包虫病流行近况 [J]. 地方病通报, 2002, 17(3): 77-79.
- [2] Lightowlers M V, Lawrence S B, Gauci C G, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen [J]. Parasite Immunol, 1996, 18(9): 457-462.
- [3] Lightowlers M V, Jensen O, Fernandez E, et al. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep [J]. Int J Parasitol, 1999, 29: 531-534.
- [4] Chow C, Charles G G, Alan F C, et al. A gene family expressing a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 118(1): 83-88.
- [5] 潘卫庆, 汤林华. 分子寄生虫学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 345-399.
- [6] 李志伟, 王志钢. 细粒棘球蚴内蒙株疫苗候选基因 Eg95 克隆 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(1): 56-57.
- [7] Jenkins R E, Tanner J A. The structure of the major protein of the human erythrocyte membrane. Characterization of the intact protein and major fragments [J]. Biochem J, 1977, 161(1): 139-147.
- [8] Deplazes P, Jimenez-Palacios S, Gottstein B, et al. Detection of *Echinococcus* coproantigens in stray dogs of northern Spain [J]. Appl Parasitol, 1994, 35(4): 297-301.
- [9] Deplazes P, Thompson R C, Constantine C C, et al. Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: systemic and local (Peyer's patches) immune responses [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 40(2): 171-184.
- [10] Rigano P, Manfre L, La Galla R, et al. Clinical and hematological response to hydroxyurea in a patient with Hb Lepore/beta-thalassemia [J]. Hemoglobin, 1997, 21(3): 219-226.