基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-0977-04

# 细粒棘球绦虫重组质粒 pBI-Eg95 构建及其在根癌农杆菌 LBA4404 中表达效率的研究

周 辉,李文桂,叶艳菊

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建细粒棘球绦虫重组质粒 pBI-Eg95,分析其在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*,*At*)LBA4404 株中的表达效率。方法:从细粒棘球蚴包囊中分离原头节,超声粉碎后抽提总 RNA,采用 RT-PCR 方法扩增 Eg95 编码基因,将该基因定向克隆到植物表达载体 pBI121 中构建 pBI-Eg95 重组质粒;电穿孔转化 *At*(LBA4404),抽提质粒进行酶切及 PCR 鉴定。用 IPTG 分别诱导 rAt 0、1、3、5、7、9、11 和 13 h,用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定所表达的蛋白质。结果:471bp Eg95 基因克隆成功。经酶切及 PCR 证实重组质粒 pBI-Eg95 成功转入 *At*(LBA4404)。用 Bio-Rad Quantity one 分析系统分析,表达产物分子质量(*Mr*)约为 16.5 kD,且能被感染细粒棘球蚴的鼠血清特异识别,表达效率为约占 LBA4404 菌体总蛋白的 20%。结论:成功构建了细粒棘球绦虫重组质粒 pBI-Eg95,且能在 *At*(LBA4404)中表达,为进一步研究细粒棘球绦虫转基因植物疫苗奠定了基础。

【关键词】细粒棘球绦虫;重组质粒 pBI-Eg95;根癌农杆菌;构建;表达效率

【中国图书分类法分类号】R383.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-05-19

# Construction and expression efficiency of the recombinant plasmid pBI-Eg95 of *Echinococcus granulosus* in the agrobacterium tumefaciens LBA4404 strain

*ZHOU Hui, et al*

(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the recombinant plasmid pBI-Eg95 of *E. granulosus*, and to study its expression efficiency in the *Agrobacterium tumefaciens* (*At*) LBA4404 strain. *Methods*: Total RNA was extracted from hydatid cyst protoscoleces shattered by supersound. The Eg95 coding gene was amplified by RT-PCR, and then was cloned into the plant expression vector pBI121 to construct the recombinant plasmid pBI-Eg95. The recombinant plasmid was electroporated into *At* (LBA4404) strain. The recombinant *At* (*rAt*) was induced by IPTG for 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11or13 hour, respectively. The expression product was identified by SDS-PAGE and Western blot assay. *Results*: The 471bp Eg95 coding gene was successfully amplified, and the recombinant pBI-Eg95 plasmid was successfully constructed, which was confirmed by restriction endonuclease digestion and PCR. The recombinant plasmid pBI-Eg95 was expressed successfully in the *rAt*, and the expression product with an approximately *Mr* of 16.5 kD could be detected by sera from mice infected by *E. granulosus*, and the expression efficiency was about 20 percent of the total bacterial protein. *Conclusion*: The recombinant plasmid could provide the basis for further research of the transgenic plant vaccine of *E. granulosus*.

【Key words】*Echinococcus granulosus*; Recombinant pBI-Eg95 plasmid; *Agrobacterium tumefaciens*; Construction; Expression efficiency

棘球蚴病(Echinococcosis)又称包虫病(hydatid disease),是由棘球属绦虫的中绦期幼虫引起的一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。其中由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*,*Eg*)的续绦期幼虫引起的称囊性棘球蚴病(Cystic echinococcosis, CE),主要累及人体肝、肺等脏器。本病呈世界性分布,在我国主要分布于西北牧区,但有向全国蔓延的趋势,危害大。因此,寻求 CE 的有效预防措施十分必要。随着分子生物学技术的发展,研制疫苗防治该病已成为广大学者的共识。Lightowlers 等[1,2]发现 Eg95 重组蛋白疫苗免疫中间宿主(羊),可抵抗六钩蚴的感染,并获得 96%~100%的免疫保护作用,其中 86%得到完全保护,提示 Eg95 是一种有希望的疫苗分子。因此,本研究拟将细粒棘球绦虫

作者介绍:周 辉(1980- ),男,硕士,
研究方向:病原微生物的分子生物学。
通讯作者:李文桂,男,研究员,E-mail: li_wengui@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金项目(30671835)。

Eg95 编码基因插入植物表达载体 pBI121,构建重组质粒 pBI-Eg95,电穿孔转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*,*At*),并研究 Eg95 能否在 *At* 中表达,表达的蛋白能否被活动性细粒棘球蚴鼠血清识别,为进一步研究细粒棘球绦虫转基因植物疫苗打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*E.coli DH5α*(含 pBI121 质粒)、根癌农杆菌 LBA4404 株由西南大学生物技术中心裴炎教授惠赠;细粒棘球蚴动物模型由青海省地方病预防控制所王虎教授提供;RNeasy mini kits 和一步法 RT-PCR 试剂盒购自 QIAGEN 公司;高保真即用 PCR 扩增试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、N'N'-亚甲丙烯酰胺、R250 考马斯亮兰、过硫酸胺、二胺基联苯胺(DAB)、中分子质量蛋白质标准、N'N'N'N'-四甲基乙二胺(TEMED)均购自上海 Sangon 公司;*Xba* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、T4DNA 连接酶和 DNA marker 均购自 Fermentas 公司。硝酸纤维素膜购自重庆百萃生物公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(GAM IgG-HRP)购自北京邦定公司;感染细粒棘球蚴的小鼠血清、LB 及 YEB 培养基由本所制备。

### 1.2 方法

1.2.1 Eg95 编码基因的扩增 ①分离原头节:处死小鼠并取出腹腔中的包囊,剪碎,用纱布过滤得到原头节。②提取 Eg 原头节总 RNA:超声粉碎原头节,按 RNeasy mini 试剂盒说明书提取总的 RNA。③RT-PCR 扩增 Eg95 编码基因:根据 GenBank(AF199354)基因序列,自行设计一对引物:Eg95 上游引物 P1:5'-GCTCTAGAATGGCATTCCAGTTATGTCTC-3',下游引物 P2:5'-GCGAGCTCTCAAGTAAGGACAACCAC-TATGC-3'。在引物的上游及下游端分别引入 *Xba* Ⅰ和 *Sac* Ⅰ位点,引物由上海 Sangon 公司合成。Eg95 的 RT-PCR 扩增条件:cDNA 合成 40℃ 30 min,94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 2 min,共 30 次循环,最后 72℃延伸 10 min。④Eg95 编码基因鉴定及测序:RT-PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。以研究之引物,对 RT-PCR 产物进行测序(上海 Sangon)。⑤Eg95 编码基因纯化:RT-PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒回收 471 bp 目的基因片段。

1.2.2 质粒 pBI121 的扩增 将含有 pBI121 的 *E.coli DH5α* 接种在含卡那霉素的 LB 液体培养基中 37℃振摇培养,待 $A_{600}$ 约 2.0 时按照 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒说明抽提质粒 pBI121。

1.2.3 重组质粒 pBI-Eg95 的构建 Eg95 编码基因的纯化产物和质粒 pBI121 分别用 *Xba* Ⅰ及 *Sac* Ⅰ双酶切,酶切体系各 60 μl:目的基因或载体 42 μl、*Xba* Ⅰ 1.3 μl、*Sac* Ⅰ 2.6 μl、10×TangoBuffer 6 μl、灭菌去离子水(DW)8.1 μl。置 37℃水浴 2 h,各取 3 μl 酶切产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,余下的酶切产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。按照酶切后载体与目的基因约 1:5 的摩尔比及 T4DNA 连接酶说明建立 20 μl 的连接体系:目的基因 5 μl、载体大片段 11 μl、10×T4 Buffer 2 μl、T4DNA 连接酶 2 μl。4℃过夜后,置 70℃水浴 10 min,灭活 T4DNA 连接酶。

1.2.4 连接产物转化 *At*(LBA4404) ①*At* 感受态的制备:取 *At*(LBA4404)株菌种,接种于 100 ml 含 50 μg/ml 链霉素的 YEB 液体培养基中,28℃,200 r/min, 振摇培养 48~72 h,待 $A_{600}$ 约 1.0 时,取 100ml 菌液,冰浴 2.5h。4℃ 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入预冷的 1% 甘油 50 ml,4℃ 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入预冷的 1% 甘油 25 ml,4℃ 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入预冷的 1% 甘油 10 ml,4℃ 1 500 r/min 离心 10 min,弃上清;加入预冷的 1% 甘油 1ml,混匀,此菌可直接用于电转化。②电穿孔转化 *At*:取 20 μl 连接产物和 80 μl *At* 感受态细菌于 1.5 ml EP 管,混匀,冰浴 1 min 后转移至电穿孔杯中(规格为 0.1cm);电穿孔参数设置:电压 1.2 kV、转化时间 5 ms、转化次数 2 次。转化完毕后 *rAt* 在电穿孔杯中停留 5~10 min,加入 1 ml YEB 液体培养基,轻轻混匀,转入 10 ml 培养管,28℃,200 r/min, 振摇 3 h。③重组质粒 pBI-Eg95 的扩增:取 *rAt* 的全部菌液涂布于含 50 μg/ml 卡那霉素的 YEB 琼脂平板上,28℃孵育 48~72 h。取单一菌落加入含 50 μg/ml 卡那霉素的 YEB 液体培养基中,28℃,200 r/min,振摇培养。待 *rAt* 培养至 $A_{600}$ 约 2.0 时按照 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒说明抽提质粒。④重组质粒 pBI-Eg95 的鉴定:以从 *rAt* 中抽提的质粒为模板进行 PCR 鉴定;用 *Xba* Ⅰ和 *Sac* Ⅰ对从 *rAt* 中抽提的质粒双酶切鉴定,酶切体系类似目的基因的制备。

### 1.3 重组质粒 pBI-Eg95 的诱导表达

将经鉴定含有重组 pBI-Eg95 质粒的 *At* 感受态细菌接种于含 50 μg/ml 卡那霉素的 YEB 液体培养基中,28℃,280 r/min 振摇 24~48 h,待 $A_{600}$ 为 0.5~0.8 时,加入 1 mmol/ml 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),至终浓度为 1 mmol/L,28℃,280 r/min 分别诱导 0、1、3、5、7、9、11 和 13 h。

### 1.4 SDS-PAGE 电泳

分别收集 1ml 未诱导及 IPTG 诱导后的菌液,加入 50 μl 的 1×蛋白上样缓冲液重悬后煮沸 5 min,离心后取上清 20 μl 进行聚丙烯酰胺凝胶(5% 的浓缩胶和 10% 分离胶)电泳,R250 考马斯亮兰染色,甲醇/冰乙酸脱色。

### 1.5 Western blot 分析

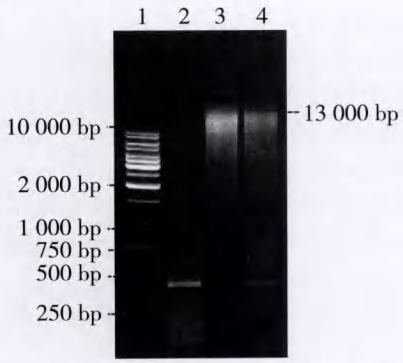
将 IPTG 诱导后的菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后,用半干转移系统将凝胶上的蛋白转移至硝酸纤上,于封闭液中室温摇床封闭 2 h,用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;将 NC 膜与用封闭液稀释的 1:20 感染细粒棘球蚴的鼠血清室温摇床孵

育 2 h；取出后用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，将其与用封闭液稀释的 1:1 000 的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 室温摇床孵育 2 h；用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min，最后将 NC 膜浸入 DAB 显色剂中避光反应 15 min，蒸馏水终止反应进行 Western blot 分析。

## 2 结 果

### 2.1 Eg95 编码基因、质粒 pBI121 及重组质粒 pBI-Eg95 的双酶切鉴定

经 *Xba* Ⅰ和 *Sac* Ⅰ酶双酶切后 Eg95 编码基因、质粒 pBI121 均呈现唯一条带，而重组质粒 pBI-Eg95 产生约 13kbp的载体片段和 500 bp 左右的目的基因片段，见图 1。




1. DNA 标志物；2. Eg95 基因双酶切产物；3. pBI121 质粒双酶切产物；4. pBI-Eg95 质粒双酶切产物

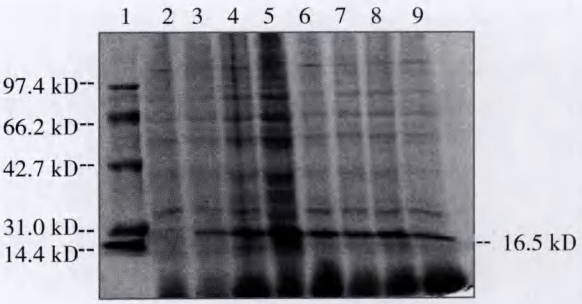
**图 1 基因 Eg95、质粒 pBI121 及重组质粒 pBI-Eg95 双酶切鉴定**

### 2.2 重组 pBI-Eg95 质粒表达产物的 SDS-PAGE 分析

*rAt*(pBI-Eg95)培养至对数生长期后，经 IPTG 诱导后，SDS-PAGE 电泳显示在 *Mr* 约 16.5 kD 处有明显的蛋白表达条带。其分子量与预期分子量大小相符。图像软件系统对凝胶上的蛋白条带进行分析表明，pBI-Eg95 蛋白约占全菌总蛋白的 20%，且在 IPTG 诱导 3~5 h 时表达量最高，而未用 IPTG 诱导的 *rAt* 没有相应的蛋白条带，见图 2。

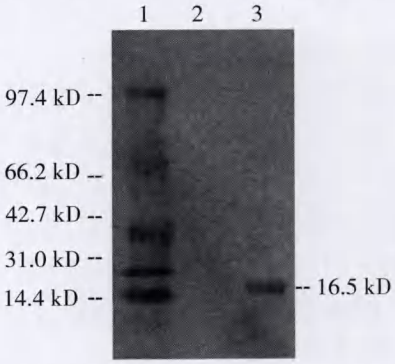
### 2.3 重组 pBI-Eg95 质粒表达产物的 Western blot 分析

经 IPTG 诱导 5 h 的重组 pBI-Eg95 质粒表达产物与感染细粒棘球蚴鼠血清反应后，在 *Mr* 约 16.5 kD 处有一特异反应条带，而非诱导的 *rAt* 中表达产物无此特异条带，见图 3。




1. 蛋白标准；2. 未经诱导的 *rAt* (pBI-Eg95)；3 ~ 9. IPTG 诱导 1、3、5、7、9、11 和 13 h 的 pBI-Eg95 转化菌

**图 2 pBI-Eg95 在 *rAt* 中表达产物的 SDS-PAGE 鉴定**




1. 蛋白标志物；2. 未经诱导的 *rAt* (pBI-Eg95)；3. 经 IPTG 诱导 5 h 的 pBI-Eg95 转化菌体蛋白与感染细粒棘球蚴鼠血清反应带

**图 3 pBI-Eg95 在 *rAt* 中表达产物的 Western blot 分析**

## 3 讨 论

Lightowlers 等[3]用抗 Eg 天然六钩蚴抗原(23~25 kD)的抗体扫筛 Eg 六钩蚴 λZAP cDNA 文库得到 1 个克隆，命名为 Eg95。其长度为 715 bp，其中 471 bp 基因可编码分子量 16.5 kD 的含 153 个氨基酸的蛋白质。氨基酸序列分析表明 Eg95 蛋白含有纤连蛋白Ⅲ型结构域，与免疫球蛋白超家族，细胞黏附分子，细胞表面受体和糖结合蛋白有部分同源性。免疫组化技术证实 Eg95 蛋白位于 Eg 虫卵的六钩蚴，育囊生发层和原头蚴以及成虫体被上，可能在 Eg 六钩蚴钻穿小肠绒毛上皮层的过程中起重要作用。韩秀敏等[4]用 DNA Star 软件对 Eg95 基因序列进行分析，Eg95 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，外显子Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ长度分别为 70 bp、30 bp 和 95 bp，推导 ORF 为 471 bp。本试验从感染 Eg 的 BALB/c 鼠中分离原头节提取 RNA，采用 RT-PCR 扩增出 471 bp 的 Eg95 编码基因，经电泳鉴定和测序分析均与预期长度相符，表明成功扩增出 Eg95 基因。将扩增出的 Eg95 基因定向克隆入植物表达载体 pBI121，构

建重组质粒 pBI-Eg95，并电穿孔转化根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*，*At*）LBA4404 株，经 PCR 及双酶切鉴定均证实 Eg95 编码基因成功插入载体 pBI121 中，并成功转化 *At*（LBA4404）。

Eg95 作为一种疫苗分子，能否正确表达以及表达效率的高低直接影响到该疫苗的作用能否有效发挥。胡旭初等[5]将构建的重组质粒 pMET-Eg95 用甲醇诱导表达，获得了较理想的表达蛋白。林仁勇等[6]把构建的 pCD-Eg95 重组质粒经脂质体转染 HeLa 细胞瞬时表达，发现能在该细胞中有效表达。李文桂等[7,8]将构建的 BCG-Eg95 疫苗采用热诱导在大肠杆菌中表达，表达效率约 12%。

根癌农杆菌是一种普遍存于土壤中的革兰氏阴性细菌，能在自然条件下感染大多数双子叶植物的受伤部位，并诱导产生冠瘿瘤，其细胞中含有 Ti 质粒（肿瘤诱导质粒），该质粒上含有 T-DNA（转移 DNA）。根癌农杆菌通过浸染植物伤口进入植物细胞，而将 T-DNA 插入到植物基因组中，因此是一种天然的植物遗传转化体系[9-12]。本研究将成功构建的细粒棘球绦虫重组 pBI-Eg95 质粒通过电穿孔转化 *At*（LBA4404），并用 1mmol/L IPTG 分别诱导表达不同时间，SDS-PAGE 分析发现经过 IPTG 诱导的 *rAt*（LBA4404）在分子量约 16.5 kD 处有明显的目的表达条带，与预期表达蛋白大小相符，提示重组 pBI-Eg95 能在 *At*（LBA4404）中表达。而非诱导的 *rAt* 没有发现明显条带，可能是表达的目的蛋白太少而 SDS-PAGE 无法检测。凝胶成像系统分析发现 pBI-Eg95 表达的蛋白含量约占 LBA4404 细菌总蛋白量的 20%，且在 IPTG 诱导的 3~5 h 蛋白表达量最高，提示 pBI-Eg95 在 *At*（LBA4404）中获得了较高的表达，同样浓度的 IPTG 诱导不同的时间蛋白表达效率不同，以 1 mmol/L 诱导 3~5 h 最佳。Western blot 鉴定发现 *At* 中表达的 pBI-Eg95 融合蛋白可以被感染细粒棘球蚴的小鼠血清特异识别，提示该重组抗原能够正确地折叠，保持着具有活性的免疫功能区，具有特异抗原性，为进一步研究开发细粒棘球绦虫转基因植物疫苗奠定了基础。

## 参 考 文 献


[1] Lightowlers M W, Lawrence S B, Gauci C G, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen[J]. Parasite Immunol, 1996, 18(9):457-462.

[2] Lightowlers M W, Jensen O, Fernandez E, et al. Vaccination trails in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(4):531-534.

[3] Lightowler M W, Flisser A, Gauci C G, et al. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease[J]. Parasitol Today, 2000, 16(5):191-196.

[4] 韩秀敏，史大中，贾万忠，等. 青海省羊源细粒棘球蚴 Eg95 基因的克隆与序列分析[J]. 中国兽医科技，2004，34(1):17-21.

[5] 胡旭初，徐 劲，陆家海，等. 细粒棘球蚴 Eg95 全长基因的克隆与在甲醇酵母中的表达[J]. 热带医学杂志，2003，3(1):28-31，95.

[6] 林仁勇，丁剑冰，卢晓梅，等. 细粒棘球绦虫 Eg95 抗原基因疫苗体外瞬时表达及对小鼠诱导的免疫应答[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，2004，22(4):204-208.

[7] 李文桂，朱佑明. 细粒棘球绦虫重组 BCG-Eg95 疫苗的构建及表达效率研究[J]. 免疫学杂志，2007，23(5):494-498.

[8] 朱佑明，李文桂. 细粒棘球绦虫 Eg95 抗原编码基因在 BCG 中的表达效率研究[J]. 中国病原生物学杂志，2006，1(2):95-97.

[9] Schell J, VanMontagu M, DeBeuckeleer M, et al. Interactions and DNA transfer between agrobacterium tumefaciens, the Ti-plasmid and the plant host[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1979, 204(1155):251-66.

[10] Ishida Y, Hiei Y, Komari T, et al. Agrobacterium-mediated transformation of maize[J]. Nat Protoc, 2007, 2(7):1614-1621.

[11] Lindbo J A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors[J]. BMC Biotechnol, 2007, 27(7):52

[12] Vega J M, Yu W, Kennon A R, et al. Improvement of Agrobacterium-mediated transformation in Hi-II maize (Zea mays) using standard binary vectors[J]. Plant Cell Rep, 27(2):297-305.


（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅