基础研究 文章编号：0253-3626(2009)01-0013-03

细粒棘球绦虫重组 pCD-Eg95 质粒构建及鉴定

周 辉，李文桂

（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：构建并鉴定细粒棘球绦虫（*Echinococcus* granulosus，Eg）重组 pCD-Eg95 质粒。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真核表达载体 pCDNA3.1 中构建 pCD-Eg95 重组质粒；电穿孔转化大肠杆菌 BL21（DE3）株，抽提质粒进行酶切及 PCR 鉴定。结果：电泳及测序证实 471 bp Eg95 基因克隆成功。经酶切及 PCR 证实重组质粒 pCD-Eg95 成功转入 BL21（DE3）。结论：成功构建了 Eg 重组 pCD-Eg95 质粒。

【关键词】细粒棘球绦虫；重组 pCD-Eg95 质粒；构建；鉴定

【中国图书分类法分类号】R383.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-29

Construction and identification of the recombinant pCD-Eg95 plasmid of *Echinococcus* granulosus

ZHOU Hui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To construct and identify the recombinant pCD-Eg95 plasmid of *Echinococcus* granulosus. *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 eukaryotic expression vector pCDNA3.1 to construct the recombinant pCD-Eg95 plasmid. The recombinant plasmid was electroporated into E. coliBL21(DE3) strain. *Results*: The 471 bp Eg95 coding gene was successfully amplified, and the recombinant pCD-Eg95 plasmid was successfully constructed, which was confirmed by restriction endonuclease digestion and PCR. *Conclusion*: The results could provide the basis for the further research of the nucleic acid vaccine of *Echinococcus* granulosus.

【Key words】 *Echinococcus* granulosus; Recombinant pCD-Eg95 plasmid; Construction; Identification

棘球蚴病（Echinococcosis）又称包虫病，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。本病分布广，危害大，是我国卫生部规划防治的 5 大寄生虫病之一。目前对该病的控制主要以中间宿主犬的驱虫和对牧民的健康教育为主，临床治疗仍以外科手术为主，药物治疗为辅，但手术对人体损伤大而且可能复发，药物化疗可产生严重的不良反应。因此，寻求 CE 的有效预防措施已迫在眉睫。Lightowlers 等[1,2]发现 Eg95 重组蛋白免疫中间宿主（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 Eg Eg95 编码基因插入真核表达载体 pCDNA3.1，构建重组 pCD-Eg95 质粒，为研究 Eg 核酸疫苗打下基础。

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

1 材料与方法

1.1 主要试剂

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、高效感受态细胞制备试剂盒均购自上海 Sangon 公司；*Xba* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ、T4DNA 连接酶和 DNA Marker 均购自 Fermentas 公司。LB 液体和固体培养基由本室制备。菌种及质粒：大肠杆菌 BL21（DE3）株、*E.coli* Top10（含 pCDNA3.1 质粒）由本室保存。

1.2 动物模型

感染 Eg 的 BALB/c 鼠由青海省地方病预防控制所王虎

教授提供;动物模型由本所用沙鼠传代保存。

1.3 Eg95 编码基因的扩增

①分离原头节:处死小鼠从腹腔中取出包囊,尽可能剪碎,利用 3 层沙布过滤得到原头节。②提取 Eg 原头节总 RNA:超声粉碎 Eg 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(X90928)基因序列,自行设计 1 对引物:Eg95 上游引物 P1:5'-CTCTAGA-ATGGCATTCCAGTTATGTCTC-3',下游引物 P2:5'-CGAATTC-TCACATTACAGTGCTTTCCTTCTTGC-3'。在上游及下游引物的 5'端分别引入 *Xba* Ⅰ 和 *EcoR* 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,由上海 Sangon 公司完成。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。

1.4 质粒 pCDNA3.1 的扩增

将含有 pCDNA3.1 的 *E.coli* Top10 接种在含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37℃振摇培养,待 A_{600} 大于 1.5 时按照 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒说明抽提质粒 pCDNA3.1。

1.5 重组质粒 pCD-Eg95 的构建

Eg95 编码基因的纯化产物和质粒 pCDNA3.1 分别用 *Xba* Ⅰ 及 *EcoR* 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、*EcoR* Ⅰ 1.3 μl、10 × Tango Buffer 6 μl、灭菌去离子水(DW)9.4 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 7.7 μl、载体大片段 8.3 μl、10 × T4Buffer 2 μl、T4DNA 连接酶 2 μl。4℃过夜后,置 70℃水浴 10 min,灭活 T4DNA 连接酶。

1.6 连接产物转化 *E. coli* BL21

①BL21(DE3)感受态的制备:按照高效感受态细胞制备试剂盒说明书进行操作,取 BL21(DE3)菌种接种 LB 平板,37℃孵箱过夜;挑取单个菌落于 LB 培养液中,37℃ 200 r/min 振摇过夜;加入 LB 培养液,37℃ 300 r/min 摇床培养 3 h,A_{600}=0.3~0.5 时取出冰浴 10 min;4℃ 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 solution A 悬浮菌体,冰浴 15 min;4℃ 3500 r/min 10 min,彻底弃上清,加入 solution B 悬浮菌体;此菌可直接用于转化。②电穿孔转化 BL21(DE3):取 20 μl 连接产物和 80 μl BL21(DE3)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 0.1 cm);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 rBL21 在电穿孔杯中停留 5~10 min,加入 1 ml LB 液体培养基,轻轻混匀,转入 10 ml 培养管,37℃,200 r/min,振摇 3 h。③重组质粒 pCD-Eg95 的扩增:取 rBL21 的全部菌液涂布于含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37℃孵育 48~72 h。取单一菌落加入含 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃,200 r/min,振摇培养。待 rBL21 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。

1.7 重组质粒 pCD-Eg95 的鉴定

①pCD-Eg95 的 PCR 鉴定:以从 rBL21 中抽提的质粒为模板进行 PCR。②pCD-Eg95 的酶切鉴定:用 *Xba* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 对从 rBL21 中抽提的质粒双酶切,酶切体系类似目的基因的制备。

2 结 果

2.1 Eg95 基因序列测定

上海 Sangon 公司测序发现其长度为 715 bp,序列分析表明其序列与预期的序列完全相同。

2.2 质粒 pCDNA3.1、重组质粒 pCD-Eg95 及 Eg95 编码基因的双酶切鉴定

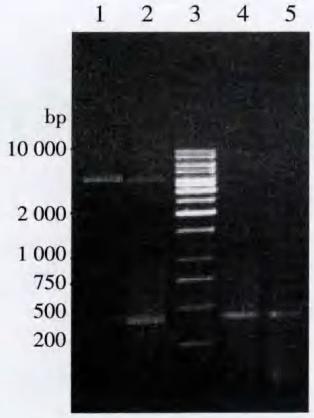
经 *Xba* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 酶双酶切后质粒 pCDNA3.1、Eg95 编码基因均呈现唯一条带,而重组质粒 pCD-Eg95 产生约 5 kb 的载体片段和 500 bp 左右的目的基因片段,见图 1。

2.3 重组质粒 pCD-Eg95 的 PCR 鉴定

以从 rBL21 中抽提的重组质粒为模板进行 PCR,可扩增出 500 bp 左右的目的基因片段,与双酶切产物的片段大小一致,而对照空载 BL21(DE3)单菌落为空白,见图 2。

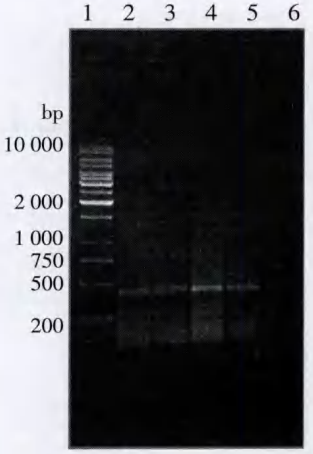
3 讨 论

Wolff 等[3](1990 年)将编码功能蛋白的质粒 DNA 肌肉注射小鼠,发现质粒 DNA 可在局部肌肉组织表达。这种 DNA 既是疫苗又是载体,故称为 DNA 疫苗。这为疫苗的发展开拓了一条崭新的途径。刁振宇等[4]在猪带绦虫融合抗原 pCC27 基因片段 5'末端引入辅助性 T 淋巴细胞表位(TGG),构建融合基因 STGG-CC27,插入 pVAX3.0 构建 pVAX-STGG-CC27。用 100 μg 重组质粒肌肉注射 BALB/c 小鼠,每 3 周 1 次,共注射 2 次,发现小鼠血清的抗 pCC27 IgG 在第 5 周达到最高,平均滴度为 1:1 024,同时 IgG1、IgG2a 以及 IgG2a /IgG1 比值也长时间保持较高应答水平。王媛媛等[5]将猪囊尾蚴保护性抗原 TSO45-4B 插入 pCDNA3.1 构建 pCDNA3.1-TSO45-4B。用 100 μg 重组质粒肌肉注射 BALB/c 小鼠,发现血清 IL-2、IL-4 及 IFN-γ 含量在第 2、4 周达到较高水平,第 8 周开始下降。孟民杰等[6]将猪囊虫抗原基因 TS76 的真核表达型质粒 VTS76 单独或与 pUC18 联合肌肉注射 BALB/c 小鼠,发现 VTS76 免疫小鼠各项细胞和体液免疫应答反应指数均比空白对照组小鼠显著提高,且联合免疫组小鼠的细胞免疫应答和体液免疫应答反应均比 VTS76 单独免疫组高,表明联合免疫能提高免疫应答效应。Rosas 等[7]在肥头绦虫 KETc7 抗原基因序列5'端引入 β 聚糖受体信号肽,克隆入 pCDNA3.0 构建 pTc-sp7。用



1. 质粒 pCDNA3.1 双酶切产物；2. 重组质粒 pCD-Eg95 双酶切产物；3. DNA 标志物；4～5. Eg95 基因双酶切产物

图 1 质粒 pCDNA3.1，重组质粒 pCD-Eg95 及基因 Eg95 双酶切鉴定



1. DNA 标志物；2～5. pCD-Eg95 的 PCR 产物；6. 空白对照

图 2 重组质粒 pCD-Eg95 的 PCR 鉴定

200 μg 重组质粒皮内注射 BALB/c 小鼠，每2 周 1 次，共 3 次，15 d 后发现小鼠血清相应 IgG 有显著升高；末次免疫 15 d 后，用 10 个幼虫腹腔注射小鼠，30 d 后发现雌性小鼠和雄性小鼠分别获得了 58.6%和 100%的保护力。Scheerlink 等[8]发现用 Eg95 的质粒 DNA 肌肉注射免疫羊 1 次，再用 Eg95 分子加强免疫，1 周后即可测出高水平 IgG 抗体，因而认为编码 Eg95 的质粒 DNA 免疫接种也是一种有效的方法。这些 DNA 疫苗主要有以下优点：同时兼有减毒活疫苗诱导全面免疫应答的能力和分子疫苗的安全性；能直接在宿主细胞内完成表达和后加工；能完整地保留产物的天然结构和抗原性；单次接种能诱导宿主持续产生表达蛋白，强化T 细胞和 B 细胞的记忆，能引起持久的细胞和体液免疫应答；目的基因很容易克隆入表达载体，制备简单，省时省力。

Lightowlers 等[9]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 kDa 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、细胞粘附分子、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[10]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。

质粒 pCDNA3.1 是一种真核表达载体，含有 CMV 启动子、GHpolyA 加尾信号和 SV40 早期启动子，能在真核细胞中高效表达插入的外源目的基因片段，是近年来构建 DNA 疫苗较为理想的载体。因此，本研究将 RT-PCR 扩增出的 Eg95 编码基因定向克隆入载体 pCDNA3.1，构建重组 pCD-Eg95 质粒，并电穿孔转化大肠杆菌 BL21(DE3)株，经 PCR 及双酶切鉴定均证实 Eg95 编码基因成功插入载体 pCDNA3.1 中，表明成功构建了 Eg DNA 疫苗。

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 conform the effectiveness of the Eg95 hydatid vaccine in sheep[J]. Int J Parasitol, 1999, 29(4):531-534.

[3] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. Science, 1990, 247(4949):1465-1468.

[4] 刁振宇，邓小昭，周宗安，等. 用辅助性 T 细胞表位增强猪带绦虫 DNA 疫苗的免疫保护反应[J]. 药物生物技术，2004，11(4):225-228.

[5] 王媛媛，孙 新，方 强，等. 猪囊尾蚴病重组 DNA 疫苗pcDNA3.1-TSO45-4B 在小鼠体内的表达及诱导的细胞免疫效应[J]. 中国病原生物学杂志，2007，2(4):262-265.

[6] 孟民杰，高 荣，沈 斌，等. 小鼠对猪囊虫抗原基因 TS76 的免疫应答[J]. 中国兽医学报，2002，22(3):247-250.

[7] Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, et al. Taenia crassiceps cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization[J]. J.Parasitol, 1998, 84(3):516-523.

[8] Scheerlink J P, Casey G, McWaters P, et al. The immune response to a DNA vaccine can be modulated by co-delivery of cytokine genes using a DNA prime-protein boost stategy[J]. Vaccine, 2001, 19(28-29):4053-4060.

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

[10] 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.

（责任编辑：关蕴良）