维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0299-03

多房棘球绦虫 Em14-3-3 抗原编码基因在 BCG 中的表达

王 鸿,李文桂

(重庆医科大学传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究多房棘球绦虫 Em14-3-3 抗原编码基因在 BCG 中的表达。方法:将重组质粒 pBCG- Em14-3-3 用电穿孔法导入 BCG 构建 rBCG，将含有重组子的细菌培养至对数生长期，在收菌前 3 天每天 45℃热诱导 30min，然后对表达产物作 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。结果:多房棘球绦虫 pBCG- Em14-3-3 在 BCG 中成功表达了 Em14-3-3 重组蛋白,在相对分子量为 27KDa 处可见明显的表达蛋白带,其表达量占菌体总蛋白量的 11%。结论:多房棘球绦虫 pBCG- Em14-3-3 能在 BCG 中高效表达,且能与鼠血清抗体发生特异结合,提示 rBCG- Em14-3-3 疫苗表达的 Em14-3-3 重组蛋白具有特异的抗原性。

【关键词】多房棘球绦虫;重组 Em14-3-3 蛋白; BCG;基因表达

【中国图书分类法分类号】R383.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-21

Expression of Echinococcus multilocularis 14-3-3 antigen encoding gene in BCG

WANG Hong, et al

(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of Echinococcus multilocularis 14-3-3 antigen encoding gene in Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Methods*: The recombinant plasmid pBCG-Em14-3-3 was introduced into BCG by electroporation and the bacteria with pBCG-Em14-3-3 were cultured to logarithm growth period , then induced daily by heating at 45℃ for 30min in the last three days. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot. *Results*: The Em14-3-3 recombinant protein was successfully expressed by pBCG-Em14-3-3 in BCG as an obvious band of 27kDa by SDS-PAGE, which accounted for 11% of total bacterial protein in BCG. *Conclusion*: The pBCG- Em14-3-3 could be expressed efficiently in BCG and be combined with specific antibody in mice sera, which suggested that the Em14-3-3 recombinant protein expressed by rBCG- Em14-3-3 vaccine was of specific antigenicity .

【Key words】Echinococcus multilocularis; Recombinant Em14-3-3 protein.; BCG; Gene expression

泡球蚴病（Alveolar echinococcosis,AE）是由多房棘球绦虫（Echinococcus multilocularis,Em）的续绦期幼虫以肿瘤样无限制浸润生长引起肝脏等脏器损害的一种严重危害人类健康和影响畜牧事业发展的人畜共患寄生虫病。AE 被认为是最致命的蠕虫感染,俗称“寄生虫癌症”,早期无明显症状,待发现时病灶多已扩散或转移,常已无法手术。据统计 AE 患者的病灶仅 20%～40%可进行手术切除,且手术治疗后复发率高,不能作手术切除的病例,10 年内死亡率高达 90%，而药物治疗副作用大,病人不能耐受,所以迫切需要研究有效疫苗进行防治。卡介苗（bacillus calmette-guerin,BCG）既是用于防治结核病的活疫苗,又是目前最强的免疫佐剂之一,具有低毒性、免疫力持久和对热稳定等特性，以 BCG 作为疫苗载体具有其它疫苗载体不可比拟的优越性。相对分子量为 27kDa 的 Em14-3-3 抗原与 AE 的病情活动及多房棘球绦虫续绦期幼虫的肿瘤样无限制浸润生长引起肝脏等脏器损害密切相关[1],作者曾成功构建了多房棘球绦虫重组质粒 pBCG-Em14-3-3 及重组 BCG-Em14-3-3 疫苗,在此基础上拟研究重组质粒 pBCG-Em14-3-3 在 BCG 中的表达效率，为进一步研究重组蛋白 Em14-3-3 的免疫保护性及 BCG 的开发利用奠定基础。

作者介绍：王 鸿(1974-),女,主治医师,硕士,
主要研究方向:从事分子生物学和分子免疫学研究。

基金项目：教育部重点项目（205131）和重庆市教委科研基金(KJ050313)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 N,N,N',N' – 四甲基乙二胺(TEMED)、丙烯酰胺、N,N' – 亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝及 DAB 显色剂购自上海生工公司。中分子量蛋白标准及硝化纤维素膜(NC 膜)购自北方同正。辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(HRP IgG)购自北京邦定生物公司。Sauton's 液体培养基及活动性泡球蚴病小鼠血清(一抗)由本室制备。

1.1.2 质粒和宿主菌 多房棘球绦虫重组质粒 pBCG–Em14–3–3 及重组 BCG–Em14–3–3 疫苗为本室构建。BCG 由重庆市疾病预防控制中心赠送。

1.2 方法

重组 BCG–Em14–3–3 的诱导表达 将经 PCR 鉴定含有 pBCG–Em14–3–3 质粒的 rBCG 接种于含 12μg/ml $HgCl_2$ 的 Sauton's 液体培养基中,37℃ 150r/min 振摇培养至对数生长期(需 3w 左右),于收菌前 3 天每天 45℃热诱导 30min。

1.3 SDS–PAGE

离心收集 1ml 热诱导后的 rBCG,用预冷的磷酸盐缓冲液重悬 rBCG 后进行超声粉碎,加入等体积 1X 蛋白上样缓冲液,煮沸 5min,取 20μl 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,考马斯亮蓝染色。

1.4 免疫印迹分析(Western–blot)

将菌体蛋白作 SDS–PAGE 后,用半干转移系统将凝胶上的蛋白质转印到 NC 膜上,于封闭液中室温摇床封闭 3h;用 PBS 洗涤 4 次,每次 10min;用封闭液稀释的 1∶100 活动性泡球蚴病鼠血清(一抗)室温摇床封闭 2h;用 PBS 洗涤 4 次,每次 10min;用封闭液稀释的 1∶1000 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(二抗)室温摇床封闭 2h;用 150mmol/L NaCl、50mmol/L Tris–Cl(pH7.5)洗涤 3 次,每次 10min;用 DAB 显色剂对 NC 膜避光反应 15min 后进行 Western–blot 分析。

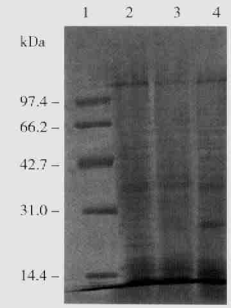
2 结 果

2.1 重组质粒 pBCG–Em14–3–3 在 BCG 中表达产物的 SDS–PAGE 分析

rBCG 培养至对数生长期后,经 45℃热诱导 3 次,SDS–PAGE 分析结果表明,在分子量约为 27kDa 处有明显的目的蛋白表达条带,图像软件系统对凝胶上的蛋白带进行分析提示 Em14–3–3 重组蛋白约占细菌总蛋白的 11%,而在相同条件下诱导含空质粒的 BCG 及非诱导的 rBCG 均没有相应的目的条带(图 1)。

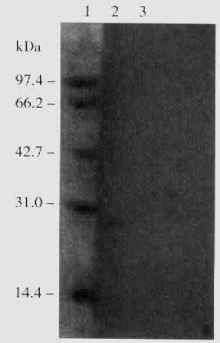
2.2 Western–blot 分析

将 45℃热诱导的含 pBCG–Em14–3–3 rBCG 菌体蛋白转移到 NC 膜上后,先后与活动性泡球蚴病鼠的血清、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 反应,DAB 显色后 rBCG 在相对分子量 27kDa 处产生一特异反应带,与 779bp Em14–3–3 基因开放读码框编码产物的理论分子量相符(图 2)。



1 Protein Marker
2 BCG(pBCG)induced by heating
3 BCG(pBCG–Em14–3–3)without induction by heating
4 BCG(pBCG–Em14–3–3)induced by heating with 3 times

图 1 SDS–PAGE 对 BCG 热诱导表达的 Em14–3–3 重组蛋白的鉴定



1 Protein Marker
2 rBCG induced by heating with 3 times
3 rBCG without induction by heating

图 2 Em14–3–3 重组蛋白的 Western–blot 分析

3 讨 论

外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工

维普资讯 http://www.cqvip.com

程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础，要在分枝杆菌中高效表达外源蛋白就要求所用的穿梭表达载体中含有能被分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶所识别的启动子。本研究采用的穿梭表达质粒 pBCG 具有卡那霉素和 $HgCl_2$ 抗性基因、大肠杆菌－分枝杆菌的复制起始点及人结核分枝杆菌热休克蛋白 70（heat shock protein 70，HSP70）的启动子。HSP70 是一种高度保守的蛋白质，从细菌到人体细胞的 HSP 序列具有很高的同源性，麻风杆菌 HSP70 全长氨基酸序列分别与结核杆菌、人的同源性为 95%、46%[2]。HSP70 在应激环境下能大量表达，生物的进化过程中具有高度的保守性，因此用人结核分枝杆菌 HSP70 启动子作为分枝杆菌中表达外源基因的启动子既能利用种属之间的高度同源性使不同分枝杆菌的 RNA 聚合酶对其易于识别而启动外源基因的表达，又可在受到热、过氧化物及被巨噬细胞吞噬等应急情况下使目的蛋白大量表达[3]。当 BCG 在体内被巨噬细胞吞噬后，HSP70 启动子被活化，诱导转录及外源蛋白的产生，并通过抗原递呈而激活机体的保护性免疫反应。HSP70 启动子这种活化方式利于载体在分枝杆菌中保持稳定性，减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用。

Em 续绦期幼虫表达 Em14-3-3 蛋白水平是 Em 成虫的 10 倍，免疫荧光显示其定位于生发层，与泡球蚴无限制浸润生长密切相关[1,4]。本研究发现 rBCG-Em14-3-3 经热诱导而高效表达 Em14-3-3 重组蛋白，从理论上揭示 rBCG-Em14-3-3 疫苗免疫接种后，被单核巨噬细胞吞噬的同时活化 HSP70 启动子，使 rBCG 在生存和繁殖的过程中表达大量的 Em14-3-3 重组蛋白，分泌或释放到吞噬体内，经抗原提呈细胞提呈而激活特异的免疫保护作用，从而为 rBCG-Em14-3-3 疫苗成为一种有价值的疫苗奠定物质基础。而非热诱导的 rBCG 可能由于表达量少而没被 SDS-PAGE 检测出来。免疫印迹试验发现，鼠抗血清能特异识别 SDS-PAGE 相对分子量为 27kDa 的目的蛋白带，提示 rBCG 中表达的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。这为进一步研究 rBCG-Em14-3-3 疫苗的免疫保护力奠定了基础，但外源基因在分枝杆菌中表达量的控制和翻译后修饰等问题尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Siles-Lucas M, Felleisen RS, Hemphill A, et al. Stage-specific expression of the 14-3-3 gene in Echinococcus multiloculris [J]. Mol Biochem Parasitol, 1998;91(2):281-293.

[2] Mckenzie K R, Adams E, Britton W J, et al. Sequence and immunogenicity of the 70 kDa heat shock protein of Mycobacterium leprae[J]. Immunol, 1991;147 (1):312-319.

[3] 程继忠，皇甫永穆，冯作化，等. 人结核分枝杆菌热休克蛋白 70 启动子对外源基因在分枝杆菌中表达的影响[J]. 中国微生物学和免疫学杂志，1997;17(6):410-415.

[4] Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A. Comparative analysis of the 14-3-3 gene and its expression in Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis metacestodes[J]. Parasitol, 2001; 122(3):281-287.

（上接第 298 页）

[3] AJ Zurita, JE Diestra, E Condom, et al. Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours [J]. Br J Cacncer, 2003;88(6):879-886.

[4] Mandoky L, Geczi L, Doleschall Z, et al. Lung resistance protein analysis in testicular cancer [J]. Magy Onkol, 2002;46(4): 339-345.

[5] Goasguen JE, Lamy T, Bergeron C, et al. Multifactorial drug-resistance phenomenon in acute leukemias: impact of P170-MDR1, LRP56 protein, gluthatione-transferases and metallothione systems on clinical outcome [J]. Leukaemia and Lymphoma, 1996;23(5-6):567-576.

[6] A Katagiri, Y Nishiyama, M Kimura, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in testis cancer [J]. Br J Cancer, 1993;68(1):125-129.

[7] Klys HS, Whillis D, Howard G, et al. Glutathione S-transferase expression in the human testis and testicular germ cell neoplasia [J]. Br J Cancer, 1992;66(3):589-593.