DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.024
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
720 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0720-04

斯氏狸殖吸虫成虫半胱氨酸蛋白酶基因片段的表达及鉴定

段文元,张锡林,王 英 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 获得表达斯氏狸殖吸虫半胱蛋白酶基因片段编码多肽,对其免疫反应性作初步研究,在吸虫所致疾病的血清学诊断的应用奠定基础。方法 用PCR法扩增目的基因片段,1%琼脂糖凝胶回收纯化后与PinPoint T载体相连,并导入到大肠杆菌JM109菌株中去,诱导表达其编码的多肽片段。用裂解液制备抗原标本,经SDS-PAGE电泳后,经考马斯亮蓝和生物素链亲合素碱性磷酸酶染色检测其表达情况,Westemblotting鉴定其免疫反应性。结果 转化实验共获得8株阳性重组子,经测序鉴定证实仅1株正向连接。经过诱导表达,制备重组抗原标本,经SDS-PAGE、转膜后生物素-链亲和素-碱性磷酸酶系统染色显示在32×10³处有一融合蛋白条带,反向连接菌株与之相似,也出现一条表达带,但分子量远小于预期值,仅仅14×10³左右。Westem-blotting显示仅正向连接菌株在32×10³的位置有一阳性染色条带。结论 成功的构建了斯氏狸殖吸虫半胱氨酸蛋白酶的原核表达载体,经过诱导后表达的重组抗原,具有良好的免疫反应性。

关键词:斯氏狸殖吸虫;融合蛋白;半胱氨酸蛋白酶
中图法分类号:R383.2;Q556.9;Q786 文献标识码:A

Expression and identification of cysteine proteinase from adult worm of *Pagumogonimus skrjabini* in *Escherichia coli*

DUAN Wen-yuan, ZHANG Xi-lin, WANG Ying (Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express the recombinant antigen coded by *Pagumogonimus skrjabini* adult cysteine protease gene fragment and to investigate the immunoreactivity of the fusion protein for further usage on serodiagnosis of the fluke disease. Methods The target gene fragment was amplified by PCR. After purification with gel-purification recoverykit, the target gene fragment was ligated with PinPointTM Xa-1 T vector and transduced into *E. coli* JM109 strain. The expressed fusion protein sample was prepared with alkaline lysis solution, and then analyzed by SDS-PAGE. The expression level was determined by Coomassie blue staining and the streptavidin alkaline phosphatase staining. The immunoreactivity of fusion protein was examined by Western blotting. Results A total of 8 positive clones were harvested, and only one had the proper orientation verified by sequencing. The recombinant antigen was obtained after being induced with IPTG (Isopropltio-β-D-galactoside), and a positive band of 32×10³ was found by streptavidin-alkaline phosphatase staining. In the same position, the fusion protein was also detected by Western blotting. Conclusion The expression vector of adult cysteine protease gene-PinPointTM Xa-1 T vector was successfully constructed. The recombinant antigen obtained after being induced with IPTG possesses good immunoreactivity.

Key words: *Pagumogonimus skrjabini*; cysteine protease; fusion protein; Western blotting; immunoreactivity

斯氏狸殖吸虫(*Pagumogonimus skrjabini*)可导致肺外型肺吸虫病[1]。该病的特点决定了病原学诊断是比较困难的,因此免疫学检查在该型肺吸虫病的诊断和鉴别诊断中尤其重要。然而,在免疫诊断抗原的制备中存在的主要问题:①均为混合抗原,易出现交叉反应;②免疫诊断抗原的标准不一致,无法对各实验室的检测结果进行比较。③严重依赖于虫体来源的成分,然而天然抗原的获得却越来越困难[2]。因而筛选一种特异的单一抗原成分,进而利用基因工程的手段进行原核表达即可以克服以上不足,又可以使实验用免疫诊断抗原的成本大大降低。并解决免疫诊断抗原的标准化,以便使各实验室的免疫诊断结果具有可比性,这是目前存在的迫切需要解决而尚未解决的问题。

半胱氨酸蛋白酶(cysteine protease)作为斯氏狸殖吸虫的主要消化酶之一,除具有蛋白水解作用外,在宿主体内还具有较强的免疫原性,并在寄生虫对宿主的入

作者简介:段文元(1968-),男,河南省西平县人,硕士,讲师,主要从事感染免疫与免疫诊断方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:张锡林,电话:(023)68753670
收稿日期:2003-05-29;修回日期:2003-11-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

侵、免疫逃避和致病机制中发挥着重要的作用[3]。从免疫学的角度看, 半胱氨酸蛋白酶是许多寄生虫的免疫优势抗原, 能够刺激宿主产生体液和细胞免疫, 且具有明显的种特异性, 因而是一种较好的候选免疫诊断抗原[4,5]。斯氏狸殖吸虫作为流行于我国的一种吸虫。目前有关其半胱氨酸蛋白酶的研究尚少。本课题拟通过对斯氏狸殖吸虫成虫半胱氨酸蛋白酶基因片段进行原核表达, 并对表达抗原的免疫反应性进行初步研究。

1　材料和方法

1.1　克隆基因、菌株

1.1.1　斯氏狸殖吸虫成虫半胱氨酸蛋白酶基因片段(AY083923)　496 bp 已克隆到大肠杆菌 DH5α 中, 由本室张锡林教授, 王英硕士提供。大肠杆菌 JM109 菌株由本校微生物学教研室饶贤才教授惠赠。

1.1.2　引物　扩增片段 496 bp

上游引物上海生物工程技术服务有限公司提供。

TCA(AG)GG(AGCT)CA(AG)TG(CT)GG(AGCT)TC(AGCT)TG(CT)TGG

下游引物由韩国国家卫生研究所 Kim 博士提供。

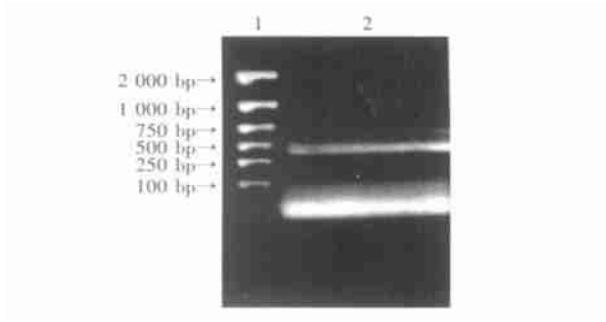
CCA(AG)CT(AG)TT(CT)TT(AGCT)AC(AG)ATCCA(AG)TA

1.2　试剂

PCR 试剂上海生物工程技术服务有限公司提供; PinPoint T 载体系统购自美国 Promega 公司; silver beads 胶纯化回收试剂盒: 上海生物工程技术服务有限公司提供; 免疫印迹用多克隆抗体由本室制备为斯氏狸殖吸虫半胱氨酸蛋白酶特异抗体; 抗体2(辣根过氧化物酶标记的SPA)购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.3　方法

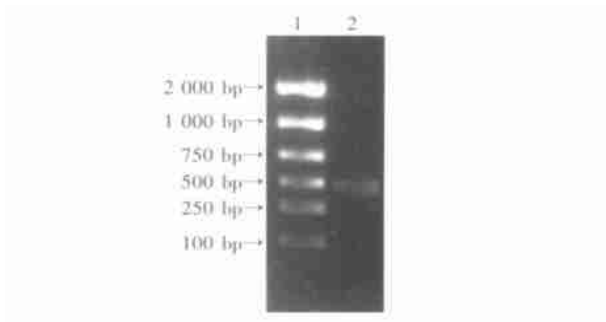
1.3.1　目的基因的制备、纯化　从新分离的含目的基因的 DH5α 菌单个菌落, 挑取单个菌落接种氨苄抗性的 LB 中 37 ℃, 250 r/min 震荡过夜, 碱裂解法提取细菌质粒, 按 1∶100 稀释后, 作为 PCR 模板, 扩增目的基因片断, 反应条件 94 ℃ 5 min, 预变性 94 ℃ 1 min, 43 ℃ 2 min, 72 ℃ 2 min, 共 45 个循环后, 72 ℃ 5 min, 后按 silver beads 胶回收试剂盒说明, 回收纯化目的基因片断, 并检测其含量。见图 1, 2。



1: PCR Marker; 2: Product of PCR

图 1　PCR 扩增护增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig 1　Electrophoresis of PCR products



1: PCR Mark; 2: Purified PCR products

图 2　纯化后 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig 2　Electrophoresis of purified PCR product on 1% agarose gel

1.3.2　连接转化、分离、鉴定　参照 PinPoint™ Xa-1T 载体系统(图 3)操作说明, 插入片断与载体 mol/L 按 4.5∶1 进行加样操作, 15 ℃孵育 16 h 后转化到大肠杆菌 JM109 中去, 铺板, 37 ℃过夜培养, 从已生长的菌落中随机挑选单个菌落接种到氨苄抗性的 LB 培养基中, 37 ℃, 250 r/min 过夜培养, 碱裂解法提取质粒, 1∶100 稀释后 PCR 扩增, 1% 琼脂糖胶电泳后, 观察有无目的基因片断, 阴性为载体自身环化者。阳性表示构建载体已导入, 增菌后该菌株送上海生物工程技术服务有限公司进行测序。测序结果用 DNAsis 软件分析找出正确连接的阳性菌株。



图 3　PinPoint™ Xa-1T 载体目的基因插入部位

Fig 3　Inserting site of the target gene of the PinPoint™ Xa-1 T-Vector

1.3.3　诱导表达及鉴定　取新分离 JM109 空菌株, 正向连接株, 反向连接菌株, 按 PinPoint™ Xa-1T 载体系统操作说明诱导表达, 并制备标本, 标本制备后用 12%SDS-PAGE 胶电泳, 浓缩胶 80 V, 分离胶 110 V 电泳。电泳完毕取下胶, 一块作考马斯亮蓝染色, 一块按 PinPoint™ Xa-1T 载体 promega 公司说明书, 用生物素-亲合素-碱性磷酸酶系统显色。

1.3.4　免疫印迹鉴定其免疫反应性　如前述制备抗原, 经 12%SDS-PEGA 电泳, 电泳完毕取下胶, 转移电泳, 转移条件 200 mA, 6 h 转移到硝酸纤维素膜上, 按 Westerm blot 试剂盒说明书进行操作。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结果

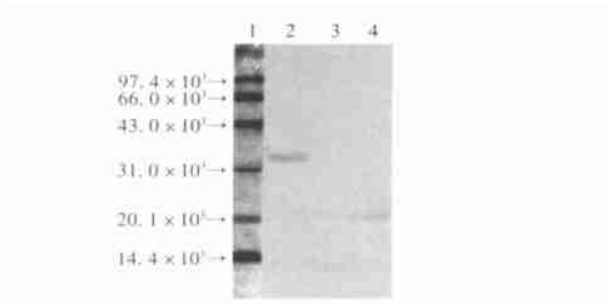
2.1 重组质粒的转导、分离和鉴定

转化实验共获得21株氨苄抗性的菌株。全部增菌后提取质粒，经过PCR扩增目的基因片段，证实有8株含有目的基因片段，分别命名为A1～A8。测序后经过与标准序列比对鉴定证实，A7正向连接，A1、A3、A4、A5、A6反向连接(A2、A8未能测出)。

2.2 诱导表达鉴定

2.2.1 考马斯亮蓝胶染色结果 Marker泳道出现6条清晰条带。其它各泳道均有多条条带，清晰而锐利。寻找不同泳道间的差异条带发现，各泳道之间差异不大。

2.2.2 生物素-亲和素-碱性磷酸酶染色 染色结果显示空菌株有一22.5×10^3大小的弱带，该蛋白应为大肠杆菌本身表达的一种内源性单生物素化蛋白，量较少。正向连接菌株除22.5×10^3大小的弱带外，在32×10^3处有一强染色条带，反向连接菌株与之相似，也出现一条阳性带，但分子量远小于预期值，仅仅14×10^3左右，见图4。

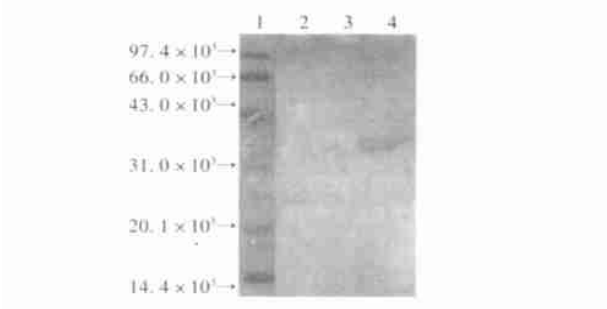


1: Marker; 2: Strain with proper orientation; 3: Strain with reversed orientation; 4: Strain with no vector

图4 生物素亲和素碱性磷酸酶染色鉴定结果

Fig 4 Result of streptavidin alkaline phosphatase stain

2.2.3 免疫印迹结果 正向连接菌株在分子量32×10^3处有一明显染色带，空菌株，反向连接菌株均无此带，免疫印迹结果显示，该片断具有很强免疫原性，见图5。



1: Marker; 2: Strain with no vector; 3: Strain with reversed orientation; 4: Strain with proper orientation

图5 免疫印迹检测重组抗原的免疫反应性

Fig 5 Identification of the immunoreactivity of recombinant antigen by Western blotting

3 讨论

利用基因工程技术来表达重组蛋白可以利用真核表达系统或原核表达系统两种方式。虽然真核表达系统可以实现有效的转录、表达，准确地完成糖基化、二硫键形成以及翻译后的剪切等后期加工过程，较客观地表达天然蛋白质的结构和功能，维持全部生物学活性，但真核表达系统表达水平一般都较低。大肠杆菌系统由于其遗传学、生物化学和分子生物学方面已充分被人们了解而成为表达许多异源蛋白质的首选表达系统。大肠杆菌遗传图谱明确，容易培养且费用低，对许多蛋白质有很强的耐受能力，能高水平地表达这些蛋白质。PinPoint载体系统则是进行原核表达的一种常用载体，其表达蛋白的鉴定和纯化简便易行[6]。本研究利用PinPoint™ Xa-1 T为表达载体，在JM109大肠杆菌中对斯氏狸殖吸虫成虫半胱氨酸蛋白酶基因片段进行原核表达。JM109大肠杆菌产生内源性生物素化蛋白较少，采用JM109为宿主菌可减少内源性生物素蛋白的干扰。本实验中转化实验共获得21个氨苄抗性菌株，仅有8个菌株的质粒扩增出了特异基因片段，说明该T载体试剂盒自身环化率比较高，理论上讲正向、反向连接的概率应该相等，但是由于未知的原因，正向连接的菌株数目明显低于反向连接。分别取空菌株、正向、反向连接菌株，经过诱导、表达，制备重组抗原标本，SDS-PAGE后，经考马斯亮蓝染色，空菌株、正向、反向之间无明显差异。转膜后生物素-链亲和素-碱性磷酸酶系统染色显示空菌株在22.5×10^3处有一弱带，该蛋白应为大肠杆菌本身表达的一种内源性单生物素化蛋白，量较少。正向连接的菌株除此之外还有1条表观分子量为32×10^3大小的融合蛋白条带，扣除13×10^3融合分子，故目的蛋白的分子量应为19×10^3。这与根据其序列推测的理论值18.18×10^3基本一致，反向连接菌株与之相似，也出现一条表达带，但分子量远小于预期值，仅仅14×10^3左右。用DNAsis对其序列分析显示在其序列开始的54位出现了终止密码，重新估算分子量理论值为14.9×10^3，与表观分子量非常接近，反过来说明我们正、反向连接的判断也是准确的，见图4。Western blotting检测显示正向连接的菌株在分子量32×10^3处有一明显染色带，空菌株，反向连接菌株均无此带，见图5。Western blotting显示的阳性条带与生物素-链亲和素-碱性磷酸酶系统染色显示的融合蛋白分子量一致不仅证明我们成功表达了目的基因编码的多肽，而且显示该融合蛋白或重组抗原具有很好的免疫反应性，能够与斯氏狸殖吸虫半胱氨酸蛋白酶特异的免疫血清产生反应，为表达的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

融合蛋白或重组抗原在斯氏狸殖吸虫病的免疫诊断中的应用奠定了坚实的实验和理论基础。

参考文献：

[1] 张锡林, 王　英, 黄　勇, 等. 三峡建坝后库区环境变化对肺吸虫病流行的影响[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(1): 30－32.
[2] 陈兴旺, 李调英, 曾明安. 斯氏肺吸虫 3 次提取的抗原单用及配用的诊断价值[J]. 实用寄生虫病杂志, 2000, 8(3): 112－113.
[3] Choi M H, Choe S C, Lee S H. A 54 kDa cysteine protease purified from the crude extract of *Neodiplostomum seoulense* adult worms[J]. Korean J Parasitol, 1999, 37(1): 39－46.
[4] Raphael P, Takakuwa Y, Manno S, *et al*. A cysteine protease activity from *Plasmodium falciparum* cleaves human erythrocyte ankyrin[J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 110: 259－272.
[5] Ikeda T. Cystatin capture enzyme-linked immuno-sorbent assay for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(2): 286－290.
[6] Kosovsky J, Durmanova V, Kudelova M, *et al*. A simple procedure for expression and purification of selected non-structural (alpha and beta) herpes simplex virus 1 (HSV-1) proteins[J]. J Virol Methods, 2001, 92(2): 121－129.

（编辑　张　宁）

文章编号: 1000-5404(2004)08-0723-01

个案与短篇

Peutz-Jeghers 综合征 4 例

Peutz-Jeghers syndrome: A report of 4 cases

何治军, 吴　涛, 周子成　（第三军医大学西南医院全军消化内科中心, 重庆 400038）

Peutz-Jeghers 综合征(P-J 综合征), 又称黑斑息肉综合征或黑斑胃肠道多发性息肉病, 为常染色体显性遗传病。现将我院 1986－2001 年收治的 4 例报告如下。

例 1, 男, 26 岁, 因反复便血 5 年, 复发 5 d 入院。9 岁时曾行"肠套叠"手术。查体: 口唇、颊粘膜、手足部可见黑色斑。肠镜示: 回盲部至直肠齿状线可见 0.6～2.0 cm 息肉多个, 呈散在分布, 肝曲至回盲部所见 8 个息肉, 均有长蒂, 表面呈分叶状。胃镜示胃大弯及十二指肠段分别见一直径约 0.4 cm 息肉, 基底宽, 表面光滑。经行肠镜下电切息肉 9 个。病理诊断: 乙状结肠息肉。

例 2, 女, 17 岁, 因反复腹痛、腹泻 5 年, 复发 5 d 入院。12 岁曾行"肠套叠"手术。查体: 口唇、鼻尖、面部、颊粘膜、手足部可见黑色斑。肠镜示: 距肛门 15 cm 见一直径约 1.5 cm 息肉, 表面充血, 暗红色, 其余肠段未见异常。经行肠镜下电切治疗息肉。病理诊断: P-J 息肉。

例 3, 男, 反复多次住院, 3 岁, 时出现双唇黑色素斑, 小肠钡灌示空回肠息肉征象。肠镜示: 距肛门 8 cm 处有 1 cm×1.5 cm 息肉, 活检病理诊断腺瘤型直肠息肉。3 月后肠镜示: 直肠 8 cm 前壁有一 2.5 cm×2 cm 呈分叶状短蒂息肉, 很不规则, 行分次电切。病理诊断: 直肠绒毛状腺瘤。12 岁肠镜示: 乙状结肠及升结肠, 见 0.3～0.5 cm 乳头状息肉 7 个, 均用活检钳咬除。病理诊断: 结肠多发性腺瘤型息肉。14 岁鼻尖、双手指桡侧出现黑色斑。并因便血肠镜下电切除息肉 7 个。18 岁时因腹痛手术探查, 术中行肠套叠复位、小肠多发性息肉切除、阑尾切除术。病理诊断: 小肠多发性腺瘤型息肉。19 岁再次行肠镜下电切结肠息肉 5 个。病理诊断: 结肠腺瘤性息肉。

例 4, 女, 22 岁, 因面部黑斑 20 年, 间歇黑便 2 年入院。其父、弟有同样黑斑。查体口唇及口周皮肤、面部有点状黑色素沉着, 双手散在黑色素沉着。肠镜示: 回肠末端有丛集分布的球形、半球形息肉。升结肠至直肠见多个直径 0.3～3 cm 的半球形息肉。经高频电切肠息肉 9 个。病理诊断: 多发性混合性腺瘤。

讨论

本综合征临床少见, 主要特征有: ①皮肤粘膜的异常色素沉着, 常见部位在口唇及颊粘膜, 其次为面、掌、指、趾等部位, 往往双侧对称; ②全胃肠道分布的多发性息肉; ③有一定的遗传, 约 40% 有家族史。本病常可引起腹痛、便血、粘液便, 个别孤立较大息肉或多发息肉密集于某一肠段可引起套叠或肠梗阻。本组例 3 曾有肠套叠手术史。结合上述特点, 本病诊断多无困难。目前对本病的治疗, 多主张对内镜检查所能够见到的息肉, 尽可能经内镜切除。对个别孤立较大息肉或多发性息肉密集于某一肠段所引起的肠套叠或梗阻者, 则应手术治疗, 但手术不能根治。多数认为癌变发生于错构瘤及腺瘤并存的病例, 其中绒毛状腺瘤的癌变率最高, 文献[1]报道为 25%～40%, 管状腺瘤癌变率最低, 报告为 3%～8.5%, 混合性腺瘤的癌变率居中, 为 11.9%～22.5%, 腺瘤随体积的增大, 癌变机会升高。刘军英等[2]报道 P-J 综合征随访 21 年发现息肉癌变 1 例。因此对本病应长期随访。

关键词: Peutz-Jeghers 综合征; 息肉
中图法分类号: 596.1　　文献标识码: B

参考文献：

[1] 吕愈敏. 大肠良性肿瘤[A]. 李益农, 陆星华. 消化内镜学[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 331.
[2] 刘军英, 石巧荣, 李学军. 黑斑息肉综合征癌变一例[J]. 中华老年医学杂志, 2001, 20(1): 21.

（编辑　张大春）

作者简介: 何治军(1966－), 男, 重庆市人, 主治医师, 主要从事消化方面的研究, 现在重庆市第五人民医院内一科。电话: (023)62879457

收稿日期: 2003-06-05; 修回日期: 2003-12-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net