DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.015
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2199-03

论著

斯氏肺吸虫半胱氨酸蛋白酶的原核表达及其免疫活性分析

王 英[1],张锡林[1],张艳玲[2],段建华[1],段文元[1] (第三军医大学:[1]基础医学部病原生物学教研室;[2]附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 对克隆的斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA进行原核表达并检测其免疫反应性。方法 利用PinPoint™ Xa-1 T表达载体系统,对已克隆的斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA片段在大肠杆菌中进行原核表达。通过SDS-PAGE和Western blot方法鉴定表达产物,分别检测所表达融合蛋白的分子量和免疫反应性。结果 SDS-PAGE结果显示,与对照相比较目的克隆在33×10^3处有一明显差异带。Western blot结果则表明有一阳性条带出现,分子量为33×10^3。结论 通过原核表达获得斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA的表达融合蛋白,分子量为33×10^3;该融合蛋白具有免疫反应性。

关键词:斯氏肺吸虫;半胱氨酸蛋白酶;原核表达
中图法分类号:R345;R383.2;R392.2 文献标识码:A

Expression and analysis of the fusion protein of cysteine protease cDNA from *Pagumogonimus skrjabini*

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

Abstract: **Objective** To express the cysteine protease cDNA fragment of *Pagumogonimus skrjabini* metacercarias. **Methods** The cysteine proteinase cDNA fragment cloned previously by RT-PCR was transfected into *E. coli* for prokaryotic expression using PinPoint™ Xa-1 T-vector. The expressed fusion protein was identified by SDS-PAGE followed by Western blotting. The immunoreactivity of the protein was determined by Western blotting. **Results** The identification and determination of the immunoreactivity of the expressed fusion protein by SDS-PAGE and Western blotting showed a band of 33×10^3 in size in cells containing the PinPoint™ Xa-1 T-Vector plus the insert of fragment. **Conclusion** A fusion protein with the molecular weight of 33×10^3 is obtained. It has immunoreactive ability.

Key words: *pagumogonimus skrjabini*; cysteine protease; prokaryotic expression

斯氏肺吸虫是严重危害人类健康的一种寄生虫,由于人体为其非正常宿主,该虫寄生人体后常引起游走性皮下包块、脑部占位性病变和内脏损伤等肺外型肺吸虫病表现,造成多器官、组织的损害,给人们身体健康造成极大的危害。该寄生虫散在流行于我国四川、重庆、甘肃、福建等15个省市自治区。半胱氨酸蛋白酶(Cysteine protease)是一类含有半胱氨酸残基的蛋白水解酶,存在于人类、寄生生物等多种动物体内。作为寄生虫的主要消化酶之一,半胱氨酸蛋白酶对寄生虫的生存(如虫体的营养摄取与消化、囊壁形成与脱囊等),及在与宿主的相互关系上(寄生虫对宿主的入侵、致病和免疫逃避等)具有重要作用[1,2]。斯氏肺吸虫作为仅在我国流行的一种吸虫,关于其半胱氨酸蛋白酶的研究尚少见报道。本实验室已通过RT-PCR的方法对斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA进行了克隆和序列分析[3],现利用PinPoint表达载体系统,对已克隆的斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA进行原核表达,并检测表达产物的免疫反应性。

1 材料与方法

1.1 菌株和标本的采集

大肠杆菌JM109菌株均为我校微生物学教研室惠赠。斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶cDNA阳性质粒为本实验室克隆[3]。

作者简介:王 英(1973-),男,河北省邢台市人,硕士,讲师,主要从事吸虫半胱氨酸蛋白酶方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752243
通信作者:张锡林,电话:(023)68752243
收稿日期:2003-06-13;修回日期:2003-08-25

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

1.2 试剂

PCR Marker 购自上海华美生物工程有限公司。Silver Beads DNA 胶纯化回收试剂盒、PinPoint™ Xa-1 T 表达系统试剂盒和碱性磷酸酶标记的链球菌亲和素购自 Promega 公司。NC 膜购自 Bio-Rad 公司。辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白购自 Sigma 公司。

1.3 斯氏肺吸虫半胱氨酸蛋白酶 cDNA 的原核表达

1.3.1 目的片段的扩增和纯化

1.3.1.1 引物 为保证阅读框正确，避免移码突变，根据 cDNA 的序列和表达载体特点，设计、合成引物。序列为 ASN primer: 5′-CCAAGCTAGTTCTTTAGCTACAGATCCAAGTA -3′; TCYS primer: 5′-TCAAGGGAGCTCAAGTGCTGGAGCTTCAGCTTGCTTGG-3′。

1.3.1.2 模板 以本室克隆的斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶 cDNA(PsMCP)阳性克隆质粒[3] 为模板。

1.3.1.3 PCR 扩增(反应总体积为 50 μl) 10 μl 反转录产物、2 条简并引物各 1 μl、1 μl dNTPs(10 mmol/L)、5 μl 10× PCR 反应缓冲液、5 μl $MgCl_2$(15 mol/L)、1 μl Taq 酶(2 U/μl)、26 μl ddH_2O。扩增条件为 94 ℃预变性 5 min，然后 94 ℃ 1 min、43 ℃ 2 min、72 ℃ 2 min，共 45 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。

1.3.1.4 PCR 产物的纯化和回收 用 Silver Beads DNA 胶纯化回收试剂盒纯化目的片段，并用核酸定量仪进行核酸定量。

1.3.2 PsMCP 表达载体的构建 将上述纯化的 PCR 产物与 PinPoint™ Xa-1 T 表达载体进行 T-A 连接，转化 $MgSO_4$ 法制备的感受态细菌 JM109(参照《分子克隆》方法)，于 LB 平板(Amp+)进行筛选培养。从筛选培养的 LB 平板上随机挑取 3 个菌落，接种于液体 LB 培养基中过夜培养。碱裂解法小量提取质粒。用与前述相同系统和条件的 PCR 方法初步鉴定有无插入片段，然后通过核酸序列测定筛选插入方向正确的克隆。

1.3.3 诱导表达 分别挑取目的克隆菌落、PinPoint™ Xa-1 T 空载体转化菌落和 JM109 空菌株单菌落(后两者为对照)，接种于 3 ml Amp+ 的液体 LB 培养基中，37 ℃振摇过夜。分别取 30 μl 过夜培养菌液接种于含 2 μmol/L 生物素的 3 ml Amp+ 的液体 LB 中(即 1∶100 稀释)，37 ℃、150 r/min 振摇 1 h。分别加入 100 mmol/L 的 IPTG 3 μl，至终浓度为 100 μmol/L，37 ℃、150 r/min 振摇 8 h。

原核表达各步骤参照 Promega 公司 PinPoint™ Xa-1 试剂盒说明书和文献[4] 的方法进行。

1.4 表达产物的鉴定

参照《分子克隆》方法，用上样缓冲液裂解表达细菌后，进行 SDS-PAGE(同时进行两块凝胶)。电泳完毕后，其中一块凝胶进行考马斯亮蓝染色，另一块凝胶进行转移电泳。利用生物素与亲和素结合的原理。将转移后的 NC 膜浸入 TBST(0.01 mol/L Tris·Cl，pH 8.0，0.15 mol/L NaCl，0.05% Tween20)，封闭膜上蛋白结合位点；再将 NC 膜浸入含有 3 μl 链球菌-AKP 的 15 ml TBST 中，室温孵育 30 min。NC 膜漂洗后，在 NBT/BCIP 液(200 μl NBT/BCIP 溶于 10 ml TBS)中显色，出现清晰条带后，水洗终止显色。NC 膜上的蛋白 Marker 泳道转移后即剪下进行氨基黑染色。

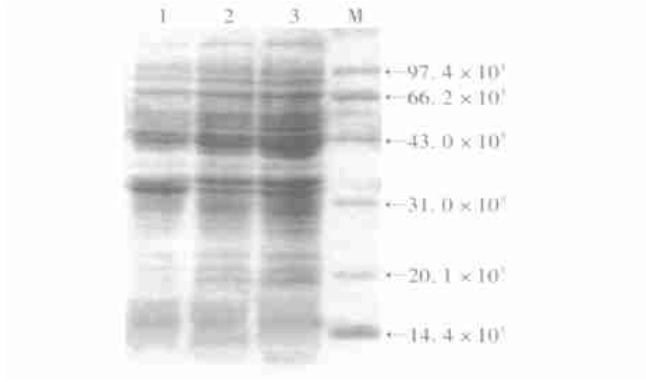
1.5 Western blotting 鉴定表达产物的免疫反应性

SDS-PAGE 及转移电泳(方法同上)后，NC 膜用 PBST 漂洗，脱脂奶粉封闭。加 1∶100 稀释的斯氏肺吸虫排泄分泌抗原(半胱氨酸蛋白酶是其主要成份)免疫的豚鼠血清，于杂交袋中 4 ℃过夜。漂洗后，将 NC 膜浸入 1∶400 稀释的辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌 A 蛋白(37 ℃孵育 1 h)，漂洗，DAB 显色。Marker 进行氨基黑染色。

2 结果

2.1 表达蛋白的鉴定结果

考马斯亮蓝胶染色结果显示，目的克隆在 33×10^3 处、空载体在 13×10^3 处各有一差异条带，见图 1。Western blotting 中 NBT/BCIP 对 NC 膜的染色结果显示，目的克隆泳道上，有 2 条紫色条带，分别位于 33×10^3 和 22.5×10^3 处。前者染色强而粗，后者染色弱而细。空载体克隆泳道上，也有 2 条紫色条带，分别位于 13×10^3 和 22.5×10^3 处，均染色弱。空菌株克隆泳道上只有一 22.5×10^3 的条带，见图 2。



1: Cells containing the vector plus the insert of interest; 2: Cells containing the vector without fragment; 3: JM109 cells with no vector; M: Marker

图 1 SDS-PAGE 电泳结果

Fig 1 Results by SDS-PAGE



M: Marker; 1: Cells containing the vector plus the insert of fragment; 2: Cells containing the vector without insert; 3: JM109 cells with no vector

图 2 免疫印迹试验鉴定表达融合蛋白

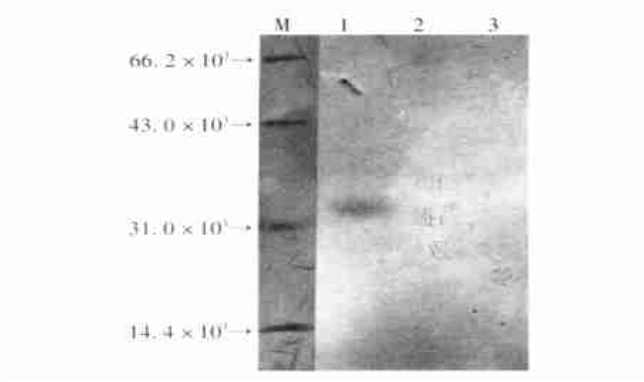
Fig 2 Identification of the expressed fusion protein by Western blotting

2.2 表达蛋白免疫反应性的检测结果

利用抗血清进行 Western blotting，分析表达蛋白的免疫学活

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

性。结果显示, NC 膜进行 DAB 显色后, 可见在目的克隆泳道上 33×10^3 处有一染色强而粗的棕色条带, 空载体和空菌株泳道均无任何条带, 见图 3。



M: Marker; 1: Cells containing the vector plus the insert of fragment; 2: Cells containing the vector without insert; 3: JM109 cells with no vector

图 3　免疫活性分析结果

Fig 3　Results of the analysis of the immunoreactive ability of the fusion protein by Western blotting

3　讨论

对人体的半胱氨酸蛋白酶的研究主要集中在细胞凋亡分子机制与检测指标和恶性肿瘤的基因诊断与治疗两个方面。而对寄生虫半胱氨酸蛋白酶研究的内容则更为广泛和深入。本研究中利用 PinPoint™ Xa-1 T 为表达载体, 在 JM109 大肠杆菌中对斯氏肺吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶进行了原核表达。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。对表达蛋白的鉴定结果显示, PsMCP 表达的融合蛋白分子量为 33×10^3, PinPoint 载体自身可编码合成一 13×10^3 的小肽。扣除载体自身序列编码部分, 目的蛋白的分子量应为 20×10^3, 这与根据其序列推测的理论分子量基本相符。此外, 目的克隆、空载体和空菌株均有一 22.5×10^3 大小的弱带, 该蛋白应为 JM109 大肠杆菌本身表达的一种内源性单生物素化蛋白, 量较少。Western blotting 检测表达融合蛋白的免疫反应性结果显示, 此融合蛋白能够与斯氏肺吸虫 ES 抗原免疫的豚鼠血清反应, 具有免疫反应性。这一结果进一步证明了斯氏肺吸虫半胱氨酸蛋白酶的免疫学活性, 为所克隆基因和表达的融合蛋白在肺吸虫病的免疫诊断、防治和疫苗的研制奠定了实验和理论基础。本研究中的原核表达产物可作为重组抗原用于免疫诊断。然而, 本研究同时表明, PinPoint™ Xa-1 T 作为表达载体的表达量偏低, 若欲将表达产物作为重组抗原用于免疫诊断, 还需改善条件提高表达量或更换高效表达载体。

近年来, 寄生虫半胱氨酸蛋白酶得到了越来越多学者的关注。研究表明, 寄生虫半胱氨酸蛋白酶有着广泛的应用前景。如由于该酶有着较好的种特异性并能刺激宿主产生体液和细胞免疫, 因此, 寄生虫半胱氨酸蛋白酶可作为寄生虫病的诊断抗原[5] 和候选疫苗[6,7]。又如半胱氨酸蛋白酶既是寄生虫的消化酶, 同时也是寄生虫对宿主的重要致病因子, 并参与了寄生虫对宿主的入侵作用; 因此, 通过抑制该酶的活性, 能够阻断寄生虫的营养来源、入侵及对宿主的损伤, 达到治疗寄生虫病的目的。将半胱氨酸蛋白酶作为寄生虫病化学治疗的靶目标, 是寄生虫病药物研制的一个新方向[8,9]。总之, 寄生虫半胱氨酸蛋白酶已逐渐成为了一个研究热点, 且必将得到越来越广泛和深入的研究[10]。对它的研究不仅有助于揭开寄生虫与宿主相互作用的机制, 也给寄生虫病的诊断与防治开辟了新的思路, 同时给化疗所引起的越来越严重的耐药性问题的解决带来了希望。

参考文献:

[1] Britton C, Murray L. A cathepsin L protease essential for Caenorhabditis elegans embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 122(1): 21－33.

[2] Moncada D, Keller K, Chadee K. Entamoeba histolytica cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function[J]. Infect Immun, 2003, 71(2): 838－844.

[3] 王　英, 张锡林, 段建华, 等. 斯氏狸殖吸虫囊蚴半胱氨酸蛋白酶 cDNA 片段的克隆和序列分析[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(9): 1052－1055.

[4] 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.

[5] Ikeda T. Cystatin capture enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human paragonimiasis and fascioliasis[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(2): 286－290.

[6] Pollock K G, McNeil K S, Mottram J C, *et al*. The Leishmania mexicana cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses[J]. J Immunol, 2003, 170(4): 1746－1753.

[7] Beyrodt C G, Pinto A R, Freymuller E, *et al*. Characterization of an antigen from Leishmania amazonensis amastigotes able to elicit protective responses in a murine model[J]. Infect Immun, 1997, 65(6): 2052－2059.

[8] Lakhdar G F, Blonski C, Willson M, *et al*. Glycolysis and proteases as targets for the design of new anti-trypanosome drugs[J]. Curr Top Med Chem, 2002, 2(5): 439－456.

[9] Rosenthal P J, Sijwali P S, Singh A, *et al*. Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy[J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(18): 1659－1672.

[10] Sajid M, McKerrow J H. Cysteine proteases of parasitic organisms[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 120(1): 1－21.

（编辑　刘洪娥）

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