DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.030

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0938-04

查菲埃立克体120 000表面抗原蛋白基因的克隆与表达

戛 锐,温博海 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建查菲埃立克体特异性表面抗原P120基因的原核表达质粒,并使该基因在*E.coli*中高效表达。**方法** 依据查菲埃立克体P120基因序列设计一对特异性引物,用PCR从查菲埃立克体的基因组中扩增含有编码P120抗原决定簇的基因片段,而后将PCR产物用T载体克隆。用酶将PCR产物从T载体切下,将它定向插入原核表达质粒PET11C构建PET11C/p120重组质粒;用重组质粒转化*E.coli* BL21(DE3)。**结果** 从DNA片断中扩增出一约1 119 bp产物,经测序为查菲埃立克体p120基因。PET11C/p120重组质粒转化的*E.coli*在IPTG的诱导下产生一分子量为41 000的天然蛋白,它的产量占细菌蛋白总量的28%,用免疫印迹分析证明它能特异地与查菲埃立克体感染病人血清反应。**结论** 查菲埃立克体特异性的P120抗原在原核表达系统被高效表达,该抗原的研制成功为制备人单核细胞埃立克体病诊断抗原和疫苗奠定了基础。

关键词: 查菲埃立克体;表面抗原;基因表达

中图法分类号: R376;R392.13 **文献标识码:** A

Cloning and expression of 120 000 surface antigen of *Ehrlichia chaffeensis*

JIAN Rui, WEN Bo-hai (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a prokaryotic expression plasmid with a gene encoding a 120 000 surface antigen (P120) of *Ehrlichia chaffeensis* for its highly express in the *E.coli* cells. **Methods** The DNA fragment containing gene encoding the immunodominant of P120 was amplifyed with a pair of primers designed based on the reported sequence of the p120 gene by PCR. The PCR product was cloned with T-vector and the cloned DNA fragment was cut off from the T-vector with *Nde*I and *BamH*I. The DNA fragment was ligated into an expression plasmid (PET11C) and transformed the *E.coli* BL21(DE3) with the recombinant plasmid (PET11C/p120). The expression of p120 gene in the *E.coli* was induced by IPTG. **Results** The DNA fragment amplified by PCR was 1 119 bp and was identified to be the p120 gene of *E. chaffeensis* by analyzing its sequence. A 41 000 natural protein that was 28% of the total protein of the *E.coli* was identified in this transformed *E.coli* by SDS-PAGE and it reacted specifically with the sera of patients infected by *E. chaffeensis* in Western blotting analysis. **Conclusion** The *E.coli* transformed by the recombinant plasmid (PET11C/p120) yield a high level of P120 antigen of *Ehrlichia Chaffeensis*, which lays a foundation of preparing a large amount of P120 antigen for serological diagnosis and vaccination of human monocytic ehlichiosis.

Key words: *Ehrlichia chaffeensis*; surface antigen; gene expression

查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)是人单核细胞埃立克体病(Human mononcytic ehrlichiosis, HME)的病原体,于1991年首次在美国被分离鉴定。该病原体主要感染人单核细胞和巨噬细胞,引起患者发热、头痛、肌痛等症状,严重者死亡。目前已有数千病例被确诊,分布于美国、欧洲、非洲[1]。在我国云南和福建的蜱和啮齿动物中均检测到查菲埃立克体的基因片段[2],提示在我国存在该病原的自然疫源地和HME。

血清学分析是目前诊断HME和对HME做流行病学调查的主要方法,但由于该病原体为严格胞内寄生菌,难以通过细胞培养制备大量抗原去满足临床HME的血清学诊断和流行病学调查的需要[3]。查菲埃立克体有120 000、66 000、55 000、44 000、29 000、28 000和22 000等7种主要蛋白抗原,其中120 000蛋白(P120)为细胞表面抗原,具有种特异性。编码查菲埃立克体P120抗原的基因首先被Yu等[4]用HME病人血清从查菲埃立克体基因文库中筛得,该基因开放阅读框(Open reading frame, ORF)全长为1 884 bp。本研究通过分析该抗原基因的序列结构设计引物,从查菲埃立克体基因组中扩增到含有编码P120抗原决定簇的基因片段,并构建了重组表达质粒PET11C/P120,经免疫印迹证实该重组质粒在大肠杆菌胞内高效表达的P120天然蛋白能够与HME病人血清反应。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

Eoli DH5α和BL21(DE3)株、查菲埃立克体(Arkansa株)基因组DNA、表达质粒PET-11C为本室保存;PUCm-T载体购自上海生工(生物工程技术服务有限公司)。在PET-11C的多克隆位点中的*Nde*I和*BamH*I位点为插入基因连接位点。

1.2 寡核苷酸引物

根据Yu等[4]报道p120基因序列自行设计一对特异性引物,上游引物为P_1(5'-CATATGCAAGAGCAAGAAGATGAC-3'),定位于p120基因序列的第312~329碱基位,含*Nde*I位点和起始密码子,下游引物为P_2(5'-TTACTCTACAACAACCGGAATC-3')位于基因的第1 637~1 620位,含终止密码子。此对引物设计扩

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870042)

作者简介:戛 锐(1972-),男,重庆市人,硕士研究生,实验师,主要从事立克次体方面的研究。电话:(023)68752239

收稿日期:2001-03-09;修回日期:2001-06-10

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

增 p120 基因片段为 1 119 bp，其编码的蛋白质约为 41 000。引物 M13（5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'）与 PUCm-T 载体序列互补位于多克隆位点的上游，用于与 P_1 或 P_2 配对做 PCR 检验基因插入 T 载体方向。以上引物均由上海生工合成。

1.3　主要试剂

限制性内切酶和其他工具酶、SK112 凝胶回收试剂盒、二硫苏糖醇（DTT）、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等购自上海生工；IPTG 购自 Sigma 公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 为北京邦定泰克公司产品；其余为国产分析纯试剂。查菲埃立克体感染病人血清为美国 Texas 大学 Galveston 医学分校 Walker 教授惠赠。

1.4　P120 基因的扩增

50 μl 反应混合物中包括 0.2 μg 查菲埃立克体 DNA，200 μmol/L dNTP（dATP，dTTP，dCTP，dGTP），2.5 mmol/L $MgCl_2$，P_1、P_2 引物分别为 30 pmol，1 × 反应缓冲液［50 mmol/L KCl，10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.3）］和 2 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应为 95 ℃预变性 5 min 后，按 94 ℃ 1 min，61 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min 循环 40 次，再于 72 ℃延伸 10 min。取 5 μl 反应产物于 1%琼脂糖凝胶（含 0.5 μg/ml 溴化乙锭）中电泳分析。

1.5　PUCm-T/p120 质粒的构建

按上述条件制备的 200 μl PCR 产物经凝胶电泳纯化回收后与 PUCm-T 载体连接并转化 *Eoil* DH5α，见图 1，方法参照试剂盒说明书和文献［5］进行。

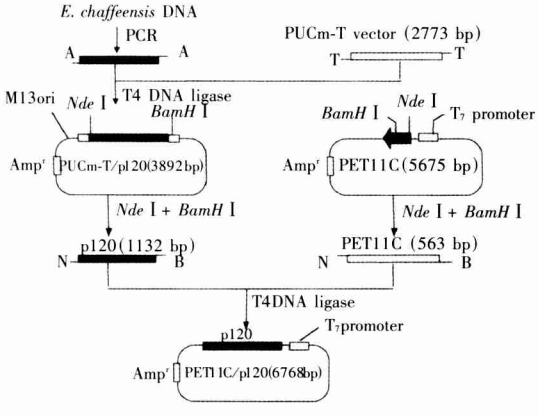


图 1　重组质粒的构建

Fig 1　Construction of the recombinant plasmids

挑选白斑菌落增菌培养后用碱变性法[5]抽提质粒，重组子用 P_1、P_2、M13 引物分别配对进行 PCR 扩增[6]以筛选正向重组子，反应条件和产物电泳分析同前。

1.6　PET-11C/p120 表达质粒的构建与鉴定

PUCm-T/p120 质粒和 PET-11C 质粒经 *Nde*I 和 *BamH*I 双酶切后，用凝胶回收试剂盒纯化目的片段，将 p120 片段与 PET-11C 定向连接后转化 *E. coli* BL21（DE3），见图 1，提取重组质粒，对质粒进行酶切分析和用 377 全自动 DNA 测序仪测定插入片段的序列，方法均按试剂盒说明书进行。

1.7　重组质粒的表达

以 PET-11C/p120 转化 *E. coli* BL21（DE3），将过夜培养的转化菌按 1:20 比例加入 LB 培养基（0.5% NaCl，1%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，200 μg/ml 氨苄青霉素），37 ℃增菌培养至 $D_{600} \approx 0.6$ 后加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L，降温至 26 ℃培养 30 min 后加入利福平至终浓度为 200 μg/ml。诱导表达12 h后离心收集细菌，用 PBS 悬浮备用。

1.8　SDS-PAGE 和免疫印迹

配制 10%分离胶和 5%的积层胶，样品与 1 × SDS 加样缓冲液［50 mmol/L Tris-HCl（pH 6.8），100 mmol/L DTT，3% SDS，12%甘油，0.1%溴酚蓝］按 1:3 体积混合，沸水浴 5 min，取 10 μl 上样电泳，电泳后凝胶染色后观察结果[7]。

用电转印法，在 4 ℃下以 100 V 恒压作用 1 h 将 SDS-PAGE 凝胶中蛋白质转至 0.22 μm 硝酸纤维滤膜上，滤膜的封闭，抗体孵育和显色均按文献［5］进行，其中一抗为查菲埃立克体感染病人血清（工作浓度为 1:100），二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG（工作浓度为 1:500）。

2　结果

2.1　p120 基因的 PCR 扩增

在上述反应条件下，从查菲埃立克体 DNA 中扩增到一长度约为 1 100 bp 的片段，与设计相符。

2.2　PUCm-T/p120 质粒的构建与筛选

用 P_1、P_2 引物做 PCR，从重组子中扩得一条 1 100 bp 产物，同时用 M13 引物与 P_2 反向引物进行 PCR，得到一 1 240 bp 产物，而 M13 引物与 P_1 正向引物进行 PCR 的结果为阴性，见图 2。证实该质粒为 p120 基因片段正向插入的阳性重组子。

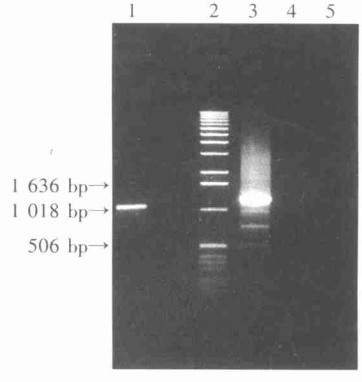


图 2　PCR 鉴定 p120 基因片段在 PUCm-T/p120 重组质粒中方向

Fig 2　Identification of the direction of p120 gene in the PUCm-T/p120

1: Primer P_1 and P_2; 2: Molecular weight marker; 3: Primer M13 and P_2; 4: Primer M13 and P_1; 5: Primer P_1 and P_2 (Negative control)

2.3　PET-11C/p120 表达质粒的构建与鉴定

p120 基因亚克隆至表达质粒 PET-11C 后，经 *Nde*I，*BamH*I 双酶切后得到一约 1 100 bp 和一约 5 600 bp 两个片段。用引物 P_1、P_2 对该重组质粒的插入片段进行测序，证实该基因片段序列与文献报道的查菲埃立克体 p120 基因序列完全一致，证明重组表达质粒 PET-11C/p120 构建成功。

2.4　SDS-PAGE 和免疫印迹

SDS-PAGE 发现被 PET-11C/p120 转化的 *E. coli* 在 41 000 处有一强蛋白带，经 UVP 凝胶分析系统分析显示其占细菌总蛋白量的28%，而 PET-11C 转化的 *E. coli* 则无此带，见图 3。免疫印

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

迹表明该蛋白带能与查菲埃立克体感染的病人血清发生反应，而与正常人血清无反应，见图3。

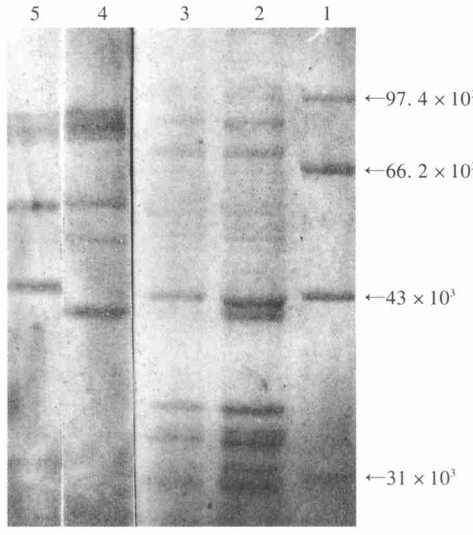


图3 免疫印迹鉴定P120抗原蛋白

Fig 3 Identification of P120 antigen by immunoblot analysis

1: Molecular weight marker; 2: *E. coli* transformed with PET11C/p120 induced with IPTG in SDS-PAGE; 3: *E. coli* transformed with PET11C induced with IPTG in SDS-PAGE; 4: *E. coli* transformed with PET11C/p120 induced with IPTG in immunoblot with HME patient sera; 5: *E. coli* transformed with PET11C/p120 induced with IPTG in immunoblot with normal sera

3 讨论

1990年在阿肯色州的查菲镇，从一蜱咬后发热士兵的血液中分离到一株在生物学性状上十分类似犬埃立克体(*E. canis*)的病原体，后经16S rRNA基因序列分析证明该病原体是与犬埃立克体密切相关的埃立克体属的一个新种，以分离地命名它为查菲埃立克体。这是首次证实蜱传埃立克体能够感染人。随后许多埃立克体感染病例在美国和其他国家被证实和几种新埃立克体被分离和鉴定。埃立克体已经被认为是一类重要的人畜共患病原体，为了有效地诊断、防治埃立克体病，许多实验室已经对某些埃立克体的主要抗原作了深入研究。

Yu等[4]对查菲埃立克体P120抗原蛋白全基因进行克隆和分析，发现在1 884 bp的ORF中有5个连续的240 bp重复单位。分析进一步发现所有查菲埃立克体均具有120 000主要表面抗原，但不同菌株p120基因的240 bp重复单位数量有差异[4,8]。连续重复单位包含了全基因的60%，因此认为，连续重复单位编码的蛋白含有P120主要表面抗原的抗原决定簇。免疫印迹分析发现HME病人均有抗P120的抗体，说明P120具有良好的免疫原性和免疫反应性[3]。

P120属表面抗原，它的多个重复单位均为B淋巴细胞识别的亲水氨基酸区域，能有效地刺激B淋巴细胞产生抗体。也有人认为查菲埃立克体感染细胞后，宿主细胞可将P120呈现在细胞表面，使得感染的宿主细胞成为细胞毒性T淋巴细胞和抗体依赖的细胞毒性细胞攻击的靶细胞。因此P120可能在抗查菲埃立克体感染免疫中扮演重要角色，是一种有效的免疫保护性抗原。采用现代分子克隆技术研制查菲埃立克体特异性的P120抗原，将为大量制备HME的血清学诊断抗原和预防疫苗奠定基础。

Studier等[9]利用T7噬菌体RNA聚合酶启动子系统建立的PET原核表达系统，具有较高的转录效率。*E. coli* BL21(DE3)为溶原菌，其染色体上的T7RNA聚合酶基因受诱导型LacUV5启动子控制，IPTG可诱导LacUV5产生T7RNA聚合酶，后者特异识别T7启动子，从而启动连接于其后的目的基因高效表达。且BL21不具有ompT外膜蛋白酶和lon蛋白酶，为低蛋白酶活性菌株，可使表达蛋白稳定存在。利福平可抑制宿主菌BL21的RNA聚合酶而具有利福平抗性的T7RNA聚合酶却能继续工作，从而相对提高目的蛋白的表达量[10]。

本研究依据Yu等[4]报告的p120基因序列设计引物，用PCR从查菲埃立克体基因组中扩得一p120基因片段，将其插入PET原核表达载体构建了PET-11C/p120重组质粒。被PET-11C/p120转化的*E. coli* BL21产生P120蛋白占细菌蛋白总量的28%，证明p120基因在大肠杆菌胞内获得高效表达。经免疫印迹证实表达的P120能特异的与HME病人血清反应，说明该蛋白具有良好的抗原特异性和免疫反应性，但其免疫原性将有待进一步研究证实。本研究获得的P120蛋白为基因工程天然蛋白并包括该蛋白4个完整的被淋巴细胞识别的重复单位，比Yu等[3]研制的仅含2个重复单位P120融合蛋白具有更完整的抗原性和不需将融合的蛋白切除等优点。

研究中发现，在较低的温度下诱导时，表达蛋白的含量相对较高且为可溶性，而在37 ℃下诱导时，则以不溶的包涵体形式存在。表达的可溶性蛋白易于分离纯化并可保持表达产物的生物学活性，从而可以低廉的成本大量制备P120抗原蛋白[11]，解决查菲埃立克体抗原难以制备的难题。

参考文献：

[1] 温博海. 人埃立克体病[J]. 国外医学：传染病和流行病学分册，1997,24(5):224－227.

[2] 高玉敏，张习坦，曹务春，等. 用半套式PCR检测蜱和啮齿动物中查菲埃立克体[J]. 中国人兽共患病杂志，2000,16(3):25－28.

[3] Yu X J, Crocquet-Valdes P, Cullman L C, *et al*. The recombinant 120 kD protein of Ehrlichia chaffeensis, a potential diagnostic tool[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(11): 2 853－2 855.

[4] Yu X J, Crocquet-Valdes P, Walker D H. Cloning and sequencing of gene

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

for a 120 kD immunodominant protein of Ehrlichia chaffeensis[J]. Gene, 1997,184(2):149-154.
[5] 萨姆布鲁克J,弗里奇E F,曼尼阿蒂斯T.分子克隆实验指南[M].金冬雁,黎孟枫,张德政,等译.第2版.北京:科学出版社,1998.19-59.
[6] 黄培堂,俞炜源,陈添弥,等.PCR技术实验指南[M].北京:科学出版社,1998.408-412.
[7] 郭尧军 编著.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999.85.
[8] Chen S M, Yu X J, Popov V L, *et al*. Genetic and antigenic diversity of Ehrlichia chaffeensis: comparative and analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains[J]. J Infect Dis, 1997, 175(4): 856-863.
[9] Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned gene[J]. J Mol Biol, 1986, 189(1):113-130.
[10] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, *et al*. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes[J]. Methods Enzymol, 1990, 185(1):60-89.
[11] 方建民,余新炳,罗树红,等.恶性疟原虫组氨酸富集蛋白Ⅱ抗原基因在大肠杆菌中的表达及表达蛋白的活性鉴定研究[J].中国人兽共患病杂志,1999,15(1):23-26.

(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2001)08-0941-01

个案与短篇

超声引导活检枪法与传统法肾脏活检的对比研究

Comparative study between ultrasound guided automat and traditional puncture techniques for renal biopsy

赵洪雯[1],吴雄飞[1],李 锐[2],彭罗民[1],刘 宏[1],方 路[1],千 磊[1],郭艳丽[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]泌尿中心肾科;[2]超声科;重庆 400038)

肾活检在肾脏疾病的诊断、治疗与判断预后等方面都有非常重要的作用,但传统方法并发症多,本研究对比超声引导下自动活检枪法与传统方法肾活检,探讨一种更安全有效的方法,提高肾脏病的诊治水平。

1 临床资料

传统方法活检48例,活检枪法68例,均有肾活检适应症,无绝对禁忌症。原发病包括原发性肾病综合征、狼疮性肾炎、无症状蛋白尿和/或血尿、不明原因急性肾衰,其中活检枪法还包括慢性肾衰肾脏未缩小2例、慢性肾衰肾脏缩小1例。所用超声仪为Acuson128XP/10,线阵式穿刺探头,频率为5~10 mHz。活检枪和穿检针均为美国Bard公司生产。

2 方法与结果

二者术前准备相同。每例穿刺2~3针,若已穿刺3针而未获足够组织,不再继续,以免出现严重并发症[1]。1998年前采用传统法(负压吸引或Tru-cut针手动法)。负压吸引法是在超声科体表定位后在本科室进行穿刺。Tru-cut针法是在超声引导下手动穿刺。1999年1月后采用超声引导自动活检枪法,根据肾皮质厚薄和肾脏大小选择进针深度(22或15 mm),实时超声引导进针,抵达肾包膜即屏气开枪取材,屏幕上可见穿刺针迅速射入肾脏,全部过程仅需数秒。肾小球总数>15个,可以满足病理诊断计成功率。传统法1次成功32例(67%),2次成功7例(15%),3次成功3例(6%),失败4例(12%)。活检枪法1次成功63例(93%),2次成功2例(3%),3次成功2例(3%),失败1例(2%)为活检枪故障。并发症:传统法肉眼血尿9例(19%),肾周血肿9例(19%),动静脉瘘1例(2%),穿通肾盂3例(6%);活检枪法肉眼血尿1例(1%),肾周血肿3例(4%)。

3 讨论

活检枪法整个过程都在实时超声声像图监控下进行,活检针在肾脏内停留时间极短,抖动小,成功率高而并发症少且轻,也给移植肾穿刺提供了一个更安全可靠的活检方法。穿刺儿童3例,最小6岁,均一次成功,无明显并发症。日本学者调查2 045例婴幼儿和年长儿肾活检中,50.8%用超声引导下自动活检枪穿刺,成功率达98.7%,肉眼血尿仅2.7%[2],说明年龄不再是肾活检的限制因素。术前可基础麻醉[3],仍不合作酌加复方氯丙嗪静注,年长儿可口服水合氯醛,细针(18 G)穿刺。严重腹水、腰背部明显水肿和显著肥胖者用活检枪法,选择20 cm长针穿刺,全部成功,且操作时间很短病人可以耐受,无明显并发症,进一步缩小了肾活检的相对禁忌症。

关键词:活检;肾脏
中图法分类号:R446.8 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 李幼姬.肾活检[A].见:叶任高,沈清瑞 主编.肾脏病诊断与治疗学[M].北京:人民卫生出版社,1994.43-49.
[2] Kamitsuji H, Yoshika K, Ito H, *et al*. Percutaneous renal biopsy in children: Survey of pediatric nephrologists in Japan[J]. Pediatric Nephrol, 1999, 13(8):693-696.
[3] 于志敏,罗运九,任志德,等.50例婴幼儿经皮肾穿刺活检的诊断分析[J].中华儿科杂志,1993,31(4):233-234.

(编辑 王 红)

作者简介:赵洪雯(1970-),女,北京市人,硕士,医师,主要从事肾脏病及肾移植临床与研究工作方面的研究。电话:(023)65358411

收稿日期:2001-01-13;修回日期:2001-04-11

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