

• 基础实验研究论著 •

日本血吸虫重组质粒 pGEX-Sj32 的构建及其在大肠埃希菌 BL21 中的表达*

谭建蓉, 李文桂[△], 张 丽

(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 构建日本血吸虫(Sj)重组质粒 pGEX-Sj32 并研究其在大肠埃希菌 BL21 中的表达效率。方法 从该实验室保存的 BL21(pET28 α -Sj32)重组菌中抽提质粒 pET28 α -Sj32, PCR 扩增 Sj32 抗原编码基因, 定向克隆入穿梭载体 pGEX-1 λ T, 构建重组质粒 pGEX-Sj32。将重组质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3), 经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达; 表达产物用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定。结果 PCR 成功扩增出 Sj32 编码基因, 并成功构建了重组质粒 pGEX-Sj32; SDS-PAGE 显示相对分子质量约为 58×10^3 的重组蛋白, 薄层扫描分析显示表达蛋白约占菌体总蛋白的 21%; Western blot 显示重组蛋白可被日本血吸虫感染兔血清识别。结论 成功构建日本血吸虫重组质粒 pGEX-Sj32, 该重组质粒在大肠埃希菌 BL21 中得到了高效表达, 且表达蛋白具有特异的抗原性。

关键词: 日本血吸虫; 聚合酶链反应; 大肠埃希菌; 表达效率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)23-3153-03

Construction of recombinant plasmid pGEX-Sj32 of *Schistosoma japonicum* and expression in *Escherichia coli* BL21*

Tan Jianrong, Li Wengui[△], Zhang Li

(Institute of Infectious and Parasitic Disease, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the recombinant plasmid pGEX-Sj32 of *Schistosoma japonicum* (Sj) and to research its expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21. Methods Sj32 gene was amplified by PCR from template of plasmid pET28 α -Sj32 extracted from recombinant bacterium BL21 (pET28 α -Sj32) stored by our laboratory, and then cloned into the vector pGEX-1 λ T to construct pGEX-Sj32. The recombinant plasmid pGEX-Sj32 was transformed into *E. coli* BL21(DE3). The recombinant strains were induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), and the expressed products were identified by SDS-PAGE and Western blot. Results Sj32 coding gene was successfully amplified by PCR and cloned into the vector pGEX-1 λ T, and the recombinant plasmid pGEX-Sj32 was constructed successfully. The molecular mass of the expressed recombinant protein was proximately 58 000 as detected by SDS-PAGE. The amount of the expressed protein was about 21% of the total bacterial protein. Western blot confirmed that the expressed protein could be recognized by the immune sera from rabbit infected with *Schistosoma japonicum*. Conclusion The recombinant plasmid pGEX-Sj32 is successfully constructed. The Sj32 protein was highly expressed in *E. coli* and the expressed recombinant protein possesses the specific antigenicity.

Key words: *Schistosoma japonicum*; polymerase chain reaction; *Escherichia coli*; expression efficiency

日本血吸虫病是一种免疫性疾病, 日本血吸虫尾蚴感染人和动物后, 在体内可发育为童虫、成虫并产生虫卵, 虫体本身及其分泌物可诱导机体免疫系统产生体液及细胞免疫应答, 这是机体清除病原体的一种保护性反应。最早由 Lichtenberg 等^[1]发现人和鼠类感染 Sj 后具有部分抵抗力, 表明 Sj 能在宿主体内诱导一定的保护性免疫反应。Capron 等^[2]认为 Sj 在终宿主体内并不繁殖, 降低感染后成虫负荷可显著减轻病理损伤和疾病的传播, 同时指出了免疫力不到 100% 的疫苗也足以从临床学角度控制血吸虫病。因此, 研制疫苗有望成为防治血吸虫病的一种新手段, 同时弥补目前血吸虫防治工作中出现的化疗耐药、灭螺难度大及不能预防潜在流行等不足, 从而有效阻断血吸虫病的流行。一种相对分子质量为 32×10^3 的蛋白被证实为天冬酰胺肽链酶^[3], 因其有较强的免疫原性而受到广泛关注, 是当前 Sj 疫苗研究的热点领域之一。本研究拟扩增 Sj32 抗原编码基因, 将其定向克隆至质粒 pGEX-1 λ T, 构建重组质

粒 pGEX-Sj32, 将重组质粒转化大肠埃希菌 BL21, 经 IPTG 诱导表达。以期阐明 Sj32 在大肠埃希菌中的表达情况, 为其用于疫苗研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 PCR 扩增试剂盒 (SK2073)、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒 (SK1192)、高效感受态细胞制备试剂盒 (SK2303)、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (SK1142)、丙烯酰胺 (SDS)、N, N, N', N'-四甲基乙二胺 (TEMED)、考马斯亮蓝及二氨基联苯胺 (DAB) 显色剂均购自上海生工公司; T4DNA 连接酶、DNA marker、BamH I 和 EcoR I 限制性内切酶购自立陶宛 Fermentas 公司; 中分子质量蛋白购自重庆百萃公司; 硝酸纤维素膜及辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自北方同正公司; LB 液体培养基、MRS 液体培养基和感染日本血吸虫的兔血清由该实验室制备。恒温摇床及恒温水箱购自日本三洋公司; 台式高速离心机及核酸蛋白仪购自德国

* 基金项目: 重庆市科委地方病重大专项基金 (2008AB5055、2008AB5008、2008AB5054)。 作者简介: 谭建蓉, 女, 硕士研究生, 主要从事病原微生物的分子生物学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: cqliwengui@163.com。

Eppendorf 公司;PCR 仪(PTC-200)购自美国 MJ Research 公司;凝胶成像仪、电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 DNA 模板、质粒和宿主菌 pET28 α -Sj32 由该实验室构建并保存,pGEX-1 λ T 及宿主大肠埃希菌 BL21 由该实验室保存^[4]。

1.3 Sj32 目的基因的扩增 根据 GenBank 检索到的 Sj32 基因全长设计并合成引物 P1:5'-CTC GGA TCC AAG AGA AAT AAT GTT TTA TTC-3',P2:5'-CGC GAA TTC GAA TAA TTT TAA CTT AAC CGC-3';在 P1、P2 的 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点(下划线部分);以 pET28 α -Sj32 为模板,P1、P2 为引物,通过 PCR 扩增 Sj32 编码基因,设 50 μ L 反应体系:2 \times PCR Master 25 μ L,上下游引物各 3 μ L,pET28 α -Sj32 为 3 μ L,双蒸水 16 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,54 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。取 PCR 产物 3 μ L,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 重组质粒 pGEX-Sj32 构建和鉴定

1.4.1 Sj32 编码基因和 pGEX-1 λ T 双酶切反应 将质粒 pGEX-1 λ T 和 Sj32 基因 PCR 产物分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,60 μ L 酶切体系:双蒸水 9.4 μ L,10 \times Tango Buffer 6 μ L,底物 DNA 42 μ L,*Bam*H I 1.3 μ L,*Eco*R I 1.3 μ L。5 000 r/min(离心半径为 15.0 cm)离心 15 s,置 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h。

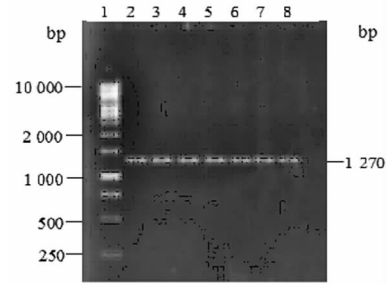
1.4.2 产物纯化、连接及鉴定 双酶切产物按 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒说明书纯化。将纯化后的质粒 pGEX-1 λ T 与目的基因 Sj32 按 1:5 的摩尔比混合,用 T4DNA 连接酶进行连接,连接体系为:质粒 pGEX-1 λ T 3 μ L,Sj32 13 μ L、T4DNA 连接酶 2 μ L、10 \times T4 Buffer 2 μ L,总体积 20 μ L。5 000 r/min 离心 15 s。4 $^{\circ}$ C 作用过夜,置 70 $^{\circ}$ C 10 min 灭活 T4DNA 连接酶。将连接产物转化大肠埃希菌 BL21 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 150 r/min(离心半径为 2.0 cm)振荡培养 1 h,随后接种至含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 厌氧培养 24~72 h。挑取平板上的单个菌落接种于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 220 r/min(离心半径为 2.0 cm)振荡培养 48~72 h,抽提重组质粒 pGEX-Sj32。双酶切鉴定重组质粒,酶切体系类似目的基因及载体质粒的制备。

1.5 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 分析 将被证明含有重组质粒 pGEX-Sj32 的大肠埃希菌接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 220 r/min(离心半径为 2.0 cm)振荡培养至吸光度(A_{600})值为 0.5~0.8 时,取适量作为未诱导对照,其余加入 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,分别于 1、3、5、7、9、11 和 13 h 时各收集菌液 1 mL。将收集的菌液以 10 000 r/min(离心半径为 15.0 cm)离心 2 min,分别收集菌体,以 50 μ L 的 1 \times 蛋白上样缓冲液重悬后煮沸 5 min,取 15 μ L 用 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色,以脱色液脱色后经 Bio-Rad 凝胶成像系统分析重组蛋白的表达情况。

1.6 Western blot 鉴定 以未诱导的菌体作对照,诱导表达的菌体总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,用半干转移系统电转移至硝酸纤维素膜上;于封闭液中室温摇床封闭 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入用封闭液 1:100 稀释的日本血吸虫感染的兔血清,室温摇床孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;再加入用封闭液 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,室温摇床孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;加入底物 DAB,避光反应 10~15 min,用蒸馏水洗膜终止反应。

2 结 果

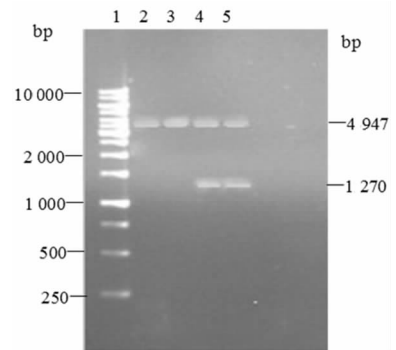
2.1 抗原编码基因 Sj32 的鉴定 经 PCR 扩增后,可获得长度为 1 270 bp 的片段,与设计的扩增片段长度相符(图 1)。



1:DNA 分子标记物;2~8:Sj32 抗原基因 PCR 扩增产物。

图 1 Sj32 抗原基因 PCR 扩增产物鉴定

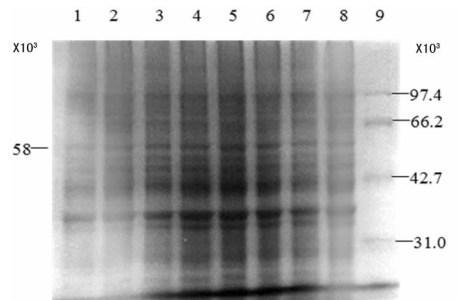
2.2 重组质粒 pGEX-Sj32 的双酶切鉴定 重组质粒 pGEX-Sj32 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,凝胶电泳结果显示 2 条条带,分别为 4 947 bp 的载体片段和 1 270 bp 的目的基因片段(图 2)。



1:DNA 分子标记物;2、3:pGEX-1 λ T 空质粒;4、5:重组质粒 pGEX-Sj32 双酶切产物。

图 2 重组质粒 pGEX-Sj32 双酶切产物鉴定

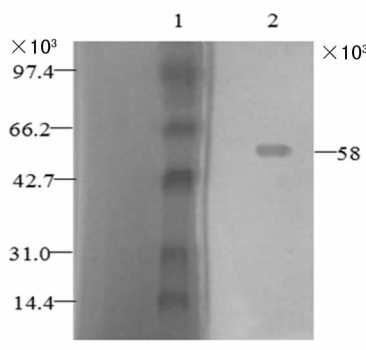
2.3 重组质粒 pGEX-Sj32 在大肠埃希菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析 将重组质粒 pGEX-Sj32 在 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导表达后,经 SDS-PAGE 凝胶电泳,得到约 58×10^3 的条带,其中以 7 h 时收集的菌液表达水平较高,表达蛋白占菌体总蛋白的 21%(图 3)。



1:未经 IPTG 诱导的 BL21(pGEX-Sj32)产物;2~8:分别为经 IPTG 诱导的 1、3、5、7、9、11 和 13 h 的 BL21(pGEX-Sj32)产物;9:蛋白标志物。

图 3 pGEX-Sj32 在 BL21 中的表达产物的 SDS-PAGE 分析

2.4 Western blot 鉴定 重组质粒 pGEX-Sj32 表达产物可被日本血吸虫感染的兔血清识别,识别的相对分子质量为 58×10^3 (图 4)。



1: 蛋白标志物; 2: 重组质粒 pGEX-Sj32 诱导表达产物。

图 4 pGEX-Sj32 在 BL21 中的表达产物的 Western blot 鉴定

3 讨 论

基因重组技术以其安全、方便、易于在体外操作等优点受到广泛关注,已有众多学者利用该技术研制日本血吸虫病疫苗,将单一或多个日本血吸虫抗原编码基因与表达载体重组后,将重组体转化原核或真核生物进行表达,表达产物通过各种途径诱导宿主产生保护性免疫应答,从而有效抵抗日本血吸虫感染。本课题组已成功将多个日本血吸虫抗原编码基因(Sj26GST-Sj32 和 Sj14-3-3)、多房棘球绦虫 Em II /3-Eml4-3-3 融合基因、结核分枝杆菌 MPT64 基因、细粒棘球绦虫 Eg95-EgA31 融合基因^[5-9]与穿梭表达载体 pGEX-1λT 重组,构建各类基因的重组质粒并在大肠埃希菌中得到了有效表达,为下一步疫苗的研究奠定了深厚的基础。

大肠埃希菌以其基因背景研究清楚、细菌生长快速、培养条件简单等优点被广泛用于载体克隆外源 DNA 后的受体菌。王孝会等^[10]将 RIPX 蛋白基因插入载体 pGEX-4T-2 中,构建原核表达质粒 pGEX-4T-2-RIPX;转化大肠埃希菌 DH5α, IPTG 诱导表达;表达产物经 SDS-PAGE 分析成功表达了相对分子质量为 70×10^3 的融合蛋白,表明大肠埃希菌能接受并整合外源 DNA,指导完成转录、翻译。为了完成携带外源 DNA 片段进入指定的受体细胞并完成复制、转录和表达,必须应用合适的载体。本课题采用的穿梭表达载体 pGEX-1λT 含有大肠埃希菌和双歧杆菌的复制起始点、一个多克隆位点、一个氨苄青霉素抗性基因和一个谷胱甘肽-S 转移酶(GST)基因,目的基因连在 GST 的下游,当基因进行表达时,表达产物是 GST 和目的基因表达蛋白的融合体,且 GST 相对分子质量大,结构复杂,免疫动物时抗原性强,这就使得 GST 融合标签便于表达蛋白的亲亲和纯化,表达效率高,容易操作。载体 pGEX-1λT 可携带 Sj32 目的基因至大肠埃希菌,为目的基因提供复制和整合能力,为扩增和表达提供必要的条件。SDS-PAGE 分析结果显示 Sj32 基因在大肠埃希菌中成功地表达了相对分子质量为 58×10^3 的目的蛋白,与预期(GST 蛋白 26×10^3 + Sj32 表达的 32×10^3 蛋白)结果相符,这为 pGEX-1λT 作为合适载体用于后续日本血吸虫病疫苗研究的可行性提供了有力依据。

血吸虫 32×10^3 蛋白是天冬酰胺肽链酶,其免疫动物后可降低机体成虫负荷及成虫的生殖能力,延缓或阻止虫体发育成熟^[11]。傅志强等^[12]将日本血吸虫 32×10^3 抗原基因转化大肠埃希菌 BL21(DE3),表达产物能被日本血吸虫阳性血清识别,提示 32×10^3 蛋白具有较好的免疫原性;沈定文等^[13]对日本血吸虫 32×10^3 蛋白的保护性免疫力研究得到了 21.8% 的减

虫率和 71.4% 的减卵率,提示 32×10^3 蛋白可诱导产生部分抗血吸虫感染的免疫保护力;李传明等^[14]构建了日本血吸虫 Sj32DNA 疫苗,将其免疫 BALB/c 小鼠、尾蚴攻击后得到了 38.6% 的减虫率和 55.7% 的肝减卵率。以上研究提示 Sj32 是一种有潜在价值的血吸虫病疫苗候选分子。

本研究以 pET28α-Sj32 为模板,PCR 扩增 Sj32 抗原编码基因,通过穿梭表达载体 pGEX-1λT 携带 Sj32 基因至大肠埃希菌 BL21 中表达,表达产物经 SDS-PAGE 显示为相对分子质量为 58×10^3 (质粒 GST26 kDa $\times 10^3$ + Sj32 表达的 32×10^3) 的蛋白,且在诱导的 7 h 表达较高,表达蛋白占全菌总蛋白的 21%;Western blot 鉴定发现该蛋白能识别血吸虫尾蚴感染的家兔血清,表明构建的重组质粒能在菌体内完成复制、转录和翻译;其编码产物是相对分子质量为 32×10^3 的蛋白,具有较好的免疫原性。这为 Sj32 疫苗用于日本血吸虫病的免疫预防提供了可靠证据,并为后续疫苗研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] Lichtenberg F, Correa-Oliveira R, Sher A. The fate of challenge schistosomula in the murine anti-schistosome vaccine model[J]. Am J Trop Med Hyg, 1985, 34(1): 96-106.
- [2] Capron A, Riveau G, Grzych JM, et al. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis [J]. Trop Geogr Med, 1994, 46(4): 242-246.
- [3] Ruppel A, Diesjed HJ, Rothers U. Immunoblot analysis of Schistosoma mansoni antigens with sera of schistosomiasis patients; diagnostic potential of an adult Schistosome polypeptide[J]. Clin Exp Immunol, 1985, 62(3): 499-506.
- [4] 李文桂, 肖邦忠, 罗兴建, 等. 日本血吸虫重组质粒 pET28α-Sj32 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(4): 286-289.
- [5] 杨梅, 李文桂, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组 Bb-Em II /3-Eml4-3-3 疫苗的构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(10): 1026-1029.
- [6] 谢婷, 李文桂. 结核分枝杆菌重组 Bb-MPT64 疫苗的构建、鉴定及表达[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(6): 657-660.
- [7] 周必英, 陈雅荣, 李文桂, 等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合基因疫苗构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 502-506.
- [8] 张宁, 李文桂. 日本血吸虫重组两歧双歧杆菌 pGEX-Sj14-3-3 疫苗构建及鉴定[J]. 中国地方病学杂志, 2011, 30(1): 82-85.
- [9] 向进平, 李文桂. 日本血吸虫重组 Bb(pGEX-Sj26GST-Sj32)疫苗的构建及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 10(7): 762-766.
- [10] 王孝会, 王桂玲. GST/RIPX 融合蛋白表达载体的构建及其在大肠埃希菌中的表达[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(9): 987-988, 994.
- [11] 谢来平, 石佑恩. 日本血吸虫 DNA 疫苗 pCD-Sj32 在小鼠皮肤组织内的表达及其保护性免疫效果的观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(1): 3-5.
- [12] 傅志强, 刘金明, 李浩, 等. 日本血吸虫 Sj32KD 抗原基因的克隆、表达及诊断应用[J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15(1): 1-6.
- [13] 沈定文, 李雍龙, 韩家俊, 等. 日本血吸虫成虫 31/32 kDa 蛋白的纯化及保护性免疫力的研究[J]. 中国寄生虫学及寄生虫病杂志, 1993, 11(4): 241-243.
- [14] 李传明, 石佑恩. 日本血吸虫 Sj32DNA 疫苗免疫效果的观察[J]. 中国寄生虫病与寄生虫病杂志, 1999, 17(1): 70-73.