

· 论 著 ·

重组日本血吸虫亲环素 B 的克隆、表达及免疫分析^{*}

陈金桃^{1,2},胡旭初^{2△}

(1. 广州医科大学附属第三医院检验科,广州 510145;2. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室,广州 510080)

摘要:目的 克隆、表达日本血吸虫亲环素 B(SjCyPB)基因,鉴定并分析重组蛋白的免疫性。方法 根据 Genbank 中日本血吸虫序列设计一对特异性引物,以日本血吸虫 cDNA 为模板扩增 SjCyPB 基因,酶切后连接到表达载体 pET28,构建 pET28a(+) - SjCyPB 重组质粒,转化入感受态大肠杆菌 BL21/DE3 后对质粒进行双酶切和测序鉴定。IPTG 诱导表达后,经亲和层析纯化重组蛋白。采用 Western Blotting 分析鉴定重组蛋白的抗原性。将纯化的重组蛋白免疫大鼠,获得免疫血清,ELISA 检测抗 SjCyPB 特异性抗体滴度。结果 构建的 pET28a(+) - SjCyPB 重组质粒经双酶切和测序鉴定证实 SjCyPB 基因成功连接到 pET28a(+) 质粒中。经原核表达后获得纯化的重组蛋白,Western Blotting 结果显示,该重组蛋白可与感染日本血吸虫的免血清结合形成明显的条带。采用 ELISA 检测重组蛋白免疫后大鼠免疫血清的特异性 IgG 抗体滴度为 1:51 200。结论 成功克隆了日本血吸虫 CyPB 基因,并获得大量纯化的重组蛋白,重组 SjCyPB 具有免疫原性和抗原性。

关键词:日本血吸虫; 亲环素 B; 原核表达

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0001-03

Prokaryotic clone, expression and immunological analysis of recombinant Schistosoma japonicum cyclophilin B^{*}

CHEN Jintao^{1,2}, HU Xuchu^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510145, China; 2. Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To clone and express *Schistosoma japonicum* cyclophilin B (SjCyPB) gene in *E. coli*, and to identify and analyze the immunity of recombinant proteins. **Methods** A pair of specific primers was designed according to GenBank of *Schistosoma japonicum* sequence. SjCyPB gene was amplify by PCR and then connected to pET28 vector. The recombinant plasmid pET28a(+) - SjCyPB was constructed and transformed into *E. coli* BL21 cell line, the recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion and sequence analysis. After induced by isopropyl-B-D-thiogalactoside (IPTG), the expressed recombinant protein was purified by affinity-chromatography, and then verified by Western blotting. Rats were immunized recombinant SjCyPB, and the Sj-CyPB-specific IgG was detected by ELISA. **Results** SjCyPB gene was successfully inserted into pET28a(+) vector which identified by double enzyme digestion and sequence analysis. Recombinant SjCyPB protein was highly expressed in *E. coli*. The Western Blotting analysis confirmed that the recombinant protein could specifically combine to *S. japonicum*-infected rabbit serum. Using recombinant protein to immunize rats, the SjCyPB-specific IgG antibody titer was 1:51 200 detected by ELISA. **Conclusion** The recombinant SjCyPB is successfully constructed, and recombinant SjCyPB has immunogenicity and antigenicity.

Key words: schistosoma japonicum; cyclophilin B; prokaryotic expression

血吸虫病是一种在世界范围内广泛流行的寄生虫病,在热带和亚热带国家有将近 2 亿人感染血吸虫,每年有近 28 万人死于该病^[1],在我国流行的是日本血吸虫。我国血吸虫病的综合防治虽取得了巨大成绩,但血吸虫作为人兽共患寄生虫,宿主范围很广,彻底消除难度很大,仍然是一个引起社会广泛关注的公共健康问题^[2]。而疫苗是预防感染性疾病的战略手段,筛选并研制有效的基因工程重组疫苗是血吸虫病防治的重要方向^[3]。

存在于真核生物中的亲环素(CyPs)是一个相对较保守的多功能蛋白家族,具有肽基脯氨酰异构酶(PPIase)活性,可催化蛋白质中的脯氨酸残基侧链发生构像改变,促进蛋白质肽链折叠和空间结构形成,在应激状态下对其他蛋白分子发挥分子

伴侣的保护作用^[4]。目前对血吸虫亲环素研究较多的是亲环素 A(CyPA),该蛋白对血吸虫感染具有较明显的保护作用^[5]。同样是亲环素家族的 CyPB 与 CyPA 的同源性很高,近年来,CyPB 越来越引起人们的关注。研究表明,CyPB 的降低与肝纤维化程度的抑制有关^[6]。在 CyPB 敲除小鼠中发现明显的胶原蛋白异常,说明 CyPB 在胶原合成中起了重要的调控作用^[7]。而血吸虫卵沉积于宿主肝脏导致的肝纤维化,是血吸虫病最主要且最严重的病变。因此,本研究拟对日本血吸虫 CyPB 进行原核克隆及表达,并分析该重组蛋白的免疫原性及抗原性,为后续疫苗开发、抗体制备奠定基础。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂 日本血吸虫成虫的 cDNA 模板由本室提

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2010CB530000)。

作者简介:陈金桃,女,技师,主要从事病原生物学研究。 △ 通信作者,E-mail:huxuchu@mail.sysu.edu.cn。

取合成。大肠埃希菌 DH5 α 、BL21/DE3 由本室保存, 原核表达质粒 pET-28a(+) 购自 novegen 公司。T4 DNA 连接酶、Ex-Taq 酶购于 Fermentas 公司、EcoR I DNA 内切酶、Xho I DNA 内切酶购自 Thermo 公司; Ni-IDA Agarose His 纯化试剂盒购自 novegen 公司、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、PVDF 膜均购于 Millipore 公司; 羊抗兔 IgG-HRP 二抗、羊抗大鼠 IgG-HRP 二抗购自 Sigma 公司; TMB 显色试剂盒购自于 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 SjCyPB 基因的扩增 结合 SjCyPB 全长基因 cDNA 序列的 ORF 和载体 pET-28a(+) 多克隆位点, 采用 DNAClub 设计 SjCyPB 引物。上游引物: 5'-TGC GAA TTC ATG GCC GTG TTA AGA GT-3', 酶切位点为 EcoR I, 下游引物: 5'-TAT CTC GAG TCA TTC AGC AGC GT-3', 酶切位点为 Xho I (下划线为酶切位点)。引物由华大基因合成。以日本血吸虫成虫的 cDNA 为模板进行扩增, PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min, 热循环参数为 95 ℃ 1 min, 62 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.2 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒的构建 用 EcoR I、Xho I 对纯化后的 PCR 产物及载体 pET-28a(+) 进行双酶切, 将酶切后的 PCR 产物与酶切后的载体用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转化入感受态大肠杆菌 BL21/DE3。

1.2.3 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒的鉴定 挑取经卡那霉素筛选阳性的菌落, 提取质粒后用 EcoR I、Xho I 进行双酶切鉴定, 将鉴定结果正确的菌株送公司测序。

1.2.4 SjCyPB 重组蛋白的表达 将含有 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒的菌株接种于含卡那霉素 (30 μg/mL) 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5$ 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 37 ℃ 诱导表达 5 h, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集细菌。菌体按每克湿菌加入 3 mL PBS 缓冲液, 吹打重悬细菌沉淀, 然后 -20 ℃ 过夜。次日将细菌沉淀自然解冻后于冰上超声破碎 (170 W, 超声 1 s, 停 2 s, 超声 15 min)。8 000 r/min 离心 15 min 后, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳判断重组蛋白的可溶性表达情况。

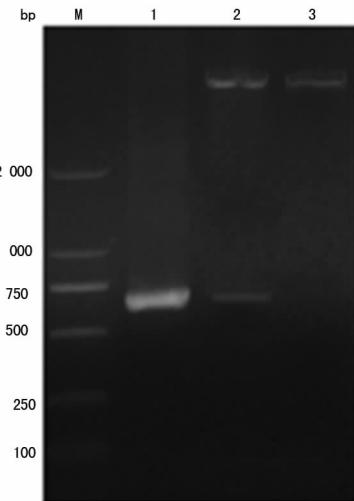
1.2.5 SjCyPB 重组蛋白的纯化 SjCyPB 主要以包涵体形式表达, 存在于沉淀中。将沉淀用 2 M 尿素-PBS 溶液完全溶解后, 采用梯度递减尿素浓度的方法, 对蛋白溶液透析, 直至透析至 PBS 溶液中。将透析后的蛋白溶液根据 His 柱蛋白纯化说明书进行纯化。

1.2.6 Western Blotting 分析 SjCyPB 重组蛋白抗原性 将 10 μg 纯化的 rSjCyPB 经 12% SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜, 经含 5% 的脱脂奶粉的 PBS 封闭后, 分别置于正常兔血清、感染血吸虫的兔血清孵育 2 h (1 : 500 稀释), 羊抗兔 IgG-HRP 二抗室温孵育 1 h (1 : 2 000 稀释), DAB 显色液中显色显示条带。

1.2.7 ELISA 分析 SjCyPB 重组蛋白的免疫原性 将纯化的 SjCyPB 重组蛋白免疫大鼠, 初次免疫, 将 100 μg 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂混合后于大鼠腹部、背部和足垫部位皮下多点免疫。间隔 2 周后, 用 50 μg 蛋白和等体积的弗氏不完全佐剂混合, 进行加强免疫, 共 2 次。末次免疫 2 周后大鼠尾部采血, 收集血清。用纯化的 SjCyPB 重组蛋白包被酶标板, 间接 ELISA 检测收集的大鼠血清中特异性抗 SjCyPB 抗体的滴度。

2 结 果

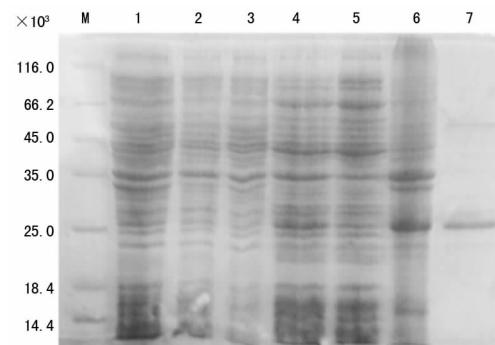
2.1 SjCyPB 基因的扩增和 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒的鉴定 纯化的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在基因长度为 500~750 bp 可见一特异性条带, 与 SjCyPB 基因片段分子大小 (648 bp) 一致, 见图 1。pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒用 EcoR I、Xho I 进行双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见两条带, 分别为质粒和 SjCyPB 基因片段, 而空质粒仅可见一质粒条带, 见图 1。将鉴定结果正确的菌株送公司测序, 测序结果在 BLAST 上进行比较, 与目的基因序列一致。



注:M 为 DNA 相对分子质量标记 DL2000, 1 为 SjCyPB PCR 产物, 2 为 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒双酶切产物, 3 为 pET-28a(+) 空质粒双酶切产物。

图 1 pET-28a(+) -SjCyPB 重组质粒的双酶切鉴定

2.2 rSjCyPB 蛋白诱导表达 将重组质粒转化入大肠埃希菌 BL21/DE3 中表达, rSjCyPB 为包涵体表达, 用 2 M 尿素溶解、复性后经 His 亲和层析纯化。SDS-PAGE 鉴定结果显示, 在相对分子质量 25×10^3 处可见清晰的单一蛋白质条带, 与分析所得蛋白相对分子质量相符, 见图 2。

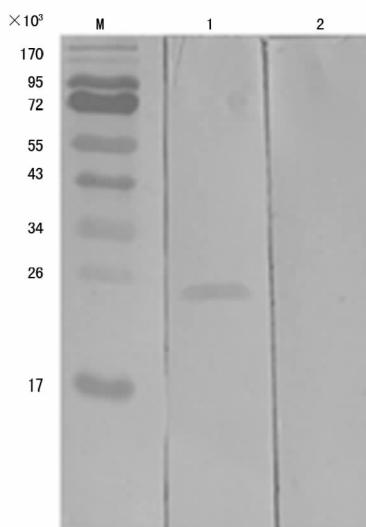


注:M 为蛋白质标准相对分子质量, 1 为空质粒诱导前, 2 为空质粒诱导后, 3 为重组质粒诱导前, 4 为重组质粒诱导后, 5 为上清, 6 为沉淀, 7 为纯化的蛋白。

图 2 重组质粒 pET-28a(+) -SjCyPB 原核表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

2.3 Western Blotting 分析 SjCyPB 重组蛋白抗原性 用感染血吸虫的兔血清和正常兔血清作为一抗, 进行 Western Blotting 分析, 发现纯化的重组蛋白与感染血清可产生明显条带; 正常血清无明显条带反应, 见图 3。

2.4 ELISA 分析 SjCyPB 重组蛋白的免疫原性 通过用重组 SjCyPB 蛋白免疫大鼠获得特异性多克隆抗体,用纯化的重组 SjCyPB 蛋白包被 ELISA 板,进行间接 ELISA,检测到大鼠血清中特异性抗重组 SjCyPB 蛋白特异性抗体滴度为 1:51 200。



注:M 为预染蛋白相对分子质量;1 为正常的小鼠血清;2 为感染血吸虫的小鼠血清。

图 3 pET-28a(+)SjCyPB 重组蛋白抗原性分析

3 讨 论

日本血吸虫侵入宿主,在皮下组织短暂停留后,随血液循环,到达肠系膜动脉穿过毛细血管进入肝门静脉,并在此发育到性器官成熟后产卵。根据这一血吸虫生活史,对血吸虫的预防及治疗研究主要针对虫体迁移及肝脏的病理改变。

CyPB 是亲环素家庭的主要成员之一,是环孢素 A、FK506、雷帕霉素等免疫抑制药物在细胞内的主要结合蛋白^[8]。它主要存在于内质网中,可分泌至细胞外,在细胞间信号传导中发挥作用,是一种分子伴侣^[9]。在伴淋巴结转移的结肠癌组织中 CyPB 表达增高,且高水平的 CyPB 可促进结肠癌淋巴结转移^[10]。在肝纤维化模型中,应用 siRNA 干扰大鼠星状细胞亲环素 B 后,发现亲环素 B 的降低与肝纤维化程度的抑制有关^[6]。最新的研究显示,在 CyPB 敲除小鼠中发现了明显的胶原蛋白异常,并证明 CyPB 可通过影响 I 型胶原末端结构域中赖氨酸羟基化调控胶原交联^[7]。此外,CyPB 还可调节丙型肝炎病毒的复制,在多种肿瘤中高表达^[10-13]。CyPB 促进肿瘤转移及肝纤维化的作用提示 CyPB 在血吸虫的致病过程中可能有类似的作用。因此,课题组选择 SjCyPB 作为血吸虫疫苗的候选分子,成功克隆了 SjCyPB 基因,表达了 SjCyPB 重组蛋白。

重组 SjCyPB 蛋白通过 Western Blotting 来检测自然感染的小鼠血清,都可以检测到 IgG 的抗体,说明 SjCyPB 在虫体自然感染过程中都有一定量的抗原释放,引起宿主一定的免疫反应。重组的 SjCyPB 蛋白免疫大鼠后,获得特异性抗体滴度达 1:51 200 的血清,表明重组蛋白具有较好的免疫原性。

本研究通过 TA 克隆技术,成功克隆了 SjCyPB 基因,并通过原核表达系统,获得了大量纯化的重组 SjCyPB 蛋白。通过

免疫分析表明该蛋白具有免疫原性及抗原性,为后续的疫苗研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 柳建发,廖奇. 血吸虫病疫苗研究的回顾与展望[J]. 宁波大学学报(理工版),2012,25(4):111-114.
- [2] 雷正龙,张利娟,徐志敏,等. 2014 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2015,27(6):563-569.
- [3] Guidi A, Andolina C, Makame Ame S, et al. Praziquantel efficacy and long-term appraisal of schistosomiasis control in Pemba Island[J]. Trop Med Int Health, 2010, 15(5): 614-618.
- [4] Ivery T. Immunophilins: switched on protein binding domains[J]. Med Res Rev, 2000, 20(6):452-484.
- [5] Han HX, Peng JB, Hong Y, et al. Molecular cloning and characterization of a cyclophilin A homologue from Schistosoma japonicum[J]. Parasitol Res, 2012, 111(2): 807-817.
- [6] 王慧,付金栋,刘京营,等. 亲环素 B,D 在肝纤维化模型中的变化及其意义[J]. 中华肝脏病杂志,2012,20(9):705-706.
- [7] Terajima M, Taga YK, Chen YL, et al. Cyclophilin-B modulates collagen cross-linking by differentially affecting lysine hydroxylation in the helical and telopeptidyl domains of tendon type I collagen[J]. J Biol Chem, 2016, 291(18):9501-9512.
- [8] Handschumacher E, Harding W, Rice J, et al. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A[J]. Science, 1984, 226(4674):544-547.
- [9] Price R, Zydowsky D, Jin J, et al. Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(5):1903-1907.
- [10] 乐飞,郑民华,陆爱国,等. 结直肠癌组织 CypB 表达及其对癌细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版),2010,30(3):288-291.
- [11] Fang F, Zheng JM, Galbaugh L, et al. Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells[J]. J Mol Endocrinol, 2010, 44(6):319-329.
- [12] Meng Q, Li L, Xie M. Expression and role of cyclophilin B in stomach cancer[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5346-5354.
- [13] Watashi K, Ishii NT, Hijikata MK, et al. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase[J]. Mol Cell, 2005, 19(1):111-122.

(收稿日期:2016-07-27 修回日期:2016-10-19)