

• 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兔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 amplified 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 SjCyPB-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制虽取得了巨大成绩, 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象改变, 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 novagen 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 novagen 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 °C 预变性 5 min, 热循环参数为 95 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 °C 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 μ g/mL)的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养至 $OD_{600} = 0.5$ 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 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 °C 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。

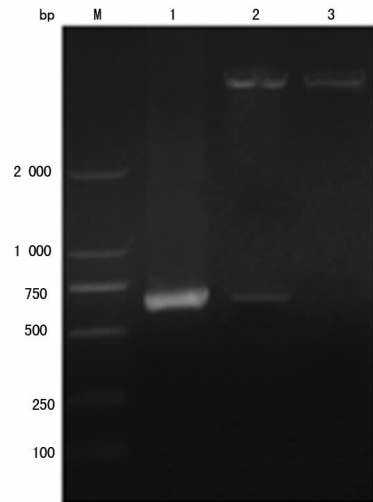
1.2.5 SjCyPB 重组蛋白的纯化 SjCyPB 主要以包涵体形式表达, 存在于沉淀中。将沉淀用 2 M 尿素-PBS 溶液完全溶解后, 采用梯度递减尿素浓度的方法, 对蛋白溶液透析, 直至透析至 PBS 溶液中。将透析后的蛋白溶液根据 His 柱蛋白纯化说明书进行纯化。

1.2.6 Western Blotting 分析 SjCyPB 重组蛋白抗原性 将 10 μ g 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 μ g 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 μ g 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

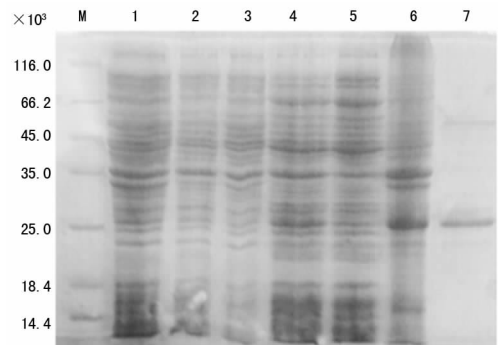
2.1 SjCyPB 基因的扩增和 pET-28a(+)-SjCyPB 重组质粒的鉴定 纯化的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在基因长度为 500~750 bp 可见一特异性条带, 与 SjCyPB 基因片段分子大小(648 bp)一致, 见图 1。pET-28a(+)-SjCyPB 重组质粒用 EcoR I、Xho I 进行双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见两条带, 分别为质粒和 SjCyPB 基因片段, 而空质粒仅可见一质粒条带, 见图 1。将鉴定结果正确的菌株送公司测序, 经测序结果在 BLAST 上进行比较, 与目的基因序列一致。



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 2M 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。

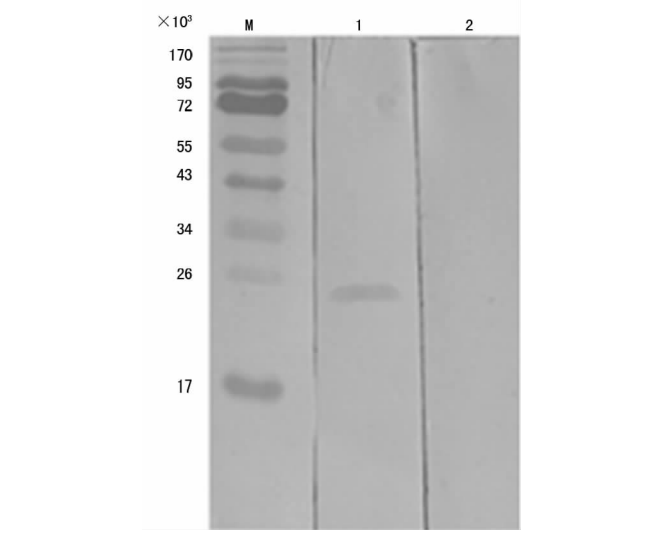


注: M 为蛋白质标准相对分子质量, 1 为空白质粒诱导前, 2 为空白质粒诱导后, 3 为重组质粒诱导前, 4 为重组质粒诱导后, 5 为上清, 6 为沉淀, 7 为纯化的蛋白。

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甲基化调控胶原交联^[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.