

旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的基因 克隆及高效表达

阎玉河 许威光 陈 辉 马增全

(河南省农科院畜牧兽医研究所, 郑州 450002)

朱元晓 蔡仕英

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 作者对编码旋毛虫肌幼虫 ES 抗原的部分结构基因进行了克隆、鉴定和表达。用 RNA PCR 技术直接从旋毛虫肌幼虫总 RNA 中反转录并扩增出 0.7kb 的靶 DNA, 酶切分析后将其克隆到融合表达载体 pEX31C 中。SDS-PAGE 电泳表明, 含重组子的大肠杆菌能够表达出一分子量为 37kDa 的融合蛋白 (P37), 后者占菌体总蛋白的 22% 以上, 并以包含体形式存在于菌体中。经对纯化后表达蛋白的 ELISA 检测, 证明它已被猪旋毛虫病阳性血清和抗旋毛虫单克隆抗体识别。研究结果揭示, 重组蛋白 P37 对于研制旋毛虫病诊断抗原和免疫抗原具有潜在的应用价值。

关键词 旋毛虫, PCR, 基因克隆, 高效表达

旋毛虫病是一种流行十分广泛的人畜共患寄生虫病。在旋毛虫病的免疫学检测抗原中, 来源于体外培养的旋毛虫肌幼虫排泄—分泌抗原 (ES) 以其检测的特异性强、灵敏度高为特点受到普遍关注^[1-5]。研究表明, 经单抗亲和纯化的 ES, 不仅可以完全消灭假阳性反应, 还可以提高原有的检出率^[6-7]。但是, 由于抗原的制备程序繁琐, 生产周期长, 加之各批次制备的质量不均, 给诊断的准确性带来人为的误差, 因而使抗原的使用受到限制。为了解决这一难题, 同时为旋毛虫病的分子免疫学研究奠定基础, 我们试图用 DNA 重组技术来研制具有 ES 功能的新一代重组抗原。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 RRI、537 和质粒 pEX31C 由军事医学科学院基础所提供。质粒 pUC19 购自华美生物工程公司。

1.2 旋毛虫虫株 (TSP) 及 TSP 总 RNA 提取

按文献分离制备^[8]。

1.3 主要仪器及试剂

DNA 化学合成仪 (ABI)、DNA 扩增仪 (国产)。RNA PCR kit (Perkin-Elmer), 工具酶分别购自华美和百泰公司。化学试剂除 SDS、丙烯酰胺和 Tris 为进口试剂外, 其余均为国产分析纯试剂。

1.4 RNA 的反转录及目的基因的 PCR 扩增

通过前期对 ES 抗原的 Western blot 分析,根据编码 46kDa 抗原蛋白的结构基因,用 PCR 引物设计的计算机程序^[9]设计一对引物,并分别在其 5' 端加上合适的酶切位点。引物合成后,按 RNA PCR kit 说明书要求进行总 RNA 的反转录和目的基因的扩增。使用的 PCR 程序是: 94℃ 变性 80 秒→55℃ 退火 70 秒→72℃ 延伸 100 秒,共 40 个循环。

1.5 DNA 的酶切分析、连接和细菌转化

参照《分子克隆手册》^[10]进行。

1.6 含目的 DNA 的表达载体在大肠杆菌中的表达

将筛选和鉴定好的重组子 pESP33 转化大肠杆菌 537,挑取单一克隆接种到含抗生素的 LB 培养液中,28℃ 培养过夜,另加 4 倍体积的 LB,42℃ 诱导培养 2—3 小时。

1.7 SDS—PAGE 电泳

取诱导后的细菌培养液 0.5ml,收菌后加适量电泳上样缓冲液,煮沸 5 分钟,取其 1/5—1/10 量上样进行 SDS—PAGE 电泳。电泳后进行考马斯亮蓝染色和 Western blot 分析。

1.8 表达蛋白的提取纯化

参考 Strebel 等^[11]报道的方法进行。

1.9 ELISA 和 Dot—ELISA 检测

按常规方法进行。

2 结 果

2.1 PCR 产物的酶切鉴定

经 RNA PCR 扩增反应后,琼脂糖电泳显示有一条浓染的约为 0.7kb 的 DNA 带 (TSP DNA),虽然除主带外还可隐约看到 0.9 和 1.1kb 两条 DNA 带 (图版 I-A,第 3 泳道),但量极少。用 Hae III 酶切回收的 TSP DNA,可获得 234bp 和 469bp 两个片段,用 Nco I 酶切可得到 127bp 和 576bp 两段 (未显示),完全符合靶 DNA 的酶切位点。

2.2 重组质粒 pUSP4 和 pESP33 的构建

分别用 EcoRI、BamHI 消化 TSP DNA 和 pUC19,再用 T4 DNA 连接酶将 TSP DNA—EcoRI—BamHI 与 pUC19—EcoRI—BamHI 作定向粘末端连接,构成 pUSP4,转化大肠杆菌 RRI。对重组子作一系列酶切鉴定后,从 pUSP4 中回收制备目的 DNA,将其克隆至表达载体 pEX31C 中,构成 pESP33,转化表达受体菌 537。整个克隆程序见图 1。

2.3 重组质粒的酶切分析

分别用 EcoRI、BamHI 和 NcoI (pUC19 中无此位点)对 pUSP4 作单酶切鉴定,结果均被切开 (图版 I-B)。再分别用 EcoRI、BamHI 双酶切 pUSP4 和 pESP33,都能将插入的 TSP DNA 切出 (图版 I-C)。

2.4 细菌的表达水平及表达蛋白的分子量测定

经温度诱导后的含 pESP33 重组子的大肠杆菌,表达出一分子量为 37kDa 的融合蛋白 P37,与理论推算值相吻合。薄层凝胶光密度扫描显示,表达蛋白占菌体总蛋白的 22%

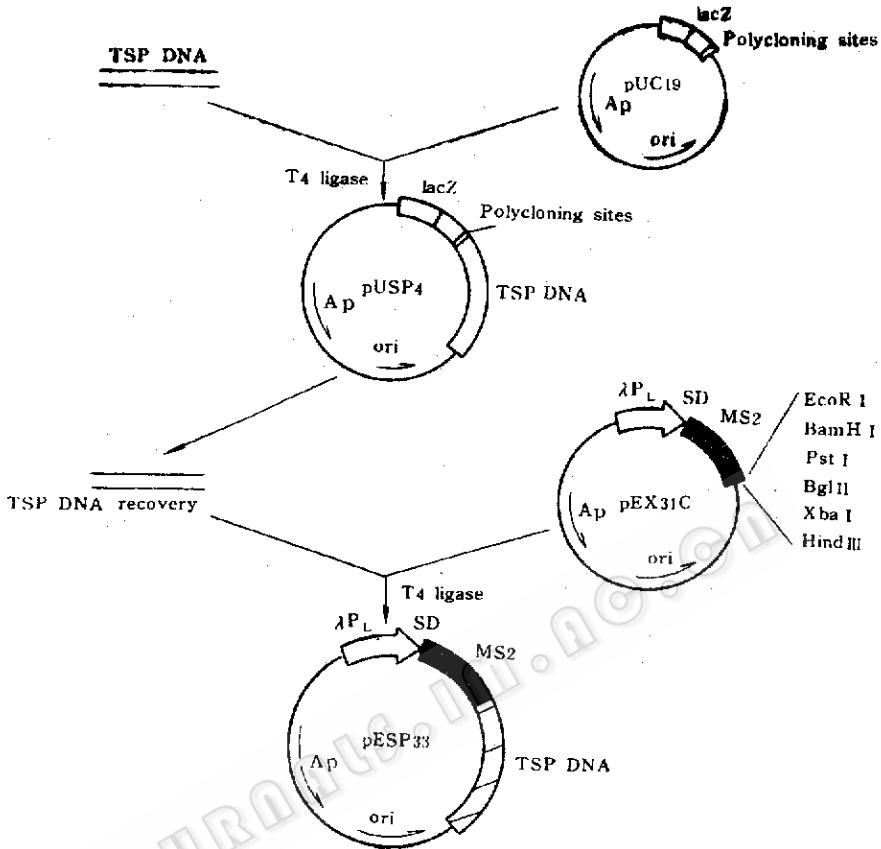


图 1 重组质粒 pESP33 的构建

Fig. 1 The scheme of construction of the recombinant plasmid pESP33

以上 (图版 I-D)。

2.5 表达蛋白的初步纯化

用超声裂解或煮沸裂解经温度诱导后的细菌, 其上清中蛋白浓度很低, SDS-PAGE 电泳也未见有表达带, 说明表达产物呈包含体形式存在于菌体中。参照文献 [11] 介绍的方法 (经适当改进) 提取表达蛋白, 结果可使蛋白纯度达 58% 以上, 如再经 SDS-PAGE 电泳回收, 其纯度可达到 90% 左右 (图版 I-E)。

2.6 表达蛋白的特异性鉴定

通过对全细菌裂解液的 Western blot 分析, 以及对尿素处理并经电泳回收后的蛋白的 ELISA 检测, 结果表达蛋白可同时被猪旋毛虫病阳性血清和抗旋毛虫单克隆抗体 (D4G6) 识别, 而正常猪血清和 Balb/c 鼠血清与表达蛋白呈阴性反应 (图版 I-F, G), 证明表达蛋白具有抗原特异性。

3 讨 论

旋毛虫肌幼虫是寄生在人和家畜横纹肌内的一种线虫。用 DNA 重组技术对旋毛虫抗原蛋白的结构基因进行克隆和表达研究, 难度颇大, 国外在这一领域的研究刚刚起步^[12], 国内尚未见报道。我们在先期对旋毛虫 ES 抗原进行分离和鉴定的基础上, 用 RNA PCR 技术成功地获取了旋毛虫目的基因, 避免了在构建 cDNA 文库时遇到的繁琐操作程序及耗时长的难题。将旋毛虫目的基因与高效融合表达载体 pEX31C 重组, 转化到带有温敏阻遏基因 (cIts857) 的大肠杆菌中, 通过温度诱导, 即可实现 22% 以上的高效表达。这是国内首次报道对旋毛虫 ES 抗原蛋白的基因克隆及高效表达。

通过对表达蛋白的特异性鉴定, 证明它对猪旋毛虫病阳性血清和抗旋毛虫单克隆抗体均具有抗原特异性。由于被检动物血清中存在有多种抗大肠杆菌抗体, 因此在大肠杆菌中表达并用于免疫学检测的抗原蛋白必须保持很高的纯度。要达到这一要求, 在大批量制备重组抗原时还需要对细菌提取液进行进一步纯化, 这也正是我们要探索的下游工艺问题。抗旋毛虫单抗能够识别表达蛋白, 为亲和层析纯化表达产物奠定了基础。另外, 重组蛋白对易感染物是否具有免疫保护作用, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Parkhouse R M E *et al.* MOLBIO, 1983, 9 (4) : 319—327.
- [2] Gamble H R *et al.* Vet Parasitol, 1983, 13 : 349—361.
- [3] Ropic D *et al.* Vet Parasitol, 1986, 21 : 285—289.
- [4] 许威光等. 华北农学报, 1989, 4 : 133—139.
- [5] Su X *et al.* J Parasitol, 1991, 77 (1) : 76—82.
- [6] Gamble H R *et al.* Am J Vet Res, 1984, 45 (1) : 67—74.
- [7] Su X *et al.* J Parasitol, 1990, 76 (6) : 842—848.
- [8] 阎玉河等. 中国兽医杂志, 1993, 19 (10) : 14—15.
- [9] 王槐春等. 生物化学杂志, 1992, 8 (3) : 342—346.
- [10] Sambrook J *et al.* Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Second edition, 1989.
- [11] Strebel K *et al.* J Virol, 1986, 57 (3) : 983—991.
- [12] Zarlenga D S *et al.* MOLBIO, 1990, 42 (2) : 165—174.

Cloning and High Level Expression of Gene Encoding ES Antigen from *Trichinella spiralis* Muscle Larvae

Yan Yuhe Xu Weiguang Chen Hui Ma Zengquan

*(Institute of Animal and Veterinary Sciences, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)*

Zhu Yuanxiao Cai Shiyang

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract The partial structure gene encoding ES antigen derived from *T. spiralis*

(TSP) muscle larvae was cloned, characterized, and expressed in *E. coli*. The target DNA (0.7 kb) was directly obtained by using RNA PCR technique from the TSP total RNA. Analysed it with the RE digestion, the fragment was cloned into the fusion expression vector pEX31C. It was shown that a kind of 37 kDa fusion proteins was expressed in *E. coli* containing the recombinant plasmid by SDS-PAGE electrophoresis. The expressed proteins was over 22% of the total cell protein and it was aggregated in the form of inclusion bodies in *E. coli*. The purified protein could be recognized in ELISA both by sera from swine-infected with TSP and by the monoclonal antibody against TSP. These findings suggest that the recombinant protein is a potentially valuable antigen both for immunodiagnosis and vaccine development of trichinellosis. This is the first demonstration of cloning and high level expression for structure gene encoding ES antigen in our country.

Key words *T. spiralis*, PCR, gene cloning, high level expression

图版说明

Explanation of plate

- A. 0.7 kb TSP DNA amplified with RNA PCR technique
1-3. 0.7 kb TSP DNA, 4. Φ X174 DNA/Hae III
- B. Recombinant plasmid pUSP4 cleaved with the RE
1. pUSP4-BamHI, 2. pUSP4-EcoRI, 3. pUSP4-NcoI
4. λ DNA/Hind III, 5. pUC19-BamHI
- C. Recombinant plasmids pUSP4 and pESP33 digested with EcoRI-BamHI
1. pEX31C-EcoRI-BamHI, 2-3. pESP33-EcoRI-BamHI
4. Φ X174 DNA/Hae III, 5. λ DNA/Hind III
6-7. pUSP4-EcoRI-BamHI, 8. pUC19-EcoRI-BamHI
- D. SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expressed in *E. coli*
1. Total cell lysate of host strain bacteria
2. Total cell lysate of host strain bacteria containing pEX31C
3. Molecular weight markers
4-9. Total cell lysates of different colonies of *E. coli* containing pESP33
- E. The result of purification of the expressed protein
1. Total cell lysate of host strain bacteria
2. Molecular weight markers
3. Total cell lysate of *E. coli* containing pESP33
4. The protein extracted with urea
5. The protein further-purified with SDS-PAGE recovery
- F, G. ELISA detection to purified recombinant antigen (different dilutions) by sera from swine infected with TSP and monoclonal antibody against TSP
Upper rows 1 and 1'. Positive sera and McAb "D4G6"
Below rows 2 and 2'. Normal sera of swine and Balb/c mouse

Yan Yuhe *et al.* Cloning and high level expression of gene encoding ES
antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae

