

# 华支睾吸虫乳酸脱氢酶 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 表位的克隆表达 与生物学特性初步研究

黄 灿, 王乐旬, 胡旭初, 余新炳, 黄 艳, 邓传欢, 徐 劲\*  
(中山大学中山医学院寄生虫教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】原核克隆及表达华支睾吸虫乳酸脱氢酶(CsLDH)两个表位 aa<sub>10-20</sub>(E<sub>10-20</sub>)及 aa<sub>94-102</sub>(E<sub>94-102</sub>),初步研究两表位与 CsLDH 免疫学及酶学相互关系。【方法】将 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 克隆至 pGEX-4T-1 载体,表达纯化重组蛋白,用 Western Blotting 和间接 ELISA 法检测 CsLDH 免疫血清对表位重组蛋白的识别,同时检测两表位重组蛋白的免疫血清对 CsLDH 蛋白的识别;利用 CsLDH 标准酶活性反应体系,比较两表位免疫血清与 CsLDH 免疫血清对 CsLDH 催化丙酮酸还原成乳酸反应的影响。【结果】成功构建 pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> 及 pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> 重组质粒,SDS-PAGE 鉴定表达的重组蛋白,菌体裂解液经亲和层析纯化,获得与 GST 融合表达的蛋白 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub>。两表位重组蛋白均可被 CsLDH 免疫血清识别,而对 E<sub>94-102</sub> 更易于识别;重组 CsLDH 也能被 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 免疫血清识别,而不能被对照血清识别。E<sub>94-102</sub> 免疫血清能抑制 CsLDH 催化丙酮酸还原成乳酸的反应。【结论】表位结构和功能研究深化了对 CsLDH 结构的理解,并为开辟 CsLDH 疫苗研究新路径奠定基础。

**关键词:** 华支睾吸虫; 乳酸脱氢酶; 表位

**中图分类号:** R382.2+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0486-05

## Clone, Expression, and Characterization of Two Epitopes E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> of Lactate Dehydrogenase from *Clonorchis sinensis*

HUANG Can, WANG Le-xun, HU Xu-chu, YU Xin-bing, HUANG Yan, DENG Chuan-huan, XU Jin\*  
(Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To clone and prokaryotically express the two epitopes aa<sub>10-20</sub>(E<sub>10-20</sub>) and aa<sub>94-102</sub>(E<sub>94-102</sub>) of CsLDH from *Clonorchis sinensis*, then to study the relationship between the two epitopes and CsLDH basically.【Methods】E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> were cloned to pGEX-4T-1 vector, then the recombinant protein were expressed and purified. CsLDH immunized sera was used as the first antibody, two epitopes were identified by Western blotting and IgG-ELISA analysis. E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> immunized sera was used as the first antibody, CsLDH was identified by the same methods above. Enzyme activity of recombinant CsLDH was assayed in the standard reaction system by adding different dilution sera.【Results】The recombinant plasmids pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> and pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> were constructed successfully. The expression products and purified ones were identified by SDS-PAGE. Western blotting and ELISA both showed that the CsLDH immunized sera could identify the two epitopes and E<sub>94-102</sub> more easily. Epitopes immunized sera both could identify CsLDH by Western blotting and ELISA analysis. E<sub>94-102</sub> immunized sera could inhibit the CsLDH enzyme activity as the CsLDH immunized sera could do.【Conclusion】Construction and function of the two epitopes helps to understand the construction of CsLDH and supply new methods to the vaccine study of the CsLDH.

**Key words:** *Clonorchis sinensis*; lactate dehydrogenase; epitope

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(4):486-490]

华支睾吸虫病是由华支睾吸虫囊蚴感染宿主所引起的一种人兽共患寄生虫病。本实验室近年

来开展对于华支睾吸虫功能基因组研究,表膜蛋白在疫苗研究中的价值初显<sup>[1-3]</sup>。我们对华支睾乳

收稿日期: 2010-01-07

基金项目: 广东省自然科学基金(815100891000005);广东省医学科研基金(B2008157)

作者简介: 黄灿, 硕士, 研究方向为寄生虫功能基因组; \* 通信作者: 徐劲, 副研究员, 研究方向为寄生虫功能基因组, E-mail: xujin@sysu.edu.cn

酸脱氢酶(lactate dehydrogenase from *Clonorchis sinensis*, CsLDH)的研究中,发现此酶能表达在华支睾吸虫表膜上,且该酶分子为厌氧代谢的关键酶分子,因而其结构与功能特点使其很有可能成为一个有价值的疫苗候选分子<sup>[4-5]</sup>。表位是蛋白质抗原性的基础,深入研究蛋白质的表位对蛋白质的结构和新型疫苗分子的设计具有重要价值<sup>[6-8]</sup>。我们运用 Pcgene 软件分析获得 CsLDH 的 3 个重要的表位:aa<sub>10-18</sub>, aa<sub>12-20</sub> 和 aa<sub>94-102</sub>。aa<sub>10-18</sub> 和 aa<sub>12-20</sub> 为连续的亲水线性表位,遂命名为 E<sub>10-20</sub>;aa<sub>94-102</sub> 则命名为 E<sub>94-102</sub>;理论预测 E<sub>94-102</sub> 位于膜外区,三维空间上构成一个抗原结合环,Arg<sub>102</sub> 为 CsLDH 催化中心中 3 个必须氨基酸之一。我们推测针对该表位的抗体可能对 CsLDH 的结构与功能产生影响<sup>[4]</sup>。作者经人工合成 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 基因序列,将其克隆至 pGEX-4T-1 载体,使短肽表达在 GST 蛋白末端,与原核表达的 CsLDH 进行对比研究,探讨 CsLDH 结构特征及线性表位对于 CsLDH 功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ /DE3、BL21/DE3 由本室保存;原核表达载体 pGEX-4T-1 购自 Pharmacia 公司,由本实验室常规保存。清洁级雄性 SD 大鼠由中山大学实验动物中心提供。

### 1.2 试剂

*Bam*H I、*Xho* I 和 T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自 Promega 公司;质粒提取和凝胶回收试剂盒为北京赛百盛公司产品;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、丙酮酸(pyruvate)、和还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)均为 Sigma 公司产品;PVDF 膜为 Millipore 公司产品;HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG (H + L)、DAB 显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 目的基因获取 根据表位 DNA 序列及克隆载体 pGEX-4T-1 多克隆酶切位点设计目的基因。E<sub>10-20</sub>, P: 5'-gatccCCAGCTGATGCTAGATCTCGC CCGAGGACGAAGTAAc-3'; N: 5'-tcgagTTACTTCC TCCTCGGGCGAGATCTAGCATCAGCTGGg-3'; E<sub>94-102</sub>, P: 5'-gatccGCTCGTCAGAATGAAGGAGAATCCAG

GTAAc-3'; N: 5'-tcgagTTACCTGGATTCTCCTTCAT TCTGACGAGCg-3'; 其中, P: 5'端下划线所示序列为 *Bam*H I 限制性核酸内切酶所识别序列(gatccg)经该酶酶切后序列, P: 3'端下划线所示序列为 *Xho* I 限制性核酸内切酶所识别序列(gtcgag)经该酶酶切后序列; N: 5'及 N: 3'为 P: 3'及 P: 5'序列的互补序列。以上基因序列均由上海英骏生物技术有限公司合成。将合成的各单链稀释成 1 nmol/mL, 相应的正反两链等体积混合, 室温放置 2 h 后, 4 °C 放置 30 min, 自然退火。

1.3.2 pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> 及 pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> 重组的构建及鉴定 将 pGEX-4T-1 质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶酶切回收, 经 T<sub>4</sub>DNA 连接酶与目的基因连接, 转化 DH5 $\alpha$ /DE3 感受态细胞, 氨苄青霉素初筛克隆, 挑克隆提取质粒 DNA, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3.3 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 原核小量表达 将测序阳性质粒转化 BL21/DE3 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选克隆, 挑取单菌 LB 培养基中增菌, 37 °C, 250 r/min ( $r = 12$  cm), 培养 18 h。取 50  $\mu$ L 增菌液接种至 5 mL LB 培养基中, 当吸光度在 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/mL, 37 °C, 250 r/min, 诱导表达 5 h, 15% SDS-PAGE 分析表达蛋白。

1.3.4 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 原核大量表达与纯化 依小量表达条件进行大量表达, 离心收集菌液, 加入裂解缓冲液适量, 超声破菌, 离心取上清液, 0.45  $\mu$ L 滤膜过滤, 将样品加入平衡好的 GST 结合树脂中, 亲和层析法纯化蛋白, 收集洗脱液, 用 4  $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液处理样品, 行 15% SDS-PAGE 分析纯化蛋白。

1.3.5 免疫血清的获取 依文献所述方法<sup>[9]</sup>纯化 CsLDH 蛋白, 用 Bradford<sup>[10]</sup>测定 E<sub>10-20</sub>、E<sub>94-102</sub> 和 CsLDH 蛋白浓度, 免疫 SD 大鼠, 皮下注射, 0.2 mg 第 1 周, 初次免疫; 0.1 mg 第 2 周和第 3 周, 加强免疫, 制备抗血清, 对各抗体进行初步纯化, 间接 ELISA 法测定各自抗体滴度。

1.3.6 CsLDH 抗血清对 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 的识别; E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 抗血清对 CsLDH 的识别 均采用 Western blotting 法和间接 ELISA 测定, 一抗为各抗血清 (Western blotting 和间接 ELISA 浓度为别为: 1:100 和 1:50), 二抗为 HRP 标记的抗大鼠抗体(两方法所用浓度分别为: 1:2 000 和 1:20 000)。

1.3.7 CsLDH、E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 免疫血清对重组

CsLDH催化丙酮酸还原成乳酸酶活性的影响 重组蛋白酶活性测定参照文献方法<sup>[11]</sup>。CsLDH 催化丙酮酸还原为乳酸的标准反应体系为:10 mmol/L 丙酮酸、0.5 mmol/L NADH 和 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)。将免疫血清 CsLDH、E<sub>10-20</sub>、E<sub>94-102</sub>、GST 免疫鼠血清以及阴性大鼠血清与 CsLDH 分别以 4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:8、1:16 比例混合,37 °C水浴中孵育 1 h,冰浴终止反应。分光光度法测定 340 nm 处吸光度的变化,实验至少重复 3 次,统计学软件分析试验结果。

## 2 结 果

### 2.1 重组质粒的鉴定和纯化

挑取阳性菌,提取质粒,送测序,证实重组质粒克隆成功。将重组质粒转染 BL21/DE3 感受态细胞,诱导表达 SDS-PAGE 分析显示在分子质量 25.0 ~ 35.0 ku 处均出现一条明显条带。pGEX-4T-1 本身表达 GST 为 26.0 ku, BamH I 与 Xho I 之间的氨基酸的大小与接入的 E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 的分子质量大小均约为 2.0 ku,而 GST 末端被 E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 片段所替代,而替代的片段分子质量预测为 3.24 ku,所以融合后表达的蛋白比 GST 本身的分子质量略小,纯化蛋白如第 6、10 泳道所示(图 1)。

### 2.2 Western blotting 反应性鉴定

Western blotting 鉴定结果显示,CsLDH 抗血清既能识别 E<sub>10-20</sub> 蛋白,也能识别 E<sub>94-102</sub> 蛋白,而 GST 蛋白不能被识别。第 5 泳道和第 6 泳道显示 CsLDH 免疫血清与 E<sub>94-102</sub> 蛋白反应更为明显(图 2)。表位抗血清对 CsLDH 蛋白的识别结果显示,E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 抗血清均能识别 CsLDH 蛋白,而 E<sub>10-20</sub> 抗血清更易识别该蛋白(图 3)。

### 2.3 ELISA 免疫反应性鉴定

ELISA 结果显示,CsLDH 免疫血清能特异性识别 E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 中的表位序列,且 CsLDH 免疫血清对 E<sub>94-102</sub> 中表位的识别能力要强于对 E<sub>10-20</sub> 中表位的识别。同样,E<sub>10-20</sub> 与 E<sub>94-102</sub> 血清中的表位抗体能识别 CsLDH 蛋白(图 4、5)。

### 2.4 CsLDH、E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 免疫血清对重组 CsLDH 催化丙酮酸还原成乳酸的作用

经初步纯化的 CsLDH 大鼠免疫血清以 PBS 倍比稀释,在稀释度为 1:2 560~1:2 时对 CsLDH 催化的丙酮酸还原成乳酸酶活性的抑制率保持在

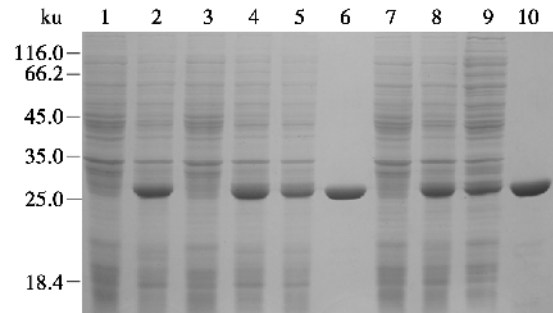


图 1 pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> 和 pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> 在大肠杆菌 BL21/DE3 的表达及纯化产物的 15% SDS-PAGE 电泳分析

Fig.1 Expression and purification of pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> and pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> homologue analyzed by 15% SDS-PAGE

Line 1: pGEX-4T-1 transformants without IPTG induction; Line 2: pGEX-4T-1 transformants with IPTG induction; Line 3: pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> transformants without IPTG induction; Line 4: pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> transformants with IPTG induction; Line 5: supernatants of lysate of pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> with IPTG induction; Line 6: pGEX-4T-1-E<sub>10-20</sub> recombinant proteins purified by the affinity purification method; Line 7: pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> transformants without IPTG induction; Line 8: pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> transformants with IPTG induction; Line 9: supernatants of lysate of pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> with IPTG induction; Line 10: pGEX-4T-1-E<sub>94-102</sub> recombinant proteins purified by the affinity purification method.

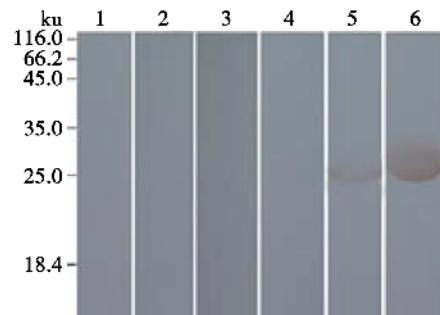


图 2 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 被 CsLDH 免疫血清识别鉴定

Fig.2 E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> recognized by CsLDH immunized sera

Lane 1-3: GST, E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> reacted with the naive rat sera, respectively; Lane 4-6: GST, E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> reacted with CsLDH immunized sera.

80% ~ 60% 范围当内;在增加血清的体积时,其酶的活性直线下降,至 2 倍体积时,酶活性抑制基本达 100%;阴性对照组,对酶活性基本无明显抑制作用(图 6)。

经初步纯化的 E<sub>10-20</sub>、E<sub>94-102</sub> 免疫鼠血清,与

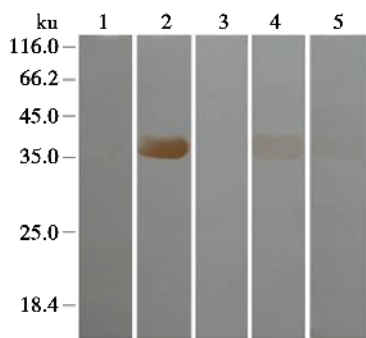


图 3 CsLDH 被 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 免疫血清识别鉴定

Fig.3 CsLDH recognized by E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> immunized sera

Lane 1: CsLDH reacted with the naive rat sera; Lane 2: CsLDH reacted with the CsLDH immunity sera; Lane 3: CsLDH reacted with the GST immunity sera; Lane 4: CsLDH reacted with the E<sub>10-20</sub> immunity sera; Lane 5: CsLDH reacted with E<sub>94-102</sub> immunity sera.

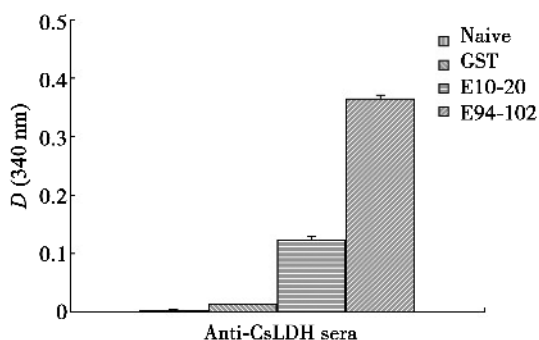


图 4 ELISA 检测 CsLDH 抗血清对 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 的免疫反应性

Fig.4 E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> reacted with rat anti-CsLDH sera by ELISA

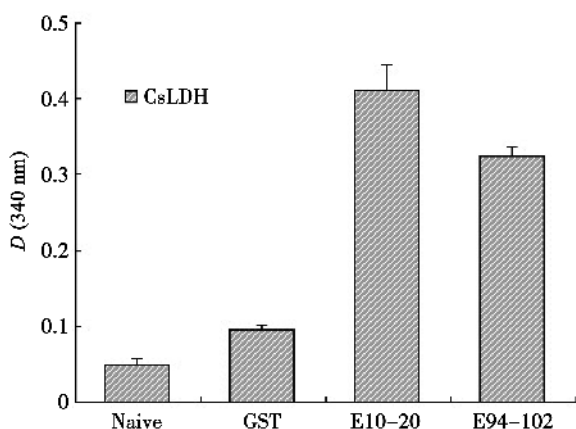


图 5 ELISA 检测 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 抗血清对 CsLDH 的免疫反应性

Fig.5 CsLDH reacted with rat anti- E<sub>10-20</sub> and E<sub>94-102</sub> sera by ELISA

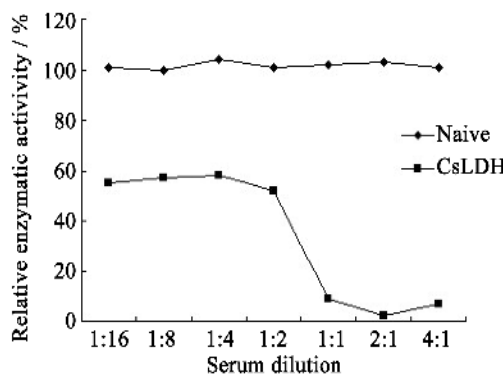


图 6 CsLDH 免疫鼠血清对 CsLDH 催化丙酮酸还原反应的影响

Fig.6 Effect of rat anti-CsLDH sera on pyruvate reduction by recombinant CsLDH

CsLDH大鼠免疫血清作相同比例稀释,结果显示 E<sub>94-102</sub> 免疫鼠血清在 1:16 ~ 4:1 之间酶活性成梯度下降,在 4 倍体积于 CsLDH 时,酶活性抑制达到 80%,再增加血清量,抑制率不再增加,E<sub>10-20</sub> 免疫鼠血清则对 CsLDH 酶活性没有明显的抑制作用(图 7)。

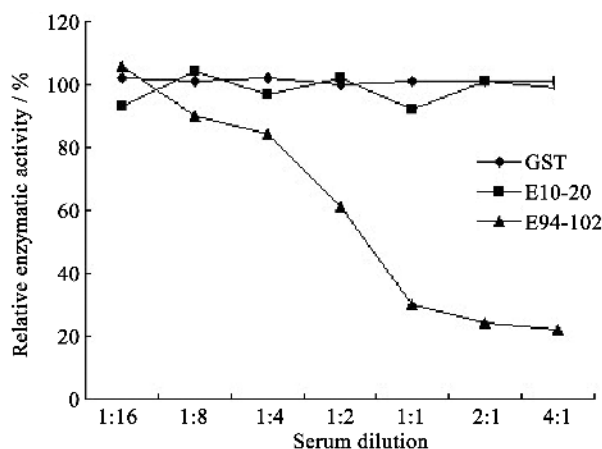


图 7 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 免疫鼠血清对 CsLDH 催化丙酮酸还原反应的影响

Fig.7 Effect of rat anti- E<sub>10-20</sub> and anti- E<sub>94-102</sub> sera on pyruvate reduction by recombinant CsLDH

### 3 讨论

E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 两个表位氨基酸序列长分别为 11 aa 和 9 aa,在三维空间中均表现为 CsLDH 分子表面的线性结构<sup>[4]</sup>。pGEX-4T-1 载体表达的 GST

其末端为游离线性末端。本实验研究将 E<sub>10-20</sub> 和 E<sub>94-102</sub> 克隆入 pGEX-4T-1 载体,在目的基因序列后加入 TAA 终止密码子,连接在 GST 下游末端,实现各表位与 GST 的融合表达。

CsLDH 抗血清对 E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 的识别, E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 抗血清对 CsLDH 的识别, Western blotting 和 ELISA 实验结果的一致性表明此两种表位均为 CsLDH 线性结构。纯化的 CsLDH 抗血清当中存在针对这两个表位的特异性抗体成分,而针对 E<sub>10-20</sub> 表位所产生的特异性抗体对 CsLDH 有更强识别能力。E<sub>10-20</sub> 及 E<sub>94-102</sub> 免疫大鼠血清中所产生的针对 E<sub>10-20</sub> 的特异性抗体和 E<sub>94-102</sub> 特异性抗体均能识别 CsLDH,且 E<sub>10-20</sub> 的特异性抗体更易于识别 CsLDH。分析其原因主要是 E<sub>10-20</sub> 中实际是含有两个强亲水性表位,两个线性表位与 CsLDH 本体反应比单一线性表位与本体反应要强。CsLDH 的免疫血清中的特异性抗体通过与 CsLDH 表面的线性表位结合,影响 CsLDH 的催化功能。以来自于 CsLDH 的特异性表位 E<sub>94-102</sub> 的免疫血清进一步证实了上述结果的推测。Arg<sub>102</sub> 是酶活性中心的关键氨基酸,特异性抗体与酶活性中心的位点结合,Arg<sub>102</sub> 不能正常行使在酶促反应中的功能,从而影响了整个酶的活性,在宏观上表现为酶促反应受到明显的抑制作用。CsLDH 的表位抗体能识别天然的 CsLDH,血清活性抑制实验结果均提示我们对于 94 ~ 102 aa 序列的研究有利于疫苗和新药的设计和研发。

#### 参考文献:

- [1] Zhou Z, Huang Y, Hu H, et al. Molecular cloning and identification of a novel *Clonorchis sinensis* gene encoding a tegumental protein [J]. Parasitol Res, 2007, 101(3): 737-742.
- [2] Zhou Z, Xia H, Hu X, et al. Immunogenicity of recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein [J]. Parasitol Res, 2008, 102(2): 293-297.
- [3] Zhou Z, Xia H, Huang Y, et al. Oral administration of a *Bacillus subtilis* spore-based vaccine expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein 22.3 kDa confers protection against *Clonorchis sinensis* [J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1817-1825.
- [4] 胡旭初,徐劲,吕刚,等. 华支睾吸虫乳酸脱氢酶(CsLDH)基因的识别及其结构与功能分析 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(12): 1145-1148.
- [5] 黄灿,胡旭初,余新炳,等. 华支睾吸虫乳酸脱氢酶(CsLDH)亚细胞及虫体组织定位 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2008, 24(10): 941-944.
- [6] 杨凡,刘朝奇,柳发勇,等. HIV-1 gp160 多表位嵌合基因的构建及表达蛋白的免疫原性分析 [J]. 实用医学进修杂志, 2008, 36(1): 98-102.
- [7] An LL, Sette A. The multivalent minigene approach to vaccine development [J]. Expert Opin Investig Drugs, 1999, 8(9): 1351-1357.
- [8] 王艳华,张德林,殷宏,等. 抗原表位预测方法的研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2009, 39(10): 938-940.
- [9] Yang G, Jing CX, Zhu PX, et al. Molecular cloning and characterization of a novel lactate dehydrogenase gene from *Clonorchis sinensis* [J]. Parasitol Res, 2006, 99(1): 55-64.
- [10] Bradford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [11] Caroline D, Eric RS, Lucy AH, et al. The kinetic properties and sensitivities to inhibitors of lactate dehydrogenases (LDH1 and LDH2) from *Toxoplasma gondii*: comparisons with pLDH from *Plasmodium falciparum* [J]. Mol and Bio Parasitol, 2001, 118(1): 23-32.

(编辑 徐杰)