

亚洲牛带绦虫钙调神经磷酸酶 B 基因的原核表达 和免疫学分析

黄江¹, 吴璇¹, 胡旭初², 徐劲², 余新炳², 包怀恩¹, 郎书源¹, 廖兴江¹

(1. 贵阳医学院寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】对亚洲牛带绦虫钙调神经磷酸酶 B 基因(CaN)进行克隆、表达和免疫学初步研究。【方法】将亚洲牛带绦虫成虫钙调神经磷酸酶 B 基因克隆到原核表达质粒 pET-30a(+)中,在大肠杆菌 BL-21/DE3 中用诱导表达,表达产物通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定,用镍离子金属螯合剂亲和层析柱进行纯化,纯化的重组蛋白用蛋白印迹进行免疫学分析。【结果】PCR、双酶切及 DNA 测序结果均表明重组质粒 pET-30a(+)-Ta CaN 构建成功。SDS-PAGE 结果表明目的基因能在大肠杆菌 BL-21/DE3 中表达,经亲和层析得到了纯化重组蛋白。重组蛋白能被感染了亚洲牛带绦虫的猪和患者的血清识别。【结论】亚洲牛带绦虫成虫钙调神经磷酸酶 B 基因可在原核表达系统中获得具有免疫学活性的表达。为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

关键词: 亚洲牛带绦虫; 钙调神经磷酸酶 B 基因; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: R383.3² 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)04-0398-04

Prokaryotic Expression and Immunoreactivity Analysis of Recombinant Protein of Calcineurin B Gene from *Taenia Saginata Asiatica*

HUANG Jiang¹, WU Xuan¹, HU Xu-chu², Xu Jin², YU Xin-bing²,
BAO Huai-en¹, LANG Shu-yuan¹, LIAO Xing-jiang¹

(1. Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Department of Parasitology, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To express an novel gene named Calcineurin B (CaN) of *Taenia saginata asiatica* in order to analyze the immunoreactivity of the recombinant protein. 【Methods】 The coding sequence of Calcineurin B was amplified with PCR from cDNA plasmid library of *Taenia saginata asiatica* adult. The sequence was cloned into the prokaryotic expression vector of pET-30a(+). The recombinant expression plasmid was identified by using PCR, digestion with endonuclease enzyme and DNA sequencing. The recombinant protein was detected by SDS-PAGE after being induced with IPTG in *E.coli*. BL21/DE and purified by Ni-IDA affinity chromatography. Its immunoreactivity was determined by Western Blotting. 【Results】 The recombinant plasmid was constructed and the recombinant protein was expressed and purified with Ni-IDA affinity chromatography successfully. The recombinant protein could be recognized by serum collected form infected swine or people with Western blotting. 【Conclusion】 A novel gene coding Calcineurin B of *Taenia saginata asiatica* was cloned, expressed, purified successfully. The recombinant Calcineurin B was of immunoreactivity. This work is cornerstone for further research on the function of Calcineurin B.

Key words: *Taenia saginata asiatica*; Calcineurin B; molecular cloning; prokaryotic expression

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(4): 398-401]

收稿日期: 2008-03-31

基金项目: 国家自然科学基金(30760227); 贵州省科技攻关项目[黔科合 NY 字(2006)3037]

作者简介: 黄江(1968-), 女, 贵州贵阳人, 副教授, 硕士生导师, E-mail: mmm_hj@126.com

Ca²⁺是真核生物体内极其重要的第二信使,主要分布于细胞内膜、内质网和线粒体中。通过信号传导通路,与寄生虫入侵宿主、细胞生长、钙通道调节及蛋白磷酸化等生物进程密切相关^[1]。钙调神经磷酸酶(calcineurin B, CaN)是目前所知唯一的一种活性受Ca²⁺/钙调素调节的Ser/Thr蛋白磷酸酶,在细胞信号传递中直接受Ca²⁺的调节,起脱磷酸化作用^[2]。本研究从亚洲牛带绦虫(*taenia saginata asiatica*)成虫cDNA质粒文库中筛选出一个CaN的同源基因。为进一步研究其功能,我们构建了pET-30a(+)-Ta CaN原核表达载体,并对其原核表达产物进行初步的免疫学研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 感染亚洲牛带绦虫猪血清由贵阳医学院寄生虫学教研室提供。患者血清采自亚洲牛带绦虫流行区。

1.1.2 文库、质粒和菌株 虫体标本采自亚洲牛带绦虫流行区贵州省都匀市米秀乡,亚洲牛带绦虫成虫全长cDNA质粒文库的构建和EST测序及Unigene分析与上海联合基因有限公司合作完成。原核表达质粒pET-30a(+)和大肠杆菌BL-21/DE3由中山医学院病原生物学实验室保存。

1.1.3 主要试剂和工具酶 Ex Taq酶(含dNTP), *Bam*H I, *Xho* I, T4 DNA连接酶, DNA标准(DL 2 000)均购自大连宝生物工程公司;异丙硫代-β-D半乳糖苷(IPTG),购自美国Promega公司;Ni-IDA Agarose(cat No:69670)购自美国Novagen公司;蛋白分子量标准购自立陶宛MBI公司;DNA凝胶回收试剂盒,质粒纯化试剂盒购自北京赛百盛基因公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪IgG二抗、兔抗人IgG二抗和DAB(3,3二氨基联苯胺)显色试剂盒均购自武汉博士德有限公司;PVDF膜购自Millipore公司;TMB显色试剂盒购自美国BD公司;SDS,丙烯酰胺,亚甲叉双丙烯酰胺,过硫酸胺等试剂均购自上海申友生物科技公司。

1.1.4 引物合成和DNA测序 基因扩增引物和重组质粒DNA测序由Introvigen上海生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Calcineurin B基因的识别 将获得的亚洲牛带绦虫unigene进行Blastx分析^[3],获得编码亚洲牛带绦虫成虫Calcineurin B基因的文库质粒编号为TaHC11-B4,登录号为ABN14963.1;并通过瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统(Expasy, <http://ca.expasy.org/>)预测其理化特性。

1.2.2 Calcineurin B基因的扩增 根据已获得的Calcineurin B编码序列,利用DNAClub和PCR design设计引物。上游引物:ATAGGATCCATGGTAATGAGGC GTCCCTTCC带*Bam*H I酶切位点;下游引物:GGGCTCGAGTTAAACATCGACTACCATC带*Xho* I酶切位点。以亚洲牛带绦虫成虫文库编号为TaHC11-B4的质粒为模版,94℃预变性5 min后,热循环参数为94℃ 1min,57℃ 1 min,72℃ 1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。PCR产物10 g/L琼脂糖凝胶电泳回收。

1.2.3 重组原核表达质粒pET-30a(+)-Ta Ca的构建及鉴定 将PCR产物和原核表达质粒pET-30a(+)经*Bam*H I, *Xho* I双酶切后回收,连接,转化大肠杆菌BL-21/DE3感受态细胞,卡那霉素筛选阳性克隆。对阳性克隆提取质粒进行PCR,双酶切和测序鉴定。

1.2.4 Calcineurin B基因在大肠杆菌BL-21/DE3中的诱导表达 取50 μL培养过夜的阳性克隆菌液,加入含有卡那霉素的5 mL LB培养基中(菌液/培养基为1/100),37℃,250 r/min振摇至OD₆₀₀=0.4~0.6时,加入IPTG至终浓度1 mmol/L诱导表达5 h。离心收集菌体,在沉淀中加入100 μL 1×SDS-PAGE上样缓冲液,煮沸5~10 min,8 000×g离心取上清10 μL进行SDS-PAGE电泳分析。

1.2.5 Calcineurin B基因在大肠杆菌BL-21/DE3中的大量诱导表达和纯化 按照上述方法对阳性克隆进行大量诱导表达,离心收集菌体,按每克菌体加入4 mL 1×结合缓冲液重悬菌体,冰上放置30 min后冰上超声裂解(功率150 W,持续1 s,停2 s,共15 min),4℃ 8 000×g,离心20 min收集上清,用0.45 μm滤膜过滤,参照Ni-IDA Agarose说明书,进行蛋白纯化,收集蛋白洗脱液,取30 μL加入10 μL 4×SDS-PAGE上样缓冲液处理样品,12% SDS-PAGE电泳,考马斯亮兰R250染色。将洗脱的目的蛋白在0.15 mol/L的PBS(pH

7.4)透析液中 4 °C 透析 24 h(其间换透析液 2 ~ 3 次)。

1.2.6 Western Blotting 检测重组蛋白的免疫反应性 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE(12%)电泳,使用电转移仪于 100V 冰浴转印 1.5 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上,50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜。PVDF 膜分别转入感染亚洲带绦虫的猪血清和人血清(1:100 稀释),室温孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,然后于辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪 IgG 和兔抗人 IgG(1:2 000 稀释),室温孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。DAB 显色至出现目的条带,超纯水终止反应。

2 结果

2.1 Calcineurin B 基因的识别

生物信息学分析该基因是钙调神经磷酸酶 B 的同源基因,是较保守的基因,与 GenBank 中日本血吸虫的同源基因 AAO59418.1 的氨基酸序列的一致性达 90%,相似性达 95%。基因全长 747 bp,编码区为 56 ~ 563 bp,编码 169 个氨基酸。理论分子量和等电点分别是 1889 0.5 U 和 4.56^[3]。

2.2 原核重组质粒的鉴定

将重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,双酶切在 500 bp 左右有一清晰的条带,与目的基因的大小基本相符,见图 1。对重组质粒插入序列进行测序,序列与目的基因一致,证明重组质粒构建成功。

2.3 蛋白表达纯化结果

将构建好的重组质粒转化到 *E.coli* BL-21/DE3 中表达,SDS-PAGE 电泳分析,大约在 25 ku 左右处出现表达条带,与目的蛋白分子量基本相符。将蛋白进行纯化后得到纯化蛋白的位置与目的蛋白相符,证明目的蛋白纯化成功(图 2)。测得纯化产物的蛋白浓度为 0.8 mg/mL。

2.4 Western Blotting 鉴定

Western Blotting 显示,感染亚洲牛带绦虫的猪血清和患者血清均能识别重组 Ta CaN,在相应位置出现清晰的条带(图 3)。

3 讨论

在前期工作的基础上^[4,5],课题组于 2006 年首

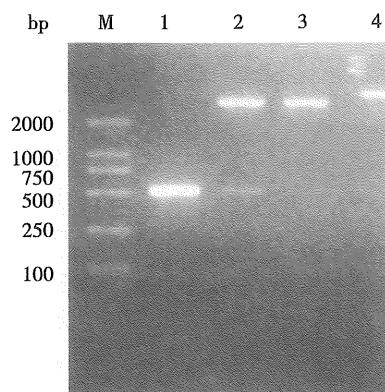


图 1 重组质粒的 PCR 及双酶切鉴定图

Fig. 1 The identification of the pET-30a(+)-Ta CaN by PCR amplification and digestion with restriction enzymes

M:DNA Marker DL2000;1:the PCR product amplified from cDNA library of *Taenia saginata asiatica* 2:the recombinants pET-30a(+)-Ta CaN digested with BamH I and Xho I 3:the recombinants pET-30a(+)-Ta CaN digested by BamH I 4:the recombinants pET-30a(+)-Ta CaN

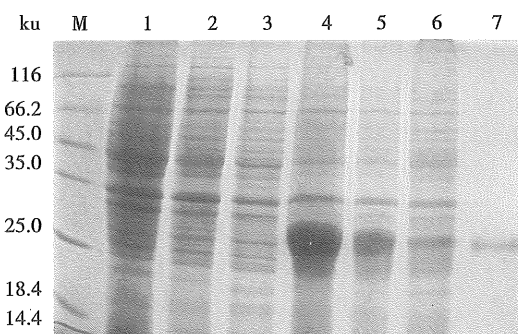


图 2 重组质粒 pET-30a(+)-Ta CaN 在大肠杆菌 BL-21/DE3 的表达产物及其纯化蛋白的 12% SDS-PAGE 电泳分析图

Fig.2 The analysis of prokaryotic expression products and purified protein by 12% SDS-PAGE

M:Protein Marker; 1:pET-30a(+) transformants without IPTG induction; 2:pET-30a(+) transformants with IPTG induction; 3:pET-30a(+)-Ta CaN transformants without IPTG induction; 4:pET-30a(+)-Ta CaN transformants with IPTG induction; 5: precipitation of lysate of BL21/DE cells containing pET-30a(+)-Ta CaN transformants; 6: the supernatant of lysate of BL21/DE cells containing pET-30a(+)-Ta CaN transformants; 7:pET-30a(+)-Ta CaN recombinant protein purified by affinity chromatography.

次建立了亚洲牛带绦虫成虫全长 cDNA 质粒文库,通过对随机挑取的阳性重组克隆进行测序和 Unigene 归并,从 1 211 个阳性克隆中获得了无冗余的 632 个 unigene,并登录到了 GenBank 中(登录号为 EF201848-EF201979 和 EF420261-EF420762),

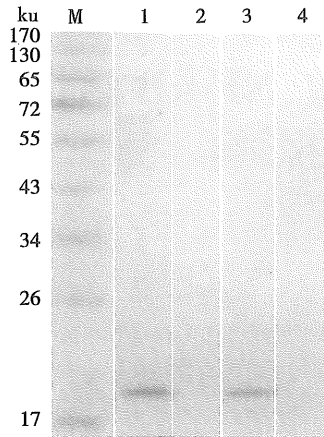


图3 重组质粒 pET-30a(+)-Ta CaN 表达产物 western blotting图

Fig.3 Western blotting analysis of the recombinant pET-30a(+)-Ta CaN

M:Protein Marker; 1:the purified product of pET-30a (+)-Ta CaN incubated with serum collected from Ta infected swine;2:the purified product of pET-30a(+)-Ta CaN incubated with serum collected from normal swine; 3:the purified product of pET-30a (+)-Ta CaN incubated with serum collected from the patient of Taenia saginata asiatica; 4:the purified product of pET-30a (+)-Ta CaN incubated with serum collected from healthy person

我们的研究发现,该策略对获取带绦虫基因资源具有很高的效率,是研究基因表达谱的非常有力的工具^[6]。

钙调神经磷酸酶是蛋白磷酸酶家族中的一个成员,是细胞信号传递中的效应酶和调节酶,尤其在 Ca^{2+} 信号传递系统中起着举足轻重的作用。同时 CaN 又是典型的 Ca^{2+}/CaM 结合酶、调节酶。CaN 参与了多种重要的细胞过程,包括它和学习记忆及老年性痴呆的关系,以及它在 T 细胞活化过程中的关键作用和细胞死亡中的重要作用^[7,8]。在对血吸虫的研究中发现钙激活中性蛋白酶作为保护性辅助 T 细胞的靶蛋白具有很强的免疫反应性,其大亚基 Sm-p80 可免疫小鼠诱导宿主产生 29%~30% 的减虫率^[9]。我们从亚洲牛带绦虫 cDNA 质粒文库中通过 BLAST X 识别出一个钙调神经磷酸酶 B 基因,并进行克隆和表达,应用于纯化的原核表达载体 pET-30a(+) 对 Ta.CaN 进行亚克隆,转化入大肠杆菌菌 BL21/DE3, IPTG 诱导表达。PCR、双酶切及 DNA 测序结果均表明重组质粒 pET-30a(+)-Ta CaN 构建成功。将融合表达产物纯

化, SDS-PAGE 显示重组蛋白条带与预期的大小基本一致,表明重组蛋白得到了表达。纯化蛋白能被感染亚洲牛带绦虫的猪和患者血清识别,证实了重组蛋白在纯化后具有免疫反应性,可以推测 Ta.CaN 是亚洲带绦虫病的一个潜在诊断抗原。本工作为进一步展开 Ta.CaN 的功能和 Ta.CaN 作为人体带绦虫病疫苗候选分子、免疫诊断抗原分子的价值研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 吕志跃,杨琳琳,胡旭初,等.日本血吸虫 SjCa8 基因的原核表达及其免疫学特征分析[J].中国地方病学杂志,2006,25(5):478-481.
- [2] Vichasri-Grams S, Subpipattana P, Sobhon P, et al. An analysis of the calcium-binding protein 1 of Fasciola gigantica with a comparison to its homologs in the phylum Platyhelminthes [J]. Mol Biochem Parasitol, 2006 146(1):10-23.
- [3] 黄江,胡旭初,包怀恩,等.亚洲带绦虫成虫钙调神经磷酸酶 B 基因的克隆和生物信息学分析 [J].中国病原生物学杂志,2008,3(1):56-59.
- [4] 张朝云,包怀恩,杨明,等.云贵两省三地带绦虫的分子鉴定-核糖体 DNA 第一内转录间隔区 (ITS1) 限制性酶切片断长度多态性 (RFLP) 分析[J].中国寄生虫病防治杂志,2005,18(5):330-332.
- [5] 张科,杨明,包怀恩,等.我国四省区五地牛带绦虫 rDNA-ITS2 序列分析 [J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(10):918-921.
- [6] 黄江,胡旭初,包怀恩,等.亚洲带绦虫成虫全长 cDNA 质粒文库的构建及 EST 测序[J].热带医学杂志 2007,7(2):116-118.
- [7] Klee CB, Cohen P. The calmodulin-regulated protein phosphatase molecular aspects of cellular regulated [M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co, 1988: 225.
- [8] Siddiqui AA, Podesta RB, Clarke MW. Schistosoma mansoni: characterization and identification of calcium-binding proteins associated with the apical plasma membrane and envelope [J]. Exp Parasitol, 1991, 72(1):63-68.
- [9] Jankovic D, Aslund L, Oswald IP, et al. Calpain is the target antigen of a Th1 clone that transfers protective immunity against Schistosoma mansoni [J]. J Immunol, 1996, 157(2):806-814.

(编辑 孙慧兰)