

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000281

猪带绦虫 TSO45W-4B 基因在长双歧杆菌中的表达

周必英, 刘美辰, 杨凤娇

(贵州省遵义医学院寄生虫学教研室, 遵义 563003)

【摘要】目的:在成功构建猪带绦虫大肠杆菌-双歧杆菌穿梭表达质粒 pGEX-TSO45W-4B 的基础上,研究猪带绦虫 TSO45W-4B 基因在长双歧杆菌中的表达情况。**方法:**将猪带绦虫大肠杆菌-双歧杆菌穿梭表达质粒 pGEX-TSO45W-4B 电转化入长双歧杆菌,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-d-thiogalactoside, IPTG)诱导表达,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和 Western blot 分析表达情况。**结果:**酶切、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和测序证实,重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 成功转入长双歧杆菌。SDS-PAGE 显示,重组蛋白相对分子质量(Mr)约为 40 kD,经谷胱甘肽转移酶(glutathione S-transferase, GST)亲和层析后可获得纯度为 85% 以上的重组蛋白。Western blot 显示,重组蛋白能被兔抗 TSO45W-4B 血清、囊虫病猪血清和囊虫病患者血清所识别。**结论:**猪带绦虫 TSO45W-4B 基因能够在长双歧杆菌中获得表达,表达的重组蛋白具有特异的抗原性。

【关键词】猪带绦虫; TSO45W-4B; 长双歧杆菌; 表达**【中图分类号】**R383.33**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-28

Expression of *Taenia solium* TSO45W-4B gene in *bifidobacterium longum*

Zhou Biying, Liu Meichen, Yang Fengjiao

(Teaching Research Section of Parasitology, Zunyi Medical College)

【Abstract】Objective: To observe the expression of the gene of TSO45W-4B of *Taenia solium* in *bifidobacterium longum* (*B. longum*) on the basis of successful construction of the *escherichia coli* (*E. coli*)-*bifidobacterium* shuttle plasmid pGEX-TSO45W-4B of *Taenia solium*. **Methods:** The shuttle expression plasmid pGEX-TSO45W-4B of *Taenia solium* was electroporated into *B. longum*. After induction with isopropyl-β-d-thiogalactoside, the expression of the recombinant protein was identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot. **Results:** Restriction analysis, polymerase chain reaction and sequencing showed that the recombinant plasmid pGEX-TSO45W-4B was successfully transformed into *B. longum*. As demonstrated by SDS-PAGE, the relative molecular mass (Mr) of the expressed recombinant protein was approximately 40 kD, and the purity of the recombinant protein was 85% after purification with glutathione S-transferase affinity chromatography. The rabbit antiserum of TSO45W-4B, cysticercosis swine serum and cysticercosis patients serum could bind to the recombinant protein in Western blot assay. **Conclusion:** The gene of TSO45W-4B of *Taenia solium* could be expressed in *B. longum* and the expressed recombinant protein shows specific antigenicity.

【Key words】*Taenia solium*; TSO45W-4B; *bifidobacterium longum*; expression

猪囊尾蚴病是由猪带绦虫的幼虫囊尾蚴寄生于人或猪等而引起的人畜共患寄生虫病,已成为全球性的公共卫生问题,在我国的感染率为 0.14%~

3.20%。药物及手术治疗都有其局限性,研制疫苗成为防治该病的重要手段^[1-3]。研究表明,猪带绦虫六钩蚴 TSO45W-4B 基因具有良好的免疫原性和免疫保护性,是一种理想的疫苗候选抗原^[4-5]。双歧杆菌是人和哺乳动物的肠道益生菌,也是一种基因工程受体菌。本研究拟在成功构建猪带绦虫大肠杆菌-双歧杆菌穿梭表达质粒 pGEX-TSO45W-4B 的基础上^[6],研究猪带绦虫 TSO45W-4B 基因在长双歧杆菌中的表达情况,为猪囊尾蚴病的疫苗研制提供基础。

作者简介:周必英, Email: zbyz01@126.com,

研究方向: 寄生虫感染与免疫。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81160206);贵州省教育厅资助项目(编号:2010040)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1111.016.html>
(2014-05-22)

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种、主要试剂和仪器

长双歧杆菌(*bifidobacterium longum*, *B.longum*)购自美国菌种典藏中心。质粒小量抽提试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自美国 Axygen 公司;T4DNA 连接酶、DNA Marker、*Bam*H I 和 *Eco*R I 购自日本 Takara 公司;MRS 培养基购自美国 Difco 公司;质粒 pGEX-TSO45W-4B 和兔抗血清由本课题组制备保存^[6],囊虫病猪血清采集自建的囊虫病猪感染模型,囊虫病患者血清由四川省疾病预防控制中心提供;其余试剂均为国产分析纯。核酸电泳装置购自北京六一仪器厂;聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)仪购自美国 MJ-Research 公司;厌氧发生器购自法国梅里埃公司。

1.2 重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 电转化 *B.longum*

将 *B.longum* 冻干粉用无菌水充分溶解后,涂布于 MRS 琼脂平板上,37 °C 厌氧培养 24~72 h,使其充分活化;挑取活化的单菌落,接种于 4 ml MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养至菌体 $A_{600\text{nm}}$ 值为 0.5 左右;按 1:25 比例接种于 MRS 培养基中,37 °C 厌氧培养 24~72 h;冰浴 30 min,4 °C 10 000 r/min 离心 1 min,弃上清,沉淀用预冷的 0.5 mol/L 蔗糖清洗 2 次,再用 100 μ l 0.5 mol/L 蔗糖缓冲液重悬。取 100 μ l 与重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 1 μ g 混匀,冰浴 10~15 min 后转移至至 1 mm 的电击杯中,电击参数设置为:电压 1.25 kV、场强 12.5 kV/cm、电容 25 μ F、电阻 200 Ω 、转化时间 5 ms;电击完毕后立即将混合液转入到 900 μ l MRS 液体培养基的 EP 管中,37 °C 厌氧培养 2 h;将菌液涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 MRS 琼脂平板上,37 °C 厌氧培养 24~72 h。挑取上述平板中单个菌落至 1 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 MRS 培养基的 EP 管中,37 °C 厌氧培养 24~72 h;将菌液 4 °C 10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀中加入 250 μ l 25%蔗糖溶液重溶菌体沉淀,37 °C 温浴 30 min,期间每隔 5 min 振荡 1 次,使其充分反应;抽提质粒,进行酶切、PCR 和测序鉴定。筛选阳性的转化菌株作为表达菌株进行诱导表达实验。

1.3 TSO45W-4B 基因在长双歧杆菌中的表达

选取电转化阳性的转化菌,接种于 MRS 液体培养基,37 °C 厌氧培养至 A 值为 0.6 左右,取未诱导的菌液作对照,余下分别加入终浓度为 0.1、0.5、1.0 mmol/L(isopropyl- β -d-thiogalactoside, IPTG)37 °C 诱导表达 48 h。分别将未诱导与诱导菌液离心收集菌体,重悬于预冷 PBS 缓冲液中。在冰浴中超声裂解 20 min,4 °C 6 000 r/min 离心 15 min,留取诱导上清及诱导沉淀,用 12%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定表达情况。

1.4 表达上清的纯化和表达沉淀的复性

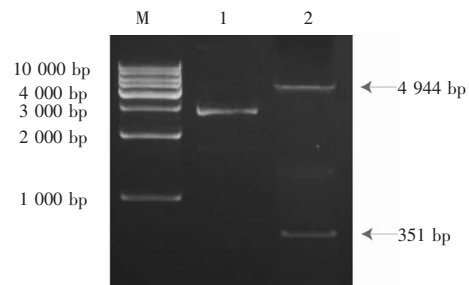
取超声破碎的上清液,按照 GST 亲和层析柱说明书进行蛋白纯化,收集表达产物包涵体,经过 8 mol/L 尿素变复性重

溶,梯度洗脱,12% SDS-PAGE 分析纯化结果。在核酸蛋白分析仪上,按照紫外分光光度法,采用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)蛋白浓度标准品绘制标准曲线,根据标准曲线计算出蛋白浓度。将诱导表达的重组蛋白转移至硝酸纤维素膜上,分别使用兔抗血清、囊虫病猪血清、囊虫病患者血清与其杂交,通过 Western blot 分析鉴定重组蛋白。

2 结果

2.1 *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的酶切鉴定

酶切鉴定结果见图 1。从具有氨苄青霉素抗性的 *B.longum* 中抽提的重组质粒 pGEX-TSO45W-4B,经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,用 1%琼脂糖凝胶电泳,得到 4 944 bp 的 pGEX-1 λ T 载体片段和 351 bp 的 TSO45W-4B 基因片段,与预期结果相符。

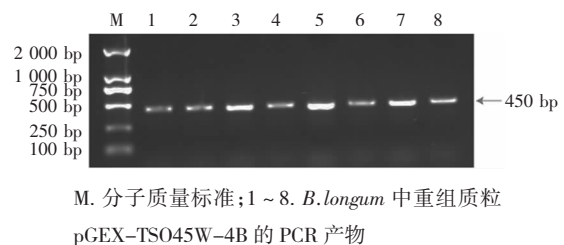


M. 分子质量标准;1. 重组质粒 pGEX-TSO45W-4B;2. *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的双酶切产物

图 1 *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的双酶切鉴定
Fig.1 Identification of restriction analysis of the recombinant plasmid pGEX-TSO45W-4B in *B.longum*

2.2 *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的 PCR 鉴定

PCR 鉴定结果见图 2。从具有氨苄青霉素抗性的 *B.longum* 中抽提的重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 为模板进行 PCR 扩增可得到 450 bp 的基因片段,除去载体序列 99 bp,TSO45W-4B 基因实际的长度为 351 bp,与预期结果相符。测序结果表明,与预期序列 100%匹配,提示重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 成功转入 *B.longum*。

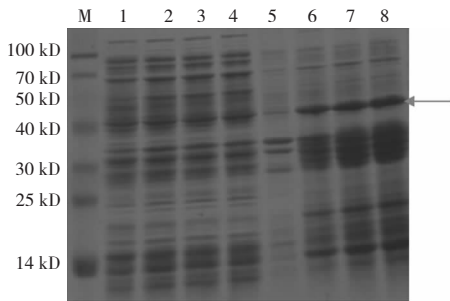


M. 分子质量标准;1~8. *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的 PCR 产物

图 2 *B.longum* 中重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 的 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of PCR of the recombinant plasmid pGEX-TSO45W-4B in *B.longum*

2.3 TSO45W-4B 基因在 *B.longum* 中的表达

转化后的菌株菌体浓度达到 A 值 0.6 左右时,分别经 0.1、0.5、1.0 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导,重组蛋白大小理论值为 39.87 kD。其中 GST 标签蛋白 26.3 kD,经 SDS-PAGE 分析表明,在诱导 48 h 后上清中 40 kD 处无明显的蛋白条带出现,而在沉淀中诱导前后出现了明显的条带差异,且大小与理论的分子量 39.87 kD 相吻合,初步判断蛋白成功表达,分布于沉淀中(图 3)。



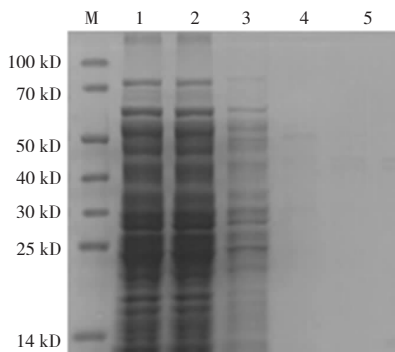
M. 分子质量标准;1. 未诱导的菌液上清;2. 0.1 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 上清;3. 0.5 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 上清;4. 1.0 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 上清;5. 未诱导的菌液沉淀;6. 0.1 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 沉淀;7. 0.5 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 沉淀;8. 1.0 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 沉淀

图 3 37 °C IPTG 诱导 48 h 表达鉴定

Fig.3 Identification of expression after induction with IPTG at 37 °C for 48 h

2.4 表达上清的纯化

为了进一步确认上清是否有目的蛋白表达,大规模培养后,收取足够的细胞裂解液上清,通过 GST 亲和树脂纯化富集重组蛋白,再通过还原型 GSH 洗脱,分别收集流出液和洗脱液,SDS-PAGE 分析各个溶液中的蛋白组分。纯化鉴定结果表明,流出液成分与上样的诱导上清条带几乎一样,洗脱液中无明显的蛋白条带,说明没有蛋白与 GST 树脂结合,在上清中无重组蛋白表达(图 4)。



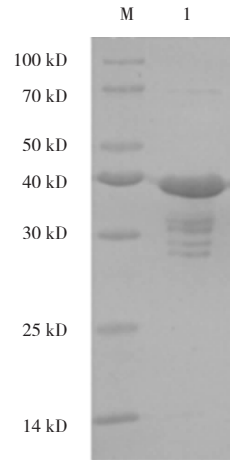
M. 分子质量标准;1:1.0 mmol/L IPTG 诱导后 48 h 上清;2~3. 流出液;4~5. 洗脱液

图 4 IPTG 诱导 48 h 上清 GST 树脂亲和纯化

Fig.4 Purification with GST affinity chromatography of supernatant induced with IPTG for 48 h

2.5 表达沉淀的复性

将蛋白裂解液沉淀经变包涵体溶解液溶解后,再经复性洗脱重溶,SDS-PAGE 鉴定变复性后的蛋白溶液,获得纯度 85% 以上的重新折叠的可溶蛋白(图 5)。测得纯化的重组蛋白浓度为 0.81 mg/ml。



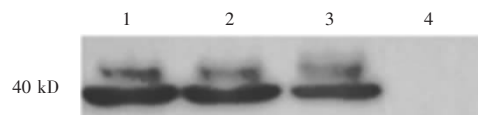
M. 分子质量标准;1. 梯度洗脱后蛋白

图 5 IPTG 诱导 48 h 包涵体变复性洗脱

Fig.5 Renaturation elution of inclusion body induced with IPTG for 48 h

2.6 Western blot 鉴定

分别使用兔抗血清、囊虫病猪血清、囊虫病患者血清与重组蛋白杂交,结果表明,重溶后的重组蛋白有特异性的结合,在 40 kD 处出现明显的反应带,说明重组蛋白在长双歧杆菌中获得了表达,且重组蛋白能被兔抗血清、囊虫病猪血清和囊虫病患者血清所识别,具有特异的抗原性(图 6)。



1. 兔抗 TSO45W-4B 血清;2. 囊虫病猪血清;3. 囊虫病患者血清;4. 空白对照

图 6 Western blot 鉴定

Fig.6 Identification of Western blot

3 讨论

45W 基因是 Johnson 等^[7]从羊绦虫六钩蚴 cDNA 文库中分离得到的一个阳性克隆,其中 765 bp 可编码相对分子质量为 28 kD 的含 254 个氨基酸的蛋白质,用其制成的 45W-GST 重组蛋白疫苗可诱导羊产生 94% 的保护率,具有良好的免疫保护作用。鉴于羊绦虫和猪带绦虫均属于带科绦虫,具有较高

的相似性, Gauci 等^[8-9]、Zheng 等^[10]、贾万忠等^[11]和才学鹏等^[12]受此启发, 相继成功地从猪带绦虫六钩蚴中克隆出 TSO45W 基因, 证明该基因至少由 5 个成员组成, 可通过交替剪切形成 A、B、C 3 种转录本, 其中 45W-4B 在同型转录本中同源性最低, 但在不同虫株和不同克隆间高度保守。因此推测 TSO45W-4B 与六钩蚴入侵宿主密切相关, 是一种理想的疫苗候选抗原。

双歧杆菌因其具有独特的安全性和益生的作用, 随着分子生物学和免疫学技术的发展, 以其作为受体菌, 在基因治疗、外源蛋白表达和疫苗研制等方面的研究受到了国内外学者的极大关注, 已在细菌、病毒、肿瘤、寄生虫等领域迅速开展起来^[13-16], 为传染病、肿瘤和寄生虫病的免疫预防和免疫治疗带来了希望。为了将外源基因有效引入双歧杆菌, 需构建大肠杆菌-双歧杆菌穿梭表达载体, 本研究采用的穿梭表达载体 pGEX-1 λ T 同时含有双歧杆菌和大肠杆菌复制起点, 外源基因既可在大肠杆菌中表达, 又可在在双歧杆菌中表达。前期本课题组已成功构建了猪带绦虫重组质粒 pGEX-TSO45W-4B, 并实现了在大肠杆菌中的成功表达^[6], 本研究在此基础上, 将构建的重组质粒 pGEX-TSO45W-4B 电穿孔转化 *B.longum*, 经 IPTG 37 °C 诱导表达 48 h, SDS-PAGE 结果显示插入的外源基因 TSO45W-4B 在 *B.longum* 中成功表达了相对分子质量约为 40 kD 的 TSO45W-4B/GST 融合蛋白, 除去载体表达的 GST 部分约 26 kD, 猪带绦虫 TSO45W-4B 基因实际表达的蛋白约为 14 kD, 与预期结果相符。用亲和层析纯化该融合蛋白, 获得了较高纯度的 40 kD 融合蛋白 TSO45W-4B/GST。Western blot 显示, 该重组蛋白能被兔抗 TSO45W-4B 血清、囊虫病猪血清和囊虫病患者血清所识别。表明 TSO45W-4B 基因在双歧杆菌中同样也得到了正确表达, 且表达的重组蛋白具有特异的抗原性。

综上所述, 本研究成功构建了猪带绦虫 TSO45W-4B 基因的双歧杆菌表达系统 pGEX-TSO45W-4B/*B.longum*, 并在双歧杆菌中表达了 TSO45W-4B 重组蛋白, 为下一步猪囊尾蚴病疫苗的研制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Ito A, Urbani C, Jiamin Q, et al. Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China[J]. *Acta Tropica*, 2003, 86(1): 3-17.
- [2] 周必英, 陈雅棠, 李文桂. 猪囊尾蚴病 DNA 疫苗研究现状[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2010, 28(2): 148-152.
- [3] 李文桂, 陈雅棠. 猪带绦虫 45W 蛋白疫苗的研制现状[J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(3): 235-237, 207.
- [4] 王福梅, 骆学农, 景志忠, 等. 猪带绦虫六钩蚴 45W-4B 重组蛋白的免疫原性研究[J]. *中国兽医寄生虫病*, 2006, 14(3): 1-5.
- [5] Luo XN, Zheng YD, Hou JL, et al. Protection against Asiatic *Taenia solium* induced by a recombinant 45W-4B protein[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(2): 230-232.
- [6] 周必英, 周 玲, 刘美辰, 等. 猪带绦虫 TSO45W-4B 基因的克隆、表达和抗体制备[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2013, 31(5): 372-337.
- [7] Johnson KS, Harrison GB, Lightowers MW, et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen[J]. *Nature*, 1989, 338(6216): 585-587.
- [8] Gauci CG, Lightowers MW. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 127(2): 193-198.
- [9] Gauci CG, Lightowers MW. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, 112(2): 173-181.
- [10] Zheng Y, Cai X, Luo X, et al. Genetic variability of the 45W gene family between Chinese and Mexican *Taenia solium*[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78(6): 946-948.
- [11] 贾万忠, 郑亚东, 王佩雅, 等. 猪带绦虫 45W 基因家族 cDNA 克隆和序列分析[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(5): 776-780.
- [12] 才学鹏, 郑亚东, 贾万忠, 等. 猪带绦虫六钩蚴 45W 基因家族分子克隆[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2117-2123.
- [13] 王国富, 高峰, 吴利先. 幽门螺杆菌重组 Bb-hpaA-vacA 疫苗的构建[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(2): 131-134.
- [14] 李世彬, 李 江, 贺志良, 等. 人轮状病毒 vp4 全基因原核穿梭表达质粒的构建及鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(10): 1126-1129.
- [15] 安丽娜, 李著华, 岳 扬, 等. 婴儿双歧杆菌介导的 CD 和 UPRT 联合 5-FC 基因疗法对黑色素瘤的体外治疗实验研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2007, 38(1): 27-30.
- [16] 向进平, 李文桂. 寄生虫重组双歧杆菌疫苗研究进展[J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2012, 39(2): 120-123.

(责任编辑: 冉明会)