

·免疫学技术与方法·

日本血吸虫铁蛋白基因的克隆、表达及其免疫诊断的研究

王 敏 易新元 曾宪芳 袁仕善 李先平 (中南大学湘雅二医院检验科,长沙 410011)

中国图书分类号 R383.2 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2004)10-0696-04

[摘要] 目的:构建、表达、纯化日本血吸虫铁蛋白基因的原核表达重组蛋白,并初步观察其免疫诊断价值。方法:将日本血吸虫铁蛋白基因亚克隆于 pGMC 载体,转化重组体到大肠杆菌 *E. coli* 2566 进行表达;采用电泳层析法分离纯化日本血吸虫铁蛋白;用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达纯化产物;用 Dot-ELISA 分别检测了血吸虫病人及正常人的血清。结果:重组的日本血吸虫铁蛋白以 GMC(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子)-日本血吸虫铁蛋白融合蛋白的形式在细菌中得到高效表达,分子量为 40 kD,能被日本血吸虫感染兔血清识别。用重组铁蛋白检测 30 例日本血吸虫病人血清和 30 例正常人血清,阳性率和假阳性率分别为 93.3% 和 3.3%。结论:成功地表达纯化日本血吸虫重组铁蛋白,且该蛋白具有一定的免疫诊断价值。

[关键词] 日本血吸虫;铁蛋白;基因克隆;表达;免疫诊断

Schistosoma japonicum ferritin :cloning ,expression and its use in immunodiagnosis

WANG Min , YI Xin Yuan * , ZENG Xian Fang * , YUAN Shi-Shan * , LI Xian Ping . Department of Clinical Laboratory , The Second Xiangya Hospital of Central South University , Changsha 410011 , China ; * Department of Parasitology , Xiangya Medical College of Central South University , Changsha 410078 , China

[Abstract] **Objective:** To construct ,express and purify the prokaryotic expressed recombinant protein which contains *Schistosoma japonicum* ferritin gene ,and to explore its use in immunodiagnosis. **Methods:** The ferritin gene was subcloned into the expression vector pGMC. The expression vector pGMC with ferritin gene(pGMC-Sj ferritin) was then used to transfer *E. coli* strain ER2566. Fractionate and purify pGMC-Sj ferritin using electrophoretic chromatography. Molecular weight of pGMC-Sj ferritin was determined by SDS-PAGE and Western blot. The protein used an antigen for Dot-ELISA to detect sera from schistosomiasis patients and normal controls. **Results:** The recombinant protein pGMC-Sj ferritin was expressed high efficiently in *E. coli* ER2566 and its molecular weight was 40 kD. The protein could be recognized by antibody in sera of rabbit infected with *Schistosoma japonicum*. The sera from 30 schistosomiasis patients and 30 normal controls were tested. The result showed the positive rate and the false-positive rate were 93.3% and 3.3% ,respectively. **Conclusion:** The authors have successfully expressed and purified the recombinant protein which contains *Schistosoma japonicum* ferritin gene. The recombinant protein can be used an antigen for the immunodiagnosis of schistosomiasis.

[Key words] *Schistosoma japonicum* ;Ferritin ; Gene cloning ; Expression ; Immunodiagnosis

铁是细胞生命过程中不可缺少的必需元素,但是元素铁可催化羟基团形成从而对细胞造成毒害;而且生理 pH 值的水溶液中含铁物质迅速氧化,通过水解或聚合作用可形成不溶性的三价铁的衍生物,它必须与铁蛋白结合才能发挥运输氧和转移电子的功能。已经发现铁蛋白普遍存在于脊椎动物、无脊椎动物、高等植物、真菌及细菌的大多数细胞中¹。近年来,曼氏血吸虫²、细粒棘球绦虫³、牛带绦虫⁴的铁蛋白基因已相继被克隆。我室采用日

本血吸虫未成熟卵免疫血清筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库,首次获得编码日本血吸虫的铁蛋白基因,插入子大小为 600 bp,与曼氏血吸虫的铁蛋白基因有 74.7% 的同源性⁵。本实验构建和表达了日本血吸虫铁蛋白基因的原核表达重组蛋白,对其进行纯化和鉴定,并初步观察其免疫诊断价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 铁蛋白基因克隆由湘雅医学院血吸虫病研究室提供。菌株 *E. coli* ER2566 由澳大利亚昆士兰医学研究所分子寄生虫学室赠送。表达载体 pGMC 由美国 Pharmingen Inc 提供。Hind III, Eco RI, Bam HI, Xho I, T₄ DNA 连接酶,广谱标准分子量蛋白、标准分子量预染蛋白均为美国新英格兰生物实

WHO/IDR 资助项目 (No. 980255); 湖南省科委基金资助项目 (No. 00jzy 2115)

中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室,长沙 410078

作者简介:王 敏(1976 年-),女,病原生物学专业硕士生,检验师;指导教师:易新元(1936 年-),男,教授,博士生导师,主要从事分子及免疫血吸虫病学研究。

验所产品。IPTG系 Promega 产品。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)为 Amersham 产品。SDS系 Serva 公司进口分装。丙烯酰胺系 Amresco 公司进口分装。甲叉丙烯酰胺系 Fluka 公司进口分装。其余试剂均系国产分析纯。

1.1.2 仪器 Minigel 电泳、转印装置系美国 Bio-Rad 公司产品。D 型凝胶大柱制备电泳槽系上海锦华实验器械厂生产。自动部分收集器系上海沪西仪器厂生产。JY92-II 超声波细胞粉碎机为宁波新芝科器研究所产品。

1.1.3 血清 正常人血清采自非血吸虫病流行区的健康人,均无疫水接触史。血吸虫病人血清由湘雅医学院寄生虫学教研室特检室提供。

1.2 方法

1.2.1 铁蛋白基因亚克隆 参照文献⁵方法进行,将铁蛋白基因克隆制备质粒 DNA,以质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 Hind III、Eco RI 消化,37℃ 1 小时。消化产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后提取凝胶中的铁蛋白 DNA,以铁蛋白 DNA 为模板, Fer/pGMC₁ 及 Fer/pGMC₁ 为引物进行扩增,扩增产物与表达载体 pGMC 均用内切酶 Bam HI 和 Xho I 在 37℃ 条件下消化 1.5 小时,然后用 T₄ DNA 连接酶使铁蛋白 DNA 与载体 pGMC 相连接,16 过夜。连接产物与感受态细胞 ER2566 冰浴作用 30 分钟,使重组体质粒转化 ER2566。

1.2.2 重组铁蛋白表达 将含重组体的阳性菌接种含氨苄青霉素(终浓度为 100 μg/ml)的 LB 培养液中,37℃ 震荡直至 OD₆₀₀ 达 0.5 时,加 IPTG(终浓度为 10 mmol/L)诱导重组铁蛋白表达,继续培养 4~5 小时,4 500 r/min 离心 20 分钟,弃上清,收集细菌沉淀,将细菌沉淀以 1:5(W/V)溶解于不含尿素的缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)中,反复冻融 3 次,以超声破碎仪破菌(功率 400 W,4 秒/次,间隔 5 秒,工作次数 50 次),4 12 000 r/min 离心 30 分钟,收集沉淀溶解于含 8 mol/L 尿素缓冲液 A 中。表达过程中收集诱导前后的菌液,SDS-PAGE 观察表达情况。

1.2.3 重组铁蛋白的纯化 参考范培昌等(1985)的方法,选择 200 ml (3.8 cm × 19.4 cm) 的玻璃柱,配制 7% 的分离胶,3% 的浓缩胶,制备电泳柱,上样,40 mA 恒流电泳,待前沿指示剂至电泳胶底时,接通自动部分收集器,以含蓝色指示剂的部分为第 1 管,1 h/管,每管约 1 ml,进行部分收集。

1.2.4 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定纯化重组铁蛋白 制备 10% 分离胶,3.9% 浓缩胶,将各管收集的液体行 SDS-PAGE 电泳(20 mA 2 小时),0.1% 考马

斯亮蓝 R250 染色,含 7% 醋酸的 5% 甲醇脱色至本底无色为止,根据标准蛋白分子量迁移率 R_f 值,用半对数坐标纸绘出标准曲线,收集分子量约 40 kD 的蛋白。将上述蛋白收集液置透析袋中在 0.01 mol/L, pH7.4 的 PBS-0.1% Tween-20 中 4 透析 24 小时以去掉蛋白收集液中的 SDS。取分离透析的蛋白进行免疫印迹分析,将 SDS-PAGE 凝胶经 120 mA 2 小时转印于 NC 膜上,丽春红染色确定转印效果。3% 脱脂奶粉 4 封闭过夜阻断非特异结合部位,经 0.5% PBS-Tween-20 洗涤后与 1:100 稀释感染兔血清 37℃ 震荡孵育 2 小时,洗涤后加酶标二抗 HRP-SPA,稀释度为 1:3 000,37℃ 反应 2 小时,DAB 显色。水洗终止反应,晾干。

1.2.5 Dot-ELISA 取纯化的重组铁蛋白(10 μg/ml)各 5 μl 点于硝酸纤维素膜上,室温下干燥后,3% 的脱脂奶粉封闭,分别加入日本血吸虫感染病人血清和正常人血清,37℃ 孵育 2 小时,经 PBST 洗涤 3~5 次,加入 HRP 标记的羊抗人 IgG,二甲基联苯胺(DAB)显色,蒸馏水水洗终止反应并观察结果。

2 结果

2.1 重组铁蛋白的电泳分析 制备 10% 分离胶,3.9% 浓缩胶行 SDS-PAGE。由图 1 可知,IPTG 诱导后重组铁蛋白得到高效表达(箭头所指)。

2.2 重组铁蛋白的纯化和鉴定 表达的重组铁蛋白经电泳层析分离后各管的电泳图谱如图 2。根据标准分子量蛋白的位置可知,第 7、8 管蛋白的分子量约为 40 kD,收集并行 Western blot 分析其免疫活

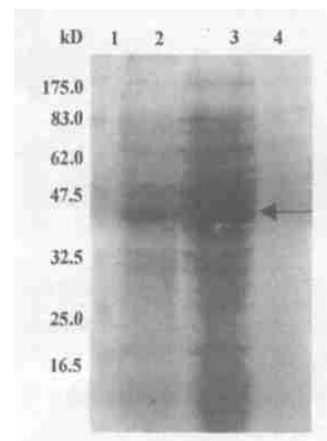


图 1 日本血吸虫重组铁蛋白表达的电泳图谱

Fig. 1 SDS-PAGE patterns of expressed recombinant *S. japonicum* ferritin

Note: 1. Molecular weight standards; 2. Expressed product induced with IPTG (in buffer A); 3. Expressed product induced with IPTG (in 8 mmol/L urea); 4. Expressed product without induction.

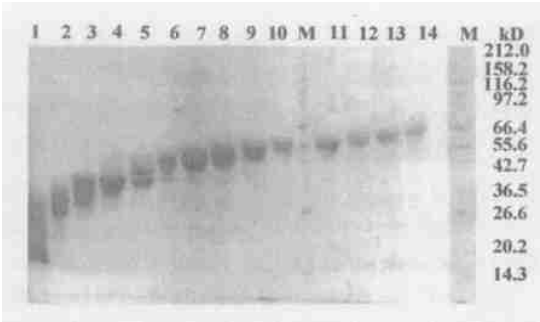


图 2 日本血吸虫重组铁蛋白的电泳层析图谱(1~14 为部分收集管的序号)

Fig.2 Chromatography of purified recombinant *S. japonicum* ferritin by SDS-PAGE 1-14 number of collections

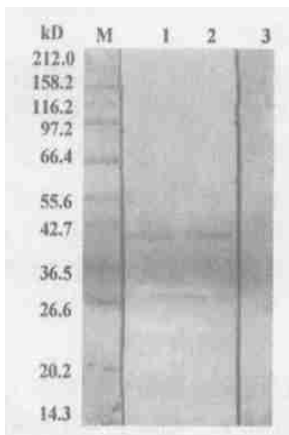


图 3 日本血吸虫重组铁蛋白的免疫印迹图谱

Fig.3 Western-blot assay of purified recombinant *S. japonicum* ferritin

Note : 1, 2. Purified ferritin incubated with sera of rabbits with *S. japonicum* ; 3. Purified ferritin incubated with sera of normal rabbits.

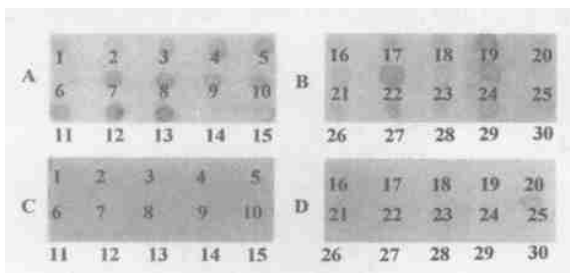


图 4 重组铁蛋白 Dot-ELISA 诊断日本血吸虫病

Fig.4 Diagnosis of schistosomiasis with the recombinant ferritin by Dot-ELISA

Note : A, B. The sera of thirty schistosomiasis patients ; C, D. the sera of the normal controls.

性。以正常兔血清识别为参照,日本血吸虫感染兔血清能识别分离纯化的 40 kD 的蛋白,说明分离的重组铁蛋白具有免疫学活性,见图 3。

2.3 日本血吸虫病人的诊断 日本血吸虫重组铁

蛋白作为抗原分别检测日本血吸虫病人血清及正常人血清。DAB 显色,结果判定标准:无色或浅黄色为阴性,橘黄色为阳性。显色后发现,30 例血吸虫病人血清中,除 14、15 号为阴性外,其余均为阳性,阳性率为 93.3%。30 例正常人中仅 1 例呈阳性结果,假阳性率仅 3.3%,见图 4。

3 讨论

血吸虫寄生于终宿主的血管内,每小时吞噬数以千计的红细胞,同时也吸入大量的铁,沉积在血吸虫肠道内的黑色素就是含铁血黄素。成熟雌虫摄取红细胞是雄虫的 8 倍。Clemens⁶ 对曼氏血吸虫童虫进行培养,在无血清的培养基中,96% 以上的虫体经培养 12 小时后,其大小、肠支等仍停止在未发育状态。而在加入铁蛋白后,童虫迅速生长,其刺激童虫生长发育的作用甚至超过血清的作用。Ersfeld 等³ 从细粒棘球绦虫的 cDNA 文库中筛出的铁蛋白具有免疫原性,认为其可用于人类棘球蚴病的诊断。有学者对日本血吸虫铁蛋白进行了初步研究,发现其具有抗血吸虫病保护性免疫价值。这些都提示铁在血吸虫卵胚的形成和血吸虫发育中起重要作用。

目前提纯血吸虫蛋白质的方法很多,如亲和层析⁷、分子筛层析⁸、HPLC⁹、FPLC¹⁰、制备后电泳切带和电渗分离蛋白质。但是在实验室条件下,通常一次所能提纯的蛋白量仅限于微克级。而电泳层析法是将制备性电泳和自动部分收集器相结合分离蛋白质达到的一种方法,其分辨率与丙烯酰胺的浓度、胶的长度和直径、电流有关。选择合适的凝胶柱,利用少量样品即可分离到多个不同分子量的蛋白,操作简单,且可使纯化蛋白的收集量从微克级上升到毫克级水平。由于我们所用的表达载体 pGMC 有 6 个组氨酸残端,后者与 Ni-NTA 树脂有高度亲和力,故可用 Ni-NTA 柱层析纯化⁵,但 Ni 有与不含 6 个组氨酸残端的宿主蛋白结合的倾向¹¹,且纯化产量不高,树脂虽可被重复使用,但多次使用后纯化效果不佳,不适于开展批量的动物免疫实验。本次实验我们在对铁蛋白基因亚克隆表达后,采用电泳层析法纯化重组蛋白,并用低温透析沉淀去除 SDS,保留了铁蛋白的免疫学活性,且能被日本血吸虫感染兔血清所识别。

目前血吸虫病免疫诊断抗原最常用的是虫卵可溶性抗原,该抗原成分复杂,与其他寄生虫抗原具有一定的交叉抗原性,故特异性不理想。而基因重组技术为制备有效的诊断抗原提供了一条新途径。Hancock 等¹² 以组氨酸融合蛋白的形式重组表达的

曼氏血吸虫微粒体抗原检测曼氏血吸虫病的敏感性为 77% ,检测埃及血吸虫病的敏感性为 89.4% 。De Noya 等¹³ 报道大多数克隆的曼氏血吸虫 31 kD 肽段对曼氏血吸虫病有较好的诊断价值。我们在得到纯化的重组铁蛋白后,观察其作为抗原诊断日本血吸虫病,结果发现 30 例血吸虫病人中,有 28 例呈阳性反应,阳性率为 93.3% 。而 30 例正常人中,仅 1 例为假阳性。

本次实验我们成功地克隆表达了日本血吸虫重组铁蛋白,并在实验条件下获得大量纯化的铁蛋白,并且纯化的重组铁蛋白具有较好的免疫原性,初步结果显示该重组蛋白对血吸虫病免疫诊断具有一定的价值。

4 参考文献

- Theil E C. Ferritin: structure, gene regulation and cellular function in animals, plants and micro-organism J. *Ann Rev Biochem*, 1987; 56: 289 - 315.
- Dietzel J, Hirzmann J, Preis D *et al* . Ferritins of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms J. *Mol Biochem Parasitol*, 1992; 50: 245-254.
- Ersfeld K, Craig P S. Cloning and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* ferritin J. *Parasitol Res*, 1995; 81: 382 -387.
- Benitez, Harrison L J S, Parkhouse R M E *et al* . Sequence and immunogenicity of *Taenia saginata* ferritin J. *Mol Biochem Parasitol*, 1996; 82: 113-116.
- 易新元, 曾宪芳, 周金春 *et al* . 日本血吸虫铁蛋白基因的筛选、克隆与表达 J. *湖南医科大学学报*, 1998; 23(5): 425-428.
- Clemens L E, Basch P F. *Schistosoma mansoni*: effect of transferring and growth factors on development of schistosomula in vitro J. *J Parasitol*, 1989; 75: 417-425.
- Attallah A M, Yones E, Ismail H *et al* . Immunochemical characterization and diagnostic potential of a 63-kilodalton schistosoma antigen J. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 60: 493-497.
- 汪世平, 曾宪芳, 易新元 *et al* . 日本血吸虫 31/32 kD 抗原纯化及诊断应用的研究(英文) J. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1995; 13(1): 25-31.
- Moyes R B, Alves-Oliveira L F, Parra J C *et al* . HPLC fractionated soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* elicits a heterogeneous human immune response J. *Parasite Immunol*, 1996; 18: 625 -633.
- 周金春, 易新元, Kalinna B H *et al* . 重组日本血吸虫副肌球蛋白的表达与纯化 J. *湖南医科大学学报*, 2000; 25(2): 106-108.
- Kasher M S, Wakulchik M, Cook J A *et al* . One-step purification of recombinant human papillomavirus Type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product J. *Bio Techniques*, 1993; 14: 630-641.
- Hancock K, Mohamed Y B, Xu E H C *et al* . A recombinant protein from *Schistosoma mansoni* useful for the detection of *S. mansoni* and *S. haematobium* antibodies J. *J Parasitol*, 1997; 83: 612 -618.
- Noya O, De Noya B A, Ballen D E *et al* . Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma* adult worms J. *Parasit Immunology*, 2001; 23 (11): 567-573.

[收稿 2003-09-24 修回 2003-12-08
(编辑 张 慧)]

消息 ·

首届感染与免疫国际研讨会会议纪要

首届感染与免疫国际研讨会(The 1st International Symposium on Infection and Immunity)在基金委的大力资助下,于2004年7月17~18日在北京香山金源商旅大酒店隆重举行。在大会的主题“Better Life through Immunology”下,参会者就HBV、HCV、HIV和SARS-CoV等严重危害社会与人口健康的病毒感染的分子免疫机制展开集中讨论。中国科学院和基金委作为会议主办方,邀请到了国际著名病毒免疫学家,1976年诺贝尔奖得主,现任加州理工大学校长 Dr. David Baltimore 做主旨演讲,会议还邀请到国际著名的病毒学家和免疫学家 Dr. Ralf Baric (University of Virginia), Dr. Robert Johnston (University of North Carolina at Chaper Hill), 以及我国旅美著名华人免疫学家陈建柱教授(MIT)、刘阳教授(Ohio State University)、国内知名教授吴玉章(第三军医大学)、王红阳(第二军医大学)、邓宏魁(北京大学)、王福生(302医院)等17位专家做了精彩的大会报告。与会代表118人参加了这次会议,整个会议演讲精彩,讨论热烈,反响强烈,在科学上和科研合作上收益颇丰。会议还收到了20多篇高质量的墙报报告,会议科学顾问团从中遴选出3个优秀研究生墙报奖,并由中科院百奥生物医药公司冠名颁奖。会议组织者和参会者都感谢基金委给大家提供的这次宝贵的学术交流机会。应大多数与会者的要求,会议承办单位中科院微生物所分子免疫中心初步定于2006年在厦门举行第二次会议。