

截短形式弓形虫 SAG1 抗原在大肠杆菌中的可溶性高效表达、纯化及免疫反应性鉴定

言 慧,李 华,周晓红,吴 昆,陈晓光(第一军医大学寄生虫教研室,广东 广州 510515)

摘要:目的 在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达弓形虫 SAG1 基因的截短片断,并进行纯化及免疫反应性鉴定。方法 利用 *Nco* I、*Hind* III 双酶切,从本室建立的 pET-30a(+)-SAG1 重组质粒中获取 SAG1 基因的截短片断,并将目的片段连接到经同样双酶切的质粒 pET32a 中,构建表达重组质粒 pET-32a(+)-trSAG1。将重组质粒转入 *E.coli* BL21 中并进行诱导表达。表达蛋白经 Ni-NTA agarose 纯化后,Western-blotting 分析其免疫反应性。结果 成功构建重组质粒 pET-32a(+)-trSAG1,通过 IPTG 诱导得到了以可溶性形式表达的重组 SAG1 蛋白,相对分子质量 40 000,Western-blotting 结果显示纯化的重组蛋白具有良好的免疫反应性,ELISA 试验表明重组 SAG1 蛋白能被弓形虫免疫血清及弓形虫感染人血清识别。结论 在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达了弓形虫 SAG1 基因的截短片断,表达蛋白能被弓形虫免疫血清及弓形虫感染人血清识别,有望成为一种有价值的诊断抗原。

关键词:弓形虫;SAG1;纯化;免疫印迹;ELISA

中图分类号:R382.5;Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)04-0412-03

Efficient soluble expression, purification and identification of the truncated SAG1 gene of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*

YAN Hui, LI Hua, ZHOU Xiao-hong, WU Kun, CHEN Xiao-guang

Department of Parasitology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To express truncated SAG1 gene in *Escherichia coli* to obtain purified recombinant SAG1, and identify the immunoreactivity of the product. **Methods** The plasmid pET-30a(+)-trSAG1 was constructed, which was cut by *Nco* I and *Hind* III to obtain truncated SAG1 gene and inserted into pET-32a (+) cut by the same two restriction enzymes. After identification by restriction enzymes, the plasmid pET-32a (+)-trSAG1 was transformed into *E.coli* BL21, and the soluble product induced by 0.1 mmol/L IPTG for 4 hour before purification with Ni-NTA agarose, followed by identification of the purified recombinant protein with SDS-PAGE, Western-blotting and ELISA. **Results** Recombinant pET-32a(+)-trSAG1 was successfully constructed and high level of truncated SAG1 expression achieved in *E.coli*. SDS-PAGE showed that the expressed protein was approximately 40 000 in size and expressed in a soluble form that could be easily purified by Ni-NTA agarose. Western-blotting demonstrated that the purified product could be specifically recognized by sera from rabbits immunized with native antigen of *T.gondii*, and could also be recognized, as shown by ELISA, by sera from human with *T.gondii* infection. **Conclusions** The truncated SAG1 gene was successfully expressed in *E.coli* in a soluble form, and the recombinant protein may be of value in the diagnosis of toxoplasmosis.

Key words: *Toxoplasma gondii*; SAG1; purification; Western-blotting; enzyme-linked immunosorbent assay

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*, *T.gondii*) 是一种专性细胞内寄生的机会致病原虫,呈世界性分布,能引起人兽共患的弓形虫病。全世界约 1/3 人口感染^[1],大多数为隐性感染,但免疫功能低下人群合并弓形虫感染可致严重并发症。调查显示,约 20% 的 AIDS 病

人患有弓形虫脑病,该病是 AIDS 病人直接死亡原因之一^[2,3]。孕妇在孕期初次感染弓形虫易造成流产、畸胎、死胎等^[4]。弓形虫对畜牧业也可造成严重危害。目前,弓形虫病/弓形虫感染的诊断主要依靠血清学检测,检测抗体的包被抗原仍主要来源于鼠/组织培养的 *T.gondii* 速殖子制备的虫体抽提抗原^[5],含有大量非特异性抗原物质,且制备程序烦琐,不易标准化。因此,通过基因工程技术制备高度纯化的诊断抗原有着十分广阔的应用前景。

本研究采用分子生物学方法在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达截短形式的弓形虫主要表面抗原 SAG1 (P30) 蛋白,并对纯化的重组抗原的免疫反应性进行了鉴定。

收稿日期:2003-12-19

基金项目:广东省重大科技攻关项目(A1090205);广州市科技计划项目(2002Z-T24011)

Supported by Guangdong Provincial Science (A1090205) and Technology Committee (A1090205)

作者简介:言慧(1973-),女,湖南株洲人,第一军医大学硕士研究生,讲师,电话:020-61640114-89122

通讯作者:陈晓光,电话:020-61648308, E-mail: xgchen2001@hotmail.com

com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 刚地弓形虫 弓形虫 RH 株为本室液氮保种。

1.1.2 菌株和质粒 *E.coli* BL21 为本室保存, 质粒 pET32a(+) 为本室引种, 质粒 pET-30a(+)-SAG1 为本室构建。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III 为 New England Biolabs 公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-IgG)、羊抗人 IgG (HRP-IgG) 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid, Ni-NTA) agarose 为 QIAGEN 公司产品。

1.1.4 实验动物 第一军医大学实验动物中心提供 15~20 g 雄性昆明鼠供转种用, 2.5~3.5 kg 雄性新西兰兔用以制备弓形虫免疫兔血清。

1.2 方法

1.2.1 弓形虫免疫兔血清的制备 弓形虫 RH 株速殖子自液氮中取出复苏后, 腹腔接种小鼠, 3 d 后, 常规无菌生理盐水腹腔冲洗, 收集纯化速殖子。速殖子超声粉碎后离心收集上清, 按常规方法免疫兔, 收集免疫兔血清。

1.2.2 重组质粒 pET-32a (+)-trSAG1 的构建及鉴定 本室陈晓光等^[6]已构建 pET-30a(+)-SAG1 质粒, 用 *Nco* I、*Hind* III 双酶切质粒 pET-30a(+)-SAG1, 用低熔点琼脂糖法回收纯化双酶切下的小片段产物, 再亚克隆到经同样双酶切的 pET32a(+) 质粒中, 转化 *E.coli* BL21 感受态细胞, 用氨卞青霉素 LB 平板进行筛选, *Nco* I、*Hind* III 双酶切及测序鉴定。

1.2.3 重组 SAG1 蛋白的表达 双酶切及测序鉴定无误后, 接种转化有重组质粒的单菌落 (pET-30a(+)-SAG1/BL21) 于 LB (A+) 液体培养基中, 37 °C, 250 r/min 培养过夜, 次日以 1:100 比例转种于 500 ml LB (A+) 培养基中, 37 °C, 250 r/min 培养 2.5 h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 继续培养 4 h, 离心收集菌体。

1.2.4 重组 SAG1 蛋白的纯化 将菌体重悬于 50 ml 裂菌缓冲液中, JY92-II 超声粉碎仪超声破菌。取上清液进行 Ni-NTA 金属亲和层析, 具体操作见说明书。

1.2.5 Western-blotting 将纯化后的重组蛋白进行 Western-blotting, 一抗为 1:250 稀释的正常兔血清及弓形虫免疫兔血清, 二抗为 1:2 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG, DAB/H₂O₂ 避光显色 20 min。

1.2.6 重组 SAG1 蛋白的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 将上述制备的纯化的重组 SAG1 做 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 梯度稀释后做 ELISA。一抗为 1:300 稀释的正常兔血清及弓形虫免疫兔血清, 二抗为 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG; 根据曲线及纯化蛋白浓度确定最佳包被浓度。在最佳包被浓度下检测人血清弓形虫 IgG 抗体, 以人弓形虫感染混合血清作为阳性对

照, 人弓形虫阴性混合血清作为阴性对照。

2 结果

2.1 pET-32a(+)-trSAG1 的构建及鉴定

提取筛选到的 pET-32a (+)-trSAG1 重组质粒 DNA, 分别进行 *Nco* I、*Hind* III 双酶切及测序鉴定。双酶切后产生 705 bp 小片段, 与预期大小相符, 经基因测序后证实插入子的序列及读码框架正确。

2.2 重组 SAG1 蛋白的表达及纯化

重组质粒 pET-32a (+)-trSAG1 经 IPTG 诱导后, SAG1 基因截短片段在大肠杆菌中以融合蛋白的形式得到了表达, 通过 12% SDS-PAGE 检测, 发现融合蛋白相对分子质量为 35 000 左右, 与理论值基本吻合; 融合蛋白约占菌体总蛋白的 18%。空载体在 21 000 的位置表达了 Trx 担体蛋白, 而空载体、重组质粒在诱导前均未出现特异的表达蛋白条带。将菌体经超声波破菌后, 14 000 r/min 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 结果显示目的蛋白主要以可溶性形式表达。上清中的目的蛋白经 Ni-NTA 纯化后, 纯度可达 81.8% (图 1)。

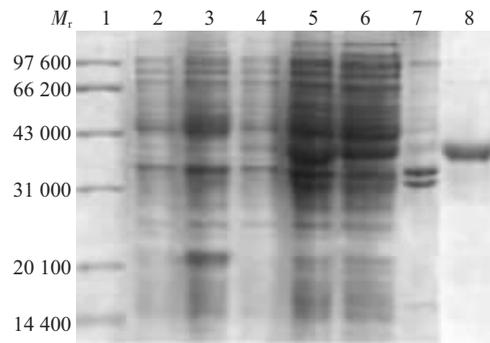


图 1 表达蛋白 SDS-PAGE 结果

Fig.1 SDS-PAGE analysis of rSAG1

Lane 1: Molecular weight protein marker; Lane 2: PET32a/BL21 before induction; Lane 3: PET32a/BL21 after induction; Lane 4: PET32a-trSAG1/BL21 before induction; Lane 5: PET32a-trSAG1/BL21 after induction; Lane 6: Supernatant of PET32a-trSAG1/BL21 after sonication; Lane 7: Pellet of PET32a-trSAG1/BL21 after sonication; Lane 8: Elution of 10 mmol/L Tris

2.3 重组 SAG1 蛋白抗原活性的初步分析

以弓形虫免疫兔血清与纯化的重组 SAG1 进行 Western-blotting, 结果显示含重组质粒 pET-32a(+)-trSAG1 菌株的诱导表达蛋白在 35 000 处与兔弓形虫免疫血清有一特异性反应条带, 而与正常兔血清无明显反应条带出现 (图 2)。

经 ELISA 测定, 根据纯化蛋白浓度及包被稀释度换算, 重组 SAG1 蛋白的最佳包被浓度约为 0.5 μg/孔。重组蛋白能被弓形虫感染人血清识别。

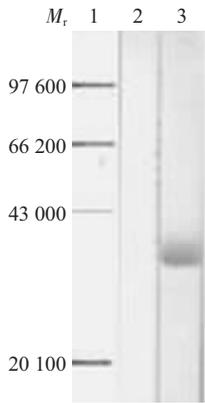


图 2 纯化蛋白 Western-blotting 结果

Fig.2 Results of Western-blotting

Lane 1: Molecular weight mark; Lane 2: Negative rabbit serum; Lane 3: Immunized rabbit serum

3 讨论

SAG1 蛋白,即 p30 蛋白,是弓形虫速殖子期特异性表面抗原,约占弓形虫速殖子总蛋白的 3%~5%^[7]。SAG1 基因在不同虫株中高度保守,各项研究表明,SAG1 蛋白是诱导宿主免疫反应的主要靶抗原,具有高度的免疫原性及免疫保护性,因此被视为免疫诊断及研制新型疫苗的候选抗原,由于纯化天然 SAG1 蛋白造价昂贵而且制备耗时,利用基因工程技术在体外表达 SAG1 蛋白是获得大量均一 SAG1 抗原的良好途径,本室已在 SAG1 蛋白的表达方面进行了大量研究^[6,8-10]。

以往在大肠杆菌中获得的重组 SAG1 大部分形成包涵体,表达产物由于错误折叠而不具有特异的免疫反应性,需经复杂的变性、复性过程才能恢复部分活性^[6,11,12]。根据 SAG1 基因序列推测,其主要翻译产物含有一个 N 末端的疏水性信号肽和一个 C 末端的疏水尾。SAG1 在翻译后要经过信号肽和疏水尾的切除、N 端连接糖基及加上糖脂锚蛋白等修饰^[13]。大肠杆菌缺乏蛋白质翻译后的修饰系统,SAG1 蛋白在大肠杆菌中表达后不能正确折叠。笔者选取 SAG1 基因的截短片克隆至表达型质粒 pET32a 中,舍弃了 N 端的信号肽和 C 端的疏水尾,结果以可溶性形式在 *E.coli* BL21 中高效表达了重组 SAG1 蛋白,经一步纯化,无需复性即表现出良好的免疫反应性。

以融合蛋白形式表达的重组 SAG1 蛋白可以很容易地用 Ni-NTA agarose 进行初步纯化。我们在实验中发现,在 pH 值一定的条件下,调节洗涤/洗脱缓冲液中的咪唑浓度对纯化效果影响不大。而在咪唑浓度一定的条件下,通过调节洗涤/洗脱缓冲液的 pH 值,则可提高纯化效率。当洗涤缓冲液 pH 为 6.5~7.5 (咪唑浓度为 35 mmol/L),洗脱缓冲液 pH 为 8.0 (咪唑浓度为 300 mmol/L)时纯化效果最佳。

在进行超声破菌时,笔者发现在不同的裂菌缓冲液系统中,上清中重组 SAG1 蛋白的量不同。在 10 mmol/L Tris 缓冲液中,重组蛋白绝大部分存在于超声上清中;而在 350 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,上清中几乎不存在重组蛋白,沉淀性状类似蛋白经盐析作用

后产物。推测在大肠杆菌中以可溶性形式表达的 SAG1 截短片,尽管理论上应高度接近天然构象,但在某些表位可能仍与天然蛋白存在差异,因此在离子浓度较高的磷酸盐溶液中不稳定,具体原因需进一步实验确证。

本研究中,纯化的重组 SAG1 蛋白表现出良好的免疫反应性,能被弓形虫免疫兔血清及弓形虫感染人血清识别,但在做 ELISA 时,本底偏高,推测可能与重组蛋白的纯度有关。进一步的纯化及应用性实验正在进行中。

参考文献:

- [1] Hughes H P A. Toxoplasmosis: the need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1985, 120: 105-39.
- [2] Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS [J]. *Clin Infect Dis*, 1992, 15(2): 211-22.
- [3] Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Some opportunistic paraitic infections in AIDS: candidiasis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis [J]. *Parasitol Today*, 1998, 14(4): 150-6.
- [4] Matsui D. Prevention, diagnosis, and treatment of fetal toxoplasmosis [J]. *Clin Perinatol*, 1994, 21(3): 675-89.
- [5] Kim K, Bulow R, Kampmeier J, et al. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells [J]. *Infect Immun*, 1994, 62(1): 203-9.
- [6] Chen XG, Gong Y, Li Hua, et al. High-level expression and purification of immunogenic recombinant SAG1 (p30) of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli* [J]. *Protein Exp Purif*, 2001, 23(1): 33-7.
- [7] Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn ER, et al. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody [J]. *J Immunol*, 1983, 10: 2407-12.
- [8] 曾方银, 刘国章, 陈晓光, 等. 弓形虫 p30 基因在真核系统中的表达 [J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(2): 91-5.
Zeng FY, Chen XG, Liu XG, et al. Expression of *Toxoplasma gondii* p30 gene in eukaryotic system [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 1998, 18(2): 91-5.
- [9] 陈晓光, 杨培梁, 李华, 等. 弓形虫 SAG1 基因在大肠杆菌中的高效表达及重组抗原对弓形虫感染的检测 [J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(8): 561-4.
Chen XG, Yang PL, Li H, et al. High expression and purification of immunogenic recombinant *T. gondii* SAG1 gene in *E.coli* and its preliminary application in *T. gondii* infection detection [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(8): 561-4.
- [10] 陈晓光. 弓形虫主要表面抗原的克隆 [J]. 第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1994, 14(2): 114-5.
- [11] Haming D, Spenter J, Metsis A, et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen (p30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies [J]. *Clin Diag Lab Immunol*, 1996, 3(5): 355-57.
- [12] Aubert D, Maine GT, Villena I, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1144-50.
- [13] Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, p30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 5569-74.