

## 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

陈晓光<sup>1</sup>, 杨培梁<sup>1</sup>, 李华<sup>1</sup>, 龚娅<sup>1</sup>, 冯明钊<sup>2</sup> (<sup>1</sup>第一军医大学寄生虫学教研室, 广东广州 510515; <sup>2</sup>香港中文大学生物系, 香港)

**摘要:**目的 在原核系统中高效表达弓形虫表面抗原 SAG1 并利用重组抗原检测弓形虫感染。方法 将截短的 SAG1 基因经 PCR 扩增后, 定向亚克隆入原核表达载体 pET-30a(+), 酶切鉴定出阳性重组子并经序列测定证实读码框正确, 将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 以 IPTG 诱导表达, 对融合的表达产物进行纯化和复性, 通过免疫印迹和 ELISA 实验检测其特异的免疫反应性。结果 成功构建截短型 SAG1 在原核系统中的重组表达质粒, 并以融合蛋白的形式在大肠杆菌中得到了高效表达, 其表达量占细菌裂解液中总蛋白量的 31.58%。经过简易的纯化和复性过程, 该重组抗原 (rSAG1) 能被弓形虫感染的人血清所识别。用 rSAG1 构建的 ELISA 试剂盒对弓形虫病的检测具有高度的敏感性和特异性。结论 截短型 SAG1 在大肠杆菌中得到了高效表达, 重组抗原经纯化和复性后, 能有效检测弓形虫的感染, 可用于构建弓形虫病检测试剂盒。

**关键词:**弓形虫感染; 基因表达; 寄生虫学

中图分类号: R382.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2001)08-0561-04

High expression and purification of immunogenic recombinant *T. gondii* SAG1 gene in *E. coli* and its preliminary application in *T. gondii* infection detection

CHENXiao-guang<sup>1</sup>, YANGPei-liang<sup>1</sup>, LIHua<sup>1</sup>, GONGYa<sup>1</sup>, FUNGMing-chiu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Parasitology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Department of Biology, Chinese University of Hong Kong, China)

**Abstract** Objective To investigate the expression of truncated *T. gondii* surface antigen SAG1 in *E. coli* and the detection of *T. gondii* infection with this recombinant antigen. Method The truncated SAG1 was subcloned into a prokaryotic expression vector pET-30a(+), and the recombinant plasmid was identified by enzyme digestion and the reading frame was confirmed by sequence analysis. A bacterium BL21 (DE3) was transformed with the recombinant plasmid and the recombinant product expressed in *E. coli* after a 3-hour induction with isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG), and the immunogenicity of the purified and refolded SAG1 (rSAG1) was tested with Western blot and ELISA. Results The truncated SAG1 of *T. gondii* was successfully subcloned and highly expressed in *E. coli*, and the expression product accounted for 31.58% of the total protein of cell lysate. After simple purification and refolding procedures, rSAG1 could be recognized by human toxoplasma-infective serum. The ELISA kits constructed by the rSAG1 were demonstrated to be highly sensitive and specific for the detection of *Toxoplasma* infection, almost comparable with immunoblotting method. Conclusion The truncated SAG1 was highly expressed in *E. coli* as a fusion protein and the recombinant antigen is immunogenic after simple purification and refolding procedures. The ELISA kit constructed with rSAG1 can be used to detect *Toxoplasma* infection.

**Key words** SAG1; toxoplasmosis; gene expression; parasitology

弓形虫是一种寄生在有核细胞内的寄生原虫, 可导致免疫功能低下的宿主产生严重疾病, 甚至威胁其生命。

弓形虫的主要表面抗原 1 (SAG1, 即以前命名的 P30) 已被证明是一种良好的诊断性和疫苗研制的候选分子<sup>[1]</sup>。研究表明 SAG1 是一种高度构象决定性抗

原, 其抗原活性与蛋白分子的正确折叠密切相关<sup>[2-4]</sup>。许多研究者曾试图用重组 DNA 技术来获得 SAG1, 但从大肠杆菌中获得的大部分重组 SAG1 由于错误折叠而并不具有特异的免疫反应性<sup>[1, 5]</sup>。国外学者报道在大肠杆菌中表达的全长 SAG1 之所以不能正确折叠, 主要归因于该蛋白 N 端信号肽和 C 端一段疏水性氨基酸的存在<sup>[1, 6]</sup>。在本研究中, 我们建立了截短型 SAG1 基因在大肠杆菌中的高效表达体系, 并在复性以后获得了具有良好抗原活性的重组 SAG1, 用重组 SAG1 构建的 ELISA 试剂盒对弓形虫病的检测具有高度的敏感性和特异性。

收稿日期: 2001-01-19

基金项目: 国家 863 项目 (国科生字 [2000]150 号); 广东省重大科技攻关项目基金 (99M01203G); Research Grants Council of Hong Kong (CUHK4142/98M)。

作者简介: 陈晓光 (1962-), 男, 河南洛阳人, 1985 年毕业于第一军医大学, 博士, 教授, 电话: 020-85148308, E-mail: xgchen@fjnet.guangzhou.gd.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试剂来源

载体质粒 pET-30a (+) 为美国 Novagen 产品, TALON™ 金属亲和树脂层析柱为美国 CLONTECH 产品, 6 000~8 000 D 孔径透析带为美国 Gelman 产品, 羊抗人 HRP 标记 IgG 为美国 BIO-RAD 产品, PVDF 膜、BCIP 及 NBT 购自德国 Boehringer Mannheim 公司, 内切酶和连接酶为美国 Promega 公司产品, 其余为国产分析纯。

### 1.2 血清来源

40 例孕妇血清、9 例中枢神经系统疾病患者血清、5 例器官移植患者血清来自第一军医大学南方医院, 50 例正常血清来自广州血站, 20 例丹麦标准血清由丹麦 Eskild Petersen 教授惠赠。

### 1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建 从构建好的质粒 pBV220-p30<sup>[7]</sup> 中用 PCR 扩增出编码 SAG1 成熟区第 61 到 290 位氨基酸的基因片断, 引物中含有 NcoI 和 HindIII 限制性内切酶酶切位点。将 PCR 扩增产物亚克隆入以 NcoI 和 HindIII 酶切的原核表达载体 pET-30a (+) 中, 插入基因通过测序 (ABIPRISMDyeTerminator CycleSystem) 进行确定。

1.3.2 SAG1 在 E. coli 中的表达 挑转化有重组质粒 pET-30a (+)-SAG1 的 BL21 (DE3) 的单菌落于加有卡那霉素 (100 μg/ml) 的 LB 液 (每升含 10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物和 10 g NaCl, pH 值为 7.0) 中 37℃ 培养过夜, 然后以新鲜 LB 培养基按 1:10 稀释。当培养液 D<sub>600</sub> 达到 0.5 时加入异丙基 β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG, 终浓度为 1.0 mmol/L) 进行诱导。诱导 3 h 后收集细菌。

#### 1.3.3 SAG1 的纯化和复性

1.3.3.1 包涵体的收集 将 40 ml 细菌培养物重悬于 10 ml 包涵体分离液 (50 mmol/L Tris·HCl pH 8.0; 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA); 0.2 mg/ml 溶菌酶, 悬液于液氮和 37℃ 水浴中反复冻融 5 次, 样品以 12000 r/min 离心 15 min, 小心倾去上清, 保留沉淀, 以包涵体洗涤液 (1 mol/L 尿素, 0.5% Triton X-100, 50 mmol/L Tris·Cl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 洗包涵体沉淀 2~3 次, 最后以 12000 r/min 离心 15 min 收集包涵体。

1.3.3.2 融合蛋白的纯化 操作步骤依 TALON™ 金属亲和树脂法纯化蛋白的操作手册 (美国 CLONTECH) 进行, 即: 取 2 ml 树脂悬液于一无菌离心管中, 700 r/min 离心 2 min, 收集树脂沉淀。在收集的包涵体中加入 10 ml 裂解液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 10 mmol/L Tris HCl pH 8.0, 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L NaCl), 震荡直至沉淀完全溶解, 以 12000 r/min 离心 5 min, 沉淀不可溶的残渣, 转上清于含树

脂的离心管中, 室温条件下轻轻摇动 20 min。700 r/min 离心 5 min 收集树脂, 以洗涤液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 8 mol/L 尿素, 100 mmol/L NaCl) 洗 3 次。加 8 ml 洗脱液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.0, 8 mol/L 尿素, 20 mmol/L MES, 100 mmol/L NaCl) 洗脱 6-组胺酸融合蛋白 SAG1, 轻轻震荡混匀后 700 r/min 离心 5 min, 收集含有融合蛋白 6×His-SAG1 的上清。1.3.3.3 复性 以稀释液 (50 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 稀释洗脱的融合蛋白或溶解的包涵体, 使蛋白的终浓度为 50~100 μg/ml, 而尿素的终浓度为 0.5~2.0 mol/L。样品先以透析液 I (0.5 mol/L 尿素, 20 mmol/L Tris·HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 于 4℃ 透析 24 h, 然后以透析液 II (20 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, pH 8.3) 再于 4℃ 透析 24 h。

1.3.3.4 浓缩 将透析过的样品分为每份 72 ml, 分别装入透析带, 埋于 PEG 20000 中。分别在终体积为原体积的 2/3、1/2、1/3、1/6 和 1/12 时停止浓缩过程。

### 1.4 ELISA 法检测

采用 ELISA 对 124 份弓形虫感染的人血清进行了分析。具体过程如下: 用复过性的重组 SAG1 包被 96 孔板 (10 μg/孔) 4 过夜, 然后以封闭液 (含 1% 无脂奶粉、0.05% Tween-20 的 PBS) 于室温封闭 1 h 后, 洗 3 次 (洗液为含 0.05% Tween-20 的 PBS)。每孔加 100 μl 待检血清 (原血清用含 1% 无脂奶粉的 PBS 按 1:100 稀释), 室温孵育 1 h 后, 洗涤 (20 mmol/L Tris·HCl, 500 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4), 每孔加入 100 μl 羊抗人 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, 同上洗 3 次, 每孔加入 100 μl 邻苯二胺显色 20 min, 加入 1 mol/L NaOH 终止显色, 于酶标仪上测定 D<sub>492</sub> 值。

### 1.5 免疫印迹

应用在昆虫杆状病毒系统中表达纯化并能被人弓形虫感染血清识别的重组 SAG1<sup>[8]</sup> 行 SDS-PAGE 电泳 (12% 凝胶), 先用考马氏亮蓝染色, 后转印到硝酸纤维素膜上, 分别对 124 例血清进行免疫印迹分析<sup>[9]</sup>, 凡能与 SAG1 条带特异结合的判为弓形虫感染阳性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 SAG1 表达

我们曾试过在不同的表达系统中表达 SAG1, 包括在大肠杆菌中的非融合的 pBV220 系统和融合的 pRSET 系统以及杆状病毒系统<sup>[7,8]</sup>。实验结果表明, SAG1 在非融合系统和杆状病毒系统中表达量很低, 在融合的 pRSET 系统中尽管 SAG1 的表达量很高, 但表达产物难以被抗天然 SAG1 的血清所识别。

现已明确 SAG1 的转录后修饰发生在其整合到

速殖子表面之前,包括 N 端信号肽的切割以及切除疏水的 C 端后加入一个含磷脂酰肌醇的糖脂类锚(成熟 SAG1C 端的确切切割位点还未知)。基于此,本研究中截取 SAG1 中被认为是成熟的一部分(第 61~290 个氨基酸)来进行表达。表达及纯化的 SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示。

图 1 表明融合的 6×His-SAG1 在 *E. coli* 中获得了高效表达,其表达量占细菌裂解液中总蛋白的 31.58%。6×His-SAG1 以不可溶的包涵体形式存在,其在包涵体中的含量超过 80%。经过纯化,6×His-SAG1 的纯度可达 95%。

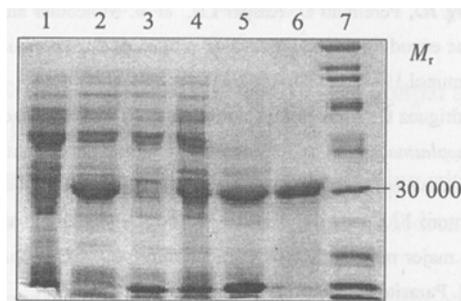


图 1 SAG1 在大肠杆菌中表达产物的凝胶电泳分析  
Fig.1 SDS-PAGE analysis of the expression of pET30(a)-SAG1 in *E. coli*

The amount of sample in each lane was equivalent to 100  $\mu$ l bacterial culture

Lane 1: Lysate of pET30(a)/DH5 $\alpha$ ; Lane 2: Lysate of pET30(a)-SAG1/DH5 $\alpha$ ; Lane 3: Supernatant of pET30(a)-SAG1/DH5 $\alpha$ ; Lane 4: Pellet of pET30(a)-SAG1/DH5 $\alpha$ ; Lane 5: Inclusion bodies of pET30(a)-SAG1/DH5 $\alpha$ ; Lane 6: Purified 6xHis-SAG1 of pET30(a)-SAG1/DH5 $\alpha$ ; Lane 7: Molecular weight marker

## 2.2 复性

外源基因在 *E. coli* 中表达后通常以不可溶的包涵体形式存在,尤其在其高效表达的时候,但经过变性剂的裂解,纯化的表达产物往往失去免疫活性。因此,为了获得具有免疫活性的重组蛋白,以适合的条件对蛋白进行复性处理是很必要的。为了解决这一问题,我们将变性后的重组 SAG1 稀释到较低的浓度(50~100  $\mu$ g/ml),然后以含有还原型和氧化型谷胱甘肽(浓度各为 0.2mmol/L)的透析液进行透析。经过这样处理后的 SAG1 可以被弓形虫感染的阳性血清所识别(图 2)。

图 2 表明纯化后但未经过透析的 6×His-SAG1 几乎不能被弓形虫感染的人血清所识别,然而经过复性后,尽管其蛋白浓度低至在考马斯亮蓝染过色的 SDS-PAGE 上难以看到,通过免疫印迹却可以检测到。相反,未经过复性的 6×His-SAG1 即使通过 SDS-PAGE 可以清楚地看到,却不能通过免疫印迹检测到。以上结果提示在 *E. coli* 中融合表达的 6×His-SAG1 经过复性处理后,获得了正确的空间构象。

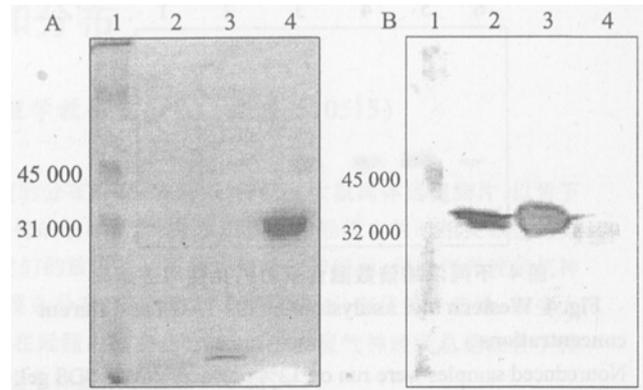


图 2 纯化后的 6×His-SAG1 凝胶电泳分析和免疫印迹分析  
Fig.2 SDS-PAGE and immunoblotting analysis of purified 6xHis-SAG1

A: Coomassie blue stained gel. Lane 1: Pre-stained molecular standards; Lane 2: Refolded TALONTM metal affinity resin-purified 6xHis-SAG1; Lane 3: Refolded inclusion bodies of 6xHis-SAG1; Lane 4: Unfolded 6xHis-SAG1  
B: Immunoblotting developed with human toxoplasma positive serum (1:100 dilution). Lanes 1-4 are the same as lanes 1-4 in A

## 2.3 浓缩样品的透析

为了使重组的融合蛋白重新折叠,通常要在较低的蛋白浓度下进行复性。但要达到应用的目的,还要对其浓缩,使其达到适当的浓度。就 6×His-SAG1 来说,我们发现,浓缩的时间是一个非常重要的因素。浓缩的时间太短,蛋白浓度太低,达不到应用目的;浓缩时间太长,蛋白浓度太高,蛋白就可能会聚集而失去免疫活性。于是我们测定了 6×His-SAG1 浓缩程度和免疫活性之间的关系(图 3、4)。

图 3、4 表明复性后的 6×His-SAG1 随着浓度的增加,其免疫活性也增强(图 3、4 的电泳条带 1~5);但当其浓度增加到一定程度时,蛋白会聚集并产生沉淀(图 3 的电泳条带 6),这些沉淀的蛋白失去了特异的免疫活性(图 4 的电泳条带 6)。

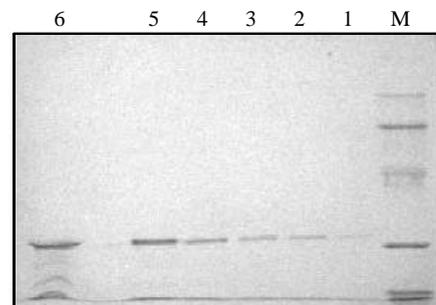


图 3 不同浓缩倍数复性包涵体的凝胶电泳分析  
Fig.3 SDS-PAGE analysis of the refolded inclusion bodies of 6xHis-SAG1 at different concentrations  
Nonreduced samples (10  $\mu$ l/well) were run on 12% polyacrylamide-SDS gel, then stained with Coomassie blue.  
M: Molecular standards; Lane 1: Purified rp30 before concentration; Lane 2-6: Ratio of purified rp30 in the final volume, with initial volume of 2/3, 1/2, 1/3, 1/6 and 1/12

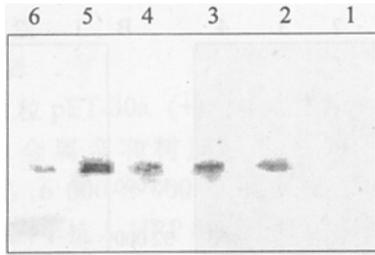


图 4 不同浓缩倍数融合蛋白的免疫印迹结果

Fig. 4 Western blot analysis of 6xHis-SAG1 at different concentrations

Nonreduced samples were run on 12% polyacrylamide-SDS gel, then transferred to nitrocellulose. Human toxoplasma positive sera (1:200 dilution) were tested for reactivity to the following. Lane 1: Purified rp30 before concentration; Lane 2-6: Purified rp30 of the ratio of final volume, with initial volume of 2/3, 1/2, 1/3, 1/6 and 1/12

#### 2.4 ELISA 和 Immunoblotting 两种检测结果的比较

124 份血清分别用 ELISA 和 Immunoblotting 两种方法进行检测,其结果分别见表 1 和表 2。

表 1 124 份血清 Immunoblotting 和 ELISA 测试结果

Tab.1 Testing results of 124 serum samples with Immunoblotting and ELISA respectively

Samples	n	Immunoblotting		ELISA	
		Positive	Negative	Positive	Negative
Pregnancy	40	4	36	5	35
CNS	9	2	7	3	6
Organ Transplants	5	2	3	2	3
Serum from Denmark	20	9	11	9	11
Normal Serum	50	4	46	5	45
Total	124	21	103	24	100

CNS: patients with trouble in the central nervous system

表 2 ELISA 和 Immunoblotting 检测 124 份血清结果的一致性和非一致性比较

Tab.2 The concordance and discordance of 124 serum samples detected by ELISA and Immunoblotting

	Positive	Negative	Total
ELISA	21	3	24
Immunoblotting	0	100	100

免疫印迹结果被视为检测的黄金标准。本实验中,ELISA 和免疫印迹检测的阳性符合率为 87.5% (21/24),不符合率为 12.5% (3/24);阴性符合率为 100% (100/100),表明基于重组 SAG1 的 ELISA 特异性检测与免疫印迹检测结果趋于一致。

在本研究中,SAG1 在 E.coli 中获得了高效融合表达,经过简易的纯化和复性过程,重组 SAG1 能被弓形虫感染的人血清所特异识别,可被用于弓形虫病的诊断。

#### 参考文献:

- [1] Burg JD, Perelman D, Kasper LH, et al. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* [J]. *Immunol*, 1988, 141(10): 3584-91.
- [2] Rodriguez C, Afchain D, Capron A, et al. Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (p30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes [J]. *Eur J Immunol*, 1985, 15(7): 747-9.
- [3] Santoro F, Charif H, Capron A. The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (p30) of *Toxoplasma gondii* [J]. *Parasite Immunol*, 1986, 8(6): 631-9.
- [4] Velge-Roussel F, Chardès T, Mevelec P, et al. Epitope analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1 [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1994, 66(1): 31-8.
- [5] Makioka A, Kobayashi A. Expression of the major surface antigen (P30) gene of *Toxoplasma gondii* as an insoluble glutathione S-transferase fusion protein [J]. *Jpn J Parasitol*, 1991, 40(4): 344-51.
- [6] Nagel SD, Boothroyd JC. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by glycolipid [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(10): 5569-74.
- [7] Chen XG, Liu GZ, Xu F, et al. Amplification, cloning, sequencing and expression of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* isolated in China [J]. *J Med Coll PLA*, 1994, 9(2): 98-102.
- [8] Chen XG, Fung MC, Ma X, et al. Baculovirus expression of the major surface antigen of *Toxoplasma gondii* and the immune response of mice injected with the recombinant P30 [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1999, 30(1): 42-6.
- [9] 李允鹤. 寄生虫病免疫学及免疫诊断 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991. 410-6.