

# 猪带绦虫 10 ku 蛋白基因在大肠杆菌中的表达及其初步应用

吴国华,郑亚东,贾万忠,张少华,景志忠,才学鹏\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室  
甘肃省动物寄生虫病重点实验室 农业部兽医公共卫生重点开放实验室,兰州 730046)

**摘要:** 将猪带绦虫六钩蚴 10 ku 蛋白(TSO10)和囊尾蚴 10 ku 蛋白(CE10)的基因克隆到表达载体中,构建重组表达载体 pGEX-4T-TSO10 和 pGEX-4T-CE10,经测序证明基因序列完全正确。重组表达载体转化大肠杆菌后诱导表达,用 SDS-PAGE、Western-blot 和薄层扫描检测表达产物。表达的目的蛋白纯化后用于血清样品 ELISA 检测。SDS-PAGE、Western-blot 和薄层扫描检测结果表明,六钩蚴和囊尾蚴 10 ku 蛋白基因均能在大肠杆菌中成功表达,表达的融合蛋白的相对分子质量约为 35 ku,并能被囊虫病病人阳性血清所识别,具有反应原性,表达量分别占菌体蛋白总量的 25%和 30%。ELISA 检测结果显示,10 ku 蛋白可用于囊虫病的诊断。

**关键词:** 猪带绦虫;10 ku 蛋白基因;表达;初步应用

中图分类号:S852.734;Q786

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2008)10-1402-04

## Expression of 10 ku Protein Gene from *Taenia solium* and Its Preliminary Application

WU Guo-hua, ZHENG Ya-dong, JIA Wan-zhong, ZHANG Shao-hua,  
JING Zhi-zhong, CAI Xue-peng\*

(Key Laboratory of Zoonoses of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture,  
Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu  
Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary  
Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** Recombinant expression plasmids, designated as pGEX-4T-TSO10 and pGEX-4T-CE10, were constructed by insertion of the TSO10 gene from *Taenia solium* oncosphere and the CE10 gene from the larva, respectively, and identified by sequencing. The results of SDS-PAGE, Western-blot and lamellar scanning showed that both fusion target proteins expressed in *E. coli* were 35 ku in molecular weight and can be recognized by the positive serum from a cysticercosis patient, and that their contents accounted for 25% and 30% of total bacteria proteins, respectively. Furthermore, the results of ELISA indicated that the recombinant proteins are suitable for diagnosis of cysticercosis.

**Key words:** *Taenia solium*; 10 ku protein gene; expression; preliminary application

猪囊虫病(Cysticercosis)是由猪带绦虫(*Taenia solium*)的幼虫——猪囊尾蚴(*Cysticercus cellulosae*)引起的一种人兽共患的寄生虫病。对囊虫病

的防治,目前尚无成熟的手段。药物治疗易产生耐药性,且药物残留对人体健康构成潜在威胁,因而具有局限性。囊尾蚴抗原、六钩蚴分泌抗原都能诱导

收稿日期:2007-10-19

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”项目(2006AA10A207)

作者简介:吴国华(1977-),江西赣州人,博士生,主要从事病原分子生物学及免疫诊断的研究,E-mail:wgh0104@yahoo.com.cn

\* 通讯作者:才学鹏,研究员,博士生导师,主要从事病原分子生物学及免疫机理研究,Tel:86-931-8342535,E-mail:caixp@public.lz.gs.cn

机体产生抗体,具有一定的保护作用,且均可作为诊断抗原<sup>[1]</sup>。但这些抗原都来自虫体本身,因而抗原来源十分有限,不能满足实际的需要。利用基因体外表达<sup>[2]</sup>和合成肽段<sup>[3]</sup>来制备抗原,进而研制诊断试剂盒,为囊虫病的诊断开辟了一条新的途径。

猪带绦虫 10 ku 蛋白基因是存在于六钩蚴和囊尾蚴阶段的基因。Yang 等<sup>[4]</sup>从猪囊尾蚴囊液分离出 10 ku 蛋白,免疫印迹分析表明能被囊虫病病人的血清识别。Chung 等<sup>[5]</sup>从 cDNA 文库中筛选出 10 ku 蛋白基因,该基因的 ORF 为 258 bp,共编码 85 个氨基酸。研究表明,用 10 ku 蛋白对囊虫病进行 ELISA 诊断具有很高的特异性和敏感性<sup>[6]</sup>。本研究将来源于猪带绦虫六钩蚴和囊尾蚴的 10 ku 蛋白基因亚克隆至表达载体 pGEX-4T-1 中,经诱导表达、纯化后用于抗囊虫血清的 ELISA 检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

BL21(DE3)、质粒 pGEM-TSO10 和 pGEM-CE10 以及表达载体 pGEX-4T-1 由本实验室保存。

### 1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶购自 Promega 公司。dNTPs、EcoR I、Xho I、Agarose Gel DNA Extraction Kit、DNA Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司。GST 蛋白纯化试剂盒购自 Amersham 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自北京经科。中等分子量蛋白 Marker 购自上海生工。猪囊虫病阳性血清由本实验室制备,囊虫病病人阳性血清由吉林农业大学囊虫病研究所提供。

### 1.3 引物的设计与合成

参照猪六钩蚴和囊尾蚴 10 ku 蛋白基因序列,用 olig(dT) 分别设计 2 条上游引物和 1 条通用的下游引物,由 TaKaRa 公司合成。六钩蚴 10 ku 蛋白基因上游引物:5'-CGGAATTCAAGGCGTC-CATCTTTCT-3';囊尾蚴 10 ku 蛋白基因上游引物:5'-CGGAATTCCTGCGTCCATCTTTCT-3';通用下游引物:5'-GGCCCTCGAGCTACTCG-TTTTCAAGGC-3'。2 条上游引物带 EcoR I 酶切位点,下游引物带 Xho I 酶切位点。

### 1.4 基因的克隆

以含 10 ku 蛋白基因的质粒 pGEM-TSO10 和 pGEM-CE10 为模板,按以下程序进行 PCR 扩增:94 °C 45 s,51 °C 30 s,72 °C 18 s,30 个循环;最后

72 °C 延伸 5 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,观察结果并纯化回收 PCR 产物。

### 1.5 重组表达载体的构建和鉴定

将纯化回收的 PCR 产物用 EcoR I 和 Xho I 双酶切,经电泳纯化回收目的片段,与经同样双酶切后得到的线性化表达载体 pGEX-4T-1 在 T<sub>4</sub>DNA 连接酶的作用下进行连接,分别构建重组表达载体 pGEX-4T-TSO10 和 pGEX-4T-CE10。连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落于 LB 培养液中,振荡培养过夜,按常规方法提取质粒<sup>[5]</sup>。PCR 和酶切鉴定后,选取阳性克隆送至 TaKaRa 公司测序,验证其阅读框是否正确。

### 1.6 重组质粒的诱导表达

将阳性重组菌按 1:100 的比例接种 3 mL 2×YT 培养液(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37 °C 250 r/min 振荡过夜。取过夜培养物 200 μL 接种于 20 mL 相同 2×YT 培养液中,37 °C 250 r/min 振荡至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 °C 诱导表达 5 h 后,收集菌液,进行 SDS-PAGE 分析,同时用未诱导的菌液和诱导的空载体菌液作阴性对照。

### 1.7 表达产物的检测<sup>[7-8]</sup>

1.7.1 SDS-PAGE 检测 用 200 μL 8 mol/L 尿素悬浮收集的菌液,加入上样缓冲液,混匀,水浴煮沸 5 min,上样。80 V 电压下电泳至溴酚蓝到分离胶后把电压调至 120 V,继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部。取下凝胶,考马斯亮蓝染色液染色 4 h 后脱色,待蓝色背景完全脱净,观察和分析电泳结果。

1.7.2 Western-blot 分析 蛋白经 SDS-PAGE 后在低温条件下 160 mA 恒流电转 2.5 h,取下 PVDF 膜,经漂洗、封闭后依次加入一抗、酶标二抗,最后将 NC 膜转移到现配的 DAB 底物溶液中,待出现条带时,立即入 PBST 缓冲液中终止显色,并观察结果。

### 1.8 表达产物的纯化

收集 1 L 诱导菌,按 100 mg/mL 加入 1×PBS 重悬,超声裂菌,收集上清与 Glutathione Sepharose 4B 混合,室温轻柔搅拌 30 min,过 Amersham 一次性亲和柱,控制流速为 1 mL/min,以 50 倍柱床体积的 1×PBS 洗柱,用洗脱液进行洗脱,收集流出的液体,即为纯化的融合蛋白。

### 1.9 表达产物的应用

将纯化的重组蛋白包被酶标板,用间接 ELISA 法检测猪囊虫血清 12 份和人囊虫病病人血清 36 份。

具体操作:(1)包被纯化的重组蛋白,1 μg/孔;(2)封闭后加适当稀释的猪囊虫病血清和囊虫病人血清,同时设猪囊虫阴性血清和健康人血清作为对照,37 °C反应 1 h;(3)加入 HRP 标记第二抗体(抗人 IgG 抗体)37 °C反应 1 h;(4)加 OPD 底物显色并终止,在酶标仪上于 492 nm 下读取 OD 值, P/N 比大于 2.5 判为阳性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物的电泳结果

琼脂糖凝胶电泳结果表明,以含 10 ku 蛋白基因的质粒为模板,经 PCR 扩增,获得了 260 bp 左右的特异带,与预计的片段大小相一致(图略)。

### 2.2 重组表达载体的构建和鉴定

构建的重组表达载体 pGEX-4T-TSO10 和 pGEX-4T-CE10,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落于 LB 培养液中,振荡培养过夜,碱裂解法提取质粒,阳性质粒经 PCR 和双酶切鉴定,均得到了 260 bp 的片段。阳性克隆的测序结果证明,基因的完整阅读框正确地插入了表达载体。

### 2.3 表达产物的检测结果

2.3.1 SDS-PAGE 检测 电泳显示,经诱导的重组菌表达出 35 ku 的融合蛋白,与推测的蛋白大小相一致。未经诱导的重组菌则没有得到表达。而诱导的空载体仅出现 26 ku 左右的 GST 条带,如图 1 所示。薄层扫描分析检测表达产物,结果表明,六钩蚴和囊尾蚴 10 ku 蛋白基因的表达量分别占菌体蛋白总量的 25%和 30%。

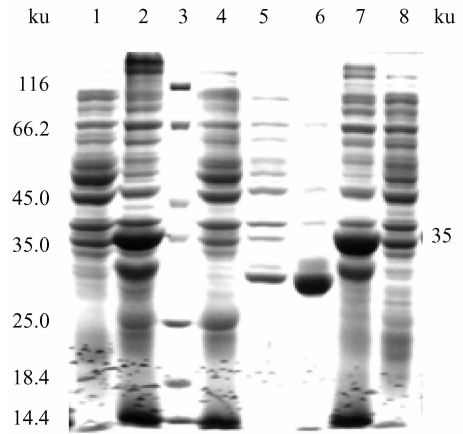
2.3.2 Western-blot 分析 表达的融合蛋白经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜上进行免疫印迹反应,在 35 ku 出现明显的阳性反应带,而诱导的空载体对照未出现反应带,说明表达产物能被囊虫病人血清所识别,具有反应原性,如图 2 所示。

### 2.4 表达产物的纯化

表达的蛋白经 GST 亲和柱纯化后杂蛋白基本除去,目的蛋白的纯度较高,如图 3。经紫外分光光度计测定,目的蛋白 TSO10 和 CE10 的浓度分别为 0.986 和 1.24 mg/mL。

### 2.5 ELISA 血清检测的结果

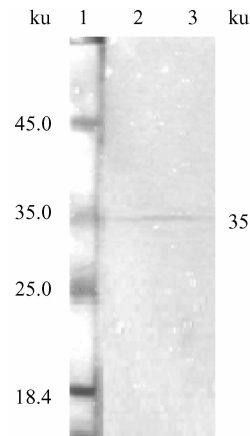
TSO10 检出 8 份阳性猪血清,29 份阳性人血清,检出率分别为 66.67%(8/12)和 80.56%(29/36),而用 CE10 为诊断抗原其检出率分别为 66.67%(8/12)和 86.11%(31/36),两者差异不显著。



1. pGEX-4T-TSO10 transformants without IPTG induction; 2. pGEX-4T-TSO10 transformants with IPTG induction; 3. Protein marker; 4. Negative control of BL21; 5. pGEX-4T-1 vector without IPTG induction; 6. pGEX-4T-1 vector with IPTG induction; 7. pGEX-CE10 transformants with IPTG induction; 8. pGEX-CE10 transformants without IPTG induction

图 1 表达产物的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed proteins in BL21



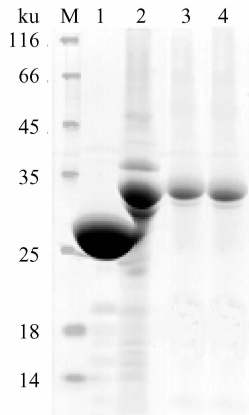
1. Protein marker; 2. Expressed products of pGEX-4T-TSO10; 3. Expressed products of pGEX-4T-CE10

图 2 表达产物的 western-blot 检测

Fig. 2 Western-blot analysis of expressed protein

## 3 分析与讨论

3.1 本试验选择了谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合表达载体 pGEX-4T-1 表达 10 ku 蛋白基因,该载体具有诱导型启动子、氨苄抗性筛选标记和有效的转录终止子。目前在原核表达系统中使用最普遍的强启动子主要有大肠杆菌的 Lac 启动子、Tac 启动子、Trp 操纵子的启动子、λ 噬菌体的 P<sub>L</sub>启动子、T<sub>7</sub>噬菌体的 T<sub>7</sub>启动子<sup>[9]</sup>。pGEX-4T-1 带有的 Tac 启动子是来源



M. Protein marker; 1. Purified GST; 2. CE10 protein before purifying; 3, 4. TSO10 and CE10 purified by GST-FF affinity chromatography

图 3 纯化产物的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE of purified proteins

于 Lac 和 Trp 的一组杂合启动子,但比 Lac 和 Trp 都强得多,属于强启动子,能促使外源基因高效表达。融合表达的蛋白不受宿主蛋白酶的降解,提高了外源蛋白的稳定性。而且融合蛋白可用谷胱甘肽琼脂糖通过亲和层析方便地从细菌裂解物中纯化,纯化的条件为非变性条件以维持蛋白的完整性,解决了目的蛋白纯化和复性难的问题。对血清 ELISA 检测的结果表明,所获得的目的蛋白可用于免疫诊断。

**3.2 猪囊虫虫体抗原能诱导中间宿主产生强烈的免疫反应<sup>[10]</sup>**,但由于猪囊虫的生活史复杂,抗原成分众多,且抗原的表达随虫体发育而呈阶段性的改变,导致抗原变异比免疫应答更为迅速,使宿主产生的抗体失去活性,不能产生完全的保护。猪带绦虫的 10 ku 蛋白是一种阶段性抗原,其六钩蚴阶段和囊尾蚴阶段的核苷酸序列同源率为 97.67%,有 6 个核苷酸不同,推导的氨基酸有 3 个不同。通过表达纯化后用作诊断抗原,二者无显著差异,推测可能是这 3 个氨基酸不在抗原决定簇上。而造成这种核苷酸阶段性变异的原因还有待于更深入的研究。

**3.3 猪囊虫大分子蛋白在诊断中由于与其它绦虫有交叉反应,特异性低,因而目前对囊虫的诊断抗原主要是侧重于低分子量蛋白(通常小于 30 ku)的研究**,如 8 ku<sup>[11]</sup>、10 ku<sup>[5-6]</sup>、14 ku<sup>[12-13]</sup>、24 ku 蛋白<sup>[2]</sup>等。国内外对猪带绦虫六钩蚴 10 ku 蛋白基因的研究报道较少,对其功能和作用还不甚了解。通过免疫印迹分析和 ELISA 应用,表明六钩蚴阶段的 10 ku 蛋白具有良好的反应原性,与囊尾蚴阶段的 10 ku 蛋白一样,可用于囊虫病的诊断。

### 参考文献:

- [1] DORNY P, BRANDT J, ZOLI A, et al. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis [J]. *Acta Tropica*, 2003, 87(1): 79-86.
- [2] HANCOCK K, PATTABHI S, FATIMA W, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2006, 147(1): 109-117.
- [3] FERRER E, CORTÉZ M M, CABRERA Z, et al. Oncospherical peptide-based ELISAs as potential sero-epidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela [J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 99(8): 568-576.
- [4] YANG H J, CHUNG J Y, YUN D, et al. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes [J]. *Parasite Immunology*, 1998, 20: 483-488.
- [5] CHUNG J Y, BAHK Y Y, HUH S, et al. A recombinant 10kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis [J]. *The Journal of Infectious Disease*, 2000, 181(5): 1 870-1 872.
- [6] LEE E G, LEE M Y, CHUNG J Y, et al. Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis [J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 99(12): 919-926.
- [7] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996: 23-24.
- [8] 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 880-893.
- [9] 顾天成, 陈章良. 现代生物技术导论 [M]. 北京: 人民教育出版社, 2000: 48-51.
- [10] EVANS C A, GONZALEZ A E, GILMAN R H, et al. Immunotherapy for porcine cysticercosis; implications for prevention of human disease [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56: 33-37.
- [11] FERRER E, BONAY P, FOSTER-CUEVAS M, et al. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007, 152 (1): 90-100.
- [12] DA SILVA M R M, MAIA A A, ESPINDOLA N M, et al. Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis [J]. *Acta Tropica*, 2006, 100 (3): 192-198.
- [13] ASSANA E, KANOBANA K, TUME C B, et al. Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis [J]. *Research in Veterinary Science*, 2007, 82 (3): 370-376.