

文章编号: 1000-7423(2008)-01-0021-04

【论著】

# 日本血吸虫表膜蛋白 Tetraspanin 2-A 基因的克隆、表达与鉴定

王阳阳, 刘淼, 朱绍春, 任翠平, 沈际佳\*

**【摘要】** 目的 扩增并表达日本血吸虫表膜蛋白(SjTsp2-A)基因 *SjTsp2*。方法 根据与曼氏血吸虫表膜蛋白 *SmTsp2* 基因同源的 *SjTsp2* 序列 (编号为 AY810722) 设计引物, 体外扩增目的蛋白基因, 并将其亚克隆入原核表达载体 pET28a, 转化至大肠埃希菌 (*E. coli*) BL21 株, 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导表达, 用纯化的重组蛋白免疫小鼠, ELISA 检测其血清抗体效价, 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析鉴定其免疫反应性。结果 PCR 扩增获得 *SjTsp2* 基因大环核苷酸序列为 228 bp, 与曼氏血吸虫表膜蛋白 (*SmTsp2*) 的氨基酸序列同源性为 52%。*SjTsp2* 基因亚克隆入 pET28a 并可溶性表达, 免疫小鼠可产生高滴度(最高 1:32 000)特异性抗体。Western blotting 分析结果表明, 纯化的 SjTsp2-A 蛋白能被疫区居民血吸虫抗体阳性者血清、急性及慢性血吸虫病患者血清识别, 与健康人血清无反应。结论 日本血吸虫表膜蛋白基因 *SjTsp2* 在体外获得表达, 其表达蛋白具有一定的抗原性。

**【关键词】** 日本血吸虫; 膜蛋白; 四跨膜超家族蛋白; 基因; 抗原性

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

## Cloning, Expression and Identification of Membrane Protein Tetraspanin 2-A of *Schistosoma japonicum*

WANG Yang-yang, LIU Miao, ZHU Shao-chun, REN Cui-ping, SHEN Ji-jia

(Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**【Abstract】 Objective** To clone and express a membrane protein (Tetraspanin 2) gene of *Schistosoma japonicum* (*SjTsp2*). **Methods** A pair of primers was designed to amplify the *SjTsp2* gene which was subcloned into prokaryotic plasmid pET28a(+). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(D3) and followed by expression of the protein induced by IPTG. The protein was purified by affinity chromatography and used to immunize BALB/c mice. Dilution of antibody against SjTsp2 was determined by ELISA. The protein was also identified by Western blotting. **Results** Big loop of SjTsp2-A, 228 bp, was amplified *in vitro* by PCR. Its deduced amino sequence shared 52% similarity with *SmTsp2*. The soluble recombinant SjTsp2-A was expressed in the experiment and high dilution antibody against the recombinant (1:32 000 in maximum) was produced in immunized mice. SjTsp2-A reacted positively with sera of acute and chronic schistosomiasis patients but not with sera from healthy persons by Western blotting. **Conclusion** *SjTsp2* has been expressed and shows certain antigenicity.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; Membrane protein; Tetraspanin 2; Gene; Antigenicity

Supported by the Natural Science Foundation of Anhui Province (No.050430805) and Educational Fund of Anhui Province (No.2006KJ3586)

\* Corresponding author, E-mail: shenjijia@hotmail.com

研制血吸虫疫苗是防治血吸虫病的理想方法之一, 但其研究进展缓慢。虽然 WHO 推荐了 6 种候选疫苗分子, 但其保护作用达到 40% 以上的较少<sup>[1]</sup>。血吸虫虫体表膜是直接和宿主相互作用的部位, 其中仅表膜外表面的抗原分子才有可能被宿主免疫系统识别, 表膜抗原分子是疫苗靶点研究热点之一<sup>[2]</sup>。Braschi

等<sup>[3]</sup>用长链生物素标记活体曼氏血吸虫, 发现 9 种分子暴露于虫体外表面, 其中包括曼氏血吸虫四跨膜家族蛋白 (*Schistosoma mansoni* Tetraspanin 2, *SmTsp2*)。Tran 等<sup>[4]</sup>研究发现, 用 *SmTsp2* 蛋白免疫小鼠具有 57% 的减虫率和 64% 减卵率, 表明 *SmTsp2* 蛋白可能是有潜力的疫苗分子。本研究采用分子生物学方法, 克隆表达日本血吸虫表膜四跨膜超家族蛋白 (*SjTsp2*) 大环部分, 并分析其与 *SmTsp2* 蛋白的氨基酸同源性以及免疫活性。

基金项目: 安徽省自然科学基金 (No. 050430805); 安徽省教育厅基金 (No. 2006KJ3586)

作者单位: 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

\* 通讯作者, E-mail: shenjijia@hotmail.com

## 材料与方 法

### 1 主要材料

1.1 文库、质粒及菌种 日本血吸虫(中国大陆株)童虫 cDNA 文库,采用美国 Clontech 公司 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒,由本教研室构建<sup>[5]</sup>。T 载体 pMD18-T 购自日本 Takara 公司,载体 pET28a(+),大肠埃希菌 (*E. coli*) XL1-blue、BL21(D3)株由本室保存。

1.2 血清与实验小鼠 健康人血清采自安徽医科大学一年级健康新生,均来自非血吸虫病流行区。急、慢性血吸虫病患者血清各 30 份,分别采自安徽省安庆市疫区血吸虫病患者。疫区居民血吸虫抗体阳性者血清 4 份,采自长期生活在安徽省安庆市高河镇血吸虫病流行区居民,年龄 40~50 岁(男、女各 2 人),特点是均经常接触疫水,从未接受过血吸虫病药物治疗,采血前均经改良加藤法 3 送 6 检虫卵阴性,血清中血吸虫特异性抗体检测呈强阳性(间接凝集实验 1:40 阳性和 ELISA 法>1:400 阳性)<sup>[6]</sup>。7 周龄清洁级雌性 BABL/c 小鼠,由安徽省实验动物中心提供。

1.3 试剂 限制性内切酶、DNA 标志物(DL2000)购自日本 Takara 公司, T<sub>4</sub> 连接酶、蛋白质标志物购自立陶宛 MBI 公司, GenExtract™ 质粒快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶电泳 DNA 纯化回收试剂盒均购自北京道普生物科技有限公司。带组氨酸标签的蛋白纯化试剂盒购自美国 Novagen 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L)(H+L 指该抗体是抗 IgG 的轻链和重链的多抗)和 HRP 标记羊抗人 IgG(H+L),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。化学发光试剂盒(ECL)购自美国 Pierce 公司。其余试剂均为国产分析纯。

### 2 *SjTsp2* 基因扩增与克隆

2.1 基因扩增 根据与 *SmTsp2* 基因同源的日本血吸虫基因序列(编号为 AY810722)设计引物, P1: 5'-GAA TTCATGGAAAAGCCGAAGGTGA-3'; P2: 5'-AAGCTT CTAGTGCTTTTATAGTCAGA-3', 分别引入限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点(划底线部分)。由上海生物工程技术有限公司合成。以日本血吸虫童虫 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增。反应条件为 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 54℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 最后 72℃ 10 min。

2.2 基因克隆 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳 DNA 纯化回收试剂盒回收,与 T 载体 pMD18-T 4℃ 连接,过夜,转化感受态细菌 *E. coli* XL1-blue,涂于含 100 μg/ml 氨苄青霉素 LB 固体平皿。挑取单一菌落,提取质粒为模板进行 PCR 扩增、双酶切和 DNA 序列测定。确

定阳性菌落的质粒,经双酶切,纯化回收目的片段,与经过相同处理的表达质粒 pET28a(+)连接,转化感受态细菌 *E. coli* XL1-BLUE,涂于 100 μg/ml 卡那霉素 LB 固体平皿。挑取单一菌落,同样经 PCR 扩增、双酶切和 DNA 序列测定。两次 DNA 测序皆由上海生物工程技术有限公司完成。

### 3 *SjTsp2* 基因表达及产物纯化

3.1 基因表达 将测序正确的表达重组质粒 pET28a(+)/*SjTsp2* 转化感受态细菌 *E. coli* BL21(D3),涂于卡那霉素 LB 固体平皿,挑取单一菌落,提取质粒,进行 PCR 扩增和双酶切鉴定。将鉴定正确的菌落接种于含 100 μg/ml 卡那霉素液体 LB 培养基中扩大培养,当吸光度 ( $A_{600}$  值)为 0.8 时,加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG,终浓度为 1 mmol/L)进行诱导表达,分别收集诱导前以及诱导后 1、3 和 5 h 的菌液。

3.2 产物纯化 大量诱导重组菌 (200 ml) 经 1 500×g 离心 10 min,收集上清,用 20 ml PBS 重悬,反复冻融 3 次,冰浴超声破碎(400 W×6 次,每次超声 3 s,间歇 3 s,停 5 min)。10 000×g 离心 10 min,收集上清。经 0.45 μm 定性滤纸过滤后进行亲和层析纯化(按产品使用说明操作)。纯化表达产物 *SjTsp2* 蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析验证。

### 4 纯化蛋白 *SjTsp2*-A 免疫小鼠及其抗体滴度测定

纯化的 *SjTsp2* 蛋白,经福氏完全佐剂乳化后皮下注射免疫小鼠,剂量为每次 100 μg/鼠。2、4 周后再用经不完全佐剂乳化的 *SjTsp2* 蛋白同法加强免疫 2 次。于末次免疫后 2 周尾静脉取血,ELISA 检测抗体效价,即每孔包板纯化 *SjTsp2* 蛋白(5 μg/ml)100 μl,4℃ 过夜, PBST 洗涤 4 次,5 min/次,含 5% 脱脂奶粉的 PBS 作封闭液,每孔 200 μl,4℃ 过夜,同上洗涤,免疫鼠血清和健康鼠血清经 PBS 倍比稀释 (1:500~1:64 000) 加至反应孔,每孔 100 μl,37℃ 作用 1.5 h,同上洗涤。然后每孔加入山羊抗小鼠 HRP-IgG (1:100 000 PBS 稀释)100 μl,作用 1 h,同上洗涤,最后用二氨基联苯胺(DAB)显色。

### 5 纯化蛋白 *SjTsp2*-A 的蛋白质印迹分析(Western blotting)

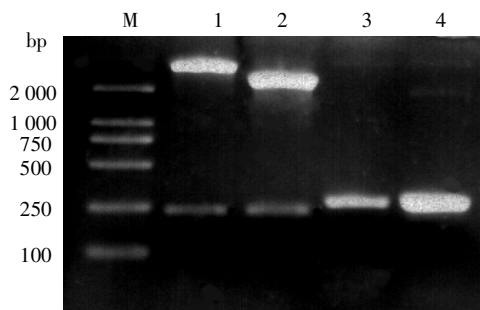
纯化的 *SjTsp2* 蛋白经 15% SDS-PAGE,然后电转移 (350 mA, 30 min) 至硝酸纤维素膜(NC 膜)。将该 NC 膜剪成条状,经过 5% 脱脂奶粉液封闭 2 h,分别与健康人血清、血吸虫急性感染者及慢性感染者血清,以及疫区居民血吸虫抗体阳性者血清于室温 (25℃) 作

用 1.5 h, 然后用 PBST (PBS 中含 0.1%吐温) 洗涤 5 次, 10 min/次。再将该膜放于 1:100 000 稀释的羊抗人 HRP-IgG 二抗液中, 置室温 1 h, 同上洗涤。最后通过化学发光法(按试剂使用手册)检测抗原抗体反应。

## 结 果

### 1 *SjTsp2* 基因克隆与亚克隆

以血吸虫童虫 cDNA 文库为模板, 扩增出 228 bp *SjTsp2* 基因。PCR 产物先与 T 载体 pMD18-T 连接为 pMD18-T-*SjTsp2*, 然后亚克隆至表达载体 pET28a(+), 构建表达 *SjTsp2* 基因的重组质粒 pET28a (+)-*SjTsp2*。两次连接产物的 PCR 与双酶切鉴定结果如图 1。



M: DNA 标志物(DL2000), 1, 3: pET28a(+)-*SjTsp2* 酶切和 PCR 分析, 2, 4: pMD18-T-*SjTsp2* 酶切和 PCR 分析。  
M: DNA marker(DL2000), 1, 3: Restriction endonuclease and PCR analysis of pET28a(+)-*SjTsp2*, 2, 4: Restriction endonuclease and PCR analysis pMD18-T-*SjTsp2* of-*SjTsp2*.

图 1 pMD18-T-*SjTsp2*, pET28a(+)-*SjTsp2* 的酶切和 PCR 鉴定  
Fig. 1 Identification of pMD18-T-*SjTsp2* & pET28a(+)-*SjTsp2* by restriction endonuclease and PCR analysis

### 2 *SjTsp2* 基因测序与分析

与 T 载体连接的产物取 3 个 (命名为 *SjTsp2*-A、*SjTsp2*-B 和 *SjTsp2*-C), 经测序各不相同, 皆与 *SjTsp2* 基因同源, 而与 *SmTsp2* 基因的同源性分别为 52%、57%和 58%。选择其中的 *SjTsp2* 基因进行亚克隆和表达, 其基因序列见图 2, 其中黑框字为限制性内切酶的酶切位点。将 *SjTsp2*-A 蛋白氨基酸序列与 *SmTsp2* 蛋白氨基酸序列比对, 同源性为 52%(图 3)。

图 3 两序列间的字母表示完全相同的氨基酸, 而“+”表示性质相似但序列不同的氨基酸, “空格”表示两序列中存在的不同的氨基酸。

GAATTCATGGAAGCCGAAGATGAAAAGACATGTCACACTACAGCATCA  
AAAGACCTTGTAGGACAATACGGACACCGATAGACGCCTAGACAAAGTT  
TFGGACGAAATCAAGATAAATTACAATGTTGTGGTCCGAATCGCCTG  
CTGATTATTCTAGCGAAAGACCTCCATCATGTAAGAATTATAATGAGGG  
ATGCATTGGTAAAGTCACCGATCTGACTAAAAGCACTAGAAGCTT

黑框内字为限制性内切酶的酶切位点。  
Letters in box stand for sites of *EcoR*I and *Hind*III.

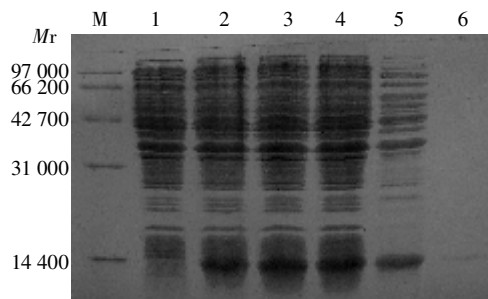
图 2 *SjTsp2* 基因测序结果  
Fig. 2 Sequence of *SjTsp2* gene

*SjTsp2*-A 1 MEKPKMKRHVTTASKDLVGYGHDRRLDKVLDEIQDKLQCCGAESPADYSSERPSPSCK-- 174  
+EKPK+K+H+T+A K LV +Y +D +KV DEIQ KL CCGA+SP DY P SC  
*Sm-TSP-2* 106 VEKPKVKKHITSALKKLVKDYRNDHEVVRKVFDEIQKLHCCGADSPKDYGENPPISCKD 165  
*SjTsp2*-A 175 --NYNEGCGIKVDTLTKKH 225  
+ EGCI KV+DL+K H  
*Sm-TSP-2* 166 GVQFTEGCIKKVSDLSKAH 184

图 3 *SjTsp2* 蛋白与 *SmTsp2* 蛋白氨基酸序列比对  
Fig. 3 Alignment of amino acid sequences of *SjTsp2* protein & *SmTsp2* protein

### 3 *SjTsp2* 基因诱导表达与其蛋白纯化

诱导前及诱导后各时相以及纯化后蛋白, 经过 SDS-PAGE (5%浓缩胶 50 V, 15%分离胶 100 V), 其中 1 条带随着诱导时间的延长而增宽, 3 h 达最大; 并且在超声破碎后的上清电泳中也可见到此条带。该条带与目的蛋白大小相近(融合 3 个组氨酸, 相对分子质量约为 *Mr* 12 000) (图 4)。



M: 蛋白质标志物, 1: 诱导前(含重组质粒菌体蛋白), 2: 诱导后 1 h, 3: 诱导后 3 h, 4: 诱导后 5 h, 5: 超声后的上清, 6: 纯化后的蛋白。  
M: Protein marker(low MW), 1: Total protein of BL21/pET28a/*SjTsp2* before induction, 2: 1 h after induction, 3: 3 h after induction, 4: 5 h after induction, 5: Supernatant of ultrasonic BL21/pET28a/*SjTsp2* 5 h after induction by centrifugation, 6: Purified protein.

图 4 重组质粒 pET28a(+)/*SjTsp2* 转化感受态 *E. coli* BL21(D3) 经 IPTG 诱导表达结果

Fig. 4 Expression of *E. coli* BL21 transformed with the recombinant plasmid induced by IPTG

### 4 免疫小鼠抗体效价的 ELISA 检测

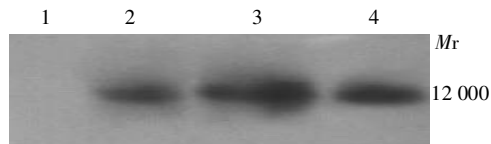
经 ELISA 检测, 免疫小鼠抗基因重组 *SjTsp2* 蛋白的 IgG 效价最高可达 1:32 000。

### 5 纯化蛋白 Western blotting 分析

纯化的 *SjTsp2* 重组蛋白能被急性、慢性血吸虫病患者血清以及疫区居民血吸虫抗体阳性者血清识别, 而不被健康人血清识别(图 5)。

## 讨 论

血吸虫表膜为合胞体, 并且是虫体与宿主直接相互作用的部位, 参与血吸虫营养、渗透调节、免疫侵袭与免疫逃避等作用<sup>[7]</sup>。血吸虫表膜分子的研究是血吸虫疫苗研究的热点。WHO 推荐的血吸虫表膜蛋白 Sm23, 其 DNA 共价疫苗对小鼠的保护作用较为明显,



1: 健康人血清, 2: 急性血吸虫病患者血清, 3: 慢性血吸虫病患者血清, 4: 疫区居民血吸虫抗体阳性者血清。

1: Normal human serum, 2: Serum from case with acute schistosomiasis, 3: Serum from case with chronic schistosomiasis, 4: Serum of local resident with antibody against *Schistosoma japonicum*.

图 5 SjTsp2-A 蛋白质免疫印迹分析

Fig. 5 Analysis of SjTsp2-A protein by Western blotting

达到 44%<sup>[8]</sup>。

Tran 等<sup>[4]</sup>利用信号序列截留 PCR 方法(signal sequence trapping PCR)扩增并表达出表膜蛋白 SmTsp1 和 SmTsp2 的大环部分,用这两种表膜蛋白分别免疫 CBA/CaH 小鼠,再经攻击感染,结果表明,SmTsp1 蛋白免疫小鼠获得 34%减虫率和 52%减卵率,而 SmTsp2 蛋白则获得 57%减虫率和 64%减卵率。SmTsp2 蛋白的保护作用明显高于 WHO 推荐疫苗的保护作用(约 40%或者更低)。Tran 等<sup>[4]</sup>在巴西曼氏血吸虫病流行区 MinasGerais 州,采集到推测具有抗血吸虫感染者的血清,用该血清对 SmTsp2 的免疫反应结果表明,几乎完全是 IgG3 和 IgG1 反应,而健康人和慢性血吸虫病患者血清对该蛋白几乎不发生反应。本研究得到的 SjTsp2 蛋白与 SmTsp2 氨基酸同源性达 52%,虽然与血吸虫病流行区血吸虫抗体阳性者血清发生明显反应,但同时也能被急、慢性血吸虫病患者血清所识别。这是由于种或期的不同,还是该蛋白存在不同亚型,值得进一步研究。而 SjTsp2 蛋白做为抗日本血吸虫感染疫苗候选分子的作用有待研究。

血吸虫四跨膜家族蛋白是包括很多不同分子的蛋白家族,除了 Tsp2 和 Tsp1,还有 Sm29<sup>[9]</sup>、Calpain<sup>[10]</sup>及 Sm23<sup>[11]</sup>等,它们 4 次跨膜,膜外有两个环状区域,其中大环由 70~90 个氨基酸组成,这些环状结构可能介导特殊的蛋白质相互作用<sup>[12]</sup>。Andre 等<sup>[13]</sup>认为四跨膜家族蛋白对人类细胞膜网络维持与组装是必要的,而血吸虫四跨膜家族蛋白对其自身细胞膜的维持是否具有相似功能,有待研究。

本研究从童虫 cDNA 文库中扩增 SjTsp2 基因时,发现 3 个不同基因,3 者之间核酸序列和氨基酸序列的相似性皆为 90%左右,推测可能都属于表膜蛋白家族,或者是 SjTsp2 基因的 3 个不同亚型。表膜蛋白家族可能参与免疫侵袭,免疫共沉淀实验结果表明,血吸虫表膜蛋白分子能与宿主组织相容性复合物(MHC)

分子结合。有趣的是,SmTsp2 蛋白能与主要组织相容性复合体 II (MHC II) $\alpha$  重链结合<sup>[12]</sup>,推测 SmTsp2 蛋白可能利用宿主分子的掩蔽而逃避宿主的免疫攻击<sup>[4]</sup>。而抗表膜蛋白抗体将封闭表膜蛋白分子与宿主的相互作用,使虫体暴露,受到机体的免疫攻击,从而限制虫体生长与繁殖,导致虫体死亡<sup>[4]</sup>。SjTsp2 蛋白是有希望的疫苗候选分子,值得深入研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccines: research to development[J]. Parasitol Today, 1998, 14: 99-104.
- [2] Alex L, Mai T, Mark SP. *Schistosoma* membrane proteins as vaccines[J]. Int J Parasitol, 2007, 37: 257-263.
- [3] Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5: 347-356.
- [4] Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis [J]. Nat Med, 2006, 12: 835-840.
- [5] Tong C, Shen JJ, Jiang ZJ, et al. Construction and identification of schistosomulum cDNA library[J]. Chin J Zoonoses, 2002, 18(4): 52-54. (in Chinese)  
(童畅, 沈际佳, 蒋作君, 等. 日本血吸虫中国大陆株肝期童虫 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(4): 52-54.)
- [6] Lei L, Zhao ZZ, Shen JJ, et al. Construction and primary identification of humanized Fab fragment phage antibody library against *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23: 386-389. (in Chinese)  
(雷黎, 赵志荣, 沈际佳, 等. 人源化抗日本血吸虫噬菌体抗体库的构建及初步鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23: 386-389.)
- [7] Jones MK, Gobert GN, Zhang L, et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions[J]. Bioessays, 2004, 26: 752-765.
- [8] Da'Dara AA, Skelly PJ, Walker CM, et al. A DNA-prime/protein-boost vaccination regimen enhances Th2 immune responses but not protection following *Schistosoma mansoni* infection[J]. Parasit Immunol, 2003, 25: 429-437.
- [9] Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA, et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies [J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144: 382-391.
- [10] Siddiqui AA, Phillips T, Charest H, et al. Enhancement of Sm-p80 (large subunit of calpain) induces protective immunity against *Schistosoma mansoni* through co-deliver of interleukin-2 and interleukin-12 in a DNA vaccine formulation[J]. Vaccine, 2003, 21: 2882-2889.
- [11] Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, et al. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice [J]. Vaccine, 2001, 20: 359-369.
- [12] Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immun-signaling complexes[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5: 136-148.
- [13] Andre M, Le Caer JP, Greco C, et al. Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS [J]. Proteomics, 2006, 6: 1437-1449.

(收稿日期: 2007-08-13 编辑: 富秀兰)