

日本血吸虫 22.6 kDa 重组抗原的高效融合表达及特性鉴定*

苏川 马磊 吴海玮 沈蕾 陈淑贞 张兆松 吴观陵

南京医科大学寄生虫学教研室 南京 210029

提要 目的: 大量获得纯化的日本血吸虫 22.6 kDa 重组抗原。**方法:** 用 PCR 方法将其编码基因序列经改造后亚克隆入载体质粒 pGEX-1 T 进行表达。**结果:** 得到了融合表达的蛋白抗原。此融合蛋白表达量大, 用凝血酶酶切后易大量制备纯化的重组 22.6 kDa 抗原。**结论:** 以此融合蛋白免疫的小鼠抗血清进行免疫印迹试验, 表明 Sj22.6/Sj26 GST 融合重组蛋白具有与 Sj22.6 蛋白一样的免疫学活性。

关键词 日本血吸虫 22.6 kDa 抗原 重组抗原 融合表达

近年来, 血吸虫重组疫苗的研究已越来越受到人们重视。迄今, 对曼氏血吸虫已发现了数种有意义的疫苗候选抗原, 对日本血吸虫病疫苗候选分子的研究也在进行中。张桂筠等^[1,2]将编码日本血吸虫 22.6 kDa 抗原 (Sj22.6) 的编码基因片段亚克隆入表达载体 pGEX-1 T, 以基因工程方法制备得到了 Sj22.6 kDa 抗原蛋白, 但是该蛋白与质粒本身编码的日本血吸虫 26 kDa GST 蛋白呈分离表达, 造成重组抗原表达量低且极难提纯, 严重影响了该重组抗原的实际应用^[2,3]。对该编码基因的测序结果显示, 在基因片段的起始密码子 ATG 上游第 10 位~12 位碱基处有一终止密码子 TAA, 因此诱导表达时重组抗原与质粒本身编码的 Sj26 GST 不能融合。本实验在此基础上, 对该重组抗原编码基因的邻近序列进行改造并进一步研究。

材料与方 法

1 Sj22.6 编码基因的改造及亚克隆^[4]

1.1 改造序列的设计 根据 Sj22.6 编码基因的开放阅读框两侧序列重新设计引物, 以去除 ATG 前面的终止密码子 TAA 并同时引入 EcoR I 酶切位点。具体设计如下:

```
1 TTGCTGTCGT TAACCTGTTA TTATGGCAAC TACTGAGTAC AGATTAAGTT TAATGGAACA
   cggaat tcattggcaac tactgagt* *****
61 ATTTATTAGA GCATTCATAG AAATAGATAA AGATAATAAT GAATGATTC ATAAACAAGA
   *****
121 ACTAAGCAAA TATTGTCAAC AGAATCAAAAT GGATATGAAA CAAATAGATC CATGGATTGC
   *****
181 AAGGTTTGAT ACTGATAAAG ATGGTAAAGT CAGTTTAGAG GAGTTTGTGC GTGGATTTCG
   *****
241 TCTAAGGTTT TGGGAAGTCC GTCGTGAAAA GGAAGAATTA AAGAGAGACA AGCAAGCCAA
   *****
```

```
301 AGTATCCACA CTTCCACTGG ATATTCAAAT TATCGCGGCA ACCATGTCAA AAGCTAAGCA
   *****
361 ATATAACATA TGTGTGAAAT TTAAGAAGCT TCTGTGATAA ACTAGTCGAA CTGGTGATGA
   *****
421 AGTAAGAGCG GTGGCAAATG ACTTAAAGC ATTTTGGAT TCTGAATATG GTCGTGTATC
   *****
481 GCAAGTGATT ATACTAACTG GTTCATATTT GATGAATTTT TCACATGAAC CATTTTTATC
   *****
541 AATGCAGTTT AAGTACAGTA ATTATGTTTG TCTATTGTGG CGAACACCGT CTTCGTAAAG
   ***** gcttgggca gaagcattct
601 TTTAATGAAT AGTACAAATG AATATACATT CATAACAAT AAAGCGACAG TATGCTAATC
   taaggc
661 TACTATTTCAT AACTGCAATA GTAATGACAA GTTTTACATA ACTTTGGATT TGGGCATTGA
721 TCATTTACTA GGGCTTTTAA CTAACCTAAA TTCTTATCAT TTNNTATGAC TGACAAAAACA
781 GACATTATTA ATGAAAAAAA AAAAGGGGCG GTCAATCCAG TGAGGCCGCG GGTACCATCC
```

注: AGCT —— 改造前的基因序列
AGCT —— Gene sequence before reform
agct *** —— 引物及改造后的基因序列
agct *** —— Primer and gene sequence after reform

1.2 以 PCR 方法从 Sj514 克隆^[1]中扩增得到改造后的 Sj22.6 编码基因片段并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 方法如下: 94 30 s, 60 30 s, 72 30 s, 共重复 35 个循环。

1.3 Sj22.6 编码基因片段的亚克隆 PCR 产物经电泳分离后, 用 Glassmilk 纯化试剂盒 (购自 Bio-Rad 公司) 从琼脂糖凝胶中回收并纯化。以 EcoR I 酶将基因片段和表达载体质粒 pGEX-1 T 分别在 37 下酶切 4 h, 并用碱性磷酸酶在 37 下对酶切后的载体末端行去磷酸化处理。再将处理后的片段和 pGEX-1 T 质粒在 DNA 连接酶的作用下, 16 连接反应过夜。

1.4 重组子转化大肠杆菌并挑选含阳性重组子的克隆 将重组子转化入感受态大肠杆菌 TG₂, 铺于

*本课题获总理预备金所设血防专项基金资助 (94-Y-23)

含氨苄青霉素 100 mg/ml 的 YT 培养板 37 培养过夜。挑取生长的菌落，以碱裂解法快速小量提取重组质粒 DNA，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定。对可疑阳性的，再用 EcoR I 酶切后，以 1% 琼脂糖凝胶电泳作进一步的鉴定。

2 纯化 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白和 Sj22.6 重组蛋白的制备^[5]

2.1 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白的表达 挑取含阳性重组子的菌落 1 个，接种入 2 ml YT 培养液于 37 生长过夜，再以 1:50 接种培养。37 培养 4 h 后 (OD₆₀₀为 0.5) 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续培养 5 h 进行表达。于 4℃，1 500 g 离心集菌后，以 PBS 重悬沉淀备用。

2.2 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白的纯化 将上述表达物在 200 瓦功率下超声粉碎 40 min 后于 4℃，10 000 g 离心 10 min，取上清加入还原型谷胱甘肽-琼脂糖珠 (glutathione Sepharose 4B, GS4B) 离心柱 (购自 Pharmacia 公司)，在室温中孵育吸附 30 min 以使 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白的 GST 部分与 GS4B 柱上的谷胱甘肽特异性结合，用 10 倍柱床体积 PBS 洗柱 3 次。每次 500 g 离心 5 min 以去除上清，最后加入 1 倍柱床体积的洗脱缓冲液 (含 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽，50 mmol/L Tris-HCl, PH8.0) 混匀，在室温下孵育 10 min 以使结合在柱上的融合蛋白被还原型谷胱甘肽竞争性置换而洗脱下来。收集到的洗脱液中即含有纯化的融合蛋白。

2.3 纯化 Sj22.6 重组蛋白的制备^[6] 将超声粉碎物的离心上清同前法装柱结合并洗柱，500 g 离心 5 min 以去除上清后加入 1 ml 凝血酶 (thrombin) 酶切液 (含 50 IU thrombin 的 PBS 液，thrombin 购自 Pharmacia 公司)，室温下酶切反应 20 h，500 g 离心 5 min，收集的上清液中即含有纯化的高浓度的 Sj22.6 重组蛋白。

3 纯化的 Sj22.6 重组蛋白及 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白的特性鉴定

3.1 鼠免疫血清的制备 取 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (购自南京军区总医院实验动物中心)，每鼠注射含 10 μg 纯化融合蛋白抗原的福氏完全佐剂与 PBS 的混合物。隔周免疫 1 次，共免疫 3 次。最后 1 次免疫 1 wk 后采血并分离血清。

3.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定 取纯化的 Sj22.6 重组蛋白、融合蛋白和可溶性成虫抗原 (SWA) 各 100 μl，分别加入等量的 2 X SDS-PAGE 载样缓冲液，进行 10% SDS-PAGE

电泳，凝胶以考马斯亮蓝染液染色后观察结果。

3.3 蛋白转移印迹试验 (Western blotting) 鉴定^[7] 将 10% SDS-PAGE 电泳后的凝胶在 300 mA 下对硝酸纤维素薄膜进行印迹转移，然后将硝纤膜浸入 5% 脱脂奶粉溶液，于 37℃ 封闭 1 h 后，以 PBS-T (PBS 中含有 0.05% Tween-20) 溶液洗 3 次，每次 5 min。再将硝纤膜浸泡于免疫鼠血清溶液 (1:20 稀释) 中，于 4℃ 反应过夜。次日将膜以 PBS-T 洗 3 次，每次 5 min，与 1:500 的绵羊抗小鼠 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 结合物于 37℃ 反应 1 h，再以 PBS-T 洗膜 4 次，每次 10 min，加入新配制的底物液 (6 mg 4-氯-1-萘酚、2 ml 甲醇、10 ml TBS、12 μl H₂O₂) 37℃ 显色 10 min，最后用蒸馏水冲洗终止反应。(本实验中应用 Bio-Rad 公司生产的 Western blotting 装置进行免疫印迹试验)。

结 果

1 用新设计的引物以 PCR 法扩增改造过的 Sj22.6 抗原编码基因并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳的结果见图 1，在约 590 bp 处可见一单一的扩增条带。



1 XI74 DNA/ He 标记物 2 PCR 产物
1 XI74 DNA/ He marker 2 PCR products
图 1 改造后 Sj22.6 编码基因的 PCR 产物
Fig. 1 PCR products of reformed gene fragment of Sj22.6

2 纯化的 Sj22.6 重组蛋白、融合蛋白及可溶性成虫抗原进行 SDS-PAGE 电泳鉴定的结果

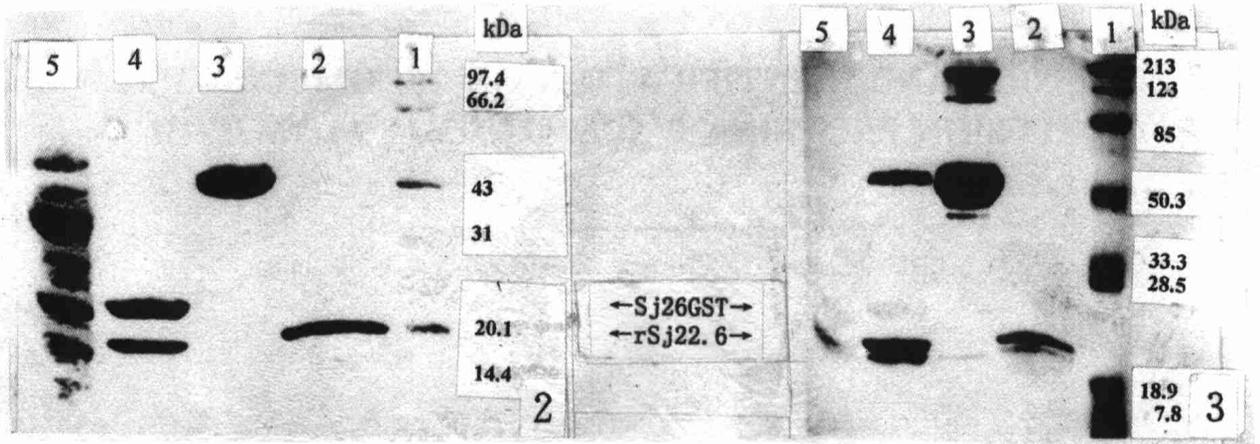
SDS-PAGE 电泳鉴定的结果：前两者分别在约 22.6 kDa 和 50 kDa 处可见较纯的蛋白条带 (图 2)，且在成虫抗原的相应部位也存在。

3 纯化的 Sj22.6 重组蛋白、融合蛋白及可溶性成虫抗原 Western blotting 的鉴定结果

Western blotting 的鉴定结果见图 3，由图中的 2、4 及 5 的 22.6 kDa 处，分别可见识别条带。在 4 及 5 的约 26 kDa 处也可见相应的识别条带。

讨 论

血吸虫病是一种严重威胁人类健康的寄生虫病。现行的以化疗为主的综合防治措施难以达到预



1 蛋白质分子量标准 2 Thrombin 切下的 rSj22.6 3 Sj22.6/ Sj26 GST 重组融合蛋白
 4 融合蛋白被 thrombin 酶切成单独的 rSj22.6 和 Sj26 GST 两条蛋白带 5 日本血吸虫可溶性成虫抗原
 1 Protein molecular weight standard 2 Purified rSj22.6 3 Sj22.6/ Sj26 GST fusion protein
 4 Two protein bands, rSj22.6 and Sj26 GST, were from the digestion 5 Adult *S. japonicum* soluble antigen

图 2 重组抗原的 SDS-PAGE 鉴定结果 图 3 重组抗原的 Western blotting 鉴定结果
 Fig. 2 Result of SDS-PAGE for identification of the Sj22.6/ Sj26 GST fusion protein and rSj22.6 Fig. 3 Result of Western blotting for identification of the Sj22.6/ Sj26 GST fusion protein and rSj22.6

防的目的，急需寻找新的防治措施。疫苗的发明和广泛应用是今天人类得以免除或减轻许多传染病危害的关键性干预措施。未来的血吸虫病防治措施中，可能采用疫苗接种预防来补充化疗控制传播的不足。在日本血吸虫病疫苗候选分子的寻找及验证过程中，大量获得纯化 rSj22.6 蛋白和 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白，可用于探讨其能否诱导小鼠产生抗日本血吸虫感染的保护力。本研究采用 PCR 方法对 Sj22.6 编码基因序列进行改造，以去除其开读框首位启动密码子 ATG 前面的终止密码子 TAA，将此改造后的基因片段亚克隆入高表达载体 pGEX-1 T 后，得到了与载体序列本身编码的日本血吸虫 26 kDa GST 融合表达的 Sj22.6 重组抗原蛋白，该融合蛋白的表达量比以前^[1-3]分离表达时明显提高。由于融合蛋白中的 GST 部分与 GS4B 柱上的谷胱甘肽能以酶与底物的形式特异性地结合，因而能够极方便地用 GS4B 柱以亲和层析的方法将其从诱导表达的克隆菌超声粉碎混合物中纯化出来。更为方便的是，应用 thrombin 酶切，可以从融合蛋白中切出纯度很高的单一 Sj22.6 蛋白。由于整个亲和层析纯化过程时间很短且可以在 4℃ 下操作，因此理论上能得到纯度很高且具有与蛋白相近活性的蛋白。从 SDS-PAGE 和 Western blotting 的结果可以看出，重组蛋白与虫本身蛋白

质具有相同的分子量。用基因工程方法生产的融合蛋白制备的小鼠免疫血清，可同时识别成虫抗原中的 Sj22.6 蛋白、重组 Sj22.6/ Sj26 GST 融合蛋白和切下的 rSj22.6 蛋白，这充分证明用基因工程方法生产的重组蛋白与血吸虫蛋白质具有相同的免疫原性和免疫学活性，用基因工程方法可大量制备抗原蛋白用于血吸虫病疫苗候选分子的研究工作。

参 考 文 献

- 1 张桂筠,张兆松,沈一平,等. 日本血吸虫重组抗原基因的高效表达和特性鉴定. 中国人兽共患病杂志 1996;12(5) 30
- 2 张桂筠,张兆松,沈一平,等. 日本血吸虫重组抗原的免疫原性鉴定. 中国人兽共患病杂志 1997;13(5) 28
- 3 苏川,沈蕾,赵巍,等. 日本血吸虫(中国大陆株)22.6kDa 重组抗原对小鼠免疫保护性的初步研究. 中国人兽共患病杂志 1998;14(2) 11
- 4 J. 萨姆布鲁克,EF. 弗里奇,T. 曼尼阿蒂斯 著. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社,1993 28~69
- 5 Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusion with glutathione-S-transferase. Gene 1988;67 31
- 6 Forsell A. The World of Pharmacia Biotech '95. Uppsala, Sweden 1995 199
- 7 苏川,张兆松, Huggins MC, 等. 日本血吸虫 32kDa 重组抗原的进一步研究. 中国人兽共患病杂志 1997; 13 (6) 3

1999 年 3 月 1 日收稿 1999 年 6 月 3 日修回
 (编辑: 庄兆农)

EXPRESSION AND IDENTIFICATION OF RECOMBINANT 22.6 kDa FUSION PROTEIN OF SCHISTOSOMA JAPONICUM

SU Chuan, MA Lei, WU Haiwei, SHEN Lei,
CHEN Shuzhen, ZHANG Zhaosong, WU Guanling

Department of Parasitology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029

ABSTRACT

AIM: To obtain a large amount of purified 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum* (Sj22.6) in large quantity. **METHODS:** The sequence of the gene fragment encoding Sj22.6 was reformed by PCR and subcloned into plasmid vector pGEX-1 T that coded for the 26 kDa GST antigen of *Schistosoma japonicum* (Sj26 GST). The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* TG₂ and then the positive recombinant clone was expressed by induction with IPTG. **RESULTS:** The recombinant Sj22.6/Sj26 GST fusion protein was expressed in 5.1% of total bacterial protein and was easy to be purified with glutathione sepharose 4B. Moreover, the purified recombinant Sj22.6 antigen could be cut off easily from the fusion protein with thrombin and had high immunogenicity. **CONCLUSION:** The purified recombinant Sj22.6 protein and Sj22.6/Sj26 GST fusion protein had the same immunological activity as the native Sj22.6 kDa protein.

Key words: *Schistosoma japonicum*, 22.6kDa antigen, recombinant antigen, fusion expression

* Supported by the Premier funds for the development of vaccine against shistosomiasis japonica (94-Y-23)

溶组织内阿米巴阴道炎一例

山东省枣庄市山亭区人民医院 枣庄 277200 张贵堂 王祥华

患者,女性,49岁,农民。因外阴、阴道瘙痒和疼痛,赤白带增多,伴轻度腹痛与腹泻3wk,于1997年8月20日来院就诊。询问病史:慢性腹泻4年,大便稀糊状,每日2~3次,1993与1994年夏季两次急性腹泻发作时,排出血脓便,并有腥臭味,次数较多,无泌尿生殖系感染症状。体检:外阴潮红,阴道壁有数个黄豆粒大小的溃疡,边缘隆起,表面覆以黄棕色粘液状分泌物。实验室检查:WBC 13.9 × 10⁹/L, N 78%, L 22%, Hb 85 g/L, RBC 2.8 × 10¹²/L。阴道分泌物查见溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*, *E. h.*)滋养体。粪便生理盐水涂片镜检查见阿米巴滋养体(+), RBC(+), 碘液染色镜检包囊(+),再做铁苏木素染色鉴定为*E. h.*大滋养体,确诊为*E. h.*痢疾与*E. h.*阴道炎。给予甲硝唑和复方新诺明治疗5d,症状消失,续服甲硝唑和喹碘仿1个疗程(10d),停药2wk后,再服1个疗程,阴道分泌物和大便均未查见*E. h.*滋养体和包囊。1年后复检仍为阴性,临床

治愈。

*E. h.*阴道炎罕见,多继发于肠道感染^[1]。该患者1993年门诊病历诊断为急性*E. h.*痢疾,口服甲硝唑和土霉素治疗。自诉症状控制后,未按疗程正规治疗,转为慢性腹泻,以致夏季用浴盆洗澡时感染阴道炎。本病例给卫生工作者较深刻的启示,首先应加强农村卫生宣传教育,患病后患者应按时服药,彻底治疗,改善不良的盆浴习惯,勤换内衣裤,减少继发感染。另一方面应健全门诊病例登记制度,并让患者保存好病历和检查报告单,为以后复诊提供快速正确的诊断依据。

参 考 文 献

- 1 王淑贞主编. 实用妇产科学. 北京:人民卫生出版社, 1997 564~565

1999年1月7日收稿 1999年6月8日修回
(编辑:庄兆农)