

# 牛带绦虫亚洲亚种乳酸脱氢酶基因的克隆表达及免疫原性分析

黄江<sup>1\*</sup>, 胡旭初<sup>2</sup>, 吴璇<sup>1</sup>, 徐劲<sup>2</sup>, 余新炳<sup>2</sup>, 包怀恩<sup>1</sup>, 郎书源<sup>1</sup>, 廖兴江<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 对牛带绦虫亚洲亚种成虫乳酸脱氢酶基因(LDH)进行克隆、表达和免疫原性分析。方法 将牛带绦虫亚洲亚种成虫 *TaLDH* 克隆到原核表达质粒 pET-30a(+)中,在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,表达产物通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定,用镍离子金属螯合剂亲和层析柱进行纯化,纯化的重组蛋白 pET-30a(+)-TaLDH 用蛋白质印迹(Western blotting)分析其免疫原性。结果 PCR、双酶切及 DNA 测序结果均显示重组质粒 pET-30a(+)-TaLDH 构建成功。SDS-PAGE 结果表明,目的基因在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中获得高效表达,经亲和层析获得了高纯度蛋白,浓度为 0.9 mg/ml。Western blotting 分析结果显示,重组蛋白 pET-30a(+)-TaLDH 能识别感染牛带绦虫亚洲亚种的猪血清和患者血清,在相对分子质量(Mr) 35 000 处有一清晰条带,表明其具有免疫反应性。结论 牛带绦虫亚洲亚种成虫乳酸脱氢酶基因可在原核表达系统中获得具有免疫学活性的高效表达。

**【关键词】** 牛带绦虫亚洲亚种; 乳酸脱氢酶基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: R383.322, R392.11 文献标识码: A

## Cloning and Prokaryotic Expression of Malate Dehydrogenase Gene of *Taenia saginata asiatica* and Immunogenicity Analysis of the Recombinant Protein

HUANG Jiang<sup>1\*</sup>, HU Xu-chu<sup>2</sup>, WU Xuan<sup>1</sup>, XU Jin<sup>2</sup>, YU Xin-bing<sup>2</sup>,  
BAO Huai-en<sup>1</sup>, LANG Shu-yuan<sup>1</sup>, LIAO Xing-jiang<sup>1</sup>

(1 Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2 Department of Parasitology, Sun Yat-sen Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**【Abstract】 Objective** To clone and express the lactate dehydrogenase (LDH) gene of *Taenia saginata asiatica* and analyze the immunogenicity of the recombinant protein. **Methods** By screening the full length cDNA plasmid library, the coding region of LDH was amplified with PCR, and cloned into the prokaryotic expression vector pET-30a(+), then expressed in *E. coli* BL21 with IPTG induction. The recombinant protein was detected by SDS-PAGE and purified by Ni-IDA affinity chromatography, and its immunogenicity was analyzed by Western blotting. **Results** PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing confirmed that the recombinant expression plasmid was constructed. The expression products were obtained and purified by Ni-IDA affinity chromatography. Western blotting analysis of LDH recombinant protein testified that the recombinant protein could be recognized by sera of the *Taenia saginata asiatica* infected swine and the patient. **Conclusions** The LDH gene of *Taenia saginata asiatica* has been cloned and expressed, and the purified protein has been confirmed with immunogenicity.

**【Key words】** *Taenia saginata asiatica*; Lactate dehydrogenase; Cloning; Prokaryotic expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30760227) and the Key Science and Technique Program of Guizhou Province [No. (2006) 3037]

\* Coresponding author, E-mail: mmm\_hj@gmc.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金(No. 30760227); 贵州省科技攻关项目 [No.(2006)3037]

**作者单位:** 1 贵阳医学院寄生虫学教研室, 贵阳 550004;  
2 中山大学中山医学院寄生虫学教研室, 广州 510080

\* 通讯作者, E-mail: mmm\_hj@126.com

牛带绦虫亚洲亚种 (*Taenia saginata asiatica*) 广泛分布于东南亚, 包括我国西南地区和台湾省, 韩国、泰国、印尼和菲律宾等地<sup>[1-3]</sup>。其成虫寄生于人体肠道, 引起亚洲牛带绦虫病, 有恶心、腹痛、肛周搔痒、头晕和头痛等临床表现<sup>[4]</sup>。人们通过食生或半

生含有牛带绦虫亚洲亚种囊尾蚴的猪或野猪的内脏特别是肝脏而感染,对劳动生产力和畜牧业造成极大损失。2006 年作者科研组在前期研究的基础上进行了牛带绦虫亚洲亚种功能基因组学的研究,系统地开展对牛带绦虫亚洲亚种在分类地位、分子生物学诊断和疫苗等方面的研究<sup>[5-6]</sup>。本研究从牛带绦虫亚洲亚种成虫 cDNA 质粒文库中筛选出一个乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的同源基因,构建了 pET-30a (+)-TaLDH 原核表达载体,并对其原核表达产物进行了初步的免疫学研究。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 感染血清 感染牛带绦虫亚洲亚种的猪血清及阴性猪血清由贵阳医学院寄生虫学教研室提供。感染牛带绦虫亚洲亚种患者血清,采自贵州省都匀市米秀乡牛带绦虫亚洲亚种病流行区感染者血清(驱虫后),健康人血清由中山大学热带病防治教育部重点实验室提供。

1.2 文库、质粒、菌株来源 虫体标本由上述感染者驱虫后获取,经形态学鉴定后,构建牛带绦虫亚洲亚种成虫全长 cDNA 质粒文库和 EST 测序及 Unigene 分析(与上海联合基因有限公司合作完成)。原核表达质粒 pET-30a(+)和大肠埃希菌 BL-21/DE3 由中山大学热带病防治教育部重点实验室保存。

1.3 主要试剂和工具酶 ExTaq 酶(含 dNTP)、Nde I、Hind III、T<sub>4</sub>DNA 连接酶和 DNA 标志物(DL2000)均购自大连宝生物工程公司,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自美国 Promega 公司,镍离子金属螯合剂亲和层析柱(Ni-IDA Agarose, cat No 为 69670)购自美国 Novagen 公司,蛋白质标志物购自陶宛 MBI 公司, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自北京赛百盛基因有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪 IgG(HRP-IgG)、兔抗人 IgG(HRP-IgG)和 3,3 二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自武汉博士德有限公司,硝酸纤维素滤膜(PVDF 膜)购自美国 Millipore 公司,十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、亚甲叉双丙烯酰胺和过硫酸胺等试剂均购自上海申友生物科技有限公司。

1.4 引物合成和 DNA 测序 基因扩增引物和重组质粒 DNA 测序由 Introvigen 上海生物技术有限公司合成。

### 2 方法

2.1 牛带绦虫亚洲亚种乳酸脱氢酶 (TaLDH) 基因的识别 将获得的牛带绦虫亚洲亚种 unigene 进行

Blastx 分析,获得编码牛带绦虫亚洲亚种成虫 TaLDH 基因的文库质粒,编号为 Ta HC4-A8, GenBank 登录号为 EF420317,并通过瑞士生物信息学研究所的蛋白分析专家系统 (ExpASY, <http://ca.expasy.org/>) 预测其理化特性。

2.2 TaLDH 基因的 PCR 扩增 根据已获得的 LDH 编码序列,利用 DNAClub 和 PCRdesign 设计引物。

P1: ATACATATGATGCATGGTGGAGGTTGTTC

Nde I 酶切位点

P2: ATAAAGCTTCCACTTGATGTCTGCGATAATCG

Hind III 酶切位点

以牛带绦虫亚洲亚种成虫 cDNA 文库中 LDH 基因的克隆质粒为模版,进行 PCR 扩增,反应条件为: 4 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。

2.3 重组原核表达质粒 (pET-30a (+)-TaLDH) 的构建及鉴定 将 PCR 产物和原核表达质粒 pET-30a (+) 经 Nde I 和 Hind III 双酶切后回收,连接,转化入大肠埃希菌 BL-21/DE3 感受态细胞,卡那霉素筛选阳性克隆,对阳性克隆提取质粒进行 PCR,双酶切和测序鉴定。

2.4 TaLDH 基因在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中的诱导表达 取 50 μl 培养过夜的阳性克隆菌液,加入含有卡那霉素的 5 ml LB 培养基中, 37 °C 250 r/min 振荡至吸光度(A<sub>600</sub>值)=0.4~0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达 5 h。离心收集菌体,在沉淀中加入 100 μl 1×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上样缓冲液,煮沸 5~10 min, 13 000×g 离心 1 min, 取上清 10 μl, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.5 TaLDH 基因的大量诱导表达和纯化 按照上述方法对阳性克隆在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中进行大量诱导表达,离心收集菌体,按每克菌体加入 4 ml 1×结合缓冲液重悬菌体,冰上放置 30 min 后冰上超声裂解(功率 150 W,持续 1 s,停 2 s,共 15 min), 4 °C 13 000×g 离心 20 min,收集上清,用 0.45 μl 滤膜过滤,参照镍离子金属螯合剂亲和层析柱说明书,进行蛋白纯化,收集蛋白洗脱液,取 30 μl 加入 10 μl 4×SDS-PAGE 上样缓冲液处理样品,12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮兰 R250 染色。将洗脱目的蛋白在 0.15 mol/L PBS (pH 7.4) 透析液中 4 °C 透析 24 h(其间换透析液 2~3 次)。

2.6 重组蛋白的蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE (12%)电泳,电转移仪于 100 V 冰浴转印 1.5 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上。

将含预染蛋白质标志物条带剪下，5%脱脂奶粉封闭过夜，PVDF膜转入用1%牛血清白蛋白(BSA)稀释(1:100稀释)的感染牛带绦虫亚洲亚种的猪血清和患者血清各20 μl，以相应的阴性血清20 μl(1:100)为对照，室温孵育2 h，PBS洗涤3次，每次5 min。加入山羊抗猪HRP-IgG(1:500)5 μl和兔抗人HRP-IgG(1:2000)2 μl，室温孵育1 h，PBS洗涤3次，每次5 min，DAB显色至出现目的条带，超纯水终止反应。

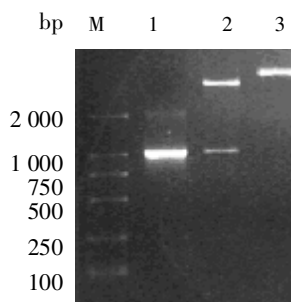
## 结 果

### 1 生物信息学分析

牛带绦虫亚洲亚种乳酸脱氢酶(*TaLDH*)基因(LDH)与恶性疟原虫的LDH基因(登录号为AAK12097)的序列一致性为55%，全长1 285 bp，编码区为92~1 084 bp，编码331个氨基酸；*TaLDH*基因的理论相对分子质量和等电点分别为 $M_r$  35 268.9和8.03。

### 2 原核重组质粒的鉴定

重组质粒的PCR产物与目的基因(993 bp)的大小相符；双酶切后鉴定结果显示，在约1 000 bp处有一清晰的条带(图1)。与目的基因的大小基本相符，证明重组质粒构建成功。



M: DNA标志物(DL2000), 1: *TaLDH*的PCR产物, 2: pET-30a(+)-*TaLDH*双酶切, 3: pET-30a(+)-*TaLDH*重组质粒。  
M: DNA marker (DL2000), 1: The PCR product amplified from cDNA library of *Taenia saginata asiatica*, 2: The recombinant (pET-30a(+)-*TaLDH*) digested by *Nde*I and *Hind*III, 3: The recombinant (pET-30a(+)-*TaLDH*).

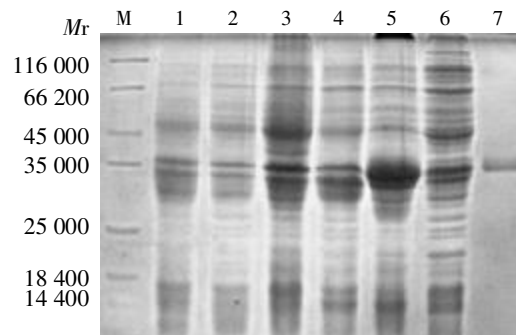
图1 重组质粒的PCR及双酶切鉴定

Fig.1 Identification of the pET-30a(+)-*TaLDH* by PCR amplification and digestion with restriction enzymes

### 3 蛋白表达纯化结果

将构建的重组质粒转化到*E.coli* BL-21/DE3中表达，SDS-PAGE分析结果显示，约在 $M_r$  35 000处出现一表达条带，与目的蛋白分子质量基本相符。将pET-30a(+)-*TaLDH*蛋白进行纯化， $M_r$  35 000处

得到一清晰的条带，且与目的蛋白相符(图2)，证明目的蛋白纯化成功。测得纯化产物的蛋白浓度为0.9 mg/ml。



M: 蛋白标志物, 1: 未诱导pET-30a(+), 2: 诱导pET-30a(+)-*TaLDH* 6h, 3: 未诱导pET-30a(+)-*TaLDH*, 4: 诱导pET-30a(+)-*TaLDH* 6h, 5: pET-30a(+)-*TaLDH*诱导破碎后沉淀, 6: pET-30a(+)-*TaLDH*诱导破碎后上清, 7: pET-30a(+)-*TaLDH*纯化产物。

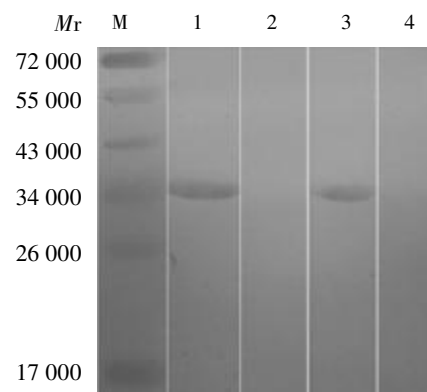
M: Protein marker, 1: pET-30a(+) transformants without IPTG induction, 2: pET-30a(+) transformants with IPTG induction, 3: pET-30a(+)-*TaLDH* transformants without IPTG induction, 4: pET-30a(+)-*TaLDH* transformants with IPTG induction, 5: Precipitation of soluble protein of pET-30a(+)-*TaLDH* transformants, 6: Soluble protein of pET-30a(+)-*TaLDH* transformants, 7: Purification of insoluble protein of pET-30a(+)-*TaLDH* transformants.

图2 重组质粒pET-30a(+)-*TaLDH*的表达及其纯化产物的SDS-PAGE电泳分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the prokaryotic expression product and purified product

### 4 蛋白质印迹(Western blotting)分析

分析结果显示，pET-30a(+)-*TaLDH*纯化蛋白能识别感染牛带绦虫亚洲亚种的猪血清以及患者血清，在约 $M_r$  35 000处均显示出一条清晰的条带(图3)。



M: 蛋白标志物, 1: 感染猪血清, 2: 健康猪血清, 3: 患者血清, 4: 健康人血清。

M: Protein marker, 1: Purified product with serum of *Taenia saginata asiatica*-infected swine, 2: Purified product with normal serum of swine, 3: Purified product with serum of patient infected by *T.s. asiatica*, 4: Purified product with sera of healthy persons.

图3 重组质粒pET-30a(+)-*TaLDH*表达产物Western blotting分析  
Fig.3 Western blotting analysis of the recombinant pET-30a(+)-*TaLDH*

## 讨 论

LDH是糖代谢过程中一个非常重要的酶,广泛分布于细菌、植物和动物中。在还原型辅酶 I/辅酶 I (NADH/NAD<sup>+</sup>) 辅助下催化丙酮酸还原为乳酸、及乳酸氧化为丙酮酸的可逆反应<sup>[8]</sup>。在人体, LDH 同工酶谱的变化可一定程度反映组织器官的病变,对诊断心脑血管疾病、呼吸道疾病、肝脏疾病和肿瘤等有重要参考价值<sup>[9]</sup>。已知绝大多数体内寄生虫能量代谢的主要途径是无氧糖酵解, LDH 是该途径的末端酶,研究寄生虫与宿主 LDH 在分子结构及功能上的差异对于寄生虫病的免疫诊断和药物开发有重要意义。有关蠕虫 LDH 的研究相对较少,韩国研究者对 LDH 在曼氏迭宫绦虫成虫及裂头蚴的组织化学定位及其特性进行了研究,发现 LDH 在成虫及裂头蚴的皮下及皮下肌层活性最高<sup>[10]</sup>。作者等通过生物信息学分析发现 TaLDH 无线粒体、过氧化酶体、溶酶体和细胞核等亚细胞定位序列,但有 3 个跨膜区,是跨膜蛋白。所以推测 TaLDH 也很可能在牛带绦虫亚洲亚种成虫的皮层细胞膜上分布较多,而膜蛋白则可能是诊断和疫苗抗原或药物的靶分子。

本研究利用纯化的原核表达载体 pET30a 对 TaLDH 进行亚克隆,转化入大肠埃希菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达。PCR、双酶切及 DNA 测序结果均表明重组质粒 pET-30a(+)-TaLDH 构建成功。但重组蛋白在亲和层吸洗脱后,在溶液中很快形成絮状沉淀,这主要是由于该蛋白的等电点与洗脱缓冲液的 pH 值接近,可通过改变洗脱缓冲液的 pH 值或加入脂溶性的助溶剂等提高其溶解性。Western blotting 分析结果显示, pET-30a (+)-TaLDH 纯化蛋白能识别感染牛带绦虫亚洲亚种的猪血清和患者血清,证实了重组蛋白在纯化后具有免疫反应性,可推测 TaLDH 是牛带绦虫亚洲亚种的潜在诊断抗原。有研究结果表明疟原虫 LDH 具有特殊的理化及免疫学特性,是理想的免疫诊断靶分子并已开发出了相应的诊断试剂盒<sup>[11,12]</sup>。本研究对牛带绦虫亚洲亚种乳酸脱氢酶基因进行了克隆、表达及可溶性重组蛋白纯化,为进一步研究该基

因的生物学功能以及在诊断尤其是疫苗研究方面奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Fan PC. *Taeniasis and Taenia saginata asiatica in Asia*[J]. Chin J Parasitol, 2000, 13(2): 71-94.
- [2] Eom KS, Rim JH. Morphological descriptions of *Taenia asiatica* sp.n.[J]. Korean J Parasitol, 1993, 31(1): 1-6.
- [3] Fan PC, Lin CY, Chung WC. Experimental infection of philippine *Taenia* in domestic animals[J]. In J Parasitol, 1992, 22(2): 235-238.
- [4] Eom KS, Jeon HK, Kong Y, et al. Identification of *Taenia asiatica* in China: molecular, morphological, and epidemiological analysis of a Luzhai isolate [J]. J Parasitol, 2002, 88(4): 758.
- [5] Huang J, Huang C, Hu XC, et al. Informatics analysis for the structure and function of spef1-like gene from *Taenia saginata asiatica*[J]. Chin J Zoonoses, 2007, 23(12): 98-100. (in Chinese) (黄江, 黄灿, 胡旭初, 等. 生物信息学分析亚洲带绦虫 Spef1-Like 基因及其蛋白结构特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(12): 98-100.)
- [6] Wu GL. Human Parasitology [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005. 495-535. (In Chinese) (吴观凌, 人体寄生虫学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 495-535.)
- [7] Huang J, Hu XC, Bao HE, et al. Construction and ETS analysis of full-length cDNA library of adult *Taenia asiatica* [J]. J Trop Med, 2007, 7(2): 116-118. (in Chinese) (黄江, 胡旭初, 包怀恩, 等. 亚洲带绦虫成虫全长 cDNA 质粒文库的构建及 EST 测序[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(2): 116-118.)
- [8] Lv G, Yu XB, Huang C, et al. Bioinformatics analysis for the structure and function of lactate dehydrogenase from *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(3): 202-205. (in Chinese) (吕刚, 余新炳, 黄灿, 等. 日本血吸虫乳酸脱氢酶(SjLDH)结构与功能的生物信息学分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 202-205.)
- [9] Tomavo S. The differential expression of multiple isoenzyme forms during stage conversion of *Toxoplasma gondii*: an developmental strategy[J]. Int J Parasitol, 2001, 31(10): 1023-1031.
- [10] Kwak KH, Cheon EW, Kim CH. Localization and characteristics of lactate and malate dehydrogenase and adult worm of *Spirometra erinacei*[J]. Korean J Parasitol, 1996, 34(1): 59-65.
- [11] Garcia M, Kirimoama S, Marlborough D, et al. Immunochromatographic test for malaria diagnosis[J]. Lancet, 1996, 347(9014): 1549.
- [12] Humar A, Ohrt M, Harrington D, et al. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers[J]. Am J Trop Med Hyg, 1997, 56(1): 44-48.

(收稿日期: 2007-11-27 编辑: 盛慧锋)