

文章编号: 1000-7423(2011)-01-0029-04

【论著】

# 微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的原核表达及鉴定

刁玉梅, 宫鹏涛, 李巍, 苏利波, 黄祥盛, 李建华, 张西臣\*

**【摘要】** 目的 对微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白 S-dsRNA 基因进行克隆、表达和反应原性分析。方法 以微小隐孢子虫总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 克隆 S-dsRNA 基因, 并转化至原核表达载体 pET-28a(+) 中, 构建重组原核表达载体 pET-28a(+)-S, 转入大肠埃希菌 BL21(DE3) 中, 用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导表达, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 观察重组蛋白的表达情况, 蛋白质印迹(Western blotting) 分析重组蛋白与鼠抗微小隐孢子虫阳性血清的反应原性。结果 PCR 和双酶切鉴定表明, 重组质粒 pET-28a(+)-S 构建成功。SDS-PAGE 结果显示, 37 °C 下经 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 重组蛋白表达量最大。重组蛋白主要以包涵体形式表达, 相对分子质量( $M_r$ ) 约为 37 000, 与预期大小一致, 重组蛋白约占蛋白总量的 72.6%。Western blotting 分析结果表明, 重组蛋白能识别抗微小隐孢子虫阳性鼠血清。结论 微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白 S-dsRNA 基因表达成功, 重组蛋白具有反应原性。

**【关键词】** 微小隐孢子虫; dsRNA 病毒; S-dsRNA; 原核表达

中图分类号: R382.3

文献标识码: A

## Prokaryotic Expression and Identification of S-dsRNA Gene from Cryptosporidium parvum Virus

DIAO Yu-mei, GONG Peng-tao, LI Wei, SU Li-bo, HUANG Xiang-sheng, LI Jian-hua, ZHANG Xi-chen\*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**【Abstract】** Objective To clone and express S-dsRNA gene of Cryptosporidium parvum virus, and investigate the reactionogenicity of the recombinant. Methods Total RNA was extracted from Cryptosporidium parvum and S-dsRNA gene was amplified by RT-PCR. The PCR product was cloned into pET-28a(+) expression vector. The recombinant plasmid pET-28a(+)-S was transformed into E. coli BL21 (DE3) and induced with IPTG. The expression situation of recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE. Its reactionogenicity was examined by Western blotting analysis. Results pET-28a(+)-S was identified by PCR and double endonuclease digestion. SDS-PAGE result showed that the recombinant protein ( $M_r$  37 000) was expressed in the form of inclusion body. High level expression of recombinant protein was found at 1 mmol/L IPTG condition after incubation at 37 °C for 4 h and reached up to 72.6 % of the total protein. The protein was recognized by the antisera from mice immunized with antigens from Cryptosporidium parvum oocysts. Conclusion The S-dsRNA gene of Cryptosporidium parvum virus has been expressed with adequate reactionogenicity.

**【Key words】** Cryptosporidium parvum; dsRNA virus; S-dsRNA; Prokaryotic expression

Supported by National Key Technology R&D Program (No.2007BAD40B05) and the Technology and Development Program of Jilin Province (No. 20100160)

\* Corresponding author, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

隐孢子虫(Cryptosporidium)是普遍存在的胃肠道寄生性原虫,能引起人与家畜的群体腹泻。含有隐孢子虫卵囊的人、家畜、宠物和野生动物的粪便,直接威胁饮用水安全,导致隐孢子虫病呈水源性大规模暴发<sup>[1-3]</sup>。隐孢子虫是艾滋病患者一种重要的机会性感染病原体,也可感染免疫力低下的人群,引起持续腹

泻甚至致死<sup>[4]</sup>。分子流行病学研究结果显示,大多数人隐孢子虫病是由人隐孢子虫(Cryptosporidium hominis, C. parvum genotype I)和微小隐孢子虫(C. parvum genotype II)引起的<sup>[5]</sup>。

微小隐孢子虫病毒(Cryptosporidium parvum virus, Crspovirus, CSpV)是 Khramtsov 于 1997 年在牛犊分离出的微小隐孢子虫卵囊中发现的,该病毒呈球形,直径约 31 nm,为 dsRNA 病毒,含大 dsRNA (L-dsRNA)和小 dsRNA (S-dsRNA)两种核酸。其中

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (No. 2007BAD40B05); 吉林省科技发展计划项目 (No. 20100160)

作者单位: 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

\* 通讯作者, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

S-dsRNA 仅有一个开放阅读框架, 编码衣壳蛋白<sup>[6]</sup>。Khramtsov 等<sup>[7]</sup>发现所有人隐孢子虫和微小隐孢子虫中均含有该 dsRNA 病毒, 而隐孢子虫属其他种不含该病毒。因此, S-dsRNA 核酸有望作为对人具有感染性的隐孢子虫(人隐孢子虫和微小隐孢子虫)与其他种类隐孢子虫相鉴别的一个分子标记, 以及含病毒虫株的分离与鉴定的依据<sup>[8]</sup>。本研究利用基因工程技术表达病毒衣壳蛋白基因 S-dsRNA, 为进一步研究该蛋白的功能和特性提供材料, 为人隐孢子虫感染的检测奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

1.1 菌株与质粒 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3) 感受态等均由本室保存; 质粒 pMD18-T 购自日本 TaKaRa 公司; 原核表达载体 pET-28a(+)由本室保存; 微小隐孢子虫总 RNA 逆转录的 cDNA 由本室保存。

1.2 实验动物 雌性 BALB/c 小鼠 6 只, 6~8 周龄, 体重 18~20 g, 购自长春生物制品研究所。

1.3 主要试剂和仪器 DNA 标志物(DL2000)和蛋白质标志物购自天根生化科技(北京)有限公司, Binspin 质粒 DNA 小量提取试剂盒购自杭州博日科技有限公司, BamH I 和 Sal I 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司, 镍亲和层析柱购自美国 GE 公司, BCA 蛋白含量分析试剂盒购自美国 Thermo 公司。PCR 仪为德国 Biometra 公司产品, 超声仪为美国 SONICS 公司产品, 垂直电泳槽为美国 BIO-RAD 公司产品, 转膜仪为北京六一仪器厂产品, 恒温培养箱和离心机为美国 Thermo 公司产品。

### 2 方 法

2.1 PCR 扩增 根据 GenBank 中微小隐孢子虫病毒 S-dsRNA 基因序列(登录号为 EU183404), 采用 Primer 5.0 软件设计特异性引物, 引物序列为: SF: 5'-CTG-GATCCATGATTACAAGTTTTGAATCAA-3', SR: 5'-AAGTCGACCTAATGGGAGCGATCTGCGCTA-3', 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以微小隐孢子虫总 RNA 的 cDNA 为模板, 进行 PCR。反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 41 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。

2.2 S-dsRNA 基因表达载体的构建 将回收的目的片段克隆至 pMD18-T 载体, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取单菌落, 提取质粒, 用 PCR 和酶切鉴定方法筛选阳性克隆, 阳性重组质粒命名为

pMD18-T-S, 送上海生工生物工程技术有限公司测序。提取质粒 pMD18-T-S, 以 BamH I 和 Sal I 进行双酶切, 回收目的片段与质粒 pET-28a (+)载体连接, 转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 挑取单菌落, 进行 PCR 和酶切鉴定, 将构建正确的重组质粒命名为 pET-28a(+)-S。

2.3 S-dsRNA 基因在原核细胞中的表达鉴定 将鉴定正确的表达质粒 pET-28a(+)-S 转化至大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细菌, 同时设 pET-28a(+)空质粒作为阴性对照, 从 LB 平板上挑取单个菌落接种于 5 ml LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡培养过夜。按 1%的比例接种于 5 ml LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 2~3 h, 至菌液吸光度 ( $A_{600}$ ) 值为 0.4~0.6, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度分别为 0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L, 继续培养 4 h, 分别收集 1 ml 诱导、未诱导和阴性对照的菌液, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

2.4 鼠抗微小隐孢子虫阳性血清的制备 取纯化的  $2 \times 10^7$  个微小隐孢子虫卵囊溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中, 超声粉碎, 期间间隔取样, 至显微镜下看不见卵囊为止, 12 000 $\times$ g 离心 20 min, 上清即为抗原。用 BCA 蛋白含量分析试剂盒测定蛋白浓度。用该抗原腹腔注射免疫 6 只 BALB/c 小鼠(100  $\mu$ g/只), 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周, 首次免疫用福氏完全佐剂, 第 2 次和第 3 次免疫用福氏不完全佐剂, 抗原和佐剂充分混匀后免疫小鼠。于末次免疫后 2 周, 摘除眼球采血, 分离血清, 用间接 ELISA 检测血清抗体效价, 效价  $\geq 1:1000$  者, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

2.5 蛋白质印迹(Western blotting)分析 重组阳性菌 pET-28a(+)-S/BL21(DE3)和空载体转化菌 pET-28a(+)/BL21(DE3)裂解物经 SDS-PAGE 电泳, 转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 用蛋白封闭干粉 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次。分别用鼠抗微小隐孢子虫阳性血清和健康小鼠血清(1:500)与 PVDF 膜上的蛋白反应, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次。再分别加入羊抗鼠 HRP-IgG(1:2 000), 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 5~10 min, 双蒸水终止反应。

2.6 表达产物含量测定 重组阳性菌 pET-28a(+)-S/BL21(DE3)裂解物进行 SDS-PAGE 电泳后, 用薄层扫描仪测量表达产物 S 蛋白占菌体总蛋白的相对含量。

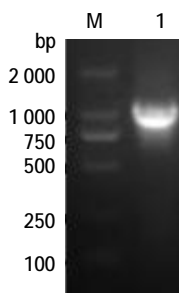
2.7 表达产物的可溶性鉴定 将阳性表达菌 pET-28a(+)-S/BL21(DE3)按 1%的比例接种于 500 ml LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 2~3 h, 至菌液  $A_{600}$  值为 0.4~0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培

养 4 h, 诱导表达结束后, 收集菌液, 用原菌液 1% 体积的 Tris-EDTA 缓冲液(TE)[50 mmol/L Tris HCl (pH 8.0)、2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]重悬, 加入溶菌酶至终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 超声破碎 30 min 后, 12 000 $\times g$  离心 30 min, 分别取上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳, 确定蛋白的可溶性。

## 结 果

### 1 S-dsRNA 基因的克隆

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到 1 条约 960 bp 的条带, 与预期相符 (图 1)。将测序所得序列与 GenBank 公布的 S-dsRNA 基因序列(登录号为 EU183-404)进行比对, 同源性为 98.75%。

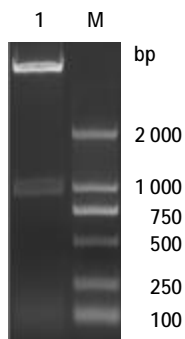


M: DNA 标志物 (DL2000); 1: S-dsRNA PCR 产物。  
M: DNA marker (DL2000); 1: PCR products of S-dsRNA.

图 1 S-dsRNA PCR 产物  
Fig.1 PCR products of S-dsRNA

### 2 表达载体的构建

质粒 pET-28a(+)-S 经 BamH I 和 Sal I 双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 2 个条带, 与预期大小相符, 重组表达质粒 pET-28a(+)-S 构建成功 (图 2)。



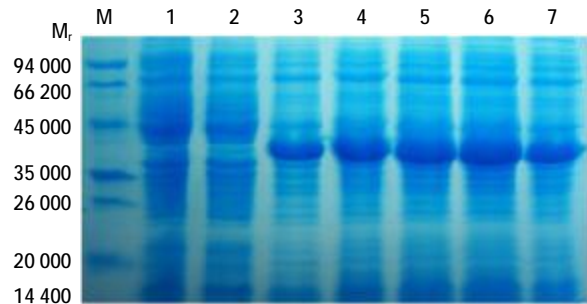
M: DNA 标志物 (DL2000); 1: pET-28a (+)-S 双酶切 (BamH I 和 Sal I)。

M: DNA marker (DL2000); 1: pET-28a (+)-S digested by BamH I and Sal I.

图 2 重组质粒 pET-28a(+)-S 双酶切鉴定  
Fig.2 Identification of pET-28a-S by digestion with BamH I and Sal I

### 3 S-dsRNA 基因在原核细胞中的表达鉴定

重组蛋白经诱导后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 在  $M_r$  37 000 处有明显的条带, 表明目的蛋白获得成功表达 (图 3)。其中, S-dsRNA 蛋白表达的最适条件为, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h。



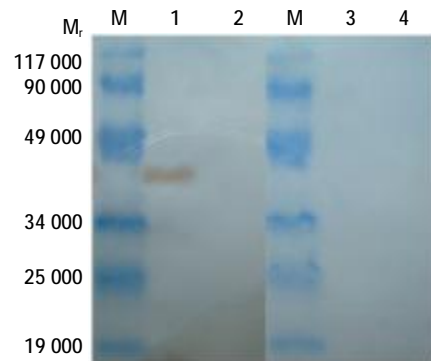
M: 蛋白质标志物; 1: pET-28a (+)载体菌对照; 2: 未诱导 pET-28a (+)-S/BL21 (DE3) 对照; 3-7: pET-28a (+)-S/BL21 (DE3) 分别用 0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h。

M: Protein marker; 1: pET-28a(+)/BL21 (DE3); 2: pET-28a(+)-S/BL21 (DE3); 3-7: pET-28a (+)-S/BL21 (DE3) 4 h after induction with 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mmol/L IPTG, respectively.

图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

### 4 Western Blotting 分析

重组蛋白可被鼠抗微小隐孢子虫阳性血清识别, 在约  $M_r$  37 000 处有目的条带 (图 4)。



M: 蛋白质标志物; 1、3: 重组阳性菌 pET-28a(+)-S/BL21 (DE3) 裂解物分别与鼠抗微小隐孢子虫阳性血清和健康小鼠血清反应; 2、4: 空载体转化菌 pET-28a (+)/BL21 (DE3) 裂解物分别与鼠抗微小隐孢子虫阳性血清和健康小鼠血清反应。

M: Protein marker; 1, 3: Expression product of pET-28a (+)-S/BL21 (DE3) recognized by antisera from mice immunized by *C. parvum* and sera of healthy mice, respectively; 2, 4: Expression product of pET-28a (+)/BL21 (DE3) recognized by antisera from mice immunized by *C. parvum* and sera of healthy mice, respectively.

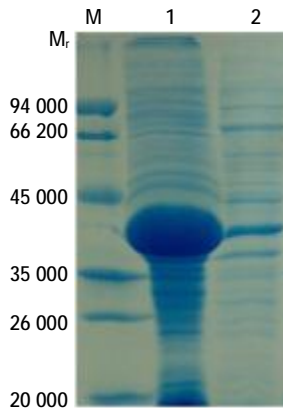
图 4 重组蛋白 Western blotting 分析  
Fig.4 Western blotting analysis of the recombinant protein

### 5 表达产物凝胶薄层扫描分析

目的蛋白的表达量可占菌体总蛋白的 72.6%。

## 6 目的蛋白的可溶性分析

阳性表达菌经诱导和超声破碎之后,离心分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,发现目的蛋白存在于沉淀中,以包涵体的形式表达(图 5)。



M: 蛋白质标志物; 1: 沉淀; 2: 上清。

M: Protein marker; 1, 2: Precipitation and supernatant of ultrasonic pET-28a(+)-S/BL21 (DE3) 4 h after induction by centrifugation, respectively.

图 5 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的可溶性分析  
Fig.5 Solubility analysis of the recombinant protein

## 讨 论

隐孢子虫根据卵囊形态、宿主特异性和基因特征,分为 18 个种<sup>[9]</sup>,其中以人隐孢子虫和微小隐孢子虫对人畜健康威胁最大。研究者在多株人隐孢子虫和微小隐孢子虫体内发现原虫病毒,但在鼠隐孢子虫、火鸡隐孢子虫和贝氏隐孢子虫等其他种内不存在该病毒。微小隐孢子虫病毒所含的 S-dsRNA 核酸仅有 1 个开放阅读框,用于编码衣壳蛋白。因此,该病毒核酸有望作为对人具有感染性的隐孢子虫与其他种类隐孢子虫相鉴别的一个分子标记,及含病毒虫株的分离与鉴定的依据。

目前国外已应用微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白基因进行微小隐孢子虫卵囊的检测。Kniel 等<sup>[8]</sup>利用表达的病毒衣壳蛋白制备了抗兔多克隆抗体——抗 rCPV40 抗体,并在斑点试验中证实该抗体可检测的卵囊数最低为 1 个,灵敏度是抗总卵囊蛋白抗体和抗 M<sub>r</sub> 41 000 卵囊表面抗原抗体的 1 000 倍。随后, Kniel 等<sup>[10]</sup>又应用斑点印迹检测人工感染 3 个不同浓度的微小隐孢子虫卵囊(每 100 μl 有 10<sup>6</sup>、10<sup>2</sup> 和 10 个)的洋葱与茼蒿叶,结果显示,抗 rCPV40 抗体可检测洋葱与茼蒿叶中的微小隐孢子虫卵囊的最低浓度为 10 个/100 μl。Kniel 等<sup>[11]</sup>用纯化的衣壳蛋白 CSpV40 免疫小鼠,制备微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白的单克隆抗体。免疫研究表明,MAbCSpV40-1 与微

小隐孢子虫卵囊粗提取物中 M<sub>r</sub> 40 000 的蛋白结合。MAbCSpV40-1 还可检测可溶性重组蛋白和卵囊总蛋白提取物中的 CSpV40 抗原。这些研究表明,抗 rCPV40 抗体可用于检测水源中的微小隐孢子虫卵囊,也进一步证实病毒衣壳蛋白可作为检测食物中的含病毒隐孢子虫卵囊的标志物。

本研究成功构建了微小隐孢子虫病毒衣壳蛋白原核表达载体 pET-28a(+)-S,在 E. coli BL21(DE3)中表达的目的蛋白主要以包涵体形式存在。在 37 ℃, IPTG 终浓度 1 mmol/L,诱导 4 h 的条件下,重组蛋白表达量最大,占菌体总蛋白的 72.6%。pET-28a(+)载体上的 His Tag 是常用的纯化蛋白(尤其是以包涵体形式表达的蛋白)的融合标签。因此,本研究构建的原核表达载体 pET-28a(+)-S,为利用 His Tag 纯化重组蛋白提供了材料,为人隐孢子虫感染的检测奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] D'Antonio RG, Winn RE, Taylor JP, et al. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts[J]. *Ann Intern Med*, 1985, 103(6): 886-888.
- [2] Hayes EB, Matte TD, O'Brien TR, et al. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply[J]. *N Engl J Med*, 1989, 320(21): 1372-1376.
- [3] Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(3): 161-167.
- [4] Petersen C, Gut J, Leech JH, et al. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus[J]. *Clin Infect Dis*, 1992, 15(6): 903-909.
- [5] Zhu HL, Zhang LX, Ning CS, et al. Zoonotic *Cryptosporidium* species and genotypes[J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2007, 14(1): 48-55. (in Chinese)  
(朱惠丽, 张龙现, 宁长申, 等. 人兽共患隐孢子虫种类及基因型[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2007, 14(1): 48-55.)
- [6] Nikolai VK, Keith MW, Michael VN, et al. Virus-like double stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* [J]. *Mol Microbiol*, 1997, 26(2): 289-300.
- [7] Khrantsov NV, Chung PA, Dykstra CC, et al. Presence of double-stranded RNAs in human and calf isolates of *Cryptosporidium parvum*[J]. *J Parasitol*, 2000, 86(2): 275-282.
- [8] Kniel KE, Higgins JA, Trout JM, et al. Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum* virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts[J]. *J Microbiol Meth*, 2004, 58(2): 189-195.
- [9] Fayer R, Xiao L. *Molecular epidemiology [M]*//Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2nd ed. CRC Press and IWA Publishing, 2008: 119-163.
- [10] Kniel KE, Jenkins MC, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts on fresh vegetables and 1 herbs using antibodies specific for a *Cryptosporidium parvum* viral antigen[J]. *J Food Prot*, 2005, 68(2): 1093-1096.
- [11] Jenkins MC, O'Brien CN, Trout JM, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts by dot-blotting using monoclonal antibodies to *Cryptosporidium parvum* virus 40-kDa capsid protein [J]. *J Parasitol*, 2008, 94(1): 94-98.

(收稿日期: 2010-10-12 编辑: 高石)