

文章编号: 1000-7423(2013)-02-0110-04

【论著】

## 细粒棘球绦虫重组 BCG-EgG1Y162 菌株的构建和表达

祖力皮也·吐尔逊<sup>1</sup>, 德力夏提·依米提<sup>2</sup>, 曹春宝<sup>2</sup>, 马海梅<sup>2</sup>,  
李玉娇<sup>1</sup>, 周晓涛<sup>2</sup>, 朱明<sup>2</sup>, 马秀敏<sup>1</sup>, 温浩<sup>1</sup>, 丁剑冰<sup>1,2\*</sup>

**【摘要】** 目的 构建和表达细粒棘球绦虫重组卡介苗 (BCG) 菌株 rBCG-EgG1Y162。方法 通过基因工程技术将细粒棘球绦虫抗原 EgG1Y162 的编码基因与大肠埃希菌 (*E. coli*) - 分枝杆菌穿梭表达质粒载体 pMV361 重组, 并转化 *E. coli* 后进行扩增。重组质粒 pMV-EgG1Y162 经 PCR 和双酶切鉴定后, 进行测序。将鉴定正确的 rpMV-EgG1Y162 通过电穿孔技术转化至感受态 BCG 菌株中, 构建 rBCG-EgG1Y162。经 PCR 和双酶切鉴定正确后, 扩增培养 2 周, 并于 45 °C 放置 30 min, 诱导目的蛋白表达, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白表达情况, 并以前体抗原核表达重组蛋白 EgG1Y162 血清为一抗进行蛋白质印迹 (Western blotting) 分析。结果 重组质粒 rpMV-EgG1Y162 经 PCR 扩增和双酶切后, 均获得约 360 bp 的 EgG1Y162 目的基因片段, 与预期片段长度一致, 测序结果表明插入序列正确。将其通过电穿孔转化 BCG 菌株后, rBCG-EgG1Y162 生长良好, 经酶切和 PCR 鉴定正确。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示, 目的表达产物的相对分子质量 ( $M_r$ ) 约为 71 000。结论 构建和表达了细粒棘球绦虫 rBCG-EgG1Y162 菌株。

**【关键词】** 细粒棘球绦虫; EgG1Y162; 重组卡介苗

中图分类号: R383.33

文献标识码: A

## Construction and Expression of the *Echinococcus granulosus* Recombinant BCG-EgG1Y162

Zulipiye·TUERXUN<sup>1</sup>, Delixiati·YIMITI<sup>2</sup>, CAO Chun-bao<sup>2</sup>, MA Hai-mei<sup>2</sup>, LI Yu-jiao<sup>1</sup>,  
ZHOU Xiao-tao<sup>2</sup>, ZHU Ming<sup>2</sup>, MA Xiu-min<sup>1</sup>, WEN Hao<sup>1</sup>, DING Jian-bing<sup>1,2\*</sup>

(1 State Key Laboratory and Incubation Base of Xinjiang Major Diseases Research, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2 Pre-clinic College of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**【Abstract】** **Objective** To construct and express *Echinococcus granulosus* recombinant bacille Calmette-Guerin (BCG) strain rBCG-EgG1Y162. **Methods** The encoding gene of the antigen EgG1Y162 of *E. granulosus* was recombined with *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle expression plasmid vector pMV361 by genetic engineering technique, and transformed into *E. coli* for amplification. The recombinant plasmid rpMV-EgG1Y162 was identified by PCR, double digestion with restriction enzymes, and sequence analysis. The confirmed rpMV-EgG1Y162 was transformed into BCG strain via electroporation technique to construct the recombinant rBCG-EgG1Y162. After identification by PCR and double digestion with restriction enzymes, the recombinant strain was cultured for about 2 weeks. In order to induce the expression of target protein, the rBCG was placed in 45 °C for 30 min. SDS-PAGE and Western blotting were used to analyze the expressive protein. **Results** The product of recombinant plasmid rpMV-EgG1Y162 was approximately 360 bp by PCR amplification and double digestion with restriction enzymes, consistent with the expected fragment length. Sequencing results showed that the inserted sequence was correct. The rBCG-EgG1Y162 grew well and the identification of PCR and enzyme digestion revealed accuracy. The results of SDS-PAGE and Western blotting showed that the relative molecular weight ( $M_r$ ) of the protein was about 71 000. **Conclusion** The *E. granulosus* rBCG-EgG1Y162 strain is constructed and expressed.

**基金项目:** 国家自然科学基金 (No. 31000411, 81160378), 新疆维吾尔自治区高校科研计划 (No. XJEDU2010S25)

**作者单位:** 1 新疆重大疾病医学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011; 2 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011

\* 通讯作者, E-mail: djbing002@163.com

**【Key words】** *Echinococcus granulosus*; EgG1Y162; Recombinant bacille Calmette-Guerin

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31000411 and 81160378) and the Scientific Research Program in High Education of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China (No. XJEDU2010S25)

\* Corresponding author, E-mail: djbing002@163.com

细粒棘球蚴病是由细粒棘球绦虫幼虫感染中间宿主引起的一种地方性和自然疫源性的人兽共患寄生虫病<sup>[1]</sup>。疫苗的研制有利于对该病流行的控制<sup>[2]</sup>。重组卡介苗 (BCG) 是借助基因工程技术对 BCG 基因进行合理的重组改造, 并利用 BCG 的活疫苗载体的特点, 构建单次免疫诱导持久作用的新型疫苗<sup>[3-5]</sup>。

前期研究发现, 细粒棘球蚴 EgG1Y162 抗原的基因序列、氨基酸序列和蛋白结构均与多房棘球蚴的候选疫苗 EmY162 具有高度的相似性<sup>[6,7]</sup>。国外研究发现, EmY162 对终末宿主有良好的保护作用, 因此推测 EgG1Y162 抗原可能也是终末宿主的保护性抗原。本研究拟将 EgG1Y162 抗原基因克隆入大肠埃希菌-分枝杆菌穿梭表达载体 pMV361 中, 将此重组质粒电转化入 BCG, 构建细粒棘球绦虫 rBCG-EgG1Y162 菌株, 并诱导表达。

## 材料与方 法

### 1 材 料

1.1 实验动物 成年雌性新西兰兔 2 只, 2~2.5 kg, 购自新疆医科大学第一附属医实验动物中心。

1.2 主要试剂 大肠埃希菌-分枝杆菌穿梭质粒 pMV361 和 BCG 由石河子大学医学院张万江教授惠赠。大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  和 BL21 菌株由本实验室保存。UNIQ 10 柱式质粒小/大量抽提试剂盒和 DNA 纯化试剂盒均购自上海捷瑞生物工程有限公司。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、LB 液体和固体培养基均购自大连宝生物 TaKaRa 公司。Middlebrook 7H10 和 7H9 琼脂培养基购自美国 Difco 公司。DNA 标志物 DL2000 和蛋白标志物购自美国 Invitrogen 公司。

### 2 方 法

2.2 目的基因的 PCR 扩增 根据 EgG1Y162 基因序列 (GenBank 登录号为 AB462014) 设计引物。分别引入限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 的酶切位点。上、下游引物序列分别为 5'-CCGAATTCGTAGACCAGAGCTAATAG-3' 和 5'-CCAAGCTTGAATCCGCCAGCTCTGTCA-3', 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。以在前期研究中构建的重组质粒 PUCm-T/EgG1Y162 cDNA 为模板<sup>[6]</sup>, PCR 反应条件

为: 95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 每个循环降 1 °C, 共 11 个循环; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 75 °C 2 min, 共 25 个循环; 72 °C 7 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.3 重组穿梭质粒 rpMV-EgG1Y162 的构建和鉴定 EgG1Y162 的 PCR 产物经 DNA 纯化试剂盒纯化回收后, 与 pMV361 载体分别用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 并按 3:1 的摩尔比 (目的片段: 载体) 进行连接。连接产物直接转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 并接种于含卡那霉素 (100  $\mu$ g/ml) 的 LB 平板上进行筛选, 选取生长良好的单菌落, 少量增菌后提取质粒, 分别通过酶切、PCR 扩增和序列测定 (由北京六合华大基因科技股份有限公司完成) 等方法鉴定。

### 2.5 rBCG-EgG1Y162 的构建和鉴定

2.5.1 BCG 的复苏和培养 将 -80 °C 保存的 BCG 菌株复苏后, 接种于含 10% 油酸白蛋白葡萄糖酶 (OADC) 营养液的 7H9 琼脂培养基中, 37 °C 180 r/min 震荡至培养液混浊, 即有沙样菌体生长后用于感受态细胞的制备。

2.5.2 感受态 BCG 细胞的制备 取在 7H9 液体培养基中生长良好的 BCG 培养物, 再次接种, 37 °C 继续震荡培养约 10 d, 4 °C 1 680 $\times$ g 离心 10 min, 收集菌体, 细菌沉淀以灭菌 10% 甘油洗涤 4 次, 最后一次用适量的 10% 甘油重悬菌体, 即得到 BCG 感受态细胞。

2.5.3 重组质粒的电转化 取 100  $\mu$ l 感受态 BCG 细胞 (吸光度  $A_{450}$  值为 0.4~0.6) 加入 10  $\mu$ l 重组质粒 (浓度为 4  $\mu$ g/ml), 混匀后转移至预冷的电击杯中。电转化条件为: 电容 25  $\mu$ F, 电阻 100  $\Omega$ , 场强  $18 \times 10^5$  V/m, 转化时间为 5 ms, 转化 3 次。放电结束后, 将 100  $\mu$ l 菌液立即转移入 1 ml 7H9 液体培养液中, 37 °C 震荡培养 24 h 以上。取该菌液 1 680 $\times$ g 室温离心 10 min, 用 100  $\mu$ l 上清重悬沉淀后, 均匀涂布于含卡那霉素 30  $\mu$ g/ml 和 OADC 营养液的 7H10 固体培养基表面。为避免培养基干燥, 在培养皿的盖子上加入 2~3 ml 灭菌去离子水, 用多层封口膜密封, 37 °C 培养 3~4 周。

2.6 rBCG 的鉴定 从 7H10 固体培养板表面挑取单菌落, 在含卡那霉素的 7H9 液体培养基中进行扩增, 37 °C 摇菌培养约 10 d。取 2 ml 菌液 1 680 $\times$ g 离心 10 min, 去上清。沉淀用双蒸水洗涤 3 次, 菌体煮沸 10 min

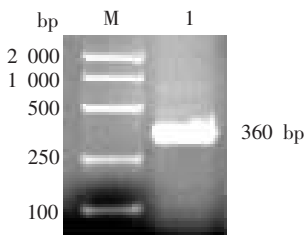
后作为模板进行 PCR 鉴定。提取质粒进行酶切鉴定。  
 2.7 rBCG-EgG1Y162 的诱导表达 将经 PCR 鉴定电转化成功的 rBCG 接种在含卡那霉素的 7H9 液体培养基中, 37 °C 摇菌培养至对数生长期 (约 15 d), 45 °C 热诱导 30 min。取 1 ml 热诱导后的 rBCG 菌液, 4 °C 1 680×g 离心 10 min, 收集沉淀, 加入 1 ml 预冷的 PBS 重悬沉淀后, 再加入等体积蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min, 立即冰浴 5 min, 4 °C 6 720×g 离心 5 min, 取 10 μl 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

2.8 免疫蛋白印迹 (Western blotting) 分析 将前期研究<sup>[6,7]</sup>中原核表达的重组蛋白 EgG1Y162 纯化后, 溶解于磷酸盐缓冲液中, 浓度为 200 μg/ml, 按 1:1 的比例加入福氏完全佐剂, 免疫家兔 2 只, 在其背部进行皮下多点免疫, 2 ml/只, 每 2 周 1 次, 共 3 次, 末次免疫后 2 周耳缘静脉采血, 制备血清。将 SDS-PAGE 后的蛋白转至 PVDF 膜上, 封闭 3 h, 洗涤 3 次, 加入多克隆血清 (1:100) 反应 2 h, 洗涤 3 次, 加入二抗 (1:1 000) 反应 1 h, 洗涤 3 次, 用 DAB 显色剂与 PVDF 膜避光反应 10~15 min, 蒸馏水终止反应。

### 结 果

#### 1 EgG1Y162 基因的 PCR 扩增

以重组质粒 PUCm-T/EgG1Y16 为模板的 PCR 扩增结果显示, 在约 360 bp 处见一特异性扩增条带, 与预期大小相符 (图 1)。



M: DNA 标志物; 1: EgG1Y162 PCR 产物。  
 M: DNA marker; 1: EgG1Y162 PCR product.

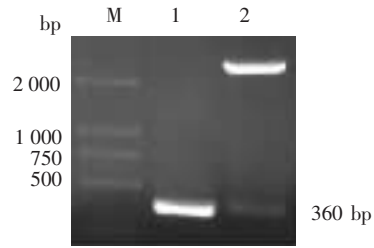
图 1 EgG1Y162 基因的 PCR 扩增结果  
 Fig.1 PCR result of EgG1Y162 gene

#### 2 重组穿梭质粒 rpMV-EgG1Y162 的鉴定

重组质粒 rpMV-EgG1Y162 经限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 双酶切, 以及 PCR 扩增, 均可见约 360 bp 的条带 (图 2), 其测序结果正确。

#### 3 rBCG-EgG1Y162 的鉴定

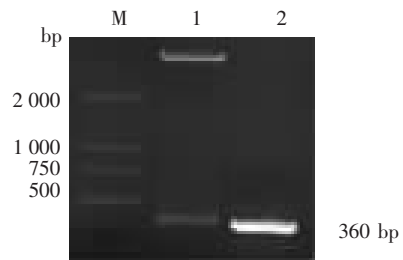
以 rBCG-EgG1Y162 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到约 360 bp 的特异性条带。抽提重组质粒, 限制性内切酶酶切结果亦得到相同位置的条带 (图 3)。



M: DNA 标志物; 1: rpMV-EgG1Y162 的 PCR 产物; 2: rpMV-EgG1Y162 的双酶切产物。

M: DNA marker; 1: PCR product of rpMV-EgG1Y162; 2: rpMV-EgG1Y162 digested by EcoR I and Hind III.

图 2 重组质粒 rpMV-EgG1Y162 的酶切和 PCR 鉴定结果  
 Fig.2 Identification of rpMV-EgG1Y162 by restriction enzyme digestion and PCR



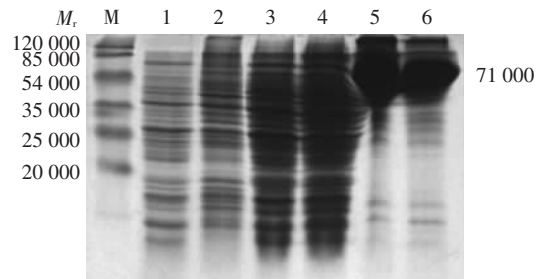
M: DNA 标志物; 1: rBCG-EgG1Y162 的双酶切产物; 2: rBCG-EgG1Y162 的 PCR 产物。

M: DNA marker; 1: rBCG-EgG1Y162 digested by EcoR I and Hind III; 2: PCR product of rBCG-EgG1Y162.

图 3 rBCG-EgG1Y162 酶切和 PCR 鉴定  
 Fig.3 Identification of rBCG-EgG1Y162 by restriction enzyme digestion and PCR

#### 4 rBCG-EgG1Y162 的诱导表达

rBCG-EgG1Y162 培养至对数生长期后, 经 45 °C 热诱导后进行 SDS-PAGE, 与未经诱导的 rBCG 相比, 在相对分子质量 ( $M_r$ ) 约 71 000 处有明显的目的蛋白条带 (图 4)。

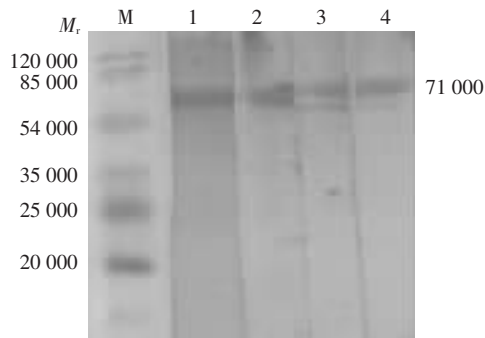


M: 蛋白标志物; 1~4: 未经诱导; 5、6: 经热诱导。  
 M: Protein marker; 1~4: Not induced; 5, 6: Induced by heating.

图 4 EgG1Y162 在 rBCG 中表达的 SDS-PAGE 鉴定  
 Fig.4 Identification of EgG1Y162 expression in rBCG by SDS-PAGE

#### 5 rBCG-EgG1Y162 表达产物的 Western blotting 分析

rBCG-EgG1Y162 表达产物与免疫家兔制备的多克隆血清反应后, 在约  $M_r$  71 000 处产生一特异反应带 (图 5)。



M: 蛋白标志物; 1~4: rBCG-EgG1Y162 的表达产物。

M: Protein marker; 1-4: Expression product of rBCG-EgG1Y162.

图 5 rBCG-EgG1Y162 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting of expression product of rBCG-EgG1Y162

## 讨 论

目前, 棘球蚴病的预防不仅是医学上的一个难题, 还是一个严重的公共卫生问题<sup>[8]</sup>。因此, 研制出具有实际应用价值的新型疫苗是解决当前公共卫生问题的关键, 而找到保护性靶抗原是目前研究工作的重点<sup>[9,10]</sup>。

重组卡介苗 (rBCG) 是借助基因工程技术对 BCG 基因进行优化改造, 并利用 BCG 活疫苗载体的特性, 构建一次免疫即能产生较强免疫应答的基因工程疫苗<sup>[3]</sup>。该种基因工程 rBCG 疫苗具有以下特点: ① 其安全性以及稳定性已经确认; ② 对与 BCG 重组的靶抗原没有限制性要求; ③ 接种一次即能诱导持久免疫; ④ 具备免疫佐剂与载体的双重功能, ⑤ 成本低, 容易保存<sup>[11,12]</sup>。

本研究采用的载体是大肠埃希菌-分枝杆菌穿梭质粒载体 pMV361, 是国外研究者 Stover 等<sup>[13]</sup>1991 年在质粒 pMV261 的基础上构建出的一种整合载体, 其包含热休克蛋白基因 hsp60。本研究将 EgG1Y162 基因片段插入至 hsp60 启动子下游, 在热诱导条件下可控制目的蛋白的表达, 表达蛋白产物为 EgG1Y162 和

HSP60 的融合蛋白, 约为  $M_r$  71 000。若用 rBCG-EgG1Y162 免疫动物, hsp60 将有助于目的蛋白在动物体内稳定、持久地表达。

志谢 本研究得到石河子大学医学院张万江教授和袁俐教授的大力支持, 在此表示感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 张先军. 包虫病危害与预防 [J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(1): 114-116.
- [2] 魏庆宽, 贾凤菊, 李瑾, 等. 微小隐孢子虫重组 BCG 疫苗免疫保护作用观察 [J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (5): 436-441.
- [3] Christy AJ, Dharman K, Dhandapaani G, *et al.* Epitope based recombinant BCG vaccine elicits specific Th1 polarized immune responses in BALB/c mice [J]. Vaccine, 2012, 30 (7): 1364-1370.
- [4] 李文桂, 王鸿, 朱佑, 等. 多房棘球绦虫 pBCG-Em14-3-3 重组质粒的构建及其在 BCG 中的表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(12): 1111-1114.
- [5] 孙颖, 张灵霞, 吴雪琼, 等. mpt64-卡介苗重组疫苗的构建、免疫原性及抗结核作用 [J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(7): 14-19.
- [6] 曹春宝, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 抗原基因的克隆及蛋白质序列分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3 (12): 903-906.
- [7] 曹春宝, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 抗原基因的克隆及序列分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(2): 177-179.
- [8] 姜磊, 陈大忠. 包虫病防治工作中的健康教育 [J]. 疾病预防控制通报, 2011, 26(6): 62-65.
- [9] 刘转转, 杨燕萍, 殷国荣, 等. 刚地弓形虫苹果酸脱氢酶基因的克隆表达及免疫原性分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(1): 2-17.
- [10] 孙敏, 何深一, 赵广会, 等. 刚地弓形虫 14-3-3 蛋白真核表达载体的构建与表达 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30 (6): 438-441.
- [11] Desel C, Dorhoi A, Bandermann S, *et al.* Recombinant BCG  $\Delta ureC$  hly+ induces superior protection over parental BCG by stimulating a balanced combination of type 1 and type 17 cytokine responses [J]. J Infect Dis, 2011, 204(10): 1573-1584.
- [12] Teo WH, Nurul AA, Norazmi MN, *et al.* Immunogenicity of recombinant BCG-based vaccine expressing the 22 kDa of serine repeat antigen (SE22) of *Plasmodium falciparum* [J]. Trop Biomed, 2012, 29(2): 239-253.
- [13] Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines [J]. Nature, 1991, 351(6326): 456-460.

(收稿日期: 2012-09-25 编辑: 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2013)-02-0113-01

【消息】

## 第五届北京热带医学与寄生虫学论坛通知

为促进热带医学与寄生虫学领域的学术交流, 首都医科大学附属北京友谊医院、北京热带医学研究所定于 2013 年 4 月 17~19 日在北京举办“第五届北京热带医学与寄生虫学论坛”。届时将邀请国内相关领域知名专家共聚一堂, 就热带医学与寄生虫学方面国内最为关注的问题作专题报告, 并从不同角度切磋相关热点问题, 以繁荣学术发展, 增进同仁交流。本届论坛已列入国家级继续医学教育项目, 与会代表将获得国家

级 I 类学分。欢迎大家踊跃报名。有关本届论坛报名、注册等事宜请与组委会联系。

地 址: 北京市宣武区永安路 95 号北京热带医学研究所

邮政编码: 100050

联系人: 谷俊朝

电 话: 010-63025849, 010-63138570

邮 箱: reyansuo2008@sohu.com