

日本血吸虫丝氨酸蛋白酶抑制剂的克隆与表达^{*}

雷 黎¹, 刘 森², 沈际佳^{2△} (1. 安徽中医药大学第二附属医院检验科, 合肥 230061; 2. 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032)

【摘要】 目的 获得日本血吸虫丝氨酸蛋白酶抑制剂的原核表达蛋白。**方法** 根据 GenBank 中日本血吸虫丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列设计引物, 以 cDNA 为模板聚合酶链反应(PCR)扩增该基因, 将其亚克隆入原核表达载体 pET28a 中, 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达重组蛋白。**结果** 成功克隆了具有完整开放阅读框的日本血吸虫丝氨酸蛋白酶抑制剂重组质粒, 获得相对分子质量约 44×10^3 的目的蛋白。**结论** 成功地克隆表达了丝氨酸蛋白酶抑制剂, 为进一步研究该蛋白的特性、功能及免疫保护作用奠定了基础。

【关键词】 日本血吸虫; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 克隆; 表达

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 02. 004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)02-0151-02

Cloning and expressing of Schistosoma japonicum serine protease inhibitor^{*} LEI Li¹, LIU Miao², SHEN Ji-jia^{2△}
(1. Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230061, China; 2. Research and Teaching Section of Pathogenic Biology, Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China)

【Abstract】 Objective To obtain Schistosoma japonicum serine protease inhibitor(SPI) prokaryotic express protein. **Methods** The primer was designed on the basis of sequence of Schistosoma japonicum SPI in Genbank, the PCR method was used to amplify the gene with cDNA as the template. Then the product was subcloned into prokaryotic expression vector pET28a, IPTG induced to express the recombination protein. **Results** The Schistosoma japonicum SPI recombinant plasmid with complete patency reading frame was successfully cloned and the interest protein with the relative molecular mass 44×10^3 was obtained. **Conclusion** SPI is successfully cloned and expressed, which lays the foundation for the further study of the protein's character, function and immunoprotection effect.

【Key words】 Schistosoma japonicum; serine protease inhibitor; clone; express

在人类寄生虫病中, 就社会经济和公共卫生重要性而言, 血吸虫病是仅次于疟疾的第二重要的热带病, 是一种严重威胁人民健康的人畜共患寄生虫性传染病, 在我国仍然是一个重要的公共卫生问题^[1]。因而通过免疫方法继续寻找新的血吸虫抗原分子是非常必要的。作者根据 GenBank 中公布的丝氨酸蛋白酶抑制剂(SPI)的序列设计引物, 克隆表达了 SPI, 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 BL-21 大肠埃希菌、表达载体 pET28a 由本室保存。克隆载体 pMD18-T、各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、聚合酶链反应(PCR) Marker、蛋白质低分子量的标准品、Tris 碱、明胶均购自大连宝生物工程有限公司; 聚合酶链反应(PCR)胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自杭州 V-gene 生物工程有限公司; 其他试剂是国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 日本血吸虫 SPI 基因的体外扩增 根据 SPI 基因序列, 设计一对引物, 序列为 Primer1: 5'-GAA TTC ATG GCA CCA AAA GTT CAA G-3'; Primer2: 5'-CTC GAG TTA TAA CAT TGG ATT GAT T-3'。两条引物分别引入限制性的内切酶 Xho I 和 EcoR I 酶切位点, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以日本血吸虫 cDNA 为模板, PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min 热启动, 94 ℃ 变性 1 min, 52 ℃ 退火 1 min, 72 ℃

延伸 1.5 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 1% 琼脂糖电泳分析。PCR 产物胶回收按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 日本血吸虫 SPI 基因的克隆与鉴定 将 PCR 扩增的 SPI 基因与 T 载体相连, 然后转化 XL1-blue; 第 2 天, 提取质粒, 经 Xho I 和 EcoR I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带。将表达载体 pET28a 用同样的两个酶进行酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收目的条带, 再与已经回收的 SPI 的 PCR 产物进行连接, 转化 BL-21, 涂含有卡那霉素的 LB 平板; 第 2 天, 从平板中挑取 10 个单个菌落, 扩大培养, 然后提取质粒, 用经 Xho I 和 EcoR I 双酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳。将酶切鉴定正确的克隆送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.2.3 日本血吸虫 SPI 的表达 将酶切与测序鉴定正确的克隆, 加入到含卡那霉素的 3 mL LB 液体培养基中, 37 ℃、220 r/min 振荡培养过夜; 再按 1:50 的比例扩大培养约 3 h, 使 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时, 留取 1 mL 的菌液; 剩余的菌液中加入 1 mol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导, 继续培养, 分别在加入 IPTG 后 5 h、12 h 收集 1 mL 的菌液, 再将所有收集的菌液均作同样的处理, 4 000 r/min 离心 5 min, 每管中加入 30 mL 的无菌水重悬细菌和 30 mL 的 2× 蛋白上样缓冲液, 沸水浴中煮沸 10 min 以裂解细菌, 4 000 r/min 离心 5 min, 采用 12% 凝胶, 不连续缓冲系统, 通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 浓缩胶 55 V 1

^{*} 基金项目: 安徽省自然科学基金项目(050430805)。

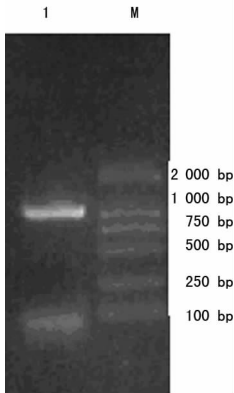
作者简介: 雷黎, 男, 副主任技师, 硕士研究生, 日本血吸虫分子免疫学, 主要从事临床分子免疫学工作。

[△] 通讯作者, E-mail: shenjijia@hotmail.com。

h、分离胶 110 V 1.5 h,考马氏亮蓝染色 1 h,摇振脱色过夜,观察结果并拍照。

2 结 果

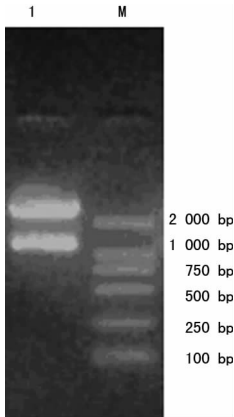
2.1 日本血吸虫 SPI 的 PCR 扩增 PCR 扩增后,1%琼脂糖电泳后可以见到约 1 200 bp 大小的条带,与理论值一致,见图 1。



注:1 为 SPI 的 PCR 产物,M 为 DNA 标记物。

图 1 SPI 的 PCR 扩增产物电泳图

2.2 日本血吸虫 SPI 的重组体的酶切鉴定结果 提取质粒,用 EcoR I 和 Xho I 酶切后,1%琼脂糖电泳可见大小两条带,可见 1 200 bp 左右的目的条带出现,与理论大小一致,结果见图 2。



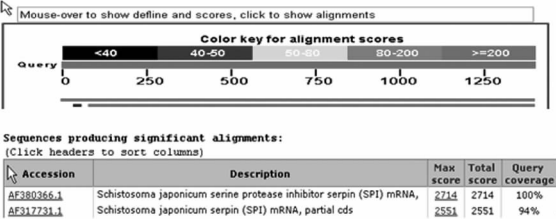
注:1 为重组体的酶切鉴定,M 为 DNA 标记物。

图 2 SPI 的酶切鉴定结果

2.3 序列分析结果 将测序结果分别与 GenBank 进行比对,结果显示本研究克隆入表达载体中的序列为日本血吸虫 SPI,表明重组质粒构建成功。

2.4 日本血吸虫 SPI 的表达(SDS-PAGE) SDS-PAGE 结果显示,在没有加入 IPTG 诱导时,未见明显特异性条带出现,在加入 IPTG 后的 5 h 和 12 h 后,在相对分子质量 44×10^3 处可见有明显条带出现,与理论值大小相符(图 3)。

Distribution of 97 Blast Hits on the Query Sequence



注:1 为未加 IPTG;2 为加入 IPTG 后 5 h;3 为加入 IPTG 后 12 h, M 为蛋白质标准物。

图 3 SPI 表达的 SDS-PAGE 图

3 讨 论

日本血吸虫生活史复杂,有性生殖和无性繁殖交替,中间宿主和终末宿主转换^[2],血吸虫在演化过程中虫体内仍具有许多种、属间及各期间高度保守的基因,已知这些高度保守基因序列及其产物在生长、发育、生殖及血吸虫与宿主相互关系中发挥着重要作用,在虫体的信号传递、细胞分化与增殖、蛋白质相互作用和宿主免疫诱导反应等生理生命活动中也是至关重要的。

本实验室在运用对血吸虫感染有抗性的血清免疫学方法筛选日本血吸虫童虫 cDNA 文库时,在 25 个阳性克隆中,其中就有 2 个为日本血吸虫 SPI^[3]。而阎玉涛等^[4]用对血吸虫感染存在天然抗性的东方田鼠的血清筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库时发现,所筛选出的 51 个阳性克隆中有 10 个为含日本血吸虫 SPI 基因的阳性克隆,可见血吸虫 SPI 与血吸虫的免疫逃避机制明显相关。

SPI 属于丝氨酸蛋白酶超家族,此家族是一类具有共同来源及结构序列高度同源的蛋白酶抑制剂家族^[3]。这个家族已发现了数百个成员,广泛分布于动物、植物体和病毒粒子中。SPI 具有多种功能,可作为酶的抑制剂起作用,如抑制丝氨酸蛋白酶的活性、抑制纤溶酶原激活剂的活性等。对血吸虫 SPI 的功能研究较少,Lim 等^[5]发现,小鼠先注射非肽类 SPI,然后进行尾蚴攻击感染,可使小鼠获得 80% 的减虫率和 92% 的减卵率。很多学者认为,血吸虫本身 SPI 的作用在于该抑制剂与血吸虫的丝氨酸蛋白酶共价结合后,封闭了丝氨酸蛋白酶的表位,该复合物中丝氨酸蛋白酶的免疫原性消失;同时该抑制剂可抑制嗜中性粒细胞弹性蛋白从而抑制嗜中性粒细胞对寄生于体内血吸虫的攻击。

本研究以日本血吸虫 cDNA 为模板,选择不含任何多克隆酶切位点的 T 载体,当 PCR 产物在与 T 载体相连后,转化细菌,提取质粒,然后使用 PCR 引物中引入的限制性内切酶将 PCR 产物酶切下来,不仅极大地提高了 PCR 产物酶切效率,而且克服了直接酶切,胶回收 PCR 产物引起的损失,大大提高了 PCR 产物与相应载体的连接效率,并将其亚克隆入原核表达载体 pET28a 中,IPTG 诱导表达重组蛋白——SPI。SPI 是一类从病毒到人类均有分布的蛋白,相对分子质量较大,通常由 300~500 个氨基酸残基组成。它含有 8~9 个 α 螺旋、3 个 β 折叠组成的保守三级结构,功能域位于 C 端,有一个暴露于蛋白主体外的反应中心环(RCL),其与抑制蛋白酶的种类和活性密切相关。其中,RCL 上的 P1 位点氨基酸残基决定了抑制蛋白酶的特异性,SPI 可在细胞内也可分泌到细胞外发挥作用,它主要参与寄生虫与宿主的相互作用,可作用于宿主酶利于虫体获取营养,或抵抗宿主酶对虫体的损伤,或参与调控宿主的炎症及免疫应答^[6]。重组表达获得血吸虫 SPI,为进一步研究日本血吸虫 SPI 的特性、功能及免疫保护作用,深入了解血吸虫适应宿主体及对宿主致病的分子机制,发展基于抑制剂靶点干预的血吸虫病防治药物提供参考,也为寻找血吸虫新保护性候选疫苗分子的研究提供了新思路。

参考文献

[1] 袁忠英,沈玉娟,曹建平,等. 东方田鼠血清免疫筛选日本血吸虫童虫 cDNA 文库及新基因分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2008,20(4):255-259.

[2] 杨蕪萍,郭素霞,陈晶,等. 编码日本血吸虫 Argonaute 蛋白全长 cDNA 克隆、表达及初步鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(9):830-834.

胞呈浓度依赖,刺激物浓度在 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 最好,L-GO 对 N2a 细胞的活性高于 D-GO,各浓度比对差异有统计学意义($P<0.01$)。

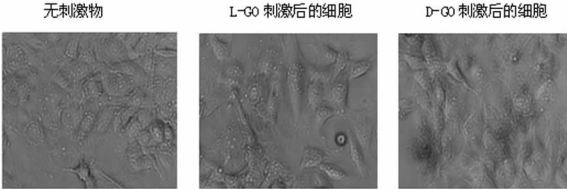


图 1 显微镜观察 N2a 细胞生长活性

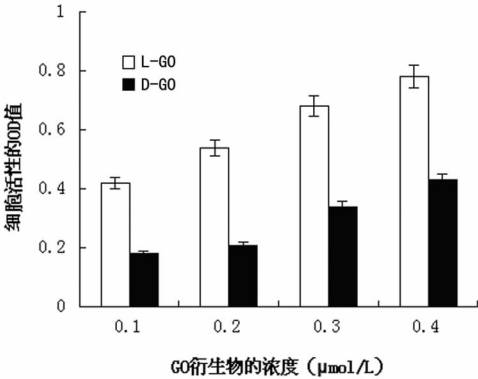


图 2 GO 衍生物对 N2a 细胞生长活性比较

2.3 0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞增殖比较 图 3 结果显示,L-GO 对 N2a 细胞的活性为 94%,D-GO 对 N2a 细胞的活性为 52%,两者间统计学分析差异有统计学意义($P<0.01$)。

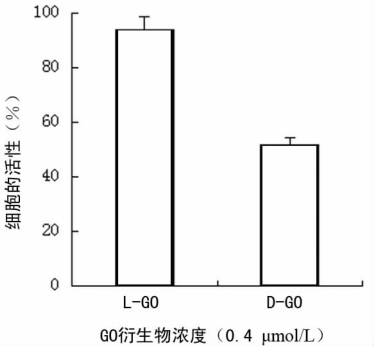


图 3 0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞生长活性的比较

3 讨 论

GO 衍生物是单原子结构,表面有很多的含氧活性基团,生物相容性很好,而且十分有利于对 GO 的表面进行化学功能化修饰。由于氧化石墨烯表面含有羟基、环氧基、羧基等基团,这些基团成为氧化石墨烯发挥功能的活性中心^[6]。氧化石墨烯在生物医学方面的应用发展十分迅速。最近几年,氧化石墨烯在疾病诊断方面,微生物学方向,药物的运输以及分子生物

学等方面得到了各研究学者的广泛关注^[7],国外也有学者将其作为药物载体开发^[8-9]。最近在阿尔茨海默病(AD)研究中,由于 GO 衍生物能透过血脑屏障,对神经瘤模型细胞具有活性^[10],因此,GO 衍生物也作为靶向药物正在被研究^[11]。本实验以 N2a 细胞为模型,分别考察 L-GO 和 D-GO 诱导下该细胞的生长活性。结果显示,0.1~0.4 $\mu\text{mol/L}$ GO 衍生物对 N2a 细胞的活性呈浓度依存,L-GO 对 N2a 细胞的生长更有促进作用,两者之间的活性差异有统计学意义($P<0.01$)。L-GO 和 D-GO 的这种差异性,为 GO 衍生物作为靶向药物的进一步开发提供了科学依据。

参考文献

[1] Mohammadi T, Pak A. Effect of calcination temperature of ka-olin as a support for zeolite membranes[J]. Sep Purif Technol, 2003, 30(3):241-249.

[2] Feng H, Li CY, Shan H. Effect of calcination temperature of ka-olin microspheres on the in situ synthesis of ZSM-5[J]. Catal Lett, 2009, 129(1/2):71-78.

[3] 李永锋,刘燕珍,杨永刚,等. L-半胱氨酸还原氧化石墨烯的研究[J]. 材料导报, 2011, 25(12):38-40.

[4] 白瑜,孙斌,尹晓敏,等. 胍蛋白多肽 PrP 106-126 对小鼠成神经瘤细胞 N2a 的毒性研究[J]. 中国农业大学学报, 2008, 13(5):1-4.

[5] 王世召,田野,江荣才,等. 多胺类似物 DENSPM 对人胶质瘤 LN229 细胞增殖的抑制作用[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(2):101-105.

[6] 李松,颜红侠,张梦萌,等. 石墨烯的功能化及其在聚合物改性中的应用研究[J]. 材料开发与应用, 2013, 28(12):86-92.

[7] 沈贺,张立明,张智军. 石墨烯在生物医学领域的应用[J]. 东南大学学报:医学版, 2011, 30(1):218-223.

[8] Sun X, Liu Z, Welscher K, et al. Nano-graphene oxide of cellular imaging and drug delivery[J]. Nano Res, 2008, 1(3):203-212.

[9] Xu C, Wu X. Sythesis of amphiic graphene oxide [J]. Carbon, 2008, 46(24):386-389.

[10] Yang W, Wong Y, Ng OT, et al. Inhibition of beta-amyloid peptide aggregation by multifunctional carbazole-based fluorophores [J]. Angew Chem Int Ed, 2012, 51(8):1804-1810.

[11] Li M, Yang X, Ren J, et al. Using graphene oxide high near-infrared absorbance for photothermal treatment of Alzheimer's disease[J]. Adv Mater, 2012, 24(13):1722-1728.

(收稿日期:2014-05-09 修回日期:2014-11-04)

(上接第 152 页)

[3] 任翠平,王晓楠,雷黎,等. 血吸虫感染抗性人血清筛选日本血吸虫童虫 eDNA 文库[J]. 中国地方病学杂志, 2007, 26(5):490-493.

[4] 阎玉涛,刘述先,宋光承,等. 东方田鼠天然抗体相关的日本血吸虫抗原基因筛选和克隆[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(3):153-156.

[5] Lim KC, Sun E, Bahgat M, et al. Block-age of skin invasion by schistosome cercariae by serine protease inhibitors [J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 60(3):487-492.

[6] 李晖,彭礼飞. 寄生线虫丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2011, 39(6):344-349.

(收稿日期:2014-05-22 修回日期:2014-11-06)