

弓形虫表面抗原 P22 的重组体构建及临床应用研究

吴丽霞¹ 赵玉红¹ 孙超¹ 郭晶¹ 陈咏君¹ 张莉² 杨丽荣³ 李新新^{4*}

1. 沈阳医学院沈洲医院, 辽宁 沈阳 110002,
2. 沈阳市妇女儿童保健中心遗传室; 辽宁 沈阳 110032,
3. 沈阳市大东区妇幼保健所, 辽宁 沈阳 110042, 4. 沈阳医学院, 辽宁 沈阳 110034)

【摘要】 目的 克隆并构建 pGEX-4T-1-P22 重组表达载体, 获取纯化的 P22 蛋白, 为进一步研究 P22 的生物学特性和免疫保护作用奠定实验基础。方法 应用 PCR 技术扩增 P22 基因片段, 连接到载体中, 诱导并纯化 P22 蛋白, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, 并组装成弓形虫 IgM 抗体酶联免疫 (ELISA) 试剂盒, 并与进口试剂盒对比。结果 成功构建了重组质粒 pGEX-4T-1-P22, 并得到分子量在 43KD 的大量表达蛋白, 具有良好的抗原性, 将该蛋白组装成 ELISA 试剂盒检测 IgM 抗体, 与意大利 SORIN 试剂盒对比检测 450 份临床血清, 阴阳性符合率分别为 92.16% 和 88.06%, 总的符合率为 88.89%。结论 高效表达纯化的 P22 重组蛋白抗原性强, 利用其建立的 IgM ELISA 试剂盒与进口试剂盒对比, 具有较高的灵敏度和特异性, 可用于检测弓形虫抗体。

【关键词】 弓形虫; 表面抗原 P22; 重组蛋白

【中图分类号】 R381、R714.53 **【文献标志码】** B

Establishment of the TOX Surface Antigen of P22 Protein Fragment Expressed in Prokaryotic Expression Vector

Wu Li-xia¹, Zhao Yu-hong¹, Sun Chao¹, Guo Jing¹, Chen Yong-jun¹, Zhang Li², Yang Li-rong³, Li Xin-xin^{4*}.

(1. Shenzhou Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110002, China; 2. Women and Children Health Care Centen of Shenyang, Shenyang 110032, China; 3. Women and Children Health Care Centen or Dadong District, Shenyang 110042, China; 4. Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

【Abstract】 **Objective** To clone the p22 Protein Fragment and construct the recombination expression vectors, get the purified P22 protein, so as to lay an experimental foundation for the further study on the biological characteristics and immune protective effect. **Method** Using PCR technology, the P22 gene fragment was were cloned and expressed, the purified protein and indentified by SDS-PAGE and Western blot. **Results** The gene fragment was correctly amplified and successfully construct the recombinant vector. The purified protein with the molecular weight of 43KD had good antigenicity. The protein was assembled into a ELISA kit to detect 450 serum samples, in contrast with the imported reagent kit Tox-IgM, the kit of the sensitivity was 92.16%; specificity was 88.06%, coarse consistency was 88.89%. **Conclusions** p22 protein highly expressed had strong specificity. Contrast to the imported reagent kit, the kit had high sensitivity and specificity. It could test the antibody to TOX.

【Key words】 Toxoplasmosis(TOX); surface antigen; P22; recombination protein

基金项目: 沈阳市科学技术项目(F10-149-9-34)

* 通讯作者: 李新新. E-mail: lixinxin9192000@yahoo.com.cn

弓形虫病(*Toxoplasmosis*)是由刚地弓形虫引起的一种原虫病,是一种人畜共患病,宿主的种类十分广泛,人和动物的感染率都很高。据国外报道,人群的平均感染率为 25%~50%,有人推算全世界至少有 5 亿人感染弓形虫。

表面抗原 P22 与其侵入宿主细胞有密切关系,弓形虫感染者血清中的 IgG 和 IgM 抗体均可识别 P22 表面抗原,因此 P22 可以作为弓形虫感染的诊断抗原,并具有良好的抗原性与免疫原性^[1,2]。目前弓形虫感染诊断方法主要有免疫学检测、直接镜检、病原体分离和聚合酶链反应(PCR)检测等^[3-5]。免疫学方法由于操作简便快捷适于临床使用。本研究通过 PCR 扩增 P22 基因片段,测序后连接到载体 pGEX-4T-1 进行表达,对表达的重组蛋白进行表达与纯化,为进一步应用该基因进行弓形虫病诊断的研究做好准备。

F1: CTGGGATCCTCCACCACCGAGACCCCGCGCCGATTGAGTGCCTGCCGGCGCAACC
 F2: GAGTGCCTGCCGGCGCAACCAAGACTGTTGATGCACCGTCCAGTGGTTCCGTTGTC
 R2: GCCACTCGGACTGATGGTAAGTTTATCGCCACATTGGAAGACAACGGAACCACT
 F3: ATCAGTCCGAGTGGCGAAGGTGATGTCTTTTATGGCAAGGAATGCACTGACTCC
 F4: GAATGCACTGACTCCCGTAAGTTGACCACTGTCCTGCCGGGTGCGGTCTTG
 R4: GTAGGTAGCCGGACCTTTCGCCGGCTGCTGGACCTTAGCAGTCAAGACCGCACCCGG
 F5: GGTCCGGCTACCTACACTCTGTCTTACGACGGTACTCCGGAGAAACCGCAGGTTCTG
 F6: AAACCGCAGGTTCTGTGTTACAAGTGCCTTCCGAAGCAGGTGCTCCGGCTGGTCCG
 R6: GCAGTCTTTCGGCGTCGGAGCGCTAGAACCATCATTATTGCGACCAGCCGGAGC
 F7: ACGCCGAAAGACTGCAAACCTCATTGTTTCGCTTCCGGGTGCCGATGGCCGTGTC
 F8: GCCGATGGCCGTGTCCTTCTGGCTTTGACCCGGTGTCTCTCACGGGCAAG
 R8: CGACTCGAGCTTGCCCGTGAGAGACACCGGGTC

2.2 目的片段的扩增 首先以 F2 为模板,F1 和 R2 分别为正反向引物进行 PCR 扩增,反应条件为变性 94 ℃ 30 秒,退火 65 ℃ 30 秒,复性 72 ℃ 10 秒,进行 25 个循环,再 72 ℃ 延伸 1 分钟。经 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测分析,并回收纯化 PCR 产物,命名为 F1R2。以此类推,以同样的方法扩增回收产物 F3R4、F5R6、F7R8。

分别以 F1 和 R4 为正反向引物,连接 F1R2 和 F3R4,反应条件为变性 94 ℃ 30 秒,退火 65 ℃ 30 秒,复性 72 ℃ 15 秒,进行 25 个循环,再 72 ℃ 延伸 1 分钟。经 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检

1 实验材料

细菌菌株及载体:pGEX-4T-1 质粒由本实验室保存,E. coli BL21 购自华美生物技术有限公司

酶及其他试剂:DNA polymerase,T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamHI 和 XhoI 均为 TaKaRa 公司产品;蛋白质分子质量标准,sepharose 4B 纯化柱购自华美生物技术有限公司。

ELISA 试剂、酶标板。

2 实验方法

2.1 PCR 引物 由上海英俊生物技术有限责任公司合成,在正向引物 F1 和反向引物 R1 分别引物 BamHI 和 XhoI 酶切位点。

测分析,并回收纯化 PCR 产物,命名为 F1R4。以同样的方法扩增回收产物 F5R8。

分别以 F1 和 R8 为正反向引物,连接 F1R4 和 F5R8,反应条件为变性 94 ℃ 30 秒,退火 65 ℃ 30 秒,复性 72 ℃ 30 秒,进行 25 个循环,再 72 ℃ 延伸 1 分钟。经 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测分析,并回收纯化 PCR 产物,命名为 F1R8。

2.3 pGEX-4T-1-P22 重组质粒的构建与鉴定 纯化的 PCR 产物 F1R8 经 BamHI 和 XhoI 酶切,并与经过同样处理的 pGEX-4T-1 原核表达载体连接,转化到大肠杆菌 TOP10 中,抽取质粒 DNA,进行酶切

鉴定,并转化到大肠杆菌 BL21 中。

2.4 pGEX-4T-1-P22 融合蛋白的诱导表达 将含 pGEX-4T-1-P22 重组质粒的 BL21 菌液以 1:100 的比例加入到 LB 培养液中,37 ℃ 振荡培养 2 小时后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/l,37 ℃ 诱导 3 小时后离心收集菌体,重悬于 2x 样品缓冲液中,100 ℃ 煮沸,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.5 表达蛋白的纯化 取诱导后的菌体培养液离心收集菌体,经超声破碎后利用 sepharose 4B 进行纯化柱。具体操作按照说明书进行。

2.6 重组蛋白的抗原性分析 将重组的菌体蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,切胶进行蛋白质电转移,将蛋白质转移到硝酸纤维素滤膜上,用自制的兔抗弓形虫多抗与膜上的蛋白进行抗原-抗体反应,用酶标二抗进行检测,TMB 显色,至目的条带显色清晰时终止反应。

2.7 捕获 ELISA 方法的建立 以方阵滴定法分别确定 P22 抗原的最佳使用浓度。用羊抗人 IgM μ 链包被酶标板,封闭,加入待检血清和 HRP-P22 并置于 37 ℃ 反应,PBS-T 洗板,加显色液 37 ℃ 显色,最后用 2 mmol/L H₂SO₄ 溶液终止反应,测定吸光度值。

3 结果

3.1 PCR 扩增 P22 片段 用设计的 12 条引物扩增出了 438 bp 大小的 DNA 片段,与预期分子量大小相符(见图 1)。

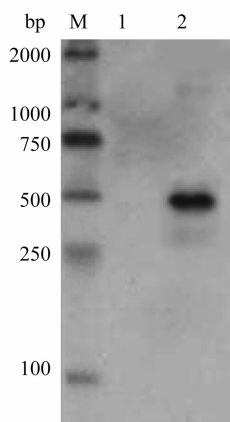


图 1 P22 基因片段扩增结果

M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: P22 基因的扩增产物

3.2 重组体的构建与鉴定 将以 BamHI 和 XhoI 双酶切的 438bp 产物与 pGEX-4T-1 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 中,进行重组克隆的筛选,提取质粒,进行双酶切鉴定,分别在 438bp 和 5kb 处出现条带(见图 2)。

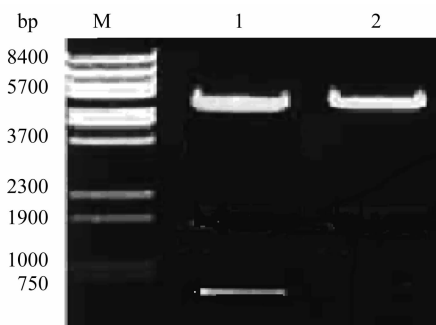


图 2 pGEX-4T-1-P22 重组质粒经 BamHI 和 XhoI 内切酶酶切鉴定结果

M1: DNA Marker; 1: pGEX-4T-1-P22 双酶切产物; 2: pGEX-4T-1 双酶切产物

3.3 重组蛋白的表达鉴定及纯化 将重组质粒 pGEX-4T-1-P22 的菌液进行 IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 电泳检测,在分子量 43KD 处出现一条新的蛋白带,其大小与推测的 pGEX-4T-1-P22 融合蛋白分子量一致。(见图 3)。

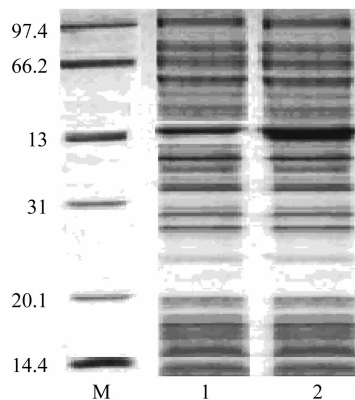


图 3 pGEX-4T-1-P22 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M: Marker; 1: pGEX-4T-1-P22 未经 IPTG 诱导; 2: pGEX-4T-1-P22 经 IPTG 诱导

3.5 Western blot 鉴定 诱导表达蛋白纯化后经 SDS-PAGE 电泳,电转移到 NC 膜上,进行 Western blot 分析(图 4)。结果在相应位置出现特异性抗原-抗体反应条带,表明表达蛋白与其抗体有良好的反应原性。

3.6 捕获 ELISA 方法的建立

3.6.1 最佳工作条件的确定 经过试验最后确定 P22 抗原浓度为 1.0 μg/ml。用羊抗人 IgM μ 链包被酶标板,4 ℃过夜;次日用封闭液封闭,室温放置 3 小时;每孔加入 20 μL 待检血清和 100 μL HRP-P22(高碘酸钠还原法制备),37 ℃反应 60 分钟;PBS-T 洗板 5 次,每孔加底物 A、底物 B 各 50 μL,37 ℃显色 15 分钟,每孔加 50 μL 2 mmol/L H₂SO₄ 溶液终止反应,测定吸光度值。

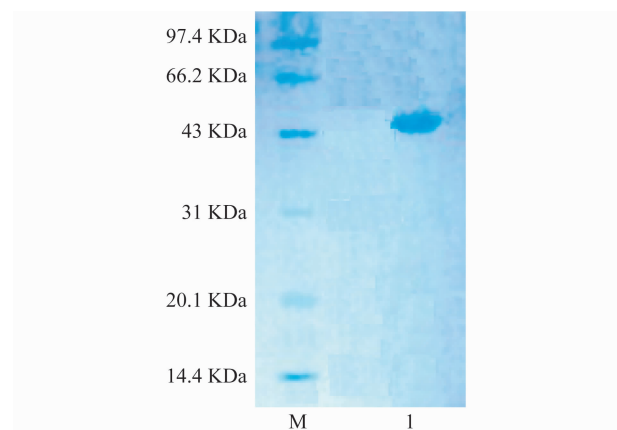


图 4 纯化产物的 Western blot 分析
M: Marker; I: 纯化后的产物

3.6.2 与意大利 SORIN 试剂盒的比较 应用捕获法检测弓形虫 IgM 抗体与意大利 SORIN 试剂盒对 450 份临床血清进行检测。结果如表 1 所示:

表 1 与意大利 SORIN 的弓形虫病毒抗体 IgM 检测试剂盒(化学发光法)进行对比

本院试剂盒	意大利 SORIN 弓形虫抗体 IgM 检测试剂盒		合计
	+	-	
+	282	16	298
-	24	118	142
合计	306	134	450

根据结果得出本院试剂盒阳性符合率为 92.16%, 阴性符合率为 88.06%, 总的符合率为 88.89%。

4 讨 论

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是猫科动物的肠道球虫,该虫呈世界性分布,人和许多动物都能感染。引起人畜共患的弓形虫病大多为隐性感染,但在宿主免疫功能低下时,可造成严重后果。孕妇

感染弓形虫后,可通过胎盘垂直传播给胎儿,造成流产、早产、畸胎或死胎,尤以早孕期感染后畸胎发生率高,是造成我国新生儿出生缺陷的一个重要原因。国家人口计生委已连续 3 年开展了出生缺陷一级防御工作,为提高我国人口素质,降低我国新生儿畸形儿的发病率,对孕妇进行弓形虫产前筛查尤为必要。

目前,弓形虫感染诊断方法主要有病原学、免疫学、分子生物学等,其中免疫学方法由于操作简便快捷等优点而被广泛应用。用于弓形虫诊断的抗原原有弓形虫膜表面抗原、重组棒状体蛋白、弓形虫微线体蛋白等。根据使用抗原的不同,检测结果的意义也不同。

弓形虫速殖子表面抗原 SAG2(P22)蛋白是刚地弓形虫主要表面抗原之一,Grimwood 等^[6]的研究表明,SAG2 蛋白不仅在介导弓形虫速殖子的入侵过程中起很重要的作用,而且还可以增强免疫动物抵抗感染的能力,具有免疫保护的作用,所以 SAG2 抗原很早就受到国内外学者的重视。

SAG2 可以作为免疫诊断及基因工程疫苗的候选抗原,由于纯化天然 SAG2 蛋白制备工艺复杂且得量较少,利用基因工程的方法是大量制备高纯度的 SAG2 抗原的可行之路。

Tomavo 等^[7]研究发现,SAG2 的 N 端前导信号肽与 C 端锚定表膜的氨基酸序列具有高度疏水性。国外有采用 PET 系列表达载体的,重组蛋白的表达量为 16%^[8],为了使 SAG2 蛋白在大肠杆菌中以可溶性形式高效表达,本研究去除序列中 N 端的疏水性信号肽及 C 端的疏水性氨基酸。选择从 N-末端第 27 位到第 172 位的 1467 个氨基酸,根据碱基序列并优化稀少密码子共合成 12 条引物,通过 PCR 扩增所需的基因片段,构建的重组质粒 pGEX-4T-1-P22 经充分诱导后,以融合蛋白的形式在 *E. coli* 内表达,通过优化表达条件使融合蛋白在上清中高效表达^[9],且 P22 融合蛋白具有 GST 标签便于纯化,为后续工作提供了便利条件。免疫印迹试验显示该重组蛋白能够被感染弓形虫的兔血清识别,表明其与天然蛋白的免疫原性一致。

本研究通过基因重组的方法制备 P22 抗原,能够避免由于蛋白质抗原纯度低或特异性差造成假阳性而降低检测特异性等问题,为弓形虫感染的检测

提供更为特异、准确的原料。IgM 抗体是体液免疫中最早出现的抗体,通过该抗原建立的试剂盒可以用于孕妇的急性弓形虫感染检测,对于产前筛查有着非常重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 雷明军,吴少庭,戴五星,等. 弓形虫 RH 株膜表面抗原 SAG2 全长基因的高效表达与抗原性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2004,8(4):231-234.
- [2] Lunden A, Parmle Y SF, Bengtsson KL, et al. Use of arecombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*[J]. Parasitol Res, 1997, 83: 6-9.
- [3] Li S, Galvan G, Araujo FG, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(5): 781-787.
- [4] Burg JL, Perelman D, Kasper LH, et al. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*[J]. J Immunol, 1988, 141(10):3584-3591.
- [5] 杨永刚,曹利民,朱荫昌. 弓形虫病免疫诊断用重组抗原及检测方法研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2010,37(4), 248-253.
- [6] Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion[J]. Int J Parasitol, 1996, 26(2): 169-173.
- [7] Toma O S, Maxtinage A, Dubremetz JF. Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens[J]. Parasitol Res, 1992, 78(7): 541-544.
- [8] Prince JB, Auer KL, Huskinson J, et al. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*[J]. MolBiochim Parasito, 1990, 43(1):97-106.
- [9] 聂福旭,蒋蔚,王权,等. 弓形虫膜表面抗原 SAG2 蛋白的高效表达及免疫活性分析[J]. 生物技术通报,2010,4:174-178.

编辑:孟梦

(收稿日期:2011-12-09)

读 者 · 作 者 · 编 者

本刊对参考文献格式的要求

参考文献按 GB771487《文后参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依参考文献在正文中首次出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号以角码注明,并按引用先后顺序排列于文末,一般不超过 15 篇。

各条项目之间的符号(“,”和“.”等)必须按要求使用(见下面的例子),三个以上作者保留 3 位再加“,”等”(中文文献)或“,” et al”(英文文献);

期刊文献的格式举例:

- [1] Brantigan JW, Cunningham BW, Warden K, et al. Compression strength of donor bone for posterior lumbar fusion[J]. Spine, 1993,18: 1213-1221.
- [2] 张喆人,蔡春林,叶圣诞,等. 110 例 75 岁以上老年人老年腹部手术的临床分析[J]. 中华老年医学杂志,1995,14: 336-338.

注:页码之间连接用“-”(半字线),不能用“~”;起止页码注写完整,不能用“1213-21”的形式;题目后加“[J]”表示来源于期刊文献,注意各条项目之间的标点符号书写正确。

专著文献的格式举例:

- [1] Khan MG. Cardiac drug therapy[M]. 4th ed. London: WB Saunders Company, 1995.
- [2] 罗瑞德. 传染病讲座[M]. 北京:人民卫生出版社,2002. 25-27.

注:需加出版地项目,二版和二版以上加版次,页码之间连接用“-”(半字线),不能用“~”;起止页码注写完整,不能用“1213-21”的形式,如参考全书可不加页码项目;题目后加“[M]”表示来源于专著文献,注意各条项目之间的标点符号书写正确。