

文章编号: 1000-7423(2007)-01-0012-05

日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 在毕赤酵母菌中的分泌表达及其抗原性分析

郑美娟¹, 李敏², 王志成², 罗飞², 罗庆礼², 储德勇², 李丛磊², 沈继龙^{2*}

【摘要】 目的 在毕赤酵母菌 (*Pichia pastoris*) 表达系统中表达日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 (Sj14-3-3), 并与原核表达 rSj14-3-3 比较其抗原性。方法 以重组质粒 pET28a-rSj14-3-3 为模板, PCR 扩增 Sj14-3-3 基因, 将特异片段连接到 pMD18-T 载体, DNA 序列分析后, 亚克隆目的片段 Sj14-3-3 至酵母菌分泌表达载体 pPICZαB。测序正确后, 重组质粒经电转化转染至毕赤酵母菌 X-33 菌株, 经抗生素 Zeocin 筛选得到高拷贝转化子。经甲醇诱导表达, 取诱导上清进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法(Western blotting) 分析。用间接 ELISA 法比较毕赤酵母菌表达的 rSj14-3-3 和原核表达 rSj14-3-3 检测血吸虫病患者血清抗体的特异性和敏感性。结果 目的基因已在酵母菌基因组中得到整合, PCR 扩增得到约 1 300 bp 的片段。经甲醇诱导, Sj14-3-3 表达并分泌到培养上清中。表达产物经 SDS-PAGE 测定为 Mr 35 000。Western blotting 结果显示, Mr 35 000 蛋白可被 Sj14-3-3 单克隆抗体识别, 表明该真核表达产物具有免疫反应性。间接 ELISA 检测结果表明, 该重组蛋白检测 36 份急性血吸虫病患者血清 rSj14-3-3 抗体, 阳性率为 81%。与 12 份华支睾吸虫感染者血清未见交叉反应, 32 份健康人血清假阳性反应率为 9.3%。以原核表达的 rSj14-3-3 为抗原, 间接 ELISA 检测, 36 份急性血吸虫病患者血清的 rSj14-3-3, 抗体阳性率为 88.9%; 与 12 份华支睾吸虫感染者的交叉反应率为 16.7%, 32 份健康人血清假阳性反应率为 12.5%, 其差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 在毕赤酵母菌中成功表达了 Sj14-3-3, 培养上清中产物丰度较高, 且免疫反应性良好。

【关键词】 日本血吸虫; 信号蛋白 14-3-3; 毕赤酵母菌; 真核表达

中图分类号: R383.24, R392.11 文献标识码: A

Secreted Expression of Signaling Protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in *Pichia pastoris* System with Primary Evaluation on its Antigenicity

ZHENG Mei-juan¹, LI Min², WANG Zhi-cheng², LUO Fei², LUO Qing-li²,
CHU De-yong², LI Cong-lei², SHEN Ji-long^{2*}

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical Colledge, Bengbu 233003, China; 2 Department of Parasitology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene Resource Utilization for Important Inherited Diseases, Ministry of Education, Hefei 230032, China)

【Abstract】 Objective To express signaling protein Sj14-3-3 in *Pichia pastoris* and compare its antigenicity with prokaryotic expression one. **Methods** Sj14-3-3 gene was amplified from pET28a-Sj14-3-3 recombinant plasmid, cloned into vector pMD18-T followed by sequencing. The Sj14-3-3 gene was subcloned into the expression vector pPICZα-B and transformed into *Pichia pastoris* X-33 by electroporation. The transformants were identified by sequencing. Three transformants with high copies were obtained when selected under zeocin, and expression was induced with methanol. The culture supernatant was collected and tested by SDS-PAGE and Western blotting. The specificity and sensitivity of eukaryotic expression rSj14-3-3 in *Pichia pastoris* were compared with that from prokaryotic expression by detecting sera of patients with schistosomiasis by indirect ELISA. **Results** The Sj14-3-3 gene was integrated into *Pichia pastoris*, and the gene of interest detected by PCR was with 1 300 bp. After induction by methanol, the Sj14-3-3 gene was expressed and secreted into the medium. The molecular weight of the recombinant protein was determined as about Mr 35 000 by SDS-PAGE. Western blotting showed that the protein has a high specificity against mouse-anti-Sj14-3-3 monoclonal antibody. The recombinant protein had a promising immune reactivity. Indirect ELISA showed that by using eukaryotic expression rSj14-3-3 in *Pichia pastoris*, the positive rate in 36 cases of acute schistosomiasis was 81%, with no cross-

基金项目: 国家自然科学基金(No.30571631)、国家 863 高技术研究发展计划(No.2004AA2Z3570)

作者单位: 1 蚌埠医学院生物化学与分子生物学实验室, 蚌埠 233003;

2 安徽医科大学病原生物学教研室, 教育部与安徽省共建重要遗传病基因资源利用重点实验室(安徽医科大学), 合肥 230032

* 通讯作者, E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

reactivity in 12 cases of *Clonorchis sinensis*, 9.3% cross-reactivity in 32 cases of normal sera. While using prokaryotic expression rSj14-3-3 in *E.coli*, the positive rate in 36 cases of acute schistosomiasis was 88.9%, with 16.7% cross-reactivity in 12 cases of *Clonorchis sinensis*, 12.5% cross-reactivity in 32 cases of normal sera. There was no statistically significant difference of the results ($P>0.05$). **Conclusion** The recombinant protein Sj14-3-3 of eukaryotic expression in *Pichia pastoris* has been successfully harvested and shows a promising immunological potential.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; 14-3-3 protein; *Pichia pastoris*; Eukaryotic expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571631) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2004AA2Z3570)

* Corresponding author, E-mail: jlshen@ahmu.edu.cn

信号蛋白 14-3-3 是一种酸性、高度保守、存在于多种生物体内的蛋白质家族,富含于神经元细胞中,其他组织也有分布但含量极低^[1]。现在已知 14-3-3 可与多达 50 多种信号转导分子结合,如丝裂原激活蛋白激酶(raf)、p21 蛋白(ras)、磷酸酶 Cdc25、蛋白激酶 C(PKC) 等,在促分裂原活化蛋白激酶(MAPK) 级联反应细胞信号传导通路中发挥重要作用,对细胞的繁殖、凋亡、周期调控及肿瘤发生发展产生关键性影响^[2,3]。血吸虫信号蛋白 14-3-3 广泛分布于各期虫体表膜,可能与其他真核细胞一样,参与虫体细胞信号转导。前期研究表明,基因工程生产重组日本血吸虫 14-3-3 蛋白(rSj14-3-3)也是一种有效的免疫诊断抗原,无论在临床应用还是基础研究中都具有重要的意义。大肠埃希菌(*E.coli*)无法进行某些真核蛋白活性所必需的翻译后加工,重组蛋白往往以不溶的形式出现在包涵体中^[4]。文献报道,毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)表达系统具有原核系统表达操作简便、细胞生长迅速、能大规模发酵生产的优点^[5],对蛋白质的翻译后加工方式也接近于哺乳动物细胞。本室已构建 Sj14-3-3 的原核表达系统^[6]。本研究尝试以该真核细胞表达系统进行 Sj14-3-3 的表达,为虫体信号转导研究和重组抗原的研发奠定基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌种、质粒和培养基 毕赤酵母菌 X-33 菌株、毕赤酵母菌整合型分泌表达质粒 pPICZ α B 均由安徽医科大学王明丽教授惠赠,用于外源蛋白的表达。大肠埃希菌 XL1-blue、TOP10 菌株由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。LB 培养基(含 0.5%酵母菌提取物、1%蛋白胨和 1% NaCl,用 NaOH 调至 pH 7.0)用于大肠埃希菌的培养,YPD 培养基(含 1% 酵母菌提取物、2%蛋白胨、2%葡萄糖)用于毕赤酵母菌 X-33 菌株培养,YPDS 培养基(含 1% 酵母菌提取物、2% 蛋白胨、2%葡萄糖、1 mol/L 山梨醇)MD 平板 [含 1.34% 酵母菌氮碱

(YNB)、 4×10^{-7} 生物素、1%葡萄糖],MM 平板(含 1.34% YNB、 4×10^{-7} 生物素、0.5% 甲醇)用于毕赤酵母菌株的表型鉴定,BMGY 培养基(含 1% 酵母菌提取物、2% 蛋白胨、1.34% YNB、 4×10^{-7} 生物素、1% 丙三醇、100 mmol/L 磷酸钾缓冲液,pH 6.0)用于酵母菌生物量的积累,BMMY 培养基(含 1%酵母菌提取物、2% 蛋白胨、1.34% YNB、 4×10^{-7} 生物素、0.5% 甲醇、100 mmol/L 磷酸钾缓冲液,pH 6.0)用于外源蛋白质的诱导表达。培养基的成分见美国 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。抗生素 Zeocin 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 主要酶和试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Kpn* I、*Sac* I 以及 T_4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶,均购自宝生物工程(大连)有限公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG(HRP-IgG)、羊抗兔 IgG(HRP-IgG)均购自北京中杉金桥公司,酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒为上海市华舜公司产品,rSj14-3-3 多抗兔血清由本课题组制备,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 待检血清 血吸虫病患者血清(36 份)、健康人血清(32 份),以及华支睾吸虫病患者血清(12 份),均为安徽省血吸虫病防治研究所提供。

2 方法

2.1 重组质粒 pMD18-T-rSj14-3-3 的构建 以本室前期构建的重组质粒 pET28a-rSj14-3-3 为模板进行 PCR,根据 Sj14-3-3 核苷酸序列合成引物。上游引物:5'-GAATTCAGGGATTCGTA-3',下游引物:5'-GGTACCGCCATCATTCCG-3'。引物中分别引入了限制性内切酶 *EcoR* I 及 *Kpn* I 识别位点。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 43 °C 45 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 最终延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接,连接产物转化感受态大肠埃希菌 XL1-blue 株。酶切鉴定筛选阳性重组质粒,送宝生物工程(大连)有限公司用双脱氧链终止法测序。

2.2 酵母菌表达重组子的构建 以限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Kpn* I 分别处理重组质粒 pMD18-T-14-3-3

及酵母菌表达质粒 pPICZ α -B, 电泳回收所需 DNA 片段进行连接, 连接产物转化感受态细胞大肠埃希菌 TOP10 株, PCR 兼酶切筛选重组质粒 pPICZ α -B-rSj14-3-3。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行序列测定。

2.3 pPICZ α -B-Sj14-3-3 质粒转化酵母菌及高拷贝整合菌株的筛选 按照美国 Invitrogen 公司毕赤酵母表达实验手册进行酵母菌 X-33 株感受态细胞的制备, 将线性化的酵母菌表达质粒 pPICZ α -B-Sj14-3-3 在 1 500 V、25 μ F 及 200 Ω 条件下进行电转化, 涂 YPDS 平板后, 将阳性转化子依次接种至含高浓度抗生素 Zeocin 的 YPDS 选择平板, 其正常生长的菌落为高拷贝转化菌株。

2.4 菌落 PCR 鉴定目的基因的整合及转化子表型的确定 用酵母菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取阳性酵母菌总 DNA, 用酵母菌载体通用引物(5'-GACTGGTTC CAATTGACAAGC-3' 和 5'-GCAAATGGCATTCTGACA TCC-3') 进行 PCR 扩增(条件为 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 90 s, 72 $^{\circ}$ C 120 s), 检测目的基因在酵母菌基因组中的整合情况。同时将 PCR 阳性的高拷贝转化子点在 MM 和 MD 选择平板上, 确定其表型为甲醇利用快表型(methanol utilization plus, Mut⁺) 或者甲醇利用慢表型(Mut⁻)。

2.5 PCR 阳性菌株的诱导表达 参照毕赤酵母表达实验手册的说明, 选 5 个 PCR 阳性菌株诱导表达, 分别于 48、72 和 96 h 取培养物 1.5 ml, 12 000 \times g 离心 10 min, 分别收集上清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.6 表达产物 SDS-PAGE 和免疫学鉴定 培养上清经 20 mmol/L Tris·HCl (pH 5.5) 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。经二乙氨基乙基 (DEAE) 琼脂糖凝胶 FF (DEAE-Sepharose Fast Flow) 和浓缩后进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。之后, 用蛋白质印迹法(Western blotting)进行免疫学鉴定。于 200 mA 将目的蛋白转移至硝酸纤维素(NC)膜, 5% 胎牛血清 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 分别用 Sj14-3-3 单克隆抗体细胞^[7]培养上清和 1:10 000 稀释的 HRP-IgG 为一抗和二抗, 室温结合 1 h, 用 二氨基联苯胺(DAB)底物溶液显色, 待出现反应条带后水洗终止反应。

2.7 ELISA 检测并与原核表达的 rSj14-3-3 比较 用纯化的毕赤酵母菌表达的 rSj14-3-3 包被 96 孔酶标板, 同时用原核表达 rSj14-3-3 和牛血清白蛋白(BSA)、空白孔(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6 包被)建立的 ELISA 作为对照包被的酶标板, 以棋盘滴定法确定抗原包被量及血清最佳稀释度, 再以最佳抗原浓度包被酶标板。所用抗原用碳酸盐缓冲液(同上)稀释, 每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 湿孵 2 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜, 次

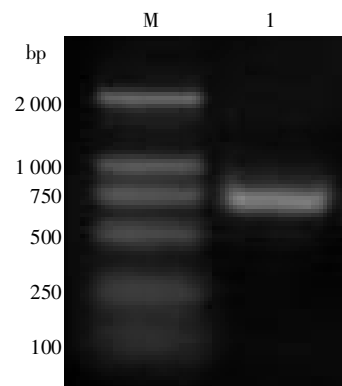
日取出, 用 pH 7.4 0.01mol/L PBS-T(PBS 含 0.05% Tween-20)满孔洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干洗液, 用 5%小牛血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 同法洗涤, 拍干。将 36 份急性血吸虫病、12 份华支睾吸虫病患者血清及 32 份健康人血清分别按最佳稀释度稀释, 取 100 μ l 加于孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 加入羊抗人 HRP-IgG 100 μ l 于相应孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS-T 洗涤 3 次, 每次 5 min, 拍干; 滴加 DAB 显色, 约 5 min 后加 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, 检测吸光度(A₄₅₀ 值)。以 A₄₅₀ 值的均数加 3 倍标准差为正常的上限, 高于上限判为阳性。

2.8 统计学分析 用 SPSS11.0 软件进行 χ^2 检验。

结 果

1 Sj14-3-3 基因的克隆

以质粒 pET28a-rSj14-3-3 为模板, PCR 扩增的 765 bp 条带与 Sj14-3-3 编码序列大小相符(图 1), 重组质粒 pMD18-T-rSj14-3-3 序列测定结果与预期一致。



M: DNA 标志物(DL2000), 1: Sj14-3-3 基因扩增产物。

M: DNA marker(DL2000), 1: PCR product of Sj14-3-3 gene.

图 1 PCR 扩增产物的电泳分析(1.0% 琼脂糖凝胶电泳)

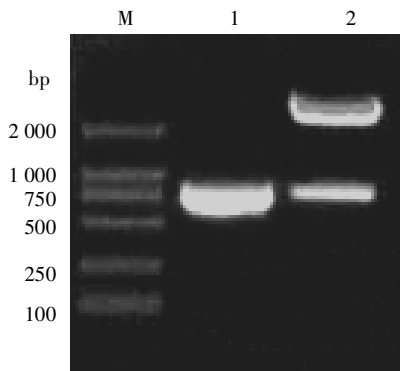
Fig.1 Agarose gel analysis of PCR product of Sj14-3-3

(1% agarose gel electrophoresis)

2 表达载体的构建、鉴定及毕赤酵母菌转化

连接产物 pPICZ α B-rSj14-3-3 用 *Eco*R I、*Kpn* I 双酶切及 PCR 扩增均产生 765 bp 片段, 与 Sj14-3-3 基因一致(图 2), 表明 Sj14-3-3 已插入 pPICZ α B。经 MM 及 MD 以含不同浓度抗生素 Zeocin 的培养基筛选得到的毕赤酵母阳性菌株 X-33 染色体 DNA 为模板, 以 5'-AOX1/3'-AOX1 为引物, 经 PCR 扩增验证目的 DNA 与酵母菌基因组整合状况。由于酵母菌基因组 DNA 中含有与引物相同的序列, 片段大小约为 2.2 kb, 而对空载体的扩增大小应为 592 bp, 因此阴性对照转化菌的扩增片段应为 2.2 kb 和 592 bp 两条带, 而阳性转化菌扩增条带大小应为 2.2 kb 和 1.3 kb(目的

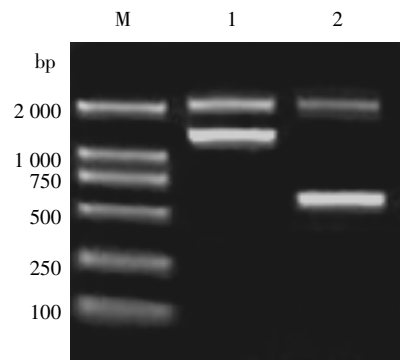
基因片段 765 bp 加空载体片段 592 bp)。实验结果获得与理论值相符的电泳条带, 表明目的基因已在酵母菌基因组中得到整合(图3)。鉴定的几个阳性菌株和 1 个空载体转化的阳性菌株在 MD、MM 培养基中的生长情况均与甲醇利用快表型(Mut⁺) 标准菌株相同。



M: DNA 标志物(DL2000), 1: pPICZαB-rSj14-3-3 为模板, Sj14-3-3 基因扩增产物, 2: pPICZαB-rSj14-3-3 经 *Kpn* I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定。
M: DNA marker(DL2000), 1: The products of Sj14-3-3 gene, 2: Restricted digestion of pPICZαB-rSj14-3-3 by *Kpn* I and *Eco*R I.

图 2 重组质粒 pPICZαB-rSj14-3-3 的鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pPICZαB-rSj14-3-3

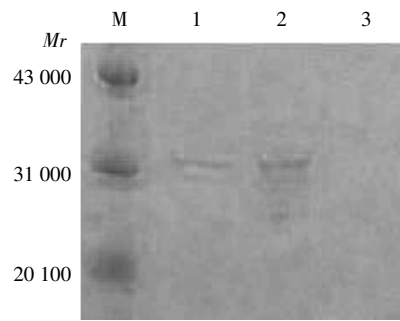


M: DNA 标志物(DL2000), 1: X-33/pPICZαB-rSj14-3-3 PCR 结果, 2: X-33/pPICZαB PCR 结果。
M: DNA marker(DL2000), 1: PCR product of pPICZαB-Sj14-3-3, 2: PCR product of pPICZαB.

图 3 PCR 分析 Sj14-3-3 基因整合到毕赤酵母菌 X-33 基因组
Fig.3 Confirmation of integration of Sj14-3-3 gene into *Pichia pastoris* X-33 by PCR

3 rSj14-3-3 的真核表达

经不同浓度抗生素 Zeocin 筛选, 获得 1 株高拷贝菌株进行诱导表达。SDS-PAGE 分析结果表明, 甲醇诱导 48 h 即有表达产物出现, 但表达量较低。随诱导时间延长, 表达量逐渐升高, 到 72 h 达到高峰。时间再延长, 表达量略有下降。从泳道 1 和 2 可见相对分子质量约为 *Mr* 35 000 的蛋白条带。用 Lowry 反应测定 rSj14-3-3 蛋白浓度为 0.42 g/L(图 4)。



M: 蛋白质标志物, 1~2: X-33/pPICZαB-rSj14-3-3 培养上清, 3: X-33/pPICZαB 培养上清。

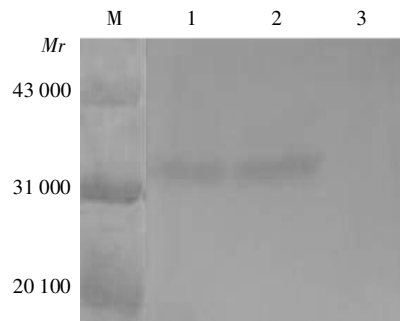
M: Protein marker, 1-2: X-33/pPICZαB-rSj14-3-3 supernatant, 3: X-33/pPICZαB supernatant.

图 4 毕赤酵母菌中 rSj14-3-3 的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE of rSj14-3-3 expressed in *Pichia pastoris*

4 表达产物的免疫学鉴定

Western blotting 结果显示, *Mr* 35 000 蛋白可被 Sj14-3-3 单克隆抗体识别显色, 证实该真核表达产物具有免疫反应性(图 5)。



M: 蛋白质标志物, 1~2: X-33/pPICZαB-rSj14-3-3 培养上清, 3: X-33/pPICZαB 培养上清。

M: Protein marker, 1-2: X-33/pPICZαB-rSj14-3-3 supernatant, 3: X-33/pPICZαB supernatant.

图 5 Sj14-3-3 蛋白的 Western blotting 分析

Fig.5 Western blotting analysis of Sj14-3-3 protein expressed in *Pichia pastoris*

5 两种 rSj14-3-3 用于血清学检测的间接 ELISA 结果比较

ELISA 结果表明, 用毕赤酵母表达的 rSj14-3-3 抗原和原核系统表达的 rSj14-3-3 抗原, 检测 36 份急性血吸虫病患者的血清, 阳性率分别为 81% 和 88.9%, 其差异无统计学意义($\chi^2=0.444$, $P>0.05$); 检测 12 份华支睾吸虫病患者血清, 前者未见交叉反应, 后者阳性率为 16.7%; 检测 32 份健康人血清, 假阳性反应分别为 9.3% 和 12.5%, 差异无统计学意义($\chi^2=0$, $P>0.05$)。

毕赤酵母表达的 rSj14-3-3 抗原与原核系统表达的 rSj14-3-3 抗原在免疫诊断方面未见显著差异。但是

在毕赤酵母菌表达的抗原, 敏感性似优于原核表达 rSj14-3-3 抗原。应用真核表达产物的最低包被浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$, 而原核表达抗原最低包被浓度为 2 $\mu\text{g/ml}$; 以前者为抗原时, 血清稀释度为 1:10, 而后者血清的最佳稀释度为 1:20~1:40。

讨 论

有研究显示, 原核系统表达的 rSj14-3-3 与佐剂免疫小鼠, 可获得约 32.2% 的减虫率、约 50.4% 减卵率^[8]。以原核表达产物为抗原的 ELISA 用于检测血吸虫病患者血清, 具有高度的特异性和敏感性^[9]。天然的 14-3-3 为二聚体, 在分子间相互作用过程中, 推测其空间构象可以有多种模式^[1]。真核表达的融合蛋白由于保持了与内源性 14-3-3 相同的空间构象, 可被用于血吸虫细胞信号转导的蛋白质相互作用研究。与原核表达产物相比, 真核表达产物是否具有优点尚未观察。本文将 Sj14-3-3 编码基因插入表达质粒 pPICZ α B, 转染毕赤酵母菌表达体系, 在培养上清中获得了高表达产物, 为利用天然 Sj14-3-3 进行信号转导研究以及开发基因工程疫苗和免疫检测试剂提供了基础资料。

毕赤酵母菌表达体系是近年来发展最快、极具潜力的真核表达系统, 已成功地应用于多种异源蛋白的商品化生产^[10,11]。表达载体质粒 pPICZ α B 含有甲醇诱导型启动子-乙醇氧化酶启动子 *Paox1* 和 α -MF 信号序列。*Paox1* 可有效防止外源基因表达产物对酵母菌生长可能产生的细胞毒性, α -MF 信号肽序列可在蛋白质分泌到胞外的过程中被有效切除。加之毕赤酵母菌分泌的自身蛋白水平很低, 这将更有利于重组蛋白的分离与纯化。其具有原核表达系统的高表达量、可大规模培养及成品低廉等优点, 又具有真核表达系统可进行蛋白翻译后修饰、加工和折叠等优点^[12,13]。原核表达系统中重组蛋白一般不能正确折叠, 而酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的重组蛋白存在过度糖基化问题^[14]。毕赤酵母菌对蛋白质产物的糖基化方式更接近高等生物, 临床应用更安全。因此, 应用毕赤酵母菌表达外源活性蛋白倍受青睐。

本研究应用毕赤酵母菌表达系统研制真核 rSj14-3-3 蛋白, 并建立了 ELISA 检测方法, 对其抗原性进行了初步观察。由于应用原核表达产物 rSj14-3-3 检测血吸虫病的实验诊断方法已经建立^[15], 故本实验将其作为对照。结果显示, 真核表达 rSj14-3-3 具有良好的抗原性。虽然毕赤酵母菌表达系统能更好地保持天然蛋白质的生物活性, 可能包含了更为完整的抗原表

位, 但 ELISA 检测其特异性和敏感性与原核表达 rSj14-3-3 相仿。由于真核表达周期较长, 培养成本相对高于大肠埃希菌, 因此就免疫诊断抗原而言, 采用原核表达产物更为简便实用。

参 考 文 献

- [1] Dave B, Greg BGM. 14-3-3 proteins: A number of functions for a numbered protein[J]. Sci STKE, 2005,296:59-66.
- [2] Freed E, Symons M, Macdonald SG, et al. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation [J]. Science,1994,265:1713-1716.
- [3] Yaffe MB. Phosphoryrosine-binding domains in signal transduction [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002,3:177-186.
- [4] Zhang YL, Chen SS, Yang KG, et al. Functional expression, purification, and characterization of human Flt3 ligand in the *Pichia pastoris* system[J]. Protein Expression and Purification, 2005,42:246-254.
- [5] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005,22:249-270.
- [6] Li DF, Shen JL, Zu Y, et al. Construction and identification of 14-3-3 protein gene expression plasmid of *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002,20:123-124. (in Chinese) (李德发, 沈继龙, 祖莹, 等. Sj14-3-3 编码基因表达质粒的构建和鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002,20:123-124.)
- [7] Li F, Hu M, Shen JL. Recombinant *Schistosoma japonicum* signaling protein 14-3-3 and antibody preparation[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003,21:221-223. (in Chinese) (李峰, 胡敏, 沈继龙. 日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3 的纯化及抗体制备[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003,21:221-223.)
- [8] Liu QZ, Shen JL. Protective immunity induced by recombinant signaling protein 14-3-3 vaccine of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003,21:257-260. (in Chinese) (刘庆中, 沈继龙. 日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3 疫苗免疫保护性的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003,21:257-260.)
- [9] Liu QZ, Shen JL, Wang XL. Evaluation of the recombinant signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in diagnosis for schistosomiasis[J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2003,38:252-254. (in Chinese) (刘庆中, 沈继龙, 汪学龙. 日本血吸虫重组信号蛋白 14-3-3 对日本血吸虫病的诊断价值 [J]. 安徽医科大学学报, 2003,38:252-254.)
- [10] Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review[J]. Yeast, 1992,8:423-488.
- [11] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005,22:249-270.
- [12] Borgheresi RA, Palma MS, Ducand F, et al. Expression and processing of recombinant sarafotoxins precursor in *Pichia pastoris* [J]. Toxicol, 2001,39:1211-1218.
- [13] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. QFEMS Microbiol Rev, 2000,24:23-52.
- [14] Tanner W, Lehle L. Protein glycosylation in yeast [J]. Biochem Biophys Acta, 1987,906:81-89.
- [15] Luo QL, Wang ZC, Li M, et al. Application of indirect ELISA with recombinant signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in the immunodiagnosis of schistosomiasis [J]. Chin J Zoonoses, 2007,23:43-46. (in Chinese) (罗庆礼, 王志成, 李敏, 等. 应用重组信号蛋白 14-3-3 间接 ELISA 诊断日本血吸虫病[J]. 中国人兽共患病学报, 2007,23:43-46.)

(收稿日期: 2006-08-14 编辑: 富秀兰)