

文章编号: 1000-7423(2009)-02-0107-04

【论著】

细粒棘球绦虫抗原 B 重组蛋白的免疫反应性

吕国栋, 刘涛, 林仁勇, 王星, 王俊华, 任智慧, 温浩, 卢晓梅*

【摘要】 目的 利用基因工程方法表达细粒棘球绦虫抗原 B 重组蛋白 (rAgB), 并分析其免疫反应性。方法 将 rAgB 基因片段插入原核表达载体 pET41a (+) 中, 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3) 菌株, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 获得重组蛋白 rAgB-GST。用谷胱甘肽琼脂糖树脂亲和层析柱 (GST-sepharose 4B) 纯化, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析重组蛋白的表达情况。用蛋白质印迹 (Western blotting) 分析其免疫反应性, 并用免疫胶体金包虫诊断试剂盒作为对照。结果 PCR、双酶切及 DNA 测序结果均显示重组质粒 pET41a-rAgB 构建成功。SDS-PAGE 结果表明, 重组蛋白 rAgB-GST 的相对分子质量 (M_r) 为 40 800, 纯化蛋白含量为 78.4%。Western blotting 分析结果显示, 重组蛋白 rAgB-GST 检测细粒棘球绦虫病和多房棘球绦病患者血清的阳性率分别为 79.2% (95/120) 和 51.1% (23/45), 但与卫氏并殖吸虫病、华支睾吸虫病患者血清以及健康人血清反应均为阴性。rAgB-GST 的敏感性和特异性分别为 79.2% (95/120) 和 81.0% (98/121), 均略高于免疫胶体金棘球绦虫病诊断试剂盒的敏感性 (72.8%, 75/103) 和特异性 (76.9%, 30/39)。结论 重组 rAgB-GST 蛋白可被细粒棘球绦虫病和多房棘球绦病患者血清识别, 有较好的免疫反应性。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 重组抗原 B; 免疫诊断

中图分类号: R532.32

文献标识码: A

Immunoreactivity of the Recombinant Protein of *Echinococcus granulosus* Antigen B

LV Guo-dong, LIU Tao, LIN Ren-yong, WANG Xing, WANG Jun-hua,
REN Zhi-hui, WEN Hao, LU Xiao-mei*

(Medical Research Center, the First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 Objective To express the recombinant antigen B (rAgB) of *Echinococcus granulosus* (Eg) and investigate its immunoreactivity. **Methods** The rAgB gene fragments were inserted into pET41a (+) prokaryotic vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and followed by expression of the protein induced by isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The protein was purified with sepharose 4B by affinity chromatography, and tested by SDS-PAGE electrophoresis. Its immunoreactivity was examined by Western blotting, and a rapid diagnosis kit for human echinococcosis was used as control. **Results** The constructed recombinant plasmid pET41a-rAgB was identified by PCR, digestion with restriction enzyme and sequencing. The recombinant rAgB-GST was about M_r 40 800 with a purity of 78.4%. Western blotting showed that the positive rate of rAgB-GST reacting with sera of cystic echinococcosis (CE), alveolar echinococcosis (AE), paragonimiasis westermani and clonorchiasis sinensis patients, and healthy persons is 79.2% (95/120), 51.1% (23/45), 0 (0/32), 0 (0/20), and 0 (0/24), respectively. Its overall sensitivity and specificity were 79.2% (95/120) and 81.0% (98/121), respectively, slightly higher than the sensitivity (72.8%, 75/103) and specificity (76.9%, 30/39) of the rapid diagnosis kit for human echinococcosis. **Conclusion** The rAgB-GST recombinant protein is recognized by the sera of CE and AE patients, showing a proper immunoreactivity.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Recombinant antigen B; Immunodiagnosis

Supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863) (No. 2007AA02Z411) and the Open Project Program of Key Laboratory of Echinococcosis, Xinjiang (No. XJDX0202-2006-05, XJDX0202-2003-05)

* Corresponding author, E-mail: luxiaomei88@163.com

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA02Z411); 新疆维吾尔自治区重点实验室开放课题 (No. XJDX0202-2006-05, XJDX0202-2003-05)

作者单位: 新疆医科大学第一附属医院医学研究中心, 新疆包虫病基础医学重点实验室, 乌鲁木齐 830054

* 通讯作者, E-mail: luxiaomei88@163.com

棘球蚴病是棘球绦虫幼虫寄生于人体及某些动物体内所致的一种严重的人兽共患病, 主要为细粒棘球蚴病和多房棘球蚴病。我国西北广大农牧区是棘球蚴病的主要流行区, 细粒棘球蚴病尤为多见^[1]。近年来研究显示, 细粒棘球绦虫抗原 B(EgAgB)是细粒棘球蚴囊液和原头节的一种主要抗原成份, 是大分子热稳定脂蛋白, 包含相对分子质量为 M_r 8 000、16 000 和 24 000 的 3 个亚单位^[2]。EgAgB 是常用的诊断细粒棘球蚴病的抗原, 有较高的特异性和确诊率^[3,4]。本实验室的前期研究将 Eg 重组抗原 B(rAgB)与麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)偶联表达, 发现其有较好的敏感性和特异性, 但由于检测样本的例数及种类较少^[5], 未能全面客观反映 rAgB 的免疫诊断效果。为进一步评价 rAgB 对细粒棘球蚴病患者的免疫诊断效果, 本研究通过扩大样本量、增加其他寄生虫病患者血清样本等方法, 进一步分析 rAgB 的免疫反应性。

材料与方法

1 材料

1.1 血清来源 经病理确诊为细粒棘球蚴病患者血清共 120 份, 其中 35 份由新疆医科大学第一附属医院标本库提供, 85 份细粒棘球蚴病患者血清、45 份多房棘球蚴病患者血清、32 份卫氏并殖吸虫病患者血清、20 份华支睾吸虫病患者血清和 24 份健康人血清均由新疆包虫病研究所提供。

1.2 质粒和菌种 原核表达载体 pET41a (+)由澳大利亚昆士兰医学研究所张文宝博士馈赠, 菌种 *E. coli* BL21(DE3)由新疆大学新疆生物资源基因工程重点实验室馈赠, pMal-p2x-rAgB 质粒由本实验室提供。

1.3 主要试剂 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自美国 Promega 公司, DNA 纯化试剂盒、限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶和 DNA 标志物购自大连宝生物工程公司, 谷胱甘肽琼脂糖树脂(GST-sepharose 4B)亲合层析柱购自美国 Amersham 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (HRP-IgG) 购自美国 Sigma 公司, 其他生化试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司, 免疫胶体金包虫诊断试剂盒购自新疆贝斯明生物技术有限公司。

2 方法

2.1 构建 rAgB 原核表达质粒 质粒 pMal-p2x-rAgB 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 用 DNA 纯化试剂盒回收 177 bp 左右的片段, 再与经同样双酶切处理的 pET41a(+)-表达载体连接并转化 DH5 α 菌株。经卡那霉素抗性筛选, 随机挑选阳性菌落, 小量提取质粒经

EcoR I 和 *Hind* III 双酶切分析, 及 PCR 验证, 选择有正确插入片段的克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序, 用 DNAMAN 软件进行序列分析。

2.2 重组蛋白的表达及纯化 选取测序鉴定正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 随机挑选菌落过夜培养后, 取 10 ml 菌液接种于 1 000 ml LB 培养基(含 50 μ g/ml 卡那霉素)中, 培养至菌液吸光度 (A_{600} 值)=0.6 时, 加入终浓度 0.25 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h。收集细菌沉淀, PBS 洗涤 2 次后离心去上清, 加入终浓度为 0.5% 溶菌酶、0.5% 曲拉通 X-100 (Triton X-100)、0.05% 苯甲基磺酰氟及 5 ml 裂解液 [含 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)和 100 mmol/L NaCl], 超声破碎, 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 10 min, 收集上清。按 GST-sepharose 4B 亲合层析柱说明书纯化蛋白, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析重组蛋白 rAgB-GST 的表达情况。

2.3 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 BL21 (DE3) pET41a-rAgB 诱导前、后菌体总蛋白、rAgB-GST 重组蛋白及 GST 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上。丽春红预染色, 标记蛋白泳道, 5% 脱脂奶粉溶液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 1 \times PBST (含 0.14 mol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na_2HPO_4 、1.8 mmol/L KH_2PO_4 和 0.05% 吐温-20) 洗涤 3 次, 将每个蛋白泳道一分为二, 分别加入用封闭液 1:100 稀释的 20 份健康人混合血清和 20 份细粒棘球蚴病患者混合血清与 NC 膜上的蛋白抗原反应, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。1 \times PBST 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (工作浓度 1:8 000) 与 NC 膜反应, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色至清晰后, 蒸馏水洗膜终止反应。

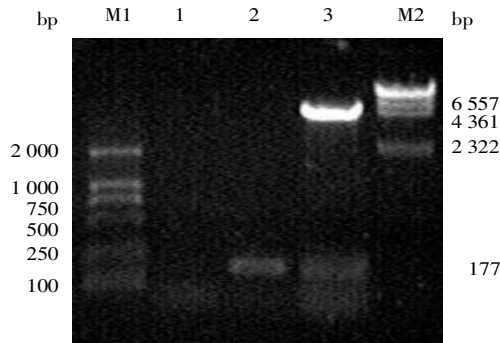
将电转移至 NC 膜上的 rAgB-GST 蛋白分别与各寄生虫病患者血清及健康人血清 (1:100 稀释), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。1 \times PBST 洗涤 3 次, 再加入 HRP-IgG(工作浓度 1:8 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。加入 DAB 显色至清晰后, 用蒸馏水终止反应。

2.4 免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒检测 利用免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒 103 份细粒棘球蚴病患者血清、15 份多房棘球蚴病患者血清和 24 份健康人血清, 具体步骤参照说明书进行, 以评价试剂盒的敏感性和特异性。

结 果

1 重组质粒 pET41a-rAgB 的 PCR、酶切鉴定及序列分析

重组质粒 pET41a-rAgB 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切与 PCR 扩增产物的电泳结果均出现 1 条约 177 bp 的特异条带(图 1)。DNAMAN 软件分析表明,成功构建了 pET41a-rAgB 重组表达质粒。



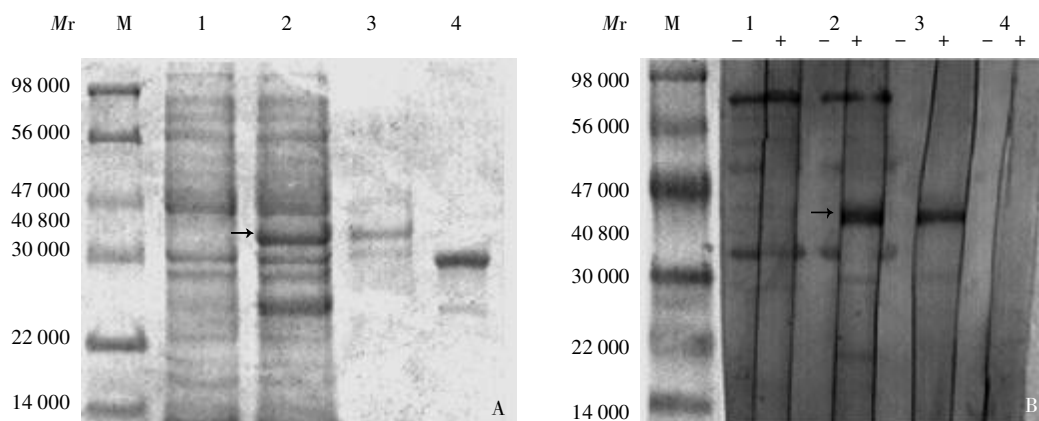
M1、M2: DNA 标志物, 1: 阴性对照, 2: 质粒 pET41a-rAgB 的 PCR 产物, 3: 质粒 pET41a-rAgB 双酶切。
M1、M2: DNA marker, 1: Negative control, 2: PCR product of plasmid pET41a-rAgB, 3: pET41a-rAgB /*EcoR* I +*Hind* III.

图 1 重组质粒 pET41a-rAgB 的 PCR 产物及酶切鉴定
Fig.1 Identification of pET41a-rAgB by PCR analysis and restriction endonuclease

2 重组蛋白 Western blotting 分析

经 GST-Sepharose 4B 亲和层析纯化,得到相对分子质量约 M_r 40 800 的纯化 rAgB-GST 融合蛋白(图 2 A), 纯化蛋白含量为 78.4%。

Western blotting 结果显示, 细粒棘球蚴病患者混合血清与诱导后 BL21(DE3)pET41a-rAgB 菌体总蛋白和纯化 rAgB-GST 在约 M_r 40 800 处均有一特异性反应条带, 但与诱导前 BL21(DE3)pET41a-rAgB 菌体总蛋白和 GST 纯化蛋白无特异反应。所有检测蛋白与健康人混合血清均无特异反应(图 2 B)。

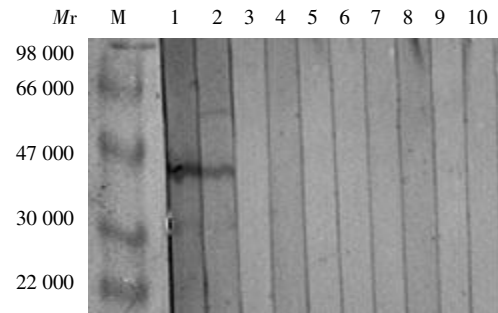


M: 蛋白质标志物, 1: 诱导前 BL21 (DE3) pET41a-rAgB, 2: 诱导后 BL21 (DE3) pET41a-rAgB, 3: 纯化 rAgB-GST 蛋白, 4: GST 蛋白; “-” 为 20 份健康人混合血清, “+” 为 20 份细粒棘球蚴病患者混合血清。
M: Protein marker, 1: *E. coli* BL21/pET41a-rAgB before induction, 2: *E. coli* BL21/pET41a-rAgB after induction, 3: Purified rAgB-GST protein, 4: Purified GST protein; “-” Sera of 20 healthy persons, “+” Sera of 20 CE patients.

图 2 纯化蛋白 GST-rAgB 的 SDS-PAGE 电泳 (A) 及 Western blotting 分析 (B)
Fig.2 Expression and purification of GST-rAgB analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B)

3 免疫反应性分析

Western blotting 分析结果显示, 重组蛋白 rAgB-GST 检测细粒棘球蚴病和多房棘球蚴病患者血清的阳性率分别为 79.2%(95/120)和 51.1%(23/45), 但与卫氏并殖吸虫病患者、华支睾吸虫病患者血清以及健康人血清反应均为阴性(图 3, 表 1)。rAgB-GST 检测细粒棘球蚴病的敏感性为 79.2%(95/120), 特异性为 81.0%(98/121)。



M: 蛋白质标志物, 1、2: 细粒棘球蚴病患者血清, 3、4: 多房棘球蚴病患者血清, 5、6: 卫氏并殖吸虫病患者血清, 7、8: 华支睾吸虫病患者血清, 9、10: 健康人血清。
M: Protein marker, 1,2: Sera of CE patients, 3,4: Sera of AE patients, 5,6: Sera of paragonimiasis patients, 7,8: Sera of clonorchiasis patients, 9,10: Sera of healthy persons.

图 3 重组 rAgB-GST 蛋白 Western blotting 分析
Fig.3 Western blotting analysis of the recombinant rAgB-GST

4 免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒检测

免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒检测细粒棘球蚴病患者血清的阳性率为 72.8%(75/103)、多房棘球蚴病患者血清的阳性率为 60.0%(9/15), 但与健康人血清反应均为阴性(表 1)。该试剂盒检测细粒棘球蚴病的敏感性为 72.8% (75/103), 特异性为 76.9%(30/39)。

表 1 rAgB-GST 重组蛋白 Western blotting 和免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒检测血清结果
Table 1 Results by Western blotting with rAgB-GST and by echinococcosis diagnosis kit

测试血清 Tested sera	重组蛋白 rAgB-GST			免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒 Echinococcosis diagnosis kit		
	检查人数 No. examined	阳性数 No. positives	阳性率(%) Positive rate	检查人数 No. examined	阳性数 No. positives	阳性率(%) Positive rate
细粒棘球蚴病患者 CE patients	120	95	79.2	103	75	72.8
多房棘球蚴病患者 AE patients	45	23	51.1	15	9	60.0
卫氏并殖吸虫病患者 Paragonimiasis patients	32	0	0	-	-	-
华支睾吸虫病患者 Clonorchiasis patients	20	0	0	-	-	-
健康人 Healthy persons	24	0	0	24	0	0

讨 论

我国是棘球蚴病高发的国家之一，以新疆、西藏、宁夏、甘肃、青海、内蒙古和四川等 7 省（区）最为严重。2005 年卫生部《全国人体重要寄生虫病现状调查报告》显示，棘球蚴病是中国人兽共患病中常见且危害性大的寄生虫病。该病在新疆等西部省区血清学检测阳性率为 12.04%，每年给我国畜产品造成的经济损失逾 8 亿元，是影响西部地区农牧民身体健康和制约经济发展的重要原因之一^[6]。

目前棘球蚴病主要通过影像学检查联合免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒进行诊断。试剂盒所用诊断抗原是从细粒棘球蚴囊液中提取的天然抗原 B，但因需不断从感染动物体内收集包囊液，易污染环境，且抗原成分不纯，易引起交叉反应。基因工程表达 rAgB 能提高蛋白的纯度，避免杂质蛋白造成的交叉反应。

本研究所用的 pET41a(+) 原核表达载体具有 2 种标签，即谷胱甘肽 S 转移酶表达标签 (GST-tag) 和组氨酸蛋白表达标签 (His-tag)，利用 GST-sepharose 4B 和镍离子亲和树脂亲和层析双重纯化，能获得较纯的蛋白。且 GST-tag 的相对分子质量 (M_r 33 000) 比麦芽糖结合蛋白 (M_r 42 000) 小，可减少产生交叉反应的概率。有研究表明，GST-tag 和 His-tag 均不与人血清反应，不会产生交叉反应^[7]。基于以上优点，本研究将 rAgB 基因构建到 pET41a(+) 表达载体上，表达、纯化 rAgB-GST。并将纯化的标签蛋白 GST 与健康人血清及细粒棘球蚴病患者血清反应，结果显示反应均为阴性，由此判断标签蛋白 GST 不干扰 rAgB 与细粒棘球蚴病患者血清反应，因此该融合蛋白可直接用于诊断，无须将 GST 切除。

本研究结果，rAgB-GST 对细粒棘球蚴病患者血清的敏感性和特异性分别为 79.2% 和 81.1%，且不与卫氏并殖吸虫病、华支睾吸虫病患者血清和健康人血清反应，均优于免疫胶体金棘球蚴病诊断试剂盒的敏感性 (72.8%) 和特异性 (76.9%)，这可能与试剂盒中所用天然抗原 B 中的杂蛋白导致的非特异性反应有关，而原核表达纯化的 rAgB-GST 可避免来自虫体其他蛋白的干扰。

重组蛋白 rAgB 与多房棘球蚴病患者血清有较高的交叉反应 (51.1%)，与 Maddison 等^[8]报道的交叉反应为 39% 的结果相近。可能与 rAgB 序列与多房棘球蚴虫 AgB1 序列具有高度同源性 (92.3%) 有关，若多房棘球蚴病患者血清中含有抗 EmAgB1 的抗体，可与 rAgB 发生交叉反应^[9]。因此，本研究结果提示，单独使用 rAgB 不能用于鉴别诊断多房棘球蚴病和细粒棘球蚴病，与多房棘球蚴病特异性诊断抗原 (如 Em18 等) 联合使用才能有效区分多房棘球蚴病和细粒棘球蚴病。

参 考 文 献

- [1] Shi DZ. The geographical distribution of cystic echinococcosis in China[J]. *Endem Dis Bull*, 2000, 15(1): 74-75. (in Chinese) (史大中. 中国囊型包虫病的地理分布[J]. *地方病通报*, 2000, 15(1): 74-75.)
- [2] Rott MB, Fernandez V, Farias S, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene in *Escherichia coli* and serological evaluation[J]. *Acta Trop*, 2000, 75(3): 331-340.
- [3] Barbieri M, Fernandez V, Gonzalez G, et al. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis[J]. *Parasit Immunol*, 1998, 20(2): 51-61.
- [4] Gonza LG, Lorenzo C, Nieto A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(11): 3979-3983.
- [5] Lu XM, Wen H, Alison FS, et al. Expression and detection of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B[J]. *Endem Dis Bull*, 2001, 16(3): 14-16. (in Chinese) (卢晓梅, 温浩, Alison FS, 等. 细粒棘球蚴重组抗原 B 的表达提取及其血清学检测初探[J]. *地方病通报*, 2001, 16(3): 14-16.)
- [6] Pawlowski ZS. *Echinococcosis in Humans: Clinical Aspects, Diagnosis and Treatment*[C]. Paris: WHO/OIE, 2001: 20-66.
- [7] Zhang CT, Lin RY, Wang JF, et al. Construction, expression and identification of three truncated pET41a-Em18 prokaryotic plasmids[J]. *J Pathogen Biol*, 2006, 1(3): 189-192. (in Chinese) (张春桃, 林仁勇, 王俊芳, 等. 3 种截短的泡球蚴 Em18 基因原核表达质粒的构建、表达及鉴定 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2006, 1(3): 189-192.)
- [8] Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, et al. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, 40(4): 377-383.
- [9] Mamuti W, Sako Y, Nakao M, et al. Recent advances in characterization of *Echinococcus* antigen B[J]. *Parasitol Int*, 2006, 55(Suppl): 57-62.

(收稿日期: 2008-09-16 编辑: 杨频)