

文章编号:1000-7423(2012)-02-0086-04

【论著】

刚地弓形虫磷酸甘油酸变位酶 2 基因片段 克隆、表达及抗原性分析

殷丽天¹, 王芬², 孟晓丽², 王海龙², 刘红丽², 申金雁², 殷国荣^{2*}

【摘要】 目的 克隆、表达刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 磷酸甘油酸变位酶 2 (*TgPGAM2*) 基因片段, 并分析其抗原性。方法 提取弓形虫 RH 株速殖子总 RNA, 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增 *TgPGAM2* 基因。扩增产物经双酶切后接入 pET30a(+) 载体, 重组质粒转化大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α , 阳性菌落经 PCR 和双酶切鉴定, 并测序。将测序正确的重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 转化至 *E. coli* BL21 并加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 结合考马斯亮蓝染色检测表达产物。以兔抗弓形虫血清为一抗, 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析重组蛋白的抗原性。结果 PCR 扩增产物约为 750 bp。菌落 PCR、双酶切和测序结果显示, 重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 构建成功。SDS-PAGE 结果显示, 经 IPTG 诱导获得相对分子质量 (M_r) 约 30 000 的可溶性重组蛋白。Western blotting 分析证实其能被兔抗弓形虫血清识别。结论 刚地弓形虫 RH 株 *TgPGAM2* 基因片段可在原核表达系统中表达, 且该可溶性重组蛋白具有抗原性。

【关键词】 刚地弓形虫; 磷酸甘油酸变位酶 2; 基因克隆; 原核表达; 抗原性

中图分类号: R382.5 文献标识码: A

Cloning, Expression and Antigenicity Analysis of Phosphoglycerate Mutase 2 Gene of *Toxoplasma gondii*

YIN Li-tian¹, WANG Fen², MENG Xiao-li², WANG Hai-long², LIU Hong-li²,
SHEN Jin-yan², YIN Guo-rong^{2*}

(1 Department of Physiology, Key Laboratory of Cellular Physiology Co-constructed by Province and Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2 Institute of Medical Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 **Objective** To clone and express the phosphoglycerate mutase 2 (PGAM2) gene of *Toxoplasma gondii*, and analyze the antigenicity of the recombinant protein. **Methods** Total RNA was extracted from *T. gondii* tachyzoites of RH strain and reversely transcribed into cDNA. *TgPGAM2* gene was amplified by PCR and cloned into pET30a(+) vector. The constructed pET30a(+)-*TgPGAM2* was transformed into *E. coli* DH5 α first and selected through the colony-PCR and confirmed by the double restriction enzyme digestion and sequencing. The correct plasmid was transformed into *E. coli* BL21 for expression induced by IPTG and the recombinant protein was further analyzed through SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining. Western blotting assay with rabbit anti-*T. gondii* serum was used to analyze its antigenicity. **Results** The length of PCR product was about 750 bp and the recombinant plasmid pET30a(+)-*TgPGAM2* was successfully constructed. The results of SDS-PAGE and Western blotting revealed that the relative molecular weight (M_r) of the soluble recombinant protein was approximately 30 000 and could be recognized by rabbit anti-*T. gondii* serum. **Conclusion** The soluble *TgPGAM2* protein has been expressed in the prokaryotic expression system and maintains its antigenicity.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Phosphoglycerate mutase 2; Gene cloning; Prokaryotic expression; Antigenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81071374)

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

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81071374)

作者单位: 1 山西医科大学生理学系, 细胞生理学省部共建教育部重点实验室, 太原 030001; 2 山西医科大学医学寄生虫学研究所, 太原 030001

* 通讯作者, E-mail: guorongyin@163.com

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种专性细胞内寄生原虫, 可感染人和所有温血动物的有核细胞^[1]。弓形虫的致病与宿主的免疫缺陷 (如艾滋病患者) 和免疫功能低下 (如接受免疫抑制剂治疗的器官移植或化疗的肿瘤患者) 密切相关。妊娠期感染弓形虫可引起垂直传播, 导致先天性弓形虫病。研究表明, 弓形虫病的疾病负担指数与沙门氏菌病和弯曲菌病基本相当, 但前者较少引起重视^[2]。目前常用的抗弓形虫病药物虽对速殖子有效, 但不能杀死组织内的弓形虫包囊^[3], 对先天性弓形虫病的疗效甚微。发展有效的疫苗预防弓形虫病乃当务之急。

磷酸甘油酸变位酶 (PGAM) 是糖酵解和糖异生通路中的一种重要蛋白酶^[4]。刚地弓形虫磷酸甘油酸变位酶 (*TgPGAM*) 包括 *TgPGAM1* 和 *TgPGAM2*。Blader 等^[5]利用人的表达序列标签对感染刚地弓形虫的人包皮成纤维细胞进行 cDNA 微阵分析表明, 在刚地弓形虫感染过程中 PGAM1 表达上调。Okomo-Adhiambo 等^[6]利用猪的表达序列标签对感染弓形虫的猪肾上皮细胞进行 cDNA 微阵分析表明, 在弓形虫感染过程中 PGAM2 表达上调。上述结果提示, PGAM 在弓形虫侵入的过程中承担着重要角色。

本实验室的前期研究发现, 弓形虫可溶性速殖子抗原 (soluble tachyzoite antigen, STAg) 可有效诱导小鼠黏膜和系统免疫应答, 并可有效抵抗弓形虫感染^[7,8]。蛋白质组学分析证明, PGAM2 为弓形虫 STAg 组分之一^[9]。生物信息学分析表明, 该蛋白包含 16 个潜在抗原表位^[10]。本研究克隆 *TgPGAM2* 基因, 表达重组 *TgPGAM2* 蛋白, 并分析其抗原性, 为筛选候选抗原提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 弓形虫虫株、质粒和菌株 刚地弓形虫 RH 株速殖子, 北京大学医学部高兴政教授惠赠, 山西医科大学医学寄生虫学研究所液氮保种。原核表达质粒 pET30a(+), 大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α 和 BL21, 山西医科大学医学寄生虫学研究所保存。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam* H I、*T*₄ DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、逆转录试剂盒和质粒提取试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司, 总 RNA 提取试剂盒 (TRIzol Reagent) 和琼脂糖凝胶回收试剂盒, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京博迈德科技发展有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体 IgG (HRP-IgG) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色液购自武

汉博士德生物工程有限公司。兔抗弓形虫血清由本室制备。

2 方法

2.1 RT-PCR 引物的设计与合成 根据刚地弓形虫 PGAM2 基因编码序列 (GenBank 登录号为 DQ457187) 设计引物, 上、下游引物序列分别为, P1: 5'-CGG-GGTACCATGGCAAAGCAAAGTACACTC-3', P2: 5'-CGGGATCCTTAGGCCTTTTCCTTGGTTGG-3', 下划线部分为酶切位点, 预期扩增产物为 750 bp。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

2.2 *TgPGAM2* 基因扩增 按文献^[7]的方法收集纯化刚地弓形虫速殖子。按 TRIzol 试剂盒说明书提取弓形虫总 RNA。取 1 μ g RNA, 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板进行 PCR, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 68 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 产物。

2.3 原核表达质粒的构建 将 PCR 产物和原核表达质粒 pET30a(+) 经 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收酶切产物。目的基因 *TgPGAM* 与质粒 pET30a(+) 按 10:1 摩尔比混合于 25 μ l 反应体系中, 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 构建原核表达质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2*。取连接产物 10 μ l 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 卡那霉素筛选阳性克隆, 对阳性克隆提取质粒进行 PCR、单酶切和双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定, 阳性菌液送宝生物工程 (大连) 有限公司测序鉴定。

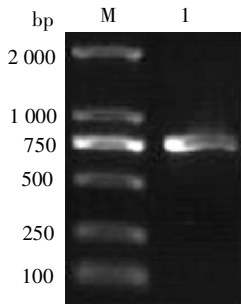
2.4 重组蛋白的表达与纯化 将测序正确的阳性重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞, 挑取单个菌落置于含卡那霉素的 5 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡 12 h (250 r/min), 取 0.2 ml 菌液加入含卡那霉素的 5 ml LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至生长对数期, 即吸光度 (A_{600} 值) 为 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 诱导表达 12 h。超声裂解菌体沉淀, 4 $^{\circ}$ C 10 000 \times g 离心 15 min, 取上清进行 Ni-NTA 亲和层析纯化。重组蛋白经 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白表达。

2.5 重组蛋白的蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 参照文献^[11]的方法, 用 Western blotting 分析重组蛋白 pET30a(+)-*TgPGAM2*, 兔抗弓形虫血清 1:50 稀释, 羊抗兔 HRP-IgG 1:2 000 稀释, DAB 显色 5 min, 纯水终止反应。

结 果

1 *TgPGAM2* 基因的 RT-PCR 结果

TgPGAM2 的 cDNA 序列全长为 790 bp, 其开放阅读框为 756 bp。依据本研究设计的引物扩增 *TgPGAM2* 基因, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 在约 750 bp 处有一特异扩增条带, 相对分子质量大小与预期值相符 (图 1)。



M: DNA 标志物; 1: *TgPGAM2* 的 PCR 产物。
M: DNA marker; 1: PCR product of *TgPGAM2*.

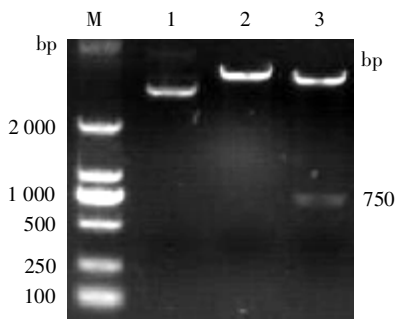
图 1 *TgPGAM2* 的 PCR 产物

Fig. 1 The PCR product of *TgPGAM2*

2 pET30a(+) -*TgPGAM2* 重组质粒的鉴定结果

对重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 进行 *Bam*H I 单酶切、*Kpn* I +*Bam*H I 双酶切和 PCR 扩增鉴定。结果显示, 阳性重组质粒单酶切可见大小约 6 000 bp 的单条带, 双酶切可见 5 422 bp 和 756 bp 的两条带, 而空质粒经 *Bam*H I 单酶切只有 5 422 bp 一条带 (图 2)。

重组质粒 PCR 扩增产物经测序后与已发表的基因序列 (GenBank 登录号为 DQ457187) 进行比较, 发现仅有第 306 位的鸟嘌呤(G) 变异为腺嘌呤(A), 但 AAG 和 AAA 均为赖氨酸密码子, 属无义突变。结



M: DNA 标志物; 1: pET30a(+) 空质粒经 *Bam*H I 单酶切; 2: pET30a(+)-*TgPGAM2* 重组质粒经 *Bam*H I 单酶切; 3: pET30a(+)-*TgPGAM2* 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切。
M: DNA marker; 1: pET30a(+) digested by *Bam*H I; 2: pET30a(+)-*TgPGAM2* digested by *Bam*H I; 3: pET30a(+)-*TgPGAM2* digested by *Bam*H I and *Kpn* I.

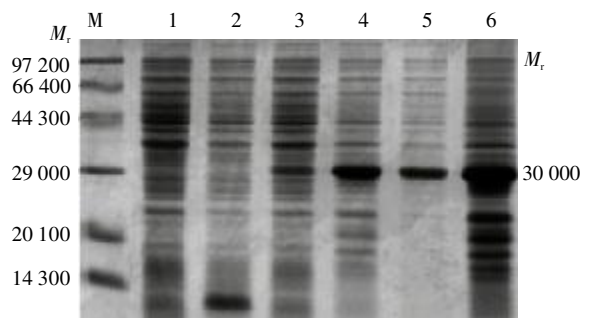
图 2 重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET30a(+)-*TgPGAM2* by restriction digestion

果表明, pET30a(+)-*TgPGAM2* 重组质粒构建成功。

3 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定结果

E. coli BL21 空菌、空质粒 pET30a(+) 转染菌和重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2* 阳性菌经 IPTG 诱导表达 12 h, 收集菌体沉淀, 经 SDS-PAGE 分离及考马斯亮蓝染色, 重组蛋白 *TgPGAM2* 在蛋白相对分子质量 (M_r) 约 30 000 处出现表达条带, 而 BL21 空菌和空质粒转染菌均未表达该条带。将重组质粒阳性菌的菌体沉淀超声裂解, 进行 SDS-PAGE 分离, 上清和沉淀中均有明显的目的蛋白条带 (图 3)。



M: 蛋白质标志物; 1: 宿主菌 *E. coli* BL21; 2: pET30a(+) 经 IPTG 诱导; 3: pET30a(+)-*TgPGAM2* 未诱导; 4: pET30a(+)-*TgPGAM2* 经 IPTG 诱导; 5: pET30a(+)-*TgPGAM2* 诱导后上清; 6: pET30a(+)-*TgPGAM2* 诱导后沉淀。

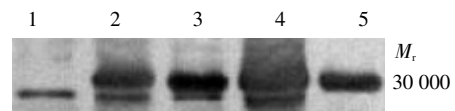
M: Protein marker; 1: *E. coli* BL21; 2: pET30a(+) induced by IPTG; 3: pET30a(+)-*TgPGAM2* without induction; 4: pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG; 5: Supernatant of pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG; 6: Precipitation of pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG.

图 3 pET30a(+)-*TgPGAM2* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of expression product of pET30a(+)-*TgPGAM2* by SDS-PAGE

4 表达产物的 Western blotting 鉴定

Western blotting 结果显示, 重组蛋白 *TgPGAM2* 能被兔抗弓形虫血清识别, 在 M_r 约 30 000 处可见一条识别条带。其他未经纯化的蛋白在 M_r 30 000 附近有杂带 (图 4)。



1: pET30a(+)-*TgPGAM2* 未诱导; 2: pET30a(+)-*TgPGAM2* 经 IPTG 诱导; 3: pET30a(+)-*TgPGAM2* 诱导后上清; 4: pET30a(+)-*TgPGAM2* 诱导后沉淀; 5: 纯化的重组蛋白 *TgPGAM2*。

1: pET30a(+)-*TgPGAM2* without induction; 2: pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG; 3: Supernatant of pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG; 4: Precipitation of pET30a(+)-*TgPGAM2* induced by IPTG; 5: Purified reconstructed protein *TgPGAM2*.

图 4 pET30a(+)-*TgPGAM2* 表达产物 Western blotting 检测结果

Fig. 4 pET30a(+)-*TgPGAM2* expression product analyzed by Western blotting

讨 论

刚地弓形虫速殖子期是主要的致病阶段和寻求有效保护性抗原的重要虫期。*TgPGAM2* 存在于速殖子质体样细胞器(apicoplast)中^[12], 在弓形虫速殖子侵入宿主的过程中发挥着供能作用。最近, Saadatnia 等^[13] 采用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹分析从 RH 株弓形虫的排泄分泌抗原(ESA)中获得 M_r 30 000 的蛋白, 经蛋白质谱分析证实为 *TgPGAM*。ESA 包含弓形虫速殖子在附着和侵入宿主细胞过程中分泌的多种蛋白, 此类分泌蛋白最先与宿主细胞接触, 不仅有助于速殖子对宿主细胞的附着与侵入, 而且是感染早期诱导宿主免疫应答的主要抗原物质。

本实验室的前期研究中, 对 RH 株刚地弓形虫可溶性速殖子抗原(soluble tachyzoite antigen, STAg)的蛋白质组分析也证实了 *PGAM2* 蛋白的存在^[9]。通过生物信息学预测发现, *TgPGAM2* 存在 16 个潜在抗原表位, 推测可能具有抗原性^[10]。本研究构建了重组质粒 pET30a(+)-*TgPGAM2*, 并在 *E. coli* BL21 中高效可溶性表达, 测序证实插入片段正确。Western blotting 分析显示, 该蛋白能被兔抗弓形虫血清识别, 表明其具有抗原性, 为研究其免疫保护性提供了实验依据。

在本研究中发现, 该重组蛋白多数以可溶性的形式存在于超声裂菌后的上清中, 但沉淀中也有部分蛋白, 这主要由于超声不彻底所致, 可通过增加超声次数改善。此外, Western blotting 分析结果显示, 在 IPTG 诱导或未诱导表达的包含宿主菌蛋白的电泳图中可见 M_r 30 000 附近有杂带, 而纯化后的 *TgPGAM2* 没有杂带, 原因可能是本研究采用的多克隆抗体血清中含有抗 *E. coli* (蛋白表达所用的宿主菌) 抗体, 这可通过将多克隆抗体血清与蛋白表达所用的宿主菌共孵育去除非特异性抗体, 以减少杂带。

参 考 文 献

[1] Kasper L, Courret N, Doreh S, et al. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity [J]. Int J Parasitol, 2004, 34(3): 401-409.
[2] Buzby JC, Roberts T. Economic costs and trade impacts of micro-

bial foodborne illness [J]. World Hlth Stat Q, 1997, 50(1-2): 57-66.
[3] Bosch-Driessen LE, Berendschot TT, Ongkosuwito JV, et al. Ocular toxoplasmosis: clinical features and prognosis of 154 patients [J]. Ophthalmology, 2002, 109(5): 869-878.
[4] Fothergill-Gilmore LA, Watson HC. The phosphoglycerate mutases[J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1989, 62(6): 227-313.
[5] Blader IJ, Manger ID, Boothroyd JC. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii*-infected human cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(26): 24223-24231.
[6] Okomo-Adhiambo M, Beattie C, Rink A. cDNA microarray analysis of host-pathogen interactions in a porcine *in vitro* model for *Toxoplasma gondii* infection [J]. Infect Immun, 2006, 74(7): 4254-4265.
[7] Meng XL, Yin GR, Liu HL, et al. Effect of intranasal immunization with different doses of the soluble tachyzoite antigen on the protection of mice against *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22(3): 202-205. (in Chinese)
(孟晓丽, 殷国荣, 刘红丽, 等. 不同剂量 STAg 滴鼻免疫小鼠诱导的抗弓形虫感染作用 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(3): 202-205.)
[8] Yin GR, Meng XL, Ma GY, et al. Intranasal immunization with mucosal complex vaccine protects mice against *Toxoplasma gondii* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(4): 290-294. (in Chinese)
(殷国荣, 孟晓丽, 马广源, 等. 弓形虫复合黏膜疫苗滴鼻免疫小鼠抵抗弓形虫感染作用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(4): 290-294.)
[9] Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, et al. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen [J]. Exp Parasitol, 2009, 122(1): 41-46.
[10] Wang F, Yin GR, Meng XL, et al. Bioinformatics analysis of the structure and epitope of the gene encoding phosphoglycerate mutase 2 protein from *Toxoplasma gondii* [J]. J Pathogen Biol, 2010, 5(11): 840-843. (in Chinese)
(王芬, 殷国荣, 孟晓丽, 等. 刚地弓形虫磷酸甘油酸变位酶 2 基因编码蛋白主要特性与抗原表位的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(11): 840-843.)
[11] Liu ZZ, Wang HL, Yin GR, et al. Cloning and prokaryotic expression of peroxiredoxin gene of *Toxoplasma gondii* and immunogenicity analysis of the recombinant protein[J]. Chin J Zoonoses, 2009, 25(4): 334-337. (in Chinese)
(刘转转, 王海龙, 殷国荣, 等. 刚地弓形虫 Peroxiredoxin 基因的克隆表达与免疫原性分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(4): 334-337.)
[12] Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, et al. Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator [J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(6): 984-996.
[13] Saadatnia G, Mohamed Z, Ghaffarifar F, et al. *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigenic proteins of diagnostic potential [J]. APMIS, 2012, 120(1): 47-55.

(收稿日期: 2011-09-20 编辑: 瞿麟平)