

文章编号:1002-2694(2007)12-1222-04

犬钩虫(*Ancylostoma caninum*)天冬氨酸蛋白酶基因的克隆和在大肠杆菌中的表达

杨玉荣, 韦 华

摘要:目的 对犬钩虫(*Ancylostoma caninum*)天冬氨酸蛋白酶 Asp 基因进行了克隆, 鉴定, 并在原核系统中进行表达。方法 以犬钩虫总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 法对犬钩虫天冬氨酸蛋白酶 Asp 基因进行扩增, 获得的 Asp cDNA 产物克隆进 pMD-18T 载体, 用 PCR 筛选阳性克隆。碱裂解法进行质粒提取, 单、双酶切进行鉴定并测序。将测序正确的阳性克隆进行双酶切, 构建到表达载体 pET-32a 中, 将此重组质粒先转化到 *E. coli* DH5a 内, 提取质粒, 酶切鉴定阳性, 再转化入表达宿主 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株内, 对转化菌株用 IPTG 进行诱导培养。收集培养液, 破菌、离心, 上清进行 SDS-PAGE, 通过电转移将胶中蛋白转到硝酸纤维素膜上进行免疫印迹分析。结果 电泳发现转化了重组质粒的菌株有表达蛋白, 所表达蛋白相对分子量为 40kDa, 抗体检测有特异条带大小为 40kDa。结论 成功进行了犬钩虫天冬氨酸蛋白酶 Asp 基因的克隆表达。

关键词:犬钩虫; 天冬氨酸蛋白酶; 克隆; 表达

中图分类号:R383 **文献标识码:**A

Cloning, expression and identification of aspartic protease gene of *Ancylostoma caninum* in *E. coli*

YANG Yu-rong, WEI Hua

(Parasite Research Lab, Life Science School, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: Cloning, expressing and identify the aspartic protease gene from *Ancylostoma caninum* for the further studying in the application in the diagnosis of *Ancylostoma* as well as for the development of anti-hookworm vaccine. The gene encoding aspartic protease was amplified from the total RNA by using RT-PCR technique. The amplified product was cloned initially into pMD-18T vector. After PCR selection, enzyme digestion, and sequencing. The positive and right sequence of plasmid was digested by enzyme and ligated with digested expression vector pET-32a by ligase, and then transformed the construct into the competent *E. coli* DH5 strain. Colonies containing the insert plasmid were selected on LB plus ampicillin (100µg/ml) plate and also by PCR screening, the positive plasmid DNA was extracted and digested with enzymes. Plasmid containing the right insert were sequenced to confirm its identity, and then retransformed the recombinant plasmids into *E. coli* BL21 (DE3) strain. Bacterial lysates from cultures induced with IPTG (1mmol/L) were directly loaded onto SDS-PAGE, and the proteins on the SDS-PAGE gel. Were transferred to nitrocellulose membrane, detected with antiserum against recombinant expressing aspartic protease. Through these procedures, a specific protein with a molecular mass of 40kDa could be visualized on gel. This recombinant expressing protein can be used for further studies in the detection of the effectiveness of immunity and the preparation of antigen and antibodies of aspartic protease in large scale.

KEY WORDS: *Ancylostoma caninum*; aspartic protease gene; cloning; expression and identification

钩虫 (hookworm) 是钩口科线虫的统称, 寄生于人体小肠, 引起钩虫病。在肠道线虫中钩虫的危害最严重, 不但可损伤肠黏膜, 造成消化道功能紊乱, 而且可使人体长期慢性失血, 重度感染者会造成严重贫血。目前, 全世界钩虫感染人数约 9 亿, 我国的感染人数在 2 亿左右, 是危害人民健康的重要寄生虫病之一。犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*) 属于

人兽共患的寄生虫, 其幼虫可以感染人体, 但不能发育为成虫, 仅引起皮肤幼虫移行症。随着人民生活水平的提高, 宠物犬越来越多走进人类生活中随着

* 本课题受国家自然科学基金 (No. 30470881) 和福建省自然科学基金重点项目 (No. C0320001) 联合资助。

作者单位: 厦门大学生命科学学院寄生动物研究室, 厦门 361005; Email: yryang@xmu.edu.cn

家庭养狗越来越普遍,特别是在卫生状况不好的农村,养狗会造成钩虫感染等人兽共患病的流行。

天冬氨酸蛋白酶是钩虫分泌的几种粘连组织水解酶之一,在 L3 感染期幼虫侵入宿主过程中有重要作用,此外在成虫中可以帮助钩虫侵入宿主的小肠绒毛。推测其在引起宿主的免疫反应方面有重要作用,是抗钩虫疫苗的候选分子。为控制犬钩虫病的流行以及研究钩虫致病和宿主免疫保护机制,特将克隆犬钩虫天冬氨酸蛋白酶的基因并在大肠杆菌中进行表达的研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 虫体、菌种与载体 犬钩虫 (*A. caninum*) 成虫和童虫由本实验室人工感染实验狗解剖获得, L3 期幼虫人工培养收集。原核表达载体 pET-32a, 大肠杆菌 DH5 及 BL21 (DE3) 均由本实验室保存。

1.2 试剂 反应中所用的 dNTP、PCR 缓冲液、Taq 酶、限制性内切酶、GeneRuler DNA Mixture ladder、Trizol 试剂和琼脂糖均购自 MBI Fermentas 公司。胶回收试剂盒购自华舜公司。引物由上海生工合成,上游引物 AspF 为: 5'-CAC AgA Agg ACA TTC CAC CA; 下游引物 AspR 为: 5'-CCg gAT AgC CAT CTT CTg AC; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 犬钩虫 RNA 的提取 用 Trizol 试剂按说明书提取 RNA。加 1mL Trizol 试剂每 50-100mg 组织冰上研磨, 15 - 30 孵育 5min; 每 1mL Trizol 试剂加入 0.2mL 氯仿, 剧烈震荡 15s, 15 - 30 孵育 2 - 3min; 于 2 - 8 下 12 000g 离心 15min, RNA 存于上层水相中; 将上层水相转移到新离心管, 用异丙醇沉淀 RNA, 混匀; 于 15 - 30 孵育 10min。于 2 - 8 下 12 000g 离心 10min; 弃上清, 用 1mL 75% 乙醇洗涤沉淀, 漩涡混匀沉淀, 于 2 - 8 、 7 500g 离心 10min; 空气干燥 RNA 5 - 10min。

1.4 PCR 扩增目的基因 以犬钩虫总 RNA 为模板, 用引物 AspF 和 AspR, RT-PCR 扩增 Asp 基因片段。RT 反应体系如下: 总 RNA 8μL, oligo (dT) 18 primer 1μL, DEPC 处理的 H₂O 3μL; 70 5min; 放置冰上, 依次加入下列试剂, 5 × reaction buffer 4μL, RiboLock™ Ribonuclease inhibitor (20u/ uL) 1μL, 10mM dNTP mix; 37 5min; 加入 Revert Aid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/μL) 1μL; 总体积 20μL; 42 60min; 70 10min; 放冰上。PCR 反应体系: 10 × buffer 10μL; 2mM dNTP mix 5μL; Taq 0.5μL; AspF 4μL; AspR

4μL; cDNA 模板 0.5μL; H₂O 76μL; 总体积 100μL。反应条件为 95 5min; (循环) 95 30s, 50 30s, 72 2min, 循环 39 次, 72 延伸 8min。产物经琼脂糖凝胶电泳割胶后, 按 QIA quick Gel Extraction Kit 说明书操作回收, 得到目的基因。

1.5 目的基因 Asp 的克隆: Asp 基因分别用 *Eco*RI、*Hind* 双酶切, 载体 pET-32a 也以 *Eco*RI、*Hind* 双酶切, PCR 产物与载体的酶切产物在 T4DNA 连接酶的作用下 16 放置 16h, 连接产物取 10μL 转化感受态 *E. coli* DH5 菌株 (CaCl₂ 法制备), 涂布于含氨苄青霉素 100μg/mL 的 LB 平板上, 于 37 培养过夜, 有细菌菌落生长。

1.6 重组质粒的鉴定: 挑取数个转化菌单菌落, 于少量 LB 液体培养基 (含氨苄青霉素) 中培养 12h, 用碱裂解法提取质粒, 以 *Eco*RI、*Hind* 双酶切鉴定。重组质粒经酶切后有符合大小的片段出现即送去测序, 将测序正确的质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 的感受态细胞内, 涂布于含氨苄青霉素 100μg/mL 的 LB 培养皿中, 于 37 培养过夜, 有细菌菌落生长。

1.7 Asp 原核融和蛋白的诱导表达: 将 Asp 重组质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 的感受态细胞内, 涂布于含氨苄青霉素 100μg/mL 的 LB 培养皿中, 于 37 培养过夜。次日, 挑单菌落培养, 当 OD₆₀₀ 接近 0.6 时, 转入大瓶培养基, 至 OD₆₀₀ 接近 0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37 培养 3 ~ 4h, 收菌。用 2 × SDS buffer 裂解, 进行 SDS - PAGE 分析。

2 结果

2.1 犬钩虫总 RNA 提取结果 用 Trizol 试剂按说明书提取犬钩虫 RNA, 电泳结果发现有 3 条带, 说明 RNA 没有降解, 可进行反转录, 见图 1。

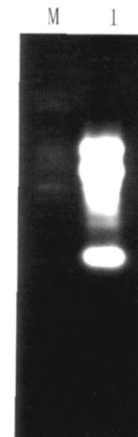


图 1 犬钩虫 RNA

Fig. 1 mRNA of *A. caninum*

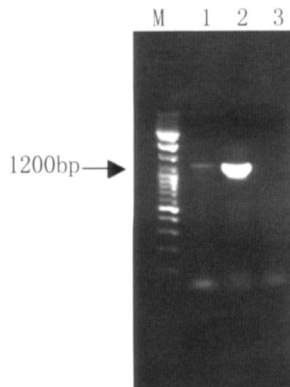


图2 PCR扩增犬钩虫 Asp 编码基因的 cDNA

Fig.2 PCR product of Asp gene cDNA from *A. caninum*

M: DNA marker; 1: PCR product of Asp gene from Male adult worms; 2: PCR product of Asp gene from female adult worms; 3: PCR product of Asp gene from L4

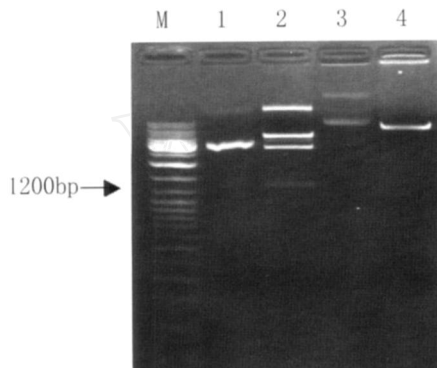


图3 pMD-ASP 酶切验证

Fig.3 The result of identification of recombinant plasmid pMD-Asp

M:DNA marker; 1: plasmid pMD-ASP; 2: Recombinant pET-ASP digested by *EcoRI* and *Hind* ; 3: plasmid pET-32a; 4: plasmid pET-32a digested by *EcoRI* and *Hind*

2.2 天冬氨酸蛋白酶基因的 PCR 扩增和表达载体的构建:将获得的犬钩虫 mRNA 进行反转录成 cDNA, RT 后用所设计的引物 AspF 和 AspR,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,用 1%琼脂糖凝胶电泳,以 DNA Ladder Mix marker 为参照,天冬氨酸蛋白酶基因扩增片段大小为 1 200bp,见图 2。将纯化的 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上,用 PCR 筛选阳性克隆。碱裂解法提取质粒,重组质粒 pMD-Asp 经 *EcoRI*、*Hind* 双酶切后,可得到与目的基因(1 200bp)相同大小的片段,双酶切鉴定如图 3 所示,表明构建正确,并进行测序。

将测序正确的 pMD-Asp 重组质粒分别用 *EcoRI*、*Hind* 双酶切,载体 pET-32a 也以 *EcoRI*、*Hind* 双酶切,带有 *EcoRI*、*Hind* 双酶切位点的目的片段与载体的酶切产物在 T4DNA 连接酶作用

下构建 pET-Asp 重组表达质粒。随后将该重组质粒进行限制性酶切鉴定和测序。重组质粒 pET-Asp 经 *EcoRI*、*Hind* 双酶切后,可得到与目的基因(1200bp)相同大小的片段,双酶切鉴定如图 4 所示,表明构建正确。测序的序列分析结果表明序列和开放阅读框正确。

2.3 天冬氨酸蛋白酶基因重组表达质粒表达产物的检测:按分子克隆所述的方法检测天冬氨酸蛋白酶基因在受体菌 BL21 (DE3) 中的表达,在 SDS-PAGE 凝胶电泳图上,见图 4,出现清晰的加浓带,蛋白分子量与理论值一致,约 40kDa。

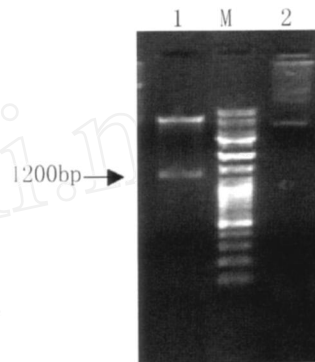


图4 重组质粒 pET-ASP 酶切

Fig.4 The identification of recombinant plasmid pET-Asp with enzyme digest

1: Recombinant pET-ASP digested by *EcoRI* and *HindIII* M:DNA marker 2: plasmid pET-ASP

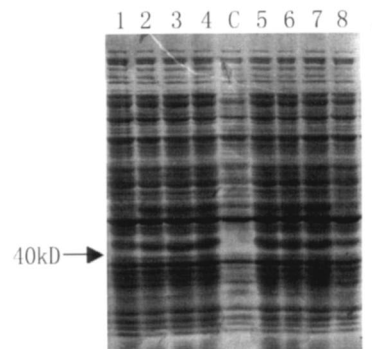


图5 pET Asp 重组表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.5 Analysis of expression products of recombinant plasmids pET-Asp by SDS-PAGE

1-4: 0.5mmol/L IPTG induced 1, 2, 3, 4h; C: uninduced cell lysate of pET-ASP; 5-8: 1.0mmol/L IPTG induced 4, 3, 2, 1h

3 讨论

由于钩虫在生活史各期虫体所表现的抗原种类很复杂,对研究钩虫感染引起宿主的免疫反应带来了很大的困难,最近十年来在这方面的研究取得了很大的进展。研究表明在钩虫发育的不同时期表达不同的 mRNA 和蛋白质^[5],这些蛋白质都可以引起

宿主的免疫应答。钩虫还分泌免疫调节分子来降低宿主的免疫应答,使它们能够在宿主体内能够长期寄生^[4]。钩虫在整个生活史过程中表现出抗原的多样性,目前研究最多的,且比较重要的主要是L3期分泌的抗原和成虫抗原。

成虫的分泌抗原主要有分泌蛋白TMP,分子量16kDa,是金属蛋白酶的抑制子。TMP占犬钩虫成虫分泌蛋白的10%,它的功能目前还不清楚。此外犬钩虫还分泌丝氨酸酶原抑制子和成虫专一的ASP以及H-gal-GP同源物。H-gal-GP复合物有多种组分组成,包括金属蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸酶等。

天冬氨酸蛋白酶是钩虫分泌的几种主要组织蛋白水解酶之一,在L3感染期幼虫侵入宿主过程中有重要作用,此外在成虫中可以帮助钩虫侵入宿主的小肠绒毛。推测其在引起宿主的免疫反应方面有重要作用,是抗钩虫疫苗的候选分子。我们通过克隆犬钩虫的天冬氨酸蛋白酶基因,在大肠杆菌中重组表达了天冬氨酸蛋白酶,并获得了纯化的重组表达蛋白。用纯化的重组蛋白免疫动物获得了抗血清。并检测了天冬氨酸蛋白酶在犬钩虫的不同发育期的表达。该重组蛋白的表达为进一步研究钩虫的免疫和进行免疫诊断研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Zhan B, Hotez PJ, Wang Y, et al. A developmentally regulated

metalloprotease secreted by host-stimulated *Ancylostoma caninum* third-stage infective larvae is a member of the astacin family of proteases [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2002, 120:291-296.

- [2] Ghosh K, Hawdon J, Hotez PJ. Vaccination with alum-precipitated recombinant *Ancylostoma* secreted protein1 protects mice against challenge infections with infected hookworm (*Ancylostoma caninum*) larvae [J]. *J Infect Dis*, 1996, 174: 1380-1383.
- [3] Gowd GN, Zhan B, Ghosh K, et al. Cloning, yeast expression isolation and vaccine testing of recombinant *Ancylostoma* secreted protein1 (ASP-1) and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum* [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189: 919-929.
- [4] Hawdon J M, Hotez P J. Hookworm: developmental biology of the infectious process [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6: 618-623.
- [5] Hawdon J M, Narasimhan S, Hotez P J. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum* [J]. *Mol Bio Chem Parasitol*, 1999, 99: 149-165.
- [6] Kooyman F N J, Schalling H D F H, VanLeeuwen M A W, et al. Protection in lambs vaccinated with *Haemonchus contortus* antigens is age related, and correlates with IgE rather than IgG antibody [J]. *Parasite Immunol*, 2000, 22: 13-20.
- [7] Hotez, P J, Zhan B, Bethony J M. Progress in the development of a recombinant vaccine for human hookworm disease: the human hookworm vaccine initiative [J]. *International Journal for Parasitology*, 2003, 33: 1245-1258.
- [8] Jones B F, Cappello M. Hookworm infection: molecular mechanism of disease and targets for control [J]. *Infectious disease*, 2004, 85:217-221.

收稿日期:2006-12-24;修回日期:2007-07-19