

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0135-04

【论著】

简单异尖线虫 L-样半胱氨酸蛋白酶基因的克隆与表达

徐世三, 倪芳, 张少雷, 刘江, 罗大民*

【摘要】 目的 克隆简单异尖线虫 L-样半胱氨酸蛋白酶基因(AsCP)全长, 研究其表达特性。方法 根据 GenBank 中简单异尖线虫表达序列标签 L-样半胱氨酸蛋白酶基因的部分信息, 设计特异引物, 用 cDNA 末端快速扩增技术扩增 3'端部分, 获得基因全长序列。根据基因全长序列设计引物, 以简单异尖线虫总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增 AsCP 基因编码序列, 产物经 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切, 克隆至表达载体 pET32a(+), 转化大肠埃希菌 BL21(DE3)株, 以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 表达效果经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。结果 3'端扩增片段大小为 1 211 bp, 拼接完整基因全长 1 462 bp, 编码 411 个氨基酸, 与秀丽隐杆线虫的 L-半胱氨酸蛋白酶相似性达 36.4%; 重组载体 pET32a(+)-AsCP 经 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切后有一条约 1 150 bp 的条带, 测序结果显示重组载体构建成功。SDS-PAGE 结果表明, 重组蛋白相对分子质量约为 M_r 60 000 (含 6 个组氨酸的标签), 与目的蛋白相符。用不同浓度的 IPTG 诱导对表达量的影响很小, 1 mmol/L IPTG 诱导 2 h 后表达量达到最高水平。结论 成功克隆并表达了 L-样半胱氨酸蛋白酶。

【关键词】 简单异尖线虫; L-样半胱氨酸蛋白酶; 克隆; 原核表达

中图分类号: R383.19

文献标识码: A

Cloning and Expression of L-like Cysteine Protease of *Anisakis simplex*

XU Shi-san, NI Fang, ZHANG Shao-lei, LIU Jiang, LUO Da-min*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

【Abstract】 Objective To clone and express the full length of L-like cysteine protease gene of *Anisakis simplex* (AsCP). **Methods** According to L-like cysteine protease encoding gene of *A. simplex* from GenBank EST database, specific primers were designed to amplify 3'-end of AsCP gene using rapid-amplification of cDNA ends (RACE), and the full length of the L-like cysteine protease gene was obtained. Specific primers were designed according to the full length of the gene. Using total RNA of *A. simplex* third-stage larvae, coding sequence of the AsCP gene was amplified by RT-PCR. The PCR product was digested by *EcoR* I and *Sal* I, and cloned into pET32a(+) vector. The recombinant plasmid was checked by double enzyme digestion and sequencing, and the positive recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Expression of the protein induced by IPTG of gradient concentration (0.2, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mmol/L) and by the same concentration (1 mmol/L) of IPTG at different time (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 h) was conducted. The expression situation of recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE. **Results** A 1 211 bp of 3'-end of AsCP gene was amplified by 3'RACE, full length of the gene was 1 462 bp and coding 411 amino acids. It showed 36.4% identity with the L-cysteine protease of *Caenorhabditis elegans*. Double enzyme digestion of the constructed recombinant plasmid pET32a(+)-AsCP showed that there was about 1 150 bp fragment, the constructed recombinant plasmid was then identified by sequencing. SDS-PAGE showed that the recombinant protein (M_r 60 000) was identical with the target. IPTG showed little effect on the protein expression, and the production of protein was up to maximum after 2 hours induction. **Conclusion** The AsCP gene has been cloned and expressed.

【Key words】 *Anisakis simplex*; L-like cysteine protease; Cloning; Prokaryotic expression

Supported by the Science and Technology Fund of Fujian Province (No. 2008N2005)

* Corresponding author, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

基金项目: 福建省科技计划项目 (No. 2008N2005)

作者单位: 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

* 通讯作者, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

异尖线虫病是一种人兽共患寄生虫病, 由误食含简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*) 期幼虫的生或半生鱼片引起。幼虫入侵胃肠黏膜, 释放分泌/排泄蛋白, 引起 IgE 介导的过敏反应, 如风疹、血管神经性水肿、哮喘、结膜炎、腹痛和呕吐等^[1,2]。该病主要见于日本、意大利、西班牙和荷兰等地^[3]。寻找抗原和过敏原蛋白是诊断与治疗该病的研究热点之一, 目前已在简单异尖线虫中找到 9 种相关的蛋白^[4-9]。

在很多自由生活和寄生生活的线虫中均发现有半胱氨酸蛋白酶, 如秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、马来布鲁丝虫 (*Brugia malayi*) 和广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 等, 该蛋白酶在寄生虫入侵宿主组织, 免疫逃避和自身的新陈代谢等方面起着重要的作用^[10]。本研究拟克隆表达简单异尖线虫 L-样半胱氨酸蛋白酶基因, 并对该蛋白酶的生物学特性进行初步分析。

材料与方 法

1 材 料

1.1 线虫来源 简单异尖线虫 期幼虫从厦门农贸市场购买的新鲜海鱼内脏中分离获得。

1.2 主要试剂和仪器 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)、DH5 α 和 pET32a(+) 载体由本室保存。RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒和 2 \times 含 *Taq* 酶的 PCR 混合物购自北京天根生化科技有限公司。*Taq* DNA 聚合酶、*Sal*、*Eco*R、3'RACE 试剂盒、cDNA 合成试剂盒、DNA 标志物和 T₄ 连接酶均购自宝生物(大连)工程有限公司, 十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、过硫酸胺、N,N,N',N'-四甲基二乙胺(TEMED)和胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 仪 (C1000TM Thermal Cycler)、凝胶成像分析系统均为美国 Bio-Rad 公司产品, 水平电泳仪(DYY-8C)为北京六一仪器厂产品, 垂直蛋白电泳仪(SE250)为美国 GE 公司产品。

2 方 法

2.1 简单异尖线虫 L-样半胱氨酸蛋白酶基因(AsCP)全长克隆 根据 GenBank 简单异尖线虫表达序列标签(EST)中 L-样半胱氨酸蛋白酶基因的 5' 部分信息, 设计特异引物, AsCP-F: 5'-TTTCGTTATGACCATC TATC-3', AsCP-R: 5'-CGTTCTGTTTACCCTGTT-3', 由上海英俊生物公司合成。取 5 条简单异尖线虫 期幼虫, 按 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA; 取 5.5 μ l 总 RNA, 按试剂盒操作进行反转录。反应体系: 反转录产物 4 μ l, AsCP-F 引物和 cDNA 末端快速扩增

外引物各 1.5 μ l、25 μ l 2 \times 含 *Taq* DNA 聚合酶的 PCR 混合物, 加双蒸水至 50 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果, 凝胶回收试剂盒回收扩增产物, 将回收片段连接至 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, 用 LB 平板(含 Amp 100 μ g/ml)进行筛选, 挑取单克隆进行 PCR 检测, 对阳性克隆进行测序, 得到 3' 全长, 与数据库中已有的 5' EST 拼接得到全长半胱氨酸蛋白酶基因。

2.2 简单异尖线虫 AsCP 基因分析 用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html> 预测简单异尖线虫 AsCP 基因的阅读框, 并翻译成蛋白质序列。将推导的蛋白质序列进行 Blastp 同源性比对。用 DNAMAN 软件将该蛋白质序列与 GenBank 数据库中相似性较高的相关 L-半胱氨酸蛋白酶序列进行比对。

2.3 pET32a-AsCP 重组质粒的构建 根据 AsCP 基因全长序列设计引物(5' 端不含跨膜域), ExAsCPF: 5'-CCGGAATTCATGACCATCTATCAAGCAG3', ExAsCPR: 5'-ACGCGTCGACCGATGACGATTATTTACAGT-3', 下划线部分分别为 *Eco*R 和 *Sal* 酶切位点。按 cDNA 合成试剂盒说明合成 cDNA。反应体系: cDNA 5 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 2.5 mmol/L 三磷酸脱氧核苷酸(dNTPs) 8 μ l, 10 mmol/L 引物各 4 μ l, 5 U/ μ l *Taq* DNA 聚合酶 1 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 6 μ l, 加双蒸水至 50 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物和 pET32a 载体用 *Eco*R 和 *Sal* 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收试剂盒纯化目的片段。取 14 μ l 双酶切的 PCR 产物, 2 μ l 双酶切的 pET32a(+) 载体, 2 μ l T₄ 连接酶, 2 μ l 10 \times 连接缓冲液, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细菌中, 用 LB 平板(含 Amp 100 μ g/ml)进行筛选, 挑取单克隆 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 摇菌过夜, 用质粒提取试剂盒提取质粒, *Eco*R 和 *Sal* 双酶切鉴定重组质粒, 并进行测序。

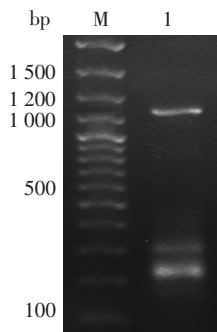
2.4 重组蛋白的表达 将 pET32a(+)-AsCP 重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 用 LB 平板(含 100 μ g/ml Amp)进行筛选。挑取单克隆, 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇菌过夜, 菌液按 1:50 接入新配制的 LB 液体培养基中(含 200 μ g/ml Amp), 37 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养至吸光度(A₆₀₀ 值)为 0.6~0.8, 取 7 个试管, 每管加入 3 ml 活化菌液和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)(终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L), 于 37 $^{\circ}$ C 180 r/min 培养 4 h。每管取 1 ml, 12 000 \times g 离心 1 min, 收集菌体加入 50 μ l 1 \times SDS 上样缓冲液悬浮菌体, 沸

水浴 5 min, 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 考马斯亮蓝 R250 染色。另取 50 ml 活化菌液, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 °C 180 r/min 培养 1 h 后, 每隔 0.5 h 取 1 ml 菌液, 共取 7 次并行 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色。

结 果

1 3' cDNA 末端快速扩增结果

3'RACE 扩增出约 1 250、300 和 250 bp 的 3 个条带 (图 1)。将 1 250 bp 片段回收测序, 结果显示该片段长 1 211 bp, 并且有 3' 多聚 A 出现。将其与数据库中的 5'EST 进行拼接, 获得简单异尖线虫 AsCP 基因全长序列 (GenBank 登录号为 GQ469988)。



M: DNA 标志物, 1: 3'RACE 扩增产物。
M: DNA marker, 1: 3'RACE PCR product.

图 1 AsCP 基因的 3'RACE PCR 产物

Fig.1 Electrophoresis of AsCP gene 3'RACE PCR products

2 简单异尖线虫 AsCP 基因及蛋白的特征分析

AsCP 基因包括 40 bp 的 5'非翻译区 (UTR) 和 262 bp 的 3'UTR, 编码 411 个氨基酸, 与数据库中相关蛋白进行多序列比对, 其与秀丽隐杆线虫的 L-半胱氨酸蛋白酶相似性最高, 达 36.4% (图 2)。

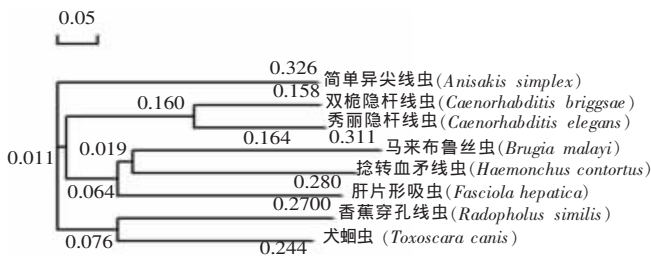
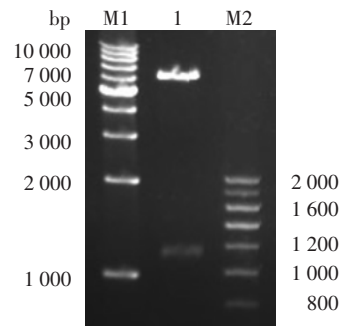


图 2 L-半胱氨酸蛋白酶多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of L-cysteine protease

3 重组质粒 pET32a(+)-AsCP 双酶切鉴定

重组质粒 pET32a(+)-AsCP 经 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切后, 在约 1 150 bp 处有一清晰条带 (图 3), 与目的基因大小基本相符, 证明重组表达载体构建成功。



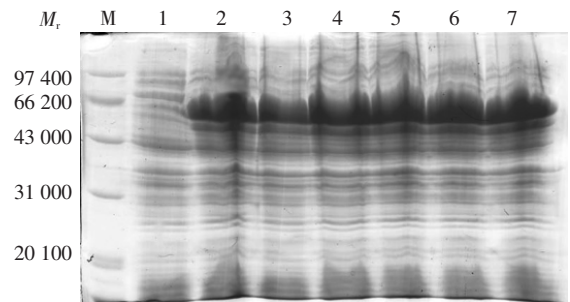
M1、M2: DNA 标志物, 1: pET32a(+)-AsCP 双酶切。
M1、M2: DNA marker, 1: pET32a(+)-AsCP digested by *EcoR* and *Sal*.

图 3 重组质粒 pET32a(+)-AsCP 双酶切鉴定

Fig.3 Identification of pET32a(+)-AsCP by restriction endonuclease

4 重组蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 结果显示, 含重组质粒 pET32a(+)-AsCP 的 *E. coli* BL21 经不同浓度 IPTG 诱导, 效果基本相同, 均能表达相对分子质量 (M_r) 约 60 000 的重组蛋白 (图 4)。在 1.0 mmol/L IPTG 诱导下, 约 2 h 蛋白的表达量达到最高 (图 5)。

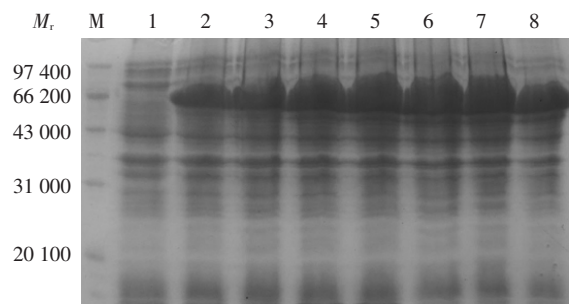


M: 蛋白质标志物, 1~7: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2 mmol/L IPTG 分别诱导。

M: Protein marker, 1~7: Induced with 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2 mmol/L IPTG, respectively.

图 4 重组蛋白不同浓度 IPTG 诱导表达 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein induced with different concentration IPTG



M: 蛋白标志物, 1~8: 1 mmol/L IPTG 分别诱导 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5 和 4 h。

M: Protein marker, 1~8: After 0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 h induction with 1 mmol/L IPTG, respectively.

图 5 诱导不同时间重组蛋白表达量的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expression at different time

讨 论

参 考 文 献

异尖线虫病主要是由异尖线虫幼虫的分泌/排泄(ES)蛋白所引起的 IgE 介导的过敏反应, 这些分泌/排泄蛋白不仅引起宿主的过敏反应, 还参与对宿主的免疫逃避以及自身的新陈代谢等。这些蛋白似乎有利于异尖线虫的寄生, 克隆寻找新的 ES 蛋白研制基因工程疫苗已成为研究热点。

在寄生虫中, 半胱氨酸蛋白酶参与自身的生长发育、宿主致病、免疫逃避和组织入侵等。如, L-半胱氨酸蛋白酶参与寄生虫卵壳的重塑和幼虫蜕皮^[11]。原发性阿米巴脑膜脑炎的病原体福氏耐格里原虫(*Naegleria fowleri*)可产生 M_r 30 000 的半胱氨酸蛋白酶, 该酶通过降解哺乳动物细胞的细胞外基质和导致细胞病变来促进其侵入和破坏宿主组织, 引发急性出血性坏死性脑膜脑炎^[12]。在肝片形吸虫的研究中表明, 半胱氨酸蛋白酶降解黏连层蛋白、胶原蛋白基底膜等细胞外基质^[13], 有利于寄生虫的入侵及体内移行。

本研究中克隆表达的 L-样半胱氨酸蛋白酶在多肽 52~74 位有 23 个氨基酸组成的疏水性很强的跨膜域, 这个结构域很可能为该蛋白酶分泌到细胞外提供了一个信号; 或是提供一个将细胞内(虫体)信息传到细胞外(宿主)的通道, 从而引起寄生虫与宿主间的相互作用, 有利于寄生。通过克隆简单异尖线虫的 L-样半胱氨酸蛋白酶基因, 在大肠埃希菌中重组表达 L-样半胱氨酸蛋白酶, 可用纯化的重组蛋白免疫动物获得抗血清。

该 L-样半胱氨酸蛋白酶在简单异尖线虫 期幼虫的入侵和寄生过程中起重要作用, 也是导致异尖线虫病的主要病因之一。借助重组蛋白的表达研究, 可对免疫诊断和探究致病机制等作进一步研究; 同时根据该蛋白的结构, 可为研发新的抗异尖线虫的药物和抗病疫苗提供依据。

- [1] Ana RM, Miguel GM, Fernando GA, *et al.* Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor[J]. *Int J Parasitol*, 2007, 37(8-9): 907-917.
- [2] Scala E, Giani M, Pirota L, *et al.* Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex* [J]. *Eur J Dermatol*, 2001, 11(3): 249-250.
- [3] Niichiro A. Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis simplex* complex[J]. *Parasitol Res*, 2008, 102(5): 1073-1075.
- [4] Rosa RP, Maria LC, Miguel GM, *et al.* Cloning and expression of a biologically active *Anisakis simplex* allergen Ani s 1 in the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 154(1): 115-118.
- [5] Pérez PJ, Fernández CE, Marañón F, *et al.* Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 123(2): 120-129.
- [6] Asturias JA, Eraso E, Martínez A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 108(2): 263-267.
- [7] Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, *et al.* Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*[J]. *Parasitol Res*, 2007, 100(6): 1233-1241.
- [8] Yukihiko K, Kuniyoshi S, Shoichiro I. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2007, 155(2): 138-145.
- [9] Rosa RP, Ignacio MA, Rodriguez M, *et al.* Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2008, 159(2): 92-97.
- [10] Duan WY, Qiu ZW, Zhang XL. Study on cysteine proteinase in medical parasitology[J]. *Chin J Schisto Control*, 2004, 16(3): 231-235. (in Chinese)
(段文元, 邱宗文, 张锡林. 半胱氨酸蛋白酶在医学寄生虫学领域的研究进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2004, 16(3): 231-235.)
- [11] Guiliano DB, Hong X, James H, *et al.* A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2004, 136(2): 227-242.
- [12] Aldape K, Huizinga H, Bouvier J, *et al.* *Naegleria fowleri*: characterization of a secreted histolytic cysteine protease[J]. *Exp Parasitol*, 1994, 78(2): 230-241.
- [13] Dalton JP, Neill SO, Stack C, *et al.* *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines[J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(11): 1173-1181.

(收稿日期: 2009-09-07 编辑: 衣凤芸)

(上接第 102 页)

- [22] Cao LJ, Feng XM, Lu S Q, *et al.* Construction and identification of GCV-hammerhead ribozyme vector of PPDK [J]. *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2008, 15(1): 1-7. (in Chinese)
(曹利静, 冯宪敏, 卢思奇等. 蓝氏贾第鞭毛虫 PPDK 特异性锤头状核酶-GCV 重组载体的构建及鉴定[J]. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2008, 15(1): 1-7.)
- [23] Yee J, Nash TE. Transient transfection and expression of firefly luciferase in *Giardia lamblia*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(12): 5615-5619.

- [24] Wang AL, Miller RL, Wang CC. Antibodies to the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus major protein can block the viral infection[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1988, 30(3): 225-232.
- [25] Chalfie M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805.
- [26] Ullu E, Lujan HD, Tschudi C. Small sense and antisense RNAs derived from a telomeric retroposon family in *Giardia intestinalis* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4(6): 1155-1157.

(收稿日期: 2009-10-12 编辑: 高石)