

# 旋毛虫 p49 抗原基因原核表达产物的纯化\*

刘光明<sup>1</sup> 宋思扬<sup>1</sup> 乔玉欢<sup>1</sup> 蔡海松<sup>2</sup> 张伟光<sup>2</sup> 苏文金<sup>1</sup>

**摘要** 目的 建立旋毛虫 p49 抗原基因原核表达产物的纯化方法。方法 菌体经冻融、超声破菌及提取包涵体后,用离子交换和凝胶过滤层析纯化蛋白质。结果 纯化后的融合蛋白 p49/GST 经 SDS-PAGE 电泳鉴定达电泳纯。双抗体夹心 ELISA 法检测结果表明纯化的 p49/GST 融合蛋白能与旋毛虫感染的鼠血清和纯化融合蛋白免疫的兔血清反应,而不与正常鼠和兔血清反应。结论 纯化后的融合蛋白 p49/GST 具有较高的纯度及较强的免疫活性,可望作为旋毛虫病的免疫诊断抗原。

**关键词** 旋毛形线虫 p49 抗原 融合蛋白 纯化

## PURIFICATION OF P49 ANTIGEN GENE PRODUCT OF *TRICHINELLA SPIRALLS* EXPRESSED IN *ESCHERICHIA COLI*

Liu Guangming Song Siyang Qiao Yuhuan Cai Haisong Zhang Weiguang Su Wenjin

(The Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen, 361005)

**ABSTRACT** Aim To establish a purification procedure for p49 antigen gene product of *Trichinella spiralis* expressed in *Escherichia coli*. Methods After centrifugation of the bacterial culture, the bacterial pellet was resuspended and lysed by freezing-thawing treatment and ultrasonication. Ion exchanged and gel filtration chromatography were used to purify the fusion protein p49/GST from the inclusion bodies. Results The purity of the fusion protein p49/GST was verified using SDS-PAGE. The purified p49/GST protein could react with mouse antisera against *Trichinella spiralis* and rabbit antisera against purified p49/GST protein, but not with normal mouse and rabbit sera by sandwich ELISA. Conclusion The purified fusion protein p49/GST with high purity and good immune activity could be used for the immune assay of trichinellosis.

**KEY WORDS** *Trichinella spiralis* p49 antigen Fusion protein Purification

旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*, 简称旋毛虫) 可感染人及 150 多种动物, 引起严重的人兽共患寄生虫病<sup>[1]</sup>。然而, 旋毛虫病的临床表现较为复杂, 诊断较困难, 易与其它传染病相混淆。免疫学诊断技术有助于旋毛虫病的诊断<sup>[2]</sup>。旋毛虫肌幼虫排泄一分泌抗原 (excretory-secretory antigens, ES 抗原) 中的 p49 抗原是旋毛虫的主要功能性抗原, 已被证明可能对疫苗研制和免疫诊断有重要价值<sup>[3-5]</sup>。由于天然抗原的制备程序繁琐、得率低, 我们利用基因工程技术已在体外成功地表达猪旋毛虫 p49/GST 融合蛋白<sup>[6]</sup>。本文报道 p49/GST 融合蛋白的纯化结果。

### 1 材料和方法

1.1 菌株与发酵液的制备 含编码猪旋毛虫 p49 基因的大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ /pGEX-p49 为厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室构建。过夜培养物接种后, 37℃ 培养 3h (OD<sub>600</sub>=0.8), 经 0.1mmol/L

IPTG 诱导表达 6h 后, 6000r/min 离心 10min 收集菌体<sup>[6]</sup>。

1.2 包涵体蛋白的纯化 离心收集的菌体用 PBS (pH7.2) 洗涤, 再用菌体裂解液 (50mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L EDTA, 0.85% NaCl) 悬浮菌体, 反复冻融 3 次, 超声破碎菌体, 4℃ 9829g 离心 15min, 取沉淀。然后依次用洗液 A (20% 蔗糖, 50mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L EDTA, 0.85% NaCl, 1.0% Triton X-100)、洗液 B (10% 蔗糖, 20mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L EDTA)、洗液 C (洗液 B+4mol/L 尿素) 洗涤, 同上离心, 所得沉淀物即为粗提纯化的 p49/GST 包涵体蛋白, 用 8mol/L 尿素、

\* 福建省重点 (农医) 项目资助 (项目编号: 95-Z-150)。

作者单位: 1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 (厦门, 361005)

2. 福建省农业科学院

20mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA (pH8.5) 悬浮溶解。

1.3 离子交换层析及分子筛层析 用 8mol/L 尿素、20mmol/L Tris-Cl (pH8.5) 平衡 Protein-Pak™ DEAE-8HR AP-1 层析柱 (Millipore), 在 Waters 650E 高级蛋白质纯化系统 (Millipore) 上对包涵体溶解液进行纯化, 按 Millennium™2010 软件系统进行操作。用 NaCl 连续浓度梯度 (0~1mol/L) 洗脱蛋白质, 样品上样及洗脱流速均为 1.0ml/min, 时间为 80min, 检测波长 280nm, 分部收集各组峰, 真空冷冻干燥法浓缩。

同上平衡液平衡 Sephacryl-300 层析柱 (Millipore) 后, 对离子交换层析纯化后的 p49/GST 收集液进一步纯化。样品上样及洗脱流速均为 1.0ml/min, 时间为 40min, 检测波长 280nm, 收集目的峰形溶液, 同上浓缩。

1.4 p49 抗原的复性及其活性分析 将纯化的融合蛋白 p49/GST 适当稀释, 使蛋白浓度低于 100μg/ml, 尿素浓度保持在 1mol/L。加入 0.1mmol/L 氧化型谷胱甘肽 (G-S-S-G), 1mmol/L 还原型谷胱甘肽 (GSH), 10℃复性 12h。将上述溶液装入透析袋中, 于 4℃对 TE 溶液透析 48h, 其间换液 3~4 次, 至尿素完全析出。取出透析袋中的蛋白质悬液, 离心去沉淀, 上清于 4℃用聚乙二醇 (PEG) 6000 浓缩 20 倍, -20℃贮存备用。

采用双抗体夹心 ELISA 法, 分析 P49 抗原活性简述如下: 包被旋毛虫感染的鼠血清 (1:400), 4℃过夜, 2%BSA-PBS 封闭。加适当稀释的融合蛋白, 37℃温育 1.5h 后弃去。加 1:3200 稀释的兔抗 p49/GST IgG, 37℃温育 1.5h 后洗涤, 然后加 1:500 稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 37℃温育 1.5h, 洗涤后加 TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色底物显色, 测 OD<sub>450</sub> 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 p49/GST 的纯化结果

2.1.1 菌体裂解和包涵体蛋白的提取 包涵体纯化过程中各组分的电泳结果表明, 各洗涤步骤的上清弃去部分基本不含 p49/GST (61kD), 说明经过系列离心、洗涤后, 去除了大部分的杂蛋白, 而融合蛋白 p49/GST 基本没有损失 (图 1)。

2.1.2 离子交换层析 SDS-PAGE 电泳分析各组峰 (图 2) 的纯度并用 ELISA 法检测抗原活性

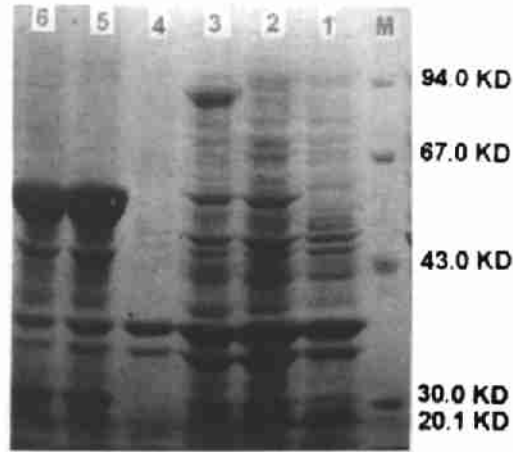


图 1 p49/GST 包涵体的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of inclusion body of p49/GST

1. supernatant of sonification;
2. supernatant of eluant A;
3. supernatant of eluant B;
4. supernatant of eluant C;
5. sediment dissolving in 8mol/L urea;
6. sediment dissolving in 9mol/L urea;
- M. MW marker

(表 1), 发现有活性的目的蛋白主要集中于第二峰, 凝胶上显示一条主带 (即目的蛋白, 61kD), 另有 2~3 条染色很浅的杂蛋白带 (图 4)。

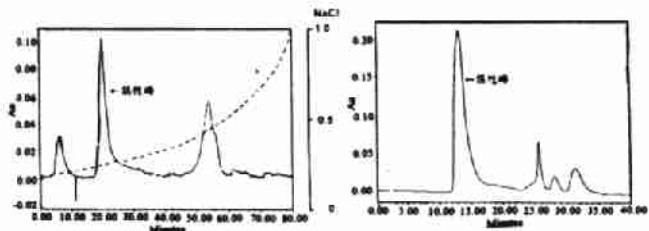


图 2 离子交换层析纯化 p49/GST

Fig. 2 Purification of p49/GST by DEAE-8HR ion exchange chromatography.

图 3 分子筛层析纯化 p49/GST

Fig. 3 Purification of p49/GST by Sephacryl S-300 gel filtration chromatography.

2.1.3 分子筛纯化 各组峰 (图 3) 经纯度鉴定和活性检测。结果表明, 经分子筛纯化后的 p49/GST 已达到电泳纯 (图 4), 并保留较强的抗原活性, 经二步层析后, 蛋白质得率约为 43.4% (表 1)。

表 1 双抗体夹心 ELISA 检测 p49/GST 融合蛋白的抗原活性  
Table 1 Assay of antigenic activity of p49/GST with sandwich ELISA

组分 (16μg/ml)	样品 OD <sub>450</sub>	对照 OD <sub>450</sub>	纯化得率 %
包涵体蛋白	0.655	0.218	100
离交纯化蛋白	0.795	0.242	52.7
分子筛纯化蛋白	0.871	0.206	43.4
复性蛋白	1.062	0.230	—
天然 ES 抗原	1.135	0.303	—

注: 以来诱导的工程菌裂解液为各组分的阴性对照进行检测。

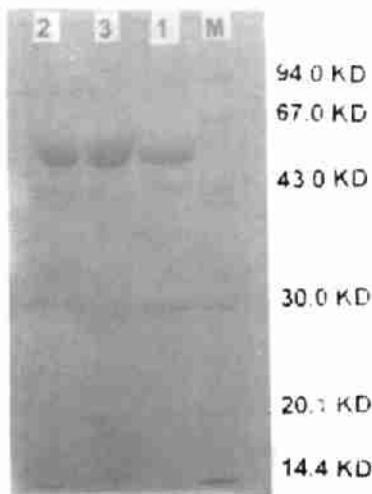


图4 融合蛋白 p49/GST 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of p49/GST

1. inclusion bodies;  
2. purified protein from ion exchange;  
3. purified protein from S-300 gel filtration;  
M. MW marker

2.2 p49/GST 纯化蛋白的活性分析 表达后的融合蛋白经 Western-blot 分析, 已证实具有抗原活性<sup>(6)</sup>。为了解纯化后融合蛋白的抗原性是否受到影响, 我们对纯化蛋白进行了抗原活性分析。

2.2.1 纯化蛋白的 ELISA 分析 采用双抗体夹心 ELISA 法对纯化包涵体、离子交换活性组分及分子筛活性组分进行分析。结果表明, 纯化蛋白的抗原活性随着抗原纯度的增加而提高(表 1)。说明纯化的 p49/GST 具有较好的抗原活性和抗原特异性。

2.2.2 纯化蛋白的复性对抗原性的影响 由于包涵体蛋白是一种变性蛋白, 这可能影响该蛋白质的抗原性。为此, 我们分析了蛋白质复性对抗原性的影响。ELISA 检测结果显示, 复性后纯化蛋白的抗原性有一定的增加, 但增加的幅度不大(表 1)。

### 3 讨论

在融合蛋白 p49/GST 纯化过程中, 首先遇到的问题是包涵体的处理。包涵体在菌体内独立存在于胞浆中, 其主要成分有表达的目的产物、质粒、核糖体以及粘附于包涵体表面的杂蛋白<sup>(7)</sup>。包涵体的提取纯化主要采用离心和反复洗涤方法, 我们选用的洗涤缓冲液中含有 Triton X-100、EDTA 及盐离子等成份。经系列离心、洗涤后, 去除了大部分的杂蛋白质, 而融合蛋白 p49/GST 基本没有损失(图 1)。

溶解后包涵体的柱层析纯化一般有亲和层析、

离子交换、分子筛及亲、疏水性纯化等, 其中以亲和层析及离子交换分离效果较佳。我们利用高级蛋白质纯化系统建立了融合蛋白 p49/GST 的两步纯化方法, 即首先根据其电荷性质进行分离, 得到抗原活性组分。再根据分子量大小进一步纯化。在纯化过程中, 我们一直在高浓度尿素条件下对融合蛋白 p49/GST 进行柱层析, 减少了操作工序, 而且避免了蛋白质在纯化过程中被酶降解或沉积于柱中, 其蛋白质得率约为 43.4% (表 1)。

融合蛋白纯化产物的复性往往也是获得有效产物的关键之一。p49 抗原分子中有 5 个半胱氨酸残基, 可以形成链内或链间二硫键, 这是生物功能所必需的。由于在纯化过程中必须使用变性剂, 使融合蛋白 p49/GST 变性, 同时, 包涵体蛋白中二硫键的形成经常是不正确<sup>(8)</sup>。所以, 纯化后的融合蛋白的二硫键位置和立体构象都受到破坏。复性过程中二硫键的正确配对以及蛋白质折叠成正确空间构象就显得十分重要。我们采用谷胱甘肽氧化还原系统在较高 pH 条件下复性。在这样的条件下, 可以加快巯基和二硫键之间的相互转换, 促进二硫键逐步趋于正确配对。从双抗体夹心 ELISA 检测结果看, 复性后的融合蛋白显然比变性蛋白的活性要高, 但增加的幅度并不明显 (OD<sub>450</sub> 增幅约 20%, 表 1), 这是否提示该蛋白质主要以非构象型抗原决定簇存在, 或受到复性方法和技术的影 响, 有待进一步研究。

### 4 参考文献

1. 赵慰先主编. 人体寄生虫学. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1994, 687~703.
2. 朱兴全, 等. 旋毛虫病. 郑州: 河南科学技术出版社, 1993, 169~192.
3. Su XZ, et al. Dot-ELISA mimicry western blot test for the detection of swine trichinellosis. J Parasitol, 1990, 77: 76.
4. Gamble HR, et al. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. Am J Vet Res. 1984, 45: 67.
5. Su XZ, et al. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. Mol Biochem Parasitol, 1990, 45: 331.
6. 张伟光, 等. 旋毛虫 p49 抗原基因克隆体外表达条件的研究. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14 (2): 7.
7. 张龙翔, 等. 生化实验方法和技术, 北京: 人民教育出版社, 1981, 165~166.
8. 隋广超, 胡美浩. 大肠杆菌中包含体的形成及其活性表达. 生物技术, 1993, 3: 6.

1997 年 12 月 5 日收稿 1998 年 6 月 22 日修回