

亚洲牛带绦虫肌动相关蛋白基因克隆及表达*

王杰, 戴佳琳, 黄江, 吴璇, 廖兴江, 杜武英, 郎书源

摘要: 目的 对亚洲牛带绦虫 (*Taenia saginata asiatica*) 成虫肌动相关蛋白 2/3 复合体亚单位 4 (Actin related protein 2/3 complex subunit 4) 基因进行克隆、表达和免疫学研究。方法 以亚洲牛带绦虫 cDNA 文库中肌动相关蛋白 2/3 复合体亚单位 4 的已知序列设计合成一对特殊引物, 进行 PCR 技术扩增目的基因, 克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 中, 在 CaCl₂ 制备的感受态大肠埃希菌 BL21/DE3 中经过异丙硫代-β-D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导目的基因表达, 表达产物经过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行鉴定。由于蛋白在包涵体表达, 故通过 N-十二烷基肌氨酸钠 (SKL) 法纯化获得纯化重组蛋白并用蛋白印迹 (Western blotting) 进行免疫学分析。结果 PCR、双酶切及 DNA 测序结果均表明, pET-28a(+)-A_{mp}2/3 重组质粒构建成功。SDS-PAGE 结果表明, 基因在大肠埃希菌 BL21/DE3 包涵体中表达, 经过包涵体沉淀的溶解、重折叠和离子交换层析方法获得高纯度蛋白。重组蛋白能识别亚洲牛带绦虫患者及牛带绦虫患者血清, 表明该蛋白具有免疫反应性。结论 成功克隆亚洲牛带绦虫肌动相关蛋白 2/3 复合体亚单位 4 基因, 表达和纯化得到了该基因的重组蛋白并且证明该基因具有免疫反应性, 为进一步研究该基因的功能提供条件。

关键词: 亚洲牛带绦虫; A_{mp}2/3 亚单位 4 基因; 基因克隆; 免疫反应性

Cloning and prokaryotic expression of actin related protein 2/3 complex subunit 4 of *Taenia saginata asiatica* WANG Jie, DAI Jia-lin, HUANG Jiang, et al. Department of Forensic Medicine, Guiyang Medical College (Guiyang 550004 China)

Abstract Objective To clone, express and conduct a preliminary immunoreactivity study on genes of *Taenia saginata asiatica* s actin related protein 2/3 complex subunit 4 (A_{mp}2/3). **Methods** Based on the A_{mp}2/3 sequence template in the library of cDNA of *Taenia asiatica*, a pair of special primers as synthesized to amplify the gene through PCR technology. The genes were cloned into prokaryotic expression vector Pet28a(+) inducing the target genes to conduct expression through IPTG in competent *Escherichia coli* BL21/DE3 processed by CaCl₂. The products of the expression was identified with SDS-PAGE. As the expression took place in an inclusion body, SKL was used to achieve purified recombinant protein and the immunoreactivity study was conducted with Western blotting. **Results** PCR, double enzyme digestion and DNA sequencing indicated that pET-28a(+) and A_{mp}2/3 recombinant plasmid was successfully constructed. SDS-PAGE results showed that the gene expression took place in *Escherichia coli* BL21/DE3 and highly pure protein was achieved after the dissolving, refolding and particle exchange chromatography of inclusion body deposits. The recombinant protein reacted with *Taenia asiatica* and *taeniarhynchus saginatus* infected patients' serum, which indicated the immunoreactivity of the protein. **Conclusion** The A_{mp}2/3 subunit 4 gene is successfully cloned. The recombinant protein is obtained through expression and purification, and the gene s immunoreactivity is confirmed, which provides the foundation for further studies of the gene.

Key words *Taenia saginata asiatica*; A_{mp}2/3 subunit 4 gene cloning; immunoreactivity

亚洲牛带绦虫广泛分布于东南亚, 包括我国西南地区、台湾、韩国、泰国、印尼和菲律宾等地, 其成虫寄生于人体肠道, 引起亚洲牛带绦虫病 (*Taeniasis bovis*)^[1]。近几年, 本课题组从流行病学、动物及人体感染实验以及分子遗传学方面进行了深入研究^[2]。本研究利用生物信息学对本室构建的亚洲牛带绦虫成虫 cDNA 文库^[3]进行分析, 筛选出肌动相关蛋白 2/3 复合体亚单位 4 (Actin related protein 2/3 complex subunit 4 A_{mp}2/3), 该蛋白作为一种介导分枝状微丝网络形成的关键蛋白, 其结构、介导肌动蛋白核化的机制以及在诸多生理活动中的作用已经基本阐明^[4]。通过克隆获得目的基因, 构建原核表达载体, 获得纯化蛋白, 并通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白印迹 (Western blot) 鉴定表达蛋白, 为探讨 A_{mp}2/3 亚单位 4 的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清 亚洲牛带绦虫患者血清采自流行区贵州省都匀市米秀乡, 牛带绦虫患者血清采自湛江, 患者均为驱出成虫经鉴定后采集血清; 健康人血清由中山大学热带病重点实验室提供。

1.1.2 文库、菌株和质粒 虫体标本采自亚洲牛带绦虫流行区贵州省都匀市米秀乡, 亚洲牛带绦虫成虫全长 cDNA 质粒文库的构建、EST 测序及 Unigene 分析与上海联合基因有限公司合作完成。大肠埃希菌 BL-21/DE3 及原核表达质粒 pET-28a(+) 为中山大学热带病重点实验室保存。

1.1.3 主要试剂和工具酶 胰蛋白酶、酵母提取物 (英国 OXOID 公司); 限制性内切酶: EcoRI、XhoI; Taq 酶、dNTP、ExTaq 酶、T4 DNA 连接酶、DNA 2000 Marker (Takara 公司); 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (美国 Promega 公司); Ni-IDA Agarose (cat No. 69670) (美国 Novagen 公司); SDS (美国 Sigma 公司); 蛋白分子量标准 (立陶宛 MBI 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); 质粒提取试剂盒 (广东东盛生物科技有限公司); DNA 凝胶回收试剂盒 (波尔公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗猪 IgG 二抗, 兔抗人 IgG 二抗, 3、3 二

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30760227); 贵州省科技攻关项目 (2008-3060)

作者单位: 贵阳医学院法医学、多媒体形态学实验室及寄生虫学教研室, 贵州 贵阳 550004

作者简介: 王杰 (1963-), 男, 贵州人, 副教授, 硕士, 研究方向: 法医分子生物学。

通讯作者: 黄江

氨基联苯胺 (DAB) 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 丙烯酰胺、尿素 (MBCHEM 公司); 氯化钙、氯化钠等 (国产分析纯试剂)。

1.1.4 主要仪器设备 PCR 扩增仪 (美国 BD - RAD 公司); UVP - GDS8000 凝胶成像分析仪 (英国 DNR 公司); 蛋白电泳及转移电泳装置 (美国 BD - RAD 公司); SM - F123Sanyo 制冰机 (日本 AMO 公司); DYY - III - 813 稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂); 超净工作台 (中国苏州化学仪器厂); 超低温冰箱 (英国 Foma Scientific 公司); CPX 400 超声破碎仪 (美国 Cole Parmer Instruments 公司); DYY - III DNA 电泳槽 (北京六一仪器厂); DYYZ - 24D 型电泳槽 (北京六一仪器厂); DYCZ - 40D 型电转移装置 (北京六一仪器厂); 水平摇床 (英国 Foma Scientific 公司); TGL - 16H 高速台式离心机 (美国 Hema Co Ltd 公司); BP61 型电子天平 (德国 CE 公司); 微量移液器 (瑞典 Eppdorf 公司)。

1.1.5 引物的合成和 DNA 的测序 基因扩增引物由 Invitrogen 上海生物技术有限公司合成, 重组质粒 DNA 的测序由北京华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 EF-1 基因的识别 亚洲牛带绦虫成虫 cDNA 质粒文库由本课题组构建^[3]。将获得的亚洲带绦虫 unigene 进行 Blastx 分析, 获得编码 Arp2/3 的文库质粒编号为 Tachc17-b8 GeneBank 登录号为: ABN14943。

1.2.2 Arp2/3 基因的扩增 根据已获得的 Arp2/3 全长编码序列的开放阅读框, 利用 DNAClab 和 PCRdesign 软件设计引物: 上游引物 P1 为: 5'-CCGGAATTCATGACAGCCAAACCA TACC-3', 引入保护性碱基 CCG 和 EcoRI 酶切位点 GAATTC; 下游引物 P2 为: 5'-CCCCTGAGCTAATCGAAGGCTTCAG-3', 引入保护性碱基 CCC 和 XhoI 酶切位点 CTCGAG。引物由上海英骏生物技术公司合成。以亚洲牛带绦虫成虫 cDNA 文库中编号为 Tachc17-b8 的质粒为模板, 应用上述设计的特异引物, TaKaRa Ex TaqTM 酶进行聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增目的基因。反应总体积 50 μl 且 PCR 反应循环参数为: 预变性, 94 °C, 5 min 变性, 94 °C, 1 min 退火, 57 °C, 1 min 延伸, 72 °C, 1 min, 30 个循环后 72 °C 总延伸 10 min。PCR 产物 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定回收。

1.2.3 重组原核表达质粒的构建及鉴定 将 PCR 产物和原核表达质粒 pET-28a(+) 用 EcoRI 和 XhoI 进行双酶切后回收, T4 DNA 连接酶连接后 4 °C 过夜, 转化到大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中, 挑取阳性单克隆, 进行双酶切、PCR 和 DNA 测序鉴定, 由北京华大基因科技股份有限公司完成。

1.2.4 重组质粒的诱导表达 将确定能表达重组蛋白的单菌落接入含有 5 μl 卡拉霉素的 LB 液体培养基中 (菌液/培养基 = 1:100), 37 °C 摇至 A₆₀₀ 约为 0.4~0.6 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C, 280 r/min 诱导表达 5 h 后离心收集菌体, 离心后取上清 5 μl 进行 SDS-PAGE 电泳分析。同时设 pET-28a(+) 质粒的诱导前后及重组质粒的诱导前作对照。

1.2.5 重组质粒的大量诱导和纯化 依据上述诱导表达方法对阳性克隆进行大量的诱导表达。跑胶鉴定发现蛋白主要表达于包涵体, 所以采用包涵体沉淀的溶解、重折叠和透析方法获得纯化蛋白^[5]。

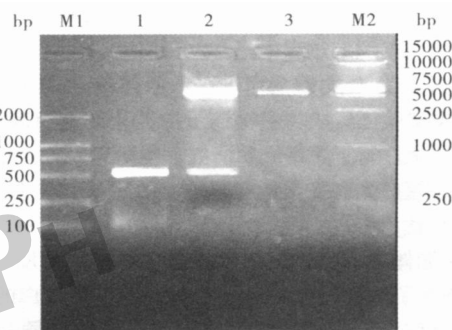
1.2.6 蛋白印迹 (Western blotting) 检测重组蛋白 将纯化的蛋白进行 SDS-PAGE (10g/L) 电泳, 使用电转移仪 (100 V 电

压) 冰浴转印 1 h 将凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜上, 一抗为亚洲牛带绦虫患者血清和牛带绦虫患者血清 (1:100 稀释), 室温孵育 1 h 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 5 次, 5 min/次, 分别加辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG (1:2000 稀释) 做二抗, 最后用 DAB 显色出现目的条带, 超纯水终止反应^[6]。

2 结果

2.1 生物信息学分析 通过生物信息学分析该基因与日本血吸虫同源基因 (登录号为 AAM64045.1) 的氨基酸序列一致性为 94%, 全长 504 bp 编码区为 30~530 bp 编码 168 个氨基酸; Taarp2/3 的理论分子量和等电点分别为 19533.9 Da 和 8.44^[7]。重组质粒的分子量和等电点分别是 23354.1 Da 和 8.79。InterPro Scan 扫描一级结构中发现该氨基酸序列中含有 2 个 ARPC4 的功能域。

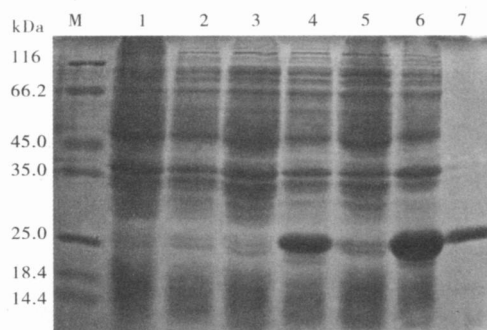
2.2 原核重组质粒的鉴定 (图 1) 将重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定, 产物行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。结果显示, 在 500 bp 左右有一清晰条带, 与目的基因大小基本相符。此外, 重组质粒的测序报告表明, 插入序列与理论序列一致, 证明重组质粒构建成功。



注: M1 DNA 标准 (DL2000); 1 Arp2/3 的 PCR 产物; 2 pET-28a(+) - Tachc17-b8 的双酶切; 3 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒; M2 DNA 标准 (DL15000)。

图 1 重组质粒的 PCR 和双酶切鉴定

2.3 蛋白表达纯化结果 (图 2) 将构建好的重组质粒转化到 E. coli BL/DE3 中表达, 超声裂解后 SDS-PAGE 电泳分析结果如第 6 泳道所示, 在大约 25 kD 处出现高效表达条带, 与目的蛋白基本相符。通过破包涵体, 将蛋白进行纯化, 结果



注: M: 蛋白标准; 1 pET-28a(+) 质粒未加 IPTG 诱导; 2 pET-28a(+) 质粒加 IPTG 诱导; 3 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒未加 IPTG 诱导; 4 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒加 IPTG 诱导; 5 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒上清; 6 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒沉淀; 7 pET-28a(+) - Tachc17-b8 重组质粒纯化蛋白。

图 2 重组质粒 pET-28a(+) - Tachc17-b8 的 10% SDS-PAGE 电泳分析

如图中第 7 泳道所示, 其位置与目的蛋白相符, 证明目的蛋白

纯化成功。测得纯化产物的蛋白浓度为 0.675 mg/ml

2.4 纯化蛋白免疫反应性鉴定 用感染亚洲牛带绦虫的患者血清以及感染牛带绦虫的患者血清对纯化蛋白的蛋白印迹实验均显示出较清晰的条带而阴性对照血清在相应位置未识别出该蛋白条带。

3 讨论

肌动蛋白相关蛋白 (actin-related protein ARP) 是一类与肌动蛋白有着共同起源、经历了不同进化历程的蛋白分子。它是肌动蛋白超家族的一员, 普遍存在于各种真核生物细胞中, 并且是细胞骨架的重要组成部分之一, 广泛参与细胞形状的维持、细胞运动、胞质分裂和细胞器移动等功能。研究证明, ARPC2 p34 ARPC4 p20 是复合体的结构中心, 均是由多个 α 螺旋和 β 片层所组成, 称为 α/β 结构, 并且这 2 个亚单位在该复合体的中心以二聚体形式形成一个“C”形的钳状结构, 并环绕 Arp2, Arp3 亚单位, 从而使 Arp2/3 复合物相当稳定^[8]。本实验已通过生物信息学中的 InterPro Scan 扫描一级结构, 发现该氨基酸序列中含有 2 个 ARPC4 的功能域, 分析推测 ARPC4 是该复合体亚单位 4 的可能性较大。

Arp2/3 复合体首次是在棘阿米巴中被发现, 它在多种肌动蛋白细胞骨架形成过程中都有重要作用。在对李斯特菌运动的研究中, 首先发现 Arp2/3 复合体与细胞的运动有关^[9,10]。本实验已经成功获得该蛋白纯化的重组表达产物, 并在此基础上进行了更深入的研究。本研究一方面成功构建了肌动相关蛋白 2/3 复合体亚单位 4 的原核表达载体, 并获得了高效表达; 另一方面, 由于表达产物以包涵体的形式存在, 在破包涵体时, 利用 N-十二烷基肌氨酸钠 (SKL) 变性重组蛋白, 得到了浓度较高的纯化蛋白, 为包涵体蛋白的纯化开辟另一条比尿素变性纯化更为简单而有效的途径。Western

blotting 结果表明, 该复合体具有较强的线性表位, 所获得的重组蛋白具有较强的免疫反应性, 获得了具有免疫活性的重组蛋白。因此, 为进一步研究 Arp2/3 复合体的生物学功能及其是否可作为一个诊断性抗原或者是作为疫苗的候选分子的相关研究提供了基础依据。

参考文献

- [1] Eom KS. What is a Sian Tean in [J]. Parasitology International, 2006, 55: 137-141.
- [2] 黄江, 胡旭初, 徐劲, 等. 亚洲牛带绦虫 26kDa GST 基因表达及免疫学分析 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(8): 970-972.
- [3] 黄江, 胡旭初, 包怀恩, 等. 亚洲牛带绦虫全长 cDNA 质粒文库的构建及 EST 测序 [J]. 热带医学杂志, 2007(2): 116-118.
- [4] 彭毅, 龚小卫, 姜勇. 肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合体的结构与调节 [J]. 生理科学进展, 2004(4): 306-310.
- [5] D. R. 马歇尔, J. T. 永, R. R. 布格斯, 等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 北京: 北京科技出版社, 1999: 148-151.
- [6] Harlow E, Lane D. 抗体技术实验室指南 [M]. 北京: 北京科技出版社, 2002: 161-170.
- [7] 唐保东, 黄江, 胡旭初, 等. 亚洲牛带绦虫肌动相关蛋白 2/3 复合体结构与功能的生物信息学分析 [J]. 热带医学杂志, 2007(7): 1057-1059.
- [8] Robinson RC, Turbedsky K, Kaiser DA, et al. Crystal structure of Arp2/3 complex [J]. Science, 2001, 23(11): 1679-1684.
- [9] Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex activation by a diverse array of proteins [J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 649-676.
- [10] Zallen JA, Cohen Y, Hudson AM, et al. SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in Drosophila [J]. J Cell Biol, 2002, 156: 689-701.

收稿日期: 2008-08-30

(蔡天德编校)

文章编号: 1001-0580(2009)04-0408-02 中图分类号: R 193.2 文献标志码: A

【公共卫生论坛】

疾病控制机构卫生应急培训内容与方式探讨

王喆¹, 梁万年¹, 邱泽青²

关键词: 疾病预防控制机构; 卫生应急; 培训需求

严重急性呼吸系统综合征 (SARS) 发生后, 中国为了应对日益严峻的突发公共卫生事件, 专门组建了各类应急专业队伍。疾病预防控制机构卫生应急专业队伍的培训是建设高素质卫生应急专业队伍的重要途径和提高应对突发公共卫生事件能力的迫切要求。目前, 国内各地开展的培训整体情况缺乏科学性、系统性。在《全国卫生应急培训大纲》的研讨和制定中, 为了提高培训的针对性和有效性, 本研究对疾病预防控制机构卫生应急专业队伍的培训内容与方式进行探讨。

1 研究方法

本研究采用个人深入访谈和专题小组讨论法, 对全国各

级卫生行政部门卫生应急培训专家和各级疾病预防控制机构专家共 20 人进行访谈。邀请各方面专家针对疾病预防控制机构卫生应急专业队伍培训的内容需求、培训方式和教学方法等问题进行讨论。访谈前征得专家同意, 对访谈过程进行记录并辅以录音, 访谈完毕后研究人员整理转录录音和笔记, 对转录的分析和解释采用内容分析法和主题框架法^[1]。按照我国知识体系编排, 通过归纳总结, 将疾病预防控制机构应急队伍需要培训内容为 3 部分: 一是相关概念和理论; 二是卫生应急工作中的常用方法和技能; 三是各类突发事件卫生应急处理的专题学习。

2 卫生应急培训内容

2.1 卫生应急的相关概念与理论 该部分内容是使疾病预防控制机构卫生应急专业队伍明确应急工作流程, 熟悉卫生应急管理的参与主体及职责, 了解自己和团队在应急工作中

作者单位: 1. 首都医科大学卫生管理与教育学院, 北京 100069;

2. 中华预防医学会

作者简介: 王喆 (1984-), 女, 吉林九台人, 硕士在读, 研究方向: 卫生事业管理。