

猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因的原核表达

宋军科^{1,2}, 才学鹏², 窦永喜², 骆学农², 林 青¹, 于三科¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 甘肃 兰州 730046)

[摘 要] **【目的】**探讨原核表达猪囊尾蚴 *TsCL-1* 蛋白的生物学特性, 为研究半胱氨酸蛋白酶(Cysteine proteinase, CP)在猪囊尾蚴与宿主相互关系中的作用奠定基础。**【方法】**将含有猪囊尾蚴半胱氨酸蛋白酶 *TsCL-1* 基因的 pGEX-4T-*TsCL-1* 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 进行表达, 诱导后的重组菌裂解上清通过谷胱甘肽(GST)-琼脂糖亲和层析法进行纯化, 纯化产物利用明胶蛋白电泳法进行活性检测。**【结果】**经 SDS-PAGE 分析显示, 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达的重组蛋白相对分子质量约为 61 ku, 表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 57.4%。表达产物应用 GST 琼脂糖凝胶纯化后, 纯化蛋白的纯度可达 90% 以上。明胶蛋白电泳结果显示, 纯化蛋白对明胶具有水解活性, 并且其水解活性能被半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64 抑制。**【结论】**从重组菌中成功表达了目的蛋白, 该蛋白具有明显的水解活性, 且 E-64 对其水解活性有抑制作用。

[关键词] 猪囊尾蚴; 半胱氨酸蛋白酶; *TsCL-1* 基因; 原核表达; 纯化; 水解活性

[中图分类号] S852.73⁺4; Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)10-0015-04

Prokaryotic expression of *TsCL-1* gene from *Taenia solium* metacestode

SONG Jun-ke^{1,2}, CAI Xue-peng², DOU Yong-xi², LUO Xue-nong²,
LIN Qing¹, YU San-ke¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 China Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: **【Objective】**In order to lay a basis for researching the role of cysteine protease (CP) in the relationship between *Cysticercus cellulosae* and its host, the study explored the characteristics of the recombinant protein expressed prokaryotically. **【Method】**The recombinant plasmid pGEX-4T-*TsCL-1* was transformed into and prokaryotically expressed in *E. coli* BL21. The expressed products were purified by using GST sepharose FF affinity chromatography. The proteolytic activity of CP was assayed by using zymography. **【Result】**SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of recombinant protein was about 61 ku, which corresponded well to the predicted size from the primary sequence of the gene. The purity of the purified protein was more than 90%. The analysis of hydrolysis activity and inhibition experiments showed that CP possessed a hydrolytic activity, and the hydrolytic activity can be specifically inhibited by E-64. **【Conclusion】**The target protein was successfully expressed, and the protein has obviously hydrolysis activity. The hydrolytic activity of this protein can be inhibited by E-64.

Key words: *Cysticercus cellulose*; cysteine protease; *TsCL-1* gene; prokaryotic expression; purification;

* [收稿日期] 2010-03-27

[基金项目] 国家高科技研究发展计划“863”项目(2006AA10A207)

[作者简介] 宋军科(1979—), 男, 陕西扶风人, 在读硕士, 主要从事动物疫病防治研究。

[通信作者] 于三科(1957—), 男, 陕西扶风人, 教授, 主要从事动物疫病防治研究。

hydrolytic activity

半胱氨酸蛋白酶(Cysteine proteases, CP)是一类活性中心含有半胱氨酸残基的蛋白水解酶,其分子质量约为 21~30 ku,在 pH 4~6.5 时水解活性最高^[1]。CP 在生物进化过程中是非常保守的酶系,不同生物物种之间的半胱氨酸蛋白酶有一定的相似性,同一物种的不同半胱氨酸蛋白酶也有结构相似的现象,这些结构特点相似的酶构成了一个蛋白酶家族,称之为 Caspase(Cysteine aspartic acid specific protease)家族^[1-3]。1879 年,第一个纯化和确认的半胱氨酸蛋白酶取自番木瓜果(*Carica papaya*),因而命名为木瓜蛋白酶(Papain)。之后发现许多与木瓜蛋白酶有相似序列的蛋白酶,统称为木瓜蛋白酶样蛋白酶(Papain like protease)或 CA 蛋白酶族。人们通过多方面的研究发现,CP 广泛分布于从病毒至脊椎动物的生物体中,而这些蛋白酶在寄生虫的发育和生存过程中的重要作用已经被证实^[4]。寄生虫半胱氨酸蛋白酶,大多属于 CA 蛋白酶族内的 C1 族(组织蛋白酶 B(cathepsin B)、组织蛋白酶 L 样蛋白酶(cathepsin L-like))和 C2 族(钙激活蛋白酶样蛋白酶)^[5]。研究认为,由寄生性蠕虫和原虫等寄生虫分泌的蛋白酶不仅是寄生虫入侵组织的因子之一^[6-8],也可能在寄生虫营养^[9-10]、免疫逃避^[11-13]和蜕皮^[14-16]等方面有重要作用。

猪囊尾蚴病(Cysticercosis)是由猪带绦虫的幼虫——猪囊尾蚴(*Cysticercus cellulosae*)感染猪或人而引起的一种人兽共患食源性寄生虫病,该病危害严重、分布广泛,是一种重要的全球性公共卫生害虫^[17]。因此,半胱氨酸蛋白酶生物活性的研究,不仅有助于阐明寄生虫与宿主之间的相互关系,而且为寄生虫病的免疫诊断和治疗开辟了新的思路。

本研究将含有猪囊尾蚴半胱氨酸蛋白酶 *TsCL-1* 基因的重组质粒转入大肠杆菌 BL21,在原核中进行表达,并对表达产物的一些生物学特性进行分析,以期探索寄生虫与宿主相互关系,以及寄生虫病的免疫诊断和治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 重组菌种 pGEX-4T-*TsCL-1* 重组质粒和大肠杆菌 BL21,均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷

(IPTG),配成 100 mg/mL 的溶液备用。明胶粉和 E-64 由 Sigma 公司生产;谷胱甘肽(GST)填料由 GE 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因的诱导表达 将重组质粒 pGEX-4T-*TsCL-1* 导入表达受体菌 BL21 中,挑取单个菌落进行鉴定,取结果为阳性的重组菌 30 μ L,接种于 3 mL 的 2 $\times$ YT 培养液(含 100 μ g/mL Amp)中,37 $^{\circ}$ C、230 r/min 剧烈振荡培养过夜,至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0 时,按照表达优化条件(IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L,28 $^{\circ}$ C 诱导 10 h)进行诱导表达。取诱导表达产物,于 4 000 r/min 离心 5 min,收集菌体沉淀,用 PBS 洗涤 2 次,然后加入适量的 PBS 悬浮菌体,置于 70 $^{\circ}$ C 冻融 3 次,然后超声 2~5 min,以完全裂解菌体。最后,在 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清和沉淀,沉淀用 8 mol/L 尿素裂解后与上清分别进行 SDS-PAGE,鉴定目的基因的表达情况。取样进行 12% SDS-PAGE,以薄层扫描确定表达的目的蛋白占细菌总蛋白的百分比。

1.2.2 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的纯化 按照 1.2.1 的方法,对重组菌进行批量诱导表达,诱导的重组菌经超声波破碎后,于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,收集裂解上清,上清中的目的蛋白用谷胱甘肽(GST)-琼脂糖亲和层析法纯化。纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 分析纯化效果,应用薄层扫描分析纯化蛋白的纯度。

1.2.3 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的水解活性 采用明胶蛋白电泳分析 CP 的水解活性和抑制性,其方法同 SDS-PAGE。下层胶含 1.0% 体积比明胶,上层胶不含明胶。纯化的目的蛋白与染料按体积比 1:1 混合,以加有半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64 的纯化目的蛋白为对照。缓冲液采用 Tris-Gly pH 8.3,电流 20 mA。染料到达底部时停止电泳,取出凝胶条,在洗脱液(2.5% Triton-100,50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,pH 7.6)中振荡洗脱 2 次,每次 40 min,然后用漂洗液(50 mmol/L Tris-HCl,5 mmol/L CaCl₂,pH 7.6)洗涤 2 次,每次 20 min,去除 SDS 以恢复蛋白的活性。

将复性蛋白的凝胶块置于孵育液(100 mmol/L Gly-NaOH,2 mmol/L CaCl₂,pH 9.0)中,在 37 $^{\circ}$ C 孵育 42 h,使酶蛋白发挥对明胶的水解作用。经考

马斯亮蓝染色 3 h 后,再按表 1 依次脱色,用凝胶分析仪观察结果。

表 1 各种脱色液的成分及作用时间

Table 1 Components and action time of each destaining solution

脱色液 Destaining solution	体积分数/% Volume			作用时间/h Action time
	甲醇 Methanol	乙醇 Ethanol	水 Water	
A 液 A solution	30	10	60	0.5
B 液 B solution	20	10	70	1
C 液 C solution	10	5	85	2

2 结果与分析

2.1 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

从图 1 可以看出,猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达菌体沉淀和上清均在 61 ku 处,出现了目的条带,与预期的多肽相对分子质量大小一致。薄层扫描分析结果表明,表达的目的蛋白约占菌体总蛋白的 57.4%。

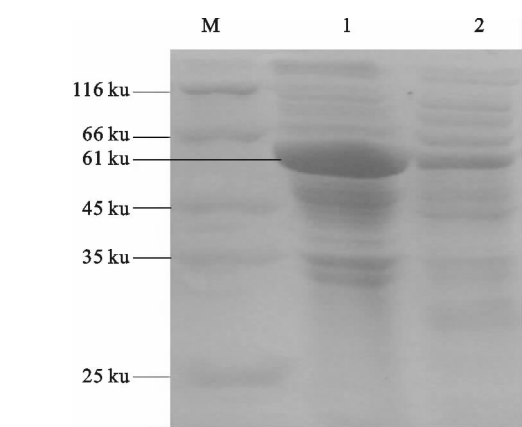


图 1 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白分子质量标准;1. 重组菌沉淀;2. 重组菌上清

Fig. 1 SDS-PAGE analysis expressed products by of *TsCL-1* gene

M. Protein molecular weight Marker;1. Precipitates of recombinant *E. coli*;2. Supernatant of the recombinant *E. coli*

2.2 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的纯化

用 GST 琼脂糖凝胶对猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达的蛋白进行纯化,结果在 61 ku 处出现纯化的目的蛋白条带(图 2)。薄层扫描分析结果表明,纯化的融合蛋白纯度可达 90%以上。

2.3 *TsCL-1* 重组蛋白水解活性和抑制性检测

由图 3 可见,第 2 泳道在 61 ku 处出现了 1 条带,而第 1 泳道则没有出现任何条带,证明第 2 泳道出现的条带系具有水解活性的 *TsCL-1* 重组蛋白水解明胶所致。这主要是由于 EC-64 是半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂^[18-19],其抑制了蛋白酶的水解活性而未能使蛋白酶对明胶产生水解作用,故而在第

1 泳道没有出现条带。

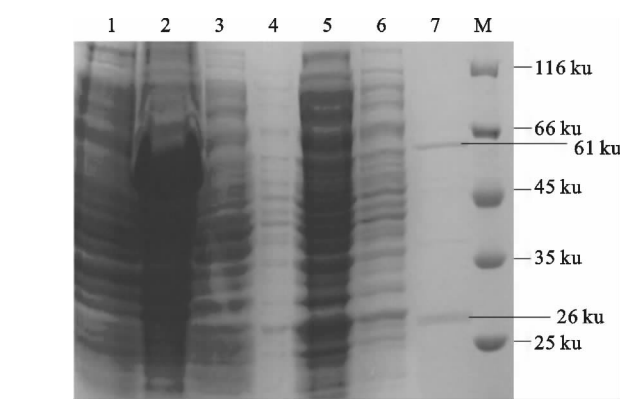


图 2 猪囊尾蚴 *TsCL-1* 基因表达产物的纯化
1. 未加 IPTG 的重组菌诱导表达沉淀;2. 加入 IPTG 的重组菌诱导表达沉淀;3. 未加 IPTG 的重组菌诱导表达上清;4,6. 洗脱的杂蛋白;5. 加入 IPTG 的重组菌诱导表达上清;7. 纯化的目的蛋白;M. 蛋白分子质量标准

Fig. 2 Purification of expression products of *TsCL-1* gene

1. Precipitates of the recombinant *E. coli* without IPTG;
2. Precipitates of the recombinant *E. coli* induced with IPTG;3. Supernatant of the recombinant *E. coli* without IPTG;4,6. Other proteins;5. Supernatants of the recombinant *E. coli* induced with IPTG;
7. Purified protein;M. Protein molecular weight Marker

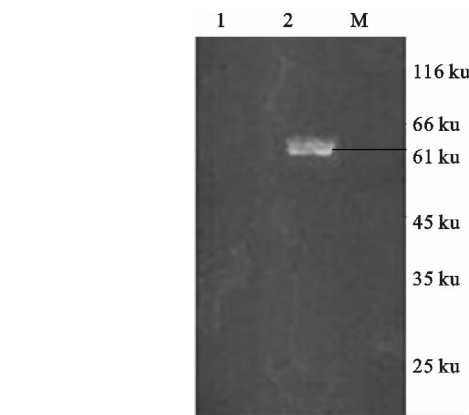


图 3 *TsCL-1* 重组蛋白的电泳结果
1. 纯化蛋白 + E-64;2. 纯化蛋白;M. 蛋白分子质量标准

Fig. 3 Gelatin electrophoresis of recombinant protein

1. Recombinant protein with E-64;2. Purified protein;
M. Protein molecular weight Marker

3 讨 论

1) 半胱氨酸蛋白酶是一类在酶的活性中心含有半胱氨酸残基的蛋白水解酶,广泛分布于从病毒至脊椎动物的生物体中^[5],可催化大分子蛋白质和小分子肽键的分解。该酶在生物体内最初合成时常为前体物质,包括无活性的前体区和催化区。其中前体区提供了大量独特的功能,涉及到在细胞内有助于蛋白质折叠的伴侣分子,内源性的蛋白抑制因子以及信号肽序列^[20]。由于半胱氨酸蛋白酶涉及到寄生虫的生长发育和生命活动的整个过程。因此,在寄生虫病的防治中,它已经被考虑作为一种潜在的抗寄生虫化学治疗的靶标。

2) 猪囊尾蚴半胱氨酸蛋白酶 TsCL-1 基因推导的蛋白质相对分子质量约为 35 ku, pGEX-4T-1 质粒编码的血吸虫谷胱甘肽转移酶(GST)的相对分子质量为 26 ku,在原核表达系统中,蛋白质表达后不进行糖基化和磷酸化等蛋白转录后加工修饰过程^[21],因此推测表达的重组 TsCL-1 蛋白相对分子质量应为 61 ku。本研究结果表明,猪囊尾蚴 TsCL-1 基因诱导表达的蛋白分子质量约为 61 ku,与预期的结果相符合;对诱导表达蛋白进行纯化,在 61 ku 处出现了目的蛋白条带,经薄层扫描分析,纯化的融合蛋白纯度可达 90% 以上;水解活性试验结果表明,所纯化的可溶性重组 TsCL-1 蛋白具有水解活性,并且其水解活性能被半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64 所抑制。

3) 随着对人及动植物半胱氨酸蛋白酶研究的不断深入,半胱氨酸蛋白酶在生物体中的各种作用已逐渐受到重视。半胱氨酸蛋白酶的诸多功能,为寄生虫与宿主之间相互关系的研究提供了一种全新思路,并为人们认识、了解和防制寄生虫及寄生虫病提供了理论基础。但是在寄生虫半胱氨酸蛋白酶的研究中,对于酶的分泌机制及其在寄生虫入侵和免疫逃避过程中如何发挥作用等问题,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 刘海东,肖军海,李 松. 半胱氨酸蛋白酶拟肽抑制剂设计新进展 [J]. 生物技术通讯,2006,17(1):119-121.
Liu H D, Xiao J H, Li S. Recent advances in design of cysteine protease peptide-like inhibitors [J]. Letters in Biotechnology, 2006,17(1):119-121. (in Chinese)
- [2] 王 英. 半胱氨酸蛋白酶在寄生虫与宿主的相互关系中的作用 [J]. 国外医学:寄生虫学分册,2001,28(4):145-149.
Wang Y. The role of cysteine protease (CP) in parasite rela-

- tionship with its host [J]. Foreign Medicine Sciences: Parasitic Diseases, 2001, 28(4): 145-149. (in Chinese)
- [3] 管增伟,王盛兰. 半胱氨酸蛋白酶与细胞凋亡 [J]. 国外医学:肿瘤学分册,2000,27(5):280-282.
Guan Z W, Wang S L. Cysteine protease and apoptosis [J]. Foreign Medicine Sciences: Cancer Section, 2000, 27(5): 280-282. (in Chinese)
- [4] 邱宗文. 寄生虫的半胱氨酸蛋白酶 [J]. 国外医学:寄生虫学分册,2003,30(4):180-184.
Qiu Z W. Parasite cysteine protease [J]. Foreign Medicine Sciences: Parasitic Diseases, 2003, 30(4): 180-184. (in Chinese)
- [5] 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.
Duan W Y, Qiu Z W, Zhang X L. Study on cysteine protease in medical parasitology [J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2004, 16(3): 231-235. (in Chinese)
- [6] Berasain P, Goni F, McGonigle S, et al. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components [J]. J Parasitol, 1997, 83(1): 1-5.
- [7] Hotez P, Haggerty J, Hawdon J, et al. Metalloproteases of infective *Ancylostoma hookworm* larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis [J]. Infect Immun, 1990, 58(12): 3883-3892.
- [8] McKerrow J H, Doenhoff M J. Schistosome proteases [J]. Parasitol Today, 1988, 4(12): 334-340.
- [9] Chappell C L, Dresden M H. *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms [J]. Exp Parasitol, 1986, 61(2): 160-167.
- [10] Shompole S, Jasmer D P. Cathepsin B-like cysteine proteases confer intestinal cysteine protease activity in *Haemonchus contortus* [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 2928-2934.
- [11] Berasain P, Carmona C, Frangione B, et al. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses; determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced [J]. Exp Parasitol, 2000, 94(2): 99-110.
- [12] Carmona C, Dowd A J, Smith A M, et al. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles [J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 62(1): 9-17.
- [13] Chapman C B, Mitchell G F. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica* [J]. Vet Parasitol, 1982, 11(2/3): 165-178.
- [14] Guiliano D B, Hong X, McKerrow J 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.
- [15] Lustigman S, McKerrow J H, Shah K, et al. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae [J]. J Biol Chem, 1996, 271(47): 30181-30189.