

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0067-04

# 旋毛虫 ES 抗原结构基因 TSPGII 重组表达质粒构建

袁慧君<sup>1</sup>, 阎玉河<sup>2</sup>, 张改平<sup>2</sup>, 李健强<sup>3</sup>

(1. 河南职业技术师范学院, 河南新乡 453003) (2. 河南省农业科学院, 郑州 450000)

(3. 西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

**[摘要]** 用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *HindIII*, 从克隆载体 pUTSII 中切出一个 0.988 kb TSPGII 基因, 经 *EcoRI* 和 *BstXI* 酶切鉴定, 同时表达载体也用相同的酶进行酶切, 经琼脂糖凝胶电泳, 分别回收 TSPGII 基因和 pSV<sup>+</sup> SPORTII 表达载体, 用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶定向连接, 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取重组子, 经 *EcoRI*, *BstXI* 和 *HindIII* 酶切鉴定, 构建了重组表达质粒 pSV<sup>+</sup> TSI.

**[关键词]** 旋毛虫; ES 抗原; 结构基因; 重组表达质粒

**[中图分类号]** S852.7 **[文献标识码]** A

用旋毛虫肌幼虫 ES(excretory-secretory)抗原建立酶联免疫吸附试验(ELISA), 来检测旋毛虫病, 其灵敏度高, 特异性强, 操作简便<sup>[1-5]</sup>。由于天然 ES 抗原来源受限制, 影响了对 ES 抗原的应用, 随着分子生物学的发展, 各国学者期望研制出具 ES 抗原功能的旋毛虫肌幼虫 ES 基因重组抗原, 以代替天然的 ES 抗原用于临床诊断。重组抗原用量比 ES 抗原低 10 倍, 且可完全排除与猪蛔虫、猪鞭虫的交叉反应, 应用前景十分乐观<sup>[6,7]</sup>。天然 ES 抗原主要存在 3 种特异性蛋白, 分子质量分别为 45, 49, 53 ku。目前, 已获得 45, 49 和 53 ku 的部分基因, 其中 TSPGII 是 49 ku 蛋白的结构基因, 并成功地在大肠杆菌和酵母中进行表达<sup>[8,9]</sup>。在酵母中, 表达产物与猪旋毛虫病阳性血清反应程度明显强于大肠杆菌中表达的重组蛋白。在哺乳动物细胞中表达的蛋白质翻译后被加工的机会多, 可提高表达产物的正确构型, 加工后蛋白特异性强, 约为酵母型的 16~20 倍<sup>[10]</sup>。本研究试图构建含 49 ku 结构基因重组表达质粒, 为进一步在哺乳动物细胞中表达奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

质粒和菌株 克隆载体 pUTSII (3.64 kb), 含有 0.95 kb 的 TSPGII 结构基因, 由阎玉河构建<sup>[5,6]</sup>, 表达载体 pSV<sup>+</sup> SPORTII (3.16 kb), 含有 SV<sub>40</sub> 真核启动子, 购自美国生命技术公司。E. coli DH5 $\alpha$  和 E. coli HB101 均为军事医学科学院基础医学研究所提供。

**[收稿日期]** 1999-03-25

**[基金项目]** 农业部“八五”生物技术项目(85-04-03)

**[作者简介]** 袁慧君(1965-), 女, 讲师, 硕士

工具酶 *Eco* R, *Bam* H I, *Hind* III, *Bst* XI 等限制性内切酶、RNA 酶和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶均购自华美生物工程公司。

培养基 LB 液体培养基: 细菌培养用胰蛋白胍 (bacto-tryptone) 10 g, 酵母提取物 (bacto-yeast extract) 5 g 和 NaCl 10 g。摇动容器直至溶质溶解, 用 5 mol·L<sup>-1</sup> (约 0.2 mL) 的 NaOH 溶剂, 调节 pH 值至 7.0, 加入去离子水至总体积为 1 L, 在 121.34°C 高压下蒸汽灭菌 20 min。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中, 加 15 g·kg<sup>-1</sup> 琼脂, 完全溶化后摇匀, 冷却至 50°C 倒入平板。

生化试剂 溴化乙锭 (EB)、低熔点琼脂糖、琼脂糖、氨苄青霉素、胰蛋白胍和酵母提取物等均属进口分装, 购自华美生物工程公司。

仪器 THZ88-1 型台式恒温摇床, DF-C 型恒压恒流电流仪, JS-HS 型冷冻高速离心机, GS-15R 型高速台式离心机, SZX-2P 型超净工作台, ULT-1490 型 -80°C 低温冰箱。

## 1.2 方法

基因克隆的方法, 包括大肠杆菌感受态的制备、转化、质粒提取及酶切反应 (包括单、双酶切), 基因片段 TSPGII 与质粒载体的连接按文献 [10] 进行, 基因片段回收采取低熔点琼脂糖回收 DNA。质粒 DNA 的定量, 用 WF2800-P2 型紫外分光光度计测定波长 260 和 280 nm 下核酸溶液的光密度值 (OD), OD<sub>260</sub> = 1, 相当约 50 mg·L<sup>-1</sup> 双链 DNA, 纯品 DNA 其 OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> = 1.8, 若低于 1.8, 需进一步纯化。琼脂糖凝胶电泳用 1× TAE 电泳缓冲液 (40 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-乙酸, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA) 配 8 mg·L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶溶液, 微波炉加热至琼脂糖完全溶解后, 加溴化乙锭 (10 g·L<sup>-1</sup>) 至终浓度 0.5 mg·L<sup>-1</sup>, 混匀, 倒入胶模中, 凝胶厚 3~5 mm, 电泳缓冲液用 1× TAE, 适量 DNA 样品与 1/6 体积加样缓冲液 (2.5 mg·L<sup>-1</sup> 溴酚蓝, 2.5 mg·L<sup>-1</sup> 二甲苯青 FF, 400 mg·L<sup>-1</sup> 蔗糖) 混匀, 用 5 V·cm<sup>-1</sup> 的电压电泳至适当位置。

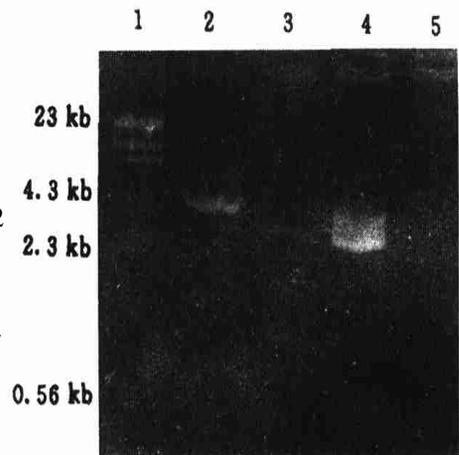


图 1 pUTSI 的酶切鉴定

1.  $\lambda$  DNA/*Hind* III;
2. pUTSI/*Eco* R I (3.64 kb);
3. pUTSI/*Eco* R I + *Bam* H I (2.69 kb, 0.95 kb);
4. pUTSI/*Eco* R I + *Bam* H I + *Bst* X I (2.69 kb, 0.43 kb, 0.52 kb);
5. pUC19/*Eco* R I (2.69 kb)

## 2 结果与分析

### 2.1 TSPGII 结构基因的鉴定及制备

pUTSI 质粒转化大肠杆菌 DH $\alpha$  (受体菌), 大量克隆, 用 *Eco* R 和 *Bam* H I 酶切, 切出 0.95 kb 的小片段和 2.69 kb (pUC19) 大片段, 回收 0.95 kb 的 DNA 片段, 用 *Bst* XI 酶切, 消化为 0.43 和 0.52 kb 片段, 结果经酶切鉴定与文献 [7] 描述相同 (见图 1)。

### 2.2 重组质粒的构建及鉴定

克隆载体 pUTSI (3.64 kb) 中, TSPGII 结构基因两端存在 *Eco* R 和 *Hind* III 2 个

酶切位点,表达载体 pSV<sup>o</sup> SPORTI (3.160 kb)中,SV<sub>40</sub>早期启动子下游及克隆位点中也存在 *Eco*R I 和 *Hind*III 2个酶切位点。因此,TSPGI 基因可以定向克隆入质粒 pSV<sup>o</sup> SPORTI ,SV<sub>40</sub>启动子下游的 *Eco*R I和 *Hind*III酶切位点之间。经 *Eco*R I ,*Hind*III和 *Bst*XI 鉴定,从而构建了重组表达质粒 pSV<sup>o</sup> TSI ,大小为 4.098 kb(见图 2, 3)。

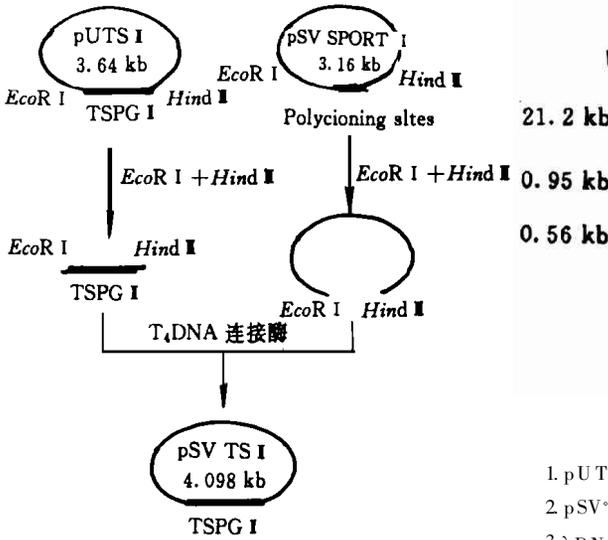


图 2 重组表达质粒 pSV<sup>o</sup> TSI 的构建策略

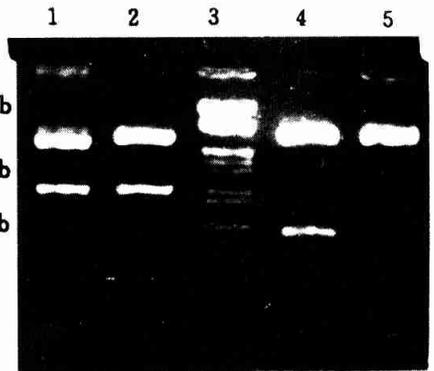


图 3 pSV<sup>o</sup> TSI 的酶切鉴定

1. pUTS I /*Eco*R I + *Hind*III (2.652 kb, 0.988 kb)
2. pSV<sup>o</sup> TSI /*Eco*R I + *Hind*III (3.11 kb, 0.988 kb)
3. λDNA /*Eco*R I + *Hind*III
4. pSV<sup>o</sup> TSI /*Eco*R I + *Bst*XI (3.68 kb, 0.43 kb)
5. pSV<sup>o</sup> TSI /*Eco*R I (4.098 kb)

### 3 讨 论

真核生物蛋白质在原核细胞中表达,成本低廉,但许多细菌中合成的真核蛋白,因折叠方式不正确或效率低下,蛋白质活性都较低。在哺乳动物细胞中表达蛋白质翻译后被加工的机率高,可以提高表达产物的正确构型,检测时反应特异性强,免疫原性好,约为酵母型的 16~ 20倍。

本研究所用的表达载体 pSV<sup>o</sup> SPORTI 为大肠杆菌-真核细胞穿梭质粒,它可以使目的基因首先在大肠杆菌中得到克隆,再将携带在重组表达质粒的目的基因通过脂质体转染 *cos7* 细胞进行表达。从重组质粒 pUTSII 中酶切回收的目的基因定向插入 pSV<sup>o</sup> SPORTI 中 SV<sub>40</sub>启动子下游,其连接效率高,挑取重组子,阳性率达 100%,经 *Eco*R I ,*Bst*XI 和 *Hind*III酶切鉴定分析,证明 ES抗原中 49 ku蛋白的结构基因 TSPGI 已克隆到表达载体 pSV<sup>o</sup> SPORTI 中,重组表达质粒 pSV<sup>o</sup> TSI 构建为该基因在真核细胞中表达奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] 许威光,袁文甫,李春华,等.旋毛虫肌幼虫排泄分泌抗原诊断猪旋毛虫病的研究与应用[J].华北农学报,1989(4): 34- 37.
- [2] 许威光,袁文甫,李春华,等.旋毛虫病 McAb快速 ELISA诊断试剂盒的研究与应用[J].畜牧兽医学报,1993,24

(6): 550- 553.

- [3] Gamble H R, Anderson W R, Graham C E, et al. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen[J]. *Vet Parasitol*, 1983, 13: 349.
- [4] Su X Z, Prestwood A K. A dot-ELISA mimicry Western blot test for the detection of swine *trichinellosis* [J]. *J Parasitol*, 1991, 77: 76.
- [5] Gamble H R, Graham C E. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of *trichinosis* [J]. *Am J Vet Res*, 1984, 45: 67.
- [6] 阎玉河. 旋毛虫 ES抗原特异性蛋白两个结构基因的序列分析及重组质粒的构建 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫杂志*, 1996, 14: 15- 19.
- [7] 阎玉河, 许威光, 陈辉, 等. 旋毛虫肌幼虫 ES抗原的基因克隆与高效表达 [J]. *生物工程学报*, 1994(10): 13- 17.
- [8] Su X Z, Prestwood A K, Mc Graw R A. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 45: 331.
- [9] Zarlenga D S, Gamble H R. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1990, 42: 165.
- [10] 金冬雁, 黎西枫, 译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2版. 北京: 科学出版社, 1992.

## Construction of Recombinant Expression Plasmids of Structural Gene TSPGII Encoding ES Antigen from *Trichinella Spiralis*

YUAN Hui-jun<sup>1</sup>, YAN Yu-he<sup>2</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>2</sup>, LI Jian-qiang<sup>3</sup>

(1. Henan Vocational-Technical Teacher's College, Xinxiang, Henan 453003, China)

(2. Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450000, China)

(3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, North western Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract** Cloning vector pUTSII was digested by *EcoRI* and *HindIII* and electrophoresed in agarose gel. The 0.988 kb TSPGII gene fragment was recovered by three methods. TSPGII gene was inserted into vector pSV°SPORTI which was predigested by *EcoRI* and *HindIII*, and ligated to the downstream of SV<sub>40</sub> promoter. Thus recombinant expression plasmids pSV°TSPGII was constructed by T<sub>4</sub>DNA ligase. Then this plasmids were transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$  and identified by *EcoRI*, *BstXI* and *HindIII*. The recombinant expression plasmids of pSV°TSPGII gene were constructed.

**Key words** *Trichinella spiralis*; ES antigen; structural gene; recombinant expression plasmids