

日本血吸虫 SjPP 基因重组杆状病毒的构建和在昆虫细胞中的表达

姚利晓^{1,3}, 陶丽红¹, 杨冠珍², 吴祥甫², 蔡幼民¹, 林娇娇^{1*}

【摘要】 目的 在昆虫细胞中表达获得可溶性的日本血吸虫 SjPP 重组蛋白。方法 提取日本血吸虫成虫总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增出 SjPP 基因的编码区序列, 将其定向克隆到供体质粒 pFastBac HT-B 中, 构建重组杆状病毒供体质粒 pFastBac-SjPP, 转化入大肠埃希菌 DH10Bac 进行转座, 提取重组杆粒 Bacmid-SjPP, 用阳离子脂质体法转染粉纹夜蛾 (TN5B1-4) 细胞。利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blotting) 分析重组蛋白表达情况。结果 构建了含日本血吸虫 SjPP 基因的重组杆粒 Bacmid-SjPP, 转染 TN5B1-4 细胞后, 获得有感染力的重组杆状病毒, 并在 TN5B1-4 细胞中成功表达 SjPP 蛋白。该重组蛋白可被抗 SjPP 蛋白的兔血清识别。结论 成功构建 SjPP 基因重组杆状病毒, 并在 TN5B1-4 细胞中表达, 该蛋白具有良好的抗原性。

【关键词】 日本血吸虫; SjPP; Bac- to-Bac 杆状病毒表达系统

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

Construction and Expression of Recombinant Baculovirus with Schistosoma japonicum SjPP Gene

YAO Li-xiao^{1,3}, TAO Li-hong¹, YANG Guan-zhen², WU Xiang-fu², CAI You-min¹, LIN Jiao-jiao^{1*}

(1 Shanghai Research Center for Animal Biotechnology/Key Laboratory of Animal Parasitology of the Ministry of Agriculture/ Shanghai Institute of Veterinary Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China; 2 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200231, China; 3 Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China)

【Abstract】 Objective To express the soluble recombinant Schistosoma japonicum SjPP proteins in TN5B1-4 cells. Methods The total RNA was extracted from adult worms of Schistosoma japonicum. The whole coding sequence of SjPP gene was synthesized by RT-PCR and cloned into donor plasmid. The recombinant donor pFastBac-SjPP was transformed into E.coli DH10Bac forming Bacmid-SjPP which was transfected into insect cell with cationic lipofectin. The fusion protein SjPP was analyzed with SDS-PAGE and Western blotting. Results The infective recombinant baculovirus Bacmid-SjPP was obtained and SjPP protein was expressed in insect cells. Conclusion The recombinant protein SjPP has been expressed in insect TN5B1-4 cells with proper antigenicity.

【Key words】 Schistosoma japonicum; SjPP; Bac-to-Bac Baculovirus Expression Vector System

Supported by The National High Technology Research and Development Program of China (No. 2006AA10A207) and National Key Technology R & D program (No. 2006BAD06A09)

* Corresponding author, E-mail: caassp@public.sta.net.cn

日本血吸虫丝/苏氨酸蛋白磷酸酶 (SjPP) 基因属于蛋白磷酸酶家族。丝/苏氨酸蛋白磷酸酶是蛋白激酶的拮抗物, 具有双重功能, 既可抑制蛋白激酶信号产生的效应, 又可对信号通路起正性、强化的效

应。SjPP 的编码蛋白与人的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶 PP6 (GenBank 登录号为 O00743)、裂殖酵母的 PPE1 (GenBank 登录号为 P36614) 及芽殖酵母的 SIT4p (GenBank 登录号为 NP_010236) 同源性较高, 分别为 72%、63%及 61%^[1]。PP6、PPE1 和 SIT4p 与细胞生长周期的调节密切相关^[2], 故推测 SjPP 在血吸虫的生长发育中具有重要作用。

杆状病毒表达载体系统 (baculovirus expression vector system, BEVS) 是一种高效的真核细胞表达系统, 具有表达效率高、表达产物与天然产物类似等优

基金项目: 国家“863”计划 (No. 2006AA10A207); 国家科技支撑计划 (No. 2006-BAD06A09)

作者单位: 1 中国农业科学院上海兽医研究所, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海动物生物技术研究中心, 上海 200232; 2 中国科学院上海生命科学研究院上海生化细胞

所 200231; 3 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712

* 通讯作者, E-mail: caassp@public.sta.net.cn

点^[3]。本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达载体系统构建日本血吸虫 SPP 基因重组杆状病毒, 并对其在粉纹夜蛾细胞中的表达状况进行分析, 为进一步研究其生物学功能奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 日本血吸虫成虫来源 中国大陆株日本血吸虫尾蚴 (由中国农业科学院上海兽医研究所钉螺室提供) 经腹部贴片法感染新西兰白兔 (2.5 kg, 雄性, 购自上海罗泾飞达实验动物养殖场), 42 d 后剖杀, 用灭菌 PBS 从肝门静脉冲出虫体, 洗涤后液氮保存备用。

1.2 质粒、菌株和主要试剂 TRIzol、Lipofectin 转染试剂和 Sf-900 SFM 昆虫细胞培养基购自美国 Invitrogen 公司。AMV 反转录酶和 Tfi DNA 聚合酶购自美国 Promega 公司。DNA 标志物 DL2 000、DL15 000, 限制性内切酶 Hind^{III}、Xho^I、T₄ DNA 连接酶和 RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司。Taq plus 酶、异丙基-β-D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 购自上海生物工程技术有限公司。酵母提取物、胰蛋白胨为英国 Oxoid 公司产品。DNA 回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司。福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂购自美国 Bio Basic 公司。大肠埃希菌 DH5 由本室保存。质粒 pFastBac HT-B、大肠埃希菌 DH10Bac 和粉纹夜蛾 (TN5B1-4) 细胞由中国科学院生化与细胞生物学研究所吴祥甫研究员实验室保存。

1.3 引物 根据日本血吸虫 SPP 基因序列 (GenBank 登陆号为 AY902477) 设计一对 SPP 基因编码区扩增引物:

Bac-upper: 5'-AGACTCGAGGACTTGGATCAGTGGATAC-3' (下划线为 Xho 酶切位点)

Bac-lower: 5'-CGGAAGCTTGTTACAAGAAGTACGGAGT-3' (下划线为 Hind 酶切位点)

根据 Bac-to-Bac 表达系统说明书 (美国 Invitrogen 公司) 提供的 M13 引物序列, 合成用于鉴定重组杆粒 Bacmid-SPP 的 PCR 引物:

M13 Forward: 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'

M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

上述各引物由上海基康生物技术有限公司合成。

2 方法

2.1 日本血吸虫成虫总 RNA 提取 RNA 提取参照 TRIzol 试剂使用说明书, 紫外分光光度计 (HP8452, 美国惠普公司) 测定吸光度 (A_{260} 和 A_{280} 值)。

2.2 SPP 基因的反转录扩增及重组供体质粒 pFastBac-SPP 的构建 按照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书, 以 Bac-upper、Bac-lower 为引物扩增 SPP 基因编码区序列。扩增条件为 48 45 min; 94 2 min; 94 30 s, 59 1 min, 68 2 min, 40 个循环; 68 延伸 10 min。用 Hind^{III} 和 Xho^I 双酶切 PCR 产物或 pFastBac HT-B 载体, 纯化回收后将酶切 PCR 产物和酶切载体连接, 转化大肠埃希菌 DH5⁺, 经氨苄青霉素 (100 μg/ml) 筛选, 随机挑选单菌落进行液体培养, 碱裂解法小量制备重组质粒 pFastBac-SPP, 进行 PCR 及双酶切鉴定并测序验证。

2.3 重组杆粒 Bacmid-SPP 的构建 用含 SPP 基因的重组供体质粒 pFastBac-SPP 转化 100 μl 感受态 DH10Bac 细胞, 37 200 r/min 培养 4 h 后, 分别做 1:10、1:100 及 1:1 000 稀释, 各取 100 μl 涂布于 LB 选择培养平板 (含卡那霉素 50 μg/ml, 庆大霉素 7 μg/ml, 四环素 10 μg/ml, IPTG 40 μg/ml, X-gal 100 μg/ml), 37 培养 48 h 后挑取白色菌落接种于 LB 液体培养基, 过夜培养后提取重组杆粒 DNA, 采用 M13Forward/Reverse 引物进行 PCR 鉴定, 反应条件: 93 3 min; 94 45 s, 55 45 s, 72 5 min, 35 个循环; 72 7 min。

2.4 重组杆粒 DNA 转染 TN5B1-4 细胞及重组杆状病毒扩增 在 6 孔细胞培养板中接种适量 TN5B1-4 细胞, 用 Sf 900 II SFM 培养基于 27 培养至对数期。分别将 4 μg Bacmid-SPP 和 6 μl 脂质体 (lipofectin) 用 100 μl 无血清、无抗生素的 Sf 900 II-SFM 培养液稀释, 轻轻混匀。混合重组杆粒和脂质体, 室温孵育 45 min。加 800 μl 无血清、无抗生素的 Sf 900 II-SFM 培养液到重组杆粒和脂质体的混合液中, 形成转染混合液, 加入细胞培养板中, 27 ℃ 培养 5 h。吸去转染混合液, 加入 2 ml Sf 900 II-SFM 培养基。在转染的第 1~6 天, 每天观察细胞。在倒置显微镜下观察到 Bacmid-SPP 所转染的昆虫细胞出现病变后, 收集细胞培养上清液, 转染细胞进行病毒扩增, 离心得到病毒上清。

2.5 重组蛋白的表达时相分析 待 25 cm² 培养瓶中细胞生长到对数期时, 更换新的 Sf 900 II-SFM 培养液, 加入病毒上清 50 μl, 分别在 0、24、48、72 和 96 h 取出, 分别收集上清和细胞, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

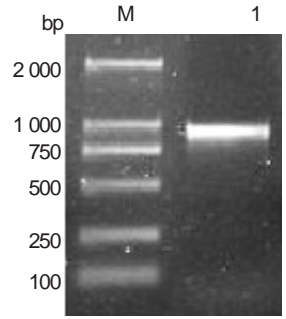
2.6 兔抗血清的制备 将含 100 μg 纯化的原核表达重组蛋白 SPP 的溶液^[4]与福氏完全佐剂充分混合, 后腿肌肉注射免疫新西兰白兔。第 2 次以等量蛋白和福氏不完全佐剂的混合物再次同法免疫, 第 3 次以蛋白

溶液加强免疫，每次免疫间隔2周。3次免疫后2周颈动脉采血制备抗血清。

2.7 Western blotting分析 收集病毒感染72h的细胞和上清，经SDS-PAGE电泳分离，冰浴条件下25mA恒流电转1.5h于硝酸纤维素膜。丽春红染液[0.2% 1-(4-磺氨基-1-萘偶氮)-2-萘酚-6,8-二磺酸三钠盐，3%三氯乙酸，3%磺基水杨酸]染色2-5min，去离子水漂洗3-5次，观察电转是否完全，并做好标记，剪取所需膜条，用原核表达的重组SjPP蛋白免疫的兔血清作为一抗，辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG作二抗，进行Western blotting检测。

结 果

1 日本血吸虫成虫总RNA提取及SjPP基因的克隆 成虫总RNA， $A_{260} : A_{280}$ 值为1.8，表明提取的RNA纯度较高。以下游引物Bac-lower在AMV反转录酶作用下合成cDNA第一链，以此cDNA为模板，Bac-upper、Bac-lower为引物扩增出约900bp的核苷酸片段，大小与预期长度(925bp)相符(图1)。



M: DNA 标志物, 1: SjPP 基因扩增片段。
M: DNA marker, 1: The amplified fragment of SjPP gene.

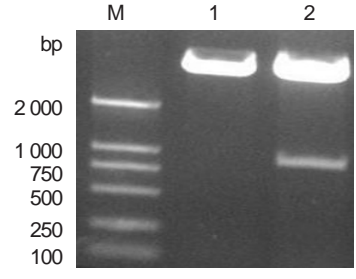
图1 SjPP基因的RT-PCR扩增
Fig.1 Amplification of SjPP by RT-PCR

2 重组供体质粒 pFastBac-SjPP 的构建及鉴定

SjPP基因与载体pFastBac HT-B均用Xho和Hind进行双酶切，连接。重组质粒pFastBac-SjPP经Hind和Xho双酶切鉴定，获得与预期大小吻合的片段(图2)。根据pFastBac HT-B的克隆位点上游序列设计测序引物，测定结果表明，重组质粒中插入的SjPP基因开放阅读框的编码氨基酸序列未发生变化，重组供体质粒pFastBac-SjPP构建成功。

3 重组杆粒 Bacmid-SjPP 的 PCR 鉴定

提取重组Bacmid-SjPP DNA，用M13F/M13R引

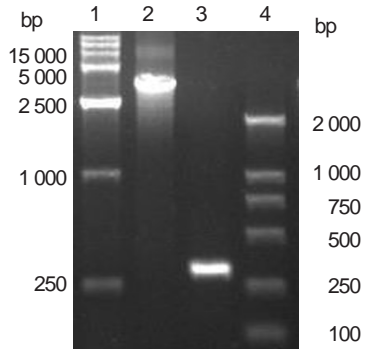


M: DNA 标志物, 1: 供体质粒 pFastBac HT-B 的双酶切产物, 2: 重组供体质粒 pFastBac-SjPP 的双酶切产物。

M: DNA marker, 1: Plasmids pFastBac HT-B digested with Hind / XhoI, 2: Recombinant plasmids pFastBac-SjPP digested with Hind / XhoI.

图2 重组供体质粒 pFastBac-SjPP Hind /XhoI 双酶切鉴定
Fig.2 Identification of the recombinant plasmids pFastBac-SjPP digested with Hind /XhoI

物进行PCR鉴定。未进行转化的Bacmid扩增出约300bp的片段，与引物间序列长度相符。重组Bacmid-SjPP的PCR产物大小约为3300bp，包括目的基因907bp，Tn7转座子左右臂之间长2130bp和引物间长300bp(图3)，表明SjPP基因正确插入到Bacmid基因组中。



1: DNA 标志物 (DL15000), 2: 重组杆粒 Bacmid-SjPP, 3: 杆粒 Bacmid, 4: DNA 标志物 (DL2000)。

1: DNA marker (DL15000), 2: Bacmid-SjPP, 3: Bacmid, 4: DNA marker (DL2000) .

图3 PCR 鉴定重组杆粒 Bacmid-SjPP
Fig.3 Identification of the recombinant shuttle vector Bacmid-SjPP by PCR

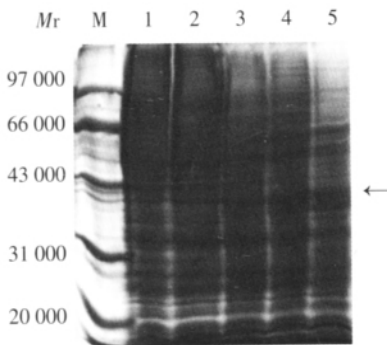
4 SjPP 基因重组杆状病毒的获得

利用阳离子脂质体转染试剂Lipofectin将重组杆粒Bacmid-SjPP转染到TN5B1-4细胞中。转染后每隔24h在倒置显微镜下观察，TN5B1-4细胞的形态逐渐发生变化，在转染72h时，细胞变大变圆，细胞间的结合变得疏松，紧密连接消失。120h时细胞逐渐脱落，部分细胞悬浮。将扩增得到的重组病毒Bacmid-SjPP的上清感染TN5B1-4细胞，48h即可观察到病理变化，表明获得有感染力的重组病毒颗粒。

讨 论

5 重组蛋白的表达与分析鉴定

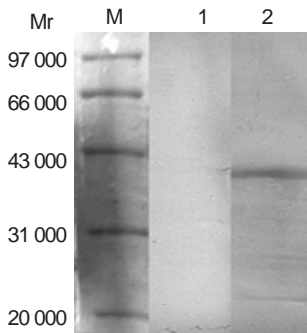
SDS-PAGE 结果表明, 重组病毒 Bacmid-SjPP 感染 TN5B1-4 细胞 48 h 后成功表达重组 SjPP 蛋白, 在 Mr 约 40 000 处出现特异的蛋白条带, 与重组融合蛋白的理论相对分子质量相符 (图 4), 在细胞培养上清中也出现目的条带。而感染野生病毒杆粒的细胞和正常细胞均不出现该条带。取重组病毒 Bacmid-SjPP 感染的细胞裂解液进一步进行 Western blotting 分析, 用原核表达的重组 SjPP 蛋白免疫的兔血清作一抗, 显示出相对分子质量 (Mr) 约为 40 000 的特征性条带, 与 rSjPP 融合蛋白的理论相对分子质量相符 (图 5)。



M: 蛋白质标志物, 1-5: 接种病毒 0、24、48、72 和 96 h 后 rSjPP 在细胞中的表达。

M: Protein marker, 1-5: Expression of rSjPP in TN5B1-4 cells infected with virus for 0, 24, 48, 72 and 96 h.

图 4 重组 Bacmid-SjPP 在 TN5B1-4 细胞中的表达
Fig.4 SDS-PAGE analysis of rSjPP protein expressed in TN5B1-4 cells



M: 蛋白质标志物, 1: 感染 Bacmid 的 TN5B1-4 细胞裂解液, 2: 感染 Bacmid-SjPP 的 TN5B1-4 细胞裂解液。

M: Protein marker, 1: Protein in TN5B1-4 infected with Bacmid, 2: Protein in TN5B1-4 infected with Bacmid-SjPP.

图 5 重组蛋白 Western blotting 鉴定
Fig.5 Identification of the recombinant protein with Western blotting

Bac-to-Bac 杆状病毒表达载体系统是近发展起来的一种杆状病毒表达系统 (BEVS)。该系统发展了一种杆状病毒穿梭载体 Bacmid, 也称杆粒, 既能以质粒形式在大肠埃希菌内复制, 又能转染昆虫细胞, 装配成有感染力的病毒粒子。外源基因在大肠埃希菌内通过位点特异性转座整合到 Bacmid 中, 经过蓝-白斑筛选和 PCR 扩增, 筛选出重组 Bacmid, 直接转染昆虫细胞即可得到纯的重组病毒, 克服了传统 BEVS 重组效率低、操作复杂、可能发生野生病毒污染等缺点^[5]。

本课题组曾构建了 SjPP 基因的原核表达系统, 重组表达蛋白以包涵体的形式存在, 纯化的重组蛋白 SjPP 经复性后具有部分酶学活性。本研究运用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统成功获得具有感染力的重组病毒粒子 Bacmid-SjPP, 转染昆虫细胞表达出目的蛋白。SDS-PAGE 结果显示在细胞培养上清中也含有目的蛋白, 可能是细胞被病毒裂解所致, 这意味着外源蛋白以可溶性形式存在于昆虫细胞中。此外, 本试验选用供体质粒 pFastBac HT-B, 该质粒上具有 6 个 His 的编码区, 可与 SjPP 基因一起转座到 Bacmid, 这样可使表达的 SjPP 融合蛋白易于纯化, 为进一步研究真核表达产物 SjPP 蛋白的酶性质及其生物学功能创造了条件。

参 考 文 献

- [1] Yao LX, Lin JJ, Fu ZQ, et al. Screening, cloning and immunological efficiency of SjPP, a novel Schistosoma japonicum gene [J]. Sci Agri Sin, 2006, 39(8): 1659-1666. (in Chinese) (姚利晓, 林娇娇, 傅志强, 等. 日本血吸虫新基因 SjPP 的筛选、克隆及在小鼠的免疫效果 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(8): 1659-1666.)
- [2] Bastians H, Ponstingl H. The novel human protein serine/threonine phosphatase 6 is a functional homologue of budding yeast St4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation [J]. J Cell Sci, 1996, 109 (12): 2865-2874.
- [3] Possee RD. Baculoviruses as expression vectors [J]. Curr Opin Biotechnol, 1997, 8(5): 569-572.
- [4] Yao LX, Sun AG, Fu ZQ, et al. Expression and protective immunity of serine-threonine specific protein phosphatase SjPP of Schistosoma japonicum [J]. Chin J Vet Sci, 2006, 36(2): 122-126. (in Chinese) (姚利晓, 孙安国, 傅志强, 等. 日本血吸虫丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸酶基因的表达及其免疫保护试验 [J]. 中国兽医科学, 2006, 36(2): 122-126.)
- [5] Luchow AV, Lee SC, Barry GF, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign gene into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli [J]. J Virol, 1993, 67(8): 4566-4579. (收稿日期: 2007-09-03 编辑: 高石)