

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.001.html>

◇基础医学研究◇

重组 GRA5 蛋白免疫诊断弓形虫病价值的研究

王楠楠^{1,2} 姚湧¹ 汪学龙¹

摘要 目的 原核表达的刚地弓形虫致密颗粒蛋白 5 (rGRA5) 免疫诊断价值的探讨。方法 GRA5 基因在 RT-PCR 被扩增, 构建 pET28a-GRA5 原核表达载体, 双核酸内酶切及序列测定进行鉴定, pET28a-GRA5IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 和 Western blot 法检测该重组蛋白的表达。建立以纯化的重组蛋白的间接 ELISA 法检测收集样本血清中弓形虫特异性抗体。结果 PCR 反应扩增出为 363 bp 大小的 GRA5 基因, 所构建的 pET28a-GRA5 原核表达载体经双酶切显示插入片段大小与上相符, DNA 测序结果表明与 GenBank 中录入的 GRA5 基因经 Blast 比对序列同源性 100%。原核细胞表达的该重组蛋白在 SDS-PAGE 和 Western blot 中均有显示(约 14 ku)。本实验建立的 ELISA 法检测的 100 例弓形虫感染者(血清学阳性)血清中有 73 例呈阳性, 阳性率为 73.0% (73/100), 其中 40 例 IgG 阳性标本的阳性率为 72.5% (29/40), 30 例 IgM 阳性标本的阳性率为 53.3% (16/30), 30 例 IgG、IgM 均阳性标本的阳性率为 93.3% (28/30), 30 例阴性血清标本的阳性率仅为 6.7% (2/30)。结论 本实验获得的原核表达的 rGRA5 具有一定的弓形虫病免疫诊断的潜在价值。

关键词 刚地弓形虫; 重组致密颗粒蛋白 GRA5; 鉴定; 酶联免疫吸附试验

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0467-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.001

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 专性有核细胞内寄生, 呈世界性分布, 引起人兽共患的弓形虫病 (toxoplasmosis)。微线体 (microneme)、棒状体 (rhoptry) 和致密颗粒 (dense granule) 是弓形虫主要的 3 类分泌细胞器, 致密颗粒分泌的致密颗粒蛋白

(dense granule proteins, GRAs) 参与虫体在宿主细胞内的生长并参与转录, 在调节纳虫泡状结构及网状结构中起重要作用, 有研究^[1-3]证实 GRA1、GRA4、GRA7 对弓形虫感染有较好的免疫保护作用。

目前, 弓形虫病以免疫学诊断为主, 如 ELISA 等。为了提高弓形虫病免疫学诊断的敏感性和特异性, 有些重组抗原已初步应用于免疫学诊断显示出较高的诊断价值^[4]。该实验构建了含弓形虫 GRA5 基因的原核表达载体 pET28a-GRA5, 表达鉴定后, 建立间接 ELISA 检测方法, 以纯化的重组蛋白为抗原检测样本中特异性抗体, 以探讨其用于弓形虫病的免疫诊断价值。

1 材料与方法

1.1 材料 弓形虫总 RNA、大肠埃希菌 (*E. coli*) 菌株 XL1-Blue、BL21、pET28a (+) Vectors 均由安徽医科大学病原生物学教研室保存提供, 130 例血清来源于太和县中医院 2015 年 5 月~2016 年 5 月门诊患者血清, 用爱尔兰 Trinity 公司的弓形虫检测试剂盒检测的弓形虫血清学阳性血清 100 份 (包括 IgG 阳性 40 例、IgM 阳性 30 例、IgM、IgG 两者均阳性 30 例), 弓形虫阴性血清 30 例。

1.2 主要试剂 EcoR I、BamH I、DNA 连接试剂盒 (大连 TaKaRa 公司); T4 连接酶、DL 2 000 Marker、逆转录试剂盒 (立陶宛 MBI 公司); 质粒抽提试剂盒、胶回收纯化试剂盒 (上海生工生物有限公司); his-bind 纯化试剂盒 (德国 Novagen 公司); HRP-山羊抗鼠 IgG (北京中衫金桥生物技术公司); ECL 化学发光试剂盒 (美国 Pierce 公司); NC 膜 (美国 Millipore 公司); 弓形虫检测试剂盒 (爱尔兰 Trinity 公司); 辣根过氧化物酶标记重组蛋白 A/G (美国 Pierce Biotechnology 公司); 全自动酶标仪 (郑州安图生物); TMB 等其他试剂均为国产分析纯。

1.3 GRA5 基因的 PCR 扩增 弓形虫 RNA 逆转录成 cDNA 按逆转录试剂盒说明书进行。以 cDNA 为模板, 用 GRA5 基因编码区全长扩增引物 GRA5 F: 5'-CGGATCCATGGCGTCTGTAAAACGCGTCC-3',

2017-02-05 接收

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2016A353)

作者单位: ¹安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032

²太和县中医院检验科, 太和 236600

作者简介: 王楠楠, 女, 硕士研究生;

姚湧, 男, 讲师, 责任作者, E-mail: 2806900253@qq.com;

汪学龙, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-gxl1964@163.com

R: 5'-GGAATTCCTACTCTTCCTCGGCAACT-3', 进行 PCR 反应。产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 按胶回收纯化试剂盒的说明进行 DNA 目的片段的回收和纯化。

1.4 克隆载体的构建与鉴定 PCR 产物 4 μ l 与 pEASY-T1 载体 1 μ l 两者充分混合反应。将连接产物转化到 *E. coli* XL1-blue 感受态细胞中, 涂 LB 平板培养过夜。挑取单个白色菌落置于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜。次日, 再提取质粒。行质粒 EcoR I、BamH I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 pET28a-GRA5 表达载体的构建与鉴定 将 pEASY-T1/GRA5 以及环状原核表达质粒 pET28a 同时做 BamH I 和 EcoR I 双酶切, 行琼脂糖凝胶电泳, 按说明书胶回收酶切的 GRA5 基因和质粒表达载体大片段。再将 GRA5 基因与表达载体 pET28a 大片段在 T4 连接酶的作用下按摩尔比为 1 : 6 混匀, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化到 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂 LB 平板上培养过夜。挑取转化的 pET28a-GRA5 (BL21) 单菌落接种到含 3 ml Kana + 液体 LB 的离心管中, 于 37 $^{\circ}$ C、210 r/min 振荡培养 12 ~ 16 h; 如上抽提质粒、双切酶、电泳观察酶切结果; 另将含 pET28a-GRA5 的质粒送公司测序; 测序结果行 Blast 比对。

1.6 pET28a-GRA5 的诱导表达及 Western blot 鉴定 取出含有 pET28a-GRA5 的 BL21 菌液接种于 LB 液体培养基 (含 Kana) 中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 次日用 IPTG 诱导表达, 分时间段收集菌液, 先进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 再进行 Western blot 鉴定。

1.7 重组 GRA5 蛋白纯化及浓度的测定 按试剂盒说明进行; 用 PBS 稀释 BSA 标准品, 浓度分别为: 0、2.5、5、10、20、40、200。取纯化后的蛋白 20 μ l, 加入 PBS 缓冲液 180 μ l, 将其 10 倍稀释制成蛋白样品, 将重组蛋白样品和标准品与测试工作液等体积比加入, 60 $^{\circ}$ C、1 h 水浴, 样品于 562 nm 处 (酶标仪) 读取光密度 (optical density, OD) 值, 制标准曲线, 计算出纯化后蛋白的浓度。

1.8 间接 ELISA 法检测血清样本中特异性抗体 抗原、血清稀释度和酶标二抗最佳工作浓度用棋盘滴定法确定, 用建立的 ELISA 方法检测 100 份弓形虫阳性血清和 30 份阴性血清, 同时用市售的 Trinity 弓形虫检测试剂盒做平行检测, 比较两种检测结果。

2 结果

2.1 GRA5 基因的扩增 用 1% 琼脂糖凝胶电泳

可检测到 PCR 产物为长约 363 bp 片段, 片段大小与理论一致 (图 1)。

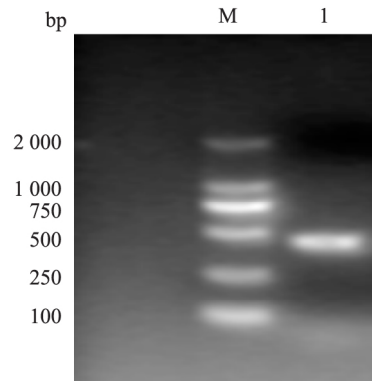


图 1 目的基因 GRA5 的 PCR 扩增产物凝胶电泳分析
M: DL 2 000 Marker; 1: GRA5 PCR 产物

2.2 pEASY-T1-GRA5 酶切鉴定 EcoR I、BamH I 双酶切后, 产物在琼脂糖凝胶电泳上可见一条约 363 bp 的片段, 与 GRA5 理论长度一致, 见图 2。

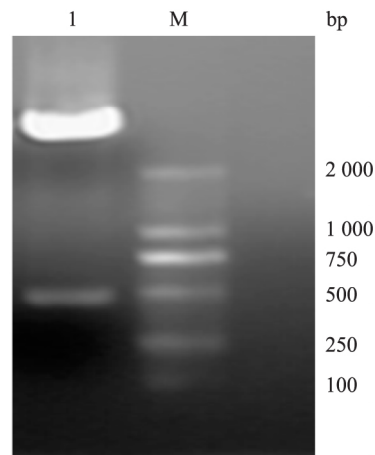


图 2 pEASY-T1-GRA5 重组质粒双酶切鉴定
M: DL 2 000 Marker; 1: pEASY-T1-GRA5 重组质粒双酶切产物

2.3 pET28a-GRA5 的双酶切鉴定 重组 pET28a-GRA5 经 BamH I 和 EcoR I 双酶切后亦可得到 363 bp 大小的目的基因片段 (图 3); 另测序结果经 Blast 比对与 GRA5 基因序列同源率为 100%。

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳 见图 4。

2.5 Western blot 法检测 pET28a-GRA5 重组蛋白的表达 提取含有 pET28a-GRA5 重组质粒的 BL21 菌蛋白, 对照为空白 pET28a 菌蛋白, 一抗用鼠抗 His-Tag, 进行 Western blot 检测, 结果显示含 pET28a-GRA5 重组质粒组的菌蛋白在 14 ku 处有条带出现, 而空白对照组没有条带出现 (图 5)。

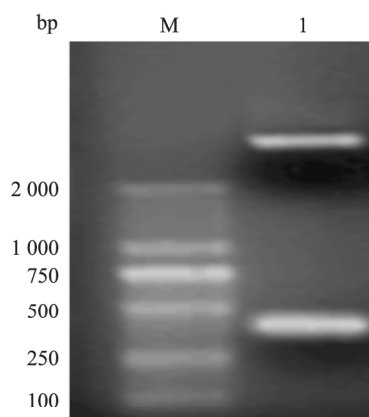


图3 重组表达质粒 pET28a-GRA5 的双酶切鉴定
M: DL 2 000 Marker; 1: pET28a-GRA5 双酶切产物

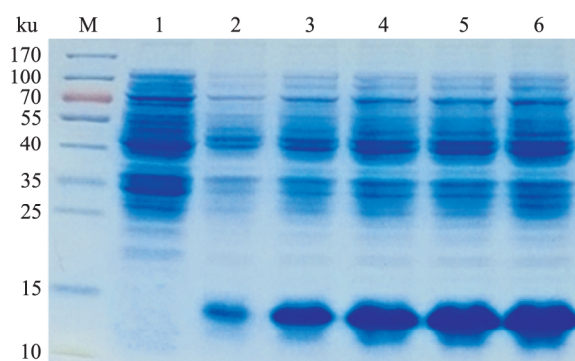


图4 GRA5 诱导表达及 SDS-PAGE 分析
M: 170 ku Marker; 1: 诱导前; 2: 诱导 1 h; 3: 诱导 2 h; 4: 诱导 3 h; 5: 诱导 4 h; 6: 菌体诱导 5 h



图5 Western blot 法鉴定 pET28a-GRA5 重组蛋白的表达
1: pET28a-GRA5 重组质粒组; 2: 空白对照组

2.6 间接法 ELISA 法检测样本 用最适包被浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化重组 GRA5 蛋白包被酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 血清样本稀释度为 1 : 25, 二抗最佳工作浓度为 1 : 20 000, 血清样本阴阳性临界值为 0.2。用建立的 ELISA 法去检测 100 例弓形虫阳性感染者血清, 有 73 例显示阳性结果, 阳性检出率为 73% (73/100), 见表 1。

3 讨论

随着宠物进入越来越多的家庭, 人和动物紧密相处, 导致如弓形虫病等人畜共患的疾病的普遍发

表 1 rGRA5 ELISA 对样本血清抗体的测定结果

检测对象	rGRA5 -ELISA	
	阳性数	n(%)
弓形虫 IgG 阳性血清	29	40(72.5)
弓形虫 IgM 阳性血清	16	30(53.3)
弓形虫 IgG、IgM 阳性	28	30(93.3)
阴性对照血清	2	30(6.7)

生。弓形虫的中间宿主极为广泛, 并可以在中间宿主与中间宿主相互传播, 因此该病由动物传播给人类的机率相应较高, 对于器官移植、恶性肿瘤、艾滋病等诸多免疫低下或免疫缺陷的患者, 危害严重, 是常见致死因素之一; 孕妇尤其是在孕早期感染弓形虫, 严重的会出现流产、畸胎和死胎等病害^[5]; 胎儿宫内发育以及后天生长也与弓形虫先天性感染有着密切关系。因此弓形虫病的及时、准确的诊断在临床上显得十分重要。故通过基因工程的技术手段, 获取与天然蛋白抗原生物活性相近的重组抗原, 用做弓形虫病的诊断抗原, 建立敏感、标准化的诊断方法对于该病的防治具有非常重要的意义。

目前, 国内外对弓形虫诊断抗原的研究已有很大进展。例如: 以弓形虫 rSAG1、rHXGPRT、rAK 3 种混合蛋白作为诊断抗原, ELISA 法检测 IgM 的敏感性为 89.4%, 特异性为 96.7%, ELISA 法检测 IgG 的敏感性为 97.1%, 特异性为 93.3%^[6]; 用弓形虫 rSAG2 作为诊断抗原, ELISA 法检测孕妇患者血清可区分急、慢性感染, 20 例急性患者中阳性率为 90.0%, 70 例慢性患者血清中阳性率为 1.4%^[7]; 将弓形虫重组 ROP1 抗原与重组 p29 和 p35 组成复合抗原, ELISA 法检测弓形虫 IgM 抗体, 敏感性 93.1%, 特异性 95.0%, 但对 IgG 抗体的亲和力很小, 也可以用于弓形虫病的早期诊断^[8]。

弓形虫致密颗粒所分泌的致密颗粒蛋白是重要的一类分泌代谢性抗原, 能够调节纳虫泡结构, 在宿主细胞与弓形虫病原体的互相作用中起关键作用。目前, 已报道^[9]的 GRAs 有 21 种: GRA1-GRA10、GRA12、GRA14、GRA15、GRA16、GRA23、GRA24、GRA25 和 2 个同工型的三磷酸核苷酸水解酶 (nucleotide triphosphate hydrolase, NTPase I 和 II), 以及两个蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, Tg-P11 和 2)。已有实验^[9]表明弓形虫 GRAs 可帮助进行弓形虫病的诊断, 如 GRA2 在检测弓形虫急性感染的敏感性可达 100%。鉴于 GRA5 是弓形虫的一种具有免疫活性的分泌蛋白^[10], 本研究构建了弓形虫的原核表达载体 pET28a-GRA5。pET28a-GRA5 转化的

BL21/DE3 菌经 IPTG 诱导表达与 His-Tag 融合的蛋白(约 14 ku), Western blot 结果显示抗 His-Tag 的单抗能特异性识别该蛋白, Western blot 的结果进一步验证了 GRA5 蛋白的表达, 与预期结果相符。

另外, 目前市场上用于检测弓形虫病的 ELISA 试剂盒众多, 其准确性和灵敏度也各不相同, 良好的 ELISA 检测方法的建立, 抗原的选择直接决定着检测结果的准确性^[11], 本研究用 GRA5 重组蛋白作为抗原包被酶标板建立 ELISA 试验, 来检测弓形虫病的阳性率, 与 Trinity 弓形虫检测试剂盒的检测结果相比较, 显示有 73% 的符合率, 这表明重组 GRA5 蛋白可作为弓形虫病免疫诊断的备选抗原之一。

参考文献

- [1] Babaie J, Sadeghiani G, Golkar M. Construction and *in vitro* expression analyses of a DNA plasmid encoding dense granule GRA5 antigen of *Toxoplasma gondii* [J]. Avicenna J Med Biotechnol, 2011, 3(3): 135-41.
- [2] Liu Q, Wang F, Wang G, et al. *Toxoplasma gondii*: immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multi-component DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2 [J]. Hum Vaccin Immunother 2014, 10(1): 184-91.
- [3] Meng M, Zhou A, Lu G, et al. DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the *Toxoplasma gondii* GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 494.
- [4] 卢致民. 弓形虫感染免疫诊断抗原研究进展 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(5): 590-4.
- [5] Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard L C, et al. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections [J]. Cell Microbiol, 2006, 8(4): 535-44.
- [6] 丁邦胜, 李霞, 罗庆礼, 等. 三种蛋白混合抗原的间接 ELISA 法检测人血清弓形虫 IgM 和 IgG 抗体 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(4): 358-63.
- [7] Li S, Galvan G, Araujo F G, et al. Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens [J]. Clin Diagn Lab Immunol 2000, 7(5): 781-7.
- [8] Aubert D, Maine G T, Viuena I, et al. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay [J]. J Clin Microbiol 2000, 38(3): 1144-50.
- [9] 胡玲英, 张念章, 王金磊, 等. 弓形虫致密颗粒蛋白的生物学功能及免疫原性研究的新进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 663-8.
- [10] 李华文, 陈观今. 弓形虫致密颗粒蛋白结构功能及免疫 [J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2004, 31(2): 51-4.
- [11] 马亮, 任保彦, 左绍志, 等. 刚地弓形虫 RH 株 SAG3 蛋白抗体检测的 ELISA 方法建立 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8527-8.

Study of recombinant GRA5 protein on immuno-diagnosis of *Toxoplasma* infection

Wang Nannan^{1,2}, Yao Yong¹, Wang Xuelong¹

(¹Dept of Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of Laboratory, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Taihe, Taihe 236600)

Abstract Objective To investigate the immunodiagnostic value of recombinant granulocyte protein 5 (rGRA5) protein in prokaryotic *Toxoplasma gondii*. **Methods** The PCR was used to amplify GRA5 gene, then insert the target gene into the prokaryotic expression vector pET28a and identified by double digestion and sequencing, then transfect the correct target gene into BL21 competent cells, SDS-PAGE and Western blot were used to detect the expression of the recombinant protein in BL21. ELISA was used to detect the serum of 100 cases of serologically *Toxoplasma*-positive individuals. **Results** The products of GRA5 gene of 363 bp in length was successfully amplified by PCR, the prokaryotic expression vector pET28a-GRA5 was constructed successfully, the result of double digestion showed that the insert fragment size was correct, and DNA sequencing results showed that the homology of GRA5 gene with GenBank was 100%. Also the expression of GRA5 protein was successfully detected in BL21 by Western blot (about 14 ku). ELISA method was used to detect 100 cases of patients with 73 cases showed positive results, the positive diagnosis rate was 73.0%. Among them, the positive detection rate of IgG positive samples was 72.5% in 40 cases, the positive detection rate of IgM positive samples was 53.3% in 30 cases, the positive detection rate of IgG and IgM positive samples was 93.3% in 30 cases. **Conclusion** The prokaryotic expression vector pET28a-GRA5 is constructed successfully, and the recombinant protein has potential for immunological diagnosis of toxoplasmosis.

Key words *Toxoplasma gondii*; GRA5; identify; enzyme-linked immunosorbent assay