

完整弓形虫 P35 重组蛋白 IgM-酶联免疫吸附测定法检测弓形虫急性感染*

吕 斌²⁾ 吴少廷¹⁾ 周宜开^{2)**} 徐顺清^{2)**} 张仁利¹⁾ 高世同¹⁾ 林 敏¹⁾ 张志仁²⁾

(¹⁾中国预防医学科学院深圳研究中心, 深圳 518020; ²⁾华中科技大学同济医学院环境医学研究所, 武汉 430030)

摘要 为利用重组的完整弓形虫表面抗原 P35-GST 蛋白对弓形虫感染进行血清学诊断, 构建了可表达 P35-GST 的 JM109 细胞株. 采用亲和层析对融合蛋白进行分离和纯化, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blot) 分析所表达的蛋白质, 并用纯化的重组蛋白进行 IgM-酶联免疫吸附测定法 (IgM-ELISA) 检测不同病人血清中的抗-P35 抗体. SDS-PAGE 分析发现 P35-GST 重组蛋白的大小约 60 ku, 为一亲水性蛋白, 蛋白质印迹分析表明该蛋白与弓形虫阳性感染病人的血清有特异性反应. 利用 P35-GST 为抗原, 对 60 例血清进行 IgM-ELISA 分析, 发现 P35-GST 可明显区分近期感染和既往感染, 在弓形虫的诊断上有很大的应用前景.

关键词 弓形虫, P35 表面抗原, 完整重组蛋白, IgM-酶联免疫吸附测定法

学科分类号 R382.33

弓形虫病是一种严重威胁人类健康的人畜共患疾病, 患病的孕妇可引起胎儿畸形, 危害下一代的健康. 近年来由于爱滋病等免疫缺陷性疾病的增加, 弓形虫病的发病率也明显上升, 为此, 有效的诊断和防治方法十分必要^[1~3].

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 在人体的状态称为速殖子, 已发现的速殖子表面抗原 P22、P30、P43、P23、P35^[1], 是引起人体免疫反应的主要成分, 也是用于诊断的主要抗原. 目前对 P35 的研究很少, 完整的 P35cDNA 序列尚未见报道. 本课题将 P35 全长 cDNA 基因克隆进大肠杆菌中, 获得了可表达含谷胱甘肽 (GST) 的完整重组 P35 蛋白的大肠杆菌株, 利用亲和层析分离纯化重组的 P35-GST 蛋白, 进行蛋白质印迹 (Western blot) 分析. 然后以 P35-GST 为抗原, 对 60 例血清进行 IgM-酶联免疫吸附测定法 (IgM-ELISA) 分析.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 弓形虫株、菌株、质粒: 弓形虫 RH 株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 株、表达质粒 pGEX 均为中国预防医学科学院深圳研究中心分子生物室保存. 冻存的 RH 株解冻后接种于 BCL-2 小鼠腹腔, 一周后收集腹水中的速殖子.

1.1.2 酶、抗生素及化学试剂: 实验所需限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I, T4DNA 连接酶均是 Promega 公司产品, Taq 酶、DNA 分子质量标准为

MBI 公司产品, SuperScriptTM II 为 Gibco 公司产品, X-gal 为 Sigma 公司产品, 氨苄青霉素为上海生工生物公司产品.

1.1.3 引物: 针对全长 P35cDNA 序列 (由作者克隆, GenBank 登录号为 AF310261) 的 RT-PCR 引物由上海生工公司合成. 引物设计中含 *Bam*HI、*Hind*III 酶切位点. 上游引物 5'-GGA TCC ATG AAC GGT CCT TTG AGT TAT-3'; 下游引物 5'-GCA AGC TTT TAA TTC TGC GTC GTT ACG GTG-3'.

1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 的提取: 按试剂盒说明进行弓形虫总 RNA 提取 (FBI 公司), 质粒 DNA 提取、纯化和回收 (ProGma 公司). cDNA 第一链合成使用 Oligo (dT) 为引物.

1.2.2 cDNA 的克隆和表达: 按文献 [4] 的方法将 RT-PCR 产物 A-T 克隆到 pGEM-T 载体上 (ProGma 公司产品), 转染 JM109 菌, 选出阳性克隆进行酶切和测序鉴定. 然后将完整 P35cDNA 序列亚克隆到表达载体 pGEX 上, 转染 JM109 菌, 挑选阳性克隆进行酶切鉴定.

1.2.3 电泳和蛋白质印迹分析: 按文献 [4] 的方法, 对获得的阳性 pGEX 克隆在含氨苄青霉素的

* 国家自然科学基金资助项目 (39770679) 和深圳市科委重大项目 (97-15).

** 通讯联系人.

Tel: 027-83692703, E-mail: zhoubk@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2002-08-16, 接受日期: 2002-09-28

LB 培养基中 37℃ 培养过夜后, 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 30℃ 诱导 6 h 后, 加入 DTT 至终浓度 5 mmol/L, 然后用超声粉碎细菌, 离心后上清可直接用于分析. 沉淀用 6 mol/L 尿素重浮, 在冰上搅拌 2 h 后, 4℃ 离心, 收集液相用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹 (Western blot) 分析. 蛋白质印迹采用弓形虫病人阳性血清为一抗, 二抗为羊抗人 IgG-HRP. 采用 DAB 显色方法进行结果鉴定.

1.2.4 重组蛋白的纯化: 采用 Amersham pharmacia 公司的 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱, 按说明进行人工层析纯化重组蛋白.

1.2.5 IgM-ELISA 检测不同病人的血清: 按 Aubert 等^[5]的方法进行 IgM-ELISA 分析. 在酶标板上 4℃ 过夜包被羊抗人 IgM, 洗涤后加入小牛血清 37℃ 封闭 2 h, 洗涤, 加入待检测的血清样本, 37℃ 孵育 1 h. 洗涤后加入纯化的 P35-GST 蛋白, 4℃ 孵育 18 h, 洗涤, 加入兔抗 GST-IgG 抗体, 4℃ 孵育 3 h, 洗涤, 加羊抗兔 IgG-HRP 抗体, 4℃ 孵育 3 h, 洗涤后二氨基联苯胺 (DAB) 显色. 测定 490 nm 吸光度值 (A_{490}). 非重组的 GST 蛋白作为阴性对照, 不含重组质粒的空白 JM109 细菌裂解液为空白对照.

2 结果与讨论

2.1 P35 的克隆鉴定

P35-pGEX 亚克隆分析见图 1. 可见克隆的 P35 片段大小约为 1 100 bp, 与预计的克隆片段大小符合.

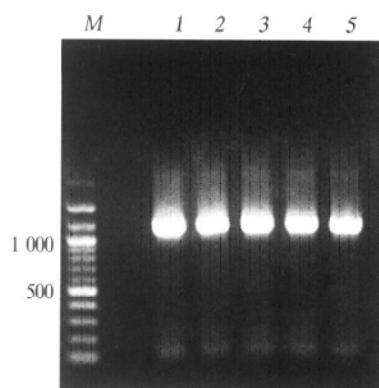


Fig. 1 PCR analysis of P35-pGEX positive clone

M: DNA marker; 1~5: PCR of positive clone.

对 P35-pGEM-T 克隆的 5' 端接头处测序结果如下: 1 CTCGTCGTGC ATCTGTT GGA TCC ATGGCTT TACCATTGCG TGTTTCGGCC AG-

GGTGTTCCG; 61 TGGTCTTCGC TGTCTTTGGT GTAGCTCGCG CCATGAACGG TCCTTTGAGT TATCATCCAA; 121 GCAGTTACGG AGCGTCGTAT CCGAATCCAG ANCNCCCCC CANNANNTN NAC.

可见开放阅读框的 ATG 启动子 (黑体表示) 紧接在酶切位点 GGA TCC 后 (用方框表示), 已按正确的方向和阅读框插入 pGEM-T 载体中. 排除了因为 ATG 启动子的错误插入而发生的移码突变, 确保所表达的重组蛋白是全长的 P35-GST 蛋白质.

2.2 P35-GST 蛋白在大肠杆菌中的表达和鉴定

P35-GST 的 SDS-PAGE 结果见图 2a. 用薄层扫描发现 P35-GST 的表达占全细胞裂解液的 10%, 占细胞裂解液上清的 17%, 占沉淀的 0.5%~1%. 用 Bradford 法测定蛋白质含量显示: 每升培养液中菌体总蛋白量约为 6 g, 可溶性蛋白质总含量约 3 g/L, 纯化后 1L 培养液约含 P35-GST 蛋白 15 mg.

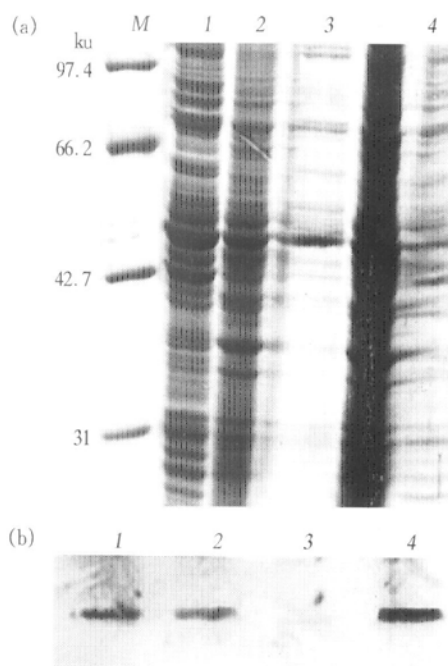


Fig. 2 SDS PAGE and Western blot of P35-GST

(a) SDS-PAGE. M: protein marker; 1: total cell lysis; 2: supernatant of cell lysis; 3: purified P35-GST; 4: pellet of cell lysis. (b) Western blot. 1: supernatant of cell lysis; 2: total cell lysis; 3: supernatant of nonrecombinant JM109; 4: purified P35-GST protein.

P35-GST 在转化阳性细菌裂解液上清中的含量高于沉淀, 表明 P35-GST 是一个亲水性蛋白质, 与膜蛋白的特征符合. P35-GST 的分子质量约为

60 ku, GST 蛋白的分子质量为 26 ku, 因此 P35 的分子质量约为 35 ku, 与预测的 P35 分子质量相符.

Western blot 结果见图 2b, 结果显示 P35-GST 与阳性病人血清中的抗体有特异性反应, 而阴性 JM109 菌无反应, 表明该蛋白质为弓形虫病人所特有, 与文献报道相同^[1-3, 5, 6]. 同时发现 P35-GST 与阳性血清除在 60 ku 部位有一特异性的反应条带外, 无其他反应条带, 显示 P35-GST 可特异地检测弓形虫阳性血清.

2.3 IgM-ELISA 分析

对 15 例急性感染病人、15 例 IgM 和 IgG 均为阳性的既往感染病人、15 例 IgM 阴性和 IgG 阳性的既往感染病人、15 例正常人的 IgM-ELISA 分析结果见表 1.

Table 1 P35-IgM-ELISA result of different serum samples

	Number of samples	IgM-ELISA
Acute infection	15	0.674 ± 0.236 ¹⁾
Chronic infection (IgM negative)	15	0.140 ± 0.107 ^{1), 2)}
Chronic infection (IgM positive)	15	0.285 ± 0.163 ^{1), 2), 3)}
Negative control	15	0.036 ± 0.029

¹⁾ means significant difference with negative control ($P < 0.05$); ²⁾ means significant difference with acute infection ($P < 0.05$); ³⁾ means significant difference with IgM negative chronic infection ($P < 0.05$).

从表 1 中可见, 对 60 例经血清学和弓形虫凝集试验确诊的不同血清, P35-GST 融合蛋白作为抗原进行的 IgM-ELISA 血清学试验可明显区分急性、IgM 阳性既往感染、IgM 阴性既往感染、阴性对照等 4 种血清标本. 急性感染患者的 IgM-ELISA 滴度最高, IgM 阳性的既往感染次之, IgM 阴性的既往感染更低, 阴性对照最低, 各种血清标本的 ELISA 读数相互间均有明显差异. 表明 P35-IgM-

ELISA 可明显区分急性和既往感染.

由于目前普遍采用检测 IgM 滴度改变的方法确定病人是否为急性感染. 但 IgM 抗体可在感染后的一年时间内均为阳性, 因此在没有系列血清学资料的前提下, 单纯采用 IgM 滴度的改变无法确定是否有急性感染. P35-IgM-ELISA 可明显区分急性和既往感染, 包括 IgM 阳性的既往感染等优点. 由于对急慢性感染的处理方法不同, 而我国一般对高危人群采取一次检测进行筛查而不是进行系列血清学筛查的方法, 因此 P35-GST 在弓形虫的早期诊断中将有很大的应用前景.

弓形虫血清学诊断是目前最常用的弓形虫感染筛查方法, 诊断所用的抗原一般采用小鼠或组织培养的弓形虫速殖子进行制备, 由于速殖子抗原包含了宿主或培养物中的其他成分, 而且目前还没有制备速殖子抗原的标准方法, 因此不同方法制备抗原的诊断试剂盒所得到的结果往往有较大的差异. 重组融合蛋白可以大量生产, 蛋白质印迹分析表明其可与弓形虫阳性血清反应, 在制备试剂盒, 建立标准化检测方法上将有很大的用途.

参 考 文 献

- 1 Couvreur G, Sadak A, Fortier B, *et al.* Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 1988, **97** (1): 1~10
- 2 Hoewe D K, Honore S, Derouin F, *et al.* Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 1997, **35** (6): 1411~1414
- 3 Li S, Maine G, Suzuki Y, *et al.* Serodiaagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection with a recombinant antigen. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** (1): 179~184
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 822~894
- 5 Aubert D, Maine G T, Villena I, *et al.* Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii* specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** (3): 1144~1150
- 6 Howe D K, Crawford A C, Lindsay D, *et al.* The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 1998, **66** (11): 5322~5328

Detection of *Toxoplasma gondii* Acute Infection Using Complete Recombinant P35 Surface Antigen and IgM-ELISA*

LÜ Bin²⁾, WU Shao-Ting¹⁾, ZHOU Yi-Kai²⁾**, XU Shun-Qing²⁾**,
ZHANG Ren-Li¹⁾, GAO Shi-Tong¹⁾, LIN Min¹⁾, ZHANG Zhi-Ren²⁾

(¹⁾ Shenzhen Center of Chinese Academy of Preventive Medicine, Shenzhen 518020, China;

(²⁾ Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract In order to Detect *Toxoplasma gondii* acute infection in serum samples by complete recombinant P35 surface antigen protein, JM109 cell line which can express P35-GST protein was constructed. Then the recombinant protein was separated and purified using affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blot were used to analyse the characters of this recombinant protein. Later P35-GST protein was used as antigen to detect *Toxoplasma gondii* infection by IgM-ELISA. The result of SDS-PAGE showed that the recombinant protein was about 60 ku and was an hydrophile protein. It reacted specifically with *Toxoplasma gondii* positive serum in Western blot analysis. 60 different serum samples were detected in IgM-ELISA tests using P35-GST as antigen. It was showed that P35-GST can separate acute infection, chronic infection with IgM and IgG positive, chronic infection with IgM negative and IgG postive significantly. P35-GST was very useful in detecting acute and chronic infection of *Toxoplasma gondii*. It can be concluded that P35-GST can effectively separate acute and chronic infection using serum samples.

Key words *Toxoplasma gondii*, P35 surface antigen, complete recombinant protein, IgM-ELISA

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39770679) and Key Program of Shenzhen City (97-15).

** Corresponding author. Tel: 86-27-83692703, E-mail: zhuyk@mails.tjmu.edu.cn

Received: August 16, 2002 Accepted: September 28, 2002