

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.16.008

弓形虫 CDPK5 基因多克隆抗血清的制备及功能鉴定*

钟亮尹,刘思敏,曾智华,徐晓松,卢汉威,周文超,黄演婷,卢景辉,陈思聪

(广东药科大学附属第一医院检验科,广州 510080)

[摘要] **目的** 筛选弓形虫(Tg)CDPK5 基因序列的免疫多肽,将合成多肽免疫新西兰白兔制备多抗血清,并对其功能进行鉴定。**方法** 利用生物信息学的方法分析确定 Tg CDPK5 序列免疫多肽,再用合成的多肽免疫新西兰白兔制备多抗。收集多抗血清,酶联免疫吸附测定(ELISA)测定多抗滴度,蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定免疫活性,免疫荧光实验分析 Tg CDPK5 的亚细胞定位。**结果** 通过生物信息学分析,选择 Tg CDPK5 序列 N 端一段长 17 bp 的多肽序列作为免疫多肽;用合成的多肽免疫兔子,成功获得多抗血清。ELISA 测定多抗血清效价为 1:640 000;Western blot 证明该多抗血清能特异性识别 Tg CDPK5 (75.4×10^3) 条带;免疫荧光实验结果表明,该多抗能特异性识别弓形虫内源 Tg CDPK5 蛋白。**结论** 研究根据 Tg CDPK5 序列信息的分析,获得 Tg CDPK5 序列免疫多肽,并制备免源多克隆抗体。

[关键词] 弓形虫;CDPK5 基因;多抗血清;免疫荧光**[中图分类号]** R392.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)16-2182-04**Preparation of the polyclonal antibodies of CDPK5 gene from toxoplasma gondii and the identification of its functions***

Zhong Liangyin, Liu Simin, Zeng Zhihua, Xu Xiaosong, Lu Hanwei, Zhou Wenchao, Huang Yanting, Lu Jinghui, Chen Sicong

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangdong

Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[Abstract] **Objective** Screening the immune polypeptide sequence of toxoplasma (Tg) CDPK5 gene, which were synthesized and then immunized the New Zealand white rabbit to prepare antiserum, and identification its function. **Methods** Bioinformatics analysis was used to determine the immune peptide of Tg CDPK5 sequence, which were artificially synthesized to immune white rabbit to prepare antiserum. The titers of antibodies were determined by ELISA and the polyclonal antibodies were verified with CDPK5 antigen by Western blot. The sub-cellular localization of Tg CDPK5 were obtained by immunofluorescence assay. **Results** 17 bp peptide sequence from the Tg CDPK5 N-terminal were chosen as immune polypeptide by bioinformatics analysis. Synthetic peptide were used to immune rabbit to obtain polyclonal antiserum. The result showed that the titer of the obtained ployantibody were 1:640 000; Western blot demonstrated that the antiserum could specifically recognize Tg CDPK5 (75.4×10^3); Immunofluorescence assay revealed this antibody could specifically recognize the endogenous Tg CDPK5 of Toxoplasma gondii. **Conclusion** According to the analysis of Tg CDPK5 sequence information, this study successful obtained Tg CDPK5 polyclonal antibody.

[Key words] toxoplasma gondii; CDPK5 gene; antiserum; immunofluorescence assay

弓形虫(*Toxoplasma gondii*, Tg)是一种顶复门寄生虫,可感染几乎所有哺乳动物和鸟类,引起人兽共患的弓形虫病^[1]。由于其传播能力极强,对畜牧业和公共卫生安全的危害极大。全世界大约有 1/3 的人感染 Tg^[2],但多数为隐形感染。在免疫力低下或免疫缺陷患者中,这种潜伏性感染可被激活,进而引起严重的损害;孕妇感染 Tg 可引起流产、死胎或畸形;另外,30%~70%患有先天性弓形虫病的新生儿会继发视网膜病变^[3]。目前,治疗弓形虫病的经典药物仍以乙胺嘧啶联合磺胺类药物为主,但其缺点是疗程长达 1 年以上,具有不良反应,而且仅对 Tg 滋养体有抑制效果,不能治愈弓形虫病^[4];阿奇霉素是惟一对包囊和速殖子均有一定作用的药物,半衰期长,不良反应较少,但长期服用会产生细胞毒性和耐药性。因此,面对不断增长的 Tg 感染患者和 Tg 抗药性的产生,开发新的抗 Tg 药物不但至关重要而且面临着紧迫性。

钙依赖的蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)家族是一类钙离子(Ca^{2+})结合的丝氨酸/苏氨酸蛋白激

酶,对 Ca^{2+} 信号转导通路下游元件的调控具有重要作用。 Ca^{2+} 作为 Tg 细胞内多种生理生化过程的重要环节,其水平的异常直接导致细胞功能的异常。研究发现,Tg CDPKs 可参与调控 Tg 入侵宿主细胞、蛋白分泌、运动,及分化等生理过程^[5]。除此之外,一些 CDPKs 具有良好的免疫原性,不仅能刺激淋巴细胞增殖,还能诱导机体产生特异性抗体,被认为是研发针对顶复门原虫新型生物制剂的候选基因^[6]。

目前研究发现,Tg CDPKs 基因大约有 11 个。已经被证实的有 CDPK1、CDPK2、CDPK3 及 CDPK4^[7]。进一步研究发现,Tg CDPK5 可能与 Tg 的细胞毒力、侵袭力相关^[8]。然而关于 Tg CDPK5 对 Tg 生长、毒力、侵袭力、微线体分泌,以及水甘油渗透性的调控作用报道较少。为了研究 Tg CDPK5 对 Tg 的生物学功能,Tg CDPK5 蛋白多抗是实验研究的重要材料之一。本研究拟通过经典多抗制备方法获得兔抗 Tg CDPK5 多克隆抗体,并通过相应检测方法,确定该多抗的效价以及特异性,旨在为 Tg CDPK5 基因后续研究奠定基础。

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(2015120124650789)。 作者简介:钟亮尹(1966—),副主任技师,本科,主要从事临床免疫学研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 Tg 虫株 Tg 虫株为刚地 Tg ME49 株(Ⅱ型虫株),液氮保种,复苏后腹腔接种小鼠传代。

1.1.2 主要试剂 免疫多肽由广州瑞博奥生物科技有限公司合成;马来酰亚胺活化的 BSA、KLH 偶联试剂盒(MBK1)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、脱脂奶粉为 Sigma 公司产品,多聚甲醛,30% 丙烯酰胺购自弗德生物,弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、购自 Roche 公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz,蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;PVDF 膜购自 BioRad 公司,TMB 底物显色液、Alexa Fluor488 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自 Invitrogen,蛋白免疫印迹法(Western blot)底物显色液购自 Thermo fisher Scientific,BSA、TritonX-100 购自碧云天生物技术研究所,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 Tg CDPK5 免疫多肽的获得 根据 NCBI 中 TgCDPK5 序列(NCBI 序列号:XM_002366128.1),使用 TMHMM 软件和 BCPREDS Server 1.0 软件对 TgCDPK5 的跨膜区和 B 细胞线性抗原表位进行预测。选取具有高度抗原性的非跨膜区保守序列,并委托广州瑞博奥生物科技有限公司合成多肽。

1.2.2 多克隆抗体的制备与纯化 合成的多肽用试剂盒偶联 BSA 或 KLH。将偶联多肽溶于无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,以等体积的比例分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂进行充分乳化作为免疫原。将获得的免疫原免疫新西兰大白兔(雄性,1.5 kg)。经背部皮下多点注射,第 3 次免疫 3 d 后,耳缘静脉取血,测抗体效价。待血清效价达到一定值后,常规心脏取血,收集血清于-80℃保存备用。用结合缓冲液稀释多抗血清后于 0.45 μm 滤膜过滤,加样到 IgG 亲和层析柱,流速 1 mL/min 至基线,用洗脱缓冲液(100 mmol/L 甘氨酸-HCl,pH 2.5)洗脱后,收集洗脱峰为纯化的多克隆抗体。取 5 μL 进行十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),观察纯化后结果。

1.2.3 多克隆抗血清效价鉴定 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测抗血清效价:每孔 100 ng 包被原于 4℃ 包被过夜,第 2 天用 1% BSA-PBS 封闭 1 h;洗涤后,加入梯度稀释的多克隆抗血清孵育 2 h,以正常兔血清作为阴性对照。洗涤后,加入 1:10 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 孵育 1 h,TMB 显色。用 ELISA 检测仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

1.2.4 多抗血清免疫活性鉴定 样本为 1×10⁷ 数量的纯化的 Tg,Tg 用人包皮成纤维细胞(HFF-1)培养,用 3 μm 滤膜纯化。超声裂解虫体后,取上清液经 12% SDS-PAGE、转膜、封闭

后,以免疫前正常兔血清为阴性对照,制备的 Tg CDPK5 抗血清为一抗,羊抗兔 HRP-IgG 为二抗,ECL 显色,观察结果。

1.2.5 免疫荧光实验分析 Tg CDPK5 的亚细胞定位 以免疫前正常兔血清为阴性对照,取纯化的 Tg 涂于激光共聚焦专用培养皿中,室温晾干。加入 4% 多聚甲醛固定 10 min,PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。加入 0.1% Triton-X-100,透化 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入 PBS 固定 30 min 后,加入制备的 Tg CDPK5 抗血清作为一抗 1:100 稀释,孵育 1 h。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。1:1 000 的比例加入二抗(Alexa Fluor488 标记的羊抗鼠 IgG),孵育 1 h,避光,室温。PBS 洗涤 3 次。加入 DAPI 染色 10 min,PBST 洗涤 1 次,上机照相。

2 结 果

2.1 Tg CDPK5 免疫多肽序列分析 利用 TMHMM 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析 Tg CDPK5(GenBank:EPT26997.1)的跨膜区域,分析结果显示该基因无跨膜区(图 1)。因此在选择多肽制备抗体时不用避免跨膜区,可以选择氨基酸序列 N 端或 C 端免疫原性评分较高的区域选择多肽。利用 IEDB 网站(<http://www.iedb.org/>)中的 Bepipred Linear Epitope Prediction 软件(<http://tools.immuneepitope.org/bcell/help/#Bepipred>)预测 B 细胞表位。基线以上黄色区域评分较高的可以作为候选的多肽,见图 2。

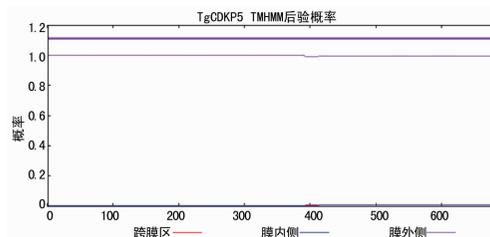


图 1 Tg CDPK5 的跨膜区分析

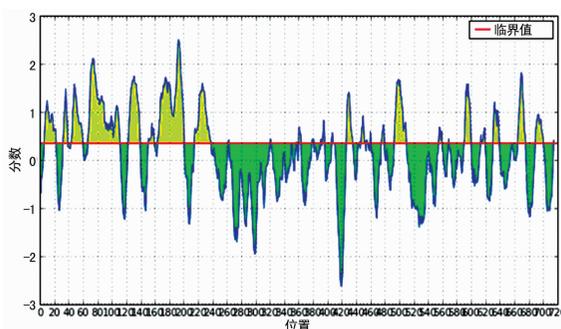


图 2 B 细胞表位分析

表 1 Tg CDPK5 序列 N 端细胞表位分析评分较高的多肽序列

序号	起点位置	末端位置	多肽序列	长度(bp)
1	6	22	AATKTSPVTAVVPGDSV	17
2	32	38	NGDATGA	7
3	44	59	STPRTEKASATRCSTP	16
4	67	111	GRNTDVPEDGKDAAA V GEGNTRKRLDDFDADYGCRRGGDCDSTK	45
5	123	139	N121EGKDKSQHDRREP	17
6	151	159	MNASEASRW	9
7	164	200	QCNSTCPGDGFDGASGTTAADG181 PASPQPEAPVF	37
8	215	238	QQITDIYDTPNGTSLGKGSYGSVV	24

2.2 免疫多肽的确定 表1列举了Tg CDPK5序列N端的评分较高的多肽。按照结合多肽长度为15~20 bp较为合适的原则,选择表格中红色标注的多肽序列进行合成,获得Tg CDPK5免疫多肽。

2.3 多克隆抗血清效价鉴定 以纯化的Tg CDPK5合成多肽作为抗原包被ELISA反应板,已采集的多克隆抗体为一抗,同时以未免疫的兔血清为阴性对照,1:10 000稀释的HRP标记羊抗兔IgG为二抗,效价以实验组的 $A_{450}(P)$ /阴性血清对照组的 $A_{450}(N)$ >2.1作为判定阳性的标准,检测结果显示多抗血清的效价为1:640 000,见图3。对该多克隆抗体进行亲和纯化,纯化结果见图4。

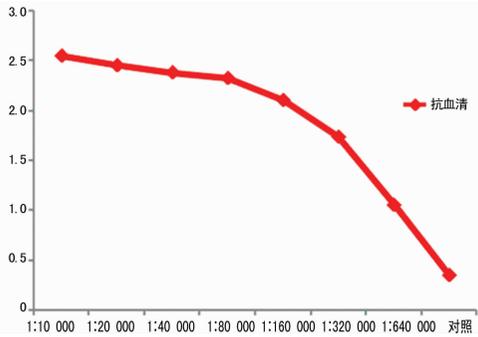
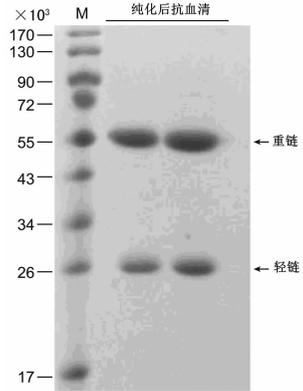


图3 抗TgCDPK5蛋白多克隆抗血清效价分析

2.4 多抗血清免疫活性鉴定 Western blot实验结果表明,以免疫前正常兔血清作为对照,制备的抗Tg CDPK5抗体能特异性识别Tg的天然Tg CDPK5蛋白,在约 75×10^3 处可见一条特异性条带,而正常兔血清中未见(图5)。可见抗Tg CDPK5血清能特异性识别Tg CDPK5(75.4×10^3)条带。

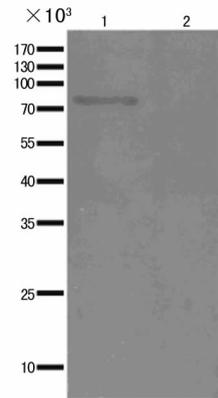
2.5 免疫荧光实验 以免疫前正常兔血清作为阴性对照,进一步的免疫荧光实验结果表明,该多克隆抗体能特异性识别

Tg内源Tg CDPK5蛋白。除此之外,通过DAPI核染发现,该蛋白以可溶的形式存在于虫体细胞质中。



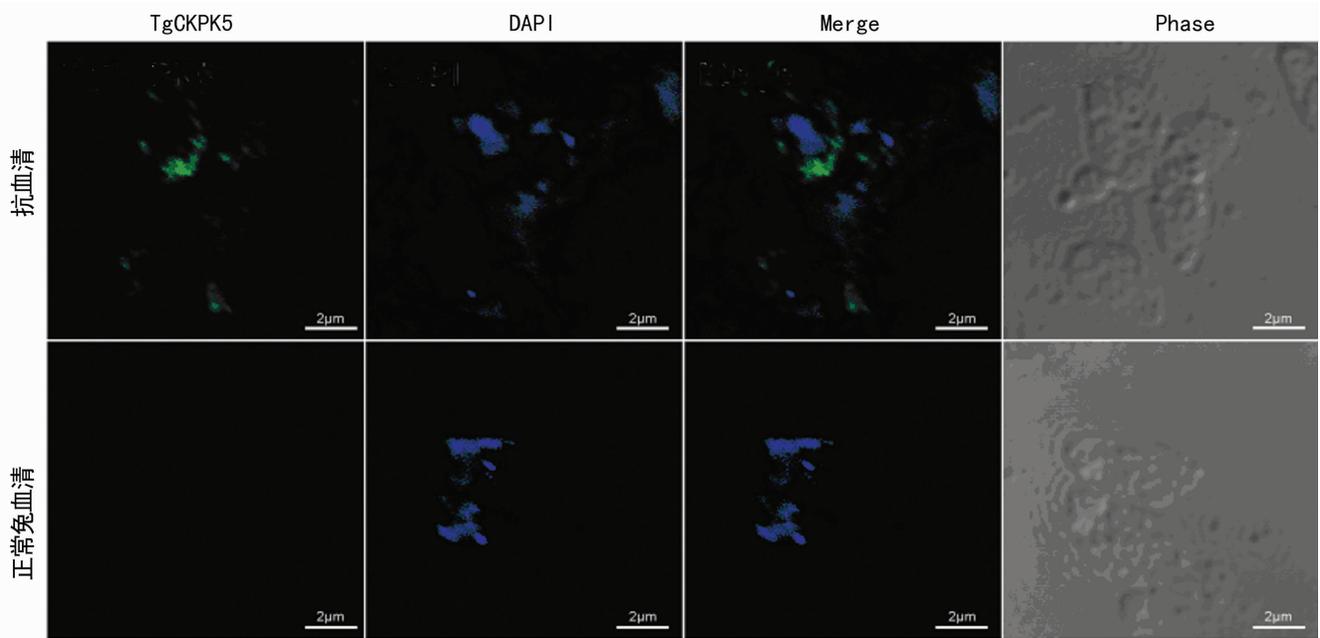
M:Marker.

图4 Tg CDPK5多抗纯化



1:抗血清;2:正常兔血清。

图5 多克隆抗血清对天然的TgCDPK5蛋白的识别



绿色荧光:CDPK5;蓝色荧光:细胞核。

图6 免疫荧光实验检测Tg CDPK5蛋白细胞定位

3 讨论

CDPKs是一类庞大的蛋白激酶家族,属于丝氨酸/苏氨酸

类蛋白激酶,广泛存在于各种植物及原生动物的。研究表明,Tg CDPK1能够有效的调控Ca²⁺依赖的胞外分泌,抑制Tg

CDPK1 的表达导致 Tg 运动性降低、入侵/离开宿主细胞能力减弱^[9];Tg CDPK3 与恶性疟原虫 CDPK1(PfCDPK1)高度同源(约 50%),对 Tg 离开宿主细胞的过程至关重要^[10-11]。Zhang 等^[8]将真核表达质粒 pVAX-TgCDPK5 注射昆明鼠后产生强烈的细胞 Th1 免疫应答并一定程度上提高了感染 Tg 小鼠的生存时间,提示 TgCDPK5 可能与细胞毒力、侵袭力相关。本研究所涉及的 Tg CDPK5 基因(NCBI 检索号:EPT26997.1)是 Tg 重要的功能基因,由 682 个氨基酸组成,其定位与生物学功能尚不清楚。关于 Tg CDPK5 对 Tg 生长、毒力、侵袭力、微线体分泌,以及水甘油渗透性的调控作用均未见报道。

为探究 Tg CDPK5 编码蛋白的功能,获得 Tg CDPK5 抗体显得意义重大。本实验通过生物信息学分析获得 Tg CDPK5 免疫多肽,成功制备了兔抗 Tg CDPK5 多克隆抗体。对于 CDPKs 在功能方面的研究通常采用生化方法来进行,可直接测定或使用特异性的激活剂来识别该酶的特异调节因子^[12]。除此之外,较难通过直接提取和纯化的方式获得该蛋白。虽然体外表达目的蛋白可以获得具有天然活性的蛋白激酶,但该方法繁琐,需较大工作量。本研究通过对 Tg CDPK5 的序列信息分析,发现该基因无跨膜区,因此可以选择氨基酸序列 N 端或 C 端免疫原性评分较高的区域选择多肽。通过对 Tg CDPK5 蛋白的免疫原性分析,本研究选定该序列 N 端一段长 17 bp 的多肽序列进行合成,从而获得制备多抗所需的 Tg CDPK5 免疫多肽。该方法较之体外表达目的蛋白的方法更加简便直接,可以获得特异性较强的抗原,为后续抗体的成功制备奠定基础。

综上所述,本实验不仅制备了能特异性识别 Tg 内源性 Tg CDPK5 蛋白的兔抗 Tg CDPK5 多克隆抗体,还利用该多抗证实了 Tg CDPK5 蛋白以可溶形式存在于虫体细胞质中。在接下来的实验中,该抗体将会发挥更多使用价值。了解 Tg CDPK5 的作用机制,针对 Tg CDPK5 独特的生物学特性进行药物设计,对治疗 Tg 的药物研发具有指导性作用,也对顶复门其他原虫的药物研究有一定借鉴意义。

参考文献

- [1] Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man [M]. FLA: CRC Press, 1998: 22-50.
- [2] Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, et al. Human impact

on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*; example of the anthropized environment from French Guiana [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(6): 1378-1387.

- [3] Samuel R, Bettiker RL, Sul B. AIDs related opportunistic infections, going but not gone [J]. *Arch Pharm Res*, 2002, 25(3): 215-228.
- [4] 唐宏霞,熊学峰,秦志强.乙酰螺旋霉素联合阿奇霉素治疗孕期弓形虫感染的临床效果 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25(5): 555-556.
- [5] 张念章,陈佳,王萌,等.顶复门原虫钙依赖蛋白激酶的研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(1): 1-6.
- [6] Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of Calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, 23(8): 1613-1627.
- [7] Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3 [J]. *Parasitol Int*, 2009, 58(4): 416-423.
- [8] Zhang NZ, Huang SY, Xu Y, et al. Evaluation of immune responses in mice after DNA immunization with putative *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 5 [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2014, 21(7): 924-929.
- [9] Lourido S, Zhang C, Lopez MS, et al. Optimizing small molecule inhibitors of calcium-dependent protein kinase 1 to prevent infection by *Toxoplasma gondii* [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(7): 3068-3077.
- [10] Choi KM, Kim JY, Moon SU, et al. Molecular cloning of *Plasmodium vivax* calcium-dependent protein kinase 4 [J]. *Korean J Parasitol*, 2010, 48(4): 319-324.
- [11] 孔春林,韩红玉,李洋,等.柔嫩艾美耳球虫钙依赖蛋白激酶 3 基因在毕赤酵母中的表达及分析 [J]. *生物技术通报*, 2012(4): 108-112.
- [12] Kieschnick H, Wakefield T, Narducci CA, et al. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15): 12369-12377.

(收稿日期:2016-01-08 修回日期:2016-03-28)

(上接第 2181 页)

- [8] 陆晓红,李洪刚,秦丽红,等.依达拉奉对阿尔茨海默病大鼠海马神经元晚期糖基化终末产物的影响 [J]. *黑龙江医药科学*, 2012, 35(3): 55-56.
- [9] 王海燕,王影,聂磊,等.左乙拉西坦对癫痫大鼠认知功能

及海马组织中 NPY 和 NCAM-mRNA 表达的影响 [J]. *黑龙江医药科学*, 2013, 36(3): 3-5.

(收稿日期:2015-12-25 修回日期:2016-03-01)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部