

李响, 张小涵, 李美琪, 等. 弓形虫 MIC1 蛋白在杆状病毒系统中的表达及活性分析[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(1): 210-218.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.01.024

弓形虫 MIC1 蛋白在杆状病毒系统中的表达 及活性分析

李响¹, 张小涵¹, 李美琪¹, 陈冉¹, 冯颖¹, 李林², 桑晓宇¹, 杨娜¹

1. 沈阳农业大学动物科学与医学学院/重要家畜疫病研究教育部重点实验室, 沈阳 110866;

2. 辽宁成大生物股份有限公司, 沈阳 110179

摘要 为构建可溶性表达弓形虫 MIC1 蛋白质的重组杆状病毒株并分析重组蛋白质的活性, 通过 PCR 扩增弓形虫 *mic1* 基因的编码序列并连接到 pFastBac 1 质粒中, 将重组的转移质粒转化 DH10Bac 感受态细胞, 通过蓝白斑筛选获得重组杆粒, 转染 Sf9 细胞后连续培养 3 代获得重组杆状病毒株。结果显示, Sf9 细胞在感染后的第 3 天出现典型的细胞病变; 间接免疫荧光和 Western blot 试验结果表明 MIC1 重组蛋白质在感染的 Sf9 细胞中成功可溶性表达; 纯化的 MIC1 重组蛋白质不仅具有结合唾液酸乳糖的能力, 同时能够刺激 Balb/c 小鼠产生较高水平的特异性抗体 (>1:25 600)。以上结果表明, 通过杆状病毒表达系统可获得具有生物学活性的弓形虫 MIC1 重组蛋白质。

关键词 弓形虫; MIC1 蛋白; 杆状病毒系统; 活性分析

中图分类号 S852.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)01-0210-09

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是重要的人兽共患寄生原虫, 其中间宿主范围广, 猫科动物作为其终末宿主^[1]。免疫功能健全者感染弓形虫后通常会呈现隐性感染, 而免疫功能低下或缺陷人群感染弓形虫后会表现出严重的临床症状, 如多器官损害等, 甚至引起死亡^[2]。孕妇感染弓形虫病后会通过胎盘传播给胎儿, 导致胎儿畸形、流产等^[3]。不仅如此, 动物弓形虫病同样给畜牧业带来不可忽视的经济损失^[4-5]。

弓形虫速殖子入侵宿主细胞的过程需多种虫体蛋白质的参与, 其中微线体 (microneme, MIC)、棒状体 (rhoptry, ROP) 和致密颗粒 (dense granule, GRA) 家族蛋白质发挥重要作用。研究表明, MIC1 蛋白质 N 末端具有 2 个微线体黏合重复域 (microneme adhesive repeat, MAR), 能够结合宿主细胞表面唾液酸受体, 介导虫体入侵宿主细胞^[6]。除此之外, MIC1 蛋白质还具有 1 个半乳糖凝集素样结构域 (galectin-like domain)^[7]。由于 MIC1 蛋白质结构复杂, 大肠杆菌表达的 MIC1 重组蛋白质通常以无活性的包涵体

形式存在, 而蛋白质的变性、复性过程复杂、耗时长, 同时也难以保证复性蛋白质的生物活性^[8]。

与原核表达系统相比, 昆虫杆状病毒表达系统对外源蛋白的表达效率高, 能对目的蛋白进行翻译后修饰, 有助于目的蛋白质的正确折叠而保持良好的生物学活性。有研究者将弓形虫膜表面抗原 SAG1 的编码序列 (coding sequence, CDS) 整合到杆状病毒载体, 转染 Sf9 细胞, 获得能够表达 SAG1 蛋白质的重组杆状病毒株^[9-11]。本研究利用 Bac to Bac 杆状病毒表达系统构建能够可溶性表达弓形虫 MIC1 蛋白质的重组杆状病毒, 并评价重组蛋白质的生物学活性, 旨在为弓形虫蛋白质的可溶性表达策略提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、细胞株和实验动物

pFastBac 1 质粒、pET22b 质粒、DH10Bac 感受态细胞和草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31902297; 31672546; 32072891); 辽宁省教育厅项目 (LJKZ0673; LSNQN202003); 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目 (RC 210291)

李响, E-mail: 2020240596@stu.syau.edu.cn

通信作者: 桑晓宇, E-mail: xysang2016@syau.edu.cn

Sf9 均由沈阳农业大学动物科学与医学学院预防兽医学教研室保存; *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; Balb/c 小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司, 小鼠的饲养以及试验的开展均通过沈阳农业大学实验动物福利伦理审查委员会的审查和批准。

1.2 主要试剂和耗材

PrimerSTAR Max DNA Polymerase、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、小型质粒提取试剂盒和血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; SIM SF Expression Medium 购自北京义翘神州科技股份有限公司; 胎牛血清、青霉素和链霉素购自以色列 BI 公司; LipoInsectTM 转染试剂、杆状病毒穿梭载体 Bacmid 小量抽提试剂盒、5 \times SDS 上样缓冲液、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)、TMB 显色液、卡那霉素、庆大霉素和四环素购自上海碧云天生物技术有限公司; 甘氨酸购自北京酷来博科技有限公司; 牛血清白蛋白 V (BSA) 购自北京索莱宝科技有限公司; Alexa Flour@488 goat anti-mouse IgG(H+L) 购自上海 Invitrogen 公司; ProLongTm Gold Antifade Mountant with DAPI 和 PageRMLerTM Prestained Protein Ladder 购自美国 Thermo Fisher 公司; DNA 标准 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 唾液酸乳糖-聚丙烯酰胺-生物素偶联物(3' sialyllactose polyacrylamide biotin conjugate, 3' SL 和 6' sialyllactose polyacrylamide biotin conjugate, 6' SL) 购自美国 GlycoNZ 公司; 链霉亲和素传感器 (Streptavidin, SA) 购自德国赛多利斯公司。

1.3 pET22b-MIC1 质粒的构建

收集细胞培养的弓形虫 RH 虫株速殖子, 提取虫体总 RNA 后反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 根据 *mic1* 基因的 CDS 序列, 设计带酶切位点的引物 MIC1-*Nde* I -5 与 MIC1-*Xho* I -3(表 1), 扩增目的片段, 再经 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切, 获得带有酶切位点的目的片段。利用 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切 pET22b 载体, 并分别纯化、回收酶切后的目的片段和线性化载体, 通过 T4 DNA 连接酶连接目的片段与线性化载体, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性菌落, 小提质粒获得连接产物 pET22b-MIC1。

1.4 pFastBac 1-MIC1 转移质粒的构建

设计带酶切位点的引物 MIC1-*Xba* I -5 与

MIC1-*Hind* III -3(表 1), 以 pET22b-MIC1 为模板, 扩增目的片段, 再经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切获得带有酶切位点的目的片段, 利用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 pFastBac 1 载体, 并分别纯化、回收酶切后的目的片段和线性化载体, 通过 T4 DNA 连接酶连接目的片段与线性化载体, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性菌落, 小提质粒获得连接产物 pFastBac 1-MIC1 转移质粒。

1.5 重组杆粒 reBacmid-MIC1 的构建

将转移质粒 pFastBac 1-MIC1 转化至 DH10Bac 感受态细胞中, 涂于含 X-gal 的三抗(卡那霉素、庆大霉素和四环素)固体平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 72 h, 通过蓝白斑筛选, 挑取含重组杆粒的白色单菌落到三抗 LB 液体培养基中培养, 并用杆状病毒穿梭载体 Bacmid 小量抽提试剂盒提取重组杆状病毒穿梭载体 reBacmid-MIC1。通过特异性通用引物 pUC/M13-F/R(表 1)对提取的重组杆粒进行 PCR 鉴定, 蓝色菌落(阴性)提取的杆粒 DNA 的扩增产物大小应约为 300 bp, 白色菌落(阳性)提取的重组杆粒 DNA 的扩增产物应约为 3 700 bp。

表 1 引物设计

Table 1 Primer design

引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence
MIC1- <i>Nde</i> I-5	5'-CCTTCATATGGCGTCGCATTCTCAT-3'
MIC1- <i>Xho</i> I-3	5'-TAACCTCGAGAGCAGAGACGGCCG-3'
MIC1- <i>Xba</i> I-5	5'-TTAATCTAGAATGGCGTCGCATTCTC-3'
MIC1- <i>Hind</i> III-3	5'-TTGCAAGCTTTCAGTGGTGGTGG-3'
pUC/M13-F	5'-CCCAGTCACGACGTTGAAAACG-3'
pUC/M13-R	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

注:引物序列中下划线为酶切位点。Note: The underline in the primer sequence represents the cleavage site.

1.6 重组杆粒 reBacmid-MIC1 转染 Sf9 细胞

根据 LipoInsectTM 转染试剂说明书, 将 2 μ L 重组杆粒 reBacmid-MIC1 和 5 μ L 脂质体加到 100 μ L 无血清 SIM SF Expression Medium 培养基中, 轻轻混匀, 室温静置 5 min。将混合液转染处于对数生长期的 Sf9 细胞, 并设置未转染空白对照组。27 $^{\circ}$ C 培养箱培养 72 h 后, 收集上清培养液, 此为第 1 代重组杆状病毒株。进一步, 经 3 次细胞传代获得高滴度重组杆状病毒株。通过基因组 DNA 提取试剂盒提取第 3 次接毒细胞的培养液中杆状病毒基因组 DNA, 并用 pUC/M13-F/R 特异性引物进行 PCR 验证, 扩增产物约为 3 700 bp。

1.7 MIC1重组蛋白质的表达验证

1) Western blot 验证。在 12 孔细胞培养板中每孔接种 1×10^6 个 Sf9 细胞, 接种重组杆状病毒株后在 27°C 恒温培养箱中培养 72 h, 弃去上层培养液后用 PBS 缓冲液洗 3 次, 经超声裂解细胞后, 在 4°C 条件下 $12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min 后分别取 $100\ \mu\text{L}$ 上清和 $100\ \mu\text{L}$ 重悬后的沉淀, 加入 $30\ \mu\text{L}$ SDS 缓冲液, 煮沸 10 min, 制成蛋白样品进行 Western blot 验证。用含 1% BSA 的 PBST 缓冲液作为封闭液, 用 Anti-His mouse 抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 为二抗对目的蛋白进行鉴定, 目的蛋白大小应在 65 ku 左右。

2) 间接免疫荧光 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 验证。在 12 孔细胞培养板中铺入细胞爬片, 每孔接种 1×10^6 个 Sf9 细胞, 接种重组杆状病毒株后在 27°C 恒温培养箱中培养 72 h, 弃去上层培养液后用 PBS 缓冲液洗 3 次, 细胞短暂晾干后, 用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 再用冷 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 然后用封闭液 (含 1% BSA 的 PBST) 37°C 封闭 1 h, 用 Anti-His mouse 抗体为一抗 (稀释液为含 1% BSA 的 PBST), 37°C 孵育 1 h 后, PBS 缓冲液洗涤 3 次, Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L) 作为二抗 (稀释液为含 1% BSA 的 PBST), 37°C 孵育 1 h, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 晾干后, 滴加含有 DAPI 和抗荧光淬灭剂的 ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, 用指甲油封片后, 在正置荧光显微镜下观察。

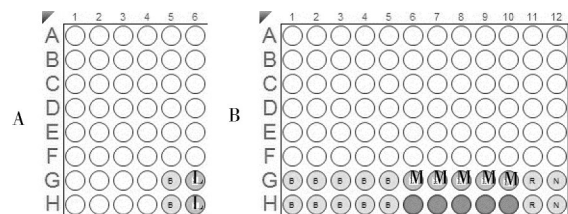
1.8 MIC1重组蛋白质的纯化

吸取 $500\ \mu\text{L}$ 第 3 代重组杆状病毒以 1 MOI 接种到 Sf9 细胞, 在 27°C 培养 72 h, 观察到明显病变后, 将细胞用预冷的 PBS 缓冲液重悬, 在 4°C 条件下 $1\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心后, 用 Binding buffer 重悬细胞, 超声破碎后, 通过亲和层析法纯化重组蛋白质。使用 BCA 试剂盒测定重组蛋白质浓度。

1.9 MIC1重组蛋白质与唾液酸乳糖 (3'SL 和 6'SL) 亲和力检测

本研究使用生物膜干涉技术 (biolayer interferometry, BIL) 检测 MIC1 重组蛋白质与唾液酸乳糖 (3'SL 和 6'SL) 的亲和力。打开 Octet® K2 大分子相互作用仪 (德国赛多利斯公司) 中的 "Data Acquisition" 软件, 设置相应程序, 输入蛋白质相应浓度。SA 传感器预湿后, 将其浸入 PBS 缓冲液中平衡 90 s 后浸入 $2.4\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 的 3'SL 或 6'SL 中 (稀释液为 PBS 缓冲

液), 固化 600 s 后, 再浸入 PBS 缓冲液中; 将固化完成的 SA 传感器浸入含有 0.1% BSA 和 0.5% Tween-20 的 PBS 缓冲液中封闭 90 s; MIC1 重组蛋白质分别稀释至 0.625、1.25、2.5、5、 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ (蛋白质稀释液为 PBST-BSA), 将 SA 传感器按稀释浓度顺序浸入蛋白样品中, 结合 90 s; 再将 SA 生物传感器浸入含有 PBST-BSA 溶液中, 解离 60 s; 最后将 SA 传感器浸入盐酸 ($\text{pH}=0.5$) 溶液中再生 900 s。根据不同稀释浓度, 重复步骤; 检测过程中实时读取结合信号, 根据结合信号分析检测结果。样品盘加样设置如图 1 所示。



A: 探针固化试验样品布局。⊙: PBS 缓冲液; ⊙L: 3'SL/6'SL 溶液; B: 亲和力试验样品布局: ⊙B: 含有 0.1% BSA 和 0.5% Tween-20 的 PBS 缓冲液 (PBST-BSA); ⊙M: 不同浓度的 MIC1 重组蛋白质; ⊙R: 再生液; ⊙N: PBS 缓冲液。A: Layout of loading probe test samples; ⊙B: PBS solution; ⊙L: 3'SL/6'SL solution; B: Layout of affinity test samples; ⊙B: PBS buffer containing 0.1% BSA and 0.5% Tween-20 (PBST-BSA); ⊙M: Recombinant proteins with different concentrations; ⊙R: Hydrochloric acid solution; ⊙N: PBS solution.

图 1 试验样品布局

Fig.1 Layout of test samples

1.10 ELISA 检测免疫小鼠抗体效价

将 6 只 Balb/c 小鼠随机平均分成 2 组, 分别为免疫组 (MIC1 重组蛋白质) 和阴性对照组 (PBS 组)。每组小鼠共免疫 4 次, 每次间隔 14 d, 每只小鼠皮下注射 $100\ \mu\text{g}$ 重组蛋白质或 $100\ \mu\text{L}$ PBS 缓冲液。免疫组小鼠首次免疫使用弗式完全佐剂与蛋白质 1:1 混合注射, 余下 3 次免疫使用弗式不完全佐剂与蛋白质 1:1 混合注射。2 组小鼠在第 4 次免疫后 10 d, 摘眼球采血, 离心分离得到血清; 56°C 灭活血清 30 min, 分装后保存于 -20°C 冰箱。

将 MIC1 重组蛋白质稀释至 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$, 于 4°C 包被抗原 18 h; 向每孔内加入 $150\ \mu\text{L}$ PBST 缓冲液以洗涤酶标板, 洗 3 次, 每次 3 min; 配制 1% BSA 溶液, 加至酶标板内, 每孔 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 封闭 1.5 h; 向每孔内加入 $150\ \mu\text{L}$ PBST 缓冲液以洗涤酶标板, 洗 3 次, 每次 3 min; 稀释灭活的血清加至酶标板中, 每孔 $100\ \mu\text{L}$, 于 37°C 孵育 1 h, 使用 PBST

洗涤酶标板3次;加入稀释的HRP标记的山羊抗小鼠二抗,每孔100 μL,于37 °C中孵育1 h;二抗孵育结束后,用PBST洗涤酶标板3次后加入100 μL TMB显色液,避光条件下显色20 min;向每孔内加入50 μL显色终止液,立即用酶标仪进行OD_{450 nm}测定。

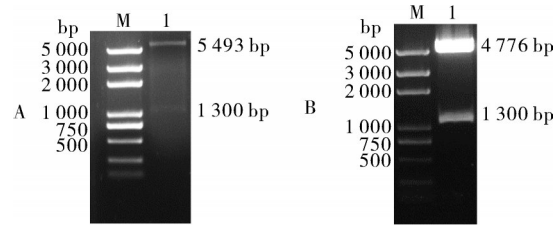
2 结果与分析

2.1 pFastBac 1-MIC1 重组转移质粒的构建

由于pFastBac 1质粒无标签,为了使MIC1重组蛋白质获得His标签,首先通过PCR扩增出弓形虫RH虫株 *mic1* 基因的CDS序列,并通过酶切、连接,将MIC1目的基因连接到pET22b质粒中,通过此方法在MIC1蛋白质C末端添加His标签(图2A)。进一步以pET22b-MIC1质粒为模板,用特异的引物扩增目的片段,再次通过酶切、连接,将其转移到pFastBac 1质粒中(图2B)。

2.2 重组杆粒reBacmid-MIC1构建与PCR鉴定

将鉴定正确的pFastBac 1-MIC1质粒转入DH10Bac感受态中,涂于含X-Gal的三抗(卡那霉素、庆大霉素和四环素)固体平板上,培养72 h后,三抗培养皿上出现白色的阳性菌落和蓝色的阴性菌落,挑取2个白色菌落和1个蓝色菌落,分别置于含有10 μL去离子水的PCR管里混匀,使用PUC/

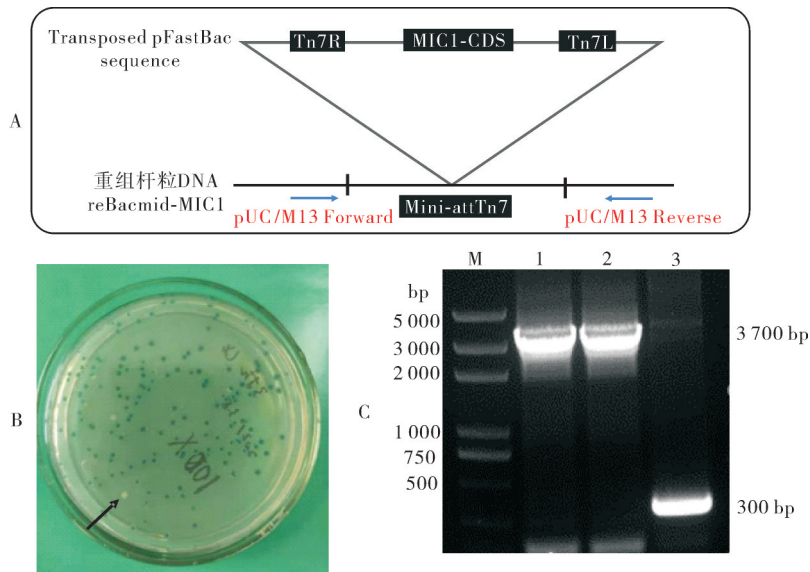


A: pET22b-MIC1 重组质粒的双酶切鉴定结果。M: DL5000 DNA marker; 1: pET22b-MIC1 质粒 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切产物; B: pFastBac 1-MIC1 重组质粒的双酶切鉴定结果。M: DL5000 DNA marker; 1: pFastBac 1-MIC1 质粒 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切产物。A: The result of pET22b-MIC1 recombinant plasmid by double enzyme digestion. M: DL5000 DNA marker; 1: The pET22b-MIC1 plasmid digested with *Nde* I and *Xho* I; B: The result of pFastBac 1-MIC1 recombinant plasmid by double enzyme digestion. M: DL5000 DNA marker; 1: The pFastBac 1-MIC1 plasmid digested with *Hind* III and *Xba* I.

图2 重组转移质粒的构建

Fig.2 Construction of recombinant transfer plasmid

M13通用引物鉴定MIC1重组杆粒。如图3A所示, DH10Bac菌株包含1个杆状病毒穿梭质粒(Bacmid),其上含有个mini-attTn7位点,当pFastBac 1质粒转化到DH10Bac菌中,在辅助质粒的帮助下, mini-Tn7发生转座,从pFastBac 1切下,插入到mini-attTn7位点中,形成重组杆粒。外源基因的插入同时破坏Bacmid上 *lacZα* 基因的表达,因此,在含有X-



A: 转移质粒的 mini-Tn7 转座子插入到 Bacmid 示意图; Transposed pFastBac sequence: pFastBac 载体中转座子序列; B: 重组杆粒的蓝白斑筛选。“→”所指为白色菌落; C: 重组杆粒的 PCR 鉴定。M: DL5000 DNA marker; 1-2: 白色菌落(阳性)的 PCR 产物; 3: 蓝色菌落(阴性)的 PCR 产物。A: Schematic diagram of the insertion of the mini-Tn7 transposon of the transfer plasmid into Bacmid. B: Blue-white spot screening of recombinant Bacmid. "→" refers to white colonies; C: PCR identification of recombinant Bacmid. M: DL5000 DNA marker; 1-2: PCR products of white colonies (positive); 3: PCR products of blue colonies (negative).

图3 重组杆粒的选择与鉴定

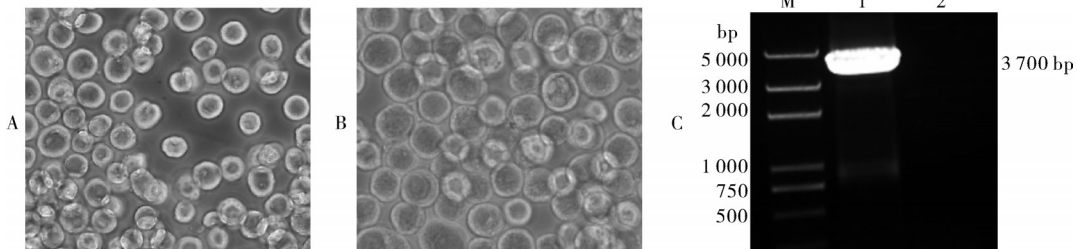
Fig.3 Selection and identification of recombinant Bacmid

Gal的三抗培养基中,发生重组的菌落呈白色,而未重组的菌落为蓝色(图3B);理论上,重组杆粒reBacmid-MIC1的PCR扩增产物大小约为3 700 bp,而未重组的Bacmid为300 bp。如图3C所示,白色菌落和蓝色菌落的PCR扩增产物大小符合预期。

2.3 重组杆状病毒rBV-MIC1的拯救与鉴定

将reBacmid-MIC1转染至Sf9昆虫细胞中,72 h后细胞出现明显病变(如图4A和4B)。与正常组Sf9细胞相比,转染reBacmid-MIC1的Sf9细胞形状

变大、变圆且界限模糊,出现颗粒状物质,细胞容易漂浮。由于拯救的杆状病毒存在于细胞培养液中,分别取转染细胞培养液和正常细胞培养液,提基因组DNA后,用PUC/M13通用引物扩增目的片段。结果如图4C所示,转染细胞组能够检测到目的片段,大小为3 700 bp,而正常细胞组未见目的条带。以上结果表明,本研究成功获得融合MIC1基因CDS序列的重组杆状病毒rBV-MIC1。



A: 正常Sf9细胞的形态(400×);B: 重组杆粒转染Sf9细胞的形态(400×);C: Sf9细胞培养液中重组杆状病毒的PCR鉴定结果。M: DL5000 DNA marker;1: 重组杆粒转染Sf9细胞培养液的PCR产物;2: 正常Sf9细胞培养液的PCR产物。A: Morphology of normal Sf9 cells (400×); B: Morphology of Sf9 cells transfected with recombinant Bacmid (400×); C: The identification of recombinant baculovirus in Sf9 cells culture medium by PCR M. DL5000 DNA marker; 1: The PCR products of culture medium of Sf9 cells transfected with recombinant Bacmid; 2: The PCR products of culture medium of normal Sf9 cells.

图4 重组杆状病毒rBV-MIC1的鉴定

Fig.4 Identification of recombinant baculovirus rBV-MIC1

2.4 IFA检测MIC1重组蛋白质的表达

将rBV-MIC1按1 MOI病毒量接种Sf9昆虫细胞,72 h后对接毒细胞进行IFA试验检测。在激光共

聚焦显微镜下可观察到,感染rBV-MIC1的Sf9细胞出现绿色荧光,阴性未转染组无荧光(图5),结果表明MIC1重组蛋白质在感染的Sf9细胞中成功表达。

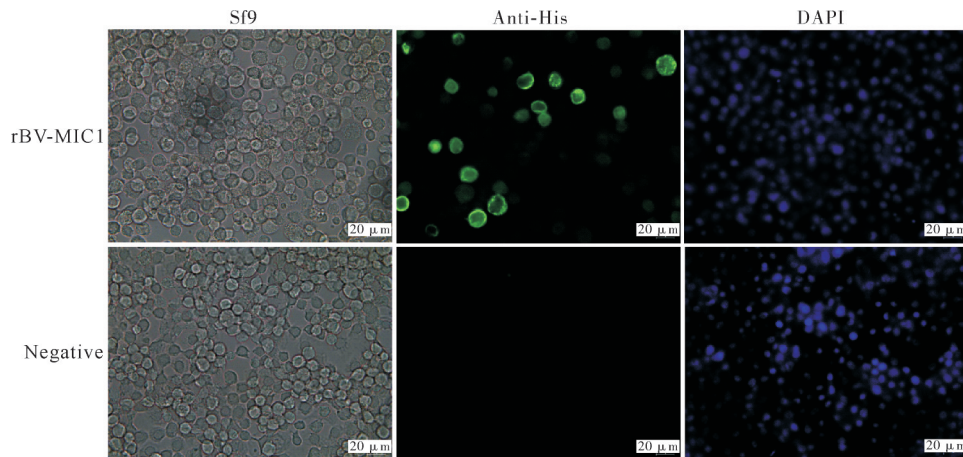


图5 IFA检测MIC1重组蛋白质在感染的Sf9细胞中的表达(200×)

Fig.5 Expression of MIC1 recombinant protein in infected Sf9 cells identified by IFA (200×)

2.5 MIC1重组蛋白的表达与纯化

收集感染rBV-MIC1的Sf9细胞进行Western blot检测。结果显示,MIC1重组蛋白质在细胞裂解液上清和沉淀中都出现目的条带(约65 ku)。表明MIC1重组蛋白质在感染的Sf9细胞中能够可溶性表

达(图6A)。

使用镍柱纯化MIC1重组蛋白质,通过SDS-PAGE和Western blot检测纯化后的重组蛋白质,结果如图6B、6C所示,纯化得到的蛋白质条带单一且大小正确。

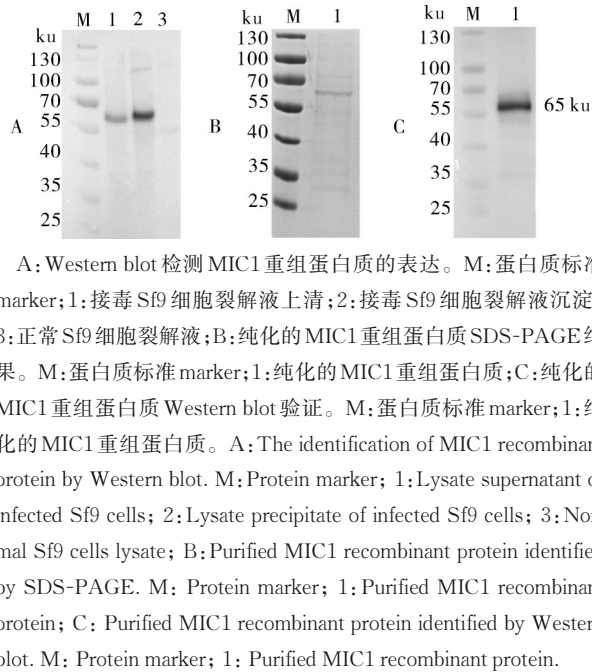
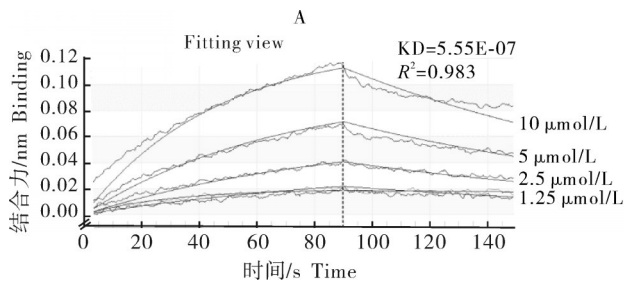


图6 MIC1重组蛋白质的表达与纯化
Fig.6 Expression and purification of MIC1 recombinant protein

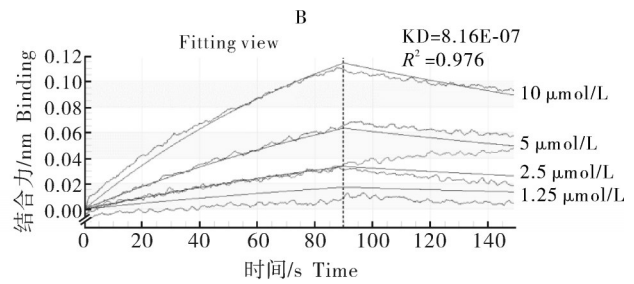


2.6 MIC1重组蛋白与唾液酸乳糖结合能力分析

为了检测纯化的MIC1重组蛋白质的生物活性,我们用生物膜干涉技术(bilayer interferometry, BLI)检测重组蛋白质与3'SL和6'SL的亲合力(KD)。如图7所示, MIC1重组蛋白质与3'SL和6'SL都能结合,并且结合-解离曲线的拟合度较好($R^2 > 0.95$), KD值分别为0.55、0.816 $\mu\text{mol/L}$,说明表达纯化的MIC1重组蛋白质具有结合唾液酸的能力。

2.7 MIC1重组蛋白质的免疫原性分析

ELISA检测血清抗体效价时,通常计算阳性血清与阴性血清的吸光度之比(D_P/D_N),将 $D_P/D_N \geq 2.1$ 时所对应的抗体最高稀释倍数作为抗体的效价。如图8A所示,将免疫组和阴性对照组小鼠血清分别用PBS缓冲液稀释25 600倍时,阳性血清与阴性血清的 D_P/D_N 仍大于4,说明免疫组小鼠血清中抗体效价较高。Western blot验证结果显示,免疫组小鼠血清能够特异地识别弓形虫RH株速殖子的裂解抗原(lysed toxoplasma antigen, TLA),目的条带单一、大小正确;而阴性组小鼠血清没有检测到目的条带(图8B和8C)。



A.3'SL; B.6'SL.

图7 BLI检测MIC1重组蛋白质与唾液酸乳糖亲和力

Fig.7 The affinity between MIC1 recombinant protein and sialyllactose detected by BLI

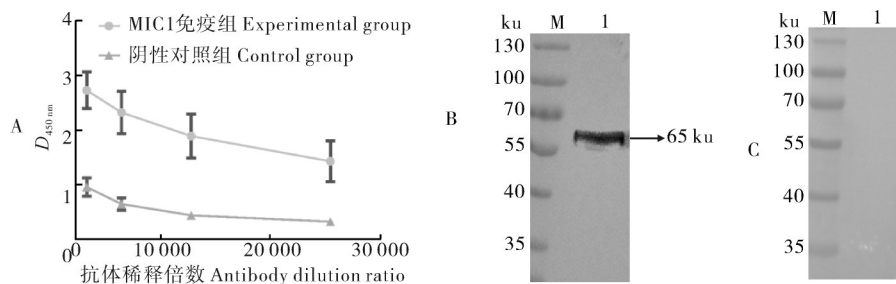


图8 MIC1重组蛋白质多克隆抗体的制备及特异性分析
Fig. 8 Preparation and specificity analysis of polyclonal antibody for MIC1 recombinant protein

A: ELISA方法检测免疫组和阴性组小鼠血清中抗体效价; B: Western blot检测免疫组小鼠血清与弓形虫RH株TLA的反应。M:蛋白质标准marker; 1:弓形虫RH株TLA的免疫印迹; C: Western blot检测阴性组小鼠血清与弓形虫RH株TLA的反应。M:蛋白质标准marker; 1:弓形虫RH株TLA的免疫印迹。A: The antibody titer in serum of mice in immunized and negative group detected by ELISA; B: The reaction between *T. gondii* RH strain TLA and serum isolated from immunized mice by Western blot. M: Protein marker; 1: Immunoblotting of *T. gondii* RH strain TLA; C: The reaction between *T. gondii* RH strain TLA and serum isolated from negative mice by Western blot. M: Protein marker; 1: Immunoblotting of *T. gondii* RH strain TLA.

3 讨论

弓形虫速殖子主动入侵宿主细胞,此过程中需要分泌多种微线体蛋白,其中MIC1、MIC4和MIC6形成复合物定位于虫体表面,并通过MIC1的MAR结构域识别宿主细胞表面唾液酸受体^[12]。有研究表明,MIC1在我国弓形虫优势基因型Chinese 1不同毒力株中的表达存在差异^[13],且有研究还发现MIC1可与小鼠树突状细胞和巨噬细胞的TLR2和TLR4受体结合导致细胞因子风暴和宿主死亡,发挥重要的免疫调节功能^[14]。有研究者通过乳糖凝胶柱亲和层析的方法纯化弓形虫速殖子裂解液,以获得大量的MIC1和MIC4蛋白质免疫小鼠,免疫后的小鼠获得了抵抗弓形虫弱毒株的感染^[15]。已有研究表明,原核系统表达的MIC1重组蛋白质通常以无生物活性的包涵体形式存在,而包涵体的变性、复性耗时长、效率低,不利于蛋白质功能研究的展开^[16-18]。通过稀有密码子在线分析软件(<http://www.detaibio.com/tools/rare-codon-analyzer.html>)分析结果表明MIC1基因在大肠杆菌中使用频率低于20%的密码子占总密码子的19%,而在Sf9细胞中所有密码子的使用频率均高于20%,因此从理论上推测,昆虫杆状病毒表达系统更有利于MIC1重组蛋白质的表达。本研究中我们选择了pFastBac1载体构建表达MIC1蛋白质的重组杆状病毒,但是该载体本身不带标签,为了方便纯化,我们首先将MIC1基因CDS序列插入pET22b载体中,在其C端添加His标签,再通过分子克隆将新构建的表达框插入pFastBac1载体中,获得的重组杆状病毒能够在Sf9细胞中可溶性表达目的蛋白质。

为了鉴定MIC1重组蛋白质是否具有唾液酸受体结合,本研究采用生物膜干涉(BLI)技术检测重组蛋白质与唾液酸乳糖的结合能力。BLI技术可以实现生物分子之间相互作用的实时分析检测,对生物分子亲和力进行实时、无标记的分析^[19]。有研究者利用BLI技术检测流感病毒血凝素蛋白质与唾液酸乳糖的亲和力^[20]。本研究结果表明MIC1重组蛋白质与2种唾液酸乳糖(3'SL和6'SL)都具有结合能力,亲和力(KD)均在微摩尔级,且与前者的结合力略高于后者;同时,将纯化的MIC1重组蛋白质免疫Balb/c小鼠后,产生较高水平的特异性抗体,抗体滴度高于1:25 600。以上结果表明,重组蛋白质具有良好的生物学活性。

获得大量的高活性的重组蛋白质对于寄生虫学的研究是至关重要的^[21]。孔祥礼等^[22]通过杆状病毒表达系统成功表达恶性疟原虫Kelch 13株F446I(pfK13-F446I)重组蛋白质,获得的重组蛋白质具有很好的可溶性及生物学活性;徐瑞敏等^[23]使用杆状病毒表达系统成功表达日本血吸虫热休克70蛋白(SjHSP70),为深入研究SjHSP70分子的免疫生物学功能提供了材料。Lee等^[24]通过杆状病毒表达系统表达弓形虫ROP18和MIC8重组蛋白质,免疫小鼠后,ROP18+MIC8疫苗在小鼠体内诱导了强烈的体液免疫反应,可以抵抗弓形虫急性和慢性感染。张耀^[25]利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达了捻转血矛线虫H11-1和H11-2糖蛋白,得到的重组蛋白质均具有良好的氨基肽酶活性,且可以与保护性抗体发生免疫反应。尽管杆状病毒表达系统可以对表达的外源蛋白质进行翻译后修饰、加工,表达出接近于天然构象的重组蛋白质,但是由于杆状病毒表达系统在翻译后修饰和蛋白质组装方面与哺乳动物细胞仍有差别,进一步完善杆状病毒表达系统在寄生虫蛋白表达领域中的作用值得深入研究。

参考文献 References

- [1] DUBEY J P, JONES J L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States[J]. International journal for parasitology, 2008, 38(11): 1257-1278.
- [2] 刘荣荣, 张晓磊, 张进顺, 等. 刚地弓形虫ROP10-ROP18真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(6): 612-616. LIU R R, ZHANG X L, ZHANG J S, et al. Construction and identification of eukaryotic expression vector of *Toxoplasma gondii* ROP10-ROP18[J]. Journal of pathogen biology, 2018, 13(6): 612-616 (in Chinese with English abstract).
- [3] 苏朝康, 邬质彬, 郭湘碧, 等. 弓形虫感染对孕妇妊娠结局的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2002, 10(1): 78-79. SU C K, WU Z B, GUO X B, et al. The effects of *Toxoplasma* infection on pregnancy in woman[J]. Chinese journal of birth health & heredity, 2002, 10(1): 78-79 (in Chinese with English abstract).
- [4] 闫鑫磊, 韩汶荧, 韩笑, 等. 内蒙古中西部绵羊弓形虫病血清学调查[J]. 中国兽医杂志, 2021, 57(1): 44-46. YAN X L, HAN W Y, HAN X, et al. Serological investigation of *Toxoplasmosis* in sheep in central and western Inner Mongolia[J]. Chinese journal of veterinary medicine, 2021, 57(1): 44-46 (in Chinese).
- [5] 杨娜, 邢蒙恩, 王大为, 等. 辽宁省猪源弓形虫虫株分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(2): 84-88. YANG N,

- XING M E, WANG D W, et al. Isolation and identification of *Toxoplasma gondii* strains from pigs in Liaoning Province [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(2): 84-88 (in Chinese with English abstract).
- [6] HAGER K M, CARRUTHERS V B. MARveling at parasite invasion [J]. Trends in parasitology, 2008, 24(2): 51-54.
- [7] LOURENÇO E V, PEREIRA S R, FAÇA V M, et al. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin [J]. Glycobiology, 2001, 11(7): 541-547.
- [8] 庄浩瀚, 潘灵韬, 姚晨倩, 等. 弓形虫 SAG1 重组抗体制备及抗原表位鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41(6): 1080-1085. ZHUANG H H, PAN L T, YAO C Q, et al. Preparation of *Toxoplasma gondii* SAG1 recombinant antibody and identification of its epitope [J]. Chinese journal of veterinary science, 2021, 41(6): 1080-1085 (in Chinese with English abstract).
- [9] CHOI W H, PARK J S. Immunogenicity and protective effect of a virus-like particle containing the SAG1 antigen of *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine candidate for toxoplasmosis [J/OL]. Biomedicines, 2020, 8(4): 91 [2023-04-18]. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040091>.
- [10] 陈晓光, 刘国章, 江静波. 含弓形虫 P30 基因插入昆虫杆状病毒的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(4): 270-273. CHEN X G, LIU G Z, JIANG J B. Construction of the recombinant baculovirus including p30 gene of *Toxoplasma gondii* [J]. Chinese journal of parasitology and parasitic diseases, 1996, 14(4): 270-273 (in Chinese with English abstract).
- [11] 严延生, 翁育伟, 杨婷婷, 等. 弓形虫主要抗原基因(SAG1)在昆虫细胞中表达的研究 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(6): 16-19. YAN Y S, WENG Y W, YANG T T, et al. Study on the expression of *Toxoplasma gondii* SAG1 gene in insect cells [J]. Chinese journal of zoonoses, 1997, 13(6): 16-19 (in Chinese with English abstract).
- [12] GARNETT J A, LIU Y, LEON E, et al. Detailed insights from microarray and crystallographic studies into carbohydrate recognition by microneme protein 1 (MIC1) of *Toxoplasma gondii* [J]. Protein science: a publication of the protein society, 2009, 18(9): 1935-1947.
- [13] WANG Y, HAN C J, ZHOU R S, et al. Differential expression of TgMIC1 in isolates of Chinese 1 *Toxoplasma* with different virulence [J/OL]. Parasites & vectors, 2021, 14(1): 253 [2023-04-18]. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04752-z>.
- [14] SARDINHA-SILVA A, MENDONÇA-NATIVIDADE F C, PINZAN C F, et al. The lectin-specific activity of *Toxoplasma gondii* microneme proteins 1 and 4 binds Toll-like receptor 2 and 4 N-glycans to regulate innate immune priming [J/OL]. PLoS pathogens, 2019, 15(6): e1007871 [2023-04-18]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007871>.
- [15] LOURENÇO E V, BERNARDES E S, SILVA N M, et al. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* [J]. Microbes and infection, 2006, 8(5): 1244-1251.
- [16] ALLMAN S A, JENSEN H H, VIJAYAKRISHNAN B, et al. Potent fluoro-oligosaccharide probes of adhesion in *Toxoplasmosis* [J]. ChemBioChem, 2009, 10(15): 2522-2529.
- [17] FRIEDRICH N, SANTOS J M, LIU Y, et al. Members of a novel protein family containing microneme adhesive repeat domains act as sialic acid-binding lectins during host cell invasion by api complexan parasites [J]. Journal of biological chemistry, 2010, 285(3): 2064-2076.
- [18] SAOUROS S, SAWMYNADEN K, MARCHANT J, et al. Complete resonance assignment of the galectin-like domain of MIC1 from *Toxoplasma gondii* in complex with the second EGF domain from MIC6 and the backbone assignment in complex with the third EGF domain [J]. Biomolecular NMR assignments, 2008, 2(2): 175-177.
- [19] 张艳, 姜丽艳, 张晓光, 等. 生物膜干涉技术在生物分子间相互作用检测中的应用 [J]. 生命科学仪器, 2019, 17(2): 49-52. ZHANG Y, JIANG L Y, ZHANG X G, et al. Application of biolayer interferometry in detection of biomolecular interaction [J]. Life science instruments, 2019, 17(2): 49-52 (in Chinese with English abstract).
- [20] CARVALHO S B, MOLEIRINHO M G, WHEATLEY D, et al. Universal label-free in-process quantification of influenza virus-like particles [J/OL]. Biotechnology journal, 2017, 12(8): 28514082 [2023-04-18]. <https://doi.org/10.1002/biot.201700031>.
- [21] 景志忠, 王佩雅, 才学鹏. 杆状病毒表达系统研究进展及在寄生虫基因工程疫苗中的应用前景 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31(3): 43-45. JING Z Z, WANG P Y, CAI X P. Research progress of baculovirus expression system and its application prospect in parasite genetic engineering vaccine [J]. Chinese veterinary science, 2001, 31(3): 43-45 (in Chinese).
- [22] 孔祥礼, 燕贺, 涂宏, 等. 恶性疟原虫 pK13-F446I 基因重组杆状病毒质粒的构建及其在昆虫细胞 SF9 中的表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(4): 442-445. KONG X L, YAN H, TU H, et al. Construction and expression of a recombinant baculovirus plasmid with the K13-F446I gene of *Plasmodium falciparum* in *Spodoptera frugiperda* 9 cells [J]. Journal of pathogen biology, 2021, 16(4): 442-445 (in Chinese with English abstract).
- [23] 徐瑞敏, 李运燕, 段明明, 等. 日本血吸虫热休克蛋白 70 在昆虫细胞 Sf9 中的表达鉴定 [J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(3): 45-50. XU R M, LI Y Y, DUAN M M, et al. Expression and identification of heat shock protein 70 of *Schistosoma japonicum* in insect cell Sf9 [J]. Chinese journal of animal infectious diseases, 2013, 21(3): 45-50 (in Chinese with English abstract).

- [24] LEE S H, KANG H J, LEE D H, et al. Virus-like particle vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection[J]. *Vaccine*, 2018, 36(38):5692-5700.
- [25] 张耀. 捻转血矛线虫H11糖蛋白疫苗候选分子的筛选及其免疫保护作用研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2023. ZHANG Y. Screening of protective antigens of *Haemonchus contortus* H11 glycoprotein and verification of its immune protection[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese with English abstract).

Purification and activity analysis of *Toxoplasma gondii* MIC1 protein expressed in baculovirus system

LI Xiang¹, ZHANG Xiaohan¹, LI Meiqi¹, CHEN Ran¹,
FENG Ying¹, LI Lin², SANG Xiaoyu¹, YANG Na¹

1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University/
Key Laboratory of Livestock Infectious Diseases, Ministry of Education, Shenyang 110866, China;
2. Liaoning Chengda Biotechnology Co., Ltd., Shenyang 110179, China

Abstract The purpose of this study was to construct a recombinant baculovirus strain expressing soluble *Toxoplasma gondii* MIC1 protein and identify the biological activity of the recombinant protein. The CDS sequence of *mic1* gene was amplified by PCR, ligated into the pFastBac 1 vector, and then transformed into DH10Bac cell. To obtain recombinant baculovirus, recombinant Bacmid was extracted and transfected into Sf9 cells. The transfected Sf9 cells exhibited typical lesion on the 3rd day after transfection. The results of indirect immunofluorescence assay and Western blot showed that the MIC1 recombinant protein was successfully expressed in transfected Sf9 cells. The purified MIC1 recombinant protein not only possessed the ability to bind to sialyllactose, but also could stimulate Balb/c mice to produce a high level of specific antibodies (>1:25 600). These results showed that the biologically active MIC1 recombinant protein was successfully obtained through the baculovirus expression system.

Keywords *Toxoplasma gondii*; MIC1 protein; baculovirus system; activity analysis

(责任编辑:边书京)