

DOI:10.13350/j.cjpb.231208

• 论著 •

# 微小隐孢子虫热休克蛋白 Hsp90 的原核表达与鉴定<sup>\*</sup>

冯琪,张楠,宫鹏涛,王晓岑,李新,张旭,王鑫,张西臣<sup>\*\*</sup>

(吉林大学动物医学学院,人兽共患病研究教育部重点实验室,吉林长春 130062)

**【摘要】** 目的 对微小隐孢子虫热休克蛋白 Hsp90 蛋白进行原核表达与鉴定。方法 根据微小隐孢子虫 Hsp90 基因的 CDS 区设计引物,PCR 扩增长度为 2 136 bp 的 Hsp90 基因片段,然后将其连接至 pET-32a(-)载体,构建重组质粒 PET-32a-Hsp90。将重组质粒转化入 BL21 感受态,使用 0.1 mmol/L IPTG 诱导重组 Hsp90 蛋白的表达并进行 SDS-PAGE 分析;采用 His 标签蛋白填料纯化柱对表达产物进行纯化,采用 Western blot 鉴定重组蛋白 Hsp90 的反应原性。

结果 PCR 扩增微小隐孢子虫 Hsp90 基因片段大小为 2 136 bp,测序表明扩增基因片段大小正确并成功与 PET-32a(-)连接。将 PET-32a-Hsp90 转化入 BL21 感受态,经 IPTG 诱导表达分子质量约为 78.32 ku 的重组 Hsp90 蛋白,Western blot 检测该蛋白能被 Anti-His 标签抗体识别。结论 成功构建 PET-32a-Hsp90 重组质粒,并通过原核表达系统成功表达具有反应原性的重组 Hsp90 蛋白,为该蛋白的功能研究奠定了基础。

**【关键词】** 微小隐孢子虫;热休克蛋白 Hsp90;表达鉴定;蛋白纯化

**【中图分类号】** R382.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)12-1407-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1407-1410.]

## Prokaryotic expression and identification of Heat Shock Protein 90 of *Cryptosporidium parvum*

FENG Qi,ZHANG Nan,GONG Pengtao,WANG Xiaocen,LI Xin,ZHANG Xu,WANG Xin,ZHANG Xichen (Key Laboratory of Zoonosis Research by Ministry of Education, Institute Of Zoonosis, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

**【Abstract】** **Objective** To express and characterize the heat shock protein 90 (Hsp90) of *Cryptosporidium parvum* using prokaryotic expression system. **Methods** Primers were designed according to the CDS region of Hsp90 gene of *Cryptosporidium parvum*. Hsp90 gene was amplified by PCR with a fragment length of 2 136 bp, and ligated into the pET-32a (-) vector to construct the recombinant plasmid PET-32a-Hsp90. Recombinant plasmid was transformed into competent cells BL21(DE3), and its expression product was induced with 0.1 mmol/L IPTG. The Hsp90 recombinant protein was initially verified by SDS-PAGE. The expression product was purified using His packed protein purification column. Western blot was used to identify the reactivity of the recombinant protein Hsp90. **Results** PCR amplified the *Cryptosporidium parvum* Hsp90 gene fragment as 2 136 bp, and sequencing results indicated that the amplified Hsp90 gene fragment was correct and successfully ligated with PET-32a(-). The recombinant plasmid PET-32a-Hsp90 was transformed into competent cells BL21(DE3). IPTG induced expression of recombinant Hsp90 protein with a molecular mass of approximately 78.32 ku. The purified Hsp90 protein was characterized by Western blotting indicated using Anti-His tag antibody. **Conclusion** This study successfully constructed the recombinant plasmid pET-32a-Hsp90, and the Hsp90 recombinant protein was expressed by the prokaryotic system, and its reactogenicity was confirmed by Western blot, which laid the foundation for the functional study of this protein.

**【Key words】** *Cryptosporidium parvum*; Hsp90; Prokaryotic expression; protein identification

<sup>\*\*\*</sup>微小隐孢子虫是一种重要的人兽共患寄生性原虫,寄生于人和多种哺乳动物的小肠,可引起腹泻等症状。免疫低下或免疫功能不全者感染微小隐孢子虫可发生严重腹泻,甚至危及生命<sup>[1-2]</sup>。目前食品药品监督管理局(FDA)批准的治疗微小隐孢子虫感染的药物只有硝唑尼特,该药可用于治疗儿童和免疫健全的病人,但对免疫缺陷者无效。目前对于微小隐孢子虫的生物学特性了解尚少,使得筛选出的多种药物疗效欠佳,新型抗隐孢子虫药物的研发进展缓慢。深入开展微小隐孢子虫的细胞生物学研究,对防治微小隐孢子虫病具

有重要意义。研究发现,热休克蛋白(Heat Shock Protein, Hsp)可增强细胞的耐热性以抵抗高温,防止蛋白聚集,对抗细胞死亡。热休克蛋白根据其分子量大小不同分为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60 和小

<sup>\*</sup> **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31972704);国家重点研发计划资助项目(No. 2022YFD1800200)。

<sup>\*\*</sup> **【通讯作者】** 张西臣, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

**【作者简介】** 冯琪(1999-),女,四川成都人,硕士研究生。主要研究方向:兽医寄生虫学。E-mail: qifeng21@mails.jlu.edu.cn

热休克蛋白<sup>[3]</sup>,其中 Hsp90 是一种广泛存在于生物体中的热应激蛋白,当机体暴露在高温环境时,会促进该蛋白的生成<sup>[4]</sup>,作为一种分子伴侣蛋白,Hsp90 在蛋白折叠中也扮演重要角色<sup>[5]</sup>。此外,Hsp90 与细胞凋亡、生物生长调节及端粒酶活性密切相关。目前已有基于隐孢子虫 Hsp90 的基因分型研究报道<sup>[6-7]</sup>。本实验通过 PCR 扩增微小隐孢子虫 Hsp90 基因并进行原核表达与鉴定,为 Hsp90 的功能研究奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 材料

**1.1 虫株、菌株及质粒** 微小隐孢子虫卵囊和原核表达载体 pET32a(-)由吉林大学寄生虫实验室保存;大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

**1.2 主要试剂** 基因组提取试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Primer STAR,DNA marker,BamH I、Xho I 限制性内切酶及 T4 连接酶购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;Ni- Agarose His 标签蛋白纯化填料,氨苄青霉素及异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司。

### 2 方法

**2.1 微小隐孢子虫 Hsp90 基因的生物学信息分析** 利用在线网站 DeepLoc(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-2.0>)预测微小隐孢子虫 Hsp90 蛋白的细胞定位;利用 SignalP(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)预测 Hsp90 蛋白的信号肽区域;使用 NetPhos(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>)预测 Hsp90 蛋白的磷酸化位点;使用 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 Hsp90 蛋白的分子质量及理论等电点等;使用 NCBI CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析 Hsp90 蛋白的保守结构域;使用 SMART ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set\\_mode.cgi?NORMAL=1](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1))、Jpred (<https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>)和 SOPMA ([https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))对 Hsp90 蛋白二级结构进行预测;使用 Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测 Hsp90 蛋白的三维同源模型。

**2.2 Hsp90 蛋白的原核表达与鉴定**

**2.2.1 PCR 扩增 Hsp90 基因** 根据 GenBank 中微

小隐孢子虫 Hsp90 基因序列(GenBank 登录号:AF038559)的 CDS 区,使用 Snapgene 设计引物。引物 Hsp90-F:5'-CTCGAGAATAAGGAAATCTTTTGAGAGAATTGATTTCTAAT-3'(下划线酶切位点 Xho I) Hsp90-R:5'-GGATCCTTGATCTTCC TTAAGGTGTAAGAT-3'(下划线酶切位点 BamH I)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

使用基因组提取试剂盒提取微小隐孢子虫总 DNA,以此为模版扩增 Hsp90 基因。反应体系:Primer STAR 25  $\mu$ L,上、下游引物和模板各 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C 3 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 120 s,共 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min。使用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,使用 PCR 产物回收试剂盒回收目的基因片段。

**2.2.2 PET-32a-Hsp90 质粒的构建** 使用限制性内切酶 BamH I、Xho I 对 PET-32a(-)载体和 Hsp90 基因进行双酶切,再使用 PCR 产物回收试剂盒回收产物,在 T4 DNA 连接酶作用下连接。连接体系:T4 DNA 连接酶和 10 $\times$ Buffer 各 1  $\mu$ L,Hsp90 基因片段与 PET-32a(-)以浓度比为 3:1 的比例加入至体系中共 10  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 过夜连接,连接产物使用热激转化法转入 DH5 $\alpha$  感受态。取 80  $\mu$ L 菌液涂布 LB 固体培养基(Amp 抗性),于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中倒置培养 12 h,挑取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基培养 12 h,提取质粒进行酶切鉴定,鉴定阳性质粒委托生工生物公司测序,测序正确后取质粒 100 ng 使用上述热激转化法转入 BL21 感受态。

**2.2.3 Hsp90 的诱导表达与鉴定** 取 6  $\mu$ L 鉴定正确的阳性克隆菌液加入 6 mL LB 液体培养基(Amp 抗性)中,置于 37  $^{\circ}$ C 摇床(180 r/min)培养 1~2 h 至 A<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8;加入 0.1 mmol/L IPTG,置于 37  $^{\circ}$ C 摇床(140 r/min)诱导 6 h,收集菌液,离心,弃上清;于菌体沉淀中加入 1 mL 1 $\times$ PBS,超声破碎后离心,分别收集上清和沉淀进行 Hsp90 的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

## 结果

### 1 Hsp90 蛋白的生物信息学分析

利用上述网站进行分析,微小隐孢子虫 Hsp90 蛋白含有 711 个氨基酸,分子质量为 78.32 ku,理论等电点为 4.92,亲水性系数为-0.537,表明该为亲水性蛋白。Hsp90 可能存在一种 Sec 信号肽,无跨膜区域,预测存在 36 个丝氨酸磷酸化位点、29 个苏氨酸磷酸化位点和 14 个酪氨酸磷酸化位点。Hsp90 蛋白的二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋(53.45%)、 $\beta$ 折叠(14.06%)、延伸链(14.06%)组成,存在一个保守结构域。DeepLoc 预

测 Hsp90 位于细胞质中,其三维结构同源模型如图 1。

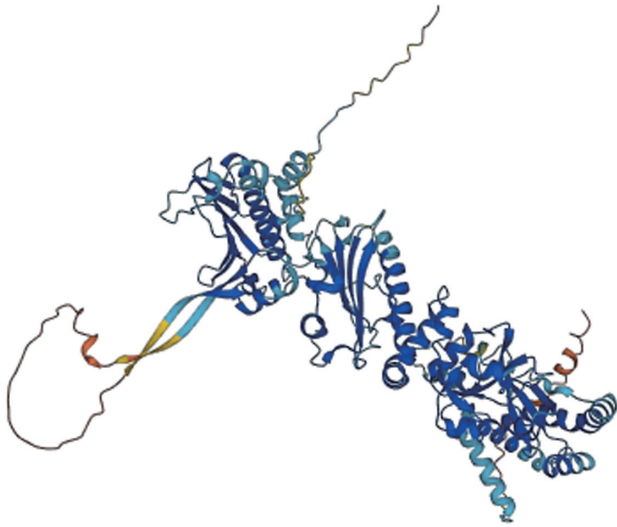
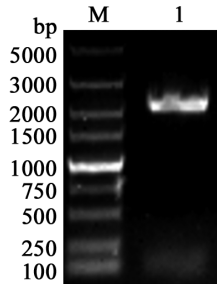


图 1 热休克蛋白 Hsp90 的三维结构同源模型  
Fig. 1 Three dimensional model of Heat Shock Proteins 90

## 2 Hsp90 基因的扩增

以微小隐孢子虫基因组为模板扩增 Hsp90 基因,得到 2 136 bp 的目的基因片段(图 2),与预期一致,且测序结果正确。



M DNA 标志物(DL5000) 1 Hsp90 基因 PCR 产物  
图 2 Hsp90 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析  
M DNA marker (DL5000) 1 PCR product of Hsp90 gene  
Fig. 2 PCR product identification of Hsp90 gene

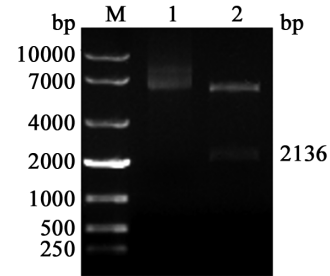
## 3 PET-32a-Hsp90 重组质粒的构建与鉴定

将目的基因与 PET-32a(-)载体使用 T4 DNA 连接酶连接后热激法转化入 DH5 $\alpha$  和 BL21 感受态细胞进行培养,取鉴定阳性的克隆质粒进行 BamH I、Xho I 双酶切,得到大小为 5 900 bp 左右的载体片段和 2 136 bp 的目的基因片段(图 3),与预期一致,且测序结果正确。

## 4 Hsp90 重组蛋白的表达与纯化

将 PET-32a-Hsp90 阳性克隆菌液于 37  $^{\circ}$ C 摇床(180 r/min)培养至 A<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8,加入 0.1 mmol/L IPTG 继续培养 6 h,离心收集菌体进行超声破碎,分别取上清和沉淀,采用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达,结果如图 4。Hsp90 重组蛋白蛋白分子质量约为 100 ku,且在上清和沉淀中均有表达。取重

组菌进行目的蛋白的大量诱导表达,再使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化填料进行纯化,采用 Western blot 检测纯化蛋白的反应原性,结果如图 5。该蛋白能被鼠抗 His 标签单抗识别,反应条带位于 100 ku 处,与预期一致。

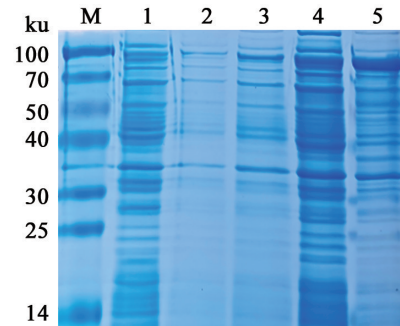


M DNA 标志物(DL10000) 1 PET-32a-Hsp90 未酶切 2 PET-32a-Hsp90 双酶切

图 3 PET-32a-Hsp90 酶切验证

M DNA marker (DL10000) 1 Undigested of PET-32a-Hsp90 2 Double digestion of PET-32a-Hsp90

图 3 Double digestion identification of PET-32a-Hsp90

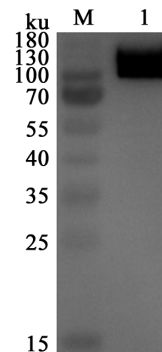


M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导空载体 pET-32a(-)对照 2 空载体 pET-32a(-)未诱导 3 IPTG 诱导重组菌全菌蛋白 4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 5 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀

图 4 Hsp90 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 PET-32a(-) induced with IPTG 2 PET-32a(-) induced without IPTG 3 Hsp90 induced with IPTG 4 The supernatant protein of Hsp90 induced with IPTG 5 The bacterial protein of Hsp90 induced with IPTG

图 4 SDS-PAGE analysis of Hsp90 recombinant protein



M 蛋白分子质量标准(15-180ku) 1 纯化重组蛋白 Hsp90 与鼠抗 His 标签单抗反应条带

图 5 Hsp90 重组蛋白的 Western blot 分析

M Protein marker(15-180) 1 Purified Hsp90 recombinant protein  
图 5 Western blot analysis of Hsp90 recombinant protein

## 讨 论

热休克蛋白 Hsp90 是一种 ATP 依赖性蛋白,在蛋白折叠、细胞凋亡以及生物生长调节中起重要作用<sup>[8]</sup>。弓形虫(*Toxoplasma Gondii*)、柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)、伊氏锥虫(*Trypanosoma evansi*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)等的 Hsp90 已被分离和测序。研究发现,Hsp90 与寄生虫的生长发育密切相关,如可促进柔嫩艾美耳球虫裂殖体、恶性疟原虫的生长发育<sup>[9]</sup>。Hsp90 还可作为寄生虫的药物靶点,如 Hsp90 抑制剂可辅助治疗锥虫病和疟疾<sup>[10-11]</sup>。Hsp90 在寄生虫入侵宿主阶段起重要作用,敲除 Hsp90 的弓形虫株难以入侵宿主细胞,无法在 Vero 细胞中增殖和小鼠体内存活<sup>[12]</sup>。Hsp90 可调节寄生虫端粒酶活性,如可调节疟原虫 Sir2 蛋白的活性<sup>[13]</sup>,而 Sir2 与端粒长度密切相关。de Oliveira 等<sup>[14]</sup>报道利什曼原虫 Hsp90 与 TERT 具有互作关系,抑制 Hsp90 的表达可使端粒缩短。明珠等<sup>[15]</sup>报道十二指肠贾第虫 Hsp90 与端粒酶逆转录酶 RNA 结合域 TRBD 具有互作关系,Hsp90 表达量降低可抑制端粒酶活性及贾第虫生长增殖。

本实验通过 PCR 成功扩增微小隐孢子虫 Hsp90 基因,其核酸序列为 2136bp,编码 711 个氨基酸。根据在线网站进行预测分析,微小隐孢子虫 Hsp90 由 3 个高度保守的域组成:N 端结构域(NTD)、中域(MD)和 C 端结构域(CTD)。其中 NTD 主要负责识别 ATP 和 ADP 等。微小隐孢子虫 Hsp90 的二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$  折叠构成,亲水性强,易于进行诱导表达。重组菌经 0.1mmol/L IPTG 诱导,表达的 Hsp90 大多以可溶性形式存在,纯化的 Hsp90 经 Western blot 检测仍具有反应原性,为该蛋白的功能研究奠定了基础。

## 【参考文献】

- [1] Gomez-Puerta LA, Gonzalez AE, Vargas-Calla A, et al. *Cryptosporidium parvum* as a risk factor of diarrhea occurrence in neonatal alpacas in Peru[J]. Parasitol Res, 2020, 119(1):243-248.
- [2] 贾丁,但佳明,孙燕,等. 四川省奶牛犊牛隐孢子虫流行情况及其

分子特性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(4):6.

- [3] Mogk A, Bukau B. Role of sHsps in organizing cytosolic protein aggregation and disaggregation[J]. Cell Stress Chaperones, 2017, 22(4):493-502.
- [4] Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 family: structure, regulation, function, and implications in health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9):2560.
- [5] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(6):345-360.
- [6] Feng Y, Dearen T, Cama V, et al. 90-kilodalton heat shock protein, Hsp90, as a target for genotyping *Cryptosporidium spp.* known to infect humans[J]. Eukaryot Cell, 2009, 8(4):478-82.
- [7] Li N, Neumann NF, Ruecker N, et al. Development and evaluation of three real-time PCR assays for genotyping and source tracking *Cryptosporidium spp.* in water [J]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81(17):5845-5854.
- [8] 焦新,尹继刚,王东强,等. 微小隐孢子虫分泌蛋白 cgd2420 的鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(4):424-428.
- [9] Peroval M, Pery P, Labbe M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(10-11):1205-15.
- [10] Rochani A K, Mithra C, Singh M, et al. Heat shock protein 90 as a potential drug target against surra[J]. Parasitology, 2014, 141(9):1148-1155.
- [11] Silva NSM, Torricillas MS, Minari K, et al. Solution structure of *Plasmodium falciparum* Hsp90 indicates a high flexible dimer [J]. Arch Biochem Biophys, 2020, 690:108468.
- [12] Sun H, Zhuo X, Zhao X, et al. The heat shock protein 90 of *Toxoplasma gondii* is essential for invasion of host cells and tachyzoite growth[J]. Parasite, 2017, 24:22.
- [13] Tabassum W, Bhattacharya M, Bakshi S, et al. Heat shock protein 90 regulates the activity of histone deacetylase Sir2 in *Plasmodium falciparum* [J]. mSphere, 2022, 7(5):e0032922.
- [14] De Oliveira BCD, Shiburah ME, Paiva SC, et al. Possible involvement of Hsp90 in the regulation of telomere length and telomerase activity during the *Leishmania amazonensis* developmental cycle and population proliferation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9:713415.
- [15] 明珠,张西臣,赵春艳,等. 十二指肠贾第虫端粒酶逆转录酶 RNA 结合域 TRBD 互作蛋白的筛选及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(5):575-582.

【收稿日期】 2023-08-14 【修回日期】 2023-10-08