

# 大片吸虫谷胱甘肽 S转移酶的提纯及生化分析\*

## Isolation and Biochemical Characterization of Glutathione S-Transferase from *Fasciola gigantica*

何波 黄维义 顾越星\*  
He Bo Huang Weiyi Gu Yuexing

(广西大学动物科技学院 南宁市西乡塘路10号 530004)

(College for Veterinary Science and Biotechnology,

Guangxi Univ., 10 Xixiangtanglu, Nanning, Guangxi, 530004)

**摘要** 用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析法从中国广西水牛源大片吸虫 (*Fasciola gigantica*) 成虫体内提纯大片吸虫谷胱甘肽 S转移酶 (FgGST) 提纯的 FgGST在 12% SDS-PAGE图谱上呈现二条清晰谱带, 分子量分别为 26.5 kD和 28 kD 以 CDNB为标准底物测得 FgGST的活力为 17.08 $\mu$ mol/min $\cdot$ mg 用谷胱甘肽亲和层析柱纯化的 FgGST, 不仅纯度好, 而且获得率高, 所得 FgGST至少占上柱上清液总蛋白含量的 3.1%。

**关键词** 谷胱甘肽 S转移酶 (GST) 大片吸虫 提纯 生化分析 水牛

中图法分类号 S 852.735

**Abstract** In our experiment, *Fasciola gigantica* glutathione s-transferase (FgGST) was isolated from crude extracts of *Fasciola gigantica* by glutathione agarose affinity chromatography. SDS-PAGE shows two closely migrating polypeptides with molecular weight of 26.5 kD and 28 kD respectively. The substance has GST activity of 17.08 $\mu$ mol/min $\cdot$ mg, when measured using CDNB as standard substrate. And *Fasciola gigantica* has high concentration of GST. For each isolation 100 mg protein of F. g extract is loaded onto the affinity column and the yield of FgGST obtained is at least 3.1% of the total protein.

**Key words** Glutathione S-Transferase, *Fasciola gigantica*, isolation, biochemical characterisation, water buffalo

谷胱甘肽 S转移酶 (GST)在寄生虫疫苗研究中有重要意义。谷胱甘肽 S转移酶 (GST)以同工酶的形式广泛存在于动、植物体中。该酶以酶促反应催化还原型谷胱甘肽 (GSH)的疏基阴离子与许多次级底物结合,或以非共价结合的蛋白质与许多疏水配基相结合,通过酶反应和结合能力,解除内源性或外源性毒物的毒性,包括脂质过氧化反应的次级产物 Brophy等<sup>[1]</sup>报道在所有蠕虫成虫的体内均存在有活性的 GST,蠕虫的 GST多存在于虫体细胞的胞质中。

GST在蠕虫的代谢中起着非常重要的作用,是蠕虫主要解毒酶之一。许多蠕虫的 GST还可能在代谢方面有更特异的内在功能,包括合成白三烯 前列腺素,作为血红素、类固醇和胆汁酸类配基的转运蛋白, GST还可与正铁血红素结合,以免形成正铁血红素结晶而堵塞吸虫的肠管<sup>[1]</sup>。因此 GST成为设计抗蠕虫药物的靶目标和一种抗蠕虫的候选疫苗抗原。在抗血吸虫病的疫苗研究中,曼氏血吸虫的 28 kD GST (Sm28GST)是最有希望的疫苗候选抗原。纯化的天然 Sm28GST免疫大鼠可诱导 50%~70%的免疫保护力。目前已获得编码 Sm28GST的 cDNA克隆,并利用基因重组技术,在多种载体 (包括大肠杆菌、酵母菌、牛痘疫苗)中表达。重组的 Sm28GST加佐剂氢氧化铝在多种动物 (小鼠、大鼠、狒狒等)的免疫试验中均获较高的免疫保护力 (平均为 42%),肝脏虫

1998-07-17收稿

\* 国家自然科学基金资助课题 (39660061)

\*\* 中国农业科学院上海家畜寄生虫研究所,上海市石龙路 106弄 1号,200232 (Shanghai Parasitology Research Institute of China Agriculture Science Academy, 106-1, Shilonglu, Shanghai, 200232).

卵肉芽肿明显缩小,雌虫平均产卵量减少 68%,虫卵的孵出明显减少 83%,虫卵孵出率、毛蚴的活力及感染性降低 (58%)<sup>[2]</sup>。Sexton 等<sup>[3]</sup>用肝片吸虫的 GST (FhGST) 免疫绵羊,结果对同源攻击有明显的保护 (与对照组比较,吸虫数量减少 57%),免疫应答似乎针对童虫。Muro A. 等<sup>[4]</sup>通过筛选基因库获得了编码 FhGST 的 cDNA 克隆。Salvatore L. 等<sup>[5]</sup>用重组的 FhGST 免疫绵羊和牛,其免疫保护率分别为绵羊 48%,牛 50%。

广西主要流行的是大片吸虫 (*F. gigantica*)。为了研究免疫预防大片吸虫病,比较大片吸虫与肝片吸虫在保护性抗原方面的异同,本实验用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析法从中国水牛源大片吸虫中提纯 FgGST,并对其生化特性进行初步鉴定,为今后进一步研究 FgGST 的免疫保护作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 虫体来源: 用中国广西南宁地区水牛胆管中寄生的大片吸虫。

1.1.2 主要的生化试剂: 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 SigmaG-9761,还原型谷胱甘肽 (GSH) SigmaG-4251, 1-氯-2, 4-硝基氯苯 (CDNB) 为 Sigma 公司产品; 标准蛋白 (14.4 kD~97.4 kD), 苯甲基磺酰氟 (PMSF); 乙二胺四乙酸 (EDTA) 为上海奥伯生物科技有限公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 虫体的处理

从新鲜水牛肝脏的胆管中取出活的大片吸虫,用冷的 0.01 M PBS (pH 值 = 7.2) 清洗干净,保存于 -80°C 冰箱或液氮备用。使用时,加入虫体 4 倍体积的 0.01 M PBS (其中含 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% Triton-x 100), 在研磨器中研成匀浆后,反复冻融 2~3 次,4°C 超声裂解,然后于 10 000 r/min, 4°C 离心 1 h,收集上清液,将其蛋白浓度调节至 8.0 mg/mL, -70°C 保存至使用<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.2 大片吸虫 GST 的提纯

将谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (SigmaG-9761) 浸于 0.01 M PBS (pH 值 = 7.0) 中饱和,置 4°C 约 2 h 将凝胶装柱后,用相同的 PBS 平衡柱子,取蛋白浓度为 8 mg/mL 的成虫匀浆上清液 15 mL 上柱,循环 3~4 次过滤,然后用上述的 PBS 液洗柱,直至无蛋白洗出为止<sup>[6]</sup>。结合于柱上的 GST 用含 7 mM 谷胱甘肽 (Sigma G-4251), 50 mM Tris 的洗脱液 (pH 值 = 9.1), 进行洗脱,将洗脱收集的 FgGST 的 pH 值调至

7.0 (用 2 M Tris 缓冲液, pH 值 = 6.0), 透析除去 Tris, 分装于小管中,蛋白浓度调至 1.5 mg/mL<sup>[7]</sup>。

### 1.2.3 大片吸虫 GST 的生化分析

1.2.3.1 FgGST 纯度及分子量的测定: 应用 12% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测纯化 GST 的纯度,并以标准蛋白 (14.4 kD~97.4 kD) 作对照,用考马斯亮蓝 R25 染色,测定 FgGST 的分子量<sup>[7]</sup>。

1.2.3.2 蛋白含量的测定: 用紫外分光光度计测定经亲和层析纯化的 FgGST 的蛋白含量,并分装保存于 -80°C。

1.2.3.3 纯化的 FgGST 酶活力的测定: 以 1 mM GSH, 1 mM CDMB 为标准底物,用紫外分光光度计,在 340 nm 处,测定 FgGST 的酶活力<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

(1) 大片吸虫虫体匀浆上清液经谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化后,收集的洗脱液在 12% SDS-PAGE 图谱上只呈现 1 条清晰的条带,分子量分别为 26.5 kD 和 28 kD (见图 1)。

(2) 用紫外分光光度计测定收集的洗脱液中蛋白含量,把蛋白含量较高的洗脱组分合并,将蛋白浓度调节为 1.5 mg/mL,分装保存。

(3) 以 1 mM GSH, 1 mM CDMB 作为标准底物,用紫外分光光度计,在 340 nm 处,测得 FgGST 活力为 17.08 μmol/min/mg。



图 1 不同浓度的大片吸虫 GST 提取物 (FgGST) 的 SDS-PAGE (12%) 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE (12%) of purified *F. gigantica* glutathione S-transferase (FgGST) at the different protein concentrations

1. 标准蛋白; 2. 3. 4. 不同浓度的大片吸虫 GST 提取物 (FgGST). 1. Molecular weight standards 2. 3. 4. Different protein concentrations of FgGST.

## 3 讨论

近年来对片形吸虫病免疫预防的研究在候选疫

苗抗原方面取得了不少进展, FhGST对同源攻击表现出较好的免疫保护作用,成为有希望的疫苗抗原成分。但目前国内外对大片吸虫 GST的研究仍甚少,据查实,仅 Wiedosari E发表了 1篇关于 FgGST方面的文章<sup>[8]</sup>。

本实验用谷胱甘肽琼脂糖凝胶亲和层析法从中国广西水牛源大片吸虫成虫体内提纯了 FgGST,并对其生化特性进行了初步的研究。大片吸虫 GST在 12% SDS-DAGE图谱上呈现 3条清晰的条带,分子量分别为 26.5 kD和 28 kD。该分子量与 Brophy等<sup>[1]</sup>报道的 FhGST的分子量为 26 kD~ 26.5 kD及 Hillyer等<sup>[6]</sup>报道的 FhGST分子量为 27.8 kD~ 29 kD接近,均在 GSTs单体分子量范围之内,电泳图谱显示 Fg-GST至少含有两组分子量较接近的成分。以 1 mM GSH, 1 mM CDNB为标准底物测得 FgGST的酶活力为 17.08  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 。研究表明 GST的酶活力,在不同蠕虫中差异较大。Salvatore<sup>[5]</sup>报道 FhGST活力为 11.5  $\pm$  0.6  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ , Sm28 kD GST活性为 7.27  $\pm$  0.22  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 。Echinococcus granulosus protoscoleces 的 GST活力为 0.4  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 。<sup>[9]</sup> Trichinella spiralis的 GST活性为 (0.365~0.1773)  $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 。<sup>[10]</sup>可见大片吸虫的 GST活性较高,这与前人报道的 GST在复殖吸虫中活性较高相符。<sup>[11]</sup>纯化所得 FgGST含量占上柱虫体匀浆上清液总蛋白含量的 3.1%,表明大片吸虫体内 GST含量较高,提示该酶在大片吸虫的代谢中也许起很重要的作用,针对该酶的免疫反应对大片吸虫而言可能是致命的。因此, FgGST抗吸虫病的免疫保护作用值得进一步研究。

总之,本实验描述了一种简单的从大片吸虫中提纯 GST的方法,为进一步的动物免疫实验奠定基础。

致谢

本实验主要部分在中国农业科学院上海家畜寄生虫研究所完成,实验过程中得到何国声,林矫矫,徐梅倩,蔡学忠等同志的热情帮助指导,特此致谢。

- 1 Brophy P M, Barrett J. Glutathione transferase in helminths. Parasitology, 1990, 100: 345~ 349.
- 2 Capron A, Balloul J M, Grezel D et al. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Trop Geogr Med, 1994, 46 (4): 242~ 246.
- 3 Sexton J L, Milner A R, Panaccio M et al. Glutathione s-transferase: Novel vaccine against Fasciola hepatica infection in sheep. Journal of Immunology, 1990, 145: 3905~ 3910.
- 4 Muro A, Rodriguez-Medina J R, Hillyer G V et al. Sequence analysis of a Fasciola hepatica glutathione s-transferase cDNA clone. Am J Trop Med Hyg, 1993, 48 (3): 457~ 463.
- 5 Salvatore L, Wijffels G, Sexton J L et al. Biochemical analysis of recombinant glutathione s-transferase of Fasciola hepatica. Molecular and Biochemical Parasitology, 1995, 69: 281~ 288.
- 6 Hillyer G V, Soler de Galanes M, Battisti G et al. Fasciola hepatica: Host responders and nonresponders to parasite glutathione s-transferase. Experimental parasitology, 1992, 75: 176~ 186.
- 7 林矫矫, 田 镔, 叶 萍等. 日本血吸虫谷胱甘肽 S-转移酶小鼠免疫试验. 中国兽医寄生虫病, 1996, 4 (1): 5~ 8.
- 8 Wiedosari E. Immune response of cattle vaccinated with GST from Fasciola gigantica. Indonesia Research Institute for Veterinary Science, 1995, 269~ 273.
- 9 Fernandez C, Hormaeche C E. Isolation and Biochemical characterisation of a glutathione s-transferase from Echinococcus granulosus protoscoleces. Int J Parasitol, 1994, 24: 1063~ 1066.
- 10 Rojas J, Matilde Rodriguez-Osorio M, Victoria Gomez-Garcia. Immunological characteristics and localization of the Trichinella spiralis glutathione s-transferase. J parasitol, 1997, 83 (4): 630~ 635.
- 11 Barrett J. Helminth glutathione transferases. Helminthologia, 1995, 32 (3): 125~ 128.

(责任编辑: 邓大玉)