

## 日本血吸虫组织蛋白酶 L1 基因的 编码区全序列分析及克隆

雷智刚 孟锦绣 何蔼 李卓雅 易冰 詹希美

**【摘要】** 目的 分析日本血吸虫组织蛋白酶 L1(SjCL1)基因编码区的完整序列,并定向克隆到真核表达质粒 pcDNA3 中。方法 从日本血吸虫成虫提取总 RNA,进行反向巢式 RT-PCR, T 载体克隆后测序。PCR 扩增 SjCL1 基因的编码区序列,并将扩增产物克隆到 pcDNA3 质粒的 BamHI 和 XhoI 位点上。结果 通过反向巢式 RT-PCR 扩增出 332 bp SjCL1 基因 5' 端序列,测序后与报道的 SjCL1 基因部分序列拼接,可得到一个编码 317 个氨基酸的完整编码区序列。PCR 特异性扩增出 SjCL1 编码区基因序列,其大小约为 1 kb。经酶切、PCR 鉴定和测序表明所构建的质粒 pcDNA-SjCL1 中含有所扩增的基因序列。结论 构建了含 SjCL1 基因的编码区序列的真核表达质粒 pcDNA-SjCL1。

**【关键词】** RT-PCR; 日本血吸虫; 组织蛋白酶 L; 基因克隆

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

### Analysis and Cloning of Proteinase Cathepsin L1 Gene Coding Sequence of *Schistosoma japonicum*

LEI Zhi-gang, MENG Jin-xiu, HE Ai, LI Zhuo-ya, YI Bing, ZHAN Xi-mei

(Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080)

**【Abstract】** Objective To analyze the full coding sequence of proteinase cathepsin L1 (SjCL1) of *Schistosoma japonicum*, and clone it into the eukaryotic expression vector pcDNA3. Methods Total RNA was isolated from adult worms of *S. japonicum*, the sequence of SjCL1 gene 5'-end was attained by performing averse nested PCR, and the sequence of SjCL1 gene 5'-end was determined by sequencing after being cloned into T vector. The coding region gene of SjCL1 was amplified by PCR, and the fragment from PCR was cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3 via BamHI and XhoI sites. The resulting construct was determined by PCR, restriction analysis and sequencing. Results A 320 bp sequence of SjCL1 gene 5'-end of *Schistosoma japonicum* was obtained by using averse nested PCR. After combined with the reported segment of SjCL1 gene, an integral coding sequence was obtained. The coding region of SjCL1 gene was specifically amplified by PCR, with a size of about 1 kb. The expression plasmid pcDNA-SjCL1 contained the amplified fragment, which is validated by PCR, restriction analysis and sequencing. Conclusion The eukaryotic expression plasmid containing the coding sequence of SjCL1 gene was constructed.

**【Key words】** RT-PCR, *Schistosoma japonicum*, cathepsin L, gene cloning

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 3017083777) and the Key Subject Fund of "211" Project of the Education Department of Guangdong Province

血吸虫成虫寄生于人的血管内,不断吞食红细胞。吞食的红细胞破坏溶解后释出的血红蛋白(Hb)降解生成的可吸收多肽是血吸虫重要的氨基酸来源。已有报道在血吸虫体内存在包括组织蛋白酶 L 在内的多种半胱氨酸蛋白酶,这些半胱氨酸蛋白酶参与 Hb 的降解过程。日本血吸虫组织蛋白酶 L 有 2 种亚型:组织蛋白酶 L1(SjCL1)和组织蛋白酶 L2(SjCL2),研究证实组织蛋白酶 L1 在 Hb 降解过程中起关键作用<sup>[1-3]</sup>。本实验根据 SjCL1 3' 端的部分序列(U38475),设计一个特异性 5' 末端磷酸化的反转录引物和两对特异性的 PCR 引物,应用反向巢式 RT-PCR 技术,对 SjCL1 基因的 5' 端未知序列进行分析。获知

SjCL1 基因的全部编码区序列后,将 SjCL1 基因的编码区序列定向克隆到真核表达质粒 pcDNA3 中,以便进一步研究。

### 材料与方 法

#### 1 日本血吸虫成虫

含尾蚴的钉螺购自湖南省血吸虫病防治研究所,逸出的尾蚴感染家兔,45 d 时剖杀,经门静脉灌注收集成虫。

#### 2 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109 和质粒 pcDNA3 由本室保存。

#### 3 主要试剂及酶类

RNA 提取试剂盒(TRIZOL Reagent)为 Gibco 公

基金项目:国家自然科学基金(No. 3017083777)和广东省高教厅 211 工程重点学科建设基金资助项目

作者单位:中山大学中山医学院寄生虫学教研室,广州 510080

司产品; Taq DNA 聚合酶, dNTPs 为上海生工生物工程技术有限公司产品; 反向巢式 RT-PCR 试剂盒、pMD18-T 载体系统为 TaKaRa 公司产品; PCR 纯化试剂盒为 Qiagen 公司产品; X-gal、IPTG、RNA 酶抑制蛋白为华美生物工程公司产品; BamHI 和 XhoI 为 MBI 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

#### 4 引物

根据已报道的日本血吸虫中国株 SjCL1 cDNA 部分核苷酸序列(U38475)<sup>[3]</sup>并结合 PCGENE 软件分析设计引物:

- LIP1: 5'-(p)-AGA AAC CTG TAA AC-3'
- LIS1: 5'-GGT GGA TCT TCT GTT CAA AG-3'
- LIA1: 5'-CCA ACA CTT ATT GCT GAA TG-3'
- LIS2: 5'-TAT CGA GGT GAT GGT ACT TG-3'
- LIA2: 5'-GTG GCA TTT CTC ATT CTT AG-3'
- P1L1: 5'-GCG GGA TCC ATG CCT CAA AAC TTA GAG-3'
- P2L1: 5'-GCC GCT CGA GTT TAG TAG ATC AAA GCT G-3'

LIP1 为反转录引物, 5' 端进行了磷酸化修饰; LIS1 和 LIA1 为外对引物, LIS2 和 LIA2 为内对引物; P1L1 和 P2L1 为编码区序列定向克隆引物, 分别引入 BamHI 和 XhoI 酶切位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

#### 5 反向巢式 RT-PCR

血吸虫总 RNA 的提取按试剂盒提供程序进行。反向巢式 RT-PCR 步骤按试剂盒说明书进行, 以 LIP1 为引物合成 cDNA 第一链, cDNA 第一链首尾连接后, 以 LIS1 和 LIA1 为外对引物, LIS2 和 LIA2 为内对引物进行反向巢式 PCR。琼脂糖凝胶电泳观察分析反向巢式 RT-PCR 结果。PCR 产物的纯化按试剂盒说明书进行。

#### 6 反向巢式 PCR 产物的 T-载体克隆与测序

以近 4:1 摩尔比将目的基因 DNA 和 pMD18-T DNA 于 16 ℃ 连接过夜。将连接物转染感受态细菌 JM109, 然后再将反应物涂布于 LB/Amp/IPTG/X-gal 平板, 37 ℃ 培养过夜。挑取单个白色菌落, 置 LB/Amp 液体培养基中振荡培养, 用碱裂解法提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定。PCR 鉴定阳性菌落接种培养, 提取质粒进行双向测序。用 PCGENE 软件和 BLAST 进行开放阅读框架的拼接和识别。

#### 7 SjCL1 编码区序列定向克隆

根据得到的 SjCL1 基因编码区的全长序列, 设计

特异性引物 P1L1 和 P2L1。以 cDNA 第一条链为模板进行 PCR 扩增, 反应总体积为 50 μl, 按以下条件进行扩增: 95 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 120 s, 30 个循环; 再 72 ℃ 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察分析 PCR 结果。PCR 产物的纯化按试剂盒说明书进行。PCR 产物和质粒 pcDNA3 经 BamHI 和 XhoI 双酶切, 电泳回收纯化后, 以近 4:1 摩尔比将目的基因 DNA 和质粒 pcDNA3 于 16 ℃ 连接过夜, 经 CaCl<sub>2</sub> 介导转化试验、重组克隆子初筛、PCR 与酶切等步骤进行鉴定。PCR 和酶切鉴定阳性菌落接种培养, 用碱裂解法提取质粒 DNA 进行测序。

### 结 果

#### 1 反向巢式 RT-PCR 扩增和重组鉴定

反向巢式 RT-PCR 产物电泳后可见有两条带, 分别约为 600 和 400 bp (图 1), 切下约为 600 bp 的含较长片段 DNA 亮带, 纯化回收。以重组 pMD18-T-SjCLIP 质粒为模板进行 PCR 扩增, 可获得一个大小约为 600 bp 的 PCR 产物的菌落为阳性菌落。

#### 2 SjCL1 基因编码区序列分析

双向测序的结果相同, 应用 BLAST 和 PCGENE 软件进行分析, 得到 332 bp 的 SjCL1 基因 5' 端未知序列, 将该序列与 U38475 拼接成为 1 362 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 登录号 AF510740)。SjCL1 基因与 SmCL1 基因的同源性为 75.5%, 与 SjCL2 同源性为 52%。SjCL1 基因完整编码区含有 954 个核苷酸。

#### 3 SjCL1 编码区序列定向克隆和测序

根据得到的 SjCL1 基因编码区序列, 设计一对特异性引物对 P1L1、P2L1 经 PCR 方法扩增出约为 1 kb 的 DNA 片段, 与预期长度相符合 (图 2)。RT-PCR 产物被克隆到 pcDNA3 的多克隆位点而形成重组真核表达质粒 pcDNA-SjCL1。在所构建的质粒中, 目的基因正向位于强启动子 CMV 的下游。质粒 pcDNA-SjCL1 经 BamHI 和 XhoI 双酶切及 PCR 鉴定, 结果均产生一大约为 1 kb 的片段, 与预期长度相符合 (图 3), 表明表达质粒构建成功。测序结果显示 SjCL1 基因编码区含有 954 个核苷酸, 编码 317 个氨基酸 (图 4)。

### 讨 论

1959 年 Timms 等首先在曼氏血吸虫成虫提取物中发现血红蛋白酶活性, 目前已有 5 种蛋白酶作为血红蛋白酶分离出来, 分别为组织蛋白酶 B、L、C、D 和 legumain。血吸虫组织蛋白酶 L 有两种亚型: 组织蛋

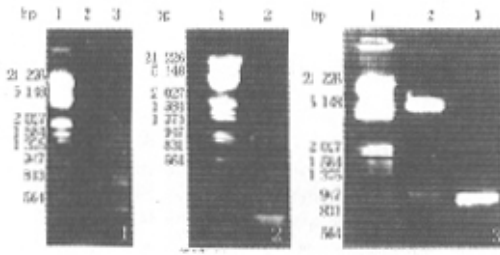


图 1 反向巢式 PCR 扩增 SjCL1 基因 5' 端结果 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 空白对照 3 5' 端的 PCR 产物 图 2 PCR 扩增 SjCL1 基因的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 日本血吸虫 cDNA 模板 图 3 pcDNA-SjCL1 的 PCR 和酶切鉴定 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 pcDNA-SjCL1 *Bam*HI + *Xho*I 双酶切 3 pcDNA-SjCL1 模板的 PCR 产物

Fig. 1 Amplified fragment of 5' terminus of SjCL1 gene by aversive nested PCR 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 Blank control 3 PCR product of 5' terminus Fig. 2 PCR amplification of SjCL1 gene in 1.2% agarose gel electrophoresis 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 PCR products using cDNA from *S. japonicum* as template Fig. 3 Identification of vector pcDNA-SjCL1 by PCR and restriction analysis 1  $\lambda$ DNA/*EcoRI* + *HindIII* marker 2 pcDNA-SjCL1 digested with *Bam*HI and *Xho*I 3 PCR products using pcDNA-sjCL1 DNA as template

```

1 ATGCCTCAAACTTAGACTACCTAGGTTTGAACCTACCTGAAAATGAGGTGAGATGAT 60
  M P Q N L E Y L G F E L P E N V G E M Y
61 GCACAATTTAAATTAACHTATAGAAAACACTCATGAAACAGATAATGAGAAGAGATT 120
  A Q P K L T Y R K Q Y H E T D N E K R F
181 AGCATCTTTAAGTCTAACTACTGAAAGCAAAATATATCAAGTACTTGAAGAAGGTTAT 180
  S I L F K N L E D W R E K G A V T E V X V
181 CGTGTTACGGACTTACACTTATTACAGATTAAAGCACTGAAGAAITTCACGTAETCAC 240
  A V Y G V T P Y S D L L T D E F S R T H
241 TTAATCTCTCCTTGGAGGCTCTAGTAAAGCAACACAAATTTGGLCTCCGACAGAAATT 300
  L T A P W R A S S K R N T I S P R R E V
301 GGGATATACCAATAATTTCCAGCTGACAGAGAAAGGCTCTCAACTGAAGTGAAGAAT 360
  G D I F N H F D W R E K G A V T E V X V
361 CAAGAACTGCTGGATGATCTTGGCCATCTCCAGCACTGTAATATAGACTCAATGG 420
  G G M C G S C W A F S T T G N I E S Q W
421 TTCCGTAAGACTGCAAAATTAATCATTAAAGTACAGCAACTGCTGACTGCGATAGT 480
  F R K T G K L L S L S E Q Q L V D C D S
481 CTAGATCAAGCTTGAATGCTGCTTACCCTAATGCTTATGAAATCAATAATACGAATG 540
  L D E G C N G G L P S N A Y E S I I R W
541 GGTGTTTAACTGAGCAATAATTCCTTAGCATGCTAAGAATGAGAATGCCACTTA 600
  G G L M L E D W Y P Y D A K R E K C H L
601 AAAGTCCCAATGTCGGCTTATATTAATAGTCTAGTAATTTAACTCAAGATGAGTCA 660
  K V A N Y A A Y I N S S V N L T Q D E S
661 GAAGTCCCAATGTCGGCTTATATCATTACAGCAATAAGTCTTGGCATGAATGCATTACT 720
  E L A I W L Y H R S A I S V G M N A L P
721 TTACAGTTTATGACATGGAATAGTACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 780
  L Q F Y R H C I S H P W I F C S K Y L
781 CTGTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 840
  L D H F Y L L V G Y G V S K N E P F W
841 ATTGTGAAGAATAGCTGGGTGTTGAATGGGCTGAAAGGGTTATTTTCTGATGATCGA 900
  I V K N S W G V E W G E K G Y F R M Y R
901 GGTGATGGTACTTGTGATTAATACAGATGCTACTACCTTCACTACTAA 954
  G D G T C G I N T D A T S A L I Y -
    
```

图 4 日本血吸虫 SjCL1 基因编码区序列和推导的氨基酸序列  
Fig. 4 The nucleotide and deduced amino acids sequences of the coding region of SjCL1 gene

蛋白酶 L1 型和组织蛋白酶 L2 型。组织蛋白酶 L1 是血吸虫组织提取物和成虫肠道排出物 (ES) 中主要的组织蛋白酶,且主要位于血吸虫肠道,这表明它可能是降解 Hb 的关键酶<sup>4</sup>。此外,组织蛋白酶 L 在血吸虫生殖和致病过程中也起到了重要作用。Wasilewski 等<sup>[5]</sup>

报道半胱氨酸蛋白酶抑制剂在体外能抑制血吸虫降解 Hb,并能减少血吸虫病小鼠体内血吸虫的数量和血吸虫虫卵的产量,所以组织蛋白酶可成为研究开发新的抗血吸虫药物的靶点。研究发现血吸虫组织蛋白酶 L 和人的组织蛋白酶活性位点氨基酸残基和对抑制剂 diazomethanes 的敏感性存在差别<sup>[6,7]</sup>,这表明寻找选择性抑制血吸虫组织蛋白酶药物是可行的。

Day 等<sup>[3]</sup>利用<sup>32</sup>P 标记的曼氏血吸虫组织蛋白酶 L1 (SmCL1) 的片段,从日本血吸虫成虫 cDNA 文库中筛选到了 SjCL1 基因。本实验应用反向巢式 RT-PCR 技术从日本血吸虫成虫总 RNA 中快速分离基因的 5' 末端,并扩增出前人未报道的部分,与报道的 SjCL1 部分序列拼接后可得到 954 bp 的开放阅读框,可编码 317 氨基酸的前组织蛋白酶 L1 酶原;并将 SjCL1 基因的编码区序列定向克隆到真核表达载体 pcDNA3 多克隆位点上。

因为血吸虫体内 SjCL1 含量很低,而且 SjCL1 与 SjCL2 的分子及底物特异性相同,所以从血吸虫分离纯化大量的 SjCL1 以分析其生化活性,困难较大。作者等在得到 SjCL1 基因并将编码区序列克隆到真核表达载体 pcDNA3 后,将在真核表达系统中高效表达和分离纯化 SjCL1,以进一步研究它的生物学功能,开发以其为作用靶点的药物。

参 考 文 献

- [1] Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, et al. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes[J]. Mol Biochem Parasitol, 1997, 89: 1-9.
- [2] Dalton JP, Smith AM, Clough KA, et al. Digestion of haemoglobin by schistosomes: 35 years on[J]. Parasitol Today, 1995, 11: 299-303.
- [3] Day SR, Dalton JP, Clough KA, et al. Characterization and cloning of the cathepsin L proteinases of *Schistosoma japonicum*[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1995, 217: 1-9.
- [4] Brady CP, D'owd AJ, Brindley PJ, et al. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin[J]. Infect Immun, 1999, 67: 368-374.
- [5] Wasilewski MM, Litn KC, Phillips J, et al. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 81: 179-189.
- [6] Dalton JP, Clough KA, Jones MK, et al. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinases of *Schistosoma mansoni*[J]. Infect Immun, 1996, 64: 1328-1334.
- [7] Michel A, Ghoneim H, Resto M, et al. Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 73: 7-18.

(收稿日期:2002-05-29 编辑:富秀兰)