

日本血吸虫信号蛋白编码基因表达质粒的构建

李德发¹ 沈继龙¹ 祖莹² 王维¹ 郭泽坤³ 余龙³

中图分类号: R 383.24

文献标识码: B

日本血吸虫以钉螺为中间宿主, 各种野生和家养动物为保虫宿主, 因此防治血吸虫病十分困难且代价昂贵。WHO 认为, 作为化疗或其他措施的必要补充, 应优先考虑人用血吸虫病疫苗的发展^[1], 但已知的候选疫苗, 包括 1998 年 WHO/TDR 推出的 6 个最具潜力的疫苗候选分子的减虫率或减卵率低于 40%。已知日本血吸虫信号蛋白(14-3-3)广泛分布于真核生物细胞内, 能结合原癌基因产物和癌基因产物, 如多瘤病毒抗原、Raf-1、Ras、cdc-25 磷酸酶和 PKC 等, 在细胞信号转导通路中起调节作用^[2-4]。国外已有有关人类 14-3-3 用于克雅氏病(CJD)诊断报道^[5-7]。Schechtman 等^[8,9]报道了曼氏血吸虫生活史各期中 14-3-3 编码基因的期特异性表达及 14-3-3 作为基因工程疫苗对曼氏血吸虫感染小鼠的免疫保护作用。目前, 14-3-3 在虫体信号转导中的作用及 14-3-3 作为候选疫苗的实验室评价研究国内未见报道。作者等在克隆了人神经元细胞 14-3-3 zeta 亚型的基础上^[10], 体外扩增、克隆了日本血吸虫(中国大陆株) 14-3-3 (Sj14-3-3) 编码基因, 并对其理论推导的氨基酸序列进行分析, 试图从干扰虫体信号转导的角度, 寻找新的血吸虫病的疫苗候选分子。

1 材料与与方法

1.1 日本血吸虫成虫 用含成熟尾蚴的阳性钉螺(购自浙江省医学科学院)常规方法逸尾蚴, 感染家兔, 45 d 左右剖杀, 门静脉灌注法收集血吸虫成虫。

1.2 菌株和质粒 *E. coli* DH5 α 为本室保存, 原核表达质粒 pET28a 由中山医科大学寄生虫学教研室余新炳教授惠赠。

1.3 PCR 引物 根据 Sj14-3-3 核苷酸序列^[11]设计并合成一对引物:

P1: 5'-TAG GGA TCC ATG AGG GAT TCG TTC 3',

P2: 5'-TAG CTC GAG TCA GCC ATC ATT TCC G-3',

2 条引物(上海基康公司合成)的 5' 端分别引入限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* P I 酶切位点。

1.4 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒 (total RNA isolation system II) 为华美公司产品, 第 1 链 cDNA 合成试剂盒为 GIBCO 公司产品, Taq DNA 聚合酶及 PCR 产物纯化试剂盒为 Promega 产品; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、 λ DNA (*Eco*R I、*Hind*III) 标志物、PCR 标志物、dNTP 及琼脂糖均为华美公司产品, T4 DNA 连接酶为 Roche 公司产品, DNA 片段凝胶回收试剂盒为上海华舜公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

1.5 总 RNA 提取及 RT-PCR 日本血吸虫总 RNA 的提取及

cDNA 第 1 链合成按试剂盒说明进行。

1.6 Sj14-3-3 基因编码区的 PCR 扩增 以日本血吸虫成虫 cDNA 第 1 链为模板, 反应总体积为 100 μ l, 其中日本血吸虫 cDNA 第 1 链合成物 4 μ l、10 \times buffer 10 μ l、MgCl₂ 6 μ l (25 mmol/L)、dNTP 2 μ l (10 mmol/L)、引物 P1 和 P2 各 2 μ l (10 μ mol/L)、Taq DNA 聚合酶 2 μ l (5 u/L)、置 HeMa480 扩增仪(珠海黑马公司)按下述条件反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。纯化按试剂盒说明进行。

1.7 Sj14-3-3 基因原核表达载体的构建和鉴定 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切纯化的 Sj14-3-3 扩增产物及 pET28a 质粒 DNA, 酶切后的 DNA 片段回收按试剂盒说明进行。插入片段和质粒 DNA 片段按摩尔比 4:1 比例 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。按文献制备 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 用连接反应物转化感受态细胞, 并涂布于 LB/Kan 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。克隆 PCR 法快速鉴定阳性克隆, 提取阳性克隆质粒 DNA, *Bam*H I、*Xho* I 单、双酶切, PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 Sj14-3-3 基因序列的测定及分析 用 pET28a 载体多克隆位点、下游的 T7 启动子和终止子序列为测序引物, 以重组质粒 pET28a-Sj14-3-3 为模板, 按 PE 公司测序试剂盒说明, 在 ABI377 型全自动测序仪上进行测序和读序(测序工作由复旦遗传研究所测序室协助完成)。用在线软件 MBS 和 Blast 对 Sj14-3-3 基因序列及推测的氨基酸序列与 GenBank 收录的日本血吸虫 14-3-3 进行同源性分析。用 Expsy Scan Prosite 和 Motif 软件对 Sj14-3-3 进行功能位点和高度保守区域分析。

2 结果

2.1 Sj14-3-3 基因编码区的 PCR 扩增和鉴定 用所设计和合成的一对引物从日本血吸虫 cDNA 中扩增出 Sj14-3-3 基因。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 697 bp 与 994 bp 之间出现 1 条特异条带, 与理论值 765 bp 相符(图 1)。

2.2 重组 Sj14-3-3 基因原核表达载体的鉴定 将 Sj14-3-3 基因克隆入原核表达载体 pET28a。用 *Bam*H I 单酶切后, 电泳条带的迁移率略慢于空质粒。用 *Bam*H I + *Xho* I 双酶切及以重组质粒为模板的 PCR 鉴定, 都出现一条大小与 Sj14-3-3 扩增条带迁移率相同的电泳条带, 表明已获得正确克隆(图 2)。

2.3 Sj14-3-3 基因 DNA 序列测定 用 ABI377 型全自动测序仪对 Sj14-3-3 基因进行了序列测定, 该基因全长 765 bp, 编码了 254 个氨基酸。

2.4 Sj14-3-3 基因序列分析 借助软件对测定的 Sj14-3-3 基因序列进行分析。同源性分析结果表明 Sj14-3-3 与 GenBank

基金项目: 安徽省自然科学基金(No. 99044547)

作者单位: 1 安徽医科大学病原生物学教研室, 合肥 230032; 2 蚌埠医学院临床免疫学教研室, 蚌埠 233003; 3 复旦大学遗传学研究所, 上海 200433

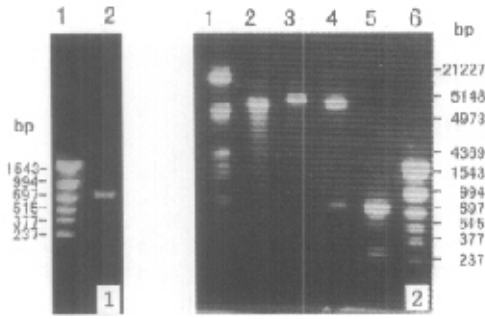


图 1 Sj14-3-3 基因 PCR 产物 1 DNA 分子量标志物 2 PCR 产物 图 2 pET28a-Sj14-3-3 的酶切和 PCR 鉴定 1 λDNA (EcoRI + HindIII) 分子量标志物 2 pET28a 单酶切 (BamHI) 3 pET28a-Sj14-3-3 单酶切 (BamHI) 4 pET28a-Sj14-3-3 双酶切 (BamHI + XhoI) 5 以 pET28a-Sj14-3-3 为模板的 PCR 6 DNA 分子量标志物

收录的日本血吸虫(中国大陆株)14-3-3 蛋白编码基因(收录号为 AF000369)具有 99.5% 同源性,氨基酸序列有 99.2% 同源性。两者有 4 个碱基不同:即第 416 位 T→A 突变、第 495 位 A→G 突变、第 559 位 A→G 突变及第 672 位 C→T 突变。与核苷酸序列对应的氨基酸序列有 2 处不同:第 139 位 F→Y 改变及第 187 位 M→V 改变。由于遗传密码的简并性,核苷酸第 495 位和第 672 位的突变未引起对应氨基酸序列的改变。通过在线软件对 Sj14-3-3 基因抗原表位进行多参数综合分析,结果显示其编码的氨基酸序列内有 5 个亲水高峰,分别位于第 20、70、123、182 及 237 位氨基酸附近;有 12 个易曲性高峰,提示这些区域可能有抗原表位存在。

3 讨论

Moore 等^[1]电泳发现 14-3-3,并根据其在 DEAE(二乙氨基)纤维素层析中片段数目及淀粉凝胶电泳中迁移的位置命名为 14-3-3。长期以来,其生物学功能未受到重视。直到 Isobe 等^[12]报道 14-3-3 与色氨酸羟化酶、酪氨酸羟化酶的活性调节有关,对 14-3-3 的研究才深入开展。近年来研究表明^[13],14-3-3 是一种信号接头蛋白,可与多种信号转导蛋白结合并参与有丝分裂原的信号转导、细胞凋亡和细胞周期调控。由于 TaqDNA 聚合酶在体外无 3'→5' 外切酶活性,所以无校正功能,PCR 扩增产物中的错误掺入难以避免且随机发生:本研究在体外扩增 Sj14-3-3 基因过程中有 4 个碱基发生突变,并导致 2 个氨基酸发生差异,但维系蛋白质空间构象的二硫键未被破坏,因此这种差异并未引起蛋白质结构的改变。序列分析结果表明,Sj14-3-3 蛋白理论分子量为 28.98 kDa,其中酸性氨基酸谷氨酸和精氨酸含量较高,分别占 10.6% 和 7.5%,故 Sj14-3-3 为酸性蛋白质,PI 为 4.86。分子内部 α 螺旋占 59.1%,无跨膜区域,是典型的胞浆蛋白质。有一段不分物种和亚型的高度保守区位于 222~241 位氨基酸,氨基酸

序列为“YKDSTLIMQLLRDNLTLW AS”,2 个 N-糖基化位点(184~187,235~238),3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(84~86,117~119,221~223),5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(13~16,74~77,210~213,216~219,221~224),2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(130~137,131~139)和 2 个 N-豆蔻酰化位点(64~69,180~185)。

根据抗原表位分析理论,抗原表位一般存在于亲水性、易曲性好的区域^[14]。这种抗原表位分析方法虽有一定的局限性,但亦有一定预测价值,可为抗原表位分析及疫苗研制提供参考。用 ProtScale 软件对 Sj14-3-3 进行多参数综合分析,结果表明其编码的氨基酸序列内有 5 个亲水高峰,而且易曲性指数亦高,提示该区域可能存在抗原表位。二级结构,第 225~232 位氨基酸区域亦可形成 α 螺旋。α 螺旋结构被认为易于诱导 T 细胞介导的免疫^[15],因而该区域可能还是 T 细胞表位。本文成功地将 Sj14-3-3 基因定向克隆到高效原核表达质粒 pET28a 中,为其体外表达及 Sj14-3-3 蛋白质免疫原性研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Butterworth AE. Vaccine against schistosomiasis: where do we stand [J]? Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992,86:1-2.
- [2] Freed E, Symons M, Macdonald SG, et al. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation [J]. Science, 1994,265:1713-1716.
- [3] Reuther GW. Association of protein kinase c-Rac and Ber-Ab1 with protein of the 14-3-3 family [J]. Science, 1994,266(5182):129-133.
- [4] Conklin DS, Galaktionov K, Beach D. 14-3-3 protein associate with cdc25 phosphatase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995,92:7892-7896.
- [5] Green AJ, Thompson EJ, Stewart GE, et al. Use of 14-3-3 and other brain-specific proteins in CSF in the diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease [J]. J Neur Neurol Psych, 2001,70:744-748.
- [6] Peoc'h K, Schroder HC, Laplanche J, et al. Determination of 14-3-3 protein levels in cerebrospinal fluid from Creutzfeldt-Jakob patients by a highly sensitive capture assay [J]. Neurol Lett, 2001,6:301:167-170.
- [7] Brandel JP, Peoc'h K, Beaudry P, et al. 14-3-3 protein cerebrospinal fluid detection in human growth hormone-treated Creutzfeldt-Jakob disease patients [J]. Ann Neurol, 2001,49:257-260.
- [8] Schechtman D, Ram D, Tarrab-Hazdai R, et al. Stage-specific expression of the mRNA encoding a 14-3-3 protein in the life cycle of *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995,73:275-278.
- [9] Schechtman D, Tarrab-Hazdai R, Arnon R. The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis [J]. Parasit Immunol, 2001,23:213-217.
- [10] 沈继龙, Chen SG. 肌蛋白诊断标志分了 14-3-3 Zeta 基因亚克隆及其表达 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2000,16(5):8-11.
- [11] Moore BW, Perez VJ. Specific acidic proteins of the nervous system [A]. In: Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration [C]. ed: FD Carlson, Englewood Cliffs. NJ:Prentice-Hall 1967:343-359.
- [12] Isobe T, Ichimura T, Sunaya T, et al. Distinct forms of the protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxy lase [J]. J Mol Biol, 1991,217:125-132.
- [13] Fu HA, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 Protein: Structure, Function and Regulation [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 2000,40:617-647.
- [14] Hopp TP, Woods KP. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981,78:3824.
- [15] Suss G, Matile H, Meloen RH, et al. Identifying polymorphic regions of the p190 protein from different *Plasmodium falciparum* strains by using specific T cells [J]. Parasite Immun, 1993,15:127.

(收稿日期:2001-06-17 编辑:富秀兰)