

【论著】

文章编号:1000-7423(2001)-01-0019-03

日本血吸虫线粒体相关蛋白的特性及抗原表位的分析*

胡雪梅² 张兆松¹ 吴海玮¹ 苏川¹ 赵巍³ 马磊¹ 周吉礼² 吴观陵¹

【摘要】 目的 分析 rSj338 重组蛋白的氨基酸序列,了解该蛋白的特性,预测其抗原表位。方法 制备 Sj338 基因片段并重组入测序载体 pGEM-T,对其核苷酸序列进行测定,分别以 DNASIS 和 GOLDKEY 软件对序列资料进行分析,并在 BLAST 网上进行同源性分析。结果 rSj338 基因长 487 bp,含 1 个由 459 bp 组成的开放阅读框,编码一由 153 个氨基酸残基组成的多肽,分子量为 17.6 kDa,氨基酸同源性分析发现,重组蛋白与人的线粒体传入受体亚单位氨基酸同源性为 46%,与褐鼠线粒体膜受体的前体氨基酸同源性为 44%,预测该蛋白的抗原表位位置为 26~32、37~46、131~136 和 147~151 氨基酸肽段。结论 rSj338 重组蛋白可能为日本血吸虫线粒体相关蛋白。

【关键词】 日本血吸虫;线粒体;重组蛋白;序列分析;线粒体相关蛋白

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Analysis of the Mitochondria-Related Protein of *Schistosoma japonicum* and its Antigen Epitopes

Hu Xue-mei², Wu Hai-wei¹, Zhang Zhao-song¹, Su Chuan¹, Zhao Wei³, Ma Lei¹, Zhou Ji-li², Wu Guan-ling¹

(1 Institute of Medical Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029;

2 Department of Parasitology, Binzhou Medical College, Binzhou 256603;

3 Department of Biology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004)

【Abstract】 Objective To sequence the cloned gene Sj338 and to identify the encoded protein and its antigen epitopes. **Methods** The Sj338 gene fragment obtained from adult *S. japonicum* cDNA library amplified by PCR method was subcloned into pGEM-T vector for sequencing. The sequence of nucleotides and the characteristics of the encoded protein were analyzed by DNASIS Program and Goldkey DNA and Protein Analytical Program, and then the homology of the amino acid sequence was searched on the BLAST net. **Results** The cloned rSj338 gene was demonstrated to be 487 bp containing one 459bp ORF, encoding a protein consisted of 153 amino acids with a molecular weight of 17.6 kDa. The amino acid sequence of the recombinant protein rSj338 shared 46% identity with that of the corresponding part of human mitochondrial import receptor and 44% identity with that of the *Rattus* sp. mitochondrial precursor receptor. The possible antigen epitopes were predicted within the peptide fragments of 26-32 aa, 37-46 aa and 147-151 aa. **Conclusion** The protein encoded by rSj338 gene fragment might be the mitochondria-related protein of *Schistosoma japonicum*.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*, mitochondria, recombinant protein, sequence analysis, mitochondria-related protein

* Supported by the Funds of Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Jiangsu Province(No. K 9832), and by the Premier's Special Research Fund(No. 94-y-23) and by the National Natural Science Foundation of China (No. 39800316)

对日本血吸虫中国大陆株成虫 cDNA 库的免疫学筛选,获得了基因 Sj338/24 基因克隆,重新设计引物,并设计双酶切位点,通过 PCR 方法扩增,以获得基因 Sj338 片段,将其亚克隆入表达载体 pGEX-6P-1,阳性克隆能够高效融合表达,其融合蛋白的分子量为 43.6 kDa^[1],为寻找新的疫苗候选分子,了解该蛋白质特性十分必要,因此本研究对该蛋白质的

特性及氨基酸序列进行分析,并预测其抗原表位。

材料与方法

1 重组体的制备

用 PCR 方法扩增目的基因 Sj338,并将目的片段亚克隆入 pGEM-T 载体,构建成 pEGM-T-rSj338 重组体,操作按 pGEM-T vector 试剂盒(购自 Promega 公司)说明书进行,将重组体转化到大肠杆菌 JM109 中。

2 重组体的鉴定及核苷酸序列测定

基金项目: * 江苏省医学分子生物学重点实验室开放课题资金(No. K9832)总理基金(No. 94-Y-23)及国家自然科学基金资助项目(No. 39800316)部分资助

作者单位:1 南京医科大学分子免疫寄生虫学研究室,南京 210029; 2 滨州医学院寄生虫学教研室,滨州 256603; 3 宁夏医学院生物教研室,银川 750004)

用 X-gal/Amp 选择培养基挑选阳性克隆,碱裂解法抽取质粒进行 *EcoR* I 和 *Not*I 双酶切鉴定,选阳性克隆菌株进行目的片段的核苷酸序列测定(分别送两家不同的生物工程公司测序,两次测序结果完全一致)。

3 氨基酸序列、氨基酸同源性及蛋白质特性分析

采用 DNASIS 软件分析该基因的核苷酸序列,并推测氨基酸的序列,在 BLAST 网上检索氨基酸的同源性;分析该基因所编码蛋白质的特性。

4 抗原表位的预测

将蛋白质的分析指标采用 GOLDKEY 软件(军事医学科学院基础医学研究所, Ver.2.0)进行分析,预测出重组蛋白的抗原表位。

结 果

1 Sj338 亚克隆入 pGEM-T 载体

将 Sj338 基因亚克隆 pGEM-T,转化大肠杆菌 JM109,获 9 个白色菌落,琼脂糖凝胶电泳鉴定,9 个白色菌落的 DNA 均明显落后于空载质粒 DNA,为可能阳性菌落。用碱裂解法提取可能阳性菌落的 DNA,经 *EcoR* I 和 *Not*I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳,均切下目的条带,表明重组成功。

2 rSj338 基因序列分析

2.1 碱基组成 该基因全长 487 bp,其中 A: 137, C: 97, G: 109, T: 144, G/C 含量为 42%, A + T/G + C 构成比为 1.36: 1,符合血吸虫结构基因高 A + T 的构成特点。

2.2 开放阅读框 在该段基因内,只有第一阅读框为开读框,第 7 位核苷酸处为第一个起始密码子,第 465 位核苷酸处为终止密码子,故开读框长 459 bp,编码 153 个氨基酸残基的多肽(图 1),编码蛋白质的分子量为 17.6 kDa。另外,在此开读框内第 206 位和 257 位核苷酸处有 2 个起始密码子。

3 氨基酸序列同源性分析

将该重组蛋白的氨基酸序列在 BLAST 网上进行同源性分析,结果与人的线粒体膜蛋白受体亚基的同源性为 46%,与褐鼠线粒体膜受体蛋白的同源性为 44%(图 2),同源的氨基酸相对集中在两个区域(19 ~ 30 和 106 ~ 115 位氨基酸)。

```

1  ATG CTT CGT TGG GCT TTT CCG TAT GTT GCT GCA GGG GCT GGG ATT ATT
1  M L R W A F P Y V A A G A G I I
49  TTC GTC GGG TAT TGC AIT IAT TTT GAC AAA AAG AGA CGA AGI CAC CCC
17  F V G Y C I Y F D K K R R S H P
97  GAC TTT TGG AAA AAI CIG CCG AAA AAA AGA ATT GAG CAA AAA GCT CTT
33  D T W K N L R K K R I E Q K A L
135  GAG GCT CAA AAG TTA TCC TCA TTT CCA TTG CCA CCG AIA AAI GAC CAG
49  E A Q K I S S T P L P P I N D Q
193  AAT GCT ATG CAG AGG TTT TTC CTT CAG CAA ATT CAA CAA GGA GAA ACA
65  N A M Q R F F I Q Q I Q Q G I T
241  GCC TTG AGT ATG GGG TCC TTA GAT GAA GTC GTT AAC CAI TIC GCT AIT
81  A L S M G S L D E V V N H F A I
289  GCC GTT ICT ATT TGC TGI CAA CCI AAI CAG TTA TTA CAG GTG CTT CAG
97  A V S I C C Q P N Q L L Q V L Q
337  CAG TCG CTT AGT CCA ACT GTA TTT TTG AGA CTC AIT GAG AIA CTT CTT
113  Q S L S P T V I L R L I E T I P
385  TCG GTG CAA TCT AAG IAC AAA ACG AIG ACT GCT AAT CGI ACG TCA TTG
129  S V Q S K Y K T M T A N R I S I
453  GGA LGA GAA ATC GAA GAG GAT CIG GAG TGA
145  G R T I F E D L L P

```

图 1 Sj338 核苷酸测序结果及其编码蛋白质的氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide sequence of Sj338 and its deduced amino acid sequence

4 蛋白质特性分析

以 GOLDKEY 软件对该段基因编码的蛋白质分析,发现该蛋白质二级结构内部形成 Loop 结构,最大的 Loop 结构由 30 个氨基酸组成,重组蛋白的等电点(PI)为 9.40,极性基团主要位于 26 ~ 33、36 ~ 47、67 ~ 73 和 131 ~ 145 位氨基酸,主要含有赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸,153 个氨基酸残基中带有非极性疏水基团的氨基酸有 72 个,共含 3 个半胱氨酸。

5 重组蛋白质抗原表位预测

根据电荷分布(charge distribution)、亲水性(hydrophilicity)、抗原性(antigenicity)、可及性(accessibility)、迁移度(mobility)及蛋白质的二级结构(secondary structure)等 6 种参数,用 GOLDKEY 软件对 rSj338 编码蛋白质抗原位点进行分析,综合各参数的分析结果,得到抗原位点的综合判断,结果显示,153 个氨基酸区域内形成 4 个主峰(图 3),可能为抗原表位,其位置及氨基酸序列从 N-端起为 26 ~ 32(KKRRSHP)、37 ~ 46(NLRKKRIEQK)、131 ~ 136(QSKYKT)和 147 ~ 151(EIFED)。

讨 论

日本血吸虫病疫苗研究进展迅速, 在国内外若干实验室已克隆和表达了一系列日本血吸虫抗原基

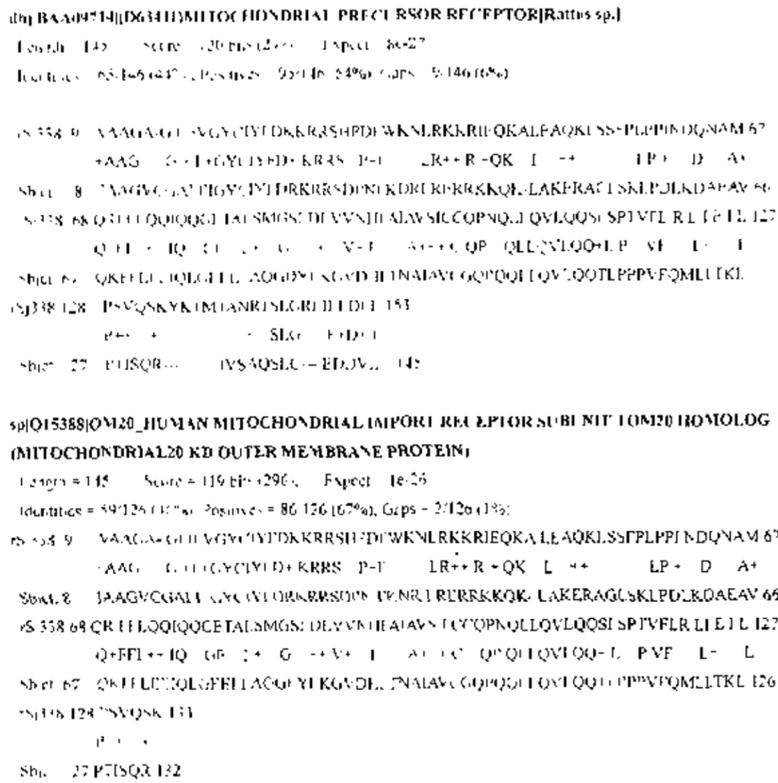


图 2 rSj338 基因所编码蛋白质氨基酸序列同源性比较
Fig. 2 Comparison of homology of amino acids of rSj338 with amino acids from other sources

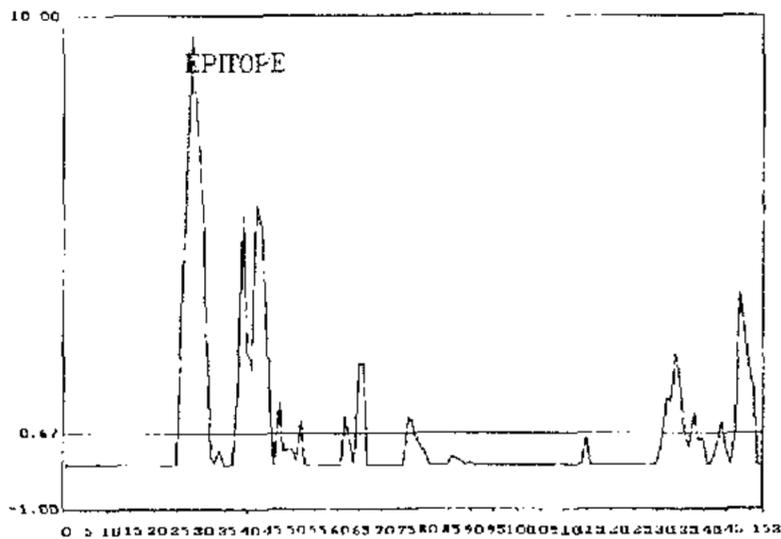


图 3 rSj338 氨基端部分蛋白抗原表位的分析
Fig. 3 Epitope analysis of the amino terminal of rSj338 protein

因, 动物实验测试其疫苗效果, 获得的保护力尚不够理想^[2-4], 基于血吸虫病免疫机理的复杂性及目前的研究现状, 有必要积极寻找并克隆表达新的疫苗候选分子, 为我国血吸虫病疫苗研究增加新的内容, 本室筛选日本血吸虫成虫 cDNA 库获得的基因片段 Sj338/24 基因片段^[5], 本研究对该基因做进一

步研究, 重新设计引物, 获得了主要编码蛋白基因, 并进行了核苷酸序列分析, 引物中设计双酶切位点, 为进一步亚克隆及表达打下了基础。氨基酸同源性分析发现, 该基因所编码蛋白与人线粒体传入受体亚单位的同源性为 46% (identity = 59/126), 与褐鼠线粒体受体前体同源性为 44% (identity = 65/146), 因此初步认为该基因所编码蛋白可能为日本血吸虫线粒体相关蛋白。为从干扰血吸虫的能量代谢及代谢调节, 进而影响虫体的生殖功能等方面来探索新的疫苗候选分子提供物质基础。蛋白质特性分析发现该蛋白为酸性蛋白质, 其中含有较多带有非极性疏水基团的氨基酸, 可以解释该重组蛋白在表达中易形成不溶性蛋白包涵体的特性。本研究利用软件可预测该基因所编码蛋白的主要抗原表位, 为开展合成肽疫苗的肽段位置的选择提供理论依据^[6,7], 并对采用噬菌体表面显示肽库筛选该蛋白的抗原表位具有参考价值。

参 考 文 献

- [1] 胡雪梅, 吴海玮, 张兆松, 等. 日本血吸虫线粒体相关蛋白的基因克隆及特性鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18: 220 - 223.
- [2] Liu SX, Song GC, Xu YX, et al. Antifecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione-S-transferase. Parasit Immunol, 1995, 17: 335 - 340.
- [3] 苏川, 马磊, 王荣芝, 等. 日本血吸虫 22.6kDa 重组蛋白对小鼠的免疫保护性研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 288 - 291.
- [4] 沈定文, 李雍龙, 韩家俊, 等. 日本血吸虫成虫 31/32 kDa 蛋白的纯化及保护性免疫力的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11: 241 - 243.
- [5] 吴海玮, 王荣芝, 陈淑贞, 等. 日本血吸虫再感染相关基因克隆的筛选及鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 372 - 373.
- [6] Patarryo ME, Romero P, Torres MI, et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. Nature, 1987, 328(6131): 629 - 632.
- [7] Patarryo ME, Amador R, Clavijo P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature, 1988, 332(6160): 158 - 161.

(收稿日期: 2000-01-20 编辑: 李雅卿)