

文章编号: 1000-7423(2000)-04-0220-04

日本血吸虫线粒体相关蛋白的基因克隆及特性鉴定*

胡雪梅¹ 吴海玮¹ 张兆松¹ 苏川¹ 赵巍³ 沈蕾¹

王荣芝¹ 马磊¹ 周吉礼² 陈淑贞¹ 吴观陵¹

(1 南京医科大学分子免疫寄生虫学研究室, 南京 210029;

2 滨州医学院寄生虫教研室, 滨州 256603; 3 宁夏医学院生物教研室, 银川 750004)

摘要 [目的] 探索研制血吸虫病疫苗的新途径, 对日本血吸虫线粒体相关蛋白进行基因克隆及特性鉴定。[方法] 分析本室筛选日本血吸虫成虫 cDNA 文库获得的 1 个 cDNA 片段 (Sj338/24) 的开读框序列, 在其上下游分别设计引物 A 和 B, 并以该 cDNA 片段为模板进行 PCR 扩增后, 将该片段重组于 pGEM-T 中并进行 DNA 测序鉴定及检索。再经酶切后将该基因片段亚克隆入表达载体 pGEX-6P-1, 并进行蛋白表达、纯化及抗原性鉴定。[结果] 该目的基因 PCR 产物全长共 487 bp, 其开读框由 459 bp 组成, 编码 153 个氨基酸经羧基组成的多肽。DNA 序列同源性分析发现 Sj338 克隆基因与人及褐鼠的线粒体外膜蛋白的部分编码基因较高度同源。重组质粒 pPEX-6P-1/Sj338 能高效融合表达, 理论蛋白的分子量为 17 kDa。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测结果表明, 重组蛋白 rSj338 具有良好的抗原性。[结论] Sj338 可能为日本血吸虫线粒体相关蛋白的基因, 重组蛋白有望成为新的疫苗候选分子。

关键词: 日本血吸虫, 线粒体, 基因克隆, 重组抗原, 融合表达, 线粒体相关蛋白

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

血吸虫病影响世界两亿人口, 因此 WHO 已把发展血吸虫病疫苗做为首要的目标。至今国内外已探索出有希望的疫苗候选分子有多种, 许多实验室已成功克隆了编码各种抗原蛋白的基因, 并进行了重组抗原基因的克隆、表达及抗原免疫保护性实验。各家结果虽有所不同, 但均仅获得了部分保护力^[1]。以上研究均从影响虫体的膜蛋白或酶的角度来寻找抗血吸虫病的候选分子。基于目前国内外研究现状, 有必要广开思路, 从多方面多途径探索抗血吸虫病的机制, 以便发现真正有价值的疫苗分子。已有研究^[2,3]表明, 线粒体在蠕虫的能量代谢及代谢调节中起着重要的作用, 这些代谢可提供虫体肌肉活动或神经传导所需的能量, 并与维持虫体生殖功能有关。本室已从日本血吸虫成虫 cDNA 库中筛选到一基因片段, 初步认为有可能是编码日本血吸虫 (中国大陆株) 线粒体相关蛋白的基因^[4], 本文在此基础上进一步研究该基因, 试图从干扰虫体的能量代谢, 进而影响虫体肌肉活动和神经传导功能, 以及影响虫体生殖功能等诸方面, 探索新的疫苗候选分子。

材料与方法

1 Sj338 基因片段的 PCR 扩增和纯化

以本室构建的日本血吸虫中国大陆株成虫

cDNA 库中筛选的得一阳性克隆 (Sj338/24), 以 DNASIS 软件分析该基因片段的开读框, 在起始密码上游设计上游引物 A:

5'-GAATTCATGCTTCGTTGGGCCTTTTCGGTA-3',

在终止密码的下游设计下游引物 B:

5'-GGGGCGCTAAACGTATTTTCACTCCAGA-3',

并在两个引物的 5' 端分别设计 1 个 EcoRI 和 1 个 NotI 酶切位点。引物由上海生工生物工程公司合成。以原基因片段 Sj338/24 为模板, 进行 PCR 扩增, 条件为: 92 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 末次循环 72 °C 延伸 20 min, 总反应体积 50 μl, 35 个循环。PCR 所用试剂盒购自 Promega 公司。PCR 产物的回收和纯化: 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物并切下目的条带, 用 Wizard DNA Clean-up Kit (试剂盒购自 Promega 公司) 纯化目的 DNA 片段 Sj338。

2 重组质粒 pGEM-T/Sj338 的构建及核苷酸序列分析

将目的片段亚克隆于 pGEM-T 载体, 操作步骤按 pGEM^(T)-T vector 试剂盒 (购自 Promega 公司) 说明书进行, 并转化到大肠杆菌 JM109 中, 用 X-gal/Amp 选择培养基挑选阳性克隆, 碱裂解法提取质粒进行鉴定, 并选阳性克隆菌株进行目的片段的核苷酸序列测定, 由上海基康生物工程公司和中国科学院人类基因组研究室完成。用 DNASIS 软件和

* 江苏省重点实验室开放课题基金资助项目 (No. K9832)

BLAST数据库对目的DNA测序资料进行分析,并分析其同源性。

3 重组质粒 pGEX-6P-1/Sj338 的构建

3.1 目的片段和重组质粒的酶切及分子克隆

挑选含 pGEM-T/Sj338 的菌落进行培养,碱裂解法回收和纯化带有目的片段的质粒;同时取适量的表达载体 pGEX-6P-1 质粒 (Pharmacia 公司产品),将两者分别用 EcoRI 和 NotI 进行双酶切处理,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离带有双粘性末端的目的片段和表达质粒,并用 Wizard DNA Clean-up Kit 进行纯化, T4 连接酶于 15℃ 连接 4 h, 构建成 pGEX-6P-1/Sj338, 并转化入 BL21 菌, Amp 选择培养基筛选出阳性菌落 (限制性内切酶和连接酶购自 MBI 公司)。

3.2 阳性菌落的鉴定

碱裂解法提取质粒经电泳进行初步鉴定,进一步对质粒进行 EcoRI 和 NotI 双酶切,并对酶切产物进行电泳鉴定。

3.3 重组蛋白的诱导表达和鉴定

将已经鉴定的阳性菌落接在 50 ml YT 培养基中,置摇床中,以 37℃、240/min 条件下进行培养,等菌液浓度生长至 $OD_{600nm} = 0.5$ 时加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续培养 5 h,离心收集细菌进行 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定,并用图象分析软件计算蛋白表达率。用血吸虫免疫血清对表达蛋白进行 Western blotting 实验。

结 果

1 PCR 扩增、pGEM-T 与目的片段的克隆和目的DNA的测序

获得一 480 bp 左右的 DNA 片段 (图 1)。经 X-gal/Amp 选择培养基筛选出白色阳性菌落,抽提质粒并进行 EcoRI 和 NotI 双酶切,电泳结果显示有一 480 bp 左右片段被切下,确定为重组成功菌。测序结果表明 PCR 产物由 487 bp 组成,其中编码基因由 459 bp 组成,编码 153 个氨基酸。本实验共进行两次核苷酸序列分析,结果完全一致 (图 2)。证明约 40 kDa 处的蛋白分子为 Sj338/GST 融合蛋白。

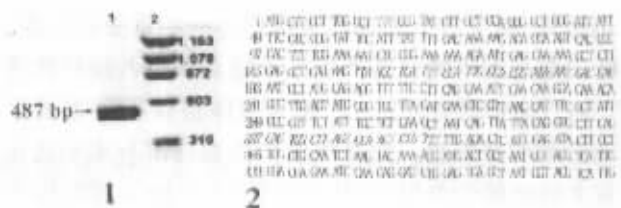


图 1 PCR 扩增产物 1 PCR 产物 2 DNA 标志物 图 2 Sj338 核苷酸测序结果

Fig. 1 PCR-amplified product Lane 1 PCR product Lane 2 DNA marker (pcl74-Hae III digest) Fig. 2 Nucleotide sequencing of Sj338

2 重组质粒 pGEX-6P-1/Sj338 的构建及阳性表达克隆菌株的确定

转化后挑选菌落进行质粒提取酶切和电泳鉴定,结果见图 3。阳性克隆菌经 IPTG 诱导表达后 SDS-PAGE 结果显示,约 40 kDa 处有一明显的染色条带,蛋白表达量为菌体总蛋白的 27.3%,带有空载质粒的阴性对照可见载体本身表达的日本血吸虫 26 GST,而不带质粒的阴性对照则两个条带均无 (图 4)。Western blotting 分析结果显示, Sj338 的表达产物和载体本身表达产物均能被免疫血清识别 (图 5)、正常兔血清则不能对上述两条带进行

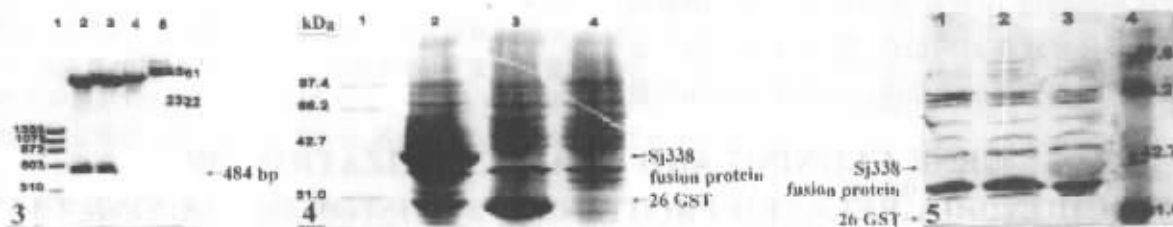


图 3 pGEX-6p-1 重组质粒的鉴定 1 DNA 标志物 (pcl74-Hae III) 2 和 3 重组克隆进行 EcoRI 和 NotI 双酶切 4 质粒 pGEX-6P-1 对照 5 DNA 标志物 (lambda-Hind III) 图 4 表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳 1 蛋白标志物 2 重组成功的表达菌 3 质粒载体表达菌 4 受态菌 BL21 图 5 表达产物的 Western blotting 分析 1 受态菌 BL21 2 含质粒 pGEX-6P-1 菌 3 重组成功表达菌 4 蛋白标志物

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pGEX-6P-1/Sj338 Lane 1 DNA marker (pcl74-Hae III digest) Lanes 2 and 3 pGEX-6P-1/Sj338 was digested with EcoRI and NotI Lane 4 pGEX-6P-1 as control Lane 5 DNA marker (lambda-Hind III digest) Fig. 4 SDS-PAGE of rSj338 Lane 1 Protein marker Lane 2 pGEX-6P-1/Sj338/BL21 Lane 3 pGEX-6P-1/BL21 Lane 4 E. coli BL21 Fig. 5 Western blotting analysis of the expressed products Lane 1 E. coli BL21 Lane 2 pGEX-6P-1/BL21 Lane 3 pGEX-6P-1/Sj338/BL21 Lane 4 Protein marker

讨 论

近年来,日本血吸虫病疫苗/诊断抗原的研究进展迅速,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因,动物实验测试其疫苗效果,获得的保护力尚不够理想^[5-7]。基于血吸虫病免疫机制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我国特有的日本血吸虫病疫苗候选分子,为我国血吸虫病疫苗研究增加新的内容。

已知线粒体与血吸虫的能量代谢及代谢调节密切相关,蠕虫的一个共性是糖作为一种重要的能源,糖代谢过程中的重要产物苹果酸必须进入线粒体进一步代谢即歧化反应,才能为虫体提供各种重要生理活动所需能量。此外线粒体内存在有与末端氧化有关的细胞色素链、无氧电子流、ATP 酶及对某些代谢产物具有特殊的转运机制,从而保证虫体完成呼吸、发育、生殖、肌肉活动及神经传导等生命活动过程。

本研究获得了目的基因 S_J338,并在上下游引物分别设计一酶切位点,为进一步双酶切后定向亚克隆创造了条件。利用 PCR 方法克隆目的基因,方便省时,但用其产物构建重组质粒,常因对其产物直接进行酶切效果不好而导致重组失败;用 PCR 产物直接进行 DNA 序列分析也难以确保质量。为了克服上述困难,我们在构建表达重组质粒之前,先将 PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体^[8],再用纯化的质粒进行目的片段的酶切及 DNA 序列分析,从而获得了准确的目的片段,并保证了重组基因测序的质量。该目的基因分别送往两家生物公司进行核苷酸序列测定,结果完全一致。

采用 DNASIS 软件, BLAST 数据库及 Gold Key 软件对该基因的核苷酸序列分析,发现该基因与人线粒体外膜蛋白 19 及褐鼠线粒体外膜受体蛋白的编码基因具有较高的同源性,提示该基因为日本血吸虫线粒体相关蛋白的基因。为从干扰虫体能量

代谢及代谢调节方面探索新的疫苗候选分子提供了物质基础。本研究进一步将该基因亚克隆入表达载体 pGEX-6P-1,该载体含有一个日本血吸虫谷胱甘肽转移酶(GST)基因,并可与重组基因进行高效融合表达。表达产物为 GST 与重组蛋白的融合蛋白。实验结果表明,我们获得的阳性重组菌株能高效表达,融合蛋白的表达量为菌体总蛋白的 27.3%,为进一步研究提供了保证。

对表达产物的 SDS-PAGE 结果显示融合蛋白条带位于约 40 kDa 处,而理论上融合蛋白的分子量为 43 kDa,其原因可能与标准蛋白分子量的准确性是蛋白表达不是第一个起始密码开始或是与融合蛋白本身结构有关。Western blotting 分析结果显示,阳性表达克隆所产生的融合蛋白能被免疫血清所识别,初步表明重组蛋白具有与天然蛋白相同的抗原表位。

本研究的目的是为日本血吸虫病疫苗研究开辟新的途径,增加新内容。目前,对正在进行免疫原性的实验。

参 考 文 献

- [1] 刘述先. 血吸虫病疫苗研制的策略、现状及展望. 中国血吸虫病防治杂志, 1994, 6(增刊): 47~55.
- [2] 丁·巴莱特著, 沈一平等译. 寄生虫的生物学. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 122~126.
- [3] Ward PF. Aspects of helmin metabolism. Parasitology, 1982, 177~194
- [4] 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与鉴定. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 372~375.
- [5] TDR News. Schistosomiasis vaccine: an update 1996, June No. 50: 4.
- [6] Wright MD, Davern KM, Mitchell GF. The function and immunological significance of some schistosome surface molecules. Parasitol Today, 1991, 7(2): 56~58.
- [7] TDR News. Schistosomiasis vaccines: Human correlates studies pave the way. 1997, October No. 54: 4.
- [8] Zhou MY, Clark SE, Gomez-Sanchez CE. Universal cloning method by TA strategy. Bio Techniques, 1995, 19: 34~35.

收稿日期: 1999-12-21
(编辑: 富秀兰)

GENE CLONING AND CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIA-RELATED PROTEIN OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM**

HU Xue-mei^{2*}, WU Hai-wei¹, ZHANG Zhao-song¹, SU Chuan¹, ZHAO wei³, SHEN Lei¹, WANG Rong-zhi¹, MA Lei¹, ZHOU Ji-li², CHEN Shu-zhen¹, WU Guan-ling¹

(1 Research Laboratory of Molecular Immunoparasitology, 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 subclone and characterize a cDNA clone coding for *Schistosoma japonicum* (S. j.) mitochondria-related protein. [Methods] The open reading frame of the fragment (S_J338/24) obtained from an adult

worm cDNA library of *S.j.* was analysed, at the upstream and downstream of the open reading frame(ORF) the primers A and B were designed, respectively, and the cDNA fragment was used as PCR template. The Sj338 gene fragment obtained was amplified by PCR method and then subcloned into pGEM-T vector for sequencing. The gene sequence was analyzed and the target fragment was restrictedly digested and subcloned into expression vector pGEX-6P-1. The expressed recombinant protein was purified and characterized. [**Results**] The cloned Sj338 gene was demonstrated to be 487 bp long containing one 459 bp ORF, encoding a protein with a molecular weight of 17 kDa. The nucleotide sequence of the cloned gene Sj338 had higher homology with those genes coding for mitochondrial outer membrane protein of *Homo sapiens* and *Rattus norvegicus*. The recombinant construct of pGEX-6P-1/Sj338 could be expressed efficiently and the antigenicity of its product rSj338 has been demonstrated by Western blotting. [**Conclusion**] Sj338 may be the gene coding for *S.j.* mitochondria-related protein and the recombinant protein may be used as a new vaccine candidate .

Key Words: *Schistosoma japonicum*, mitochondria, gene cloning, recombinant antigen, fusion expression