

文章编号: 1000-7423(2008)-03-0161-05

【论著】

# 日本血吸虫四跨膜蛋白第二亲水基团(TSP<sub>2</sub>HD)基因合成、表达与免疫原性研究

余传信<sup>1,2\*</sup>, 李健<sup>1,2</sup>, 殷旭仁<sup>1,2</sup>, 华万全<sup>1,2</sup>, 梁幼生<sup>1,2</sup>, 高琪<sup>1,2</sup>

**【摘要】** 目的 合成和表达日本血吸虫四跨膜蛋白第二亲水基团(TSP<sub>2</sub>HD)基因,并研究其免疫原性。方法 采用重叠 PCR 人工合成日本血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD (aa107~aa182)完整基因片段,经测序正确后,将此片段插入表达载体 pGEX-4T-3,构建重组表达质粒 TSP<sub>2</sub>HD-PG,转化大肠埃希菌 BL21 (DE3),获得含重组表达质粒的转化子,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 观察 TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白表达情况。用谷胱甘肽 (GST) 融合蛋白纯化胶 (glutathione sepharose 4B) 从表达产物裂解上清中纯化 GST-TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白,用凝血酶切割融合蛋白,制备纯化的重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白。通过蛋白质印迹 (Western blotting) 分析重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白与血吸虫病患者血清及血吸虫重感染兔血清的免疫反应性;重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白刺激血吸虫感染小鼠淋巴细胞进行淋巴细胞增殖试验,通过比较实验组与对照组脉冲指数 (cpm) 值的差异研究重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白的免疫原性。结果 经过 3 轮重叠 PCR 扩增,获得长 228 bp 的 TSP<sub>2</sub>HD 基因,序列分析证实与天然基因序列完全一致。含重组质粒 TSP<sub>2</sub>HD-PG 的转化子细菌,经 IPTG 诱导后表达相对分子质量 (Mr) 约为 34 000 的可溶性 GST-TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白。凝血酶切割 GST-TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白获得纯化的重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白。Western blotting 分析证明,重组表达蛋白可被血吸虫重感染兔血清和血吸虫病患者血清识别,有较好的免疫反应性;重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白能刺激血吸虫感染小鼠脾细胞增殖,实验组 cpm 值明显高于对照组,两者间差异有统计学意义 (P<0.01)。结论 日本血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD 基因合成及表达获得成功,重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白有天然免疫原性。

**【关键词】** 日本血吸虫;四跨膜蛋白第二亲水基团基因;重叠 PCR;基因合成;表达;免疫原性

中图分类号: R532.21 文献标识码: A

## Gene Synthesis, Expression and Immunogenicity Analysis of TSP<sub>2</sub> Hydrophilic Domain(TSP<sub>2</sub>HD) of *Schistosoma japonicum*

YU Chuan-xin<sup>1,2\*</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>, YIN Xu-ren<sup>1,2</sup>, HUA Wan-quan<sup>1,2</sup>, LIANG You-sheng<sup>1,2</sup>, GAO Qi<sup>1,2</sup>

(1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 Key Laboratory on Technology for Parasitic Disease Prevention and Control, Ministry of Health, China, Wuxi 214064, China)

**【Abstract】 Objective** To synthesize and express the gene of TSP<sub>2</sub> hydrophilic domain of *Schistosoma japonicum*, and investigate the immunogenicity of the recombinant TSP<sub>2</sub>HD protein. **Methods** The whole DNA fragment encoding the TSP<sub>2</sub> hydrophilic domain was synthesized by overlapping PCR, and confirmed by DNA sequencing. The recombinant plasmid TSP<sub>2</sub>HD-PG was constructed by inserting the purified TSP<sub>2</sub>HD DNA fragment into expression vector pGEX-4T-3 and the GST-TSP<sub>2</sub>HD fusion protein was expressed by transforming the recombinant plasmid TSP<sub>2</sub>HD-PG into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced the recombinant with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressing situation of fusion protein was analyzed by SDS-PAGE. The GST-TSP<sub>2</sub>HD fusion protein was purified by affinity chromatography with glutathione sepharose 4B gel, and the purified recombinant TSP<sub>2</sub>HD protein was prepared by digesting the GST-TSP<sub>2</sub>HD fusion protein with thrombin. The immuno-response of the recombinant TSP<sub>2</sub>HD recognized by the pool sera of schistosomiasis patients and the pool sera of heavily infected rabbits was explored by Western blotting analysis. The immunogenicity of the recombinant TSP<sub>2</sub>HD was investigated by comparing the difference of counts per minute (cpm) value of lymphocyte proliferation test between experiment group and control group. **Results** A 228 bp of TSP<sub>2</sub>HD gene fragment was obtained after overlapping PCR of three times and its DNA sequence was confirmed by DNA sequencing, which was same to one of the native TSP<sub>2</sub>HD. The recombinant containing recombinant plasmid

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30471515, No. 30671833); 江苏省重点人才项目 (No. RC2007095)

作者单位: 1 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064; 2 卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室, 无锡 214064

\* 通讯作者, E-mail: chxnyu@163.com

TSP<sub>2</sub>HD-PG expressed a soluble fusion protein of GST-TSP<sub>2</sub>HD ( $M_r \approx 34\ 000$ ) after being induced with IPTG. The purified recombinant TSP<sub>2</sub>HD protein was obtained through digesting the GST-TSP<sub>2</sub>HD fusion protein with thrombin. The recombinant TSP<sub>2</sub>HD was recognized by pool sera of schistosomiasis patients and pool sera of infected rabbits, indicating that the recombinant TSP<sub>2</sub>HD has a good response activity. The recombinant TSP<sub>2</sub>HD also stimulated proliferation of lymphocytes in infected mouse, the cpm value of experiment group was higher than that of the control ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The Sj TSP<sub>2</sub>HD gene has been synthesized and expressed with immunogenicity which is similar to that of the native antigen.

**[Key words]** *Schistosoma japonicum*; TSP<sub>2</sub>HD; Overlapping PCR; Gene synthesis; Expression; Immunogenicity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30471515, No. 30671833) and Key Talent Fund of Jiangsu Provincial Health Bureau (No. RC2007095)

\* Corresponding author, E-mail: chxnyu@163.com

日本血吸虫病是危害人类健康的重要寄生虫病之一，全世界有 6 亿多人口受到血吸虫感染的威胁<sup>[1]</sup>。我国水流多变的长江流域或地形复杂的大山区，常规防治措施已难以控制血吸虫病的流行。疫苗可增强易感人群抗血吸虫感染的能力，未来可能成为控制血吸虫病流行的有效方法。

跨膜蛋白或外分泌蛋白在血吸虫的生长发育过程中起到受体或激素作用，可能是血吸虫疫苗潜在的有效靶分子。四跨膜蛋白(tetraspanins, TSP)是一个与细胞发育、增殖、激活和迁移等多种功能相关的膜糖蛋白家族<sup>[2]</sup>。Tran 等<sup>[3]</sup>研究表明，重组曼氏血吸虫四跨膜蛋白的两个亲水基团 (Sm-tsp-1 和 Sm-tsp-2)，尤其 Sm-tsp-2 能诱导高于 40% 抗血吸虫感染的免疫保护作用，可作为疫苗候选分子。本研究对日本血吸虫四跨膜蛋白第二亲水基团 (TSP<sub>2</sub> hydrophilic domain, TSP<sub>2</sub>HD) 基因进行合成、重组表达，并分析其免疫原性。

## 材料与方法

### 1 试剂

T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自美国 Invitrogen 公司，Taq DNA 聚合酶、酶切产物纯化试剂盒及凝胶 DNA 纯化试剂盒购自美国 Promega 公司，Pfu DNA 聚合酶购自上海皓嘉生物技术有限公司，表达载体 pGEX-4T-3 和重组蛋白亲和纯化试剂盒 (Bulk GST Purification Module) 购自美国 Amersham 公司，辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 及羊抗人 IgG 等购自上海华美生物技术有限公司。

### 2 基因序列

本实验室采用信号序列捕捉方法鉴定带信号序列的日本血吸虫 TSP<sub>2</sub> 基因 (EF634060) 亲水区片段，

即 5'-GAAAAGCCGAAGGTGAAAAGACATGTCACTA CAGCATTTAAAAGACCTTGTAGGACAATACGGACACG ATAGACACTTAGACAAAGTTTTGGACGAAATTCAAG ATAAATTACAATGTTGTGGTGCCGAATCGCCTGCTGATTATTCTCGAGGACCACCTCCATCATGTAAGAATTATAATGAGGGATGCATTGGTAAAGTCACCGAACTGACT AAAAAAGCACCTAAAT-3'。

### 3 基因合成、克隆与鉴定

3.1 寡核苷酸序列的合成 根据上述基因序列设计 8 条末端互补的寡核苷酸片段，由上海生工生物工程技术有限公司合成。在这 8 条片段之间，上一条片段的 3' 端与下一条片段的 5' 端有 20 个碱基为互补序列，并在第 1 条片段的 5' 端及第 8 条片段的 5' 端分别引入 BamH I 及 Sal I 的限制性内切酶位点。

- P1: 5'-TTGGATCCGAAAAGCCGAAGGTGAAAAGACATGTCA-  
Bam H I  
CTACAGCATTTAAAA-3'
- P2: 5'-TCTATCGTGTCCGTATTGTCCTACAAGGTCTTTTAATG-  
CTGTAGTGACAT-3'
- P3: 5'-CAATACGGACACGATAGACACTTAGACAAAAGTTTTGG-  
ACGAAATTCAAG-3'
- P4: 5'-GCGATTCGGCACCACAACATTGTAATTTATCTTGAATT-  
TCGTCCAAAACCT-3'
- P5: 5'-ATGTTGTGGTGCCGAATCGCCTGCTGATTATTCTCGAG-  
GACCACCTCCATC-3'
- P6: 5'-CCAATGCATCCCTCATTATAATTCTTACATGATGGAGG-  
TGCTCCTCGAGAA-3'
- P7: 5'-TATAATGAGGGATGCATTGGTAAAGTCACCGAACTGA-  
CTAAAAAGCACCT-3'
- P8: 5'-AAGTCGACTCAATTTAGGTGCTTTTTAGTCAGTTC-3'  
Sal I

3.2 重叠 PCR (overlapping PCR) 合成 TSP<sub>2</sub>-HD 基因全序列。PCR 反应体系为：10×PCR 缓冲液 10 μl，

25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 μl, 2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs) 8 μl, 50 μmol/L 寡核苷酸片段 P1、P2 (或 P3、P4、P5、P6、P7、P8) 各 2 μl, 5 U/μl *Pfu* DNA 聚合酶 1 μl, 加灭菌无离子水至 100 μl。使用 PCR 仪 (2800 型, 美国 PE 公司) 扩增。反应条件为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s, 30 个循环。PCR 扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 观察电泳结果。回收 P1P2、P3P4、P5P6 及 P7P8, 然后按上述方法, 以 P1P2、P3P4、P5P6 及 P7P8 分别互为引物进行 PCR 扩增, 获得 P1-P4、P5-P8 的片段, 再以此两片段互为引物合成 P1-P8 的 TSP<sub>2</sub>HD 基因全序列。

### 3.3 合成 TSP<sub>2</sub>HD 片段的克隆与序列分析

3.3.1 TSP<sub>2</sub>HD 基因 5' 端加腺嘌呤 (A) 尾巴 将纯化的 TSP<sub>2</sub>HD 基因片段置于 PCR 反应管中, 加入 10×PCR 缓冲液 10 μl、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 μl、10 mmol/L 三磷酸脱氧腺嘌呤 (dATP) 1 μl、5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 1 μl, 加灭菌无离子水至 100 μl, 在 PCR 仪上 72 °C 保温 30 min, 使 TSP<sub>2</sub>HD 基因 5' 端加上“A”尾巴。用酶切产物纯化试剂盒纯化加 A 尾后的 TSP<sub>2</sub>HD 片段。

3.3.2 TSP<sub>2</sub>HD 基因片段克隆与鉴定 按文献[4]方法将纯化的 TSP<sub>2</sub>HD 基因片段与 pGEMT 载体混合, 在 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶的作用下 16 °C 过夜, 将连结产物转化大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细胞后, 涂布在含氨苄青霉素 (AMP, 100 mg/ml) 的 LB 平板上, 此平板上预先涂有 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 37 °C 培养过夜。次日取白色菌斑, 以 P1、P8 为引物进行 PCR 扩增鉴定阳性菌落。抽提 PCR 阳性菌落中的重组质粒 DNA, 进行 DNA 序列分析, 由上海生工生物工程技术有限公司完成。

## 4 重组表达质粒的构建

用限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I 对表达质粒 pGEX-4T-3 及含有 TSP<sub>2</sub>HD 基因的 TA 克隆重组质粒同时进行限制性酶切, 回收酶切后 pGEX-4T-3 线性质粒及 TSP<sub>2</sub>HD 基因片段。将纯化的 pGEX-4T-3 线性质粒及 TSP<sub>2</sub>HD 基因片段按一定比例混合连接, 构建重组表达质粒 TSP<sub>2</sub>HD-PG, 连接方法与重组子的鉴定方法同 3.3.2, 但 LB 平板上无 X-gal 和 IPTG。

## 5 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白的重组表达与纯化

挑取单个含 TSP<sub>2</sub>HD-PG 重组质粒的转化子菌落, 接种于 3 ml LB 液体培养基 (含 AMP 100 mg/ml) 中, 37 °C 培养过夜, 次日按 1:10 将培养物转种到新的 LB 液体培养基中, 培养至吸光度 ( $A_{600}$  值)=0.5,

加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 3 h。离心收集细菌, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 观察 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白表达情况。

将能表达 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白的重组子细菌用 IPTG 进行大量诱导表达, 用 GST 融合蛋白亲和纯化试剂盒按文献[5]方法纯化重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白。

## 6 重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白免疫原性分析

6.1 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 将 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 条件为电压 30 V、电流 90 mA。4 °C 转移过夜, 再用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 磷酸缓冲液封闭 NC 膜。将 NC 膜切成 4 条, 分别用 1:200 稀释的血吸虫重感染兔血清、血吸虫病患者血清、健康兔血清、健康人血清与 NC 膜上的蛋白抗原反应, 37 °C 保温 2 h。用 PBST (含 0.05% Tween-20) 洗膜 3 次。用羊抗兔 HRP-IgG (1:50) 与 NC 膜反应 2 h, 再用羊抗人 HRP-IgG (1:50) 与 NC 膜反应, 37 °C 作用 2 h, PBST 洗膜 3 次后, 将膜浸入 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 底物溶液中 (20 mg DAB 溶于 10 ml PBS 中, 临用前加入 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 ml)。室温下显色 5~10 min, 显色后用蒸馏水洗膜终止反应。

### 6.2 淋巴细胞增殖试验

6.2.1 感染小鼠脾淋巴细胞的制备 BALB/c 小鼠 6 只 (体重 20 g/只, 6 周龄), 购自中国科学院上海实验动物中心。随机分为实验组及对照组, 实验组每只小鼠感染 35 条血吸虫尾蚴, 感染后第 6 周拉颈处死, 取脾, 制备脾淋巴细胞悬液 (培养基为含 5% 小牛血清的 RPMI 1640)。对照组为未感染的健康小鼠, 以相同方法制备脾淋巴细胞悬液。

6.2.2 增殖试验 调整上述脾淋巴细胞悬液浓度为  $2 \times 10^6$  个/100 μl, 分装至 96 孔平底细胞培养板中, 每孔 100 μl, 每只小鼠脾淋巴细胞悬液设 9 个平行孔 (即空白对照孔、测定孔和阳性对照孔各 3 个)。测定孔中加入纯化的 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白抗原 (终浓度为 5 μg/μl), 空白孔加入等量 RPMI 1640 培养基, 阳性对照孔中加入等量的刀豆球蛋白 A (Con A, 终浓度为 5 μg/μl)。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 56 h 后, 每孔加入 0.5 mCi 氚标记的胸腺嘧啶核苷, 继续培养 12~16 h, 将淋巴细胞收集到玻璃纤维膜上, 依次用 PBS (pH 7.2)、5% 三氯醋酸和无水乙醇洗涤细胞各 3 次, β 液闪烁计数器计数液闪仪 (LS6500 型, 美国贝克曼公司) 测定脉冲指数 (counts per minute, cpm)。

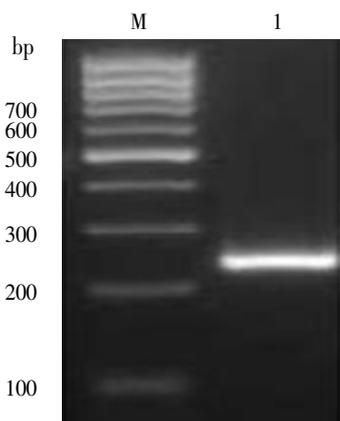
## 7 统计学分析

应用 SPSS11.5 统计软件对数据进行 *t* 检验。

## 结 果

### 1 TSP<sub>2</sub>HD 基因的合成

采用重叠 PCR 法, 经过 3 轮扩增, 获得长约 228 bp 的片段 (图 1)。使用普通 *Taq* DNA 聚合酶在此合成片段 5' 端加上 “A” 尾巴后进行 TA 克隆和 DNA 测序, 测序结果与日本血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD 基因序列 (EF634060) 完全一致, 说明此次 TSP<sub>2</sub>HD 基因合成成功。



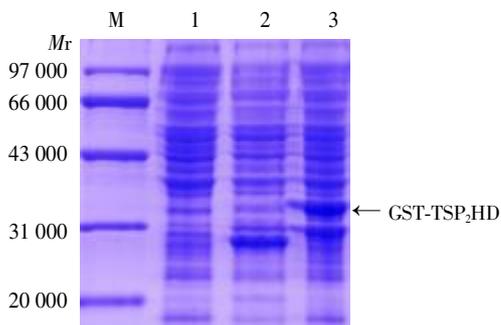
M: DNA 标志物, 1: 合成的 TSP<sub>2</sub>HD 全长 PCR 片段。  
M: DNA marker, 1: The full length of synthesized TSP<sub>2</sub>HD.

图 1 TSP<sub>2</sub>HD 基因合成

Fig.1 Gene synthesis of TSP<sub>2</sub>HD

### 2 重组表达质粒的构建、融合蛋白质表达与纯化

含重组质粒 TSP<sub>2</sub>HD-PG 的 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导能表达约 *M<sub>r</sub>* 34 000 GST-TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白, 而只含表达质粒 pGEX-4T-3 的细菌只表达 *M<sub>r</sub>* 26 000 GST 蛋白, 空白宿主菌无额外的表达蛋白带 (图 2)。

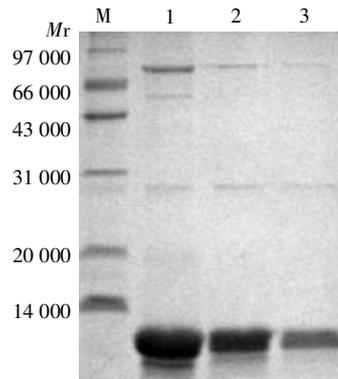


M: 蛋白质标志物, 1: *E. coli* BL21 (DE3), 2: 含重组表达质粒 TSP<sub>2</sub>HD-PG 的细菌表达产物, 3: 含质粒 pGEX-4T-3 的细菌表达产物。  
M: Protein marker, 1: *E. coli* BL21 (DE3), 2: Expression product of bacteria containing recombinant plasmid TSP<sub>2</sub>HD-PG, 3: Expression product of bacteria containing plasmid pGEX-4T-3.

图 2 TSP<sub>2</sub>HD 基因在 *E. coli* 中的融合表达产物

Fig.2 The fusion expression product of TSP<sub>2</sub>HD gene in *E. coli* BL21 (DE3)

纯化 GST-TSP<sub>2</sub>HD 融合蛋白经凝血酶切割, 得到相对分子质量约 *M<sub>r</sub>* 8 500 的纯化 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白 (图 3)。



M: 蛋白质标志物, 1、2、3: 纯化的重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白产物。

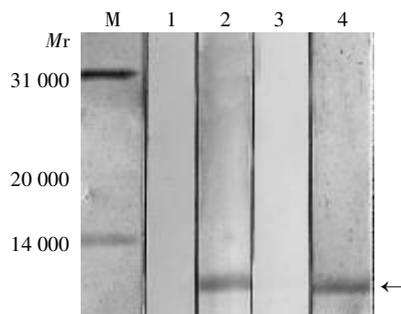
M: Protein marker, 1, 2, 3: Purified product of the recombinant TSP<sub>2</sub>HD.

图 3 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白纯化

Fig.3 Purification of TSP<sub>2</sub>HD

### 3 重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白的免疫原性分析

分别以血吸虫病患者血清和血吸虫重感染兔血清作为一抗, 与纯化的重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白进行 Western blotting 鉴定, 以健康人和健康兔血清为阴性对照。结果显示, 重组蛋白 TSP<sub>2</sub>HD 在约 *M<sub>r</sub>* 8 500 与血吸虫病患者血清和血吸虫重感染兔血清均有一特异性反应条带, 而与健康人及健康兔血清无特异反应 (图 4), 说明重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白有较好的免疫反应性。



M: 蛋白质标志物, 1: 健康兔血清, 2: 重感染兔血清, 3: 健康人血清, 4: 血吸虫感染患者血清。

M: Protein marker, 1: Sera of healthy rabbits, 2: Sera of infected rabbits, 3: Sera of healthy persons, 4: Sera of schistosomiasis patients.

图 4 重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白 Western blotting 分析

Fig.4 Western blotting analysis of the recombinant TSP<sub>2</sub>HD

纯化重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白对日本血吸虫感染小鼠脾细胞进行淋巴细胞增殖试验, 对照组 cpm 值为 358.0±56.3, 而实验组为 4 508.0±866.2, 两者差异有统计学意义 (*P*<0.01) (表 1), 表明重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白能有效刺激感染小鼠脾细胞增殖, 有较好的免疫原性。

表 1 两组小鼠脾脏 T 淋巴细胞增殖反应的比较 (cpm 值)  
Table 1 Comparison of T lymphocyte proliferative response in murine spleen of the two groups (cpm value)

组别 Group	cpm 值 cpm value	
	Con A	TSP <sub>2</sub> HD
对照组 Control group	4 619.4±707.2	358.0±56.3
实验组 Experiment group	4 637.9±806.2	4 508.0±866.2*

注: \* 与对照组比较,  $P < 0.01$ 。

Note: \* Compared with control group,  $P < 0.01$ .

## 讨 论

血吸虫病疫苗是未来能长效预防血吸虫感染的一种潜在手段<sup>[6]</sup>, 已成为国内外研究者关注的热点, 获得有效的血吸虫病疫苗候选分子是研制高效疫苗的关键。

在血吸虫的生长发育过程中, 血吸虫的外分泌蛋白及膜结合蛋白发挥了重要的作用, 如激素、受体功能。选择有激素、受体功能的分子作为血吸虫病疫苗候选分子可起到双重抗血吸虫保护作用, 一方面可以通过抑制这些分子的生理功能而阻滞血吸虫的生长发育过程, 另一方面可以通过免疫病理作用杀灭血吸虫。

使用信号序列捕捉技术筛选生物体内带有信号序列的蛋白分子基因, 是获得生物的外分泌蛋白、膜结合蛋白分子基因的有效手段<sup>[7]</sup>。本课题组曾采用信号序列捕捉技术筛选日本血吸虫童虫的外分泌蛋白与膜结合蛋白分子基因, 获得了一批日本血吸虫童虫的外分泌蛋白、膜结合蛋白分子基因<sup>[8]</sup>, 对这些分子的进一步研究将有助于筛选出可作为血吸虫病疫苗的候选分子。

曼氏血吸虫的四跨膜蛋白(TSP)是存在于血吸虫各个阶段(除虫卵以外)体表的受体蛋白<sup>[9]</sup>, 虽然其功能尚不十分清楚, 但已被证明是一个新的有效的血吸虫病疫苗候选分子<sup>[7,8]</sup>。由于日本血吸虫与曼氏血吸虫存在种系的差别, 日本血吸虫与曼氏血吸虫的 TSP 分子结构虽然很相似, 但两者基因序列有一定差异, 氨基酸同源率为 72%, 日本血吸虫 TSP 的功能, 尤其是其免疫原性的研究尚无报道。本研究根据日本血吸虫 TSP 分子开放阅读框的基因序列, 采用重叠 PCR 方法, 人工合成编码 TSP 分子的第 2 亲水肽段(TSP<sub>2</sub>HD)基因序列, 测序结果表明人工合成的 DNA 序列与天然基因序列完全一致, 说明本研究的基因合成策略是有效的。

将 TSP<sub>2</sub>HD 基因插入表达载体 pGEX-4T-3 构建重组表达质粒, 经 IPTG 诱导进行融合蛋白的表达, 采用 GST 亲和层析方法获得可溶性融合重组蛋白, 对

重组蛋白用凝血酶进行切割, 获得纯化的重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白。免疫原性研究表明重组表达的 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白能与血吸虫重感染兔血清及血吸虫病患者血清反应, 而不被健康兔血清和健康人血清识别, 说明免疫反应性好, 提示重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白中存在与天然 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白相似的 B 细胞表位。本研究结果还表明, 重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白能显著刺激血吸虫感染小鼠脾细胞增殖, 说明 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白中可能存在天然的 T 细胞表位, 这一结果亦间接证实重组曼氏血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白诱导高水平保护性作用的机制与免疫反应相关, 预示重组日本血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白亦可能是一个有效的抗血吸虫感染疫苗候选分子。

本研究成功地表达了日本血吸虫 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白, 重组 TSP<sub>2</sub>HD 蛋白可通过亲和层析大量制备, 并具有与天然蛋白相似的免疫原性, 为进一步研究其用于血吸虫病疫苗候选分子的价值提供了依据。

## 参 考 文 献

- [1] Engels D, Chistosulo L, Montresor A, et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research[J]. Acta Trop, 2002, 82(2): 139-146.
- [2] Hemler ME. Specific tetraspanin functions[J]. J Cell Biol, 2001, 155(7): 1103-1107.
- [3] Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis[J]. Nat Med, 2006, 12 (7): 835-840.
- [4] Sambrook J, Rensull D. Protocol of Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT. 3rd ed. Beijing: Science and Technique Press, 2002. 228-290. (in Chinese)  
(Sambrook J, Rensull D. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学技术出版社, 2002. 288-290.)
- [5] Yu CX, Zhu YC, Yin XR, et al. Gene cloning and sequencing of triosephosphate isomerase of *Schistosoma japonicum* Chinese strain (Sjc-TPI)[J]. Chin J Schisto Control, 1997, 9(6): 321-324. (in Chinese)  
(余传信, 朱荫昌, 殷旭仁, 等. 日本血吸虫(中国大陆株)磷酸丙糖异构酶(Sjc-TPI)基因克隆与序列分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1997, 9(6): 321-324.)
- [6] Bergquist R, Sherbiny M, Barakat R, et al. Blueprint for schistosomiasis vaccine development[J]. Acta Trop, 2002, 82(2): 183-192.
- [7] Kojima T, Kitamura T. A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(5): 487-490.
- [8] Yu CX, Yin XR, Li J, et al. Construction and preliminary screening of signal sequence trapping cDNA library of *Schistosoma japonicum* juvenile[J]. Chin J Pathogen Biol, 2007, 2(6): 417-420. (in Chinese)  
(余传信, 殷旭仁, 李健, 等. 日本血吸虫童虫信号序列捕捉文库的构建及初步筛选[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(6): 417-420.)
- [9] Myth D, McManus DP, Smout MJ, et al. Isolation of cDNAs encoding secreted and transmembrane proteins from *Schistosoma mansoni* by a signal sequence trap method[J]. Infect Immun, 2003, 71(5): 2548-2554.

(收稿日期: 2007-10-15 编辑: 盛慧锋)