

# 日本血吸虫弹性蛋白酶基因的克隆、表达及虫期特异性转录

黄成玉<sup>1</sup>, 卢艳<sup>2</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 鞠川<sup>2</sup>, 冯正<sup>2</sup>, 杨忠<sup>1</sup>, 王升跃<sup>3</sup>, 胡薇<sup>2\*</sup>

**【摘要】** 目的 克隆和表达日本血吸虫弹性蛋白酶基因(*SjCE-2b*), 纯化表达重组蛋白, 并研究该基因在各虫期的转录情况。方法 预测 *SjCE-2b* 基因的编码序列。绘制血吸虫尾蚴弹性蛋白酶家族成员系统进化树。用 RT-PCR 和蛋白质印迹(Western blotting)分析 *SjCE-2b* 基因在日本血吸虫各期转录的差异。将 RT-PCR 扩增得到的 *SjCE-2b* 基因亚克隆至载体 pET28b, 在大肠埃希菌中诱导表达得到重组蛋白 r*SjCE-2b*, 用组氨酸标签亲和层析法纯化表达产物, Western blotting 分析其免疫原性。结果 在虫卵、子胞蚴和成虫检测到 *SjCE-2b* 基因转录本(714 bp), 表达的重组蛋白 r*SjCE-2b*, 相对分子质量约为 Mr 31 000, 与预测的融合蛋白相对分子质量相符。构建了重组原核表达载体 *SjCE-2b*/pET28b, 并在大肠埃希菌中表达。纯化后的重组蛋白 r*SjCE-2b* 可被日本血吸虫感染的兔血清识别。结论 在日本血吸虫虫卵、子胞蚴和成虫发现 *SjCE-2b* 基因转录本。*SjCE-2b* 基因有可能成为潜在的日本血吸虫病疫苗候选抗原和药物及诊断靶点。

**【关键词】** 日本血吸虫; 弹性蛋白酶基因; 原核表达

中图分类号:R383.24, R392.11

文献标识码:A

## Cloning, Expression of *Schistosoma japonicum* Elastase Gene and its Stage-specific Transcription

HUANG Cheng-yu<sup>1</sup>, LU Yan<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, JU Chuan<sup>2</sup>, FENG Zheng<sup>2</sup>,  
YANG Zhong<sup>1</sup>, WANG Sheng-yue<sup>3</sup>, HU Wei<sup>2\*</sup>

(1 Biotechnology School, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 3 Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 200231)

**【Abstract】 Objective** To clone, express and purify *Schistosoma japonicum* elastase-2b gene(*SjCE-2b*), and analyze its stage-specific transcription and expression. **Methods** The coding sequence of the *Sj* gene was predicted, and a phylogenetic tree of *Sj* elastase was drawn. RT-PCR and Western blot were used to investigate the differential transcription and expression of *SjCE-2b* gene during the developmental stages. The *SjCE-2b* gene obtained by RT-PCR was subcloned into pET28b, and expressed in *E.coli* (r*SjCE-2b*). The expressed protein was purified with His-Tag affinity chromatography. Western blotting was used to investigate the immunogenicity. **Results** RT-PCR showed specific bands in sporocysts, eggs and adult worms, while Western blot showed that the recombinant protein(r*SjCE-2b*) existed only in cercariae and sporosysts, with Mr 31 000. The expression vector of *SjCE-2b*/pET28b was constructed and expressed in *E. coli*. The recombinant protein r*SjCE-2b* was specifically recognized by the *S. japonicum*-infected rabbit serum. **Conclusion** The transcript of *Sjaponicum* elastase-2b gene was found in sporocysts, eggs and adult worms, and this gene might be a potential candidate for vaccine, for drug and diagnosis target.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; Elastase gene; Prokaryotic expression

Supported by 973 National Key Project (No. 2003 CB716804); 863 National Key Project (No. 2004AA2Z1010, 04DZ14010); National Funding for Natural Science (No. 30400562); Shanghai Young Scientist Star Initiative Plan (No. 04QMX1455); TMRC/NIH/USA (No. 5P50 AI039461-10)

\* Corresponding author, E-mail: hubeixf@hotmail.com

**基金项目:** 国家 973 重点基础研究发展计划(No. 2003 CB716804); 国家 863 高技术研究发展计划(No. 2004AA2Z1010, 04DZ14010); 国家自然科学基金(No. 30400562); 上海市青年科技启明星计划(No. 04QMX1455); 美国国立卫生研究院 TMRC (No. 5P50 AI039461-10)

**作者单位:** 1 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237; 2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025; 3 国家人类基因组南方研究中心, 上海 200231

\* 通讯作者, E-mail: hubeixf@hotmail.com

血吸虫尾蚴感染哺乳动物宿主过程中,胰蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶(即弹性蛋白酶, elastase)发挥了重要作用<sup>[1-3]</sup>。弹性蛋白酶是从尾蚴腹吸盘周围的穿刺腺分泌出来的,能够降解宿主皮肤中所含的如角蛋白、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白等多种大分子物质,帮助尾蚴完成对宿主的入侵<sup>[4]</sup>。

20世纪90年代对曼氏血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因及其功能进行了较深入的研究<sup>[5-7]</sup>,但日本血吸虫弹性蛋白酶基因(*SjCE-2b*)的研究目前尚未见报道。本研究通过同源性对比方法,在日本血吸虫基因组中寻找*SjCE-2b*基因,预测其编码序列,设计特异性引物,体外扩增及克隆表达该基因,并检测该基因在日本血吸虫各个虫期的转录情况。

## 材料与方 法

### 1 材 料

1.1 各虫期日本血吸虫 虫卵:按常规腹部贴片法每只新西兰白兔(体重2~3 kg,雄性,购于中国科学院实验动物中心)感染1500条中国大陆株日本血吸虫尾蚴,感染后45 d自肝脏分离虫卵。毛蚴:每只C57BL/6小鼠(雌性,体重20 g,购自中国科学院实验动物中心)感染日本血吸虫尾蚴100条,42 d后剖杀,取肝脏,压碎,用去氯水淘洗去除肝组织,收集虫卵,22℃~27℃光照条件下孵化毛蚴,4℃10 000×g离心15 min,收集毛蚴,液氮保存。子胞蚴:取感染毛蚴后45 d的阳性钉螺(无锡血吸虫病防治研究所提供),敲碎,解剖镜下分离胞蚴,生理盐水清洗后液氮保存。尾蚴:将感染毛蚴后60 d左右的阳性钉螺置于去氯水中,28℃光照条件下逸出尾蚴,用玻片捞取尾蚴,在预冷的去氯水中1 000×g离心10 min,取沉淀,重复洗涤几次,最后用0.15 mol/L PBS (pH 7.2)洗3次,置微量离心管中,立即置-20℃冰箱保存备用。童虫、成虫:每只新西兰白兔(雄性,体重2.5 kg,购于中国科学院实验动物中心)感染2 000条尾蚴,感染后第14天和第42天剖杀,灌注法从门静脉收集14日龄童虫,以及42日龄雌虫和雄虫,用灭菌的PBS洗涤3~4次,置液氮中冻存备用。

1.2 主要试剂及酶类 总RNA提取试剂(TRIZOL Reagent)购自美国Invitrogen公司,第1链cDNA合成试剂盒为日本TOYOBO公司产品;Taq DNA聚合酶、异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)和脱氧核苷三磷酸(dNTP)购自上海赛百盛生物公司,B型DNA片段快速胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物公司。限制性内切酶Hind III、Xho I为美国NEB公司产品,日常

型质粒DNA小量快速制备试剂盒为中国杭州V-gene公司出品,T<sub>4</sub>DNA连接酶购自美国Promega公司,BugBuster蛋白抽提试剂购自德国Merck公司,纯化重组蛋白所用的镍-硝基三乙酸琼脂糖(Ni-NTA agarose)树脂购自德国QIAGEN公司。其余试剂为国产分析纯。pET-28b质粒、大肠埃希菌DH5α和BL21(DE3)均为本实验室提供。r*SjCE-2b*重组蛋白多抗兔血清由中国科学院实验动物中心制备。

### 2 方 法

2.1 预测*SjCE-2b*的编码序列 根据编码*SjCE-2b*基因序列(序列编号为d000046963.contig1),应用基因分析工具Netgene2预测该基因的外显子和内含子边界,从而得知*SjCE-2b*的编码序列(coding sequence, CDS)。

2.2 *SjCE-2b*生物信息学分析 利用生物信息学软件MEGA3.1以及TREEVIEW构建血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因家族的系统进化树<sup>[8,9]</sup>,用Clustal X<sup>[10]</sup>完成各基因多序列联配;用EXPASY中提供的工具预测基因相应蛋白的理论相对分子质量和等电点。

2.3 6个虫期总RNA提取 按总RNA提取试剂说明进行,主要步骤为:分别称取各虫期日本血吸虫100 mg,加1 ml Trizol试剂,于30℃研磨5 min,加入0.2 ml三氯甲烷(CHCl<sub>3</sub>),30℃3 min。于4℃12 000×g离心15 min,移水相至新的微量离心管,加异戊醇0.5 ml,25℃作用10 min,4℃12 000×g离心15 min,弃上清。于沉淀中加入70%乙醇1 ml,4℃7 500×g离心5 min,弃乙醇,晾干。溶液沉淀于100 μl经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的水中,置于-70℃长期保存,也可置于-20℃保存随时使用。同时,用紫外分光光度计(GeneQuant Pro,英国)测定吸光度(A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>值),以及琼脂糖凝胶电泳分析。

2.4 *SjCE-2b*的RT-PCR扩增 根据预测的*SjCE-2b*序列,用Primer 5.0软件设计1对特异性引物*SjCEPF/SjCEPR*,对*SjCE-2b*进行RT-PCR扩增,引物由上海英峻生物技术有限公司合成。

PF: 5'-CCCAAGCTT ATACGTAGTGGTGAACCCG-3'

Hind III酶切位点

PR: 5'-CCGCTCGAG TTAGATATTAGAGAGTATA-3'

Xho I酶切位点

取各虫期总RNA为模板,寡聚脱氧胸腺嘧啶[Oligo(dT)20]为引物,应用RT-PCR技术合成cDNA第1链,反应总体积为20 μl。取2 μl cDNA为模板,于0.5 ml离心管中加入引物PF和PR各约20 pmol、4种脱氧核苷三磷酸(dNTP)200 μmol/L、10×PCR缓

冲液 5  $\mu$ l、*Taq* DNA 聚合酶 2.5 U, 再加无菌双蒸水至总反应体积 50  $\mu$ l, 混匀。RT-PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 57  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。然后将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。按胶回收试剂盒说明将其回收, 溶于 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中, -20  $^{\circ}$ C 保存。

**2.5 重组质粒 *SjCE-2b/pET28b* 的构建** 将纯化的 RT-PCR 产物和质粒 pET-28b 分别用 *Hind* III、*Xho* I 进行双酶切, 纯化回收双酶切产物, 以 8:1 摩尔浓度比, 用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶将双酶切后的 *SjCE-2b* 片段和双酶切后的质粒 pET28b 连接, 并将连接产物转化感受态大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  株, 均匀地涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上 (100 mg/ml), 37  $^{\circ}$ C 倒置培养过夜。随机挑取少量细菌克隆进行双酶切鉴定, 并对阳性克隆测序。重组克隆的菌液和适当量的丙三醇混合, -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

**2.6 弹性蛋白酶基因的原核表达与纯化** 从大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  株提取重组质粒 *SjCE-2b/pET28b* 转化感受态大肠埃希菌 BL21(DE3), 构建 *SjCE-2b/pET28b* 原核表达系统。经酶切鉴定及测序无误后, 阳性克隆接种到含卡那霉素 (50  $\mu$ g/ml) 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 取 50  $\mu$ l 培养液加到 5 ml 含卡那霉素 (50  $\mu$ g/ml) 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 通气培养 2 h, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/ml, 进行诱导表达, 分别加入 IPTG 后, 2、4、6 及 8 h 各取 1 ml 离心收集菌体, 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 观察表达时相变化。

经鉴定重组蛋白为包涵体, 扩大培养 BL21 单菌落的菌液, 离心去除上清菌液后用蛋白抽提试剂裂解已经诱导的菌液离心产物, 5 000 $\times$ g 离心 15 min, 弃上清, 加入裂解缓冲液, 室温裂解 1 h, 12 000 $\times$ g 离心 20 min, 保留上清, 用 Ni-NTA agarose 亲和纯化 r*SjCE-2b* 重组蛋白。

**2.8 r*SjCE-2b* 重组蛋白的蛋白质印迹 (Western blotting) 分析** 用纯化的 r*SjCE-2b* 重组蛋白免疫家兔, 得到重组蛋白免疫的多抗兔血清。将纯化的 r*SjCE-2b* 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 再电转移到硝酸纤维膜上, 转移条件为 0.22 A, 2 h, 对 r*SjCE-2b* 重组蛋白免疫的多抗兔血清、感染日本血吸虫尾蚴 42 d 的兔血清及正常兔血清进行 Western blotting 分析。

## 结 果

### 1 *SjCE-2b* 编码序列

通过预测得到 *SjCE-2b* 含有 3 段外显子, 其 cDNA 序列长 792 bp, 编码 263 个氨基酸, 蛋白质的理

论相对分子质量 (*Mr*) 为 28 536.24, 等电点 (*PI*) 为 6.94。

### 2 血吸虫尾蚴弹性蛋白酶家族系统进化树的分析

挑选目前已鉴定出的包括日本血吸虫在内的 4 种血吸虫尾蚴 10 个弹性蛋白酶氨基酸序列, 进行多序列联配。结果表明血吸虫尾蚴弹性蛋白酶家族成员间蛋白序列比较保守, 有较高的同源性。

在进行多序列联配的基础上, 进一步对 *SjCE-2b* 家族的系统进化关系进行预测, 绘制系统进化树, 在分支上显示 bootstrap 支持率 (bootstrap 检验值为 1 000 次重复), 显示 *SjCE-2b* 与 *SmCE-2b* 亲缘关系最为紧密 (图 1)。

### 3 *SjCE-2b* 在血吸虫发育各阶段的转录情况

将分别抽提的虫卵、毛蚴、子胞蚴、尾蚴、童虫及成虫的总 RNA, 用 *SjCE-2b* 的特异性引物进行 RT-PCR 扩增, 结果在虫卵、子胞蚴和成虫均扩增出 714 bp 片段 (图 2)。将扩增产物连入 T-easy Vector 载体中, 筛选重组质粒进行测序, 结果显示扩增出的片段均为 *SjCE-2b* 的编码序列。

### 4 *SjCE-2b/pET28b* 重组质粒的鉴定

构建的重组质粒 *SjCE-2b/pET28b*, 经 *Hind* III/*Xho* I 双酶切鉴定, 结果如图 3 所示。序列测定结果表明, 插入的外源基因片段正确, 重组质粒 *SjCE-2b/pET28b* 构建成功。

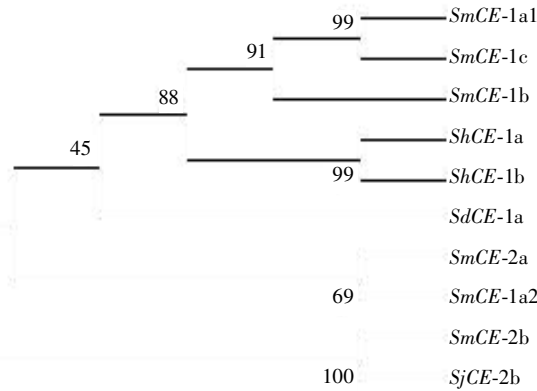
### 5 *SjCE-2b* 原核表达产物的鉴定与纯化

用 *SjCE-2b/pET28b* 重组质粒转化大肠埃希菌 BL21 感受态细胞, 培养的菌液经 IPTG 诱导后, 和诱导前相比较在靠近 *Mr* 31 000 处有一明显条带, 与理论预测的融合蛋白相对分子质量相符 (图 4)。

表达重组蛋白 *SjCE-2b* 的菌体经 BugBuster 蛋白抽提试剂裂解, 离心后分离上清和沉淀, 将沉淀用 PBS 重悬。分别取上清液和沉淀的悬浮液进行 SDS-PAGE 分析。结果表明 *SjCE-2b* 的表达产物位于沉淀中, 为不可溶性蛋白, 按照 QIAGEN 公司的 6 $\times$ 组氨酸标签 (6 $\times$ His-tagged) 亲和柱层析法纯化表达产物结果见图 4。

### 6 重组蛋白的免疫原性分析

Western blotting 结果显示, 纯化的重组蛋白可以被感染兔血清和免疫兔血清识别, 在约 *Mr* 32 000 处均出现 1 条特异性条带, 而与正常兔血清则无反应 (图 5)。

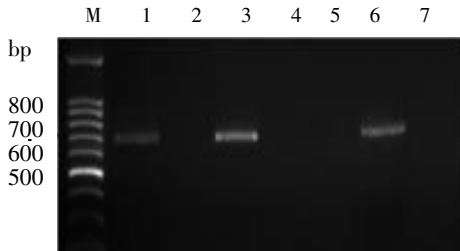


*SmCE-1a1*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 1a1 亚型, *SmCE-1c*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 1c 亚型, *SmCE-1b*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 1b 亚型, *SmCE-1a*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 1a 亚型, *ShCE-1a*: 埃及血吸虫弹性蛋白酶 1a 亚型, *ShCE-1b*: 埃及血吸虫弹性蛋白酶 1b 亚型, *SdCE-1a*: 杜氏血吸虫弹性蛋白酶 1a 亚型, *SmCE-2a*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 2a 亚型, *SmCE-1a2*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 1a2 亚型, *SmCE-2b*: 曼氏血吸虫弹性蛋白酶 2b 亚型, *SjCE-2b*: 日本血吸虫弹性蛋白酶 2b 亚型。

*SmCE-1a1*: *S.mansoni cercaria elastase-1a1*, *SmCE-1c*: *S.mansoni cercaria elastase-1c*, *SmCE-1b*: *S.mansoni cercaria elastase-1b*, *SmCE-1a*: *S.mansoni cercaria elastase-1a*, *ShCE-1a*: *S.haematobium cercaria elastase-1a*, *ShCE-1b*: *S.haematobium cercaria elastase-1b*, *SdCE-1a*: *S.douthitti cercaria elastase-1a*, *SmCE-2a*: *S.mansoni cercaria elastase-2a*, *SmCE-1a2*: *S.mansoni cercaria elastase-1a2*, *SmCE-2b*: *S.mansoni cercaria elastase-2b*, *SjCE-2b*: *S.japonicum cercaria elastase-2b*.

图 1 血吸虫尾蚴弹性蛋白酶家族基因邻接树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of CE family genes generated by neighbor-joining method



M: DNA 标志物, 1: 虫卵, 2: 毛蚴, 3: 子胞蚴, 4: 尾蚴, 5: 童虫, 6: 成虫, 7: 对照 (未加模板)。

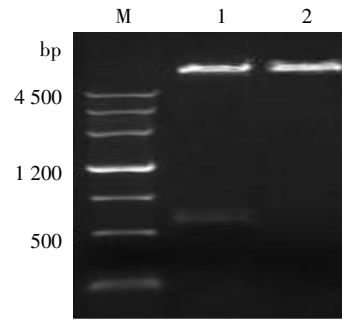
M: DNA marker, 1: Eggs, 2: Miracidia, 3: Sporocysts, 4: Cercariae, 5: Schistosomula, 6: Adult worms, 7: Negative control.

图 2 各虫期 RT-PCR 结果

Fig. 2 Agarose gel analysis of RT-PCR products

## 讨 论

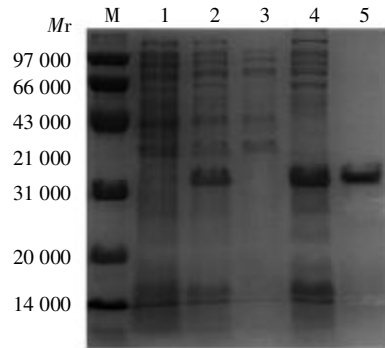
血吸虫的尾蚴弹性蛋白酶是一种胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, 是血吸虫尾蚴入侵感染终宿主过程中的关键酶。文献报道, 除日本血吸虫外, 其他 3 种血吸虫[曼氏血吸虫(*S.mansoni*), 杜氏血吸虫(*S.douthitti*), 埃及血吸虫(*S.haematobium*)], 特别是曼氏血吸虫已进行了较为全面和深入的研究, 但日本血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因的研究尚未见报道。钱应娟等<sup>[1]</sup>曾用酪蛋白



M: DNA 标志物, 1: 重组质粒 *SjCE-2b/pET28b* 双酶切产物, 2: 质粒 *pET28-b* 双酶切产物。

M: DNA marker, 1: Recombinant *SjCE-2b/pET28b* digested with *Hind*III and *Xho*I, 2: Empty plasmid *pET-28b* digested with *Hind*III and *Xho*I.

图 3 重组质粒 *SjCE-2b/pET28b* 酶切鉴定  
Fig. 3 The enzyme restriction for identification of recombinant plasmids



M: 蛋白质标志物, 1: 重组蛋白诱导前, 2: 重组蛋白诱导 4 h (1 mmol/L IPTG), 3: 菌体裂解后上清, 4: 菌体裂解后沉淀, 5: 纯化后的重组 *SjCE-2b* 蛋白。

M: Protein marker, 1: *SjCE-2b/pET28b* without IPTG induction, 2: *SjCE-2b/pET28b* with IPTG induction, 3: Soluble fractions of *SjCE-2b/pET28b* with IPTG induction, 4: Insoluble fractions of *SjCE-2b/pET-28b* with IPTG induction, 5: Elution of fusion protein.

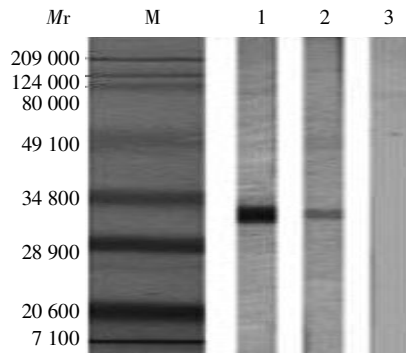
图 4 重组蛋白 *SjCE-2b* 可溶性分析

Fig.4 Solubility analysis of *SjCE-2b* recombinant protein

溶液对粗制的日本血吸虫尾蚴分泌的蛋白水解酶活性进行测定, 证实日本血吸虫尾蚴在转化为童虫的过程中能分泌一种具有较强水解蛋白活性的蛋白水解酶。

在日本血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因 *SjCE-2b* 被发现之前, 人们已在其他 3 种血吸虫 (曼氏血吸虫, 杜氏血吸虫, 埃及血吸虫) 中发现 9 个弹性蛋白酶家族成员。在曼氏血吸虫中, 已先后鉴定出 5 个弹性蛋白酶基因 *SmCE-1a*、*1b*、*1c*、*2a* 及 *2b*, 在杜氏血吸虫和埃及血吸虫中分别发现了 *SdCE-1a*、*1b* 和 *ShCE-1a*、*1b*<sup>[6]</sup>。

Chlichlia 等<sup>[12]</sup>用纯化的曼氏血吸虫尾蚴蛋白酶制备的兔血清, 通过免疫荧光定位法在日本血吸虫尾蚴腺体中检测到尾蚴蛋白酶的存在。而应用 *SmCE-1a* 基因制成的 DNA 疫苗鼠血清却不能识别日本血吸虫尾



M: 预染蛋白质标志物, 1: 重组蛋白 *SjCE* 免疫多抗兔血清, 2: 感染尾蚴 42 d 的兔血清, 3: 正常兔血清。

M: Protein marker, 1: Serum of immunized rabbit, 2: Infected rabbit serum, 3: Normal rabbit serum.

图 5 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of *SjCE-2b* recombinant protein

蚴腺体和分泌物中蛋白酶。而且在目前公布的日本血吸虫基因组数据中也找不到与 *SmCE-1a* 有足够同源性的序列, 因此 Chlichlia 等<sup>[12]</sup>推测日本血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因“*SjCE-1a*”缺失。

在日本血吸虫基因组测序工作完成之后, 本研究对获得的基因组序列进行了搜索, 仅得到 1 个尾蚴弹性蛋白酶编码基因; 通过与已知的血吸虫弹性蛋白酶家族成员作同源比对, 显示该基因为 *SjCE-2b*。除此之外, 是否还含有其他尚未发现的尾蚴弹性蛋白酶或其他蛋白酶成分, 仍有待进一步研究。

Pierrot 等<sup>[5]</sup>分别在 mRNA 和蛋白质两个水平上对曼氏血吸虫弹性蛋白酶所受到的调控进行了研究。首先, 利用 RT-PCR 技术在曼氏血吸虫虫卵、尾蚴和成虫 RNA 中检测弹性蛋白酶 mRNA, 结果在每个阶段均扩增出一段长度为 800 bp 的 DNA 片段。这些片段的测序结果表明虫卵、尾蚴和成虫所有这些阶段均含有弹性蛋白酶的转录本。本研究结果显示, 在日本血吸虫虫卵、子胞蚴和成虫 3 个阶段均存在 *SjCE-2b* 的转录本。而在尾蚴则未检测到 *SjCE-2b* 转录本, 分析原因, 可能是在尾蚴阶段该基因的转录本拷贝数太少的缘故。此外 Pierrot 等<sup>[5]</sup>进一步利用纯化的重组弹性蛋白酶制备的兔抗血清与曼氏血吸虫不同发育阶段中的提取物进行 Western blotting 分析, 结果在尾蚴和子胞蚴的匀浆中检测出天然的弹性蛋白酶, 而在虫卵和成虫中则无。

综上所述, 推测 *SjCE-2b* 可能在日本血吸虫各个虫期均被转录, 但在子胞蚴和尾蚴阶段或是只在子胞蚴阶段才被翻译为尾蚴弹性蛋白酶来行使其生物学作用, 帮助日本血吸虫穿过宿主完整的皮肤, 进而感染

终宿主。该基因的表达可能受到某种翻译水平的调控。本研究 RT-PCR 正向引物序列为 5'-CCCAAGCTT ATACGTAGTGGTGAACCCG-3', 克隆表达的重组蛋白是成熟的日本血吸虫尾蚴弹性蛋白酶所对应的基因序列。另外, 通过 Western blotting 分析证实, 日本血吸虫弹性蛋白酶具有一定的免疫原性, 它有可能成为日本血吸虫疫苗的候选抗原和药物或诊断靶点。本研究首次对日本血吸虫尾蚴弹性蛋白酶基因 *SjCE-2b* 进行了克隆和表达, 为下一步对该基因功能的深入研究打下了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Landsperger WJ, Stirewalt MA, Dresden MH. Purification and properties of a proteolytic enzyme from the cercariae of the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*[J]. *Biochem J*, 1982, 201: 137-144.
- [2] McKerrow JH, Keene WE, Jeong KH, et al. Degradation of extracellular matrix by larvae of *Schistosoma mansoni*: I. Degradation by cercariae as a model for initial parasite invasion of host [J]. *Lab Invest*, 1983, 49: 195-200.
- [2] Lindquist RN, Senft AW, Pettit M, et al. *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms[J]. *Exp Parasitol*, 1986, 61: 398-404.
- [4] Mckerrow JH, Pino Heiss S, Lindquist R, et al. Purification and characterization of an elastolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260: 3703-3707.
- [5] Pierrot C, Godin C, Liu JL, et al. *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle[J]. *Parasitology*, 1996, 113(pt6): 519-526.
- [6] Salter JP, Choe Y, Albrecht H, et al. Cercarial elastase is encoded by a functionally conserved gene family across multiple species of schistosomes[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 24618-24624.
- [7] Bahgat M, Ruppel A. Biochemical comparison of the serine protease(elastase) activity in cercarial secretions from *Trichobilharzia ocellata* and *Schistosoma mansoni*[J]. *Parasitol Res*, 2002, 88: 495-500.
- [8] Liu Y, Zhu NS. Molecular markers in constructing phylogenetic tree[J]. *Bioinformatics*, 2004, 2(4): 34-36. (in Chinese) (刘洋, 朱乃硕. 谈系统发生树建立的分子标准[J]. *生物信息学*, 2004, 2(4): 34-36.)
- [9] Chang Q, Zhou KY. Phylogeny reconstruction in the study of molecular evolution[J]. *J Biodiversity*, 1998, 6: 55-62. (in Chinese) (常青, 周开亚. 分子进化研究中系统发生树的重建[J]. *生物多样性*, 1998, 6: 55-62.)
- [10] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [11] Qian YJ, Zhang HY. *Schistosoma japonicum*: a study of the secreted proteolytic enzyme in cercaria[J]. *Chin J Vet Parasitol*, 1997, 5(3): 13-16. (in Chinese) (钱应娟, 张惠英. 日本血吸虫尾蚴分泌蛋白水解酶的初步研究[J]. *中国兽医寄生虫病*, 1997, 5(3): 13-16.)
- [12] Chlichlia K, Schauwienold B, Kirsten C, et al. *Schistosoma japonicum* reveals distinct reactivity with antisera directed to proteases mediating host infection and invasion by cercariae of *S. mansoni* or *S. haematobium*[J]. *Parasit Immunol*, 2005, 27: 97-102.

(收稿日期: 2007-05-24 编辑: 富秀兰)