

文章编号:1000-7423(2009)-01-0080-03

日本血吸虫童虫 cDNA 文库免疫学筛选及阳性克隆的初步鉴定

段新伟¹, 傅颖慧³, 卢艳², 黄成玉¹, 鞠川², 徐斌², 许学年², 冯正², 胡薇^{2*}

【摘要】 用日本血吸虫感染 14 d 的小鼠血清免疫筛选日本血吸虫童虫 cDNA 文库, 将获得的 7 个阳性克隆进行核苷酸序列同源性分析, 结果显示其中一个克隆所测序列与日本血吸虫 HSP70 有很高的同源性 (分值 score=650), 另有 2 个克隆所测序列分别与已报道的日本血吸虫 FABP (score=229) 和含锌指结构的 CDGSH 型蛋白样蛋白 (score=246) 明显同源, 其余 4 个未找到已知的同源序列, 为新基因。4 个新基因序列已被 GenBank 接受 (登录号为 EU121231、202646、202647 和 202648)。

【关键词】 日本血吸虫; 童虫; cDNA 文库; 免疫筛选; 抗原基因

中图分类号: R383.24 文献标识码: B

Immunoscreening and Identification of *Schistosoma japonicum* Juvenile cDNA Library

DUAN Xin-wei¹, FU Ying-hui³, LU Yan², HUANG Cheng-yu¹, JU Chuan², XU Bin², XU Xue-nian², FENG Zheng², HU Wei^{2*}

(1 Biotechnology School, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2 National Institute of Parasite Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 3 Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 The cDNA library of *Schistosoma japonicum* (Sj) juveniles was immunoscreened with the anti-serum from day 14 post-infection mice. The inserts of the seven positive clones were sequenced and analyzed for their homology in GenBank database. Results showed that one was highly homologous to the SjHSP70 (score=650), two were significantly homologous to the SjFABP(score=229) and Sj CDGSH-type Zn finger-containing protein-like protein(score=246), and the other four were not homologous to genes in GenBank and thus identified as Sj novel genes. The sequences of the novel genes were submitted to GenBank and the accession numbers were obtained (EU121231, 202646, 202647 and 202648).

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Schistosomula; cDNA library; Immunoscreening; Antigen gene

Supported by the Hi-tech Research and Development Program of China (No. 2007AA02Z153); TMRC/NIH(No. 5 P50 AI39461); The National Basic Research Program of China (No. 2003CB716804)

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

随着分子生物学与免疫学的迅速发展, 血吸虫病的诊断和疫苗研究取得很大进展^[1]。然而, 迄今尚无用于现场的兽用或人用血吸虫疫苗, 亦未建立高敏感性和特异性的诊断方法。目前研制基因工程疫苗面临诸多困难, 数个被认为有发展潜力的基因工程疫苗候选分子的免疫保护作用均未达到 WHO 提出的 40% 减虫率^[2], 免疫保护力的持续时间较短^[3], 分子诊断用抗

原抗体的大批量制备、质量监控以及诊断用重组抗原的无活性或活性低等^[4]。因此继续寻找新的血吸虫抗原分子非常必要。本实验用感染日本血吸虫 14 d 的小鼠血清在其童虫 cDNA 文库中筛选早期诊断抗原和疫苗候选抗原分子, 并对阳性克隆进行初步鉴定和分析。

1 材料与与方法

1.1 cDNA 表达文库与菌株 日本血吸虫中国大陆株童虫 cDNA 文库由本实验室构建 (容量为 3×10^5 pfu/ml, 平均插入片段长度为 920 bp)。EXAssist 辅助噬菌体 (Stratagene)、XL1-Blue MRF⁺ 菌株 (Stratagene)、SOLR 菌株 (Stratagene) 和大肠埃希菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 由本实验室保存。

1.2 实验动物 雌性昆明小鼠 20 只, 4 周龄, 体重约 20 g, 购自中国科学院实验动物中心。

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (No. 2007A A02Z153); 热带医学研究中心/美国国立卫生研究院 (No. 5 P50 AI39461); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (No. 2003CB716804)

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 上海交通大学医学院, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: hubeixf@hotmail.com

1.3 主要试剂 血吸虫抗体检测试剂盒购自深圳市康百得生物科技有限公司，辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgM (HRP-IgM)、麦芽糖和氨基联苯胺 (DAB) 购自美国 Sigma 公司，酵母提取物和蛋白胨购自英国 OXOID 公司，酪蛋白的酶促水解物 (NZ 胺) 购自美国 AMRESCO 公司，四环素 (tetracycline) 购自洛阳华美生物工程公司，硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自英国 Amersham 公司，其他试剂为国产分析纯。

1.4 小鼠血清的制备 日本血吸虫尾蚴感染 20 只昆明小鼠 (800 条/鼠)，14 d 后眼眶取血。用 ELISA 法检测出效价较高的小鼠血清，混合后经大肠埃希菌 XL1-blue 裂解液反复吸附，用于筛库。

1.5 cDNA 文库的免疫筛选 参照文献 [5,6] 的方法对日本血吸虫童虫 cDNA 文库进行免疫筛选。

1.6 体外删除环化阳性克隆 按照 ZAP-cDNA 合成试剂盒 (美国 Stratagene 公司) 操作说明进行。

1.7 阳性克隆插入基因片段的 PCR 鉴定 用质粒提取试剂盒抽提环化后的质粒 DNA，并以此为模板进行 PCR 扩增。PCR 引物为通用引物 T3 (5'-ATTAACCTCACTAAAGGGA-3') 和 T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')，反应条件为：95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。依据 1% 琼脂糖凝胶电泳结果判断插入片段的大致分子量。

1.8 插入片段核苷酸序列测定及同源性分析 由上海英峻生物技术有限公司测序，测序结果与 GenBank 中的核苷酸序列进行同源性分析。根据分值 (score) 判断其是否为已知基因，将新基因序列上传至 GenBank。

1.9 阳性克隆的生物信息学分析 使用 ORF finder 软件分析新基因编码的蛋白质阅读框，SignalP3.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测蛋白是否含有信号肽，SubLoc v1.0 软件 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>) 对蛋白进行亚细胞定位的预测，TMPred 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析蛋白的跨膜区，Scanprosite 软件 (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>) 分析蛋白的功能位点，SOPMA 软件 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构。

2 结果

2.1 cDNA 表达文库的免疫学筛选和阳性克隆的 PCR 鉴定 用预吸附的小鼠血清对日本血吸虫童虫 cDNA 文库进行 3 轮筛选，获得 7 个持续阳性克隆。PCR 扩增结果显示，7 个阳性克隆全部扩增出特异条带，插入的 cDNA 片段大小约为 0.5~3.0 kb。

2.2 阳性克隆的 DNA 测序与同源性分析 测定 7 个阳性克隆 (编号为 P1、P2、P4-3、P7、P11、P13 和 P16) 的核苷酸序列。这 7 个克隆的插入片段长度分别为 1 398、1 295、666、547、2 425、722 和 817 bp; A+T 含量分别为 59.37%、68.80%、61.11%、67.28%、62.85%、64.13% 和 64.26%。利用 NCBI-Blast 对这 7 个序列进行核苷酸同源性分析，结果显示 P1 与已报道的日本血吸虫 HSP70 有很高的同源性 (score=650)，P4-3 与已报道的日本血吸虫 FABP 有一定的同源性 (score=229)，P13

与已报道的含锌指结构的 CDGSH 型蛋白样蛋白有一定的同源性 (score=246)。其余 4 个克隆所测序列与已知基因序列无显著同源性，为新基因。其中 P2 蛋白基因长 1 295 bp，含有一个 612 bp 的开放阅读框，起始密码子位于第 70 位。P7 蛋白基因长 547 bp，含有一个 423 bp 的开放阅读框，起始密码子位于第 54 位。P11 蛋白基因长 2 425 bp，含有一个 1 785 bp 的开放阅读框，起始密码子位于第 210 位。P16 蛋白基因长 817 bp，含有一个 507 bp 的开放阅读框架，起始密码子位于第 71 位 (表 1)。

表 1 7 个阳性克隆的特征

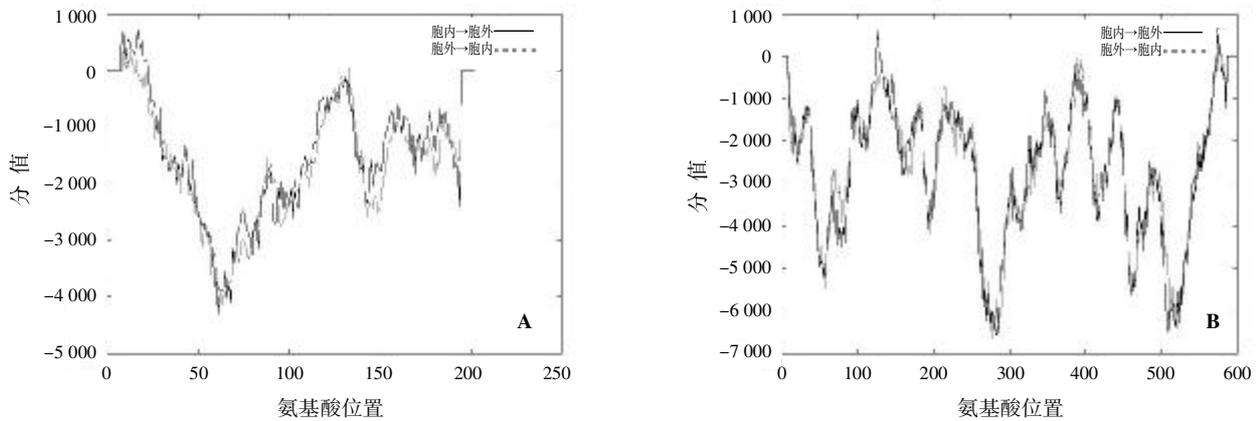
编号	登录号	基因注释	结构域	插入片段长度(bp)	编码蛋白(Mr)
P1	AF044413	HSP70	热休克蛋白 Hsp70 家族特征位点	1 398	41 000
P2	EU202646	新基因	HEAT 重复位点	1 295	22 000
P4-3	AF331756	FABP	脂肪酸结合蛋白特征位点	666	15 000
P7	EU121231	新基因	无	547	16 000
P11	EU202647	新基因	核定位信号序列位点	2 425	68 000
P13	DQ480550	CDGSH 型蛋白样蛋白	无	722	15 000
P16	EU202648	新基因	hesB 家族特征位点	817	19 000

2.3 蛋白质结构与功能预测 7 个阳性克隆的编码蛋白的特征见表 2。4 个新基因编码蛋白的结构与功能预测如下：P2 基因编码 203 个氨基酸，等电点为 4.27，预测其编码蛋白为跨膜蛋白 (score=734) (图 1A)，前 19 个氨基酸为信号肽，编码蛋白定位于细胞质。P7 基因编码 140 个氨基酸，等电点为 4.75，预测其编码蛋白定位于细胞核。P11 基因编码 594 个氨基酸，等电点为 9.61，预测其编码蛋白为跨膜蛋白 (score=611) (图 1B)，定位于细胞核。P16 基因编码 168 个氨基酸，等电点为 9.68，预测其编码蛋白定位于细胞核。

表 2 7 个蛋白的定位和功能位点的预测

编号	等电点	信号肽	跨膜区	亚细胞定位	功能位点	二级结构*
P1	5.57	无	无	线粒体	abcdf	1234
P2	4.27	有(第 1~19 位氨基酸)	1 个(第 1~20 位氨基酸)	细胞质	abcd	1234
P4-3	7.93	无	无	细胞外	abcd	3214
P7	4.75	无	无	细胞核	abd	1234
P11	9.61	无	1 个(第 117~137 位氨基酸)	细胞核	abcde	2134
P13	8.83	无	1 个(第 36~59 位氨基酸)	细胞质	abceg	2134
P16	9.68	无	无	细胞核	abc	2314

注：功能位点，a：蛋白激酶 C 磷酸化位点，b：酪蛋白激酶 II 磷酸化位点，c：N-肉豆蔻酰化位点，d：N-糖基化位点，e：cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点，f：酪氨酸激酶磷酸化位点，g：酰化位点；* 按照含量多少排序，“1”α 螺旋，“2”无规卷曲，“3”延伸链，“4”β 转角。



A: P2 基因, B: P11 基因。纵坐标: 负值表示亲水性, 正值表示疏水性, 分值大于 500 者有统计学意义。

图 1 2 个新基因编码蛋白的跨膜区分布图

3 讨论

随着分子生物学、分子免疫学和基因工程技术的快速发展及其在寄生虫学方面的应用,人们开始致力于基因工程重组诊断抗原和分子疫苗的研究。分离和鉴定抗原候选基因常用方法之一就是构建血吸虫某一发育阶段的 cDNA 文库,采用核酸探针或抗体探针进行筛选。免疫筛选血吸虫童虫文库具有以下优势:童虫较成虫脆弱,对宿主免疫攻击的抵抗力弱,若能找到针对此阶段的特异性抗原分子,则有望使用单一的疫苗分子将其杀死;童虫文库中可能含有童虫特有的基因,比如与生长发育和性别分化有关的阶段特异性基因;若能将在童虫阶段或是在此阶段影响其生长发育,便可有效的减轻血吸虫对宿主的机体损伤,甚至可阻止其传播^[7]。因此,对血吸虫童虫 cDNA 文库进行免疫筛选有望找到其早期诊断的靶点。

目前 cDNA 文库筛选常用的抗体探针有健康动物血清、免疫动物血清、感染动物血清以及疫区患者血清。感染血清易获得、且能获得较高的阳性克隆筛出率^[8]。本研究采用感染 14 d 的小鼠血清筛选日本血吸虫童虫 cDNA 文库,经过 3 轮筛选获得 7 个持续阳性反应克隆,其中 3 个与已知基因有较高同源性,其余 4 个为新基因。经相关蛋白质数据分析软件预测,这 4 个新基因所编码的蛋白中 P2 和 P7 为酸性蛋白, P11 和 P16 为碱性蛋白;这 4 种蛋白均含有酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点,说明这 4 种蛋白可能在日本血吸虫细胞信号传导和基因的表达调控过程中发挥一定作用。P7 和 P16 为非跨膜蛋白, P2 和 P11 为单次跨膜蛋白。目前所发现的血吸虫抗原分子中,有许多为跨膜蛋白基因,如血吸虫 Mr 23 000 膜蛋白^[9,10]、血吸虫 TOR (trispinning orphan receptor)^[11]以及日本血吸虫乳酸脱氢酶 (SjLDH)^[12]等,这些跨膜蛋白参与血吸虫的细胞信号传导,是血吸虫表膜理想的免疫攻击靶位,而 P2 和 P11 蛋白可能是日本血吸虫表膜潜在的免疫攻击靶点^[13]。基于生物信息学提供的这些线索,目前针对这 4 种新基因的进一步研究正在进行中。

参 考 文 献

[1] Dunne DW, Hagan P, Abath FG, et al. Prospect for immunological control of schistosomiasis[J]. Lancet, 1995, 345(8963):

1488-1491.
 [2] McManus D. The *Schistosoma japonicum* angle on vaccine research [J]. Parasitol Today, 2000, 16(8): 357-358.
 [3] Woolhouse ME. Human schistosomiasis: potential consequences of vaccination[J]. Vaccine, 1995, 13(12): 1045-1050.
 [4] Xi JF, Li L, Wang YN, et al. Review on the diagnostic molecular antigens of schistosomes[J]. J First Milit Med Univ, 2001, 21(12): 117-121. (in Chinese)
 (习佳飞, 李林, 王亚楠, 等. 血吸虫分子诊断抗原的研究进展[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 117-121.)
 [5] Knight M, Simpson AJ, Bickle Q, et al. Adult schistosome cDNA libraries as a source of antigens for the study of experimental and human schistosomiasis[J]. Mol Biochem Parasitol, 1986, 18(2): 235-253.
 [6] Young RA, Davis RW. Efficient isolation of genes by using antibody probes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(5): 1194-1198.
 [7] Bian MH, Shen JJ. Immunoscreening of *Schistosoma japonicum* cDNA library and cloning of H1 gene[J]. J Clin Transfu Lab Med, 2002, 4(3): 18-20. (in Chinese)
 (卞茂红, 沈际佳. 日本血吸虫童虫 cDNA 文库免疫学筛选及 H1 基因的克隆[J]. 临床输血与检验, 2002, 4(3): 18-20.)
 [8] Saint RB, Beall JA, Grumont RJ, et al. Expression of *Schistosoma japonicum* antigens in *Escherichia coli*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1986, 18(3): 333-342.
 [9] Da'dara AA, Skelly PJ, Wang MM, et al. Immunization with plasmid DNA encoding the integral membrane protein, Sm23, elicits a protective immune response against schistosome infection in mice[J]. Vaccine, 2001, 20(3-4): 359-369.
 [10] Gan Y, Shi YE, Bu LY, et al. Immune responses against *Schistosoma japonicum* after vaccinating mice with a multivalent DNA vaccine encoding integrated membrane protein Sj23 and cytokine interleukin-12[J]. Chin Med J, 2004, 117(12): 1842-1846.
 [11] Inal JM. *Schistosoma* TOR (trispinning orphan receptor), a novel antigenic surface receptor of the blood-dwelling, *Schistosoma* parasite[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1445(3): 283-298.
 [12] Lv G, Hu XC, Huang C, et al. Prokaryotic expression, purification and identification of lactate dehydrogenase from *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Publ Hlth, 2007, 23(10): 1242-1244. (in Chinese)
 (吕刚, 胡旭初, 黄灿, 等. 日本血吸虫乳酸脱氢酶原核表达、纯化及鉴定[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(10): 1242-1244.)
 [13] Vicogne J, Dissous C. *Schistosoma mansoni* receptor tyrosine kinases: towards new therapeutic targets[J]. J Soc Biol, 2003, 197(4): 367-373.

(收稿日期: 2008-01-04 编辑: 杨频)