

## 日本血吸虫中国大陆株琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白的克隆与表达

余俊龙,汪世平\*,何 卓,戴 橄,姜孝新,曾少华,肖晓芹,周松华,李文凯,徐绍锐,吕志跃,彭先楚  
(中南大学湘雅医学院病原生物学系,长沙 410078)

**[摘要]** 目的:克隆日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(SjSDISP)全长编码基因,并对所获基因在大肠杆菌中进行表达。方法:根据基因库中SjSDISP对应的EST(BU804141)以及日本血吸虫成虫cDNA文库载体 $\lambda$ gt11多克隆位点邻近核苷酸序列设计引物,以日本血吸虫成虫cDNA文库为模板,采用锚式PCR对SjSDISP基因不完整的3'端和5'端进行扩增、测序,用电子软件拼接成全长cDNA,将其克隆到表达载体pGEX-4T-1上,经琼脂糖凝胶电泳、限制性内切酶消化、PCR和测序鉴定后,选择阳性克隆进行表达及Western印迹分析。结果:获得1 071 bp全长cDNA,其理论推导为编码278个氨基酸残基的蛋白质。SjSDISP基因在大肠杆菌BL<sub>21</sub>中获得良好表达。该融合表达产物相对分子质量约为56 kD,且能被日本血吸虫成虫抗原免疫血清特异识别。结论:编码日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白全长cDNA克隆及其在大肠杆菌中的表达获得成功。

**[关键词]** 日本血吸虫; 琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白; 基因克隆; 基因表达

**[中图分类号]** R383.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0458-06

## Cloning and expression of the succinate dehydrogenase iron-sulfur protein of *Schistosoma japonicum* Chinese strain in *E. coli*

YU Jun-long, WANG Shi-ping\*, HE Zhuo, DAI Gan, JIANG Xiao-Xin, ZENG Shao-hua,  
XIAO Xiao-qing, ZHOU Song-hua, LI Wen-kai, XU Shao-rui, LÜ Zhi-yue, PENG Xian-chu  
(Department of Pathogenic Biology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

**Abstract:** **Objective** To clone the full-length gene encoding succinate dehydrogenase iron-sulfur protein of *Schistosoma japonicum* (SjSDISP) Chinese strain and express it in *Escherichia coli*. **Methods** According to the published incomplete EST (BU804141) of SjSDISP and the sequence of multicloning sites of  $\lambda$ gt11 vector, 2 pairs of primers were designed and synthesized. Then the 3' and 5' ends of the EST of the SjSDISP from adult *Schistosoma japonicum* cDNA library were amplified by anchored PCR. After sequencing, a full-length cDNA sequence of the SjSDISP was obtained, and then it was cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. Identified by agarose gel electrophoresis, endonucleases digestion and PCR, the resultant recombinant plasmid was used for the expression under the temperature-dependent condition and Western blot analysis. **Results** A 1 071 bp sequence was obtained. Sequence analysis showed that the fragment contained a complete open reading frame (ORF), encoding 278 amino acid residues. This target fragment was cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1, and expressed in *Escherichia coli*. SDS-PAGE revealed that the molecular weight of the expressed fusion recombinant product was 56 kD. Western blot showed that the recombinant protein was recognized by polyclonal rabbit antiserum immunized with *Schistosoma japonicum* adult worm antigen. **Conclusion** Cloning of the full-length gene encoding SjSDISP and its bacterial expression were successfully done.

收稿日期:2005-10-15 作者简介:余俊龙(1966-),男,湖南沅江人,副研究员,博士,主要从事感染免疫研究。

\* 通讯作者, E-mail:wsp4373383@126.com

基金项目:国家“十五”重大科技专项(2002AA2Z3343);国家863重大计划(2004AA2Z3530);湖南省“十一五”重大专项;湖南省重点学科建设专项经费(03-985-3-7)

**Key words:** *Schistosoma japonicum*; succinate dehydrogenase iron-sulfur protein; gene cloning; gene expression

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2006,31(4):0458-06]

血吸虫病是一种严重危害人类健康的螺传寄生虫病,全球有76个国家和地区流行此病。WHO估计全球有6亿人受到血吸虫病感染的威胁,有2亿人受感染,每年有50余万人死于血吸虫病<sup>[1]</sup>。我国主要流行日本血吸虫病(*Schistosomiasis japonica*),主要分布于长江流域及其以南的12个省市、自治区,有80多万人受感染。血吸虫致病的主要原因是雌虫所产大量虫卵沉积于肝、肠壁等组织中,形成虫卵肉芽肿、组织损伤和纤维化,同时大量虫卵排出体外可造成血吸虫的传播和流行。因此人们试图通过研制抗病疫苗达到减轻发病,减少排卵从而阻断传播的目的。汪世平等<sup>[2-5]</sup>用新鲜未成熟活卵反复致敏BALB小鼠诱导抗卵胚发育效应,此后证明未成熟虫卵可溶性抗原(soluble immature egg antigen, SIEA)及其SIEA26/26 kD组分具有明显的抗虫卵胚胎发育和抗雌虫生殖产卵效果。2000年,在全国统一血吸虫疫苗免疫效果评价中,本课题组提供的未成熟卵天然分子疫苗(1号)在16种被抽查的疫苗中获得最佳动物保护效果:53.9%减雌雄合抱率和89.3%肝减卵率<sup>[6]</sup>。1号疫苗的主要成分为日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原26~28 kD分子(SjSIEA 26/28)。近几年中南大学湘雅医学院寄生虫教研室借助蛋白质组学等研究手段,对SjSIEA26/28进行了深入分析,发现此组分由10余个不同的蛋白质分子组成,其中一分子与日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白同源性最高。

通过美国生物技术信息中心网站(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)对SjSDISP进行搜索,发现SjSDISP基因有众多表达序列标签(EST),但其3'端和5'端均不完整。本研究拟用锚式PCR就SjSDISP对应的一EST(BU804141)先行3'和5'末端扩增与测序,然后拼接cDNA全长;对获得的全长编码基因(ORF)进行克隆、测序和表达,以获得与天然分子(SIEA26~28 kD)对应的重组分子,并对重组分子进行纯化和免疫学测定。

## 1 材料与与方法

1.1 菌株与质粒 日本血吸虫中国大陆株成虫cDNA文库由南京医科大学陈淑贞教授构建,

pGEX-4T-1和大肠杆菌BL<sub>21</sub>, Y<sub>1090</sub>为中山医科大学吴忠道教授惠赠。

1.2 主要试剂 ExTaqDNA聚合酶、限制性核酸内切酶BamHI和SalI、质粒提取试剂盒及DNA marker均为大连TaKaRa公司产品;Protein marker为美国Fermentas公司产品;T<sub>4</sub>DNA连接酶为上海生工生物工程公司产品;氨苄青霉素、IPTG、DTT等为美国Sigma公司产品;硝酸纤维素膜(NC膜)为上海四青生化材料厂产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG系晶美公司产品。

1.3 引物 根据文库载体多克隆插入位点上下游邻近区核苷酸序列设计上下游引物P1, P2;根据序列号为BU804141的EST 5'端和3'端核苷酸序列设计特异引物分别为S1, S2;根据全长序列编码阅读框起始密码子和终止密码子附近的核苷酸序列再设一对引物S3和S4, 5'端引物S3内含BamHI酶切位点, 3'端引物S4内含SalI酶切位点, 以上引物由大连TaKaRa公司合成。

P1: 5'-GGTGGCGACGACTCCTCGAGCCCG-3';

P2: 5'-TTGACACCAGGCCAACTGGTAATG-3';

S1: 5'-AGGGCCACAGTCGTTGAGGTCAAC-3';

S2: 5'-CGTCCACATATTCGTCGGAATTTG-3';

S3: 5'-GCGGATCCATGCTGAAGTCTCTATCTAC-3';

S4: 5'-ACGTGCGACTCAGTCAGTTCCTGTCTCCG-3'

1.4 模板准备 将适量日本血吸虫中国大陆株成虫cDNA文库包装液入适量过夜培养的大肠杆菌Y<sub>1090</sub>中,放置37℃预吸附20 min,然后加入含有MgSO<sub>4</sub>、氨苄青霉素、麦芽糖的55℃平衡的顶层琼脂中,快速混匀后倒入直径为8 cm的LB琼脂培养皿中,42℃培养4 h后每皿加3 mL SM液,置4℃轻摇过夜。收集上清,5 000 r/min室温离心5 min,取上清加入20% PEG,混匀室温放置30 min后12 000 r/min室温离心15 min,弃上清,沉淀中加入100 μL双蒸水,沸水浴5 min,使噬菌体DNA变性,-20℃保存备用。

1.5 锚式PCR扩增基因不完整的5'端和3'末端 SjSDISP 5'端锚式PCR扩增:PCR体系100 μL, 10×ExTaq buffer 10 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10 μL,引物P1和S1各2 μL,文库模板6 μL, ExTaq酶1 μL,双蒸水67 μL。96℃

预变性 3 min, 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 35 个循环; *SjSDISP* 3' 末端锚式 PCR 扩增: PCR 体系 100  $\mu$ L, 10  $\times$  ExTaq buffer 10  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$ L, 引物 S2 和 P2 各 2  $\mu$ L 文库模板 6  $\mu$ L, ExTaq 酶 1  $\mu$ L, 双蒸水 67  $\mu$ L。96 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定相对分子质量, 根据同源基因估计, 对符合目的条带大小的片段进行回收, 送大连 TaKaRa 公司进行 DNA 测序。最后将扩增到的 5' 端和 3' 末端序列与原 EST (BU804141) 合并成长 cDNA。

**1.6 全长编码基因的克隆与鉴定** 用根据全长序列编码阅读框起始密码子和终止密码子附近的核苷酸序列再设一对引物 S3 和 S4 为引物, 以 cDNA 文库为模板进行全长编码基因的 PCR 扩增。用 *Bam*HI 和 *Sal*I 同时双酶切目的片段及原核表达质粒 pGEX-4T-1, 用凝胶回收试剂盒对双酶切产物进行回收后, 将已双酶切的目的片段与质粒在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶作用下 16 °C 连接 16 h, 然后转化感受态大肠 BL<sub>21</sub>, 将转化产物涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂皿, 于 37 °C 培养过夜, 挑取菌落接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 摇床培养过夜, 抽提质粒, 双酶切鉴定和测序。

**1.7 目的基因的诱导表达** 将经双酶切和测序鉴定正确的重组菌接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 按常规方法诱导表达, 置 37 °C 摇床培养至 A<sub>600</sub> 为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 置 28 °C 摇床轻摇 4~5 h, 按常规方法提取菌体蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

**1.8 Western 印迹检测表达产物抗原性** 将表达的融合蛋白先进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 再电转印到硝酸纤维膜上, 用经 pGEX-4T-1 载体转化的大肠杆菌 BL<sub>21</sub> 裂解液吸附过的, 由日本血吸虫成虫粗抗原免疫新西兰大白兔制得的免疫血清作第一抗体, 按文献<sup>[7]</sup>中提供的方法进行 Western 印迹检测。

## 2 结 果

**2.1 *SjSDISP* 5' 端和 3' 末端锚式 PCR 扩增** 经锚式 PCR 扩增 *SjSDISP* 5' 端和 3' 末端, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 5' 锚式 PCR 获得一条约 350 bp 的条带, 回收该条带送大连 TaKaRa 公司进行测序, 得一个 335 bp 的序列, 有效长度为 284 bp。该

序列 3' 末端与原琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 EST (BU804141) 5' 端有 24 bp 碱基重叠, 表明是所要的目的片段; 原 EST 3' 端锚式 PCR 获得一条约 150 bp 的条带, 回收该条带送大连 TaKaRa 公司进行测序, 得一个 143 bp 的序列, 有效长度为 114 bp。该序列 5' 末端与原琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 EST 3' 端有 27 bp 碱基重叠, 表明是所要的目的片段。用电子软件将上述三者连接后得到一个总长为 1 071 bp 的 cDNA。序列分析表明, 此序列为 *SjSDISP* 全长 cDNA (图 2)。

### 2.2 全长编码基因的克隆、重组子构建与鉴定

以成虫 cDNA 文库为模板, S3 和 S4 为引物, 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见一条约 850 bp 大小的 DNA 条带, 与预期大小一致。图 1 为插入 *SjSDISP* 全长编码基因的质粒表达载体 pGEX-4T-1/*SjSDISP*, 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切鉴定和 PCR 验证, 证明原核表达质粒构建成功。原核表达载体 pGEX-4T-1/*SjSDISP* 质粒测序结果与全长 ORF 完全一致。

**2.3 *SjSDISP* 在大肠杆菌中表达和表达产物的纯化** 用 SDS-PAGE 对 IPTG 诱导重组菌在不同时间表达结果进行分析时发现, 表达产物在诱导 4~5 h 表达达高峰, 重组融合蛋白相对分子质量约为 56 kD (1 D = 1 u), 与推测的大小相符 (图 3)。

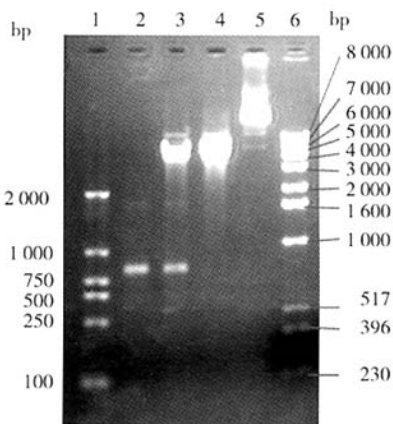


图 1 原核重组质粒 pGEX-4T-1/*SjSDISP* 双酶切鉴定和 PCR 验证 1: 核酸 marker DL2000; 2: 以重组质粒为模板进行的 PCR 产物; 3: 重组质粒经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切产物; 4: 空质粒经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切产物; 5: 空质粒 pGEX-4T-1; 6: 核酸 marker D016-2

Fig. 1 Restriction and PCR identification of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/*SjSDISP* 1: DL2000 marker; 2: PCR amplification using recombinant pGEX-4T-1/*SjSDISP* as template; 3: Recombinant pGEX-4T-1/*SjSDISP* digested by restriction enzyme *Bam*HI and *Sal*I; 4: pGEX-4T-1 digested by restriction enzyme *Bam*HI and *Sal*I; 5: pGEX-4T-1 plasmid; 6: D016-2 marker

```

1          gg t c a g t a a a a t t t c a t t t c a t a e c t c a c a g a t t t t c a g t t t e g a c a
46 t e a c a g t a t t t t g t g e g t g t t t t a a t a c c t e g a g a g a c a a a c c e t t t t a t t g a a g t t c a g a
106 a t t g c t g a a g t e t e t a t e t a e t t t t g e a g l e a g e a l e c t t c a a a c t t g t t e g t t a t g t t t c a
      M L K S L S T L Q S A S F K L V R Y V S
166 a c t g e a t c e a g a g t t a g e a c c e a g t a t t a a a a e g t t t t e a a t e a c a g a t g g a a c c e a g a e
      T A S E L L A P R I K T F S I Y R W N P D
226 a a a c c t g g g c g a g a a a c c t a g t a t g e a g a a t t a t c a a g t t g a e c t e a a e g a e t g l g g e e c t
      K P G E K P S M Q N Y Q V D L N D C G P
286 a t g g t e t t g g a t g e t e t a a t t a a g a t a a a a a a t g a a c a a g a e t e c a e t t t g a c a t t t g e a
      M V L D A L I K I K N E Q D S T L T F R
346 e g t t e t t g t e g t g a g g g g a t t t g e g g t t e t t g t g c a a t g a a t a l a g g a g g e e g t a a t c a t
      R S C R E G I C G S C A M N I G G R N H
406 e t t g e t t g c a t a t g g g a a a l e g a t e a a g a l g t t a g e a a a c c e g a e t a a a a t a t a l e c a t t a
      L A C I W E I D Q D V S K I Y P L
466 c e g c a c a t g t a t g t t a l l a a g g a t e t a a t t e c t g a t a t g a a c a a t t t e t a t g e t e a a l a a c
      P H M Y V I K D L I P D M N N F Y A Q Y
526 e g t t t t a t t g a e c t t a t t l a a a g a a a a a a a a a t g t a a e t g a a g a a g a t a t t g g g a a g a a g
      R F I E P Y L K K K N V T E E D I G K K
586 a e t t a t t a t e a g t e a g t g g a a g a c a g a g e a a a a c t a g a t g g g t t a t a e g a g t g c a t t e t g
      T Y Y Q S V E D R A K L D G L Y E C I L
646 t g t g e e t g e t e t e l l e a t t g t e c a t e t t a t t g g t g g a a t g g t g a t a a a t a t t t a g g t
      C A C G C S T S C P S Y W W N G D K Y L G
706 e e t g c a g t e e c t e c c e a g g e t t a t a g a t g g e t a g t t g a t t e t e g t a g a t g a e t a e a c a t a e
      P A V L L Q A Y R W L V D S R D D Y T Y
766 g a g e g l e t g l e t g a a t t e c a g a a c a a a t g g t e a c t t t a t e g a l t g c a t a e t a t t a t g a a e
      E R L S E F Q N K W S L Y R C H T I M N
826 t g c a c a g a a a e g t g l c c a a a a g g a e t g a a t e c t g g t t t l g g e e a t t g g a g a a a t t a a g a a a
      C T E T C P K G L N P G L A I G E I K K
886 a t g t t a a t e t a t t t a a t e a g t a c a a g g a c a a a a a g c e g g a g a c a a g a a e t g t e t g a a c t
      M L I Y F N Q Y K D K K P E T R T V
946 g t g t g a c t g t t t t e g t e c a e a t a t t e g t e c g a a t t t t g g a t a a c t t t t t a t t a t t g t t t a t
1006 a g t g a a t t e a g e c a t a l e t t e t a e t t t t t g a t t t a a c t t a t a t a a a t t c a t a g t c a a a a a
1066 a a a a a a

```

图2 SjSDISP 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列 序列中斜体为起始密码子、终止密码子、Kozak 序列和 PolyA, 下划线部分为引物 S1 和 S2  
 Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of SjSDISP Initiation and termination codon, Kozak sequence, and polyadenylation signal are in italic. Primers S1 and S2 are underlined.

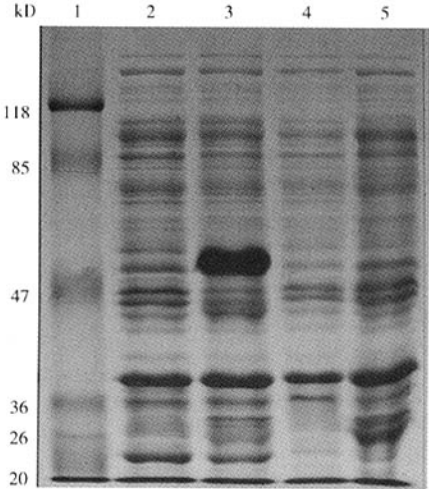


图3 pGEX4T-1/SjSDISP 原核表达产物的 SDS-PAGE 分析 1: 蛋白 marker; 2: 未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/SjSDISP 重组菌; 3: 经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1/SjSDISP 重组菌; 4: 未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 空载体菌; 5: 经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1 空载体菌  
 Fig.3 SDS-PAGE analysis of pGEX-4T-1/SjSDISP expression product in E. coli BL21 1: Protein marker; 2: pGEX-4T-1/SjSDISP without IPTG induction; 3: pGEX-4T-1/SjSDISP with IPTG induction; 4: pGEX-4T-1 without IPTG induction; 5: pGEX-4T-1 with IPTG induction

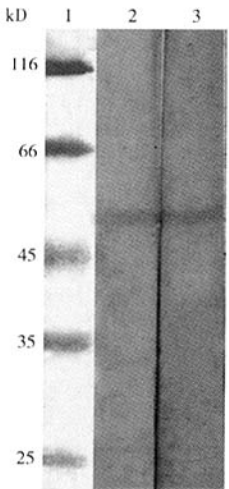


图4 Western 印迹分析 SjSDISP 重组质粒在大肠杆菌中表达产物的免疫活性 1: 蛋白 marker; 2, 3: SjSDISP 重组质粒在大肠杆菌中的表达产物  
 Fig.4 Immunoreactivity analysis of the expression product of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/SjSDISP in E. coli BL<sub>21</sub> by Western blot 1: Protein marker; 2, 3: Expression products of the recombinant plasmid pGEX-4T-1/SjSDISP in E. coli BL<sub>21</sub>

2.4 表达产物的抗原性测定 用经 pGEX-4T-1 载体转化的大肠杆菌 BL<sub>21</sub> 裂解液吸附过的日本血吸虫成虫兔免疫血清作一抗体,对原核表达产物进行 Western 印迹分析,在 56kD 处有一明显的识别条带(图 4)。

### 3 讨 论

世界卫生组织热带病研究特别规划署(WHO/TDR)根据曼氏血吸虫抗原分子纯化或重组蛋白质的保护水平、诱导效应等多种因素,提出 6 种最具潜力的疫苗候选分子,它们是谷胱苷肽-S-转移酶(GST)、副肌球蛋白(paramyosin, Sm97),照射减毒抗原 5(Irv-5)、磷酸丙糖异构酶(TPI)、完整膜蛋白(Sm23)和脂肪酸结合蛋白(FABP, Sm14),其中 5 个是胞浆蛋白,一个是膜蛋白。1998 年 TDR 对这 6 种疫苗候选分子进行了独立效果评价,虽然证实这些疫苗候选分子均能诱导宿主产生部分保护性免疫作用,但均未能获得 40% 以上的保护作用<sup>[8]</sup>。因此血吸虫,特别是日本血吸虫疫苗候选分子的寻找及各种疫苗候选分子之间的“配伍”研究成为人们感兴趣的课题。

业已证明日本血吸虫未成熟虫卵可溶性 26 ~ 28 kD 天然分子抗原(SjSIEA 26/28)具有抗雌虫生殖和抗卵胚发育的作用<sup>[2,3]</sup>,蛋白质组学研究表明,它是由 10 多个不同的蛋白质分子组成的混合物<sup>[9]</sup>。由于难以大量生产此组天然分子作为疫苗,本课题组计划对这 10 多个不同的蛋白质分子分别进行克隆、表达及动物免疫保护性实验,以期用基因疫苗替代天然分子疫苗。这 10 个蛋白质分子中有一分子与琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(SDISP)同源性最高。

SDISP 作为细胞三羧酸循环限速酶之一的琥珀酸脱氢酶的亚单位成分,主要参与能量代谢过程。Smith 等<sup>[10]</sup>研究认为,三羧酸循环酶类在曼氏血吸虫尾蚴体内有较高活性,而雌雄合抱的曼氏和日本血吸虫成虫三羧酸循环酶表达水平及活性均较低,据此认为糖酵解途径是曼氏和日本血吸虫成虫能量的主要来源。如果从用作化疗靶标的角度考虑,通过调控 SDISP 的表达或抑制其活性,达到减小体内虫荷的目的,可能难以奏效;但从生物进化和疫苗角度考虑,可能是一种重要的疫苗候选分子。目前公认的免疫保护力最高的疫苗是致弱尾蚴减毒活疫苗,有报道其免疫保护力高达 84%<sup>[11]</sup>,显然,其高免疫保护力与尾蚴阶段特异

性抗原的表达不无关系。SDISP 在尾蚴阶段表达水平较高,而在成虫阶段较低,具有阶段特异性。众所周知,尾蚴断尾进入皮肤,以童虫形式在组织中移行,最后在门静脉系统发育成成虫,这是血吸虫入侵宿主的 3 个主要阶段。在这 3 个阶段中,尾蚴阶段以独立方式生活,虫体能量来源主要是有氧化,因此,琥珀酸脱氢酶等三羧酸循环限速酶功能的正常发挥是尾蚴的体外生存所必需。进入体内发育成成虫后,生存环境发生了变化,酵解途径可能成为其体内能量的重要来源,琥珀酸脱氢酶等三羧酸循环限速酶类出现用进度退现象,可以推测童虫阶段三羧酸循环限速酶类表达水平较尾蚴阶段有所下降,发育至成熟的成虫阶段表达水平最低。童虫阶段是由体外生活转换成体内寄生的转型期,虫体各方面表现较为脆弱,是化疗和疫苗应用的首选阶段,虽然此阶段 SDISP 表达水平有所下降,但降幅理应不大,这为疫苗的应用创造了良好条件。目前,血吸虫研究领域未见有关此酶用作候选疫苗的文献报道。本研究以日本血吸虫成虫 cDNA 文库为模板,以 SjSDISP 表达序列标签(BU804141)和文库载体多克隆位点序列为依据,设计引物,反复进行锚式 PCR 和测序,首次从日本血吸虫中国大陆株克隆到编码 SDISP 的全长编码基因,对研究和开发日本血吸虫候选疫苗具有重要意义。

锚着 PCR 后获一总长为 1 071 bp 的序列,含有 3 个可能的阅读框(ORF),其中最长的 ORF 长 837 bp,编码 278 AA。起始密码子 ATG 位于 106 ~ 108 bp,同一阅读框架下起始密码子前的第 7 ~ 9 bp 处有一终止密码子 TAA;终止密码子 TGA 位于 940 ~ 942 核苷酸,紧随其后的 949 ~ 951 处出现另一终止密码子 TGA;1 036 处出现 ATTTAA 加尾信号,3'端 1 060 处有较长的 poly(A)尾。起始密码子邻近序列,-3 位为 A,-4 位为 C,符合 Kozak 规则<sup>[12]</sup>。据此推断该片段为日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白的全长 cDNA(图 2)。此序列已送 GenBank 数据库中进行登录,登录号为 AY841892。

另外,本研究将 SjSDISP 全长编码基因克隆到表达质粒 pGEX-4T-1 相应的酶切位点中成功构建重组质粒(图 1);转化大肠杆菌 BL<sub>21</sub>,并在大肠杆菌中得到良好表达。由于 SjSDISP 本身相对分子质量约为 30 kD,而该表达产物含融合片段大小为 26 kD,故其表达产物相对分子质量约为 56 kD

(图3,4)。用日本血吸虫成虫抗原免疫新西兰兔所得抗血清对该表达产物进行 Western 印迹检测,在预测位置上出现明显的反应条带,说明所克隆的基因为编码日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白基因,具有良好的免疫反应性。上述实验结果的获得为下一步对 SjSDISP 进行动物免疫保护性研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, et al. The global status of schistosomiasis and its control[J]. *Acta Trop*, 2000, 77(1):41-51.
- [2] 汪世平, 赵慰先, 周汨波, 等. 日本血吸虫卵的体外培养与抗卵胚发育研究[J]. *中华医学杂志*, 1996, 76(3): 218-221.
- [3] 汪世平, 周汨波, 张顺科, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵对小鼠肝肉芽肿形成的免疫学影响[J]. *中华医学杂志*, 1997, 77(3): 768-770.
- [4] 汪世平, 周汨波, 沈国励, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26/28kD 抗原诱导抗雌虫生殖和抗卵胚发育免疫的研究[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1997, 15(2): 79-83.
- [5] Wang SP, Liu LP, Tan YW, et al. Analysis of SIEA and SIEA 28kD antigen in *Schistosoma japonicum* by two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Chin J Schisto Control*, 2003, 16(1):8-12.
- [6] Yu JL, Wang SP, He Z, et al. Cloning, expression and immunization of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma japonicum* [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, 33(7):665-672.
- [7] 陈利玉, 易新元, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫抗原基因的筛选、克隆、表达及免疫效果研究[J]. *进展*, 2005, 32(4): 331-337.
- [8] Wu ZD, Lu ZY, Yu XB. Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: A review [J]. *Acta Trop*, 2005, 96(2-3):106-116.
- [9] Li WK, WANG SP, LU ZY, et al. Anti-fecundity immunity induced by sIEA 26 ~ 28 kD antigens of *Schistosoma japonicum* is HGPRT antigen a major target for the immunity? [J]. *中国人畜共患病杂志*, 2005, 21(1): 1-4.
- [10] Smith TM, Brown JN. Tricarboxylic acid cycle enzyme activities in adult *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* [J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1977, 71(4): 329-320.
- [11] Soisson LA, Reid GD, Farah I, et al. Protective immunity in baboons vaccinated with a recombinant antigen or radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* is antibody-dependent [J]. *J Immunol*, 1993, 151(9): 4782-4789.
- [12] Kozak M. The scanning model for translation: An update [J]. *J Cell Biol*, 1989, 108(2): 229-241.

(本文编辑 陈丽文)