

地适应现场检测的需要。

参 考 文 献

[1] Siamak P, Yazdankhah, Liv S, et al. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in composite milk [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 67(2): 113-125.

[2] Rattle SJ, Pumell DR, Williams PIM, et al. New separation method for monoclonal immunoradiometric assays and its application to assays for thyrotropin and human chorionadotropin[J]. *Clin Chem*, 1984, 30(9): 1457-1461.

[3] Ishikawa E, Imagawa M, Hashida S, et al. Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and im-

munohistochemical staining[J]. *J Immun*, 1983, 4(3):209-327.

[4] Wu GL. Immunodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection in China: review and prospects[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2005, 23(5): 323-328. (in Chinese)  
(吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 323-328.)

[5] Liu ZS, Zhou H, Chen HS, et al. Methodological study on magnetic enzymatic immunoassay for detection of free HCG $\beta$  subunit [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2006, 22(3): 392-394. (in Chinese)  
(刘振世, 周昊, 陈海生, 等. 人绒毛膜促性腺激素游离 $\beta$ 亚单位磁分离酶联免疫方法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(3): 392-394.)

(收稿日期: 2008-10-10 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0226-03

【研究简报】

马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆、  
序列分析及编码产物 B 细胞表位预测

谢东方, 方政\*, 童海燕, 徐邦生, 黄为群, 方浩, 沈勤

【摘要】 根据 GenBank 中马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (BmG3PD 基因) 序列设计引物, 以马来丝虫 mRNA 为模板, RT-PCR 扩增 BmG3PD 基因, 将其克隆入 pGEM-T 载体, 转化大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆。经 EcoR I 和 Xho I 双酶切及 PCR 鉴定, 获得阳性重组质粒 pGEM-BmG3PD, 经序列分析及同源性比较, 以及对其编码产物进行 B 细胞表位预测, 结果表明 PCR 扩增的特异性条带为 1 020 bp, 与预期相符, 与 GenBank 已知基因序列同源性为 99%。编码产物 B 细胞表位预测, 氨基酸区域可能在 22~36、242~255、303~318 和 326~336 位。

【关键词】 马来丝虫; 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 基因克隆; 序列分析; B 细胞表位

中图分类号: R383.161 文献标识码: A

Cloning, Sequencing of G3PD Gene from *Brugia malayi*  
and Prediction of B cell Epitopes in its Amino Acid Sequence

XIE Dong-fang, FANG Zheng\*, TONG Hai-yan, XU Bang-sheng,  
HUANG Wei-qun, FANG Hao, SHEN Qin

(Department of Parasitology, School of Basic Medical Sciences, Nantong University, Nantong 226001, China)

【Abstract】 Specific primers were designed and synthesized based on the reported glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (BmG3PD) gene of *Brugia malayi* (GenBank Accession No. U18137). Total RNA was extracted from *Brugia malayi* and its BmG3PD gene was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR product was purified and cloned into plasmid pGEM-T, then transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . The recombinant plasmids were screened and identified by digestion with restriction enzyme and PCR amplification. The positive recombinant plasmid pGEM-T-BmG3PD was confirmed by sequencing and homology comparison. Five parameters and methods were used to predict B-cell epitopes in amino acid sequence of BmG3PD. The amplified DNA fragment (1 020 bp) had a high identity of 99% with the BmG3PD gene sequence of *Brugia malayi*. B-cell epitopes of BmG3PD were probably at or adjacent to 22-36, 242-255, 303-318 and 326-336 in its amino acid sequence.

【Key words】 *Brugia malayi*; G3PD; Gene cloning; Sequence analysis; B-cell epitope

Supported by the Social Progression Fund of Jiangsu Province (No. BS2006522)

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

基金项目: 江苏省社会发展科技计划项目 (No. BS2006522)

作者单位: 南通大学医学院寄生虫学教研室, 南通 226001 \* 通讯作者, E-mail: fznt@163.com

丝虫病对人类危害较大,全世界丝虫病患者约 1.2 亿,为全球致残的第二大病因,每年因此损失达数十亿美元<sup>[1,2]</sup>。3-磷酸甘油醛脱氢酶 (G3PD) 广泛存在于原核和真核生物,在糖代谢中有重要作用。研究表明, G3PD 具有较显著的免疫原性,可产生一定的保护作用<sup>[3,4]</sup>。本实验体外扩增周期型马来丝虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (BmG3PD 基因),并对其编码产物的 B 细胞表位进行预测,结果报告如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物和主要试剂** 周期型马来丝虫感染的沙鼠模型由大连医科大学实验动物中心提供。焦碳酸二乙酯 (DEPC) 为美国 Sigma 公司产品,总 RNA 提取试剂 Trizol 及第 1 链 cDNA 合成试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品。Taq DNA 聚合酶、Xho I 和 EcoR I 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、DNA 标志物及 PCR 纯化试剂盒,均为日本 Takara 公司产品。pGEM-T 载体为美国 Promega 公司产品, E. coli DH5 $\alpha$  为本实验室保存。猴肾成纤维细胞系 COS-7 (COS-7 细胞) 由南通大学生物化学教研室惠赠。

**1.2 引物设计** 根据 GenBank 中已知 BmG3PD 基因序列 (登录号为 U18137) 设计 1 对引物,在每条引物的 5' 端分别引入 EcoR I 和 Xho I 酶切位点及保护性碱基。上游引物为 5'-CC GAA TTC ATT ATG AGC AAA CCA AAG G-3', 其中 GAA TTC 为 EcoR I 酶切位点, ATG 为起始密码子。下游引物为 5'-CC CTC GAG TTT ATC TGC TGG CAA T-3, 其中 CTC GAG 为 Xho I 酶切位点,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

**1.3 虫体收集和总 RNA 测定** 以 5 ml 灭菌生理盐水冲洗阳性长爪沙鼠腹腔,收集腹腔液,用平皿孵育法收集周期型马来丝虫微丝蚴。按试剂盒说明提取总 RNA,待其沉淀干燥后,加入 DEPC (密度为 1.12 g/ml) 30  $\mu$ l 溶解,用紫外分光光度计检测其吸光度 ( $A_{260}$  和  $A_{280}$  值),计算其浓度和纯度。

**1.4 目的基因克隆及鉴定** RT-PCR 扩增目的基因,反应总体积为 25  $\mu$ l,反应条件为 95  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 57  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经纯化与酶切,再用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。将目的基因和 pGEM-T 载体于 4  $^{\circ}$ C 连接过夜,制备感受态细胞大肠埃希菌 (E. coli) DH5 $\alpha$ ,将连接物转染细胞,再将培养物涂于 LB 平板 [平板上含有异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷 (X-gal) 和氨苄西林 (Amp)], 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。自 LB 平板挑取单个白色菌落接种于液体培养基 (含 Amp), 37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。用碱裂解法提取所筛质粒 DNA (pGEM-BmG3PD), 对质粒进行 EcoR I 和 Xho I 双酶切, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

**1.5 目的基因序列分析** 取目的基因 T-A 克隆的阳性重组子——重组质粒 pGEM-BmG3PD, 送上海生工生物工程有限公司测序。并将测序结果进行同源性分析和推导其编码的氨基酸序列。

**1.6 BmG3PD 蛋白 5 种参数及其二级结构预测** 采用 Hopp 和 Woods 亲水性参数、Emini 表面可及性参数、Jameson-Wolf 抗原性参数、Zimmerman 极性参数和柔韧性参数进行预测<sup>[5-8]</sup> (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>), 以及应用 EXPASY 服务器上的 SOPMA、GOR、nnPredict、HNN 和 EMBOSS 程序

分析预测 BmG3PD 的二级结构。将上述方法互相参照和综合分析比较,兼顾各预测参数,推断其 B 细胞识别的表位。

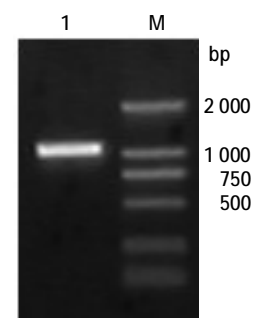
**1.7 表达产物分析** 构建真核表达载体,抽提重组质粒 pcDNA3.1 (+)/BmG3PD, 转染对数生长期的 COS-7 细胞。置 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 60 h, 用空载体对照细胞和未转染的 COS-7 细胞作为对照。转染后培养 60 h, 收集细胞,提取总 RNA, 并进行 RT-PCR 验证。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析和鉴定表达产物。

## 2 结 果

**2.1 总 RNA 浓度测定和 BmG3PD 基因片段扩增** RNA 提取后经甲醛变性电泳分析, 28 S 和 18 S rRNA 条带清晰。  $A_{260}/A_{280}$  为 1.801, RNA 浓度为 854  $\mu$ g/ml。RT-PCR 扩增目的基因片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 显示 1 条约 1 020 bp 的特异性条带, 与预期值相符 (图 1)。

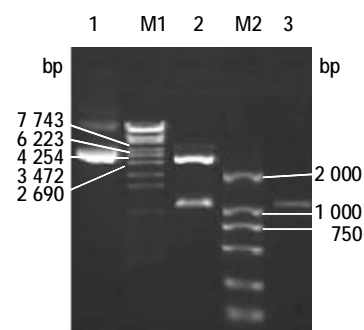
**2.2 重组质粒 pGEM-BmG3PD 酶切鉴定** 阳性重组质粒 pGEM-BmG3PD 经 EcoR I 与 Xho I 双酶切和 PCR 扩增, 均出现约 1 020 bp 的特异性条带 (图 2)。

**2.3 BmG3PD 基因序列分析** 对重组质粒 pGEM-BmG3PD 中的目的基因进行序列分析, 其全长为 1 020 bp, 含完整的开放阅读框, 编码 339 个氨基酸。与 GenBank 中 BmG3PD 基因序列进行 Blast 比较, 其同源性为 99%, 仅第 628 (T/C)、683 (G/A)、709 (A/T)、792 (G/A)、828 (G/A) 及 904 (T/G) 位共 6 个碱基不同; 而推导的氨基酸顺序, 仅第 210 (M/T)、237 (K/F) 和 302 (S/A) 位 3 个氨基酸不同, 分别是由第 628、709 和 904 位上的碱基改变所引起。



M: DNA 标志物, 1: BmG3PD 基因。

图 1 BmG3PD 基因 RT-PCR 琼脂糖凝胶电泳

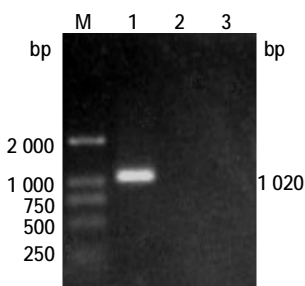


M1 和 M2, DNA 标志物, 1: pGEM 空质粒, 2: pGEM-BmG3PD 双酶切, 3: pGEM-BmG3PD。

图 2 重组质粒 pGEM-BmG3PD 双酶切电泳分析

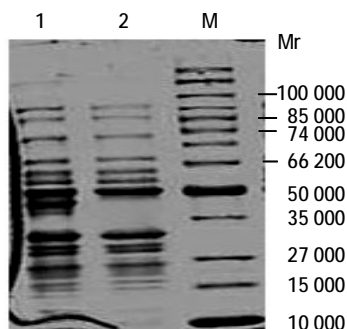
2.4 BmG3PD 抗原 B 细胞表位预测及其抗原性 对 BmG3PD 的二级结构预测,提示其中的柔性区域以无规则卷曲为主,少见  $\beta$ -转角。其无规则卷曲主要位于 N 端 9~15、31~37、54~58、82~93、127~133、186~196、204~217、248~259、290~296 和 309~321 区段。这些柔性区域多出现在蛋白表面,因为是突出结构,利于与抗体嵌合,成为抗原表位的可能性较大。各参数预测结果显示,其预测的抗原表位的数目和抗原表位出现的肽段可有所不同,但氨基酸序列片段 22~36(AVEKDTVDDVAVN DP)、242~255(TPDVSVVLDLTCRLQ)和 303~318(LACISLNPNF VKLIAW)、326~336(SNRVVDLISYI)则与多种预测方法的预测结果基本一致,且抗原性指数均较高。综合以上多种预测方法的结果,显示 B 细胞表位可能位于此 4 个区段内或其附近。

2.5 表达产物分析 结果表明,转染的 COS-7 细胞高水平表达 BmG3PD 的 mRNA,而未转染的 COS-7 细胞及空质粒对照细胞均未检测到 BmG3PD mRNA 的表达(图 3)。SDS-PAGE 结果显示,转染的 COS-7 细胞裂解后在约 Mr 43 000 处见特异条带,而空质粒对照细胞无此条带(图 4)。



M: DNA 标志物, 1: pcDNA3.1(+)/BmG3PD 转染的 COS-7 细胞, 2: COS-7 细胞, 3: pcDNA3.1(+)/转染的 COS-7 细胞。

图 3 转染 COS-7 细胞 RT-PCR 凝胶电泳



M: 蛋白质标志物, 1: pcDNA3.1 (+) /BmG3PD 转染的 COS-7 细胞, 2: pcDNA3.1 (+) 转染的 COS-7 细胞。

图 4 重组蛋白 BmG3PD 的 SDS-PAGE 分析

### 3 讨论

丝虫的生活史及抗原成分复杂,寻找有效疫苗抗原分子一直是免疫预防丝虫病研究工作的重点<sup>[9]</sup>。抑制寄生虫所依赖的生物合成旁路中的某些关键酶活性,是研制抗寄生虫药物的一种有效策略。G3PD 具有催化甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化,使其生成 1,3-二磷酸甘油酸。哺乳动物的 G3PD 除具有酶活性外,

还参与膜转运、微管装配、核 RNA 转运,甚至基因表达的翻译调控等过程<sup>[10,11]</sup>。作为生物体糖酵解过程中的一个重要酶,在人体寄生原虫(如利什曼原虫、恶性疟原虫)和锥虫的酶和基因均有一些研究,并为开展 G3PD 分子疫苗和药物研究提供了重要的参考资料<sup>[12]</sup>。本实验克隆的 BmG3PD 基因与 GenBank 中已知基因序列同源率为 99%。其中有一些差异,可能与不同地域马来丝虫株型间基因多态性有关,需进一步研究。

B 细胞表位是抗原中可被 B 细胞受体或抗体特异性识别,并互相结合的线性片段,或空间构象性结构。B 细胞表位的研究可帮助研究者进行相关疫苗的设计、抗原表位的筛选,提高成功率。准确预测 B 细胞表位,有助于基础免疫学研究、疫苗和抗体的研究与开发,以及疾病预防和诊断。

### 参 考 文 献

- [1] Dean M. Lymphatic filariasis: The Quest to Eliminate a 4000-years-old Disease[M]. London: Hollis Publishing Company, 2001: 1-111.
- [2] World Health Organization. Monitoring and epidemiological assessment of the programme to eliminate lymphatic filariasis at implementation level[R]. WHO/CDS/CPE/CEE/2005.50.
- [3] Waine GJ, Becker M, Yang W, et al. Cloning molecular characterization and function activity of Schistosoma japonicum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against Schistosoma japonicum[J]. Infect Immun, 1993, 61(11): 4716-4720.
- [4] Daubenberger CA, Polt-Frank F, Jiang G, et al. Identification and recombinant expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Plasmodium falciparum[J]. Gene, 2000, 246(1-2): 255.
- [5] Hopp TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1981, 78(6): 3824-3828.
- [6] Janin J. Surface and inside volumes in globular proteins [J]. Nature, 1979, 277(5696): 491-492.
- [7] Zimmerman JM, Eliezer N, Simha R. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods [J]. J Theor Biol, 1968, 21(2): 170-201.
- [8] Karplus PA, Schultz GE. Prediction of chain flexibility in proteins[J]. Immunology, 1985, 72(2): 212-216.
- [9] Chen Y, Fang Z, Huang WQ, et al. Construction of eukaryotic expression plasmids with paramyosin gene of periodic Brugia malayi [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25 (3): 250-252. (in Chinese)  
(陈阳, 方政, 黄为群, 等. 周期型马来丝虫副肌球蛋白基因真核表达重组质粒构建 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 250-252.)
- [10] Brode AE, Ree DJ. Reversible oxidation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cell by hydrogen peroxidase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 148(2): 120-125.
- [11] Kawamoto RM, Caswell AH. Autophosphorylation of glyceraldehydes phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes [J]. Biochem, 1996, 25 (4): 657-661.
- [12] Daubenberger CA, Tisdale EJ, Curcic M, et al. The N'-terminal domain of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the apicomplexan Plasmodium falciparum mediates GTPase Rab2-dependent recruitment to membranes[J]. Biol Chem, 2003, 384 (8): 1227-1237.

(收稿日期: 2008-07-25 编辑: 富秀兰)