

文章编号: 1000-7423(2011)-02-0081-06

【论著】

日本血吸虫金属蛋白酶基因的克隆和表达 及其对小鼠的免疫保护性研究

徐斌¹, 鞠川^{1,3}, 卢艳², 莫筱谨¹, 冯正¹, 许学年¹, 胡薇^{1*}

【摘要】 目的 克隆和表达日本血吸虫金属蛋白酶 (metalloprotease) 编码基因并纯化表达产物, 观察其在成虫体内定位及在小鼠的免疫试验。方法 根据表达序列标签 (EST) 测序的结果设计引物, 从含有金属蛋白酶基因的日本血吸虫 cDNA 克隆 (SJM2CFB04, 简称 SJB04) 中扩增得到该编码基因片段, 亚克隆至原核表达载体 pET28a 中表达, 应用组氨酸标签亲和层析法纯化表达产物, 蛋白质印迹 (Western blotting) 分析其免疫原性。应用间接免疫荧光法, 观察金属蛋白酶在血吸虫成虫体内的分布。将 18 只 C57BC/6 小鼠随机分成两组, 实验组用 SJB04 重组蛋白 (25 μ g/只) 免疫小鼠, 共 3 次, 每次间隔 2 周; 对照组用佐剂免疫 (50 μ l/只)。末次免疫后 2 周, 每鼠腹部感染 40 ± 2 条日本血吸虫尾蚴, 攻击后第 37 天起连续收集 6 d 小鼠粪便, 计算每克粪虫卵数和减卵率; 第 42 天剖杀小鼠, 门静脉灌注收集成虫并计算减虫率。结果 获得了 SJB04 基因 (ORF 528 bp) 的编码序列, 构建了原核表达载体, 并在大肠埃希菌中表达, 经组氨酸标签亲和层析法获得纯化重组蛋白 SJB04。免疫荧光法检测结果显示, SJB04 主要定位于日本血吸虫成虫的肠管表皮。Western blotting 分析结果显示, 该纯化重组蛋白 SJB04 能被感染兔血清和免疫兔血清识别, 在相对分子质量 (M_r) 29 800 处出现一清晰条带。用该纯化蛋白免疫 C57BC/6 小鼠后, 减虫率为 27.1%, 粪减卵率为 57.8%。结论 克隆获得的日本血吸虫 SJB04 重组蛋白主要定位于日本血吸虫成虫的肠管表皮, 该蛋白可明显减少感染日本血吸虫的 C57BC/6 小鼠的粪卵排出量。

【关键词】 日本血吸虫; 金属蛋白酶; 免疫保护力

中图分类号: R532.21, R392.11 文献标识码: A

Cloning and Expression of Metalloprotease Gene from *Schistosoma japonicum* and its Immunoprotective Efficiency

XU Bin¹, JU Chuan^{1,3}, LU Yan², MO Xiao-jing¹,
FENG Zheng¹, XU Xue-nian¹, HU Wei^{1*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Biotechnology School, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3 Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

【Abstract】 **Objective** To clone and express a metalloprotease gene of *Schistosoma japonicum*, purify the expressed protein, and investigate the induced immune response in mice and its localization in the parasite. **Methods** Specific primers were designed according to the EST sequence and used for amplification of the encoding sequence from the *S. japonicum* cDNA clone containing *S. japonicum* metalloprotease. The gene was subcloned into pET-28a plasmid and expressed, and the recombinant protein was purified with HisoTag affinity chromatography. Western blotting was used to analyze the immunogenicity. Eighteen C57BC/6 mice were divided into two groups. Mice in group A were immunized each with 25 μ g purified recombinant SJB04 at every 2 weeks for 3 times. Mice in group B received only adjuvant as control. Each mouse was challenged by (40 ± 2) cercariae at the third week after the last immunization. Fecal samples were collected for 6 days from 37th days after challenge. Eggs per gram feces and rate of egg reduction were calculated. *S. japonicum* adult worms were collected from infected mice, and used for preparing frozen sections and indi-

基金项目: 国家传染病科技重大专项 (No. 2009ZX1004-302); 国家高技术研究发展计划(863)项目 (No. 2007AA02Z153)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237; 3 华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079

* 通讯作者, E-mail: hubeixf@hotmail.com

rect immunofluorescence staining with specific polyclone antibody to *S. japonicum* metalloprotease. **Results** The metalloprotease gene Sjb04 was cloned, sequenced and expressed. The immuno-fluorescence localization showed that Sjb04 protein distributed mainly in the intestinal epithelium of the adult worm. The recombinant protein was specifically recognized by the *S. japonicum*-infected rabbit sera, showing that the expressed product possessed antigenicity. Mice immunized with the recombinant protein revealed a reduction in number of adult worms, eggs in feces by 27.1% and 57.8%, respectively. **Conclusion** The recombinant protein of *S. japonicum* metalloprotease has been obtained with M_r 36 500. The protein locates in the intestinal epithelium of adult worm. Immunization with the Sjb04 protein induces significant reduction of fecal eggs.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; Metalloprotease; Immune protection

Supported by the National Special Science and Technology Project for Major Infectious Diseases of China (No. 2009ZX1004-302) and the High-tech Research and Development Program of China (863)(No. 2007AA02Z153)

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

血吸虫病是一种影响人类健康和社会发展的重要寄生虫病,其最严重的病理变化是引起宿主肝组织内虫卵的沉积、诱发虫卵肉芽肿及其后的肝纤维化病变^[1],病变过程中主要与基质金属蛋白酶失衡导致的胶原沉积有关^[2]。目前,对于人源性的基质金属蛋白酶基因及其功能作了较深入的研究^[3-5],但有关对寄生虫的金属蛋白酶基因的研究报道较少。近年来,随着我国日本血吸虫基因组研究的开展,发现了众多新基因。本实验在进行大规模表达序列标签(EST)测序的基础上运用DNA重组技术,构建含日本血吸虫金属蛋白酶基因Sjb04的重组质粒pET-28a/Sjb04,转入大肠埃希菌表达,用纯化的重组Sjb04蛋白进行免疫保护试验,并对该蛋白在虫体内的分布进行研究。

材料与方 法

1 材 料

1.1 质粒和菌株 含日本血吸虫(Sj)金属蛋白酶基因(ORF 528 bp)序列的cDNA(GenBank 登录号为AY810171),pET28a质粒、大肠埃希菌JM109和BL21(DE3)菌株均由本实验室提供。

1.2 实验动物 雌性清洁级C57BL/6小鼠,4~6周龄,体重约为20g,购自中国科学院上海分院实验动物中心。日本血吸虫中国大陆株尾蚴由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所寄生虫病原与媒介生物学重点实验室提供。

1.3 主要试剂 *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(dNTPs)购自上海赛百胜生物有限公司,B型小量DNA片段快速胶回收试剂盒购自北京博大泰克生物有限公司,限制性内切酶*EcoR* I和*Xho* I购自美国NEB公司,日常型质粒DNA小量快速制备试剂盒购自中国杭州V-gene公司, T_4 DNA连接酶购自美国Promega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Amersia QIAGEN公司,福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂购自美国DIFICO公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG(HRP-IgG)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔IgG(FITC-IgG)均购自美国SIGMA公司。

2 方 法

2.1 Sjb04基因片段的克隆 根据含Sjb04基因的cDNA克隆的编码序列,应用Premier primer5软件分析设计1对特异性引物P1和P2,由上海生工生物工程有限公司合成。

P1: 5'-CGCGAATTCTTGGCAGCAGACGATCCCAA-3'

EcoR I酶切位点

P2: 5'-CCGCTCGAGCTTGGATGGTAATATTTAG-3'

Xho I酶切位点

其中引物P1为Sjb04基因5'端,引物P2为Sj metalloprotease基因3'端。

以日本血吸虫cDNA克隆SJM2CFB04为模板进行PCR扩增,反应总体积为25 μ l(包括模板2.5 μ l、引物P1和P2各1 μ l、10 mmol/L dNTP 1 μ l, 10 \times PCR缓冲液2.5 μ l、5 U/ μ l *Taq* DNA聚合酶0.5 μ l, MgCl₂ 0.75 μ l, 双蒸水15.75 μ l)。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取5 μ l PCR产物作1%琼脂糖凝胶电泳分析。用DNA片段快速胶回收试剂盒获得纯化PCR产物。

2.2 重组质粒pET-28a/Sjb04的构建 将纯化的PCR产物和质粒pET28a分别用限制性内切酶*EcoR* I和*Xho* I进行双酶切,酶切产物用DNA片段快速胶回收试剂盒纯化回收,再按5:1摩尔浓度比,用T₄ DNA连接酶连接纯化的目的基因片段和质粒pET28a,并将连接产物转化大肠埃希菌JM109株感受态细胞,以构建重组表达载体pET-28a/Sjb04。随

机挑取 pET-28a/SjB04 重组质粒的单菌落, 用微量质粒 DNA 抽提试剂盒进行质粒的抽提和纯化, 然后用 PCR、酶切和核苷酸序列分析方法对重组质粒 pET-28a/SjB04 进行鉴定。

2.3 SjB04 融合基因的原核表达 将抽提和纯化的 pET-28a/SjB04 重组质粒转化入大肠埃希菌 BL21 (DE3), 随机挑取 BL21(SjB04) 单菌落接种于含硫酸卡那霉素 (Kan) 抗性 (50 $\mu\text{g/ml}$) 的 LB 培养液 20 ml (50 $\mu\text{g/ml}$) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至吸光度 (A_{600} 值) = 0.6~0.8 时, 取 10 ml 分装 1 管并加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续震荡培养 4 h 后, 各取 1 ml 菌液 10 000 $\times g$ 离心 1 min, 收集菌体细胞, 加 50 μl PBS 悬浮菌体。取 10 μl 加入 1 \times 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS) 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 处理 5 min, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表达情况。电泳条件为浓缩胶 (5%) 80 V, 分离胶 (12%) 100 V。考马斯亮兰 (R250) 固定、染色, 乙醇-冰醋酸脱色。

2.4 SjB04 重组蛋白的制备与纯化 经鉴定表达蛋白为包涵体, 取含有重组质粒 pET-28a/SjB04 的表达菌株接种于 LB (含 Kan 抗性 50 $\mu\text{g/ml}$) 培养液中大量表达, 诱导表达后的菌液离心去除上清, 菌体细胞用适量 PBS 重悬, 反复冻融超声裂解, 高速离心, 弃上清, 加裂解缓冲液, 室温结合 1 h, 10 000 $\times g$ 离心 10 min, 保留上清, 用 Ni-NTA agarose 树脂亲和纯化目的蛋白。

2.5 SjB04 重组蛋白的蛋白质印迹 (Western blotting) 分析 取 SjB04 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 将目的蛋白电转移至硝酸纤维素 (NC) 膜, 采用 Western blotting 分别以纯化的重组蛋白免疫获得的兔血清、尾蚴感染 42 d 的兔血清和健康兔血清为一抗, 按 1:100 比例稀释, 以 HRP-IgG 抗体 (1:1 500) 作为二抗, 每次反应体积均为 500 μl , 进行检测分析。

2.6 小鼠免疫保护实验 将 4~6 周龄的 C57BL/6 小鼠 18 只分成两组 (每组 9 只), 实验组首次每鼠用纯化的 SjB04 重组蛋白 (25 μg) 与福氏完全佐剂等量混合后制成乳剂背部皮下多点注射, 2 周后用纯化的 SjB04 重组蛋白 (25 μg) 与福氏不完全佐剂 (50 μl /只) 混合乳化后背部皮下多点注射, 4 周后仅用纯化蛋白加强免疫 1 次。对照组用佐剂免疫 (50 μl /只)。6 周后两组每鼠分别腹部攻击感染 (40 \pm 2) 条日本血吸虫尾蚴。攻击感染后第 37 天开始收集小鼠粪便, 连续收集 6 d, 将收集的粪便称重, 用 0.9% 生理盐水浸泡、捣碎, 用 160 目和 260 目尼龙筛过滤, 收集虫卵混悬液, 取 100 μl 涂片后镜检全部虫卵数, 采用两人盲法

计数, 每人镜检 3 张涂片, 计算每鼠的每克粪虫卵数的平均值, 并计算减卵率。至感染后第 42 天剖杀小鼠, 门静脉灌注收集成虫并计算减虫率; 同时取每鼠肝组织称重, 组织匀浆, 用 10% KOH 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 6 h, 取 100 μl 涂片后镜检全部虫卵数, 计数方法等同上。减虫率及肝脏和粪便的减卵率计算公式^[6]: 减虫率 = $[1 - (\text{免疫组平均虫数} / \text{对照组平均虫数})] \times 100\%$, 减卵率 = $[1 - (\text{免疫组平均每克肝组织 (粪便) 卵数} / \text{对照组平均每克肝组织 (粪便) 卵数})] \times 100\%$ 。

2.7 间接免疫荧光法检测 SjB04 在成虫组织中的定位 新鲜的日本血吸虫成虫用聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物 (OCT) 包埋, 在 -18 $^{\circ}\text{C}$ ~ -30 $^{\circ}\text{C}$ 环境下制成 4~6 μm 厚的冰冻切片。按文献 [7] 方法进行间接免疫荧光试验, 分别用纯化的重组蛋白免疫的兔血清、健康兔血清为一抗, FITC-IgG 为二抗, 用荧光显微镜 (Leica, 美国) 观察结果, 并拍照。

2.8 生物信息学分析 蛋白质同源性分析, 在 GenBank 通过蛋白-蛋白序列比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中 blastn 进行。用 TM PRED 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析跨膜区, 用 SignalP3.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 预测蛋白是否含有信号肽, 用 SubLoc v1.0 软件 (<http://www.bioinfo.singhua.edu.cn/SubLoc/>) 预测蛋白亚细胞定位, 用 Scan-prosite 软件 (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>) 分析蛋白的功能位点。用 SOPMA 软件 (http://npsa-pbilibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白二级结构, 用 PHYLIP 软件构建日本血吸虫金属蛋白酶的进化树。

结 果

1 SjB04 基因的 PCR 扩增

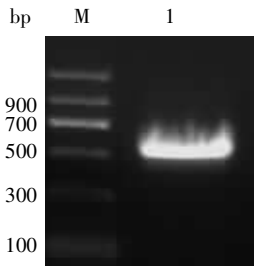
根据 SjB04 全长 ORF 设计一对内含 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点的引物, 以日本血吸虫 cDNA 克隆 (SJM2CF-B04) 为模板进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在约 500 bp 处显示 1 条清晰条带, 和预计的大小相一致 (图 1)。

2 重组质粒 pET-28a/SjB04 的构建与鉴定

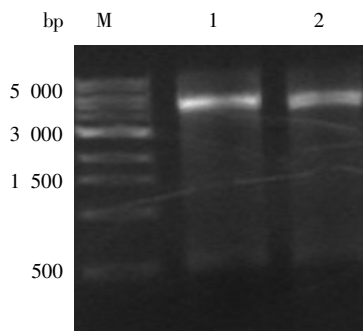
构建的重组质粒 pET-28a/SjB04 用特异性引物进行 PCR 扩增, 对阳性克隆进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。结果表明, PCR 扩增和双酶切均产生 1 条约 530 bp 条带, 与目的基因片段大小一致 (图 2)。

3 SjB04 融合基因的诱导表达和纯化

SDS-PAGE 结果显示, 在 M_r 31 000 处有一清晰



M: DNA 标志物; 1: 金属蛋白酶基因 PCR 产物。
 M: DNA marker; 1: PCR product of metalloprotease gene.
图 1 金属蛋白酶基因的 PCR 结果 (1%琼脂糖凝胶电泳)
Fig.1 PCR product of metalloprotease gene
 (1% agarose gel electrophoresis)

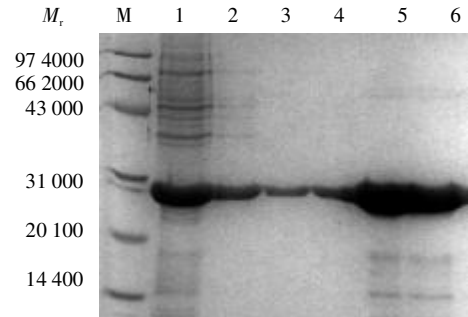


M: DNA 标志物; 1,2: pET-28a/SjB04 重组质粒的双酶切。
 M: DNA marker; 1,2: Recombinant pET28a/SjB04 digested with *EcoR*I and *Xho*I.
图 2 pET-28a/SjB04 重组质粒双酶切鉴定
Fig.2 Identification of the recombinant pET-28a/SjB04
 digested with *EcoR*I and *Xho*I

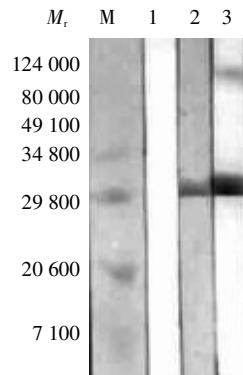
条带, 与 SjB04 重组蛋白的理论相对分子质量相符。融合蛋白大部分以包涵体形式存在。用 Ni-NTA agarose 树脂亲和层析法纯化 SjB04 重组蛋白, 经 SDS-PAGE 分析, 获得了纯化的重组蛋白(图3)。

4 SjB04 融合蛋白的 Western blotting 分析

Western blotting 分析结果显示, 在 M_r 29 800 处有明显条带, 表明纯化的重组蛋白可以与免疫兔血清、感染兔血清特异性 IgG 结合, 而与健康兔血清无反应, 证明该蛋白具有一定的免疫原性 (图 4)。



M: 蛋白质标志物; 1: 诱导后的 pET-28a/SjB04; 2~6: 纯化蛋白。
 M: Protein marker; 1: pET-28a/SjB04 with IPTG induction; 2-6: The elution of fusion protein.
图 3 纯化 pET-28a/SjB04 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein pET-28a/SjB04



M: 蛋白质标志物; 1: 健康兔血清; 2: 感染兔血清; 3: 免疫兔血清。
 M: Protein marker; 1: Normal rabbit serum; 2: Infected rabbit serum; 3: Serum of immunized rabbit.
图 4 pET28a/SjB04 表达产物的 Western blotting 分析
Fig.4 Western blotting analysis for the expressed product from the recombinant pET28a/SjB04

5 小鼠免疫保护实验

C57BC/6 小鼠免疫保护实验结果显示, 免疫组减虫率为 27.1%, 肝组织减卵率为 16.2%, 粪减卵率为 57.8% (表 1)。

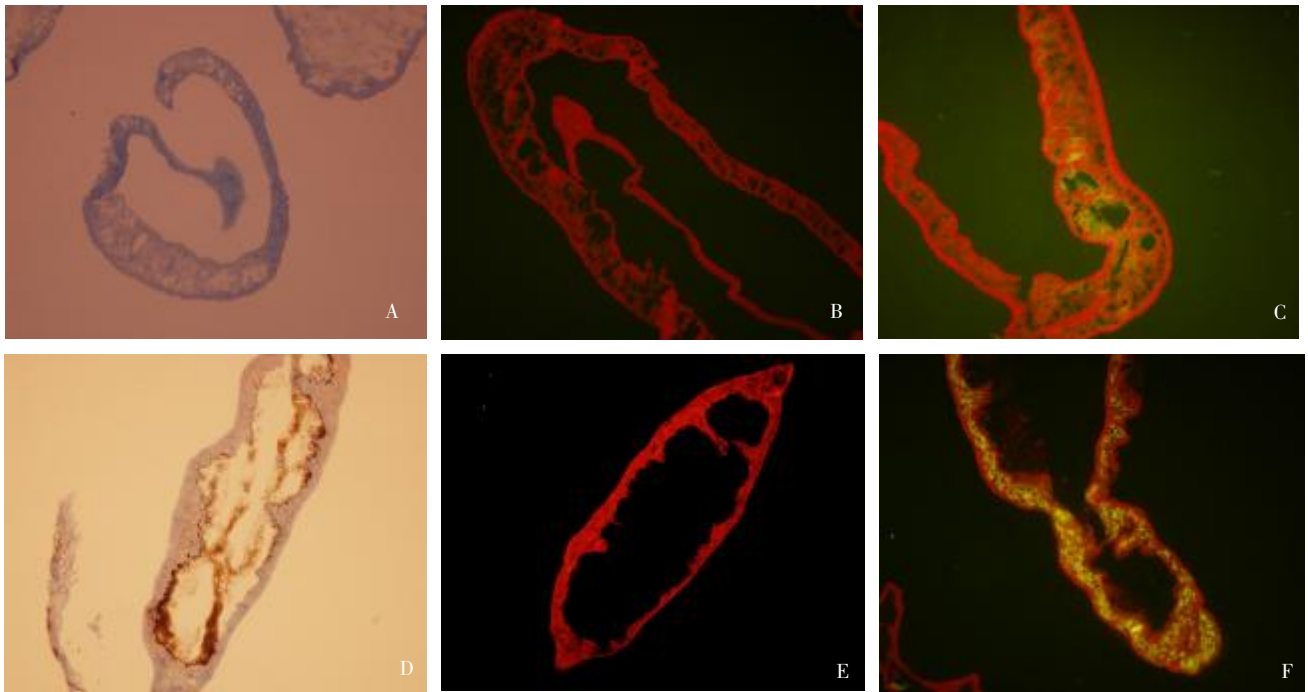
6 SjB04 在日本血吸虫成虫中的组织定位

间接免疫荧光定位结果显示, SjB04 主要分布在日本血吸虫成虫的肠管表皮, 特异性荧光较强, 呈线

表 1 日本血吸虫 SjB04 重组蛋白免疫小鼠的免疫效果
Table 1 Effect of immunization with Sj metalloprotease in mice

组别 Group	平均成虫数 Worm burden	减虫率 Worm reduction rate (%)	平均肝卵数* No. of EPG in liver ($\times 10^3/g$)	肝减卵率 Egg reduction rate (%)	平均粪卵数* No. of EPG in feces ($\times 10^3/g$)	粪减卵率 EPG reduction rate (%)
对照组 Control group	19.20±6.75		7.96±2.59		4.27±0.35	
实验组 Immunized group	14.00±1.09	27.1	6.67±1.67	16.2	1.80±0.46	57.8

* EPG 为每克粪(或肝)虫卵数。EPG: Number of eggs per gram feces or liver.



A: 光镜下雄虫阴性对照; B: 雄虫阴性对照; C: SJB04 在雄虫体内的定位; D: 光镜下雌虫阴性对照; E: 雌虫阴性对照; F: SJB04 在雌虫体内的定位。

A: Male negative control under light microscope; B: Male negative control; C: Localization of the SJB04 protein in adult male; D: Female negative control under light microscope; E: Female negative control; F: Localization of the SJB04 protein in adult female.

图 5 间接免疫荧光对 SJB04 在日本血吸虫成虫体内的定位 (×20)

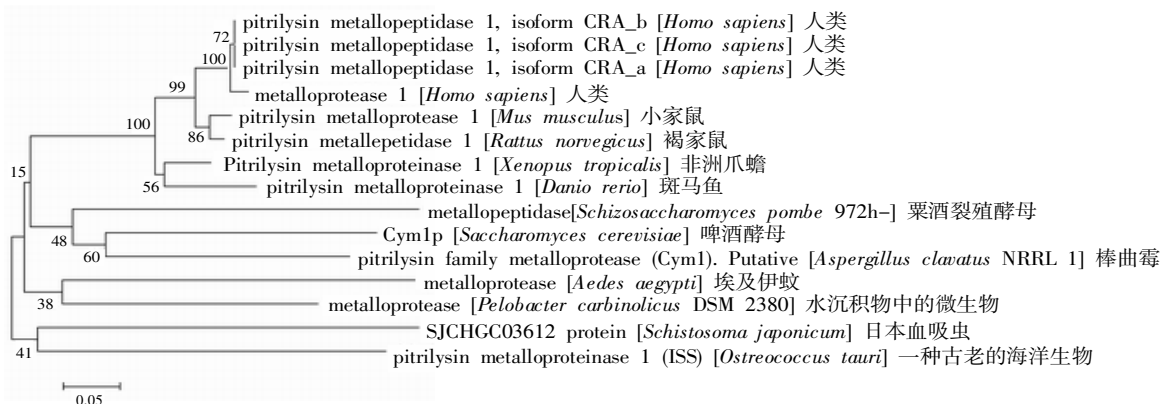
Fig.5 Localization of SJB04 in *S. japonicum* adult worm by indirect immunofluorescence method (×20)

状分布; 阴性对照未见荧光分布 (图 5)。

7 生物信息学分析结果

含日本血吸虫金属蛋白酶基因的 cDNA 序列全长为 881 bp, 经 ORF 分析阅读框架, 共 528 bp 编码 176 个氨基酸。等电点为 6.07, 理论 M_r 为 26 500。经氨基酸序列比对 (blastn), SJB04 属于蛋白酶 pitrilysin 亚家族的成员, 与已知的如非洲爪蟾 (登录号为 AA154674)、沟鼠 (登录号为 NP_001100833) 等的

pitrilysin 金属蛋白酶的核苷酸序列一致性达 62%, 通过进化树分析, 显示它只与一种名为 *Ostreococcus tauri* 的古老的海洋最小生物有 41% 的相似 (图 6)。生物信息学分析预测 SJB04 编码蛋白的亚细胞定位于细胞质中, 不含有信号肽, 在第 54~74 氨基酸位含有一个跨膜螺旋区 (score=497), 由 20 个氨基酸构成。二级结构预测该蛋白 α 螺旋占 38.2%、无规卷曲占 38.76% 和 β 折叠占 8.43%。



注: Pitrilysin metallopeptidase 1 为蛋白酶 pitrilysin 亚家族的成员。

图 6 日本血吸虫金属蛋白酶同系物的进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of *S. japonicum* metalloproteinase homologous proteins

讨 论

由于酶在血吸虫的生长、发育和繁殖过程中起着重要的作用，对血吸虫酶学的深入研究将有助于发现新的抗寄生虫因子、发展新的抗血吸虫药物和筛选有效的疫苗候选抗原基因等。近年来，对参与血吸虫生命过程（主要是三大物质代谢）的重要酶类进行了许多深入研究。但是在血吸虫代谢过程中有一类蛋白酶——金属蛋白酶，目前在寄生虫领域中研究较少。

金属蛋白酶是一类以金属离子作为辅基的蛋白酶，存在于血吸虫生活史各阶段的一种亮氨酸氨基肽酶，尤其是在启动虫卵孵化中起重要作用^[8]。Day 等^[9]利用锌螯合型金属蛋白酶抑制剂 1,10-邻二氮杂菲(phenanthroline)，通过体外和体内试验证明曼氏血吸虫成虫存在起重要作用的金属蛋白酶。袁仕善等^[10]用明胶-SDS-PAGE 分离日本血吸虫成虫肠道内容物，将电泳后的凝胶于不同 pH 缓冲液和酶抑制剂中孵育，对其中的金属蛋白酶进行分析和鉴定，显示日本血吸虫成虫肠道内容物中存在金属蛋白酶。该结果与本研究获得的日本血吸虫金属蛋白酶在日本血吸虫成虫中的组织定位的结果相一致。Etges 等^[11]认为这种功能保守的金属蛋白酶与寄生虫对哺乳动物宿主的感染无关，但对虫体在宿主体内的存活起作用。这些研究表明，金属蛋白酶对寄生虫的存活起重要作用，但其作用机制尚不清楚。

虽然日本血吸虫金属蛋白酶在血吸虫中的功能还不能确定，但应用纯化蛋白质研究该酶的生理功能、活性及应用其制备特异性抗体将有助于探索其在血吸虫营养、代谢和致病中的作用。本研究在大规模 EST 测序的基础上，以日本血吸虫 cDNA 克隆为模板，通过特异性扩增获得了 528 bp 大小的金属蛋白酶基因的编码序列，并成功采用大肠埃希菌系统表达该基因，用免疫亲和层析法获得了纯化的重组抗原。通过对其进行序列分析和功能位点的预测，发现该蛋白含有 2 个 N-糖基化位点、2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、2 个 N-豆蔻酰化位点位点和 1 个羧基端前导信号位点。

利用纯化蛋白制备的特异性多抗进行 Western blotting 分析，结果显示该蛋白有较强的免疫原性。该纯化蛋白免疫小鼠，减虫率为 27.1%，粪减卵率 57.8%。特别引起注意的是用日本血吸虫金属蛋白酶基因的表达产物主动免疫可明显减少感染小鼠粪虫卵的排出。由于血吸虫虫卵是血吸虫病的致病源，由宿主肠组织脱落的虫卵随粪便排出体外是造成血吸虫病再传播的主要因素。周晓钟^[12]指出血吸虫病的主要传

染源是家畜，应用数学模式研究的结果表明，耕牛是湖沼区血吸虫病的主要传染源，占传播来源的 70%~90%^[13]。因此，牛用疫苗结合化疗可能降低血吸虫病的传播。SjB04 蛋白的免疫效果及其作为牛用疫苗候选抗原的应用前景值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sidner RA, Carter CE, Colley DG. Modulation of *Schistosoma japonicum* pulmonary egg granulomas with monoclonal antibodies [J]. Am J Trop Med Hyg, 1987, 36(2): 361-370.
- [2] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis with special reference to the role of matrix metalloproteinases[J]. Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(suppl): D26-D32.
- [3] Chen F, Cai W, Chen Z, et al. Dynamic changes in the collagen metabolism of liver fibrosis at the transcription level in rabbits with schistosomiasis japonica[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(11): 1637-1640.
- [4] Vaillant B, Chiamonte MG, Cheever AW, et al. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases[J]. J Immunol, 2001, 167(12): 7017-7026.
- [5] Gomez DE, de Lorenzo MS, Alonso DF, et al. Expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis[J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 61(1): 9-13.
- [6] Huang FS, Yi XY, Zeng XF, et al. Intranasal or intragastric vaccination of mice with recombinant *Schistosoma japonicum* ferritin induces immunoprotection against challenge infection [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(1): 37-41. (in Chinese) (黄复深, 易新元, 曾宪芳, 等. 重组日本血吸虫铁蛋白粘膜免疫诱导小鼠保护力的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(1): 37-41.)
- [7] Liu QZ, Shen JL, Wang XL. Immunolocalization of the signaling protein 14-3-3 of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2003, 21(6): 330-332. (in Chinese) (刘庆中, 沈继龙, 汪学龙. 日本血吸虫信号蛋白 14-3-3 的虫体免疫定位[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2003, 21(6): 330-332.)
- [8] Liu WQ, Li YL. The study progress of enzymes in *Schistosoma*[J]. Foreign Med Sci Parasit Dis, 2001, 28(5): 198-202. (in Chinese) (刘文琪, 李雍龙. 血吸虫酶类研究进展[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2001, 28(5): 198-202.)
- [9] Day TA, Chen GZ. The metalloproteinase inhibitor 1,10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability[J]. Parasitology, 1998, 116(Pt4): 319-325.
- [10] Yuan SS, Yi XY, Zeng XF, et al. Identification of metalloproteinase in intestinal contents of adult *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20(5): 298-301. (in Chinese) (袁仕善, 易新元, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫成虫肠道内容物中金属蛋白酶的鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20(5): 298-301.)
- [11] Etges R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*[J]. Acta Trop, 1992, 50(3): 205-217.
- [12] Zhou XZ. Distribution and control of schistosomiasis in China[J]. J Anhui Agri Sci, 2007, 35(12): 3766-3768. (in Chinese) (周晓钟. 我国血吸虫病的分布及防治[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(12): 376-3768.)
- [13] Guo JG, Li YS, Darren G, et al. A drug-based intervention study on the importance of buffaloes for human *Schistosoma japonicum* infection around Poyang Lake, People's Republic of China [J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 74(2): 335-341.

(收稿日期: 2010-12-19 编辑: 盛慧锋)