

细粒棘球蚴原头蚴包囊和原头蚴成虫抑制差减杂交文库中差异表达基因的筛选及分析

赵莉^{1#}, 石保新^{1#}, 李军³, 张壮志¹, 马正海², 张旭¹, 薛晶¹, 金映红¹, 张文宝^{3*}

(1. 新疆畜牧科学院兽医研究所, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆大学生命科学与技术学院重点实验室, 乌鲁木齐 830046; 3. 新疆医科大学第一附属医院医学研究中心, 新疆包虫病基础医学重点实验室, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 细粒棘球蚴原头蚴(PSC)具有双向发育的特点, 本文旨在利用 SSH 和生物信息学方法筛选原头蚴包囊(CW)和成虫(AW)特异性的基因。将 PSC-CW 和 PSC-AW 双相发育差减 cDNA 文库的差减 PCR 产物克隆入 pGEM-T 载体并测序, 利用 CAP3 sequence assembly 在线软件、Blast2GO 软件与 GenBank 数据库对测序结果进行分析, 筛选原头蚴成囊和成虫特异性的基因, 并探讨这些基因的功能。结果显示: 对 PSC-CW 和 PSC-AW 文库进行扩增, 分别得到 280 和 200 个阳性克隆, 菌落 PCR 鉴定结果表明, 这些克隆均插入 200~1 000 bp 片段。测序结果显示从 PSC-CW 和 PSC-AW SSH 文库中分别得到 16 和 10 个特异性基因。其中 PSC-CW SSH 文库中得到 4 个出现频率较高的基因, 其余 12 个基因仅出现 1 次, 其中 5 个为未知基因, 已知基因分别编码细胞色素 C 氧化酶 I、热休克蛋白 70 和铁蛋白等功能蛋白质。PSC-AW SSH 文库中得到 10 个基因, 其中 2 个出现频率较高基因, 8 个基因仅出现 1 次, 4 个为未知基因, 6 个已知基因分别编码基质蛋白 1、延伸因子 1 α 和脂肪酸结合蛋白等功能蛋白质。本研究筛选获得原头蚴成囊和成虫发育时差异表达的基因, 对这些基因的功能进行分析表明, PSC-CW SSH 文库中多是与营养和能量转运功能的相关基因, 而 PSC-AW SSH 文库中多为发育与分化相关的基因, 这些基因的差异表达可能与原头蚴处于不同的生长环境和发育方向有关, 同时也为棘球蚴病免疫诊断、药物筛选和疫苗研制提供候选基因。

关键词: 细粒棘球蚴; 抑制差减杂交; 特异性基因

中图分类号: S852.734

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)07-1215-09

The Screening and Analysis of Differentially Expressed Genes in Suppression Subtractive Hybridization Library with either Cyst (CW) or Adult Worm (AM) Development from *Echinococcus granulosus* Larval Protoscolex (PSC)

ZHAO Li^{1#}, SHI Bao-xin^{1#}, LI Jun³, ZHANG Zhuang-zhi¹, MA Zheng-hai², ZHANG Xu¹, XUE Jing¹, JIN Ying-hong¹, ZHANG Wen-bao^{3*}

(1. *Veterinary Research Institute of Animal Science Academy of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China*; 2. *Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China*; 3. *Xinjiang Hydatid Fundamental Medical Key Lab, First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China*)

Abstract: According to the bidirectional development of the protoscolex (PSC) of *Echinococcus granulosus*, the study was conducted to screen the specific genes of *E. granulosus* PSC development between a larval cyst and adult worm. The subtractive PCR products of the SSH library of

收稿日期: 2014-09-26

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项项目(201103008)

作者简介: 赵莉(1982-), 女, 江苏宿迁人, 硕士, 助理研究员, 主要从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: 82285053@qq.com; 石保新(1963-), 男, 河北馆陶人, 研究员, E-mail: 2423930978@qq.com。石保新与赵莉为同等贡献的第一作者

* 通信作者: 张文宝, 研究员, E-mail: wenbaozhang2013@163.com

E. granulosus PSC-adult (AW) and *E. granulosus* PSC-cyst (CW) were connected to the pGEM-T easy vector, and were cloned and sequenced. Totally, 280 and 200 clones were obtained from PSC-CW and PSC-AM libraries, respectively, with the length of fragments 200 to 1000 bp. The clones were sequenced. Sequence alignment analysis showed that these sequences belong to 16 and 10 gene clusters representing 16 and 10 unique genes from PSC-CM and PSC-AW libraries respectively. As the genes are specifically or differentially expressed during the development of PSC to either adult worm or cyst, they are important for the parasite development and differentiation, thus can be candidates for drug and vaccine development.

Key words: *Echinococcus granulosus*; suppression subtractive hybridization (SSH); the specific genes

细粒棘球绦虫,又称为包虫病,是由细粒棘球绦虫引起的一种严重的人畜共患病^[1]。细粒棘球绦虫原头蚴具有独特的双向性发育的能力,可以在中间宿主体内发育为包囊,进而完成生活史的无性繁殖(继发性感染),若中间宿主带包囊的脏器被终末宿主(犬等)采食,原头蚴在犬小肠中发育为细粒棘球绦虫成虫,这又构成了原头蚴有性繁殖(图1),若能寻找到相关的特异性基因,就可以切断其循环史。随着分子生物学技术的发展和寄生虫虫体发育学的深入认识,人们可以筛选出在虫体不同发育阶段特异性表达的基因,以研究这些基因在细胞分化过程中的作用及相互关系,为寄生虫病的免疫诊断、药物筛选和疫苗研制提供候选基因。抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是一

种高效鉴定和克隆差异表达基因的新技术^[2]。SSH在许多方面具有其独特的优越性:该方法操作简便、周期短,且阳性率高,达94%以上^[3],有利于快速建立基因表达图谱,从整体上了解生物(细胞)在特定时期或特定环境下的基因表达动态;该方法灵敏度高,可使低丰度的mRNA得以高于1000倍的富集,较其他方法更易于在转录水平上研究特定细胞或组织的基因表达差异^[4]。本研究利用细粒棘球绦虫生长发育的特殊生物学特点,以幼虫(原头蚴)双相发育为切入点。利用SSH分离原头蚴特异的成囊及成虫基因,并结合生物信息学(bioinformatics)技术对获得基因进行分析,以筛查细粒棘球绦虫双相发育相关基因,为研究细粒棘球绦虫双相发育现象奠定基础。

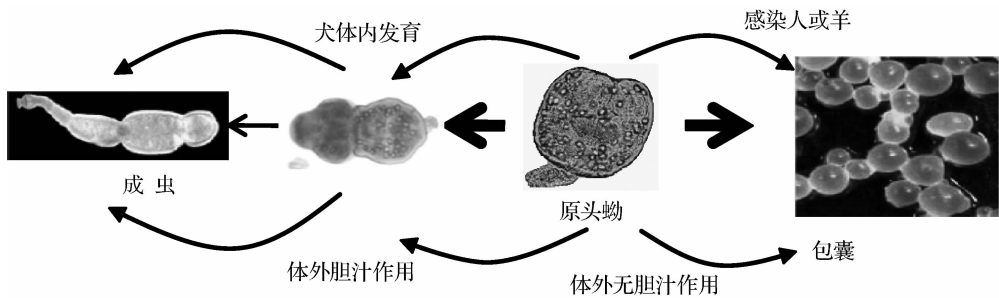


图1 细粒棘球绦虫原头蚴的双相发育

Fig. 1 Bidirectional development of the protoscolex of *E. granulosus*

1 材料与方法

试验于2009—2010年在新疆畜牧科学院兽医研究所完成。

1.1 SSH文库

1.1.1 PSC-CW SSH文库 以细粒棘球绦虫原头蚴为驱动相,包囊为实验相,构建的原头蚴包囊抑制差减杂交文库,由新疆畜牧科学院兽医研究所寄

生虫研究室提供。

1.1.2 PSC-AW SSH文库 以细粒棘球绦虫原头蚴为驱动相,成虫为实验相,构建的原头蚴成虫抑制差减杂交文库,由新疆畜牧科学院兽医研究所寄生虫研究室提供。

1.2 菌种和质粒

pGEM-T easy vector 购自 Promega 公司; pMAL-p2x 载体由本室保存,大肠杆菌 DH5 α 和

BL21 由本室保存。其他试剂均为国产分析纯产品。

1.3 生化及分子生物学试剂

PCR 片段回收试剂盒, 胶回收试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司; Ex Taq DNA 聚合酶、DNA marker、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 硝酸纤维素膜及 3 mm 滤纸均为德国 Whatman 公司产品; 其余常规试剂为国产分析纯试剂。

1.4 引物设计与合成

根据 pGEM T easy vector 载体序列合成以下引物, T7 primer: 5'-TAATACGACTCACTAT-AGGG-3'; M13 reverse primer: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3', 引物由上海生工公司合成。

1.5 目的片段与载体的连接反应

将原头蚴包裹和原头蚴成虫的 SSH 文库的 PCR 产物与 pGEM T 载体于 T₄ DNA 连接酶作用下, 4 °C 连接过夜, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂在含 Amp⁺ (75 μ g · mL⁻¹) 琼脂平板上, 37 °C, 正置 20 min 后, 倒置培养过夜。

1.6 SSH 文库的鉴定

用牙签挑取单菌落接入少量 LB 培养基 (Amp⁺) 中, 摇床振荡培养过夜, 取少量细菌为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增参数: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1

min, 共进行 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。在 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物后, 用 DNA 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行切胶纯化。

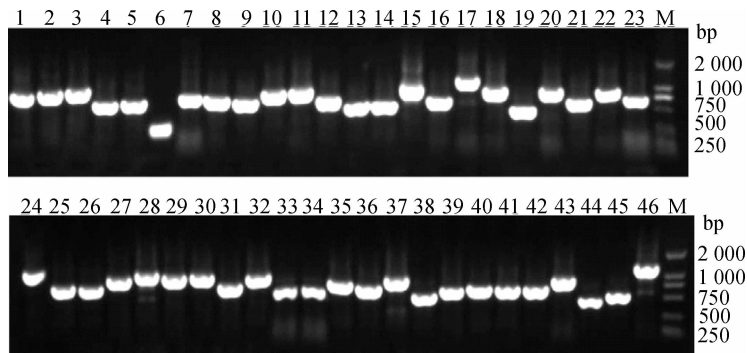
1.7 SSH 文库测序与序列分析

将菌落 PCR 扩增片段在 200~1 000 bp 的克隆分别挑选 100 个克隆送上海博尚生物有限公司进行测序。PSC-CW 和 PSC-AW SSH 文库测序成功的序列分别为 86 和 80 个序列。将测序结果去除载体和引物序列以后, 首先利用 CAP3 sequence assembly 在线软件对序列的正反向进行比对, 获得高表达基因和单一基因, 然后利用 BLAST2GO 在线软件与 GenBank 数据库进行同源序列比对分析和已知序列在生物学过程、分子功能和细胞组分方面所具有的功能。

2 结果

2.1 消减文库插入片段的 PCR 鉴定

将 PSC-CW 和 PSC-AW 文库的 PCR 产物分别插入 pGEM-T easy vector, 转化 DH5 α 感受态细胞, 分别得到 280 和 200 个阳性克隆, 以 pGEM-T easy vector 通用引物进行菌落 PCR 扩增, 均能扩增出大小不等的插入片段, 电泳结果显示插入片段大小主要分布在 200~1 000 bp, 这些条带可能代表差异表达的基因片段 (图 2、3)。



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1~46. cDNA 插入片段的 PCR 产物

M. DNA marker DL2000; 1-46. The PCR products of cDNA inserts

图 2 PSC-CW SSH 文库的部分 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR analysis of the PSC-CW SSH library

2.2 PSC-CW 文库的 cDNA 测序与序列分析初步结果

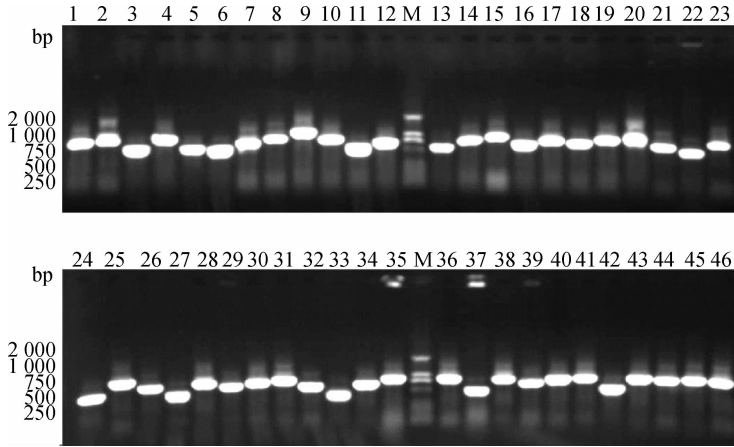
2.2.1 序列同源性比较 将文库送至上海博尚生物有限公司, 进行全文库单向测序。利用 CAP3 sequence assembly 在线软件进行正反向序列分析,

结果显示, 共获得 16 个基因, 其中有 4 个为出现频率较多基因, 12 个基因仅出现 1 次, 用 Blast2GO 在线软件与 GenBank 数据库进行同源性比较, 结果显示 11 个基因是已知基因, 5 个未知基因, PSC-CW 文库测序结果见表 1。

表 1 文库中扩增基因的分析

Table 1 The analysis of the clones of SSH library

文库 Library	序列名 Seq. name	序列描述 Seq. description	序列数 Number sequence	序列长度/bp Seq. length	比对的片段 Hits	最小 e 值 Min. e value	平均相似性/% Mean similarity
	EPCContig1	---NA---	67	663	0		
	EPCContig2	Cytochrome c oxidase subunit 1	2	217	20	2.13×10^{-37}	97.05
	EPCContig3	Probable plasmid replication initiation protein	2	1 137	20	3.83×10^{-38}	87.35
	EPCContig4	Heat shock protein 70	3	447	20	2.91×10^{-66}	93.10
	EPCc02	---NA---	1	552	0		
	EPCc06	Mitochondrial import inner Membrane translocase subunit tim8	1	320	20	3.86×10^{-18}	61.80
	EPCc09	---NA---	1	285	0		
	EPCd02	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	1	378	3	9.82×10^{-6}	64.33
	EPCe06	Ribosomal protein x-linked	1	406	20	2.38×10^{-52}	86.95
	EPCe07-2	Charged multivesicular body protein 4b	1	557	9	1.87×10^{-7}	62.00
	EPCe08	40s ribosomal protein	1	399	20	1.37×10^{-31}	76.90
	EPCe12-2	Cytochrome c oxidase subunit iii	1	442	20	8.85×10^{-55}	83.30
	EPCf08	Ferritin	1	364	20	6.56×10^{-63}	80.75
	EPCf09	---NA---	1	355	0		
	EPCg04	---NA---	1	276	0		
	EPCg12	Ribosomal protein s10	1	251	20	1.81×10^{-12}	74.05
	Contig1	---NA---	69	1 000	0		
	Contig2	---NA---	3	596	0		
	PA5	Fatty acid binding protein	1	552	20	3.78×10^{-40}	76.80
	PA10	Nuclear elongation factor 1 alpha	1	368	20	7.20×10^{-65}	98.85
	PA51	PREDICTED;hypothetical protein [Nasonia vitripennis]	1	452	1	3.23×10^{-4}	54.00
	PA71	Matrix protein 1	1	631	20	4.35×10^{-24}	89.00
	PA82	Alkaline phosphatase	1	531	20	1.09×10^{-30}	56.40
	PA121	---NA---	1	649	0		
	PA126	Protein fam82b	1	590	20	3.15×10^{-25}	56.80
	PA180	---NA---	1	649	0		



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1~46. cDNA 插入片段的 PCR 产物

M. DNA marker DL2000; 1-46. The PCR products of cDNA inserts

图 3 PSC-AW 文库的部分 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR analysis of the PSC-AW SSH library

2.2.2 功能分析 对差异表达基因编码的蛋白质按照生物学过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组分 (cellular component) 水平进行功能分类分析。按生物学过程水平分析 (图 4), 其功能主要涉及细胞分化和凋亡 (GO: 0009987)、细胞内大分子等物质代谢 (GO: 0008152)、蛋白转运与定位 (GO: 0051179)、电子传递及细胞内环境调节 (GO: 0065007)、应激反应 (GO: 0050896) 以及编码细胞构成成分 (GO: 0016043) 等。在分子功能水平分析 (图 5), 它们主要具有核苷酸、阴离子、血红素等的结合能力 (GO: 0005488)、氧化还原酶类的催化活性 (GO: 0003824)、核糖体的组成成分 (GO: 0005198)、基质跨膜转运活性 (GO: 0005215) 和氢、铁等离子载体活性 (GO: 0009055) 等功能。按照细胞组分水平分析 (图 6), 这些基因编码蛋白能够构成细胞膜 (GO: 0005623)、线粒体、细胞质等器官 (GO: 0043226) 和细胞复杂的大分子物质等 (GO: 0032991)。

2.3 PSC-AW 文库的 cDNA 测序与序列分析初步结果

2.3.1 序列同源性比较 将文库送至上海博尚生物有限公司, 进行全文库单向测序扫描。根据 CAP3 sequence assembly 在线软件进行正反向序列分析, 结果显示, 共获得 10 个基因, 其中 2 个为出现频率较多的基因, 8 个基因仅出现 1 次, 用 Blast2GO 在线软件与 GenBank 数据库进行同源性比较, 结果显示 6 个基因是已知基因, 4 个未知基因, PSC-AW 文库测序结果列于表 1。

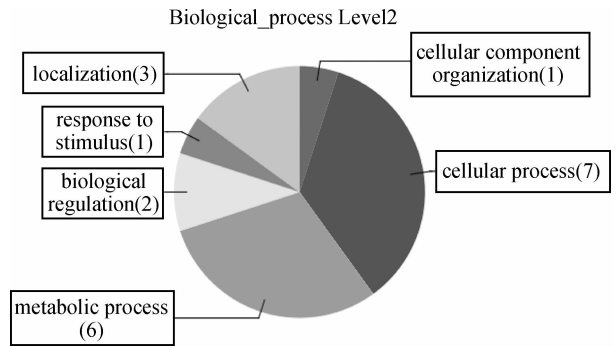


图 4 基于生物学过程水平对 PSC-CW 文库序列进行分析

Fig. 4 The analysis of the clone of the PSC-CW SSH library at biological process level

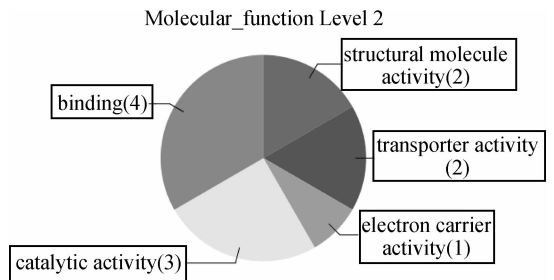


图 5 基于分子功能水平对 PSC-CW 文库序列的分析

Fig. 5 The analysis of the clone of the PSC-CW SSH library at molecular function level

2.3.2 功能分析 将上述已知序列在生物过程水平上进行分析 (图 7), 其编码的蛋白质涉及细胞大分子物质的合成等生物合成过程 (GO: 0009987)、细胞内大分子、蛋白质等的代谢过程 (GO: 0008152)、细胞营养成分转运等 (GO: 0051179)。在分子功能水平上进行分析 (图 8), 结果显示, 它们主

要具有核酸、脂质体等的结合作用(GO:0005488),水解酶活性(GO:0003824),RNA 构成活性(GO:0005198),翻译延伸因子的转运活性(GO:0005215)

Cellular_component Level 2

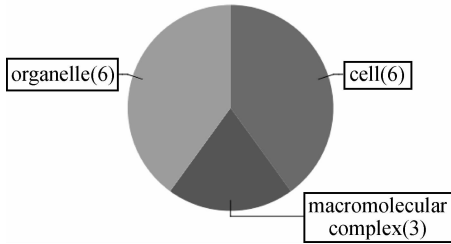


图 6 基于细胞成分水平对 PSC-CW 文库序列的分析

Fig. 6 The analysis of the clone of the PSC-CW SSH library at cellular component level 2

等功能。按照细胞组分水平分析(图 9),这些基因编码蛋白质可构成宿主细胞的细胞核(GO:0005623)、细胞膜(GO:0005576)等成分。

Biological_process Level 2

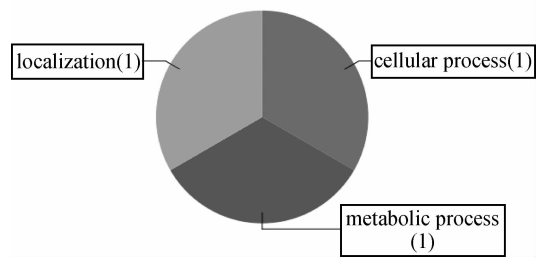


图 7 基于生物过程水平对 PSC-AW 文库序列进行分析

Fig. 7 The analysis of the clone of the PSC-AW SSH library at biological process level

Molecular_function Level 2

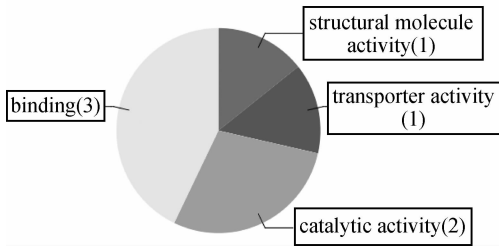


图 8 基于分子功能水平对 PSC-AW 文库序列进行分析

Fig. 8 The analysis of the clone of the PSC-AW SSH library at molecular function level

Cellular_component Level 2

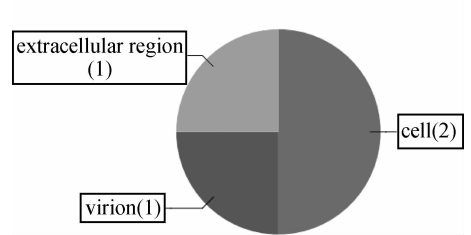


图 9 基于细胞成分水平对 PSC-AW 文库序列的分析

Fig. 9 The analysis of the clone of the PSC-AW SSH library at cellular component level

3 讨论

寄生虫的生活史比较复杂,需经过几个不同发育阶段来完成整个生命周期,每个阶段的虫体均有不同的形态结构和生理特点,需要不同的生活条件。因此,每个发育阶段都有其特异表达的基因。目前,已经发现了一些危害较为严重的寄生虫不同发育阶段的差异表达基因。细粒棘球绦虫的生长和发育是一个复杂的过程,存在 4 个发育阶段,包虫囊可大如西瓜、成虫(绦虫)细小而分节、原头蚴及虫卵期(六钩蚴)仅能借助于显微镜才能看到,它们的生长发育、形态、行为和对环境的需求方面都有很大程度的不同。其原头蚴和包囊是在羊等中间宿主体内生长发育的,而成虫和虫卵是在犬等终末宿主体内生长发育的。在实验室条件和自然宿主体内,诱导细粒棘球绦原头蚴分别向包囊和成虫方向分化生长,差异不显著。在中间宿主体内,原头蚴是在肝、肺等内脏器官中发育成包囊,而在终末宿主体内,原头蚴寄生在肠道。本研究在实验室条件下,利用培养基中

成分的不同,将原头蚴培养成包囊,同时,模拟犬肠道内环境,将原头蚴培养成成虫。但是细粒棘球绦原头蚴分别向包囊和成虫方向分化生长过程中出现的阶段性、差异性以及各发育阶段产生的特性的内在机制尚不清楚,有待进一步研究。

SSH 技术是 1996 年由 L. Diatchenko 等^[2]在抑制性 PCR 和 DNA 差减杂交方法的基础上,建立的一种分离和鉴定不同细胞或不同基因型差异表达基因和低丰度基因的方法。本实验室曾经进行过相关试验,但试验结果不理想,测序结果显示,大部分基因都是终末宿主犬体内的基因。在本研究中,首次以细粒棘球绦虫幼虫原头蚴为驱动相,分别以包囊和成虫为实验相,获得了 PSC-CW 和 PSC-AW 两个差减文库,继而将差异 PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上,对其进行测序和同源性分析。

对 PSC-CW 文库的测序结果进行初步分析(表 1),结果表明得到了 16 个基因序列,其中已知基因 11 个,出现频率较高的有 3 个基因,分别编码热休克蛋白 70(HSP70)、细胞色素 C 氧化酶 I 和类质

粒复制起始蛋白,其他基因均只出现过一次,分别编码线粒体蛋白、细胞色素 C 氧化酶 III、铁蛋白等功能和调控蛋白。其中,EPCf08 与编码铁蛋白的基因序列相似性为 80.75%,铁蛋白是原核生物和真核生物体内储存铁的一种蛋白质^[5]。EPCContig4 与编码热休克蛋白 70(HSP70)的基因序列相似性为 93.1%,HSP70 是细胞水平上的一种分子监控蛋白,参与蛋白质合成和细胞内囊泡的转折和装配^[6],而且此蛋白在许多原虫感染过程中具有很高的免疫原性^[7-9]。鉴于 HSP70 的功能,我们进行了克隆表达,进一步探讨其在包虫病防治方面可能的应用前景。EPCContig2,与编码细胞色素 C 氧化酶 I(*cox I*)的基因序列相似性为 97.05%,*cox I* 基因已被广泛用来区分扁形动物的种间界限和系统发育的亲合力,它在不同物种的分类和系统发育研究中具有重要意义^[9-12]。对于从形态学差异无法区分的物种,可通过 *cox I* 基因序列分析加以区分,并可从系统发育学的角度阐述这种物种的形成过程,可作为物种的基因标志^[13-15]。EPCc06,与编码线粒体内膜移位酶 *Tim8* 的基因序列相似性为 61.08%,线粒体内膜移位酶 *Tim8* 位于线粒体内膜,在部分营养成分进入线粒体的过程中起一定作用^[16-18]。

上述 PSC-CW 文库中的基因序列,从生物过程水平分析,基因序列 EPCf08 编码的蛋白质在细胞内有运输金属离子等功能,如运输铁离子等二价和三价无机阳离子,从而维持细胞内平衡。基因序列 EPCe12-2 编码的蛋白质在线粒体中具有运输 ATP、氧和铁离子等作用,在维持呼吸系统电子传递和磷酸化过程中起重要作用;基因序列 EPCContig2 编码细胞内氧化呼吸作用及代谢过程中能量产生所需的酶;基因序列 EPCc06 编码蛋白质导向和胞内蛋白转运相关的蛋白质;基因序列 EPCe06 e08 编码核糖体蛋白,在翻译及生物大分子的合成中起重要作用;基因序列 EPCContig4 编码的蛋白质能够调节生长素等激素的合成和代谢及对刺激物的反应。从细胞组分角度上,其大多基因编码的蛋白质参与合成线粒体、核糖体、细胞膜等生物器官。从分子功能上,其大多基因编码的蛋白与离子、氧、ATP 转运有关,以维持细胞生长和代谢,其中基因序列 EPCContig2 和 EPCe12-2 具有细胞色素 C 活性,编码运输阳离子的跨膜蛋白;基因序列 EPCf08 编码的蛋白质能转运铁离子等阳离子和氧;基因序列 EPCe06、EPCContig4 编码的蛋白质具有 RNA 结

合能力的结构分子。另外还有一部分克隆在 GenBank 中无法查到相对应的同源性基因,可能是一些新基因。

对 PSC-AW 文库的测序结果进行初步分析,得到 10 个基因,其中 6 个为已知基因,且都是出现频率较低的基因,分别编码脂肪酸结合蛋白、基质蛋白和碱性磷酸酶等。其中,PA5 与编码脂肪酸结合蛋白的基因序列相似性为 76.8%,脂肪酸结合蛋白接种动物后可诱导产生免疫保护^[19]。有报道称其能诱导动物产生抗血吸虫的免疫保护效果,能够作为预防血吸虫病的候选疫苗^[20]。在 C. T. Fonseca 等的研究中,脂肪酸结合蛋白能诱导小鼠产生免疫应答,在小鼠体内的荷虫量减少 24%~33%,肝中的虫体数量减少 27%~29%^[21]。PA10 与延伸因子 1 α (EF-1 α)的基因序列相似性为 98.85%,其在不同物种间具有高度保守性,可用于物种的种系发生分析,同时它还是一个多功能蛋白质,在翻译过程中起重要作用^[22-24]。以往确定细粒棘球绦虫的亚类主要根据线粒体基因^[25-30]。最近,研究者开始尝试用核酸延伸因子 1 α (EF-1 α)基因的序列和类型来区分细粒棘球绦虫亚型^[31-32]。M. Okamoto 等在细胞凋亡试验中发现 EF-1 在转录过程中起重要作用,并调节细胞凋亡^[32]。PA71 与编码基质蛋白 1 的基因序列相似性为 89%,基质蛋白 1 是细胞生长和发育过程中不可或缺的成分,它有诱导细胞分化的作用^[33]。根据生化过程水平的分析,PA5 与代谢产物的转运和细胞识别有关,PA10 在基因翻译和表达以及细胞内蛋白质等大分子的合成和代谢等过程中发挥作用。分子功能水平分析表明,PA5、PA10、PA71 和 PA82 能够编码一些调控蛋白,可调控信号转导或基因表达等过程。细胞成分水平分析表明,A10 为细胞质的组成成分,PA71 是细胞膜的组织成分。同样,PSC-AW 文库中也测得一些未知基因。

原头蚴通过无性繁殖发育成包裹,这是一个缓慢的发育过程,3~6 月才能发育成 0.5 cm 的包裹,原头蚴进入中间宿主绵羊等体内,寄生在宿主的肝、肺等脏器,从宿主体内获得营养成分,使自身得到繁殖,故需要营养转运和能量获取相关的蛋白质。本研究中,PSC-CW SSH 文库筛选出的基因大多能编码和调控转运营养和能量的功能性蛋白质,如 *cox I*、铁蛋白、*cox III* 和 *Tim8* 等,这与成囊期发育过程所需蛋白质相吻合。

原头蚴通过有性繁殖发育成成虫,原头蚴进入终末宿主犬等体内,寄生在小肠内,约 45 d 后,犬开始排泄虫卵,约 10 d 左右,大量虫卵都脱落了,故成虫发育较快,需要大量参与代谢的酶以及转运蛋白,同时也需要大量构成细胞的组分。我们的研究中,PSC-AW SSH 文库中筛选获得的基因主要参与生物发育与分化,可促进生物体的快速发育,这与成虫阶段的快速发育相一致。

参考文献(References):

- [1] MCMANUS D P, ZHANG W, LI J, et al. *Echinococcosis*[J]. *Lancet*, 2003, 362(9392):1295-1304.
- [2] DIATCHENKO L, LAU Y F, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(12):6025-6030.
- [3] GRUMOLATO L, ELKAHLOUN A G, GHZILI H, et al. Microarray and suppression subtractive hybridization analyses of gene expression in pheochromocytoma cells reveal pleiotropic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cell proliferation, survival, and adhesion[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6):2368-2379.
- [4] REBRIKOV D V, BRITANOVA O V, GURSKAYA N G, et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(20):E90.
- [5] ERSFELD K, CRAIG P S. Cloning and immunological characterisation of *Echinococcus granulosus* ferritin [J]. *Parasitol Res*, 1995, 81(5):382-387.
- [6] SHONHAI A, BOSHOF A, BLATCH G L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*[J]. *Protein Sci*, 2007, 16(9):1803-1818.
- [7] JENSEN A T, CURTIS J, MONTGOMERY J, et al. Molecular and immunological characterisation of the glucose regulated protein 78 of *Leishmania donovani* (1)[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1549(1):73-87.
- [8] JENSEN A T, ISMAIL A, GAAFAR A, et al. Humoral and cellular immune responses to glucose regulated protein 78- a novel *Leishmania donovani* antigen[J]. *Trop Med Int Health*, 2002, 7(5):471-476.
- [9] IWAGAMI M, MONROY C, ROSAS M A, et al. A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador [J]. *J Helminthol*, 2003, 77(1):33-38.
- [10] MORGAN J A, DEJONG R J, KAZIBWE F, et al. A newly-identified lineage of *Schistosoma* [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(9):977-985.
- [11] RAZO-MENDIVIL U J, LEÓN-RÉGAGNON V, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G. Description of two new species of Glythelminths Stafford, 1905 (Digenea: Macroderoididae) in *Rana* spp. from Mexico, based on morphology and mtDNA and rDNA sequences [J]. *Syst Parasitol*, 2004, 59(3):199-210.
- [12] RAZO-MENDIVIL U, ROSAS-VALDEZ R, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G. A new cryptogonimid (Digenea) from the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Osteichthyes: Cichlidae), in several localities of the Yucatán Peninsula, Mexico [J]. *J Parasitol*, 2008, 94(6):1371-1378.
- [13] LEÓN-RÉGAGNON V. Evidence of new species of *Haematoloechus* (Platyhelminthes: Digenea) using partial *cox1* sequences [J]. *Mitochondrial DNA*, 2010, 21(Suppl 1):12-17.
- [14] LANE N. Biodiversity: On the origin of bar codes [J]. *Nature*, 2009, 462(7271):272-274.
- [15] OGEDENGBE J D, HANNER R H, BARTA J R. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata) [J]. *Int J Parasitol*, 2011, 41(8):843-850.
- [16] KOEHLER C M, LEUENBERGER D, MERCHANT S, et al. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(5):2141-2146.
- [17] CURRAN S P, LEUENBERGER D, SCHMIDT E, et al. The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins [J]. *J Cell Biol*, 2002, 158(6):1017-1027.
- [18] BLACKSTONE C, ROBERTS R G, SEEBURG D P, et al. Interaction of the deafness-dystonia protein DDP/TIMM8a with the signal transduction adaptor molecule STAM1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(2):345-352.
- [19] BERGQUIST R, AL-SHERBINY M, BARAKAT R, et al. Blueprint for schistosomiasis vaccine development [J]. *Acta Trop*, 2002, 82(2):183-192.
- [20] CHUNCHOB S, GRAMS R, VIYANANT V, et al.

- Comparative analysis of two fatty acid binding proteins from *Fasciola gigantica* [J]. *Parasitology*, 2010, 137(12):1805-1817.
- [21] FONSECA C T, PACIFICO L G, BARSANTE M M, et al. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14 DNA vaccine alone [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(9-10): 2509-2516.
- [22] FAVRET C, VOEGTLIN D J. Speciation by host-switching in pinyon *Cinara* (Insecta: Hemiptera: Aphididae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 32(1): 139-151.
- [23] CHAVERRI P, BISCHOFF J F, EVANS H C, et al. *Regiocrella*, a new entomopathogenic genus with a pycnidial anamorph and its phylogenetic placement in the Clavicipitaceae [J]. *Mycologia*, 2005, 97(6): 1225-1237.
- [24] XIAO N, QIU J, NAKAO M, et al. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China [J]. *Int J Parasitol*, 2005, 35(6): 693-701.
- [25] NAKAO M, MCMANUS D P, SCHANTZ P M, et al. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes [J]. *Parasitology*, 2007, 134(Pt5): 713-722.
- [26] HÜTTNER M, NAKAO M, WASSERMANN T, et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* (Cestoda: Taeniidae) from the African lion [J]. *Int J Parasitol*, 2008, 38(7): 861-868.
- [27] THOMPSON R C, MCMANUS D P. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus* [J]. *Trends Parasitol*, 2002, 18(10): 452-457.
- [28] THOMPSON R C. The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus* [J]. *Exp Parasitol*, 2008, 119(4): 439-446.
- [29] SAARMA U, JÖGISALU I, MOKS E, et al. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence [J]. *Parasitology*, 2009, 136(3): 317-328.
- [30] BADARACO J L, AYALA F J, BART J M, et al. Using mitochondrial and nuclear markers to evaluate the degree of genetic cohesion among *Echinococcus* populations [J]. *Exp Parasitol*, 2008, 119(4): 453-459.
- [31] HAAG K L, GOTTSTEIN B, AYALA F J. The EG95 antigen of *Echinococcus* spp. contains positively selected amino acids, which may influence host specificity and vaccine efficacy [J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5362.
- [32] OKAMOTO M, NAKAO M, BLAIR D, et al. Evidence of hybridization between *Taenia saginata* and *Taenia asiatica* [J]. *Parasitol Int*, 2010, 59(1): 70-74.
- [33] NARAYANAN K, SRINIVAS R, RAMACHANDRAN A, et al. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(8): 4516-4521.

(编辑 白永平)