

# 日本血吸虫中国大陆株雌、雄成虫 cDNA 文库的构建

苑纯秀<sup>1</sup> 李 铭<sup>1</sup> 陈永军<sup>1</sup> 石耀军<sup>1</sup> 吴祥甫<sup>2</sup> 蔡幼民<sup>1</sup> 林矫矫<sup>1</sup>

( 中国农业科学院上海家畜寄生虫研究所 农业部动物寄生虫学重点开放实验室 上海 200232 )

( 中国科学院上海生物化学研究所 上海 200231 )

**摘 要** 用 TRIZOL 试剂盒分别提取日本血吸虫中国大陆株雌、雄成虫总 RNA ,Oligo( dT )纤维素柱纯化 mRNA ,反转录合成第一链 cDNA ,完成第二链 cDNA 合成后 ,凝胶电泳回收 500bp 以上的片段并过柱纯化后 ,与载体  $\lambda$ ZipLox 连接。体外包装后分别得到雌、雄成虫 cDNA 噬菌体表达文库。经测定雌、雄文库容量分别为  $3.74 \times 10^6$ 、 $3.28 \times 10^6$  ,重组比率均在 96% 以上 ,插入片段长度多在 1kb 左右。通过 PCR 技术 ,我们从文库中钓取到 EGP、23kD 膜蛋白、Actin 和 GCP 的 cDNA ,其中 GCP 基因为低丰度表达基因。各项指标表明 ,我们成功构建了高质量的 cDNA 文库 ,可作为研究雌雄成虫基因差异及筛选保护性抗原基因的重要资源。

**关键词** 日本血吸虫 雌、雄成虫 cDNA 文库

中图分类号 Q522 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0727-04

血吸虫病是一种严重危害人类健康的寄生虫病 ,流行于全世界 74 个国家。国内流行株为日本血吸虫中国大陆株。血吸虫生活史复杂 ,入侵机体后有一个从童虫到成虫、雌雄合抱、交配、受精、产卵的复杂发育过程。其虫卵沉积是引起血吸虫病严重病理损害的主要因素 ,随粪便排出的虫卵是造成环境污染的传染源。鉴于血吸虫的特殊发育、成熟特点 ,若能从血吸虫性别特异性方面入手 ,找出雌、雄虫遗传基因的差异 ,阻断其雌雄合抱、性成熟等 ,便可通过控制血吸虫的生殖来达到防治血吸虫病的目的。目前 ,国外学者已逐步深入研究血吸虫在性成熟过程中基因表达的性别特异性 ,曼氏血吸虫方面已取得了可喜的成果<sup>1~4</sup> ,可为日本血吸虫中国大陆株同类工作的研究提供参考和借鉴。为从基因水平上找出血吸虫的性别差异 ,我室构建了日本血吸虫中国大陆株雌、雄成虫 cDNA 噬菌体表达文库 ,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

自感染 1500 条日本血吸虫尾蚴 42d 的家兔门静脉收集成虫 ,雌、雄分离后分别置液氮中保存。TRIZOL 及 SUPERSCRIPT<sup>TM</sup> Lambda System for cDNA

Synthesis and  $\lambda$  Cloning 试剂盒购自 Gibco BRL 公司 ;DEPC 为 Sigma 公司产品 ;mRNA 纯化试剂盒购自 Pharmacia Biotech 公司 ;DNA 胶回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品 ;Gigapack<sup>®</sup> III Gold-11 噬菌体包装蛋白为 Stratagene 公司产品。T7、SP6 寡核苷酸引物由 Sangon 公司合成。Actin<sup>5</sup>及 GCP 片段引物由朱建国博士提供 ,GCP 上游引物序列为 5'-AAGGATCCAACATGGCCGACGAGGAAG-3' ,下游引物序列为 5'-GGCTCGAGTTAGAAGCATTTCACGGTGAACAA-3'。EGP 引物由张慧硕士提供 ,其上游引物序列为 5'-AAGGATCCAACATCATCACG ATCACTCAAAGAA-3' ,下游引物序列为 5'-CCAAGC TTTGAACTCAATAGGAGGGTGCA-3'。23kD 膜蛋白基因引物由本室刘金明提供 ,上游引物序列为 5'-GAGGATCCTTGGCGACTTTGGGATC-3' ,下游引物序列为 5'-GCGTCGACTTAAACATTCTGATA ATCGTGT-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 提取和 Poly( A )<sup>+</sup> RNA 分离** :将液氮冻存的虫体称重后 ,加液氮迅速研磨粉碎。每克湿重虫体加 10mL TRIZOL ,用电动匀浆器剧烈搅动 ,余下按试剂盒说明操作。异丙醇沉淀后取小部分离心 ,DEPC 水溶解后甲醛变性电泳检测 RNA 的

质量,紫外检测 RNA 的纯度及浓度。用 Oligo(dT) 纤维素柱纯化 mRNA。

**1.2.2 cDNA 的合成:**以 5.0 $\mu$ g mRNA 为模板,1.0 $\mu$ g 含 Not I 位点的 Oligo(dT)15 为引物,在 SUPERSCRIPT II RT 反转录酶作用下,合成第一链 cDNA,加入 *E. coli* Rase H,*E. coli* DNA 聚合酶 I 和 *E. coli* DNA 连接酶,合成第二链 cDNA;再加 T4 DNA 聚合酶补平末端后与 Sal I 接头连接,经 Not I 酶解后得到 5'端是 Sal I、3'端是 Not I 酶切位点的双粘性末端 cDNA。

**1.2.3 cDNA 的纯化与定量:**将 dscDNA 全部上样进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下迅速切下 500bp 以上片段的凝胶,用 QIAquick Gel Extraction kit 纯化,具体操作按试剂盒操作手册进行。洗脱出的 dscDNA 加 1/10 体积 3mol/L NaAc,2 体积的冰乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜,以 25ng 和 50ng $\lambda$ DNA 作定量 Marker,电泳对 dscDNA 定量。

**1.2.4 cDNA 与载体  $\lambda$ ZipLox 的连接与包装:**将约 40ng cDNA 与 1.0 $\mu$ g 载体 8 $^{\circ}$ C 过夜连接,22 $^{\circ}$ C 包装 2h,加 0.5mL 噬菌体包装稀释液(SM)和 30 $\mu$ L 氯仿,混匀后,高速离心 30s,水相移至新管。取 5 $\mu$ L 做梯度稀释后,铺平板,测文库容量。

**1.2.5 文库质量鉴定与评价:**

(1)文库的滴度测定:文库的容量测定后,按 10 万个噬菌斑/板将剩余的文库全部铺板扩增。扩增后每板各加 10mL SM,摇床上洗脱噬斑。收集文库,高速离心去除菌体碎片,取 5 $\mu$ L 梯度稀释,铺平板,测文库滴度。取少部分加 3% 氯仿 4 $^{\circ}$ C 保存,其余加 7% DMSO-70 $^{\circ}$ C 冻存。

(2)文库重组比测定:在雌、雄文库扩增的平板上各随机挑取 50 个噬斑,加 50 $\mu$ L SM 室温浸泡 2h 后铺小板。各加 3mL SM 洗脱,离心去菌体碎片后,取上清,按 200 $\mu$ L/mL 加入 20% PEG,混匀,室温放置 0.5h 后离心,加 40 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀。取 5 $\mu$ L 做模板,以载体多克隆位点两端的 T7、SP6 为引物进行 PCR,循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,+55 $^{\circ}$ C 45s,+72 $^{\circ}$ C 2min,循环 30 次后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。电泳检查扩增情况,计算文库的重组比率。

(3)用特异引物从文库中钓取目的基因:以 1.0 $\mu$ L 雌虫文库为模板,用张慧硕士提供的引物钓取卵壳蛋白 EGP 的 cDNA,用刘金明提供的引物钓取 23kD 的膜蛋白基因的 cDNA。以 1.0 $\mu$ L 雄虫文库为模板,用朱建国博士提供的两对引物,分别钓取

肌动蛋白基因 Actin 及抱雌沟蛋白 GCP 的部分基因片段。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 7min,94 $^{\circ}$ C 1min,+42 $^{\circ}$ C 45s,+72 $^{\circ}$ C 1min,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。电泳检查扩增情况。

## 2 结 果

### 2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 分离

如图 1 所示,所提取的日本血吸虫总 RNA 在甲醛变性凝胶电泳上只呈现 18S、5S 两条带,而另一条 L-rRNA(26S)未出现。Cox<sup>[6]</sup>等认为这是一种典型的 L-rRNA 体内切口现象,电泳时 L-rRNA(26S)与 S-rRNA(18S)一同迁移,只形成一条亮带。电泳结果表明在抽提过程中有效抑制了 RNA 酶的活性,并无 RNA 降解的迹象。紫外测定  $A_{260}/A_{280}$  介于 1.9~2.0 之间,说明 RNA 提取纯度高。此 RNA 经 Oligo(dT) 纤维素柱 2 次纯化后,得到 mRNA。高质量的 mRNA 是构建高质量 cDNA 文库的前提。如图 2 所示,纯化所得 mRNA 在凝胶电泳上分布良好,无降解,紫外测定  $A_{260}/A_{280}$  介于 1.9~2.0 之间,完全符合建库的要求。

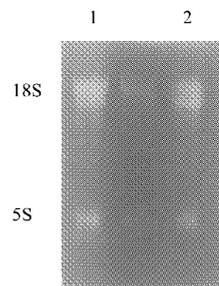


图 1 雌、雄成虫总 RNA 甲醛变性电泳

Fig.1 Total RNA isolated from mature female and male worm of *sj* on denaturing agarose  
1. Female worm RNA ; 2. Male worm RNA

### 2.2 cRNA 的合成

dscDNA 电泳显示,合成的 cDNA 大小分布在 0.3~6kb 之间。主要集中在 1~2kb(图 3、图 4)。据载,用绝大多数组织来源的 RNA 进行反转录,cDNA 长度分布在 350~6000bp 范围内,平均长度为 1300~1600bp<sup>[7]</sup>,由此可见,本实验 cDNA 合成体系较好。

### 2.3 cDNA 文库的质量鉴定与评价

40ng cDNA 与 1.0 $\mu$ g 载体  $\lambda$ ziplox 连接包装后,分别得到容量为  $3.74 \times 10^6$  的雌虫文库和  $3.28 \times 10^6$  的雄虫文库。滴度分别为  $5.75 \times 10^{10}$  pfu/mL、 $4.7 \times 10^{10}$  pfu/mL。随机挑选噬斑进行 PCR 鉴定

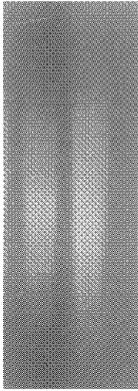


图2 雌、雄虫 mRNA 变性凝胶电泳

Fig.2 mRNA of mature female and male worm of *sj* run on denaturing agarose  
1. Female worm mRNA ;2. Male worm mRNA

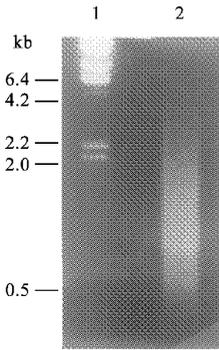


图3 雌虫 cDNA1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 1% agarose gel electrophoresis of *sj* mature female cDNA

1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III marker ;2. *sj* mature female cDNA

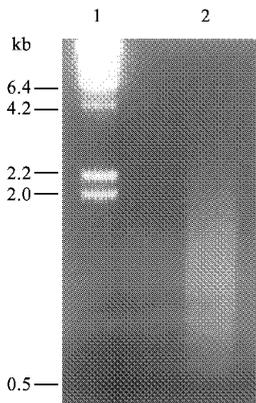


图4 雄虫 cDNA1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 1% agarose gel electrophoresis of *sj* mature male cDNA

1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III marker ;2. *sj* mature male cDNA

结果从雌虫库中获得 640bp 的一卵壳蛋白 EGP 基因和 657bp 的 23KD 膜蛋白基因。从雄虫库中扩增到 1152bp 的肌动蛋白 Actin 基因和抱雌沟蛋白基因的 844bp 的片段,与引物提供者的 RT-PCR 结果相同(图 6)。其中抱雌沟蛋白基因为低丰度表达基因。以上各项指标表明,我们构建了高质量的 cDNA文库。

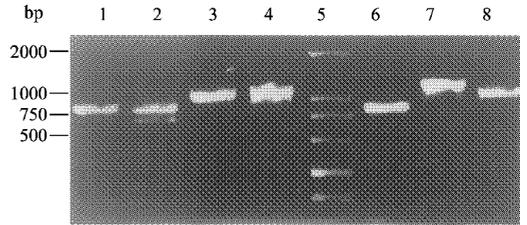


图5 雌、雄文库中随机挑选的克隆 cDNA 插入片段的 PCR 产物电泳结果

Fig.5 The PCR production of lambda cDNA clones picked at random from *sj* female and male worm cDNA libraries  
1~4. The clones from female cDNA library ;  
6~7. The clones from male cDNA library ;5. DL2000 marker

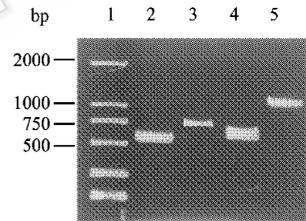


图6 雌雄文库中特异引物 PCR 产物的凝胶电泳

Fig.6 Agarose gel electrophoresis of PCR products from *sj* mature female and male cDNA libraries  
1. DL2000 marker ;2. EGP ;3. GCP ;  
4. *sj*23kD ;5. Actin

### 3 讨论

血吸虫虫卵沉积所引起的宿主肝脏与肠粘膜形成肉芽肿及肝组织纤维化是血吸虫病的主要病理表现。由于虫卵在发病和致死方面的重要性使得血吸虫的生殖系统作为免疫靶器官的潜在目标越来越受到研究者的关注<sup>[3-4,8]</sup>。

血吸虫是裂体科的雌雄异体吸虫,其雌虫的生殖呈现一个动态的成熟过程。与双性感染的血吸虫相比,单性感染的雌虫生长迟缓且生殖系统不发育。而发育成熟的雌虫与雄虫分离后,卵黄腺和卵巢迅速退化<sup>[9]</sup>。可见,血吸虫雌虫生殖能力与雌雄合抱行为紧密相关。1985年, Aronstein 和 Strand 曾报道 86kD 的抱雌沟蛋白(Sm-GCP)是曼氏血吸虫性别

文库重组比均大于 96%,插入片段的长度多在 1kb 左右(图 5)。用特异引物从文库中钓取目的基因,

特异性蛋白<sup>[10]</sup>,雄虫在与雌虫合抱后表达该蛋白,而未配对的雄虫则无此蛋白表达,合抱后再分离的雄虫此蛋白的表达也随之停止。这一研究提示抱雌沟蛋白对血吸虫交配、产卵有重要作用,可能为我们进行血吸虫抗生殖治疗的思路提供一个理想的着眼点。在目前已鉴定的血吸虫抗原基因中,与血吸虫性成熟、产卵、致病等相关的基因较少,因此寻找、确定与血吸虫生长、发育、成熟和生殖相关的基因将是血吸虫基因组计划的一个重要内容<sup>[11]</sup>。

根据已有的报道,血吸虫抗原具有种的特异性,异种抗原不起交叉保护作用。日本血吸虫中国大陆株分子生物学的研究起步较晚,目前国内关于日本

血吸虫中国大陆株性别特异性基因方面的研究尚未见报道。为开展这方面的研究,以期能探索出血吸虫抗生殖治疗的方法,我室首先构建了日本血吸虫中国大陆株雌、雄成虫的 cDNA 表达文库。多项实验数据表明,我室构建了高质量的 cDNA 文库,可作为雌雄成虫基因差异研究及筛选保护性抗原基因的重要资源。

致 谢 本研究得到上海肿瘤研究所赵新泰、周筱梅、李宏年老师,以及中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所冯新港博士后、朱建国博士及本室刘金明、傅志强、李浩等的指导与帮助,在此表示感谢!

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Reis M G ,Kuhns J ,Blanton R *et al.* *Mol Biochem Parasitol* ,1989 ,**15** (3)(2-3) :113~119
- [ 2 ] Bostic J R ,Strand M. *Mol Biochem Parasitol* ,1996 ,**79**( 1 ) :79~89
- [ 3 ] Grevelding C G ,Sommer G ,Kunz W. *Parasitology* ,1997 ,**115**( pt6 ) :635~640
- [ 4 ] Freebern W J ,Osman A ,Niles E G *et al.* *J Biol Chem* ,1999 ,**19**( 8 ) :4577~4585
- [ 5 ] 朱建国 林娇娇 冯新港等 . 生物化学与生物物理学报 ,2000 ,**32**( 5 ) :545~549
- [ 6 ] Cox R A. *Prog Biophys Mol Biol* ,1977 ,**32**( 3 ) :193~231
- [ 7 ] Robinson P A ,Marley J J ,McGarva J. *Methods Mol Cell Biol* ,1992 ,**3** :118~127
- [ 8 ] Moore D V ,Yolles T K ,Meleny H E. *J Parasitol* . 1954 ,**40**( 21 ) :166~185
- [ 9 ] Popiel I ,Cioli D ,Erasmus K A. *Int J Parasitol* . 1984 ,**14**( 2 ) :183~190
- [ 10 ] Aronstein Strand ,*Am J Trop Med Hyg* . 1985 ,**34**( 3 ) :508~512
- [ 11 ] Tanaka M ,Tanaka J ,Inazawa J *et al.* *Mem Inst Oswaldo Cruz* ,1997 ,**92**( 6 ) :829~834

## Construction of cDNA Libraries from Mature Female and Male Worm of *Schistosoma japonicum* Chinese Main Land Strain\*

YUAN Chun-Xiu<sup>1</sup> LI Ming<sup>1</sup> CHEN Yong-Jun<sup>2</sup> SHI Yao-Jun<sup>1</sup> WU Xiang-Fu<sup>2</sup> CAI You-Min<sup>1</sup> LIN Jiao-Jiao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Shanghai Institute of Animal Parasitology ,Chinese Academy of Agricultural sciences ,Shanghai 200232 )

<sup>2</sup>( Shanghai Institute of Biochemistry ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200231 )

**Abstract** Total RNA of mature female and male worm of *Schistosoma japonicum*( *Sj* ) were extracted by Trizol. mRNA were further purified through oligo-dT cellulose. The first strand cDNA was synthesized by using AMV reverse transcriptase. After the synthesis of the second strand ,the fragments longer than 500bp were collected by electrophoresis and purified by kit ,and were then ligated with lambda ZipLox vector. After package in vitro ,two cDNA libraries were constructed , a female cDNA library containing  $3.74 \times 10^6$  clones and a male cDNA library containing  $3.28 \times 10^6$  clones ,in which more than 96% clones are recombinant and most of insert DNA were 1kb ,more or less. By using PCR we obtained the cDNAs of EGP ,23KD membrane protein ,Actin and GCP from our cDNA libraries ,GCP is a low-abundant expressed gene. These datas show that two cDNA libraries are of reasonably good quality ,and can be used to study the gene differences between female and male worm and to screen the protective antigen genes.

**Key words** Mature female and male cDNA libraries , *Schistosoma japonicum*