

日本血吸虫中国大陆株 21.7kD 蛋白编码基因的克隆和表达

金亚美^{1,2} 林矫矫¹ 张 亮¹ 傅志强¹ 吴祥甫² 周元聪² 蔡幼民^{1*}

¹(中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所,农业部动物寄生虫学重点开放实验室,上海 200232)

²(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

摘 要 根据日本血吸虫菲律宾株编码 21.7kD 蛋白的基因设计引物,以日本血吸虫中国大陆株成虫 mRNA 为模板,用 RT-PCR 法扩增出大小为 558bp 的基因片段。经序列分析推断该基因片段为编码日本血吸虫中国大陆株 21.7kD 蛋白基因的完整阅读框,与菲律宾株该基因的碱基序列同源性为 98%。将其克隆到表达载体 pET28a(+) 中,在大肠杆菌 BL21 中获得表达,融合表达产物分子量约为 25.4kD。利用日本血吸虫成虫抗原免疫血清对该表达产物进行 Western 印迹检测,在预测位置出现了明显的识别条带,说明该基因的表达产物具有抗原性。

关键词 日本血吸虫,中国大陆株,21.7kD 蛋白,基因克隆,基因表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0698-05

血吸虫病是一种流行广泛、危害严重的人畜共患寄生虫病。虽然治疗血吸虫病的药物吡喹酮疗效较好,但无法防止重复感染,且存在用药副反应等问题。因而,为控制和消灭血吸虫病,迫切需要开拓免疫预防的途径。为此,人们积极开展了血吸虫病疫苗的候选抗原研究。近有研究结果显示 IgE 抗体在血吸虫病的保护性免疫中起着重要作用^[1,2],Hafalla J C^[3]等 1999 年用来自抗血吸虫成虫抗原应答中高 IgE 滴度人群的 IgE 抗体从日本血吸虫菲律宾株中筛选出编码 21.7kD 蛋白的基因。本研究针对在我国流行的日本血吸虫中国大陆株,采用 RT-PCR 方法克隆到相应基因,通过对该基因进行同源性分析发现其与血吸虫多种膜相关蛋白基因有不同程度的同源性。本试验并对 21.7kD 蛋白基因在大肠杆菌中的表达及表达产物的抗原性进行了研究,为评估其表达产物在日本血吸虫病抗感染免疫中的作用提供了条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌(*E. coli*)TG1 和 BL21,质粒 Psk, pET28a(+) 分别由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所和中

国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所保存。

1.1.2 日本血吸虫中国大陆株成虫:由中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所钉螺室以感染性钉螺维持的日本血吸虫中国大陆株安徽品系尾蚴感染新西兰大白兔 5 周后剖杀冲虫,液氮冻存备用。

1.1.3 主要酶类及其他生化试剂:各种 DNA 限制酶购自 TaKaRa 公司。T4 连接酶购自 Promaga 公司。琼脂糖、Silver Beads DNA 回收试剂盒及 PCR 系列试剂均为生工生物工程公司产品。反转录酶 AMV、Trizol 试剂购自 Gibco 公司。硝酸纤维素膜(NC 膜)系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 系华美生物工程公司产品。

1.1.4 PCR 引物:根据已报道的编码日本血吸虫菲律宾株 21.7kD 抗原基因 *Sj21.7^[3]* 的序列设计引物,扩增日本血吸虫中国大陆株的相应基因。引物 1: 5'-ACGGATCCATGGCGAGTACAAGGAAC-3',引物 2: 5'-CCTCTCGAGTTAATTGTTTGGTGTACGCC-3'。为便于 PCR 产物的克隆及表达,分别在两引物的 5' 端设计了一个 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点。引物由上海基康生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 反转录聚合酶链反应(RT-PCR):取液氮冻存的日本血吸虫成虫 200 mg,分别按 Trizol 试剂盒和

收稿日期 2002-05-20,修回日期 2002-09-04。

基金项目 科技部科研院所社会公益研究专项基金(No.2000-181)国家自然科学基金(No.39870548;No.300100138)。

* 通讯作者。 Tel 86-21-54082503, Fax 86-21-54080044, E-mail caassp@public.sta.net.cn

反转录试剂盒说明抽提其总 RNA ,并反转录成 cDNA。取 1 μ L cDNA 为模板进行 PCR ,PCR 反应条件分别为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min ,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min ,55 $^{\circ}$ C 55s ,72 $^{\circ}$ C 45s ,共 30 个循环 ,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 PCR 产物的克隆和鉴定 :将 PCR 产物用 Silver Beads DNA 回收试剂盒进行回收 ,利用 PCR 产物两端的 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点 ,将 PCR 产物及 pSK (+) 质粒分别酶切后用 Silver Beads DNA 回收试剂盒进行回收 ,按文献介绍的方法连接 ,并转化到大肠杆菌 TG1 ,分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行限制性酶切分析鉴定重组克隆。将阳性克隆用 Sangers 双脱氧核糖核酸末端终止法测序 ,由上海基康生物技术有限公司完成。

1.2.3 与其它膜相关蛋白基因的碱基序列和氨基酸序列的一致性比较 :将克隆得到的 *Sj21.7(Ch)* 的序列及其理论推测氨基酸组成用 Blast 软件分析其与其它相关基因及蛋白的序列一致性。

1.2.4 融合基因在大肠杆菌中的表达 :按文献的方法 ,从测序后确定的重组质粒 pSK(+)-*Sj21.7(Ch)* 中用限制酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 切出 *Sj21.7(Ch)* 全长编码基因片段 ,克隆到表达型质粒 pET28a(+) 相应的酶切位点中 ,转化表达宿主菌 BL21 ,经酶切鉴定及测序无误后 ,阳性克隆接种到含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜 ,取 50 μ L 培养液加到 5mL 含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中 ,37 $^{\circ}$ C 通气培养 2h 后 ,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/mL ,进行诱导表达 ,分别于加入 IPTG 0h、2h、4h、6h、8h 时各取 1mL 离心收集菌体 ,按文献 [4] 进行 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺分离胶浓度 12% ,浓缩胶 5%) 观察表达时相变化。

1.2.5 融合蛋白抗原性鉴定 :将表达量高时相段的产物进行 SDS-PAGE ,再转移到硝酸纤维膜上 ,转移条件为 0.25 A 3 h ,用经 pET28a(+) 载体转化的大肠杆菌培养液吸附处理过的日本血吸虫成虫抗原免疫血清作一抗 ,按文献 [4] 的方法进行 Western 印迹检测。

1.2.6 基因表达产物的纯化 :在 pET28a(+) 中融合表达的外源蛋白均带有一段 His 序列 ,可用专门的 HisBind Resin 蛋白纯化试剂盒来纯化融合蛋白 ,按纯化试剂盒说明书操作 ,纯化融合蛋白。

1.2.7 *Sj21.7* 编码蛋白的结构和功能预测 :用 ANTHE 软件和计算机辅助疫苗设计软件对 *Sj21.7* 编码蛋白的结构域、功能域和可能的抗原表位进行预测。

2 结 果

2.1 *Sj21.7(Ch)* 全长编码基因的克隆及序列分析

以日本血吸虫中国大陆株成虫 mRNA 为模板 ,参照菲律宾株 *Sj21.7* 基因序列设计引物 ,用 RT-PCR 扩增出一段大小为 575 bp 的 DNA 片段。将其克隆到 pSK (+) 上 ,重组质粒经酶切鉴定含插入片段。通过测序并进行序列分析 ,推断该片段含编码日本血吸虫中国大陆株 21.7kD 抗原的全序列 *Sj21.7(Ch)* 。该编码基因 ORF 为 558bp ,编码 185 个氨基酸 (图 1)。

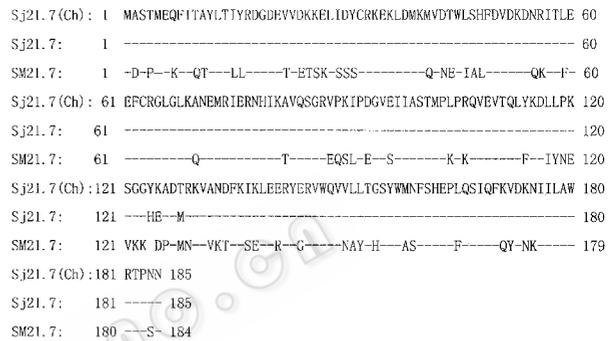


图 1 日本血吸虫中国大陆株和日本血吸虫菲律宾株、曼氏血吸虫 21.7kD 蛋白氨基酸序列比较

Fig.1 comparison of sequence of amino acid of 21.7kD protein Between *Sj21.7(Ch)* , *Sj21.7* and *Sm21.7*

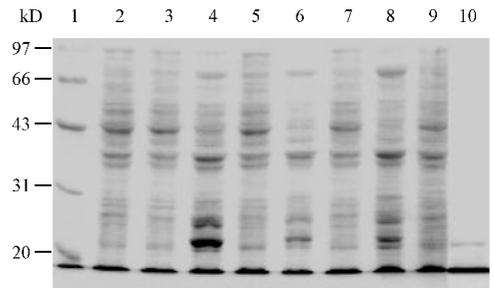


图 2 SDS-PAGE 分析 *rSj21.7(Ch)* 在大肠杆菌中的表达

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression products of *rSj21.7(Ch)* in *E. coli*

1. Protein marker ;
- 2、4、6、8. pET28a(+)- *rSj21.7(Ch)* induced with IPTG for 0h、2h、4h and 6h
- 3、5、7、9. pET28a(+) induced with IPTG for 0h、2h、4h and 6h
10. purified *rSj21.7(Ch)* expression product

宾株该基因碱基序列的同源性 ,发现有 9 个碱基不同 ,分别在 72、84、110、112、198、228、231、370、383 位置 ,由碱基 C、G、T、G、A、A、T、C、T 改换为 T、T、G、T、G、G、A、T、C ,二者同源性为 98%。经软件分析发现这 9 个碱基的变化导致了 3 个氨基酸的变换

(图 2)。

2.2 同源性比较

经软件分析发现 *Sj21.7(Ch)* 于其它几种膜相关蛋白在碱基序列和氨基酸组成上都有一定的同源性。其与曼氏血吸虫的 *Sm21.7*、*Sm24* 基因的碱基同源性为 88% ,编码氨基酸序列同源性为 64% ;与曼氏血吸虫 *Sm22.6*、*Sm22*、*Sm20.8* 基因 ,日本血吸虫 *Sj22.6*、*Sj22* 基因编码氨基酸同源性分别为 52%、52%、34%、48%、48% ;与肝片吸虫的两个 Ca^{2+} 结合蛋白的氨基酸同源性为 43%。

2.3 *Sj21.7(Ch)* 在大肠杆菌中表达及其产物的鉴定

将目的片段克隆到 pET28a(+) 中 ,酶切鉴定及测序证实克隆无误 ,通过不同时相诱导表达 ,表明诱导 2h 已达最高表达时相(图 2) 。用 His Bind Resin 试剂盒纯化 ,SDS-PAGE 结果显示该融合表达产物 *rSj21.7(Ch)* 分子量约为 25.4 kD ,与推测的大小相符合(图 3)。

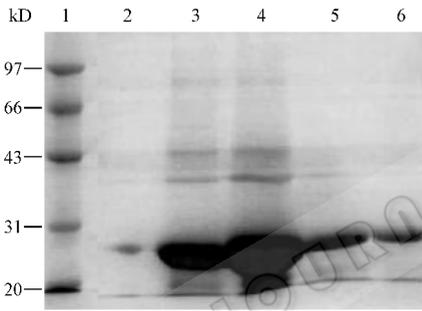


图 3 SDS-PAGE 分析 *rSj21.7(Ch)* 的纯化产物
Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified *rSj21.7(Ch)* Expression products

1 2 3 4 5. Samples from different collected tubes ; 6. Protein marker

2.4 表达产物的抗原性测定

以重组表达产物进行 SDS-PAGE ,经电转移到 NC 膜上 ,用经 pET28a(+) 的大肠杆菌转化子培养液吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫血清做一抗进行 Western 印迹检测 ,结果在约 25.4kD 处有一明显的识别条带(图 4) ,证实重组表达产物与日本血吸虫抗原的一致性。说明所克隆编码日本血吸虫大陆株 21.7kD 蛋白基因的表达产物具有良好的抗原性。

2.5 *Sj21.7* 编码蛋白的结构和功能域预测

用 ANTHE 软件对 *Sj21.7* 编码蛋白进行结构和功能域预测 ,结果显示该蛋白没有信号肽 ,虽与一些膜蛋白有高度的同源性但却没有跨膜区(图 5) ,且与 TMSF 膜蛋白家族成员无同源性 ,亲、疏水区均匀

分布(图 6) 。对其功能性肽段分析结果显示该担保具有 N-糖基化位点 ,EF 手型 Ca^{2+} 结合区和一些激酶的磷酸化位点(结果见表 1) 。计算机辅助疫苗设计软件分析结果表明 160-168 的氨基酸序列 VLLTGSYWM 为 T 细胞抗原表位 ,具有较强的免疫原性。

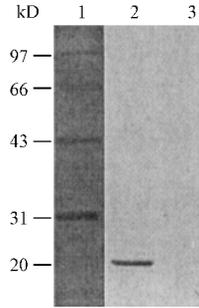


图 4 用日本血吸虫成虫抗原的免疫血清进行 Western-blotting 分析重组 *rSj21.7(Ch)* 的抗原特异性
Fig.4 Wstern-blotting analysis of *rSj21.7(Ch)* expression product

Probed with the serum immunized with *Sj* adult worm antigen
1. Protein marker ; 2. Expressed product of pET28a(+) - *rSj21.7(Ch)* ; 3. Expressed product of pET28a(+) -

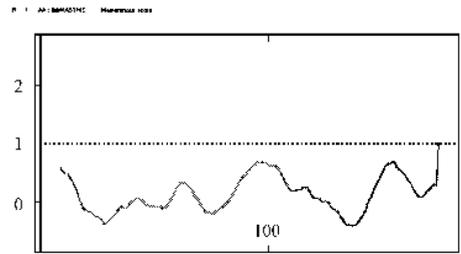


图 5 *Sj21.7c* 的跨膜区预测结果

Fig.5 Membrane-spanning region prediction results of *Sj21.7c*

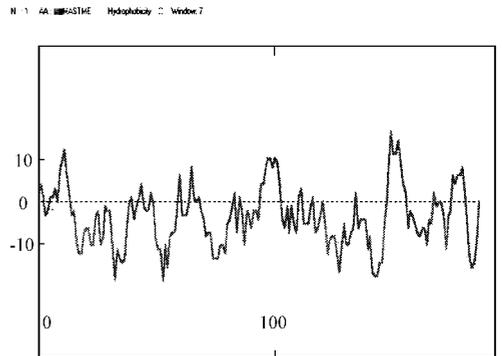


图 6 *Sj21.7c* 的疏水性预测结果

Fig.6 Hydrophobicity prediction results of *Sj21.7c*

表 1 *Sj21.7c* 结构和功能域预测Table 1 The results on structural and functional motifs of *Sj21.7c*

Name of site	Number	Site	Sequence of A. A.
N-glycosylation sites	1	159 - 162	NFSH
EF-Ca sites	1	50 - 62	DVDKDNRI
			TLEEF
PKC Phosphorylation sites	2	85 - 87	SGR
		128 - 130	TRK
CK II Phosphorylation sites	3	3 - 6	STME
		47 - 50	SHFD
		58 - 61	TLEE
PTK Phosphorylation sites	1	136 - 143	KIKLEERY
N-14-Alkylation sites	2	67 - 72	GLKANE
		122 - 127	GGYKAD

3 讨论

血吸虫病是一种重要的人畜共患病,在世界范围内广泛分布,严重威胁着人畜健康。大量现场研究资料表明,人类在血吸虫感染后可获得自然免疫力,提示发展血吸虫病疫苗的策略是可行的。

近年来的研究工作表明,IgE 抗体在血吸虫病免疫中起着重要的保护性作用^[1,2,5]。IgE 抗体是巨嗜细胞介导杀伤作用的基本成分,IgE 抗体在血吸虫病的免疫作用中激活了巨嗜细胞,诱发了抗血吸虫的细胞毒反应,且 IgE 激发的细胞毒反应具有种属特异性^[6-9]。另有研究发现,IgE 抗体能刺激机体血小板的杀童虫作用^[10]。由于 IgE 抗体在血吸虫保护性免疫中起的重要作用,在血吸虫候选疫苗抗原的研究中,分离能刺激机体产生 IgE 抗体的相关抗原基因引起了人们的重视。Hafalla. J C^[3]等来自于抗血吸虫成虫抗原应答中高 IgE 滴度人群的 IgE 抗体筛选出日本血吸虫菲律宾株的 21.7kD 蛋白基因。本研究则针对在我国流行的中国大陆株,参照该基因序列设计引物,用 RT-PCR 方法克隆得到日本血吸虫中国大陆株的相应基因 *Sj21.7(Ch)*,经测序和序列分析发现其与菲律宾株有 9 个碱基的差异,序列同源性达 98%,造成 3 个氨基酸的变化,这些差别可能反映了地理品系之间的差异。

在血吸虫生活周期中,表膜蛋白分子既是虫体细胞的组成部分,对虫体结构的维系和寄生生活起重要作用,又易受到宿主的免疫攻击。用识别血吸

虫表膜蛋白的单克隆抗体做被动转移保护实验,可产生 30% ~ 50% 的保护效果^[11];重组的 Sm23 表膜蛋白能使小鼠获得 40% ~ 50% 的保护力^[12],被 WHO/TDR 选定为血吸虫候选疫苗分子之一。因此这一类蛋白分子在抗血吸虫疫苗研究中倍受研究者的关注。本试验克隆所得的基因及其理论推测氨基酸组成功用 Blast 软件进行了同源性分析,结果表明该基因编码的蛋白与曼氏血吸虫和日本血吸虫多种膜相关蛋白有较大的同源性。此外该蛋白与肝片吸虫的两个 Ca²⁺ 结合蛋白^[13,14]有较大的同源性,肝片吸虫的这两个 Ca²⁺ 结合蛋白皆属具有 EF 手型模体的 Ca²⁺ 结合蛋白,能可逆地与钙离子结合^[13,14],此结果暗示该蛋白也可能与血吸虫对 Ca²⁺ 的利用有关。

利用 ANTHE 软件对 *Sj21.7c* 编码蛋白质的结构和功能域进行了分析,结果表明该蛋白质虽属于膜蛋白但却没有跨膜区,其亲、疏水区呈均匀分布,推测该蛋白质可能是一种位于细胞膜表面的天线蛋白,可在信号接受和传递方面起重要作用。分析结果还显示该蛋白质具有几种酶的磷酸化位点,提示其可能是磷酸化/去磷酸化信号途径中的重要成分。该蛋白质还具有一个 EF 手型 Ca²⁺ 结合域,这一结果和同源性分析的其与肝片吸虫两个属 EF 手型模体的 Ca²⁺ 结合蛋白同源的结果相吻合,说明该蛋白质应与血吸虫对 Ca²⁺ 的利用有关。分析又发现该蛋白质具有 N-糖基化位点,糖蛋白是血吸虫各阶段的重要抗原物质,在血吸虫免疫应答及免疫调节方面起着重要的作用^[15],该蛋白质具有糖基化位点对作为疫苗候选抗原甚为有利,但糖蛋白在血吸虫的免疫应答中可能具有双重效应,即既可以诱导保护性抗体,亦可能诱导封闭性抗体的产生,但从该蛋白质相应诱导的 IgE 抗体在血吸虫病保护性免疫中起重要作用的实验事实考虑,它应能诱导保护性抗体的产生,当然对此还应作进一步的研究。此外应用计算机辅助疫苗设计软件对该蛋白质进行分析,发现该蛋白质具有诱导细胞免疫的氨基酸序列,显示该蛋白质还可能诱导 T 细胞免疫的潜能。综上所述,该蛋白质作为抗血吸虫病基因工程疫苗候选抗原值得深入研究。

本文研究结果对进一步研究其生物学功能,进而探讨其在血吸虫病防治中的作用打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kleij D V D, Aloysius G M T, Maria Y B. Recognition of Schistosome Glycolipids by Immunoglobulin E Possible role in Immunity In-

- fection and immunity, 1999 **67**(11): 5946 ~ 5950
- [2] Hagan P, Blumenthal U J, Dunn D *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 1991, **349**(6306): 243 ~ 245
- [3] Hafalla J C, Alamares J A, Acosta L P *et al.* Molecular identification of a 21.7 Kda schistosoma japonicum antigen as a target of the human IgE response. *Mol Biochem Parasitol*, 1999 **98**(1): 157 ~ 161
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [5] Dunne D W, Butterworth A E, Fulford A J C *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol*, 1992 **22**: 1483 ~ 1489
- [6] Capron A, Dessaint JP, Capron M *et al.* Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 1975 **253**: 474 ~ 475
- [7] Joseph M, Dessaint J P, Capron A. Characteristics of macrophage cytotoxicity induced by IgE immune complexes. *Cell Immunol*, 1977, **34**(2): 247 ~ 258
- [8] Capron A, Dessaint J P, Capron M. IgE and Cells in schistosomules. *Amer J Trop Med Hyg*. 1977 **26**(suppl) 39 ~ 47
- [9] Joseph M, Capron A, Butterworth A E *et al.* Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro*: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin Exp Immunol*, 1978 **33**(1): 48 ~ 56
- [10] Smith M A, Clegg J A, Snary D *et al.* Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with an IgM monoclonal antibody. *Parasitology*, 1982 **84**: 83 ~ 91
- [11] Michel J, C Auriault, A Capron *et al.* A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature*, 1983 **303**: 810 ~ 812
- [12] Bergquist N R, Hall B F, James S. Schistosomiasis vaccine development. *The Immunologist*, 1994 **2**(4): 131 ~ 134
- [13] Machin M A, Diaz Ruiz de Eguino A, Casais Goyos R *et al.* Cloning, characterization and heterologous expression of the *Fasciola hepatica* related to the family of calcium-binding proteins (Unpublished)
- [14] Ruiz A D, Machin M A, Casais G R *et al.* Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Fasciola hepatica* gene encoding a calcium-binding protein. *Mol Biochem Parasitol*, 1999 **101**(1 ~ 2): 13 ~ 21
- [15] NIU P A (牛平安), WANF S F (汪世平), ZENG X F (曾宪芳). Advances of studies on glycoprotein of *Schistosoma*. *Chinese Journal of Zoonoses* (中国人兽共患病杂志) 2002 **18**(2): 106 ~ 109

Cloning and Expression of 21.7kD Protein Gene of *Schistosoma japonicum* (Chinese strain)

JIN Ya-Mei^{1, 2} LIN Jiao-Jiao¹ NI Zhen-Ya¹ FU Zhi-Qiang¹ WU Xiang-Fu² ZHOU Yuan-Cong² CAI You-Min^{1*}
¹(Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture of China, Shanghai 200232, China)

²(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract A 558 bp cDNA fragment was amplified by RT-PCR from adult *Schistosoma japonicum* (Chinese strain) mRNA with a pair of primers that were designed according to published Sj21.7p gene encoding 21.7 kD protein of *Schistosoma japonicum* (Philippines strain). Sequence analysis indicated that this frame, named Sj21.7 (Ch), with 99% homology to Sj21.7p, contained a complete open reading fragment (ORF) of 21.7 kD protein gene of *Schistosoma japonicum* (Chinese strain). The amino acid sequence shared 98% homology with 21.7 kD protein of *Schistosoma japonicum*. This fragment was cloned into the expression vector pET28a (+) and subsequently expressed in *Escherichia coli* with IPTG induction. SDS-PAGE analysis revealed that the molecular weight of this expressed product was 25.4 kD. Western blotting showed that the recombinant protein reacted well with the rabbit serum immunized with Sj worm antigen, indicating that this expressed product had good antigenicity.

Key words *Schistosoma japonicum*, Chinese strain, 21.7 kD protein, gene cloning, gene expression

Received: 05-20-2002

This work was supported by The Research Institutions' Special Welfare Research Grant from the Ministry of Science and Technology (No. 2000-181) and National Natural Science Foundation of China (No. 39870548 ; No. 300100138).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54082503; Fax: 86-21-54081818; E-mail: caassp@public.sta.net.cn