

日本血吸虫特异性膜蛋白的筛选及其中 sj15 蛋白编码序列的克隆

张双民<sup>1,2</sup>, 张莉滢<sup>1</sup>, 刘稳升<sup>1</sup>, 吕志跃<sup>1</sup>, 郑焕钦<sup>1</sup>, 吴忠道<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学中山医学院, 教育部热带病防治重点实验室, 广州 510080; 2. 陕西师范大学生命科学院微生物研究室, 西安 710062)

**[摘要]** **目的:** 筛选日本血吸虫可能的特异性膜蛋白, 并根据筛选结果在日本血吸虫成虫中尝试克隆某一可能具有免疫保护功能的预测蛋白的编码序列, 为血吸虫病防治研究寻找新的疫苗候选分子或药物靶标。 **方法:** 以“*Schistosoma japonicum*”和“membrane or tegument”为关键词, 在公共数据库 NCBI 进行查找并下载数据, 建立本地化的日本血吸虫膜蛋白序列数据库, 与本实验室建立的曼氏血吸虫、人类、大鼠及小鼠蛋白质数据库等进行多序列比对, 筛选日本血吸虫特异性膜蛋白, 同时通过 CBS 网站相应分析工具软件预测目的蛋白的特征和功能。针对其中可能有免疫保护功能的预测蛋白的预测编码序列设计引物, 采用 RT-PCR 技术从日本血吸虫成虫中扩增出该编码序列, 并克隆入 pGEX-4T-1 构建原核表达重组质粒。 **结果:** 共检索到 153 个理论推测的日本血吸虫膜蛋白序列, 筛选出 28 个可能的日本血吸虫特异性膜蛋白; 成功从日本血吸虫成虫中扩增出相对分子质量为 15 000 的预测蛋白的预测编码序列, 暂命名为 sj15 基因, 同时成功构建 pGEX-4T-1-sj15 重组质粒。 **结论:** 成功筛选出多个日本血吸虫特异性膜蛋白; 从日本血吸虫成虫中成功克隆出 GenBank 公布的预测的 sj15 基因, 证实了成虫中该预测基因的存在, 并成功构建原核表达载体, 为进一步的功能研究奠定了基础。

**[关键词]** 血吸虫, 日本; 膜蛋白质类; 生物信息学; 克隆, 分子

**[中图分类号]** R 383.24      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0894-04

Screening for specific membrane protein of *Schistosoma japonicum* and cloning of sequence encoding protein sj15

ZHANG Shuang-min<sup>1,2</sup>, ZHANG Li-yan<sup>1</sup>, LIU Wen-sheng<sup>1</sup>, LÜ Zhi-yue<sup>1</sup>, ZHENG Huan-qin<sup>1</sup>, WU Zhong-dao<sup>1\*</sup> (1. Key Laboratory for Tropical Diseases Control of Ministry of Education, the Pre-Clinical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Microbiology, College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To screen for the potential specific membrane protein from the protein database built by our Lab and to clone the encoding sequence of a potential immunoprotective protein according to the screening result, so as to search for new vaccine candidate or drug targets for Schistosomiasis control. **Methods:** The related data were retrieved using the key words “*Schistosoma japonicum*” and “membrane or tegument” from the NCBI database to construct local database of membrane protein of *S. japonicum*. The specific membrane proteins were screened by multi-alignment with the protein sequences from our local database of *Schistosoma mansoni*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*. Meanwhile, the character and function of the predicted membrane protein were analyzed with public software in the website CBS. The specific primer for the sequence of the predicted protein with potential immuno-protective function were designed and synthesized; the coding sequence was then amplified from the adult worm of *S. japonicum* by PCR and was cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. **Results:** A total of 153 predicted membrane protein of *S. japonicum* were retrieved and 28 potentially specific for *S. japonicum* were screened out. The coding sequence of the predicted protein, with a relative molecular weight of about 15 000, was successfully amplified from the adult worm of *S. japonicum* and was temporarily named gene sj15; the recombinant plasmid pGEX-4T-1-sj15 was also successfully constructed. **Conclusion:** Many specific membrane proteins of *S. japonicum* have been successfully screened out. The predicted sj15 gene (announced as AY223457 in GenBank) has been successfully cloned, proving the existence of sj15 gene in adult worm of *S. japonicum*. The prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 for sj15 has also been successfully constructed, providing a foundation for further study of sj15 function.

**[KEY WORDS]** *Schistosoma japonicum*; membrane proteins; bioinformatics; cloning, molecular

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 894-897]

血吸虫病是由人体血吸虫感染引起的以虫卵肉芽肿和肝纤维化为主要特征的人兽共患寄生虫病, 我国只有日本血吸虫病。日本血吸虫尾蚴经皮肤侵入人体后转为童虫、童虫沿循环系统移行并不断发育, 最后定居门脉-肠系膜静脉系统, 雌雄成虫在此合抱, 成熟雌虫产卵, 并造成机体严重的肝脏病理损

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30271165), 教育部博士点基金[(2005)216号]。Supported by National Natural Science Foundation of China(30271165) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China[(2005)216]。

**[作者简介]** 张双民, 博士生, 讲师。E-mail: ss69m@yahoo.com.cn  
\* Corresponding author. E-mail: wuzhd@mail.sysu.edu.cn

伤。血吸虫感染后,可引起机体产生一定程度的“伴随免疫”。血吸虫表面膜蛋白(表膜)是宿主免疫系统与血吸虫虫体直接接触的界面,其表膜组成成分复杂,种类繁多,包括蛋白、多肽、糖蛋白、糖脂、脂肪酸等<sup>[1-3]</sup>。血吸虫在宿主体内发育成熟过程中,虫体表膜的分子组分不断更新,膜的抗原及其受体发生显著变化,同时血吸虫还可获得宿主的抗原成分(如血型抗原,组织相容抗原和细胞内物质抗原),致使血吸虫的抗原性降低,借以逃避宿主的免疫攻击。因此,对表膜相关抗原的研究在血吸虫病疫苗开发和免疫诊断等方面起重要作用<sup>[4-5]</sup>。但目前对日本血吸虫表膜蛋白的相关研究尚不系统,不少研究仅仅停留在理论预测水平,缺乏更进一步的实践验证和详细的实验数据支持。为此,本课题组充分利用日本血吸虫基因组序列信息,结合本实验室相关研究平台,建立了日本血吸虫膜蛋白编码序列筛选及克隆技术体系,为筛选新的疫苗候选分子或药物靶标提供实验基础。本文报道日本血吸虫特异性膜蛋白序列的筛选及其中可能有免疫保护功能的 sj15 预测蛋白编码序列克隆的结果。

## 1 材料和方法

1.1 主要实验设备与试剂 Bio-Rad PCR 扩增仪(Bio-Rad),DYY-III-8B 稳压稳流型电泳仪,高速离心机(Eppendoff),凝胶电泳成像分析仪(Bio-Rad)。宿主菌 DH5 $\alpha$  和载体 pGEX-4T-1 为本实验室保藏, *Taq* 酶、dNTP、Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)、DNA Marker DL2000 及 DL15000、琼脂糖、逆转录试剂盒、凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均为大连宝生物公司产品,ddH<sub>2</sub>O 为灭菌 Millipore 超纯水,限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶为 New England Biolabs 公司产品,TRIzol 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 日本血吸虫特异性膜蛋白的筛选 以“*Schistosoma japonicum*”和“membrane or tegument”为关键词,在公共数据库 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行查找并下载数据,建立本地化的日本血吸虫膜蛋白序列数据库。采用 SHELL 语言编写程序在 Redhat 9.0 的 LINUX 系统下将本地化的日本血吸虫膜蛋白质数据库分别与本实验室建立的曼氏血吸虫蛋白质数据库、人类蛋白质数据库、大鼠及小鼠蛋白质数据库等 4 个本地数据库进行多序列比对,筛选与人类、曼氏血吸虫、大鼠、小鼠氨基酸序列相似性差的日本血吸虫特异性膜蛋白。同时通过 CBS 网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)的

相应分析工具软件预测目的蛋白的特征和功能。

蛋白序列同源性判断标准:① 同源序列为 E 值小于 10<sup>-3</sup>且长度不少于 80 个氨基酸,其序列相似性大于 20%;② 非同源性序列为 E 值大于 1 且长度小于 80 个氨基酸,其序列相似性小于 20%。

### 1.3 预测膜蛋白 sj15 编码序列的克隆

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 公布的预测序列(GenBank AY223457)设计 sj15 的一对引物。上游引物 P1 序列为 5'-TAG GAA TTC AGC GCT GAT AGT TGG GAT AAT C-3'[5'端加 *EcoR* I 切点(下划线为引物中引入的酶切位点)并去除起始密码 ATG](31 bp),下游引物 P2 序列为 5'-AAT CTC GAG GTA ACC CAT TCG CTC GTA ATG-3'[5'端加 *Xho* I (下划线为引物中引入的酶切位点)并去除终止密码子](30 bp),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.2 日本血吸虫成虫总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 首先采用 TRIzol 一步法提取日本血吸虫成虫(通过购买的阳性钉螺逸出尾蚴,再以 1 500 条尾蚴/只的剂量感染家兔,感染 45 d 后处死并自肝门静脉收集成虫)总 RNA,再取 5  $\mu$ l 总 RNA 作模板,按逆转录试剂盒说明操作合成 cDNA,作为预测蛋白基因 sj15 的 PCR 扩增模板。

1.3.3 PCR 扩增 PCR 扩增体系,总反应体积 25  $\mu$ l,在 500  $\mu$ l EP 管中加入 2  $\mu$ l cDNA 模板、上下游引物各 0.5  $\mu$ l、dNTP 2  $\mu$ l、10 $\times$ PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus)2.5  $\mu$ l、*Taq* 酶 0.25  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O(灭菌双蒸水)17.5  $\mu$ l,加 15  $\mu$ l 灭菌的液体石蜡后瞬时离心后置 PCR 仪中开始扩增。PCR 扩增反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,进入三温循环,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,32 个循环,72 $^{\circ}$ C 末端延伸 10 min。扩增反应结束后用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 终产物。

1.3.4 pGEX-4T-1-sj15 重组质粒的构建 用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后再次凝胶回收,进而将目的基因克隆到载体 pGEX-4T-1 并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,通过菌落 PCR 初步鉴定转化的克隆,再提取菌落 PCR 初步检测为阳性克隆的重组质粒,进而进行双酶切和 PCR 鉴定,1%的琼脂糖凝胶电泳检测。将双酶切和 PCR 鉴定均为阳性的克隆送大连宝生物工程有限公司测序。

## 2 结果

2.1 日本血吸虫特异性膜蛋白序列筛选结果 在

NCBI 网站通过关键词检索到 153 个日本血吸虫膜蛋白序列及理论推测的膜蛋白序列,将下载 的每个蛋白序列与本实验室建立并更新的人 类、曼氏血吸虫、大鼠、小鼠本地蛋白质数据库进 行多重比对分析。结果筛选出 28 个与人 类、大鼠或小鼠蛋白质序列相似性低的膜 蛋白序列,其中的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、sj97、sj66、serpin、paramyosin 等与曼氏血吸虫有较高同源性,且已作为日本血吸虫病疫苗候选分子得到深入研 究<sup>[6-7]</sup>。

2.2 Sj15 的筛选及其序列特征 在这 28 个候选膜蛋白中,GenBank 收录号为 AAP06493 的预测蛋白可能是一个抑制蛋白或变应原(hypothetical protein, putative profilin/allergen),其含有 129 个氨基酸残基,相对分子质量约 15 000,其编码序列(CDS)收录号为 AY223457,预测大小为 390 bp。为便于描述,暂将该蛋白定名为 sj15 蛋白,其编码基因定名为 sj15 基因。该蛋白的理论等电点为 6.0,理论相对分子质量为 14 400。

应用 CBS 网站的公共分析软件对 sj15 蛋白序列进行分析发现:BepiPred 1.0 软件预测该蛋白的第 1~7、第 31~42、第 102~112 氨基酸之间含有 3 个线性 B 细胞表位;NetCTL-1.2 软件预测该蛋白第 5~13、第 25~33、第 57~65、第 61~69、第 116~124 位氨基酸之间有 4 个 T 细胞表位;TMpred 预测在第 14~33 氨基酸之间有 1 个跨膜螺旋;NetPhosK 1.0 预测第 93 个氨基酸苏氨酸处有 1 个蛋白激酶磷酸化位点。

2.3 Sj15 基因的 PCR 扩增 Sj15 的 CDS 大小为 390 bp,加上设计引物时添加的酶切位点和保护性碱基,扩增片段理论大小应为 408 bp。本研究 PCR 扩增产物大小约为 400 bp,与预测大小基本一致(图 1)。

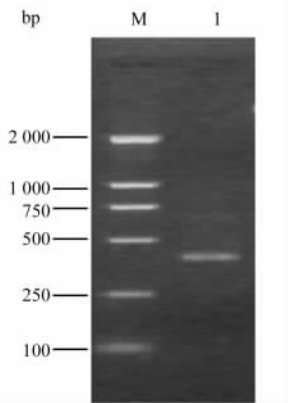


图 1 日本血吸虫膜蛋白 sj15 基因的 PCR 扩增结果

Fig 1 Electrophoresis of PCR product of sj15 gene of *S. japonicum*

M:DNA molecular weight marker DL2000;1:PCR product of sj15

2.4 Sj15 重组质粒的构建与鉴定 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后再次凝胶回收,将目的基因克隆到载体 pGEX-4T-1 中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,菌落 PCR 筛选阳性克隆,进行重组质粒双酶切鉴定,结果发现 PCR 产物及双酶切切割下来的插入片段大小均为 408 bp(图 2),与预期大小基本一致。阳性克隆测序结果与 GenBank 预测序列 AY223457 完全一致。

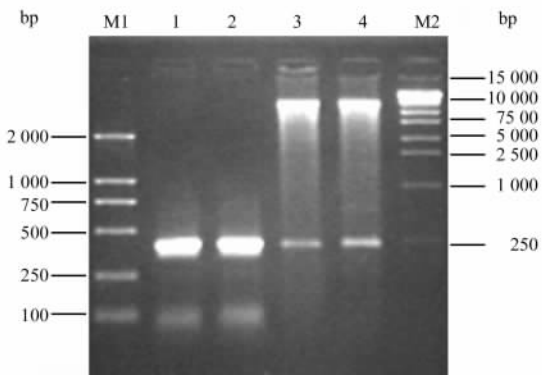


图 2 重组质粒的 PCR 及双酶切鉴定结果

Fig 2 Identification of PCR product and double restriction map of recombinant plasmid

M1:Molecular weight marker DL2000; M2:Molecular weight marker DL15000; 1,2: PCR product of recombinant plasmid; 3,4: *EcoR* I/*Xho* I double restriction map of recombinant plasmid

3 讨 论

血吸虫成虫的表皮(tegument)曾被认为是无活力,只是有保护作用的“角皮”。但深入的研究发现,它是覆盖整个虫体的合胞体(syncytium)结构,且具有代谢活力;从外到内由外质膜、远端胞质区、基质膜组成;除具有保护虫体作用外,还兼具吸收营养物质及感觉等生理功能。在结构上,体被可随环境条件、发育阶段的不同而有差别,也可出现更新。表皮在与宿主相互作用的过程中参与营养吸收、免疫逃避及免疫调节、排泄代谢产物、调节渗透压、感觉和信号转导等生理过程;更重要的是,从疫苗开发角度讲,表皮是血吸虫与宿主直接的接触面<sup>[8]</sup>。表皮中表达最丰富的膜蛋白四跨膜蛋白分子(tetraspanin superfamily, TM4SF)家族成员(如 Sm23、TSP-1、TSP-2、Sm04463、Sm07392)被证明是很好的疫苗抗原,四跨膜蛋白分子可能是宿主蛋白的受体<sup>[9-10]</sup>,与血吸虫的营养吸收和免疫逃避有重要关系。

随着血吸虫蛋白质组学研究的深入,对表皮中表达的蛋白质认识更为全面,这使得从表皮蛋白中筛选疫苗分子或药物靶标成为可能。尽管血吸虫绝

大部分营养依赖吞食红细胞获取, 但其在宿主内移行过程中表皮是摄取营养的主要结构, 尤其是在肝门脉系统中借助表皮中的各种转运蛋白(如转运糖类的 SGTP1 和 SGTP4 等)和离子通道维持其寄生生活的稳定, 吡喹酮就是通过破坏钙离子的稳态而发挥杀虫效应<sup>[11]</sup>。值得注意的是所有表皮蛋白中只有为数极少的含特定结构域(motif)(如信号肽或跨膜区等结构)的膜蛋白才真正“暴露”给宿主。

以往研究<sup>[9]</sup>一般采用人或动物感染血清免疫筛选 cDNA 表达文库中的分泌蛋白或膜蛋白作为疫苗候选分子, 虽然发现了一些较好的疫苗候选分子, 但这种方法略显盲目而费时费力。借助蛋白质组学特定的方法, 可以快速、特异、高通量地从预测序列中筛选出真正存在于表皮的功能蛋白。Liu 等<sup>[12]</sup>运用高通量的蛋白质组学方法预测出日本血吸虫 156 个成虫膜蛋白和 159 个肝期童虫膜蛋白, 但亚细胞定位提示大部分都是胞内蛋白。

本研究应用 NCBI 数据库平台, 共检索到 153 个日本血吸虫膜蛋白序列及理论推测的膜蛋白序列, 成功建立本地化日本血吸虫膜蛋白序列数据库; 结合本实验室的研究平台, 共筛选出 28 个可能的日本血吸虫特异性膜蛋白; 从日本血吸虫成虫中成功扩增出登录号为 AAP06493 的预测蛋白编码基因序列, 证实成虫中该蛋白的存在, 该蛋白预测相对分子质量为 15 000, 故暂命名为 sj15 基因, 并成功构建 pGEX-4T-1-sj15 重组质粒。重组质粒酶切鉴定时条带结果不很理想, 估计是制作凝胶时基质不均匀而使分子量标准 M2 的泳动减慢, 故图 2 显示该标准的 250 bp 条带明显慢于分子量标准 M1 中的相应条带。

Profilin 是哺乳动物大量表达的肌动蛋白结合蛋白, 可结合含多聚脯氨酸的蛋白、膜磷酸肌醇及肌动蛋白单体等, 除了主要参与肌动蛋白解聚外, 作为胞膜与胞内微丝系统信号转导通路的受体, 还参与 3,4-磷脂酰肌醇二磷酸和 2,3,4-磷脂酰肌醇三磷酸介导的信号转导<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>发现小鼠神经元特异表达的 profilin-2 可参与膜转运调节, 其过量表达能抑制细胞内吞作用, 而不表达或低表达则增强内吞作用及膜循环。以上结果表明, profilin 是真核细胞中有重要功能的蛋白质。本研究筛选、克隆的 sj15 蛋白是 Liu 等<sup>[12]</sup>预测的日本血吸虫表达膜蛋白, 理论推测为一种过敏原, 与 profilin 有相似的结构域, 但其与 profilin 是否具有同样的功能还有待进一步实验验证。

本研究成功建立本地化日本血吸虫膜蛋白序列数据库, 成功筛选出 28 个日本血吸虫特异性膜蛋白; 从日本血吸虫成虫中成功克隆出 GenBank 公布的预测的 sj15 基因, 证实了成虫体内该预测基因的存在, 成功构建原核表达载体, 并对该蛋白功能域进行了初步预测分析, 为进一步的功能研究奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] MacGregor A N, Kusel J R. Isolation and characterisation of a surface membrane glycoprotein from adult *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1989, 34: 237-244.

[2] Simpson A J, Smithers S R. Characterization of the exposed carbohydrates on the surface membrane of adult *Schistosoma mansoni* by analysis of lectin binding [J]. Parasitology, 1980, 81: 1-15.

[3] Dalton J P, Lewis S A, Aronstein W S, et al. *Schistosoma mansoni*: immunogenic glycoproteins of the cercarial glycocalyx [J]. Exp Parasitol, 1987, 63: 215-226.

[4] Bergquist R. Prospects of vaccination against *Schistosomiasis* [J]. Scand J Infect Dis Suppl, 1990, 76: 60-71.

[5] Simpson A J, Cioll D. Progress towards a defined vaccine for *Schistosomiasis* [J]. Parasitol Today, 1987, 3: 26-28.

[6] Zhang D M, Pan W Q, Qian L, et al. Investigation of recombinant *Schistosoma japonicum* paramyosin fragments for immunogenicity and vaccine efficacy in mice [J]. Parasite Immunol, 2006, 28: 77-84.

[7] McManus D P. Prospects for development of a transmission blocking vaccine against *Schistosoma japonicum* [J]. Parasite Immunol, 2005, 27(7-8): 297-308.

[8] Van-Hellemond J J, Retra K, Brouwers J F, et al. Functions of the tegument of *Schistosomes*: clues from the proteome and lipi-dome [J]. Int J Parasitol, 2006, 36: 691-699.

[9] Tran M H, Pearson M S, Bethony J M, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against *Schistosomiasis* [J]. Nat Med, 2006, 12: 835-840.

[10] Loukas A, Tran M, Pearson M S. *Schistosome* membrane proteins as vaccines [J]. Int J Parasitol, 2007, 37(3-4): 257-263.

[11] Greenberg R M. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action [J]? Int J Parasitol, 2005, 35: 1-9.

[12] Liu F, Lu J, Hu W, et al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum* [J]. PLoS Pathog, 2006, 2: e29.

[13] Moens P D, Bagatolli L A. Profilin binding to sub-micellar concentrations of phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate and phosphatidylinositol (3, 4, 5) trisphosphate [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768: 439-449.

[14] Gareus R, Di-Nardo A, Rybin V, et al. Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1 [J]. J Biol Chem, 2006, 281: 2803-2811.

[收稿日期] 2007-04-27 [修回日期] 2007-07-20  
[本文编辑] 贾泽军