

日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白全长 cDNA 的克隆、表达及保护性免疫评价

余俊龙 汪世平* 李文凯 戴 橄 徐绍锐 何 卓
彭先楚 周松华 刘雪琴

(中南大学湘雅医学院寄生虫学系, 长沙 410078)

摘要 根据 GenBank 日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(*SjSDISP*)不完整的表达序列标签(BU804141)以及日本血吸虫成虫 cDNA 文库载体多克隆位点邻近核苷酸序列设计引物, 以日本血吸虫成虫 cDNA 文库为模板, 采用锚式 PCR 策略, 对 *SjSDISP* cDNA 不完整的 3'端和 5'端进行扩增、测序, 用序列比对拼接电子软件比对, 基于重叠区进行序列合并, 获得 1071 bp 的 *SjSDISP* 全长 cDNA. 序列分析推断该片段含有编码 *SjSDISP* 基因的完整阅读框, 编码 278 个氨基酸残基. 将其编码基因克隆到原核表达载体 pQE30 上, 在大肠杆菌 M15 中获得准确、高效表达, 表达产物分子量约为 32 kD. 用日本血吸虫成虫抗原免疫血清对表达产物进行 Western blot 检测, 在预测位置上出现明显的识别条带. 用纯化的重组蛋白 r*SjSDISP* 免疫小鼠, 进行动物免疫保护性评价, 在虫荷、每克肝卵、每克粪卵和每雌子宫内卵数方面, 与佐剂对照组比较差异均具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$). 结果表明, 日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(*SjSDISP*)全长 cDNA 成功克隆并在大肠菌中得到表达; 表达产物具有良好的抗原性和动物免疫保护效果, 是一种潜在的具有部分免疫保护性的抗日本血吸虫病疫苗候选分子.

关键词 日本血吸虫 琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 基因克隆 基因表达 免疫保护

血吸虫病是一种严重危害人类健康的人畜共患寄生虫病, 全球有 76 个国家和地区流行血吸虫病, WHO 估计全球有 6 亿人受到血吸虫病感染的威胁, 有 2 亿人受到感染. 我国仅有日本血吸虫病流行, 主要分布于长江以南的 12 个省市、自治区的一些地区^[1,2]. 目前, 仍有上百万人和各种家畜受到感染. 虽然疫区人畜同步化疗及易感地带灭螺, 使血吸虫病疫情大为降低, 但由于湖区钉螺难以消灭, 保虫宿主等多种原因, 血吸虫病的传播仍然难以阻断, 急性重

复感染时有发生^[3]. 单一化疗药物吡喹酮的长期使用, 面临耐药性虫株的产生的威胁. WHO 热带病研究特别规划署(TDR)提出应加强血吸虫病疫苗的研究. 近年国内外研究者在血吸虫病疫苗的研制方面取得了可喜的成绩, 根据曼氏血吸虫(*Shistosoma mansoni*)抗原分子纯化或重组蛋白质的保护水平、诱导效应等多种因素, 提出了 6 种最具潜力的疫苗候选分子, 它们分别是谷胱苷肽-S-转移酶(GST)、副肌球蛋白(paramyosin, Sm97)、照射减毒抗原 5(Irv-5)、磷酸丙糖异构酶

收稿日期: 2006-06-23; 接受日期: 2006-09-27

国家“十五”重大科技专项(2002AA2Z3343)、国家高技术研究发展计划(“863”项目)(2004AA2Z3530)、湖南省“十一五”重大专项(2006SK1001)和湖南省重点学科建设专项(03-985-3-7)资助

* 联系人, E-mail: wsp4373383@126.com

(TPI)、完整膜蛋白(Sm23)和脂肪酸结合蛋白(FABP, Sm14), 其中 5 种是胞浆蛋白, 1 种为膜蛋白^[4]。1998 年 TDR 对这 6 种疫苗候选分子进行了独立效果评价, 虽然证实这些疫苗候选分子均能诱导宿主产生部分保护性免疫作用, 但均未能获得 40% 以上的保护作用。因此, 血吸虫疫苗候选分子的寻找成为人们关注的焦点。Garcia 等人^[5]用新鲜未成熟活卵, 反复致敏 BALB 小鼠, 诱导抗卵胚发育效应。此后汪世平等^[6]证明, 未成熟卵可溶性抗原(soluble immature egg antigen, SIEA)及其 SIEA 26~28 kD 组分具有明显的抗虫卵胚胎发育和抗雌虫生殖产卵效果。2000 年, 在全国统一血吸虫疫苗抗原免疫效果统一试验, 盲法考核评价中, 本课题组提供的未成熟卵天然分子疫苗(1 号)在 16 种被检测的疫苗中获得最佳动物保护效果: 53.9% 减雌雄合抱率和 89.3% 肝减卵率^[7]。1 号疫苗的主要成分之一为日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原 26~28 kD 分子(SjSIEA 26/28)。已有研究表明, SjSIEA26/28 被认为是抗日本血吸虫生殖和卵胚发育的疫苗候选分子^[6]。

由于从血吸虫未成熟虫卵中获取足够用于天然 SjSIEA26/28 抗原满足疫苗的现场应用十分困难, 拟用分子生物学技术和手段, 借助工程菌对其进行表达。近几年本室借助蛋白质组学等研究手段, 对 SjSIEA26/28 进行了深入分析, 发现此组分由 10 多个不同的蛋白质分子组成, 其中一蛋白质分子与日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白(SjSDISP)同源性最高^[8]。SjSDISP 是否是 SjSIEA26/28 中抗生殖和卵胚发育的主要分子是人们感兴趣的问题。由于 SjSDISP 全长 cDNA 不清楚, 本课题组用锚式 PCR 策略, 克隆了 SjSDISP 全长 cDNA, 成功构建了 pQE30/SjSDISP 原核重组质粒, 并在大肠杆菌中获得高效表达。Western blot 分析表明, 表达产物具有良好的抗原性, 可用作抗血吸虫病疫苗候选分子的潜能评价。

1 材料与与方法

1.1 实验动物

雌性 6~8 周龄 BALB/c 鼠和新西兰大白兔由中南大学湘雅实验动物中心提供, 用专用饲料饲养在湘雅动物实验中心隔离环境。所有实验动物用于实验前适应环境一周, 实验人员严格遵守湘雅动物实验中心动物使用规程。

1.2 血吸虫和抗血清准备

阳性湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)购自湖南省岳阳血吸虫病防治研究所。从人工感染约 2000 条 Sj 尾蚴后 42 天的健康新西兰大白兔门脉内冲虫, 分离出雌性成虫, 生理盐水洗净, 反复冻融, 冰浴匀浆, 10000 r/min 离心 10 min, 上清即为 Sj 雌虫可溶性抗原。测定蛋白质浓度后, 在 0, 2, 4 周分别于新西兰大白兔颈、背部皮下多点注射经 FCA 或 FIA 乳化的雌虫可溶性抗原, 每次 0.3 mg, 末次免疫后第二周经耳缘静脉采血, ELISA 法测定抗体效价。免疫血清使用前用大肠杆菌 pQE30/M15 裂解液吸附 3 次, 以除去抗大肠杆菌抗体等非特异性成分。

1.3 日本血吸虫成虫 cDNA 文库、质粒、细菌及生化试剂

日本血吸虫中国大陆株成虫 cDNA 文库由南京医科大学陈淑贞教授构建, pQE30 原核表达质粒、大肠杆菌 M15, Y1090 由中山大学医学院吴忠道教授惠赠。限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I, T₄DNA 连接酶、ExTaqDNA 聚合酶、质粒提取试剂盒及 DNA marker 均为大连 TaKaRa 公司产品; 用于 Western blot 和 dot-ELISA 的辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG 系晶美公司产品; 其它试剂, 如氨苄青霉素, IPTG, DTT 等为美国 Sigma 公司产品。

1.4 模板准备

将一定量日本血吸虫中国大陆株成虫 cDNA 文库包装液接种到适量过夜培养的大肠杆菌 Y₁₀₉₀ 中, 先 37℃ 预吸附 20 min, 然后加入含有 MgSO₄, 氨苄青霉素、麦芽糖的 55℃ 平衡的顶层琼脂中, 快速混匀后倒入直径为 8 cm 的 LB 琼脂培养皿中, 42℃ 培养 4 h, 每皿加 3 mL SM 液, 4℃ 轻摇过夜。收集上清, 5000 r/min 室温离心 5 min, 取上清加入 20% PEG 混匀, 室温放置 30 min 后 12000 r/min 室温离心 15 min, 沉淀中加入 100 μL 双蒸水, 沸水浴 5 min, 使噬菌体 DNA 变性, -20℃ 保存备用。

1.5 引物

根据文库载体多克隆插入位点上下游邻近区核苷酸序列设计上下游通用引物 P1, P2; 根据序列号为 BU804141 的 EST 5'端和 3'端核苷酸序列设计特异引物分别为 P3, P4; 根据全长 cDNA 序列阅读框起始密

码子和终止密码子附近的核苷酸序列,再设一对分别带限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 的引物 P5 和 P6. 以上引物由大连 TaKaRa 公司合成. 引物序列为: P1: 5'-gggtggcgcagcactcctggagccc-3', P2: 5'-ttgacaccaggccaactggaatg-3' P3: 5'-agggccacagctggtgaggtcaac-3', P4: 5'-cgtccacatattcgtccgaattg-3' P5: 5'-gcgatccatctgaagtc-tctatctac-3', P6: 5'-acgtcgcactcagtcagttctgtctccg-3'.

1.6 锚式 PCR 扩增与全长 cDNA 的获得

*Sj*SDISP 5'端锚式 PCR 扩增: PCR 体系 100 μ L, 引物 P1 和 P3 各 2 μ mol/L, 成虫 cDNA 文库模板 0.2 μ g, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 10 μ L, ExTaq 酶 1 μ L, 10 \times ExTaq buffer 10 μ L. 96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环; *Sj*SDISP 3'末端锚式 PCR 扩增: 引物为 P4 和 P2, PCR 条件是 96 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 61 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环. PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定分子量大小, 根据同源基因估计, 对符合目的条带大小的片段进行回收, 送大连 TaKaRa 公司进行 DNA 测序. 最后将扩增到的 5'端和 3'末端序列与原 EST(BU804141)进行比对, 基于重叠区进行序列合并, 并对所获序列进行全长 cDNA 序列分析.

1.7 全长编码基因的克隆与重组质粒构建

全长 cDNA 获得以后, 以 P5 和 P6 为引物, 以 cDNA 文库为模板进行全长编码基因的 PCR 扩增, 反应条件同 *Sj*SDISP 3'末端锚式 PCR 扩增. 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 同时双酶切目的片段及原核表达质粒 pQE30, 用凝胶回收试剂盒对双酶切产物进行回收后; 将已双酶切的目的片段与线性质粒在 T₄ DNA 连接酶作用下 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 然后转化感受态大肠杆菌 M15; 将转化产物涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂皿, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取菌落接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜, 抽提质粒, 进行 PCR, 双酶切鉴定和测序验证.

1.8 蛋白的表达与纯化

将经双酶切和测序鉴定正确的重组菌 pQE30/*Sj*SDISP 及空质粒 pQE30 转化菌, 接种至含终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素 LB 液体培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 A₆₀₀ 为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 置 28 $^{\circ}$ C 摇床轻摇 4~5 h, 按常规方法提取菌

体蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析. 电泳结束后, 将胶用预冷的 0.1 mol/L KCl 处理 5~10 min, 根据蛋白分子量标准和表达产物考马斯亮蓝染色结果, 准确切取电泳分离的融合蛋白条带, 将胶条切成小块, 进行电渗处理, 然后 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 超滤浓缩, 测定蛋白质浓度后, -70 $^{\circ}$ C 贮存备用.

1.9 表达产物的 Western blot 分析

参照文献 [9]描述, 将表达的融合蛋白通过 12% SDS-PAGE凝胶电泳后, 可直接用考马斯亮蓝染色观察分离蛋白条带, 也可将分离胶电转印到硝酸纤维素膜上, 用经 pQE30 载体转化的大肠杆菌裂解液吸附过的日本血吸虫成虫可溶性抗原免疫血清作第一抗体(1:200), 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 作二抗(1:5000), 进行 Western blot 检测.

1.10 免疫和免疫保护效果评价

动物免疫保护性实验参照文献 [10]提供的方法进行. 30 只 BALB/c 小鼠随机分成 3 组: A 组为 r*Sj*GST 阳性对照, B 组为 r*Sj*SDISP 实验组, C 组为 FCA 对照组. 每只鼠每次免疫经佐剂乳化的重组蛋白 100 μ g/100 μ L, 首次免疫用福氏完全佐剂, 加强免疫用福氏不完全佐剂, 每隔 2 周同量加强免疫 1 次, 第 3 次免疫后第 2 周, 采用 dot-ELISA 法 [2]测定免疫各组血清特异性抗体效价后, 经腹部皮肤攻击感染日本血吸虫尾蚴(40 \pm 2)条. 感染后第 42 天处死小鼠, 经左心室-肝门静脉灌注, 收集血吸虫成虫并计算减虫率; 同时取每只肝脏称重、组织均浆, 于 37 $^{\circ}$ C, 10% NaOH 消化过夜, 取 50 μ L 涂片两张, 镜检全部虫卵数, 计算每克肝虫卵数; 雌虫子宫内虫卵计数按以下方法进行: 将从门静脉收集到的成虫放入生理盐水中, 雌雄合抱的成虫立即分开, 将雌虫夹在两片载玻片中, 轻轻按压后置低倍显微镜下计算每雌虫子宫内虫卵数; 每克粪卵数采用 Kato-Katz 法进行. 减虫率和减卵率计算公式为: 减虫率(%)=(1-实验组检获成虫均数/对照组检获成虫均数) \times 100%, 减卵率(%)=(1-实验组检获虫卵均数/对照组检获虫卵均数) \times 100%.

1.11 统计学分析

统计分析采用 SPSS10.0 软件. 实验数据以均数 \pm 标准差表示, 组间均数比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为差异有显著性.

2 结果

2.1 目的基因全长 cDNA 的获得和重组表达质粒的构建

SjSDISP 5'端和 3'末端锚式 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分别可见 350 和 150 bp 的条带, 胶回收产物送大连 TaKaRa 公司进行测序, 所得序列与原琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白 EST(BU804141)进行比对, 结果发现 5'末端产物有 24 bp 碱基与之完全重叠; 3'末端产物有 27 bp 碱基与之完全重叠, 表明是所要的目的片段. 基于重叠区, 用电子软件将上述三者连接后得到一个总长为 1071 bp 的 cDNA. 序列分析表明, 此序列为 *SjSDISP* 全长 cDNA, 并送 GenBank 登录, 登录号为 AY841892(图 1).

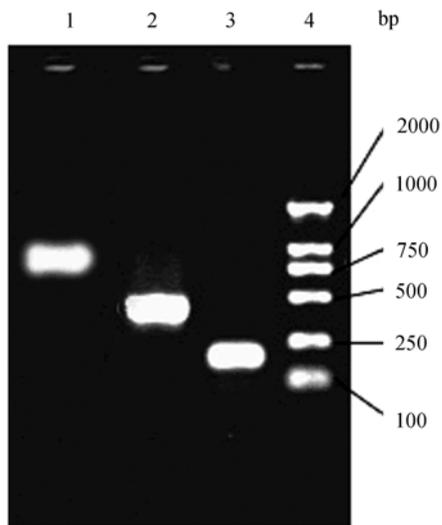


图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

1 示 *SjSDISP* 全长 cDNA ORF; 2 示 *SjSDISP* 5'端锚式 PCR 产物; 3 示 *SjSDISP* 3'端锚式 PCR 产物; 4 示 DL2000 DNA marker

以日本血吸虫成虫 cDNA 文库为模板, P5 和 P6 为引物, 对 *SjSDISP* 全长编码基因(coding sequence, CDS)进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在 750~1000 bp 之间出现单一条带, 图中条带位置与理论预测值 837 bp 大小一致(图 1). 经 *Bam*H I, *Sal* I 双酶切后, 将目的基因定向克隆入 pQE30 原核表达质粒, 构建 *SjSDISP/pQE30* 原核重组表达载体. 用构建的重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增, 能得到与目的基因片段大小一致的产物; 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sal* I 内切酶双酶切, 1% 琼脂糖电泳可检测到与插入

片段大小一致的条带(图 2). 重组质粒 DNA 测序结果显示: 插入片段与目的基因 *SjSDISP* ORF 完全一致.

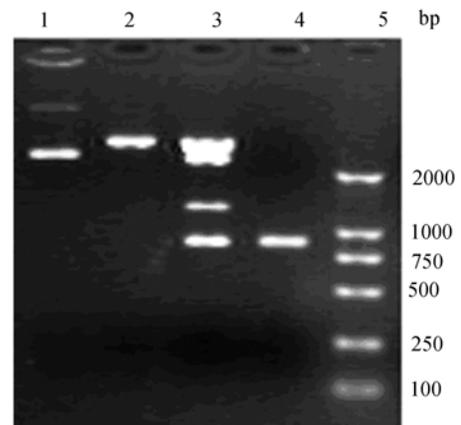


图 2 pQE30/*SjSDISP* 重组体内切酶和 PCR 鉴定

1 示 pQE30 质粒; 2 示经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 pQE30 质粒; 3 示经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 pQE30/*SjSDISP* 重组质粒; 4 示以 pQE30/*SjSDISP* 重组质粒为模板, P5/P6 为引物的 PCR 扩增产物; 5 示 DL2000 DNA marker

2.2 重组蛋白表达、纯化和免疫活性测定

经 IPTG 诱导, 6×His-目的基因融合蛋白在 *SjSDISP/pQE30* 转化的大肠杆菌 M15 中表达, 细菌裂解物经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色, 观察转化菌株诱导前、后 *SjSDISP* 重组蛋白的诱导表达. 结果显示, 28℃ 温度下, 经 1 mmol/L IPTG 诱导后, pQE30 转化菌株因 6×His 分子量太小, 诱导前后无明显差异; *SjSDISP/pQE30* 转化菌株, 存在特有的 6×His-融合蛋白表达, 诱导 4~5 h 可检测到蛋白有较高水平表达, 蛋白分子量大小约为 32 kD, 与理论预测的 *SjSDISP* 编码蛋白分子量大小一致, 并能被成虫可溶性抗原多克隆免疫兔血清识别, 表明 *SjSDISP* 编码基因在大肠杆菌中表达成功且具有抗原性(图 3). 在大肠杆菌中表达的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用预冷的 0.1 mol/L KCl 处理, 凝胶中蛋白条带清晰可见, 根据蛋白分子量标准和表达产物考马斯亮蓝染色结果, 准确切取融合蛋白带, 将胶块切成小块, 进行电渗处理, 然后透析过夜, 超滤浓缩, 可得到单一条带电泳纯重组表达蛋白, 测定蛋白质浓度后, -70℃ 保存, 可用于下一步动物免疫保护性等研究.

2.3 rSjSDISP 免疫保护性实验

攻击感染前一天, 按文献 [7] 介绍的方法, 用 50

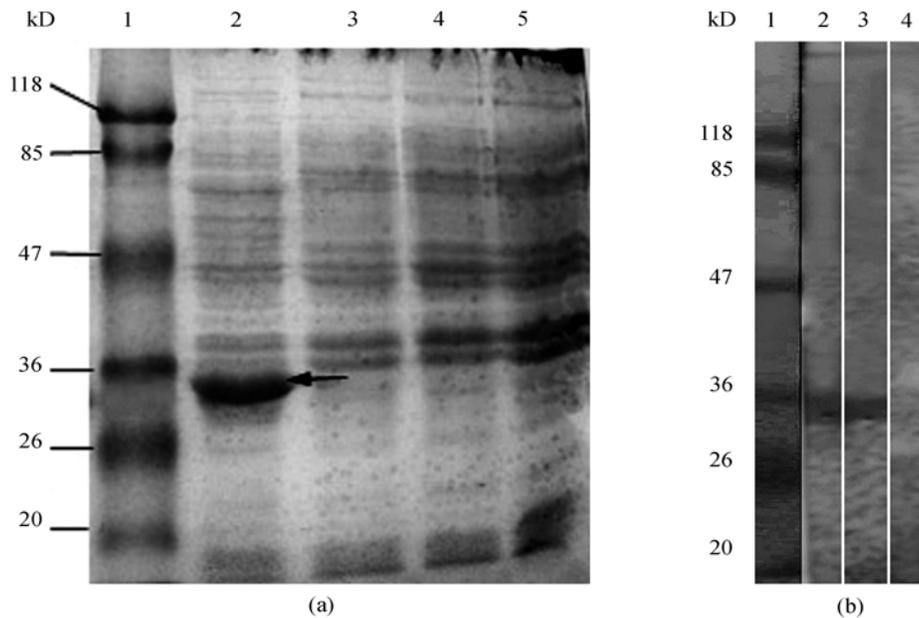


图 3 重组表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

(a) 1 示 Protein marker; 2 示 IPTG 诱导重组菌; 3 示未经 IPTG 诱导重组菌; 4 示未经 IPTG 诱导 pQE30 转化菌; 5 示 IPTG 诱导 pQE30 转化菌; (b) 1 示 Protein marker; 2, 3 示成虫可溶性抗原免疫兔血清; 4 示正常兔血清

$\mu\text{g/mL}$ 纯化的 rSjSDISP 和 rSjGST 重组蛋白包被 NC 膜, 每片 $5 \mu\text{L}$, 采用 dot-ELISA 法检测免疫 3 次后小鼠血清中特异性抗体效价. 结果显示, rSjSDISP 和 rSjGST 重组蛋白免疫组小鼠血清特异抗体效价均约为 1:3200(图 4), 与 FCA 对照组比较差异均具有显著性. 攻击感染后第 42 天, 收获小鼠 24 h 粪便, 处死小鼠, 收获成虫和小鼠肝脏, 对成虫和虫卵进行计数, 运用统计学软件对各组小鼠检出的虫荷和虫卵数进行分析, 所得结果见表 1. 从表中可以看出, rSjGST 和 rSjSDISP 免疫组在检获的每克肝卵、虫荷、每克粪卵及每雌虫子宫内卵数等方面, 与 FCA 对照组比较, 差异均显著有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$).

3 讨论

在通常情况下, 大多数寄生虫在离体自由生活阶段靠有氧代谢获得能量, 在寄生阶段并不是利用宿主体内的可能氧分, 而是用一些非氧化磷酸化途径合成 ATP. SDISP 作为细胞三羧酸循环限速酶之一的琥珀酸脱氢酶的亚单位成分, 主要参与脱氢和传递电子等能量代谢过程 [11,12]. Smith 等人研究认为, 三羧酸循环酶类在曼氏血吸虫尾蚴体内有较高活性, 而雌雄合抱的曼氏血吸虫和日本血吸虫成虫三羧酸循环酶类表达水平及活性均较离体自由生活的尾蚴阶段低, 推测糖酵解途径可能是曼氏血吸虫和日本血吸虫成虫能量的主要来源; 在雌雄合抱虫体内, 日

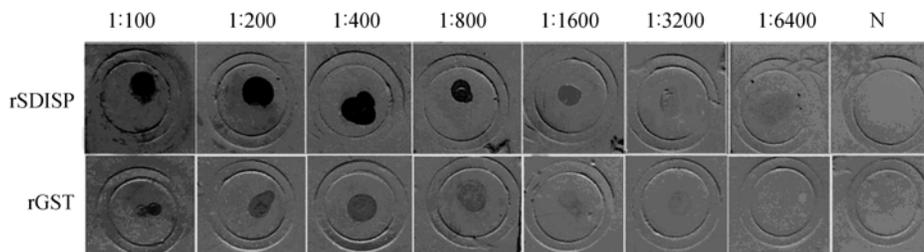


图 4 dot-ELISA 检测 rSjSDISP 和 rSjGST 免疫小鼠特异性抗体效价

N: 1:100 FCA 免疫鼠血清

表 1 *rSjGST* 和 *rSjSDISP* 免疫小鼠对日本血吸虫尾蚴攻击感染的保护性效果^{a)}

	FCA 阴性对照	阴性对照减少百分率/%	<i>rSjSDISP</i> 组减少百分率/%	P 值
样本数	10	10	10	
每克肝卵($\times 10^3$)	28.40 \pm 3.52	17.58 \pm 2.82(38.06)	17.03 \pm 1.91(40.00)	<0.01
虫荷	30.00 \pm 2.98	24.00 \pm 4.11(20.00)	23.78 \pm 3.77(20.60)	<0.05
每克粪卵	2828.28 \pm 466.18	1562.13 \pm 404.04(44.77)	1711.81 \pm 289.57(39.48)	<0.01
每雌虫子宫内卵	192.60 \pm 67.44	152.11 \pm 62.03(20.83)	156.67 \pm 41.17(18.66)	<0.05

a) *rSjGST* 和 *rSjSDISP* 免疫组在检获的每克肝卵、虫荷数、每克粪卵及每雌虫子宫内卵数方面, 与 FCA 对照组比较, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$)

本血吸虫琥珀酸脱氢酶活性比曼氏血吸虫高出 2 倍以上. 据此认为SDISP在血吸虫体内具有种特异性和阶段性^[13]. 如果单从用作化疗靶标的角度考虑, 设想通过调控SDISP的表达或抑制其活性, 达到减少体内虫荷或抑制血吸虫雌虫产卵的目的, 可能难以奏效; 但从生物进化和疫苗角度考虑, 可能是一种重要的疫苗候选分子. 众所周知, 尾蚴断尾进入皮肤, 以童虫形式在组织中移行, 最后在门静脉系统发育为成虫, 是血吸虫入侵宿主过程中的 3 个主要阶段. 在这 3 个阶段中, 尾蚴阶段以独立方式生活, 虫体能量来源主要是有氧氧化, 因此, 琥珀酸脱氢酶等三羧酸循环限速酶功能的正常发挥是尾蚴的体外生存所必需的. 进入宿主体内后, 生存环境发生了变化, 酵解途径可能成为其体内能量的重要来源. 琥珀酸脱氢酶等三羧酸循环限速酶类出现“用进废退”现象, 可以推测在童虫阶段, 三羧酸循环限速酶类表达水平较尾蚴阶段有所下降, 发育至成熟的成虫阶段表达水平最低, 具阶段性或部分阶段性; 另外, 童虫阶段是由体外生活变成体内寄生的转型期, 虫体各方面表现较为脆弱, 是化疗和疫苗应用的首选阶段, 虽然此阶段SDISP表达水平有所下降, 但降幅理应不大, 这为疫苗的应用创造了良好条件.

目前, 关于SDISP文献报道众多^[14-16], 但*SjSDISP*序列, 特别是其全长cDNA仍不清楚, 并且血吸虫研究领域未见有关此酶用作候选疫苗的文献报道. 本研究以日本血吸虫成虫cDNA文库为模板, 以*SjSDISP*表达序列标签(BU804141)和文库载体多克隆位点序列为依据, 设计引物, 对目的基因EST不完整的 3'和 5'末端进行锚式PCR扩增, 分别获得大小为 350 和 150 bp两DNA片段, 与原EST进行比对, 基于重叠区合并, 获得一总长为 1071 bp 的序列. 此序列含有 3 个可能的阅读框(ORF), 其中最长的ORF长 837 bp, 起始密码子ATG位于 106~108 bp, 终止密码子

TGA位于 940~942 核苷酸, 紧随其后的 949~951 处出现另一终止密码子TGA, 编码 278 个氨基酸残基, 理论推导编码蛋白分子量约为 32 kD, 等电点为 8.57. 起始密码子邻近序列(TCAGAATGCT), -3 位为A, -4 位为C, 符合Kozak规则^[17]. ORF前后分别有 105 和 118 bp非编码区, 1036 处出现ATTTAA加尾信号, 3'端 1060 处有较长的poly(A)尾, 同一阅读框架下起始密码子前的第 7~9 bp处有一终止密码子TAA. 据此推断该片段为日本血吸虫琥珀酸脱氢酶铁硫蛋白的全长cDNA. *SjSDISP*全长cDNA的获得, 对研究和开发日本血吸虫候选疫苗具有重要意义.

本研究将*SjSDISP*全长编码基因克隆到原核表达质粒pQE30 相应的酶切位点中, 成功构建了原核重组质粒(图 2), 并在大肠杆菌中得到良好表达. Western blot和dot-ELISA表明, 表达产物具有良好的抗原性. 用*rSjSDISP*, WHO热带病研究特别规划署(WHO/TDR)推荐的最具潜力的血吸虫疫苗候选分子之一的*rSjGST*和FCA免疫小鼠 3 次, 间隔 2 周, 第 3 次免疫后第 2 周测定血清特异抗体效价. 同时进行日本血吸虫尾蚴攻击感染, 结果表明: *rSjSDISP* 和 *rSjGST*重组蛋白免疫组在虫荷、每克肝卵、每克粪卵和每雌虫子宫内虫卵数方面均低于对照组, 且与对照组比较, 差异均具有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$). *rSjSDISP*是*SjSIEA* 26~28 kD组分中 10 多个不同蛋白分子中的 1 个分子, 虽然对日本血吸虫尾蚴攻击感染的免疫保护力不如*SjSIEA* 26~28 kD组分强, 但单一分子的免疫保护性效果还是令人鼓舞的, 具有进一步研究与开发价值. 其减卵率明显高于减虫率, 表明*SjSDISP*分子可能主要在抗血吸虫卵胚发育或抗生殖方面起重要作用, 这与本室前期工作基本一致^[6]. 本研究的完成为下一步对于*SjSIEA* 26~28 kD中其它分子的克隆、表达及多价复合疫苗的研制打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Wu Z D, Lu Z Y, Yu X B. Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: a review. *Acta Trop*, 2005, 96(2-3): 106—116 [DOI]
- 2 宫 鹏, 徐 冰, 梁 松. 用遥感和地理信息系统研究传染病的时空分布. *中国科学, C 辑*, 2006, 36(2): 184—192
- 3 Yan Y T, Liu S X, Song G C, et al. Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from *Schistosoma japonicum* (Sj serpin). *Vet Parasitol*, 2005, 131(1-2): 53—60 [DOI]
- 4 Zhang Y B, Taylor M G, Bickle Q D. *Schistosoma japonicum* myosin: cloning, expression and vaccination studies with the homologue of the *S. mansoni* myosin fragment IrV-5. *Parasite Immunology*, 1998, 20(12): 583—594 [DOI]
- 5 Carcia E G, Mitchell G F, Rivera P T, et al. Evidence of anti-embryonation immunity and egg destruction in mice sensitized with immature eggs of *Schistosoma japonicum*. *Asian Pac J Allergy Immunol*, 1987, 5(2): 137—141
- 6 汪世平, 周汨波, 沈国励, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26/28kDa 抗原诱导抗雌虫生殖和抗卵胚发育免疫的研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1997, 15(2): 79—83
- 7 Yu J L, Wang S P, He Z, et al. Cloning, expression and immunization of the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Schistosoma japonicum*. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(7): 665—672
- 8 Wang S P, Liu L P, Tan Y W, et al. Analysis of SIEA and SIEA 28kDa antigen in *Schistosoma japonicum* by Two-dimensional gel electrophoresis. *中国血吸虫病防治杂志*, 2003, 16(1): 8—12
- 9 Zhu J G, Lin J J, Feng X G, et al. Cloning and expression of Actin gene of *Schistosoma japonicum* Chinese strain. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(5): 545—549
- 10 陈利玉, 易新元, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫新基因的筛、克隆、表达及免疫保护效果研究. *生物化学与生物物理进展*. 2005, 32(4): 331—337
- 11 Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 1985, 54: 1015—1069 [DOI]
- 12 Kita K, Hirawake H, Miyadera H, et al. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1553(1-2): 123—39 [DOI]
- 13 Smith T M, Brown J N. Tricarboxylic acid cycle enzyme activities in adult *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Tran R Soc Trop Med Hyg*, 1977, 71(4): 329—320
- 14 Suraveratun N, Krungkrai S R, Leangaramgul P, et al. purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000, 105(2): 215—222 [DOI]
- 15 Leckschat S, Ream-Robinson D, Scheffler I E. The gene for the iron sulfur protein of succinate dehydrogenase (SDH-IP) maps to human chromosome 1p35-36.1. *Somat Cell Mol Genet*, 1993, 19(5): 505—511 [DOI]
- 16 Au H C, Scheffler I E. Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene--both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur J Biochem*, 1998, 251(1-2): 164—174 [DOI]
- 17 Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol*, 1989, 108(2): 229—241 [DOI]