

# 猪蛔虫感染期幼虫抑制消减 cDNA 文库的构建

黄翠琴<sup>1</sup>, 陈 宁<sup>1</sup>, 张新高<sup>2</sup>, 林瑞庆<sup>1</sup>, 宋慧群<sup>1</sup>, 朱兴全<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510640; . 深圳市南山区动物防疫监督所, 深圳 518051)

**摘要:** 为筛选与线虫感染性相关的基因, 本研究以猪蛔虫为对象, 构建猪蛔虫感染期幼虫差异表达消减 cDNA 文库, 为研究线虫期特异性发育的分子机制奠定基础。分别提取感染期幼虫和其它各期幼虫及成虫的总 RNA, 纯化 mRNA 后, 采用 Clontech 公司 PCR-select<sup>TM</sup> 试剂盒进行反转录合成 cDNA 并进行抑制消减杂交 (SSH), 构建猪蛔虫感染期幼虫差异表达的消减 cDNA 文库, 并采用 Southern 斑点杂交进行消减效率的检测。随机从文库中抽取 45 个克隆进行测序及在线 BLAST 分析。试验结果表明, 感染期幼虫差异表达的消减 cDNA 文库具有较强的特异性; 在得到的 41 个 ESTs 中, 有 40 个 ESTs 与已报道的基因有较高的相似性, 主要代表猪蛔虫第三期幼虫基因和成虫头部基因, 有 1 个 cDNA 片段可能代表新基因。猪蛔虫感染期幼虫差异表达的消减 cDNA 文库的成功构建, 为进一步研究幼虫发育差异表达基因的功能奠定了基础。

**关键词:** 猪蛔虫; 感染期幼虫; 抑制消减杂交; 差异表达基因; 消减 cDNA 文库; 斑点杂交

**中图分类号:**           **文献标识码:** A           **文章编号:** 0336-6964(2007)08-0000-00

## Construction of a Subtractive cDNA Library for Infective Larvae of *Ascaris suum*

HUANG Cui-qin<sup>1</sup>, CHEN Ning<sup>1</sup>, ZHANG Xin-gao<sup>2</sup>, LIN Rui-qing<sup>1</sup>,

SONG Hui-qun<sup>1</sup>, ZHU Xing-quan<sup>1\*</sup>

(1. Laboratory of Parasitology, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Nangshan Institute of Animal Diseases Prevention and Control, Shenzhen 518051, China)

**Abstract:** The objective of present study was to construct a subtractive cDNA library for infective larvae of *Ascaris suum*, for the identification and cloning of differentially expressed genes in infective larvae of *A. suum*. The subtractive cDNA library for infective larvae of *A. suum* was constructed with the technique of suppression subtractive hybridization (SSH) using the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech) after subtraction with cDNAs representing other developmental stages (adults, eggs, L3 and late L3). The specificity of the constructed archives was determined using Southern dot blot, followed by sequencing of 45 random clones showing significant expression in the infective stage. The results showed that the the subtractive cDNA library for infective larvae of *A. suum* specific was highcy as confirmed by Southern Dot Blot. 40 of the 41 valid ESTs had significant similarities with that of other known genes, mainly representing L3 genes and female head gene of *A. suum*. One EST may represent a new gene. The successful construction of the subtractive cDNA library for infective larvae of *A. suum* provides a foundation for further studies of genes related to the infectivity and migration of *A. suum* larvae.

**Key words:** *Ascaris suum*; infective larvae; subtractive spression hybridization (SSH); differentially expressed genes; subtractive cDNA library; dot blot

收稿日期: 2006-11-16

基金项目: 国家自然科学基金(30671578); 国际科学基金项目(IFS, B/4018-1); 广东省科技计划项目(2004B50201020)

作者简介: 黄翠琴(1978-), 女, 福建宁化人, 博士生, 主要从事分子寄生虫学研究。

\* 通讯作者: 朱兴全, 博士, 教授, Email: xingquanzh@scau.edu.cn

寄生线虫是寄生于人和动物的一类重要的寄生虫,严重危害人和动物的生命、健康,并给国民经济造成严重损失。长期以来,对寄生线虫的防治主要依靠药物,但由于寄生线虫的耐药性、幼虫对宿主体内环境的适应、疫苗的保护性弱、免疫逃避等现象,导致寄生线虫病仍未得到有效的控制<sup>[1]</sup>。因此,寻找新的途径来控制寄生线虫病已刻不容缓。如能选择性地抑制或阻断寄生线虫与入侵、感染相关基因的表达,则可抑制其入侵宿主和在宿主体内的移行,从而有效地控制寄生线虫病的传播、流行。

抑制消减杂交技术(SSH)是将消减杂交和抑制 PCR 结合的一种筛选差异基因的方法,该方法具有高度的敏感性<sup>[2]</sup>,已成功应用于各个领域的研究<sup>[3~8]</sup>。本研究以猪蛔虫作为研究对象,利用该技术构建猪蛔虫感染期幼虫的消减 cDNA 文库,从中筛选感染期幼虫差异表达基因,从而为进一步研究幼虫发育差异表达基因的功能奠定基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 各期猪蛔虫的收集

从深圳某屠宰场采集猪蛔虫成虫,鉴别雌雄后,雄虫和部分雌虫存于 $-86^{\circ}\text{C}$ 备用,剩余雌虫解剖其子宫,将子宫内的受精虫卵部分存于 $-86^{\circ}\text{C}$ 备用,部分体外培养至感染期,取部分感染性虫卵体外脱鞘获得感染期幼虫,其它用于感染小猪,从其肝、肺和小肠中获得第三期(L3)和第四期(L4)幼虫<sup>[9,10]</sup>,全部存于 $-86^{\circ}\text{C}$ 备用。

### 1.2 各期虫体总 RNA 和 mRNA 的提取

取备用的猪蛔虫各期虫体,用 RNA 提取试剂盒( TRIzol™, 美国 Gibcol 公司)分别提取总 RNA,将受精虫卵、L3、L4 和雌雄虫的总 RNA 等量混合作为混合虫体的总 RNA,用 mRNA 纯化试剂盒(德国 Qiagen 公司)分离感染期幼虫和混合虫体的 mRNA。提取的 mRNA 经分光光度计检测吸光度( $A_{280}$ )后用于构建文库。

### 1.3 抑制消减杂交

按 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech)说明书进行。首先分别取约  $2\mu\text{g}$  mRNA 合成猪蛔虫感染期幼虫和混合虫体的双链 cDNA,然后分别经 *Rsa* I 酶切消化后,纯化,加上接头(adaptor)并分析接头的连接效率;以感染期幼虫的酶切 cDNA 加接头为受试子(Tester)、未加接头的混合虫体的酶切 cDNA 为驱逐子(Driver),经过

$68^{\circ}\text{C}$  8 h 和 20 h 两轮消减杂交后,然后进行两轮抑制性 PCR,获得特异性扩增的感染期幼虫 cDNA(正向消减 cDNA),同时进行了混合虫体 cDNA 的扩增(反向消减 cDNA)。

### 1.4 斑点杂交检测消减效率

根据克隆的数目设计方阵,每个点各取  $1\mu\text{L}$  PCR 产物分别点于 2 张 NC 膜上,进行变性等后处理。用  $^{32}\text{P}\alpha\text{-dATP}$  分别对正向及反向消减 cDNA 进行标记,制备探针。经过预杂交、杂交及洗膜,用放射性强度检测仪扫描图像,杂交的数据分析采用总信号值均一化方法进行信号定量,并分析试验结果。

### 1.5 感染期幼虫差异表达的消减 cDNA 文库的构建及其序列比较分析

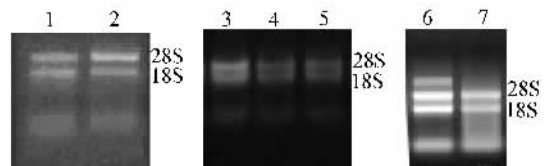
将获得的猪蛔虫感染期幼虫差异表达的 cDNA 插入 pGEM-T Easy 载体(Promega)上,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞(Promega),蓝/白斑法筛选阳性克隆。

从该文库中随机挑选 45 个克隆,采用质粒抽提试剂盒(Vitagene)提取质粒,用 *Eco*R I 进行酶切鉴定后,送上海联合基因公司用 ABI PRISM 377 测序仪进行测序。将所测 ESTs 序列在美国生物信息中心网站进行在线 BLAST 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

## 2 结果

### 2.1 提取的猪蛔虫各期虫体总 RNA 质量分析

提取的总 RNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,紫外灯下观察结果并照相。结果可见 28S 及 18S 核糖体 RNA 条带清晰,其他 RNA 呈涂布状分布,表明所提取的总 RNA 未降解(图 1)。各期虫体的总 RNA 及 mRNA 的  $A_{260}/A_{280}$  均在 1.80~2.0。



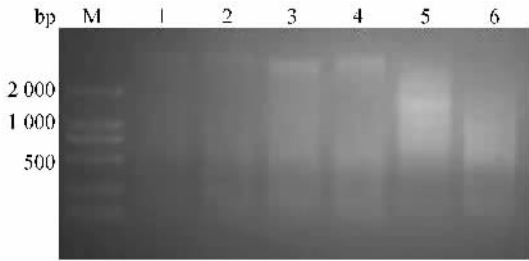
1. 感染期幼虫; 2. 肝 L3; 3. L4; 4. 雌虫; 5. 雄虫; 6. 肺 L3; 7. 虫卵  
1. Infective larvae; 2. L3 in liver; 3. L4; 4. Female adult; 5. Male adult; 6. L3 in lung; 7. Egg

图 1 猪蛔虫各发育期虫体总 RNA 琼脂糖电泳  
Fig. 1 Analysis of total RNA from *Ascaris suum* infective larvae and L3 by agarose gel electrophoresis

### 2.2 消减文库的构建

#### 2.2.1 双链 cDNA 合成及 cDNA *Rsa* I 酶切结果

双链 cDNA 酶切片段呈涂布状分布(图 2),从对照组中的酶切片段可看出,酶切效果较好。



M. DL2000 DNA 分子量标准;1. 感染期幼虫 cDNA; 2. 感染期幼虫 cDNA *Rsa* I 酶切产物; 3. 混合虫体 cDNA; 4. 混合虫体 cDNA *Rsa* I 酶切产物; 5. 对照 cDNA 6. 对照 cDNA *Rsa* I 酶切产物  
M. DL2000 DNA marker; 1. cDNA of infective larvae; 2. cDNA of infective larvae after *Rsa* I digestion; 3. Mixed cDNA of other stages; 4. Mixed cDNA of other stages after *Rsa* I digestion; 5. Control cDNA; 6. Control cDNA after *Rsa* I digestion

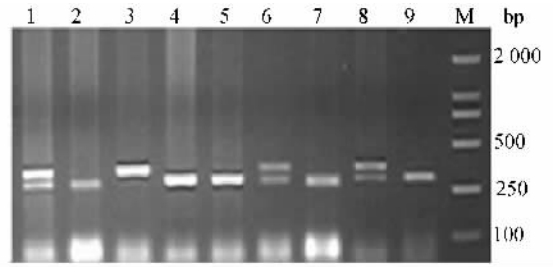
图 2 cDNA 及其 *Rsa* I 酶切产物电泳分析

Fig. 2 Analysis of cDNA and the corresponding *Rsa* I-digested products by agarose gel electrophoresis

2.2.2 消减产物巢式 PCR 鉴定 以消减产物为模板的巢式 PCR 产物电泳结果显示,经第 2 轮 PCR 后,Tester cDNA 中的差异表达基因得到大量富集,说明消减较成功(图 3)。

2.2.3 PCR 鉴定消减文库克隆插入片段 以 384 个目标克隆菌液为扩增模板,嵌套引物 1 及嵌套引物 2R 为引物,进行 PCR 扩增,得到插入片段大小范围在 300~700bp,克隆阳性率达到 99.2%。

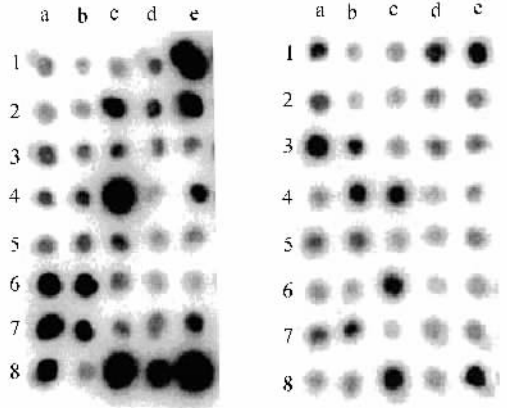
2.2.4 斑点杂交及序列分析 随机挑选 384 个感染期幼虫消减 cDNA 克隆进行斑点杂交,检测消减效率,杂交的数据分析采用总信号值均一化方法。放射性强度检测结果显示,以正向消减文库(感染期幼虫 cDNA)为探针的杂交信号强度总体高于以反向消减文库(除感染期幼虫的各期虫体混合 cDNA)为探针的信号强度,说明消减结果较好(图 4)。挑选 45 个与正向消减文库探针杂交信号值明显高于与反向消减文库探针杂交信号值的 EST(信号强度比值大于 5.0)进行测序,之后对得到的 41 个表达序列标签(EST) 进行生物信息学分析,结果见表 1。通过在线 BLAST 分析,40 个 ESTs 与已知基因高



M. DL2000 DNA 分子量标准; 1. 差减组感染期幼虫的差减结果; 2. 感染期幼虫加双接头; 3. 差减组混合虫体的差减结果; 4. 混合虫体加双接头; 5. 骨骼肌 cDNA 含 0.2%  $\Phi$ x 174/*Hae*III 的差减结果; 6. 骨骼肌 cDNA 含 0.2%  $\Phi$ x 174/*Hae*III 加双接头  
M. DL2000 marker; 1. Subtracted product; 2. Infective larvae cDNA cut by *Rsa* I and ligated with adaptors 1 and 2R; 3. Reversely subtracted product; 4. Mixture of other stage larvae cDNA cut by *Rsa* I and ligated with adaptors 1 and 2R; 5. Subtracted product of skeletal muscle cDNA with 0.2%  $\Phi$ ×174/*Hae* III, 6. Skeletal muscle cDNA with 0.2%  $\Phi$ ×174/*Hae* III with adaptors 1 and 2R

图 3 消减产物套式 PCR 鉴定电泳分析

Fig. 3 Amplification of subtracted products by nested PCR



左: 图示与正向消减文库探针杂交; 右: 图示与反向消减文库探针杂交  
从图中可看出, e1, c2, d2, e2, a3, c3, a4, c4, e4, c5, a6, b6, c6, a7, c7, e7, a8, c8, d8, e8 可能为感染期幼虫的差异表达 cDNA

Left: The membrane was hybridized with infective larvae subtracting mixture of other stage larvae cDNA library probe; Right: The membrane was hybridized with mixture of other stage larvae subtracting infective larvae cDNA library probe

图 4 从正向消减 cDNA 文库(感染期幼虫消减混合虫体)中随机挑选 192 个克隆的斑点杂交部分结果  
Fig. 4 The representative results of Southern dot-blot analysis of the subtractive efficiency

度相似,1 个无明显相似性,可能代表新基因。在 40 个已知 ESTs 中,1 个为已知编码热休克蛋白 70 (HSP70)的基因,1 个为编码核糖体蛋白(rpl-31)的

基因,还有 1 个与秀丽新杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的假定蛋白 Y71G12B.4 基因相关,其它基因功能未知。

表 1 从猪蛔虫感染期幼虫消减 cDNA 文库中随机获取并经斑点杂交验证的 41 个特异性 ESTs 信息

Table 1 Information for the ESTs from the subtractive library of infective larval of *A. suum* verified by dot-blot

推测的同源基因 Putative homologues	相似性 Identity/%	41 个 EST 中 出现的频率/次
<i>A. suum</i> L3 cDNA clone As-L3-33E08 5', mRNA	99	20
<i>C. elegans</i> ribosomal protein, Large subunit family member (rpl-31)	72	1*
<i>A. suum</i> female head pAmP1V2 Chiapelli McCarter, mRNA	98	10
<i>A. suum</i> L3 cDNA clone As-L3-33E07 5', mRNA	98	7
<i>A. suum</i> L3 cDNA clone As-L3-48G02 5', mRNA	99	1
<i>A. suum</i> L3 cDNA clone As-L3-41D01 5', similar to P27541 Heat shock 70 kDa, mRNA	99	1
Tc-EST-200(5' read) <i>Toxocara canis</i> infective larva cDNA library	71	1
<i>T. canis</i> cDNA 5', similar to Tc-pam-1, mRNA 无明显相似序列		1

\* 该 EST 同时与 *A. suum* L3 cDNA clone As-L3-33E08 具有 99% 相似性。

\* The EST shared 99% homology with *A. Suam* cDNA clone As-L3-3308

### 3 讨论

由于猪蛔虫对养猪业的危害及在公共卫生上的重要性,国内外学者对猪蛔虫分子生物学研究较多,而且将猪蛔虫作为一个模式生物来研究,主要集中在呼吸和代谢机制、各种酶的结构、作用和功能等方面<sup>[11, 12]</sup>,但对猪蛔虫的发育相关基因研究很少。因此,本研究利用 SSH 技术筛选猪蛔虫感染期幼虫的差异表达基因。SSH 是近年来兴起的一种筛选差异表达基因的好方法,它综合了 DD-PCR 和 RDA 两种技术的优点且相应地改进了各自的缺点,敏感性较高<sup>[2]</sup>。

本研究所获得的 41 个感染期幼虫的消减 cDNA 中,通过在线 BLAST 分析发现,出现频率较高的 ESTs 依次为猪蛔虫 L3 As-L3-33E08 基因、雌虫头部 pAmP1 基因、猪蛔虫 L3 As-L3-33E07 基因。说明这些基因在感染期幼虫发育过程中表达量较高。目前,上述 3 种基因的功能未知,还有待于研究。

除了以上表达量较高的 EST 外,有 1 个 EST

与猪蛔虫 L3 的热休克蛋白 70(HSP70)基因同源,热休克蛋白(HSP)具有重要的生理功能,其中属 HSP70 在细胞内含量最多,广泛存在于细胞内不同部位,是一类相当保守的蛋白质,其表达受虫体发育阶段及热应激的调控。研究表明,曼氏血吸虫 HSP70 表达于胞蚴、童虫和成虫,而在尾蚴不表达,但尾蚴转化为童虫和成虫受 42℃ 热应激处理后, HSP70 突然增加,6h 达最高水平<sup>[13]</sup>。以盘尾丝虫编码 HSP cDNA 为探针,筛选淋巴丝虫微丝蚴 cDNA 文库,获得一个小 HSP cDNA, Northern 印迹证明其 mRNA 表达是严格期特异和温度依赖的<sup>[14]</sup>。寄生虫在发育过程中要经历温度和渗透压的急剧变化,热休克反应对寄生线虫的幼虫在宿主中移行有重要作用,在不同发育阶段 HSP 表达不一,其机制尚不清楚,因此,研究 HSP70 在其发育各阶段中的变化和作用很有意义。

1 个 EST 与犬弓首蛔虫的感染性幼虫 Tc-EST-200 基因的 EST 相似性达 71%, 而此基因与编码黑腹果蝇的肽酰甘氨酸  $\alpha$ -羟化单氧合酶 (Peptidyl-glycine  $\alpha$ -hydroxylating monooxy-

genase)基因存在50%的相似性,该EST与*C. elegans*的假定蛋白Y71G12B.4基因也有68%的相似性,此基因包含了编码肽酰甘氨酸 $\alpha$ -酰胺化单氧合酶(*Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase*)的结构域,推测单氧合酶可能在感染期幼虫的发育过程中起重要作用。

从挑选的ESTs在DNA数据库中的序列比对结果可看出,猪蛔虫感染期幼虫的差异表达基因与*C. elegans*相似性较低,说明了营寄生生活的线虫和自由生活的*C. elegans*在幼虫发育及调控方面确有不同<sup>[15]</sup>。

迄今为止,国内外学者仅从几种寄生线虫克隆出为数不多的呈期特异性表达的相关基因<sup>[16~18]</sup>。从BLAST分析中可看出,有多种已知序列的基因,其功能未知,寄生线虫发育的分子机制有待研究。由于抑制消减杂交技术还存在一些不足<sup>[19]</sup>,例如SSH检测低丰度表达的靶基因的能力有限,所以SSH方法还是主要用于富集高度差异表达的基因。本试验的斑点杂交中未设看家基因,杂交的数据分析采用总信号值均一化方法,定性地评价了整个消减文库的消减效率良好,在此基础上,将采用高通量DNA微阵列技术进行筛选<sup>[20]</sup>,然后进行大规模测序,以寻找更多的差异基因,再结合RNA干扰技术研究相关的基因功能,将有助于筛选到与寄生线虫发育相关的关键基因,从而为筛选疫苗候选分子和药物靶分子奠定基础。

#### 参考文献:

[1] 黄翠琴,邹丰才,陈宁,等. 寄生线虫期特异性发育相关基因的研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006,1:48~52.

[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]. Proceedings of National Academy of Science of USA, 1996, 93 (12): 6 述说 025~6 030.

[3] Hao Z, Kasumba I, Lehane M J, et al. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: Implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2001, 98 (22): 12 648~12 653.

[4] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, et al.

Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26 (4): 1 116~1 123.

- [5] Yang G P, Ross D T, Kuang W W, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(6): 1517~1523.
- [6] Sangrador V A, Lenington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL28-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization[J]. Cytokine, 2002, 17 (2): 66~70.
- [7] Radnedge L, Agron P G, Hill K K, et al. Genome differences that distinguish *Bacillus anthracis* from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* [J]. Applied and environmental microbiology, 2003, 69(5): 2 755~2 764.
- [8] 吴绍强,邹丰才,翁亚彪,等. 利用抑制消减杂交技术筛选猪蛔虫性别差异表达基因[J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 1 040~1 045.
- [9] Fagerholm H P, Nansen P, Roepstorff A, et al. Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg[J]. The Journal of Parasitology, 2000, 86(3): 421~427.
- [10] 黄翠琴,陈宁,邹丰才,等. 猪蛔虫不同发育期幼虫的收集方法研究[J]. 热带医学杂志, 2006, 5: 487~489.
- [11] Ho N F, Geary T G, Barsuhn C L, et al. Mechanistic studies in the transcuticular delivery of antiparasitic drugs. II: Ex vivo/in vitro correlation of solute transport by *Ascaris suum* [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1992, 52(1): 1~13.
- [12] Martin R J, Murray I, Robertson A P, et al. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch [J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28(6): 849~862.
- [13] Neuman S, Ziv E, Lantner F, Schechter I. Regulation of HSP70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni* [J]. European Journal of Biochemistry / FEBS, 1993, 212 (2): 589~596.
- [14] Devaney E, Martin S A, Thompson F J. Stage-specific gene expression in lymphatic filarial nematodes [J]. Parasitology Today, 1996, 12(11): 418~424.

- [15] Dessens J T, Margos G, Rodriguez M C, *et al.* Identification of differentially regulated genes of *Plasmodium* by suppression subtractive hybridization [J]. *Parasitology Today*, 2000, 16(8): 354~356.
- [16] Maizels R M, Tetteh K K, Loukas A. *Toxocara canis*: genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode[J]. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30(4): 495~508.
- [17] Stepek G, Auchie M, Tate R, *et al.* Expression of the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein, ES62, is stage specific[J]. *Parasitology*, 2002, 125(Pt 2): 155~164.
- [20] 杨 静, 诸欣平, 张新梅, 等. 旋毛虫成虫期特异性基因的筛选与序列分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2001, 19(2): 68~71.
- [21] Ji W, Wright M B, Cai L, *et al.* Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes[J]. *BMC Genomics*, 2002, 3(1): 12.