

猪囊尾蚴抗原-B 基因 cDNA 编码区的克隆

王庆敏 戴建新 张平武 孙树汉

(第二军医大学医学遗传学教研室, 上海 200433)

摘要 [目的] 扩增和克隆猪带绦虫囊尾蚴 AgB 基因的 cDNA 编码区。[方法] 提取猪囊尾蚴总 RNA 中, 利用 RT-PCR 技术扩增出 AgB 基因 cDNA 编码区, 然后将其克隆到载体 pUC118 中进行序列分析。[结果] PCR 反应产物为单一条带, 大小为 2.6 kb。测序结果与澳大利亚株猪囊尾蚴 AgB 序列有 99.8% 的同源性, 二者的氨基酸序列有 99.3% 的同源性。[结论] 成功地克隆了猪囊尾蚴 AgB 基因 cDNA 编码区。

关键词: 猪带绦虫囊尾蚴, AgB 基因 cDNA 编码区, 副肌球蛋白, 多聚酶链反应, 基因克隆

中图分类号: R383.34

文献标识码: A

猪囊尾蚴抗原-B(AgB)为一种副肌球蛋白(paramyosin, pm), 是扁形动物门寄生虫所共有的一种保守性较强的免疫抗原^[1]。有文献表明, 曼氏血吸虫副肌球蛋白与猪囊尾蚴副肌球蛋白氨基酸序列有很高的同源性^[2]。日本血吸虫的副肌球蛋白注射到宿主体内, 可诱导免疫保护性抗体, 表明 AgB 是很有希望的疫苗候选抗原。我们用 RT-PCR 方法在国内首次从猪囊尾蚴总 RNA 中扩增出 AgB 基因 cDNA 编码区, 并将其克隆到 pUC118 载体中, 经测序发现与澳大利亚株猪囊尾蚴副肌球蛋白基因序列有较高的同源性。该研究为进一步观察 AgB 基因在真核细胞中的表达及活体中的免疫反应创造了条件。

材料与方法

材料

质粒载体 pUC118 及菌株 *E. coli* DH5 α 由本教研室保存。猪带绦虫囊尾蚴由内蒙古自治区通辽市教育印刷厂职工医院提供。PCR 引物由上海市植物生理研究所设计与合成。

引物 1 5'-GCGCAAGCTTACGAAGACATGTCTGAATCACACG-3' 中引入了限制性酶切位点 HindIII(AAGCTT 保护性碱基 GCGC);

引物 2 5'-GCCGATCCACATCTACATGATGCTGGTTGCAC-3' 中引入限制性内切酶位点 BamHI(GGATCC)及保护性碱基 GC。

工具酶和主要试剂: 限制性内切酶、T4 连接酶购自华美生物工程公司, 组织总 RNA 抽提试剂盒购自华舜生物试剂公司, ExpandTM Template PCR System 购自 Boehringer 公司, 逆转录酶购自 Gibco 公司。

方法

1 猪囊尾蚴总 RNA, 参照组织总 RNA 抽提 Kit 说

明, 从虫体中抽提。

2 以 Oligo-dT 作为引物, 以总 RNA 中的 mRNA 为模板, 在 M-MLV 的作用下, 进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链。

3 逆转录的 cDNA 单链产物为模板, 利用引物 1、引物 2, 在 ExpandTM Template PCR System 作用下, 进行 PCR 反应扩增目的基因。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 5 min 10 个循环, 余下 20 个循环中延伸时间依次延长 10 s, 反应结束前 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

4 重组载体的构建 扩增的 cDNA 编码区及 pUC118 载体经 HindIII、BamHI 双酶切后连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 挑取重组质粒进行全自动序列分析。

5 将该基因进行全自动测序, 先用两条通用引物进行测序, 由于 AgB 基因较长, 无法通读, 因此根据已测出的部分序列又重新合成了 3 条测序引物进行序列测定。

结 果

1 猪囊尾蚴总 RNA 的提取

提取的总 RNA 完整, 18S, 28S 带形清晰。

2 猪囊尾蚴 AgB 基因 cDNA 编码区的 PCR 扩增

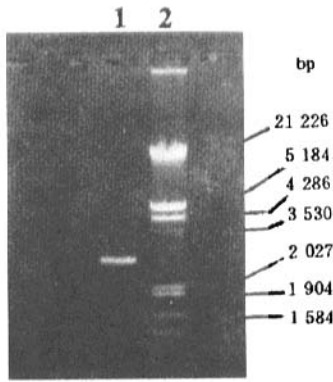
经过 PCR 反应, 获得单一清晰条带的扩增产物, 与 λ DNA/EcoRI+HindIII 分子量标准比较, 大小约 2.6 kb, 同 GenBank 中 AgB cDNA 编码区目标片段长短相符(图 1)。

3 重组载体 pUC118-AgB cDNA 编码区的构建

挑取的重组克隆可以被 HindIII、BamH 双酶切为 3.2 kb 和 2.6 kb 两条片段, 2.6 kb 为目的基因, 3.2 kb 为线形 pUC118 载体, 与预期结果一致(图 2)。

4 测序结果

pUC118-AgB 测序结果与 GenBank 中登录澳大利亚株的 AgB 的序列有 99.8% 的同源性。AgB cDNA 编码区长 2 592 bp, 共编码 864 个氨基酸, 二者的氨基酸序列的同源性为 99.3% (图 3)。



1 AgB 基因 cDNA 编码区的 PCR 产物; 2 λDNA/EcoRI+Hind III 分子量标准 Lane 1; PCR amplified product of *Cysticercus cellulosae* AgB cDNA coding region; Lane 2; Molecular weight markers (λDNA/EcoRI+Hind III)

图 1 猪囊尾蚴 AgB 基因 cDNA 编码区 PCR 扩增产物

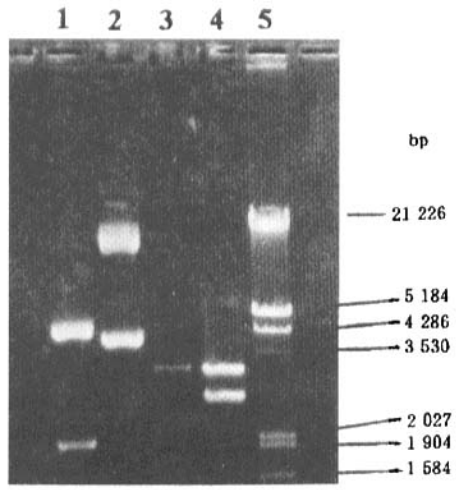
Fig. 1 PCR amplified product of *Cysticercus cellulosae* AgB cDNA coding region

```

tctgtttcac      acgtcaaaat      ttctcgtacc      atcatacggc      gaagac      atg
cgacttgaga      gtcgcgtacg      agaactggag      gcactgctcg      ggaactcccc      aggtactgtt
gtccgggctcg      aacgcaatgc      caacgagatg      agcattcagc      atctgtgagc      agatgctcgc
cttgacgaat      tgagtggtac      ttctctcag      actcaccgat      tgacacacct      taaggtatag
gagatctcga      agctggcga      ggtctcggaa      ctatcgccg      ctgtctcga      aactggccgag
gccactctgc      gcccaaaac      caaccacatg      atotccgaga      tctcagcga      ggttgagaa
ttgcgaaagc      agaagggcag      ggcagagaag      gcaagagacc      agctcatgct      tgaaatcgt
uacggtcttg      gcaaaccttga      tgccgcttta      gcaagagacc      cctcagcggg      gagcaaacgt
gagggccttg      acagccagct      gacgcgcttg      caagtgcgct      ccgacgatct      tcaacgccaa
atggccgacg      ctaactctgc      caagtgcgct      acaaagctgc      agaaactcga      ttgacttcgc
gtaaatcagg      agtatgaagc      acagtgctgc      acgttctcga      agacaagagc      agactctcga
agccagctgg      atgaccttaa      acgggcccag      gatgaaagatg      cbcgcaatcg      cctaagcctt
caaacacagt      tctcggatct      gcaaatggac      taagaaacc      tgcaagcacc      ttacgagggg
gaagccgagg      cagccggaaa      tctggcgaac      caagttgcc      aattcaaccg      cgatatggct
gccctcaaga      cccgcttga      gagagaaact      atgggcaagga      tgaagaactc      tgaagaactc
aaacgcaagc      tgactgttgc      cattaccgag      ttggagagata      tgagctgacg      tgagctcact
cgtgccaaac      acctggagaa      gccaaaagt      aaactgactc      tgagatcaaa      ghatctacag
gctggaagac      agggcgttggc      agcagaagaa      cgcactcggc      cgcactcggc      gacagagaca
gagaatcttg      ccaatggctc      gcaagcagaa      atagacggga      aatcaaaccc      aatcaaaccc
ctcaactcgg      ccaacagcgc      tctagaggcg      gacacatgac      gcctcaaggc      gcaggctcgg
gacctcaccg      accgcatcgc      caatctcgac      cgcgaaacc      gccaacttgg      cgatcaactg
aaggagagcg      aatcagccct      gctgatgcg      aatcgctgac      tgaccgatgt      tgaccgatgt
cgagtcagt      tggagggcaga      gctgacaac      gctgatgcg      ctcccgatgt      tctcctcagc
gcactgaaag      agatggaagc      gaagtactgt      gaagtactgt      acgctcttaa      acgctcttaa
tccgagatgg      aacaacgter      gctgagagag      gaaagagagc      tgagagactt      tgagagactt
acgactcgca      cgaltgagga      gttgcaaac      accactcagc      tgagagactt      tgagagactt
tcggatattg      ctcgctgaa      gaagaagtag      gaggcgacaa      tcagcgagct      tcagcgagct
ctgagcgtgg      cgaacaaagg      gaaagcgaac      ctcaaccgag      agaaccaaac      agaaccaaac
cgagttcaag      agcttgaggc      tgctgtggag      gacgagcgac      gacgagcgac      gacgagcgac
agcaacttgc      aggtgagcga      gctgagagag      atcgcccttg      ctcggaagct      ctcggaagct
cgcagccaaac      tgaaactcga      gctgagagag      cgcagaagac      cctcgaagat      cctcgaagat
gccaatggac      gtatctcggg      gctcaaccct      tcggatcaaca      ctctcaaac      ctctcaaac
cgaactgagc      cgtatattgg      cgtcaagcag      tgacagtgag      atgagggcgt      atgagggcgt
aaggctgctg      aggatagagc      tgaccgtctg      aacgctgagg      tactccgct      tactccgct
ctgcgacagg      aacaagaaaa      ttacaagcgt      gctgagagctc      tgcgctgca      tgcgctgca
gagatcctgt      agatcaggt      caagttggag      gaggctgagg      ctctgctca      ctctgctca
cgccgatagc      ttcaaaagct      ccgaatcggg      gtaggggggc      ttgagggcga      ttgagggcga
gaaattcgtc      gccccaagga      ggccttcgcc      aacggcgca      aataacaa      aataacaa
gaactgcaga      cacagagcga      ggccttcgcc      cgcatgattt      tgagacttca      tgagacttca
gacaaagactc      agatcagat      gaaagcctac      aaacgtcagc      tggagactca      tggagactca
tctagctga      cgatgagcaa      gtaccgtaag      gagcagcaac      agattgagga      agattgagga
cgtctgaca      tggcggggag      gacgatcacc      attaagagga      caattgagg      caattgagg
cgcccgctt      cggtagttcg      gggagataaac      aggtctccc      gtaggtaacc      gtaggtaacc
atcatgtaga      tgt
    
```

图 3 AgB cDNA 编码区的测序结果 (====为非编码区, ——表示与澳大利亚株序列不同的碱基)

Fig. 3 The sequencing result of AgB cDNA coding region (====; Non-coding region; ——; Basepairs different from that of Australia *Cysticercus cellulosae*)



1 质粒 pUC118; 2 pUC118-AgB cDNA 编码区重组子; 3 pUC118 的 BamHI+Hind III 酶切产物; 4 pUC118-AgB cDNA 编码区的 BamHI+Hind III 酶切产物; 5 λDNA/EcoRI+Hind III 分子量标准 Lane 1; plasmid pUC118; Lane 2; Recombinant plasmid pUC118-AgB cDNA coding region; Lane 3; pUC118 digested with BamHI and Hind III; Lane 4; pUC118-AgB cDNA coding region digested with BamHI and Hind III; Lane 5; Molecular weight markers(λDNA/EcoRI+Hind III).

图 2 pUC118-AgB cDNA 编码区重组子的酶切分析

Fig. 2 Endonuclease digestion analysis of the recombinant plasmids pUC118-AgB cDNA coding region

```

gaagac      atg
ggaactcccc      aggtactgtt
atctgtgagc      agatgctcgc
tgacacacct      taaggtatag
ctatcgccg      aactggccgag
ctgtctcga      ggttgagaa
tctcagcga      agctcatgct
agctcatgct      tgaaatcgt
cctcagcggg      gagcaaacgt
ccgacgatct      tcaacgccaa
agaaactcga      ttgacttcgc
agacaagagc      agactctcga
cbcgcaatcg      cctaagcctt
tgcaagcacc      ttacgagggg
aattcaaccg      cgatatggct
ctgaaagaggt      tgaagaactc
tgagctgacg      tgagctcact
aaactgactc      tgagatcaaa
cgcactcggc      ghatctacag
atagacggga      gacagagaca
gacacatgac      aatcaaaccc
cgcgaaacc      gcctcaaggc
aatcgctgac      gccaacttgg
ctcgcctctg      tgaccgatgt
gctctgcaga      ctcccgatgt
gaaaggggac      acgctcttaa
accactcagc      tgagagactt
gagcagtgag      tgagagactt
tcagcgagct      tgagagactt
agaaacaaac      tgagagactt
gacgagcgac      tgagagactt
ctcggaagct      tgagagactt
cctcgaagat      tgagagactt
ctctcaaac      tgagagactt
atgagggcgt      tgagagactt
tactccgct      tgagagactt
tgcgctgca      tgagagactt
ctctgctca      tgagagactt
ttgagggcga      tgagagactt
aataacaa      tgagagactt
tgagacttca      tgagagactt
tggagactca      tgagagactt
aaacgtcagc      tgagagactt
agattgagga      tgagagactt
caattgagg      tgagagactt
gtaggtaacc      tgagagactt
    
```

讨 论

猪囊尾蚴病是世界上最常见的人畜共患疾病之一,不仅给养猪业带来了巨大的经济损失,也严重地危害着人类的健康。能否找出一种保护性抗原是防治该病的关键,也是科研工作者研究的热点^[3]。

核酸疫苗是20世纪90年代兴起的一种新疫苗,它以制作简单、经济方便、稳定、激发全面的免疫反应等优点越来越受到科研工作者的关注。猪囊尾蚴 AgB,或副肌球蛋白,是蠕虫共有的一种保守性很强的免疫抗原,以其免疫接种可诱导对线虫和吸虫的保护性免疫。Juan 等^[4]报道,猪囊尾蚴 AgB 是由表层胞体合成后,通过表层膜和螺旋体腔分泌的。为重复的超螺旋结构,分子量约为95 kDa。对于血吸虫病的防治是一种有潜力的候选抗原^[5], Yang 等^[6]研究了小鼠体内血吸虫副肌球蛋白核酸疫苗的免疫保护性。世界卫生组织已将副肌球蛋白选为血吸虫疫苗抗原。

本研究通过 RT-PCR 方法,首次在国内成功地克隆出猪囊尾蚴的 AgB 基因 cDNA 序列编码区。AgB 基因 cDNA 序列编码区全长2.6 kb,因此 RT-PCR 中最关键的一步是获得全长的 cDNA 第一链。本研究以 Oligo-dT 作引物,首先反转录成完整的 cDNA 第一链,为后面的 PCR 反应打下良好的基础。PCR 反应中,用 Expand™ Template PCR System 有错配修复的高保真性,极大地减少了 AgB 基因突

变的机率。由于该基因较长,所以在后面的20个循环中,将延伸时间依次延长10 s。AgB cDNA 编码区克隆的成功,为进一步研究 AgB 核酸疫苗的应用创造了条件。

在国外,羊肉及牛肉为主要的肉食品,研究羊肉绦虫及牛肉绦虫较多。我国因猪囊尾蚴抗原基因的缺乏,研究工作受到了限制。本次猪囊尾蚴 AgB 基因 cDNA 编码区克隆成功,将有助于进一步开展有关 AgB 的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Angelica O, Agustin P, Ana F. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercosis in other Platyhelminthes. *Int J Parasitol*, 1988,18:543~545.
- [2] Juan PL, Abraham L, Lourdes A, et al. Paramyosin is the *Schistosoma* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Bioche Parasitol*, 1991,44:287~296.
- [3] 孙树汉,王俊霞,陈蕊雯,等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1997,15:15~20.
- [4] Juan PL, Marie TM, Kaethe W, et al. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. *J Parasitol*, 1987,73:121~129.
- [5] Bernd HK, Donald PM. A vaccine against the Asian schistosome, *Schistosoma japonicum*; an update on paramyosin as a target of protective immunity. *Int J Parasitol*, 1997,27:1213~1219.
- [6] Yang W, Waine GJ, McManus DP. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995,212:1029~1039.

收稿日期: 1999-09-23

(编辑: 庄兆农)

CLONING OF *CYSTICERCUS CELLULOSAE* AgB cDNA CODING REGION

WANG Qing-min, DAI Jian-xin, ZHANG Ping-wu, SUN Shu-han

(Department of Medical Genetic, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract [Objective] To amplify and clone *Cysticercus cellulosae* AgB cDNA coding region. [Methods] The AgB cDNA was amplified by RT-PCR technique from the total RNA of *Cysticercus cellulosae*. It was cloned into the vector pUC118 and sequenced. [Results] The PCR amplified product was a single band of 2.6 kb in size. The sequences of AgB cDNA coding region has 99.8% homology with that of Australian *Cysticercus cellulosae*, and their amino acid sequences have 99.3% homology. [Conclusion] *Cysticercus cellulosae* AgB cDNA coding region has been cloned successfully.

Key Words: *Cysticercus cellulosae* gene, AgB cDNA coding region, paramyosin, PCR, gene clone.