

间存在捕食行为,这是棘球绦虫形成野生循环的主要因素。作为青藏高原特有的优势鼠种高原鼠兔,不仅分布广、数量多,且感染率较高,危害极大;它既是野生食肉动物(狐狸、狼等)的捕食对象,也是牧区大量无主犬的捕食对象,与家犬、狐之间形成多房棘球绦虫生活史的混合循环链,同时也是导致该地域泡型棘球绦虫病传播的重要原因。

犬作为棘球绦虫的主要终宿主,在本省不仅数量庞大,且平均感染率高达 39.9%。感染犬粪便中的大量虫卵随犬的活动及尘土、风、水等播散,严重污染了环境。由于自然因素、生物因素,人群的生产方式、生活习惯等的影响,导致人、家畜、犬及野生动物之间棘球绦虫感染的恶性循环,致使棘球绦虫及棘球绦虫感染处于较高水平。

在青南高原的调查中,在藏狐体内发现一种与当地犬、狐体内多房棘球绦虫形态学特征有明显差异的棘球绦虫成虫,也在高原鼠兔体内肝脏发现类似于泡球绦虫的病灶,经分子生物学检查分析,与四川省石渠县高原鼠兔体内的病灶及藏狐体内的成虫一致,说明该棘球绦虫在青藏高原腹地分布广泛,肖宁等^[3]

认为是一新种—石渠棘球绦虫。

参 考 文 献

- [1] Han XM, Wang H, Qiu JM, *et al.* Analysis on an epidemiological survey of cystic and alveolar hydatid disease in Banma County of Qinghai Province [J]. Chin J Zoonoses, 2006, 22: 189-190. (in Chinese)
(韩秀敏, 王虎, 邱加闵, 等. 青海省班玛县泡型和囊型包虫病流行现状调查分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2006, 22: 189-190.)
- [2] Wang H, Chai JJ, Liu FJ, *et al.* A study on ecological-epidemiology of two hydatid diseases in Qinghai [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2002, 15: 284-286. (in Chinese)
(王虎, 柴君杰, 刘凤洁, 等. 青海省包虫病的生态流行病学研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15: 284-286.)
- [3] Xiao N, Qiu J, Nakao M, *et al.* *Echinococcus shiquicus* n.sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China [J]. Int J Parasitol, 2005, 35: 693-701.

(收稿日期: 2007-01-24 编辑: 高石)

文章编号: 1000-7423(2007)-04-0352-03

【研究简报】

细粒棘球绦虫内蒙株 FABP 基因 cDNA 的克隆与核酸疫苗的构建

郝慧芳, 王志钢*, 李志伟

【提要】 根据 GenBank 中细粒棘球绦虫脂肪酸结合蛋白 (FABP) 基因 cDNA 序列设计引物,并在起始密码子前加上 Kozak 序列 (CCACC),提取细粒棘球绦虫(内蒙株)的原头蚴总 RNA,RT-PCR 扩增目的基因。回收其纯化的产物克隆到 pMD19-T 载体后进行序列分析。克隆到的 FABP 基因 cDNA 序列长 402 bp,开放阅读框 (ORF) 编码 133 个氨基酸。FABP 基因 cDNA 亚克隆到 pcDNA3.1 (+) 中,构建核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM,经测序验证,结果正确。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 脂肪酸结合蛋白(FABP); 核酸疫苗

中图分类号: R532.32, R392.11 文献标识码: B

Cloning and Construction of Nucleic Acid Vaccine of FABP Gene cDNA from *Echinococcus granulosus*

HAO Hui-fang, WANG Zhi-gang*, LI Zhi-wei

(College of Life Science, Inner Mongolia University, Huhehaot 010021, China)

【Abstract】 Specific primers were designed according to published nucleotide sequence of FABP (fatty acid binding protein) gene in the GenBank database. The kozak sequence (CCACC) was introduced at the upstream of initiator. The total RNA was extracted from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (Inner Mongol isolate). The FABP gene cDNA fragment was amplified by RT-PCR and cloned into pMD19-T vector for sequencing and analyzing. The cloned FABP gene cDNA was with 402bp. The ORF encoded 133 amino acids. The amplified cDNA fragment was subcloned into pCDNA3.1 (+) vector. The results showed that the nucleic acid vaccine candidate pcDNA-FABP-NM has been constructed.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; Fatty acid binding protein (FABP); Nucleic acid vaccine

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJ05041)

作者单位: 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021

* 通讯作者, E-mail: lswzg@imu.edu.cn

Supported by the scientific research grants for universities, Inner Mongolia (NJ05041)

* Corresponding author, E-mail: lswzg@imu.edu.cn

细粒棘球蚴病亦称囊性棘球蚴病, 我国 25 省 (市、区) 均有病例报道^[1]。由于细粒棘球蚴组织结构复杂, 其抗原表现也很复杂。核酸疫苗是近年发展起来的新一代疫苗, 在一些寄生虫病的免疫预防中取得了较好的效果^[2]。对细粒棘球蚴脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 的研究表明, FABP 是具有应用价值的疫苗候选分子, 构建 FABP 核酸疫苗预防棘球蚴病具有良好的应用前景^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细粒棘球蚴的原头蚴样本采集 于内蒙古锡林郭勒盟屠宰场, 从患细粒棘球蚴病的羊体内取出含包囊的肝脏, 无菌条件下抽取包囊液, 离心, 弃上清。用 pH 7.2 的 PBS 洗涤沉淀, 镜检确认细粒棘球蚴的原头蚴后, 迅速放入液氮中冷冻, 带回实验室 -80 °C 保存备用。

1.1.2 质粒和菌种 真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 由本院寇廷茂教授馈赠, 大肠埃希菌 (*E. coli*) DH5 α 株和重组质粒 MD19-mTOR 由本实验室保存。

1.1.3 主要酶类及生化试剂 少量不含 DNA 的总 RNA 抽提试剂盒 (W6711) 和质粒提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; T₄ DNA 连接酶、PCR 相关试剂、高保真 DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、反转录酶、莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶 M-MLV (点突变缺失 RNase H)、寡脱氧胸苷酸 18T 引物 [Oligo (dT)18 primers] 及 DNA 标志物 (DL2000) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、焦碳酸二乙酯 (DEPC)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 及其他生化试剂均购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 常规试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细粒棘球蚴的原头蚴总 RNA 的提取及反转录 按 RNA 抽提试剂盒说明书提取总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外检测定量, 用寡脱氧胸苷酸 18T 引物按照反转录酶莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶 M-MLV 说明书进行反转录, 合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 PCR 引物设计及 FABP 基因 cDNA 扩增 根据 GenBank 中的细粒棘球蚴 FABP 基因 cDNA 序列 (登录号: X-65947) 经引物 5 软件分析, 设计引物。上游引物 P1 的 5' 端加上 Kozak 序列 (CCACC) 和 *EcoR* I 酶切位点及 GC 保护性碱基, 下游引物 P2 的 5' 端加上 *Hind* III 及 *Xba* I 酶切位点和 GC 保护性碱基。

P1: 5'-GCCAATTCCACCATGGAGGCATTCCTTGGTAC-3',

P2: 5'-GCAAGCTTTCTAGATTACGCCACCTTTGAG-3'。

以细粒棘球蚴的原头蚴总 RNA 的反转录产物 cDNA 为模板, 加入特异性扩增引物 P1 和 P2, 扩增 FABP 基因 cDNA, 25 μ l 反应体系: 5 \times 高保真 DNA 聚合酶缓冲液 (含 Mg²⁺) 5 μ l, 4 种脱氧核苷三磷酸混合物 (各 2.5 mmol/L) 2 μ l, P1

(5 pmol/ μ l) 1 μ l, P2 (5 pmol/ μ l) 1 μ l, cDNA 模板 (75 ng/ μ l) 2 μ l, 高保真 DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ l) 0.25 μ l, 灭菌超纯水 13.75 μ l。扩增条件: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 52 °C 10 s, 72 °C 30, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

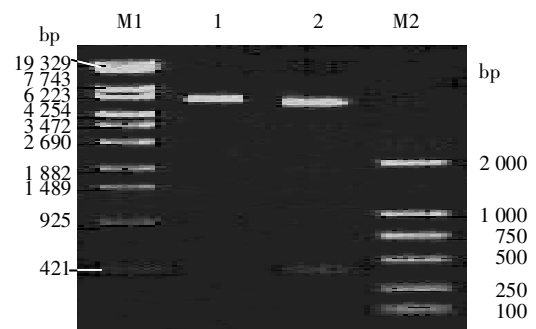
1.2.3 FABP 基因 cDNA 克隆及测序 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物, pMD19-mTOR 质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后回收载体大片段, 与经同样酶切的 FABP 基因 cDNA 回收产物经 T₄ DNA 连接酶连接, 得到 pMD19-FABP-NM 重组质粒。再经 PCR 和酶切双重鉴定确认正确后测序。具体操作按试剂盒说明书及参考文献^[6]方法进行。

1.2.4 生物信息学方法 FABP-cDNA 测序结果用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 上的序列相似性比较软件 (BLAST)^[7] 进行序列比对。

1.2.5 核酸疫苗的构建与鉴定 测序正确的 pMD19-FABP-NM 重组质粒经由 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切, 回收其小片段 FABP 基因。真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 经同样的双酶切, 回收其载体大片段 pcDNA3.1 (+)。在 T₄ DNA 连接酶的作用下连接, 构建核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM, 经酶切鉴定确认正确后再测序验证。

2 结果

2.1 细粒棘球蚴 FABP 基因 cDNA 的 PCR 扩增 以细粒棘球蚴的原头蚴 cDNA 为模板, 加入特异性扩增引物 P1 和 P2, 得到 402 bp 的 FABP-cDNA 片段 (图 1)。



M1: λ -*EcoT*14 标志物, M2: DNA 标志物 (DL2000), 1: pcDNA3.1-FABP/*Xba* I, 2: pcDNA3.1-FABP/*EcoR* I + *Xba* I。

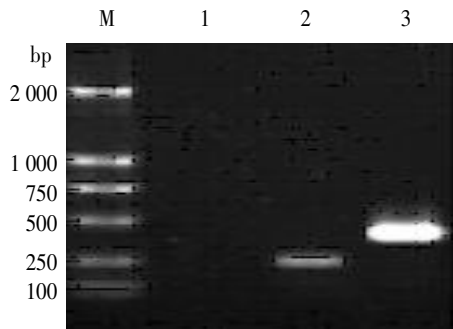
图 2 核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM 的酶切鉴定

2.2 序列测定 克隆到的 FABP-cDNA 经上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 全长 402 bp。ORF 为 399 bp, 编码 133 个氨基酸, 编码蛋白质的相对分子质量为 M_r 15 095。

2.3 核苷酸序列分析 序列比对结果显示, 内蒙株细粒棘球蚴的原头蚴 FABP 基因 cDNA 序列与国内、外已报道虫株的 FABP 基因 cDNA 序列 (登录号: AF359278 和 X65947) 的同源性均为 99%^[8,9]。推导的氨基酸序列与我国新疆株的同源性为

98% (登录号: AAK51437)^[8], 第 6 位的氨基酸由缬氨酸 Val 变为甘氨酸 Gly, 第 128 位由天冬酰胺 Asn 变为苏氨酸 Thr; 与国外株的同源性为 99% (登录号: CAA46765), 第 82 位由丙氨酸 Ala 变为苏氨酸 Thr。

2.4 核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM 的构建与鉴定 将 pMD19-FABP-NM 重组质粒上的 FABP 基因 cDNA 片段亚克隆到真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 上, 构建核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM。pcDNA3.1-FABP-NM 经酶切鉴定 (图 2) 和测序验证正确, 表明成功构建 FABP 核酸疫苗。



M: DNA 标志物 (DL2000), 1: 阴性对照, 2: 阳性对照 β -actin, 3: PCR 产物。

图 1 PCR 扩增结果

3 讨论

寄生性扁虫不能合成其生命活动需要的脂, 而是依靠宿主提供。其中 FABP 在此过程中起着重要作用。目前已知细粒棘球绦虫有 9 种基因型, 包括不同的虫株^[3], 但其 FABP 基因是否具有地理株差异尚不明确。Esteves 等^[9]报道细粒棘球绦虫国外株 FABP 基因 cDNA 序列 ORF 长为 399 bp, 编码 133 个氨基酸。郭中敏等^[8]报道我国细粒棘球绦虫新疆株的 FABP 基因 cDNA 序列 ORF 长也是 399 bp, 编码 133 个氨基酸。本研究克隆的细粒棘球绦虫内蒙株 FABP 基因的 cDNA 序列 ORF 长与上述一致, 但其核苷酸组成和编码的氨基酸组成存在差异, 表明细粒棘球绦虫不同地理株的 FABP 基因和蛋白可能存在差异。

核酸疫苗相对于灭活疫苗、减毒活疫苗和重组蛋白疫苗具有较多的优点, 如能表达天然蛋白抗原分子, 可同时诱导较强的体液免疫和特异性 CD8⁺ T 细胞毒淋巴细胞 (CTL) 性细胞免疫反应, 使机体产生比使用常规疫苗更有效的应答并具有持续性。近年研究表明, 核酸疫苗对寄生虫感染具有免疫保护作用^[2,3], 并且 FABP 核酸疫苗在日本血吸虫和曼氏血吸虫的研究中已显示出具有很强的动物免疫保护性^[10]。本研究克隆到细

粒棘球绦虫内蒙株疫苗候选基因 FABP, 构建的核酸疫苗 pcDNA3.1-FABP-NM 在 FABP 基因 cDNA 起始密码子 ATG 的上游添加了 Kozak 序列 (CCACC), 可以提高其在真核细胞中的表达效率, 其免疫功能正在研究中。

参 考 文 献

[1] Zhu YM, Li WG. Research progress in molecular biology of *Echinococcus granulosus* [J]. Chin J Parasit Dis Control, 2005, 18: 217-219. (in Chinese)
(朱佑明, 李文桂. 细粒棘球绦虫分子生物学研究进展[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2005, 18: 217-219.)

[2] Liu SX, Cao JP. Current status and prospects of vaccine for parasitic diseases [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23 (Suppl. 5): 362-368. (in Chinese)
(刘述先, 曹建平. 寄生虫病疫苗研究的现状及展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23 (增刊 5): 362-368.)

[3] Pan WQ, Tang LH. Molecular Parasitology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2004. 345-369. (in Chinese)
(潘卫庆, 汤林华, 主编. 分子寄生虫学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004. 345-369.)

[4] Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, et al. *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine [J]. Vaccine, 2000, 19: 460-469.

[5] Fraize M, Sarciron ME, Saboulard D, et al. An *in vitro* model to evaluate the cytokine response in *Echinococcus* infections [J]. Parasitol Res, 2004, 92: 506-512.

[6] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1-138. (in Chinese)
(萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. 1-138.)

[7] Wang Z, Huang GS. Database resources of the national center for biotechnology information and its application [J]. Chin Bull Life Sci, 2002, 14: 59-62. (in Chinese)
(王哲, 黄高升. NCBI 的数据库资源及其应用[J]. 生命科学, 2002, 14: 59-62.)

[8] Guo ZM, Lu JH, Xu J, et al. Cloning and sequencing of the potential vaccine antigen FABP of *Echinococcus granulosus* [J]. J Trop Med, 2002, 2: 143-146. (in Chinese)
(郭中敏, 陆家海, 徐劲, 等. 包虫疫苗候选抗原基因 FABP 的克隆与序列分析[J]. 热带医学杂志, 2002, 2: 143-146.)

[9] Esteves A, Dallagiovanna B, Ehrlich R. A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.5-kiloDalton polypeptide related to fatty acid binding proteins [J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 58: 215-222.

[10] Yu CX, Zhu YC, Yin XR, et al. Protective immunity induced by the nucleic acid vaccine of fatty acid binding protein of *Schistosoma japonicum* Chinese strain (SjC FABP) in BALB/c mice [J]. Chin J Schisto Control, 2002, 14: 163-167. (in Chinese)
(余传信, 朱荫昌, 殷旭人, 等. 日本血吸虫脂肪酸结合蛋白 (SjC FABP) 核酸疫苗诱导小鼠免疫保护作用研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, 14: 163-167.)

(收稿日期: 2007-01-08 编辑: 富秀兰)