

日本血吸虫 149 个表达序列标签和 18 个全长 cDNA 的获取和分析

曾桥, 肖建华*, 万志刚, 张愉快, 刘传爱, 杨秋林

【摘要】 目的 从日本血吸虫成虫 cDNA 文库中分离、鉴定和分析表达基因序列, 为日本血吸虫病的防治提供候选疫苗和药物靶点。方法 构建日本血吸虫成虫 cDNA 文库, 随机挑取重组阳性克隆进行测序, 将获取的表达序列标签 (Expressed Sequence Tag, EST) 登录 GenBank; 对某些感兴趣的序列进行步移法测序获取全长 cDNA, 并进行生物信息学分析和登录。结果 随机挑取 382 个阳性克隆进行测序, 获得 149 个 EST, 同源性比较发现, 部分序列与血吸虫的生活史的不同阶段和不同性别序列有一定的同源性。共获取 18 个日本血吸虫全长 cDNA, 大部分为管家基因, 其中部分可作为日本血吸虫的候选疫苗分析和药物靶点。结论 EST 技术有助于快速、经济地获取日本血吸虫表达序列。

【关键词】 日本血吸虫; cDNA 文库; 表达序列标签; 基因

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Acquisition and Analysis of 149 ESTs and 18 Novel Genes of *Schistosoma japonicum*

ZENG Qiao, XIAO Jian-hua, WAN Zhi-gang, ZHANG Yu-kuai, LIU Chuan-ai, YANG Qiu-lin

(Institute of Pathogenic Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

【Abstract】 **Subjective** To acquire and analyze adult stage *Schistosoma japonicum* (Chinese strain) expressed sequence tags and new genes from an adult *S. japonicum* cDNA library, and to search new vaccine candidates and drug targets. **Methods** A cDNA library was constructed from adult stage *S. japonicum*. Clones were selected randomly from the cDNA library and were sequenced. ESTs and new genes were acquired after analysis in GenBank databases by BLAST and other programs. All ESTs and new genes were submitted to GenBank and received accession numbers. **Results** 149 ESTs were acquired from a total 382 clones that were randomly selected from the adult *S. japonicum* cDNA library. All ESTs were successfully submitted to the dbEST at Genbank. Some of them were homologous with sequences of male, female, egg, schistosomula, cercaria and miracidia of *S. japonicum*. 18 new genes of adult *S. japonicum* were acquired. Some genes were housekeeping genes and some genes might be interesting as vaccine candidates or drugs targets. **Conclusions** The EST strategy is a rapid, efficient and economical method to acquire ESTs and to discover new genes of adult stage *S. japonicum* from cDNA libraries.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; cDNA library; Expressed Sequence Tags (ESTs); Gene

Supported by the key Project of Hunan Provincial Health Department (No. 2001-Z05)

* Corresponding author, E-mail: jhxiao223@163.com

血吸虫病是严重危害人类健康的寄生虫病, 寻找新的杀虫药物和开发研制有效抗血吸虫病疫苗已成为刻不容缓的工作, 而新的基因的寻找及其功能的研究是以上工作的必要前期工作。表达序列标签法是一种快速筛选生物新基因的常用方法。到目前为止 GenBank 中血吸虫表达序列标签 (EST) 已有 69 000 条, 其中只有极少部分有详细的研究。因此, 继续开展日本血吸虫编码基因的研究对防治日本血吸虫病仍具有重要的意义。

材料与方法

1 日本血吸虫及实验动物

日本血吸虫为中国大陆株 (岳阳); 感染血吸虫尾

蚴的实验用兔为新西兰家兔。

2 宿主菌及载体

大肠杆菌 DH5 α ; 载体: pBC sk +。

3 试剂

TRIZOL 试剂盒为美国 Gibco/BRL 公司产品, DEPC 为美国 sigma 产品, Oligotex mRNA Midi Ki 为德国 Qiagen 公司产品, cDNA synthesis Kit、ZAP-DNA synthesis Kit 和 ZAP-cDNA GIPack III old Cloning Kit 为美国 Stratagene 公司产品。其它均为国产分析纯试剂。

4 cDNA 文库的构建

约 1 000 条日本血吸虫尾蚴经皮肤感染宿主兔, 6 周后解剖并行门静脉灌注获取成虫, TRIZOL 试剂盒抽

基金项目: 湖南省卫生厅重点项目基金的资助 (No. 2001-Z05)

作者单位: 湖南省南华大学病原生物学研究所, 衡阳 421001

* 通讯作者, E-mail: jhxiao223@163.com

提总 RNA, oligotex mRNA Midi kit 分离纯化 mRNA, 利用 Strategene 公司文库构建试剂盒构建文库。

5 阳性克隆的分离及测序

蓝白斑筛选, 挑取白色菌落, 扩增后提取质粒于 ABI377 型自动测序仪上进行序列测定。

6 序列分析, EST 和新基因的获取和登录

将原始测序结果进行编辑, 去除序列中载体部分, 将剩余序列运用 BLAST 程序进行同源性分析 ([http:// www. ncbi. nhl. gov/ Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast))。

将得到的 EST 按照 GenBank 提交指定的格式编写, 通过 E-mail 提交至 GenBank dbEST (E-mail: batchsub @ ncbi.nlm.nih.gov)。对某些感兴趣的序列采用步移法测序, 直至获取全长 cDNA, 并 SWISS-PROT 等相关站点进行基因分析。将获取的基因利用 Sequin 程序进行登录。

结 果

1 文库质量

血吸虫 cDNA 文库的包装效率为 2×10^6 pfu/ml, 重组率在 96% 以上, 文库的平均插入片段长度为 1.4 kb。

2 获取的 149 个 ESTs 及登录号

本研究随机挑取 382 个阳性克隆进行了测序, 获得 149 个 ESTs, 提交至 GenBank dbEST 数据库, 获取的 GenBank dbEST 进入编号: CA747382-CA747391, BU917055-BU917058, CA305307-CA305309, BU581980, BU582400-U582403, BU666906 和 CA946548-CA946666。

3 ESTs 组成

将获得的有价值的 EST 通过 BLAST 程序分析后可分为 5 个类别, 如表 1 所示。

表 1 EST 的组成

Table 1 The composition of ESTs-quality sequences

类 别 Category (Homology with)	EST 数量 No. ESTs	百分率 Percent(%)
日本血吸虫同源序列 Homology with sequences of <i>Schistosoma japonicum</i>	47	31.5
曼氏血吸虫同源序列 Homology with sequences of <i>Schistosoma mansoni</i>	31	20.8
其它血吸虫同源序列 Homology with sequences of other schistosomes	33	22.1
其它生物同源序列 Homology with other organisms	1	0.7
无同源序列 No hit	37	24.9
总 计 Total	149	100

4 同源性比较

同源性比较发现, 部分 EST 与日本血吸虫的虫卵、毛蚴、尾蚴、童虫和雌雄成虫的序列有一定的同源性。获取的 18 个全长 cDNA 及同源性比较情况见表 2。

讨 论

EST 是一种分析和确定生物表达基因特性的快速有效的方式^[1]。本次研究共随机挑取 382 个阳性克隆, 共获取 149 个 ESTs, 同源性比较发现, 分别与日本血吸虫序列、曼氏血吸虫序列及其他物种序列有一定的同源性, 其中 37 个未找到同源的匹配序列, 两者占 24.9%, 为全新序列。上述结果表明, 该文库值得进一步研究。

获取的 18 个新基因分析发现, 某些基因为结构基因, 如 beta-微管蛋白基因 (AY220457) 和细胞动力蛋白轻链基因 (AY225851) 等。微管蛋白为细胞骨架蛋白, 比较保守。肌动蛋白轻链 (dynein light - chain, DLC) 是细胞动力蛋白的一部分, DLC 蛋白对于细胞周期的控制、凋亡及细胞极性的保持有着极其重要的作用^[2]。DLC 蛋白在血吸虫成虫和尾蚴的皮层中被发现, 可望成为血吸虫的靶抗原和药物的靶位点。有些基因为分析伴侣家族成员, 如 DnaJ-like 蛋白基因 (AY226982) 和分子伴侣 TCP-1 尾复合蛋白基因 (AY226979)^[3]。这些基因在细胞应急或非应急条件下参与蛋白质代谢。如蛋白质的从头折叠、跨膜运输、错误折叠多肽的降解及其调控过程中有重要作用。某些基因为泛素/蛋白酶系统 (ubiquitin/proteasome system) 中重要组分, 如泛素连接酶 E2 基因 (AY251608)、泛素激活酶 E1 基因 (AY251607) 和聚合泛素基因 (AY254344), 构建泛素 - 蛋白水解酶复合体通路 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 途径。泛素/蛋白酶系统 (ubiquitin/proteasome system) 与细胞内许多主要的生化过程如 DNA 损伤修复、细胞周期的运转、信号传导、抗原的提呈、蛋白的跨膜定位、蛋白质进入线粒体、应急反应、细胞表面受体修饰、神经递质前体的摄入、过氧化物小体的形成、核糖体的组装和细胞凋亡等也有重要关系^[4]。某些基因为代谢中重要酶类, 如组织蛋白酶 CB2 基因 (AY226984)、乳酸脱氢酶基因 (AY225190)、核苷二磷酸激酶基因 (AY226980)、钙调神经磷酸酶 B 基因 (AY220751) 和 ATP 合酶脂结合蛋白基因 (AY226981)。组织蛋白酶可降解血红蛋白, 所以组织蛋白酶一直是血吸虫防治研究的热点, 并以此作为候选疫苗和药物作用的靶位点^[5]。乳酸脱氢酶 (LDH) 对宿主细胞利用糖类等营养物质进行厌氧酵解和需氧氧化磷酸化的代谢活动发挥着重要的调

表 2 18 个 cDNA 的同源性比较
Table 2 comparison between new genes and known genes and proteins

基因名称 Gene name	基因的登录号 GenBank Accn	cDNA 长度 (bp)	编码蛋白长度 (aa)	同源基因或蛋白 Known genes or proteins	Identity (%)	Positives (%)	Program
BBC1 基因 BBC1 gene	AY220747	736	204	<i>Schistosoma mansoni</i> breast basic conserved protein (BBC1)	82	—	BLASTn
钙调神经磷酸酶 B 基因 Calcineurin B	AY220751	1266	169	<i>Schistosoma mansoni</i> calcineurin B	84	—	BLASTn
细胞动力蛋白轻链基因 Dynein light chain	AY225851	374	88	(DLC) Dynein light chain. [<i>Schistosoma mansoni</i>]	80	91	BLASTx
ATP 合酶脂结合蛋白基因 ATPase subunit C (Lipid-binding protein)	AY226981	558	122	ATPase subunit C (Lipid-binding protein). [<i>Manduca sexta</i>]	51	60	BLASTx
40S rRNA 蛋白基因 40S rRNA	AY223904	428	121	40S rRNA protein homolog (Fragment). [<i>Schistosoma mansoni</i>]	90	92	BLASTx
组织蛋白酶 CB2 基因 Cathepsin CB2 endopeptidase	AY226984	1353	348	<i>Schistosoma mansoni</i> cathepsin B endopeptidase (ct2 gene)	86	—	BLASTn
乳酸脱氢酶基因 L-lactate dehydrogenase	AY225190	1251	331	L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) [<i>Pelodiscus sinensis japonicus</i>]	70	85	BLASTx
皮层蛋白 Sj20.8 基因 Tegumental protein Sj20.8	AY225315	871	176	<i>S. mansoni</i> tegumental protein Sj20.8	87	—	BLASTn
分子伴侣 DnaJ-like 蛋白基因 t-complex polypeptide 1	AY226982	1303	349	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12. [<i>Mus musculus</i>]	35	54	BLASTx
分子伴侣 TCP-1 基因 t-complex polypeptide 1	AY226979	517	147	t-complex polypeptide 20 [<i>Drosophila virilis</i>]	63	82	BLASTx
核苷二磷酸激酶基因 NDPK	AY226980	594	157	Nucleoside diphosphate kinase [<i>Columba livia</i>]	61	76	BLASTx
G 蛋白基因 GTP-binding protein	AY226983	737	199	GTP-binding protein sara [<i>Homo sapiens</i>]	68	78	BLASTx
LGG 基因 LGG	AY226985	844	197	LGG [<i>Schistosoma mansoni</i>]	51	74	BLASTx
核糖体蛋白 S8 基因 Ribosomal protein S8	AY226986	748	212	Ribosomal protein S8 [<i>Apis mellifera</i>]	57	68	BLASTx
beta-微管蛋白基因 beta-tubulin	AY220457	1440	443	<i>Fasciola hepatica</i> partial mRNA for beta-tubulin	82	—	BLASTn
泛素连接酶 E2 基因 Ubiquitin-conjugating enzyme E2	AY251608	846	149	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 [<i>Homo sapiens</i>]	54	72	BLASTx
泛素激活酶 E1 Ubiquitin-activating enzyme E1	AY251607	2281	554	ubiquitin-activating enzyme E1 [<i>Homo sapiens</i>]	72	85	BLASTx
聚合泛素基因 Poly-ubiquitin	AY254344	1052	342	Similar to ubiquitin C [<i>Mus musculus</i>]	100	100	BLASTx

节作用^[6]。核苷二磷酸激酶能结合在蛋白质的二磷酸核苷磷酸化为三磷酸核苷,调节细胞内的能量池的大小,进而活化蛋白质^[7]。钙调神经磷酸酶是一种钙离子敏感的蛋白磷酸酶,属丝/苏氨酸蛋白磷酸酶家族(P-型膜蛋白家族)成员,是迄今发现的唯一受Ca²⁺/钙调素(CaM)调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶。钙调神经磷酸酶在神经递质的释放、突触可塑性方面亦具有重要的调节作用^[8]。某些基因为信号转导相关蛋白,

如G蛋白基因(AY226983)等,它存在于各个组织和细胞中,是联系外部信息(如神经递质、细胞因子、激素、活性多肽等)和胞内第二信使的中间环节,参与细胞内外信息的转导^[9]。某些基因为皮层蛋白或膜蛋白,如皮层蛋白Sj20.8基因(AY225315)等,表膜或皮层是血吸虫与宿主和外环境直接接触的界面,对保持虫体的自身稳定和参与宿主的相互作用起着重要的作用,一些表膜抗原可不断变异,对表膜的深入研究可揭示宿主

与寄生虫相互作用的机制^[10]。某些基因为保守的核糖体蛋白如 BBC1 基因 (AY220747)、40S rRNA 蛋白基因 (AY223904) 和核糖体蛋白 S8 基因 (AY226986)。有些基因的功能尚不太清楚如 LGG 基因 (AY226985)。上述基因大部分为管家基因, 涉及血吸虫的生长、发育和繁殖, 可作为候选疫苗和药物靶点。

总之, EST 技术是一种快捷、经济、有效地发现数量可观的日本血吸虫表达序列的方法。本研究获取 149 ESTs 和 18 个全长 cDNA, 其中对部分感兴趣的基因将进行进一步研究, 观察其在防治日本血吸虫病中的地位和作用, 为血吸虫的基因组研究和血吸虫病的防治提供基础资料。

参 考 文 献

- [1] BIAN GW, YU XB, WU ZD. Generation and analysis of 113 adult stage *Schistosoma japonicum* (Chinese strain) expressed sequence tags [J]. Chin Med J, 2002, 115: 1517-1520
- [2] Hoffmann KF, Johnston DA, Dunne DW. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray

- profiling [J]. Genome Biol, 2002, 3:452-459
- [3] Campos EG, Hamdan FF. Cloning of the chaperonin t-complex polypeptide 1 gene from *Schistosoma mansoni* and studies of its expression levels under heat shock and oxidative stress [J]. Parasitol Res, 2000, 86:253-258
- [4] Varadan R, Walker O, Pickart C, et al. Structural properties of poly-ubiquitin chains in solution [J]. J Mol Biol, 2002, 324: 637-647.
- [5] Caffrey CR, Salter JP, Lucas KD, et al. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2002; 121: 49-61
- [6] 吴英松, 李明, 陆家海, 等. 恶性疟原虫乳酸脱氢酶活性测定及在药物疗效监测方面的初步观察. 第一军医大学学报 [J], 2002, 22: 25-27
- [7] Kouni MH, Naguib FN. Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni* [J]. Int J Parasitol, 1990, 20: 37-44.
- [8] Mecozzi B, Rossi A, Lazzaretti P, et al. Molecular cloning of *Schistosoma mansoni* calcineurin subunits and immunolocalization to the excretory system [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 110: 333-343.
- [9] Hamdan FF, Abramovitz M, Mousa A, et al. A novel *Schistosoma mansoni* G protein-coupled receptor is responsive to histamine [J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 119: 75-86.
- [10] Abath FG, Xavier EM, Allen R, et al. Characterization of Sm13, a tegumental antigen of *Schistosoma mansoni* [J]. Parasitol Res, 2000, 86: 745-752.

(收稿日期:2004-01-02 编辑:庄兆农)

文章编号:1000-7423(2005)-02-0089-01

【病例报告】

胃肠蝇蛆病一例报告

苏水莲, 陈桂凤, 张瑞其, 廖华

中图分类号:R757.9 文献标识码:D

患者,男,37岁,农民,江西瑞金湖岭村人,有外出史,现在广东汕头市某村的一家服装厂打工。食欲不振、上腹部疼痛、腹胀、睡眠差、头昏、耳鸣、口渴、烦躁不安,畏寒怕冷、乏力半年余。曾到当地诊所治疗,诊断为胃炎和感冒。服用雷尼替丁、感冒清及速效伤风胶囊等药,未见好转。2004年11月初因身体虚弱、体力不佳,口服柠檬葡萄糖液600ml,出现恶心、呕吐、水样血便,呕吐物和大便中有大量光滑棕褐色和棕黑色长圆形比花生米小的虫体。呕吐物内的虫体洗净,计数为321条蝇蛹。次日到汕头市医院做胃镜检查,未发现异常。然后将呕吐物中部分虫体带至本室作进一步鉴定。

实验室检查及治疗:肉眼观察,见外表光滑呈棕褐色和棕黑色圆筒状虫体,将棕褐色虫体的后气门切下,依次置于70%、80%、90%、95%、100%的乙醇中各脱水15min,取出后置纯冬青油中透明10min。取出标本,迅速滴上中性树脂,盖上洁净的盖玻片压平后气门,自然干燥后镜检摄像。镜下观察蛹的后端有较小的后气门一对。两后气门相距较远。气门环完整,近圆形;气门钮在气门环中,气门裂形直,后气门四周有数对突起,背方各突

间的距离约相等。用解剖针挑去棕黑色的蛹壳,置4×10倍的体视显微镜下观察,可见1个尚未羽化的蝇,其头部为橙色,腹部蓝色,复眼红色无毛。根据蝇蛹和未羽化蝇的形态特点,作者确定呕吐物中的虫体为红头丽蝇(*Calliphora vicina*)的蛹。口服甲苯达唑每次100mg,每天2次连服2d,一周后随访,患者恢复正常。

从口中呕出红头丽蝇的蛹,未见文献报道。患者打工处生活条件差、工作环境恶劣。大小便均排在居住房前、后的沟里。红头丽蝇常出没在垃圾堆、厕所、人畜粪便及人类食物上。该患者由于误食含有红头丽蝇卵或幼虫污染的食物而感染。幼虫利用前端外露的一对口钩和腹面前缘具带状的腹垫,附着在人的胃肠道内生长发育、化蛹,引起人体胃肠道蝇蛆病^[1,2],蛹可随大便或呕吐物排出体外。

参 考 文 献

- [1] 赵魁先,主编. 人体寄生虫学[M]. 北京:人民卫生出版社,1983.1037.
- [2] 姚永政,许先典,主编. 实用医学昆虫学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社,1982.254-256.

(收稿日期:2004-11-18 编辑:伯韦)

作者单位:赣南医学院病原生物学教研室,赣南 341000