

编码大陆株日本血吸虫天冬酰胺 肽链酶 cDNA 的克隆及其在 BALB/c 小鼠体内的表达*

同济医科大学寄生虫学教研室 武汉 430030 李传明 石佑恩

血吸虫成虫 31/32 kDa 蛋白除具有公认的免疫学诊断价值外, 作为疫苗抗原的候选分子也有潜在价值^[1]。我们对编码大陆株日本血吸虫 32 kDa 天冬酰胺肽链酶(Sj 32)进行了克隆、测序鉴定、构建真核表达载体, 并在小鼠骨骼肌细胞得到表达, 为该抗原的 DNA 疫苗研究打下了基础。

材料与方法

Sj 32 cDNA 的克隆、鉴定

日本血吸虫成虫 RNA 的分离纯化, cDNA 合成等参见文献^[2]。根据文献^[3]报道的核苷酸序列, 设计并合成引物, P₁: 5'-CTCGGA TCCAA GA GAAA TAA TGTTTTA TTC-3', P₂: 5'-CGCAA GCTTGAATTA TTTTAACTTAACCGCA-3', P₁ 和 P₂ 分别在其 5' 端设有 BamHI 和 HindIII 酶切位点, 常规 RT-PCR 制备 Sj32 编码区 cDNA。PCR 产物经 BamHI 和 HindIII 双酶切后, 在 T4 DNA 连接酶作用下, 克隆到 pBluescript, 构建重组 pSj 32, 转化大肠杆菌 TG1, 酶切图谱法筛选鉴定阳性克隆, 并采用 DNA 测序酶 2.0 版试剂盒 (USA), 对 Sj 32 cDNA 进行核苷酸序列测定。

真核表达载体 PCD-Sj 32 的构建

另设计一条 5' 端带 XbaI 酶切位点的引物 P₃: 5'-CTCTCTA GA GAATTA TTTTAACTTAACCGCA-3', 与 P₁ 一起以 pSj 32 为模板, 扩增出 Sj 32 cDNA, 经 BamHI 和 XbaI 双酶切后, 亚克隆入 PCD 载体, 构建重组真核表达载体 PCD-Sj 32, 常规转化、筛选、鉴定阳性克隆。

Sj 32 在小鼠骨骼肌细胞的表达及检测

将制备纯化的 PCD-Sj 32 溶于无菌生理盐水, 调整浓度为 1 μg/μl, 取 50 μl 直接注射于 5 wk 龄雄性 BALB/c 小鼠股四头肌, 做好标记, 10 d 后处死小鼠, 取注射部位肌肉进行冰冻切片。多聚甲醛固定切片, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 加抗 Sj 31/32 的 McAb 在室温下孵育 1 h 或 4 过夜, PBS 洗 3 次后, 加 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 室温下孵育 1 h, PBS 洗涤后, 吹干, 滴加甘油封片, 荧光显微镜下观察结果。

结 果

重组 DNA pSj 32 的构建及鉴定

用 1 μg 血吸虫成虫的总 RNA, 在逆转录酶作用下, 合成 cDNA 第一链, 采用 RT-PCR 方法成功扩增出 1 312 bp

的 Sj 32 编码区 cDNA。重组 pSj 32 测序结果, 在 cDNA 编码区 5' 端可见 ATG 起始密码子及其前面的 BamHI 位点, 在 3' 端可见 TAA 终止密码子及其后面的 HindIII 位点, 均与预期结果一致。

真核重组表达载体 PCD-Sj 32 的鉴定

PCD-Sj 32 经 BamHI 和 XbaI 双酶切后可得到 1 312 bp 的 Sj 32 cDNA 片段。以该重组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 可得到以 cDNA 为模板同样大小的 DNA 片段。

Sj 32 在小鼠骨骼肌细胞的表达

免疫组化结果显示 Sj 32 能在小鼠体内表达, 表达产物主要见于骨骼肌细胞胞浆内, 在肌细胞间也可见到表达产物。空白载体和生理盐水对照组均未见阳性表达产物。

讨 论

过去认为 Sm 32 即血红蛋白酶, 现发现具有血红蛋白酶活性的是 Sm 31^[4]。Sm 32 与编码豆荚天冬酰胺肽链酶的 cDNA 具有同源性。因此, 血吸虫的 32 kDa 蛋白应为天冬酰胺肽链酶, 归类于新的半胱氨酸家族。该酶主要作用于天冬酰胺残基的羧基端肽链^[5]。该酶在血吸虫生活史中的重要生物学功能有待进一步阐明。

参 考 文 献

- 1 沈淀文, 李雍龙, 韩定俊, 等. 日本血吸虫成虫 31/32 kDa 蛋白的纯化及保护性免疫力的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1993; 11: 241~243
- 2 李传明, 石佑恩. 日本血吸虫大陆株 26 kDa 谷胱甘肽 S-转移酶编码区基因的克隆及序列测定. 寄生虫与医学昆虫学报 1997; 4: 6~11
- 3 Merckelbach A, Hasse S, Dell R, et al. cDNA sequences of *Schistosoma japonicum* coding for two cathepsin B-like proteins and Sj32. Trop Med Parasitol 1994; 45: 193~198
- 4 Gotz B, Klinkert MQ. Expression and partial characterization of a cathepsin B-like enzyme (Sm31) and a proposed 'haemoglobinase' (Sm32). Biochem J 1993; 229: 801~806
- 5 Dalton JP, Holo-Jam riska L, Brindley PJ. A sparaginyI endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology 1995; 111: 575~580
- 6 李传明, 石佑恩. 日本血吸虫 26 kDa 谷胱甘肽 S-转移酶 DNA 疫苗的研究及其保护性免疫效果观察. 中国寄生虫病防治杂志 1998; 11: 207~211

* 此研究项目获卫生部总理基金资助 (No. 94-y-19)

1997 年 3 月 27 日收稿 1998 年 8 月 20 日修回

(编辑: 任燕芬)