

## 【研究简报】

文章编号: 1000-7423(2009)-01-0087-02

## 微小隐孢子虫孢子与宿主黏附相关蛋白的筛选

郭安<sup>1</sup>, 尹继刚<sup>1\*</sup>, 向梅<sup>2</sup>, 刘贤英<sup>2</sup>, 张岩<sup>1</sup>, 陈启军<sup>1</sup>

**【摘要】** 利用人结肠癌细胞 (Caco-2 cell) 对微小隐孢子虫孢子噬菌体展示文库进行筛选。对筛选得到的噬菌体进行克隆及测序分析, 共获得 5 个特异的基因片段, 其中 1 个为已知的编码微小隐孢子虫重要的侵入和黏附相关蛋白 CP2, 另外 4 个编码功能未知的蛋白。筛选得到的蛋白可能参与孢子与宿主细胞的黏附过程。

**【关键词】** 微小隐孢子虫; T7 噬菌体展示; 筛选; 黏附

中图分类号: R382.3 文献标识码: B

Screening for Relevant Proteins Involved in Adhesion of *Cryptosporidium parvum* Sporozoites to Host CellsGUO An<sup>1</sup>, YIN Ji-gang<sup>1\*</sup>, XIANG Mei<sup>2</sup>, LIU Xian-ying<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, CHEN Qi-jun<sup>1</sup>

(1 Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China; 2 Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Hospital, Jilin University, Changchun 130041, China)

**【Abstract】** The *Cryptosporidium parvum* T7 phage display library was screened by using Caco-2 cells. Five specific gene fragments were identified by blasting sequences in GenBank, one of which encoding the CP2 protein was previously identified as a surface molecule of sporozoites and involved in parasite invasion. The others are hypothetic proteins with unknown functions. Bioinformatic analysis of these proteins indicated that they may be involved in the host-parasite interactions.

**【Key words】** *Cryptosporidium parvum*; T7 phage display; Screening; Adhesion

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30400324)

\* Corresponding author, E-mail: yjg@jlup.edu.cn

隐孢子虫病是一种世界范围的人兽共患寄生虫病, 被认为是六大腹泻病之一, 2002 年被美国疾病预防控制中心和美国国家卫生研究院列为 B 类生物恐怖病原<sup>[1]</sup>。艾滋病患者的隐孢子虫感染率高达 48%, 是其重要致死原因之一。尽管硝唑尼特 (nitazoxanide) 已被美国食品药品监督管理局批准用于治疗儿童隐孢子虫病, 但对免疫缺陷患者来说, 目前尚无有效的防治药物。至今已尝试的 200 多种药物均不能有效控制隐孢子虫感染, 主要原因在于该虫寄生于由宿主细胞膜和虫体膜共同构成的、位于细胞质外的纳虫空泡内。隐孢子虫细胞与宿主细胞之间的作用机制尚不清楚。隐孢子虫孢子对宿主上皮细胞的识别、黏附和侵入可能是虫体致病的关键。有研究证实, 位于孢子表膜的分子在虫体对宿主上皮细胞的黏附和侵入过程中起着关键作用, 这些分子的发现及功能鉴定对于研制疫苗或有效的防治药物至关重要。

本研究用人结肠癌细胞系 (Caco-2 cell) 筛选微小隐孢子虫 T7 噬菌体展示文库, 以期获得微小隐孢子虫黏附相关蛋白

质, 为探讨微小隐孢子虫致病机制奠定基础。

## 1 材料与方 法

1.1 虫株与细胞株 牛源微小隐孢子虫长春分离株由本室保

存。Caco-2 cell 购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。

1.2 噬菌体展示文库构建 隐孢子虫 T7 噬菌体展示文库由本实验室构建<sup>[2]</sup>, 文库容量为  $1.2 \times 10^7$  个重组子, 插入片段平均大小为 400 bp。

1.3 筛选微小隐孢子虫噬菌体展示文库 将 Caco-2 细胞悬液加至 96 孔细胞培养板, 约 3 d 长成单层, 吸出培养基, 每次筛选使用 16 个孔。每孔加入 100  $\mu$ l 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 37  $^{\circ}$ C 封闭 1 h。用含 0.1% Tween-20 的 Tris 平衡盐缓冲液 (TBST) 洗 5 次, 200  $\mu$ l/次。将重组噬菌体与培养基 1:1 混合, 50  $\mu$ l/孔, 37  $^{\circ}$ C 放置 1 h。弃上清, TBST 洗 5 次, 每孔再加入 200  $\mu$ l 噬菌体洗脱液, 37  $^{\circ}$ C 放置 10 min。将噬菌体洗脱液吸出, 即为第 1 轮结合的噬菌体, 取 10  $\mu$ l 梯度稀释后感染大肠埃希菌 (BLT5403) 检测滴度。将第 1 轮筛选获得的噬菌体加入 100 ml 宿主菌 (大肠埃希菌 BLT5403) 内, 37  $^{\circ}$ C 震荡培养至宿主菌裂解, 约 5 h 后, 菌液变澄清。将菌液 5 000 $\times$ g 离心 30 min, 收集上清, 即为扩增后文库。反复使用 Caco-2 细胞筛选扩增文

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30400324)

作者单位: 1 吉林大学人兽共患病研究所人兽共患病教育部重点实验室, 长春 130062; 2 吉林大学第二临床医院妇产科, 长春 130041

\* 通讯作者, E-mail: yjg@jlup.edu.cn

库,待结合噬菌体的滴度稳定后终止筛选,共筛选 7 轮。

1.4 噬菌体插入片段的序列测定与分析 用无菌枪头从原始包装物滴度测定平板上挑取 100 个噬菌斑,分别加入含 100 μl 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA, pH 8.0)的离心管内,漩涡振荡 30 s, 65 °C 加热 10 min。冷却至室温, 12 000×g 离心 3 min, 上清含噬菌体裂解物。以噬菌体裂解物为模板,利用 T7 引物(上游引物: 5'-ggagctgtcgtattccagtc-3', 下游引物: 5'-aacccct-caagaccgttta-3', 来自 Novagen 公司 T7 Select 10-3b 克隆试剂盒) PCR 扩增插入的基因片段, PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 50 s, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物凝胶回收后克隆至 pMD18-T 载体(日本 TaKaRa 公司),送上海生物工程技术有限公司测序。测序结果登陆 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 Blast 核酸同源性检索,对所获得的基因序列及其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析。

## 2 结果

2.1 噬菌体展示文库的筛选 用 Caco-2 细胞对微小隐孢子虫噬菌体展示文库进行 7 轮筛选,第 5 轮至第 7 轮筛选结合的噬

菌体滴度基本稳定,说明能结合在细胞上的噬菌体已饱和,去除了非特异性结合的噬菌体(表 1)。

表 1 各轮筛选的噬菌体富集结果

筛选轮次	投入噬菌体滴度(pfu/ml)	结合噬菌体滴度(pfu/ml)	结合率
1	2.4×10 <sup>10</sup>	2.2×10 <sup>4</sup>	8.8×10 <sup>-7</sup>
2	2.8×10 <sup>10</sup>	3.6×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>-6</sup>
3	1.9×10 <sup>10</sup>	7.6×10 <sup>5</sup>	5.1×10 <sup>-6</sup>
4	2.2×10 <sup>10</sup>	2.1×10 <sup>6</sup>	9.5×10 <sup>-5</sup>
5	2.6×10 <sup>10</sup>	5.4×10 <sup>6</sup>	2.1×10 <sup>-4</sup>
6	1.8×10 <sup>10</sup>	6.5×10 <sup>6</sup>	3.6×10 <sup>-4</sup>
7	1.7×10 <sup>10</sup>	4.5×10 <sup>6</sup>	2.6×10 <sup>-4</sup>

2.2 基因测序及同源性分析 以裂解的噬菌体为模板,进行 PCR 扩增,扩增出 5 个基因,其中 1 个为编码已知功能蛋白质的基因,4 个为编码未知功能蛋白质的基因。将筛选得到的 5 个功能基因编码的氨基酸序列通过 InterProScan 分析,结果显示,4 个蛋白质含有 N 端信号肽,3 个蛋白质含有跨膜区。利用生物信息学软件 DNASTAR 对编码蛋白质的基因与已知序列的同源性进行分析,同源性均为 100%(表 2)。

表 2 Caco-2 细胞筛选得到的基因及其编码的蛋白质

基因登录号	基因编码的蛋白质	功能	片段长度(bp)	A+T 含量(%)	与已知序列同源性(%)
XM_625389	微小隐孢子虫可能的顶器门特异蛋白质	未知	333	62.76	100
XM_625966	微小隐孢子虫包含信号肽的蛋白质	未知	415	53.01	100
XM_627245	微小隐孢子虫分泌蛋白,富含半胱氨酸,含有一个黏蛋白样苏氨酸重复序列和信号肽的蛋白质	未知	508	61.42	100
XM_628196	微小隐孢子虫含信号肽和可能的 4-5 个跨膜区,SKSR 家族成员,末端着丝粒的(染色体)蛋白	未知	433	71.36	100
AY471868	微小隐孢子虫 CP2 蛋白	已知	366	63.93	100

## 3 讨论

随着微小隐孢子虫全基因组序列的破解,对隐孢子虫的研究已从结构基因组学阶段转到功能基因组学阶段。微小隐孢子虫孢子与宿主上皮细胞之间的黏附作用是其致病作用的关键,这一过程涉及多种虫体分子与宿主细胞的相互作用。研究虫体对宿主细胞识别和作用的分子机制对于阐明隐孢子虫的致病机制和制定有效的防治策略至为重要。但目前对两者之间的分子识别机制研究很有限,其黏附机制尚不明确。

本研究用 Caco-2 细胞从已构建的微小隐孢子虫孢子的噬菌体展示文库中筛选黏附相关蛋白。Caco-2 细胞具有与小肠上皮细胞相同的微绒毛结构和紧密连接,并且可被微小隐孢子虫感染<sup>[3]</sup>,因而广泛应用于微小隐孢子虫同宿主细胞相互作用的研究中,其对文库的筛选模拟了隐孢子虫在宿主体内的黏附和侵入过程,获得 5 条编码黏附相关蛋白的基因,其中 1 条编码 CP2 蛋白,该蛋白位于卵囊和孢子的表面,可能与隐孢子虫孢子的黏附和侵入有关<sup>[4]</sup>。

筛选得到的 5 个蛋白经 InterProScan 分析,可能是黏附和侵入相关蛋白。这些基因与 GenBank 中的已知序列具有高同源性,表明这些基因序列是保守的,可能编码具有重要功能的蛋白。其中编码含有跨膜区蛋白质 XM\_625389 的基因在顶器门寄生虫(如疟原虫、微小泰勒虫)中含有类似基因,表明蛋

白 XM\_625389 可能在顶复门寄生虫中具有某种相似的功能,可能是潜在的黏附和侵入相关蛋白。另外, XM\_627245 为黏蛋白类相关蛋白,而且与已报道的 GP900 蛋白在结构上相类似,具有黏蛋白样模体、半胱氨酸和苏氨酸富集模体,并具有 O-糖基化位点<sup>[5]</sup>,提示该蛋白可能具有与 GP900 蛋白相似的黏附功能。

## 参 考 文 献

- [1] Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents[J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(2): 225-30.
- [2] Yao LQ, Yin JG, Zhang XC, et al. *Cryptosporidium parvum*: Identification of a new surface adhesion protein on sporozoite and oocyst by screening of a phage-display cDNA library[J]. Exp Parasitol, 2007, 115(4): 333-338.
- [3] Joe A, Verdon R, Tzipori S, et al. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to human intestinal epithelial cells[J]. Infect Immun, 1998, 66(7): 3429-3432.
- [4] Steven P, O'Hara, Jae-Ran Y, et al. A novel *Cryptosporidium parvum* antigen, CP2, preferentially associates with membranous structures[J]. Parasitol Res, 2004, 92(4): 317-327.
- [5] Barnes DA, Bonnin A, Huang JX, et al. A novel multidomain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion[J]. Mol Biochem Parasitol, 1998, 96(18): 93-110.

(收稿日期: 2008-06-17 编辑: 高石)