

广州管圆线虫 cDNA 文库基因筛选的研究进展

陈婧 詹希美*

【摘要】 cDNA 文库因不含内含子而便于克隆和大量扩增,利用多种筛选方法并结合生物信息学软件获得阳性克隆,对于从分子水平上深入研究广州管圆线虫病的致病机制及诊断方法具有重要意义。该文综述了广州管圆线虫各期 cDNA 文库特异基因筛选的研究进展。

【关键词】 广州管圆线虫;cDNA 文库;筛选

Advances on screening of the genes from *Angiostrongylus cantonensis* cDNA library CHEN Jing, ZHAN Xi-mei*. Department of Parasitology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

* Corresponding author: ZHAN Xi-mei, Email: zhanxm@mail.sysu.edu.cn

Supported by National Basic Research Program of China (973 Program) (2010CB530004) and National Natural Science Foundation of China (2005U0632003)

【Abstract】 This paper reviewed the research progress on screening of the specific genes from *Angiostrongylus cantonensis* cDNA library. The cDNA library is easy to clone and amplify for lack of introns. Obtaining positive clones using a variety of screening methods combined with softwares of bioinformatics is of significance to deep on the researches on pathogenic mechanism and diagnostic methods of *Angiostrongylus cantonensis* on molecular level.

【Key words】 *Angiostrongylus cantonensis*; cDNA library; Screening

广州管圆线虫病是一种人兽共患寄生虫病,其病原体主要流行于东南亚、太平洋岛屿及加勒比海沿岸国家和地区,随着全球旅游的普及和潜在中间宿主的多样性分布,近几年来在欧洲、美国南部等地也相继出现该病的流行^[1]。广州管圆线虫幼虫进入人体后主要侵犯中枢神经系统,引起嗜酸性粒细胞增多性脑膜脑炎或脑膜炎,除大脑和脑膜外,病变还可波及小脑、脑干、脊髓和眼部^[2],在成年患者中,主要的临床症状为头痛(95%)、颈项强直(46%)、感觉异常(44%)、呕吐(38%)和恶心(28%)^[3]。该病诊断的金标准是在患者脑积液中查出幼虫,但检出率一般为 10%~44%,易造成误诊、漏诊以致患者死亡。虽然用虫体粗抗原或蛋白组分抗原可以检出患者产生的抗体,但虫体的获得有限,用虫体能够制备的粗抗原和蛋白组分就更少,亦造成广州管圆线虫病诊断困难。

以 mRNA 为模板,在体外经反转录酶催化反转

录成 cDNA,与适当的载体(常用噬菌体或质粒载体)连接后转化受体菌,则每个细菌含有一段 cDNA 并能繁殖扩增,这样包含着细胞全部 mRNA 信息的 cDNA 克隆集合称为该组织细胞的 cDNA 文库。在寄生虫学领域,由于寄生虫特异抗原基因重组 DNA 技术的发展,构建 cDNA 文库可以从分子水平上提供虫源抗原,在保护性和诊断性抗原的获取及研究方面起到重要作用。同时,cDNA 文库有自身的特殊用途,如可对寄生虫发育过程中时间调节基因的表达特征进行分析^[4]。构建优质的表达文库,从中筛选特异性抗原,对于从分子水平上深入研究广州管圆线虫病的致病机制及诊断方法具有重要意义。现将广州管圆线虫各期 cDNA 文库免疫筛选出的结果分述如下。

1 广州管圆线虫 IV 期幼虫 cDNA 文库的筛选结果

1.1 组织蛋白酶

岳永亮等^[5]将构建的 IV 期幼虫 cDNA 文库大规模测序及归类,从中发现了组织蛋白酶 Z 的同源基因,再根据已获得的广州管圆线虫组织蛋白酶 Z cDNA 序列,去除信号肽的编码序列并设计引物,PCR 扩增目的基因,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2011.05.013

基金项目:国家 973 基金(2010CB530004)和国家自然科学基金重点项目(2005U0632003)基金联合资助

作者单位:510080 广州,中山大学医学院寄生虫学教研室

* 通信作者:詹希美,Email: zhanxm@mail.sysu.edu.cn

感受态细胞,经卡那霉素筛选获得阳性克隆。生物信息学分析表明克隆号为 00012F09 的 EST 基因在 GenBank 中与多个物种的组织蛋白酶 Z 基因同源,其中与新隐杆线虫的组织蛋白酶 Z 的同源性最高,一致性达 82%,相似性达 89%。在物种进化关系上,与新隐杆线虫及秀丽隐杆线虫亲缘关系最近。该基因编码 294 个氨基酸,N 端的 17 个氨基酸属于分泌型信号肽,未发现线粒体等亚细胞定位序列及跨膜序列。因此推断此蛋白酶为一种分泌性的蛋白酶,作为分泌抗原有可能进入宿主体内刺激宿主产生可供临床检测的特异抗体,同时该酶具有构成真核生物半胱氨酸蛋白酶活性中心的 3 个氨基酸残基(Asn253、Cys84、His232),属于木瓜蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白酶,且在溶液中性质稳定,有研究表明半胱氨酸蛋白酶是多种寄生虫的免疫优势抗原,作为诊断抗原具有很好的敏感性及特异性。

1.2 半胱氨酸蛋白酶抑制剂

潘智华等^[6]将广州管圆线虫 IV 期幼虫 cDNA 质粒文库测序后经同源比对,筛选出半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin)基因,再将该基因克隆表达后用纯化的融合蛋白隔周免疫小鼠,末次免疫 1 周后用广州管圆线虫 III 期幼虫攻击感染,3 周后剖杀小鼠,小鼠产生了 58.1% 的减虫率和 20% 的保护率。半胱氨酸蛋白酶抑制剂是半胱氨酸蛋白酶可逆的竞争性内源抑制剂超家族,根据其他寄生线虫研究报告,半胱氨酸蛋白酶抑制剂对于其寄生宿主的免疫应答调节起重要作用,主要表现在以下 3 个方面:(1)抑制抗原提呈细胞 MHC-II 分子恒定链的切割,从而抑制特异 T 细胞增殖。(2)上调宿主 IL-10 表达,通过抑制 Th1 型细胞因子合成及细胞增殖分化,使得宿主 T 细胞从免疫保护性 Th1 型免疫应答向无保护性 Th2 型免疫应答转变。(3)上调 IFN- γ 活化的巨噬细胞释放一氧化氮(nitric oxide, NO),而 NO 对寄生虫有细胞毒作用^[7-10]。Dainichi 等^[11]证实巴西日圆线虫的重组半胱氨酸蛋白酶抑制剂免疫小鼠对巴西日圆线虫有更强的抵御能力。此实验表明广州管圆线虫的半胱氨酸蛋白酶抑制剂可诱导小鼠产生保护型免疫力,对小鼠有免疫保护作用,然而保护率不高,仅 20%,可能通过对免疫剂量的探索和免疫途径的改变来提高免疫保护效果。

Liu 等^[12]根据表达序列标签(expressed sequence tag, EST)分析设计引物,经 PCR 扩增含一个 369 bp 的完整开放读框,构建重组质粒并表达,再

用抗血清筛选出特异性抗原。经 RT-PCR 分析显示该基因在 III 期、IV 期幼虫和成虫体内表达量相同,该基因在广州管圆线虫感染过程中可能起着免疫调节作用。

1.3 天冬氨酸蛋白酶

郭鹏娟等^[13]以 cDNA 文库中含有天冬氨酸蛋白酶(ASP)基因的质粒为模板扩增目的基因,得到广州管圆线虫 ASP 基因,编码 121 个氨基酸,相对分子质量(M_r)为 13 398.26。天冬氨酸蛋白酶在人体中构成胃蛋白酶等已被确认,这些酶主要参与降解和吞饮细胞内蛋白,且在组织中分布广泛。目前天冬氨酸蛋白酶已经在很多线虫中得到确认,包括秀丽隐杆线虫、美洲板口线虫、犬钩口线虫及粪类圆线虫等^[14-17]。由天冬氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶以及金属蛋白酶组成的肠源性多酶体系已被认为是较好的线虫疫苗候选抗原,在许多寄生虫病的临床用药中,天冬氨酸蛋白酶已成为临床用药靶位。

1.4 胶原蛋白

王琼等^[18]根据 EST 中部分序列和文库载体序列设计引物,采用 PCR 技术从广州管圆线虫幼虫的 cDNA 文库中分段扩增,再拼接获得全长 cDNA 序列。根据 cDNA 全长序列,从文库中扩增出编码一种胶原蛋白的新基因。胶原蛋白是动物体内含量最丰富的蛋白,它不仅是结缔组织的主要蛋白成分,也是与多种组织器官密切相关的功能性蛋白。过去认为胶原蛋白只用于构成支架,起到保护作用,现已发现胶原蛋白结构的改变可以使天然状态下未充分暴露的抗原决定簇暴露,从而增强抗原性。

1.5 半乳凝素蛋白

郝丽等^[19]根据 cDNA 文库 EST 测序结果筛选出有诊断潜能的半乳凝素基因。半乳凝素最早是 Barondes 等^[20]从脊椎动物中提取出的一种能和半乳糖结合的凝集素,它的出现是嗜酸性或嗜碱性炎症的标志,半乳凝素以二聚体或三聚体结构域存在,可能参与细胞分化、细胞调节和细胞间的相互作用,该蛋白可能是一个较好的诊断抗原。

以上的研究可以看出,大多数研究者都选择广州管圆线虫 IV 期幼虫 cDNA 文库进行筛选,主要是由于广州管圆线虫 III 期幼虫侵入人体后在中枢神经系统发育为 IV 期幼虫并致病有关。该期筛选到

的基因多为编码蛋白酶及蛋白酶抑制剂、结构蛋白等,此类蛋白大多具有较好的诊断及免疫调节功能,这对于将广州管圆线虫病的诊断及免疫调节锁定在 IV 期幼虫有着很好的提示意义。

2 广州管圆线虫 V 期幼虫 cDNA 文库的筛选结果

赵巧莲等^[21]从广州管圆线虫 V 期幼虫提取总 RNA,用 SMART cDNA 文库构建试剂盒构建了滴度为 1.49×10^{10} pfu/ml 的扩增文库,重组效率达到 99.8%。应用感染 SD 大鼠血清作为探针免疫筛选表达文库,共获得 11 个阳性克隆。同源分析发现其中 1 个与广州管圆线虫 V 期幼虫的 1 个 EST 同源率为 99%,有 5 个与秀丽隐杆线虫和新杆状线虫同源率最高,为 91%。用 DNASTar 软件预测出 6 个序列含有完整的开放读框,推测的编码蛋白质 M_r 为 17 600 ~ 40 900。

王寒等^[22]在前期研究中用广州管圆线虫感染鼠血清筛选 cDNA 文库,获得了广州管圆线虫 V 期幼虫 7 个特异性抗原基因。对这些抗原基因进行同源分析,结果显示,AC11 基因与犬钩虫和秀丽隐杆线虫中一种假定的亚硫酸盐氧化酶 mRNA 序列的同源率为 78%,表明 AC11 可能为广州管圆线虫的亚硫酸盐氧化酶。有研究证明亚硫酸盐氧化酶的催化反应对人是极其重要的,一旦缺乏会导致严重的神经系统异常,甚至引起早期死亡^[23-24]。由此推测 AC11 蛋白可能与广州管圆线虫的生长发育有关。

3 筛选广州管圆线虫成虫 cDNA 文库

孟锦绣等^[25]利用多克隆抗大鼠血清制备抗体探针免疫筛选广州管圆线虫成虫 cDNA 文库,对筛选得到的阳性克隆做交叉反应实验,PCR 扩增外源基因插入片段并测序,结果获得 15 个阳性克隆,cDNA 插入片段分属于 3 种基因。经核苷酸序列分析和同源比对,其中 1 个属中间纤维家族基因,长为 1 510 bp,3 个与旋盘尾丝虫和秀丽隐杆线虫的真皮抗原基因同源,11 个属精原蛋白家族基因。蛋白质结构预测表明 3 种基因均存在明显疏水区。

孟锦绣等^[26]在成虫 cDNA 文库中挑选分离良好的噬菌斑进行 PCR 扩增,获得长 1 416 bp、编码 421 个氨基酸的 γ -丁基甜菜碱羟化酶 (GAMMA-BBH) 的基因。GAMMA-BBH 是 L-肉碱生物合成的关键酶,而 L-肉碱是脂肪酸代谢的关键酶,提示寄生虫与宿主在脂肪酸代谢方面可能存在一定关系。

一般寄生虫缺乏脂肪酸代谢的酶类,而广州管圆线虫成虫高丰度表达该酶,推测可能是因为成虫早期寄生在终宿主脑部,而脑是富含脂类物质的器官,广州管圆线虫寄生的血管中脂类物质含量也相对较高,这些脂类物质可能成为广州管圆线虫重要的食物和能量来源^[27]。如果破坏广州管圆线虫的脂肪酸 β -氧化作用就有可能阻止该虫的生长发育,因此 GAMMA-BBH 可能成为抗广州管圆线虫的新药靶。

4 结语

1997 年以前,广州管圆线虫病在我国大陆地区极为罕见,仅报道 3 例确诊病例。近年来,该病病例数迅速增加,先后在浙江温州、福建长乐^[28-29]等地暴发流行。广州管圆线虫病日益成为威胁我国人民健康的传染病之一,2003 年广州管圆线虫病被卫生部列为我国新发传染病^[30]。

利用基因重组和分子生物学技术在体外表达特异性蛋白现已广泛适用于各个研究领域,通过免疫筛选的方法从 cDNA 文库中筛选特异有效的抗原是寄生虫研究的常用方法,结合生物信息学软件对筛选的基因进行核酸序列分析和蛋白质结构功能预测是更常见的分析途径。目前已有研究者报道一些新的筛选方法,如抑制性消减杂交技术、SSS (subsection screening) 筛选法^[31-32]。目前筛选获得的蛋白大致分为分泌排泄抗原、结构蛋白类、酶类和酶抑制剂类。

参 考 文 献

- [1] Graeff-Teixeira C, da Silva AC, Yoshimura K, et al. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(2):322-348.
- [2] 詹希美. 人体寄生虫学(八年制)[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 227-229.
- [3] Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, et al. Human angiostrongyliasis[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(10):621-630.
- [4] 凌家俭, 张耀娟, 章子豪. 寄生虫 cDNA 文库的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14(4):299-301.
- [5] 岳永亮, 于彦杰, 杨潇, 等. 广州管圆线虫组织蛋白酶 Z 基因的原核表达及免疫学分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(9):810-817.
- [6] 潘智华, 何嵩, 程梅, 等. 广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的克隆表达及免疫保护作用研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6):534-538.
- [7] Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, et al. Bm-CPI-2A, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing[J]. Curr Biol, 2001, 11(6):447-451.

- [8] Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, et al. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production [J]. Eur J Immunol, 1997, 27 (9) : 2253-2260.
- [9] Schonemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus* [J]. J Immunol, 2001, 167 (6) : 3207-3215.
- [10] Hartmann S, Schonemeyer A, Sonnenburg B, et al. Cystatins of filarial nematodes up-regulate the nitric oxide production of interferon gamma-activated murine macrophages [J]. Parasite Immunol, 2002, 24 (5) : 253-262.
- [11] Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K, et al. A cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response [J]. Infect Immun, 2001, 69 (12) : 7380-7386.
- [12] Liu YH, Han YP, Li ZY, et al. Molecular cloning and characterization of cystatin, a cysteine protease inhibitor, from *Angiostrongylus cantonensis* [J]. Parasitol Res, 2010, 107 (4) : 915-922.
- [13] 郭鹏娟, 詹希美, 甘明, 等. 广州管圆线虫 ASP 基因的克隆及原核表达 [J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (5) : 471-474.
- [14] 杨荣武. 生物化学原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 135-141.
- [15] Na BK, Lee EG, Lee HW, et al. Aspartic proteases of *Plasmodium vivax* are highly conserved in wild isolates [J]. Korean J Parasitol, 2004, 42 (2) : 61-66.
- [16] Williamson AL, Brindley PJ, Loukas A, et al. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules [J]. Parasitology, 2003, 126 (2) : 179-185.
- [17] Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, et al. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets [J]. Trends Parasitol, 2001, 17 (11) : 532-537.
- [18] 王琼, 吴焜, 陈晓光, 等. 一种广州管圆线虫新基因—胶原蛋白全长 cDNA 的克隆和鉴定 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6 (9) : 965-968.
- [19] 郝丽, 吴焜, 陈晓光, 等. 广州管圆线虫半乳糖凝集素基因的克隆表达、蛋白纯化及免疫反应性研究 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27 (5) : 584-587.
- [20] Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (33) : 20807-20810.
- [21] 赵巧莲, 马雪莲, 王寒, 等. 广州管圆线虫 V 期幼虫 cDNA 文库的构建及免疫学筛选 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5 (1) : 48-53.
- [22] 王寒, 刘文权, 赵巧莲, 等. 一种新的广州管圆线虫候选诊断抗原基因的克隆、表达及初步鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5 (10) : 764-768.
- [23] Johnson JL, Duran ED. The metabolic and molecular bases of inherited disease [M]. New York: McGraw-Hill, 2001: 63-77.
- [24] Karakas E, Wilson HL, Graf TN, et al. Structural insights into sulfite oxidase deficiency [J]. Biol Chem, 2005, 280 (39) : 33506-33515.
- [25] 孟锦绣, 李卓雅, 詹希美, 等. 广州管圆线虫成虫 cDNA 文库抗原基因的筛选 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (11) : 934-937.
- [26] 孟锦绣, 梁瑜, 何嵩. 广州管圆线虫 γ -丁基甜菜碱羟化酶基因的获得与分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (3) : 186-189.
- [27] 孟锦绣, 何嵩, 程梅, 等. 广州管圆线虫 GAMMA-BBH 基因的克隆表达鉴定和荧光定量检测 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7 (7) : 613-617.
- [28] 薛大燕, 阮云洲, 林宝楚, 等. 温州市一起广州管圆线虫病爆发流行的调查 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18 (3) : 176-178.
- [29] 陈宝建, 李友松, 林金祥, 等. 福建省长乐市广州管圆线虫病爆发感染及疫源地的调查研究 [J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2003, 1 (1) : 6-8.
- [30] 于恩庶, 魏承毓. 新发现和再肆虐传染病诊断标准和防治指南 [M]. 香港: 国际炎黄文化出版社, 2002: 282-283.
- [31] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93 (12) : 6025-6030.
- [32] 瞿文全, 金治平, 赵德修, 等. 快速简便筛选 cDNA 文库的 SSS 法 [J]. 遗传, 2003, 25 (5) : 583-586.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:陈勤)