

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0027-06

【论著】

# 日本血吸虫脱尾童虫表膜结合短肽的筛选与鉴定

刘彦<sup>1</sup>, 张组萍<sup>2</sup>, 王可耕<sup>1</sup>, 顾孔珍<sup>2</sup>, 蔡立汀<sup>2</sup>, 曾庆仁<sup>2\*</sup>

**【摘要】** 目的 筛选噬菌体十二肽库中与日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 脱尾童虫表膜特异性结合而不与尾蚴表膜结合的短肽并鉴定。方法 利用 M13 噬菌体十二肽库, 经体外逆向差异筛选日本血吸虫尾蚴和脱尾活童虫, 从第 3 轮回收的结合噬菌体中随机挑取 15 个克隆进行测序。获取目标噬菌体后, 采用 ELISA 法、洗脱回收率实验 (以 M13KE 为阴性对照) 和免疫组织化学法检测日本血吸虫脱尾童虫、尾蚴与噬菌斑克隆的特异性结合。荧光显微镜观察人工合成的阳性噬菌体短肽与日本血吸虫脱尾童虫体外的特异性结合。构建目的片段 pEGFP-C2 质粒体外转染日本血吸虫脱尾童虫。结果 经 3 轮逆向差异筛选后, 噬菌体回收率从第 1 轮的  $3.50 \times 10^{-5}\%$  到第 3 轮的  $3.20 \times 10^{-2}\%$ , 富集度明显提高。DNA 测序结果表明, 15 个噬菌体克隆分别含有 ZL6、ZL4 和 ZL1 等 3 个不同的短肽序列。ELISA 结果显示, M13 噬菌体短肽 ZL4 (MppZL4)、MppZL6 和 MppZL1 分别与脱尾童虫膜蛋白结合后的 P/N 值为 6.72, 3.65 和 2.22, 分别与尾蚴膜蛋白结合后的 P/N 值为 1.58, 5.15 和 1.20。洗脱回收率实验结果显示, MppZL4 与脱尾童虫洗脱回收率  $[(4.60 \pm 0.27) \times 10^{-2}\%]$  远高于 MppZL6  $[(2.10 \pm 0.23) \times 10^{-3}\%]$ 、MppZL1  $[(1.20 \pm 0.28) \times 10^{-3}\%]$  和 M13KE  $[(1.30 \pm 0.60) \times 10^{-7}\%]$  ( $P < 0.01$ )。免疫组化结果显示, 日本血吸虫脱尾童虫与 MppZL4 特异性结合, 阳性率为 83.0% (83/100)。荧光显微镜检测结果显示, 人工合成的 RhB-ZL4 可与日本血吸虫脱尾童虫体外特异性结合。构建的 ZL4/pEGFP-C2 质粒体外可成功转染日本血吸虫脱尾童虫。结论 筛选获得的短肽 ZL4 能与日本血吸虫童虫表膜特异性结合, 不与尾蚴表膜结合。

**【关键词】** 日本血吸虫; 表膜; 噬菌体展示技术

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

## Screening and Analysis of Peptides Specifically Binding to the Schistosomulum Tegument of *Schistosoma japonicum*

LIU Yan<sup>1</sup>, ZHANG Zu-ping<sup>2</sup>, WANG Ke-geng<sup>1</sup>, GU Kong-zheng<sup>2</sup>, CAI Li-ting<sup>2</sup>, ZENG Qing-ren<sup>2\*</sup>

(1 Department of Parasitology, School of Medicine, University of South China, Hengyang 421001, China; 2 Cell & Molecular Biological Experiment Center, Xiangya School of Medicine, the Central South University, Changsha 410013, China)

**【Abstract】 Objective** To screen and analyze the peptides in 12 phage-display peptide library specifically binding to the schistosomulum, not cercaria, tegument of *Schistosoma japonicum*. **Methods** A 12 phage-display peptide library was screened with the *S. japonicum* schistosomula and cercariae as the target cells for biopanning by degrees, 15 positive clones were picked randomly and deduced by DNA sequencing. According the sequencing result, ELISA test, elution recovery test and immunohistochemical staining were performed to determine the specificity of the phages to the tegument. To further examine its binding properties, the positive peptide conjugated to RhB and recombinant pEGFP-C2 plasmid were similarly synthesized. **Results** After 3 rounds of biopanning, the phage recovery rate increased from  $3.50 \times 10^{-5}\%$  to  $3.20 \times 10^{-2}\%$ , indicating that the phage library was successfully enriched in the tegument of schistosomula. The analyzed sequences were identical with 3 peptide sequence of ZL6, ZL4 and ZL1. ELISA showed that the P/N value of MppZL4, MppZL6 and MppZL1 binding the schistosomulum membrane protein was 6.72, 3.65 and 2.22, while 1.58, 5.15 and 1.20 of binding the membrane protein of cercariae, respectively. Elution recovery test showed that the elution recovery rate of MppZL4  $[(4.60 \pm 0.27) \times 10^{-2}\%]$  was much higher than that of MppZL6  $[(2.10 \pm 0.23) \times 10^{-3}\%]$ , MppZL1  $[(1.20 \pm 0.28) \times 10^{-3}\%]$  and M13KE  $[(1.30 \pm 0.60) \times 10^{-7}\%]$  ( $P < 0.01$ ). Immunohistochemical staining showed that MppZL4 specifically bound to the tegument of schistosomula with a positive rate of 83.0% (83/100). Fluorescent microscopy revealed that the

**基金项目:** 1 教育部博士点基金博导类资助项目 (No. 20110162110029); 2 国家自然科学基金 (No. 81101274); 3 湖南省自然科学基金 (No. 10JJ3010); 4 湖南省教育厅优秀青年项目 (No. 11B106)

**作者单位:** 1 南华大学医学院寄生虫学教研室; 2 中南大学基础医学院细胞与分子生物学实验中心

\* 通讯作者, E-mail: qingrenz@sysm.net

synthesized RhB-ZL4 bound to the tegument of schistosomula. The ZL4/pEGFP-C2 plasmid was introduced into juvenile *S. japonicum* and expressed in the parasite. **Conclusion** The peptide of ZL4 specifically binds to the schistosomulum tegument but not to that of cercaria.

**【Key words】** *Schistosoma japonicum*; Tegument; Phage display

Supported by the Ph.D. funding Project of the Ministry of Education (No. 20110162110029), the National Natural Science Foundation of China (No. 81101274), the Natural Science Fund of Hunan Province (No. 10JJ3010) and Outstanding Youth Project of Hunan Provincial Department of Education (No. 11B106)

\* Corresponding author, E-mail: qingrenz@xysm.net

日本血吸虫病是一种严重危害人类健康的人兽共患寄生虫病。中国和菲律宾,有 6 900 万~7 500 万人受到日本血吸虫感染的威胁<sup>[1]</sup>。由于缺乏行之有效的可控制传播与反复感染的方法和技术,使血吸虫病在部分湖洲地区流行仍然相当严重<sup>[2-6]</sup>。

用于治疗血吸虫病的吡喹酮和预防药物青蒿素类,在体内药代动力学特点表现为代谢快和分布面广,使药物的生物利用度不高<sup>[7,8]</sup>。如能将杀虫药物特异靶向到虫体,则不仅可提高药物在虫体部位的浓度,发挥更好抗虫效果,而且还可低剂量投药以减少药物所致毒副作用,并达到提高药物生物利用度的目的<sup>[9]</sup>。

本课题组在实践中经过反复探索,研究获得噬菌体体外逆向差异筛选活虫体的技术(专利号为 CN200910043720.5)。为探索日本血吸虫体被在正常生理状态下所能黏附和结合的外源性多肽分子和特性,本研究根据日本血吸虫尾蚴和脱尾童虫体表不同特性<sup>[10-13]</sup>,以日本血吸虫脱尾活童虫为靶标,利用噬菌体展示技术对其进行筛选和鉴定。

## 材料与方 法

### 1 材料

1.1 实验钉螺、尾蚴和脱尾童虫 阳性钉螺由湖南省寄生虫病防治所提供(来源于洞庭湖血吸虫病流行区)。阳性钉螺常规方法逸蚴。参照文献<sup>[14、15]</sup>方法将尾蚴机械脱尾,制备脱尾童虫,用于实验。

1.2 试剂和仪器 Ph.D.-12™ 噬菌体表面展示肽库试剂盒、M13KE 噬菌体和宿主菌 ER2738 购自美国 NEW ENGLAND 公司, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 和二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,胰蛋白胨、酵母浸出物和琼脂粉等常规试剂购自上海汇合生物科技有限公司,培养瓶和培养板为美国 Corning 公司产品,净化工作台为苏州苏净集团安泰公司产品,恒温摇床为美国 Labnet 公司产品,倒置显微镜和数码相机为日本 Olympus 公司产

品,酶标板置酶标分析仪 (ELX800) 为美国 Bio-Tek 设备公司产品。

### 2 方法

2.1 M13 噬菌体肽库体外逆向差异筛选童虫体表膜结合短肽

2.1.1 筛选童虫体表膜结合短肽 取 (500±20) 条尾蚴,放入 15 ml 玻璃离心管,加入封闭液 3 ml, 37 ℃ 封闭 10 min, 1 000×g 离心 10 min, 弃上清;加入 5.7×10<sup>10</sup> pfu 噬菌体, 37 ℃ 轻摇 150 min, 1 500×g 离心 10 min, 吸出上清噬菌体置于新管;取 1 μl 上清,分别用双层琼脂平板法和 real-time PCR 法测定噬菌体丰度<sup>[16]</sup>,并计算回收率(回收率=尾蚴吸附后上清中的噬菌体数/加入的噬菌体总数×100%)。

根据试剂盒操作说明和参考文献<sup>[17]</sup>,将剩余上清加入至 100 ml 对数前期的 ER2738 培养液中, 37 ℃ 200 r/min 轻摇 8 h, 1 500×g 离心 10 min, 收集上清,聚乙二醇 (PEG) /NaCl 收集沉淀,用 TBS 悬浮沉淀,即为扩增后上清,用于差异筛选与脱尾童虫结合的短肽, real-time PCR 法测定噬菌体丰度。

取脱尾童虫 (500±20) 条,用 RPMI 1640 培养基洗涤 3 次,封闭 10 min 后,放入 10 ml 玻璃离心管中,加入扩增后上清, 37 ℃ 轻摇 150 min, 1 000×g 离心 10 min, 弃上清。用 0.1% TBST 洗涤虫体,同等条件再次离心,弃上清,洗涤虫体,重复 10 次。加入 500 μl 洗脱液,温和摇 5 min, 1 500×g 离心 10 min, 吸取上清,加入 150 μl 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 中和。取 10 μl 洗脱后上清, real-time PCR 法测定噬菌体丰度,并计算洗脱回收率(洗脱回收率=脱尾童虫洗脱后的噬菌体数/加入的噬菌体总数×100%)。其余置于 20~40 ml 对数前期的 ER2738 菌液中扩增,进行下一轮逆向差异筛选,共重复 3 轮。

2.1.2 阳性克隆鉴定 根据试剂盒操作说明,第 3 轮逆向差异筛选获得的洗脱上清用双层琼脂平板法测定滴度,挑选噬菌斑进行克隆扩增,碘化银 (AgI) 抽提单链 DNA 并纯化<sup>[17]</sup>,经凝胶电泳检测后,送上海英骏 (Invitrogen) 生物技术有限公司进行自动循环

双脱氧测序, 引物为 5'-CCCTCATAGTTAGCG-TAACG-3'。

2.2 ELISA 检测脱尾童虫膜蛋白、尾蚴膜蛋白与噬菌斑克隆的特异性结合 参考文献[18]制作日本血吸虫脱尾童虫膜蛋白, 二喹啉甲酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 法定量, 将 50  $\mu\text{l}$  用碳酸盐包被缓冲液稀释的膜蛋白(10  $\mu\text{g}$ ) 加入 96 孔酶标板中, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 弃包被液, PBS 洗涤 3 次, 轻拍孔板甩干; 每孔中加入 200  $\mu\text{l}$  封闭液 (5% 脱脂牛奶) 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; PBS 洗涤 2 次; 每孔加入  $10^8$  pfu 筛选的噬菌体, 盖上膜板, 室温轻摇 150 min 后, PBS 洗涤 10 次, 加入 100  $\mu\text{l}$  (1:5 000) 辣根过氧化物酶标记的抗 M13 单抗 (Pharmacia#27-9411-01), 孵育 2 h, PBS 洗涤 6 次, TMB 底物作用 15 min 后, 加入 50  $\mu\text{l}$  5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 测定吸光度 ( $A_{450}$  值)。设 M13KE 克隆为阴性对照组, TBS 为空白对照组, 实验重复 3 次, 计算 P/N 值。计算公式为  $P/N \text{ 值} = (\text{待测孔 } A_{450} - \text{空白孔 } A_{450}) / (\text{阴性对照孔 } A_{450} - \text{空白孔 } A_{450})$ ,  $\geq 2.1$  为阳性,  $2.1 < P/N < 1.5$  为疑似阳性,  $\leq 1.5$  为阴性<sup>[19]</sup>; 同法测定尾蚴膜蛋白与噬菌斑克隆的特异性结合。

2.3 洗脱回收实验检测脱尾童虫与噬菌斑克隆的特异性结合 根据说明书稍加改进: 取 15 ml 离心管, 放入 (500 $\pm$ 20) 条脱尾童虫, 封闭 10 min 后加入  $10^{10}$  pfu 的筛选的噬菌体, 37  $^{\circ}\text{C}$  轻摇 150 min, 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清, 洗脱、回收、滴定噬菌体丰度, 比较噬菌体与脱尾童虫的洗脱回收率 (洗脱回收率=洗脱噬菌体丰度/加入噬菌体丰度 $\times$ 100%), 洗脱回收率高, 则表示噬菌体与脱尾童虫特异性结合较好, 反之亦然。设 M13KE 克隆为阴性对照组, 实验重复 3 次。

2.4 免疫组织化学检测脱尾童虫与阳性噬菌体的特异性结合 (500 $\pm$ 20) 条脱尾童虫放入 15 ml 离心管中, TBS 洗涤 3 次, BSA 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 60 min 后加入  $10^{10}$  pfu 的阳性噬菌体, 37  $^{\circ}\text{C}$  轻摇 150 min, 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清, 最后 1 次洗涤后, 保留约 50  $\mu\text{l}$  液体, 再缓缓悬起虫体, 滴至载玻片上, 均匀涂片, 风扇轻轻吹干, 使虫体贴在载玻片上, 加多聚甲醛 1 ml, 固定 10 min, 0.5% TBST 洗涤 3 次; 加入灭活内源性过氧化物酶 1 ml, 常温下孵育 10 min, TBST 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 的 anti-M13 单克隆抗体 1 ml (TBS 稀释), 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜后, PBST 洗涤 6 次, 滴加 200  $\mu\text{l}$  (1:200) 辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 G (HRP-IgG), 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 60 min, PBST 洗涤 6 次后 DAB 显色, 虫体带有棕黄色色素沉着即判为阳性, 计算 100 条虫体的阳性率。设 M13KE 克隆和日本血吸虫尾蚴

为对照组, 实验重复 3 次。

2.5 荧光显微镜观察人工合成的阳性噬菌体短肽与脱尾童虫体外特异性结合情况 根据阳性噬菌体的插入短肽序列, 人工合成罗丹明标记的短肽。(500 $\pm$ 20) 条脱尾童虫放入 15 ml 离心管中, TBS 洗涤 3 次, BSA 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 60 min, 加入 50  $\mu\text{g}$  人工合成的阳性噬菌体短肽, 设随机 12 肽为阴性对照, 37  $^{\circ}\text{C}$  轻摇 150 min, 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃上清。收集虫体, TBST 洗涤 3 次, 1 000 $\times$ g 离心 10 min, 重复 10 次, 倒置荧光显微镜观察并拍照<sup>[20]</sup>, 计算阳性率。实验重复 3 次。

2.6 目的片段 pEGFP-C2 质粒体外转染脱尾童虫 根据阳性噬菌体插入短肽的基因序列, 优化后人工合成含目的片段的 pEGFP-C2 质粒。取 (100 $\pm$ 5) 条脱尾童虫, 置入含有 0.75% 二甲基亚砷培养基的 24 孔板中, 加入 100  $\mu\text{g}$  人工合成质粒, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 饱和湿度培养箱培养 72 h, 隔天换液 1 次, 每 12 h 倒置荧光显微镜观察 1 次, 计算 100 条虫体的阳性率<sup>[21,22]</sup>。设空白载体为对照组。实验重复 3 次。

### 3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行  $\chi^2$  检验, 显著性差别设置为  $P < 0.05$ 。

## 结 果

### 1 M13 噬菌体肽库体外逆向差异筛选活虫体表膜结合短肽

经随机 12 肽库对虫体表膜的 3 轮逐步加压逆向差异筛选, 噬菌体上清回收率逐级提高, 从第 1 轮的 1.70 $\times 10^{-3}\%$  到第 3 轮的 73.5%, 提高约 40 000 倍。洗脱回收率亦逐级提高, 从第 1 轮的 3.50 $\times 10^{-5}\%$  到第 3 轮的 3.20 $\times 10^{-2}\%$ , 提高约 1 000 倍, 洗脱的噬菌体得到有效富集 (表 1)。

在符合条件 (平板噬菌斑总量为 10~100 个, 无成堆现象) 的 4 块平板上共挑取 15 个样品, 根据主要实验人员姓氏和重复的频率分别命名为 M13 噬菌体短肽 ZL6 (M13 phage peptide Zeng and Liu 6, MppZL6), MppZL4 和 MppZL1 (表 2)。BLAST 分析显示, MppZL1 与家鼠载脂蛋白 B 有 53.8% (7/13) 同源性, MppZL6 与日本血吸虫 CHGC07116 蛋白有 69.2% (9/13) 同源性, MppZL4 与阴道毛滴虫自交第 3 代的表面抗原 Bsp A 样蛋白有 80.0% (8/10) 同源性。

### 2 ELISA 检测脱尾童虫膜蛋白、尾蚴膜蛋白与 MppZL6、MppZL4 和 MppZL1 特异性结合

表 1 每轮逆向差异筛选后噬菌体富集度  
Table 1 Phage enrichment after each round of reverse absorption and bio-panning

筛选轮数 Round	加入噬菌体数量/ pfu No. added phages/ pfu	尾蚴逆向吸附后上清中噬菌体 Phage in supernatant after cercariae absorption		脱尾童虫洗脱回收的噬菌体 Phage eluted from schistosomula	
		数量/pfu Number/pfu	回收率/% Yield rate/%	数量/pfu Number/pfu	洗脱回收率/% Recovery rate/%
第 1 轮逆向吸附 1st reverse absorption	5.70×10 <sup>10</sup> ●	9.80×10 <sup>5</sup>	1.70×10 <sup>-3</sup>		
第 1 轮筛选 1st bio-panning	2.60×10 <sup>10</sup> ▼			9.00×10 <sup>3</sup>	3.50×10 <sup>-5</sup>
第 2 轮逆向吸附 2nd reverse absorption	4.10×10 <sup>10</sup> ▲	1.50×10 <sup>7</sup>	3.57×10 <sup>-2</sup>		
第 2 轮筛选 2nd bio-panning	3.70×10 <sup>10</sup> ▼			6.70×10 <sup>3</sup>	1.80×10 <sup>-3</sup>
第 3 轮逆向吸附 3rd reverse absorption	5.40×10 <sup>10</sup> ▲	3.90×10 <sup>10</sup>	73.51		
第 3 轮筛选 3rd bio-panning	3.10×10 <sup>10</sup> ▼			9.90×10 <sup>6</sup>	3.20×10 <sup>-2</sup>

注: ● 原始噬菌体肽库; ▼ 尾蚴逆向吸附后经过扩增后的噬菌体; ▲ 上一轮筛选后扩增的噬菌体。

Note: ● Phages from original peptide library; ▼ Phages from cercariae reverse absorption and amplified on the phage volume; ▲ Phages from the last round of bio-panning and amplified on the phage volume.

表 2 15 个噬菌体克隆的碱基序列  
Table 2 Base sequence of the 15 phage clones

样品编号 Sample code	碱基序列(5'→3') Base sequence(5'→3')	频率 Frequency	噬菌体命名 Named phage	插入肽段命名 Named inserted peptide
1-1、1-4、 2-2、2-3、 2-4、4-1	GAT CGT TAT TCT GAG ATT CGG ACT TCT TCG ACG TTG	6	MppZL6	ZL6
1-2、2-1、 2-5、4-2	TAT TCG GGG TTG CAG GAT AGT TCG CTT AGG CTT CGG	4	MppZL4	ZL4
1-3	GAT TAT CCT TCT GCG AAT AAG TGG CCG CCG TAT GTT	1	MppZL1	ZL1
2-6、3-4	插入片段缺如	2		
3-1、3-2	DNA 已经降解	2		

结果显示, MppZL4、MppZL6 和 MppZL1 分别与脱尾童虫膜蛋白结合后的 P/N 值为 6.72, 3.65 和 2.22, 均为阳性, 提示 3 个噬菌体短肽均能与脱尾童虫膜蛋白结合; 与尾蚴膜蛋白结合后的 P/N 值为 1.58、5.15 和 1.20, 仅 MppZL6 与尾蚴膜蛋白结合 (图 1)。

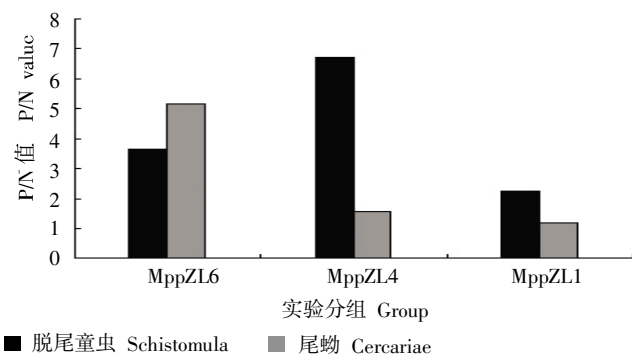


图 1 ELISA 鉴定阳性克隆

Fig. 1 Identification of positive clones of linear 12 peptide library by ELISA

### 3 洗脱回收实验检测脱尾童虫与 MppZL6、MppZL4 和 MppZL1 的特异性结合

结果显示, MppZL4 与脱尾童虫特异性结合较好, 其洗脱回收率 [(4.60±0.27) ×10<sup>2</sup>%] 远高于 MppZL6 [(2.10±0.23) ×10<sup>-3</sup>%]、MppZL1 [(1.20±0.28) ×10<sup>-3</sup>%] 和 M13KE [(1.30±0.60) ×10<sup>-7</sup>%] (P<0.01) (表 3)。

表 3 MppZL6、MppZL4 和 MppZL1 与日本血吸虫脱尾童虫结合后的洗脱回收率

分组 Group	噬菌体加入量/pfu Phages added/pfu	噬菌体洗脱量/pfu Phages eluted/pfu	洗脱回收率/% Recovery rate/%
MppZL6	(4.30±0.03)×10 <sup>10</sup>	(9.10±0.063)×10 <sup>5</sup>	(2.10±0.23)×10 <sup>-3</sup>
MppZL4	(4.20±0.04)×10 <sup>10</sup>	(1.90±0.093)×10 <sup>7</sup>	(4.60±0.27)×10 <sup>-2</sup>
MppZL1	(5.50±0.02)×10 <sup>10</sup>	(6.70±0.054)×10 <sup>5</sup>	(1.20±0.28)×10 <sup>-3</sup>
M13KE	(5.10±0.04)×10 <sup>10</sup>	(6.80±0.024)×10 <sup>10</sup>	(1.30±0.60)×10 <sup>-7</sup>

注: 与 M13KE 比较, \* P<0.01。

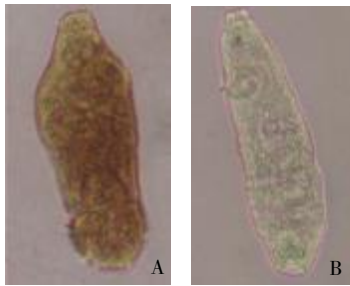
Note: vs. M13KE, \* P<0.01.

### 4 免疫组织化学检测脱尾童虫与阳性噬菌体 MppZL4 的特异性结合

脱尾童虫与 MppZL4 反应后, 有棕黄色色素附着于童虫体表, 虫体颜色明显比阴性对照组黄而深 (图 2)。脱尾童虫与 MppZL4 结合的阳性率为 83.0% (83/100)。

### 5 荧光显微镜观察 RhB-ZL4 与脱尾童虫体外特异性结合

根据 MppZL4 的插入短肽序列, 由上海 ChinaPeptide 公司合成罗丹明标记的 ZL4 短肽 RhB-YSLQDSSLRLR (RhB-ZL4), 其纯度为 98%; 同时合



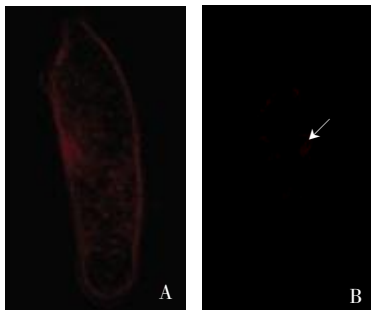
A: MppZL4 与脱尾童虫结合; B: M13KE 与脱尾童虫结合 (阴性对照)。A: MppZL4 binding to schistosomula; B: M13KE binding to schistosomula (negative control).

图 2 日本血吸虫脱尾童虫与 MppZL4 特异性结合的检测 (×200)

Fig. 2 Detection of MppZL4 specifically binding to schistosomula (×200)

成罗丹明标记的随机 12 肽 RhB-12P。

脱尾童虫与 RhB-ZL4 孵育后, 荧光显微镜下明显可见童虫表膜的红色荧光, 尤以腹吸盘明显 (图 3A); 童虫与 RhB-12P 孵育后, 腹吸盘偶见轻微红色荧光 (图 3B); 经计数, 童虫与 RhB-ZL4 孵育 15 min 后的阳性率为 78.0% (78/100)。



A: RhB-ZL4 与脱尾童虫结合; B: RhB-12P 与脱尾童虫结合 (阴性对照)。A: RhB-ZL4 binding to schistosomula; B: RhB-12P binding to schistosomula (negative control).

图 3 日本血吸虫脱尾童虫与 RhB-ZL4 特异性结合的检测 (×200)

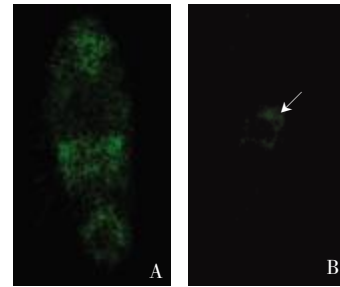
Fig. 3 Detect on of RhB-ZL4 binding to schistosomula (×200)

## 6 ZL4/pEGFP-C2 质粒体外转染血吸虫脱尾童虫

根据宿主菌大肠埃希菌 *E. coli* ER2738 菌株和实验动物小鼠, 对 ZL4 基因序列进行密码子优化后 (5'-TACTCTGGCCTGCAGGACAGCTCCCTGAGGCTGAGA-3'), 由南京 Genscript 公司合成 ZL4/pEGFP-C2 质粒。

二甲亚砜培养液中加入 100 μg ZL4/pEGFP-C2 质粒, 24 h 后第 1 次换液, 倒置荧光显微镜下未见增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达, 换液后追加 ZL4/pEGFP-C2 质粒 100 μg, 24 h 后, 倒置荧光显微镜下可见部分脱尾童虫在蓝色激发光下呈现绿色荧光 (图 4A), 表明有 EGFP 的表达, 换液后未添加 ZL4/pEGFP-C2 质粒, 72 h 后荧光亮度减弱, 96 h 后荧光消失; EGFP 主要集中于童虫的皮层和副皮层, 呈颗粒状, 虫体的口、腹吸盘部位尤为明显, 转染率为 7%; pEGFP-C2 空白

载体组腹吸盘稍带绿色荧光 (图 4B), 余未见明显阳性。



A: ZLW/pEGFP-C2 转染脱尾童虫; B: pEGFP-C2 空白载体转染与脱尾童虫 (阴性对照)。

A: ZLW/pEGFP-C2 transfected into schistosomula; B: pEGFP-C2 transfected into schistosomula (negative control).

图 4 重组质粒 ZLW/pEGFP-C2 体外转染日本血吸虫脱尾童虫 (×200)

Fig. 4 ZLW/pEGFP-C2 *in vitro* transfected into schistosomula (×200)

## 讨 论

噬菌体展示技术使特异性靶分子的筛选具有更为便利的手段<sup>[23]</sup>。Ph.D.库作为噬菌体展示肽库的代表被广泛利用, 特别是分离一系列生物分子 (如抗体、酶、受体、细胞因子以及细胞溶质成分的某些胞质蛋白) 的肽配体<sup>[24,25]</sup>。在肿瘤和心血管研究领域, Ph.D.库有不少用来直接筛选活体内细胞或脉管的标志物, 是一种高效获取结果的途径<sup>[26,27]</sup>; 而在血吸虫研究领域仅见用抗体作探针来免疫筛选相应抗原模拟表位<sup>[28,29]</sup>, 其目的是通过筛选获取模拟抗原表位, 作免疫保护或免疫诊断的研究。

已有研究证实, 血吸虫尾蚴和童虫的体表成分有较大不同<sup>[10,30]</sup>; 尾部脱落对于虫体通透性的影响尽管时间短暂, 但效果非常明显<sup>[31]</sup>, 可促使虫体单细胞腺体内的钙离子、碱性蛋白和酶类等分泌物排空, 使一些童虫具备的特异性蛋白附着于虫体表面, 而尾蚴则不具备, 如 SmSLP<sup>[11]</sup>、Sm-7TM<sup>[12]</sup>等, 因此, 能与血吸虫活童虫表膜结合的多肽有可能通过噬菌体肽库筛选出来; 此外, 血吸虫脱尾童虫暴露了与宿主发生关系的膜界面, 血吸虫体被具有与自身生理功能 (如分泌代谢和调节渗透压) 有关的离子通道 (如 Ca<sup>2+</sup>通道)<sup>[32]</sup>, 同时也具有与信号转导有关的多种受体<sup>[33]</sup>, 而这些受体和通道亦有可能与适合的短肽分子结合。基于这些理论基础, 本研究利用噬菌体肽库, 通过逆向吸附和筛选技术, 从活虫体表筛选与童虫结合而不与尾蚴结合的噬菌体短肽。经过 3 轮差异筛选, 富集度明显增高。阳性克隆测序后显示, Mpp-ZL6、MppZL4 和 MppZL1 短肽均由 8~9 个亲水的极性氨基酸残基和疏水的非极性氨基酸残基交错构成, 此结构便于蛋白与蛋白之间的结合, 这可能是目标噬

菌体能与虫体结合的原因之一；且 MppZL4 和 Mpp-ZL1 短肽等电点分别为 8.75 和 8.50，呈碱性，也有利于与具有酸性特征<sup>[10]</sup>的虫体膜分子结合。经过 ELISA 和噬菌体回收实验，MppZL4 是目前所筛选的最佳噬菌体短肽，能与脱尾童虫结合而不与尾蚴结合。

由于 MppZL4 是 ZL4 短肽与 M13 噬菌体结合的分子，为验证 ZL4 短肽是否具备同样的特异性结合作用，本课题人工合成了罗丹明标记的 ZL4 短肽 RhB-ZL4，并通过荧光显微镜检测发现 RhB-ZL4 可与日本血吸虫脱尾童虫体外特异性结合。但 ZL4 为只有 12 个氨基酸的短肽，直接注入宿主体内，很快被降解，且有可能诱导免疫耐受，产生免疫逃避，促使病情发展，因此将 ZL4 序列优化后构建 ZL4/pEGFP-C2 质粒，体外转染日本血吸虫脱尾童虫后发现，ZL4 可在虫体内表达，但其转染率和荧光亮度均不及本课题组构建的另 1 个质粒<sup>[22]</sup>。

本研究创建了一种新筛选方法，在体外利用日本血吸虫活童虫筛选出目标噬菌体 ZL4，该噬菌体在日本血吸虫的药物治疗、影像学诊断和基因治疗方面将具有重要的实用价值和学术意义。

#### 参 考 文 献

- [1] 雷正龙, 郑浩, 张利娟, 等. 2010 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 23(6): 401-404.
- [2] 黄少玉, 林荣幸, 张启明, 等. 广东省流动人口血吸虫病分布与潜在传播危险因素 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(2): 194-197.
- [3] 吴成果, 周晓农, 肖邦忠, 等. 三峡库区血吸虫病潜在流行因素与监测指标研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(4): 747-749.
- [4] 范宏萍, 涂祖武, 刘建兵, 等. 湖北省国家级血吸虫病监测点两年疫情比较[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(1): 56-59.
- [5] 徐慧英, 章世清, 黄德强, 等. 2005-2007 年望城县国家级血吸虫病监测点疫情监测 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(1): 60-61.
- [6] 王琳, 张联恒, 蒋小兰, 等. 2005-2007 年镇江市国家级血吸虫病监测点疫情监测 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2009, 21(1): 67-68.
- [7] 贾冬舒, 韩继福, 马成林, 等. 吡喹酮在绒山羊体内药代动力学的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2): 84-88.
- [8] 陈有根, 余伯阳. 蒿甲醚在模拟体内酸碱环境中的代谢动力学研究[J]. 色谱, 2002, 20(1): 37-39.
- [9] Day TA, Botros S. Drug resistance in schistosomes//Maule AG, Marks NJ. Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology [M]. Wallingford: CABI, 2005: 256-268.
- [10] 吴观陵. 人体寄生虫学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 344-345.
- [11] Brännström K, Sellin ME, Holmfeldt P, et al. The *Schistosoma mansoni* protein Sm16/SmSLP/SmSPO-1 assembles into a nine-subunit oligomer with potential to inhibit Toll-like receptor signaling[J]. Infect Immun, 2009, 77(3): 1144-1154.
- [12] Pearson MS, McManus DP, Smyth DJ, et al. Cloning and characterization of an orphan seven transmembrane receptor from *Schistosoma mansoni*[J]. Parasitology, 2007, 134(Pt.14): 2001-2008.
- [13] Liu F, Lu J, Hu W, et al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*[J]. PLoS Pathog, 2006, 2(4): e29.
- [14] Eveland LK, Morse SI. *Schistosoma mansoni*: in vitro conversion of cercariae to schistosomula[J]. Parasitology, 1975, 71(2): 327-335.
- [15] 陈佩惠, 周述龙. 医学寄生虫体外培养[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 278.
- [16] 王可耕, 曾庆仁, 禹正杨, 等. 一种高效准确定量计数噬菌体文库目标分子的方法 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(3): 81-83.
- [17] 魏琦, 刘彦, 曾庆仁, 等. 日本血吸虫表膜结合多肽的亲亲和筛选与初步鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(3): 81-84.
- [18] 方会龙, 曾庆仁, 王俊杰, 等. 运用 Quantity One 软件分析日本血吸虫不同发育时期蛋白组分差异[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(4): 320-322.
- [19] Tran MH, Freitas TC, Cooper L, et al. Suppression of mRNAs encoding tegument tetraspanins from *Schistosoma mansoni* results in impaired tegument turnover[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(4): e1000840.
- [20] Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques[J]. J Clin Pathol, 1978, 31(6): 507-520.
- [21] Smodyrev AM, Berkowitz ML. Molecular dynamics simulation of DPPC bilayer in DMSO[J]. Biophys J, 1999, 76(5): 2472-2478.
- [22] 刘彦, 曾庆仁, 杨胜辉, 等. 日本血吸虫表膜特异结合肽重组质粒 ZLW/pEGFP-C2 体外转染日本血吸虫童虫的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 81-85.
- [23] Staquicini FI, Sidman RL, Arap W, et al. Phage display technology for stem cell delivery and systemic therapy[J]. Adv drug deliv Rev, 2010, 62(12): 1213-1216.
- [24] Sachdev SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces[J]. Curr Opin Struct Biol, 2007, 17(4): 481-487.
- [25] Witt H, Hajdin K, Iljin K, et al. Identification of a rhabdomyosarcoma targeting peptide by phage display with sequence similarities to the tumour lymphatic-homing peptide LyP-1[J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2026-2032.
- [26] Chen J, Bai G, Yang Y, et al. Identifying glucagon-like peptide-1 mimetics using a novel functional reporter gene high-throughput screening assay[J]. Peptides, 2007, 28(4): 928-934.
- [27] Hardy B, Raiter A, Weiss C, et al. Angiogenesis induced by novel peptides selected from a phage display library by screening human vascular endothelial cells under different physiological conditions[J]. Peptides, 2007, 28(3): 691-701.
- [28] 王欣之, 傅志强, 黄劭鹏, 等. 噬菌体展示日本血吸虫 SSj14 单抗的模拟抗原表位及其免疫保护性研究 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(1): 119-124.
- [29] 朱晓华, 姜昌富, 张颖颖, 等. 日本血吸虫抗原模拟表位免疫学活性的初步研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(1): 46-48.
- [30] He YX. Biology of *Schistosoma japonicum*. From cercaria penetrating into host skin to producing egg [J]. Chin Med J, 1993, 106(8): 576-583.
- [31] Howells RE, Gerken SE, Ramalho-Pinto FJ, et al. *Schistosoma mansoni*: tail loss in relation to permeability changes during cercaria-schistosomulum transformation[J]. Parasitology. 1975, 71(1): 9-18.
- [32] Beall MJ, Pearce EJ. Human transforming growth factor-beta activates a receptor serine/threonine kinase from the intravascular parasite *Schistosoma mansoni* [J]. J Biol Chem, 2001, 276(34): 31613-31619.
- [33] Kohn AB, Anderson PA, Roberts-Misterly JM, et al. Schistosome calcium channel beta subunits. Unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel[J]. J Biol Chem, 2001, 276(40): 36873-36876.

(收稿日期: 2012-06-21 编辑: 张争艳)