

## 日本血吸虫亲免疫素基因的扩增及序列分析

李 孜<sup>1,2</sup>, 余新炳<sup>1</sup>, 吴忠道<sup>1</sup>, 徐 劲<sup>1</sup>, 田春林<sup>3</sup>

(1. 中山大学基础医学院寄生虫学教研室, 广东 广州 510180; 2. 广州医学院微生物与免疫学教研室, 广东 广州 510182; 3. 广西医科大学, 广西 南宁 530000)

**摘 要:** 【目的】研究日本血吸虫亲免疫素基因编码序列的结构及进行初步的功能预测。【方法】用 5'端和 3'端锚定 PCR 从尾蚴文库中扩增, 以获取日本血吸虫中国大陆株亲免疫素基因完整的开放阅读框 (open reading frame, ORF); 用生物信息学技术确认其是否为亲免疫素编码基因并进行结构功能的初步分析和预测。【结果】用 5'端和 3'端锚定 PCR 从尾蚴文库中获得了亲免疫素基因 5'端和 3'端所缺序列, 得到的亲免疫素基因 cDNA 的总序列长为 1 438 bp, 其 ORF 长 1 296 bp, 编码 431 个氨基酸。利用生物信息学技术鉴定其为日本血吸虫亲免疫素基因的完整 cDNA 序列。并用 RT-PCR 从日本血吸虫尾蚴 mRNA 扩增出亲免疫素基因的 ORF。【结论】成功获得了日本血吸虫亲免疫素编码基因的全长 cDNA, 为进一步的功能研究打下了基础。

关键词: 日本血吸虫; 中国大陆株; 亲免疫素; 序列分析; 基因扩增

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0395-04

## *Schistosoma japonicum*: Amplification and Sequence Analysis of Novel Gene Encoding Immunophilin

LI Zi<sup>1,2</sup>, YU Xin-bing<sup>1</sup>, WU Zhong-dao<sup>1</sup>, XU Jin<sup>1</sup>, TIAN Chun-lin<sup>3</sup>

(1. Department of Parasitology, Basic Medicine College, SUN Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China;

2. Department of Microbiology and Immunology, Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510182, China;

3. Guangxi University of Medicine Science, Nanning, 530000, China)

**Abstract:** 【Objective】To learn the coding sequence structure of immunophilin gene of *Schistosoma japonicum* (*Sj*) and predict its function. 【Methods】The full-length cDNA of immunophilin gene was obtained by 5'-end and 3'-end nested polymerase chain reaction (PCR). Specific primers were synthesized and used to amplify immunophilin gene by reverse transcription PCR (RT-PCR) from *Sj* cercariae mRNA. The product of PCR was sent to Bioasia company to sequence. The cDNA sequences were analyzed by bioinformatics. 【Results】A novel cDNA sequence was obtained, the sequence contains a full-length sequence with 1 296 bp open read frame (ORF), which encodes 431 amino acid residues. The new gene was identified to be the gene encoding immunophilin. Its sequences were identified by sequencing and bioinformatics. 【Conclusion】The full-length cDNA sequences encoding *Sj* immunophilin were firstly obtained, which gave the basis for further study.

**Key words:** *Schistosoma japonicum*; Chinese strain; immunophilin; sequence analysis; gene amplification

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 395 - 398]

亲免疫素 (immunophilin) 是指免疫抑制剂环孢素 及雷帕霉素等的结合蛋白; 该类结合蛋白亲环素

收稿日期 2003-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (60070683); 国家教育部博士点项目 (200045); 广东“211工程”重点建设基金资助项目 (98169)

作者简介: 李 孜 (1971-), 女, 湖南衡阳人, 博士生, 讲师; 余新炳, 教授, 导师, 课题负责人, 通讯作者. E-mail: jmfang@gzsums.edu.cn

CyP, 其与 CySA 结合)和 FK506 结合蛋白(FKBP) 分别属于两个大的家族, 现已发现 CyP 家族成员 30 多个, FKBP 家族成员 20 多个, 它们在原核及真核生物中广泛存在且高表达<sup>[1]</sup>。目前为止已经在哺乳动物中发现了 15 种 FKBP, 他们绝大多数在脑中以高浓度表达<sup>[2]</sup>; 在无脊椎动物中, 只有曼氏血吸虫亲免疫素基因是唯一的 cDNA 及 DNA 全长已知的<sup>[3,4]</sup>。曼氏血吸虫亲免疫素基因 cDNA 全长及 DNA 序列已在美国国家生物技术信息中心(NCBI, 网址: <http://ncbi.nlm.nih.gov/>)上登录。我们在欧洲生物信息学研究所(EBI)上对曼氏血吸虫亲免疫素基因开放阅读框(open reading frame, ORF)利用寄生虫 Blastn(网址: <http://www.ebi.ac.uk/blast/index.html>)进行分析后, 对与之同源性高的日本血吸虫表达序列标签(EST)序列进行电子拼接, 发现最长的 EST 属于日本血吸虫菲律宾株亲免疫素样 mRNA 序列(NCBI 登陆号 AF175126), 其 5' 端尚缺 15 个 bp 的序列, 而日本血吸虫中国大陆株中, 与该基因同源性高的 EST(NCBI 登陆号 BU797121, 以及 NCBI 登陆号 BU792859)的 5' 和 3' 端均不完整。对这些序列我们利用 EBI 上的 ClustalW(网址: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)进行多序列比对, 显示全部同源性序列的位置, 据此设计了 4 条引物, 用 5' 端锚定和 3' 端锚定 PCR 从尾蚴文库中扩增, 以获得日本血吸虫中国大陆株亲免疫素基因完整的 ORF; 并利用生物信息学进行了结构、功能分析和预测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 尾蚴的获取及其文库资料 阳性湖北钉螺(*Oncomelania hupensis*)购自江苏省血吸虫病防治研究所。日本血吸虫尾蚴文库由香港中文大学冯明钊教授惠赠; 文库运用“SMART”cDNA 文库构建试剂盒构建为全长文库。

1.1.2 引物设计 为扩增日本血吸虫亲免疫素基因 cDNA 全长, 根据曼氏血吸虫亲免疫素基因 cDNA 及日本血吸虫亲免疫素 EST 的 ClustalW 分析结果(图 1), 设计 4 条巢式引物为: P1: 5' CCACGAT-CACCAGATGGGCTTAA 3'; P2: 5' TTGTTTCTGCT-GACATCAGAGCCCA 3'; P2' (P2 的反向互补序列): 5' TGGGCTCTGATGTCAGCAGAAACAA 3';

P3: 5' AAAGGATTCTAAATTTGATTTC 3'。文库通用上游 5' 端引物为 S1: 5' CTCCGAGATCTGGACGAGC 3', 通用下游 3' 端引物为 S2: 5' TAATACGACT-CACTATAGGGC 3', 文库插入片段 5' 端测序引物为 S3: 5' CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT 3'。扩增亲免疫素基因全长 cDNA 序列的特异引物为: IP1: CAGAATTCATGCCGAAGATCGCAGTTGACA; IP2: CAGTCGACTCACAGGGCAGACTTTTCATCA, 分别引入 *EcoR* I 和 *Sal* I 的酶切位点。以上引物均由上海生工公司合成。

1.1.3 主要试剂 *Taq* 酶、dNTP、Marker DL2000 为大连宝生物公司产品。凝胶及质粒回收试剂盒是上海申友公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 序列同源性检索 采用 EBI 上的 Parasite blastn 和 NCBI 上的 blastx 与数据库中的核苷酸序列或蛋白质序列进行同源性比较。

1.2.2 日本血吸虫文库 DNA 模板的提取 取文库液稀释到 1:100 后, 与噬菌体宿主菌 XL1-Blue 预吸附 15 min 后, 加入到顶琼脂中, 然后铺到含 LB 和 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 的平板上, 6~18 h 后(见到噬菌斑互相融合), 加入噬菌体缓冲液(SM 液)洗脱过夜, 吸取洗脱液 4 000 × g 离心 5 min, 每 mL 上清加入 200 g/L 聚乙二醇(*M<sub>r,PEG</sub>* = 8 000)200 μL, 沉淀 DNA 0.5 h 后, 12 000 × g 离心 15 min, 用超纯水煮沸溶解, 测双链 DNA 含量后即可用作 PCR 扩增的模板。

### 1.2.3 5'端和 3'锚定 PCR 扩增亲免疫素所缺片段

利用上述方法制备的模板, 先用引物 S1 和外引物 P2 进行 PCR 扩增, 然后回收其 PCR 产物并作为模板, 用引物 S1 和内引物即靠 5' 端引物 P1 进行 PCR 扩增得到亲免疫素基因的 5' 端。用同样的模板, 先用 P2' 和 S2 作引物进行扩增, 回收 PCR 产物作模板, 再用靠 3' 端引物 P3 和引物 S2 进行 PCR, 即可得到目的基因的 3' 端。PCR 反应体系(25 μL 总反应): 10 × buffer(含 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 引物 P1(P2、P2'、P3)和引物 S1(S2)(引物浓度为 20 pmol/μL)各 0.5 μL, 文库 DNA 模板 2.0 μL(第 1 次 PCR 产物回收后加 1 μL), *Taq* 酶(5 U/μL) 0.25 μL, 补水至 25.0 μL。采用 Stepdown PCR, 反应参数为: 96 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 72 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min 10 个循环, 以后的退火温度分别为 67 °C、62 °C 2

min 各 10 个循环, 57 °C 2 min, 15 个循环, 延伸条件同前, 共 45 个循环。序列测定: PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定分子大小, 对目的片段进行回收, 回收产物送上海申友公司利用 S3 作为测序引物进行 5' 端序列测定; 用 P3 作为测序引物进行 3' 端序列测定。

1.2.4 编码基因全长 cDNA 的扩增及鉴定 采用特异引物 IP1、IP2, 以尾蚴 mRNA 为模板 RT-PCR 扩增目的片段, 并测序鉴定。

1.2.5 序列分析 利用 Internet 上的有关生物信息学网站如 NCBI、EMBL 和 ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/>) 对所获得的全长序列进行序列的结构分析, 分析内容包括核苷酸序列 ORF 的寻找, 编码氨基酸的推导, 推导的氨基酸与 SWISS-PROT 蛋白质库中序列的同源性比较等。

## 2 结 果

### 2.1 日本血吸虫亲免疫素 EST 与曼氏血吸虫亲免疫素基因 cDNA 序列的多序列比对

将日本血吸虫亲免疫素 EST 与曼氏血吸虫亲免疫素基因 cDNA 序列的多序列进行比对, 显示全部同源性序列的位置。结果显示, 日本血吸虫亲免疫素基因 cDNA 序列中 5' 端最长的 EST BU792615 与曼氏血吸虫全长 cDNA 序列相比, 尚差 5 bp; 而 3' 端最长的 EST BU797121 与曼氏血吸虫全长 cDNA 序列相比, 尚差 274 bp。序列图中其中斜体或者变浅的 3 段序列为巢式引物序列, 在曼氏血吸虫和日本血吸虫之间相对保守(图 1)。

### 2.2 亲免疫素编码基因的扩增与测序

用 5' 端和 3' 端锚定 PCR 分别获得约 300 bp 和接近于 750 bp 的条带, 回收该条带送上海申友公司测序, 分别得到一个 125 bp 和 592 bp 的序列, 与日本血吸虫亲免疫素基因的 3 条相关 EST 进行 ClustalW 分析、电子拼接后, 得到一个 1 438 bp 的总序列。对其在 NCBI 上进行 ORF 的寻找和分析, 确定 *Sj* 亲免疫素基因 cDNA 序列 ORF 长 1 296 bp。RT-PCR 扩增后得到一位于 1 000 ~ 2 000 bp 之间的片段(图 2), 送测序后的序列与电子 PCR 拼接后的序列的 ORF 相同。通过 ExPASy 上的程序翻译成氨基酸, 共 431 个氨基酸残基, 其氨基酸序列如下:

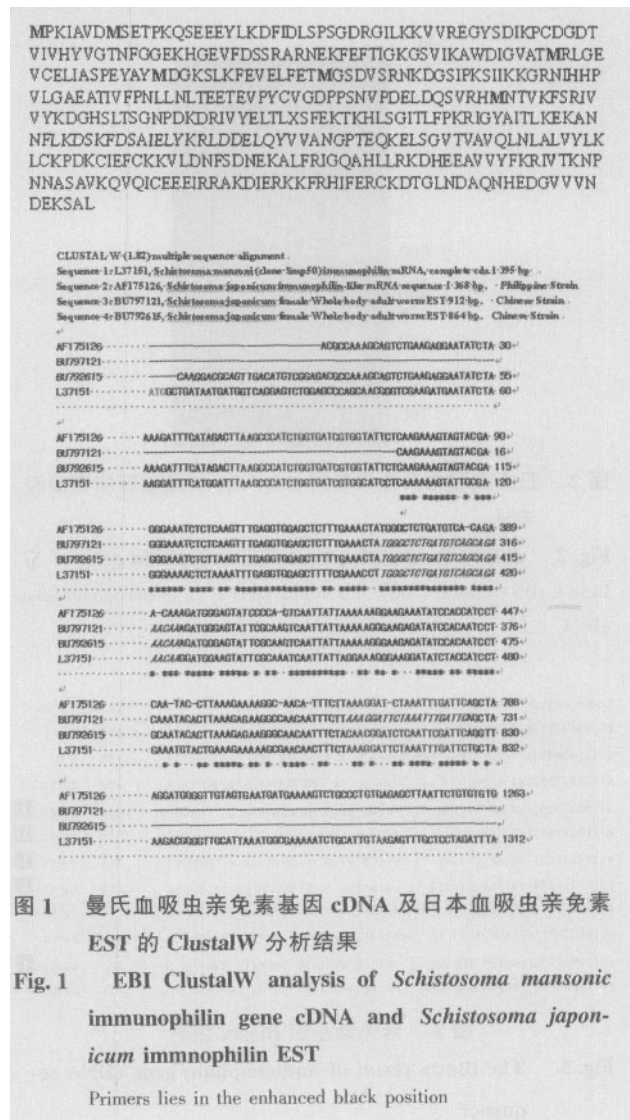


图 1 曼氏血吸虫亲免疫素基因 cDNA 及日本血吸虫亲免疫素 EST 的 ClustalW 分析结果

Fig. 1 EBI ClustalW analysis of *Schistosoma mansoni* immunophilin gene cDNA and *Schistosoma japonicum* immunophilin EST

### 2.3 日本血吸虫亲免疫素核苷酸及氨基酸序列的结构及功能的初步预测

利用 ExPASy 网站预测亲免疫素基因编码的氨基酸序列的相对分子质量  $M_r = 48.618 \times 10^3$ , 等电点为 6.07。用 NCBI 上的 Blastx 程序对核苷酸总序列进行同源性检索, 结果如图 3。

结果表明该序列编码 FK506 结合蛋白 4, 为亲免疫素编码基因。采用 ExPASy 中的 Motifscan 程序对 SWISS-PROT 蛋白质数据库进行检索, 该氨基酸序列具有 FK506 结合蛋白型肽脯氨酰顺反异构酶 (FKBP - type peptidyl - prolyl cis - trans isomerase, FKBP-PPIASE) 特征性结构域: PDOC00426 和 PS50059; 其 pfam: 为 FKBP (aa 42 ~ 131); prf: 为 FKBP-PPIASE-3 (aa51118)。

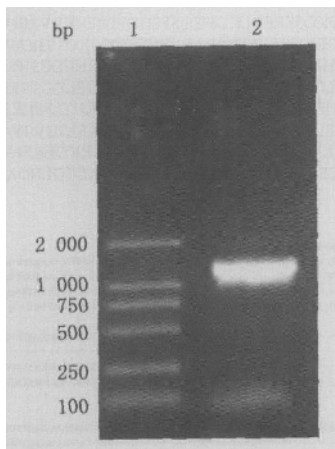


图 2 日本血吸虫亲免疫素基因 RT-PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 RT-PCR amplification of immunophilin gene of *Sj*  
Lane 1. DNA Marker 2 000, 1 296 bp; Lane 2. *Sj* immunophilin gene cDNA

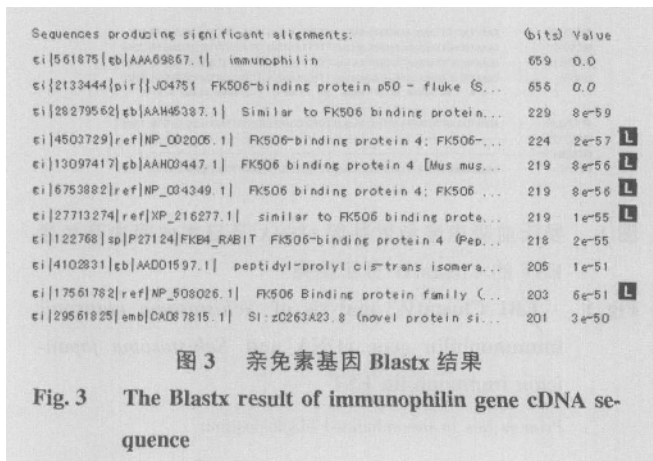


图 3 亲免疫素基因 Blastx 结果

Fig. 3 The Blastx result of immunophilin gene cDNA se-  
quence

### 3 讨论

利用生物信息学对新获得的核苷酸序列,经常按如下顺序来进行基因的识别和鉴定<sup>[5, 6]</sup>: ① 预测其可能的阅读框; ② 找寻启动子、终止子、poly(A)尾及判断启动子附近序列是否符合真核生物 Kozak 原则; ③ 翻译成蛋白质的氨基酸序列; ④ 通过 Blastn 和 Blastx 搜寻,与数据库中已知的核酸序列和蛋白质序列进行比较,如果 Blastx 结果显示与该基因对应的蛋白质具有 Score 值大于 200 或/和 Identity 大于 50%,则可大概判断该基因编码的为何种蛋白质; ⑤ 通过 NCBI 中的 Conserved domain search 程序进行分析,如果保守功能域完整,则可以判断该基因是否具有完整的阅读框。当然,进一步的鉴定应该是实验的证实。

本研究即是通过该步骤识别了日本血吸虫亲免疫素基因 cDNA 全长具有 1 438 bp。

扩增新基因全长的方法可总结为 EST 策略、巢式 RT-PCR<sup>[7]</sup>、锚定 PCR、RACE 及利用保守序列的简并引物进行扩增等。从 cDNA 文库中进行未知基因全长的扩增,锚定 PCR 是首选的方法,从亲免疫素相关 EST 设计巢式引物及利用 Step down PCR,有利于提高扩增产物的特异性,从而得到目的 EST 的特异延伸。当然,文库的质量也是保证是否可得到基因序列全长的关键,如果文库中无该基因全长的克隆,也将得不到全长。香港大学冯明钊教授惠赠的全长尾蚴文库保证了该 cDNA 文库的质量<sup>[8]</sup>。本实验室彭赛玉等<sup>[9]</sup>利用该方法扩增得到了乳酸脱氢酶、亲环素 A 等基因。亲环素即属于亲免疫素大家族的另一成员。亲免疫素基因的测序为研究亲免疫素家族的功能及血吸虫病疫苗的研制有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Hamilton G S, Steiner J P. Immunophilins: beyond immunosuppression[J]. *J Med Chem*, 1998, 41(26): 5119-43.
- [2] Herdegen T, Fisher G, Gold B G. Immunophilin ligands as a novel treatment for neurological disorders[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, 20(10): 3-5.
- [3] Osman A, Kiang D, Lo Verde P T, *et al.* Schistosoma mansoni: characterization of p50, an immunophilin[J]. *Exp Parasitol*, 1995, 80(3): 550-9.
- [4] Kiang D, Karim A M, LoVerde P T. Cloning the gene encoding Schistosoma mansoni p50, an immunophilin[J]. *Gene*, 1996, 17, 170(1): 137-40.
- [5] 吴忠道,郑亦男,徐劲,等. 日本血吸虫精氨酸酶编码基因 cDNA 的分离和序列分析 [J]. *中山医科大学学报* 2001, 22(2): 85-8.
- [6] 吴忠道,黄静,徐劲. 生物信息学及在寄生虫学上的应用[J]. *热带医学杂志* 2001, 1(1): 80-3.
- [7] 雷志刚,卓雅,何蔼,等. 巢式 RT-PCR 分析日本血吸虫组织蛋白酶 L1 (SjL1) 的基因 5'末端序列 [J]. *中国人兽共患病杂志* 2003, 19(1): 25-8.
- [8] Fung M C, Lao M T, Chen X G, *et al.* Expressed sequence tag (EST) of a *Schistosoma japonicum* cercariae cDNA library[J]. *Acta Tropica*, 2002, 82(2): 215-24.
- [9] 彭赛玉,吴忠道,徐劲,等. 日本血吸虫亲环素 A 和乳酸脱氢酶编码基因的克隆及序列分析 [J]. *中国人兽共患病杂志* 2003, 19(3): 36-9.

(编辑 张敏瑞)