

# 日本血吸虫 26 ku 谷胱甘肽硫-转移酶基因的克隆及分析

李焱, 余新炳, 吴忠道, 冯新港, 罗树红, 徐劲, 周俊梅, 郑亦男

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:** 【目的】扩增日本血吸虫 26 ku 谷胱甘肽硫-转移酶(Sj26GST)基因片段, 构建其重组原核载体, 以研制 Sj26GST 重组克隆。【方法】根据已知基因序列设计一对引物, 运用 RT-PCR 技术扩增 Sj26GST 目的基因 cDNA 片段, 将其克隆到 pBluescript(KS)质粒中, 并经酶切、PCR 和测序鉴定。【结果】获得 GST-pBluescript(KS)重组克隆。【结论】本实验获得 Sj26GST 重组克隆, 为进一步研制基因工程蛋白疫苗作准备。

**关键词:** 血吸虫, 日本; 谷胱甘肽 S-转移酶; 基因扩增; 序列分析

中图分类号: R383.24 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0432-03

## Cloning of 26 ku Glutathione S-transferase Gene of *Schistosoma japonicum* and Analysis

LI Yan, YU Xin-bing, WU Zhong-dao, FENG Xin-gang, LUO Shu-hong,  
XU Jin, ZHOU Jun-mei, ZHENG Yi-nan

(Department of Parasitology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract:** 【Objective】To amplify the gene of 26 ku glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* (Sj26GST) and construct a recombinant prokaryotic expression vector. 【Methods】One pair of primers was designed according to the sequence of GST. The cDNA fragment of Sj26GST gene was obtained by RT-PCR, then it was cloned into a vector pBluescript (KS), and corroborated through restriction enzymes map, PCR and sequencing. 【Results】GST-pBluescript (KS) recombinant clone was constructed successfully. 【Conclusions】GST recombinant clone was achieved in the experiment. It is prepared for further study on Gene-engineering vaccine.

**Key words:** *Schistosoma japonicum*; glutathione S-transferases; gene amplification; sequence analysis

日本血吸虫病仍然是一种严重危害我国人民身体健康的寄生虫病。因此发展血吸虫疫苗是我国血吸虫病防治的重要研究课题。目前在众多的候选疫苗分子中, 血吸虫谷胱甘肽硫-转移酶(GST)被认为是一种很有发展前途的候选疫苗分子。血吸虫 GST 是存在于血吸虫体内的具有解毒作用的一组同工酶, 在其生活中具有关键的作用。作者对日本血吸虫 26 ku 谷胱甘肽硫-转移酶(Sj26GST)基因进行了初步研究, 为进一步研制基因工程蛋白疫苗作准备。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细菌菌株 DH5 $\alpha$  为本室保存。

1.1.2 质粒 pBluescript (KS) 为本室保存。

1.1.3 日本血吸虫 阳性湖北钉螺购自江苏省血吸虫病研究所, 按常规方法逸出尾蚴感染家兔获得成虫。

1.1.4 主要试剂 异硫氰酸胍、AMV 逆转录酶为 Promega 产品, PCR 扩增试剂为真达公司产品,

收稿日期: 2000-03-29

基金项目: 中国博士后基金资助项目(1998)

作者简介: 李焱(1973-), 女, 湖北襄樊人, 博士研究生。

PCR markers 和  $\lambda$ DNA/*Hind* III markers 为华美公司产品, *T*<sub>4</sub> 连接酶、*Hind* III、*Eco*RI 为生工公司产品。

## 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 按文献[1]自行设计一对引物。引物 I 含 *Hind* III 酶切位点和起始密码子 ATG: 5'GAAGCTTGGTCATG TCCCCTACT 3'; 引物 II 含 *Eco*RI 酶切位点: 5'AGAATTCGCACATTATATTTAGTTTAA3'。引物经 PCGENE 软件分析后, 由上海生工公司合成。

1.2.2 日本血吸虫成虫总 RNA 的提取 取日本血吸虫成虫 30 mg, 加入 300  $\mu$ L 变性缓冲液, 匀浆, 加入 1/10 体积 2 mol/L 醋酸钠, 等体积水饱和酚 (pH 5) 和 2/10 体积氯仿: 异戊醇, 混匀, 冰浴后离心, 5 000 r/min, 20 min (TGL-18R 台式冷冻离心机, 转头半径 4.5 cm), 取上清。异丙醇沉淀后, 冷无水乙醇洗两次, 溶于 20  $\mu$ L DEPC 水中。

1.2.3 逆转录 cDNA 第一链合成 将总 RNA、反向引物 II、AMV Buffer 混合, DEPC 水补足剩余体积, 65  $^{\circ}$ C 10 min, 加入 dNTP 和 AMV 逆转录酶, 混匀, 置 42  $^{\circ}$ C 1 h, 70  $^{\circ}$ C 15 min 终止反应。

1.2.4 PCR 扩增目的基因片段 以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增反应, 在 500  $\mu$ L Eppendorf 管中依次加入下列物质: ddH<sub>2</sub>O、Buffer、dNTP、引物、cDNA 第一链, 总反应体积 50  $\mu$ L, 97  $^{\circ}$ C 预变性 6 min, 加入 *Taq* 酶 2.5 U), 94  $^{\circ}$ C 45 s; 55  $^{\circ}$ C 50 s; 72  $^{\circ}$ C 90 s; 共 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 酚: 氯仿抽提纯化。

1.2.5 GST-pBluescript (KS) 质粒的构建 分别用 *Eco*RI 和 *Hind* III 双酶切目的基因和载体 pBluescript (KS), 低熔点琼脂糖凝胶回收纯化。酶切目的基因 2  $\mu$ g 与载体 0.5  $\mu$ g 加入 1  $\mu$ L *T*<sub>4</sub> 连接酶缓冲液和 1 U *T*<sub>4</sub> 连接酶, 以水补足反应体积到 10  $\mu$ L, 16  $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 5  $\mu$ L 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 利用蓝-白斑法进行初筛。挑取白斑摇菌, 抽提质粒, 进行双酶切和 PCR 扩增鉴定。

1.2.6 测序 将重组质粒送宝生物公司测序。

## 2 结果

### 2.1 GST 基因 cDNA 片段的扩增

运用异硫氰酸胍酚法抽提总 RNA, 通过逆

转录 PCR 方法扩增得到 GST 基因 cDNA 片段。根据引物 I 和引物 II 的理论扩增值, 目的基因 cDNA 片段大小为 721 bp, 扩增产物大小与理论值相符(图 1)。



图 1 RT-PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Detection of RT-PCR products with 20 g/L agarose electrophoresis

Lane 1: blank control; Lane 2, 3, 4: GST RT-PCR products; m: DNA markers

### 2.2 重组质粒构建和鉴定

如图 2 所示, 重组质粒 GST-pBluescript (KS) 经过双酶切得到两条电泳条带, 其中一条与空质粒 pBluescript (KS) 双酶切后大小相符; 另一条与目的基因产物大小相等。以重组质粒为模板进行 PCR 扩增反应, 得到与目的基因片段大小相同的电泳条带, 表明已获得 GST 重组克隆。

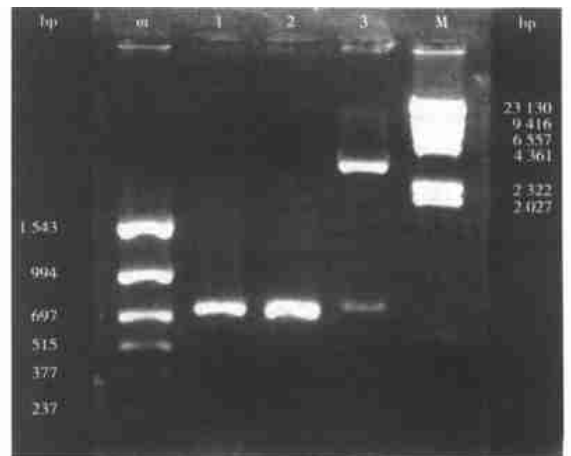


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid

m: DNA markers; Lane 1: GST RT-PCR products; Lane 2: pBluescript-GST PCR products; Lane 3: pBluescript-GST digested by *Eco*RI and *Hind* III M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III markers (repeated for 5 times)

### 2.3 测序及分析

将重组质粒测序, 所得序列有起始密码 ATG

和终止密码 TAA, 具有完整的阅读框。与 Gen-Bank 中日本血吸虫成虫菲律宾株 26 ku 抗原 cDNA 序列进行对比分析, 在第 499 位和第 576 位均由 T 碱基取代了 C 碱基; 由第 499 位到 501 位密码子编码的氨基酸, 在大陆株是丝氨酸, 而菲律宾株是脯氨酸; 第 574 位到 576 位密码子编码的氨基酸则都是酪氨酸(图 3)。

```

Sjc 1  atgtcccctalactaggttatggaataaaggccctgtgcaaccctcgcactctt 60
Sjp  atgtcccctalactaggttatggaataaaggccctgtgcaaccctcgcactctt

Sjc 61  ttggaatattctgaagaaaaatgaagagcatttataagacgcgatgaaggataaa 120
Sjp  ttggaatattctgaagaaaaatgaagagcatttataagacgcgatgaaggataaa

Sjc 121 tggcgaacaaaaagtttgaattgggttggagtttccaatctcctattatattgat 180
Sjp  tggcgaacaaaaagtttgaattgggttggagtttccaatctcctattatattgat

Sjc 181 ggtgatgttaaatcaacagctctatggccatcactatagctgacaagcacaac 240
Sjp  ggtgatgttaaatcaacagctctatggccatcactatagctgacaagcacaac

Sjc 241 atgttgggtggtgtccaaaagagcgtgcagagatttcaatgcttgaaggagcggtttg 300
Sjp  atgttgggtggtgtccaaaagagcgtgcagagatttcaatgcttgaaggagcggtttg

Sjc 301 gatattagatacgggttttcgagaattgcatatagtaaagactttgaaactctcaagt 360
Sjp  gatattagatacgggttttcgagaattgcatatagtaaagactttgaaactctcaagt

Sjc 361 gattttctagcaagctaccctgaaatgctgaaatgttcgaagatcgtttatgcataaa 420
Sjp  gattttctagcaagctaccctgaaatgctgaaatgttcgaagatcgtttatgcataaa

Sjc 421 acatattaaatggtgatcatgtaaccatcctgacttoatggttgaagcgcctctgat 480
Sjp  acatattaaatggtgatcatgtaaccatcctgacttoatggttgaagcgcctctgat

Sjc 481 gttgtttatcatggact*caatgtgcttggatgcttcccaaaatggttgttttaa 540
Sjp  gttgtttatcatggact*caatgtgcttggatgcttcccaaaatggttgttttaa

Sjc 541 aaacgtattgaagctatcccacaaatgataagat*ttgaaatccagcaagtatatagca 600
Sjp  aaacgtattgaagctatcccacaaatgataagat*ttgaaatccagcaagtatatagca

Sjc 601 tggcctttgcagggctggcaagccacgtttgggtggcgcaccctcccaaaataaatt 661
Sjp  tggcctttgcagggctggcaagccacgtttgggtggcgcaccctcccaaaataaatt

Sjc 661 aagaatgattgttttagtaaacattattatcacttacaattaactaaataaaatgctg 720
Sjp  aagaatgattgttttagtaaacattattatcacttacaattaactaaataaaatgctg

```

图 3 序列的分析比较

Fig. 3 Analysis and comparing of sequences

Sjc: *Schistosoma japonicum* (strain Chinese) Sjp: *Schistosoma japonicum* (strain Philippines)

### 3 讨论

谷胱甘肽硫转移酶(GST)是一组以谷胱甘肽为底物的具有解毒作用的同工酶。在曼氏血吸虫和日本血吸虫成虫体内都存在有 26 ku 和 28 ku GST<sup>[1]</sup>。曼氏血吸虫 Sm28GST 是当前血吸虫疫苗研究最深入的候选分子, 已在小鼠、大鼠、羊、猪、狒狒以及人身上作过实验, 具有降低虫荷数及雌虫

产卵率等作用<sup>[2-3]</sup>, 此外虫卵孵出毛蚴的能力也受到影响<sup>[4]</sup>。SmGST 与 SjGST 同源性很高<sup>[5]</sup>, 但 Sj28GST 的免疫保护效果并不好。实验证明 Sj26GST 免疫小鼠和猪也取得了与 Sm28GST 相似的保护效果<sup>[6]</sup>。此外有学者研究发现血吸虫 26 ku GST (Sj26GST、Sm26GST) 的抗原肽对人乳腺癌、胃癌和白血病细胞及红白血病细胞均有一定的抑制作用<sup>[1]</sup>。因此日本血吸虫 GST 具有潜在的开发应用价值。

本实验运用 RT-PCR 技术, 成功获得了编码 Sj26GST 的基因 cDNA 片段, 测序证明具有完整的阅读框。与日本血吸虫成虫菲律宾株 26KDaGST 相比较, 在第 499 位和 576 位碱基有所不同, 分别由 T 取代了 C; 大陆株第 167 位氨基酸是丝氨酸, 菲律宾株则是脯氨酸, 第 192 位氨基酸则二者相同均为酪氨酸。与国内学者李传明报道有所不同<sup>[7]</sup>。

本实验将编码 Sj26GST 的基因 cDNA 片段克隆入原核质粒 pBluescript (KS) 中, 为进一步研制日本血吸虫重组 GST 奠定了基础。

### 参考文献:

[ 1 ] 许家喜. 血吸虫抗原肽对某些肿瘤细胞的抑制作用 [ J ]. 生命科学, 1998, 10(3): 150.  
[ 2 ] Boulanger D, Trottein F, Manny F, et al. Vaccination of goats against the trematode *Schistosoma bovis* with a recombinant homologous *Schistosoma*-derived glutathione S-transferase [ J ]. Parasite Immunol, 1994, 16(8): 399.  
[ 3 ] Boulanger D, Reid G D, Sturrock R F, et al. Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni* [ J ]. Parasite Immunol, 1991, 13(5): 473.  
[ 4 ] Capron A, Riveau G, Grzych J M, et al. Development of a vaccine strategy against human and bovine Schistosomiasis [ J ]. Trop Geogr Med, 1994, 46(4 SpecNo): 242.  
[ 5 ] Trottein F, Godin C, Pierce R J, et al. Inter-Species variation of *Schistosoma* 28 kDa glutathione S-transferases [ J ]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 54(1): 63.  
[ 6 ] Liu S, Song G, Xu Y, et al. Immunization of mice with recombinant Sjc26GST induces a pronounced anti-fecundity effect after experimental infection with Chinese *Schistosoma japonicum* [ J ]. Vaccine, 1995, 13(6): 603.  
[ 7 ] 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 [ J ]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1997, 4(1): 6.

(编辑 张敏瑞)