

日本血吸虫成虫抗原基因的克隆和序列分析^①

陈代雄^② 刘启文 詹希美

(中山医科大学寄生虫学教研室; 广州, 510089)

摘要 本实验在用感染兔血清和单克隆抗体对日本血吸虫(大陆株)成虫 cDNA 表达文库进行筛选的基础上, 对筛选出的阳性克隆插入片段 DNA 进行了亚克隆和序列分析。

关键词 血吸虫, 日本/遗传学; 基因; 克隆; 分子; 序列分析, DNA

中图分类号 R 383.24

血吸虫病是一种世界性分布的人兽共患寄生虫病, 它发病率高, 危害严重。多年来人们一直在探索能对它进行有效控制的实用防治方法, 目前一般认为血吸虫分子疫苗的研制和应用, 能为达到这个目的提供一条充满希望的途径^[1]。使用抗体探针对血吸虫表达基因文库进行筛选, 是获得抗血吸虫病疫苗抗原成分的常用方法。本实验在用感染兔血清和单克隆抗体对日本血吸虫(大陆株)成虫 cDNA 表达文库进行筛选的基础上, 对筛选出的阳性克隆插入片段 DNA 进行了亚克隆和序列分析, 报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

日本血吸虫成虫 cDNA 表达文库由上海医科大学生生化教研室提供。日本血吸虫感染兔血清为本室按常规方法制备; 抗日本血吸虫成虫 140 kd 抗原的酶标单克隆抗体由南京医科大学寄生虫学教研室管晓虹教授惠赠。试剂: PCR 扩增试剂盒(kit)与文库载体 λ gt11 克隆位点两端序列引物(华美生物工程公司产品); 质粒: pTZ19 和加“T”法克隆 kit(Strata); T₄ 连接酶(Boehringer Mannheim); T₇ Sequencing kit(Pharmacia)。

1.2 方 法

1.2.1 文库的筛选和阳性克隆的鉴定 参照 Sambrook 等^[2]有关方法进行。

1.2.2 阳性克隆插入片段的亚克隆 ①阳性克隆

插入片段的制备及纯化: 用 PCR 方法扩增一阳性克隆插入片段 DNA^[3], 用低熔点琼脂糖凝胶挖块回收法验证并纯化 PCR 扩增产物, 然后用玻璃微珠洗脱法对其进行进一步纯化^[3]。②插入片段的亚克隆: 加“T”法, 参照 Strata 公司试剂盒(名称: T-vector cloning kit; 批号: ST 951108 A)说明书进行。③转染: 亚克隆质粒 pTZ19 转染宿主菌 DH₅ 过程参照文献^[2]。④亚克隆重组质粒的筛选和鉴定: 运用菌落颜色筛选法、PCR 法和 *Ssp* I、*Pst* I 双酶切分析 3 种方法对重组质粒进行鉴定^[2]。

1.2.3 亚克隆重组质粒的制备 参照文献^[3]用碱裂解法制备用于序列分析的亚克隆重组质粒。

1.2.4 插入片段序列分析 ①测序: 用 Sanger 双脱氧链末端终止法对插入片段测序, 具体参照 Pharmacia 测序 kit 说明书。②序列分析: 用 PcGENE 软件对测序结果进行分析。

2 结 果

2.1 日本血吸虫 cDNA 表达文库的筛选及阳性克隆的鉴定

文库筛选共获得 8 个复筛阳性克隆。对这些阳性克隆进行了诱导表达和 SDS-PAGE、ELISA 及 Western-blotting 等方法的鉴定, 证明它们表达的融合蛋白均包含特异的日本血吸虫抗原; 且表达产物抗体反应滴度可高达 1:1280。

① 国家教委博士点基金资助课题。② 第一作者 1963 年出生, 男, 硕士, 讲师, 现在广州医学院寄生虫学教研室工作(广州, 510260)。

2.2 阳性克隆插入片段的亚克隆

①采用PCR方法对其中一阳性克隆的插入片段进行扩增,得到一约0.4 kb的DNA扩增片段。②扩增的插入片段用加“T”法借助T₄连接酶连接到经SmaI酶切的亚克隆质粒pTZ19上。③铺板培养已转染宿主菌的亚克隆重组质粒,在IPTG和X-gal存在条件下,平板上出现散在分布的数十个白色和蓝色菌斑,蓝斑:白斑约为1:5左右;而对照的培养平板上只有蓝斑出现。④PCR法与双酶切分析的鉴定结果(图1)显示:亚克隆DNA片段与目的DNA片段大小一致,且目的基因为正向插入。

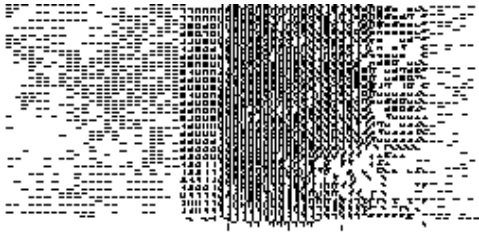


图1 阳性克隆插入片段的亚克隆

- A 亚克隆重组质粒PCR筛选;
B 亚克隆重组质粒双酶切分析

2.3 序列分析

阳性克隆插入片段DNA的测序结果如图2。该序列共有亲水性高峰8个,易曲性区域8处,且亲水性和易曲性部位基本一致(如图3)。根据读片结果确定:插入片段由372个碱基组成,其对应的氨基酸序列见图4。

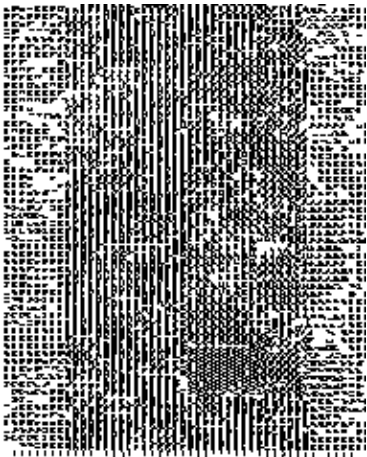


图2 阳性克隆插入片段DNA的测序
箭头所示为阅读起始区

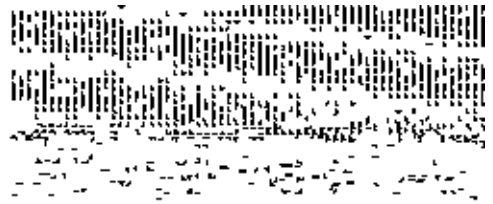


图3 氨基酸链的亲水性(A)和易曲性(B)分析

3 讨论

目前,日本血吸虫抗原基因的研究是寄生虫研究的一个热点^[1]。其结果对于血吸虫的分类及血吸虫病的诊断和预防均有重要意义。

本实验通过对cDNA文库的筛选,以获取包含日本血吸虫抗原基因的阳性克隆。我们选取用日本血吸虫多克隆血清抗体筛选出的一个阳性克隆,对其插入片段DNA进行了亚克隆和序列分析。

首先,我们对该阳性克隆的插入片段用PCR法进行了扩增,由于PCR扩增所用引物上无合适的酶切位点。故对扩增的插入片段只能用平端连接法克隆到质粒载体上。本实验所选用的质粒载体pTZ19是法国Strata公司的专利产品,被证明用于PCR产物的平端克隆效果良好。另外,我们选用加“T”法进行克隆,结果获得较高克隆效率。由于加“T”法有方法简便,不影响克隆位点两端的酶切位点等突出优点,因此,它被认为是一种最新的高效平端克隆方法^[4]。

亚克隆完成后,我们对克隆子进行了筛选。本实验首先使用了菌落颜色筛选法初步对重组与非重组质粒进行区分;然后,我们挑选白色菌斑用PCR法进行进一步的鉴定;经PCR筛选出的重组子,我们根据重组克隆位点两端的内切酶图谱,进行双酶切分析,经上述方法的筛选和鉴定,将保证我们能获得正确克隆的目的DNA重组质粒。

对插入片段的测序结果,我们利用PcGENE软件在计算机上对该序列编码的多肽进行了抗原表位分析和推测。那些亲水性强,且易曲性好的区域,很可能是该序列抗原表位之所在^[3]。

此外,经比较发现本实验测定的序列与已知的日本血吸虫基因序列同源性较低,其性质与意义将另文讨论。

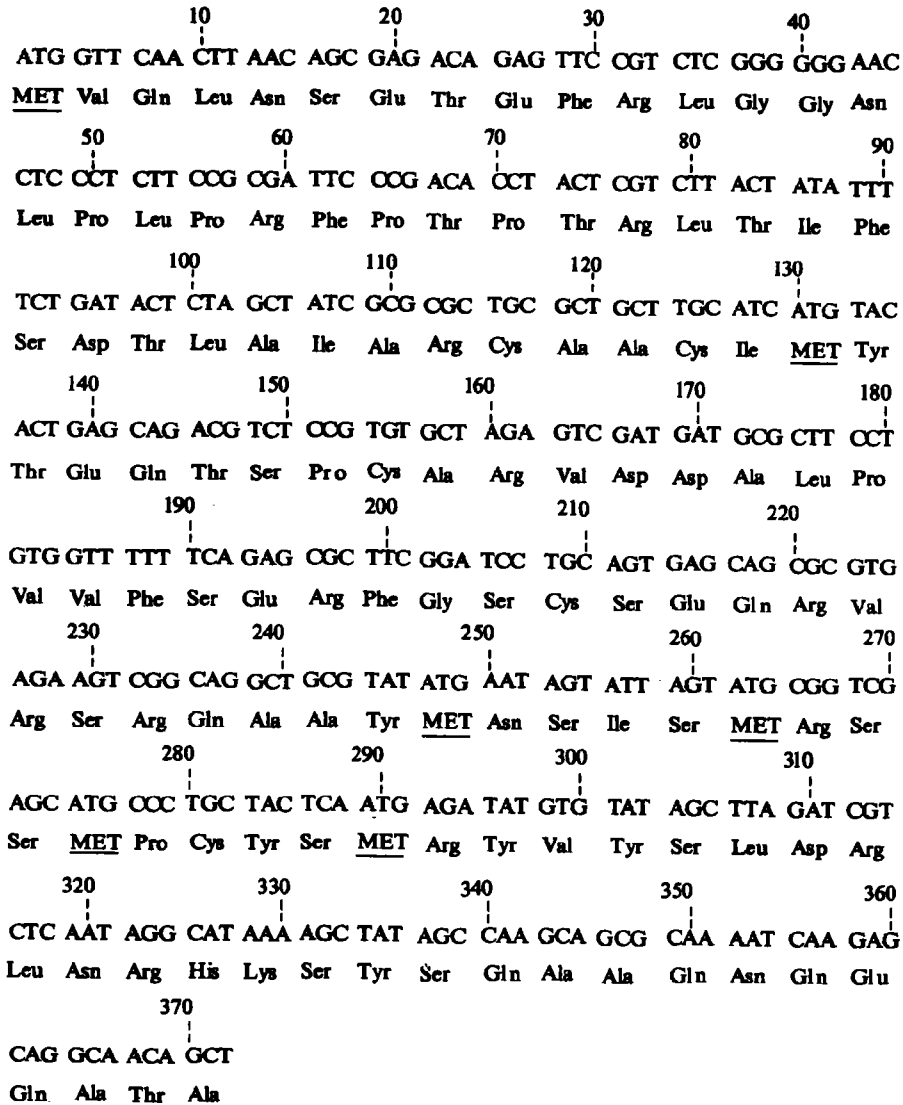


图 4 插入片段 DNA 序列和其编码的氨基酸链

本实验结果对于建立一种独特的日本血吸虫抗原表达基因结构的研究方法, 探讨其表达的抗原分子的性质和效应机制, 及寻找新的日本血吸虫抗原基因, 都具有一定的意义。

参 考 文 献

- 1 Dunne L W, Hagan P, Abath F G C. The control of schistosomiasis. *Lancet*, 1995, 345 (8963):1488
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989. 55~56, 56~60, 583~590, 822~826, 888~898

- 3 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993. 107~118, 131~132, 408~429
- 4 Zacher A N, Barrett A F. A new cloning vector-T. *Nat Genet*. 1992, 9:127
- 5 Lal A A, Goldman I F. An approach in the identification of epitopes for malaria vaccine. *J Biol Chem*, 1991, 266: 6868

(1996-11-13 收稿 1997-07-04 修回)

CLONING AND SEQUENCING OF ANTIGENIC GENE OF ADULT WORM OF SCHISTOSOMA JAPONICUM (CHINESE STRAIN)

Chen Daixiong Liu Qiwen Zhan Ximei

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

Using infective rabbit sera (IRS) and two strains of monoclonal antibodies as catching antibody probes the authors have immunologically screened cDNA expression library of *Schistosoma japonicum* (adult worm). Eight positive clones were obtained. The gene inserted of a positive clone was subcloned and its sequence was also analyzed.

Subject headings *Schistosoma japonicum*/ genetics; genes; cloning, molecular; sequence analysis DNA

·新成果·

假肥大型肌营养不良症细胞膜缺陷 的基因机制的研究

课题负责人 刘焯霖

(中山医科大学附属第一医院神经科, 广州, 510080)

假肥大型营养不良症的发病是由于肌细胞缺陷所引起, 机制是什么仍然不清楚。故此, 课题组从假肥大型肌营养不良症(DMD)患者细胞膜缺陷的机制 提出了缺失热区疏水肽段是该蛋白的重要功能区, 细胞膜的缺陷导致肌细胞内肌酶的外溢而致 DMD 患者的血清中肌酶明显升高。证实 DMD 基因产物的结构特点是导致 DMD 患者肌细胞膜缺陷的最重要的原因。应用该成果进行 DMD 的基因诊断和携带者的检出对提高我国人口素质和优生优育有重要意义。为 DMD 的基因治疗打下基础, 该研究 1996 年获国家教委科技进步二等奖。

(陈丽芳)

(上接第 303 页)

and ascending phlebography. Postoperative follow-up rate was 73.1% [mean time (6.5±0.5) years]. In all limbs with PCCS plus greater saphenous vein ligation and stripping, recurrent varicosis was found in 13 limbs (7.6%), and recurrent ulceration in 10 limbs (16.1%). Deep venous valve insufficiency was found in all recurrent cases. The symptoms and signs disappeared in all limbs with external valvuloplasty and deep venous valve sufficiency was demonstrated by Color Doppler. PCCS combined with greater saphenous vein ligation and stripping is an ideal method for varicosis of lower extremities. External valvuloplasty of superficial femoral vein valve should be performed on the cases with deep venous valve insufficiency above II° ~ III° at the same time.

Subject headings peripheral vascular disease/surgery; vascular surgery/method