

细粒棘球蚴抗原 B 亚单位基因序列分析

陆家海¹, 余新炳¹, 高劲松², 单志新¹, 陈慧红¹, 郭中敏³

(中山医科大学 1. 寄生虫学教研室; 2. 达安基因诊断中心; 3. 实验动物中心, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】获得细粒棘球蚴抗原 B 亚单位基因序列, 并进行序列分析。【方法】从包虫病羊体内获取细粒棘球蚴原头节, 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA。根据 *E. granulosus* 抗原 B 亚单位基因的已知序列设计一对引物, 采用 RT-PCR 技术扩增出抗原 B 亚单位基因; 将 PCR 产物纯化后用双脱氧链末端终止法进行序列测定, 并进行序列分析。【结果】用 RT-PCR 成功扩增出细粒棘球蚴抗原 B 亚单位基因序列, 测序表明该基因 ORF 为 270 bp, 和已发表基因核苷酸序列相比, 缺失 3 个碱基, 同源率为 84.2%, 推导编码氨基酸序列同源率为 77.8%。【结论】从 *E. granulosus* cDNA 扩增出抗原 B 亚单位基因, 该基因编码 8 ku 亚单位前体蛋白。

关键词: 细粒棘球蚴; 抗原 B; 基因扩增; 序列分析

中图分类号: R383.3 文献标识码: A 文章编号: 100-257X(2000)04S0-0027-03

Amplify and Sequence the Antigen B Subunit Gene from *Echinococcus granulosus*

LU Jia-hai¹, YU Xin-bing¹, GAO Jin-song², SHAN Zhi-xin¹, CHEN Hui-hong¹, GUO Zhong-min³

(1. Department of Parasitology; 2. Da'an Gene Diagnostic center; 3. Medical Laboratory Animal Center, Sun Yet-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To obtain and analyze the sequence of cDNA of *Echinococcus granulosus* antigen B subunit gene. 【Method】Total RNA was extracted from protosoles of cysts from ovine origin by using TRIzol Reagents. The specific primers were designed according to published nucleotide sequence in the GenBank database. The *Echinococcus granulosus* cDNA was amplified by RT-PCR. The purified product of PCR was sequenced by the dideoxy chain termination method, and sequence analyses was performed by using standard computer program. 【Results】A cDNA sequence with an open reading frame of 270 bp has been amplified successfully by using RT-PCR. Comparison of the DNA sequence and amino acid sequence deduced from cDNA with the published 8 ku subunit sequence of *Echinococcus granulosus* antigen B in the GenBank revealed lack of three bases and 84.27% and 77.8% identity respectively. 【Conclusion】Ag B subunit gene has been isolated from cDNA of *E. granulosus*, this gene encodes a 8 ku subunit precursory protein.

Key words: *Echinococcus granulosus*; Antigen B; gene amplification; sequence analysis

在全世界牧区, 包虫病仍是一个严重的公共卫生问题。该病在中东、南欧、拉丁美洲、中亚、澳大利亚、和非洲部分国家流行, 在我国以甘肃、新疆、宁夏、内蒙、青海等省(区)流行严重。随着现代社会的发展, 人口流动增加, 宠物(犬)和经济动物(狐狸)养殖数量增加, 导致包虫病蔓延扩散, 很多

省(区)均发现包虫病病人^[1]。对于人的包虫病, 往往在以下情况下才被发现: 寄生在身体各器官的包囊增大到一定程度而引起功能障碍时, 包囊遭到创伤性破裂而引起过敏现象或体检时进行物理检查(如 X 射线扫描等)。尽管物理诊断如超声扫描、CT 断层分析有助于确定包囊的位置大小、包囊液充盈

收稿日期: 2000-05-15

基金项目: 中国博士后基金资助项目(1999 17 号)

作者简介: 陆家海(1964-)男, 河南济源人, 博士后

度、是否钙化,但对它们的性质往往难以作出精确判断。因而,特异性的血清学诊断就显得尤为重要。几乎所有的试验都曾用于包虫病的诊断。但是由于诊断包虫病的抗原因其特异性差或敏感性低而使其受到限制。因此,研究者试图来寻找一种特异、敏感的抗原。目前最常用的血清学诊断抗原是包囊液,但粗制的包囊液抗原对囊虫感染有严重的交叉反应,尽管用盐析技术分离包囊液抗原提高了敏感性,但非特异反应增多。用亲和层析法对抗原进一步纯化,增加了特异性,但敏感性降低^[4]。研究表明,包囊液中有2种脂蛋白抗原(即抗原5和抗原B),是具有十分特异的包虫病诊断抗原。通常用肝素亲和层析法来分离包囊液中的抗原5和抗原B,用于包虫病的诊断,具有很高的敏感性和特异性。然而由于制备这些抗原需要长期不断提供包囊液,同时用包囊液进行纯化抗原要求条件高,且因宿主自身抗原的存在而出现假阳性结果。理论上,重组抗原有助于解决上述弊端。基于此,本研究根据抗原B基因的发表序列,从我国新疆包虫病羊体内获取细粒棘球蚴原头节,分离RNA,采用RT-PCR扩增抗原B亚单位前体蛋白基因,并进行测序鉴定,为进一步克隆表达和实际应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细粒棘球蚴原头节的收集

从乌鲁木齐四桥屠宰场屠宰的包虫病羊,获取含包囊的肝脏,无菌条件下完整获取包囊,抽取包囊液,分离原头节,经PBS(pH 7.2)两次洗涤后,镜下观察其活力,然后放入液氮中保存备用。

1.2 主要酶类和其它试剂

Taq DNA 聚合酶(5×10^6 U/L), dNTP 购自TakaRa 公司, TRIzol 试剂, MMLV 逆转录酶购自Gibco BRL 公司。PCR 系列试剂购自大连宝生物公司。

1.3 PCR 引物

根据已报道的细粒棘球蚴抗原B亚单位前体蛋白基因cDNA 序列经pcGENE 软件分析设计引物^[3]:引物1: 5'-GCCGTCGACATGAGGACTTACATCCTTCTCTC-3', 对应于抗原B的开放读框(ORF)41~63 bp; 引物2: 5'-GCCTCGAGTTACTTTGAATCATCATCTTTTTC-3', 对应于*E. granulosus* 抗原B ORF 中的289~313 bp。在两条

引物加上保护性碱基GC, 为了便于PCR 产物的克隆,在引物1和引物2的两端分别引入一个Sal I 和Xho I 酶切位点,引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 *E. granulosus* 原头节总 RNA 的提取 取新鲜或液氮中冻存的*E. granulosus* 原头节100 mg,使用TRIzol(LIFE TECHNOLOGIES)试剂抽提总RNA,紫外分光光度计测定其含量,琼脂糖电泳鉴定其纯度。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 其组成和反应条件:5×RT Buffer 2 μL, 10 mmol dNTP 1 μL, MMLV 1 μL, RNA 5 μL, Oligo(dT)1 μL, 37 °C 1 h, 95 °C 3 min。然后进行PCR,其组成和反应条件为:5×PCR Buffer 5 μL, 2 mmol dNTP 2.5 μL, Tag 酶0.5 μL, 引物1和引物2各1 μL, cDNA 1 μL, H₂O 14 μL。94 °C 3 min, 85 °C 30 s; 93 °C 45 s 50 °C 45 s 72 °C 1 min, 10 个循环; 93 °C 45 s 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。

1.2.3 PCR 产物的纯化、鉴定和序列测定 将PCR 产物进行琼脂糖电泳,鉴定其大小是否与预期基因片段大小相符;然后将PCR 产物纯化后,用上述引物(P1和P2)为测序引物,采用Sanger 双脱氧链末端终止法,在ABI-373A 自动测序仪上阅读碱基序列,对测序结果进行序列分析和同源性比较。

2 结 果

2.1 *E. granulosus* 原头节 RNA 提取

按TRIzol试剂抽提总RNA,紫外测定核酸含量为0.336 g/L, $A_{260}/A_{280}=2.1$,用1 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定, RNA 有2条带。

2.2 PCR 产物的电泳鉴定

将PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳,扩增出符合预期大小(270 bp)的片段(图1)。

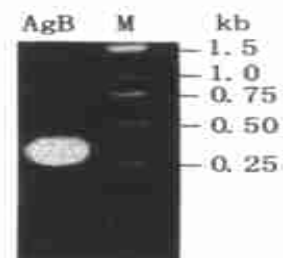


图1 抗原B PCR 产物电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis analysis of Antigen B PCR products

2.3 序列测定和同源性比较

从 *E. granulosus* 原头节提取 RNA, 依据抗原 B 亚单位前体基因序列设计的引物, 利用 RT-PCR 扩增出抗原 B 亚单位前体基因, 经序列测定和同源性比较和已发表序列的同源性为 84.2% (碱基序列和推导的氨基酸序列如图 2)。已发表基因 ORF 为 273 bp, 编码 8 ku 亚单位前体蛋白。该序列和已报告基因序列相比, 缺失 3 个碱基 (图 3)。推导

```

1 atg agg acc tac atc ctc ctc tct ctt gct ctc glg gci tci gfg gcc gtc gtt caa gcc
M R T Y I L L S L A L V A F V A V V Q A 20
61 aaa gct gaa ccc gag aga tgc aag tgc ctc ata atg aga aaa tlg ggc gaa att cgg gac
K A E P E R C K C L I M R K L G E I R D 40
121 ttc ttt aga agt gal cca ctg ggt caa aaa ctt gtt gct ctt ggc agg gac cig act gcc
F F R S D P L G Q K L V A L G R D L T A 60
181 atc tgc cag aag ctg caa tlg aag gti cac gaa gfg tlg aag aaa taf gtc aag gat cig
I C Q K I Q L K V H E V L K K Y V K D I 80
241 ctg gaa gaa aaa gat gat gat tca ang taa
L E E K D D D S K

```

图 2 抗原 B 亚基核苷酸序列和推导的氨基酸序列
Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. granulosus* Ag B subunit

GenBank accession: AF252859

```

Seq1 1 ATGAGGACTTACATCCTCTCTCTCTCTGCTCTGCTGGCTTTCGTGGCGTCTTCAAGCG
Seq2 1 ATGAGGACTTACATCCTCTCTCTCTCTGCTCTGCTGGCTTTCGTGGCGTCTTCAAGCT
*****
Seq1 61 AAAGCTGAACCCGAGAGATGCAAGTGCC---TCATAATGAGAAAATGGGCGAAATTCGG
Seq2 61 AAAGATGAGCCAAAAGCACACATGGGGCAAGTGTAAAAAAAAGATGGGGTGAACCTGCA
*****
Seq1 118 GACTTCTTTAGAACTGATCCACTGGGTCAAAAACCTTGTGCTCTTGGCAGGACCTGACT
Seq2 121 GACTTCTTTAGAAATGATCCACTGGGTCAAAAGACTTGTGCTCTTGGCAATGACCTAACT
*****
Seq1 178 GCCATCTGCGCAGAAGCTGCAATGAAAGTTCAAGACTGTTGAAGAAAATATGTCAGGAT
Seq2 181 GCCATTTGCGCAGAAGCTGCAATGAAAGTTCCGTGAGTGTCTGAAGAAGTATGTTAAGAAT
*****
Seq1 238 CTGCTGGAAGAAAAGATGATGATCAAAGTAA
Seq2 241 TTGCTGGAAGAAAAGATGATGATCAAAGTAA
*****

```

图 3 抗原 B 核苷酸同源性比较

Fig. 3 Comparison of homology with other *E. granulosus* Ag B variants

Alignment of Seq 1 the nucleotide sequence derived from RT-PCR and Seq 2 one of the published sequences of the 8 ku subunit of Ag B^[3]

```

Seq1 MRTYIILSIALVAVVAVVQAKAEFERCKCIIMRKL-GEIIRDFRNSDPIGQKIVAIGRDIT
Seq2 MRTYIILSIALYAVVAVVQAKDEPKAIMGQVVKRWGEIRDFRNDPIGQRLVAINDIIT
*****
Seq1 AICQKIQKLVHVLKYYKNIIEPKDDDSK
Seq2 AICQKIQKILRIVLKYYKNIIVFEPDDDSK
*****

```

图 4 氨基酸同源性比较

Fig. 4 Homology is the same with the other *E. granulosus* variants

Alignment of Seq 1 the amino sequence derived from RT-PCR and Seq 2 one of the published sequences of the 8 ku subunit of Ag B^[3]

的氨基酸序列同源性为 77.8%, 和已报告的氨基酸序列相比, 在 36 位置缺失一个氨基酸 (图 4)。

3 讨论

抗原 5 (Ag5) 和抗原 B (AgB) 是两个公认的细粒棘球蚴特异抗原蛋白。曾认为 Ag5 在细粒棘球蚴血清学反应中具有特异性抗原, 但后来试验发现其与多房棘球蚴、囊虫和某些肠道线虫有交叉反应。AgB 亦是公认的具有诊断价值的寄生虫蛋白, 免疫印迹显示其最小亚基 (12 ku/8 ku) 可用于包虫病患者血清抗体的检测^[4]。Frosch 等进行了 8 ku 亚基的序列测定和同源性比较, 显示不同地理来源的 *E. granulosus* 分离株在几个特定位置上的氨基酸种类有变动^[5]。本研究扩增新疆羊源 *E. granulosus* 抗原 B 8 ku 亚基序列, 和 Frosch 等所测序列的同源性为 84.2%, 所推导氨基酸同源性为 77.8%, 且在 36 位置缺失一个氨基酸。Fernandez 等^[3] 分离得到 8 ku 亚单位 cDNA 克隆, 其序列与 Frosch 所测序列的同源性只有 38%, 说明 AgB 最小亚基并非单一蛋白, 不同株间具相关性但存在差异。利用多株 8 ku 重组蛋白单克隆抗体研究抗原位点发现, 大多数 McAb 与其编码的肽的 N 端结合, 也有与 C 端 RGLIAEGE 序列反应的。在 AgB 其它亚基亦有类似的抗原位点。Leggatt 等^[6] 利用抗原 B 亚单位重组蛋白研究抗原位点, 并用于检测病人血清, 结果能检出 67% 包虫病阳性血清。

本研究利用 RT-PCR 首次扩增出中国新疆羊源 *E. granulosus* 抗原 B 亚单位前体蛋白基因, 并进行了序列测定和同源性比较, 结果表明不同地理株之间存在差异。该基因的克隆和抗原位点分布及免疫应用等研究结果将另文发表。

参考文献:

[1] 王全中, 崔 晶, 晋雪香, 等. 河南省包虫病的流行病学特征 [J]. 地方病通报, 1996 11(1): 42.

[2] Rickard M D, Honey R, Brumley J L, *et al*. Serological diagnosis and post-operative surveillance of human hydatid disease. II. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using various antigens [J]. Pathology, 1984, 16: 211.

(下转第 33 页)

测人源细粒棘球蚴原头节、13G-5 细胞系细胞、包裹液及包虫病人血清的酯酶同工酶谱含有相同迁移率(RF 值)的区带, 表明 13G-5 细胞系是来源于细粒棘球蚴细胞。严雷等^[10, 12]对新疆不同地区的羊源、牛源的 *E. granulosus* 原头节的酯酶同工酶(EST)、苹果酸脱氢酶(MDH)、苹果酸酶(ME)、葡萄糖磷酸异构酶(GPI)、酸性磷酸酶(ACP)等同工酶进行了测定, 并比较了不同地区和来源的 *E. granulosus* 原头节之间同工酶在区带数目、排列形式、Rf、Sm 值、等电聚焦分析, 以及对细粒棘球蚴是否存在种间差异提供依据。严雷结果提示: 不同地区来源于不同宿主的 *E. granulosus* 原头节在酯酶同工酶谱的区带数目不同, 但有 3 个 Rf 值相等的共同酶带。本实验检测 *E. granulosus* 原头节、包裹液和细胞系细胞酯酶同工酶, 得到一条相同位置的酯酶区带, 而包虫病人血清除含有相同位置的一条区带外, 至少还有另外 5 条酯酶区带。尽管这一结果和文献[10, 12]中 *E. granulosus* 原头节酯酶酶谱有差异, 却能够说明 13G-5 细胞系来源于细粒棘球蚴细胞。

参考文献:

- [1] Fruya K. An Established cell line of larval *Echinococcus multilocularis* [J]. Int J Parasitol, 1991, 21(2): 233.
- [2] 陆家海, 程维兴, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴细胞系 13G-5 培育 [J]. 中国兽医学报, 1998, 18(5): 479.
- [3] 陆家海, 郭中敏, 李德昌, 等. 棘球蚴细胞系(株)的培

- 育及其在免疫预防中的应用研究. 1. 人源细粒棘球蚴细胞培养 [J]. 中国兽医学报, 1997, 17(5): 473.
- [4] 陆家海, 程维兴, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴生发细胞体外培养的实验观察 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15(6): 392.
- [5] 陆家海, 孔长青, 钱若筠, 等. 人源细粒棘球蚴染色体测定 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(5): 73.
- [6] 陆家海, 官荣荣, 郭中敏, 等. 应用 ELISA 检测细粒棘球蚴代谢抗原 [J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(6): 131.
- [7] 陆家海, 李德昌, 郭中敏, 等. 细粒棘球蚴细胞系(13G-5)细胞代谢抗原的免疫原性和反应原性 [J]. 中国兽医学报, 1998, 19(6): 566.
- [8] Rickard M D. The immunological diagnosis of hydatid disease [J]. Aus Vet J, 1979, 55: 99.
- [9] Todorov T, Dakov I, Kosturkova M, et al. Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. I. A comparative study of immunodiagnostic tests. Bull WHO, 1978, 57: 735.
- [10] 严雷, 张文林, 翟群, 等. 新疆不同地区不同来源细粒棘球蚴原头节的几种同工酶谱比较研究 [J]. 地方病通报, 1992, 7(增刊): 76.
- [11] Fiori P L, Monacon G, Scappaticci S, et al. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* [J]. Int J Parasitol, 1988, 18(3): 297.
- [12] 严雷, 张文林, 翟群, 等. 新疆不同地区不同来源细粒棘球蚴原头节的几种同工酶的等电聚焦分析 [J]. 地方病通报, 1992, 7(增刊): 82.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 29 页)

- [3] Fernandez V, Ferreira H B, Fernandez C, et al. Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 77(2): 247.
- [4] Leggatt G R, Yang W, McManus D P. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1992, 86(2): 189.

- [5] Frosch P, Hartmann M, Muhlschiegel F, et al. Sequence heterogeneity of echinococcal antigen B [J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 64: 171.
- [6] Leggatt G R, McManus D P. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid [J]. Parasite Immunol, 1994, 16(2): 87.

(编辑 张敏瑞)