

日本血吸虫表达基因 EST 测定及同源性分析

吴忠道, 余新炳, 李 焱, 郑亦男, 李晖婷, 周俊梅

(中山医科大学寄生虫学教研室, 广东 广东 510089)

摘要:【目的】建立日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, *Sj*)表达基因的大规模随机测序体系。【方法】从 *Sj* cDNA 文库中随机挑选出单个重组克隆, 扩增出 cDNA 插入片段, 采用 PCR 直接序列测定方法对插入片段 5' 端进行部分序列测定。通过互联网将获得的表达序列标签(expressed sequence tags EST)送入 WHO 血吸虫基因库进行同源性检索。【结果】完成了 160 个 *Sj* 表达基因 EST 序列测定, 获得了 126 个可用于分析的 EST, 并在 GenBank 登录。10 个为 *Sj* 已知编码基因, 其中 3 个为 *Sj* 抗原基因全长 cDNA。【结论】建立了 *Sj* 表达基因 EST 测序及同源分析体系, 为进一步开展 *Sj* 表达基因的研究奠定了基础。

关键词: 日本血吸虫/遗传学; 序列同源性; 序列分析

中图分类号: R383.2 文献标识码: A 文献编号: 1000-257X(2000)04S0-0027-02

Generation and Identification of Expressed Sequence Tags from *Schistosoma japonicum*

WU Zhong-dao, YU Xin-bing, LI Yan, ZHENG Yi-nan, LI Hui-ting, ZHOU Jun-mei

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

Abstract: 【Objective】To establish large-scale sequencing system for expressed genes of *S. japonicum* (*Sj*). 【Methods】The cDNA clones were selected randomly from *Sj* cDNA library, and the insert fragments were amplified by PCR. The expressed sequence tags (ESTs) were obtained by PCR directed sequencing from 5' end of the partial sequence, then the ESTs were compared with all sequences in WHO Schistosoma GenBank data bases. The ESTs were submitted to NCBI dbEST for obtaining accession numbers. 【Results】160 recombinant clones were picked from the cDNA, and the inserts of cDNA were identified by PCR. 126 ESTs were generated by PCR directed sequencing. 10 ESTs belonged to "identified genes of Schistosoma" for they matched with Schistosome sequences in the databases, among them, 3 ESTS contain full cDNA sequences with ORF. 【Conclusion】The system for large scale sequencing of Chinese strain *Schistosoma japonicum* is successfully established and provides the basis for further study related to *Sj* expressed genes.

Key words: *Schistosoma japonicum* /genetics; sequence homology; sequence analysis

血吸虫是多细胞生物, 其基因组大小为 270 Mb, 估计表达基因总数为 15 000~20 000 个。表达基因的序列测定, 对于寻找和鉴定新的血吸虫疫苗候选分子、药物靶标, 以及诊断抗原分子均具有重要意义^[1]。当今, 大规模表达序列标签(expressed sequence tags, EST)测序已成为基因序列测

定的主要手段^[2]。我们在广东省“211 工程”重点学科建设基金的资助下, 建立了日本血吸虫中国大陆株(Chinese strain *Schistosoma japonicum*, *Sj*)表达基因的大规模随机测序体系, 为寻找和发现具有我国自主知识产权的血吸虫功能基因奠定工作基础。

收稿日期: 2000-04-18

基金项目: 中国博士后基金资助项目[中博基(1998)6号]; 广东省博士后基金资助项目[粤学位办(1997)35号]; 中山医科大学“211”重点学科建设课题基金资助项目(98169)

作者简介: 吴忠道(1962-), 男, 江西南昌人, 博士, 副教授。 http://www.cnki.net

1 材料与方 法

1.1 cDNA文库的随机测序

日本血吸虫(中国大陆株)成虫 cDNA 文库(*Sj*. cDNA 文库)系采用定向克隆构建于 λ gt11/Y1090 系统中,所构成的基因表达文库容量为 3.13×10^6 重组子^[3]。随机从文库中挑出单个 cDNA 克隆,制备模板,扩增出 cDNA 插入片段;采用 PCR 产物直接序列测定技术,对插入片段的 5' 端进行部分序列测定^[4]。

1.2 数据分析

原始的碱基序列经人工处理,去除模糊序列及载体序列后得到相应的 cDNA 克隆插入片段的 EST 序列,筛选出非冗余 EST 与 WHO 血吸虫基因库进行 Fastn 分析,将与已知基因同源性超过 95%、同源片段长度超过 100 bp 的序列归为已知的血吸虫基因,同源性较低或同源片段小于 100 bp 的归为血吸虫未知基因。所获得的 EST 序列均送入 GenBank 登录,获取进入号。

2 结 果

2.1 测序及登录

利用已建立的大规模测序体系,获得 160 个 EST,其中 126 个为有分析价值的 EST 序列。根据 WHO 血吸虫基因组计划有关规则并获得 NCBI GenBank 认可,建立了本实验室 cDNA 克隆和 EST 的命名方法。克隆和 EST 分别按格式“JAYXnnnn.GY”和“JAYXnnnn.GYL”命名。其中,J 代表日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*),A 代表成虫(Adult worm),Y 代表余新炳实验室,X 代表具体的工作者,nnnn 代表克隆编号(阿拉伯数字),G 代表中山医科大学(Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, China),L 代表引物名(Lambda gt11 forward primer)。到 2000-01-26 为止,在 GenBank 中登录的 EST 序列有 126 条,其进入号分别是 AI725355 ~ AI725361、AI740189 ~ AI740204、AI816553 ~ AI816554、AW160107 ~ AW160132、AW231224 ~ AW231255、AW282251 ~ AW282275、AW329868 ~ AW329884。

2.2 同源搜寻

采用 Fastn 程序与 WHO 血吸虫基因库进行同源性检索,结果发现 10 个 EST 分别与已知血吸虫编码基因高度同源,这 10 个基因分别是甘油醛-3-磷酸脱氢酶、亲环蛋白、烯醇化酶、动力蛋白、脂肪酸结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、跨膜蛋白、丝束蛋白、丝氨酸酶和反式剪接 mRNA 等编码基因。经与已知同源基因序列比较,JA YH0030.GYL,JA YH0011.GYL 和 JA YH0009.GYL 等 3 个 EST 分别含完整的动力蛋白、脂肪酸结合蛋白和谷胱甘肽-S-转移酶的编码区(CDS)序列,表明这 3 个 EST 分别为上述 3 个编码基因的全长 cDNA。其余的 116 个 EST 未搜索到同源的血吸虫已知基因。

3 讨 论

通过本课题的开展,建立了日本血吸虫(中国大陆株)表达基因的大规模随机测序体系,现已有 126 个 EST 在 GenBank 中登录。在获得的 10 个血吸虫已知基因 EST 中,3 个为血吸虫抗原基因全编码序列(全长 cDNA);另外 116 个 EST 的基因识别及全长 cDNA 克隆工作正在进行之中。这为进一步开展日本血吸虫(中国大陆株)表达基因的研究奠定了基础。分析发现,到目前为止在 GenBank 登录的血吸虫 EST 已达 14 000 多个,但主要为曼氏血吸虫 EST,*Sj* EST 仅占 1/10 左右。因此,*Sj* EST 测序仍值得继续进行。

参考文献:

- [1] David A J, Mark L B, Wim M D, *et al*. Genomics and the biology of parasites [J]. *Bio Essays*, 1999, 21(2): 131.
- [2] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, *et al*. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project [J]. *Science*, 1991, 252: 1651.
- [3] 陈淑贞,吴海玮,张兆松,等.一个定向克隆的日本血吸虫基因表达文库[J]. *中国人兽共患病杂志*, 1997, 13(6): 23.
- [4] 吴忠道,余新炳,郑亦男,等.日本血吸虫(中国大陆株)表达基因的分离和 EST 序列测定 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(1): 3.

(编辑 张敏瑞)