

绵羊肝片吸虫谷胱甘肽硫转移酶基因的克隆与序列分析

冉旭华^{1,2}, 闻晓波^{1,2}, 王春仁², 刘娣¹, 孙中武¹, 李晓娟², 王密²

(1. 黑龙江省农业科学院博士后科研工作站, 东北林业大学博士后科研流动站, 黑龙江哈尔滨 150030;

2. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要:本研究扩增肝片吸虫(*Fasciola hepatica*, Fh)谷胱甘肽硫转移酶(GST)基因, 并进行同源性分析。根据 GenBank 发表的部分 Fh GST 基因序列设计并合成一对特异性引物, 利用 RT-PCR 方法扩增出 Fh GST 基因完整的开放阅读框(open reading frame, ORF), 测定序列, 使用分子生物学软件进行同源性分析。获得 Fh GST 基因全长 682 bp, 编码 218 个氨基酸, 与澳大利亚分离的肝片吸虫 GST 同源性较高, 与大片吸虫和卫氏并殖吸虫的 GST 也有较高的同源性。不同虫株 GST 基因具有较高的同源性, 因此 Fh GST 蛋白不适合用作诊断抗原, 但由于其存在交叉反应, GST 基因作为分子疫苗的候选基因具有重要意义。肝片吸虫 GST 基因的克隆, 为进一步研究 GST 蛋白的功能和作用奠定了基础。

关键词:肝片吸虫; GST 基因; 序列分析

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2012)01-0064-03

肝片吸虫病(fasciolosis)是由肝片吸虫寄生于牛、羊等反刍动物肝胆管中, 引起的急性或慢性肝炎和胆管炎, 并伴发全身性中毒现象和营养障碍的一种吸虫病。该病遍及世界各地, 牧区家畜发病率较高, 牛、山羊、绵羊、马、骆驼等易感, 其中牛、羊肝片吸虫病感染率可达 33% ~ 79% (Dalton 等, 2003), 是中国危害最严重、覆盖面最广泛的反刍兽寄生虫病之一 (赵辉元, 1996; Gaasenbeek 等, 2001)。肝片吸虫病在给畜牧业带来巨大经济损失的同时, 还能够感染人, 威胁人们的身体健康。

谷胱甘肽硫转移酶(GST)在寄生虫疫苗研究中有重要意义。GST 是广泛分布于脊椎动物和无脊椎动物中, 与细胞解毒和许多生理及生物异源物质排泄有关的一种多功能酶家族 (Gaasenbeek 等, 2001)。GST 存在于所有蠕虫成虫的体内, 在蠕虫的代谢中起着非常重要的作用, 是蠕虫主要解毒酶之一 (Chemale 等, 2006)。研究结果表明, GST 分布于肝片吸虫成虫的实质和皮层及肠道细胞的表层。Spithill 等(1997)用肝片吸虫分泌排泄物中提取的 GST 免疫动物, 取得了较好的抗肝片吸虫感染的免疫保护效果。

本试验针对肝片吸虫 GST 基因进行研究。根据 GenBank 上的已知序列设计一对特异性引物, 采用 RT-PCR 方法扩增大庆地区分离的绵羊肝片吸虫的 GST 基因, 测定 GST 基因的完整 ORF 序列, 并用分子生物学软件对其核苷酸序列和氨基酸序列进行同源性分析, 以期从分子生物学水平了解其结构特点, 为进一步了解 GST 的生物学特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株、宿主菌与载体 肝片吸虫成虫由黑龙江八一农垦大学王春仁教授惠赠, 液氮冻存保种; 大肠杆菌 TG1、pMD18-T 载体由黑龙江八一农垦大学预防兽医学省重点实验室保存备用。

1.1.2 酶和试剂 RNase 抑制剂、Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind*III 均购自宝生物工程(大连)有限公司; 鼠源反转录酶购自 Fermentas 公司; 柱式 PCR 产物回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司; TRIzol RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 肝片吸虫总 RNA 提取 参照 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒的方法略作修改提取肝片吸虫总 RNA; 取出液氮中冻存的肝片吸虫, 称取 50 mg 虫体, 加入 1 mL TRIzol, 用研磨器充分匀浆处理。将匀浆样品于室温放置 5 min, 4 °C 条件下 10000 r/min 离心 10 min。取上清, 每 1 mL TRIzol 加入 200 μ L 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s, 室温放置 10

收稿日期: 2011-05-16

作者简介: 冉旭华(1978—), 女, 黑龙江人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学研究。

通信作者: 闻晓波(1977—), 男, 黑龙江人, 副教授, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学的相关研究。E-mail: wenxiaobo1977@163.com

基金项目: 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划项目(1251G042); 黑龙江省农科院博士后进站项目; 黑龙江八一农垦大学博士科研启动基金。

min。4℃条件下 10000 r/min 离心 15 min,把水相转移到新管中,加入等体积异丙醇,混匀,-20℃放置 30 min。4℃条件下 12000 r/min 离心 10 min,去上清。室温放置晾干沉淀,根据试验需要,加入 50 μL DEPC 水,反复吹打混匀。

1.2.2 RT-PCR 根据 GenBank 上已发表的序列设计 Fh GST 基因完整的开放阅读框的特异性引物进行扩增。引物序列如下,P1: 5'-ATGCCAGC-CAAACTCGGAT-3', P2: 5'-GGATTGACGCG-GACAATGTC-3',由上海生工生物工程有限公司合成引物。

1.2.2.1 反转录 取 RNA 模板 4 μL,上、下游引物各 1 μL 加入到用 DEPC 水处理过的 0.5 mL 离心管中,70℃ 5 min,冰浴 2 min,加入 5× Buffer 4 μL,4×dNTP(2.5 mmol/L)8 μL,RNase 抑制剂 1 μL,37℃ 5 min,加入鼠源反转录酶 1 μL,混匀,42℃ 2.5 h,70℃ 10 min 终止反应,获得 cDNA,取出放于冰上待用。

1.2.2.2 PCR 扩增 以上述 cDNA 为模板进行 PCR 反应,反应体系如下:10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP 1.5 μL,上、下游引物各 0.25 μL,模板 0.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,补充灭菌去离子水至 25 μL。扩增程序如下:95℃变性 5 min;94℃变性 40 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,30 个循环;72℃延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物的克隆与测序 回收上述 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体,转化 TG1 感受态细胞,涂布于含 Amp⁺(终浓度为 100 μg/mL)的 LB 固体培养基,挑取单个菌落培养,常规方法提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定,筛选阳性克隆,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.4 序列分析 通过 NCBI BLAST 分析,选取同源性较高的序列作为参考,进行分析,参考株见表 1。应用 DNASTar MegAlign 进行核苷酸序列与氨基酸同源性比较分析。

表 1 GST 基因序列分析参考虫株

分离地点/时间	简写	GenBank 登录号
中国大庆/2007	Dq	HM584608
澳大利亚/1992	Australia-2	M77682
波多黎各/1992	Puertorican	M93434
泰国/1998	Thailand	AF112567
澳大利亚/1992	Australia	M77680
澳大利亚/1992	Australia-1	M77681
澳大利亚/1992	Australia-9	M77679
韩国/2003	Korea	AY513643

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 以虫体 cDNA 为模板,P1、P2 为引物扩增出一条 682 bp 的片段,与预期大小相符(图 1)。

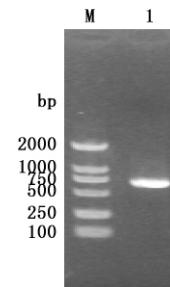


图 1 RT-PCR 扩增结果

注:M,DL2000 DNA Marker;1,Fh GST 基因 PCR 产物。

2.2 重组质粒的鉴定 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上后,转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,少量提取质粒,经 PCR 鉴定与 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定,筛选出阳性质粒 pMD18-T-FhGST。PCR 扩增出约 682 bp 条带(图 2),与 GST 基因大小相符;双酶切得到 2692 和 682 bp 的两条带,与载体和目的片段大小相符(图 3),表明目的基因已正确插入载体。阳性样品送上海生工生物工程有限公司测序。

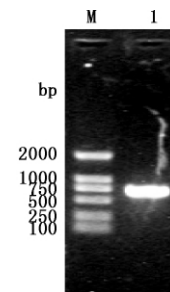


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

注:M,DL2000 DNA Marker;1,Fh GST 基因的扩增产物。

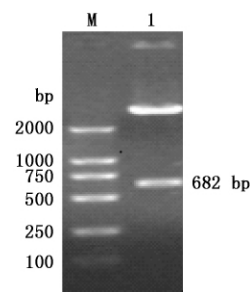


图 3 重组质粒双酶切鉴定结果

注:M,DL2000 DNA Marker;1,重组质粒的酶切结果。

2.3 测序结果及序列比较分析 测序结果表明 Fh GST 基因全长 682 bp,编码 218 个氨基酸,推测其分子质量为 25.3 ku。利用 DNASTar 软件对 GST 核

核苷酸序列及氨基酸序列进行同源性分析,结果见图4,表明该序列与澳大利亚分离的肝片吸虫 GST 同源性较高(氨基酸同源性为 75.2%~98.3%,核苷酸同源性为 73.8%~98.1%),与波多黎各分离大片吸虫的 GST 同源性也较高(氨基酸同源性为

97.9%,核苷酸同源性为98.1%),而与韩国分离卫氏并殖吸虫的 GST 同源性较低(氨基酸同源性为 62.3%,核苷酸同源性为65.1%),说明 Fh GST 与肝片吸虫 μ 型谷胱甘肽转移酶的同源性最高,其差异可能来自地域的影响。

氨基酸同源性 (%)									
	Dq	Australia-2	Puertorican	Thailand	Australia	Australia-1	Australia-9	Korea	
核苷酸同源性 (%)	Dq		98.3	97.9	97.1	92.7	89.6	75.2	62.3
	Australia-2	98.1		98.8	97.1	90.0	88.4	71.2	60.7
	Puertorican	98.1	98.6		97.3	90.2	88.0	71.6	60.8
	Thailand	96.2	94.8	95.7		92.9	90.3	74.8	61.5
	Australia	90.5	89.0	90.0	90.0		87.6	72.6	60.4
	Australia-1	86.7	86.7	86.7	85.7	84.3		74.1	62.9
	Australia-9	73.8	73.3	74.4	73.3	73.3	75.9		65.3
	Korea	65.1	65.1	66.0	63.2	64.1	65.1	67.7	

图4 同源性比较

3 讨论

GST 是一组由多基因家族编码的多功能蛋白质,能通过多种防御机制逃避宿主免疫反应,如 GST 的解毒作用及修复机制(Daniel, 1993; Chemale 等, 2010)。据研究报道,蠕虫含有至少 7 个 GST 亚型,已克隆其中 4 种亚型,这些克隆的亚型都属于 μ 型谷胱甘肽 S 转移酶,它们共有大于 71% 的同源性,分别显示不同的底物特异性。GST 折叠结构由两部分组成:N 端谷胱甘肽结合区,包括 4 条 β 折叠链和 3 个单环;C 端是完整的 α 螺旋(Rossjohn 等, 1997)。GST 作为防治血吸虫病的分子疫苗候选抗原的研究已取得可观的进展。对 GST 的研究也已扩展到其它寄生虫,用来自肝片吸虫的 GST 接种绵羊和牛已经取得了较好的抗虫保护,因此 GST 有望成为一种抗肝片吸虫的候选疫苗抗原。GST 还是肝片吸虫与血吸虫交叉免疫的主要反应成分(Hillyer 等, 1992),交叉免疫的存在提示了交叉保护力的可能。

本研究采用 RT-PCR 方法扩增出大庆地区分离的绵羊肝片吸虫的 GST 基因全长序列,利用分子生物学软件研究 GST 基因序列间的同源性,从而在基因水平发现不同吸虫 GST 的共性。GST 活性所需残基的保守性很可能是肝片吸虫与血吸虫之间交叉免疫的分子基础。本研究结果表明该序列与澳大利亚分离的肝片吸虫的 GST 同源性较高(氨基酸同源性为 75.2%~98.3%,核苷酸同源性为 73.8%~98.1%),与波多黎各分离大片吸虫的 GST 同源性也较高(氨基酸同源性为 97.9%,核苷酸同源性为 98.1%),与韩国分离卫氏并殖吸虫的 GST 同源性较低(氨基酸同源性62.3%,核苷酸同源性65.1%)。

说明 Fh GST 与肝片吸虫 μ 型谷胱甘肽转移酶的同源性最高,各地区虫种之间的序列差异可能来自地域的影响。GST 基因在吸虫间同源性较高,不适合用作诊断抗原的靶基因,但其作为分子疫苗的候选基因较为理想。本研究为进一步了解 GST 基因的进化及肝片吸虫分子疫苗的研制奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 赵辉元. 家畜寄生虫与防治法[M]. 长春:吉林科技出版社, 1996, 217~222.
- 2 Chemale G, Morphew R, Moxon J V, et al. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*[J]. Proteomics, 2006, 6(23): 6263~6273.
- 3 Chemale G, Perally S, LaCourse E J, et al. Comparative proteomic analysis of triclabendazole response in the liver fluke *Fasciola hepatica*[J]. J Proteome Res, 2010, 9(10): 4940~4951.
- 4 Dalton J P, Neill S O, Stack C, et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines[J]. Int J Parasitol, 2003, 33(11): 1173~1181.
- 5 Daniel V. Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993, 28(3): 173~207.
- 6 Gaasenbeek C P, Moll L, Cornelissen J B, et al. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep[J]. Vet Parasitol, 2001, 95(1): 37~43.
- 7 Hillyer G V, Soler de G M, Battisti G. *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase[J]. Exp Parasitol, 1992, 75(2): 176~186.
- 8 Rossjohn J, Feil S C, Wilce M C, et al. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase[J]. J Mol Biol, 1997, 273(4): 857~872.

单克隆抗体研究进展

刘萍,陈苗苗,刘学荣,牟克斌,黄银君

(中农威特生物科技股份有限公司,甘肃兰州 730046)

摘要:杂交瘤技术使鼠源单克隆抗体被广泛用于人类疾病的诊断和研究,建立了治疗性抗体的第一个里程碑。随着生物学技术的发展和抗体基因结构的阐明,应用 DNA 重组技术和抗体库技术对鼠单抗进行人源化改造,先后出现了嵌合抗体、人源化抗体和全人抗体,它们从不同角度克服了鼠单抗临床应用的不足,使抗体制备技术进入了一个全新的时代。

关键词:单克隆抗体;鼠源性单抗;人源性单抗

中图分类号:S859.79⁺7

文献标识码:A

文章编号:1671-7236(2012)01-0067-04

1975 年 Koehler 和 Milstein 创立了体外杂交瘤技术(Kohler 等,1975),得到了鼠源性单克隆抗体,开始了多克隆抗体走向单克隆抗体的新时代。与多克隆抗体相比,单克隆抗体具有无可比拟的优越性,它具有特异性高、效价高、纯度高、理化性状均一、重复性强、成本低并可大量生产等优点。鼠源性单抗应用于人类有较强的免疫原性,但主要缺陷是诱发人抗鼠抗体(human anti-mouse antibody, HAMA)

反应,其次是鼠单抗不能有效地激活人体的生物效应功能,因此限制了其临床应用(Dhar 等,2004)。减少或避免 HAMA 反应并提高疗效的主要途径是鼠源性单抗人源化,随着对各类抗体结构和氨基酸序列及其变异的种属和功能之间关系的深入了解,而能够利用抗体工程技术对抗体结构进行改造(胡春艳等,2008)。抗体的应用经历了非人源抗体、人鼠嵌合抗体、人源化抗体,最终到制备全人源单抗的转基因小鼠和噬菌体展示文库等不同的阶段。

1 鼠源性单抗

自单克隆抗体制备技术问世以来,制备单抗的一般程序基本相同,从超免疫的供体中即抗原免疫的小鼠获取脾细胞,再与骨髓瘤细胞融合,最后对单

修回日期:2011-05-11

作者简介:刘萍(1979—),女,山东人,研习员,研究方向:分子生物化学及病毒学。

基金项目:甘肃省科技计划资助(1008FCCA006);中农威特研发项目(YF20101007)。

9 Spithill T W, Piedrafita D, Smooker P M. Immunological approaches for the control of fasciolosis[J]. Int J Parasitol, 1997, 27

(10):1221~1235.

Cloning and Sequence Analysing of *GST* Gene of *Fasciola hepatica* Isolated from Sheep

RAN Xu-hua^{1,2}, WEN Xiao-bo^{1,2}, WANG Chun-ren², LIU Di¹, SUN Zhong-wu¹, LI Xiao-juan², WANG Mi²

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Postdoctoral Programme, Northeast Forestry

University Postdoctoral Programme, Harbin 150030, China;

2. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The glutathione S-transferase gene of *Fasciola hepatica* was amplified and its homology was analyzed. According to the published genomic sequence of Fh GST in GenBank, a pair of primers was designed and the open reading frame of GST gene of *Fasciola hepatica* was amplified by RT-PCR. The homology of GST gene was analyzed by molecular biological soft. The PCR analysis results showed that the Fh GST gene was 682 bp, and encoded 218 amino acid. It indicated that the Fh GST gene was highly homologous with *Fasciola hepatica* isolated from Australia, *Fasciola gigantica* and *Paragonimus westermani*. Because of the high homology of the GST gene of different parasite, it could not be used in diagnosis assay with Fh GST protein, but could be used in gene vaccine. The clone of Fh GST gene had advantages to investigate the function and effect of GST protein.

Key words: *Fasciola hepatica*; GST gene; sequence analysis