

日本血吸虫单性感染雄虫和双性感染雄虫 差异表达蛋白的筛选与鉴定*

戴 橄 汪世平** 余俊龙 徐绍锐 彭先楚 刘雪琴 周松华 刘 芬

(中南大学湘雅医学院血吸虫病研究室, 长沙 410078)

摘要 采用双向凝胶电泳和质谱技术对日本血吸虫单性感染雄虫和双性感染雄虫蛋白质表达谱进行分析,并在 mRNA 水平进行验证;观察差异表达 SJCHGC 蛋白重组真核表达质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 在 COS-7 细胞中的表达和亚细胞定位,并分析其表达产物的抗原性.成功鉴定了 9 个日本血吸虫雌雄合抱差异表达蛋白,其中在日本血吸虫雄虫合抱前表达上调的蛋白质有 6 个;而有 3 个蛋白质在日本血吸虫雄虫合抱后表达明显上调.大多数差异蛋白功能涉及血吸虫的生长发育、生殖、营养、运动、信号传递等过程.重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 融合基因真核表达载体在真核细胞 COS-7 中获得了表达,可用荧光显微镜直接观察其表达情况及亚细胞定位,细胞所表达的融合蛋白具有血吸虫抗原性.研究结果为揭示日本血吸虫雌雄合抱机制、研制抗血吸虫雌雄合抱疫苗提供了理论依据.

关键词 日本血吸虫,雌雄合抱,蛋白质组学,双向电泳(2-DE),基因克隆,绿色荧光蛋白,COS-7 细胞

学科分类号 R383

日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, Sj) 的一个显著特点是雌雄异体但又终生合抱.雌雄合抱是童虫发育成熟的必要条件,没有合抱的雌虫不能发育至性成熟,一直停留在童虫阶段,而不能产卵;只有居住在雄虫抱雌沟中的雌虫,其卵黄细胞才能产生蛋白质颗粒及增强梅氏腺细胞合成的能力.发育成熟的雌虫一旦与雄虫分离也会退化至不成熟状态.由此推论,雌虫需要一种来自雄虫的刺激来达到并维持性成熟生殖状态^[1],这种刺激被认为是靠雌雄虫间物质传递实现的.血吸虫对人体的损害主要是其虫卵的大量产生及由此而致的虫卵肉芽肿,因此可以说,雌雄合抱又是血吸虫致病的必要前提.如果能搞清楚血吸虫雌雄合抱的机理,进而抑制其合抱,可为血吸虫病的防治开辟新的研究领域.随着基因组学研究的进展,人们发现,仅仅知道生物体基因组遗传密码信息仍不能确切了解一个生物体是如何工作的,蛋白质作为生命功能的体现者和行使者,在某种程度上比基因更能直接地反映生理功能的过程及其变化^[2,3].近年来,差异蛋白质组学研究显示出其独特优势:通过比较分析不同生理状态下蛋白质表达图谱,实现对体系内代谢调控的动态监测,从而更易于揭示机体对内外环境变化

产生反映的本质规律^[4,5].目前,国内利用双向电泳(2-DE)技术对日本血吸虫蛋白质的研究少有报道^[4,6,7],而利用该技术于血吸虫雌雄合抱相关蛋白研究尚未见报道.

鉴于此,本研究利用双向电泳和质谱技术,分析日本血吸虫雄虫在合抱与未合抱状态下蛋白质表达上的差异,并在 mRNA 水平进行进一步验证.鉴定了多个血吸虫雌雄合抱差异表达蛋白.经生物信息学分析显示^[8],基因 SJCHGC 可能为日本血吸虫的一个新钙结合蛋白;功能位点分析显示,含有多个磷酸化位点,可能为一重要的胞浆内信号转导分子;基因结构及抗原表位分析显示,该基因具有较好的抗原性,进一步研究其功能具有重要的生物学意义.所以,本研究构建以 GFP 为报告基因的重组表达质粒 pEGFP-C1/SJCHGC,转染真核细胞,以观察合抱相关 SJCHGC 蛋白重组真核表达质粒

*国家“十·五”重大科技专项课题(2002AA2Z3343),国家高技术研究发展计划(863)(2004AA2Z3530),湖南省“十一五”重大专项(2006SK1001)和湖南省重点学科建设专项经费联合资助.

**通讯联系人. Tel: 0731-2355001, E-mail: wsp4373383@126.com

收稿日期: 2006-07-31, 接受日期: 2006-09-04

pEGFP-C1/SJCHGC在 COS-7 细胞中的表达和亚细胞定位, 并分析其表达产物的抗原性, 为揭示日本血吸虫雌雄合抱机制、研制抗血吸虫雌雄合抱疫苗奠定基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

昆明系小鼠, 4~6 周龄, 购自中南大学湘雅医学院动物实验中心. 猴肾成纤维细胞系 COS-7 细胞为本室保存. 用含 10% 小牛血清 DMEM 培养基传代培养, 液氮保种.

1.2 载体和菌株

真核表达载体 pEGFP-C1 购自 ClonTech 公司, 大肠杆菌 DH5 α 由本室保存.

1.3 试剂与仪器

二喹啉甲酸(bicinchoninic,BCA)蛋白质定量试剂盒为 Pierce 公司产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED、尿素、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘乙酰胺、CHAPS、苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂等试剂均购自 Sigma 公司; 固相 pH 梯度预制胶条(IPG strip, pH 3~10, 18 cm)、IPG 缓冲液, 覆盖液、蛋白质银染试剂盒均为 Amersham Pharmacia 公司产品; RT-PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品. 各种限制性内切酶、DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒购自上海生物工程公司, 脂质体转染试剂(Lipofectamine™2000)购于 Invitrogen 公司, 引物合成及 DNA 测序由大连宝生物公司完成. 其他试剂为国产分析纯. IPGphor 等电聚焦仪(Pharmacia 公司); Protean X II 垂直电泳槽、MODEL1000/5000 电泳仪、PDQuest 2D 凝胶分析软件、Gel Doc 2000 凝胶成像仪(Bio-RAD 公司产品); Savant 冷冻浓缩机(美国); Dy-B2 型脱色摇床(国产); Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱仪(ABI 公司).

1.4 引物

SJCHGC00821 亚克隆的 ORF 5' 加端 PCR 扩增引物. SJCHGC 5' *Kpn* I : 5' GCGGTACCACTAACATGGGAGAAGAGA 3', SJCHGC 3' *Apa* I : 5' ACGGGCCCCCTAAATGTCCTGATTACCTC 3'.

1.5 日本血吸虫雌雄合抱前后蛋白质的双向电泳分离

1.5.1 日本血吸虫合抱前后雌虫虫体的收集. 将阳性钉螺按常规方法逸出尾蚴, 分别用单性别尾蚴、

混合性别的尾蚴人工感染昆明系小鼠, 第 42 天解剖, 采用灌注法收集单性感染雄虫、混合感染雄虫, 并用无菌生理盐水洗涤 3 次, 置 Eppendorf 管中, 立即置 -80℃ 冰箱中保存备用.

1.5.2 蛋白质样品制备. 取 80~100 mg 日本血吸虫单性感染雄虫、混合感染雄虫样品分别于液氮中充分研磨至粉末状, 置于 400 μ l 裂解液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 40 mmol/L Tris, 4% CHAPS, 60 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF) 中冰浴匀浆, 充分涡旋混匀, 12 000 r/min、4℃ 离心 60 min, 收集上清液, 样品分装后存放于 -80℃. 用 BAC 蛋白质定量试剂盒测定蛋白质浓度, 每次上样量为 700 μ g.

1.5.3 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳. 按 IPGphor 等电聚焦系统指南和 Gorg 等^[9]的方法进行, 按其说明书进行第一向电泳. 上样量为 700 μ g 总蛋白. IPG 干胶条水化和聚焦在 20℃ 自动进行, 参数设定如下: 30 V, 12 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 1 500 V, 1 h; 8 000 V, 7 h. 等电聚焦结束后, 取出胶条, 加入平衡液 A (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 0.1% DTT) 振荡平衡 15 min, 再换平衡液 B (8 mol/L 尿素, 0.5 mol/L Tris-HCl, 2% SDS, 30% 甘油, 1.5% 碘乙酰胺) 振荡平衡 15 min, 用润湿的滤纸吸掉胶条上多余的平衡液, 准备第二向电泳.

1.5.4 第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE). IPG 胶条经过平衡后, 放在预先铺好的 12% SDS-PAGE 胶上, 在其一端的外侧加上蛋白质标准, 排净气泡后用含痕量溴酚蓝的 0.5% 琼脂糖封闭, 加入 SDS 电泳缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, 192 mmol/L 甘氨酸, 0.1% SDS), 15℃ 循环水冷却, 进行第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 电泳参数设置为恒流 30 mA, 30 min 后, 改用 60 mA 恒流电泳至溴酚蓝离胶最底缘约 1 mm 处, 停止电泳进行银染显色.

1.5.5 银染. 电泳所得的 2-DE 胶按蛋白质银染试剂盒的操作手册进行银染. 在含 40% 乙醇加 10% 冰乙酸中固定 30 min; 30% 乙醇加 0.2% 硫代硫酸钠, 再加 6.8% 乙酸钠敏化 30 min; 蒸馏水洗涤 3 次, 每次 5 min; 0.25% 硝酸银染色 20 min; 蒸馏水洗涤 2 次, 每次 1 min; 2.5% 无水碳酸钠加 0.007 4% 甲醛显影至蛋白质斑点清晰为止; 立即加入 1.46% EDTA-Na₂·H₂O 终止 10 min; 蒸馏水洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后用 30% 乙醇加 4.6% 甘油保存.

1.5.6 凝胶成像及图像分析. 通过 Gel Doc 2000 凝胶成像仪采集图像, 用 PDQuest 2D 凝胶分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配、量化获取斑点位置坐标等分析. 分析并比较单性感染雄虫和混合感染雄虫的双向电泳图谱, 选取具有 3 倍以上量变的蛋白质点, 作为进一步基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF/MS)分析的差异候选蛋白. 所有数据的统计分析在 SPSS for Windows10.0 软件上进行.

1.6 差异蛋白质点的肽质指纹图分析

1.6.1 胶内酶切及质谱鉴定. 切取二维电泳凝胶上的差异候选蛋白斑点, 进行蛋白质斑点的脱色和胶上原位消化、酶解. 具体如下: 用脱色工作液 (30 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$: 100 mmol/L $Na_2S_2O_3=1:1$) 对银染胶块进行脱色, 用含 10 mmol/L DTT 的 100 mmol/L NH_4HCO_3 于 57°C 还原 1 h 后, 再以含 55 mmol/L 碘乙酰胺的 100 mmol/L NH_4HCO_3 烷基化 30 min. 冻干后以 0.02 g/L 胰蛋白酶 37°C 酶解过夜. 酶解后的肽片段依次用 2 份含 50 μ l 5% TFA 的 50% 乙腈萃取, 萃取物以 Zip-Tip™ (10 μ l, Millipore) 脱盐和挂柱, 再与 CCA 基质液混合, 点样于不锈钢板上, 空气干燥后备用. 酶解后的肽混合物经 MALDI-TOF-MS 分析, 获得肽质量指纹图.

1.6.2 数据库检索. 通过因特网在 Matrix Science

MSDB 数据库(<http://www.matrix-science.com/>)中进行搜索, 搜索软件 Mascot Peptide Mass Fingerprint, 对获得的肽质指纹进行查询和鉴定. 查询条件: 肽质指纹图中的肽片段质量控制在 1 000~3 000 u 范围, 表观等电点 (pI) 的误差范围为 ± 0.5 pH, 表观分子质量 (M) 的误差范围为 $\pm 20\%$, 肽片段分子质量最大容许误差控制在 ± 0.5 u, 酶解片段不完全选择为 2 个, 使用单一同位素质量, 肽片段以正离子形式存在, 最少匹配肽片段数规定为 4, 物种来源为 CHORDATA 或 METAZOA 或 EUKARYOTA, 半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl-Cys), 被选择的片段信号均应较强, 为基线强度的 2 倍以上.

1.7 mRNA 表达水平的验证

采用 Trizol 试剂提供的标准步骤提取日本血吸虫单性感染雄虫、混合感染雄虫组织的总 RNA, DNA 酶处理后取等量的 RNA 在相同条件下进行逆转录合成 cDNA. 从已鉴定的差异候选蛋白中任选 2 个设计基因特异性引物. 取 1 μ l cDNA 与 dNTP、引物、Taq 酶等混合组成 25 μ l PCR 反应体系. 以 β -tubulin 为内参照与目的片段一起扩增. 5 μ l 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测. 待扩增片段的引物序列见表 1 (大连宝生物工程有限公司合成).

Table 1 Primers and PCR condition for each gene

Spot	Name	Primer(5'~3')	Annealing/°C	Product/bp
3	FABP	Sense: CGTGGATCCATGTCTTCTTTCTTG Antisense: AGAACCTCTCAGTCACGTTCAAAT	56	205
4	SJCHGC	Sense: GATGAATCACCTGGACCAT Antisense: CCTAAATGTCCTGATTACCTC	56	291
-	β -Tubulin	Sense: AGGCGGGACAGTGTGGTAAT Antisense: TTGAGAAGGAACACTACTGAA	56	501

1.8 合抱相关 SJCHGC 蛋白的亚细胞定位

1.8.1 SJCHGC 真核表达质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 的构建. 根据 SJCHGC 开放阅读框(open reading frame, ORF)设计的 PCR 引物, 以血吸虫成虫 cDNA 文库为模板, 用带有 *Kpn* I 和 *Apa* I 酶切位点引物 PCR 扩增基因 SJCHGC 的 ORF. PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 57°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环后 72°C 延伸 8 min. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分别鉴定目的片段

的大小, 并按琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收目的片段. 用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Apa* I 对回收目的片段和载体 pEGFP-C1 分别进行双酶切, 纯化后将 PCR 产物定向克隆到 pEGFP-C1 载体中, 连接产物转化感受态 DH5 α 菌, 以卡那霉素筛选白色克隆进行质粒扩增、提取和酶切鉴定. 重组的阳性克隆进行序列测定.

1.8.2 COS-7 细胞培养及质粒的转染. 按常规方法用 DMEM 完全培养液培养 COS-7 细胞: 10% 胎牛

血清在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育, 间隔 2 天更换培养液, 用 0.25% 胰酶消化后进行传代培养. 转染前 24 h 传代, 细胞密度为 1×10^5 / 培养皿(35 mm), 共分 3 组, 分别是重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 组、空载体 pEGFP-C1 组和空白对照组. 采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 转染 COS-7 细胞. 转染方法参照产品说明书进行: 转染前一天, 用 0.25% 胰酶消化生长状态好的对数生长期细胞并计数, 用不含抗生素、含 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 培养液调细胞浓度为 1.5×10^5 /ml, 铺入 24 孔培养板, 使其在转染日密度为 90%; 制备质粒 DNA 与 Lipofectamine 2000 复合物. A 液: 对于每孔细胞, 使用无血清、无抗生素 DMEM 培养液稀释纯化的 pEGFP-C1/SJCHGC 或 pEGFP-C1 质粒(对照) 1 μg, 轻轻混匀. B 液: 对于每孔细胞, 于 50 μl 无血清、无抗生素 DMEM 培养液中加入 Lipofectamine 2000 1~3 μl, 轻轻混匀. 将 B 液于 5 min 内与 A 液混合, 室温放置 20 min, 形成复合物; 将待转染的细胞用 PBS 洗 3 次, 加入准备好的复合物及 400 μl 无血清、无抗生素 DMEM 培养液, 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 12 h, 补加完全培养液(含 20% 灭活胎牛血清、无抗生素 DMEM) 0.5 ml, 继续培养 24 h.

1.8.3 转染 COS-7 细胞的荧光显微观察. 在用重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 转染 COS-7 细胞 48 h 后, 采用倒置荧光显微镜观察绿色荧光在细胞中的分布. 用 490 nm 蓝光激发, 以空载体 pEGFP-C1 为阳性对照, 确定重组表达 pEGFP-C1/SJCHGC 融合蛋白在细胞中的分布和定位.

1.8.4 转染 COS-7 细胞中 mRNA 的 RT-PCR 检测. 转染后 48 h 分别提取细胞总 RNA, RT-PCR 扩增 SJCHGC 基因片段. 总 RNA 的提取采用 Gibco BRL 公司的 TRIzol 试剂, 按说明书操作方法进行. 经琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 无降解, 紫外分光光度计定量后用于反转录. 反转录反应体系为: DEPC 水 14 μl, 5×AMV 反应缓冲液 6 μl, AMV 逆转录酶(Promega 公司) 1 μl, dNTP 2 μl, 上、下游引物 P1、P2 各 1 μl, RNA 5 μl. 42℃ 水浴 60 min, 95℃ 5 min 灭活转录酶. 取 5 μl 反转录产物为模板进行 PCR, 按上述 PCR 反应条件扩增 SJCHGC DNA 片段. PCR 扩增 SJCHGC 基因片段条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 8 min, 然后行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果.

1.8.5 表达产物的 SDS-PAGE、蛋白质印迹分析. 质粒转染 48 h 后, 提取重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 组、空载体 pEGFP-C1 组和空白对照组细胞的总蛋白. 裂解产物经 SDS-PAGE, 蛋白质印迹鉴定表达产物, 一抗为血吸虫雄虫可溶性抗原免疫血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, DAB-H₂O₂ 底物显色, 置蒸馏水中终止反应.

2 结 果

2.1 日本血吸虫雄虫合抱前后的 2-DE 差异分析

分别抽提日本血吸虫单性感染雄虫、混合感染雄虫组织的总蛋白, 通过蛋白质定量, 确保每一次上样量为恒定的 700 μg. 经一向固相 pH 梯度等电

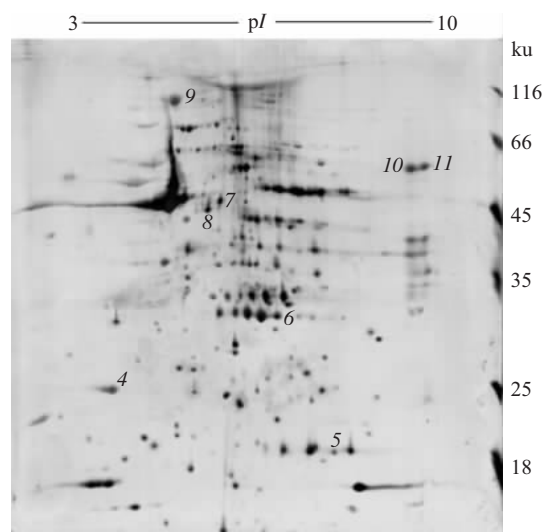


Fig. 1 Identify up-regulated expression protein of male worms derived from single-sex infection

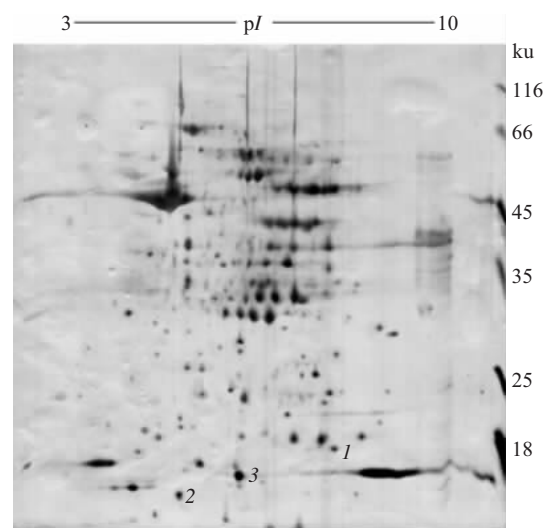


Fig. 2 Identify up-regulated expression protein of male worms derived from bisexual infection

聚焦电泳和第二向垂直平板 SDS-PAGE, 凝胶银染后获得二维凝胶图并扫描输入计算机. 采用软件分析, 发现银染后二维凝胶图上蛋白质表达水平明显改变 (Student's *t* 检验, $P < 0.05$), 个别点仅出现于

合抱前或合抱后的血吸虫雄虫 2-DE 图谱中, 选取 11 个差异表达蛋白质点进行质谱分析, 图 1, 图 2 和图 3 分别为典型的 2-DE 图谱和差异蛋白的局部放大图.

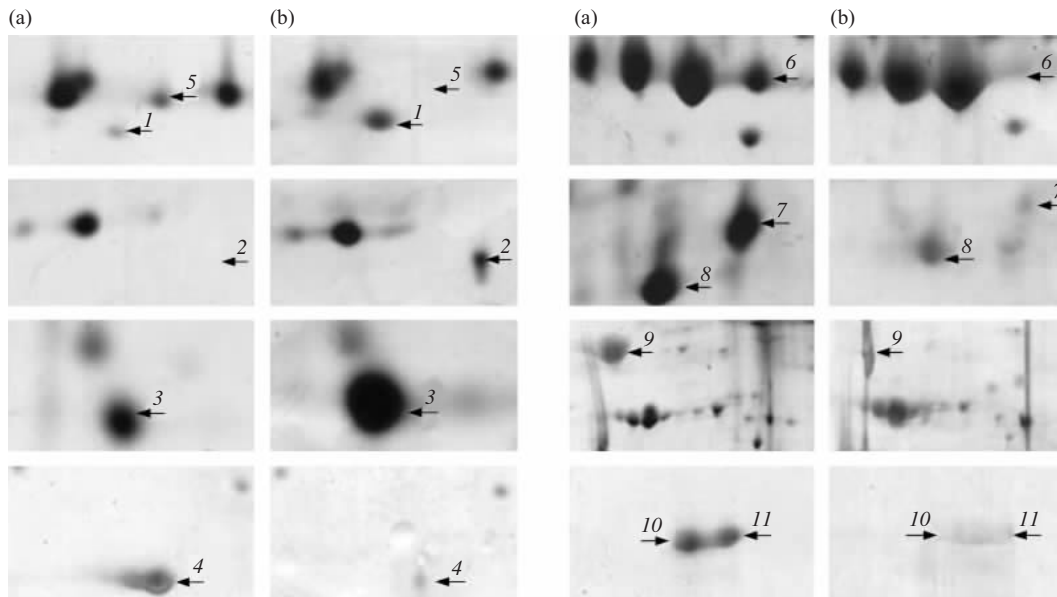


Fig. 3 Spots on the gels showing differentially expressed.

(a) Male worm of single-sex infection. (b) Male worms of bisexual infection.

2.2 差异蛋白质点 MALDI-TOF-MS 肽质量指纹图鉴定

将差异表达的 11 个蛋白质斑点 (二维凝胶图中标记) 从二维凝胶中切下, 进行蛋白质斑点的脱色和胶上原位消化、酶解. 酶解后的肽混合物经 MALDI-TOF-MS 分析, 获得肽质量指纹 (图 4). 将

差异表达蛋白的肽质指纹、分子质量及等电点输入蛋白质数据库并进行搜寻, 在 11 个差异表达的蛋白质点中, 成功鉴定出了其中的 9 个蛋白质 (表 2), 它们的得分均超过 75 分, 认为结果可靠 ($P < 0.05$) (图 5).

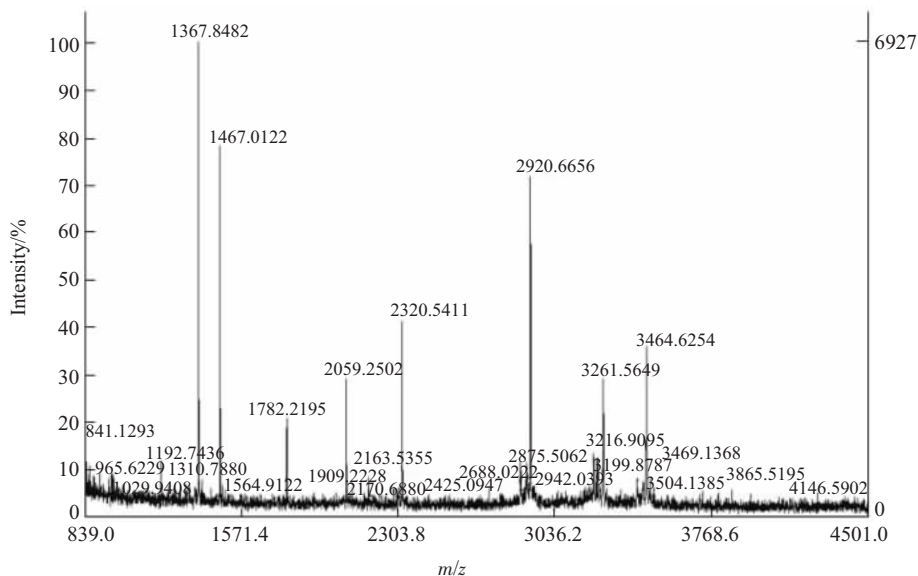


Fig. 4 MALDI-TOF mass spectrum of spot 4

Table 2 Differentially expressed protein identified by MALDI-TOF MS and PMF

Spot	Database searched	Accession number	Matched peptides	Score	Coverage sequene	Protein Level*	Protein identify
1	Mascot	Q5DDH3	10	148	72%	↓	Hypothetical protein
2						↓	Not identified
3	Mascot	AAG50052	7	91	63%	↓	Fatty acid binding protein
4	Mascot	Q86EK2	9	116	62%	↑	SJCHGC00821 protein
5						↑	Not identified
6	Mascot	E961611	7	89	33%	↑	S.japonicum GST polypeptide
7	Mascot	Q71TT8	8	101	38%	↑	Actin.-Schistosoma japonicum
8	Mascot	O82564	9	81	33%	↑	Actin 2.-Anemia phyllitidis
9	Mascot	AA05972	43	325	56%	↑	S.japonicum mRNA for paramyosin
10	Mascot	A72777	4	78	37%	↑	Hypothetical protein APE0203
11	Mascot	ZKF1Q	5	77	42%	↑	Reversetranscriptase(fragment)- Human immunodeficiency virus 1

* ↑, Up-regulated in male worm of single-sex infection. ↓, Down-regulated in male worm of single-sex infection.

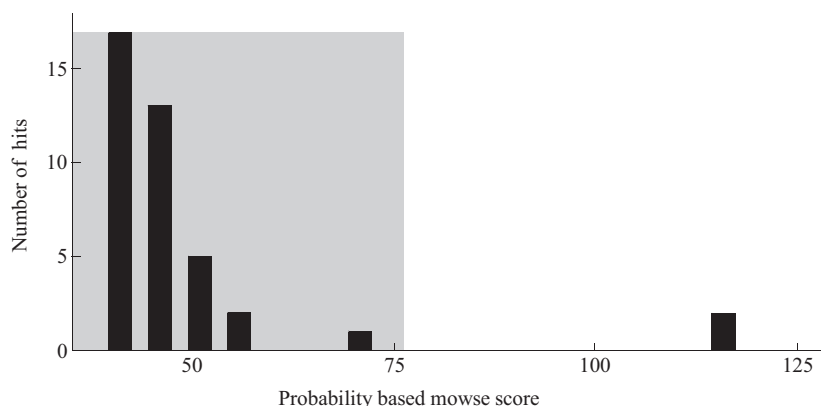


Fig. 5 Mascot search result of protein spot 4 peptide
Mass finger print data in database (116 score)

2.3 RT-PCR 验证 mRNA 水平表达

为了检测差异候选蛋白在 mRNA 水平是否仍然存在显著性差异, 采用半定量 RT-PCR 技术对其几个差异候选蛋白进行了验证. 半定量 RT-PCR

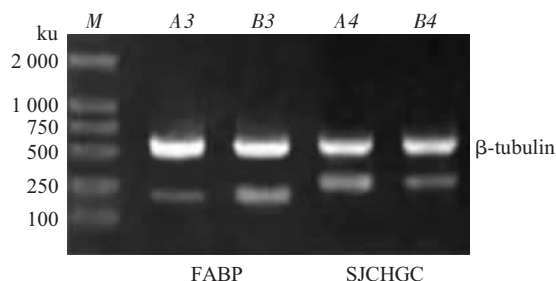


Fig. 6 RT-PCR analysis of some differentially expressed proteins

M: DL2000 molecular mass marker; A: Male worm of single-sex infection; B: Male worms of bisexual infection; “3,4” : Denote the same genes reported in Figure 1, Figure 2 and Table 2. Product length are showed in Table 1.

的结果显示: 内参照 β -tubulin 在单性感染雄虫、混合感染雄虫细胞内 mRNA 水平基本一致的情况下, 编码 FABP 的 mRNA 在混合感染雄虫细胞内表达水平明显增高, 而 SJCHGC protein 在单性感染雄虫细胞内表达, 在混合感染雄虫细胞内表达明显下降(图 6). 这些结果表明, 差异候选蛋白在 mRNA 水平的表达结果与我们进行的蛋白质组学研究的结果一致.

2.4 SJCHGC 基因扩增及鉴定

以血吸虫成虫 cDNA 文库为模板, PCR 扩增基因 SJCHGC, 将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 可见大小约 622 bp 左右的条带.

2.5 pEGFP-C1/SJCHGC 重组质粒的鉴定

以 pEGFP-C1/SJCHGC 阳性重组质粒为模板进行 PCR 扩增, 能得到与目的基因片段大小一致的产物, 以限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Apa* I 双酶切后,

可切出 4.7 kb 和 622 bp 2 个片段, 而空载体 pEGFP-C1 酶切后仅见一 4.7 kb 左右片段, 大小与预期结果一致(图 7). SJCHGC 基因的测定结果与 GenBank 登录的碱基序列完全一致.

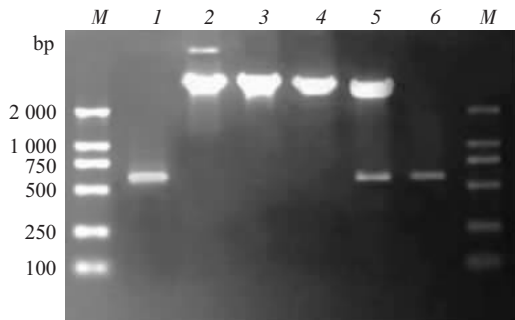


Fig. 7 The results of plasmids digestion

M: DL2000 ladder marker; 1: SJCHGC PCR products; 2: pEGFP-C1 plasmid; 3: pEGFP-C1 digested by *Kpn* I and *Apa* I ; 4: pEGFP-C1/SJCHGC plasmid; 5: pEGFP-C1/SJCHGC digested by *Kpn* I and *Apa* I ; 6: PCR products of pEGFP-C1/SJCHGC.

2.6 pEGFP-C1/SJCHGC 融合蛋白的亚细胞定位

用重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 转染 COS-7 细胞后 24 h, 荧光显微镜下观察, 发现细胞带有绿色荧光, 并且随着时间的延长, 绿色荧光增强. 在不携带外源基因的空载体 pEGFP-C1 转染的对照组 COS-7 细胞, 绿色荧光均匀分布于整个细胞中; 而用重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 转染 COS-7 细胞, 绿色荧光弥散地分布于细胞浆中(图 8), 与生物学信息学预测结果一致.

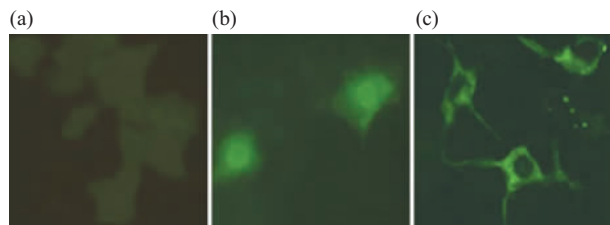


Fig. 8 Subcellular localization of pEGFP-C1/SJCHGC (400×)

(a) Untreated COS-7 cells. (b) COS-7 cells transfected with pEGFP-C1. (c) COS-7 cells transfected with pEGFP-C1/SJCHGC.

2.7 转染 COS-7 细胞中 mRNA 的检测

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, pEGFP-C1/SJCHGC 转染 COS-7 细胞后获得了约 622 bp 的目的条带, 与以 SJCHGC DNA 为模板的扩增产物大小一致, pEGFP-C1 转染 COS-7 细胞和正常细胞则无条带, 表明 pEGFP-C1/SJCHGC 转染

细胞中存在有 SJCHGC 基因的转录. 未经逆转录而直接以 RNA 为模板进行的 PCR 未扩增出任何产物, 表明样品未沾染质粒 DNA.

2.8 表达产物的 SDS-PAGE、蛋白质印迹分析

SDS-PAGE、蛋白质印迹分析结果显示, 在 pEGFP-C1/SJCHGC 转染的 COS-7 细胞裂解液中分子量约 49 ku 的蛋白质条带能被血吸虫雄虫可溶性抗原免疫血清识别, 未转染 COS-7 细胞和转染 pEGFP-C1 的 COS-7 细胞均未见此条带(图 9). 表明构建的 pEGFP-C1/SJCHGC 质粒能够在体外真核细胞中表达.

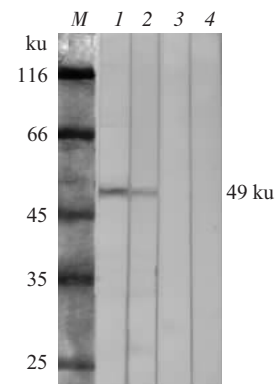


Fig. 9 Analysis of expression products of pEGFP-C1/SJCHGC transfected COS-7 cells by Western blot

M: Protein marker; 1, 2: pEGFP-C1/SJCHGC transfected COS-7 cells; 3: pEGFP-C1 transfected COS-7 cells; 4: Normal COS-7 cells.

3 讨 论

随着血吸虫基因组计划的顺利开展, 血吸虫蛋白质组研究也开始受到人们的关注^[10,11]. 由于蛋白质所处状态的不同其表达也存在很大差异, 差异蛋白质组学就是着眼于这种差异, 动态反映生物体系所处的状态, 提供细胞或组织在特定状态下精确的分子描述, 更有利于揭示生命现象的本质和规律. 血吸虫的复杂发育过程和期别及性别特异性表现的分子机制, 能由蛋白质的差异表达揭示出来^[12]. 例如, Blanton 等^[13]通过研究曼氏血吸虫尾蚴转变为童虫之后蛋白质合成的变化, 来分析血吸虫蛋白质合成的调节. 朱建国等^[14]用双向电泳初步分析了日本血吸虫雌雄虫体的蛋白质差异.

本研究以单性感染雄虫、混合感染雄虫为研究模型, 利用双向电泳技术对比分析了二者之间的明显差异蛋白, 并结合在 mRNA 水平的验证. 利用肽质量指纹图谱检索数据库鉴定了 9 个血吸虫雄虫合抱差异表达蛋白点: 脂肪酸结合蛋白、假设蛋

白、SJCHGC00821 蛋白、血吸虫谷胱甘肽 S- 转移酶、血吸虫肌动蛋白、血吸虫副肌球蛋白、假设蛋白 APE0203、逆转录酶片段. 其中脂肪酸结合蛋白 (FABP) 是血吸虫的一种生理性蛋白, 天然提取的血吸虫 FABP 能诱导小鼠产生免疫保护作用^[9]. 血吸虫谷胱甘肽 S- 转移酶是血吸虫生理功能所需的解毒酶, 在血吸虫的生命活动中发挥着重要作用. 其免疫动物可降低机体虫荷及成虫的生殖能力, 延缓或阻止虫卵发育成熟. 目前 GST 作为颇有希望的疫苗, 已进入临床二期试验阶段^[10]. 血吸虫副肌球蛋白是虫体可溶性抗原的有效成分, 可刺激机体免疫系统通过细胞介导的免疫方式, 诱导机体产生较高的抗再感染抵抗力. 用血吸虫肌球蛋白的重链部分免疫小鼠, 可获得 50%~70% 的保护力. Grossman 等^[17]研究发现, 血吸虫副肌球蛋白和肌球蛋白以期别特异性方式表达, 这一点在本研究中也证实. 以上结果提示, 大部分差异蛋白功能涉及血吸虫的生长发育、生殖、营养、运动、信号传递等过程. 目前国际上公认有发展前途的疫苗候选抗原共有 6 种, 其中 3 种与本研究中的差异候选蛋白相对应. 这一点使得我们对于其他几种功能未知的差异候选蛋白分子产生了较大的兴趣, 对于这些差异候选蛋白分子进一步研究, 我们很有可能发现新的基因, 新基因的发现为揭示血吸虫雌雄合抱的分子机制带来新的线索和思路. 因此, 克隆这些新基因的全长并分析其功能具有重要意义.

绿色荧光蛋白(GFP)是一种从海洋生物水母分离纯化的单链多肽蛋白, 分子质量约为 27×10^3 , 是一种天然荧光蛋白. 目前 GFP 已用于在从大肠杆菌到哺乳类动物的一系列细胞中进行表达, 并被认为是一种适用于不同情况、不同领域基因表达研究的通用报告基因^[18,19]. 本实验构建了绿色荧光蛋白融合 SJCHGC 基因的表达载体, 并在 COS-7 细胞中获得了成功的表达. 该载体可用绿色荧光蛋白作为报告基因观察 SJCHGC 基因的表达及定位. 荧光显微镜下发现: 在空载体 pEGFP-C1 转染组, COS-7 细胞中绿色荧光弥散分布于整个细胞中; 在重组质粒 pEGFP-C1/SJCHGC 转染的 COS-7 细胞中可见绿色荧光弥散分布于细胞浆内. RT-PCR 结果显示: 转染融合蛋白表达载体的 COS-7 细胞中存在有 SJCHGC 基因的转录. SDS-PAGE、蛋白质印迹的结果也确证了 pEGFP-C1/SJCHGC 融合蛋白的表达, 且能被血吸虫雄虫可溶性抗原免疫兔血清识别. 以上结果表明, 我们已在 COS-7 细胞中成功表

达了有生物活性的 pEGFP-C1/SJCHGC 融合蛋白, 可进一步用于体内试验.

从分子水平上研究血吸虫合抱前后特异性表达产物的功能及其调控机制, 必将对控制血吸虫生殖功能发挥巨大的作用, 免疫宿主血清在体外可以抑制曼氏血吸虫成虫合抱和产卵, 更预示了这方面的巨大潜力; 本室汪世平^[20]教授曾探讨在离体培养情况下, 抗未成熟虫卵超免疫血清对血吸虫成虫生殖产卵力的影响, 以及干扰初产卵胚胎发育的效果. 以往的成功经验表明: 在血吸虫体内每发现一个在虫体生命活动中起重要作用的物质, 都有可能被成功地用来作为抗原, 诱导保护性抗体的产生进而用于血吸虫病的防治. 所以, 通过对合抱过程中雌雄虫间传递物质的生物学性质及免疫学功能进行深入研究, 既可以诱导体抗体, 也可以研制特效药物, 阻断该物质的作用^[21]. 血吸虫合抱前后蛋白质组学的差异研究为寻找血吸虫合抱表达差异蛋白及其相应基因, 从分子水平上揭示血吸虫雌雄合抱机制, 为研制抗日本血吸虫雌雄合抱疫苗, 以及防治血吸虫病开辟一条崭新的途径.

参 考 文 献

- 臧 炜, 曹建平. 血吸虫雌雄合抱及其意义. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, **33** (2): 63~65
Zang W, Cao J P. National Institute of Parasitic Diseases, 2006, **33** (2): 63~65
- 易 红, 杨轶轩, 陈主初, 等. 应用蛋白质组技术筛选胃癌耐药相关蛋白. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33** (3): 267~276
Yi H, Yang Y X, Chen Z C, et al. Prog Biochem Biophys, 2006, **33** (3): 267~276
- Baltimore D. Our genome unveiled. Nature, 2001, **409** (6822): 814~816
- Cheng G F, Lin J J, Feng X G, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. Proteomics, 2005, **5** (2): 511~521
- 袁雪宇. 差异蛋白质组学技术和应用前景. 同济大学学报, 2004, **25** (4): 49~351
Yuan X Y. Journal of Tongji University(Medical Science), 2004, **25** (4): 349~351
- 朱建国, 林矫矫, 杨冠珍, 等. 编码日本血吸虫抱雌沟蛋白及肌动蛋白的基因性别间的表达差异性. 动物学报, 2002, **48** (2): 240~244
Zhu J G, Lin J J, Yang G Z, et al. Acta Zoologica Sinica, 2002, **48** (2): 240~244
- 高兴政, 谭荣安. 用双向电泳分析日本血吸虫雌虫和雄虫抗原. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, **13** (2): 65~68
Gao X Z, Tan R A. Chinese J Schistosomiasis Control, 2001, **13** (2): 65~68
- 戴 敏, 汪世平, 余俊龙, 等. 日本血吸虫合抱相关未知功能基因 SJCHGC00821 的克隆及生物信息学分析. 中国现代医学杂志,

- 2006, **16** (11): 1665~1669
- Dai G, Wang S P, Yu J L, *et al.* China J Modern Medicine, 2006, **16**: 1665~1669
- 9 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 1999, **20** (4~5): 712~717
- 10 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 2000, **405**: 837~846
- 11 梁宋平, 陈平, 王贤纯. 蛋白质鉴定技术. 见: 陈主初, 梁宋平主编, 肿瘤蛋白质组学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2002. 37~39
Chen Z C, Liang S P. Cancer Proteomics. Changsha: Hunan Scientific and Technical Press, 2002. 37~39
- 12 Barrett J, Jefferies J R, Brophy P M. Parasite Proteomics. *Parasitol Today*, 2000, **16** (9): 400~403
- 13 Blanton R E, Licate L S. Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1992, **51** (2): 201~208
- 14 朱建国, 林矫矫, 万海保, 等. 日本血吸虫成虫蛋白质的性别差异性研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2001, **19** (2): 107~109
Zhu J G, Lin J J, Wan H B, *et al.* Chinese J Parasitology And Parasitic Diseases, 2001, **19** (2): 107~109
- 15 Lee J S, Yong T S. Expression and cross-species reactivity of fatty acid-binding protein of *Clonorchis sinensis*. *Parasitol Res*, 2004, **93** (5): 339~343
- 16 Capron A, Capron M, Dombrowicz D, *et al.* Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, **124** (1~3): 9~15
- 17 Grossman Z, Ram D, Markovics A, *et al.* *Schistosoma mansoni*: stage-specific expression of muscle-specific genes. *Exp Parasitol*, 1990, **70** (1): 62~71
- 18 Rosochacki S J, Matejczyk M. Green fluorescent protein as a molecular marker in microbiology. *Acta Microbiol Pol*, 2002, **51**(3): 205~216
- 19 Yu Ya, Oberg K, Wang G, *et al.* Visualization of molecular and cellular events with green fluorescent proteins in developing embryos: a review. *Luminescence*, 2003, **18** (1): 1~18
- 20 汪世平, 赵慰先, 周汨波, 等. 日本血吸虫虫卵的体外培养与抗卵胚发育研究. *中华医学杂志*, 1996, **76** (3): 218~221
Wang S P, Zhao W X, Zhou M B, *et al.* *Natl Med J China*, 1996, **76** (3): 218~221
- 21 朱建国, 蔡幼民, 林矫矫. 血吸虫性别特异性表达产物研究现状及展望. *中国人兽共患病杂志*, 2000, **16** (5): 91~93
Zhu J G, Cai Y M, Lin J J. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2000, **16** (5): 91~93

Screening and Identification of Differential Expression Proteins Between Male Worms of Single-sex and Bisexual Infection in *Schistosoma japonicum* by Two-dimensional Electrophoresis*

DAI Gan, WANG Shi-Ping**, YU Jun-Long, XU Shao-Rui,
PENG Xian-Chu, LIU Xue-Qin, ZHOU Song-Hua, LIU Fen

(Institute of Schistosomiasis Research, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Two-dimensional (2D) gel electrophoresis followed by mass spectrometry was utilized to compare the protein expression between male worms of single-sex infection and male worms of bisexual infection in *Schistosoma japonicum*. To observe the *in vitro* expression and subcellular localization of recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-C1/ SJCHGC in COS-7 cells and analyze the antigenicity of the products expressed. 9 pairing-related proteins were identified and further validated by semi-quantitative RT-PCR analysis. Most of the candidate proteins have been evident to be somehow associated with various aspects of *S. japonicum* such as cell growth, development, motility, reproduction, nutrition and signal transmission. The SJCHGC gene was expressed in the transfected COS-7 cells. The expression and subcellular localization of the fusion protein were analyzed by fluorescence microscopy. The proteins expressed show the antigenicity of *Schistosoma japonicum*. These results provide the basis for elucidating the Schistosome mechanism of development and reproduction, and may permit the identification of protein candidates for the development of novel vaccine or new targets for drug development against schistosomiasis.

Key words *Schistosoma japonicum*, pairing, proteome, 2-DE, gene cloning, green fluorescent protein, COS-7 cells

*This work was supported by grants from The China National "Tenth Five-Year Plan" Important Special Program (2002AA2Z3343), Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA2Z3530), Hunan Province "Eleventh Five-Year Plan" Important Special Program (2006SK1001) and Hunan Province "Tenth Five-Year Key Xueke Plan".

**Corresponding author. Tel: 86-731-2355001, E-mail: wsp4373383@126.com

Received: July 31, 2006 Accepted: September 4, 2006