

# 日本血吸虫 *SjOST48* 基因的克隆、表达及其重组蛋白免疫保护效果分析

刘艳涛<sup>1</sup>, 洪炆<sup>1</sup>, 张旻<sup>1,2</sup>, 韩倩<sup>1</sup>, 曹晓丹<sup>1</sup>, 李莎<sup>1</sup>, 陆珂<sup>1</sup>, 李浩<sup>1</sup>, 傅志强<sup>1</sup>, 林矫矫<sup>1,3</sup>

1 中国农业科学院上海兽医研究所 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200241

2 河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471023

3 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

刘艳涛, 洪炆, 张旻, 等. 日本血吸虫 *SjOST48* 基因的克隆、表达及其重组蛋白免疫保护效果分析. 生物工程学报, 2015, 31(4): 501-511.

Liu YT, Hong Y, Zhang M, et al. Cloning, expression of gene *SjOST48* from *Schistosoma japonicum* and evaluation of the immunoprotective efficacy of rSjOST48 in mice. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 501-511.

**摘要:** 为了鉴定日本血吸虫 *SJCHGC01743* 基因并评估其重组蛋白作为新的血吸虫病候选疫苗抗原的潜力, 利用 PCR 技术扩增日本血吸虫 *SJCHGC01743* 基因, 应用荧光实时定量 PCR 分析该基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体的转录水平, 以 pET-28a(+) 为载体构建重组表达质粒并诱导其在大肠杆菌中表达。将纯化的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备免疫血清, 利用 Western blotting 检测重组蛋白的免疫原性, 应用间接免疫荧光技术对 *SJCHGC01743* 进行蛋白组织定位, 利用间接 ELISA 方法检测小鼠血清中特异性抗体水平。将重组抗原免疫小鼠, 评估其免疫保护效果。PCR 扩增得到 1 248 bp 不含信号肽的 cDNA 序列, 同源性分析结果显示, 该基因为日本血吸虫寡糖转移酶 OST48 亚基, 命名为 *SjOST48*。实时定量 PCR 分析显示 *SjOST48* 在检测的童虫和成虫各个期别虫体中均有转录, 其中在 28 d 虫体中的转录水平最高, 在 42 d 雌虫中的转录量显著高于雄虫。构建的重组表达质粒 pET-28a(+)-*SjOST48* 成功在大肠杆菌中表达, 重组蛋白 rSjOST48 分子量约 50 kDa。Western blotting 分析表明 rSjOST48 能被小鼠免疫血清识别, 具有良好的免疫原性, 间接免疫荧光实验表明 *SjOST48* 蛋白主要分布于虫体体被, 少量分布于实质。ELISA 检测结果表明 rSjOST48 能诱导产生较高的特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体。动物免疫保护实验结果表明 *SjOST48* 能诱导小鼠产生 32.62% ( $P < 0.05$ ) 的减虫率及 57.61% ( $P < 0.01$ ) 的肝脏减卵率。本研究为深入探讨日本血吸虫 *SjOST48* 基因的生物学功能及筛选新的血吸虫疫苗候选分子奠定了基础。

**关键词:** 日本血吸虫, *SjOST48* 基因, 表膜蛋白, 免疫保护效果

**Received:** August 20, 2014; **Accepted:** October 29, 2014

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31172315, 81271871).

**Corresponding author:** Jiaojiao Lin. Tel: +86-21-34293440; E-mail: jjlin@shvri.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31172315, 81271871) 资助。

网络出版时间: 2014-11-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140420.html>

# Cloning, expression of gene *SjOST48* from *Schistosoma japonicum* and evaluation of the immunoprotective efficacy of rSjOST48 in mice

Yantao Liu<sup>1</sup>, Yang Hong<sup>1</sup>, Min Zhang<sup>1,2</sup>, Qian Han<sup>1</sup>, Xiaodan Cao<sup>1</sup>, Sha Li<sup>1</sup>, Ke Lu<sup>1</sup>, Hao Li<sup>1</sup>, Zhiqiang Fu<sup>1</sup>, and Jiaojiao Lin<sup>1,3</sup>

1 Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China

2 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

3 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** To identify *SJCHGC01743* gene of *Schistosoma japonicum* and evaluate the potential of the recombinant protein as a new vaccine candidate for schistosomiasis, polymerase chain reaction (PCR) technique was used to amplify the cDNA of the gene and real-time RT-PCR was used to analyze the transcription profiles of *SJCHGC01743* at different development stages. Recombinant plasmid was successfully constructed and transformed into competent *Escherichia coli* BL21 (DE3). Then the recombinant protein was expressed, purified and emulsified with ISA206 adjuvant to immunize BALB/c mice for three times. The immunogenicity was confirmed by Western blotting and tissue localization was detected by indirect immunofluorescent assay. The specific antibody level was detected by ELISA. The immunoprotection of rSjOST48 was evaluated by the reduction in worm and egg counts in mice. A cDNA with 1 248 nucleotides was isolated from 28-day-old schistosomes cDNAs by PCR. Sequence analysis revealed that *SJCHGC01743* was a 48-kDa subunit of the oligosaccharyltransferase complex (*OST48*) and named as *SjOST48*. Real-time PCR analysis indicated that this gene was expressed in all investigated stages and had the highest expression level in 28 d worms, the level of gene transcription in female worms was significantly higher than that of male worms. Then recombinant plasmid pET28a(+)-SjOST48 was successfully constructed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Western blotting analysis showed that rSjOST48 had good immunogenicity. Indirect immunofluorescent analysis revealed that SjOST48 was mainly distributed on the tegument of the worms. The result of ELISA indicated that the rSjOST48 vaccinated group could induce a significant increase in the level of specific IgG, IgG1 and IgG2a. An immunoprotection experiment showed that the vaccination of rSjOST48 in mice induced 32.62% ( $P<0.05$ ) reduction in the numbers of worms and 57.61% ( $P<0.01$ ) in eggs in liver, compared with that of the control group. This study provides the foundation for proceeding further research on the biological function of SjOST48 and screening new vaccine candidates for schistosomiasis.

**Keywords:** *Schistosoma japonicum*, *SjOST48* gene, tegument protein, immunoprotective effect

血吸虫病 (Schistosomiasis) 是一种分布广泛、危害严重的人畜共患寄生虫病, 在全球 76 个国家和地区流行, 受感染人数高达 2 亿。截至 2012 年底, 我国仍有 45 个血吸虫病流行县(市、区), 血吸虫病人总数多达 240 597 例<sup>[1]</sup>。

目前血吸虫病防治仍以吡喹酮化疗为主, 但化疗可能诱导抗药性产生, 具有潜在产生耐药性的危险, 且药物治疗无法控制重复感染, 因此血吸虫病新型疫苗及新药相关研究已成为目前血吸虫病防治研究的重大需求。

血吸虫的体被表膜暴露于虫体表面,是血吸虫和宿主物质交换的场所也是宿主免疫效应分子与虫体直接接触的界面,被认为与血吸虫营养摄取、免疫逃避、免疫调节、排泄、渗透压调节和信号转导等密切相关<sup>[2]</sup>,而分布于体被上的表膜蛋白是研发疫苗和药物的理想靶标。目前研究发现 *Sj23*、*Sm-TSP-2* 和 *Sj29* 等表膜蛋白可作为抗血吸虫病疫苗候选分子<sup>[3-4]</sup>,但其产生的免疫保护效果仍需提高,筛选诱导更高免疫保护效果的疫苗候选分子是血吸虫病预防取得突破的基础。

2006 年 Liu 等<sup>[5]</sup>在通过蛋白组学分析日本血吸虫与宿主互作研究和本实验室 Zhang 等<sup>[6]</sup>在对日本血吸虫体被蛋白进行蛋白组学分析时都鉴定到了 *SJCHGC01743* 蛋白。同源性分析结果显示该蛋白与哺乳动物的寡糖转移酶中的一个亚基 *DDOST/OST48* 高度同源,命名为 *SjOST48*。*DDOST/OST48* 是寡糖转移酶 (*OST*) 复合体中的一个亚基<sup>[7]</sup>,属于寡糖转移酶 48 kDa 亚家族,它能够跨过内质网膜催化高甘露糖型寡糖 (*Dolichol-P-GlcNac<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub>*) 从多萜醇联糖载体转运到新生肽链的糖基化识别位点 (*Asn-X-Ser/Thr*) 的天冬酰胺受体部位上<sup>[8]</sup>,参与新生蛋白质 N-连接糖基化修饰过程。N-连接糖基化普遍发生在细胞外环境的蛋白质中,包括膜蛋白、分泌蛋白和体液中蛋白质,而这些蛋白恰巧都是容易获得并适合用作诊断和治疗的分子,因此,许多临床的生物标志物及治疗的靶标常是糖蛋白<sup>[9]</sup>。本实验室经鉴定得到 *SjOST48*,推测其参与了蛋白质 N-糖基化修饰作用,可能在血吸虫发育、繁殖与蛋白运输中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。本研究对 *SjOST48* 编码基因进行克隆、表达,评估重组蛋白 *rSjOST48* 在

小鼠中诱导的免疫保护效果,为深入研究该基因的生物功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和酶

Trizol、逆转录酶、RNA 酶抑制剂购自 Invitrogen 公司; *Ex Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD19-T 载体、限制性内切酶 *Sac* I、*Xho* I 购自大连宝生物工程有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、B 型质粒小量快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; *Ni-NTA HisBind Resin* (Merck-Novagen) 购自中科新生命生物科技有限公司;硝酸纤维素膜 (Whatman) 购自经科宏达生物技术有限公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自北京碧云天生物技术研究所以; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG1、IgG2a 购自 AbD Serotech 公司; DAB 显色试剂盒、可溶性单组分 TMB 购自天根生物科技有限公司。

#### 1.1.2 菌种、质粒、实验动物和寄生虫

大肠杆菌 *DH5 $\alpha$* 、*BL21*, 表达质粒 *pET-28a(+)*, 日本血吸虫 42 d 成虫 cDNA 均由中国农业科学院上海兽医研究所动物血吸虫病研究室保存;中国大陆株安徽品系的血吸虫阳性钉螺由中国农业科学院上海兽医研究所钉螺室提供;雄性新西兰白兔,体重 2.5-3.0 kg,购自上海罗泾飞达实验动物养殖场;6 周龄雄性 *BALA/c* 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 虫体的收集

新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 20 000、

15 000、10 000、8 000、5 000、2 000 条血吸虫尾蚴，在感染后 7、14、21、28、35 和 42 d 后剖杀，以肝门静脉灌注法收集虫体，液氮冻存备用。

### 1.2.2 总 RNA 的提取

取液氮中冻存的 7、14、21、28、35 和 42 d 日本血吸虫各 200 mg，按 Trizol 试剂盒说明书分别进行总 RNA 的提取。

### 1.2.3 引物设计和含 ORF cDNA 片段的扩增

参照 NCBI 收录的日本血吸虫 *SJCHGC01743* (gb|AY813753.1) 核苷酸序列，利用 Primer Premier 5.0 软件分析并设计引物，分别在上、下游引物的 5'端引入 *Sac* I 和 *Xho* I 限制性内切酶位点。引物序列见表 1，引物由上海华津生物技术有限公司合成。取 1  $\mu$ L 42 d 成虫 cDNA 模板进行 PCR 扩增，PCR 反应条件为：94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min；然后 94  $^{\circ}$ C 30 s，50  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1.5 min，共 30 个循环；循环结束后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2.4 荧光实时定量 PCR 检测 *SjOST48* 在不同时期虫体内的转录水平

分别提取日本血吸虫 7、14、21、35、42 d 及雌雄虫体的总 RNA，去除基因组 DNA 后按 Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent kit 试剂盒操作说明反转录获得日本血吸虫各时期的 cDNA。以日本血吸虫  $\alpha$ -*tublin* 基因为内参，以不同期别的日本血

吸虫 cDNA 为模板，采用 SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> 进行荧光实时定量 PCR。*SjOST48* 和 *Sj $\alpha$ -tublin* 的实时定量 PCR 引物序列见表 1，预期扩增基因片段长度分别为 162 bp 和 213 bp。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成，引物使用浓度为 10 pmol/ $\mu$ L。

### 1.2.5 重组质粒 pET-28a(+)-*SjOST48* 的构建

以日本血吸虫 42 d 成虫 cDNA 作为模板，利用 Ex *Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增编码 *SjOST48* 的 cDNA 序列。PCR 产物经 A 型 DNA 快速纯化试剂盒纯化后，亚克隆到 pMD19-T 载体中并转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。将转化后的大肠杆菌接种于含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，取阳性单克隆测序。将测序正确的重组质粒 pMD19-T-*SjOST48* 和表达载体 pET-28a(+)进行双酶切后，用 T4 DNA 连接酶构建重组表达质粒 pET-28a(+)-*SjOST48*。

### 1.2.6 重组质粒在大肠杆菌中的表达与表达产物的纯化

将构建的重组表达质粒 pET-28a(+)-*SjOST48* 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞中，经 PCR 扩增、序列测定及酶切鉴定正确后，接种到含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37  $^{\circ}$ C 振荡培养至大肠杆菌对数生长期，加入 1 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达。用 8 mol/L 尿素溶解重组蛋白，利

表 1 PCR 和 qPCR 引物

Table 1 Primers used for PCR and qPCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
SjOST48	P1: GAAGAGCTCGAGGACAAGCGGAAAAAT	1 248
	P2: GCGCTCGAGTTATTCACCCCTTTTCT	
RT- <i>Sj<math>\alpha</math>-tublin</i>	P3: CTGATTTTCCATTCGTTTG	213
	P4: GTTGTCTACCATGAAGGCA	
RT- <i>SjOST48</i>	P5: CCAAATACAGTCGGGACAAACAC	162
	P6: CACCTGATTGCCACATAGAACAC	

用 Ni-NTA HisBind Resin 层析柱 (Merk 公司) 在变性条件下分离纯化重组蛋白, 经含不同梯度浓度尿素 (5、4、3、2、1、0 mol/L) 的 PBS 逐步透析复性。

### 1.2.7 动物免疫与免疫血清制备

选择 6-8 周龄 (SPF 级) BALB/c 小鼠 30 只, 随机分成 3 组, 每组 10 只, 分别为免疫组、佐剂对照组和空白对照组。免疫组每次每只注射 100  $\mu$ L 含 206 佐剂和 20  $\mu$ g 纯化的 *SjOST48* 重组蛋白的乳化液; 佐剂对照组每次每只注射 100  $\mu$ L 206 佐剂和 PBS 的乳化液; 空白对照组每次每只注射 100  $\mu$ L 的 PBS。免疫间隔时间为 2 周, 共免疫 3 次。第 3 次免疫后 2 周, 每只小鼠经腹部皮肤贴片攻击感染  $40 \pm 1$  条日本血吸虫尾蚴。分别在免疫前和每次免疫后第 8 天对每组小鼠进行眼静脉采血, 制备免疫血清。

### 1.2.8 重组蛋白的免疫原性分析

将 10  $\mu$ g 重组蛋白 r*SjOST48* 进行 SDS-PAGE 后低温电转移至硝酸纤维素膜上 (130 mA, 1 h), 分别以重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠血清、免疫前健康 BALB/c 小鼠血清室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 羊抗鼠 IgG-HRP 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 用二氨基联苯胺 (DAB) 进行底物显色。

### 1.2.9 *SjOST48* 蛋白的虫体组织定位分析

将日本血吸虫 35 d 虫体  $-20^{\circ}\text{C}$  包埋固定, 制成 8  $\mu$ m 的冰冻切片备用。用丙酮将虫体组织固定 30 min, PBST 洗涤 3 次, 以重组蛋白免疫的小鼠血清室温孵育 2 h; 洗涤 3 次, 以免疫前小鼠血清作为阴性对照。Cy3 标记的羊抗鼠 IgG (H+L) 室温孵育 1 h, 洗涤后用 DAPI (10  $\mu$ g/mL) 溶液室温避光复染 8 min, 置荧光显微镜下观察蛋白的

分布情况。

### 1.2.10 ELISA 检测免疫小鼠血清抗 *SjOST48* 特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平

以纯化的重组蛋白 r*SjOST48* 为抗原, 以 1.2.7 中制备的免疫血清为一抗, 利用间接 ELISA 方法检测 3 组小鼠免疫前后血清中抗 *SjOST48* 特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体效价变化。以包被缓冲液稀释抗原浓度至 10  $\mu$ g/mL, 包被 96 孔 ELISA 板, 每孔 100  $\mu$ L,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 用 PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 150  $\mu$ L PBST-1.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 进行封闭,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次, 被检血清按 1:100 稀释后每孔加入 100  $\mu$ L,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 羊抗小鼠 IgG-HRP (北京碧云天生物技术研究所) 1:1000 稀释, 羊抗小鼠 IgG1-HRP 和 IgG2a-HRP (AbD Serotec, UK) 按 1:4000 稀释后作二抗 (100  $\mu$ L/孔),  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 然后加入可溶性 TMB 底物 100  $\mu$ L, 避光显色 5 min, 加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50  $\mu$ L/孔) 终止反应, 用 BioTek 公司的酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

### 1.2.11 小鼠减虫率和减卵率计算

末次免疫 2 周后, 每只小鼠用腹部贴片法感染尾蚴  $40 \pm 1$  条。攻击尾蚴 6 周后解剖小鼠, 肝门静脉冲洗法收集成虫并记数, 同时收集每只小鼠的肝脏。称取肝组织 0.5 g, 剪碎后加 10 mL 5% NaOH, 组织匀浆器匀浆, 置  $56^{\circ}\text{C}$  水浴消化 15 min, 混匀, 吸取 50  $\mu$ L 的悬液 3 份, 镜检计数肝组织虫卵。按以下公式计算减虫率、肝脏减卵率 (EPG 为平均每克肝组织中所负荷虫卵数)。

减虫率 =  $(1 - \text{免疫组平均虫荷数} / \text{对照组平均虫荷数}) \times 100\%$ ;

肝脏减卵率 = (1 - 免疫组 EPG / 对照组 EPG) × 100%。

### 1.2.12 统计学分析

采用 SPASS 软件对数据进行统计学分析 (Duncan 法)。对有 3 个数值以上的样本数据进行方差分析, 求标准差; 对两组以上数据进行 *t* 检验, 分析各组数据之间的差异是否显著。

## 2 结果

### 2.1 *SjOST48* 基因的克隆及生物信息学分析

参照 NCBI 收录的日本血吸虫 *SJCHGC01743* (gb|AY813753.1) 核苷酸序列设计特异引物, 以日本血吸虫 42 d 成虫 cDNA 为模板 PCR 扩增其 ORF, 得到大小为 1 248 bp 的特异片段 (图 1), 与预期目的片段大小相符, 与参考序列相比存在 5 个核苷酸和 3 个氨基酸的差异。

生物信息学分析结果表明 *SjOST48* 的 ORF 含 1 299 个核苷酸, 由 433 个氨基酸组成, 相对分子量为 48 696.6, 理论等电点为 5.14。该氨基酸序列的 N 端有一个跨膜区和一个信号肽, 存在一个糖基化位点 Asn51。利用 NCBI 的 Blast 软件对该基因编码的氨基酸序列进行同源性搜

索, 结果显示该基因编码蛋白与日本血吸虫 DDOST/OST48 蛋白具有高度同源性, 氨基酸序列相似性高达 98%。推测该蛋白为日本血吸虫 OST48 蛋白, 命名为 *SjOST48*。

### 2.2 *SjOST48* 在不同时期虫体内的转录水平分析

Real time PCR 分析结果表明, *SjOST48* 在日本血吸虫的 7、14、21、28、35 和 42 d 虫体中均有转录, 其中 28 d 虫体转录量最高, 其次是 7 d、21 d、35 d, 14 d 虫体转录量最低。28 d 和 42 d 虫体转录量与 14 d 虫体转录量相比, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 42 d 雌虫的转录量显著高于 42 d 雄虫, 差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 2.3 *SjOST48* 基因在大肠杆菌中的表达及重组蛋白纯化

SDS-PAGE 结果显示, 重组质粒 pET-28a(+)-*SjOST48* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达, 得到一重组蛋白 r*SjOST48*, 重组蛋白分子质量约为 50 kDa, 与预期大小相符 (图 3)。在 IPTG 诱导后 1-4 h 表达量随时间增长而增加, 诱导 4 h 后表达量达到最高并趋于稳定。重组蛋白以包涵体形式存在, 可溶解于 8 mol/L 尿素溶液中。经过 Ni-NTA His Bind Resin 树脂纯化后, 获得了较纯的重组蛋白, 经尿素梯度 PBS 逐步透析进行蛋白复性。

### 2.4 重组蛋白的抗原性分析

将重组蛋白进行 SDS-PAGE, 经电转移至硝酸纤维素膜上, 分别用重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠血清、健康 BALB/c 小鼠血清作为一抗进行 Western blotting 分析, 结果显示用重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠血清作为一抗时, 50 kDa 处有一明显的识别条带, 而阴性对照组在 50 kDa 处未有条带出现, 表明重组蛋白具有良好的抗原性 (图 4)。

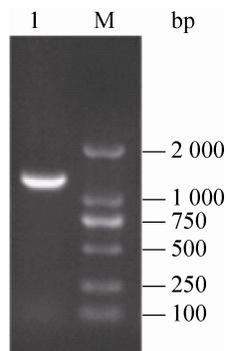


图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of *SjOST48* gene. 1: PCR product of *SjOST48*; M: DL 2 000 DNA ladder.

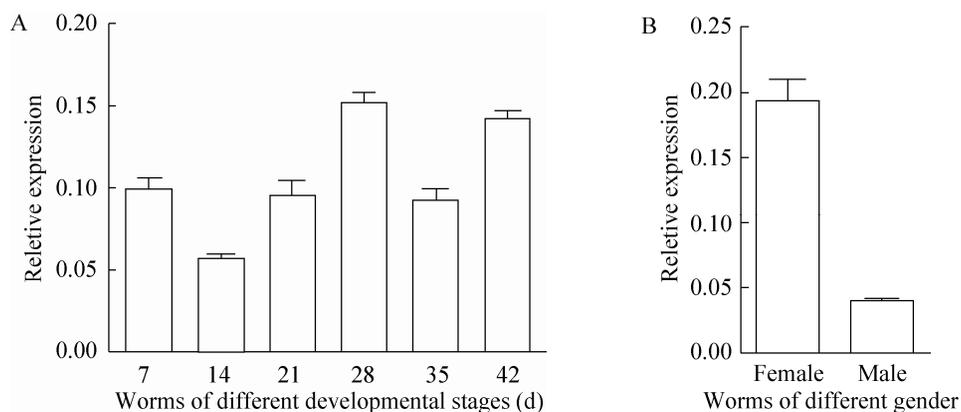


图 2 实时定量 PCR 分析 *SjOST48* 在不同期别 (A) 及不同性别 (B) 虫体中的转录水平差异

Fig. 2 Stage and gender differential expression of *SjOST48* in *S. japonicum*. Expression throughout six stages of *S. japonicum* (A), and expression in male and female adult worms (B) were analyzed by real-time PCR. Data were normalized against amplification of an internal housekeeping control gene  *$\alpha$ -tublin*. The data are the  $\bar{x} \pm s$  of one representative of three independent experiments.

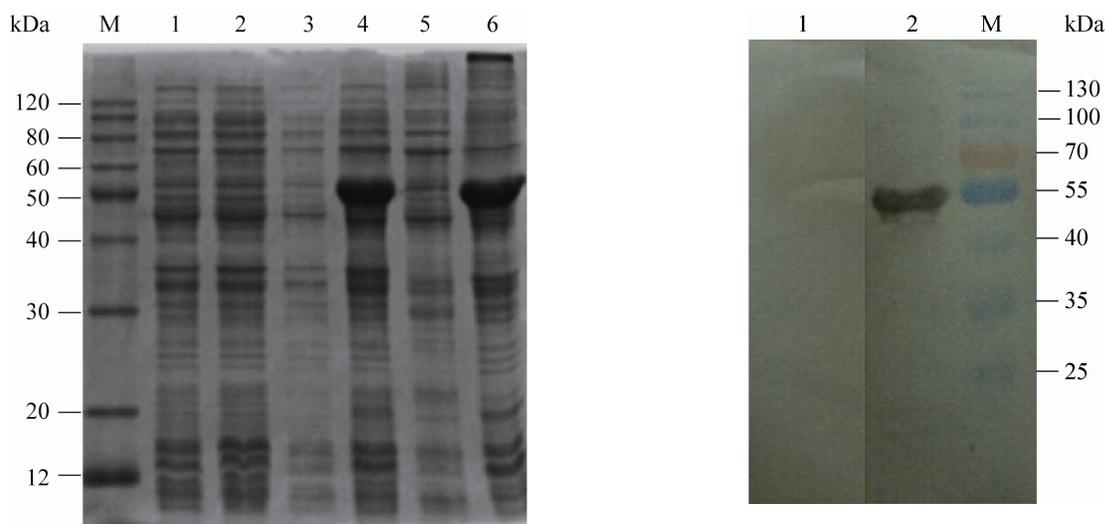


图 3 重组蛋白 rSjOST48 的表达分析

Fig. 3 Expression analysis of the *SjOST48* protein. M: molecular mass markers; 1-2: total extract from BL21 with pET-28a(+) before and after induction with 1 mmol/L IPTG; 3-4: total extract from BL21 with recombinant expression plasmid pET-28a(+)-*SjOST48* before and after induction with 1 mmol/L IPTG; 5-6: extract from soluble and insoluble fractions of BL21 with recombinant expression plasmid pET-28a(+)-*SjOST48*.

图 4 重组蛋白 rSjOST48 的免疫原性分析

Fig. 4 Western blotting analysis of the immunogenicity of rSjOST48. M: protein marker; 1: normal mouse serum; 2: mouse serum against rSjOST48.

## 2.5 rSjOST48 蛋白在日本血吸虫体内的组织定位

在荧光显微镜下可以观察到 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗发出的红色荧光以及 DAPI 复染核酸后发出的蓝色荧光, 实验结果表明,

以免疫前小鼠血清孵育后，未见红色荧光（图 5A），以重组抗原免疫小鼠血清孵育后，在日本血吸虫体被上出现红色荧光，实质部分也有少量红色荧光分布（图 5B），表明 SjOST48 蛋白主要分布于体被，少量分布于实质。

## 2.6 小鼠血清抗 rSjOST48 蛋白特异性抗体的检测

用间接 ELISA 法检测 3 组小鼠免疫前后血清抗 rSjOST48 特异性抗体 IgG、IgG1 和 IgG2a

效价变化，结果显示重组蛋白第一次免疫小鼠后并没有引起小鼠体内特异性 IgG 抗体水平显著升高，二免、三免后特异性抗体水平较 206 佐剂组极显著升高 ( $P<0.01$ )，在攻击血吸虫尾蚴 6 周后其抗体水平达到最大值，与 206 佐剂组相比差异极显著 ( $P<0.01$ )；而佐剂对照组和空白对照组在整个实验过程中抗 rSjOST48 的特异性 IgG 抗体滴度均未出现明显变化（图 6）。同时，对抗 rSjOST48 蛋白特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体

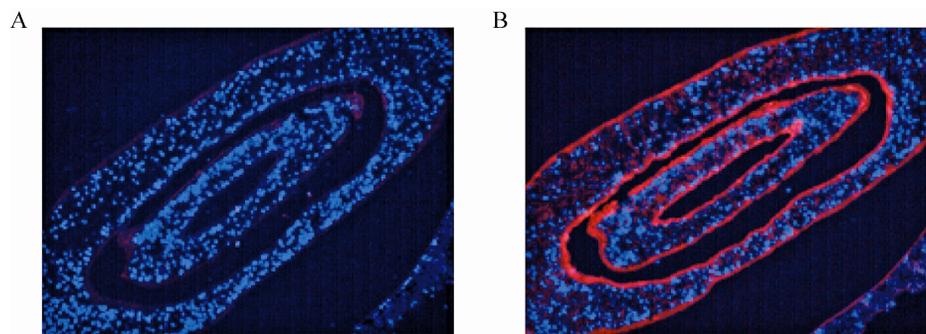


图 5 SjOST48 蛋白在 35 d 日本血吸虫虫体内的定位分析 (10×40)

Fig. 5 Immunolocalization of *SjOST48* in 35 d worm of *S. japonicum*. (A) Normal mouse serum (negative control). (B) Anti-rSjOST48 mouse serum.

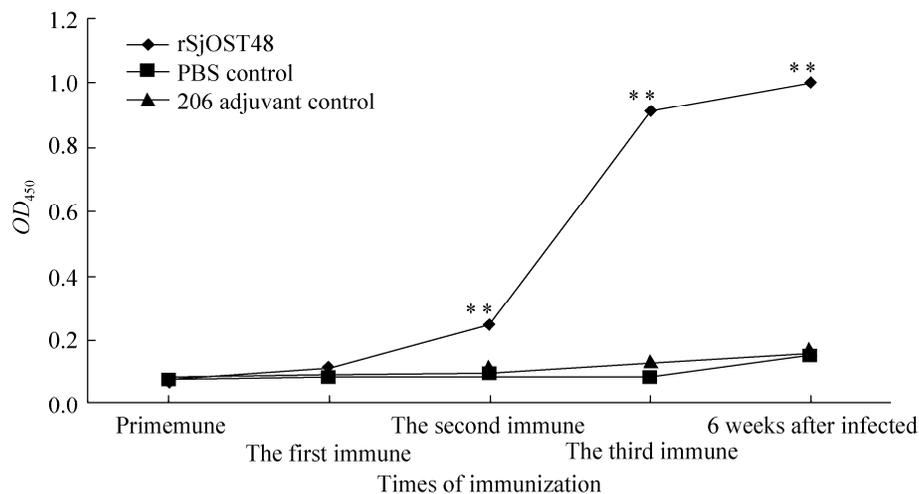


图 6 小鼠血清抗 rSjOST48 特异性 IgG 抗体水平变化

Fig. 6 Kinetics of specific anti-rSjOST48 IgG in testing mice. \*\*( $P<0.01$ ) indicates statistically significant difference compared to the group of mice immunized with ISA 206.

滴度的测定结果表明,随着3次免疫的进行,206佐剂对照组IgG1和IgG2a抗体滴度没有明显变化,但rSjOST48蛋白免疫组IgG1抗体滴度二免后略有升高,而IgG2a特异性抗体在一免、二免后都没有明显变化,三免后IgG1、IgG2a抗体滴度均显著升高,与206佐剂组相比差异极显著( $P<0.01$ ),且随着免疫次数的增加,IgG1/IgG2a比值逐渐增高,二免以后IgG1抗体滴度一直高于IgG2a(表2)。

### 2.7 动物免疫保护效果

动物免疫实验结果表明,重组蛋白rSjOST48诱导产生了部分的免疫保护效果(表3)。和PBS组比较,重组融合蛋白rSjOST48分别诱导小鼠产生了32.62% ( $P<0.05$ )的减虫率以及57.61% ( $P<0.01$ )的肝脏减卵率,而佐剂对照组获得的减虫率和减卵率分别为11.63%和1.51%,差异均不显著。

## 3 讨论

体被具有许多重要的生物功能,被认为是诊断、疫苗和药物的潜在靶点,而其上的表膜蛋白是执行这些功能的分子基础。所以,通过对血吸虫体被表膜蛋白的研究有可能发现新的疫苗和药物靶标,这可为血吸虫病防治提供新思路。实验证明,多种膜蛋白能够诱导宿主产生抗血吸虫感染的保护性免疫反应。例如,属于四跨膜蛋白家族的SmTSP-2能够诱导57%的减虫率和64%的肝脏减卵率<sup>[10]</sup>。定位于血吸虫体被中的Sm29能够诱导51%的减虫率、60%的肠减卵率和50%的肝脏减卵率<sup>[11]</sup>。所以,鉴定并比较日本血吸虫不同发育阶段的体被表膜蛋白有助于进一步了解其免疫逃避机理以及发现新的疫苗候选分子和药物靶标<sup>[12]</sup>。

表2 小鼠血清抗rSjOST48特异性抗体亚型IgG1及IgG2a分析

Table 2 Specific IgG1 and IgG2a antibody level in rSjOST48 vaccinated or adjuvant control mice

Time	Group				
	IgG1		IgG2a		IgG1/IgG2a
	rOST48	ISA 206	rOST48	ISA 206	rOST48
Preimmune	0.069±0.004 2	0.069±0.003 7	0.078±0.000 70	0.063±0.006 0	0.884 6
The 1st immune	0.073±0.003 2	0.070±0.002 0	0.089±0.037	0.073±0.005 2	0.820 2
The 2nd immune	0.12±0.063*	0.069±0.003 0	0.073±0.005 6	0.071±0.005 21	1.643 8
The 3rd immune	1.15±0.019*	0.072±0.005 0	0.53±0.036*	0.094±0.040	2.169 8

Data are expressed as  $\bar{x} \pm s$ . \*\* ( $P<0.01$ ) indicates statistically significant difference compared to the group of mice immunized with ISA 206.

表3 重组蛋白rSjOST48诱导小鼠产生的免疫保护效果

Table 3 Protection induced in mice immunized with rSjOST48

Group	Average worm burden ( $\bar{x} \pm s$ )	Worm reduction rate (%)	<i>P</i> value	Eggs/g liver ( $\bar{x} \pm s$ )	Liver egg reduction rate (%)	<i>P</i> value
PBS	21.15±6.54	-		28 426.42±14 892.75	-	
ISA206	19.0±8.43	11.63	>0.05	27 996.24±9 986.99	1.51	>0.05
rSjOST48	14.25±5.89	32.62*	<0.01	12 049.00±3 218.74	57.61	<0.01

本研究对日本吸血虫体被表膜蛋白 SJCHGC01743 进行了克隆、表达、纯化以及生物信息学分析,结果表明 SJCHGC01743 和日本血吸虫寡糖转移酶 OST48 亚基的同源性最高,达到 98%,命名为 SjOST48。实时定量 PCR 结果显示 *SjOST48* 基因在检测的童虫和成虫各个期别虫体中均有转录,42 d 雌虫的转入量显著高于雄虫,约为雄虫的 4.7 倍,表明 *SjOST48* 是一个雌虫偏向基因,这与之前 Fitzpatrick 等<sup>[13]</sup>和 Moertel 等<sup>[14]</sup>的推测相吻合,*OST48* 是寡糖转移酶复合体中起辅助催化作用的亚基<sup>[15]</sup>,提示雌雄虫的蛋白质糖基化作用可能存在差异。间接免疫荧光定位实验结果表明,SjOST48 蛋白主要分布在日本血吸虫体被上,进一步验证了 Zhang 等<sup>[6]</sup>等在日本血吸虫体被蛋白组学研究中有关此蛋白的质谱鉴定结果。Western blotting 结果显示重组抗原 rSjOST48 可被重组蛋白免疫血清识别,表明 rSjOST48 具有较好的抗原性。以 rSjOST48 重组抗原进行小鼠免疫保护实验,结果显示免疫小鼠成虫荷虫量减少了 32.62%,肝脏虫卵数减少了 57.61%,与空白对照组相比差异极显著,表明 SjOST48 重组抗原在小鼠体内诱导产生了部分免疫保护效果,具有作为日本血吸虫疫苗候选分子的潜能。寡糖转移酶是一个多亚基复合体,OST48 作为其中的一个亚基,只用这一亚基的重组蛋白作为疫苗分子获得的免疫保护效果可能有限,如果同时对 OST 复合体中其他亚基作为疫苗候选分子的潜力进行探讨,研制多价疫苗或多表位重组抗原疫苗,有可能进一步提高候选疫苗的免疫保护效果。免疫应答分析表明,rSjOST48 能诱导小鼠产生较高的特异性 IgG 抗体水平,且随着免疫次数增加,特异性抗体水平显著升高,而空白对照

组和佐剂对照组特异性 IgG 抗体水平一直维持在较低水平,推测重组蛋白在小鼠体内诱导的免疫保护效果可能和其诱导的较高的特异性抗体水平有关。同时,对抗 rSjOST48 蛋白的特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体进行测定,结果显示免疫组小鼠特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体滴度呈上升趋势,二免以后 IgG1 抗体滴度一直高于 IgG2a,且 IgG1/IgG2a 比值逐渐增高。以往研究表明 IgG2a 主要激活 Th1 型辅助细胞,而 IgG1 主要促进 Th0 前体细胞向 Th2 细胞转化<sup>[16]</sup>,在血吸虫感染小鼠模型中,Th1 型免疫应答诱导抗感染免疫保护力,而 Th2 型免疫应答则主要与免疫病理损害有关<sup>[17]</sup>,因此,推测 rSjOST48 可能诱发小鼠以 Th2 型为主、抗日本血吸虫感染的 Th1/Th2 混合型免疫应答。综上所述,*SjOST48* 基因值得作为潜在的日本血吸虫疫苗候选分子深入研究。本文为深入开展 SjOST48 的生物学功能研究及抗血吸虫疫苗候选分子筛选提供了基础。

## REFERENCES

- [1] Li SZ, Zheng H, Gao J, et al. Endemic status of schistosomiasis in People's Republic of China in 2012. *Chin J Schistoso Cont*, 2013, 25(6): 557-563 (in Chinese).  
李石柱, 郑浩, 高婧, 等. 2012 年全国血吸虫病疫情通报. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25(6): 557-563.
- [2] Jones MK, Gobert GN, Zhang LH, et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. *Bioessays*, 2004, 26(7): 752-765.
- [3] Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Med*, 2006, 12(7): 835-840.

- [4] Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm 29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008, 2(10): 1–10.
- [5] Liu F, Lu J, Hu W, et al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS Pathogens*, 2006, 2(4): 268–281.
- [6] Zhang M, Hong Y, Han Y, et al. Proteomic analysis of tegument-exposed proteins of female and male *Schistosoma japonicum* worms. *J Proteome Res*, 2013, 12(11): 5260–5270.
- [7] Kelleher DJ, Karaoglu D, Mandon EC, et al. Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. *Molecular Cell*, 2003, 12(1): 101–111.
- [8] Kelleher DJ, Gilmore R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 2006, 16(4): 47R–62R.
- [9] Wang JH, Tong Y, Zhu Y, et al. The research progress in protein glycosylation. *Pharm Biotechnol*, 2011, 18(1): 77–80 (in Chinese).  
王家红, 董玥, 朱玥, 等. 蛋白质糖基化的研究进展. *药物生物技术*, 2011, 18(1): 77–80.
- [10] Tran MH, Pearson MS, Bethony JM, et al. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Med*, 2006, 12: 835–840.
- [11] Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008, 2(10): e308.
- [12] Qian MB. The structure and function of schistosome tegument and related proteomic study. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2008, 26(6): 466–471 (in Chinese).  
钱门宝. 血吸虫体被的结构功能及其蛋白质组研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26(6): 466–471.
- [13] Fitzpatrick JM, Johnston DA, Williams GW, et al. An oligonucleotide microarray for transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* and its application/use to investigate gender-associated gene expression. *Mol Biochem Parasitol*, 2005, 141(1): 1–13.
- [14] Moertel L, McManus DP, Piva TJ, et al. Oligonucleotide microarray analysis of strain- and gender-associated gene expression in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Mol Cell Probes*, 2006, 20(5): 280–289.
- [15] Roboti P, High S. The oligosaccharyltransferase subunits OST48, DAD1 and KCP2 function as ubiquitous and selective modulators of mammalian N-glycosylation. *J Cell Sci*, 2012, 125(14): 3474–3484.
- [16] Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 1990, 8(1): 303–333.
- [17] Sher A, Coffman RL, Hieny S, et al. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(1): 61–65.

(本文责编 郝丽芳)