

日本血吸虫童虫裂解物对东方田鼠肝脏 T7 噬菌体展示 cDNA 文库的筛选及阳性克隆分析

贾人初^{1,2}, 孙毅¹, 刘金明¹, 傅志强¹, 苑纯秀¹, 石耀军¹, 陆珂¹, 孙焕¹, 李浩¹, 金亚美¹, 林矫矫¹

1 中国农业科学院上海兽医研究所国家防治动物血吸虫病专业实验室, 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200232

2 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘 要: 东方田鼠对血吸虫具有天然抗性。为筛选和分析东方田鼠抗血吸虫抗性相关基因, 以日本血吸虫童虫可溶性裂解物为探针, 筛选东方田鼠肝脏噬菌体展示 cDNA 文库。经三轮筛选, 特异性噬菌体得到有效富集(375 倍)。随机挑取 92 个克隆进行序列测定, 获得了 19 条有效 EST 序列。其中 13 个条 EST 序列与已知基因或表达序列标签同源, 6 个 EST 序列与已知基因或表达序列标签均无同源性, 为新的表达序列标签。将 19 个 EST 序列的阳性噬菌体克隆和血吸虫童虫共培养, 其中 4 号(GenBank Accession No.: EW968294)、13 号(GenBank Accession No.: EW968303)、14 号(GenBank Accession No.: EW968304)、15 号(GenBank Accession No.: EW968305)、18 号(GenBank Accession No.: EW968308)克隆均诱导了显著的杀虫效果。综合生物信息学分析结果及体外杀伤试验结果, 编码 CASP8 和 FADD 类似性细胞程序性死亡调节蛋白、 α -2-HS-糖蛋白、M4 蛋白、具有 R3H 结构域的一种 mRNA 结合蛋白以及三种未知蛋白的编码基因(14、15、18 号克隆)可能是东方田鼠抗血吸虫病抗性相关基因。为进一步研究东方田鼠抗血吸虫机理奠定了基础。

关键词: 日本血吸虫, 东方田鼠, 肝脏, 噬菌体展示 cDNA 文库, 抗性基因

Screening of T7 Phage-display cDNA Library from Liver of *Microtus fortis* with Extracts of *Schistosomulum* and Characterization of the Positive Clones

Renchu Jia^{1,2}, Yi Sun¹, Jinming Liu¹, Zhiqiang Fu¹, Chunxiu Yuan¹, Yaojun Shi¹, Ke Lu¹, Huan Sun¹, Hao Li¹, Yamei Jin¹, and Jiaojiao Lin¹

1 National Laboratory of Animal Schistosomiasis Control, Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200232, China

2 College of Life and Environmental Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: *Microtus fortis* is naturally resistant to *Schistosoma japonicum*. In order to find schistosome-resistance-related genes of *Microtus fortis*, a T7 phage-display cDNA library from liver of *Microtus fortis* was screened with the soluble lysate of schistosomula. The specific phages were enriched 375-fold after 3 rounds of biopanning. Ninety-two positive clones picked at random were

Received: September 19, 2007; **Accepted:** November 16, 2007

Supported by: the Scientific Research Project from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 054909002) and the National Resource Platform Project from Ministry of Science and Technology (No. 2005DKA21104).

Corresponding author: Jinming Liu. E-mail: jimyliu48@126.com

上海市科学技术委员会科研计划项目(No. 054909002)和科技部自然资源平台项目(No. 2005DKA21104)资助。

sequenced and 19 ESTs including 6 unreported genes were obtained. Compared with the negative phage clone control, five positive clones, No.4 (GenBank Accession No.: EW968294), No.13 (GenBank Accession No.: EW968303), No.14 (GenBank Accession No.: EW968304), No.15 (GenBank Accession No.: EW968305) and No.18 (GenBank Accession No.: EW968308) could induce significantly higher schistosomula mortality rate when co-cultivated with schistosomula. According to the function analysis and the schistosomula-killing effect in vitro, the genes encoding CASP8 and FADD-like apoptosis regulator isoform protein, alpha-2-HS-glycoprotein, M4 protein, R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) isoform 2 and 3 previously unreported proteins (No.14, No.15 and No.18) obtained here, were schistosomiasis-resistance-related genes of *Microtus fortis*.

Keywords: *Schistosoma japonicum*, *Microtus fortis*, liver, T7 phage-display cDNA library, schistosomiasis-resistance-related gene

血吸虫病(Schistosomiasis)是一种危害严重的人兽共患病。据世界卫生组织估计,在世界范围内有6.5亿人受到威胁,约1.93亿人感染血吸虫病^[1]。其中,日本血吸虫病主要流行于中国和其他东南亚国家,仅在中国就有约84万人感染,6500万人受到威胁^[2]。已报道我国有39种哺乳动物能感染日本血吸虫,但东方田鼠(*Microtus fortis*)是唯一一种通过试验验证对日本血吸虫具有天然抗性、感染血吸虫后不致病的哺乳动物^[3,4]。迄今为止,关于东方田鼠对日本血吸虫抗性机制研究主要集中于一些免疫学研究^[5-7],其抗病机理仍不清楚。由于肝脏是东方田鼠杀灭血吸虫的重要场所^[3],为深入探索东方田鼠抑制其体内日本血吸虫发育并杀灭日本血吸虫的分子机理,发现东方田鼠抗血吸虫抗性相关基因,我们用日本血吸虫肝期童虫可溶性裂解产物对本研究室构建的东方田鼠肝脏 T7 噬菌体展示文库进行了筛选,对筛选获得的部分阳性克隆进行了序列测定和体外杀伤血吸虫童虫效果观察。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 东方田鼠肝脏 T7 噬菌体展示 cDNA 文库

东方田鼠肝脏 T7 噬菌体展示 cDNA 文库由本实验室构建,其库容量为 1.3×10^7 pfu,扩增后文库滴度为 1.8×10^{11} pfu/mL。将扩增后文库稀释至 1×10^{10} pfu/mL 待用。

1.1.2 主要试剂

RPMI₁₆₄₀ 培养基购自 GIBCO 公司,按产品说明书配制,为不完全培养基,添加 20% 犊牛血清后为完全培养基。T7 载体引物序列由 Novagen 公司的 T7 Select 10-3b Cloning Kit 说明书提供,上海赛百盛公司合成,上游引物序列为 5'-GGAGCTGTCGT ATTCCAGTC-3',下游引物序列为 5'-AACCCCTC

AAGACCCGTTTA-3'。Taq DNA 聚合酶为上海生工生物工程有限公司产品。

1.1.3 菌种与实验动物

T7 噬菌体宿主菌 BLT5403 购自 Novagen 公司。日本血吸虫安徽株尾蚴由本所钉螺室提供。新西兰白兔(2.5~3.0 kg)购自上海罗泾飞达实验动物饲养场。

1.2 方法

1.2.1 日本血吸虫肝期童虫可溶性裂解产物的制备

以 7000~8000 条日本血吸虫尾蚴按腹部贴片法感染新西兰白兔,于感染后 13 d 剖杀,用肝门静脉灌注法收集肝期童虫,用 PBS 反复冲洗后,于液氮中充分研磨至粉状,转移至 1.5 mL 离心管,加入 500 μ L PBS 缓冲液,反复冻融 3 次,超声 15 min (80 Hz, 间隔 1 s), 10 000 g 离心 30 min, 取上清,紫外吸收法测蛋白浓度, -20°C 保存备用。

1.2.2 噬菌体展示文库的筛选

日本血吸虫童虫可溶性裂解物用 TBS 稀释浓度至 10 μ g/mL, 以 100 μ L/孔包被酶联板, 4°C 过夜, 1 \times TBS 洗 3 次, 以 200 μ L 5% 牛血清白蛋白封闭, 4°C 过夜, 去离子水洗 5 次, 每孔加入滴度为 1×10^{10} pfu/mL 的噬菌体文库 100 μ L, 室温孵育 30 min, 1 \times TBST 洗 5 次, 每孔加入 4 mol/L 尿素 200 μ L, 室温孵育 15 min 洗脱, 收集合并洗脱液, 按下述方法测定洗脱液中噬菌体滴度, 用 PCR 鉴定阳性克隆外源片段大小分布以检测筛选情况。将洗脱液用宿主菌 BLT5403 扩增, 并按上述方法进行下一轮筛选。共进行 3 轮筛选。

1.2.3 噬菌体滴度测定

将宿主菌 BLT5403 接种于 M9LB 培养液, 37°C 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值为 1。取 10 μ L 洗脱液或扩增后的噬菌体上清, 按 1:100 比例进行梯度稀释, 每个梯度的稀释产物各取 100 μ L, 分别加入到 250 μ L 上述培养菌液, 混匀, 37°C 作用 10~20 min, 与顶层

琼脂混合后铺于 LB 平板上层, 37°C 倒置培养 3~4 h, 计数平板上噬菌斑数, 按下列公式计算滴度。计算公式为: 滴度 = Σ (各平板的噬菌斑个数 \times 该平板的稀释倍数 $\times 10$) / 平板数。

1.2.4 阳性克隆的 PCR 鉴定及序列测定

直接从每轮筛选的洗脱液滴度测定板上挑取噬菌斑, 以 T7 载体引物进行 PCR 扩增, 鉴定阳性克隆外源片段大小分布以检测筛选情况。第三轮筛选后用平板扩增, 挑取噬菌斑, 用 T7 载体引物以 PCR 扩增外源片段, 由 Invitrogen 公司测定 PCR 产物的核苷酸序列。PCR 应条件为: 80°C 预变性, 94°C 变性 50 s、50°C 退火 1 min、72°C 延伸 1 min, 35 个循环后, 72°C 延伸 6 min。取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 序列分析及蛋白功能预测

将测序所得序列用 DNAMAN 软件进行聚类分析, 获取非重复序列, 在美国国立卫生研究院(NIH)的 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 中进行同源序列查找。利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) 及 <http://www.expasy.org> 在线预测蛋白功能。

1.2.6 阳性克隆对日本血吸虫童虫的体外杀伤实验

根据序列分析结果, 取不同序列的阳性克隆分别加入 BLT5403 菌液进行扩增, 取上清, 用 PEG/NaCl (20% 的 PEG-8000, 2.5 mol/L NaCl) 纯化单克隆噬菌体颗粒并稀释至 10^9 pfu/mL。按文献方法^[5]用尾蚴制备童虫, 用 RPMI1640 完全培养基调整童虫浓度, 加入 96 孔细胞培养板 (每孔 100 μ L, 含 50~70 条童虫), 于 5% CO₂ 37°C 培养过夜, 次日加入 10 μ L 纯化的单克隆噬菌体, 每份样品设 3 个重复孔, 同时设空白对照 (加入 RPMI 完全培养基) 和阴性噬菌体对照 (加入 PCR 鉴定时未扩增到外源片段的噬菌体), 连续培养 96 h, 每 24 h 观测计数 1 次, 计算童虫死亡率。童虫死亡的判定标准见参考文献^[7]。

2 结果

2.1 噬菌体展示文库的筛选

用日本血吸虫 13 日龄肝期童虫的可溶性裂解物对文库进行筛选, 经三轮亲和筛选后, 洗脱的噬菌体由第一轮的 3.6×10^3 增加到第三轮的 2.1×10^6 , 富集了 375 倍 (表 1); PCR 检测的结果显示, 随着筛

选次数的增加, 扩增的外源片段大小由分散逐步集中。上述结果提示, 文库中没有亲和力和低亲和力的噬菌体已被成功去除。

表 1 各轮筛选的噬菌体的回收率 (pfu, %)
Table 1 Recovery rate of phage clones during biopanning (pfu, %)

Rounds of biopanning	Phages added (pfu)	Phages eluted (pfu)	Yield rate /%
1	5×10^9	5.6×10^3	1.1×10^{-4}
2	5×10^9	7.9×10^4	1.6×10^{-3}
3	5×10^9	2.1×10^6	4.2×10^{-2}

2.2 阳性克隆的 PCR 鉴定及序列测定

随机挑取第三轮筛选铺板后的 100 个克隆进行 DNA 序列测定, 获得了 92 个克隆的插入片段序列。对测序结果用 DNAMAN 软件进行聚类分析, 得到了 21 条非重复序列, 分别记为克隆 1-21, 其 PCR 鉴定结果见图 1。其中 1 号克隆出现频率最高, 为 16 次, 其次依次为: 8 号克隆出现 10 次; 12、15 号克隆出现 8 次; 10、13 号克隆出现 6 次; 4、14、17 号克隆出现 5 次; 6 号克隆出现 4 次; 5、9、11 号克隆出现 3 次; 2、3 号克隆出现 2 次; 其他克隆均出现 1 次。

利用 BLAST 软件搜索这 21 条 ESTs 在 GenBank 中的同源序列, 利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) 及 <http://www.expasy.org> 在线收询其编码蛋白的功能。结果有 13 条序列找到了与其同源的鼠源蛋白。其中包括 5 种酶蛋白: 氢哌啶羧酸氧化酶 (1 号克隆)、细胞色素 C 氧化酶 (3 号克隆)、alpha-2-HS-glycoprotein (6 号克隆)、脂酰辅酶 A 脱氢酶 (7 号克隆)、DNA 拓扑异构酶 II (9 号克隆); 5 种结合蛋白: 维生素 D 结合蛋白 (2 号克隆)、具有 R3H 结构域的一种 mRNA 结合蛋白 (4 号克隆)、载脂蛋白 E (5 号克隆)、多聚胞嘧啶结合蛋白 (8 号克隆)、M4 蛋白 (12 号克隆); 2 种信号转导蛋白: 整合素 alpha 8 (10 号克隆)、CASP8 和 FADD 类似性细胞程序性死亡调节蛋白 (13 号克隆); 1 种细胞组成蛋白: 核糖体蛋白 S18 (11 号克隆)。有 6 条序列未见明显的同源蛋白 (14 号~19 号克隆)。另外的两条序列 (20 号、21 号克隆) 也找到了同源序列, 但这两个基因片段在噬菌体中是反向或非对码展示, 也就是展示的蛋白并非 GenBank 登录基因的表达蛋白。有关 21 条序列的生物信息学分析及在 GenBank 的登陆号详见表 2。

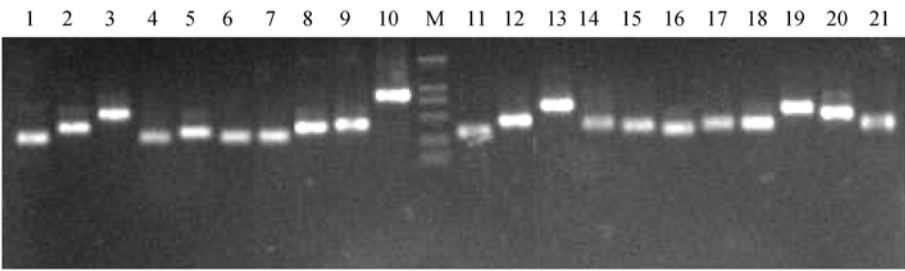


图 1 阳性克隆的插入片段 PCR 结果
Fig. 1 PCR products of positive clones screened from the T7 phage display library
M: DL2000 marker; 1~21: the PCR products of positive clones

表 2 肝噬菌体展示 cDNA 文库筛选阳性克隆的生物信息学分析
Table 2 Bioinformation analysis of positive clones

Serial number	GenBank Accession No.	NCBI	GO term annotation		
		Definition	Process	Function	Component
1	EW968291	pipecolic acid oxidase [<i>Rattus norvegicus</i>]	electron transport	oxidoreductase activity	
2	EW968292	vitamin D-binding protein [<i>Mus musculus</i>]	transport	carrier activity	extracellular space
3	EW968293	cytochrome c oxidase subunit I [<i>Cratogeomys fulvescens</i>]	electron transport	cytochrome-c oxidase activity	Membrane
4	EW968294	similar to R3H domain (binds single-stranded nucleic acids) isoform 2 [<i>Rattus norvegicus</i>]		nucleic acid binding	
5	EW968295	Apolipoprotein E [<i>Rattus norvegicus</i>]	lipid transport	lipid binding	extracellular region
6	EW968296	alpha-2-HS-glycoprotein [<i>Rattus norvegicus</i>]		kinase inhibitor activity	
7	EW968297	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase medium chain [<i>Mus musculus</i>]	electron transport	acyl-CoA dehydrogenase activity	
8	EW968298	poly (rC) binding protein [<i>Mus musculus</i>]	mRNA metabolic process	nucleic acid binding	
9	EW968299	topoisomerase (DNA) II beta [<i>Mus musculus</i>]	DNA topological change	DNA topoisomerase activity	chromosome
10	EW968300	integrin alpha 8 [<i>Mus musculus</i>]	Integrin-mediated signaling pathway	receptor activity	integrin complex
11	EW968301	ribosomal protein S18 [<i>Mus musculus</i>]	translation	structural constituent of ribosome	ribosome
12	EW968302	M4 protein [<i>Rattus norvegicus</i>].		nucleic acid binding	
13	EW968303	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator isoform 1 [<i>Mus musculus</i>].	Signal transduction	regulation of apoptosis	membrane
14	EW968304	No find			
15	EW968305	No find			
16	EW968306	No find			
17	EW968307	No find			
18	EW968308	No find			
19	EW968309	No find			
20	EW968310	similar to Intelectin-1a precursor (Intestinal lactoferrin receptor) (Galactofuranose-binding lectin) [<i>Musmusculus</i>]			
21	EW968311	unnamed protein product [<i>Mus musculus</i>]			

2.4 体外杀伤实验结果

将这 21 个阳性噬菌体克隆分别与血吸虫童虫共培养, 24~96 h 的童虫死亡率见表 3。1、5、14、15、18、19 号克隆在共培养 24 h 诱导的童虫死亡率, 4、13、14、15、18 号克隆在共培养 48 h 诱导的童虫死亡率, 4、12、13、14、15、16、18 号克隆在共

培养 72 h 诱导的童虫死亡率和 3、4、6、12、13、14、15、18、19 号克隆在共培养 96 h 诱导的童虫死亡率均明显高于阴性噬菌体在相应时段诱导的童虫死亡率($P<0.05$)。在上述 4 个时间段内有 3 个时间段的童虫死亡率显著高于阴性噬菌体的噬菌体克隆有 4、13、14、15、18 号克隆。

表 3 筛选获得部分阳性克隆的噬菌体纯化产物对日本童虫的体外杀伤效果

Table 3 Killing schistosomula effect *in vitro* of some purified positive clones screened from the T7 phage display library

Serial number	Mortality rate/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	9.79 ± 1.25	13.61 ± 1.73	21.85 ± 2.23	28.87 ± 2.78
2	8.16 ± 2.16	12.79 ± 2.80	18.94 ± 2.56	23.64 ± 2.65
3	6.43 ± 2.26	13.17 ± 2.99	20.80 ± 4.22	29.11 ± 2.61
4	6.49 ± 1.76	15.92 ± 1.06	23.65 ± 1.75	34.58 ± 2.27
5	10.04 ± 1.75	14.52 ± 2.04	21.91 ± 1.86	27.78 ± 1.42
6	8.20 ± 2.05	13.12 ± 2.21	24.94 ± 2.84	33.21 ± 3.25
7	5.43 ± 2.08	13.84 ± 2.78	18.39 ± 2.08	22.80 ± 2.96
8	8.60 ± 2.22	11.65 ± 2.54	19.69 ± 1.20	27.29 ± 2.98
9	6.26 ± 0.81	13.20 ± 2.32	18.77 ± 1.95	26.70 ± 3.61
10	6.53 ± 2.81	13.16 ± 1.23	17.62 ± 1.76	23.56 ± 1.54
11	7.10 ± 1.98	12.68 ± 4.10	19.71 ± 5.58	25.28 ± 6.81
12	6.26 ± 0.64	15.14 ± 2.43	24.73 ± 0.75	36.52 ± 1.55
13	6.68 ± 0.89	18.11 ± 1.33	29.11 ± 2.39	37.31 ± 3.54
14	11.14 ± 2.15	18.85 ± 2.79	27.50 ± 3.34	35.76 ± 4.51
15	9.28 ± 2.19	16.83 ± 2.43	27.49 ± 3.16	32.53 ± 3.39
16	8.69 ± 1.93	15.93 ± 2.48	22.24 ± 1.89	28.14 ± 1.50
17	6.14 ± 1.17	15.43 ± 2.25	21.64 ± 2.82	25.82 ± 3.24
18	10.07 ± 2.09	17.38 ± 0.97	23.47 ± 1.53	30.34 ± 2.89
19	9.13 ± 0.73	13.05 ± 1.49	20.46 ± 1.06	28.64 ± 1.90
20	7.18 ± 1.55	13.38 ± 3.99	19.69 ± 2.77	22.83 ± 2.41
21	7.23 ± 1.41	12.71 ± 1.40	20.05 ± 1.22	27.19 ± 3.19
Negative phage	5.55 ± 1.24	11.14 ± 2.02	17.60 ± 2.03	23.66 ± 2.16
Blank control	4.40 ± 1.32	9.59 ± 0.89	13.88 ± 0.91	19.08 ± 1.63

3 讨论

东方田鼠是我国血吸虫病流行区洞庭湖广泛分布的一个优势鼠种。近年来的研究表明,日本血吸虫流行区野生东方田鼠(洞庭湖种群)^[3]、非日本血吸虫流行区野生东方田鼠(宁夏指名亚种)^[8]和室内繁殖的东方田鼠^[9]均具有抗日本血吸虫能力,提示东方田鼠对血吸虫的抗性是可遗传的,东方田鼠可能具有抗日本血吸虫的相关基因。但迄今为止,在东方田鼠抗血吸虫相关基因的研究方面,除秦志强等^[10]通过构建东方田鼠骨髓基因池筛选到几个对日本血吸虫有抑制作用的基因,以及孙军等^[11]利用基因表达芯片分析技术发现了丝氨酸蛋白酶抑制剂、胰岛素样生长因子(IGF-I)、溶菌酶和组织蛋白酶等非特异性免疫相关基因和 CD74、MHCI、MHCII 等特异性免疫相关基因的表达差异可能与其抗血吸虫病相关外,进展甚为缓慢。

噬菌体展示技术是一种可以将目的基因与其表达产物在同一噬菌体颗粒上建立——对应关系的技术,它实现了基因型和表型的结合,可以通过受体与配体结合的方式,以简单的亲和淘洗方法筛选到与任何靶标相结合的分子^[12]。童虫是血吸虫在终宿主体内发育的早期阶段,也是其个体发育、性别分化的关键性阶段。童虫虫体小,较成虫脆弱,对宿主的免疫效应机制特别敏感,容易受到免疫攻击。在东方田鼠体内,肺脏、肝脏是东方田鼠杀灭血吸虫的主要场所,肺期童虫和肝期童虫是日本血吸虫在东方田鼠体内消亡的主要阶段。充分利用噬菌体展示技术的特点,用血吸虫童虫虫体裂解物对东方田鼠肝脏、肺脏及其它组织的噬菌体展示 cDNA 文库进行亲和淘洗,可能是探索 and 发现东方田鼠抗血吸虫抗性基因的有效途径。

本研究用日本血吸虫童虫可溶性裂解物对东方田鼠肝脏噬菌体展示 cDNA 文库进行筛选,获得了

19 个有效阳性噬菌体克隆。其中有 68%(13 个 ESTs) 与已知基因和表达序列标签同源, 32%(6 个 ESTs) 与已知基因和表达序列标签无同源性, 为新的表达序列标签, 其插入 cDNA 片段大小在 300~800 bp 之间。

将获得的噬菌体克隆纯化后与童虫共培养, 所有克隆诱导的童虫死亡率都比阴性噬菌体高, 其中 4、13、14、15、18 号克隆在共培养 24 h、48 h、72 h、96 h 时间段中的三个时间段诱导的童虫死亡率均显著高于阴性噬菌体诱导的童虫死亡率。但所有克隆对血吸虫童虫的杀伤效果均不及东方田鼠血清^[7], 可能是因为东方田鼠的天然抗性是多因子作用的结果, 而本文所获得的噬菌体克隆展示的蛋白为其中的某一单因子, 且展示的并非完整蛋白, 只是某一或某些关键功能域, 故而只诱发了有限的杀伤效果。

结合生物信息学分析与体外杀伤实验, 我们认为以下几个基因可以作为今后研究东方田鼠抗血吸虫抗性相关基因的候选分子: 1. CASP8 和 FADD 类似性细胞程序性死亡调节蛋白(13 号克隆), 在共培养 96 h 诱导的童虫死亡率高达 37.31%, 该蛋白是一种信号蛋白, 传递细胞凋亡信息。一般来讲该类蛋白都是识别本体组织中的特定老化或病理细胞表面递呈的编程性凋亡蛋白受体, 并启动胞内一系列信号传导, 最终导致细胞死亡。推测该蛋白在东方田鼠抗血吸虫中的作用可能是启动血吸虫细胞编程性死亡。2. alpha-2-HS-glycoprotein, 在共培养 96 h 诱导的童虫死亡率为 33.21%, 该蛋白为糖基化蛋白, 是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 能够降解带有半胱氨酸功能表位的蛋白酶, 对于哺乳动物, 在病理条件下(如局部的炎症)该蛋白一般会有上调趋势, 另外在抗原递呈方面也有其作用, 对于一些寄生虫该蛋白也在抗应激方面起到关键的作用, 但未见该蛋白在日本血吸虫研究方面的相关报道; 3. 两种 mRNA 结合蛋白, 分别是 M4 蛋白和具有 R3H 结构域的一种 mRNA 结合蛋白, 杀伤效果分别为 36.52% 和 34.58%。这类蛋白主要通过结合相应的 mRNA 序列位点, 控制反转录的进行, 从而阻断或促进某类生理活性蛋白的合成。但该类蛋白一般是胞内甚至核内作用蛋白, 如何跨膜进入其他细胞并最终产生作用是今后需要研究的。

六个未见明显同源序列的 ESTs 中, 14、15、18

号噬菌体克隆的杀伤效果均非常显著, 其展示的蛋白也有可能是东方田鼠特异的抗血吸虫相关因子, 今后可用 RACE 的方法从东方田鼠基因组文库中钓出相关基因, 获得全长基因后可进一步分析其功能。

REFERENCES

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, *et al.* The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*, 2000, **77**(1): 41-51.
- [2] Hao Y, Wu XH, Xia G, *et al.* Schistosomiasis situation in People's Republic of China in 2004. *Chin J Schisto Control*, 2005, **17**(6): 401-404.
郝阳, 吴晓华, 夏刚, 等. 2004 年全国血吸虫病疫情通报. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, **17**(6): 401-404.
- [3] Li H, He YY, Lin JJ, *et al.* The observation on *Microtus fortis* resistant phenomemon to schistosomiasis. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology*, 2000, **8**(2): 12-15.
李浩, 何艳燕, 林矫矫, 等. 东方田鼠抗日本血吸虫现象的观察. 中国兽医寄生虫病, 2000, **8**(2): 12-15.
- [4] Li H, He YY, Lin BF, *et al.* Preliminary study of the experiment on *Microtus fortis* repeat infection to shichistosoma japonicum. *Chinese Journal of Veterinary Parasitology*, 2001, **9**(3): 115-117.
李浩, 何艳燕, 林邦发, 等. 东方田鼠重复感染日本血吸虫试验初步研究. 中国兽医寄生虫病, 2001, **9**(3): 115-117.
- [5] He YK, Luo XS, Zhang XY, *et al.* Immunological characteristics of natural resistance in *Microtus fortis* to infection owith *Schistosoma japonicum*. *Chin Med J (Engl)*, 1999, **112**(7): 649-654.
- [6] Jiang SF, Wei MX, Lin JJ, *et al.* Preliminary study on natural antibodies and IgG subclasses against *schistosoma japonicum* in *Microtus fortis*. *Chin J Schisto Control*, 2001, **13**(1): 1-3.
蒋守富, 魏梅雄, 林矫矫, 等. 东方田鼠天然抗日本血吸虫抗体及 IgG 亚类的初步研究. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, **13**(1): 1-3.
- [7] Ouyang Li, Yi XY, Zeng XF, *et al.* Killing effects of serum from *Microtus fortis* and its different fractions *in vitro* to *Schistosoma japonicum* schistosomula. *Chin J Schisto Control*, 2003, **15**(2): 98-101.
欧阳理, 易新兀, 曾宪芳, 等. 东方田鼠血清及其不同部分对日本血吸虫童虫的体外杀伤作用. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, **15**(2): 98-101.
- [8] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUGinitiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **44**(2): 283-292.
- [9] He HB, Zuo JJ, Liu BX, *et al.* Comparison of laboratory

breeding *Microtus fortis* with wild on infection to schistosoma japonicum. *Journal of Practical Parasitic Disease*. 1995, **3**(21): 72–74.

贺宏斌, 左家铮, 刘伯香, 等. 室内繁殖和野生东方田鼠感染日本血吸虫比较. *实用寄生虫病杂志*, 1995, **3**(21): 72–74.

- [10] Qin ZQ, Hu WX, Wu GJ, *et al.* Construction of gene pool of *Microtus fortis* and screening resistance-associated genes to infection of *Schistosoma japonicum*. *Life Science Research*, 2004, **8**(4): 333–338.

秦志强, 胡维新, 邬国军, 等. 东方田鼠骨髓基因池的构建及抗日本血吸虫抗性相关基因的筛选. *生命科学* 研究, 2004, **8**(4): 333–338.

- [11] Sun Jun, Lin JJ, Cheng GF, *et al.* Gene difference expression between mice and *Microtus fortis* infected with *Schistosoma japonicum* using cDNA microarrays. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*. 2004, **40**: 532–537.
- [12] Smith GP, Petrenko VA. Phage display. *Chem Rev*, 1997, **97**: 391–410.

爱思唯尔生物医学工程专业图书推荐



ISBN: 0123708699

ISBN-13: 9780123708694

Publication Date: 03/25/2008

Tissue Engineering

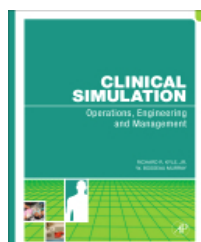
By van Blitterswijk *et al*

Product Type: Hardcover

Price: \$110.00

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

Tissue engineering is one of the fastest growing fields in technology and medicine. In the United States alone, over half-a-trillion dollars are spent each year to care for patients who suffer from tissue loss or dysfunction. This important science is enhancing lives by providing replacement human parts, from heart valves and skin to nerves, muscle, cartilage and liver tissue. As such, large amounts of money are being invested in this developing field as it grows as an area of study. *Tissue Engineering* is the most comprehensive text available for upper level undergraduate and graduate level courses in tissue engineering within bioengineering, medical and research departments. It surpasses other books that merely provide a collection of research and protocols and presents an insightful examination of the different aspects of tissue engineering. Full-color throughout, extensive examples, and ancillary material optimize the usefulness of this book for students and professors.



ISBN: 0123725313

ISBN-13: 9780123725318

Publication Date: 12/05/2007

Clinical Simulation

By Kyle and Murray

Product Type: Hardcover

Price: \$99.95

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

Simulation facilities are invaluable for training in medicine and clinical education, biomedical engineering and life sciences. They allow the practice of prevention, containment, treatment, and procedure in a risk-free setting. This book is a practical guide and reference to the latest technology, operations and opportunities presented by clinical simulation. It shows how to develop and make efficient use of resources, and provides hands-on information to those tasked with setting up and delivering simulation facilities for medical, clinical and related purposes, and the development and delivery of simulation-based education programs.



ISBN: 0121602400

ISBN-13: 9780121602406

Publication Date: 11/26/2007

Introduction to Modeling in Physiology and Medicine

By Cobelli and Carson

Product Type: Hardcover

Price: \$99.95

Subject Area: Engineering / Electronics - Biomedical Engineering

This unified modeling textbook for students of biomedical engineering provides a complete course text on the foundations, theory and practice of modeling and simulation in physiology and medicine. It is dedicated to the needs of biomedical engineering and clinical students, supported by applied BME applications and examples.

以上为爱思唯尔经典生物医学工程图书信息, 如果对您的研究工作有所帮助, 请向所在图书馆推荐。谢谢!