

日本血吸虫 SjIrV1 的基因特性及免疫保护效果

魏梅梅^{1,2}, 熊雅念¹, 洪炆¹, 黄莉妮¹, 孟培培¹, 艾德宙¹, 张旻¹, 傅志强¹, 刘升发², 林矫矫¹

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实验室, 上海 200241

2 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005

魏梅梅, 熊雅念, 洪炆, 等. 日本血吸虫 SjIrV1 的基因特性及免疫保护效果. 生物工程学报, 2013, 29(7): 891-903.

Wei MM, Xiong YN, Hong Y, et al. Characterization and immunoprotective effect of SjIrV1, a 66 kDa calcium-binding protein from *Schistosoma japonicum*. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 891-903.

摘要: 钙结合蛋白是日本血吸虫生长发育不可缺少的蛋白, 具有非常广泛而重要的功能。在课题组日本血吸虫体被表膜蛋白研究基础上, 利用 PCR 技术克隆了中国大陆株日本血吸虫 66 kDa 钙结合蛋白 (*SjIrV1*) 编码基因的 cDNA 序列, BLAST 分析与菲律宾株日本血吸虫 *SjIrV1* cDNA 编码序列一致, 荧光定量 PCR 分析表明该基因在童虫和成虫期不同发育阶段均有表达, 其中在 35 d 和 42 d 成虫中表达量较高, 在 42 d 雌虫中该基因表达水平远高于 42 d 雄虫。构建重组表达质粒 pET28a (+)-*SjIrV1*, 在大肠杆菌中成功诱导表达, 重组蛋白主要以可溶性形式存在, 通过高效液相色谱法 (RP-HPLC) 以及串联质谱法 (MS/MS) 鉴定所获蛋白为目的蛋白 SjIrV1。蛋白质印迹 (Western blotting) 分析结果显示重组蛋白能被感染日本血吸虫鼠血清和免疫鼠血清所识别, SjIrV1 蛋白在虫体各发育阶段中均表达。免疫荧光染色实验观察表明 SjIrV1 主要分布在日本血吸虫成虫的表膜。应用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠后, 免疫鼠血清中检测到较高水平的特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体。结果表明 SjIrV1 可能在日本血吸虫的生长发育过程中起着重要作用。

关键词: 日本血吸虫, 钙结合蛋白, 表达, 免疫原性, 免疫保护

Received: November 19, 2012; **Accepted:** April 8, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31172315), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 12140902700), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2012M510630).

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

Shengfa Liu. Tel: +86-592-2185082; E-mail: liuxie_1@163.com

国家自然科学基金 (No. 31172315), 上海科技发展基金 (No. 12140902700), 中国博士后科学基金 (No. 2012M510630) 资助。

网络出版时间: 2013-06-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130625.1625.002.html>

Characterization and immunoprotective effect of SjIrV1, a 66 kDa calcium-binding protein from *Schistosoma japonicum*

Meimei Wei^{1,2}, Yanian Xiong¹, Yang Hong¹, Lini Huang¹, Peipei Meng¹, Dezhou Ai¹,
Min Zhang¹, Zhiqiang Fu¹, Shengfa Liu², and Jiaojiao Lin¹

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

² School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract: Calcium-binding protein is an indispensable protein which performs extensive and important functions in the growth of *Schistosoma japonicum*. Based on our primary study on tegument surface proteins of *S. japonicum*, a cDNA encoding a 66 kDa calcium-binding protein of *S. japonicum* (Chinese strain) was cloned, sequence analysis revealed that it was identical with that of *SjIrV1* of Philippines strains *S. japonicum*. The expression of *SjIrV1* were detected by Real-time PCR, using cDNA templates isolated from 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days worms and the results revealed that the gene was expressed in all investigated stages, and the mRNA level of *SjIrV1* is much higher in 42 d female worms than that in 42 d male worms. The cDNA containing the open reading frame of *IrV1* was subcloned into a pET28a (+) vector and transformed into competent *Escherichia coli* BL21 for expression. The recombinant protein was purified using a Ni-NTA purification system, and confirmed by high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and tandem mass spectrometry (MS/MS). Western blotting analysis showed that recombinant SjIrV1 (rSjIrV1) could be recognized by the *S. japonicum* infected mouse serum and the mouse serum specific to rSjIrV1, respectively. Immunofluorescence observation exhibited that SjIrV1 was mainly distributed on the tegument of the 35-day adult worms. ELISA test revealed that IgG, IgG1 and IgG2a antibodies are significantly increased in the serum of rSjIrV1 vaccinated mice. The study suggested that rSjIrV1 might play an important role in the development of *S. japonicum*.

Keywords: *Schistosoma japonicum*, calcium-binding protein, expression, immunogenicity, immunoprotection

血吸虫病是由血吸虫感染引起的一种慢性寄生虫病,被世界卫生组织认为是仅次于疟疾的第2个最具社会经济破坏性的寄生虫病,全球有数以百万的人感染^[1-2]。寄生于人体的血吸虫主要有3种:日本血吸虫、曼氏血吸虫和埃及血吸虫,其中在我国流行的血吸虫病是由日本血吸虫(中国大陆株)感染引起的,它严重影响着人类的健康,据统计我国2010年血吸虫病人数达到325 824例^[3]。在血吸虫病治疗方面,尽管有吡喹酮等有效的药物,但由于较高的重复感染率及不断使用这些抗血吸虫药物,可能导致抗药虫株的出现^[4-6]。现已有研究证实中国大陆株日本血

吸虫在吡喹酮药物选择压力下可产生抗药性^[7]。

有专家提出,对于预防措施,单独使用疫苗或结合药物治疗可能是持续控制血吸虫病较为理想有效的方法^[8]。

Hawn等1993年报道用放射性照射尾蚴免疫的鼠血清筛选曼氏血吸虫cDNA文库,得到一非EF-hand家族蛋白*SmIrV1*的编码基因^[9]。

Hooker等在1999年用去垢剂Triton X-14溶解的血吸虫膜相关蛋白免疫家兔,制备多克隆抗血清,用该抗血清从日本血吸虫(菲律宾株)表达cDNA文库中筛到编码*SjIrV1*的cDNA序列基因。生物信息学分析表明SjIrV1蛋白与SmIrV1

蛋白具有 83% 的相似性,一级结构上保守的钙结合位点及重组蛋白的钙独立性电泳试验证明 *SjIrV1* 蛋白是一种功能性的钙结合蛋白^[10]。2011 年本课题组张旻^[11]在不同时期日本血吸虫 (中国大陆株) 虫体体被表膜蛋白质谱分析的基础上筛选到一个在血吸虫童虫和成虫多个时期都有表达的膜蛋白 66 kDa 钙结合蛋白 *SjCa66*, 经生物信息学分析该基因与 *SjIrV1* cDNA 编码序列一致,命名为 *SjIrV1*。文中对 *SjIrV1* 进行了克隆和原核表达,对日本血吸虫 *SjIrV1* 基因及其编码蛋白的表达进行了分析,评估了 *SjIrV1* 重组蛋白在小鼠中诱导的免疫保护效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

日本血吸虫中国大陆株尾蚴由中国农业科学院上海兽医研究所钉螺室提供;新西兰大白兔 (雄性, 2.0~3.5 kg) 购自上海罗泾飞达实验动物养殖场; 6~8 周龄雄性 (SPF 级) BALB/c 小鼠, 购自斯莱克上海实验动物中心。

1.1.2 cDNA 文库、质粒与菌株

日本血吸虫成虫 cDNA 文库, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21 (DE3), 原核表达载体质粒 pET28a (+) 均由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I, pMD19-T 载体, T4 DNA 连接酶, 高保真 LA *Taq* 酶, SYBR Green II 购自 TaRaKa 公司; Ni-NTA His-Bind Resin 购自中科新生命生物科技有限公司; DNA Marker, Protein Marker, 辣根过氧化物酶标记羊

抗鼠 IgG (羊抗鼠 IgG-HRP) 购于北京康为世纪生物科技有限公司; DAB 显色试剂盒、可溶性单组分 TMB 购于天根生物科技 (北京) 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; Cy3 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购于 Invitrogen 公司 (USA); 鼠抗 6-组氨酸 (6-His) 单抗、蛋白酶抑制剂购于 Roche 公司; 山羊血清购自上海鼎国生物工程公司; DNA 小量纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 生物技术有限公司; RIPA (强) 裂解液购于碧云天生物公司; Eppendorf Mastercycler ep 梯度 PCR 仪, 激光共聚焦扫描成像分析系统为 (型号 CISI) 日本 Nikon 公司产品; 蛋白电泳及电转移装置为美国 BIO-RAD 公司产品; 超声波细胞破碎仪 (型号 VCX-130) 为美国 SONICS 公司产品; 多功能酶标仪 (型号 SynergyTM HT) 为美国 BioTek 公司产品。

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、8 000、5 000、2 000 条尾蚴, 感染 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 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 和虫体蛋白的提取

取液氮中冻存 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 和 42 d 的日本血吸虫虫体, 按 Trizol 试剂盒说明书分别进行总 RNA 的提取。将各期别虫体进行研磨, 加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂, 低温超声, 离心, 收集上清虫体蛋白。

1.2.3 *SjCa66* (*SjIrV1*) 基因的克隆和生物信息学分析

根据本课题组在日本血吸虫虫体体被表膜

蛋白的基础上,选择一个在多个时期都有表达的膜蛋白 SjCa66 (AF030342.1),以该蛋白编码基因序列设计一对引物 P1 和 P2 (表 1),以日本血吸虫成虫 cDNA 为模板,PCR 扩增含完整 ORF 的 cDNA 序列片段。PCR 产物纯化回收后,亚克隆至 pMD19-T 载体,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑选单个菌落扩大培养,抽提质粒进行双酶切鉴定,阳性质粒命名为 pMD19-T-SjCa66,并送上海英骏生物技术有限公司测序。将测序得到的 cDNA 序列在 NCBI 上进行同源性比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 DNASTar 软件分析该基因的 ORF,并对其氨基酸残基数、组成、蛋白质相对分子质量等进行分析;利用信号肽预测软件 SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)进行信号肽分析。

1.2.4 SjIrV1 在各期别虫体的转录水平分析

分别提取 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d 虫体和 42 d 雌、雄虫体的总 RNA,定量,反转录成 cDNA。以日本血吸虫 α -tubulin 基因作为内参,以获得的各期别的日本血吸虫 cDNA 为模板,采用 SYBR Green 法进行荧光定量 PCR (qPCR) 检测 SjIrV1 基因在不同发育时期虫体的表达量。分别设计 α -tubulin 和 SjIrV1 基因的实时定量 PCR 引物 (表 1),引物均由上海英骏生物技术有限公司合成,其工作浓度为 10 pmol。反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II(2 \times) 10 μ L, ROX Reference Dye II(50 \times) 0.4 μ L, PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, PCR Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.4 μ L, DNA 模板 2.0 μ L,加入 RNase free H₂O 至总体积 20 μ L; 反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s; 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环;最后添加溶解曲线反应 95 $^{\circ}$ C 15 s,

60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s。每个反应均做 3 个重复孔,7500 Software 软件进行计算分析,得出相对于每百万 α -tubulin 基因的 SjIrV1 基因含量。

1.2.5 重组质粒 pET28a (+)-SjIrV1 的构建及在大肠杆菌中的表达、鉴定

将测序比对后的结果通过信号肽预测软件 SignalP 分析,发现 SjIrV1 蛋白的第 1~20 个氨基酸为信号肽,根据 SjIrV1 基因的 cDNA 序列设计一对引物 P3 和 P4 (表 1),以经过测序验证序列正确的 pMD19-T-SjCa66 质粒为模板,于序列的 5'端和 3'端分别引入 BamH I、Xho I 两个酶切位点,PCR 扩增去除信号肽后的 ORF 序列片段。将 PCR 扩增得到的产物酶切纯化后亚克隆到原核表达载体 pET28a (+) 的多克隆位点上,构建得到重组质粒 pET28a (+)-SjIrV1,并转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中。将阳性重组菌进行 PCR 鉴定,抽提其重组质粒进行酶切鉴定,并送至上海华津生物公司进行测序验证。将重组菌液加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达。反复冻融 3 次,超声破菌离心后,12% SDS-PAGE 分析重组表达蛋白是以可溶性还是包涵体存在。可溶性 rSjIrV1 以 Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen 公司) 纯化,洗脱后的蛋白进行 SDS-PAGE 分析 (12%),考马斯亮蓝 R250 染色,脱色后将表达的蛋白条带切下,经中国科学院上海生命科学院蛋白质组研究分析中心对其进行胶内酶解 (Trypsin, 20 h),抽提酶解肽段,毛细管高效液相色谱法 (RP-HPLC) 对酶解后的蛋白混合物进行分离,采用 4 800 串联飞行时间质谱仪 (4 800 Plus MALDI TOF/TOFTM Analyzer) (Applied Biosystems, USA) 根据多肽和多肽碎片

的质量电荷比进行全扫描,采集 20 个碎片图谱,用 BIORWORKS 软件搜索日本血吸虫 *S. japonicum* 数据库,确定所鉴定的目的蛋白的性质。

1.2.6 Western blotting 分析重组蛋白抗原性及各期别虫体 SjIrV1 蛋白的表达

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,低温 130 mA 电转移 1 h 至硝酸纤维素 (NC) 膜上,分别以免疫前鼠血清、重组蛋白免疫鼠血清、鼠抗 6-组氨酸 (6-His) 单抗以及感染日本血吸虫鼠血清作一抗,以羊抗鼠 IgG-HRP 作为二抗,二氨基联苯胺 (DAB) 作为底物进行显色。

将 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 虫体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移到 NC 膜上,用 tubulin 单抗、SjIrV1 重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠血清作一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,DAB 作为底物进行显色。

1.2.7 间接免疫荧光分析 SjIrV1 的虫体组织定位

收集日本血吸虫 35 d 成虫虫体,制成 8 μm 的冰冻切片,以 rSjIrV1 重组蛋白免疫的 BALB/c 小鼠血清作为一抗,Cy3 标记羊抗鼠 IgG (H+L) 作为二抗,10 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 溶液室温避光复染,置荧光显微镜下观察蛋白的分布情况。

1.2.8 rSjIrV1 多克隆抗体的制备及 rSjIrV1 的动物免疫保护试验

将 30 只 6~8 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 3 组,每组 10 只,分别为 rSjIrV1 重组蛋白免疫组、206 佐剂对照组和 PBS 对照组。免疫组每只每次皮下注射含 20 μg rSjIrV1 蛋白和 206 佐剂的乳化液,每隔两周免疫 1 次,共免疫 3 次,PBS 对照组注射相同剂量的 PBS,206 佐剂对照组注射相同剂量的 206 佐剂和 PBS 混合液。于第 1 次免疫

前 1 周及每次免疫后 1 周分别经眼眶采集各组小鼠血液 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min,分离并收集血清。末次免疫 2 周后,每只小鼠经腹部皮肤攻击感染约 40 条日本血吸虫尾蚴。感染后第 42 天眼球采血并处死各组小鼠,肝门静脉灌注法收集虫体并对其进行计数,计算减虫率。同时采集肝脏,称其重量,加入 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 至终体积 20 mL,组织匀浆器匀浆后,取 1 mL 匀浆液并加入 1 mL 10% NaOH (*W/V*),56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 15 min,消化完全后混匀吸取 20 μL 样品,显微镜下计算虫卵数,每份样本进行 3 次重复,取其平均值,按以下公式计算减虫率和肝脏减卵率 (EPG 为平均每克肝组织中所负荷虫卵数):

减虫率 = $(1 - \text{免疫组平均虫荷数} / 206 \text{ 佐剂对照组平均虫荷数}) \times 100\%$;

减卵率 = $(1 - \text{免疫组 EPG} / 206 \text{ 佐剂对照组 EPG}) \times 100\%$ 。

1.2.9 间接 ELISA 法检测特异性抗体

纯化的 rSjIrV1 重组蛋白用紫外分光光度计测定蛋白浓度,0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释重组蛋白至终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,以 100 $\mu\text{L/孔}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜包被 96 孔酶标板,将收集的各组小鼠血清作为一抗,羊抗小鼠 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG1-HRP 和 IgG2a-HRP 作为二抗,可溶性单组分 TMB 避光显色,2 mol/L H_2SO_4 终止反应。BioTek 公司酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行 *t* 检验分析。

表 1 PCR 和 qPCR 引物

Table 1 Primers used for PCR and qPCR

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Product length (bp)
<i>SjCa66</i>	P1: ATGTTTGTGGAGGTGTCTCG	1 749
	P2: TTATTCCTCCGCGAACGC	
<i>SjIrv1</i>	P3: GCCGGATCCATGAATAATCCTGAGTTAGAACCTG	1 692
	P4: ATTCTCGAGTTATTCCTTCCGCGAACGCC	
α -tubulin	P5: CTGATTTTCCATTCGTTTG	213
	P6: GTTGTCTACCATGAAGGCA	
<i>SjIrv1</i>	P7: TGCCGATCACCATCCAAACAC	176
	P8: GCCAATGACTCATCACCAGAAC	

2 结果

2.1 *SjIrv1* 基因的克隆及生物信息学分析

在本课题组日本血吸虫体被表膜蛋白质组学分析中筛选得到的 *SjCa66* 基因, 经 PCR 克隆获得含完整 ORF 大小为 1 749 bp 的 cDNA 片段。对该基因编码的氨基酸序列分析表明, 该基因编码 582 个氨基酸, 理论等电点为 5.03, 理论相对分子质量为 66 kDa。该蛋白 N 端第 1~20 个氨基酸为信号肽序列, 第 463~485 个氨基酸之间为跨膜结构区。去除信号肽后的理论相对分子质量为 63.80 kDa。BLAST 分析表明该基因与编码日本血吸虫 (菲律宾株) *SjIrv1* 序列完全一致, 故命名为 *SjIrv1*。

2.2 Real-time PCR 分析各时期 *SjIrv1* 转录表达水平

Real-time PCR 分析结果表明, *SjIrv1* 在日本血吸虫各个虫体发育阶段均有转录, 其中 14 d 虫体和 42 d 雄虫转录量较低, 35 d 和 42 d 虫体表达量最高, 42 d 雌虫的转录量显著高于 42 d 雄虫, *t* 检验分析结果表明 42 d 雌虫与雄虫转录量差异性极显著, $P < 0.001$ (图 1)。

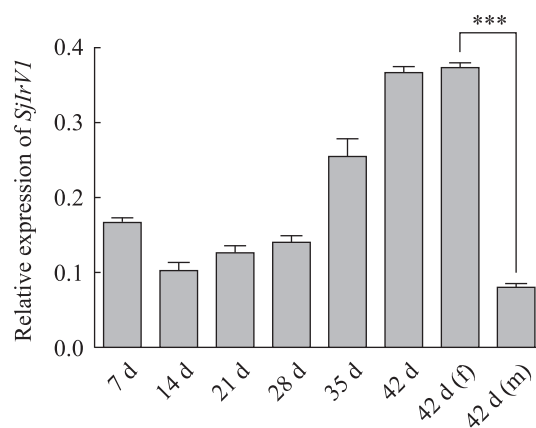


图 1 实时荧光定量 PCR 分析 *SjIrv1* 基因在日本血吸虫不同阶段虫体的表达情况

Fig. 1 Differential expression of *SjIrv1* in different stages of *S. japonicum* analyzed by Real-time PCR. 7 d: 7 days schistosomula; 14 d: 14 days schistosomula; 21 d: 21 days schistosomula; 28 d: 28 days worms; 35 d: 35 days worms; 42 d: 42 days worms; 42 d(f): 42 days female worms; 42 d(m): 42 days male worms.

2.3 重组质粒 pET28a (+)-*SjIrv1* 的诱导表达、重组蛋白纯化及鉴定

经 PCR、双酶切鉴定和测序, 证明 pET28a (+)-*SjIrv1* 重组表达质粒构建成功。SDS-PAGE 结果显示诱导表达的蛋白主要以可溶性形式存在, 重组蛋白分子量约为 94 kDa, 比

理论值 67.80 kDa 偏大 (*SjIrV1* 去除信号肽后预测分子量约为 63.8 kDa, 表达载体蛋白大小约 4 kDa) (图 2)。将该条带切下送公司进行高效液相和质谱鉴定, 通过查询血吸虫 *S. japonicum* 数据库, 结果确定鉴定到登录号为 AAC62193.1 的蛋白, 分子量大小约为 66 kDa, 与本研究目的蛋白相符 (表 2)。结果表明 pET28a (+)-*SjIrV1* 重组蛋白成功诱导表达并主要以可溶性形式存在, *rSjIrV1* 得到较好的纯化效果。

2.4 Western blotting 检测重组蛋白抗原性及各期别虫体蛋白的表达

以纯化重组蛋白作为抗原, 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠血清、小鼠抗 His-tag 单抗以及感染日本血吸虫 42 d 小鼠血清作为一抗进行 Western blotting 分析, 结果显示在 94 kDa 处有一明显的识别条带, 而免疫前小鼠作为阴性对照在此处未

有明显条带出现, 表明重组蛋白具有良好的抗原性 (图 3)。

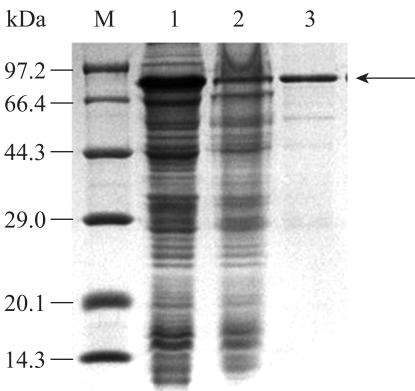


图 2 SDS-PAGE 分析 pET28a (+)-*SjIrV1*/BL21 重组蛋白的表达

Fig. 2 SDS-PAGE ananlysis of the expression products of pET28a (+)-*SjIrV1*/BL21 in *E. coli*. M: low-molecular protein marker; 1, 2: supernatant and inclusion bodies of the recombinant protein, respectively. 3: purified recombinant protein of pET28a (+)-*SjIrV1*/BL21.

表 2 *rSjIrV1* 串联质谱 (BIOWORKS 软件) 结果分析
Table 2 Database searching results of peptide mass of *rSjIrV1*

Reference	Pep. count sequence	Unique pep. count MH+	Cover percent Diff (MH+)	MW Charge	PI	Identified name
gi 3687623	77	28	51.20%	66027.29	5.04	gi 3687623 gb AAC62193.1 Calcium-binding protein Sj66 [<i>Schistosoma japonicum</i>]

Results showed the purified recombinant protein identified as a homolog of a 66 kDa calcium-binding protein from *S. japonicum*.

以各时期虫体 (7 d、14 d、21 d、28 d、35 d) 蛋白作为抗原, 小鼠抗 tubulin mAb、*SjIrV1* 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠血清作为一抗除了在 55 kDa 处显示出 tubulin 蛋白条带外, 在 94 kDa 和 66 kDa 处出现较明显的两条带 (图 4), HPLC 和 MS/MS 鉴定分析两处均为 66 kDa 钙结合蛋白, 即 *SjIrV1*。

2.5 日本血吸虫体内 *SjIrV1* 蛋白的表达分布观察

通过荧光显微镜可观察到 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗发出的红色荧光, DAPI 复染核后发出的蓝色荧光(B), 以免疫前小鼠血清作阴性对照 (A), 免疫荧光染色实验结果表明, 该蛋白广泛分布于虫体实质及表膜, 其中在表膜中表达最高 (图 5)。

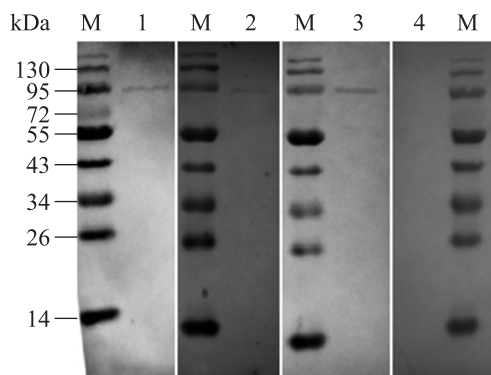


图3 pET28a (+)-SjIrV1 重组蛋白的抗原性分析

Fig. 3 Antigenicity analysis of recombinant protein pET28a (+)-SjIrV1. M: protein marker; 1: stained with infected mouse serum; 2: stained with mouse anti-His mAb; 3: stained with mouse serum against SjIrV1; 4: negative serum control.

2.6 免疫小鼠血清抗 rSjIrV1 蛋白特异性抗体的检测

利用间接 ELISA 法检测各组小鼠血清中抗 rSjIrV1 特异性 IgG 抗体水平变化, 实验结果表明, 重组蛋白免疫组小鼠在第 1 次免疫后就检测到特异性抗 rSjIrV1 重组蛋白的 IgG 抗体, 第 2 次免疫后特异性 IgG 抗体滴度进一步升高, 第 3

次免疫后和剖杀时变化不明显。 t 检验分析表明, 重组蛋白免疫组与 PBS 对照组和 206 佐剂对照组特异性 IgG 抗体水平差异性极显著 ($P < 0.01$)。206 佐剂对照组和 PBS 对照组在 3 次免疫后抗 rSjIrV1 的特异性 IgG 抗体滴度均未出现明显的变化, 只在剖杀时才出现低滴度的抗 rSjIrV1 的特异性 IgG 抗体 (图 6)。

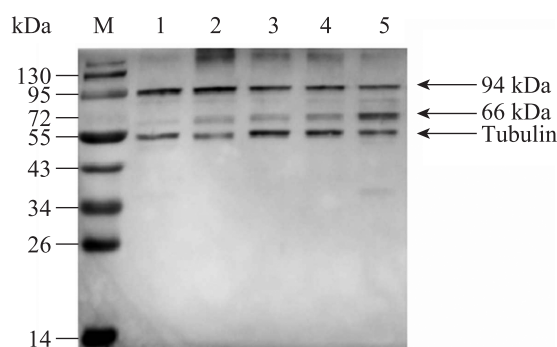


图4 各期别虫体蛋白中 SjIrV1 的表达分析

Fig. 4 Expression of SjIrV1 protein in different stages of *S. japonicum* analyzed by Western blotting. M: protein marker; 1-5: proteins of 7 days, 14 days, 21 days, 28 days, 35 days worms were probed with mouse serum against SjIrV1 and anti-tubulin mAb.

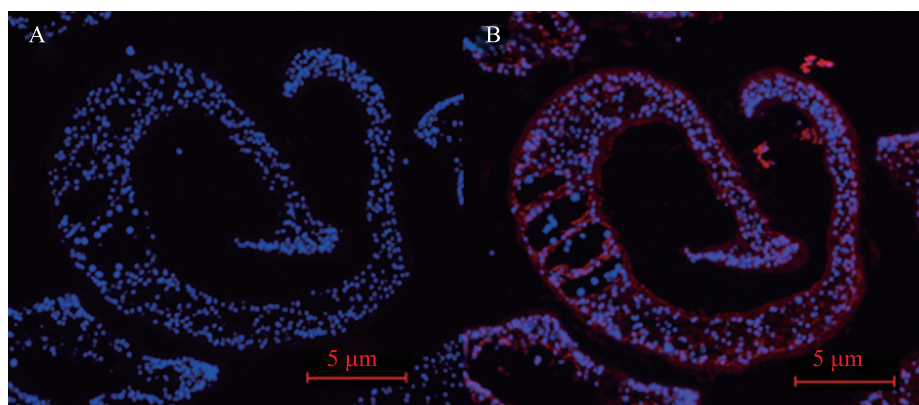


图5 SjIrV1 蛋白的免疫组织定位 (100×)

Fig. 5 Immunolocalization of SjIrV1 in 35 d of *S. japonicum* (100×). secondary antibody Cy3-conjugated anti-mouse IgG (red) were used for fluorescence detection of SjIrV1 on worm section. DAPI (blue) was used to stain parasite nuclei. (A) The section was probed with native mice serum (the negative control). (B) The section was probed with anti-SjIrV1 mouse serum.

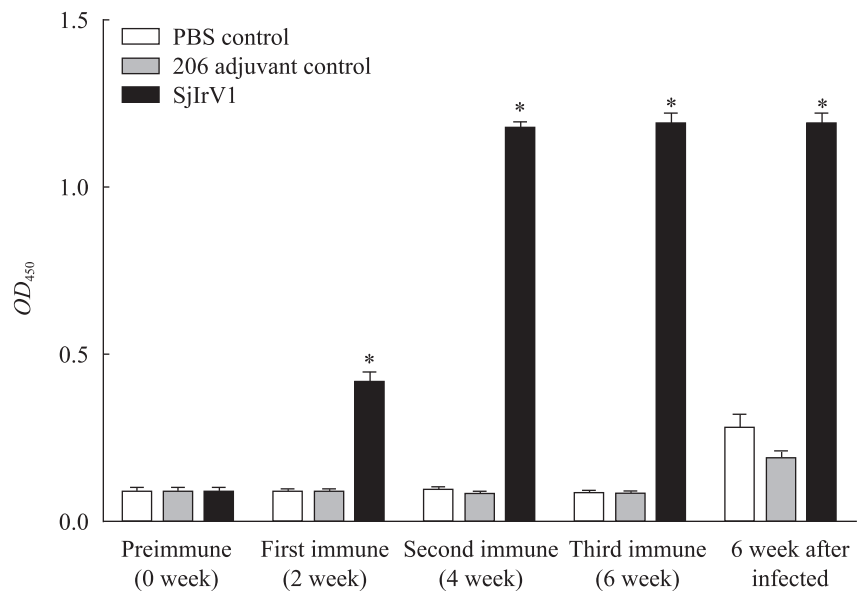


图 6 BALB/c 小鼠血清抗 rSjIrV1 特异性 IgG 抗体水平检测结果
Fig. 6 Specific IgG level against SjIrV1 in the sera of BALB/c mice by ELISA. Mice were injected with rSjIrV1, 206 adjuvant and PBS. The asterisks (*) indicate significantly increased serum antibody titres compared with the PBS control ($P<0.01$).

用每次免疫后采集的血清作为一抗,对抗 rSjIrV1 蛋白特异性 IgG1 和 IgG2a 抗体进行测定,结果显示,随着 3 次免疫的进行,206 佐剂组对照组 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型没有明显的趋势变化,但 rSjIrV1 蛋白免疫组 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型均呈上升趋势且免疫组与对照组差异性均极显著 ($P < 0.01$), IgG1/IgG2a 比值不断下降,提示重组蛋白

rSjIrV1 可能诱导小鼠产生 Th1 型占主导的免疫反应 (表 3)。

2.7 动物保护性试验结果

重组蛋白免疫保护试验结果显示与 206 佐剂对照组比较, rSjIrV1 在 BALB/c 小鼠中诱导了 12.25% 的减虫率, 34.07% 的肝组织减卵率, t 检验分析表明对照组与免疫组均没有产生显著性差异 (表 4)。

表 3 rSjIrV1 诱导产生的抗体亚型分析
Table 3 IgG immune profile induced by vaccination with rSjIrV1

Time	206 adjuvant		r SjIrV1		IgG1/ IgG2a ratio of rSjIrV1
	IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2a	
First immune	0.095±0.001	0.087±0.001	0.592±0.039*	0.197±0.019*	3.200
Second immune	0.090±0.001	0.084±0.001	1.603±0.019*	1.099±0.044*	1.480
Third immune	0.086±0.001	0.083±0.001	1.648±0.023*	1.235±0.045*	1.350

The results are presented as $\bar{x} \pm s$ for each group. The asterisks(*) indicate statistically significant compared to group of animals immunized with 206 adjuvant ($P<0.01$).

表 4 BALB/c 小鼠免疫保护试验结果

Table 4 Results of protective efficacy against *S. japonicum* challenge in mice induced by rSjIrV1

Group	Average worm burden ($\bar{x} \pm s$)	Percent reduction in worm burden (%)	<i>P</i> value	Eggs/g liver ($\bar{x} \pm s$)	Percent reduction in liver egg count (%)	<i>P</i> value
206 adjuvant	26.86 \pm 1.68	—		108 600 \pm 15 380	—	—
rSjIrV1	23.57 \pm 2.79	12.25	>0.05	71 600 \pm 7 421	34.07	>0.05

Statistically significant compared to group of animals injected with 206 adjuvant.

3 讨论

Ca 是真核生物体内极其重要的第二信使, 主要分布于细胞内膜、内质网和线粒体中, 很多生理活动的调控都由钙来完成, 通过信号传导通路, 与血吸虫尾蚴入侵宿主、细胞生长、钙通路调节及蛋白磷酸化等生物进程密切相关^[12]。组织中钙离子的浓度必须在系统和细胞水平得到精细的调节, 这项功能由种类繁多的钙结合蛋白来完成^[13], 成为血吸虫寄生于宿主不可或缺的一类蛋白, 是一类值得深入研究的疫苗候选分子或新药物靶标。所报道的血吸虫钙结合蛋白包括有 EF-hand 家族和非 EF-hand 家族蛋白, 它们都具有钙结合位点。EF-hand 家族包括钙调蛋白 (Calmodulin)、肌球蛋白 C 及以微白蛋白为代表的可溶性的肌质钙结合蛋白。前两者通过与 Ca^{2+} 的结合, 使蛋白的构象发生变化, 发挥其调节机能; 后者通过结合游离钙离子作为生理钙或钙库源^[14]。Hawn 等用致弱尾蚴免疫鼠血清筛选曼氏血吸虫 cDNA 文库获得 *SmIrV1* 和 *SmIrV5* 两个基因, 其中 IrV5 蛋白是 WHO/TDR 提出的血吸虫疫苗候选分子^[15], *SmIrV1* 和 *SjIrV1* 均属于非 EF-hand 结构的钙网织蛋白家族。

本研究将去除 N-末端区信号肽后的 *SjIrV1* 编码基因亚克隆到带有 His-tag 的 pET28a (+) 原核表达载体中并在大肠杆菌中表达, 经

SDS-PAGE 分析表明获得的重组蛋白分子量约为 94 kDa, 比理论值 (66 kDa) 偏大, 把重组蛋白作抗原与抗 His-tag 单抗作用, 得到的阳性条带分子量也为 94 kDa, 与纯化的重组蛋白条带分子量一致。进一步应用高效液相法和 MS/MS 质谱分析验证该纯化重组蛋白确定为目的蛋白 *SjIrV1*, 同时以抗 *rSjIrV1* 重组蛋白免疫鼠血清作为探针, Western blotting 分析各期别虫体蛋白表达情况时, 显示在 66 kDa 和 94 kDa 处出现明显条带, 后经 HPLC 和 MS/MS 进一步鉴定确认两条带中均含有目的蛋白 *SjIrV1*。Hooker 等将 *SjIrV1* 亚克隆到 pQE30 表达纯化后 SDS-PAGE 分析重组蛋白大小约 90 kDa, 与我们获得的重组蛋白大小相近, 都比理论值 (66 kDa) 偏大^[10]。在 SDS-PAGE 分析中会出现这种偏差, 推测 *SjIrV1* 可能结合了某种物质而改变了其构象, 使其显示出相对分子质量为 94 kDa 蛋白的情况, 又或许是由于 *SjIrV1* 的高酸性 (PI=5.03) 影响其与 SDS 的结合, 根据已有研究报道钙连蛋白、钙网织蛋白、钙镁蛋白、*SmIrV1*^[16-9]均出现相对于理论蛋白大小在 SDS-PAGE 分析中迁移率变慢的情况, 这些蛋白与 *SjIrV1* 一样都呈现高酸性, 而 OvRAL1 酸性相比于上述蛋白低, 该蛋白纯化后的蛋白条带与预测的蛋白大小最接近^[19]。还有一种说法是由于 His-tag 中的碱性氨基酸与

目的蛋白中的氨基酸共同作用,影响了蛋白与 SDS 的结合而造成目的蛋白在 SDS-PAGE 中迁移变慢导致偏差^[20]。就目前的研究进展来看,出现这种蛋白大小比理论值偏差较大的具体原因尚未能明确,待进一步的深入研究。

Real-time PCR 分析基因转录水平结果显示随着虫体的生长发育及成熟,*SjIrV1* 呈上调趋势。日本血吸虫尾蚴在侵入宿主后第 15~16 天两性童虫开始配对,出现合抱,第 24 天雌虫开始产卵^[21],根据实验结果在第 35 天和 42 天虫体中 *SjIrV1* 转录水平显著升高并且差异性显著,42 d 雌虫的转录水平显著高于雄虫,推测可能与日本血吸虫在虫卵细胞的快速合成过程中对 IrV1 需求的增加有关。有报道称钙结合蛋白和钙释放蛋白在体内的有规律变化可能在卵母细胞成熟、受精及早期胚胎发育的过程中对调控 Ca^{2+} 稳态平衡中起着重要的作用^[22],文中动物免疫试验中用重组 rSjIrV1 免疫小鼠,诱导了 34.07% 的减卵率,但是相比于减虫效果,产生了更高的减卵效果,推测 SjIrV1 作为钙结合蛋白可能在血吸虫雌虫产卵和虫卵形成中发挥一定的作用。免疫荧光结果显示 SjIrV1 在虫体中广泛分布且在体被表膜大量表达,已有研究表明该蛋白与 Calnexin, Calreticulin 在氨基酸序列和蛋白质结构上相似,其中与 Calnexin 更为接近^[10],表明 SjIrV1 和 Calnexin 在功能上有很大的相似性,而 Calnexin 是存在于内质网中的一种重要的类凝集素分子伴侣,参与细胞内的许多重要生物功能,如辅助新合成肽链的折叠和装配、转运,参与内质网的蛋白质质量控制系统^[23],因此 SjIrV1 在血吸虫的这些生物进程中是否发挥着一定作用有待进一

步实验验证。

尽管吡喹酮作为治疗血吸虫病非常有效,但不能阻止重复感染或对现有的损伤起修复作用^[24],同时目前对血吸虫的疫苗候选抗原的研究也有了重大进展,但已研制的血吸虫疫苗分子绝大多数只能提供部分的保护力。因此寻找新的有效的候选疫苗抗原或通过优化组合合成新抗原分子,以提高免疫保护作用是当前疫苗研究的一个重点。钙结合蛋白作为血吸虫寄生于宿主不可或缺的蛋白, SjIrV1 又是一种功能性的钙结合蛋白,间接 ELISA 和 Western blotting 结果均显示重组抗原 rSjIrV1 可被血吸虫感染小鼠血清识别,表明日本血吸虫 SjIrV1 具有较好的免疫原性,该蛋白有可能成为日本血吸虫疫苗的候选抗原和药物靶点。用纯化的 rSjIrV1 蛋白免疫小鼠后,实验结果显示小鼠产生了较高水平的特异性 IgG、IgG1、IgG2a 抗体,抗 rSjIrV1 抗体亚型 IgG1/IgG2a 比值不断下降, 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^[25]。推测 rSjIrV1 可能诱发小鼠抗日本血吸虫感染的 Th1/Th2 混合型免疫反应,但以 Th1 型占主导。保护性动物实验显示,重组蛋白 rSjIrV1 免疫的 BALB/c 小鼠,其减虫率和减卵率分别为 12.25% 和 34.07%, rSjIrV1 诱导宿主虽然未能产生很好的保护效果,但可以通过其他途径来进一步提高 rSjIrV1 的免疫保护效果。已有研究报道可通过更换佐剂来改变免疫反应的极化方向^[26],例如, SjGP-3 结合 ISA 70 MVG 佐剂时主要诱导产生 Th1 型免疫反应,而与另外 3 种佐剂联合使用时主要诱导产生 Th1/Th2 混合型免疫反应^[27]。还可以将来自于多种抗原的保护

性抗原表位制成嵌合蛋白,能够诱导产生较好的保护效果^[27]。也可以考虑针对不同发育阶段、不同部位和不同抗原成分选择2种或2种以上的多种疫苗候选分子的联合应用,以达到协同和增强作用^[28]。

REFERENCES

- [1] Schistosomiasis Fact Sheet [EB/OL]. [2012-12-10]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>.
- [2] Schistosomiasis: Centers for Disease Control and Prevention [EB/OL]. [2012-12-10]. <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/>.
- [3] Lei ZL, Zheng H, Zhang LJ, et al. *Schistosomiasis status* in People's Republic of China in 2010. *Chin J Schistosom Control*, 2011, 23(6): 599-604 (in Chinese).
雷正龙, 郑浩, 张利娟, 等. 2010 年全国血吸虫病疫情通报. *中国血吸虫病防治杂志*, 2011, 23(6): 599-604.
- [4] Redam CA, Robertson A, Fallon PG, et al. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol Today*, 1996, 12(1): 14-20.
- [5] Gryseels B, Polderman AM. Morbidity, due to *Schistosomiasis mansoni*, and its control in Sub-Saharan Africa. *Parasitol Today*, 1991, 7(9): 244-248.
- [6] Taylor DW. Schistosome vaccines. *Cell Mol Life Sci*, 1991, 47(2): 152-157.
- [7] Liang YS, Li HJ, Dai JR, et al. Studies on resistance of schistosoma to praziquantel XIII resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel is experimentally induced in laboratory. *Chin J Schistosom Control*, 2011, 23(6): 605-610 (in Chinese).
梁幼生, 李洪军, 戴建荣, 等. 血吸虫对吡喹酮抗药性的研究 X III 日本血吸虫吡喹酮抗药性的实验诱导. *中国血吸虫病防治杂志*, 2011, 23(6): 605-610.
- [8] Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell GF. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends Parasitol*, 2005, 21(3): 112-117.
- [9] Thomas RH, Timothy DT, Mette S. Molecular cloning and expression of SmIrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulin and OvRa11. *J Biol Chem*, 1993, 268(11): 7692-7698.
- [10] Hooker CW, Brindley PJ. Cloning of cDNA encoding *SjIrV1*, a *Schistosoma japonicum* calcium-binding protein similar to calnexin, and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1429(2): 331-341.
- [11] Zhang M, Fu ZQ, Lin JJ. Researches on proteomics of *Schistosoma japonicum*. *Chin J Animal Infect Dis*, 2011, 19(3): 61-68 (in Chinese).
张旻, 傅志强, 林矫矫. 日本血吸虫蛋白质组学研究. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(3): 61-68.
- [12] Santos TM, Johnston DA, Azevedo V, et al. Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using the expressed sequence tag approach. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 103(1): 79-97.
- [13] Stewart GL, Kim I, Shupe K, et al. Chemotactic response of macrophages to *Acanthamoeba castellanii* antigen and antibody-dependent macrophage-mediated killing of the parasite. *Parasitology*, 1992, 78(5): 849-855.
- [14] Stewart TJ, Smith AL, Havercroft JC. Analysis of the complete sequence of a muscle calcium-binding protein of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 1992, 105(3): 399-408.
- [15] Al-Sherbiny M, Osman A, Barakat R, et al. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Acta Trop*, 2003, 88(2): 117-30.
- [16] Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, et al. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(3): 124-128.
- [17] Rzepecka J, Rausch S, Klotz C, et al. Calreticulin

- from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Mol Immunol*, 2009, 46(6): 1109–1119.
- [18] Watanabe D, Yamada K, Nishina Y, et al. Molecular cloning of a novel Ca^{2+} -binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *J Biol Chem*, 1994, 269(10): 7744–7749.
- [19] Unnasch TR, Gallin MY, Soboslay PT, et al. Isolation and characterization of expression cDNA clones encoding antigens of *Onchocerca volvulus* infective larvae. *J Clin Invest*, 1988, 82(1): 262–269.
- [20] Tang WH, Zhang JL, Wang ZY, et al. The cause of deviation made in determining the molecular weight of His-tag fusion proteins by SDS-PAGE. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2000, 26(1): 64–68 (in Chinese).
唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因. *植物生理学报*, 2000, 26(1): 64–68.
- [21] He YX, Yang HZ. Physiological studies on the post-cercarial development of *Schistosoma japonicum*. *Curr Zool*, 1980, 26(01): 32–41 (in Chinese).
何毅勋, 杨惠中. 日本血吸虫发育的生理学研究. *动物学报*, 1980, 26(01): 32–41.
- [22] Balakier H, Dziak E, Sojecki A, et al. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 2002, 17(11): 2938–2947.
- [23] Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, et al. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19(3): 124–128.
- [24] Bergquist R, Utzinger J, McManus DP. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. *PLoS Neglect Trop Dis*, 2008, 2(6): e244.
- [25] Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol*, 1990, 8: 303–333.
- [26] Golding B, Scott DE. Vaccine strategies: targeting helper T cell responses. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 754: 126–137.
- [27] Xu XD, Zhang DM, Sun W, et al. A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. *BMC Infect Dis*, 2009, 9: 54.
- [28] Zhang L, Chen JP. Advances in the study of candidate vaccines of *Schistosoma japonicum*. *Paras Infect Dis*, 2005, 3(01): 31–34 (in Chinese).
张莉, 陈建平. 日本血吸虫疫苗候选分子的研究进展. *寄生虫病与感染性疾病*, 2005, 3(01): 31–34.

(本文责编 郝丽芳)