

# 日本血吸虫 *Sj Cyclophilin B* 基因的克隆、表达及免疫保护效果分析

彭金彪, 韩宏晓, 洪炆, 王艳, 郭凡吉, 石耀军, 傅志强, 刘金明, 程国锋, 林矫矫

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

**摘要:** 本研究克隆和表达了日本血吸虫 Cyclophilin B (*Sj CyPB*) 编码基因的 cDNA, 分析其在日本血吸虫不同发育阶段虫体的表达情况, 评估该重组抗原在小鼠体内诱导的抗血吸虫免疫保护效果。本研究以日本血吸虫童虫 cDNA 为模板, RT-PCR 扩增其基因全长 cDNA, 提交序列到 NCBI, 登录号为 GQ403665。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表达情况, 构建重组表达质粒, 表达纯化重组蛋白。利用 Western blotting 检测重组蛋白的抗原性。以重组抗原免疫小鼠, 评估其对小鼠诱导的免疫保护效果。结果表明, RT-PCR 获得了 *Sj CyPB* 编码基因的全长 cDNA, 其开放阅读框为 672 bp。经分析确定其为 CyPs 家族中的 CyPB 基因, 命名为 *Sj CyPB*。荧光实时定量 PCR 分析表明, 该基因在 18 d 童虫期表达量最高, 32 d 次之。构建了重组表达质粒 pGEX-6P-1-*Sj CyPB*, 并在大肠杆菌中成功表达, 表达产物分子量为 49.5 kDa。Western blotting 试验显示该重组蛋白具有良好的抗原性, 在小鼠免疫试验中, 与空白对照组比较, 免疫组小鼠获得 31.5% 的减虫率和 41.01% 的肝脏减卵率。本研究获得了日本血吸虫童虫期高表达的 *Sj CyPB* 基因的全长 cDNA, 成功构建了 *Sj CyPB* 原核重组表达质粒, 并在大肠杆菌中成功表达, 证实该重组抗原在小鼠体内诱导产生了部分免疫保护效果。

**关键词:** 日本血吸虫, Cyclophilin B(CyPB), 克隆和表达, 免疫保护效果

## Cloning and expressing of Cyclophilin B gene from *Schistosoma japonicum* and the analysis of immunoprotective effect

Jinbiao Peng, Hongxiao Han, Yang Hong, Yan Wang, Fanji Guo, Yaojun Shi, Zhiqiang Fu, Jinming Liu, Guofeng Cheng, and Jiaojiao Lin

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

**Abstract:** The present study was intend to clone and express the cDNA encoding Cyclophilin B(CyPB) of *Schistosoma japonicum*, its preliminary biological function and further immunoprotective effect against schistosome infection in mice. RT-PCR technique was applied to amplify a full-length cDNA encoding protein Cyclophilin B (*Sj CyPB*) from schistosomula cDNA. The

**Received:** October 30, 2009; **Accepted:** February 2, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30671581), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB513108), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A207-1), National Key Technology R&D Program of China (No. 2006BAD06A09).

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

国家自然科学基金 (No. 30671581), 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (No. 2007CB513108), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10A207), 国家科技支撑计划 (No. 2006BAD06A09) 资助。

expression profiles of *Sj* CyPB were determined by Real-time PCR using the template cDNAs isolated from 7, 13, 18, 23, 32 and 42 days parasites. The cDNA containing the Open Reading Frame of CyPB was then subcloned into a pGEX-6P-1 vector and transformed into competent *Escherichia coli* BL21 for expressing. The recombinant protein was renaturated, purified and its antigenicity were detected by Western blotting, and the immunoprotective effect induced by recombinant *Sj* CyPB was evaluated in Balb/C mice. The cDNA containing the ORF of *Sj* CyPB was cloned with the length of 672 base pairs, encoding 223 amino acids. Real-time PCR analysis revealed that the gene had the highest expression in 18-day schistosomula, suggesting that *Sj* CyPB was schistosomula differentially expressed gene. The recombinant protein showed a good antigenicity detected by Western blotting. Animal experiment indicated that the vaccination of recombinant CyPB protein in mice led to 31.5% worm and 41.01% liver egg burden reduction, respectively, compared with those of the control. A full-length cDNA differentially expressed in schistosomula was obtained. The recombinant *Sj* CyPB protein could induce partial protection against schistosome infection.

**Keywords:** *Schistosoma japonicum*, Cyclophilin B(*Sj* CyPB), gene clone and expression, immunoprotective effect

血吸虫 (Schistosome) 感染引起的血吸虫病 (Schistosomiasis) 是一种严重危害人类健康的寄生虫病, 目前该病仍在全球 74 个国家和地区流行, 有 2 亿人受感染, 6 亿人受威胁。截止 2007 年, 我国尚有 449 个血吸虫病流行县 (市、区) 和 3563 个流行乡镇, 估计患者 50 多万人<sup>[1]</sup>。近年来我国加大血吸虫病防治工作力度, 血吸虫病流行态势得到有效控制, 但是传染源控制措施很难落实到位, 家畜作为传染源的威胁依然严峻。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。随着生物化学、分子生物学、免疫学等学科的快速发展, 利用相关实验技术寻找潜在疫苗候选分子和药物靶标逐渐成为研究的热点<sup>[2]</sup>。

日本血吸虫生活史繁杂, 经过多个宿主和不同发育阶段, 血吸虫不同发育阶段虫体具有不同的生理病理特征。童虫是血吸虫在终末宿主的早期发育阶段虫体, 在血吸虫生长发育中具有重要意义, 童虫虫体脆弱, 侵入皮肤内早期的血吸虫童虫是宿主免疫系统攻击的重要靶标, 寻找日本血吸虫童虫期特异性信号分子作为疫苗候选分子或药物靶标, 以疫苗或药物阻断血吸虫的生活史不失为防控血吸虫病的理想途径<sup>[3]</sup>。本课题组构建的日本血吸虫童虫 cDNA 文库, 为童虫期差异表达基因的深入系统研究提供了良好的平台。CyPB 参与的蛋白加工、修饰、折叠和转运等生物学功能相关, 在多个物种中有着广泛研究<sup>[4]</sup>。本研究以童虫期高表达基因 *Sj*

CyPB 为研究对象, 克隆、表达了该基因, 验证了该基因在日本血吸虫童虫期高表达, 同时评估该基因重组抗原在小鼠体内诱导的抗血吸虫病的保护效果, 为进一步研究该基因的生物学功能及其作用机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和酶

Trizol 和 superscript<sup>TM</sup>II 反转录酶购自 Invitrogen 公司; Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、RNA inhibitor、DNase、荧光实时定量 PCR (SYBR Green 法) 检测试剂盒和随机引物购自 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司; DNA Marker DL2000、DL5000, 小量质粒抽提试剂盒购自上海天根生物科技有限公司; QIAquick®Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司; Agrose、DEPC 购自上海生工生物工程公司; 硝酸纤维素膜 (Whatman) 购自北京经科宏达生物技术有限公司; Bacto-yeast extract、bacto-tryptone 为 Oxoid 公司产品; GST Bind Resin (Merck-Novagen) 购自中新生命科技有限公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、羊抗兔 IgG-HRP、羊抗鼠 IgG-HRP 均购自 Sigma 公司。

### 1.2 菌种、实验动物和血清

感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, pET28a(+) 表达载体由本实验室保存。新西兰白兔 (雄性, 2.5~3.0 kg) 购自上海罗泾飞达实验动物养殖场, BALB/c 小鼠购自中国科学院上海实验动物中心。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。新西兰白兔以腹部贴片法分别感染 15 000、8000、5 000、2000 条血吸虫尾蚴, 在感染后 7、13、18、23、32、42 d 分别剖杀, 以肝门静脉灌注法收集虫体, 用 PBS 充分洗涤去除粘附的宿主组织后, 冻存液氮备用。日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清由本室金亚美老师惠赠。

### 1.3 RNA 的提取

取液氮冻存的日本血吸虫童虫和成虫, 按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取及纯化。

### 1.4 含 ORF cDNA 片段扩增及生物信息学分析

从本课题组构建的童虫 cDNA 文库中获得一段童虫差异表达 EST, 长 436 bp, 通过 NCBI 中 Blast 分析, 发现该序列与 *Schistosoma mansoni* Cyclophilin B 同源。以 *Schistosoma mansoni* Cyclophilin B 序列设计引物 (上游引物 P1 和下游引物 P2), 以日本血吸虫童虫 cDNA 为模板, PCR 扩增含 ORF 的 cDNA 片段序列片段。引物 P1(5'-3'): ATGGCCGTGTTAAG AGTGTT, P2(5'-3'): TCATTCAGCAGCGTCAGTGT, 由上海英骏生物技术有限公司合成。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 Clustalw 软件对不同物种的 CyPB 蛋白氨基酸序列进行多重比对; 利用 GeneDoc 软件对比对结果进行编辑。

### 1.5 荧光实时定量 RT-PCR 检测

分别提取日本血吸虫 7、13、18、23、32 日龄及 42 日龄的虫体总 RNA, 定量, 反转录, 消化基因组 DNA, 纯化回收。以日本血吸虫 NADH 基因为内参, 以纯化的不同期别的日本血吸虫 cDNA 为模板, 以 SYBR Green 法进行实时定量 PCR 检测 *Sj CyPB* 基因的表达量。扩增 *Sj CyPB* 的引物: Sense primer(5'-3'): ATGGCTAATGCTGGTCCTAAC, Antisense primer(5'-3'): GTCCACAGTTTGCTATCTTCAC, 引物均由上海英骏生物技术有限公司合成, 预期扩增基因片段长度为 250 bp 左右, 引物使用浓度为 10 pmol。NADH 引物, Sense primer(5'-3'): CGAGGACCTAAC AGCAGAGG, Antisense primer(5'-3'): TCCGAACGA

ACTTTGAATCC, 引物序列由 Dr Goffrey Gobert 提供, 引物均由上海英骏生物技术有限公司合成, 预期扩增基因片段长度为 250 bp 左右, 引物使用浓度为 10 pmol。反应体系: 2×SYBR Green PCR Premix *Taq* 10 μL, 上游引物 0.4 μL, 下游引物 0.4 μL, EASY Dilution Butter 8.2 μL, 模板 1 μL; 反应条件为: 95°C 10 s, 然后 95°C 5 s, 55°C 10 s, 72°C 15 s, 40 个循环, 其中 72°C 15 s 结束时间为荧光信号检测点, 每个反应均做 3 孔重复。采用 cobert 公司 rotogene6.0 软件进行计算分析, 以 NADH 作为内参, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量。

### 1.6 重组表达质粒的构建与表达

#### 1.6.1 重组表达质粒的构建

在该基因 ORF 扩增序列的 5'端和 3'端分别引入 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点, 通过 PCR 扩增得到含完整 ORF 的 *Sj CyPB* 基因序列, 将该序列定向亚克隆于原核表达载体 pGEX-6P-1 的多克隆位点区, 构建重组表达质粒 pGEX-6P-1-*Sj CyPB*。

#### 1.6.2 在大肠杆菌中的表达

将以 PCR、酶切和测序 3 种方法鉴定为阳性的 pGEX-6P-1-*Sj CyPB*/BL21 接种于 LB 培养基, 37°C 振荡培养, 当  $OD_{600}=1.0$  时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后不同时间点分别收集菌液, 确定最佳诱导时间和相关诱导表达条件; 同时以 SDS-PAGE 电泳分析经超声波裂解后的菌体蛋白, 判定其表达状况。将以包涵体形式存在的重组蛋白溶解于 8 mol/L 尿素, 然后以浓度梯度降低的溶解尿素的 PBS 逐渐透析至 PBS 中, 完成复性, 随后以 GST Bind Resin 纯化出重组蛋白。

#### 1.6.3 Western blotting 检测

将纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素(NC)膜上, 用经 pGEX-6P-1/BL21 空载体转化的大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫全虫抗原免疫兔血清作一抗, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 为二抗, 以沉淀型 TMB 作为底物进行显色。

### 1.7 小鼠免疫保护性试验

#### 1.7.1 动物分组

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含 206 佐剂和 20  $\mu\text{g}$  纯化的 *Sj* CyPB 重组蛋白的乳化液;佐剂对照组每次每只注射相同体积的 206 佐剂和 PBS 的乳化液;空白对照组每次每只注射相同体积的 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 (30 $\pm$ 2) 条日本血吸虫尾蚴。

### 1.7.2 虫体计数

攻虫 42 d 后,剖杀小鼠,收集血清,以肝门静脉灌注法收集虫体,计数虫体,计算减虫率。

### 1.7.3 肝组织虫卵计数

解剖小鼠时采集肝脏,称取 1 g,加入 5 mL PBS,用匀浆机混匀后,加入 5 mL 10% NaOH (W/V),56 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中消化 2 h,消化完全后混匀取 4 份 50  $\mu\text{L}$  样品,镜检计算虫卵数 (EPG 为平均每克肝组织中虫卵数),计算减卵率<sup>[5]</sup>。

### 1.7.4 ELISA 检测抗体水平

试验小鼠分别于免疫前、一免、二免和三免后第 7 天尾部采血,剖杀时收集血液分离血清,1:100 稀释后按常规 ELISA 方法检测抗体效价<sup>[6]</sup>。

### 1.7.5 数据分析和统计

试验数据以 SPSS 软件进行统计学分析 (Duncan 法)。

## 2 结果

### 2.1 *Sj* CyPB 基因的克隆及生物信息学分析

在本课题组构建的童虫文库中筛选得到日本血吸虫 *Sj* CyPB 基因,核苷酸和氨基酸序列分析比较结果显示:该序列编码的氨基酸与曼氏血吸虫 CyPB 具有较高相似性,同时具有典型的 CyP 家族功能结构域,故命名为日本血吸虫 Cyclophilin B 基因 (*Sj* CyPB),将该基因序列提交到 NCBI,登录号为 GQ403665。

以日本血吸虫童虫 cDNA 为模板,PCR 克隆获得含完整开放阅读框的编码基因,其开放阅读框为 672 bp (图 1)。分析表明,该基因编码 243 个氨基酸,推测蛋白分子量为 23.5 kDa。选择分别来自曼氏血吸虫、果蝇、鸡、硬蜱、爪蟾、斑马鱼、小鼠、牛、人、秀丽杆线虫、球虫、家蚕、马来丝虫、海葵、

锥虫 15 个物种的 CyPB 蛋白的氨基酸序列进行多重比对,结果显示:该基因所编码氨基酸序列与曼氏血吸虫的 CyPB 相似性为 84%,与 CyPB 其他物种相似性在 54%~64%之间。这也与 CyPB 基因在不同物种中较为保守,其遗传距离远近与物种的遗传距离远近基本吻合。

### 2.2 *Sj* CyPB 基因的期别差异表达分析

Real-time PCR 分析结果表明,*Sj* CyPB 在日本血吸虫童虫和成虫中均有较高表达 (图 2),其中以 18 d 童虫基因表达量最高,7 d 童虫的基因表达量相对较低 (图 2)。

### 2.3 重组原核表达质粒 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 的构建与原核表达及蛋白纯化

经 PCR、双酶切鉴定和测序,证实 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 重组表达质粒构建成功。重组表达质

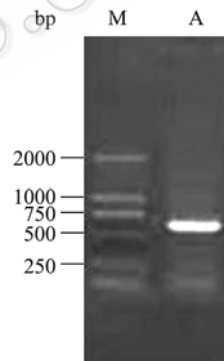


图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of *Sj* CyPB gene. M: DL2000 DNA ladder; A: PCR products of *Sj* CyPB gene.

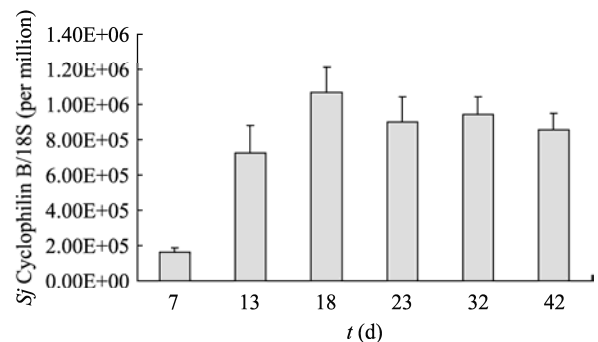


图 2 荧光实时定量 PCR 分析 *Sj* CyPB 基因在日本血吸虫不同阶段虫体的表达情况

Fig. 2 Stage differential expression of *Sj* CyPB in different stages of *Schistosoma japonicum* by real-time PCR. 7 d: 7 days schistosomula; 13 d: 13 days schistosomula; 18 d: 18 days schistosomula; 23 d: 23 days worms; 32 d: 32 days worms; 42 d: 42 days adult worms.

粒 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 在大肠杆菌 BL21 中获得表达, 重组蛋白分子量约为 49.5 kDa, 与预期结果相符。改变诱导剂浓度和诱导表达时间以优化表达条件, 结果显示终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 6 h, 蛋白达到最大表达量。可溶性分析显示: 重组蛋白以包涵体形式存在 (图 3)。将重组蛋白溶解于 8 mol/L 尿素, 以尿素浓度梯度降低的 PBS 逐渐透析至 PBS 中。完成复性, 经过 GST Bind Resin 纯化重组蛋白 (图 4)。

#### 2.4 表达产物抗原性分析

表达的重组蛋白纯化后进行 SDS-PAGE 电泳, 经电转移至 NC 膜上, 用经 pGEX-6P-1/BL21 载体和大肠杆菌菌体蛋白吸附的日本血吸虫全虫抗原免疫

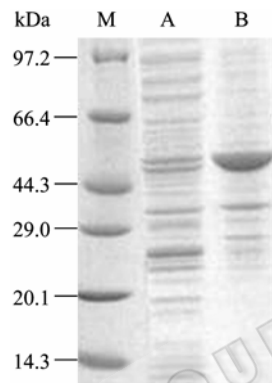


图3 SDS-PAGE 分析 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 重组蛋白的表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression products of pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 in *E. coli*. M: low-molecular protein marker; A: pGEX-6P-1 uninduced with IPTG for 6 h; B: pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 induced with 1 mmol/L IPTG.

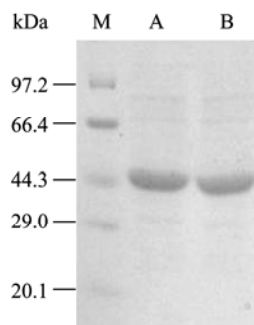


图4 SDS-PAGE 分析 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 纯化的重组蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein of pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 in *E. coli*. M: low-molecular protein marker; A&B: purified recombinant protein of pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 in *E. coli*.

兔血清作一抗, Western blotting 检测, 结果发现有一明显的识别条带, 大小与已知目的条带一致 (图 5), 表明重组表达产物具有良好的抗原性。

#### 2.5 动物免疫试验结果

动物试验结果 (表 1) 表明空白对照组平均每只小鼠载虫数为 21.9 条, 佐剂对照组为 20.91 条, 而免疫组为 15.0 条, 与空白对照组相比, 重组蛋白 *Sj* CyPB 在 Balb/c 小鼠中诱导了 31.50% 的减虫率, *t* 检验分析表明免疫组和空白对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 与佐剂对照组相比, 重组蛋白 *Sj* CyPB 在 Balb/c 小鼠中诱导了 28.26% 的减虫率, *t* 检验分析表明免疫组和佐剂对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。肝脏经消化处理后, 显微镜下进行虫卵计数, 空白对照组平均每克小鼠肝脏虫卵数为 70.768 个, 佐剂对照组为 69.866 个, 而免疫组为 41740.7 个, 与空白对照组相比, 肝脏虫卵数减少 41.01%, *t* 检验分析显示差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 与佐剂对照组相比, 肝脏虫卵数减少 40.25%, *t* 检验分析显示差异显著 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

#### 2.6 血清抗体水平

各组小鼠血清中 *Sj* CyPB 特异性 IgG 抗体的变化见图 6。第 2 次免疫后 7 d 重组抗原免疫组的抗 *Sj* CyPB 特异性 IgG 抗体滴度达到较高水平, 三免后又略有升高, 攻虫 6 周后剖杀动物时抗体水平达到更高水平, 而空白对照组和佐剂对照组 *Sj* CyPB 特异性 IgG 抗体水平在攻击前后一直维持在较低水平, 无明显变化 (图 6)。

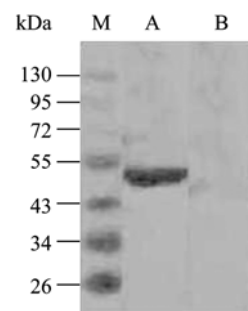


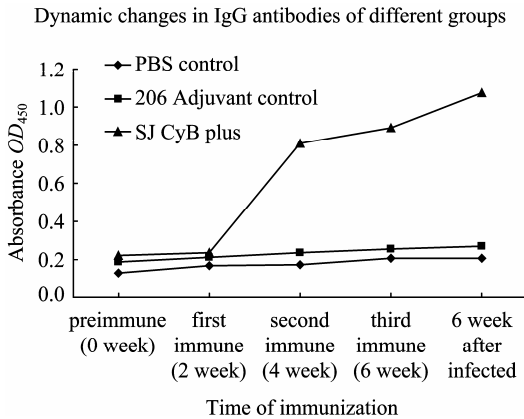
图5 pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of *Sj* CyPB recombinant protein. M: protein marker; A: protein of pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 induced with IPTG; B: purified protein of pGEX-6P-1-*Sj* CyPB/BL21 uninduced with IPTG.

表1 BALB/c 小鼠免疫保护试验结果

Table 1 Worm and egg counting reduction rate induced by *Sj* CyPB in Balb/c mice

Group	Average worm burden ( $x\pm s$ )	Worm reduction rate (%)	<i>P</i> value	Eggs/g liver ( $x\pm s$ )	Liver egg reduction rate (%)	<i>P</i> value
PBS	21.9 $\pm$ 4.94413	—	—	70768 $\pm$ 28327.72	—	—
206 adjuvant	20.91 $\pm$ 7.3818	4.52	>0.05	69866 $\pm$ 35330.36	1.28	>0.05
SjCyB	15.0 $\pm$ 5.56776	31.50	<0.01	41740.7 $\pm$ 16609.72	41.01	<0.01

图6 Balb/c 小鼠血清抗 *Sj* CyPB 抗原特异性 IgG 抗体水平检测结果Fig. 6 Specific IgG level against *Sj* CyPB by ELISA.

### 3 讨论

血吸虫生活史繁杂, 血吸虫在生活史不同阶段的个体形态、发育等有着很大差异, 就其原因, 可能源于日本血吸虫不同发育阶段基因组、转录组及蛋白质水平差异。信号通路相关分子在基因转录、翻译及蛋白修饰等过程中发挥重要的生物学功能, 加强日本血吸虫信号分子的研究, 可为研究寄生虫与宿主相互作用关系和高效的抗日本血吸虫疫苗提供基础<sup>[7-8]</sup>。

Cyclophilin (CyP) 广泛存在, 在不同物种中较为保守。CyP 可结合相关蛋白, 并催化加速其折叠、装配和转运; 特别是可催化富含脯氨酸的蛋白质折叠, 起着分子伴侣的作用; 同时在信号转导中起着重要调节作用<sup>[9]</sup>。本研究克隆的 *Sj* CyPB 基因为 CyP 家族的主要成员, CyPB 存在于内质网, 也存在于高尔基复合体、细胞表面和基质中, 研究表明其在多个物种生物体内发挥着重要的生物学功能, 包括加速蛋白结合及辅助折叠、装配及转运的功能等<sup>[10-11]</sup>, 但在血吸虫中未见有对其功能的详细研究报道。

本研究以 *Sj* CyPB 为研究对象, 克隆了该基因,

将其序列与 *Sm* CyPB 比对, 发现日本血吸虫该基因所编码氨基酸序列与曼氏血吸虫编码氨基酸序列的相似性为 84%, 与其余物种 CyPB 基因的相似性在 54%~64% 之间。该基因编码氨基酸序列与日本血吸虫终末宿主如人、牛 CyPB 的编码氨基酸序列差异较大, 说明有作为潜在疫苗候选分子何药物靶标进行深入研究的可能性。

本研究发现, *Sj* CyPB 在日本血吸虫各个发育阶段发育中均有表达, 其中以 18 d 童虫基因表达量最高, 7 d 童虫的基因表达量相对较低。18 d 童虫及随后阶段虫体在终末宿主体内生长发育较快, 代谢旺盛, 虫体细胞分化迅速, CyPB 基因在该阶段的大量表达, 可能与 CyPB 参与的蛋白加工、修饰、折叠和转运等生物学功能相关, CyPB 基因可能在日本血吸虫生活和生长发育中有着重要的生物学意义。

本研究以日本血吸虫全虫抗原免疫兔血清作为一抗, Western blotting 证实 *Sj* CyPB 重组蛋白具有良好的免疫原性。以 *Sj* CyPB 重组抗原进行小鼠抗原免疫保护试验, 结果表明 *Sj* CyPB 重组抗原在小鼠体内诱导产生部分免疫保护效果, 小鼠成虫荷虫量减少了 31.5%, 肝脏虫卵数减少了 41.01%。以上研究表明, *Sj* CyPB 基因可作为潜在的日本血吸虫疫苗候选分子深入研究。同时, 应用 ELISA 方法检测了试验鼠 *Sj* CyPB 重组抗原特异性 IgG 抗体消长情况, 结果显示重组抗原免疫小鼠产生了特异性 IgG 抗体, 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, 基本上没有变化, 提示 *Sj* CyPB 重组抗原免疫小鼠后诱导产生的体液免疫应答可能在抗血吸虫感染中发挥一定的作用。

本研究克隆了日本血吸虫 *Sj* CyPB 基因, 分析 *Sj* CyPB 在日本血吸虫不同期别的表达情况, 随后在大肠杆菌中进行了表达, 并进行动物免疫保护试验, 验证该基因重组抗原可在机体内诱导产生免疫保护

作用。总之, 本研究对 *Sj* CyPB 基因进行了初步研究, 该基因在血吸虫性别发育中的生物学功能以及其作为抗血吸虫病候选疫苗或药物靶标的潜力仍需进一步深入研究。

## REFERENCES

- [1] Wang LD, Zhou XN, Chen HG, *et al.* A new strategy to control transmission of *Schistosoma japonicum*. *Chin Eng Sci*, 2009, **11**(5): 37-43.  
王陇德, 周晓农, 陈红根, 等. 血吸虫病控制新策略的研究. 中国工程科学, 2009, **11**(5): 37-43.
- [2] Zhou SL, Lin JY, Jiang MS. *Schistosomiasis*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001.  
周述龙, 林建银, 蒋明森. 血吸虫学. 2 版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] Wang XZ, Gobert GN, Feng XG, *et al.* Analysis of early hepatic stage schistosomula gene expression by subtractive expressed sequence tags library. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, **166**(1): 62-69.
- [4] Rycyzyn MA, Reilly SC, O'Malley K, *et al.* Role of Cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *J Mol Endocrinol*, 2000, **14**(8): 1175-1186.
- [5] Chen LY, Yi XY, Zeng XF, *et al.* Expression and immunization of the novel gene *SjF1* of *Schistosoma japonicum*. *Chin J Zoon*, 2004, **20**(6): 467-470.  
陈利玉, 易新元, 曾宪芳, 等. 日本血吸虫新基因 *SjF1* 的克隆、表达及免疫保护效果研究. 中国人兽共患病杂志, 2004, **20**(6): 467-470.
- [6] Zhu Y, Ren J, Harn DA, *et al.* Protective immunity induced with 23 kDa membrane protein DNA vaccine of *Schistosoma japonicum* Chinese strain in infected C57BL/6 mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003, **34**(4): 697-701.
- [7] Liu F, Zhou Y, Wang ZQ, *et al.* The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay. *Nature*, 2009, **460**(7253): 345-351.
- [8] Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, *et al.* Proteomics analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*, 2005, **5**: 511-521.
- [9] Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol*, 2005, **6**(7): 226-230.
- [10] Rycyzyn MA, Reilly SC, O'Malley K, *et al.* Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol Endocrinol*, 2000, **4**(8): 1175-1186.
- [11] Horibe T, Yoshio C, Okada S, *et al.* The chaperone activity of protein disulfide isomerase is affected by cyclophilin B and cyclosporin A *in vitro*. *J Biochem*, 2002, **132**(3): 401-407.