

日本血吸虫蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基基因的克隆、表达及功能分析

洪炆^{1,2}, 韩宏晓^{1,2}, 彭金彪¹, 李晔¹, 石耀军¹, 傅志强¹, 刘金明¹, 李祥瑞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开放实验室, 上海 200241

2 南京农业大学动物医学院, 南京 210095

摘要: 26S 蛋白酶体是一种能够降解大多数内源性蛋白的多亚基复合物, 它的蛋白降解作用能够影响细胞周期、转录控制和其他一些重要的细胞进程。本实验利用 PCR 技术从日本血吸虫 18 d 童虫中首次扩增到蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基基因 (GenBank Accession No. AY813725), 序列分析表明该基因的开放阅读框 (ORF) 含 708 bp, 编码 235 个氨基酸, 理论分子量 25.84 kDa。同源性分析结果显示, 该基因为日本血吸虫蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基, 命名为 *SjPSMA2*。实时定量 PCR 分析显示该基因在 7 d、13 d、18 d、23 d、32 d 和 42 d 虫体中都有表达, 7 d 和 23 d 虫体表达量低于其他几个时期。构建了该基因的原核表达质粒 pET28a(+)-*SjPSMA2*, 在大肠杆菌系统中成功获得了表达, 重组蛋白以包涵体形式存在, Western blotting 显示表达产物能被日本血吸虫成虫粗抗原免疫血清所识别, 并且能检测到天然状态下该蛋白的存在。应用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠后, 诱导产生了较高的特异性抗体水平及 12.33% 的减虫率和 35.23% 的肝脏减卵率。*SjPSMA2* 基因及其表达产物的获得, 为探索蛋白酶体在血吸虫生长发育中的作用提供了重要基础。

关键词: 日本血吸虫; 蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基; 克隆; 表达; 免疫保护

Cloning, expression and characterization of a gene encoding $\alpha 2$ subunit of the proteasome in *Schistosoma japonicum*

Yang Hong^{1,2}, Hongxiao Han^{1,2}, Jinbiao Peng¹, Ye Li¹, Yaojun Shi¹, Zhiqiang Fu¹, Jinming Liu¹, Xiangrui Li², and Jiaojiao Lin¹

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

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The 26S proteasome is a proteolytic complex responsible for the degradation of the vast majority of eukaryotic proteins. Regulated proteolysis by the proteasome is thought to influence cell cycle progression, transcriptional control, and other critical cellular processes. A novel *Schistosoma japonicum* gene (GenBank Accession No. AY813725) proteasome $\alpha 2$ subunit

Received: December 16, 2009; **Accepted:** January 28, 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), National Key Technology Research and Development Program of China (No. 2006BAD06A09).

Corresponding author: Jiaojiao Lin. Tel: +86-021-34293440; 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。

(*SjPSMA2*) was cloned. Sequence analysis revealed that the ORF of *SjPSMA2* gene contains 708 nucleotides encoding 235 amino acids, and the molecular weight was estimated to be 25.84 kDa. Real-time PCR analysis showed that this gene expressed in 7 d, 13 d, 18 d, 23 d, 32 d and 42 d schistosoma. The mRNA level of *SjPSMA2* was lower in 7 d and 23 d schistosomulum than that in other stages. The *SjPSMA2* cDNA fragment was subcloned into an expression vector pET28a(+) and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. After induction with IPTG, the 30 kDa fusion protein was produced as included bodies. Western-blotting revealed that the fusion protein could be recognized by the rabbit serum anti-*Schistosoma japonicum* adult worm antigen preparation, and the protein in native could be detected. After immunization of BALB/c mice with the fusion protein, the reduction rates of worm counts and liver egg counts were 12.33% and 35.23%. ELISA results revealed that the vaccinated group showed a significant increase in the level of IgG antibody. This study provided an important basis for investigating the regulation mechanism of the proteasome during the development of *Schistosoma japonicum*.

Keywords: *Schistosoma japonicum*, proteasome $\alpha 2$ subunit (PSMA2), clone, expression, immunoprotection

血吸虫病 (Schistosomiasis) 是由血吸虫 (Schistosome) 感染引起的一种分布广泛、危害严重的人畜共患寄生虫病。全球有 76 个国家和地区流行血吸虫病, 有 5~6 亿人受到威胁, 约 2 亿人感染血吸虫病^[1]。

我国血吸虫病的防治虽然已经取得了巨大成就, 但是全面控制血吸虫病传播的前景仍不容乐观。吡喹酮自问世以来, 以其高效、低毒、使用方便、价格低廉等优点在血吸虫病临床治疗和防治工作中得到广泛应用, 并成为目前治疗血吸虫病的唯一药物, 20 多年来, 未见有新的治疗血吸虫病的药物出现^[2]。然而, 近年来曼氏血吸虫已经有吡喹酮抗性虫株的报道^[3], 耐药虫株的出现引起了人们的不安与高度关注。因此, 加强抗血吸虫高效疫苗的开发和新药物靶标的筛选显得格外重要。

血吸虫童虫是在宿主体内发育早期阶段的虫体, 也是虫体发育的关键阶段, 虫体比较脆弱, 容易受到外界影响和宿主免疫系统的攻击。血吸虫在终宿主体内从尾蚴发育到成虫, 在形态和生理上都发生了很大的变化, 这些变化的实现是以蛋白合成、降解途径的正常进行为基础的。假如在童虫阶段对血吸虫的蛋白降解途径进行人为干预, 则有可能使血吸虫在宿主体内的蛋白降解途径受阻, 继而对血吸虫之后的生长发育产生重要影响, 对控制血吸虫病有着重要的意义, 同时也可作为抗血吸虫疫苗和潜在药物靶标的研究提供基础。

近几年, 有个别学者对曼氏血吸虫蛋白酶体进行了研究^[4-6], 并认为它在曼氏血吸虫的生长发育中具有重要作用。但对日本血吸虫蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基基

因的研究国内外尚未有报道, 对其在日本血吸虫发育和生存中的作用还是了解甚少。本研究室在前期构建的 7 d 童虫消减 cDNA 文库中, 获得了一个 EST 序列, 经生物信息学分析命名为日本血吸虫蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基基因 (*SjPSMA2*), 本实验利用 PCR 技术首次克隆到编码日本血吸虫蛋白酶体 $\alpha 2$ 亚基含 ORF 的 cDNA 序列, 分析了该基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体中的表达情况, 应用大肠杆菌系统表达了该基因, 测定了表达产物的抗原性并在 BALB/c 小鼠中进行了动物免疫保护试验。

1 材料和方法

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、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I、SYBR Green I、EASY Dilution 购自 TaKaRa 生物工程 (大连) 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; 四甲基联苯胺 (TMB) 购自天根生化科技 (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; 山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 购自上海鼎国生物工程公司。

1.1.2 菌种、质粒、实验动物、寄生虫及血清

pET-28a(+) 质粒、大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由本实验室保存; BALB/c 小鼠 (雄性, 20~25 g)、新西

兰白兔 (雄性, 2.5~3 kg) 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科院上海兽医研究所钉螺室提供; 日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清由本实验室制备。

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、8000、5000、2000 条血吸虫尾蚴, 在感染后 7 d、13 d、18 d、23 d、32 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 的提取

取液氮中冻存的 7 d、13 d、18 d、23 d、32 d 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

首先从本实验室构建的 7 d 童虫消减 cDNA 文库中, 获得一个 EST 序列, 以此序列为询问序列, 在日本血吸虫 EST 库中搜索到 1 个日本血吸虫的相应 EST 片段 (GenBank Accession No. AY813725)。根据该 EST 序列设计特异引物, 应用 PCR 技术进行 cDNA 片段的扩增。上游引物 FP: 5'-ATGGATCCATGAGCGAACGGTA-3' (下划线处为 *Bam*H I 酶切位点); 下游引物 RP: 5'-GCGTTCGACTTATGGTATAGCTG-3' (下划线处为 *Sal* I 酶切位点), 由上海英骏生物技术有限公司合成。取 1 μ L 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 纯化后亚克隆至 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, 提取质粒进行双酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pMD19-T-*SjPSMA2*, 并送英骏生物技术有限公司测序。

1.2.4 生物信息学分析

将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行同源性比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 DNASTar 软件分析确定基因的读码框, 并对氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子质量 (Mr)、理论等电点等参数进行分析。利用 ProtScale 软件 (www.expasy.ch/

[tools/pscale](http://www.expasy.ch/)) 进行蛋白质的疏水性分析。利用 Clustalw 软件对不同物种 PSMA2 蛋白进行多重比对。抗原肽位点分析利用 DNAMAN 软件, 蛋白的跨膜区预测利用 DAS 软件 (<http://www.sbc.su.se/miklos/DAS/>), 信号肽预测利用 SignalP 软件 (www.cbs.dtu.dk/services/Signalp/)。

1.2.5 荧光实时定量 PCR

选择血吸虫持家基因 18S rRNA 为内参^[7]。将提取的 7 d、13 d、18 d、23 d、32 d 及 42 d 虫体总 RNA, 去除基因组 DNA 后利用随机引物合成 cDNA 第一链。*SjPSMA2* 荧光定量 PCR 引物: FP: 5'-CAGTCTGTGGTGTTCGG-3', RP: 5'-GTCCTAATGCAGTAGCTTTCC-3', 扩增 *SjPSMA2* 基因片段长度为 133 bp; 18S rRNA 荧光定量 PCR 引物 FP: 5'-GCAAACGTTCATCACCG-3', RP: 5'-CAATCCAACGACCTCACTAA-3', 片段扩增长度 172 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。采用荧光染料法进行实时定量 PCR, 反应体系包括: 2 \times SYBR Premix Ex *Taq*TM 10 μ L, 10 μ mol/L Forward Primer 0.4 μ L, 10 μ mol/L Reverse Primer 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, 模板 cDNA 1.0 μ L, 共 20 μ L。反应参数: 95 $^{\circ}$ C 10 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环, 其中 72 $^{\circ}$ 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 Corbett Research 公司 Rotor-Gene 软件进行计算分析, 以 18S rRNA 为内参标准化反应结果, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量。

1.2.6 重组表达质粒的构建

根据 *SjPSMA2* 基因的 cDNA 序列设计引物, 在其扩增序列的 5'端和 3'端分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点, 通过 PCR 扩增得到含完整 ORF 的 *SjPSMA2* 基因序列, 将该序列定向克隆于原核表达载体 pET28a(+) 的多克隆位点区, 构建重组质粒 pET28a(+)-*SjPSMA2*, 并转化表达宿主菌 BL21。

1.2.7 pET28a(+)-*SjPSMA2* 在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的 pET28a(+)-*SjPSMA2*/BL21 接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养, OD₆₀₀ 为 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 并确定最佳诱导时间和相关的表达条件。在判定其表达状况后, 将以包涵体形式存在的重组蛋白溶解于 8 mol/L 尿素,

以 Ni-NTA HisBind Resin 纯化, 随后以含 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、1 mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 逐步透析, 完成复性。

1.2.8 Western blotting 检测

将纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 用经 pET28a(+)/BL21 大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清和免疫的 BALB/c 小鼠血清作一抗, 分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 为二抗, TMB 作为底物进行显色。

将 42 d 日本血吸虫虫体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 用免疫的 BALB/c 小鼠血清作一抗, 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, TMB 作为底物进行显色。

1.2.9 ELISA 检测免疫小鼠血清抗 SjPSMA2 重组蛋白特异性 IgG 抗体水平

将 30 只 BALB/c 小鼠随机分为 SjPSMA2+206 佐剂组、206 佐剂组、PBS 组, 每组 10 只, 重组蛋白 SjPSMA2 的注射剂量为每次每鼠 20 μ g, 共免疫 3 次, 每次间隔 20 d。各免疫组小鼠分别在免疫前 1 周和每次免疫后 2 周采血, 使用间接 ELISA 方法检测抗体水平。

1.2.10 小鼠减虫率和减卵率计算

末次免疫 2 周后, 每只小鼠用腹部盖玻片法感染尾蚴 (30 \pm 1) 条。攻击尾蚴后 6 周解剖小鼠, 肝门静脉冲洗法收集成虫记数, 同时收集每只小鼠的肝脏。称取肝组织 0.5 g, 剪碎后加 5% NaOH 10 mL, 组织匀浆器匀浆, 放 56 $^{\circ}$ C 水浴消化 1 h, 混匀, 吸取 20 μ 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 - 免疫组平均虫荷数 / 对照组平均虫荷数) \times 100%;

减卵率 = (1 - 免疫组 EPG / 对照组 EPG) \times 100%。

2 结果

2.1 SjPSMA2 基因的克隆及生物信息学分析

本研究在对本实验室构建的 7 d 童虫消减 cDNA 文库克隆生物信息学分析^[8]的基础上, 挑选出一个

EST 序列并对其进行了深入研究。设计特异引物, 应用 RT-PCR 技术扩增获得一个含完整开放阅读框的基因片段。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 PSMA2 家族蛋白具有高度同源性, 具有十分典型的 PSMA2 蛋白特征。选择来自曼氏血吸虫、鲑疮痲鱼虱、鲍鱼、裂喉大马哈鱼、褐家鼠、盐湖鲑鱼、鲑、人 (GenBank Accession No. 分别为 CAZ34242.1、ACO11852.1、ABO26645.1、ACO08660.1、AAH60576.1、ACM08632.1、NP_001019612.1、BAD96696.1) 9 个物种的 PSMA2 蛋白进行氨基酸序列的多重比对。结果显示, 该基因所编码的氨基酸序列与曼氏血吸虫的 PSMA2 相似性最高, 达到 96% (E Value=5e-131), 与人 PSMA2 的相似性为 73%, 其余相似性都在 73%~74% 之间 (图 1)。据此, 推测该基因编码的蛋白为日本血吸虫 PSMA2 蛋白, 命名为日本血吸虫 PSMA2 (SjPSMA2)。

对该基因编码的氨基酸序列进行生物信息学分析结果表明, SjPSMA2 基因的 ORF 为 708 bp, 编码 235 个氨基酸, 理论分子量为 25843.34 Da, 理论等电点为 5.62。该氨基酸序列的 N 端不具有信号肽, 也不存在跨膜结构, 疏水性区域分布比较均匀, 并且具有多个抗原肽位点, 有良好的免疫原性。

2.2 SjPSMA2 基因的期别表达分析

Real time PCR 分析结果表明, SjPSMA2 在日本血吸虫的 7 d、13 d、18 d、23 d、32 d 和 42 d 虫体中都有表达, 其中 42 d 虫体表达量最高, 7 d 和 23 d 童虫表达量较低 (图 2)。

2.3 SjPSMA2 基因在大肠杆菌中的表达及蛋白纯化

重组表达质粒 pET28a(+)-SjPSMA2 在大肠杆菌 BL21 中获得表达, 并且在诱导后 5 h 的表达量最高。SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组蛋白分子量约为 30 kDa, 与预期结果相符 (预测分子量约为 25.843 kDa, 载体表达蛋白大约 4 kDa)。重组蛋白以包涵体形式存在, 溶解于含 8 mol/L 尿素的 PBS。经过 Ni-NTA 树脂纯化后, 获得了较纯的重组蛋白, 经过 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、1 mol/L 尿素的 PBS 及 PBS 逐步透析, 完成重组蛋白的复性 (图 3)。

```

SjPSMA2 : -MSERYSPSLTTFSPSGKLVQIEYALKAVESGAEVSGIRAAANGVVLAAVKKFTSKLMDDESTVSKIEQITNGICGMVYSGLS : 79
SmPSMA2 : -MSERYSPSLTTFSPSGKLVQIEYALKAVEAGAEVSGIRAAANGVVLAAVKKFTSKLMDDESTVTKIEQVTKGICGMVYSGLS : 79
LsPSMA2 : MASERYSPSLTTFSPSGKTLVQIEYALKAVISGAASVGIKASNGVVLATEKKKRSSEHEEHSIHKLEEBSSNIGMTYSGMG : 80
HdPSMA2 : -MTERYSFSLTTFSPSGKLVQIEYALAVGAGAEVSGIRATNGVVLATEKKORSVLYDDEHSINKVVESTTKNIGMVYSGMG : 79
DrPSMA2 : MAERGYSPSLTTFSPSGKLVQIEYALAVAGAEVSGIKASNGVVLATEKKORSILYDEQSVHKVEPLTKKHIGMVYSGMG : 80
SsPSMA2 : MGERGYSFSLTTFSPSGKLVQIEYALSVAAGAEVSGIKASNGVVLATEKKORSILYDETSVHKVEMITKKHIGMVYSGMG : 80
OmPSMA2 : MGERGYSFSLTTFSPSGKLVQIEYALSVAAGAEVSGIKASNGVVLATEKKORSILYDETSVHKVEMITKKHIGMVYSGMG : 80
RnPSMA2 : MAERGYSPSLTTFSPSGKLVQIEYALAVAGAEVSGIKAAANGVVLATEKKORSILYDETSVHKVEMITKKHIGLVYSGIG : 80
HsPSMA2 : MAERGYSPSLTTFSPSGKLVQIEYALAVAGAEVSGIKAAANGVVLATEKKORSILYDETSVHKVEMITKKHIGLVYSGMG : 80

SjPSMA2 : PDYRVLVKQARKSSQAYQLAYGEFISPEBOLVIRIAAVMQEYTSGGVRFPGVSLLVAGWDRDLORPELYOCGSPSGYFFPW : 159
SmPSMA2 : PDYRVLVKQARKSSQAYQLAYGEFISPEBOLVIRIAAVMQEYTSGGVRFPGVSLLVAGWDRDLORPELYOCGSPSGYFFPW : 159
LsPSMA2 : PDYRLLVRKARKMSEBYTMTIYGERIPTSOLVARVAVDMQEYTHSGGVRFPGVSLLVAGWDEEANKPYLEOCGSPSGAYFAW : 160
HdPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDEDEEKELIYOCGSPSGAYFAW : 159
DrPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDED--RPLYEQSDPSGAYFAW : 158
SsPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDDD--HPLYEQSDPSGAYFAW : 158
OmPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDDD--HPLYEQSDPSGAYFAW : 158
RnPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDDD--RPLYEQSDPSGAYFAW : 158
HsPSMA2 : PDYRVLVRRARKLAQOYFLVYQEQIPTAQLVGRVAVVMQEQETSGGGVRFPGVSLLVAGWDDD--RPLYEQSDPSGAYFAW : 158

SjPSMA2 : KATALGONSQNGKSFLEKRYNENLELEDATHAAILTLKESFEGQMTENNIEVGCNENGFNILLSEEVKDYLAALP- : 235
SmPSMA2 : KATALGONSQNGKSFLEKRYNENLELEDATHAAILTLKESFEGQMTESNIEVGCNENGFNILLSDEVKDYLAALP- : 235
LsPSMA2 : KATAMGNFVNGKTFLEKRYDDSVLEDAVHTAAILTLKESFEGQMTENHIEITGICNAQGFRLSFTDVKDYLANVTV : 237
HdPSMA2 : KATAMGRNQINGKTFLEKRYSESELEDAVHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEITGICNKDGPRLSFTDVKDYLASVS- : 235
DrPSMA2 : KATAMGRNVYNGKTFLEKRYNEDLEDAHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEVGCNEAGFRRLTAEVKDYLAALP- : 234
SsPSMA2 : KATAMGRNVYNGKTFLEKRYNVDLEDAHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEVGCNEAGFRRLTAEVKDYLAALP- : 234
OmPSMA2 : KATAMGRNVYNGKTFLEKRYNVDLEDAHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEVGCNEAGFRRLTAEVKDYLAALP- : 234
RnPSMA2 : KATAMGRNVYNGKTFLEKRYNEDLEDAHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEVGCNEAGFRRLTAEVKDYLAALP- : 234
HsPSMA2 : KATAMGRNVYNGKTFLEKRYNEDLEDAHTAAILTLKESFEGQMTEDNIEVGCNEAGFRRLTAEVKDYLAALP- : 234
    
```

图 1 不同物种 PSMA2 基因氨基酸序列的同源性分析

Fig. 1 Homology analysis of the amino sequences of magonashi gene among difference species.

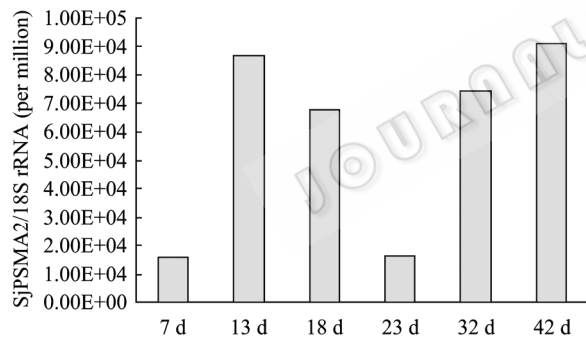


图 2 荧光实时定量 PCR 分析 Sj PSMA2 基因在日本血吸虫不同阶段虫体的表达情况

Fig. 2 Stage differential expression of Sj PSMA2 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.

2.4 表达产物抗原性的鉴定

以重组表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 经电转移至 NC 膜上, 分别用经 pET28a(+)/BL21 大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清和免疫的 BALB/c 小鼠血清作一抗进行 Western blotting 分析, 结果在 30 kDa 处有一明显的识别条带 (图 4A、B), 表明重组表达产物蛋白具有良好的抗原性。

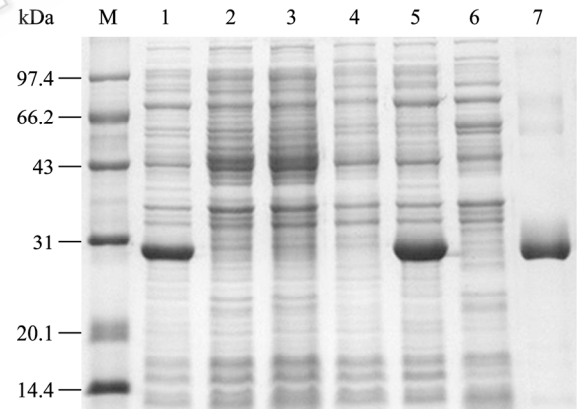


图 3 SDS-PAGE 分析 pET28a(+)-SjPSMA2/BL21 的蛋白表达情况

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of pET28a(+)-SjPSMA2/BL21 in *E. coli*. M: low-molecular protein marker; 1, 2: total extract of a clone after and before induction with 1 mmol/L IPTG; 3, 4: total extract of pET28a(+) after and before induction with 1 mmol/L IPTG; 5, 6: inclusion bodies and supernatant after lysis, respectively; 7: rSjPSMA2 purified through Ni²⁺-charged column chromatography and after dialysis.

将 42 d 日本血吸虫虫体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 用免疫的 BALB/c 小鼠血清作一抗进行 Western blotting 分析, 结果在 26 kDa 处有一明显的识别条带 (图 4C), 这与生物信息学分析的结果一致。

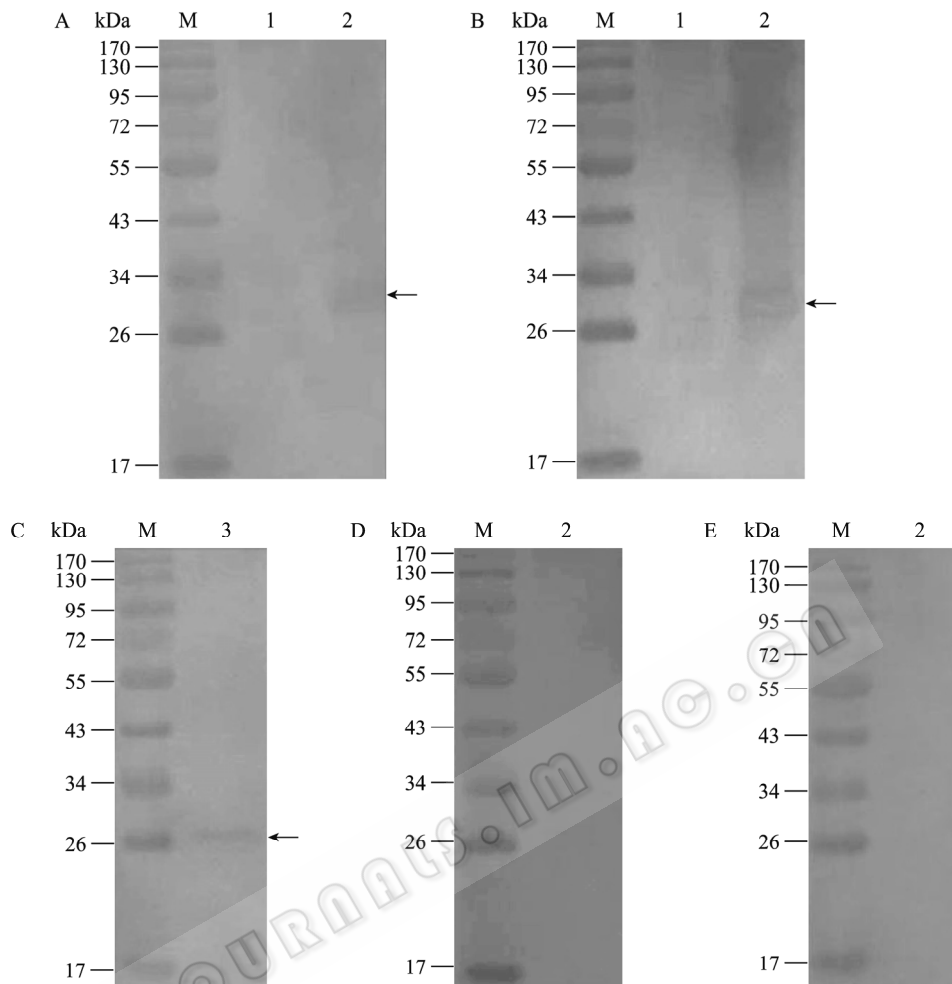


图 4 pET28a(+)-SjPSMA2 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of *SjPSMA2* expression product. M: marker; 1: expressed product of pET28a(+)-*SjPSMA2* uninduced. 2: expressed product of pET28a(+)-*SjPSMA2* induced with IPTG; 3: 32-day-old adult worm crude extracts. (A) Recombinant protein was probed with the serum from rabbit immunized with *Schistosoma japonicum* adult worm antigen preparation; (B, C) Recombinant protein was probed with mouse serum against SjPSMA2. (D) Recombinant protein was probed with the serum from mice immunized with PBS. (E) Recombinant protein was probed with the serum from mice immunized with 206 adjuvant.

2.5 BLAB/c 小鼠血清抗 SjPSMA2 特异性 IgG 抗体的检测

用间接 ELISA 方法检测各组小鼠血清中抗 SjPSMA2 特异性 IgG 抗体变化, 试验结果表明, SjPSMA2 免疫组小鼠在第 1 次免疫后就检测到较高水平的特异性抗 SjPSMA2 蛋白的 IgG 抗体, 在第 2 次免疫后特异性 IgG 抗体滴度进一步升高, 但变化很小, 第 3 次免疫后达到最高。攻击尾蚴后至解剖, 特异性抗体基本保持不变。佐剂对照组及空白对照组在整个实验过程中抗 SjPSMA2 的特异性 IgG 抗体滴度均未出现明显的变化 (图 5)。

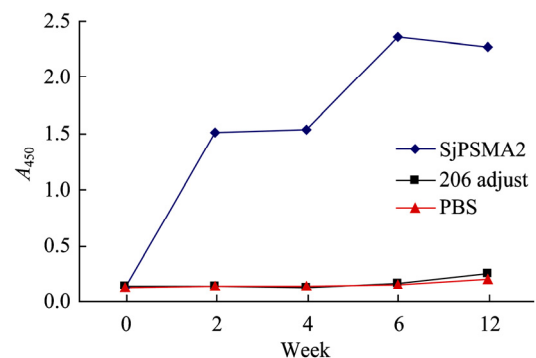


图 5 BALB/c 小鼠血清抗 SjPSMA2 抗原特异性 IgG 抗体水平检测结果

Fig. 5 Specific IgG level against SjPSMA2 in the sera of BALB/c mice by ELISA.

表 1 BALB/c 小鼠免疫保护试验结果

Table 1 Worm and egg counting reduction rate induced by SjPSMA2 in BALB/c mice

| Group | Average worm burden ($\bar{x} \pm s$) | Percent reduction in worm burden (%) | P value | EPG | Percent reduction in liver egg count (%) | P value |
|--------------|---|--------------------------------------|---------|----------------------|--|---------|
| PBS | 21.9 \pm 4.94 | — | — | 70768 \pm 28327.72 | — | — |
| 206 adjuvant | 20.9 \pm 7.38 | 0.05% | >0.05 | 69866 \pm 35330.36 | 1.28% | >0.05 |
| SjPSMA2 | 19.2 \pm 4.46 | 12.33% | <0.05 | 45833 \pm 26166.14 | 35.23% | <0.05 |

2.6 免疫保护效果

疫苗免疫保护效果见表 1。与 PBS 对照组相比, 重组蛋白 SjPSMA2 在 BALB/c 小鼠中诱导了 12.33% 的减虫率, 35.23% 的肝组织减卵率, 差异都显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

蛋白酶体(Proteasome) 是一种从真菌到动物细胞中广泛存在的^[9], 具有多催化活性的多亚基大分子复合物, 在细胞内降解多种短半衰期蛋白、错误折叠蛋白和核蛋白的细胞器, 参与细胞周期、特异性基因转录、抗原处理、分泌、膜蛋白的定位和蛋白质的质量监控等许多重要的过程。蛋白酶体依赖 ATP 对泛素化的内源性蛋白质进行降解, 它是由沉降系数为 19S 的调节复合物 (PA700) 结合在 20S 催化核心的两端而成。19S 调节复合物主要起识别泛素化蛋白质^[10]和调节蛋白酶体生物活性的作用^[9]; 20S 催化核心是降解蛋白质的核心部分, 它是由 4 个圆环叠成的圆筒状颗粒, 每个圆环包含 7 个亚基, 两外环由 7 个不同的 α 亚基组成, 而两内环则由 7 个不同的 β 亚基组成^[11-12]。

本实验所克隆的 SjPSMA2 是蛋白酶体诸多亚基中的成员之一。泛素-蛋白酶体途径是细胞内除溶酶体途径之外主要的蛋白降解途径。在泛素依赖性的蛋白降解途径中, 绝大多数底物的降解要先与多个泛素分子共价结合进行降解标记, 泛素偶联的蛋白被蛋白酶体识别并迅速降解。蛋白酶体广泛地存在于酵母、果蝇、吸虫以及小鼠等生物中, 但至今对日本血吸虫蛋白酶体的研究国内外还没有报道。蛋白酶体的 α 亚基既可以自身装配成环, 也为 β 环装配所必需, 并提供了蛋白酶体活化因子 PA700 和 PA28 的结合位点; 同时 α 亚基位于 20S 蛋白酶体的

入口处, 一方面能控制蛋白质的进入, 另一方面又能阻止部分水解的底物从活性位点释放, 这些都说明 α 亚基可能在蛋白酶体的结构和功能中起着重要的作用。血吸虫从尾蚴侵入终宿主体内到发育为成虫, 在大小、形态、生物学和生理学等方面都发生了很大变化, 这些变化的实现以大量内源性蛋白的降解为基础, 而蛋白酶体又在这一过程中起着重要的作用。通过对蛋白酶体结构和功能的深入研究, 了解各亚基的作用及相互之间的关系, 将会对整个蛋白酶体在血吸虫蛋白降解、生长发育中所起的作用有更深认识。因此, SjPSMA2 基因的成功克隆表达具有重要意义。

研究已表明, 蛋白酶体在寄生原虫的发育过程中是非常重要的。Shaw 等^[13]用蛋白酶体抑制剂乳胞素、MG-132 作用弓形虫, 虫体的生长很快受到抑制, 而它的子代芽孢的形成和释放也受到阻碍; Diego 等^[14]用乳胞素处理克氏锥虫, 能够阻止其从有鞭毛体转变为无鞭毛体; Makioka 等^[15]用乳胞素处理内阿米巴原虫, 发现其包囊期被阻断; Lindenthal 等^[16]报道, 用乳胞素处理过的疟原虫, 从红细胞外进入到红细胞内的过程被阻断。对曼氏血吸虫的研究表明, 通过使用蛋白酶体抑制剂^[5]或者进行 RNAi^[6]敲除蛋白酶体的一个亚基, 都能明显地阻断蛋白降解的途径, 从而导致曼氏血吸虫在体外和宿主体内不能进一步发育。因此, 如果通过人为干预抑制 $\alpha 2$ 亚基的表达或者以该亚基作为药物靶标, 是否会引起蛋白酶体 20S 催化核心结构发生改变, 进而影响其功能的发挥, 不能正常的进行蛋白降解, 并使血吸虫的生长发育受到抑制, 从而减轻血吸虫病病理损伤及减少传染源扩散。

本实验的研究结果表明 SjPSMA2 基因在日本血吸虫感染宿主后第 7、13、18、23、32、42 天都有

表达, 在 13 d 到 18 d 这个阶段表达水平都比较高, 这个时期正好是日本血吸虫个体大小变化较大的阶段, 蛋白代谢比较旺盛, 在 32~42 d 这个阶段, 虫体逐步发育成熟并且开始产卵, 新陈代谢旺盛, 该基因的表达变化特点可能与血吸虫生长发育和繁殖有一定的关系, 从侧面揭示了 *SjPSMA2* 基因在血吸虫生长发育中的重要作用。Western blotting 结果表明该重组表达产物具有良好的抗原性, 用 *SjPSMA2* 重组抗原免疫 BALB/c 小鼠后, 可诱导小鼠体内的抗重组抗原的特异性 IgG 抗体迅速产生, 并且维持在一个较高的水平。初步动物免疫实验表明, 用重组蛋白免疫诱导了 12.33% 的减虫率和 35.23% 的肝组织减卵率。特异性抗体在杀伤虫体中可能起了一定的作用, 也暗示该重组蛋白具有发展为抗血吸虫病候选疫苗及新药靶的潜力和深入研究的价值。

本研究首次克隆和表达了 *SjPSMA2* 基因, 为探索蛋白酶体在血吸虫蛋白代谢、生长发育、繁殖过程中所起的作用以及开发高效的抗血吸虫病疫苗和筛选新型的抗血吸虫药物都奠定了重要基础。

REFERENCES

- [1] Engels D, Chitsulo L, Montresor A, *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*, 2002, **82**(2): 139–146.
- [2] Cioli D. Chemotherapy of *Schistosomiasis*: an update. *Parasitol Today*, 1998, **14**(10): 418–422.
- [3] Ismail M, Metwally A, Farghaly A, *et al.* Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **55**(2): 214–218.
- [4] Ram D, Ziv E, Lantner F, *et al.* Interaction of the proteasome S5a/Rpn10 multiubiquitin-binding protein and the 8 kDa calcium-binding protein of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 2003, **127**(4): 337–347.
- [5] Guerra-Sa R, Castro-Borges W, Evangelista EA, *et al.* *Schistosoma mansoni*: functional proteasomes are required for development in the vertebrate host. *Exp Parasitol*, 2005, **109**(4): 228–236.
- [6] Joseph FN, Fouad ES, Nicholas P, *et al.* The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. *Exp Parasitol*, 2007, **117**(3): 337–347.
- [7] Hoffmann KF, Johnston DA, Dunne DW. Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biol*, 2002, **3**(8): 1–12.
- [8] 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.
- [9] Coux O, Tanaka K, Goldberg F. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem*, 1996, **65**: 801–847.
- [10] Van Nocker S, Deveraux Q, Rechsteiner M, *et al.* *Arabidopsis* MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(2): 856–860.
- [11] Grziwa A, Baumeister W, Dahlmann, *et al.* Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett*, 1991, **290**(1/2): 186–190.
- [12] PuNer G, Weinkauff S, Bachmann L, *et al.* Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO*, 1992, **11**(4): 1607–1616.
- [13] Shaw MK, He CY, Roos DS, *et al.* Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 2000, **121**(1): 35–47.
- [14] De Diego JL, Katz JM, Marshall P, *et al.* The ubiquitin-proteasome pathway plays an essential role in proteolysis during *Trypanosoma cruzi* remodeling. *Biochemistry*, 2001, **40**(4): 1053–1062.
- [15] Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, *et al.* Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res*, 2002, **88**(5): 454–459.
- [16] Lindenthal C, Weich N, Chia YS, *et al.* The proteasome inhibitor MLN-273 blocks exoerythrocytic and erythrocytic development of *Plasmodium* parasites. *Parasitology*, 2005, **131**(1): 37–44.