

日本血吸虫 SjRAD23 基因的克隆表达及基因重组抗原的免疫保护效果

李长健^{1,2}, 张旻², 洪炆², 韩艳辉², 曹晓丹², 韩宏晓², 傅志强², 朱传刚², 陆珂², 李浩², 林矫矫²

1 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234

2 中国农业科学院上海兽医研究所 农业部寄生虫重点实验室, 上海 200241

李长健, 张旻, 洪炆, 等. 日本血吸虫 SjRAD23 基因的克隆表达及基因重组抗原的免疫保护效果. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1669-1678.

Li CJ, Zhang M, Hong Y, et al. Cloning, expression and protective efficacy evaluation of radiation sensitive protein 23 (RAD23) from *Schistosoma japonicum*. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1669-1678.

摘要: 辐射敏感蛋白 23 具有核苷酸切除修复功能, 在泛素蛋白酶体途径中起到重要作用。本研究利用 PCR 技术克隆了日本血吸虫辐射敏感蛋白 23 (SjRAD23) 编码的 cDNA 序列, 成功获得 SjRAD23 的基因序列, 其 ORF 为 1 053 bp。构建 SjRAD23 基因重组表达质粒 pET28a(+)-SjRAD23, 并在大肠杆菌 BL21 中成功诱导表达, 重组蛋白在上清和沉淀中都有存在。利用免疫组化技术检测该蛋白在虫体的分布情况, 该蛋白广泛分布在日本血吸虫虫体被膜。用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠后, 免疫小鼠血清中检测到较高水平的特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a。Western blotting 分析显示重组蛋白能够被日本血吸虫成虫可溶性抗原免疫小鼠血清所识别。用重组蛋白 rSjRAD23 免疫结果与 206 佐剂对照组比较, rSjRAD23 在 BALB/c 小鼠中诱导了 35.94% 减虫率, 40.59% 肝脏减卵率。结果表明 SjRAD23 具有作为疫苗候选分子的潜力。

关键词: 日本血吸虫, 辐射敏感蛋白 23, 表达, 免疫保护, 疫苗候选分子

Received: February 19, 2014; **Accepted:** April 25, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31172315, 81271871), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No. 12140902700), Basic Scientific Research Operation Cost of State-level Public Welfare Scientific Research Courtyard (No. 2013JB18), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2012M510630)

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), 上海市科技发展基金 (No. 12140902700), 中国农业科学院院长基金 (No. 2013JB18), 中国博士后科学基金 (No. 2012M510630) 资助。

Cloning, expression and protective efficacy evaluation of radiation sensitive protein 23 (RAD23) from *Schistosoma japonicum*

Changjian Li^{1,2}, Min Zhang², Yang Hong², Yanhui Han², Xiaodan Cao², Hongxiao Han², Zhiqiang Fu², Chuangang Zhu², Ke Lu², Hao Li², and Jiaojiao Lin²

1 College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

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

Abstract: Radiation sensitive protein 23 (RAD23) is a nucleotide excision repair (NER) protein that plays an important role in Ubiquitin-proteasome pathway (UPP). *Schistosoma japonicum* radiation sensitive protein23 (SjRAD23) cDNA sequences were amplified by PCR and cloned into pET28a (+) vector to construct recombinant expression plasmid pET28a (+)-SjRAD23. The recombinant protein was expressed as both inclusion bodies and the supernatant in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell. Immunofluorescence observation shows that SjRAD23 was mainly distributed on the tegument surface of the worms. ELISA assay reveals that specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies could be detected in the sera of rSjRAD23 immunized mice. Western blotting analysis shows that the recombinant SjRAD23 could be recognized by serum specific to soluble adult worm antigen of *S. japonicum*. BALB/c mice vaccinated with rSjRAD23 combined with 206 adjuvant revealed 35.94% worm reduction and 40.59% liver egg reduction when compared with that of the adjuvant control group. This study suggests that rSjRAD23 has the potential as a vaccine against schistosome infection.

Keywords: *Schistosoma japonicum*, SjRAD23, expression, immunoprotection, vaccine candidate

血吸虫病 (Schistosomiasis) 是由血吸虫感染引起的一种慢性寄生虫病, 危害严重, 是我国重要的公共卫生问题之一。被世界卫生组织认定为具有社会经济破坏的寄生虫病, 流行于全球 70 多个国家和地区, 约 6 亿人生活在有感染危险的环境中, 深受其害^[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, 流行于我国的是日本血吸虫。虽然半个多世纪以来, 我国血吸虫病防治取得巨大成就, 但该病防治形势依然严峻。在血吸虫病治疗方面, 目前唯一大规模使用的治疗药物是吡喹酮, 有研究表明在长期使用吡喹酮的情况下, 可以产生对中国大陆株血吸虫的抗药

性^[3-4]。所以, 如果有有效的疫苗再结合药物治疗, 可能会给防治血吸虫病带来更为理想的防治效果^[5-6]。

泛素是一类低分子量的蛋白质, 泛素化是指泛素分子在一系列特殊的酶作用下, 将细胞内的蛋白质分类, 从中选出靶蛋白分子, 并对靶蛋白进行特异性修饰的过程^[7]。泛素化是真核细胞中广泛存在的蛋白修饰方式, 在蛋白质的定位、代谢、调节和降解中都起着十分重要的作用。同时, 它也参与了细胞增殖、凋亡、分化、转录调节、基因表达、损伤修复、信号传递、炎症免疫等几乎一切生命活动的调控^[8-9]。RAD23 是蛋白泛素化过程中的配体蛋白, 具有

泛素连接酶 E3 的功能,其 C 末端具有泛素相关基序 (Ubiquitin-associated motif, UBA),能够与多泛素蛋白链相结合,同时也在 N 端具有一泛素样结构域 (Ubiquitin-like domain, UBL),能够指引配体蛋白和底物蛋白进入蛋白酶体,蛋白酶体可以识别多泛素化修饰的底物蛋白,进而促使泛素化修饰的底物蛋白进入蛋白酶体进而被降解^[10]。此外, Rad23 蛋白还可能保护多泛素蛋白侧链免遭泛素蛋白水解酶的降解作用。同时,泛素化相关蛋白能够借助 RAD23 蛋白的作用使糖蛋白去糖基化。由于 RAD23 在泛素化过程中起到重要作用,所以 RAD23 参与重要的生命活动的调控^[11]。尽管 RAD23 在其他物种已有相关报道,但关于日本血吸虫 RAD23 蛋白尚未报道。

我们实验室在日本血吸虫蛋白质组学中鉴定到辐射敏感蛋白 (SjRAD23)。本研究根据 NCBI 数据库中的日本血吸虫辐射敏感蛋白 (SjRAD23) 基因序列 (GI:226470141) 克隆表达了 SjRAD23 基因,通过 Western blotting、ELISA 及动物保护实验评估了 SjRAD23 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 实验动物与寄生虫

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实验室提供;雄性 (SPF) 6-8 周龄 BALB/c 小鼠购自上海史莱克动物实验中心;新西兰大白兔 (雄性 2.0-3.5 kg) 购自上海罗径飞达动物实验中心。

1.1.2 主要试剂和菌种

206 佐剂为 SEPPIC 公司的 QP239129;限

制性内切酶 *Xho*、*Bam*H、T4 DNA 连接酶、*Ex Taq* Hot Start DNA 聚合酶、pMT19-T 载体等购自 TaKaRa 生物工程有限公司;DNA marker DL2 000、DL5 000 小量质粒抽提试剂盒和 DAB 底物显色液,感受态大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3),购于上海天根生物科技有限公司;QIAquick[®] Gel Extraction Kit 购自 Qiagen 公司;Agarose、DEPC、DNA ladder、Bradford Reagent 蛋白定量试剂盒等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-trypton 为 Oxoid 公司产品;Ni-NTA His Bind 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;山羊抗小鼠 IgG-HRP 购自北京康为世纪生物工程公司。表达载体 pET28a(+) 和日本血吸虫成虫由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保存。

1.2 方法

1.2.1 虫体的收集及 c-DNA 制备

新西兰大白兔以腹部贴片法分别感染 2 000-20 000 条尾蚴,并分别于感染 42 d 后剖杀,肝门静脉灌注法收集虫体,将虫体置于液氮冻存储备用。将液氮保存的虫体取出,按照 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 提取及纯化。反转录按照 TaKaRa 试剂盒说明书来操作进行。

1.2.2 SjRAD23 基因的克隆及生物信息学分析

根据日本血吸虫辐射敏感蛋白 SjRAD23 (GI:226470141) 基因的 ORF 序列,设计引物,以日本血吸虫 42 d 成虫 cDNA 为模板,用 PCR 方法扩增含有完整 ORF 的 cDNA 序列片段。上游引物 P1 : GCGGGATCCATGAAGGTTACTTTC,下游

引物 P2 : CAGCTCGAGT CATACCATTTTCATC。斜体下划线部分分别为上下游引物的酶切位点部位。PCR 反应条件为 : 92 °C 预变性 10 min , 92 °C 变性 30 s , 56 °C 退火 30 s , 72 °C 延伸 1 min。PCR 产物纯化回收以后 , 将其亚克隆至 pMD19-T 载体 , 并转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 培养 12–16 h 后挑取单菌落进行扩大培养 8 h 后提取质粒 , 将质粒命名为 pMD19-T-SjRAD23。质粒双酶切鉴定后 , 将阳性质粒送上海华津生物科技有限公司测序。将测序得到的 cDNA 序列在 NCBI 上进行同源性比对。用 DNASTar 软件分析该基因的 ORF , 并对该基因的等电点、残基数、蛋白相对分子量进行分析。利用软件 Signal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对其序列信号肽进行预测 , 利用 CBS 服务器 (<http://www.cbs.dtu.dk/services>) 提供的 TMHMM Server v.2.0 预测氨基酸序列的跨膜结构域。

1.2.3 重组质粒 pET28 α (+)-SjRAD23 的构建与表达

将测序鉴定正确的 SjRAD23 的 ORF 序列的 5' 端和 3' 端分别加入 *Bam*H 和 *Xho* 两个酶切位点后定向亚克隆至原核表达载体 pET28 α 的多克隆位点上 , 构建得到 pET28 α (+)-SjRAD23 重组质粒 , 并转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中。挑取单菌落进行扩大培养 , 通过菌液 PCR 鉴定和双酶切鉴定正确后 , 阳性质粒送上海华津生物科技有限公司测序。将鉴定测序正确的阳性菌液接种至 LB 培养基 , 37 °C , 250 r/min , 振荡培养 , 当 OD 值=0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂 IPTG 进行诱导表达。在诱导剂加入后不同时间段收取菌液 , 以 SDS-PAGE 电泳分析最佳表达时间及鉴定表达蛋白的存在形式。用

不同浓度的 Tris-HCl 缓冲液进行多次透析 , 最终获得稳定的 pET28 α (+)-SjRAD23 重组蛋白。

1.2.4 重组蛋白 rSjRAD23 多克隆抗体的制备及动物免疫保护实验

将 30 只 6–8 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分成 3 组 , 每组 10 只。分别为 PBS 对照组 , 206 佐剂对照组和重组蛋白 rSjRAD23 免疫组。PBS 对照组每次每只皮下注射 100 μ L 的 PBS。206 佐剂对照组每次每只皮下注射 100 μ L 的 206 佐剂与 PBS 的乳化液 , 其中乳化剂中含有乳液 54 μ L。重组蛋白 rSjRAD23 免疫组每次每只皮下注射 100 μ L 的重组蛋白 rSjRAD23 与 206 佐剂的乳化液 , 其中乳化剂中含有 206 佐剂 54 μ L , 含重组蛋白 rSjRAD23 (20 μ g) 46 μ L。以相同的免疫剂量 , 每隔两周免疫 1 次 , 共免疫 3 次。分别于第 1 次免疫前 1 周及每次免疫后 1 周经眼眶静脉采集小鼠血液 , 37 °C 静置 1 h , 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min , 分离并收集血清于 -20 °C 保存。第 3 次免疫 2 周后 , 每只小鼠经腹部皮肤贴片攻击感染 40 \pm 2 条日本血吸虫尾蚴。在感染尾蚴 42 d 剖杀小鼠 , 收集血清 , 以肝门静脉灌注法收集虫体并计数 , 计算减虫率。同时 , 收集肝脏 , 称重 , 置于 50 mL 离心管内 , 加入适量去离子水 , 用匀浆机匀浆后定容至 20 mL。取 1 mL 匀浆液和 10% NaOH 等体积混合 , 56 °C 水浴消化 20 min , 消化完全后取 20 μ L 在光学显微镜下计算虫卵数 , 每份样品重复计数 3 次 , 取其平均值 , 按照以下公式计算减虫率和减卵率 (EPG= 每克肝组织中的虫卵数)。

减虫率=[1-免疫组平均虫荷数/206 佐剂对照组平均虫荷数] \times 100%

肝脏减卵率=[1-免疫组 EPG/206 佐剂对照组 EPG] \times 100%

1.2.5 间接 ELISA 法检测特异性抗体

纯化的重组蛋白 rSjRAD23 用紫外分光光度计测定其浓度, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液将纯化的重组蛋白 rSjRAD23 稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 包被 96 孔酶标板, 每孔 100 μL 。将收集的各组小鼠血清 1:100 稀释后作为一抗, 羊抗小鼠 IgG-HRP、羊抗小鼠 IgG1-HRP 和羊抗小鼠 IgG2a-HRP 作 1:5 000 稀释后作为二抗, 可溶性单组分 TMB 100 mL 避光显色, 2 mol/mL 硫酸终止反应, 最后置于酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 检测抗体水平。

1.2.6 间接免疫荧光技术分析 SjRAD23 的虫体组织定位

取日本血吸虫 42 d 新鲜成虫虫体, 制成厚度为 10 μm 的冰冻切片, -20°C 用丙酮固定 30 min 后用 10% 山羊血清封闭 2 h。以重组蛋白 rSjRAD23 免疫的 BALB/c 小鼠血清作为一抗孵育 1 h, 以正常小鼠血清作为阴性对照, Cy3 标记的山羊抗小鼠的 IgG 作为二抗孵育 1 h, 加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 溶液室温避光复染 5 min, 置荧光显微镜下观察蛋白的分布情况。

1.2.7 Western blotting 分析重组蛋白 rSjRAD23 的抗原性

将纯化的重组蛋白 rSjRAD23 进行 SDS-PAGE 电泳, 低温转移至硝酸纤维素 (NC) 膜上, 以日本血吸虫成虫可溶性抗原免疫小鼠血清 (实验室保存提供) 作为一抗, 正常的小鼠血清作为阴性对照, 以羊抗小鼠 IgG-HRP (1:5 000) 作为二抗, 二氨基苯胺 (DAB) 作为底物进行显色观察。

1.3 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 5 对实验数据进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 SjRAD23 基因的克隆及生物信息学分析

以 42 d 成虫 cDNA 作为模板, 应用 PCR 技术克隆获得含有完整 ORF 的 SjRAD23 编码基因。分析表明该基因 ORF 为 1 053 bp, 编码 351 个氨基酸, 预测分子量大概为 37.88 kDa, 等电点为 4.46。获取的目的基因通过 BLSAT 比对, 结果显示该基因与 NCBI GenBank 中日本血吸虫辐射敏感蛋白 (RAD23, GI:226470141) 基因序列的相似性为 100%。经生物信息学分析该蛋白不含跨膜结构域, 不含信号肽。

2.2 SjRAD23 基因的原核表达及重组蛋白的纯化及鉴定

经过 PCR、双酶切鉴定及测序, 证实 pET28 α (+)-SjRAD23 重组表达质粒构建成功 (图 1)。pET28 α (+)-SjRAD23 重组表达质粒在大肠杆菌 BL21 中诱导表达, SDS-PAGE 结果显示重组蛋白以可溶性和包涵体形式存在。重组蛋白分子量约为 44 kDa, 与预测的分子量相符 (图 2)。

2.3 间接 ELISA 法检测特异性抗体结果

利用间接 ELISA 法检测免疫小鼠血清中抗 rSjRAD23 特异性抗体 IgG 抗体水平变化。实验结果显示, 重组蛋白免疫组小鼠在第 1 次免疫后就能够检测到抗 rSjRAD23 特异性 IgG 抗体, 第 2 次免疫后特异性 IgG 抗体水平升高, 第 3 次免疫后又进一步升高, 剖杀时特异性 IgG 抗体水平基本保持不变。而 206 佐剂组对照组和 PBS 空白对照组在 3 次免疫及剖杀后特异性 IgG 抗体基本保持不变。*t* 检验分析表明, 重组蛋白免疫组与 206 佐剂组对照组和 PBS 空白对照组比较, 特异性 IgG 抗体水平差异极显著 ($P < 0.01$) (图 3)。

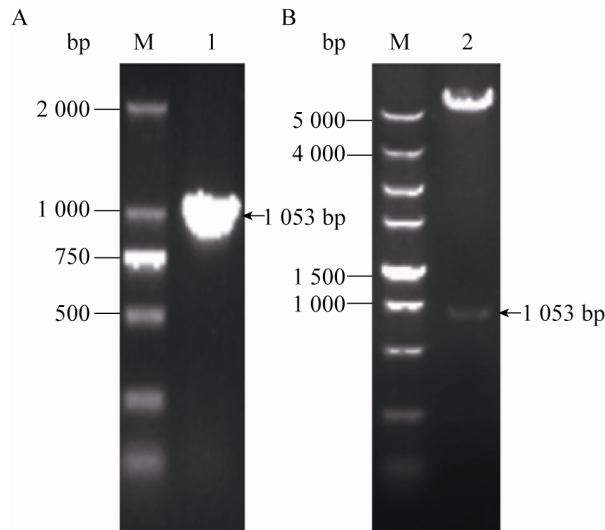


图 1 SjRAD23 基因的克隆及重组质粒双酶切鉴定:
Fig. 1 Cloning of SjRAD23 gene and the identification of recombinant plasmid pET28a(+)-SjRAD23 by *EcoR* I and *Xho* I digestion. (A) PCR Product of SjRAD23 gene. M: DNA marker DL2 000; 1: PCR product of SjRAD23 gene. (B) Identification of the recombinant plasmid pET28a(+)-SjRAD23 by *Bam*H I and *Xho* I. M: DNA marker DL5 000; 2: production of the recombinant plasmid pET28a(+)-SjRAD23 by *Bam*H I and *Xho* I digestion.

在一免、二免及三免后重组蛋白 rSjRAD23 在小鼠体内诱导产生了特异性的 IgG1 和 IgG2a 抗体，且呈现上升趋势，而 206 佐剂对照组却没有诱导产生特异性的 IgG1 和 IgG2a 抗体。免疫组与对照组比较，差异极显著 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 间接免疫荧光分析 SjRAD23 的虫体组织定位结果

在荧光显微镜下可以观察到 Cy3 标记的羊抗小鼠二抗 IgG 发出红色荧光，DAPI 复染细胞核后发出蓝色荧光 (图 4A)。用免疫前小鼠血清作为阴性对照 (图 4B)。实验结果表明该蛋白广泛分布在虫体表膜中及部分虫体实质中 (图 4)。

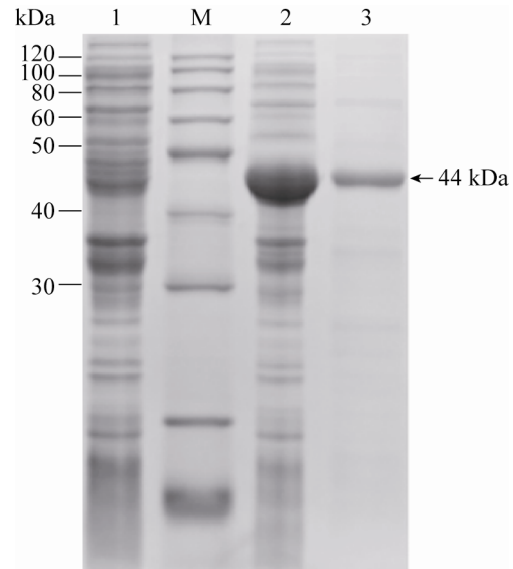


图 2 SDS-PAGE 分析 pET28a(+)-SjRAD23/BL21 重组蛋白的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression products of pET28a(+)-SjRAD23/BL21 in *E. coli*. M: protein marker; 1, 2: expression of plasmid pET28a and recombinant plasmid of pET28a(+)-SjRAD23; 3: purified recombinant protein of pET28a(+)-SjRAD23/BL21.

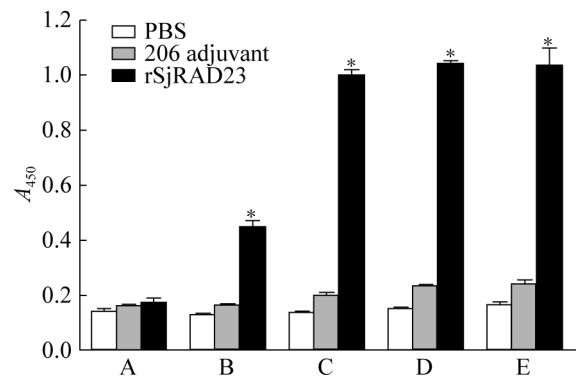


图 3 BALB/c 小鼠血清抗 rSjRAD23 特异性 IgG 抗体水平检测结果

Fig. 3 Specific IgG level against rSjRAD23 in the serum of BALB/c mice by ELISA; Mice were injected with rSjRAD23, 206 adjuvant, and PBS. A: preimmune; B: first immune; C: second immune; D: third immune; E: 6 week after infected. The asterisks (*) indicate serum antibody compared with the PBS control ($P < 0.01$).

表 1 rSjRAD23 诱导产生的抗体亚型分析

Table 1 Analysis of the level of IgG subtype induced by vaccination with rSjRAD23

Days	IgG1		IgG2a		IgG1/IgG2a ratio of rSjRAD23
	rSjRAD23	206 adjuvant	rSjRAD23	206 adjuvant	
10	0.637±0.086*	0.267±0.043	0.295±0.050*	0.113±0.017	2.159
25	1.890±0.084*	0.277±0.049	1.045±0.079*	0.125±0.034	1.808
40	1.898±0.081*	0.363±0.081	1.113±0.071*	0.106±0.007	1.705

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 ($P < 0.01$).

2.5 Western blotting 分析重组蛋白 rSjRAD23 的抗原性

以纯化的重组蛋白 rSjRAD23 作为抗原,以日本血吸虫成虫可溶性抗原免疫小鼠血清作为一抗进行 Western blotting 分析,结果显示在 44 kDa 呈现一条明显的条带,而正常小鼠血清作为阴性对照在此处未有条带出现(图 5),表明重组蛋白 rSjRAD23 具有良好的抗原性。

2.6 动物保护性实验结果

重组蛋白 pET28 α (+)-SjRAD23 免疫保护实验显示与 206 佐剂对照组比较显示, rSjRAD23 在 BALB/c 小鼠中诱导表达了 35.94% 减虫率, 40.59% 肝脏减卵率。 t 检验分析表明差异显著 ($P < 0.05$) (表 2), 说明 rSjRAD23 在 BALB/c 小鼠中诱导产生了部分的免疫保护效果。

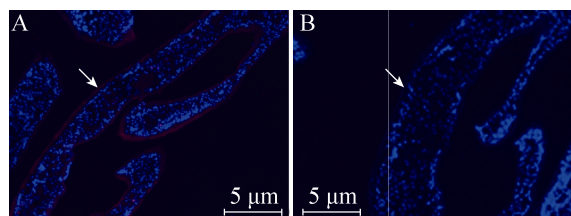


图 4 SjRAD23 蛋白在 42 d 日本血吸虫虫体内的免疫组织定位 (100 \times)

Fig. 4 The localization analysis of SjRAD23 by immunofluorescence in 42 d worms (100 \times).

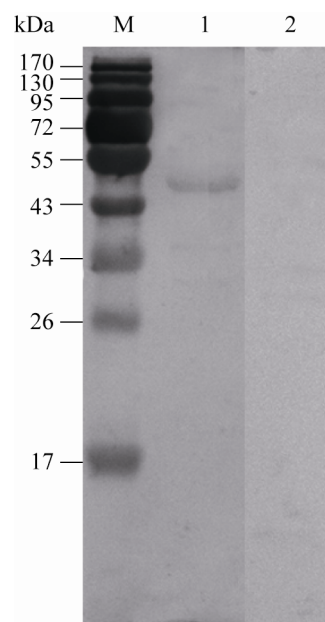


图 5 重组蛋白 SjRAD23 的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of recombinant SjRAD23 protein. M: protein marker; 1: probed with mice serum specific to schistosome adult worm antigen preparation; 2: probed by negative mouse serum.

3 讨论

日本血吸虫生活史复杂,中间宿主是钉螺,终末宿主包括人类及其他多种哺乳动物,危害严重。截止 2012 年底,我国推算日本血吸虫病病人共计 240 597 例^[12]。日本血吸虫体被是与宿主直接接触的界面,是血吸虫摄取营养物质和运

表 2 BALB/c 小鼠免疫保护效果

Table 2 Results of protective efficacy against *S. japonicum* challenge in BALB/c mice induced by rSjRAD23

Group	Worm burden ($\bar{x} \pm s$)	Percent reduction in worm burden (%)	Eggs/g liver ($\bar{x} \pm s$)	Percent reduction in liver egg count (%)
206 Adjuvant	24.00 \pm 9.49	----	55729.34 \pm 7957.58	----
rSjRAD23	15.37 \pm 4.96	35.94*	33105.09 \pm 7683.24	40.59*

Statistically significant compared with group animal injected with 206 adjuvant ($P < 0.05$).

送代谢物质的重要场所。同时,日本血吸虫体表膜含有一些重要的生长因子、通道蛋白、受体、信号转导蛋白,在日本血吸虫生长发育过程中起到重要作用^[13-14]。例如,乙酰胆碱通过与表膜上的乙酰胆碱受体作用,可以辅助血吸虫吸收营养和神经调节^[15]。更值得关注是,在日本血吸虫不同的生长发育阶段,为了适应宿主内不同的环境,其体表膜不断地更新和改变,以修复宿主抗体损伤的部位,从而逃避宿主的免疫攻击。因此,体表相关蛋白的研究对于日本血吸虫病疫苗发展和免疫诊断具有重要意义^[16]。

RAD23 最初是从酵母辐射突变体 (Radiation sensitive mutant, RAD) 中分离发现的^[17]。早期研究发现该蛋白能够促使核酸切除修复 (Nucleotide excision repair, NER) 复合体中的 TFIIH 与 RAD14 的结合,在 DNA 的切除修复过程中起到重要作用^[18-19]。RAD23 是蛋白泛素化过程中的配体蛋白,蛋白泛素化是真核细胞内广泛存在的蛋白修饰方式,泛素化在蛋白的定位、代谢、功能及降解中都起到重要作用,同时它也参与了细胞增殖、分化、基因表达、损伤修复等生命活动的调控^[20]。越来越多的研究表明,蛋白质的泛素化在调节细胞免疫应答中发挥着非常重要的作用^[21-22]。RAD23 具有泛素连接酶 E3 的功能,其 C 末端具有泛素相关基

序 (Ubiquitin-associated motif, UBA), 能够与多泛素蛋白链相结合,同时也在 N 端具有一泛素样结构域 (Ubiquitin-like domain, UBL), 能够通过泛素-26S 蛋白酶体途径在细胞周期调控、基因表达、细胞增殖分化等生物过程中发挥重要作用^[23-24]。

本实验首次克隆、表达了日本血吸虫辐射敏感蛋白 SjRAD23, 生物信息学分析表明该蛋白不含信号肽和跨膜结构域。间接免疫荧光实验分析显示日本血吸虫 SjRAD23 蛋白广泛分布于虫体表膜和部分实质中。间接 ELISA 和 Western blotting 结果都显示重组抗原 rSjRAD23 可被日本血吸虫成虫可溶性抗原免疫小鼠血清和重组蛋白免疫小鼠血清识别,表明日本血吸虫 SjRAD23 具有较好的抗原性和免疫原性。用纯化的 rSjRAD23 蛋白免疫小鼠后,实验结果显示小鼠产生了较高水平的 IgG、IgG1、IgG2a 抗体, IgG1 参与激活 Th2 型辅助细胞, IgG2a 与激活 Th1 型辅助细胞有关^[25], 表明 rSjRAD23 诱发小鼠产生了抗日本血吸虫感染的 Th1/Th2 混合型免疫反应。PBS 组和 206 佐剂组中在 3 次免疫后未能产生针对重组蛋白 rSjRAD23 的抗体, 只在感染 6 周后出现很低滴度的抗 rSjRAD23 的特异性抗体。推测其原因可能是: 首先, RAD23 是蛋白泛素化过程中的配体蛋白, 主要参与 26S 蛋白酶体调控, 而调控过程主要

是在真核细胞内进行,因此此蛋白主要存在于细胞内,难以诱导较高滴度的特异性抗体;其次,血吸虫蛋白种类非常多,RAD23可能含量较低,只是虫体源的蛋白难以诱导较高滴度的特异性抗体。重组蛋白免疫组小鼠感染后6周的抗体与第3次免疫后抗体比较没有差异,可能是因为第3次免疫后针对重组蛋白的特异性抗体没有能够继续上升;也可能是由于小鼠感染血吸虫后,如上所述,重组蛋白只产生很低滴度的特异性抗体。动物保护实验显示,重组蛋白 rSjRAD23 免疫的 BALB/c 小鼠与 206 佐剂对照组比较,减虫率和减卵率分别为 35.94%和 40.59%,获得部分免疫保护效果。这些都表明,日本血吸虫 SjRAD23 具有成为日本血吸虫疫苗的候选抗原的潜能。SjRAD23 蛋白作为蛋白泛素化途径中的重要配体蛋白,在泛素化过程中起到重要的作用,可能也在日本血吸虫的生长和发育过程中产生了重要、不可替代的作用,2005年 Guerra-Sa R 等也实验证明了泛素蛋白酶体途径对曼氏血吸虫的生长发育的重要性^[26]。有关日本血吸虫 SjRAD23 蛋白在日本血吸虫体内具体的作用机制仍需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol*, 2002, 18(7): 309–314.
- [2] Lei ZL, Zheng H, Zhang LJ, et al. *Schistosomiasis status* in People's Republic of China in 2010. *Chin J Schistoso Contr*, 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.
- [3] McManus DP, Wong JYM, Zhou J, et al. Recombinant paramyosin (rec-Sj-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine*, 2001, 20(5): 870–878.
- [4] Liang YS, Li HJ, Dai JR, et al. Studies on resistance of *Schistosoma* to praziquantel X III resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel is experimentally induced in laboratory. *Chin J Schistoso Contr*, 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.
- [5] 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 Neg Trop Dis*, 2008, 2(10): e308.
- [6] Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell GF. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach. *Trends Parasitol*, 2005, 21(3): 112–117.
- [7] Smalle J, Vierstra RD. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 555–590.
- [8] Robinson PA, Ardley HC. Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, 2004, 117(22): 5191–5194.
- [9] Reed SH, Gillette TG. Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway—do all roads lead to rome? *DNA Repair*, 2007, 6(2): 149–156.
- [10] Chen L, Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(13): 4902–4913.
- [11] Rao H, Sastry A. Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem*, 2002, 277(14): 11691–11695.
- [12] Li SZ, Zheng H, Gao J, et al. Endemic status of schistosomiasis in People's Republic of China in 2012. *Chin J Schistoso Contr*, 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.
- [13] MacGregor AN, Kusel JR. Isolation and characterisation of a surface membrane glycoprotein from adult *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, 1989, 34(3): 237-244.
- [14] Simpson AJG, Schryer MD, Cesari IM, et al. Isolation and partial characterization of the tegumental outer membrane of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology, 1981, 83(01): 163-177.
- [15] Camacho M, Alford S, Jones A, et al. Nicotinic acetylcholine receptors on the surface of the blood fluke *Schistosoma*. Mol Biochem Parasitol, 1995, 71(1): 127-134.
- [16] Da'Dara AA, Li YS, Xiong T, et al. DNA-based vaccines protect against zoonotic schistosomiasis in water buffalo. Vaccine, 2008, 26(29): 3617-3625.
- [17] Friedberg EC. Eukaryotic DNA repair: glimpses through the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bioessays, 1991, 13(6): 295-302.
- [18] Prakash S, Sung P, Prakash L. DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Genet, 1993, 27(1): 33-70.
- [19] Dantuma NP, Heinen C, Hoogstraten D. The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. DNA Repair, 2009, 8(4): 449-460.
- [20] Pickart CM. Back to the future with ubiquitin. Cell, 2004, 116(2): 181-190.
- [21] Liu YC, Penninger J, Karin M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. Nat Rev Immunol, 2005, 5(12): 941-952.
- [22] Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitylation in immune defence and pathogen evasion. Nat Rev Immunol, 2012, 12(1): 35-48.
- [23] Farmer LM, Book AJ, Lee KH, et al. The RAD23 family provides an essential connection between the 26S proteasome and ubiquitylated proteins in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2010, 22(1): 124-142.
- [24] Xie Z, Liu S, Zhang Y, et al. Roles of Rad23 protein in yeast nucleotide excision repair. Nucleic Acids Res, 2004, 32(20): 5981-5990.
- [25] Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. Annu Rev Immunol, 1990, 8(1): 303-333.
- [26] 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.

(本文责编 郝丽芳)