

日本血吸虫期别差异表达基因文库的构建及分析*

苑纯秀 冯新港** 林娇娇 李浩 陆珂 石耀军 傅志强 刘金明 蔡幼民

(中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所, 农业部动物寄生虫学重点实验室, 上海市动物生物技术研究中心, 上海 200232)

摘要 为从期别差异表达基因分析入手研究血吸虫的生长发育机制, 应用抑制性消减杂交 (suppressed subtractive hybridization, SSH) 技术首次构建了日本血吸虫尾蚴、虫卵和成虫的期别差异表达基因文库。经消减效率分析和三种文库克隆的 EST 的期别差异性鉴定, 表明所建文库质量较高, 为在整个基因组水平分离血吸虫的差异表达基因提供了重要材料。由三个文库选择 257 个插入片段大于 500 bp 的克隆测定了 EST 序列。同源性分析结果表明 257 个 EST 代表 182 种血吸虫基因, 其中有 22 种为血吸虫已知基因, 有 128 种为血吸虫已知 EST, 有 32 种为新发现的血吸虫基因。对 EST 编码蛋白的功能预测结果显示: 尾蚴消减文库的基因多与运动、能量代谢、转录调节及致病性相关; 虫卵消减文库的基因可能参与信号转导、细胞粘附、蛋白质和碳水化合物代谢以及抗氧化反应; 成虫消减文库的基因多参与蛋白质的合成、转运及分解代谢, 参与虫体的运动等。大规模分离、分析血吸虫期别差异表达基因将对从分子水平去解读血吸虫的生长发育机制, 筛选高效疫苗候选抗原、药物靶标及诊断制剂有重要意义。

关键词 日本血吸虫, 期别, 差异表达, 基因文库

学科分类号 S852.735

血吸虫病是一种分布广泛, 危害严重的人兽共患寄生虫病。近年来对血吸虫病流行情况的统计数字显示, 全球仍有 74 个国家流行, 2 亿人受感染, 6 亿人受威胁^[1]。这些触目惊心的数字警示: 血吸虫病仍然对人类健康构成巨大威胁, 控制血吸虫病刻不容缓。

血吸虫在生长发育方面表现非常特殊、复杂。在水中游动生活的尾蚴具有感染性, 侵入宿主皮肤后经历由童虫到成虫、雌雄合抱、产卵等发育过程。血吸虫成虫在宿主体内不增殖, 致病作用不大, 而性成熟的雌虫产生的大量虫卵沉积于宿主肝脏, 诱发肝脏肉芽肿是血吸虫病的主要病理表现。随粪便排出的虫卵又成为血吸虫病再传播的传染源^[2]。纵观血吸虫的生活史, 不同的生长发育阶段具有不同的发育特征和病理效应。产生这种阶段差异性的分子基础到底是什么? 控制血吸虫复杂生活史循环的机制是什么? 血吸虫在感染过程中与宿主发生了怎样的相互作用? 这些问题如果能得到清楚的解读, 将会为血吸虫候选疫苗、药物靶标的确定, 以及新药的开发提供极有价值的理论指导, 有助于开辟防治血吸虫病的新途径。对不同发育阶段差异表达基因的获取和分析将是解决上述问题的捷径。血吸虫基因组为 270Mb, 而表达基因大约只有 15 000 个^[3], 选择差异表达基因入手研究则又可大

大缩小目标基因的范围, 且在不同发育阶段呈现差异表达的功能基因可能与血吸虫的生长发育密切相关。迄今为止, 关于血吸虫不同发育阶段差异表达基因的研究报道甚少^[4,5], 这些基因都是用传统方法逐个鉴定的, 费时费力, 进展不快, 且为数不多的差异表达基因难以阐明血吸虫的生长发育机制及其与宿主的相互作用关系, 故而探索新的差异表达基因是十分必要的。

20 世纪 90 年代初期相继建立的基因发现及比较技术, 为差异表达基因的大规模获取提供了技术支持。其中抑制性消减杂交技术的优越性显著^[6]: 起始材料少, 假阳性率低, 能使低丰度的差异表达基因得到同样的分离和扩增。因此, 本研究应用抑制性消减杂交技术构建日本血吸虫尾蚴、虫卵及成虫的差异表达基因文库, 为从整个基因组水平分离血吸虫的差异表达基因提供了基础材料, 并完成了一部分表达序列标签 (EST) 的分析。

* 国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2004AA2Z3510, 2001AA215151), 上海市重大科技攻关项目 (03DZ19231)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54082675, Fax: 021-54081818

E-mail: xingangf62@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-04-18, 接受日期: 2005-05-31

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 不同发育阶段的血吸虫材料. 本研究所用虫株为日本血吸虫中国大陆株. 在实验室内通过钉螺和昆明鼠维持生活史循环. 尾蚴由感染钉螺光照过夜逸出, 经离心沉淀收集. 虫卵由感染的新西兰大白兔(感染后 7 周) 肝脏中分离. 成虫由感染兔(感染后 7 周) 经肝门静脉灌注法收集, 雄虫由人工分离雌雄成虫而得. 各阶段的实验材料使用前均在液氮中保存.

1.1.2 主要仪器、试剂. 总 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司, mRNA 分离试剂盒 oligotex mRNA midikit 为 Qiagen 产品. SMART PCR cDNA Synthesis Kit 及 PCR-select™ cDNA subtraction kit 为 Clontech 公司产品. PCR 仪为 PE 公司生产的 PE480, 凝胶成像系统为复日科技的 FR-200 紫外与可见分析装置.

1.2 方法

1.2.1 日本血吸虫尾蚴、虫卵和雄虫总 RNA 的提取及 mRNA 纯化. 利用 TRIzol 试剂盒分离虫卵、尾蚴和成虫的总 RNA. 利用 oligotex 试剂盒分离总 RNA 中的 mRNA. 操作均按试剂盒使用说明书进行. 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 样品的完整性. 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度及纯度.

1.2.2 消减杂交分组. 消减杂交共分三组: (1)虫卵消减 cDNA 文库以虫卵为实验组, 成虫为驱动组, 富集虫卵阶段高表达的转录本; (2)雄虫消减 cDNA 文库以雄虫为实验组, 虫卵为驱动组, 富集成虫阶段高表达的转录本(以雄虫代替混合成虫是为避免雌虫体内虫卵的影响); (3)尾蚴消减 cDNA 文库以尾蚴为实验组, 成虫为驱动组, 富集尾蚴阶段高表达的转录本.

1.2.3 尾蚴、虫卵和雄虫阶段消减 cDNA 质粒文库的构建. 抑制性消减杂交方法分别构建日本血吸虫三个期别的消减文库. 因为尾蚴很难收集, 故尾蚴的 cDNA 是利用 SMART PCR cDNA 合成试剂盒由 1 μg 的总 RNA 合成^[7]. 其他阶段的 cDNA 由 1 μg 的 mRNA 起始, 按消减杂交试剂盒操作手册合成. 对试剂盒中的槽式 PCR 引物, 我们稍作改动, 在引物 1 和引物 2R 的 5' 端分别加了 *Xho* I 和 *Eco*R I 酶切位点, 序列如下: 槽式引物 1 5' AGTTCTCGAGCGGCCGCGGGCAGGT 3', 槽式引物 2R 5' TCGGGAATTCTGGTCGGTCGCG-

GCCGAGGT 3'. 这样 PCR 产物可被定向克隆到载体 pCMV-SCRIPT (XR) 中, 再经电转化到宿主细胞 XL1-Blue 中. 消减杂交按试剂盒操作手册进行.

1.2.4 消减杂交效率分析. 以消减杂交组 (1) 消减后的第二轮 PCR 产物和相应的未消减的第二轮 PCR 产物为模板, 用持家基因微管蛋白的 5' 和 3' 引物进行 PCR 扩增, 循环参数为: 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 分别于 18、23、28、33 个循环结束时取样, 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果, 比较相同循环数下消减和未消减样品扩增得到的 PCR 产物来评估消减杂交效率.

1.2.5 消减文库中克隆的期别差异性鉴定. 将由尾蚴扣除文库中获得的未知基因 1UE12 片段用 RT-PCR 方法进行鉴定. 0.5 μg 的尾蚴和成虫总 RNA 分别用来反转录合成克隆 1UE12 的单链 cDNA. 血吸虫微管蛋白作为内参, 标化反应结果. PCR 所用的引物序列见表 1. PCR 反应进行 16, 19, 22, 25 个循环时各取一份样品, 1% 琼脂糖凝胶电泳比较两个基因的扩增情况.

Table 1 Primer sequence for RT-PCR

Gene/Clone name	Primer sequence
1UE12	5' TTTTAACTTCAAAATGAGC 3' 5' TGAATGTTGCACAATTTTAT 3'
Tubulin	5' TGGAAGTATATCGTCA ACTTTTCCATCC 3' 5' GAAGTGGATACGAGGATAAGGTACCAG 3'

虫卵消减文库中的未知基因片段 42E5 以及雄虫消减文库中的已知基因片段(组织蛋白酶 B) 3QE9 用 RNA 印迹方法进行鉴定. 总 RNA 在 1.2% 的甲醛变性凝胶上电泳, 每个泳道 15 μg 总 RNA. 电泳结束后于 20×SSC 中过夜转移到 Hybond-N⁺ 膜上, 80℃ 孵育 2 h, 使 RNA 结合到膜上. 在杂交液中 68℃ 预杂交 4 h 以上. 上述两个基因片段用 [α-³²P]dCTP 标记作为探针. 微管蛋白作为内参. 68℃ 条件下杂交、洗膜, 增光屏下曝光 48~72 h 放射自显影.

1.2.6 部分消减文库克隆测序、聚类及生物信息学分析. 用文库构建时应用的巢式 PCR 引物, 对文库中的克隆进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小, 选择 257 个插入片段大于 500 bp 的克隆测 EST 序列, 其中尾蚴消减文库选择 76 个克隆, 虫卵消减文库选择 88 个克隆, 雄虫消减文库

选择 93 个克隆. 测序由上海申能博采生物科技有限公司完成. 测序结果先用 GeneTool 软件进行序列联配分析, 把所有的序列按同源性聚类. 将序列去除载体后用 BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 在 GenBank/EMBL/DDBJ 的 EST 数据库中, 以及 GenBank/EMBL/DDBJ/PDB 的非冗余性核酸数据库中分别进行同源性搜索. 再用 InterPro release 9.0 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 在 PDBdata 数据库中在线查询, 预测该序列编码的蛋白质分子可能参与的生物学过程及可能的分子功能.

2 结 果

2.1 尾蚴、虫卵和雄虫总 RNA 提取及 mRNA 纯化

高纯度和完整的总 RNA 是保证文库质量的前提. 本研究提取的尾蚴、虫卵、雄虫和混合成虫的总 RNA 经电泳检查质量良好. 四个样品的 A_{268}/A_{280} 均在 2.0~2.2 之间, 符合建库要求. 由虫卵、雄虫及混合成虫的总 RNA 分离 mRNA 的结果见图 1, 三个样品的 mRNA 呈均匀的弥散性分布, 无降解现象.



Fig. 1 Results of mRNA by agarose gel electrophoresis

1: mRNA from egg; 2: mRNA from sex-mixed adult worm; 3: mRNA from male.

2.2 期别差异表达基因文库消减效率的分析

消减杂交的效率, 关系到所得消减产物的阳性率. 如果消减效率低, 则假阳性率高. 为分析消减效率, 本研究以虫卵消减文库为例进行了分析. 分别以消减后的第二轮 PCR 产物及未消减对照的第二轮 PCR 产物为模板, PCR 扩增管家基因微管蛋白, 分别于不同的循环取样同时电泳, 结果如图 2 所示. 消减后的样品在扩增到 33 个循环时才出现可见的扩增产物, 而相同条件下未消减的样品在 18 个循环时就有可见的扩增产物, 表明在杂交组中的相同基因得到有效扣除, 杂交体系的消减效率较高.

说明本研究建立的文库为进一步分离期别差异表达基因奠定良好基础.

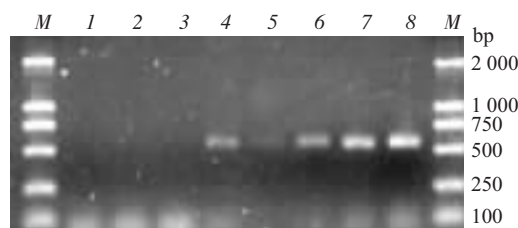


Fig. 2 Analysis of the efficiency for SSH PCR amplification of tubulin was carried out with the subtracted (1~4) and unsubtracted (5~8) products as templates respectively

1, 5: 18 cycle; 2, 6: 23 cycle; 3, 7: 28 cycle; 4, 8: 33 cycle; M: DL 2000 marker.

2.3 消减文库中克隆的期别差异性鉴定

由三个消减杂交组分别挑选一个克隆进行鉴定, 微管蛋白作为内参. 由于尾蚴的量较少, 故尾蚴与成虫杂交组选择 RT-PCR 方法进行鉴定. 图 3a 为尾蚴消减文库中的克隆 1UE12 的 RT-PCR 电泳图, 图 3b 为内参微管蛋白在相同条件下的对照电泳图. 由 16~25 个循环中, 微管蛋白在成虫和尾蚴间的扩增无明显差异, 而 1UE12 在成虫中扩增的 PCR 产物的量始终少于同等条件下尾蚴扩增的量, 表明 1UE12 在尾蚴阶段的表达量高于成虫阶段, 证明该克隆确为消减杂交获得的阳性克隆.

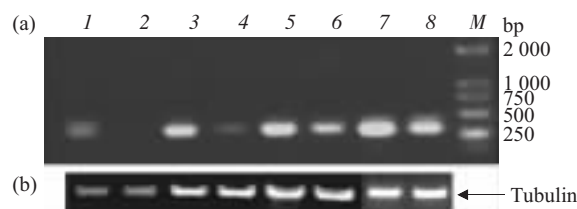


Fig. 3 RT-PCR results of cercariae 1UE12 compared to adult worm

(a) 1,3,5,7: 1UE12 16,19,22,25 cycle in cercariae; 2,4,6,8: 1UE12 16,19,22,25 cycle in adult worm. (b) 1,3,5,7: Tubulin 16,19,22,25 cycle in cercariae; 2, 4, 6, 8: Tubulin 16,19,22,25 cycle in adult worm; M: DL2000 marker.

虫卵消减文库中的克隆 42E5 及雄虫消减文库中的克隆 3QE9 用 RNA 印迹鉴定, 结果见图 4. 杂交结果显示 42E5 在虫卵阶段的量远远高于成虫阶段, 近乎于虫卵阶段的特异性表达. 3QE9 则在雄虫中的表达量远高于虫卵. 杂交结果也证实, 这两个克隆均为消减杂交的阳性克隆. 作为内参的微管蛋白在虫卵阶段的表达量稍低于成虫阶段, 但不影

响它作为内参来判定结果^[8]. 对以上随机选择的克隆鉴定结果表明, 本研究所建日本血吸虫期别差异消减文库质量较高, 适用于期别差异表达基因的筛选研究.

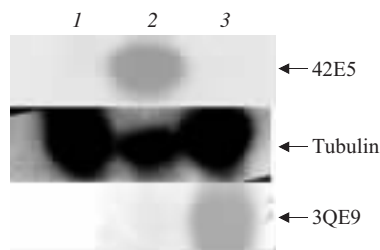


Fig. 4 Northern blot analysis for differentially expressed genes between egg and male

1: Sex-mixed adult worm total RNA was hybridized with probe 42E5 and tubulin; 2: Egg RNA was hybridized with probe 42E5, tubulin and 3QE9 respectively; 3: Male RNA was hybridized with probe 42E5, tubulin and 3QE9.

2.4 差异表达克隆 EST 的测序与聚类分析

所建消减文库中的克隆, 经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测, 选择 257 个插入片段大于 500 bp 的基因克隆测 EST 序列, 其中尾蚴文库 76 个, 虫卵文库 88 个, 雄虫文库 93 个. 所有测序结果去除载体序列后均进行了登记注册, 来自尾蚴消减文库的 76 个 EST 的 GenBank 登录号为 DN652406~DN652481, 来自虫卵文库的 88 个 EST 的 GenBank 登录号为 DN652482~DN652569, 来自雄虫消减文库的 93 个 EST 的 GenBank 登录号为 DN652570~DN652662. 经 GeneTool 分别将三个文库的 EST 进行序列联配, 所得的聚类结果表明, 上述 EST 分别代表 38、73 和 71 种血吸虫基因. 序列的同源性搜索结果表明: 所测 EST 序列共有 53 条与 22 种血吸虫已知基因匹配, 有 149 条与数据库中已有的血吸虫 EST 匹配, 还有 32 条与数据库中的数据无明显同源性, 这部分 EST 代表新发现的血吸虫 EST, 结果见表 2. 由于尾蚴建库的材料

Table 2 Clustering and sort results of EST from cercariae, egg and male subtracted cDNA library

Stat. item \ ETS origin	Cercariae subtracted cDNA library	Egg subtracted cDNA library	Male subtracted cDNA library	Total
Total number of EST	76	88	93	257
Cluster	38	73	71	182
Homologous with schistosome known gene	20	9	24	53
Homologous with schistosome known EST	32	59	58	149
Homologous with gene encoding ribosome and mitochondria	24		5	29
No match		20	12	32

起始于总 RNA, 造成尾蚴消减文库所测的 EST 中有 24 条是血吸虫线粒体及核糖体的编码基因, 这部分基因的存在, 会增加文库的冗余性, 所以 cDNA 文库的构建最好起始于 mRNA.

2.5 消减文库克隆的 EST 序列的生物信息学分析

将所测 EST 序列进行了同源性搜索及编码蛋白的功能预测, 表 3~5 分别为尾蚴、虫卵、雄虫消减文库 EST 的生物信息学分析结果. 完成了 56 种 EST 相应的编码蛋白功能及可能参与的生物学过程的预测. 其中尾蚴消减文库有 4 种 EST 与血吸虫已知基因高度同源, 分别为多聚泛素 (polyubiquitin)、8 ku 钙结合蛋白 (CaBP)、3 磷酸甘

油醛脱氢酶 (G3PDH) 及核苷去磷酸激酶 (NDK). EST 编码蛋白的功能预测结果显示: 尾蚴消减文库中的基因多与运动、能量代谢、转录调节及致病性相关. 虫卵消减文库有 3 类 EST 与已知血吸虫基因高度同源, 分别为精氨酸蛋白酶前体 (aspartic proteinase precursor)、热休克蛋白 70 (HSP70) 及半胱氨酸加双氧酶 (CDO). 虫卵消减文库的基因可能参与信号转导、细胞粘附、蛋白质和碳水化合物的代谢以及抗氧化反应. 雄虫消减文库有 15 类 EST 与已知血吸虫基因高度同源 (表 5), 结果显示雄虫消减文库基因多参与蛋白质的合成、转运及分解代谢, 参与虫体的运动等.

Table 3 The results of homology comparison and function prediction of EST from cercariae subtracted cDNA library

Clone name	GenBank accession number	Description	Biological process	Molecular function
1Bb7	DN652408	<i>Sj</i> EST	Microtubule-based movement	Structural molecule activity
1Bd3	DN652416	<i>Sj</i> EST	Viral infectious cycle	
1Cc7	DN652462	<i>Sj</i> EST	Pathogenesis	Glycosaminoglycan binding
1Ce5	DN652470	<i>Sj</i> EST	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome
1Fa9	DN652422	<i>Sj</i> EST	Carbohydrate metabolism	Hyaluronoglucosaminidase activity
1fE6	DN652426	<i>Sj</i> EST	Regulation of transcription, DNA-dependent	Transcription factor activity
1hE9	DN652433	<i>Sj</i> EST		Metal ion binding
1hF8	DN652434	<i>Sj</i> EST		DNA binding
1hH9	DN652435	<i>Sj</i> EST		ATP binding
1iA3	DN652436	<i>Sj</i> EST	Electron transport	Disulfide oxidoreductase activity
1iG11	DN652444	<i>Sj</i> EST	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome
1jC5	DN652445	<i>Sj</i> EST	Protein amino acid phosphorylation	Protein kinase activity
1k'B2	DN652446	<i>Sj</i> EST		RNA binding
1k'E2	DN652449	<i>Sj</i> EST	Metabolism	Alcohol dehydrogenase activity
1cD1	DN652473	<i>Schistosoma japonicum</i> polyubiquitin-like mRNA partial sequence	Proteolysis and peptidolysis	Serine-type endopeptidase
1cE2	CX427130	<i>Schistosoma japonicum</i> 8 ku calcium-binding protein gene		Calcium ion binding
1iF8	DN652413	<i>Schistosoma japonicum</i> glyceraldehyde-3-phos- phate dehydrogenase	Glycolysis	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
1iH9	DN652414	<i>Schistosoma japonicum</i> nucleoside diphosphate kinase	GTP, CTP, UTP biosynthesis	Nucleoside-diphosphate kinase

Table 4 The results of homology comparison and function prediction of EST from egg subtracted cDNA library

Clone name	GenBank accession number	Description	Biological process	Molecular function
4aA6	DN652482	<i>Sj</i> EST	Carbohydrate metabolism	Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
44D11	DN652514	<i>Sj</i> EST	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome
45A7	DN652527	<i>Sj</i> EST	Cellulose biosynthesis	Cellulose synthase (UDP-forming) activity
45C11	DN652568	<i>Sj</i> EST	Signal transduction	Signal transducer activity
45D8	DN652536	<i>Sj</i> EST	Cell adhesion	Hyaluronic acid binding
45F4	DN652540	<i>Sj</i> EST	Response to oxidative stress	Peroxidase activity
45F9	DN652542	<i>Sj</i> EST		Nucleic acid binding
422B12	CX535722	<i>Sj</i> EST	Regulation of transcription, DNA-dependent	Transcription factor activity
44A8	DN652559	<i>Schistosoma japonicum</i> aspartic proteinase precursor	Proteolysis and peptidolysis	Aspartic-type endopeptidase
44B8	DN652560	<i>S.japonicum</i> heat shock protein 70 (Hsp70) mRNA	Heat shock protein	ATP binding
45E11	DN652569	<i>Schistosoma japonicum</i> cysteine dioxygenase (CDO) mRNA		Cysteine dioxygenase

Table 5 The results of homology comparison and function prediction of EST from male subtracted cDNA library

Clone name	GenBank accession number	Description	Biological process	Molecular function
3a1D2	DN652640	<i>Sj</i> EST	Fatty acid biosynthesis	Catalytic activity
31C3	DN652630	<i>Sj</i> EST	Electron transport	Electron transporter activity
31C12	DN652629	<i>Sj</i> EST		DNA binding
313E2	DN652598	<i>Sj</i> EST	Aromatic amino acid family biosynthesis	Chorismate synthase activity
313E7	DN652599	<i>Sj</i> EST	Microtubule-based movement	Structural molecule activity
314D2	DN652608	<i>Sj</i> EST	Carbohydrate metabolism	Phosphoric ester hydrolase activity
314E3	DN652610	<i>Sj</i> EST	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	
314F2	DN652612	<i>Sj</i> EST		G-protein coupled receptor activity
314F4	DN652614	<i>Sj</i> EST	Intracellular protein transport	
315C8	DN652621	<i>Sj</i> EST		Nucleic acid binding
315G1	DN652625	<i>Sj</i> EST	tRNA Processing	Pseudouridylate synthase activity
3bA5	DN652650	<i>Sj</i> EST	amidase	
3a1A5	DN652584	<i>Schistosoma japonicum</i> non-LTR retrotransposon		Reverse transcriptase <i>Sj</i> R1
3a1D7	DN652592	<i>Schistosoma mansoni</i> T-complex polypeptide 1 alpha subunit (SmTCP-1A)	Protein folding	ATP binding
3a1F1	DN652642	<i>Sjaponicum</i> mRNA for cathepsin B	Proteolysis and peptidolysis	Cysteine-type endopeptidase
3a1G2	DN652585	<i>Schistosoma japonicum</i> T-complex protein	Protein folding	ATP binding
31D6	DN652586	<i>Schistosoma japonicum</i> gynecophoral canal protein	Cell adhesion	
313A11	DN652594	<i>Schistosoma japonicum</i> polyubiquitin-like mRNA	Proteolysis and peptidolysis	Serine-type endopeptidase
313B9	DN652588	<i>Schistosoma japonicum</i> 22.6 ku membrane-associated antigen mRNA	Microtubule motor	Calcium ion binding
313C1	DN652591	<i>Schistosoma mansoni</i> 200 ku surface protein mRNA		
313E10	DN652583	<i>Schistosoma japonicum</i> actin mRNA	Actin cytoskeleton	
314B6	DN652581	<i>Schistosoma japonicum</i> dynein light chain 1 (DLC1) mRNA	Microtubule-based process	Microtubule motor
314C2	DN652575	<i>Schistosoma japonicum</i> cathepsin B endopeptidase (cb) mRNA	Proteolysis and peptidolysis	Cysteine-type endopeptidase
315B3	DN652579	<i>Schistosoma mansoni</i> ribosomal protein L37 mRNA	Protein biosynthesis	Structural constituent of ribosome
315C9	DN652590	<i>Schistosoma mansoni</i> CD9-like protein Sm-TSP-1 mRNA		
315F7	DN652580	<i>Schistosoma mansoni</i> 14-3-3 epsilon mRNA	Protein domain specific binding	
315G3	DN652593	<i>Schistosoma japonicum</i> immunophilin-like mRNA sequence	Protein folding	Isomerase

3 讨 论

血吸虫复杂的生活史成为血吸虫研究工作者筛选高效候选疫苗等的极大障碍. 血吸虫在不同发育阶段基因的表达是呈动态变化的, 在某个阶段有些基因开始表达, 有些基因关闭, 有些基因上调, 有些基因下调^[9,10]. 如果能知道哪些基因是呈期别差异方式表达的, 就容易发现其生长发育的关键所在, 以此为基础筛选疫苗、药靶、诊断制剂或研发新药, 无疑会开辟防治血吸虫病的新途径. 为此, 本研究选择尾蚴、虫卵和成虫三个阶段构建期别差异表达基因文库以分离日本血吸虫差异表达基因. 尾蚴是血吸虫的感染阶段, 有研究证明, 辐照致弱尾蚴可诱导宿主产生迄今最好的免疫效果^[11], 这提示尾蚴阶段特异性表达或高度表达的基因产物有可能引发高效免疫效应. 成虫主要寄生在宿主的肠系膜静脉, 可刺激产生保护性免疫反应作用于再感染的童虫, 但对已存在的成虫不起作用, 称为伴随免疫^[2], 是一种消耗形式. 查明成虫阶段差异表达基因有助于我们弄清血吸虫成虫逃避宿主免疫攻击及发育成熟的分子机制. 虫卵作为血吸虫病致病和再传播的主要因素, 该阶段的差异表达基因可用来研究如何控制虫卵形成、减轻虫卵引起的病理损害及阻断血吸虫病的再传播.

关于血吸虫不同发育阶段差异表达基因的研究过去报道甚少, 这些基因都是用传统方法逐个鉴定的, 不仅耗时费力, 而且单个基因的克隆表达, 无法得到差异表达基因之间变化的相关性. 因此本研究选择应用抑制性消减杂交技术构建了日本血吸虫的期别消减 cDNA 文库, 经消减杂交效率分析和三种文库克隆的期别差异性检测, 证明所建文库质量较高, 对大规模从整个基因组水平筛选期别差异表达基因具有重要价值. 当然, 作为后续工作, 对分离到的期别差异表达基因, 还要对相应 EST 作进一步分析鉴定.

对三个期别消减文库的 257 个克隆分别进行了 EST 测序及生物信息学分析. 分析结果表明, 257 条 EST 代表 182 种血吸虫基因, 其中有 22 个为血吸虫已知基因, 128 种为血吸虫已知 EST, 32 种为新发现的血吸虫 EST. 在这些已知基因中, 8 ku 的钙结合蛋白(CaBP)^[12], 热休克蛋白 70(HSP70)^[13], 组织蛋白酶 B (cathepsin B)^[14], 22.6 ku 的膜相关抗原 (tegument associated antigen)^[15], 抱雌沟蛋白 (gynecophoral cacanl protein)^[16], 动力蛋白轻链

(dynein light chain 1)^[17], 14-3-3 蛋白^[18]以及肌动蛋白(actin)^[17]为已报道的血吸虫期别差异表达基因, 研究结果表明上述差异表达基因在血吸虫的生长发育方面起重要作用. 其余 14 个已知基因尚未被作为差异基因报道过. 这些基因连同 128 种血吸虫已知 EST 及 32 种新发现的 EST, 为发现新的日本血吸虫期别差异表达基因提供了重要基础. 应特别指出的是, 32 条 EST 在数据库未找到与之同源的血吸虫或其他生物基因或 EST 序列, 因此, 他们极有可能是日本血吸虫的特异基因, 这些新基因的注释和信息挖掘可望为理解血吸虫生物学增加新的内容.

对三个期别消减文库的 EST 编码蛋白进行了功能预测, 结果颇有启迪. 尾蚴消减文库的 EST 编码蛋白主要与运动、能量代谢、转录调节及致病性相关. Fung 等^[19]和 Santos 等^[20]分别对日本和曼氏血吸虫尾蚴文库的大规模测序, 也发现这一阶段与能量代谢及转录翻译活性相关的基因丰度较高. 这一预测结果与尾蚴阶段的生物学特性也相符, 尾蚴是从中间宿主钉螺体内逸出, 侵染终末宿主人、畜等的一个发育阶段, 感染宿主之前在水中游动生活, 身体的收缩需要大量参与运动的结构蛋白, 游动过程中需要消耗大量能量. 同时活跃的转录为尾蚴下一阶段转变为童虫所要经历的形态学和生理学改变作了准备^[21].

虫卵在血吸虫生物学中处在一个比较重要的位置, 既是致病因素又是传播因子. 虫卵阶段的差异表达基因尤其是虫卵阶段高表达的基因研究报道较少, 已报道的血吸虫差异表达基因多数在虫卵中不表达, 或低表达. 因此, 对虫卵阶段呈高表达的基因的查明, 将会增加对虫卵发育及致病方面的认识. 本研究所获得的虫卵消减文库中的基因功能预测结果显示, 这些蛋白质主要参与信号转导、细胞粘附、蛋白质和碳水化合物的代谢以及抗氧化反应. 推测这些蛋白质在虫卵粘附宿主组织^[22]、保护虫卵内容物免受外界环境的损害^[23]、刺激宿主免疫反应产生虫卵肉芽肿^[24]等方面发挥重要作用.

成虫消减文库 EST 预测结果显示, 这些基因多参与蛋白质的合成、转运及分解代谢, 参与虫体的运动等功能. 成虫寄生于宿主的肝门静脉或肠系膜静脉, 通过消化宿主红细胞为自身的生存提供能量, 因此这一阶段的有关蛋白质合成、转运及分解代谢的功能蛋白呈上调表达^[14]. 另外, 有研究报道, 曼氏血吸虫雄虫的肌动蛋白及动力蛋白轻链这两种

参与运动的结构蛋白较雌虫表达量高^[17], 与本研究结果一致, 推测这些蛋白质在雌雄虫的合抱配对过程中起重要作用。

综上所述, 本研究首次成功构建了高质量的日本血吸虫尾蚴、虫卵及雄虫的消减 cDNA 质粒文库, 可用于从整个基因组水平筛选期别差异表达基因。对文库部分克隆进行了测序及生物信息学分析, 为进一步分析期别差异表达基因的生物学功能提供基础。大规模分离、分析期别差异表达基因, 对从分子水平去解读血吸虫的生长发育机制, 筛选候选疫苗、诊断制剂、药物靶标具有重要意义。

参 考 文 献

- Ross A G, Sleight A C, Li Y S, *et al.* Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. *Clin Microbiol Rev*, 2001, **14**: 270~295
- Ross A G, Bartley P B, Sleight A C, *et al.* Schistosomiasis. *N Engl J Med*, 2002, **346** (16): 1212~1220
- Johnston D A, Blaxter M L, Degraeve W M, *et al.* Genomics and the biology of parasites. *Bioessays*, 1999, **21** (2):131~147
- Moser D, Doenhoff M J, Klinkert M Q, *et al.* A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, **51** (2): 229~238
- Scott J C, McManus D P. Identification of novel 70-kDa heat shock protein-encoding cDNAs from *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol*, 1999, **29** (3):437~444
- Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (12): 6025-6030.
- Matz M, Shagin D, Bogdanova E, *et al.* Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1558~1560
- Mei H, LoVerde P T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol*, 1997, **86** (1): 69~78
- Moser D, Doenhoff M J, Klinkert M Q. A stage-specific calcium-binding protein expressed in eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, **51** (2): 229~238
- Pierrot C, Godin C, Liu J L, *et al.* *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle. *Parasitology*, 1996, **113** (Pt 6): 519~526
- Ruppel A, Diesfeld H J, Rother U. Immunoblot analysis of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clin Exp Immunol*, 1985, **62** (3): 499~506
- Ram D, Grossman Z, Markovics A, *et al.* Rapid changes in the expression of a gene encoding a calcium-binding protein in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, **34** (2):167~175
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, *et al.* Regulation of HSP70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem*, 1993, **212** (2): 589~596
- Zerda K S, Dresden M H, Chappell C L. *Schistosoma mansoni*: expression and role of cysteine proteinases in developing schistosomula. *Exp Parasitol*, 1988, **67** (2): 238~246
- Jeffs S A, Hagan P, Allen R, *et al.* Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, **46** (1): 159~167
- Bostic J R, Strand M. Molecular cloning of a *Schistosoma mansoni* protein expressed in the gynecophoral canal of male worms. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, **79** (1): 79~89
- Yang G P, Ross D T, Kuang W W, *et al.* Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1517~1523
- Schechtman D, Ram D, Tarrab-Hazdai R, *et al.* Stage-specific expression of the mRNA encoding a 14-3-3 protein during the life cycle of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 1995, **73** (1~2): 275~278
- Fung M C, Lau M T, Chen X G. Expressed sequence tag (EST) analysis of a *Schistosoma japonicum* cercariae cDNA library. *Acta Trop*, 2002, **82** (2): 215~224
- Santos T M, Johnston D A, 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
- Skelly P J, Stein L D, Shoemaker C B. Expression of *Schistosoma mansoni* genes involved in anaerobic and oxidative glucose metabolism during the cercaria to adult transformation. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, **60** (1): 93~104
- Lejoly-Boisseau H, Appriou M, Seigneur M, *et al.* *Schistosoma mansoni*: *in vitro* adhesion of parasite eggs to the vascular endothelium. Subsequent inhibition by a monoclonal antibody directed to a carbohydrate epitope. *Exp Parasitol*, 1999, **91** (1): 20~29
- Gharib B, Abdallahi O M, Dessein H, *et al.* Development of eosinophil peroxidase activity and concomitant alteration of the antioxidant defenses in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J Hepatol*, 1999, **30** (4): 594~602
- El-Ahwany E G, Hanallah S B, Zada S, *et al.* Immunolocalization of macrophage adhesion molecule-1 and macrophage inflammatory protein-1 in schistosomal soluble egg antigen-induced granulomatous hyporesponsiveness. *Int J Parasitol*, 2000, **30** (7): 837~842

Construction and Analysis of Differentially Expressed Gene cDNA Library From *Schistosoma japonicum* in Different Development Stage*

YUAN Chun-Xiu, FENG Xin-Gang**, LIN Jiao-Jiao, LI Hao,

LU Ke, SHI Yao-Jun, FU Zhi-Qiang, LIU Jin-Ming, CAI You-Min

(Shanghai Institute of Animal Parasitology, Chinese Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Agricultural Ministry Animal Parasite,
Shanghai Research Center for Animal Biotechnology, Shanghai 200232, China)

Abstract In order to understand the mechanism of growth and development of *Schistosoma japonicum*, the differentially expressed gene cDNA libraries of *Schistosoma japonicum* cercariae, egg and adult worm were constructed separately for the first time by SSH (suppressed subtractive hybridization) technique, which can be used to isolate and analyze differentially expressed genes on the whole genome scale. The results of subtractive efficiency and identification of stage difference among above three subtracted cDNA libraries indicated the quality were high. The 257 clones which inserted fragments more than 500 bp from above three cDNA libraries were sequenced. BLASTn results showed that these 257 ESTs represented 182 schistosome genes, including 22 schistosome known genes, 128 schistosome ESTs and 32 no match genes which may represent schistosome novel gene. Results of these ESTs function prediction indicated that differentially expressed genes from cercariae subtracted cDNA library were mainly involved in movement, energy metabolism, transcriptional regulation and pathogenesis; differentially expressed genes from egg were mainly involved in signal transduction, cell adhesion, protein and carbohydrate metabolism and response to oxidative stress; differentially expressed genes from adult worm were mainly involved in protein biosynthesis, transport and body movement. To isolate and analyze differentially expressed gene on large scale must provide the valuable information for understanding the mechanism of parasite growth and development on the molecular level, for screening highly effective antigen candidates, target of drug and diagnostic antigen.

Key words *Schistosoma japonicum*, differentially expressed gene, suppressed subtractive hybridization, development stage

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA2Z3510, 2001AA215151) and Ministry of Major Science & Technology of Shanghai (03DZ19231).

**Corresponding author . Tel: 86-21-54082675, Fax: 86-21-54081818, E-mail: xingangf62@yahoo.com.cn

Received: April 18, 2005 Accepted: May 31, 2005