[文章编号] 1005-6661 (2012) 04-0440-05 ·论著·

日本血吸虫视黄酸X受体2全长cDNA的克隆及初步分析

邱春辉[1,2],刘升发[1],洪炀[2],傅志强[2],张旻[2],魏梅梅[1,2],艾德宙[2],林矫矫[2*]

[摘要] **目的** 克隆编码日本血吸虫视黄酸X受体2 (SjRXR2) 蛋白的全长cDNA,并对其进行初步研究。**方法** 利用cDNA末端快速扩增技术 (RACE) 获得SjRXR2蛋白全长编码cDNA。利用生物信息学技术,对基因结构进行初步分析。利用实时荧光定量 (Real-time) PCR技术对该基因在日本血吸虫不同时期虫体中的转录情况进行分析。应用在线抗体表位预测软件获得SjRXR2配体结合区抗原性较强的一个多肽序列,合成该多肽片段,并免疫小鼠制备抗血清。利用Western blot技术分析该蛋白在日本血吸虫中的表达。**结果** 采用RACE技术成功获得了SjRXR2蛋白全长编码cDNA,总长度为5 960 bp,其完整开放阅读框为4 308 bp,编码1 435个氨基酸,预测分子量为159 kDa。生物信息学分析表明该基因编码的蛋白质序列具有核受体家族2的典型结构域特征,且与曼氏血吸虫RXR2有较高的相似性。Real-time PCR分析表明,该基因在21、42 d龄日本血吸虫虫体内有较高的转录水平。Western blot分析表明,小鼠SjRXR2多肽免疫血清可特异性识别日本血吸虫虫体150 kDa蛋白。**结论** 成功获得了编码SjRXR2蛋白的全长cDNA,并制备了针对该蛋白的特异性多克隆抗体,为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

[关键词] 日本血吸虫 视黄酸X受体2;cDNA末端快速扩增技术 核受体
[中图分类号] R383.24 [文献标识码] A

Identification and preliminary analysis of a novel full-length cDNA encoding retinoid X receptor 2 from *Schistosoma japonicum*

QIU Chun-hui[1,2] *LIU Sheng-fa*[1], *HONG Yang*[2], *FU Zhi-qiang*[2], *ZHANG Min*[2], *WEI Mei-mei*[1,2], *AI De-zhou*[2], *LIN Jiao-jiao*[2*]
1 *School of Life Science, Xiamen University, Xiamen* 361005, *China*; 2 *Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, China*
* *Corresponding author*

[Abstract] **Objective** To clone and preliminarily analyze the full-length cDNA encoding retinoid X receptor 2 (RXR2) from *Schistosoma japonicum*. **Methods** The rapid amplification cDNA ends (RACE) was applied to get a full-length cDNA encoding retinoid X receptor 2 from *S. japonicum* (SjRXR2). The transcription of SjRXR2 was detected by real-time PCR. By bioinformatical technology, the gene structure was analyzed and the antibody epitope was predicted. The polyclonal antibodies were raised in mice immunized with the synthesis peptide. Western blot was applied to detect its expression in the worm. **Results** The full-length cDNA of SjRXR2 was 5 960 bp and contained an open reading frame encoding a 1 435 amino acid which had a predicted molecular weight 159 kDa. Bioinformatical analysis indicated that SjRXR2 had a highly conserved DNA binding domain (DBD) and a moderate conserved ligand binding domain (LBD). The relative mRNA (s) of SjRXR2 with higher expressions at Day 21 and 42 were evaluated in five different *S. japonicum* developmental stages. The Western blot analysis showed that polyclonal antibodies were able to specifically recognize the protein with molecular around 150 kDa from the extract of *S. japonicum*. **Conclusion** A full-length cDNA encoding retinoid X receptor 2 (RXR2) from *S. japonicum* is obtained which provides preliminary information for further investigation of SjRXR2 functions in *S. japonicum*.

[Key words] *Schistosoma japonicum*; Retinoid X receptor 2 (RXR2); Rapid amplification cDNA ends (RACE); Nuclear receptor

[基金项目] 国家自然科学基金 (31172315);公益性行业 (农业) 科研专项 (20090303036)
[作者单位] 1厦门大学生命科学学院 (厦门 361005);2中国农业科学院上海兽医研究所
[作者简介] 邱春辉,女,博士研究生。研究方向:分子寄生动物学
* 通信作者 E-mail: jjlin@shvri.ac.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

核受体作为后生动物一类重要的转录调控因子，在一系列重要的生化过程中发挥了关键的作用，包括细胞分化和增殖[1-2]。核受体包含有共同的蛋白结构域：一个N端A/B区，一个高度保守的DNA结合区（DBD），一个铰链区（D区）和一个C端配体结合区（LBD）。作为一个重要的核受体成员，视黄酸X受体（RXR）调控着很多细胞的增殖、分化和凋亡。在1990年第一个核受体RXR被发现后的20多年中，其他物种的RXR也相继被报道[3]。寄生蠕虫核受体是最早在曼氏血吸虫中被鉴定[4-5]。到目前为止，已有21个曼氏血吸虫核受体被鉴定，其中有14个核受体的全长cDNA已被克隆和研究[6-8]。日本血吸虫作为另外一种广泛流行的血吸虫物种，其核受体尚未见报道。本研究根据推测的RXR序列设计引物，利用PCR和cDNA末端快速扩增技术（RACE）克隆到编码日本血吸虫视黄酸X受体2（SjRXR2）蛋白的全长cDNA，并对该基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体的转录情况进行了分析，为深入研究SjRXR2蛋白在血吸虫生长发育中的功能奠定了基础。

材料与方法

1 菌种、质粒和实验动物

大肠杆菌DH5α购于天根生化科技有限公司；pMD19 T载体购自大连宝生物工程有限公司；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小鼠购自上海斯莱克实验动物中心；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感染日本血吸虫尾蚴，1 000～6 000条，在感染后第7、13、21、35 d和42 d剖杀，以肝门静脉灌注法收集虫体，液氮冻存备用。

2 主要试剂

Trizol购自Invitrogen公司；SMARTer™ RACE cDNA扩增试剂盒（Clontech）、Prime Script™ RT reagent Kit、Ex Taq和LA Taq、SYBR Premix Ex Taq™酶均购自大连宝生物工程有限公司；Spin Column DNA Gel Extraction Kit购自生物工程（上海）有限公司；RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司；羊抗小鼠IgG-HRP购自上海鼎国生物技术有限公司；DNA Marker和HRP-DAB底物显色试剂盒购自天根生化科技有限公司。

3 总RNA的提取和cDNA

5′、3′端的RACE扩增根据http://lifecenter.sgst.cn/schistosoma/cn/schdownload数据库中报道的视黄酸X受体推测序列（predicted Sjc_0002350）设计了数对引物，其中一对引物（P1和P2）能够扩增得到相应序列，然后根据扩增得到的相应片段的测序结果设计合成RACE引物（由Invitrogen生物技术有限公司合成）。PCR上游引物P1：5′-TCCGCTACAGTCCTATCA-3′；下游引物P2：5′-ATCACTTAACCACCTTTT-3′；5′ RACE的巢式引物5GPS1：5′-TTGCACGGTCTGAACATATTGAACAC-3′；5GPS2：5′-GTCCTGACGGTCGTAGTAAACAACAT-3′；3′ RACE的巢式引物3GPS1：5′-ACTTCCAGCAGTTATTCCACCG-3′，3GPS2：5′-GACGTAAACGGTGGTTAAGTGA-3′。按Trizol试剂盒说明书提取21 d日本血吸虫虫体总RNA并纯化，据SMART™ RACE cDNA扩增试剂盒的说明合成3′ RACE和5′ RACE的cDNA模板。使用上述引物并按该试剂盒操作手册进行PCR扩增。把PCR产物克隆到pMD19T载体中，通过菌液PCR鉴定阳性克隆，并送到Invitrogen生物技术有限公司测序。利用DNAStar软件查找5′和3′与原序列的重叠部分，然后将3段序列拼接。

4 基因结构分析

把获得的全长cDNA序列与在线的scaffold数据库（http://lifecenter.sgst.cn/blast/cn）进行比对，获得该基因的内外显子分布图。

5 生物信息学分析

利用在线工具NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）的Blast和ORF finder对所获得的全长cDNA的保守结构域进行分析和编码框的预测；利用DNAStar软件对氨基酸的残基数、组成、蛋白质相对分子质量等参数进行分析；利用ClustalX分析工具对其与日本血吸虫SjRXR1、曼氏血吸虫RXRs蛋白，包括SmRXR1（AF094759）和SmRXR2（AAD33428.2）进行同源性分析。根据Genbank中登陆的序列号：ChRXRa，*Gallus gallus*，XP_003642339.1；TgRXRg，*Taeniopygia guttata*，NP_001243138.1；XenRXRg，*Xenopus laevis*，P51129；HRXRa，*Homo sapiens*，P19793；MRXRa，*Mus musculus*，P28700；HRXRb，*Homo sapiens*，P28702；MRXRb，*Mus musculus*，P28704；DUSP，*Drosophila melanogaster*，P20153；SmRXR1，*Schistosoma mansoni*，AF094759；SmRXR2，*Schistosoma mansoni*，AAD33428.2和SjRXR2，*Schistosoma japonicum*，JX111996，利用MEGA4软件构建系统进化树。

6 Real-time PCR分析SjRXR2在虫体不同发育时期的表达

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分别提取日本血吸虫7、13、21、35 d及42 d虫体总RNA,分光光度计法定量,用Prime Script™ RT reagent Kit反转录获得日本血吸虫cDNA。以日本血吸虫NADH-ubiquinone reductase为内参,以不同期别的日本血吸虫cDNA为模板,用SYBR Premix Ex Taq™进行实时荧光定量Real-time PCR分析。SjRXR2上游引物:5′-AGTTATCTGGTCGTCAAA-3′;下游引物:5′-AGAAGTATCCGTAATGGG-3′,预期扩增片段长度208 bp。内参上游引物:5′-CGAGGACCTAACAGCAGAGG-3′;下游引物:5′-TCCGAACGAACT TTGAATCC-3′,预期扩增片段长度174 bp,上述引物均由Invitrogen公司合成。每个反应均做3个复孔,使用$2^{-\Delta\Delta CT}$方法计算试验数据。

7 SjRXR2蛋白多肽的合成及多克隆抗体的制备

利用在线抗体表位预测软件(http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb input)得到了位于配体结合区抗原性较强的一条多肽序列:RDQVYTGLEYYCNQV,由强耀生物技术公司合成,多肽与KLH偶联免疫BALB/c小鼠制备多克隆抗体。以KLH单独免疫小鼠,制备对照多抗血清。

8 Western blot分析

以RIPA裂解液抽提21 d虫体总蛋白,进行SDS-PAGE电泳,然后经280 mA恒流电泳2 h,转移到硝酸纤维膜上。用封闭液(5%脱脂奶粉/PBST)4 ℃封闭过夜,以PBST洗膜后,按1∶100的比例加入上述方法制备的多抗血清,37 ℃孵育2 h,洗膜3次,每次10 min,再以1∶2 500的比例加入HRP标记的山羊抗小鼠IgG,37 ℃孵育1 h,洗膜3次,每次10 min,最后用DAB作为底物显色,检测目的蛋白。

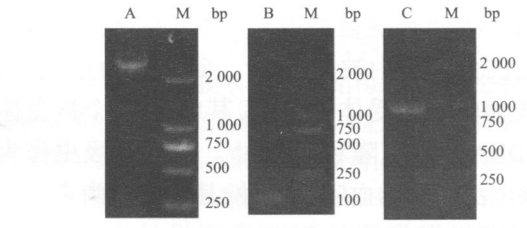
结 果

1 PCR扩增结果

利用引物P1和P2扩增得到一特异性条带(图1C),大小为972 bp,与推测的mRNA序列匹配。利用该扩增序列设计RACE引物,进行3′和5′RACE扩增。5′RACE第2轮PCR扩增获得一特异性条带,将其克隆到pMD19 T载体中,序列测定表明为2 838 bp序列(图1A)。3′RACE第2轮PCR扩增获得一2 459 bp条带(图1B),测序分析表明其包含转录终止信号和一条poly(A)尾。

2 全长cDNA的克隆及生物信息学分析

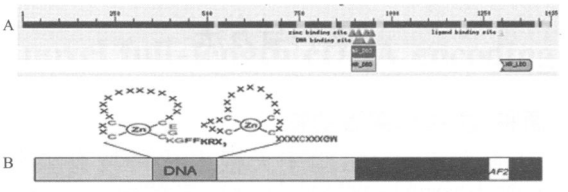
生物信息学分析表明,日本血吸虫SjRXR2全长编码cDNA包含了完整ORF,可编码1 435个氨基酸,预测其编码的蛋白分子量为159 kDa。保守功能结构域分析显示,该蛋白含DBD和LBD 2个功能域及2个锌指基序(图2),推测为日本血吸虫SjRXR2蛋白。多重序列比较表明,日本血吸虫SjRXR2与曼氏血吸虫SmRXR2蛋白具有61%的相似性(图3)。系统进化树分析表明,该蛋白与曼氏血吸虫视黄酸受体X具有较高的相似性(图4)。



M DNA标志物(100~2 000 bp);A 5′ RACE扩增产物;B 3′ RACE扩增产物;C 引物P1和P2 PCR扩增产物
M DNA Marker; A PCR product of 5′RACE; B PCR product of 3′ RACE; C PCR product by primers P1 and P2;

图1 PCR结果分析

Fig. 1 PCR product analysis



A 日本血吸虫SjRXR2蛋白结构域;B SjRXR2 DNA结合结构域的两个锌指基序
A Analysis of SjRXR2 domains; B Two zinc-finger modules of DNA Binding Domain

图2 日本血吸虫SjRXR2蛋白结构域和DNA结合结构域的2个锌指基序分析

Fig. 2 Analysis of SjRXR2 domains and two zinc-finger modules of DNA binding domain

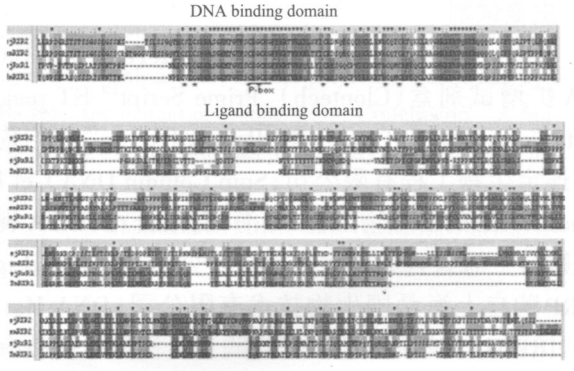


图3 SjRXR2与SjRXR1、曼氏血吸虫SmRXR 1、SmRXR2的多重序列比较

Fig. 3 Multiple sequence alignment of SjRXR2, SjRXR1 and *S. mansoni* SmRXR1, SmRXR2

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

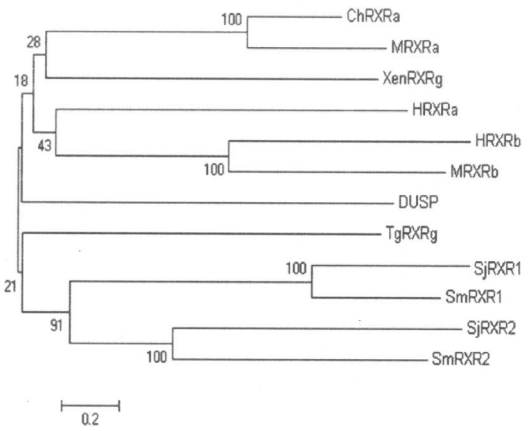


图4 SjRXR2系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of SjRXR2 proteins

3 SjRXR2基因在日本血吸虫不同发育时期的转录水平分析

为了解SjRXR2基因在日本血吸虫不同发育时期的转录水平，分别提取7、13、21、35、42 d虫体的总RNA，以NADH-泛醌还原酶为内参，利用Real-time PCR法检测该基因在上述发育时期的转录情况。结果表明SjRXR2在以上几个发育时期均有转录，其中在21、42 d的虫体中转录水平较高（图5）。

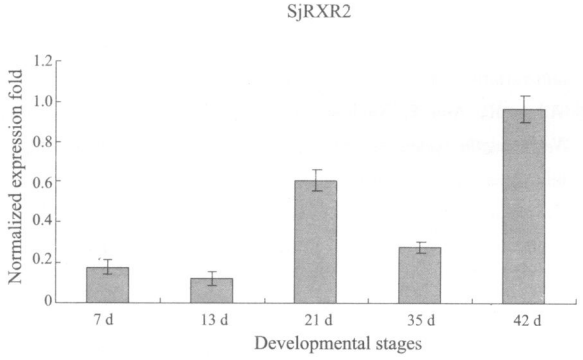


图5 SjRXR2基因在日本血吸虫不同期别虫体中的转录水平
Fig 5 Transcript profiles of SjRXR2 in differential development stages of *S. japonicum*

4 SjRXR2基因结构分析

SjRXR2基因结构分析表明，2个支架（SJC_S000912、SJC_S000005）涵盖了5′-UTR、完全的ORF和部分3′-UTR。SjRXR2包含至少10个大小分别为173、607、1 151、624、168、519、107、475、625 bp和1 157 bp的外显子和9个内含子（图6）。

5 Western blot分析

以多肽免疫血清为一抗，利用Western blot技术分析血吸虫虫体蛋白抽提物，结果表明，在约150 kDa的位置出现特异性条带（图7A），而KLH血清对照组在该位置未见明显条带（图7B）。

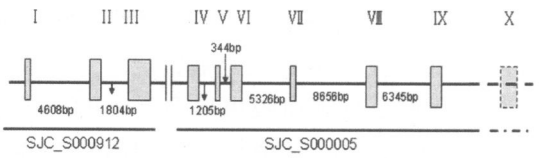
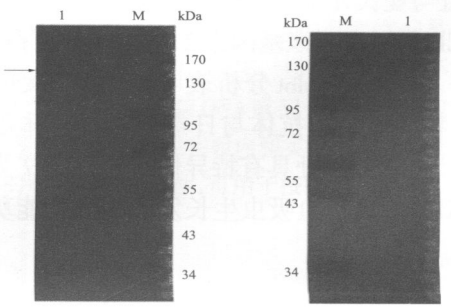


图6 SjRXR2基因结构分析
Fig. 6 Gene structure of SjRXR2



A 多肽与KLH偶联免疫BALB/c小鼠制备多克隆抗体；B KLH免疫BALB/c小鼠制备多克隆抗体；1 21 d虫体蛋白裂解物；M蛋白标志物（34～170 kDa）
A Polyclonal antibodies were raised in mice immunized with the synthesis peptide; B Polyclonal antibodies were raised in mice immunized with KLH only; 1 Protein extracted from 21 d schistosomes; M Protein Marker

图7 Western blot结果图
Fig. 7 Western blot analysis

讨 论

血吸虫病是由血吸虫感染引起的全世界范围的一种重要寄生虫病，目前世界上大约有2亿人口受到该病威胁。2010年我国仍有血吸虫病人325 824例[9-10]。血吸虫寄生于人体血管，它们在正常发育时会摄取宿主的血液成分，并对宿主的分子信号做出反应[11]。荷尔蒙信号是正常生理的必要组成成分，控制了后生动物的发育和分化。宿主的荷尔蒙主要影响寄生虫的存活、生长、性成熟、产卵和幼虫的定殖[12-14]。很多荷尔蒙是通过核受体起作用的。根据保守的序列和结构基序，核受体被分为6个家族，分别为核受体家族1～6（NR1～6）[4]。NR2的首个RXR家族成员在1990年被鉴定出来，之后的20多年时间里，很多物种的其他核受体也陆续被发现[3]。秀丽线虫有多达284个核受体基因，但均不属于NR2家族[15]，而犬恶丝虫（*Dirofilaria immitis*）和马来丝虫（*Brugia malayi*）

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基因组中发现有编码视黄酸受体/气门蛋白基因的序列[16-18]。海葵(*Nematostell vectensis*)基因组中未见编码RXR的序列[19],然而在另外一种刺胞动物——水母(*Tripedalia cystophora*)中却鉴定出RXR蛋白[20]。代表了进化中最原始的核受体家族成员之一、属于NR2的曼氏血吸虫RXR也已经被鉴定[6-8]。本文采用RACE技术获得了日本血吸虫生命活动的一种重要核受体——SjRXR2蛋白全长编码cDNA,长度为5 960 bp,其ORF为4 308 bp,编码1 435个氨基酸,预测分子量为159 kDa。生物信息学分析表明该基因编码的蛋白质序列具有核受体家族2的典型结构域特征,且与曼氏血吸虫RXR2有较高的相似性。Real-time PCR分析表明该基因在21、42 d龄中有较高的转录水平。Western blot分析表明,利用多肽免疫小鼠获得的特异多克隆抗体与日本血吸虫虫体蛋白在分子量约为150 kDa处具有特异性反应。本文为深入研究SjRXR2蛋白在血吸虫生长发育中的功能奠定了基础。

[参考文献]

[1] Gronemeyer H, Laudet V. Nuclear receptors [J]. Protein Profile, 1995, 2(11): 1173-1308.

[2] Laudet V, Auwerx J, Gustafsson JA, et al. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily [J]. Cell, 1999, 97: 161-163.

[3] Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors [J]. Cell, 1995, 83(6): 841-850.

[4] Escriva H, Safi R, Hanni C, et al. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1997, 94(13): 6803-6808.

[5] Wu W, Loverde PT. Nuclear hormone receptors in parasitic helminthes [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 334: 56-66.

[6] Freebern WJ, Osman A, Niles EG, et al. Identification of a cDNA encoding a retinoid X receptor homologue *Schistosoma mansoni* [J]. J Biol Chem, 1999a, 274(8): 4577-4585.

[7] Freebern WJ, Niles EG, Loverde PT. RXR-2, a member of the retinoid X receptor family in *Schistosoma mansoni* [J]. Gene, 1999, 233(1): 33-38.

[8] De Mendonça RL, Escrivá H, Bouton D, et al. Structural and functional divergence of a nuclear receptor of the RXR family from the trematode parasite *Schistosoma mansoni* [J]. Eur J Biochem, 2000a, 267(11): 3208-3219.

[9] Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa [J]. Acta Trop, 2003, 86: 125-139.

[10] 雷正龙,郑浩,张利娟,等. 2010年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(6): 599-604.

[11] Forrester SG, Warfel PW, Pearce EJ. Tegument expression of a novel type Ⅱ receptor serine/threonine kinase in *Schistosoma mansoni* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004, 136: 149-156.

[12] Lawrence PO. Hormonal effects on insects and other endoparasites *in vitro* [J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1991, 27A(6): 487-496.

[13] De Mendonça RL, Escrivá H, Bouton D, et al. Hormones and nuclear receptors in schistosome development [J]. Parasitol Today, 2000, 16(6): 233-240.

[14] Beckage NE. Host - parasite hormonal relationships: a common theme? [J]. Exp Parasitol, 1991, 72: 332-338.

[15] Sluder AE, Mathews SW, Hough D, et al. The nuclear receptor superfamily has undergone extensive proliferation and diversification in nematodes [J]. Genome Res, 1999, 9(2): 103-120.

[16] Taubert S, Ward JD, Yamamoto KR. Nuclear hormone receptors in nematodes: evolution and function [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 334(1): 49-55.

[17] Shea C, Hough D, Xiao J, et al. An RXR/USP homolog from the parasitic nematode, *Dirofilaria immitis* [J]. Gene, 2004, 324: 171-182.

[18] Sluder AE, Maina CV. Nuclear receptors in nematodes: themes and variations [J]. Trends Genet, 2001, 17(4): 206-213.

[19] Adam R, Ann T. Nuclear receptor complement of the cnidarian *Nematostella vectensis*: phylogenetic relationships and developmental expression patterns [J]. BMC Evol Biol, 2009, 9: 230.

[20] Kostrouch Z, Kostrouchova M, Love W, et al. Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95(23): 13442-13447.

[收稿日期] 2012-04-05 [编辑] 钱熠礼

欢迎订阅,欢迎投稿,
欢迎联系广告业务!

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net