

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21620071152044

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

犬钩虫中 6 种 *Caenorhabditis elegans*
同源基因的克隆表达

Cloning and expression of six *Caenorhabditis elegans*
homologous genes in *Ancylostoma caninum*

郑 晶

指导教师姓名: 杨玉荣 副教授

专业名称: 动 物 学

论文提交日期: 2010 年 07 月

论文答辩时间: 2010 年 08 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	III
Abstract	III
第一章 前言	1
1 钩虫概况	1
2 钩虫基因组学研究现状	5
3 与 <i>C.elegans</i> 同源基因的研究	6
3.1 14-3-3 蛋白家族	7
3.2 腺苷酸转移酶蛋白家族	8
3.3 逆转录转座子蛋白家族	9
3.4 神经病靶酯酶蛋白家族	10
3.5 CDC-42 和 MEX-3 蛋白	11
4 钩虫抗原的研究进展	12
4.1 ES 抗原成分组成	12
4.2 成虫虫体蛋白	13
5 钩虫疫苗	14
5.1 钩虫病动物模型研究	14
5.2 疫苗发展	15
6 本论文研究的目的和意义	17
第二章 材料与仪器	19
2.1 材料	19
2.1.1 犬钩虫及实验动物	19
2.1.2 菌株和质粒	19
2.2 主要仪器	19
2.3 常用的药品与试剂	19
2.3.1 药品	19
2.3.2 主要试剂	20

2.3.3 引物·····	21
2.3.4 染液配方·····	22
2.3.5 试剂盒·····	22
第三章 犬钩虫 <i>ant-1</i> 基因的克隆、表达及定位的研究·····	23
3.1 实验方法·····	23
3.2 实验结果·····	28
3.3 讨论·····	41
第四章 犬钩虫 <i>ftt-2</i> 基因的克隆、表达及定位的研究·····	43
4.1 实验方法·····	43
4.2 实验结果·····	44
4.3 讨论·····	55
第五章 犬钩虫 <i>Retr-1</i> 基因的克隆、表达及定位的研究·····	57
5.1 实验方法·····	57
5.2 实验结果·····	58
5.3 讨论·····	70
第六章 犬钩虫 <i>NTE</i> 基因的克隆、表达及定位的研究·····	72
6.1 实验方法·····	72
6.2 实验结果·····	74
6.3 讨论·····	85
第七章 犬钩虫 <i>cdc-42</i> 与 <i>mex-3</i> 基因的初步研究·····	87
7.1 实验方法·····	87
7.2 实验结果·····	88
7.3 讨论·····	98
结 论·····	100
参 考 文 献·····	101
致 谢·····	111

Table of contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1. Hookworm overview	1
2. The genome of hookworm	5
3. The homologous genes in <i>C.elegans</i>	6
3.1 14-3-3 protein family	7
3.2 Adenine nucleotide translocase protein family.....	8
3.3 Retrotransposon-like family.....	9
3.4 Neuropathy target esterase protein family.....	10
3.5 CDC-42 and MEX-3 protein.....	11
4. ES antigen in hookworm	12
4.1 Secretion and component of ES antigen.....	12
4.2 Adult worm protein.....	13
5. Hookworm vaccine	14
5.1 The Animal model of hookworm	14
5.2 Vaccine development	15
6. Aims and significance of this dissertation	17
Chapter 2 Materials and instruments	19
2.1 Materials	19
2.1.1 <i>A.caninum</i> and experimental animals.....	19
2.1.2 Plasmids and strains.....	19
2.2 Instruments	19
2.3 Reagents	19
2.3.1 Reagents	19

2.3.2 Chemicals	20
2.3.3 Primers	21
2.3.4 Preparation of staining solution	22
2.3.5 Kits	22
Chapter 3 Cloning, expression and localization of <i>ant-1</i> gene in	
<i>A.caninum</i>	23
3.1 Materials and methods	23
3.2 Results	28
3.3 Discussion	41
Chapter 4 Cloning, expression and localization of <i>ftt-2</i> gene in	
<i>A.caninum</i>	43
4.1 Materials and methods	43
4.2 Results	44
4.3 Discussion	55
Chapter 5 Cloning, expression and localization of <i>Retr-1</i> gene in	
<i>A.caninum</i>	57
5.1 Materials and methods	57
5.2 Results	58
5.3 Discussion	70
Chapter 6 Cloning, expression and localization of <i>NTE</i> gene in	
<i>A.caninum</i>	72
6.1 Materials and methods	72
6.2 Results	74
6.3 Discussion	85
Chapter 7 Cloning and phylogenetic analysis of <i>cdc-42</i> and <i>mex-3</i>	
genes from <i>A.caninum</i>	87

7.1 Materials and methods	87
7.2 Results	88
7.3 Discussion	98
Conclusion	100
Reference	101
Acknowledgements	111

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

钩虫是重要的人兽共患寄生虫,寄生于人体可导致贫血,儿童感染钩虫后会造发育迟缓。犬钩虫是寄生于犬的钩虫, *Caenorhabditis elegans* 在 dauer 时期的行为、形态和功能与钩虫 L3 期极其相似。另外, *C.elegans* 从 dauer 时期进入 L4 期的机制也与钩虫 L3 感染宿主的机制比较相似。本文根据犬钩虫 EST 库从中筛选出与模式生物 *C.elegans* 同源基因,根据这些序列设计一系列引物,以犬钩虫 cDNA 为模板,扩增 *C.elegans* 同源的基因片段。

为了解犬钩虫中 ANT-1、FTT-2、RETR-1 和 NTE-1 的功能,我们对犬钩虫的 *ant-1*、*ftt-2*、*Retr-1* 和 *NTE* 基因进行了克隆和表达鉴定。我们通过 RT-PCR 对这四种基因的 cDNA 进行了扩增,获得的 cDNA 片段大小分别为 700bp(*ant-1*)、1200bp(*ftt-2*)、1300bp(*Retr-1*)和 800bp (*NTE*)。对这四种基因进行克隆,获得的阳性质粒通过酶切验证和测序。将测序正确的片段构建到不同的原核表达载体上,构建重组表达质粒并转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中用 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析表达情况。

运用 SDS-PAGE 凝胶电泳对表达结果进行了分析,发现重组蛋白分子量大小分别为 46kDa (ANT-1)、45kDa (FTT-2)、56kDa (RETR-1)和 20kDa (NTE-1)。进行了重组蛋白的纯化和免疫获得相应抗体。用 Western Blot 检测了这些蛋白在 L3、雌虫时期的表达情况,结果表明这些蛋白在 L3 和成虫中均表达。

RT-PCR 的结果显示, *ant-1* 的 mRNA 转录在雌虫、雄虫、杆状蚴和丝状蚴中均有发生; *ftt-2* 的 mRNA 转录在雌虫中含量最高,丝状蚴中最低; *retr-1* 的 mRNA 转录在雌虫、雄虫、杆状蚴和丝状蚴中均有发生,但在丝状蚴中表达量最低; *NTE* 的 mRNA 转录在雌虫、雄虫和丝状蚴中均有发生,但在杆状蚴中没有检测到。

利用免疫荧光抗体染色分析了这四种蛋白在犬钩虫不同发育时期的表达情况,发现这四种基因在犬钩虫成虫和不同发育时期均有表达。ANT-1 在犬钩虫体内分布广泛,在钩虫的卵、L1/L2、L3 和成虫时期均有表达,在 L1/L2 期中,ANT-1 蛋白在钩虫头部,特别是食道腺中的荧光特别强烈,L3 期 ANT-1 分布在整个虫体中,食道腺、生殖腺原基荧光较亮,成虫切片显示 ANT-1 分布在肠道、

卵巢和子宫等部位。

FTT-2 在钩虫各个时期均有表达，在 L1/L2 期，主要分布在食道腺、肠道等部位，头部、尾部基本没有检测到荧光，L3 期以及成虫切片显示 FTT-2 主要集中在食道腺、生殖腺原基部位，其荧光较亮。

RETR-1 在虫卵中荧光强烈，在 L1/L2 期，RETR-1 只分布在肠道，其他部位基本没有检测到荧光，L3 期分布广泛,成虫切片免疫荧光定位显示 RETR-1 分布在肠道、卵巢等部位。

NTE 在虫卵中有明显的表达，荧光强烈，在 L1/L2 期，几乎没有检测到荧光。L3 期 NTE 荧光检测较弱，成虫切片免疫荧光定位显示 NTE 分布广泛，在肠道、卵巢等部位都能检测到。

为了更好的了解犬钩虫的基因组信息,我们从犬钩虫得到了 2 个与 *C.elegans* 同源性高的新基因的 cDNA 片段。克隆后测序并通过序列分析发现，它们翻译得到的蛋白与 *C.elegans* 中 CDC-42、MEX-3 蛋白的一致性分别为 91.6%、27.6%，并且发现这两个蛋白都有该蛋白家族的保守区。

关键词：犬钩虫；*Caenorhabditis elegans*；同源基因；克隆；表达

Abstract

Hookworms are important intestinal parasitic nematodes. The dauer stage of *C.elegans* is morphologically, behaviorally, and functionally analogous to hookworm L3. The molecular biology of dauer recovery is well-defined, and has provided an useful information for investigation of the molecular biology of hookworm infection. A series of primers were designed according to the EST library of *A.caninum* and the genomic information of *C.elegans*, and we got cDNA fragments of *C.elegans* homologous genes from *A. caninum* by RT-PCR.

In order to study the function of ANT-1, FTT-2, RETR-1 and NTE-1, the cDNAs encoding ANT-1, FTT-2, RETR-1 and NTE-1 were amplified by RT-PCR from *A. caninum* mRNA. The fragments of cDNAs were about 700bp(*ant-1*), 1200bp(*ftt-2*), 1300bp (*Retr-1*) and 800bp (*NTE*) respectively, and the amplified products were cloned into pMD-18T vector. After PCR screening, enzyme digestion, and sequencing, the right sequence of plasmids were digested by enzymes and ligated with expression vector digested with the same enzymes, and then transformed into *E.coli* BL21 (DE3) strain.

Bacterial lysates from cultures induced with IPTG were loaded onto SDS-PAGE gel, and a specific band of 46KDa (ANT-1), 45KDa (FTT-2), 56KDa (RETR-1) and 20KDa (NTE-1) respectively was detected in the SDS-PAGE gel. The purification of recombinant proteins and the immunization of mice were undertaken, the antibodies were obtained. Western blot results showed that these proteins were expressed in L3, and female adult worms respectively.

RT-PCR results showed that: *ant-1*mRNA was detected in the L1/L2, L3, male and female adult worms; *ftt-2* mRNA was detected at the highest level in the female adult worm, but at the lowest level in L3; *retr-1* mRNA was also detected in each stage of worms, but at the lowest level in L3; *NTE* mRNA wasn't detected in L1/L2.

The expressions of four proteins in eggs, larval and adult of worms were detected

by immunofluorescence antibody staining. ANT-1 distributed in intestine, ovary and uterus of adult worms, and also in L1/L2, and L3 larval esophageal gland, as well as gonad primordium. FTT-2 expressed in the L1/L2 and L3 larval intestine, esophageal gland and gonad primordium. RETR-1 distributed in eggs, L1/L2 intestine and adult intestine, ovary. NTE didn't express in L1/L2, but distributed in egg, L3 larval esophageal gland, as well as adult intestine and ovary.

In order to understand the *A.caninum* genome information, we got two cDNAs fragments of *C.elegans* homologus *cdc-42* and *mex-3* from *A.caninum* by RT-PCR. The sequences of *cdc-42* and *mex-3* were translated and analyzed by softwares. The results showed that these genes were homologus to *C.elegans* CDC-42, MEX-3 proteins respectively, and their identity were 91.6% and 27.6% respectively. We also found the conserved domain of CDC-42 and MEX-3 presents in the amino acids sequence of these two proteins in *A.caninum*, respectively.

Key words: *Ancylostoma caninum*; *Caenorhabditis elegans*; homologus gene; cloning; expression

第一章 前言

钩虫 (hookworm) 是钩口科线虫的统称, 至少包括17个属, 100余种, 寄生在猫、狗、羊等各种生物中, 寄生在人体小肠可引起钩虫病。在肠道线虫中钩虫的危害最严重, 不但可损伤肠黏膜, 造成消化道功能紊乱, 而且可使人体长期慢性失血, 重度感染者会造成严重贫血。目前, 全世界钩虫感染人数越来越多, 已成为危害人民健康的重要寄生虫病之一^[1]。

1 钩虫概况

钩虫隶属于圆线虫总科 (*Strongyloidea*) 钩口线虫 (*Ancylostomatidae*), 口囊发达, 口孔边缘有齿或切板。目前至少包括17个属, 100余种。寄生人体的钩虫, 主要有十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma duodenale* Dubini, 1843), 简称十二指肠钩虫; 美洲板口线虫 (*Necator americanus* Stiles, 1902), 简称美洲钩虫。另外, 寄生猫和狗的钩虫主要有锡兰钩口线虫 (*Ancylostoma ceylanicum* Loose, 1911), 犬钩口线虫 (*Ancylostoma caninum* Ercolani, 1859) 和巴西钩口线虫 (*Ancylostoma braziliense* Gomezde Faria, 1910), 其感染性幼虫偶可感染人体, 引起皮肤幼虫移行症。

钩虫为土源性肠道寄生线虫, 广泛分布于热带及亚热带的发展中国家, 属于世界性分布。十二指肠钩虫广泛分布于地中海流域、印度、中国、日本和南美洲太平洋沿岸, 而在美国和赤道非洲罕见。美洲钩虫主要分布于中、南非洲、东南亚、美拉尼西亚和波利尼西亚, 也广泛分布于美国南部, 加勒比海的岛屿和中南美洲的大西洋沿岸^[2] (图1)。

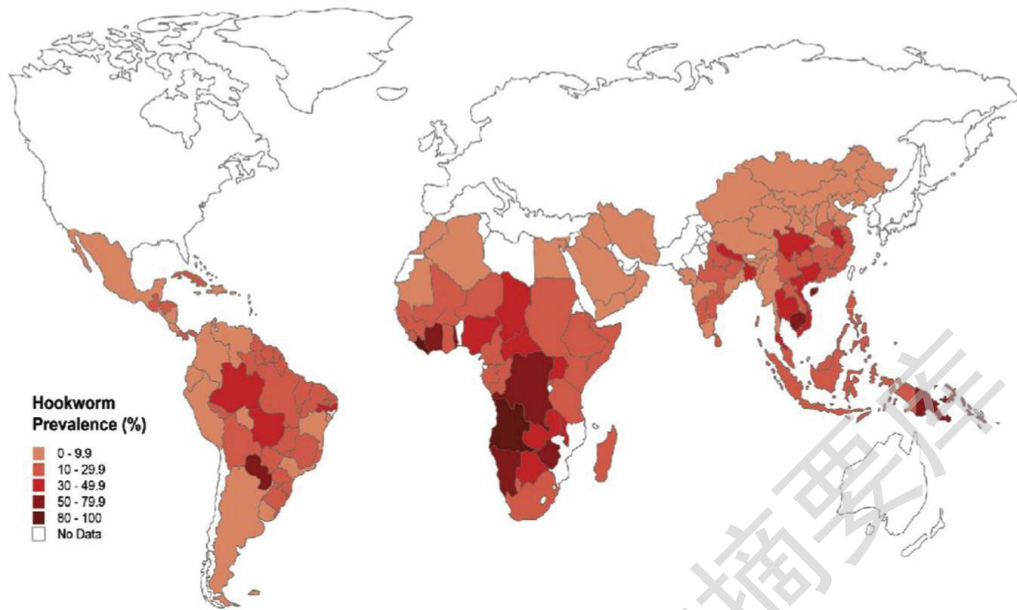


图1 人类钩虫感染全球分布现状

(引自:De Silva N R ,Brooker and Hotez P J 2003^[2])

钩虫生活史分为 6 个时期，各个阶段的形态分别为虫卵、L1、L2、L3、L4、成虫等 6 种形态。钩虫虫卵椭圆形，两端钝圆，卵壳较薄，无色透明，卵内通常含 4 个细胞。L1、L2 期幼虫体壁透明，前端钝圆，后端尖细。口腔细长，有口孔，咽管为典型的杆状形。L3 期幼虫体表覆有鞘膜，口腔封闭，有口矛，咽管细长，约占虫体的 1/5，咽管末端球状部分已不甚明显，尾尖细，丝状蚴具有感染能力，故又称为感染期蚴。到达宿主小肠的幼虫，在第三次蜕皮后，形成口囊，在 3~4 周内再进行第四次蜕皮发育为成虫。成虫体细长，半透明，肉红色，死后呈灰白色。虫体前端较细，顶端有一发达的口囊，由坚韧的角质构成。因虫体前端向背面仰曲，形成颈弯，仰曲程度，即颈弯大小，因虫种而异。口囊的上缘为腹面、下缘为背面。

成虫寄生于小肠，两性虫体成熟后，交配产卵。虫卵随粪便排出体外，在适宜条件下，经 12~30h 孵出幼虫(杆状蚴)，再经 1 周左右蜕化为感染性幼虫(带鞘丝状蚴)。通常经口感染，也可经皮肤和口腔黏膜感染，感染期幼虫钻入宿主皮肤后，即进入血管或淋巴管，随血流经右心至肺，穿过肺微血管进入肺泡。然后沿着湿润的肺泡壁，向阻力最弱的方向移行，借助于小支气管、支气管上皮细胞纤毛的运动向上移行至咽，再随吞咽至食管，经胃而达小肠。部分幼虫也可随痰

被吐出。到达小肠的幼虫，经过蜕皮后，形成口囊，最终发育为成虫^[3]。十二指肠钩虫与美洲钩虫的生活史基本相同^[4]（图2）。

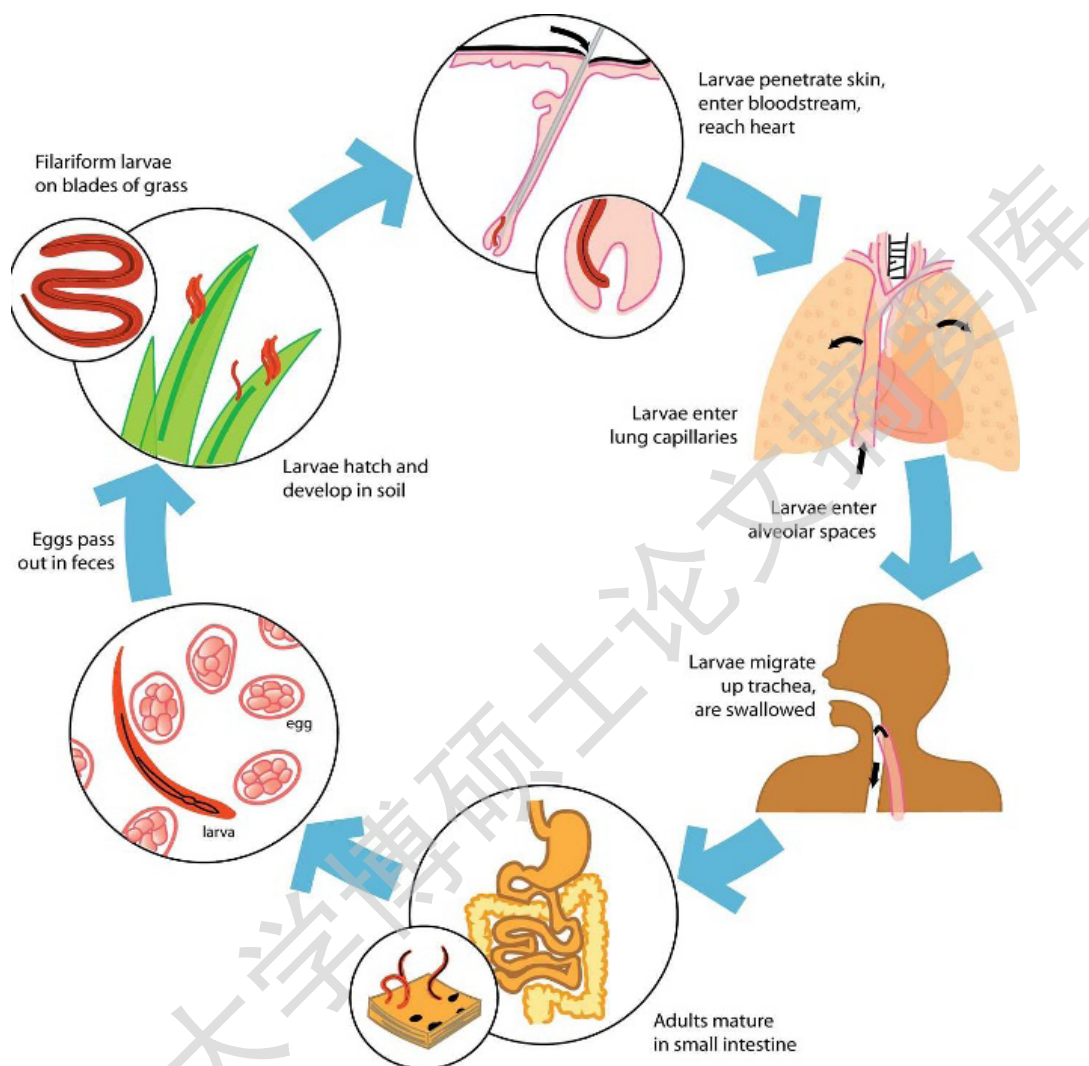


图2 钩虫生活史

（引自 Hotez P J, Bethony Jand Bottazzi M E 2005^[4]）

钩虫病（Ancylostomiasis）是由钩虫寄生人兽体引起以缺铁性贫血和营养不良为主要临床表现的疾病，其主要病原是十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫。钩虫病的临床表现可分为三期，即由幼虫引起皮肤（或粘膜）侵袭期、肺部移行期和成虫在肠道的寄生期。有钩蚴性皮炎、贫血、胃肠功能失调和营养不良等主要临床表现，轻者无明显临床症状，称为带虫者，重者可致急性便血性腹泻、重度贫血、心功能衰竭和儿童发育障碍等，婴儿钩虫病引起的并发症是造成婴儿死亡的常见病^[5]。

20世纪初人类就开始了钩虫感染的研究,在过去的几十年内世界上许多地方都出现了本病的暴发,钩虫病已成为全球的一个公共卫生问题^[4]。钩虫病主要集中在撒哈拉沙漠以南的非洲以及东亚地区,同时高发病率也发生在中国南部,印度次大陆以及美洲等地方^[6]。据最新统计,目前全球有超过7.6亿人口感染十二指肠钩虫和美洲钩虫^[7],近8千万人口面临着严重的临床症状^[4]。在一些发展中国家,钩虫已成为了一种传染病,主要造成缺铁性贫血,更严重的可导致身体和精神发育迟滞及死亡。因此有人认为,钩虫病可能是仅次于疟疾位居第二的最严重危害人类健康的寄生虫病^[8]。

在我国,钩虫病的分布也极为广泛,感染人体的十二指肠钩虫与美洲钩虫在我国均有分布,前者主要分布在较高纬度的北方地区^[9, 10],后者则多分布于低纬度的南方地区^[11]。根据2002—2004年的全国第二次人体重要寄生虫病调查数据显示,我国钩虫感染人数大约有3930万,其中海南省人数感染率达33.18%,其次是广西(19.67%)、四川(18.01%)、重庆(16.49%)和福建(15.9%)^[12]。钩虫病的感染会导致缺铁和蛋白营养不良、认知缺陷、记忆力丢失、影响孩子生长和发育、孕妇生产以及劳动者生产力的丧失,给人们带来巨大的损失。

目前钩虫病的治疗主要集中在药物治疗上,其中包括对症治疗和病原治疗。在早期对症治疗过程中,主要采取的治疗方案是加强营养,口服硫酸亚铁和适当输血。病原治疗又可分为早期治疗和驱虫治疗,早期治疗指杀灭感染局部及体内,特别是肺部的钩蚴,驱虫治疗指驱除肠道寄生的钩虫。驱虫治疗常用的驱虫药为阿苯达唑、甲苯达唑、左旋咪唑、噻嘧啶以及伊维菌素等药物,在早期的治疗过程中达到了较好的驱虫效果^[5]。

当前钩虫病的预防主要采取综合性防治措施,主要包括:查治病人和带虫者,控制传染源;加强粪、水管理,切断传播途径;开展健康教育,提高防病意识;加速新药研制,有效控制疾病。采用的群体化疗方案包括集体化疗、选择性化疗和目标化疗^[5]。

但近年来,治疗钩虫病又面临着新的难题,随着噻嘧啶、甲苯达唑和阿苯达唑等广谱驱肠道线虫药物的长期广泛使用,引起了犬钩虫对这些药物产生了抗性,治疗后重复感染成为了防治工作急待解决的问题。因此,有些学者提出发展疫苗的设计,并陆续开展了研究工作,以期通过疫苗的应用,达到有效地防治的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库