

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152272

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

日本血吸虫 SjIrV1 基因的特性及其重组
蛋白免疫保护效果的初步评估

Characterization of SjIrV1 of *Schistosoma japonicum* and
the preliminary analysis of immunoprotective effect
of SjIrV1 recombinant protein

魏 梅 梅

指导教师姓名: 林 矫 矫 研究员

刘 升 发 教 授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2013 年 5 月

论文答辩时间: 2013 年 5 月

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2013 年 05 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	1
Abstract.....	2
英文缩略表	3
第一章 前言	5
1.1 血吸虫和血吸虫病	5
1.2 血吸虫疫苗研究进展	7
1.2.1 虫源性疫苗	8
1.2.2 基因工程疫苗	8
1.2.3 合成多肽抗原疫苗	9
1.2.4 抗独特型抗体疫苗	10
1.2.5 血吸虫疫苗候选抗原分子筛选	10
1.2.6 血吸虫疫苗研究面临的问题与展望	14
1.3 血吸虫钙结合蛋白研究进展	15
1.3.1 EF-hand 家族的钙结合蛋白	16
1.3.2 非 EF-hand 家族的钙结合蛋白	20
1.3.3 膜相关的钙结合蛋白	21
1.3.4 结语	23
第二章 日本血吸虫 SjIrV1 基因的克隆、表达及特性分析	25
2.1 引言	25
2.2 试验材料	25
2.2.1 实验动物	25
2.2.2 cDNA 文库、质粒与菌株	26
2.2.3 主要试剂和仪器	26
2.2.4 主要试剂配制	26
2.3 实验方法	30
2.3.1 虫体的收集	30
2.3.2 虫体 cDNA 模板的制备	30
2.3.3 蛋白浓度的测定	32

2.3.4 感受态细胞的制备 (CaCl ₂ 法).....	32
2.3.5 SjCa66 (SjIrV1) 基因的克隆和生物信息学分析	33
2.3.6 重组质粒 pET28a(+)-SjIrV1 的构建及鉴定	35
2.3.7 重组质粒 pET28a(+)-SjIrV1 在大肠杆菌中的表达、纯化及鉴定 ..	36
2.3.8 日本血吸虫 SjIrV1 基因在不同期别和性别虫体内的差异表达分析	37
2.3.9 rSjIrV1 的钙结合特性分析	39
2.4 统计学分析	39
2.5 实验结果	40
2.5.1 SjIrV1 基因的克隆及生物信息学分析.....	40
2.5.2 重组质粒 pET28a (+) - SjIrV1 的诱导表达、重组蛋白纯化及鉴定	46
2.5.3 Real-time PCR 分析各时期虫体 SjIrV1 转录表达水平	47
2.5.4 钙结合蛋白特性.....	48
第三章 rSjIrV1 的免疫原性及免疫保护效果的初步评估	50
3.1 引言.....	50
3.2 试验材料	50
3.2.1 实验动物.....	50
3.2.2 主要试剂和仪器.....	50
3.2.3 主要试剂配制.....	51
3.3 实验方法	52
3.3.1 虫体蛋白的提取.....	52
3.3.2 Western blotting 分析重组蛋白抗原性及各期别虫体 SjIrV1 蛋白的表 达.....	52
3.3.3 间接免疫荧光分析 SjIrV1 的虫体组织定位.....	53
3.3.4 rSjIrV1 的动物免疫保护效果评估	53
3.4 统计学分析	55
3.5 实验结果	55
3.5.1 Western blotting 检测重组蛋白的免疫原性及抗原性和各期别虫体蛋	

白的表达.....	55
3.5.2 日本血吸虫体内 SjIrV1 蛋白的表达分布观察.....	57
3.5.3 动物免疫保护效果评估.....	58
第四章 讨论	62
第五章 小结与展望	66
参考文献	68
致 谢	80
在学期间发表的文章	82

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	2
List of abbreviations	3
Chapter I Preface	5
1.1 Schistosoma and schistosomiasis	5
1.2 Advance of vaccine of schistosomiasis	7
1.2.1 Insect-derived vaccines	8
1.2.2 Genetic engineering vaccine	8
1.2.3 Synthetic peptide antigen vaccine.....	9
1.2.4 Anti-idiotypic vaccine	10
1.2.5 Filter vaccine candidate antigen molecules of schistosoma	10
1.2.6 Problem of schistosomiasis vaccine research and expectation	14
1.3 Research progress on Schistosoma japonicum calcium-binding protein.	15
1.3.1 EF-hand family of calcium-binding proteins	16
1.3.2 Non-EF-hand calcium-binding proteins	20
1.3.3 Membrane-related calcium binding proteins	21
1.3.4 Summary	23
Chapter II Cloning, expression and bioinformation of SjIrV1 in Schistosoma japonicum	25
2.1 Introduction	25
2.2 Testing materials	25
2.2.1 Experimental animals.....	25
2.2.2 cDNA library, plasmids and strains.....	26
2.2.3 Main reagents and apparatus.....	26
2.2.4 Preparation of reagents	26
2.3 Methods	30
2.3.1 Parasite collection	30
2.3.2 Stages of preparation of cDNA templates.....	30

2.3.3 Determination of protein concentration	32
2.3.4 Preparation of competent cells.....	32
2.3.5 Cloning and bioinformatic analysis of SjCa66 (SjIrV1)	33
2.3.6 Construction and identification of the recombinant plasmid pET28a(+)-SjIrV1	35
2.3.7 Expression, purification and identification of recombinant plasmid SjIrV1.....	36
2.3.8 Real-time RT-PCR analysis of SjIrV1 transcription at different developmental stages of <i>S. japonicum</i>	37
2.3.9 Calcium binding.....	39
2.4 Statistical analyses.....	39
2.5 Results	40
2.5.1 Cloning and bioinformatic analysis of SjIrV1	40
2.5.2 Expression, purification and identification of recombinant SjIrV1	46
2.5.3 Analysis of stage-specific expression of SjIrV1 transcripts	47
2.5.4 Recombinant SjIrV1 binds Ca ²⁺	48
Chapter III The immunoprotective effect of SjIrV1	50
3.1 Introduction.....	50
3.2 Materials	50
3.2.1 Experimental animals.....	50
3.2.2 Main reagents and apparatus.....	50
3.2.3 Preparation of reagents	51
3.3 Methods.....	52
3.3.1 Insect protein extraction.....	52
3.3.2 Antigenicity analysis and expression of different development stages of SjIrV1 by Western blotting	52
3.3.3 Immunolocalization of SjIrV1 in schistosomula and adult worms of <i>S. japonicum</i>	53
3.3.4 Evaluation of immune protective efficacy against <i>S. japonicum</i>	

challenge	53
3.4 Statistical analyses.....	55
3.5 Results	55
3.5.1 Antigenicity analysis and expression of different development stages of SjrV1 by Western-blotting.....	55
3.5.2 Immunolocalization of SjrV1 in <i>S. japonicum</i>	57
3.5.3 Evaluation of immune protective efficacy against <i>S. japonicum</i> challenge	58
Chapter IV Discussion.....	62
Chapter V Summary and Outlook	66
References	68
Acknowledgements	80
Publications	82

廈門大學博碩士論文摘要

摘 要

钙结合蛋白是日本血吸虫生长发育不可或缺的蛋白,执行着非常广泛而重要的功能。本研究在课题组日本血吸虫体被表膜蛋白研究基础上,利用 PCR 技术克隆了中国大陆株日本血吸虫 66 kDa 钙结合蛋白 (SjIrV1) 编码基因的 cDNA 序列, BLAST 分析与菲律宾株日本血吸虫 SjIrV1 cDNA 编码序列一致, 荧光定量 PCR 分析表明该基因在童虫和成虫期不同发育阶段均有表达, 其中在 35 d 和 42 d 成虫中表达量较高, 在 42 d 雌虫中该基因表达水平远高于 42 d 雄虫。构建重组表达质粒 pET28a(+)- SjIrV1, 在大肠杆菌中成功诱导表达, 重组蛋白主要以可溶性形式存在, 通过高效液相色谱法 (RP-HPLC) 以及串联质谱法 (MS/MS) 鉴定所获蛋白为目的蛋白 SjIrV1。蛋白质印迹 (Western blotting) 分析结果显示重组蛋白能被感染日本血吸虫鼠血清和免疫鼠血清所识别, SjIrV1 蛋白在虫体各发育阶段中均表达。免疫荧光染色实验观察表明 SjIrV1 主要分布在日本血吸虫成虫的表膜。应用重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠后, 免疫鼠血清中检测到较高水平的特异性 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体, 且 IgG1/IgG2a 比值呈下降趋势, 同时诱导小鼠产生较高滴度的 IL-12p70 和 IFN- γ 细胞因子, 说明 rSjIrV1 免疫小鼠后诱导了 Th1/Th2 混合型免疫应答, 但以 Th1 型占主导。动物保护实验结果表明, rSjIrV1 诱导小鼠产生 12.25% 的减虫率和 34.07% 的肝脏减卵率。本研究结果提示, SjIrV1 可能在日本血吸虫的生长发育过程中起着重要作用。

关键词: 日本血吸虫; 钙结合蛋白; 基因表达; 免疫原性; 免疫保护

Abstract

Calcium-binding protein is an indispensable protein which performs extensive and important functions in the development of *Schistosoma japonicum*. Based on our primary study on tegument surface proteins of *S. japonicum*, a cDNA encoding a 66 kDa calcium-binding protein of *S. japonicum* (Chinese strain) was cloned, sequence analysis revealed that it was identical with that of SjIrV1 of Philippines strains *S. japonicum*. The expression of SjIrV1 were detected by Real-time PCR, using cDNA templates isolated from 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days worms and the results revealed that the gene was expressed in all investigated stages, and the mRNA level of SjIrV1 is much higher in 42 d female worms than that in 42 d male worms. The cDNA containing the open reading frame of IrV1 was subcloned into a pET28a (+) vector and transformed into competent *Escherichia coli*. BL21 for expression. The recombinant protein was purified using a Ni-NTA purification system, and confirmed by high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and tandem mass spectrometry (MS/MS). Western blotting analysis showed that recombinant SjIrV1 (rSjIrV1) could be recognized by the *S. japonicum* infected mouse serum and the mouse serum was specific to rSjIrV1. Immunofluorescence observation exhibited that SjIrV1 was mainly distributed on the tegument of the 35-day adult worms. ELISA test revealed that IgG, IgG1 and IgG2a antibodies are significantly increased in the serum of rSjIrV1 vaccinated mice, and partial protective effect with 12.25% worm reduction and 34.07% liver egg burden reduction. Immunization with rSjIrV1 induced a mixed Th1/Th2 response in which Th1 was dominant. The response was characterized by a reduced IgG1/IgG2a ratio and elevated production of cytokines IL-12p70 and IFN- γ . The study suggested that SjIrV1 might play an important role in the development of *S. japonicum*.

Keywords: *Schistosoma japonicum*; Calcium-binding Protein; Gene Expression; Immunogenicity; Immunoprotection

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APS	Ammonium Persulfate	过硫酸铵
bp	base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
BPB	Bromophenol blue	溴酚蓝
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
d	day	天
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	二脒基苯基吲哚
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附试验
g	RCF, relative centrifugal force	相对离心力
h	hour	小时
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IEF	Isoelectric point	等电点
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖 苷
Kan	Kanamycin	卡那霉素
LB	Luria-bertani culture medium	LB 培养基
M	Marker	分子量标准
2-ME	2-Mercaptoethanol	巯基乙醇
mg	milligram	毫克
min	minute	分
mM	Millimol	毫摩尔
μ M	Micromole	微摩尔

英文缩写	英文全称	中文全称
ml	milliliter	毫升
mol	mole	摩尔
mRNA	Message RNA	信使 RNA
NC	Nitrocellulose filter	硝酸纤维素膜
NCBI	National center for biotechnology information	全美生物技术信息中心
OD	Optical density	光密度值
ORF	Open reading frame	开放性阅读框
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT-PCR	Reverse transcription-PCR	反转录-PCR
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
s	second	秒
<i>Sj.</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>	日本血吸虫
<i>Sm.</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>	曼氏血吸虫
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-四乙基乙二胺
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲替联苯胺
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethane	三(羟甲基)胺基甲烷
μL	microliter	微升

第一章 前言

1.1 血吸虫和血吸虫病

血吸虫 (*Schistosoma*) 隶属于动物界 (Animalia), 扁形动物门 (Platyhelminthes), 吸虫纲 (Trematoda), 复殖目 (Digenea), 裂体科 (Strigeidida), 裂体属 (*Schistosoma*) [1]。

日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 生活史复杂, 包括卵、毛蚴、胞蚴、尾蚴、童虫和成虫等六个阶段, 中间宿主为钉螺 (*Oncomelania hupensis*), 终末宿主为人、牛、兔等 40 余种哺乳类动物。成虫主要寄生于终末宿主的门脉-肠系膜静脉系统的血管中, 雌雄成虫合抱发育成熟后产卵, 卵随血液流入肝脏或沉积于肠壁组织, 经 11 天发育为成熟卵。部分虫卵落入肠腔随粪便排出体外, 含有虫卵的粪便污染水体, 在适宜环境下孵化出毛蚴。毛蚴遇到中间宿主钉螺从头足部钻入螺体, 并在螺体内经母胞蚴、子胞蚴的无性繁殖产生大量尾蚴。成熟的尾蚴从螺体中逸出, 借尾部摆动, 遇到人或牛等哺乳类动物便侵入皮肤脱去尾巴, 变成皮肤型童虫, 经宿主血液循环达到肺部发育成肺型童虫, 随后移至肝脏的门脉系统发育为肝门型童虫。最后下行至肠系膜静脉寄居并发育为成虫, 雌虫产卵, 完成一个生长发育周期 (图 1)。

血吸虫病是由血吸虫感染引起的一种人畜共患寄生虫病, 被世界卫生组织认为是仅次于疟疾的第二个最具社会经济破坏性的寄生虫病, 全球有数以百万的人感染^[2, 3]。血吸虫成虫寄生于哺乳动物肝门静脉和肠系膜静脉内, 寄生于人体的主要有 3 种, 即: 流行于非洲北部的埃及血吸虫 (*S. haematobium*)、流行于拉丁美洲及非洲中部的曼氏血吸虫 (*S. mansoni*) 以及流行于亚洲的日本血吸虫。其中在我国流行的血吸虫病是由日本血吸虫 (中国大陆株) 感染引起的, 以急性或慢性肠炎、肝硬化、严重腹泻、贫血、消瘦为特征, 流行于中国长江以南十三个省、市、自治区, 给人类的健康和畜牧业经济发展构成了很大的威胁。据统计我国 2011 年血吸虫病人达 286 836 例, 与 2010 年相比减少了 11.97%^[4], 全国血吸虫病疫情总体上突破了近几年疫情处于平台期的状态, 特别是急血病例数和耕牛感染率大幅度降低, 为 2015 年实现中长期规划目标奠定了良好基础 (图 2)。但是 2011 年的高危环境血吸虫病传播风险评估^[5]、重点水域哨鼠监测^[6]结果提示

我国血吸虫病防治工作仍面临挑战，达标形势不容乐观。

目前我国对血吸虫病的主要防治措施是消灭或控制传播媒介钉螺和治疗病人病畜，而难点主要在于中间宿主钉螺作为生态系统中的一员难以被彻底消灭，以及保藏宿主种类多，数量大，活动范围广，难以控制，人畜重复感染严重。在血吸虫病治疗方面，尽管有吡喹酮等有效的药物，但由于较高的重复感染率及不断使用这些抗血吸虫药物，可能导致抗药虫株的出现^[7,8,9]。现已有研究证实日本血吸虫在吡喹酮药物选择压力下可产生抗药性^[10]。有专家提出，对于预防措施，单独使用疫苗或结合药物治疗可能是持续控制血吸虫病较为理想有效的方法^[11]。因此发展血吸虫疫苗是综合防治血吸虫病的一项具有战略意义的措施。

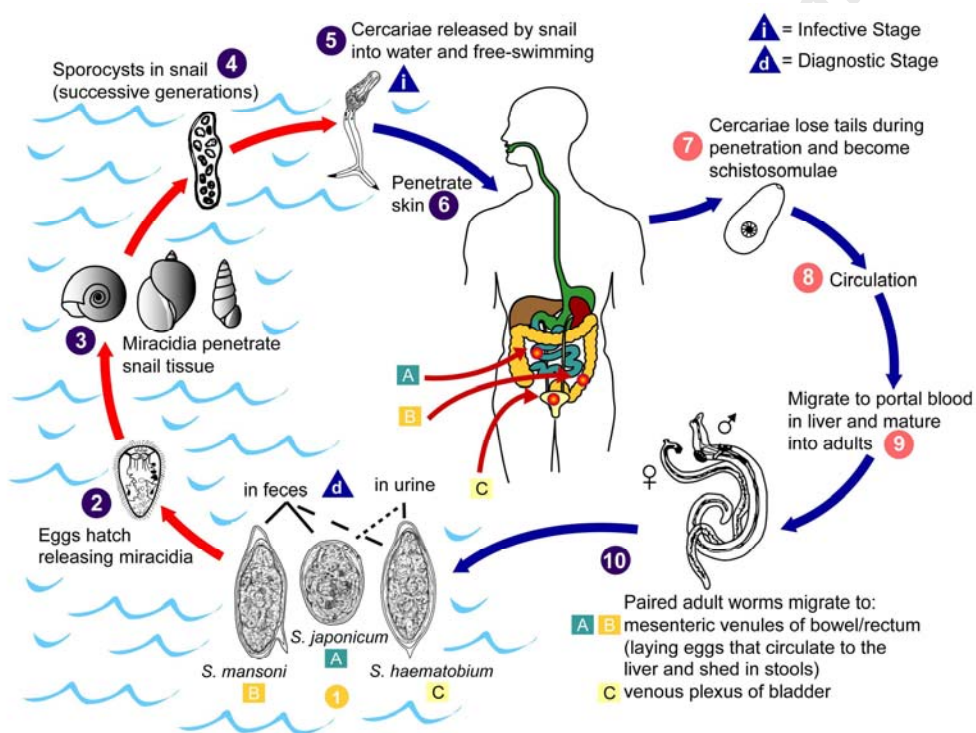


图 1 血吸虫生活史

Fig.1 The life cycle of schistosoma parasite

(图片来源于: <http://www.genome.gov>)

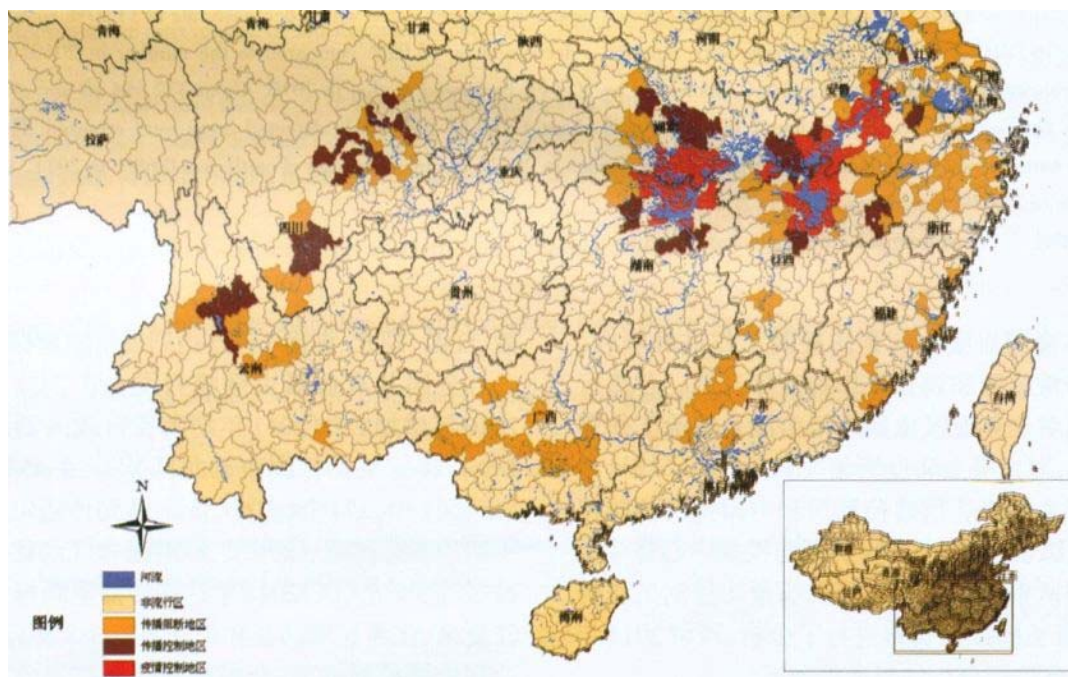


图 2 2011 年全国血吸虫病疫情分布图

Fig. 2 The epidemiological status of schistosomiasis in P. R. China in 2011

(引自 郑浩, 张利娟, 朱蓉 等, 2012)

1.2 血吸虫疫苗研究进展

血吸虫病是由血吸虫引起的以虫卵肉芽肿及肝纤维化为主要特征的免疫性疾病^[12], 是一种严重危害人类健康的寄生虫病。由于日本血吸虫的生活史复杂, 包括在终宿主体内的有性世代和在中间宿主钉螺体内的无性世代的交替, 而且血吸虫的分布与钉螺的分布严格一致, 凡有血吸虫病流行的地方, 必有钉螺孳生。故灭螺和药物治疗感染血吸虫病患者及其他哺乳动物是控制血吸虫病流行的一种策略, 然而防治实践表明, 单靠药物治疗不能从根本上解决血吸虫病防治问题, 因而迫切需要寻找长期有效的防治措施, 疫苗预防由此而倍受关注, 是综合防治血吸虫病的一项具有战略意义的措施^[13]。

从 20 世纪初人们就开始血吸虫疫苗的研制, 经历了从死疫苗、致弱活疫苗、亚单位疫苗到基因工程疫苗等的探索过程。目前已研制的血吸虫疫苗大致归结为虫源性疫苗、基因工程疫苗、合成多肽抗原疫苗和抗独特型抗体疫苗。

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫