

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610167531.5

[51] Int. Cl.

*C12N 15/30 (2006.01)*

*C12N 15/10 (2006.01)*

*A61K 31/7088 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

*A61P 33/12 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年6月25日

[11] 公开号 CN 101205538A

### [51] Int. Cl. (续)

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

[22] 申请日 2006.12.29

[21] 申请号 200610167531.5

[30] 优先权

[32] 2006.12.15 [33] CN [31] 200610147333.2

[71] 申请人 中国农业科学院上海兽医研究所

地址 200232 上海市石龙路345弄3号

[72] 发明人 林矫矫 陶丽红 苑纯秀 姚利晓

傅志强 冯新港 刘金明 石耀军

王欣之 贾人初

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书4页 说明书12页 附图3页

### [54] 发明名称

日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt - 4 基因的克隆、表达及应用

### [57] 摘要

本发明公开了利用 RACE 技术从日本血吸虫 19 天童虫中首次扩增到一个 Wnt 家族基因, 序列分析表明该基因的完整编码框含 1311bp, 编码 436 个氨基酸, 理论分子量 49.6kD。 同源性分析结果表明, 该基因的氨基酸序列具有典型 Wnt 家族蛋白特征, 与日本三角涡虫、人 Wnt4 的氨基酸序列相似性分别达 43%、37%, 推测为血吸虫的 Wnt4 基因, 命名为 Sjwnt4 ( GenBanK 登陆号 DQ643829)。 实时定量 PCR 分析显示该基因在 14 天童虫、19 天童虫、31 天成虫、44 天雌虫及 44 天雄虫中均有表达, 本发明构建了该基因的原核表达载体 pGEX - 4T - 2 - Sjwnt4, 应用大肠杆菌系统进行了表达, 表达蛋白以包涵体形式存在, Western 印迹显示表达产物能被日本血吸虫成虫粗抗原免疫血清所识别。

1、一种日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt-4 基因的克隆和表达，其特征在于该方法包括下列步骤：

(1) 材料

Trizol、GeneRacer<sup>TM</sup> Kit； Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、限制性内切酶 *BamH*I、*Xho*I、T4 DNA 连接酶、荧光定量 PCR 检测试剂盒和随机引物；羊抗鼠 IgG-HRP 抗 GST 单抗；羊抗兔 IgG-HRP；逆转录酶；RNA 酶抑制剂；SYBR Green I 和 Calibration；

(2) 菌种、质粒及实验动物

质粒 pGEX-4T-2、大肠杆菌 DH5  $\alpha$ 、BL21 DE3 由上海兽医研究所提供；pUCm-T 载体；新西兰白兔 雄性，2.5~3.0kg；日本血吸虫中国大陆株尾蚴由上海兽医研究所提供；新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 20 000，5000，2000 条血吸虫尾蚴，在 14 天、19 天、31 天和 44 天后剖杀，以肝门静脉灌注法收集虫体，液氮冻存备用；

(3) 方法

① 总 RNA 的提取 取液氮中冻存的日本血吸虫 19 天童虫 200mg，按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取；

② RACE 的引物设计和扩增

利用双向电泳结合肽质量指纹图谱技术获得一个 Wnt 家族蛋白的一段肽序列，以此肽序列为询问序列在日本血吸虫 EST 库中搜索到一个日本血吸虫的相应 EST 片段 GenBank<sup>TM</sup> accession number AAM89872，长 727bp，不含有完整的 ORF，以该 EST 序列为模板设计合成 RACE 引物，3'RACE 的两个巢式引物：3GSP1：

5' -TATGCTGTGGTCGAGGATTTAAACG-3' ， 3GSP2：

5' -GGTGTTGCAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' ； 5'RACE 的两个巢式引物：5GSP1：

5' -GGTGTTGCAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' ， 5GSP2：

5' -TTGTCGTTTAAATCCTCGACCACAG-3' ；

具体步骤按 GeneRacer<sup>TM</sup> 试剂盒操作手册进行，将 RACE 产物克隆到试剂盒提供

的 pCR4-TOPO 载体中, 挑选阳性克隆测序, 利用 DNASTar 软件查找 3'、5' RACE 产物序列与原 EST 序列的重叠部分, 将三段序列拼接;

### ③ 含 ORF cDNA 片断的扩增

根据拼接的 cDNA 序列设计引物 F1 和 F2 进行含 ORF cDNA 片断的扩增, F1: 5' -CCGGGATCCATGAATCTAACTCAGCTAGAA-3' 引入酶切位点 *Bam*H I 加下划线; F2: 5' -CGGCTCGAGTTAATTACATGTAGATATAAC-3' 引入酶切位点 *Xho* I; 取 3 $\mu$ l 在 3'RACE 中反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件分别为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C、30s, 55 $^{\circ}$ C、30s, 72 $^{\circ}$ C、1min30s, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 纯化后连 pUCm-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5  $\alpha$  感受态细胞, 选单个菌落酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pUCm-T-*Sjwnt4* 并测序;

### ④ 生物信息学分析

将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行相似性比对, 利用 NCBI 上的 ORF finder 找出新基因的读码框; 利用 DNASTar 软件对氨基酸残基数、组成、蛋白质相对分子量等参数进行分析; 利用 clustalW 软件对不同物种 Wnt 蛋白进行多重比对; 利用 NetAcet 软件进行糖基化位点预测, 利用 SYFPEITHI 的 MHCII 表型在线预测工具进行 T 细胞表位预测;

### ⑤ 荧光实时定量 RT-PCR

试验中选择血吸虫的持家基因  $\alpha$ -微管蛋白为内参; 分别提取 14 天和 19 天童虫、31 天成虫、44 天雄虫和 44 天雌虫总 RNA, 去除基因组 DNA 后利用随机引物合成 cDNA 第一链; 荧光定量 PCR 引物: 扩增 *Sjwnt4* 的引物: S1: 5'-ACATACAAAATCGTCTGGTCTC-3', S2: 5'-GATGGTAAAGGCGATGTAGTC-3', 扩增片段长度 214bp; 扩增  $\alpha$ -tubulin 引物: T1: 5'-CTGATTTTCCATTCGTTTG-3', T2: 5'-GTTGTCTACCATGAAGGCA-3', 扩增片段长度 213bp; 引物由上海生工合成, 采用荧光染料法进行实时定量 PCR, 反应体系包括: 5 $\times$ R-PCR Buffer 5 $\mu$ l, 250mM Mg<sup>2+</sup> 0.3 $\mu$ l, 10mM dNTP 0.75 $\mu$ l, 10 $\mu$ M 引物 1.0 $\mu$ l, 25 $\times$  SYBR Green I 1.0 $\mu$ l, 10-3 $\times$

Calibration 1.0 $\mu$ l, 5U/ $\mu$ l Ex Taq Hs 0.25 $\mu$ l, ddh<sub>2</sub>O 14.7 $\mu$ l, 模板 cDNA 1.0 $\mu$ l, 共 25 $\mu$ l; 反应参数: 95 $^{\circ}$ C 变性 3min, 95 $^{\circ}$ C 5s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环, 其中 58 $^{\circ}$ C 30s 结束时间为荧光信号检测点, 每个反应均做 3 孔重复; 采用 BIO-RAD 公司 iCycler™ IQ version 3.0 软件进行计算分析, 以  $\alpha$ -tubulin 为内参标准化反应结果, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量;

#### ⑥ 重组表达质粒的构建

从测序后确定的重组质粒 pUCm-T-*Sjwnt4* 中用限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 切出 *Sjwnt4* 含 ORF 的 cDNA 片断, 将该完整序列定向克隆于原核表达载体 pGEX-4T-2 的多克隆位点区, 构建重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*, 并转化表达宿主菌 BL21 DE3;

#### ⑦ 在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21 DE3 接种于液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养, OD 值为 0.6 时加终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h 分别收集菌体, 应用 SDS-PAGE 分析菌体蛋白, 确定最佳诱导时间;

#### ⑧ Western blotting 检测

将高表达时相菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 GST 单抗或经 pGEX-4T-2/BL21 大肠杆菌裂解液吸附处理过的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清作一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 作为底物进行显色。

2、根据权利要求 1 所述的一种日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的克隆和表达, 其特征在于所述的一种日本血吸虫信号转导蛋白 *Sjwnt-4* 基因的核苷酸和推测氨基酸序列如下:

```

1 AATATGATGCTACTCCTTATGATGATTCAACATCAGCCAGTAGATTAACAAAAATAATTACAACACTGAAGGATACCGTCGATCACCAA
91 ATTCTGATTTACGTTTTGTGAAGCATCAAAATCACAAGATTTGGATTATCCTCATACAAGTAAAAAATATATAAATTCAGACTTAAATA
181 CAAATAATTATAATCATGAACGA
204 ATCAATCTAACTCAGCTAGAACAACGATTCAAGACATGAATAATAATGATAGTAACAATATAATGACATCAGAAACATTTGTTGGTGCC
N D S N N I M T S E T F V G A M N L T Q L E Q T I Q D M N N
294 GATGGAAAATTACAAATGAGTATATGCGATCATCAAATGGATTTTACGGAGACAAAAGAAATATGCCGTCAGTATTTACATTTGATG
D G K L Q M S I C D H P N G F L R R Q K K L C R Q Y L H L M
384 GAGAGTGAATCCGTGGTTATTTTATGGGTTTAAAAGAATGTGAATATCAATTTTCTGCACATCGATGGAATTTGTCAGGGTCATAACTTA
E S V I R G Y F M G L K E C E Y Q F S A H R W N C Q G H N L
474 ACTATTCAAGCACCAACTAGTCGAAAACAGAAACGTTTAAAGATATAGAGAATCTGAGTTGAAAAATGATATGGATAATTCACGAAGAAAA

```

T I Q A P T S R K Q K R L R Y R E S E L K N D M D N S R R K  
 564 TCTGTACGTATACAAACATACTTAGACAAGCTTTTATCTAAAGGAACAAGAGAATCAGCTTATGTTTTGGCTGTTACATCCGCCGGTGA  
 S V R I Q T Y L D K L L S K G T R E S A Y V L A V T S A G V  
 654 TCACATGCAGTCACTAAAGCATGCAGTAGTGGTCTACATGATAACTGTGGATGTGACAGAACAAATATACGATCATCCTAGAGAACCAAAT  
 S H A V T K A C S S G L H D N C G C D R T I Y D H P R E P N  
 744 TTTGAATGGTCAGGATGTTTACAGATAATATACATTTTGGAGCAGCATTTTCAAGACAATTTCTTGATGTACGAGAACGTAACAGACTGAAA  
 F E W S G C S D N I H F G A A F S R Q F L D V R E R N R L K  
 834 CGTAATCCAAAATTAGGACTGACAAATTTACATAATAATCATGTGGGAAGACATATGGTAATCAATAAAATGGAAGTCCAGTGCAAATGT  
 R N P K L G L T N L H N N H V G R H M V I N K M E V Q C K C  
 924 CATGGTGAAGTGGTTCATGTGAAATGCGTACATGTTGGCGATCGTTACCGAAATTTCCGGCATTAGGTGCACAATTACAAGAAAGATTT  
 H G V S G S C E M R T C W R S L P K F R H L G A Q L Q E R F  
 1014 CATGAAGCAATACAAGTCACTTACATACAAAATCGTCTGGTCTCGATGAAAGCACTAGAACAATTAAGTAAAGAATCAAATGGAACGCA  
 H E A I Q V T Y I Q N R L V S M K A L E Q L S K E S N G N A  
 1104 CTATTACTTTCTCATTCTGCATTATTATCATCAGTAGTATCAGGAGTATCATCATCCGATGAATTACCGGCATCACCGGTATTAATAGA  
 L L L S H S A L L S S V V S G V S S S D E L P A S P R I N R  
 1194 AATGCGTTTGATACTTTAACTCGTCTACATCATTGACTACATCGCCTTTACCATCACCAACTGAAAATGATTTGATTTATATTAGTGAA  
 N A F D T L T R S T S L T T S P L P S P T E N D L I Y I S E  
 1284 TCACCAACATTTTGTATCATGATCCAAGATATGGTAGTATTGGTACATATGGTCCAGTGTGATGAAAATTTCAAGGTTTAAACAGT  
 S P T F C H H D P R Y G S I G T Y G R Q C D E N S Q G L N S  
 1374 TGTAATTTATGCTGTGGTCCGAGGATTTAAACGACAAACGTTTGTTCACAAGAGAGATGTGATTGTAATTTTCAAGGTTTAAACAGT  
 C N Y L C C G R G F K R Q T F V Q Q E R C D C K F Q W C C K  
 1464 GTTGTCTGTAACATGTCGTAACAGTAGTTATATCTACATGTAATTTAATATATATATATAAGGTATCTTTTATCGTTCGCAATC  
 V V C K T C R K T V V I S T C N \*  
 1554 ACTTTGTGTGTTATTTTCATTTTCGTACAATGAACTCCCCTACCTCTGTAGATCTTTCATAACTATTCCAAAAGTCTTCTCTTATTGC  
 1644 ATTTGTATTACAAAAGATCTGAATTAAGTAACAACCTCTGATAATCCTAATCAAAGCAAACAAGTAACTGAGTTTGCAGGGGATGA  
 1734 AGAAGATTTGAAAACATAAAATTTACTAAGTTGATGACAATTTACTCCAAAAAGGAAATAAGGAAACGATAAAGAATAACCGAAAGACAA  
 1824 TATATTATTGGTGAATTCAGTGTGCTTAAAAATAAAATATCAAGAGAGAACAAATCGAATTTGCACACGTTTTCTTTCTTCTCTAAATTC  
 1914 TATCTTTCTATAACACTGTTTCTGTATATGTTATTTTCTCAATATACCGATTACATTGTGTATATTCTGTTTACAGTCAATTACTTAT  
 2004 TAAATCAGTCAGTAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

3、一种如权利要求 1 所述的日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt-4 基因在制备防治血吸虫疾病药物中的应用。

## 日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt-4 基因的克隆、表达及应用

### 技术领域:

本发明属于基因技术领域，具体涉及一种日本血吸信号转导蛋白Sjwnt-4基因的克隆、表达及应用。

### 背景技术:

Wnts是一类从水螅、昆虫到脊椎动物中都能发现的分泌型糖蛋白，由细胞分泌出来后，与自身或邻近细胞的膜受体结合，激发下游的信号通路，调节核内靶基因的表达，决定细胞的分化命运，在动物发育中起着广泛的调节作用。Wnt蛋白异常的时空表达或异常的激活往往与肿瘤的发生有关。有研究表明，Wnt信号通路对哺乳动物生殖系统的正常发育起关键的调节作用，它主要参与了缪勒氏管及其派生器官的形成，调控卵泡的发育、排卵及黄体化，另外与正常妊娠的建立以及妊娠过程中乳腺的变化也有关。Wnt4是Wnt家族蛋白成员之一，在小鼠中，Wnt4对缪勒氏管的形成有关键意义，缺失Wnt4的雌、雄小鼠都没有缪勒氏管；Wnt4突变的雌鼠没有缪勒氏管的派生器官(即输卵管、子宫、子宫颈和阴道上部)；而沃尔夫管则继续存在。Wnt4缺失的雄性动物其睾丸的发育不受影响，但当发育着的雌性性腺中一旦缺失Wnt4信号，其结构和功能上都呈现一定的雄性化特征，性腺虽然定位在它们正确的部位，但其外形比正常的卵巢更圆，且像睾丸一样没有包被。此外，突变的性腺可以分化MIS（缪勒氏管抑制物质）及睾酮。在人类中，男性的染色体1p31~p35片断的二倍体导致了Wnt4增多，Wnt4的过量表达致使XY的男性具有了女性的表型。因此，Wnt4可能是一种性别表型的决定基因。

对血吸虫生长发育信号转导的研究是解和认识血吸虫生活特征的有效途径。但是到目前为止，对血吸虫生长发育信号转导系统的研究甚少，以致在开发高效候选疫苗分子和筛选新型药物的方面进展缓慢。而对血吸虫Wnt基因的研究国内外尚未有研究报道。

## 发明内容:

本发明所要解决的技术问题在于设计血吸虫 Wnt 基因的有关表达。

本发明利用 RACE 技术首次克隆到编码日本血吸虫 Wnt4 蛋白的含 ORF 的 cDNA 序列,分析了该基因在日本血吸虫不同发育阶段中的表达情况,应用大肠杆菌进行了表达,并对表达产物进行了抗原性测定。

本发明提供了一种日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt-4 基因的克隆和表达。

该方法包括下列步骤:

### (1) 材料

Trizol、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司; Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、荧光定量 PCR 检测试剂盒和随机引物购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;羊抗鼠 IgG-HRP 购自天根生化科技(北京)有限公司;抗 GST 单抗购自 SIGMA 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司;逆转录酶购自 Stratagen 公司;RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司;SYBR Green I 和 Calibration 购自 BIO-RAD 公司;

### (2) 菌种、质粒及实验动物

质粒 pGEX-4T-2、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 由本所(上海兽医研究所)提供, pUCm-T 载体购自天根生化科技(北京)有限公司。新西兰白兔(雄性, 2.5~3.0kg) 购自上海罗泾飞达实验动物养殖场。日本血吸虫中国大陆株尾蚴由本所(上海兽医研究所)钉螺室提供。新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 20 000, 5000, 2000 条血吸虫尾蚴, 在 14 天、19 天、31 天和 44 天后剖杀, 以肝门静脉灌注法收集虫体, 液氮冻存储备用;

### (3) 方法

① 总 RNA 的提取 取液氮中冻存的日本血吸虫 19 天童虫 200mg, 按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取;

② RACE 的引物设计和扩增 本实验室程国锋等利用双向电泳结合肽质量指纹图谱技术获得一个 Wnt 家族蛋白的一段肽序列, 以此肽序列为询问序列在日本血吸虫

EST 库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索到一个日本血吸虫的相应 EST 片断 (GenBank™ accession number AAM89872), 长 727bp, 不含有完整的 ORF。以该 EST 序列为模板设计合成 RACE 引物 (由上海申能博采生物技术有限公司合成)。

3'RACE 的两个巢式引物: 3GSP1: 5' -TATGCTGTGGTCGAGGATTTAAACG-3' , 3GSP2: 5' -GGTGTTCGAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' ; 5'RACE 的两个巢式引物: 5GSP1: 5' -GGTGTTCGAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' , 5GSP2: 5' -TTGTCGTTTAAATCCTCGACCACAG-3' ; 具体步骤按 GeneRacer™ 试剂盒操作手册进行。将 RACE 产物克隆到试剂盒提供的 pCR4-TOPO 载体中, 挑选阳性克隆, 由英俊生物技术有限公司测序。利用 DNASTar 软件查找 3'、5' RACE 产物序列与原 EST 序列的重叠部分, 将三段序列拼接;

③ 含 ORF cDNA 片断的扩增 根据拼接的 cDNA 序列设计引物 (F1 和 F2) 进行含 ORF cDNA 片断的扩增。F1: 5' -CCGGGATCCATGAATCTAACTCAGCTAGAA-3' 引入酶切位点 *Bam*HI (加下划线); F2: 5' -CGGCTCGAGTTAATTACATGTAGATATAAC-3' 引入酶切位点 (*Xho*I) (由上海申能博采生物技术有限公司合成)。取 3μl 在 3'RACE 中反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件分别为 94℃ 预变性 5min, 然后 94℃、30s, 55℃、30s, 72℃、1min30s, 共 30 个循环, 循环结束后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 纯化后连 pUCm-T 载体, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 选单个菌落酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pUCm-T-*Sjwnt4* 并送英俊生物技术有限公司测序;

④ 生物信息学分析 将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行相似性比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 NCBI 上的 ORF finder 找出新基因的读码框; 利用 DNASTar 软件对氨基酸残基数、组成、蛋白质相对分子量等参数进行分析; 利用 clustalW 软件对不同物种 Wnt 蛋白进行多重比对; 利用 NetAcet 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>) 进行糖基化位点预测。利用 SYFPEITHI 的 MHCII 表型在线预测工具 (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) 进行 T 细胞表位预测。

⑤ 荧光实时定量 RT-PCR 试验中选择血吸虫的持家基因  $\alpha$ -微管蛋白 ( $\alpha$ -tubulin) 为内参; 分别提取 14d 和 19d 童虫、31d 虫体、44d 雄虫和 44d 雌虫总 RNA, 去除基因组 DNA 后利用随机引物合成 cDNA 第一链; 荧光定量 PCR 引物: 扩增 *Sjwnt4* 的引物: S1: 5'-ACATACAAAATCGTCTGGTCTC-3', S2: 5'-GATGGTAAAGGCGATGTAGTC-3', 扩增片段长度 214bp; 扩增  $\alpha$ -tubulin 引物: T1: 5'-CTGATTTTCCATTCGTTTG-3', T2: 5'-GTTGTCTACCATGAAGGCA-3', 扩增片段长度 213bp; 引物由上海生工合成, 采用荧光染料法进行实时定量 PCR, 反应体系包括: 5×R-PCR Buffer 5 $\mu$ l, 250mM Mg<sup>2+</sup> 0.3 $\mu$ l, 10mM dNTP 0.75 $\mu$ l, 10 $\mu$ M 引物 1.0 $\mu$ l, 25×SYBR Green I 1.0 $\mu$ l, 10-3×Calibration 1.0 $\mu$ l, 5U/ $\mu$ l Ex Taq Hs 0.25 $\mu$ l, ddh<sub>2</sub>O 14.7 $\mu$ l, 模板 cDNA 1.0 $\mu$ l, 共 25 $\mu$ l; 反应参数: 95℃变性 3min, 95℃ 5s, 58℃ 30s, 40 个循环, 其中 58℃ 30s 结束时间点为荧光信号检测点, 每个反应均做 3 孔重复; 采用 BIO-RAD 公司 iCycler™ IQ version 3.0 软件进行计算分析, 以  $\alpha$ -tubulin 为内参标准化反应结果, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量;

⑥ 重组表达质粒的构建 从测序后确定的重组质粒 pUCm-T-*Sjwnt4* 中用限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho*I 切出 *Sjwnt4* 含 ORF 的 cDNA 片断, 将该完整序列定向克隆于原核表达载体 pGEX-4T-2 的多克隆位点区, 构建重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*, 并转化表达宿主菌 BL21 (DE3);

⑦ 在大肠杆菌中的表达 将鉴定好的 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3)接种于液体 LB 培养基, 37℃震荡培养, OD 值为 0.6 时加终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h 分别收集菌体, 应用 SDS-PAGE 分析菌体蛋白, 确定最佳诱导时间;

⑧ Western blotting 检测 将高表达时相菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 分别用抗 GST 单抗或经 pGEX-4T-2/BL21 大肠杆菌裂解液吸附处理过的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清作一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 作为底物进行显色。

本发明的另一目的是提供了 *Sjwnt-4* 编码基因在制备防治血吸虫疾病药物中的

应用。

### 本发明的 SjWnt-4 编码基因的克隆及生物信息学分析

本研究利用 RACE 技术对 EST 片断 (GenBank™ 登陆号为 AAM89872) 进行 3' 端和 5' 端延伸, 分别经 2 轮 PCR 扩增, 将 PCR 产物测序后拼接得到 2 044bp 的 DNA 片断, 进一步利用 PCR 技术克隆获得含完整阅读框的编码基因, 其开放阅读框为 1 311bp, 编码 436 个氨基酸, 利用 NCBI 的 Blast 软件对该序列进行同源性搜索, 结果与血吸虫其它已知基因无显著同源性, 为血吸虫新基因。氨基酸序列的相似性比较结果显示与 Wnt 家族蛋白具有高度同源性, 其中与 Wnt4 蛋白的同源性最高, 并且对氨基酸序列进行分析也发现其具有十分典型的 Wnt 家族蛋白特征: 整个蛋白序列中散在着 100 多个 Wnt 家族蛋白的保守位点; 富含可交连形成二硫键的半胱氨酸残基, 约 23~24 个保守的半胱氨酸, 其中 50% 位于蛋白的羧基端; 具有三个或四个糖基化位点, 又选择了分别来自日本三角涡虫 (登陆号 BAD93239.1)、人 (GeneBank 登陆号 NP\_110388.2)、小鼠 (GeneBank 登陆号 NP\_033549.1)、尤金袋鼠 (GeneBank 登陆号 AAY18780.1)、鸡 (GeneBank 登陆号 JC2451)、线虫 (GeneBank 登陆号 NP\_493668.1)、果蝇 (GeneBank 登陆号 NP\_476810.1) 的 7 个物种的 Wnt4 蛋白进行氨基酸序列的多重比对。结果显示, 该基因所编码氨基酸序列与同属扁形动物门的日本三角涡虫的 Wnt4 相似性最高达 43% ( $E=1e-100$ ), 与人 Wnt4 的相似性为 37% ( $E=9e-72$ ), 其余皆在 36%~38% 之间。据此, 推测该基因编码的蛋白为日本血吸虫 Wnt4 蛋白, 将该基因命名为日本血吸虫 wnt4 (Sjwnt4) (GeneBank 登陆号 DQ643829)。

对该基因编码的氨基酸序列进行 T 细胞表位的预测结果显示该序列中含有多个可与特定 HLA 分子具较高结合效价的抗原肽段 (表 1)。

表 1 Sjwnt4 与 HLA 有较高结合效率的潜在的抗原肽  
Table 1 The peptide binding to HLA with high efficiency in Sjwnt4

Types of HLA	Pos	Amino Sequence	Score
HLA-DRB1*0101	139	SAYVLA VTSAGVSHA	30
	256	LPKFRHLGAQLQERF	29
	49	QKKLCRQYSHLMESV	28

	306	SALLSSVVSQVSSSD	28
HLA-DRB1*0301	25	ETFGADGKLQMSIC	28
	206	RNRLKRNPKLGLTNL	27
	198	RQFLDVRERNRLKRN	26
HLA-DRB1*0401	330	RNAFDLTLRSTSLTT	28
	125	QTYLDKLLSKGTRES	26
	139	SAYVLA VTSAGVSHA	26
	151	SHAVTKACSSGLHDN	26
HLA-DRB1*1101	330	RNAFDLTLRSTSLTT	30
	250	RTCWRSLPKFRHLGA	26
HLA-DRB1*1501	253	WRSLPKFRHLGAQLQ	30
HLA-DRB1*0701	151	SHAVTKACSSGLHDN	30
	189	NIHFGAAFSRQFLDV	30
	298	GNALLSHSALLSSV	30
	273	AIQVTYIQNRLVSMK	28

### 本发明 *SjWnt4* 基因的期别、性别表达分析

为了了解 *SjWnt4* 基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体的表达情况，提取 14 天童虫、19 天童虫、31 天成虫、44 天雄虫和 44 天雌虫等阶段虫体总 RNA，选择管家基因  $\alpha$ -tubulin 作为内参，利用荧光定量 PCR 法检测该基因在日本血吸虫几个不同发育阶段虫体的表达情况。实验结果表明，*SjWnt4* 在日本血吸虫童虫、成虫及雌雄虫中均有表达（图 1），其中在 19 天童虫中表达量最高，44 天雌虫表达量明显比雄虫高。

### 重组原核表达载体 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 的构建鉴定

经 PCR、*Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定（图 2）和测序证实 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组表达质粒构建成功（图 3）。

### 本发明 *Sjwnt4* 基因在大肠杆菌中表达

重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得表达，SDS-PAGE 电泳结果显示，1mM IPTG 诱导 4h 即达到最大表达量；重组蛋白分子量约为 76kD，与预期结果相符（*Sjwnt4* 蛋白推测分子量约为 49.6kD，载体表达蛋白 GST 约 26kD，故重组蛋白分子量约为 75.6kD）（图 4）。重组蛋白以包涵体形式存在，可溶于含 8M 尿素的 PBS。

### 上述表达产物抗原性分析

以重组表达产物进行 SDS-PAGE 电泳，经电转移至 NC 膜上，分别用抗 GST 单抗

和经 pGEX-4T-2/BL21 大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫血清作一抗进行 Western blot, 结果均在 75kD 处有一明显的识别条带 (图 5 箭头处), 表明重组表达产物为 GST 融合蛋白且具有良好的抗原性。

上述结果表明 *Sjwnt4* 基因在日本血吸虫感染宿主后第 14 天童虫、19 天童虫、31 天虫体、44 天雌虫和 44 天雄虫体内均有表达, 但 19d 童虫的表达量显著的高于其它各个阶段; 与此同时, 该基因在 44d 雌虫中的表达量高于 44d 雄虫。从过去的研究已知日本血吸虫感染宿主后, 在第 15-16 天雌雄虫合抱配对, 雌雄虫合抱后卵黄腺开始发育, 卵黄细胞分化, 合成卵黄小滴; 第 22 天雌虫体内表达卵壳蛋白; 到第 24 天后长期保持排卵状态。上述 *Sjwnt4* 基因的表达状况分析结果显示, 该基因的表达变化与血吸虫性别表型的发育变化密切相关, 从一个侧面揭示了 *Wnt4* 基因在血吸虫生殖系统发育中的重要作用。这个结果与该基因在小鼠和小袋鼠中表达的生物学意义有一定的相似性。在小鼠中, *Wnt4* 最初在肾管间充质及未分化的性腺中表达, 它在两性未分化的性腺中都表达, 但经过性别特异的分化后, 在雄性性腺中 *Wnt4* 表达下降, 而在雌性性腺中一直维持。在有袋动物如塔马尔沙袋鼠中, *Wnt4* mRNA 在未分化的两性性腺中都有表达; 雌性小袋鼠 *Wnt4* mRNA 在卵巢分化过程中表达水平显著上升, 约在小鼠出生后 9~13 天后到达顶峰, 然后当所有的雌性生殖细胞进入减数分裂后开始下降; 雄性小袋鼠的 *Wnt4* mRNA 表达水平在输精管形成后立即下降。因此, 如果能通过人为干预, 如使用 RNAi 干扰技术抑制血吸虫 *Wnt4* 的表达或者以 *Wnt4* 蛋白为药靶抑制它的活性, 从而控制血吸虫性别发育、产卵, 对减轻血吸虫病的病理损害, 及阻断传播将有重要意义。

本发明首次克隆获得血吸虫 *Wnt4* 基因, 为 *Wnt* 信号通路在血吸虫生长发育特别是生殖器官发育中的作用以及开发高效的抗血吸虫病的疫苗和筛选新型的抗血吸虫药物有较大的应用价值。

#### *SjWnt-4* 的核苷酸和推测氨基酸序列。

```

1 AATATGATGCTACTCCTTATGATGATTCAACATCAGCCAGTAGATTAACAAAAATAATTACAACACTGAAGGATACCGTCGATCACCAA
91 ATTCTGATTACGTTTTGTTGAAGCATCAAAATCACAAAGATTTGGATTATCCTCATACAAGTAAAAAATATATAAATTCAGACTTAAATA
181 CAAATAATTATAATCATGAACGA
204 ATGAATCTAACTCAGCTAGAACAAACGATTCAAGACATGAATAATAATGATAGTAACAATATAATGACATCAGAAACATTTGTTGGTGCC
    N D S N N I M T S E T F V G A M N L T Q L E Q T I Q D M N N
294 GATGGAAAATTACAAATGAGTATATGCGATCATCCAAATGGATTTTACGGAGACAAAAGAAATTATGCCGTCAGTATTTACATTTGATG

```

```

D G K L Q M S I C D H P N G F L R R Q K K L C R Q Y L H L M
384 GAGAGTGAATCCGTGGTTATTTTATGGGTTAAAAGAATGTGAATATCAATTTCTGCACATCGATGGAATGTCAGGGTCATAACTTA
E S V I R G Y F M G L K E C E Y Q F S A H R W N C Q G H N L
474 ACTATTCAAGCACCACACTAGTCGAAAACAGAAACGTTTAAAGATATAGAGAATCTGAGTTGAAAAATGATATGGATAATTCACGAAGAAAA
T I Q A P T S R K Q K R L R Y R E S E L K N D M D N S R R K
564 TCTGTACGTATACAACATACTTAGACAAGCTTTATCTAAAGGAACAAGAGAATCAGCTTATGTTTGGCTGTTACATCCGCCGGTGTA
S V R I Q T Y L D K L L S K G T R E S A Y V L A V T S A G V
654 TCACATGCAGTCACTAAAGCATGCAGTAGTGGTCTACATGATAACTGTGGATGTGACAGAACAATATACGATCATCCTAGAGAACCAAT
S H A V T K A C S S G L H D N C G C D R T I Y D H P R E P N
744 TTTGAATGGTCAGGATGTTTCAGATAATATACATTTTGGAGCAGCATTTTCAAGACAATTTCTTGATGTACGAGAACGTAACAGACTGAAA
F E W S G C S D N I H F G A A F S R Q F L D V R E R N R L K
834 CGTAATCCAAAATTAGGACTGACAAAATTTACATAATAATCATGTGGGAAGACATATGGTAATCAATAAAAATGGAAGTCCAGTGCAAAATGT
R N P K L G L T N L H N N H V G R H M V I N K M E V Q C K C
924 CATGGTGAAGTGGTTCATGTGAAATGCGTACATGTTGGCGATCGTTACCGAAAATTCGGCATTTAGGTGCACAATTACAAGAAAGATTT
H G V S G S C E M R T C W R S L P K F R H L G A Q L Q E R F
1014 CATGAAGCAATACAAGTCACTTACATACAAAATCGTCTGGTCTCGATGAAAGCACTAGAACAATTAAGTAAAGAATCAAATGGAACCGCA
H E A I Q V T Y I Q N R L V S M K A L E Q L S K E S N G N A
1104 CTATTACTTTCTCATTCTGCATTATTATCATCAGTAGTATCAGGAGTATCATCATCCGATGAATTACCGGCATCACCGCGTATTAATAGA
L L L S H S A L L S S V V S G V S S S D E L P A S P R I N R
1194 AATGCGTTTGATACTTTAACTCGTTCTACATCATTGACTACATCGCCTTTACCATCACCAACTGAAAATGATTTGATTTATATTAGTGAA
N A F D T L T R S T S L T T S P L P S P T E N D L I Y I S E
1284 TCACCAACATTTTGCATCATGATCCAAGATATGGTAGTATTGGTACATATGGTCGACAGTGTGATGAAAATTTCTCAAGTTTAAACAGT
S P T F C H H D P R Y G S I G T Y G R Q C D E N S Q G L N S
1374 TGTAATTTATTTATGCTGTGGTCGAGGATTTAAACGACAAACGTTTGTCAACAAGAGAGATGTGATTGTAATTTTCAGTGGTGTGCAAAA
C N Y L C C G R G F K R Q T F V Q Q E R C D C K F Q W C C K
1464 GTTGTCTGTAAAACATGTCGTAACAGTAGTTATATCTACATGTAATTAATATATATATATAAGGTATCTTTTTATCGTTCCGAATC
V V C K T C R K T V V I S T C N *
1554 ACTTTGTGTGTTATTTTCATTTTCGTACAATGAACTCCCTACCTCTGTAGATCTCTTCATAACTATTCCAAAAGTTCTTCCTTATTGC
1644 ATTTGTATTACAAAAGATCTGAATTAAGTAACAACCTCCTGATAATCCTAATCAAAAAGCAAAAACAAGTTAACTGAGTTTGCAGGGGATGA
1734 AGAAGATTTGAAAACATAAAAATTTACTAAGTTGATGACAATTTACTCCAAAAGGAAATAAAGGAAACGATAAAGAATAACCGAAAGACAA
1824 TATATTATTGGTGAATTCAGTGTGCTTAAAATAAAAATATCAAGAGAGAACAATCGAATTTGCACACGTTTTCTTTCTCCTAAATTC
1914 TATCTTTCTATAAACTGTTTCTGTATATGGTTATTTTCTCAATATACCGATTACATTGTGTATATTCTGTTTACAGTCAATTACTTAT
2004 TAAATCAGTCAGTAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

### 附图说明:

图 1: 实时定量 RT-PCR 检测 *Sjwnt4* 基因在日本血吸虫不同期别和性别虫体中的表达;

14d: 14 天童虫; 19d: 19 天童虫; 31d: 31 天虫体; 44d (M): 44 天雄虫; 44d (F): 44 天雌虫。

图 2: 重组质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 双酶切鉴定及 PCR 鉴定;

M1: DNA Marker DL15 000; 1: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组质粒经 *Bam*HI、*Xho* I 双酶切; 2: pGEX-4T-2 空载体经 *Bam*HI、*Xho* I 双酶切; M2: DNA marker DL 2 000; 3: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组质粒 PCR 产物。

图 3: pGEX-4T-2-Sjwnt4 重组质粒示意图;

Fig 5 The recombinant plasmid pGEX-4T-2-Sjwnt4.

图 4: SDS-PAGE 分析 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21 (DE3) 不同时相的表达蛋白;

M: 蛋白标准分子量; 1、2、3、4、5、6: 重组质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 在 IPTG 诱导后 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h 的表达产物; 7: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 不加 IPTG 培养 6h 的产物

图 5: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 重组蛋白的 Western blot 分析;

M: 预染标准蛋白分子量; 1: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 未诱导产物; 2: pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 诱导表达产物; a.: 以鼠抗 GST 单抗为一抗进行的 Western blot; b: 以抗日本血吸虫成虫抗原兔血清为一抗进行的 Western blot。

## 具体实施方式:

### 实施例 1 日本血吸虫信号转导蛋白 Sjwnt-4 基因的克隆

#### 1. 实验材料

##### 1.1 材料

Trizol、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司; Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司。

##### 1.2 菌种、质粒及实验动物

大肠杆菌 DH5 α 由本所提供, pUCm-T 载体购自天根生化科技(北京)有限公司。新西兰白兔(雄性, 2.5~3.0kg) 购自上海罗泾飞达实验动物养殖场。日本血吸虫中国大陆株尾蚴由本所钉螺室提供。新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 20 000, 5000, 2000 条血吸虫尾蚴, 在 14 天、19 天、31 天和 44 天后剖杀, 以肝门静脉灌注法收集虫体, 液氮冻存备用;

#### 2. 方法

2.1 总 RNA 的提取 取液氮中冻存的日本血吸虫 19 天童虫 200mg, 按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取;

**2.2 RACE 的引物设计和扩增** 本实验室程国锋等利用双向电泳结合肽质量指纹图谱技术获得一个 Wnt 家族蛋白的一段肽序列,以此肽序列为询问序列在日本血吸虫 EST 库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索到一个日本血吸虫的相应 EST 片断 (GenBank™ accession number AAM89872),长 727bp,不含有完整的 ORF。以该 EST 序列为模板设计合成 RACE 引物 (由上海申能博采生物技术有限公司合成)。  
3'RACE 的两个巢式引物: 3GSP1: 5' -TATGCTGTGGTCGAGGATTTAAACG-3' , 3GSP2: 5' -GGTGTTCGAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' ; 5'RACE 的两个巢式引物: 5GSP1: 5' -GGTGTTCGAAAGTTGTCTGTAAAACA-3' , 5GSP2: 5' -TTGTCGTTTAAATCCTCGACCACAG-3' ; 具体步骤按 GeneRacer™ 试剂盒操作手册进行。将 RACE 产物克隆到试剂盒提供的 pCR4-TOPO 载体中,挑选阳性克隆,由英俊生物技术有限公司测序。利用 DNASTar 软件查找 3'、5' RACE 产物序列与原 EST 序列的重叠部分,将三段序列拼接;

**2.3 含 ORF cDNA 片断的扩增** 根据拼接的 cDNA 序列设计引物 (F1 和 F2) 进行含 ORF cDNA 片断的扩增。F1: 5' -CCGGGATCCATGAATCTAACTCAGCTAGAA-3' 引入酶切位点 *Bam*HI (加下划线); F2: 5' -CGGCTCGAGTTAATTACATGTAGATATAAC-3' 引入酶切位点 (*Xho*I) (由上海申能博采生物技术有限公司合成)。取 3μl 在 3'RACE 中反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应条件分别为 94℃ 预变性 5min,然后 94℃、30s,55℃、30s,72℃、1min30s,共 30 个循环,循环结束后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收,纯化后连 pUCm-T 载体,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,选单个菌落酶切鉴定,阳性质粒命名为 pUCm-T-*Sjwnt4* 并送英俊生物技术有限公司测序;

**2.4 生物信息学分析** 将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行相似性比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 NCBI 上的 ORF finder 找出新基因的读码框;利用 DNASTar 软件对氨基酸残基数、组成、蛋白质相对分子量等参数进行分析;利用 Genetool 软件对不同物种 Wnt 蛋白进行多重比对;利用 NetAcet 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAcet/>) 进行糖基化位点预测。利用 SYFPEITHI

的 MHCII 表型在线预测工具 (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>) 进行 T 细胞表位预测。

### 3. 结果

利用 RACE 技术对 EST 片断 (GenBank™ 登陆号为 AAM89872) 进行 3'端和 5'端延伸, 分别经 2 轮 PCR 扩增, 将 PCR 产物测序后拼接得到 2 044bp 的 DNA 片断, 进一步利用 PCR 技术克隆获得含完整阅读框的编码基因, 其开放阅读框为 1 311bp, 编码 436 个氨基酸, 利用 NCBI 的 Blast 软件对该序列进行同源性搜索, 结果与血吸虫其它已知基因无显著同源性, 为血吸虫新基因。氨基酸序列的相似性比较结果显示与 Wnt 家族蛋白具有高度同源性, 其中与 Wnt4 蛋白的同源性最高, 并且对氨基酸序列进行分析也发现其具有十分典型的 Wnt 家族蛋白特征: 整个蛋白序列中散在着 100 多个 Wnt 家族蛋白的保守位点; 富含可交连形成二硫键的半胱氨酸残基, 约 23~24 个保守的半胱氨酸, 其中 50%位于蛋白的羧基端; 具有三个或四个糖基化位点, 又选择了分别来自日本三角涡虫 (登陆号 BAD93239.1)、人 (GeneBank 登陆号 NP\_110388.2)、小鼠 (GeneBank 登陆号 NP\_033549.1)、尤金袋鼠 (GeneBank 登陆号 AAY18780.1)、鸡 (GeneBank 登陆号 JC2451)、线虫 (GeneBank 登陆号 NP\_493668.1)、果蝇 (GeneBank 登陆号 NP\_476810.1) 的 7 个物种的 Wnt4 蛋白进行氨基酸序列的多重比对。结果显示, 该基因所编码氨基酸序列与同属扁形动物门的日本三角涡虫的 Wnt4 相似性最高达 43% ( $E=1e-100$ ), 与人 Wnt4 的相似性为 37% ( $E=9e-72$ ), 其余皆在 36%~38%之间。据此, 推测该基因编码的蛋白为日本血吸虫 Wnt4 蛋白, 将该基因命名为日本血吸虫 wnt4 (Sjwnt4) (GeneBank 登陆号 DQ643829)。

### 实施例 2

日本血吸虫 *Sjwnt4* 基因在大肠杆菌中的表达

#### 1. 实验材料

1.1 材料 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司。

**1.2 菌种、质粒** 质粒 pGEX-4T-2、BL21 (DE3) 由本所提供。

## 2. 方法

**2.1 重组表达质粒的构建** 从测序后确定的重组质粒 pUCm-T-*Sjwnt4* 中用限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho* I 切出 *Sjwnt4* 含 ORF 的 cDNA 片断，将该完整序列定向克隆于原核表达载体 pGEX-4T-2 的多克隆位点区，构建重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*，并转化表达宿主菌 BL21 (DE3)；

**2.2 在大肠杆菌中的表达** 将鉴定好的 pGEX-4T-2-*Sjwnt4*/BL21(DE3)接种于液体 LB 培养基，37℃震荡培养，*OD* 值为 0.6 时加终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后 0h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h 分别收集菌体，应用 SDS-PAGE 分析菌体蛋白，确定最佳诱导时间。

## 3.结果

重组表达质粒 pGEX-4T-2-*Sjwnt4* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得表达，SDS-PAGE 电泳结果显示，1mM IPTG 诱导 4h 即达到最大表达量；重组蛋白分子量约为 76kD，与预期结果相符 (*Sjwnt4* 蛋白推测分子量约为 49.6kD，载体表达蛋白 GST 约 26kD，故重组蛋白分子量约为 75.6kD) (图 4)。重组蛋白以包涵体形式存在，可溶于含 8M 尿素的 PBS。

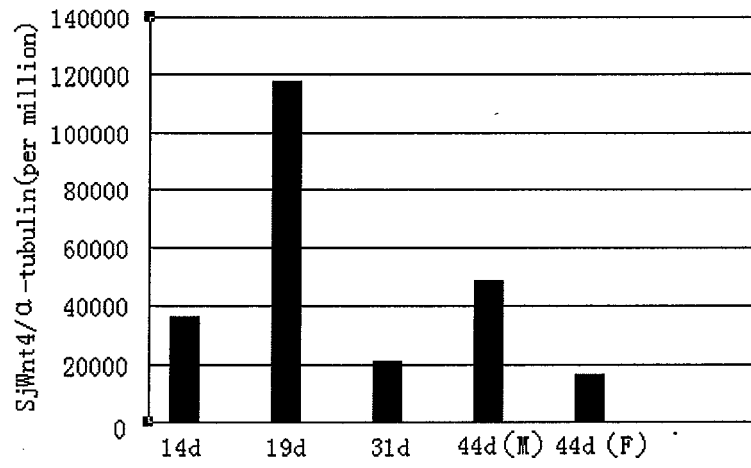


图 1

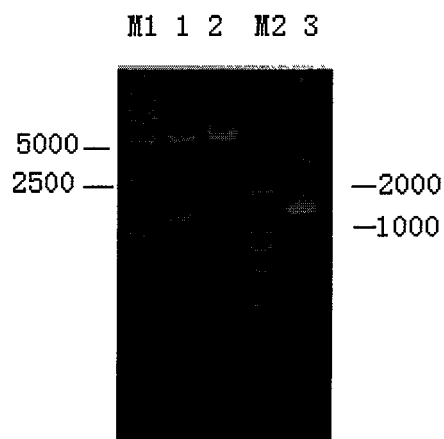


图 2

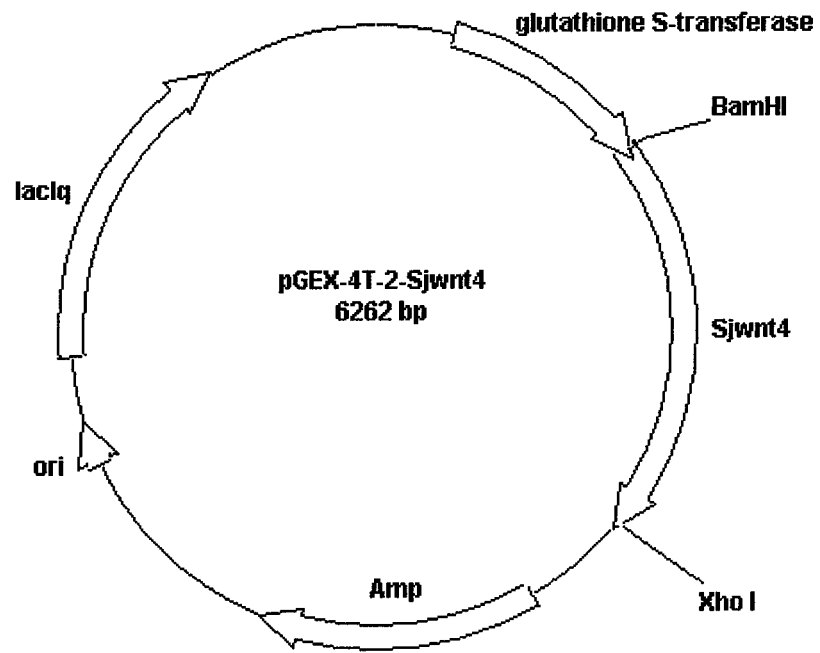


图 3

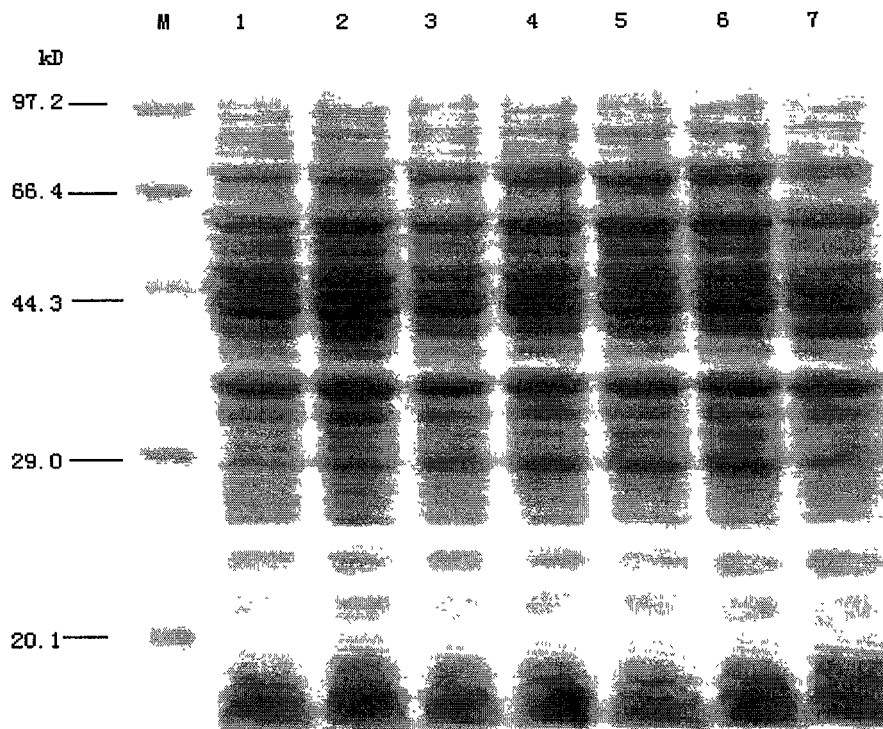


图 4

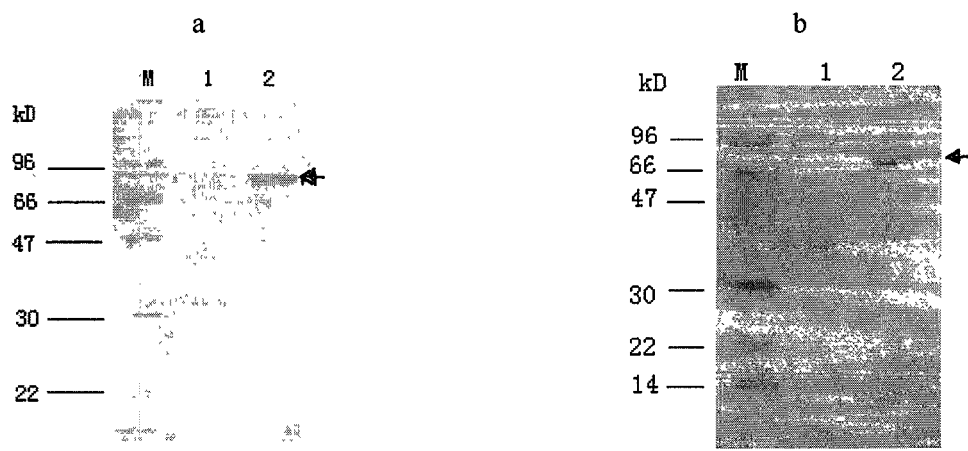


图 5

专利名称(译)	日本血吸虫信号转导蛋白Sjwnt - 4基因的克隆、表达及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101205538A</a>	公开(公告)日	2008-06-25
申请号	CN200610167531.5	申请日	2006-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院上海兽医研究所		
[标]发明人	林矫矫 陶丽红 苑纯秀 姚利晓 傅志强 冯新港 刘金明 石耀军 王欣之 贾人初		
发明人	林矫矫 陶丽红 苑纯秀 姚利晓 傅志强 冯新港 刘金明 石耀军 王欣之 贾人初		
IPC分类号	C12N15/30 C12N15/10 A61K31/7088 A61K48/00 A61P33/12 C12N15/63 C12N1/21 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	Y02A50/423		
代理人(译)	王巍		
优先权	200610147333.2 2006-12-15 CN		
其他公开文献	CN101205538B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了利用RACE技术从日本血吸虫19天童虫中首次扩增到一个Wnt家族基因，序列分析表明该基因的完整编码框含1311bp，编码436个氨基酸，理论分子量49.6kD。同源性分析结果表明，该基因的氨基酸序列具有典型Wnt家族蛋白特征，与日本三角涡虫、人Wnt4的氨基酸序列相似性分别达43%、37%，推测为血吸虫的Wnt4基因，命名为Sjwnt4(GenBank登陆号DQ643829)。实时定量PCR分析显示该基因在14天童虫、19天童虫、31天成虫、44天雌虫及44天雄虫中均有表达，本发明构建了该基因的原核表达载体pGEX - 4T - 2 - Sjwnt4，应用大肠杆菌系统进行了表达，表达蛋白以包涵体形式存在，Western印迹显示表达产物能被日本血吸虫成虫粗抗原免疫血清所识别。

Types of HLA	Pos	Amino Sequence	Score
HLA-DRB1*0101	139	SAYVLAVTSAGVSHA	30
	256	LPKFRHLGAQLQERF	29
	49	QKKLCRQYSHLMESV	28