



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101892240 B

(45) 授权公告日 2012.05.02

(21) 申请号 201010239053.0

A61K 38/17(2006.01)

(22) 申请日 2010.07.28

A61P 33/12(2006.01)

(73) 专利权人 中国农业科学院上海兽医研究所
地址 200241 上海市闵行区紫月路 518 号(72) 发明人 苑纯秀 李红飞 王孝波 冯新港
杨健美 林矫矫(74) 专利代理机构 上海大邦律师事务所 31252
代理人 周东萍

(51) Int. Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101205538 A, 2008.06.25, 全文.

CN 101532008 A, 2009.09.16, 全文.

韩琳

苑纯秀

冯新港

. 本血吸虫 Wnt 受体蛋白 Fz5 编码基因的克隆及其在不同发育时期虫体的表达差异.《中国血吸虫病防治杂志》. 2008, (第 5 期), p333-p338.

审查员 吕健

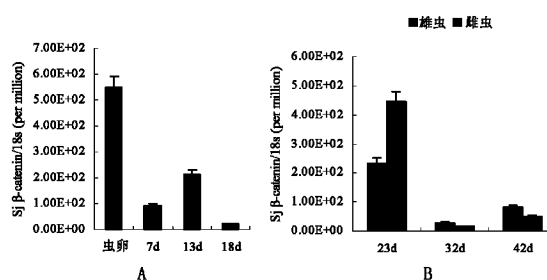
权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 2 页

(54) 发明名称

日本血吸虫 β -catenin 基因、蛋白及用途

(57) 摘要

本发明公开了一种日本血吸虫基因,所述基因具有编码 β -catenin 蛋白的核苷酸序列,该核苷酸序列包含:编码 SEQ ID NO.1 氨基酸序列的 DNA 序列,或编码 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有 SEQ ID NO.1 相同活性的氨基酸序列的 DNA 序列。本发明还公开了上述基因编码的蛋白质。本发明的日本血吸虫 β -catenin 基因和蛋白,参与调控血吸虫的器官分化、虫卵的形成及卵胚发育等过程,对开发控制血吸虫生长发育的新药具有很高的应用价值。



1. 一种日本血吸虫基因,其特征在于,所述基因为编码 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列的 β -catenin 基因。
2. 根据权利要求 1 所述的日本血吸虫基因,其特征在于,所述基因的核苷酸序列为 SEQ ID NO. 2 所示的 DNA 序列。
3. 一种日本血吸虫蛋白质,其特征在于,所述蛋白质为 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列的 β -catenin 蛋白质。
4. 一种重组载体,其特征在于,包含编码 SEQ ID NO. 1 中 8-310 位氨基酸序列的 DNA 序列。
5. 一种宿主细胞,其特征在于,包含权利要求 4 所述的重组载体。
6. 一种抗血清,其特征在于,该抗血清是用权利要求 4 所述重组载体表达的重组蛋白免疫动物而制得。

日本血吸虫 β -catenin 基因、蛋白及用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,尤其涉及一种日本血吸虫 β -catenin(β -连环蛋白)基因、蛋白及用途。

背景技术

[0002] 血吸虫病是一种严重危害人类健康的慢性消耗性寄生虫病,目前该病在全球 74 个国家和地区流行,主要集中在热带、亚热带欠发达国家和地区,感染人数超过 2 亿。2007 年我国仍有约 60 万人口感染该病,其中 80% 以上集中在安徽、江西、湖北和湖南等省的沼泽和湖泊地区。目前中国血吸虫病的防治仍以吡喹酮等化学药物为主,该药物虽然能够有效杀伤体内血吸虫成虫,但不能控制重复感染,且长期使用可能诱发虫体的耐药性,因此新的治疗药物亟待开发。然而,要使新药研究取得突破性进展,充分了解血吸虫的生长发育过程及其相关的调控机制是重要基础。

[0003] 日本血吸虫生活史复杂,在整个生活循环过程中表现出明显的形态学及生理生化方面的改变,但是,以往研究者对血吸虫的研究主要集中于表观生物学及组织化学层面,对于虫体复杂的生长发育调控机理缺乏认识,因而在新药开发方面没有新的突破。生物体的生长发育由细胞间的信号网路系统调控,日本血吸虫也不例外。

[0004] 真核生物的生长发育、生殖生理等生命进程由进化保守的 Hedgehog、BMP、Wnt 等信号网络系统进行调节。其中 Wnt 信号通路是调控细胞增殖和分化的重要途径,在胚胎发育、细胞命运及组织器官形态发生等生物学过程均发挥重要调控作用。模式生物上的研究发现,Wnt 信号通路存在经典和非经典的细胞信号传递途径。经典通路指 Wnt/ β -catenin 信号通路;非经典通路包括:平面细胞极性通路(planar cell polarity pathway,PCP)及 Wnt/ Ca^{2+} 信号通路。 β -catenin(β -连环蛋白)是经典 Wnt 信号途径的关键信号分子,在 Wnt 信号未被激活时,胞浆内的 β -catenin 大部分与细胞膜上的钙黏蛋白结合,少部分与轴蛋白、腺瘤性结肠息肉病基因蛋白、酪蛋白激酶、糖原合酶激酶形成巨大复合体,最终导致 β -catenin 通过蛋白酶体被降解,因而胞浆内游离 β -catenin 水平极低。当 Wnt 信号激活后, β -catenin 复合体不被降解,大量游离的 β -catenin 在胞质中聚集,这种累积打破了细胞内原有的 β -catenin 出核和入核平衡,使得细胞核内的 β -catenin 大大增加,促进 Wnt/ β -catenin 信号通路靶基因的转录激活。

[0005] 利用生物信息学方法,预测到血吸虫体内也存在 Wnt 信号通路。并参考其它模式生物数据,利用血吸虫转录本组及蛋白质组数据重构了血吸虫 Wnt 信号通路(<http://lifecenter.sgst.cn/schistosoma/en/pathwayImage.do?map=map04310&name=Wnt%20signaling%20pathway>)。目前该通路对血吸虫生长发育的调控机制在国内外尚未有详细报道。本实验室率先开展了血吸虫 Wnt 信号通路的相关研究,已鉴定了两个 Wnt 配体:SjWnt4(GenBank 登陆号 DQ643829)和 sjWnt10(GenBank 登陆号 DQ643830);三个 Frizzled 家族七次跨膜受体:sjFz5(GenBank 登陆号 EU370926),sjFz7(GenBank 登陆号 EU370927)和 sjFz9(GenBank 登陆号 GQ500895)。通路中更多成员的鉴定及生物学特性的

分析,有助于全面认识 Wnt 信号通路对血吸虫生长发育调控的分子机制,从而发现重要的功能分子用于发展候选疫苗或药靶。

[0006] 目前国内外尚没有日本血吸虫 β -catenin 基因的研究报道。

发明内容

[0007] 本发明要解决由于对日本血吸虫的生长发育调控机制缺乏认识而导致在新药研发方面难以取得突破的技术问题,提供一种日本血吸虫 β -catenin 基因和蛋白,该 β -catenin 基因参与调控血吸虫的器官分化、虫卵的形成及卵胚发育等过程,对开发控制血吸虫生长发育的新药具有较高的应用价值。

[0008] 此外,还需要提供一种日本血吸虫 β -catenin 基因和蛋白质的用途。

[0009] 为了解决上述技术问题,本发明通过如下技术方案实现:

[0010] 在本发明的一个方面,提供了一种日本血吸虫基因,所述基因具有编码 β -catenin 蛋白的核苷酸序列,该核苷酸序列包含下述 DNA 序列之一:

[0011] (1) 编码 SEQ ID NO. 1 氨基酸序列的 DNA 序列;

[0012] (2) 编码 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有 SEQ ID NO. 1 相同活性的氨基酸序列的 DNA 序列。

[0013] 优选的,所述基因具有 SEQ ID NO. 2 所示的 DNA 序列。

[0014] 在本发明的另一方面,提供了一种日本血吸虫蛋白质,所述蛋白质选自:

[0015] (1) 具有 SEQ ID NO. 1 氨基酸序列的蛋白质;

[0016] (2) 具有 SEQ ID NO. 1 中部分氨基酸序列的活性片段或保守性变异蛋白质;

[0017] (3) SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有 SEQ ID NO. 1 相同活性的氨基酸序列的蛋白质。

[0018] 优选的,所述蛋白质具有 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列。

[0019] 在本发明中,由于体内或纯化期间蛋白质本身的修饰等或由于编码蛋白基因的多态性及变异,天然存在的蛋白质会出现氨基酸的缺失、添加、插入、取代或其他变异。事实上,存在着一些生理和生物活性上基本等同于无变异蛋白质的蛋白。这些结构不同于相应的蛋白质但与该蛋白质没有明显的功能差异的多肽或蛋白称为功能等同变异体。

[0020] 功能等同变异体同样适用于通过人工手段向一种蛋白质的氨基酸序列中导入这类变异而制成的多肽。

[0021] 例如,人白介素 2(IL-2) 的氨基酸序列中用丝氨酸替换特定的半胱氨酸残基所得到的多肽仍保留着 IL-2 的活性 [Science, 224, 1431 (1984)]。

[0022] 此外,在用基因工程方法生产蛋白质时,常把所需蛋白质表达为融合蛋白质,例如,把源于其他蛋白质的 N-末端肽链加到所需蛋白质的 N-末端以提高所需蛋白质的表达,或者把一个合适的肽链加到所需蛋白的 N-或 C-末端,表达该蛋白并使用一种对所加肽链具有亲和力的载体使所需蛋白的纯化变得更加容易。

[0023] 就决定基因上特定氨基酸的密码子(三联体碱基组合)而言,每种氨基酸存在 1 到 6 个密码子。因此尽管依赖于氨基酸序列,但仍有许多编码一种氨基酸的基因。在自然界中,基因并不稳定,常发生核酸变异。基因的变异可能不影响所编码的氨基酸序列(沉默变异),这种情况下,会产生编码相同氨基酸序列的不同基因。因此,即使分离出了编码特定

氨基酸序列的基因,随着含有该基因生物体的传代,仍不可避免地会产生编码相同氨基酸序列的不同基因。

[0024] 用各种基因工程技术人工产生编码相同氨基酸序列的各种基因并不困难。例如,当编码所需蛋白质的天然基因的密码子在用于以基因工程技术产生蛋白质的宿主中可利用性较低、表达的蛋白量不够时,可以人工将密码子转变成在该宿主中可利用性高的另一密码子而不改变所编码的氨基酸序列,即可增强所需蛋白质的表达。因此,这类人工生产的不同多核苷酸也包括在本发明的范围内,只要它能编码出本发明公开的氨基酸序列即可。

[0025] 另外,由至少一种改变(如蛋白质的氨基酸序列中有一个或多个氨基酸残基的缺失、添加、插入或取代)所得的多肽或蛋白一股具有功能上等同于所述蛋白质的活性,编码这类多肽或蛋白的基因也包括在本发明的范围内,不管它是从天然来源分离还是人工生产的。

[0026] 一股的,编码功能等同变异体的基因是同源的。因此,能与本发明的基因杂交且编码具有 β -catenin 活性的蛋白质的核酸分子也包括在本发明的范围内。

[0027] 在本发明的另一方面,还提供了一种包含上述日本血吸虫基因 DNA 序列的全部或部分序列的重组载体。

[0028] 所述重组载体包括重组克隆载体或重组表达载体,重组表达载体包括重组原核表达载体、重组真核表达载体。

[0029] 优选的,所述重组载体包含编码 SEQ ID NO. 1 中 8-310 位氨基酸序列的 DNA 序列。

[0030] 在本发明的另一方面,还提供了一种宿主细胞,包含上述重组载体,或已用上述基因序列转化或转染。

[0031] 在本发明的另一方面,还提供了一种上述日本血吸虫基因的用途,用于制备预防或治疗血吸虫病的药物;或用于筛选预防或治疗血吸虫病的药物。

[0032] 在本发明的另一方面,还提供了一种上述日本血吸虫蛋白质的用途,用于制备预防或治疗血吸虫病的药物;或用于筛选预防或治疗血吸虫病的药物。

[0033] 所述药物通过阻断血吸虫生长发育来发挥作用。

[0034] 本发明日本血吸虫 β -catenin 基因、蛋白可用于发展为高效候选疫苗或药靶。

[0035] 本发明日本血吸虫 β -catenin 基因,由实时荧光定量 PCR 分析结果表明,其在日本血吸虫各个发育阶段均有表达,在虫卵中表达量最高,23d 雌虫次之,13d 虫体和 23d 雄虫的表达量约是 23d 雌虫的一半,其它阶段的表达量相对较低;Western blotting 分析结果显示 β -catenin 在日本血吸虫不同发育阶段蛋白水平的变化和 mRNA 变化基本一致。结合日本血吸虫发育特征,推测 Wnt/ β -catenin 信号通路可能对虫体的器官分化,虫卵的形成及卵胚发育等过程起重要的调控作用,本发明的日本血吸虫 β -catenin 基因,为开发阻断虫体发育的新药提供了新思路。

附图说明

[0036] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明。

[0037] 图 1 是本发明实施例 1 日本血吸虫 β -catenin 基因保守的 ARM 结构特征图;

[0038] 图 2 是本发明实施例 2 实时定量 PCR 分析 β -catenin 在日本血吸虫不同发育阶段表达量的变化图;

[0039] 图3是本发明实施例3重组质粒 pET28a- β -catenin-310 的 BamH I/Xho I 双酶切产物鉴定图；

[0040] 图4是本发明实施例3的 SDS-PAGE 分析 pET28a- β -catenin-310 重组质粒的包涵体表达及纯化图；

[0041] 图5是本发明实施例4天然虫体蛋白和抗 β -catenin 抗血清的 Western Blotting 分析图；

[0042] 图6是本发明实施例5的 SDS-PAGE 分析 pET28a 载体及 pET28a- α -tubulin 重组质粒的诱导表达图；

[0043] 图7是本发明实施例5天然虫体蛋白和抗 α -tubulin 抗血清的 Western Blotting 分析图；

[0044] 图8是本发明实施例6的 Western Blotting 分析日本血吸虫不同发育阶段 β -catenin 蛋白水平表达量的变化图。

具体实施方式

[0045] 下列实施例中,未注明具体条件的实验方法,通常按常规条件,如《分子克隆实验指南》(J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著,黄培堂,汪嘉玺,朱厚础,等译. 第3版,北京:科学出版社,2002)中所述的方法进行。

[0046] 本发明以 7d 童虫 cDNA 为模板,通过 RACE 技术获得日本血吸虫 β -catenin 全长 cDNA 序列,再利用生物信息学软件分析该基因及其编码蛋白的结构。结果表明,该 β -catenin 的 cDNA 序列全长 2354bp,含完整的开放阅读框 2016bp,编码 671 个氨基酸。利用荧光实时定量 PCR 方法分析了 β -catenin 基因在日本血吸虫不同发育阶段 mRNA 水平的变化。以含有多个抗原表位的 β -catenin 部分 cDNA 序列为模板,构建原核表达载体,表达 β -catenin 重组蛋白。以纯化的原核表达产物为抗原,免疫 BALB/c 小鼠制备抗血清,以此抗血清为一抗,通过 Western blotting 分析 β -catenin 在日本血吸虫不同发育阶段蛋白水平的变化。实验结果显示 β -catenin 基因的 mRNA 水平在虫卵中最高,23d 雌虫次之,在 13d 童虫和 23d 雄虫中也较高,约是 23d 雌虫的一半,在其它发育阶段虫体水平相对较低,结合日本血吸虫发育特征,推测 Wnt/ β -catenin 信号通路可能对虫体的器官分化,虫卵的形成及卵胚发育等过程起重要的调控作用,表明该 β -catenin 基因编码蛋白对开发控制血吸虫生长发育的新药具有较高的应用价值。

[0047] 实施例1日本血吸虫 β -catenin 全长 cDNA 序列的获得及生物信息学分析

[0048] 1. 不同发育阶段的日本血吸虫收集

[0049] 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,新西兰大白兔腹部贴片,按照所需不同阶段虫体分别感染 2000 ~ 15000 条尾蚴,分别在感染后 7d、13d、18d、23d、32d、42d 用肝门静脉灌注法收集虫体,并将 23d、32d 及 42d 虫体雌雄分开,取感染 42d 兔的肝脏,剪碎匀浆后分别过 80 目、120 目、160 目、200 目及 300 目筛网纯化虫卵,将收集的不同发育阶段虫体做好标记后液氮保存备用。

[0050] 2. 日本血吸虫 β -catenin 全长 cDNA 序列的扩增及生物信息学分析

[0051] 取液氮中冻存的 7d 童虫,按 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 抽提。分别用 1% 琼脂糖凝胶和分光光度计检测 RNA 的完整性和浓度。以 NCBI 获得的与其它物种 β -catenin

有部分同源性的日本血吸虫 EST 序列 (GenBank 登陆号 AA618990) 为模板设计 RACE 引物, 由上海英俊生物工程有限公司合成。3' -RACE 正义引物 / 正义巢式引物 (5' -3') 分别为: CAACTTCACGTTCTGGATCTCAAGC (SEQ ID NO. 3), TGCTGCGTATACTGCTGCTATCCTG (SEQ ID NO. 4); 5' -RACE 反义引物 / 反义巢式引物 (5' -3') 分别为: TCAGGACGTGTTATTTTCATCAGTGG (SEQ ID NO. 5), GACCAACAACAGATTTTCAGTAATGG (SEQ ID NO. 6)。

[0052] 参照 RACE 试剂盒说明书, 将 7d 童虫 RNA 分别转录为 3' -RACE cDNA 和 5' -RACE cDNA。首轮 touch-down PCR 扩增条件如下: 94℃ 5min 预变性; 94℃ 30s, 70℃ 3min 设定 5 个循环; 94℃ 30s, 70℃ 30s, 72℃ 3min 设定 5 个循环; 94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 3min 设定 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。第二轮是特异巢式 PCR, 将首轮 touch-down PCR 产物经灭菌去离子水稀释 50 倍后取 5 μL 作模板, 扩增条件为 94℃ 5min, 94℃ 30s, 68℃ 30s, 72℃ 3min, 共 25 个循环。

[0053] 经两轮 PCR, 3' -RACE、5' -RACE 分别得到长 346bp、1568bp 的产物。将扩增后的 PCR 产物与 T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆到上海英俊生物技术公司进行测序鉴定。用 Gene tool 软件将 3' -RACE 序列、5' -RACE 和已知的作为 RACE 模板的 β-catenin EST 序列拼接, 得到完整的 β-catenin 全长 cDNA 序列。

[0054] 将获得的 cDNA 序列通过 NCBI 进行同源性比对和 ORF 分析, 推测其编码框和蛋白结构域 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); 通过 ExPASy 分析 β-catenin 等电点、稳定性等生化特性 (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>); 通过 Signal P 分析信号肽的存在与否 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

[0055] 上述序列分析表明该 β-catenin 基因全长 2354bp (见 SEQ ID NO. 2), 完整编码框为 2016bp, 共编码 671 个氨基酸 (SEQ ID NO. 1), 理论相对分子量为 75.69kD, 理论等电点为 6.15, 无信号肽序列。

[0056] 同源性分析表明, 该 β-catenin 基因编码的氨基酸序列与曼氏血吸虫 β-catenin 的相似性为 85%, 与日本三角涡虫、非洲爪蟾、黑腹果蝇、人等其它物种 β-catenin 的相似性均在 30% ~ 35% 之间。对该蛋白序列进行高级结构预测, 其氨基端含有系列的丝氨酸 / 苏氨酸残基, 能够被磷酸化, 调节蛋白的稳定性。中间区域有 6 个 β-catenin 家族典型的 ARM 重复 (ARM 为 armadillo 的简称, 为 β-catenin 在果蝇属的同源性基因), 构成 2 个 ARM 超家族, 其中每个 ARM 重复能形成三个 α-螺旋, 该蛋白通过 α-螺旋间相互作用形成精密的右手超螺旋高级结构 (图 1), 能够有效防止蛋白水解作用。至此确定该基因为日本血吸虫 β-catenin。

[0057] 实施例 2 β-catenin 在日本血吸虫不同发育阶段 mRNA 表达量分析

[0058] 1. 实验方法

[0059] 按照实时定量 PCR 的引物设计原则, 设计 β-catenin 引物, 上游引物 (5' -3') : AAGGCATCCATCAGAAGT (SEQ ID NO. 7); 下游引物 (5' -3') : ACTGCTTTCATAGACTGCCATAC (SEQ ID NO. 8), 扩增片段长度为 207bp。选择 18S rRNA (GenBank 登陆号 AY157226.1) 作内参, 上游引物 (5' -3') : TTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG (SEQ ID NO. 9); 下游引物 (5' -3') : CTGTTATTGCTCAATTTCTGCGAC (SEQ ID NO. 10), 扩增片段 214bp。引物序列由公司合成。

[0060] 用 Trizol 法分别抽提虫卵、7d、13d、18d、23d、32d 及 42d 虫体 RNA, DNase I 消化 RNA 中残留 DNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度法测定 RNA 浓度。参

照 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明,将 RNA 反转录成 cDNA,以 SYBR Green I 为荧光染料,反应体系为:2×SYBR Green PCR Premix Ex Taq 12.5 μL,上游引物 (10 μM)0.5 μL,下游引物 (10 μM)0.5 μL,无菌去离子水 9 μL, cDNA 模板 2.5 μL;反应条件为:95℃ 10s,然后 95℃ 15s,60℃ 15s,72℃ 15s,共 40 个循环,其中每个循环的 72℃ 15s 结束时间为荧光信号检测点,每个样品均做三个重复。以 7d 童虫 cDNA 作 10 倍系列稀释后为模板,构建 β-catenin 和 18S rRNA 内参的标准曲线。保证每个标准曲线的相关系数 $R^2 > 0.99$ 。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析,得到不同期别每百万 18S rRNA 看家基因中 β-catenin 的含量。

[0061] 2. 结果

[0062] 以 10 倍系列稀释的 7d 童虫 cDNA 为模板,首先构建了 β-catenin 和 18S rRNA 扩增标准曲线,分别为 β-catenin:Conc = $10^{(-0.350*CT+7.990)}$,阈值 (Threshold)0.069; 18S rRNA:Conc = $10^{(-0.336*CT+7.875)}$,阈值 (Threshold)0.0908。这两条标准曲线都有良好的扩增效率和相关系数。

[0063] 实时定量 PCR 分析结果表明 (图 2), β-catenin 在虫卵中表达量最高,23d 雌虫次之,13d 虫体和 23d 雄虫的表达量也较高,约是 23d 雌虫的一半,其它阶段的表达量相对较低。在虫体发育过程中, β-catenin mRNA 水平从 7d 到 13d 逐渐上升,13d 后又迅速下降,到 18d 降到最低水平 (图 2A)。合抱后的雌雄虫 β-catenin mRNA 水平逐渐升高,到 23d 达到高峰,随后又下降,到 32d 达到最低水平,而 42d 雌雄虫表达量又略有升高 (图 2B)。

[0064] 实施例 3 重组质粒 pET28a-β-catenin-310 的构建及重组蛋白的表达和纯化

[0065] 1. 重组质粒的构建

[0066] 用 BepiPred 1.0b Server 软件在线预测了 β-catenin 抗原表位,氨基酸 8~310 区段具有 8 个抗原指数较高表位,有较好的抗原性。因此选取该段氨基酸作为免疫组化定位的目标抗原,设计引物对如下:上游引物 (5'-3') :GTGGATCCATGAAAAATACTCACATGTAG (SEQ ID NO. 11);下游引物 (5'-3') :GTCTCGAGATCACTAAGATTACGTAATCCC (SEQ ID NO. 12),上下游引物中分别引入 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶位点 (引物序列中划线处标出)。

[0067] 以反转录的 7d 童虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将纯化的目的片段 (957bp) 和 pET28a 质粒分别进行 BamH I 和 Xho I 双酶切并连接,将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,挑选克隆抽提质粒,经双酶切、测序鉴定后获得重组阳性质粒,命名为 pET28a-β-catenin-310。重组质粒 pET28a-β-catenin-310 经 BamH I/Xho I 双酶切鉴定结果如图 3 所示。在图 3 中,M:DL2000DNA 分子量标准;1:重组质粒 pET28a-β-catenin-310 的 BamH I/Xho I 双酶切产物。

[0068] 2. 重组质粒在原核细胞中的表达及纯化

[0069] 将重组质粒转 ABL21 (DE3) 表达型感受态细胞,挑取单克隆于 LB 培养基,37℃ 过夜培养。次日以 1:100 接种新鲜 LB 培养基,待菌液 OD₆₀₀ 为 0.8 时加入不同终浓度 IPTG 进行诱导。在诱导的不同时间分别收集菌液,确定 IPTG 最佳诱导时间。SDS-PAGE 电泳分析经超声裂解后的菌体蛋白,判定其是以可溶性或包涵体形式表达。用 His Bind Resin 纯化重组蛋白,若为包涵体表达再用尿素浓度梯度降低的 PBS 进行透析,复性。

[0070] 结果:用不同浓度 IPTG 诱导不同时间均获得了分子量约为 36kDa 的重组蛋白,与预测分子量一致,其中终浓度 0.8mM 的 IPTG 诱导 4h 获得最大表达量。蛋白表达分析表明

重组蛋白以包涵体形式存在(图 4A)。将包涵体溶于 8M 尿素,用 His bind Resin 纯化,将纯化后的蛋白用尿素浓度梯度降低的 PBS 透析至 PBS 中复性,得到纯化目的蛋白(图 4B)。

[0071] 实施例 4pET28a- β -catenin-310 蛋白抗血清的制备及特异性分析

[0072] 1. 抗血清的制备

[0073] 取 8~12 周龄 BALB/c 雌性小鼠 10 只,其中 2 只用于佐剂对照。将纯化后的重组蛋白调整为 1mg/mL,首次免疫时将蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀,背部皮下分点注射实验组 8 只小鼠,注射剂量为 200 μ L/只(100 μ g 蛋白),同时取等体积无菌 PBS 与弗氏完全佐剂混匀后,同等剂量、同样途径注射入佐剂对照组小鼠。首次免疫后 2 周、4 周分别进行第二次免疫和第三次免疫,免疫剂量及途径同于首免,所用佐剂为弗氏不完全佐剂。3 免后 5d 小鼠尾静脉采血,用间接 ELISA 法检测血清中特异性 IgG 抗体水平,结果显示 8 只实验组小鼠效价均在 1:51 200 以上,2 只佐剂对照组小鼠血清系列稀释后 OD₄₅₀ 均小于 0.2。对效价高的实验组小鼠眼眶静脉丛采血,收集血清,置于 -70℃ 冰箱冻存备用。

[0074] 2. 抗血清的特异性分析

[0075] 本实验制备的抗血清为原核表达的重组蛋白免疫产生,因此用 Western blotting 分析抗血清和虫体天然 β -catenin 能否特异性结合。收集 13d 虫体,用 PARIS™ kit 蛋白抽提试剂盒抽提虫体蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,20 μ g 虫体蛋白/孔进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后按常规方法将蛋白转移到 NC 膜上,以 1:500 稀释的 pET28a- β -catenin-310 蛋白免疫多抗作一抗,1:2000 稀释 IRDye™800 标记的羊抗小鼠 IgG 作二抗进行 Western blotting,同时设置正常小鼠血清作阴性对照,通过 Odyssey 红外荧光扫描成像系统分析显色结果。

[0076] 结果:Western blotting 结果表明 pET28a- β -catenin-310 多克隆抗体能与天然虫体蛋白中的单一条带相结合,被结合蛋白呈现明显绿色荧光,分子量在 70kDa 左右,与 β -catenin 预测的蛋白分子量一致(图 5A)。阴性血清对照组无特异条带出现(图 5B),表明以原核表达的 β -catenin 为免疫原得到的抗血清能特异性识别虫体天然蛋白中的 β -catenin,可用于分析不同发育阶段虫体 β -catenin 蛋白水平的表达变化。

[0077] 实施例 5 日本血吸虫 α -tubulin 抗血清的制备及特异性分析

[0078] 1. pET28a- α -tubulin 重组质粒的构建及在原核细胞的表达

[0079] 本研究以 α -tubulin 为内参,分析 β -catenin 在日本血吸虫不同发育阶段的蛋白水平的表达,为此也构建了 α -tubulin 的原核表达载体,并进行了表达、纯化和多克隆抗体制备。以 NCBI 获得的日本血吸虫 α -tubulin(GenBank 登陆号 AY815746)完整核苷酸序列 ORF 为模板设计 PCR 引物对,上游引物(5'-3'):GTGGATCCATGCGTGAATGTATTAGTGTAC(SEQ ID NO. 13);下游引物(5'-3'):GTCTCGAGGTACTCTTCCTCCCTTCA(SEQ ID NO. 14),上下游引物中分别引入 BamH I 和 Xho I 限制性内切酶位点(引物序列中划线处标出)。引物序列由公司合成。

[0080] 以反转录的 7d 童虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将纯化的目的片段(1365bp)和 pET28a 质粒分别进行 BamH I 和 Xho I 双酶切并连接,构建 pET28a- α -tubulin 重组质粒。将重组质粒转入 BL21(DE3)表达型感受态细胞,用 1mM IPTG 诱导表达,His Bind Resin 纯化重组蛋白。

[0081] 结果:pET28a- α -tubulin 重组质粒转入 BL21(DE3),用 1mM IPTG 诱导 4h 获得

了分子量约为 55kDa 的重组蛋白,与预测分子量一致(图 6)。在图 6 中,1:未诱导表达的 pET28a;2:用 1mM IPTG 诱导表达 4h 的 pET28a;3:未诱导表达的 pET28a- α -tubulin;4:用 1mM IPTG 诱导表达 4h 的 pET28a- α -tubulin。

[0082] 2. pET28a- α -tubulin 抗血清的制备及特异性分析

[0083] 纯化后的重组蛋白免疫小鼠,制备抗 α -tubulin 免疫血清,用 Western blotting 分析该抗血清的特异性。日本血吸虫 α -tubulin 抗血清的制备及特异性分析过程同 β -catenin。

[0084] 结果:pET28a- α -tubulin 多克隆抗体能与天然虫体蛋白中的单一条带相结合,被结合蛋白呈现明显绿色荧光,分子量在 55kDa 左右,与 α -tubulin 预测的蛋白分子量一致(图 7A)。阴性血清对照组无条带产生(图 7B),表明以原核表达的 α -tubulin 为免疫原得到的抗血清能特异性识别虫体 α -tubulin 蛋白,可作为内参蛋白抗血清,用于分析不同发育阶段虫体 β -catenin 蛋白水平的表达变化。

[0085] 实施例 6 β -catenin 在日本血吸虫不同发育阶段蛋白表达分析

[0086] 用 PARISTM kit 蛋白抽提试剂盒分别抽提虫卵、7d、13d、18d、23d、32d、42d 虫体蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,50 μ g 虫体蛋白/孔进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后按常规方法将蛋白转移到 NC 膜上,分别以 1:500 稀释的抗 β -catenin 免疫血清、抗 α -tubulin 免疫血清作一抗,1:2000 稀释 IRDyeTM800 标记的羊抗小鼠 IgG 作二抗进行 Western blotting,通过 Odyssey 红外荧光扫描成像系统分析显色结果。

[0087] 结果:日本血吸虫不同发育阶段 β -catenin 蛋白水平的表达变化见图 8。在 α -tubulin 内参蛋白基本一致条件下,虫卵中 β -catenin 蛋白水平最高,23d 雌/雄虫表达量次之,13d 虫体表达量也较高。18d 及 32d 雌雄虫表达量较低,但 42d 雌雄虫表达量均略有升高。该变化趋势与日本血吸虫不同发育阶段 β -catenin 的 mRNA 水平表达量的变化基本一致。

[0088] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

[0089] 序列表

[0090] <110> 中国农业科学院上海兽医研究所

[0091] <120> 日本血吸虫 β -catenin 基因、蛋白及用途

[0092] <160>14

[0093] <170>PatentIn version 3.3

[0094] <210>1

[0095] <211>671

[0096] <212>PRT

[0097] <213>Schistosoma japonicum

[0098] <400>1

[0099] Met Lys Lys Tyr Ser His Val Val Asp Ser Gln Asn Ser Lys Glu Phe

[0100] 1 5 10 15

[0101]	Gln Tyr Ser Leu Ser Val Asn Ser Ser Lys Ser Asp Leu Ser Thr Pro
[0102]	20 25 30
[0103]	Thr Phe His Glu Cys Phe Ser Ser Val Glu Gln Leu Ser Gly Pro Val
[0104]	35 40 45
[0105]	Ser Lys Leu Asn Glu Ile Ile Gln Glu Leu Ile Asn Tyr Lys Asn Asp
[0106]	50 55 60
[0107]	Ala Glu Phe Ala Ala Leu Thr Ala Ser Asp Leu Ala Lys Arg Leu His
[0108]	65 70 75 80
[0109]	Ser Asn Ile Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gln Thr Met Ser Tyr Ile His
[0110]	85 90 95
[0111]	Lys Leu Ala Arg Tyr Gln Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Val Ser Cys Pro
[0112]	100 105 110
[0113]	Glu Leu Val Gln Val Ile Ile Gln Ile Leu Gln Thr Thr Lys Asp Thr
[0114]	115 120 125
[0115]	Asp Leu Gln Ser Glu Ala Ala Leu Thr Leu Gln Leu Leu Thr Lys Ser
[0116]	130 135 140
[0117]	Leu Thr Gly Ala Lys Leu Thr Cys Glu Glu Ile Gly Ile Ser Lys Leu
[0118]	145 150 155 160
[0119]	Val Asp Met Leu Arg His Pro Ser Glu Val Met Tyr Thr Thr Ala Leu
[0120]	165 170 175
[0121]	Tyr Val Leu Asn Gln Leu Leu Trp His Leu Pro Asn Tyr Ala Arg Pro
[0122]	180 185 190
[0123]	Glu Phe Arg Arg Tyr Asn Gly Gln Trp Asn Leu Ile Tyr Leu Leu Glu
[0124]	195 200 205
[0125]	Glu Asn Arg Leu Asp Asp Ser Asn Trp Leu Leu Ile Cys Leu Asp Thr
[0126]	210 215 220
[0127]	Leu Arg Met Ala Val Tyr Glu Ser Ser Glu Thr Lys Leu Ser Leu Ile
[0128]	225 230 235 240
[0129]	Ser Thr Asn Ile Tyr Gln Ile Ile Val His Leu Leu Arg Thr Tyr Ser
[0130]	245 250 255
[0131]	Ile Asn Met Lys Ile Ala Tyr Asn Leu Ala Arg Leu Ile Lys Val Leu
[0132]	260 265 270
[0133]	Ser Val Cys Asn Glu Asn Lys Ile Lys Leu Val Glu Phe Gly Thr Val
[0134]	275 280 285
[0135]	Glu Ala Leu Thr Pro Leu Leu Asn Ser Asn Asn Glu Val Leu Gln Leu
[0136]	290 295 300
[0137]	Glu Thr Leu Trp Gly Leu Arg Asn Leu Ser Asp Gln Ala Tyr His Leu
[0138]	305 310 315 320
[0139]	Ile Ala Thr Lys Asn Leu Ile Pro Ile Leu Ile Asn Leu Leu Ala Ser

[0140]		325		330		335
[0141]	Lys Asn Glu His Ile Ser Ile Cys Ser Ala Gly Cys Leu Cys Asn Leu					
[0142]		340		345		350
[0143]	Thr Cys Gln Asn Val Gln Asn Lys Ser Leu Leu Val Glu Lys Gly Gly					
[0144]		355		360		365
[0145]	Val Lys Val Leu Cys Arg Leu Leu Cys Leu Asn Ser Asp Arg Gln Glu					
[0146]		370		375		380
[0147]	Ile Ala Glu Pro Ile Cys Ser Ala Leu Arg His Val Thr His Arg Asn					
[0148]	385		390		395	400
[0149]	Pro His Ala Asn Ser Ala Val Cys Glu Val Arg Thr Ser Asp Thr Leu					
[0150]		405		410		415
[0151]	Pro Thr Ile Ala Ser Leu Phe Leu Lys Tyr Gln Phe Val Ser Ala Leu					
[0152]		420		425		430
[0153]	Pro Leu Leu Lys Ser Val Val Gly Leu Val Arg Asn Leu Ser Thr Asp					
[0154]		435		440		445
[0155]	Glu Ile Thr Arg Pro Glu Leu Arg Asp Leu Asn Val Ser Lys Met Val					
[0156]		450		455		460
[0157]	Ala Asn Ile Phe Ile Gln Thr Phe Asn Ser Leu Asn Asp Ile Asn Lys					
[0158]	465		470		475	480
[0159]	Gln Gln Phe Asn Ile Glu Glu Gln Gln Cys Asn Asp Thr Leu Glu Gly					
[0160]		485		490		495
[0161]	Val Asn Leu Asp Asp Met Leu Glu Leu Thr Leu Ala Ala Leu Gln Ile					
[0162]		500		505		510
[0163]	Leu Ala Lys Asp Asn Thr Ile Gln Glu Glu Leu Ile His Thr Ala Gly					
[0164]		515		520		525
[0165]	Leu Ile Ser Ser Val Val Arg Leu Val Tyr Ser Pro Ser Glu Cys Leu					
[0166]		530		535		540
[0167]	Gln Arg Ala Ser Ser Ala Phe Leu Ser Gln Leu Ser Thr Ser Arg Ser					
[0168]	545		550		555	560
[0169]	Gly Ser Gln Ala Ile Glu Lys Glu Gly Val Cys Pro Arg Phe Thr Glu					
[0170]		565		570		575
[0171]	Leu Ile Gln Ser Asn Asn Glu Tyr Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Ile					
[0172]		580		585		590
[0173]	Leu Tyr Arg Ile Ala Gln Asp Lys Pro Glu Ser Tyr Arg Arg Arg Leu					
[0174]		595		600		605
[0175]	Ser Leu Glu Leu Arg Gln Ser Leu Phe Asp Gly Gly Leu Leu Asn Asp					
[0176]		610		615		620
[0177]	Pro Asn Glu Ile Leu Asp Pro Tyr Asn Ser Ser Pro Ser Lys Phe Ile					
[0178]	625		630		635	640

[0179] Asn Ser Thr Ser Leu Pro Asp Asp Ser Ser Pro His Ile Lys Asp Arg
 [0180] 645 650 655
 [0181] Arg Ser Arg His Leu Ser Glu Ser Asn Leu Arg Gln Arg Ser Asn
 [0182] 660 665 670
 [0183] <210>2
 [0184] <211>2354
 [0185] <212>DNA
 [0186] <213>Schistosoma japonicum
 [0187] <220>
 [0188] <221>CDS
 [0189] <222>(255).. (2270)
 [0190] <220>
 [0191] <221>mi_sc_feature
 [0192] <222>(1745).. (1745)
 [0193] <223>n is a, c, g, or t
 [0194] <400>2
 [0195] gacttttgaa ggtagtctgt aaacagtgt tatttcgaaa attcccgga gtaaataatg
 60
 [0196] tcacgttctt agttattttg tcttggcgtt cacaacatgt acagctaaaa atatgcaact
 120
 [0197] caaaaatgac cttcaaacct ataatcagaa cacagcaatc acggcactgt aaaccaggta
 180
 [0198] ttactaat ttttcaaagatt gtgtatat tctacactta attcattgga aaacatattt
 240
 [0199] tcaaagaatt tgta atg aaa aaa tac tca cat gta gtt gat tca caa aat 290
 [0200] Met Lys Lys Tyr Ser His Val Val Asp Ser Gln Asn
 [0201] 1 5 10
 [0202] tct aaa gaa ttt cag tac agt tta tct gtt aat tct tca aag tct gat 338
 [0203] Ser Lys Glu Phe Gln Tyr Ser Leu Ser Val Asn Ser Ser Lys Ser Asp
 [0204] 15 20 25
 [0205] tta tct aca cca aca ttt cat gag tgt ttt tct tca gtt gaa caa tta 386
 [0206] Leu Ser Thr Pro Thr Phe His Glu Cys Phe Ser Ser Val Glu Gln Leu
 [0207] 30 35 40
 [0208] tct gga ccg gta tct aaa ttg aat gag ata att caa gaa ctc att aac 434
 [0209] Ser Gly Pro Val Ser Lys Leu Asn Glu Ile Ile Gln Glu Leu Ile Asn
 [0210] 45 50 55 60
 [0211] tat aaa aat gat gct gaa ttt gca gct ttg act gct tca gat tta gct 482
 [0212] Tyr Lys Asn Asp Ala Glu Phe Ala Ala Leu Thr Ala Ser Asp Leu Ala
 [0213] 65 70 75

[0214]	aaa cgt ctt cat tct aac att tct act gat gaa ata ctt caa act atg	530
[0215]	Lys Arg Leu His Ser Asn Ile Ser Thr Asp Glu Ile Leu Gln Thr Met	
[0216]	80 85 90	
[0217]	tca tat att cat aaa ctt gca cgt tat caa gct gca cgt tat gga ttg	578
[0218]	Ser Tyr Ile His Lys Leu Ala Arg Tyr Gln Ala Ala Arg Tyr Gly Leu	
[0219]	95 100 105	
[0220]	gtg agt tgt cct gag ctt gtc caa gtt att att caa att cta caa aca	626
[0221]	Val Ser Cys Pro Glu Leu Val Gln Val Ile Ile Gln Ile Leu Gln Thr	
[0222]	110 115 120	
[0223]	act aaa gat act gat cta cag tca gaa gca gca tta aca ctt cag ttg	674
[0224]	Thr Lys Asp Thr Asp Leu Gln Ser Glu Ala Ala Leu Thr Leu Gln Leu	
[0225]	125 130 135 140	
[0226]	tta act aaa tca cta act ggt gct aaa ttg acc tgt gaa gaa atc ggt	722
[0227]	Leu Thr Lys Ser Leu Thr Gly Ala Lys Leu Thr Cys Glu Glu Ile Gly	
[0228]	145 150 155	
[0229]	atc tca aag tta gtt gat atg tta agg cat cca tca gaa gtg atg tat	770
[0230]	Ile Ser Lys Leu Val Asp Met Leu Arg His Pro Ser Glu Val Met Tyr	
[0231]	160 165 170	
[0232]	aca act gct ctc tat gta ttg aat caa tta tta tgg cat tta cca aat	818
[0233]	Thr Thr Ala Leu Tyr Val Leu Asn Gln Leu Leu Trp His Leu Pro Asn	
[0234]	175 180 185	
[0235]	tat gca cgt cca gaa ttc cga cga tat aat ggt caa tgg aat ctt att	866
[0236]	Tyr Ala Arg Pro Glu Phe Arg Arg Tyr Asn Gly Gln Trp Asn Leu Ile	
[0237]	190 195 200	
[0238]	tac tta ctc gaa gag aat cgt tta gat gac tca aat tgg tta tta ata	914
[0239]	Tyr Leu Leu Glu Glu Asn Arg Leu Asp Asp Ser Asn Trp Leu Leu Ile	
[0240]	205 210 215 220	
[0241]	tgt ttg gat aca tta cgt atg gca gtc tat gaa agc agt gaa aca aag	962
[0242]	Cys Leu Asp Thr Leu Arg Met Ala Val Tyr Glu Ser Ser Glu Thr Lys	
[0243]	225 230 235	
[0244]	tta tca ctt att tca acg aat att tat caa att att gta cat cta tta	1010
[0245]	Leu Ser Leu Ile Ser Thr Asn Ile Tyr Gln Ile Ile Val His Leu Leu	
[0246]	240 245 250	
[0247]	aga aca tat tca atc aat atg aaa att gct tat aat cta gca aga tta	1058
[0248]	Arg Thr Tyr Ser Ile Asn Met Lys Ile Ala Tyr Asn Leu Ala Arg Leu	
[0249]	255 260 265	
[0250]	att aaa gtt tta agt gta tgc aat gag aat aaa att aaa tta gtt gaa	1106
[0251]	Ile Lys Val Leu Ser Val Cys Asn Glu Asn Lys Ile Lys Leu Val Glu	
[0252]	270 275 280	

[0253]	ttt ggc act gta gaa gca tta aca cca tta ttg aat agt aac aat gaa	1154
[0254]	Phe Gly Thr Val Glu Ala Leu Thr Pro Leu Leu Asn Ser Asn Asn Glu	
[0255]	285 290 295 300	
[0256]	gta tta caa ttg gaa aca ctt tgg gga tta cgt aat ctt agt gat caa	1202
[0257]	Val Leu Gln Leu Glu Thr Leu Trp Gly Leu Arg Asn Leu Ser Asp Gln	
[0258]	305 310 315	
[0259]	gct tat cat tta ata gca aca aaa aat ctt ata cca ata tta att aat	1250
[0260]	Ala Tyr His Leu Ile Ala Thr Lys Asn Leu Ile Pro Ile Leu Ile Asn	
[0261]	320 325 330	
[0262]	tta ttg gct agt aaa aat gaa cat att tca ata tgt tca gct gga tgt	1298
[0263]	Leu Leu Ala Ser Lys Asn Glu His Ile Ser Ile Cys Ser Ala Gly Cys	
[0264]	335 340 345	
[0265]	tta tgt aat tta act tgt caa aat gta caa aat aaa agt tta ctt gtt	1346
[0266]	Leu Cys Asn Leu Thr Cys Gln Asn Val Gln Asn Lys Ser Leu Leu Val	
[0267]	350 355 360	
[0268]	gaa aaa ggt ggt gtt aaa gtt ctc tgt aga cta ttg tgt ttg aat tca	1394
[0269]	Glu Lys Gly Gly Val Lys Val Leu Cys Arg Leu Leu Cys Leu Asn Ser	
[0270]	365 370 375 380	
[0271]	gat cgt caa gag att gca gaa cca atc tgt tct gct tta cgt cat gta	1442
[0272]	Asp Arg Gln Glu Ile Ala Glu Pro Ile Cys Ser Ala Leu Arg His Val	
[0273]	385 390 395	
[0274]	act cat cgt aat cca cac gcg aat tca gct gtt tgt gaa gta cgt act	1490
[0275]	Thr His Arg Asn Pro His Ala Asn Ser Ala Val Cys Glu Val Arg Thr	
[0276]	400 405 410	
[0277]	agt gat act tta cca act att gca tca tta ttt tta aaa tat caa ttt	1538
[0278]	Ser Asp Thr Leu Pro Thr Ile Ala Ser Leu Phe Leu Lys Tyr Gln Phe	
[0279]	415 420 425	
[0280]	gta tcc gct tta cca tta ctg aaa tct gtt gtt ggt ctt gtt cga aat	1586
[0281]	Val Ser Ala Leu Pro Leu Leu Lys Ser Val Val Gly Leu Val Arg Asn	
[0282]	430 435 440	
[0283]	tta tcc act gat gaa ata aca cgt cct gaa ctt aga gat tta aat gta	1634
[0284]	Leu Ser Thr Asp Glu Ile Thr Arg Pro Glu Leu Arg Asp Leu Asn Val	
[0285]	445 450 455 460	
[0286]	tcc aag atg gta gct aat ata ttc ata caa aca ttc aat tca tta aat	1682
[0287]	Ser Lys Met Val Ala Asn Ile Phe Ile Gln Thr Phe Asn Ser Leu Asn	
[0288]	465 470 475	
[0289]	gat ata aat aaa caa caa ttc aat ata gaa gaa caa caa tgt aat gat	1730
[0290]	Asp Ile Asn Lys Gln Gln Phe Asn Ile Glu Glu Gln Gln Cys Asn Asp	
[0291]	480 485 490	

[0292] aca tta gaa ggt gtn aat ctt gac gat atg tta gag tta aca tta gct 1778
 [0293] Thr Leu Glu Gly Val Asn Leu Asp Asp Met Leu Glu Leu Thr Leu Ala
 [0294] 495 500 505
 [0295] gca tta caa att cta gca aaa gat aat act att caa gaa gaa tta ata 1826
 [0296] Ala Leu Gln Ile Leu Ala Lys Asp Asn Thr Ile Gln Glu Glu Leu Ile
 [0297] 510 515 520
 [0298] cat aca gct ggt tta att tca tca gtt gta cga tta gtt tat tca cca 1874
 [0299] His Thr Ala Gly Leu Ile Ser Ser Val Val Arg Leu Val Tyr Ser Pro
 [0300] 525 530 535 540
 [0301] tcg gaa tgt tta caa cgt gca tca tct gca ttt tta agt caa tta tca 1922
 [0302] Ser Glu Cys Leu Gln Arg Ala Ser Ser Ala Phe Leu Ser Gln Leu Ser
 [0303] 545 550 555
 [0304] act tca cgt tct gga tct caa gca att gaa aaa gaa gga gta tgt cct 1970
 [0305] Thr Ser Arg Ser Gly Ser Gln Ala Ile Glu Lys Glu Gly Val Cys Pro
 [0306] 560 565 570
 [0307] aga ttt act gaa ctt att caa tcg aat aat gaa tac att gct gcg tat 2018
 [0308] Arg Phe Thr Glu Leu Ile Gln Ser Asn Asn Glu Tyr Ile Ala Ala Tyr
 [0309] 575 580 585
 [0310] act gct gct atc ctg tat cgt att gca caa gat aaa cct gaa tcg tat 2066
 [0311] Thr Ala Ala Ile Leu Tyr Arg Ile Ala Gln Asp Lys Pro Glu Ser Tyr
 [0312] 590 595 600
 [0313] aga cgt cga cta tca tta gaa tta cgt caa tca ctt ttt gat gga gga 2114
 [0314] Arg Arg Arg Leu Ser Leu Glu Leu Arg Gln Ser Leu Phe Asp Gly Gly
 [0315] 605 610 615 620
 [0316] tta ctt aat gat cca aat gaa ata tta gat cca tac aat tca agt cca 2162
 [0317] Leu Leu Asn Asp Pro Asn Glu Ile Leu Asp Pro Tyr Asn Ser Ser Pro
 [0318] 625 630 635
 [0319] tca aaa ttt atc aat agt aca tca tta cca gat gat agt tca cca cat 2210
 [0320] Ser Lys Phe Ile Asn Ser Thr Ser Leu Pro Asp Asp Ser Ser Pro His
 [0321] 640 645 650
 [0322] att aaa gat cga cga tca aga cat tta tct gaa tct aat tta aga caa 2258
 [0323] Ile Lys Asp Arg Arg Ser Arg His Leu Ser Glu Ser Asn Leu Arg Gln
 [0324] 655 660 665
 [0325] cgt tca aat tag actgtaatag tattttgtat aattctctga ttaataacat
 2310
 [0326] Arg Ser Asn
 [0327] 670
 [0328] aattactaac ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
 2354

[0329]	<210>3	
[0330]	<211>25	
[0331]	<212>DNA	
[0332]	<213> 人工序列	
[0333]	<220>	
[0334]	<221>misc_feature	
[0335]	<222>(1)..(25)	
[0336]	<223> 引物	
[0337]	<400>3	
[0338]	caacttcacg ttctggatct caagc	25
[0339]	<210>4	
[0340]	<211>25	
[0341]	<212>DNA	
[0342]	<213> 人工序列	
[0343]	<220>	
[0344]	<221>misc_feature	
[0345]	<222>(1)..(25)	
[0346]	<223> 引物	
[0347]	<400>4	
[0348]	tgctgcgtat actgctgcta tcttg	25
[0349]	<210>5	
[0350]	<211>25	
[0351]	<212>DNA	
[0352]	<213> 人工序列	
[0353]	<220>	
[0354]	<221>misc_feature	
[0355]	<222>(1)..(25)	
[0356]	<223> 引物	
[0357]	<400>5	
[0358]	tcaggacgtg ttatttcacac agtgg	25
[0359]	<210>6	
[0360]	<211>25	
[0361]	<212>DNA	
[0362]	<213> 人工序列	
[0363]	<220>	
[0364]	<221>misc_feature	
[0365]	<222>(1)..(25)	
[0366]	<223> 引物	
[0367]	<400>6	

[0368]	gaccaacaac agatttcagt aatgg	25
[0369]	<210>7	
[0370]	<211>18	
[0371]	<212>DNA	
[0372]	<213> 人工序列	
[0373]	<220>	
[0374]	<221>misc_feature	
[0375]	<222>(1)..(18)	
[0376]	<223> 引物	
[0377]	<400>7	
[0378]	aaggcatcca tcagaagt	18
[0379]	<210>8	
[0380]	<211>23	
[0381]	<212>DNA	
[0382]	<213> 人工序列	
[0383]	<220>	
[0384]	<221>misc_feature	
[0385]	<222>(1)..(23)	
[0386]	<223> 引物	
[0387]	<400>8	
[0388]	actgctttca tagactgcca tac	23
[0389]	<210>9	
[0390]	<211>25	
[0391]	<212>DNA	
[0392]	<213> 人工序列	
[0393]	<220>	
[0394]	<221>misc_feature	
[0395]	<222>(1)..(25)	
[0396]	<223> 引物	
[0397]	<400>9	
[0398]	ttagttggtg gagcgatttg tctgg	25
[0399]	<210>10	
[0400]	<211>25	
[0401]	<212>DNA	
[0402]	<213> 人工序列	
[0403]	<220>	
[0404]	<221>misc_feature	
[0405]	<222>(1)..(25)	
[0406]	<223> 引物	

[0407]	<400>10	
[0408]	ctgttattgc tcaatttcgt gcgac	25
[0409]	<210>11	
[0410]	<211>30	
[0411]	<212>DNA	
[0412]	<213> 人工序列	
[0413]	<220>	
[0414]	<221>misc_feature	
[0415]	<222>(1).. (30)	
[0416]	<223> 引物	
[0417]	<220>	
[0418]	<221>misc_feature	
[0419]	<222>(3).. (8)	
[0420]	<223>BamH I 酶切位点	
[0421]	<400>11	
[0422]	gtggatccat gaaaaaatac tcacatgtag	30
[0423]	<210>12	
[0424]	<211>30	
[0425]	<212>DNA	
[0426]	<213> 人工序列	
[0427]	<220>	
[0428]	<221>misc_feature	
[0429]	<222>(1).. (30)	
[0430]	<223> 引物	
[0431]	<220>	
[0432]	<221>misc_feature	
[0433]	<222>(3).. (8)	
[0434]	<223>Xho I 酶切位点	
[0435]	<400>12	
[0436]	g t c t c g a g a t c a c t a a g a t t a c g t a a t c c c	30
[0437]	<210>13	
[0438]	<211>30	
[0439]	<212>DNA	
[0440]	<213> 人工序列	
[0441]	<220>	
[0442]	<221>misc_feature	
[0443]	<222>(1).. (30)	
[0444]	<223> 引物	

- [0445] <220>
- [0446] <221>misc_feature
- [0447] <222>(3)..(8)
- [0448] <223>BamH I 酶切位点
- [0449] <400>13
- [0450] g t g g a t c c a t g c g t g a a t g t a t t a g t g t a c
30
- [0451] <210>14
- [0452] <211>30
- [0453] <212>DNA
- [0454] <213>人工序列
- [0455] <220>
- [0456] <221>misc_feature
- [0457] <222>(1)..(30)
- [0458] <223>引物
- [0459] <220>
- [0460] <221>misc_feature
- [0461] <222>(3)..(8)
- [0462] <223>Xho I 酶切位点
- [0463] <400>14
- [0464] g t c t c g a g g t a c t c t t c t c c t t c c c c t t c a
30

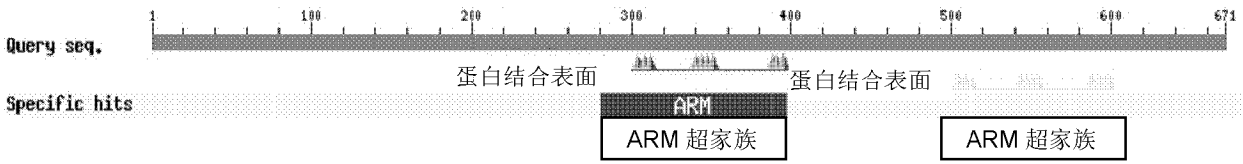


图 1

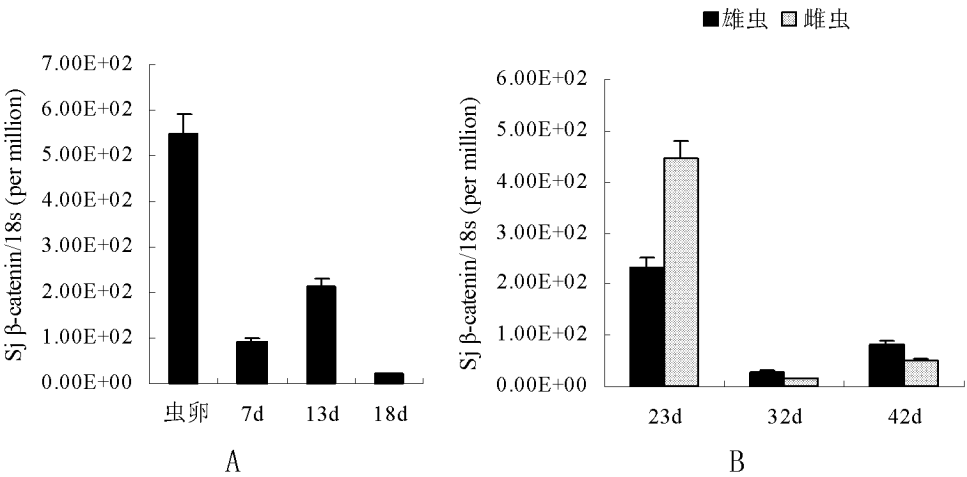


图 2

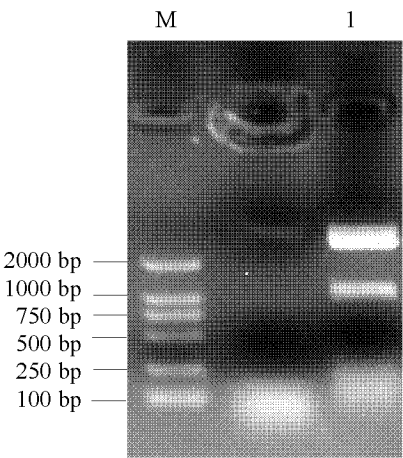


图 3

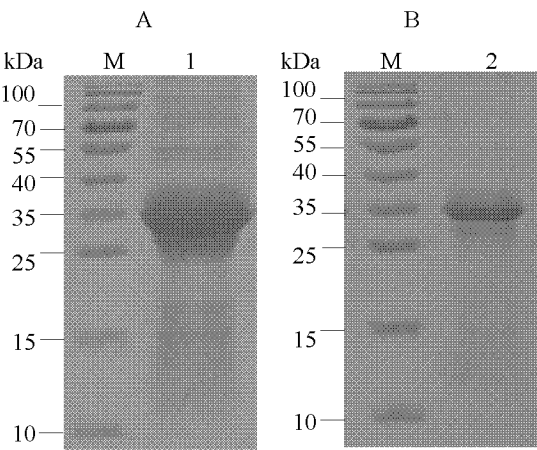


图 4

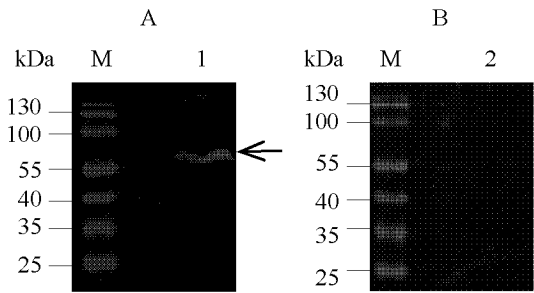


图 5

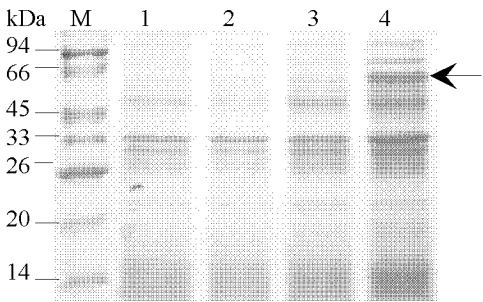


图 6

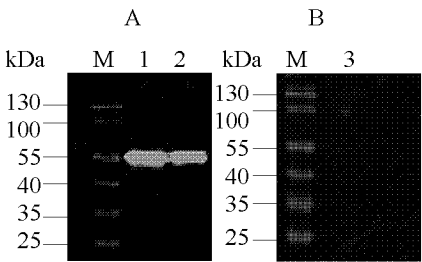


图 7

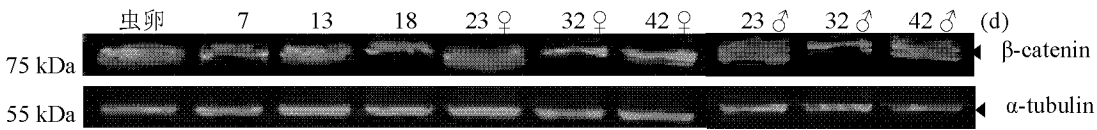


图 8

专利名称(译)	日本血吸虫 β -catenin基因、蛋白及用途		
公开(公告)号	CN101892240B	公开(公告)日	2012-05-02
申请号	CN201010239053.0	申请日	2010-07-28
[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	苑纯秀 李红飞 王孝波 冯新港 杨健美 林矫矫		
发明人	苑纯秀 李红飞 王孝波 冯新港 杨健美 林矫矫		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/435 C07K16/18 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/53 A61K48/00 A61K38/17 A61P33/12		
CPC分类号	Y02A50/423		
审查员(译)	吕健		
其他公开文献	CN101892240A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种日本血吸虫基因，所述基因具有编码 β -catenin蛋白的核苷酸序列，该核苷酸序列包含：编码SEQ ID NO.1氨基酸序列的DNA序列，或编码SEQ ID NO.1所示氨基酸序列中缺失、添加、插入或取代一个或多个氨基酸所得到的具有SEQ ID NO.1相同活性的氨基酸序列的DNA序列。本发明还公开了上述基因编码的蛋白质。本发明的日本血吸虫 β -catenin基因和蛋白，参与调控血吸虫的器官分化、虫卵的形成及卵胚发育等过程，对开发控制血吸虫生长发育的新药具有很高的应用价值。

