

弓形虫 PRU 株 BSR4 基因的体外扩增及生物信息学分析

郭 凯 陈兴智 焦玉萌 夏 惠 方 强 王雪梅

[摘要]目的:克隆弓形虫 *Prugnialud*(PRU) 株表面抗原 BSR4 基因,并进行序列测定和生物信息学分析。方法:根据 BSR4 基因已知序列(ME49 株)设计合成一对引物,应用 PCR 技术从弓形虫 PRU 株基因组 DNA 中扩增 BSR4 基因,克隆入 pET28a(+)载体并进行序列测定。用生物信息学方法对 BSR4 的理化性质、结构和功能进行预测。结果:得到弓形虫 PRU 株 BSR4 基因片段,测序结果表明,获得 BSR4 基因片段约 1 194 bp,编码 398 个氨基酸。同源性分析显示,弓形虫 PRU 株和 ME49 株基因序列同源性为 100%,BSR4 相对分子量为 42 344.75,有 2 个功能结构域,氨基酸序列的前 40 位为信号肽序列。N 端为信号肽,C 端为疏水序列,预测它为糖基磷脂酰肌醇固着蛋白,存在 18 个潜在抗原表位及 2 个保守功能区域。结论:成功获得弓形虫 PRU 株 BSR4 基因序列。

[关键词] 弓形虫; BSR4 基因; 体外扩增; 生物信息学分析

[中国图书资料分类法分类号] R 382.5 [文献标识码] A

Amplification and bioinformatics analysis of *Toxoplasma gondii* BSR4 gene

GUO Kai ,CHEN Xing-zhi ,JIAO Yu-meng ,XIA Hui ,FANG Qiang ,WANG Xue-mei

(Department of Pathogen Biology ,Bengbu Medical College ,Bengbu Anhui 233030 ,China)

[Abstract] Objective: To clone and identify the surface antigen BSR4 of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) PRU strain ,to match the homology of BSR4 among *T. gondii* PRU and ME49 strains and to analyze the feature by bioinformatics. Methods: DNA of strain PRU of *T. gondii* was extracted ,and a pair of specific primers were designed from sequence of *T. gondii* ME49 bradyzoite surface antigen BSR4 and used to amplify the BSR4 of *T. gondii* PRU strain by PCR ,then cloned into vector pET28a(+) and sequencing. Predict the physical and chemical nature ,structure and function of BSR4. Results: The target gene was amplified by PCR. The sequencing result showed that the fragment was 1 194 bp which encoded 398 amino acid. The deduce amino acid sequence of PRU strain BSR4 gene showed a 100% homology with that of ME49 strain. The predicted BSR4 protein molecular weight is 42 344.75 Dalton which can form two functional domains with a signal peptide location before 40 amino acids. The N-terminal of BSR4 was a signal peptide and the C-terminal was a hydrophobic region which suggested it was a GPI-anchored surface protein. There were 18 potential antigenic epitopes and 2 conserved domains in BSR4. Conclusions: The sequence of bradyzoite-specific antigen BSR4 from *T. gondii* PRU strain was successfully cloned.

[Key words] *Toxoplasma gondii*; BSR4 Gene; amplification in vitro; bioinformatics analysis

弓形虫是一种广泛存在于人体和动物体内的能引起人兽共患疾病的原虫,呈世界性分布。其临床症状复杂,感染率高,流行广泛,对人和畜牧业造成严重的威胁。弓形虫只有一个种,但根据不同地域,不同宿主、不同毒力、生活史及其发育时间不同等,将其分为许多不同的虫株。Prugnialud (PRU) 株和 ME49 株为弱毒株, RH 株为强毒株。

弓形虫存在多种表面抗原(SAG),其可被宿主免疫系统所识别,而成为杀伤虫体的主要部位^[1],

其中缓殖子表面抗原 BSR4 是 SAG1 超家族成员之一,被认为是速殖子与缓殖子转化早期的标志,可能在转化机制中起重要作用^[1-3]。弓形虫是一种机会性致病原虫,大多数免疫功能正常者感染弓形虫后无明显症状,因此作为缓殖子期特异抗原的 BSR4,更适合作为慢性感染的研究对象。

本文根据弓形虫 ME49 株 BSR4 基因序列设计并合成了一对引物,采用 PCR 技术从弓形虫 PRU 株基因组 DNA 中扩增编码 BSR4 基因片段,比较不同虫株 BSR4 编码序列的同源性,并对其进行序列测定及生物信息学分析,为下一步通过基因工程进行表达做准备,进一步将其应用于免疫诊断打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料 弓形虫 PRU 株,为本实验室保种传代。实验动物为同系昆明种小鼠(雌雄各半),体重 18 ~

[收稿日期] 2010-12-13

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2004kj287zc),安徽省教育厅优秀青年科研资助项目(2004jq174)

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室,感染与免疫安徽省重点实验室,安徽蚌埠 233030

[作者简介] 郭凯(1983-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 陈兴智,硕士研究生导师,副教授,E-mail: chenxingzhi@sohu.com.

22 g, 购自本校实验动物中心。菌株与质粒: 大肠埃希菌 DH5 α 株, pET28a(+) 质粒为本实验室保存。主要试剂: 基因组提取试剂盒为 BIOMIGA 公司产品; 限制性内切酶及 PCR Master Mix(2 \times) 为 MBI 公司产品; 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒均为上海生工产品; 其余均为国产分析纯。测序由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 弓形虫 PRU 株基因组 DNA 的提取

昆明种小鼠经弓形虫 PRU 株感染 6 周后, 以颈椎脱臼法处死, 参照基因组提取试剂盒说明书进行基因组 DNA 的提取。

1.2.2 PCR 引物设计与合成

用 Primer Premier5 软件参考 GenBank 登录的弓形虫 ME49 株 BSR4 mRNA 序列(基因序列登陆号 XM_002369844), 设计所需的引物。上游引物 F: 5'-TAT ACC ATG GTG ATG ATG GGC AGC ATG CAG CAA C-3', 下游引物 R: 5'-CGA CAA GCT TCC AAC CTA CTC CCA AGG AAC TAA C-3'。在上、下游引物中分布加入 *Nco*I 和 *Hind* III 酶切位点(划线处), 理论扩增片段大小为 1 194 bp, 由上海生工生物工程技术有限公司合成并纯化。

1.2.3 PCR 扩增 BSR4 基因

以弓形虫 PRU 株基因组 DNA 为模板, 用 PCR Master Mix(2 \times) 按照常规 PCR 条件进行扩增, 反应体系为 25 μ l。反应参数如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 65 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 35 个循环, 最后一个循环结束后于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.4 目的基因 BSR4 的回收与连接

PCR 产物用胶回收试剂盒回收纯化后, 将目的基因用 *Nco*I 和 *Hind* III 双酶切后与同样进行双酶切后的 pET28a(+) 载体进行连接, 以连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α 铺板于 LB/Kan 固体培养基表面, 培养 12 ~ 16 h, 挑取数个菌落, 进行菌落 PCR 初步筛选, 取阳性菌落于 3 ml LB 培养液中, 于 37 $^{\circ}$ C 以 200 r/min 培养过夜, 用质粒提取试剂盒提取质粒, 进行 *Nco*I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 将鉴定正确的重组质粒送公司测序。

1.2.5 目的基因的序列测定和结构分析

通过 NCBI 网站 BLAST 工具([DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome\) 对已获得的弓形虫 PRU 株 BSR4 基因与弓形虫 ME49 株 BSR4 基因进行序列对比, 通过 DNASTAR 软件分析其等电点、分子量及抗原表位; 通过蛋白质分析专家 ExPASy 网站的 ProtScale 程序\(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>\) 分析弓形虫 PRU 株 BSR4 基因编码氨基酸的亲水性、疏水性; ProtParam 程序\(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>\) 分析物化参数; MotifScan 程序\(\[http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan\]\(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan\)\) 分析结构域; Swiss Model 程序\(<http://swissmodel.expasy.org/repository/>\) 对蛋白质 3D 结构进行预测; PredictProtein\(<https://www.predictprotein.org/submit>\) 分析跨膜区; NPS 的 SOPMA 服务器\(\[http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html\]\(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html\)\) 预测二级结构; SignalP 预测信号肽切割位点; big-PI Predictor\(\[http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html\]\(http://mendel.imp.ac.at/sat/gpi/gpi_server.html\)\) 预测 GPI 位点; 利用 NCBI 的 CDD 程序\(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>\) 和 EBI 的 InterProScan 程序\(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>\) 预测氨基酸序列中的保守结构域和功能域。](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_</p>
</div>
<div data-bbox=)

2 结果

2.1 弓形虫 PRU 株 BSR4 基因的扩增

以弓形虫 PRU 株基因组 DNA 为模板, 自行设计的引物 F、R 体外扩增 BSR4 基因, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示, 扩增条带位于 DNA 标准分子质量为 1 000 bp 条带之上, 与理论预测值 1 194 bp 相近(见图 1)。

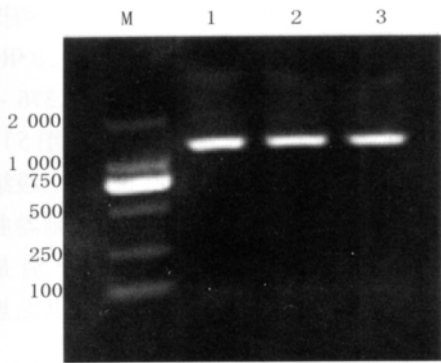
2.2 pET28a(+)-BSR4 重组质粒的构建及鉴定

重组质粒经菌落 PCR 鉴定, 阳性重组克隆能扩增出 1 200 左右的目的片段(见图 2); 用 *Nco*I 和 *Hind* III 双酶切后可见 1 200 bp 左右及空质粒 5 300 bp 左右的条带, 证明 BSR4 基因序列已成功克隆入 pET28a(+) 载体(见图 3)。

2.3 测序结果及序列对比

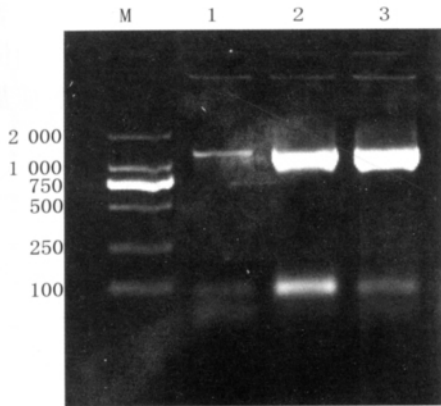
重组质粒经南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 结果表明 BSR4 基因已经连接入 pET28a(+) 质粒载体中, 且读码框架正确; 被测序序列包含了一段从 ATG 到 TGA 前一个密码子的整个开放阅读框架, 此序列两端分别是 *Nco*I 和 *Hind* III 的酶切位点, 与预期相吻合, 且在 N 末端包含了一个六组氨酸序列便于后续的蛋白纯化。经 NCBI 上的 BLAST 工具分析, 与刚地弓形虫 ME49 株 BSR4 基因的同源性为 100%, 所扩增序列位于

BSR4 基因组 DNA 序列的 109 ~ 1 302 位,共 1 194 个碱基(见图 4)。



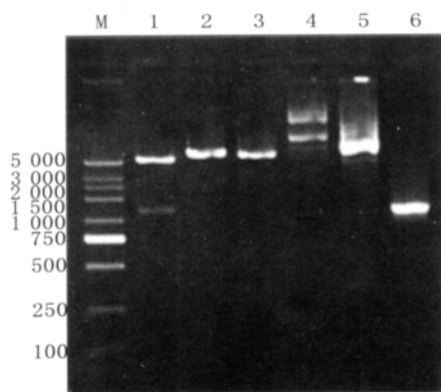
M:DNA分子量标准(DL2000);1、2、3:BSR4基因PCR产物(约1 200 bp)

图1 BSR4基因的PCR扩增产物



M:DNA分子量标准(DL2000);1:BSR4PCR扩增产物;2、3:pET28a(+)-BSR4重组质粒PCR扩增产物

图2 pET28a(+)-BSR4重组质粒PCR鉴定



M:DNA分子量标准(DL5000);1:pET28a(+)-BSR4的NcoI和HindIII双酶切;2:pET28a(+)-BSR4的NcoI单酶切;3:pET28a(+)-BSR4的HindIII单酶切;4:pET28a(+)-BSR4重组质粒;5:pET28a(+)空质粒;6:BSR4纯化产物

图3 pET28a(+)-BSR4重组质粒双酶切鉴定

Query	70	CCAACCTACTCCCAAGGAACTAACAATGAACCCCGTCACGGCGCCGCGCTAGAGGCTGC	129
Sbjct	1302	CCAACCTACTCCCAAGGAACTAACAATGAACCCCGTCACGGCGCCGCGCTAGAGGCTGC	1243
Query	130	AGCCAAAGATTGACACAGTTGGTGATGCGTGGGAAGCAGAGCTCGCGGCTTTGACAGTTAC	189
Sbjct	1242	AGCCAAAGATTGACACAGTTGGTGATGCGTGGGAAGCAGAGCTCGCGGCTTTGACAGTTAC	1183
Query	190	CAGCACAGTGCAACTCGTTGGCGCGCCGGTCTCTGTTCACCTTTCCCTTATCTTTCTTGGG	249
Sbjct	1182	CAGCACAGTGCAACTCGTTGGCGCGCCGGTCTCTGTTCACCTTTCCCTTATCTTTCTTGGG	1123
Query	250	GTCCTCAGGAGCAGTCTTCTTGGGGACGCAGCCACAAGGAACAGCTGGTCCGCTCGGG	309
Sbjct	1122	GTCCTCAGGAGCAGTCTTCTTGGGGACGCAGCCACAAGGAACAGCTGGTCCGCTCGGG	1063
Query	310	AAGGTCGCTCGGGGAATAGTCAGCGTAGCTGAACTCCGTTTCTGGGTCTCTGTACCCCA	369
Sbjct	1062	AAGGTCGCTCGGGGAATAGTCAGCGTAGCTGAACTCCGTTTCTGGGTCTCTGTACCCCA	1003
Query	370	CCAGCTCTTCAGGAAGTTGGGAAAATCTCTACAAACCTCGTTGTGCAACATCTGTTCAC	429
Sbjct	1002	CCAGCTCTTCAGGAAGTTGGGAAAATCTCTACAAACCTCGTTGTGCAACATCTGTTCAC	943
Query	430	GTCTTTACTGTCTGCGACGCAGTACTCTTCTGCGTATGTCGTCGGCTGGAGAGAACCCTC	489
Sbjct	942	GTCTTTACTGTCTGCGACGCAGTACTCTTCTGCGTATGTCGTCGGCTGGAGAGAACCCTC	883
Query	490	GCTGCCGAGTTAATGGTCAAGTGTGTTTTCTCCGTTGACATCTCCACCCTCCACGGGATT	549
Sbjct	882	GCTGCCGAGTTAATGGTCAAGTGTGTTTTCTCCGTTGACATCTCCACCCTCCACGGGATT	823
Query	550	CGGATTGCTGCCCTTTGCCGTATGCGCAGGTCACAACGTTATTTTCTGCAAGAGAAGAAGC	609
Sbjct	822	CGGATTGCTGCCCTTTGCCGTATGCGCAGGTCACAACGTTATTTTCTGCAAGAGAAGAAGC	763
Query	610	CCTCGCTTCCACATTCACCGTGAAGTTTGCAGGCGAGCCGTTTGGCCGATTCTGTACCTCT	669
Sbjct	762	CCTCGCTTCCACATTCACCGTGAAGTTTGCAGGCGAGCCGTTTGGCCGATTCTGTACCTCT	703
Query	670	GGCAGCGGAAGTGGCTTGACAACCGACGACGAACGCGCTTGTGAGTTAAAGGAAGGCTTTC	729
Sbjct	702	GGCAGCGGAAGTGGCTTGACAACCGACGACGAACGCGCTTGTGAGTTAAAGGAAGGCTTTC	643
Query	730	GTTATGCAGCTCCAACGACCACCTTTTGGACTGTGTGCTCTCTCTCTCTGTTGCTTAC	789
Sbjct	642	GTTATGCAGCTCCAACGACCACCTTTTGGACTGTGTGCTCTCTCTCTCTGTTGCTTAC	583
Query	790	TTTCCAAATTAACAATGCGGCTCTGTTTCAAGTAAAGCTTTTCAAGCGTTACTTCTGTGCTGC	849
Sbjct	582	TTTCCAAATTAACAATGCGGCTCTGTTTCAAGTAAAGCTTTTCAAGCGTTACTTCTGTGCTGC	523
Query	850	CGAGCCGTTTGGCCCAACTGGCACACCCTTCCATTGTTGCTTCTTGGGATCGCACAC	909
Sbjct	522	CGAGCCGTTTGGCCCAACTGGCACACCCTTCCATTGTTGCTTCTTGGGATCGCACAC	463
Query	910	GTTCGCTCAATATTAGTCGGTATCGTAGATATGCTCAGTGCCTGCGTAGCAGAATTC	969
Sbjct	462	GTTCGCTCAATATTAGTCGGTATCGTAGATATGCTCAGTGCCTGCGTAGCAGAATTC	403
Query	970	AAAAGTGGCCGTCATCCTTCTTTGGACAACGTCAGCTGCCCCTAACTgggggggAATC	1029
Sbjct	402	AAAAGTGGCCGTCATCCTTCTTTGGACAACGTCAGCTGCCCCTAACTGGGGGGGAATC	343
Query	1030	TTGTGTGGCTGGCGTAAAGAAATCACACTTCGATCTGAACCCGCTACGGTTAGCCTTGA	1089
Sbjct	342	TTGTGTGGCTGGCGTAAAGAAATCACACTTCGATCTGAACCCGCTACGGTTAGCCTTGA	283
Query	1090	AGTCACCTCCACTTGTGTGCTGCAAAGTCCGATGCAAGGAGTCCCTCAAGAGATTATCAGC	1149
Sbjct	282	AGTCACCTCCACTTGTGTGCTGCAAAGTCCGATGCAAGGAGTCCCTCAAGAGATTATCAGC	223
Query	1150	AACAGCCTGTCCGCTAGAGAAAAACAACTCCGCTCATGCAAACTGCCCAACAATGTGC	1209
Sbjct	222	AACAGCCTGTCCGCTAGAGAAAAACAACTCCGCTCATGCAAACTGCCCAACAATGTGC	163
Query	1210	AGCATTGGACCTTAAACCCCGCGCGGTTGCTGATGCTGCCATCATCACCAT	1263
Sbjct	162	AGCATTGGACCTTAAACCCCGCGCGGTTGCTGATGCTGCCATCATCACCAT	109

图4 pET28a(+)-BSR4 BLAST比对结果

2.4 扩增序列的生物信息学分析结果

2.4.1 物理化学特性分析 通过 DNASTAR 软件分析,该序列全长 1 194 bp,编码 398 个氨基酸,理论等电点为 5.65,相对分子量为 42 344.75,其中含 37 个强碱性氨基酸(K,R),41 个强酸性氨基酸(D,

E),129 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,V),138 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y),97 个带电荷氨基酸(R,K,H,Y,C,D,E)。其氨基酸序列如下: MVM MGS MQQ RRG GLR SNA RQL LAV CMS GVV FFS SGQ AVA DNL LEG LLH RTL QQQ VEV TSR LTV

AGS DAK CDF FTP ATQ DSP PVS GSL TLS KGR
 MTA TFE CSA TQA LSI STI PTN IEQ NVC DPK KTT
 NGT VCQ FGA NGS AGT EVT LKD LLE TDR IVN
 WKV NEQ REE SNK SQK WSL ELH NED LPL TDK
 AFV VGC QAT SAA RGT ESG KTA ACK LTV NVE
 ARA SSL AEN NVV TCA YGK GSN PNP VEV EMS
 TEK NTL TIN CGS DGS LQP TTY AEE YCV ADS
 KDV NRC STT RFV EIF PKF LKS WWV TET QKR
 TSA TLT IPQ TDL PEA DQQ FLV GCV PKK TAP
 EDP KKD KES GTE TGA PTS CTV LVT VKA ASS
 ASH ASP TVQ ILA AAS SAA AVT GFI VSS LG
 VGW。

通过 protparam 分析 BSR4 的物化参数 ,其在哺乳动物、酵母、大肠埃希菌的半衰期分别为 30 h(体内)、>20 h(体内)、>10 h(体内) ,不稳定指数为 40.08 ,脂溶性指数为 73.27 ,亲水性指数为

-0.247。

2.4.2 氨基酸序列的跨膜区、二级结构的预测和折叠类型预测 根据 PredictProtein 的预测结果 ,BSR4 具有 2 个跨膜区域 ,分别位于第 23 ~ 33aa、376 ~ 393aa ,可能是表面膜蛋白 ,其 N 端在膜内(见图 5) 。NPS 的 SOPMA 服务器同源比对发现 ,BSR4 二级结构(见图 6) 由 α -螺旋(h)、 β -折叠(e)、无规则卷曲(c)和 β -转角(t)组成 ,其组成比分别是 26.38%:24.62%:41.21%:77% ,二级结构以无规则卷曲为主。

2.4.3 信号肽预测与糖基磷脂酰肌醇固着位点预测 利用 Signalp3.0 对 BSR4 信号肽预测的结果见图 7。两种算法(NN 和 HMM)显示其编码的氨基酸序列的前 40 个氨基酸为信号肽序列 ,信号肽切割位点在 39 ~ 40 位。big-PI Predictor 预测 GPI 转酰胺基酶切割位点位于 Ala380 ~ Ser381。



图5 BSR4编码氨基酸的跨膜区域

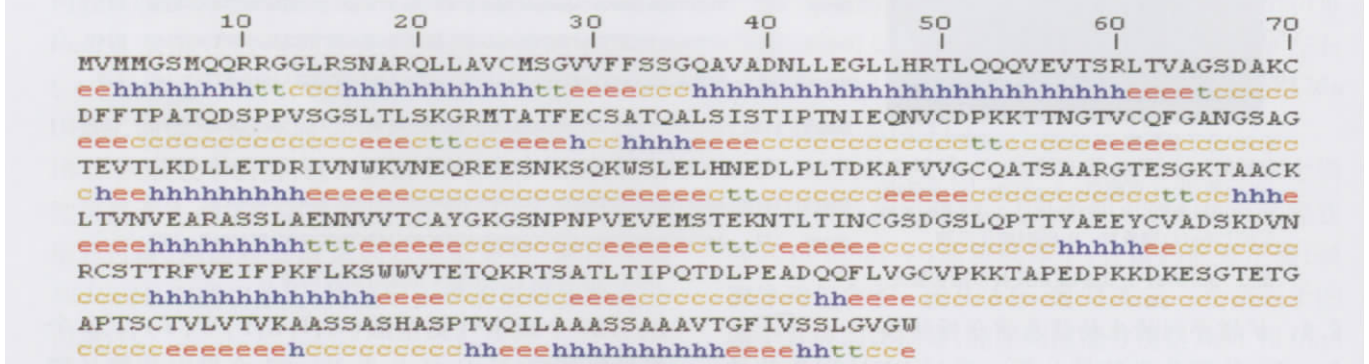


图6 BSR4二级结构预测

2.4.4 亲水性预测 根据 protscale 预测结果(分值越高 ,亲水性越强 ,分值越低 ,疏水性越强) ,由图 8

可见 BSR4 氨基酸序列的第 7 ~ 19、37、40 ~ 41、52 ~ 53、56 ~ 58、60、63 ~ 71、79 ~ 83、89 ~ 95、97、117 ~

127、138 ~ 140、142 ~ 157、159 ~ 172、175 ~ 179、181 ~ 184、195 ~ 208、214 ~ 222、235 ~ 252、257、259 ~ 262、266

~ 267、271 ~ 285、289、293、302 ~ 309、316 ~ 321、323 ~ 324、331 ~ 352、364 ~ 366 位为高亲水区域。

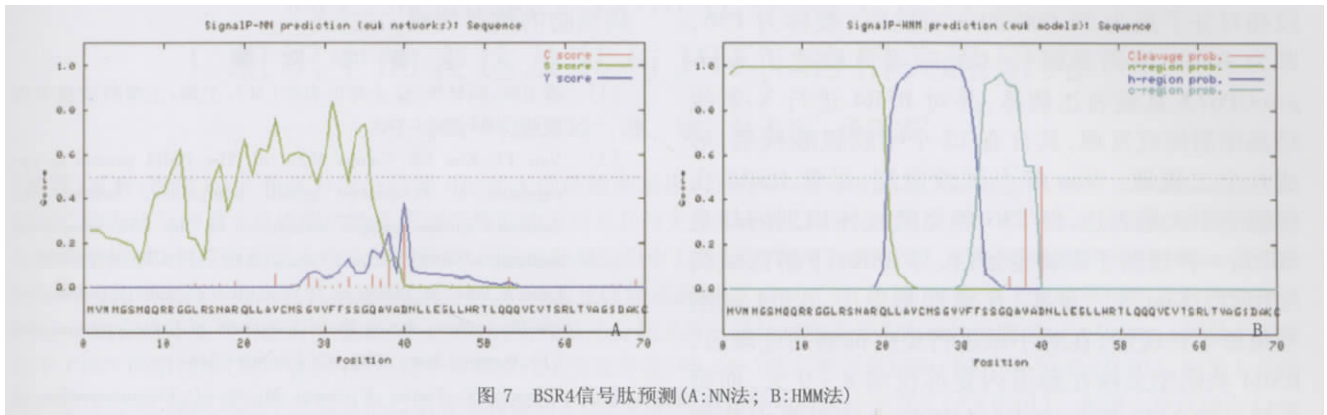


图 7 BSR4信号肽预测 (A:NN法; B:HMM法)

2.4.5 NCBI 的 CDD 和 InterProScan 预测氨基酸序列中的保守结构域和功能域 BSR4 有 2 个保守结构域,分别位于其氨基酸序列的 64 ~ 215 位及 224 ~ 361 位。对搜索结果进行总结,推测 BSR4 可能有 2 个氨基酸功能区,位于 66 ~ 218 位及 221 ~ 364 位。

2.4.6 结构域的预测 采用 ExPASy 中的 Motifscan 程序分析,第 58 ~ 60、144 ~ 146、151 ~ 153、166 ~ 171、184 ~ 186、203 ~ 205、247 ~ 249、284 ~ 286、303 ~ 305、360 ~ 362 位可能为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (CK2 _ PHOSPHO _ SITE Casein kinase II phosphorylation site); 第 127 ~ 130、136 ~ 139、167 ~ 170 位可能为 N-糖基化位点 (ASN _ GLYCOSYLATION *N-glycosylation site*); 第 12 ~ 17、35 ~ 40、134 ~ 145、191 ~ 196、200 ~ 205、257 ~ 262、346 ~ 351 位可能为 N-豆蔻酰化位点 (MYRISTYL N-

myristoylation site); 123 ~ 126、305 ~ 308 位可能为 cAMP 和 cGMP 依赖性的蛋白激酶磷酸化位点 (cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site); 第 58 ~ 60、144 ~ 146、151 ~ 153、166 ~ 171、184 ~ 186、203 ~ 205、247 ~ 249、284 ~ 286、303 ~ 305、360 ~ 362 位可能为蛋白激酶 C 磷酸化位点 (PKC _ PHOSPHO _ SITE Protein kinase C phosphorylation site)。

2.4.7 抗原表位的预测 通过 DNASTAR 对 BSR4 进行抗原表位的预测,结果显示 BSR4 有 18 个抗原肽段,分别在 34 ~ 38、41 ~ 43、55 ~ 59、65 ~ 70、75 ~ 84、89 ~ 96、113 ~ 127、134 ~ 172、176 ~ 185、196 ~ 208、215 ~ 223、233 ~ 251、256 ~ 268、271 ~ 286、293 ~ 308、316 ~ 323、330 ~ 354、363 ~ 372 位。

2.4.8 BSR4 蛋白质 3D 结构预测 利用 Swiss model server 对蛋白质 3D 结构进行预测,结果见图 9。

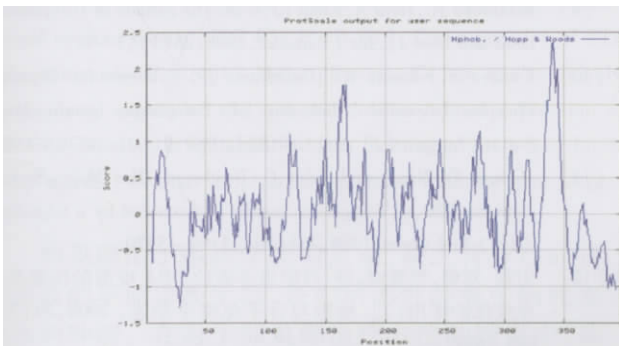


图 8 BSR4高亲水区域预测

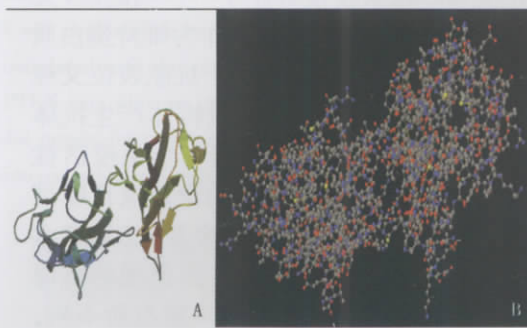


图 9 BSR4蛋白质3D结构预测图 (A:箭头模式; B:球棍模式)

3 讨论

BSR4 隶属于弓形虫主要表面抗原相关序列 (SRS) 超家族,是一种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 固着

蛋白,由 SAG 基因家族编码,仅在缓殖子表面特异性表达^[2]。弓形虫表面抗原对弓形虫与宿主细胞的相互作用以及宿主对虫体产生的免疫反应都有重要的影响。

目前,国内对 BSR4 基因的研究尚无报道, Tomavo 等^[4]首先从单克隆抗体(T8 4A12)识别出一段相对分子量为 36 000 的表面抗原(被称为 P36,即为 BSR4 编码基因)。Grujic 等^[5]构建了 bsr4-pAcGP67A 真核表达载体,并对 BSR4 进行 X-射线结晶衍射研究发现,其含有 12 个半胱氨酸残基,形成 6 个二硫键。Van 等^[2]试验发现,尽管 BSR4 在缓殖子中大量表达,但 P36 单克隆抗体识别的却是 SRS9,一种缓殖子期特定蛋白,与 BSR4 下游区域高度相似。Kim 等^[6]证实,在慢性感染中,BSR4 缺陷型虫株生长缓慢,在对小鼠进行免疫抑制剂处理后,BSR4 缺陷型虫株在肠道内复苏仅需 8~9 天,而野生株却需 2 周,提示 BSR4 在维持虫体生长中的重要性。P36 是编码缓殖子特异性表面抗原 BSR4 的基因,P36 转录的 mRNA 在速殖子和缓殖子具有同等水平,但 BSR4 却只在缓殖子表达,而在速殖子向缓殖子转换过程中,最先出现的缓殖子表面特异性抗原也是 BSR4,表明 BSR4 的表达调控是在转录后^[7]推测 BSR4 在速殖子转化为缓殖子的过程中起主要作用,但其具体机制还未阐明。

本研究应从 PRU 株基因组中克隆了 BSR4 基因并对比了 PRU、ME49 株弓形虫中基因的同源性。对比发现,2 株 BSR4 基因序列同源性为 100%,证明表面抗原 BSR4 在弓形虫 2 种弱毒株之间高度保守。

通过生物信息学预测,分析了弓形虫 PRU 株 BSR4 基因编码蛋白质的功能与性质,此蛋白有一个 N-末端信号肽位点及 C 端 GPI 位点,与已有研究的 SAG 超家族及 SRS 超家族相吻合^[8-11]。功能区(无规则卷曲和 β -转角)占到 48.91%,作为维持蛋白质空间构象的 α -螺旋占到了 26.38%。抗原表位又称抗原决定簇,是指抗原分子上能刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的一个免疫活性区,对其预测有助于新型疫苗分子的设计及诊断试剂的开发。经 DNASTAR 应用不同的方法(如亲水性、表面可及性、柔韧性、二级结构)所预测的抗原表位的数目和可能出现肽段的位点可能有所不同,但第 55-59、67-70、75-84、89-96、113-127、136-145、196-207、215-223、233-251、257-268、295-308、316-323、332-353、366-372 位点附近显示多种预测方法结果基本一致,且抗原指数较高。BSR4 的抗原表位很可能就在这些位点附近。

目前,抗原表位已应用到弓形虫疫苗的研究^[12-13]。开发新的、多种抗原表位联合疫苗,将是今后弓形虫病预防的热点领域。

[参 考 文 献]

- [1] 潘卫庆,汤林华.分子寄生虫学[M].上海:上海科学技术出版社,2004:150-175.
- [2] Van TT, Kim SK, Camps M, et al. The BSR4 protein is up-regulated in *Toxoplasma gondii* bradyzoites, however the dominant surface antigen recognised by the P36 monoclonal antibody is SRS9[J]. Int J Parasit 2007, 37(8/9): 877-885.
- [3] Lane A, Soete M, Dubremet JF. *Toxoplasma gondii*: appearance of specific markers during the development of tissue cysts in vitro[J]. Parasitol Res, 1996, 82(4): 340-346.
- [4] Tomavo T, Fortier F, Soete M, et al. Characterization of Bradyzoite-Specific Antigens of *Toxoplasma gondii* [J]. IAI, 1991, 59(10): 3750-3753.
- [5] Grujic O, Grigg HE, Boulanger MJ. Insect-cell expression, crystallization and X-ray data collection of the bradyzoite-specific antigen BSR4 from *Toxoplasma gondii* [J]. Acta Cryst, 2008, 64(Pt 5): 425-427.
- [6] Kim SK, Karasov A, Boothroyd JC. Bradyzoite-Specific Surface Antigen SRS9 Plays a Role in Maintaining *Toxoplasma gondii* Persistence in the Brain and in Host Control of Parasite Replication in the Intestine [J]. Infect Immun, 2007, 75(4): 1626-1634.
- [7] Knoll LJ, Boothroyd JC. Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(2): 807-814.
- [8] He XL, Grigg ME, Boothroyd JC, et al. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily [J]. Nature Struct Biol, 2002, 9(8): 606-611.
- [9] Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, et al. The surface of *Toxoplasma*: more and less [J]. Int J Parasitol, 1998, 28(1): 3-9.
- [10] Tomavo S, Schwarz RT, Dubremetz JP. Evidence for Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchoring of *Toxoplasma gondii* Major Surface Antigens [J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(10): 4576-4580.
- [11] Susana D, Nagel and John C. Boothroyd. The Major Surface Antigen P30 of *Toxoplasma gondii* Is Anchored by a Glycolipid [J]. J Biol Chem, 1989, 264(10): 5569-5570.
- [12] 史霖,刘珊,程雁斌,等.弓形虫多表位 DNA 疫苗的构建及其免疫保护作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(7): 689-691.
- [13] 谭逵,张琼,范久波,等.弓形虫新基因 wx2 表位疫苗免疫小鼠的保护研究[J].生物化学与生物物理进展,2008,35(9): 1051-1058.

(本文编辑 姚仁斌)