

[文章编号] 1005-6661(2009)03-0235-03

· 综述 ·

光滑双脐螺基因组计划研究进展

刘琴(综述), 周晓农(审校)

[摘要] 本文介绍了光滑双脐螺基因组计划的最新研究进展, 包括基因组测序、新基因的发现、基因差异表达以及类纤维素蛋白原研究等方面, 为理解螺类生物学、综合鉴定水生螺类发育阶段的基因表达、螺和寄生虫共进化机制及自然选择机制、鉴定灭螺药物靶点提供了理论依据, 同时也为湖北钉螺的研究提供了科学参考。

[关键词] 光滑双脐螺; 基因组计划; 差异表达基因; 类纤维素蛋白原基因

[中图分类号] R383.24 [文献标识码] A

Progress of research on genome project of *Biomphalaria glabrata*

Liu Q¹, Zhou Xiaonong

National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China

[Abstract] This paper introduces the latest development of the genome project of *Biomphalaria glabrata* including the study of genome sequencing, discovering new genes, differential gene expression and fibrinogen related protein, etc. which would provide theoretic evidence for understanding snail biology, identifying the gene expression of all the developmental stages, the co-evolutionary dynamics that exists in host-parasite interactions and identifying the drugs targets for molluscicide, as well as provide the scientific reference for the study of *Oncomelania hupensis*.

[Key word] *Biomphalaria glabrata*; Genome project; Differential expression gene; Fibrinogen related protein gene

基因组序列是生物信息学研究的基础, 其可使研究者在更广阔的领域研究生命行为^[1]。在血吸虫学方面, 了解中间宿主螺的基因组及其与血吸虫和终末宿主基因组之间的关系, 对于寻找有效的分子手段防治血吸虫病意义重大。随着人类基因组和血吸虫基因组测序的完成^[2], 螺的基因组测序开始进入人们的视野。

2001年光滑双脐螺基因组计划启动, 而后光滑双脐螺的基因组联合会建立。2002~2004年, 以墨西哥大学(UNM)、生物医学研究所(BR)及人类基因组研究机构(NHGR)为主体的研究机构构建了光滑双脐螺 BB02株的 BAC文库(平均插入片段 136 kb, 约覆盖基因组 9.1倍)。随后, BR、UNM 及美国基因组研究协会向 NHGR 提交了螺基因组测序白皮书。2004年华盛顿大学(WashU)基因组测序中心提出优先测定光滑双脐螺基因组并于同年开始着手测序工作。与曼氏血吸虫基因组(270 Mb)相比, 光滑双脐螺基因组较大(931 Mb), 因此需要分阶段完成, 目前探索性的测序已完成了 26 398 条序列, 其基因序列已提交 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6526>)^[3,4]。2005年, 新一轮螺类基因组会议召开, 在总结成绩的同时, 指出光滑双脐螺基因组很大, 因此需要多单位协作完成, 并提出在 2005 年底测定 12 500 条光滑双脐螺的 EST 序列, 依据现有的基因组数据使用 25 个微卫星和约 75 个随机扩增多态/扩增长度多态(RAPD/sAFLPs)分子标记建立基因组连锁图谱, 进一步建立遗传物理图谱并通过网络注释光滑双脐螺的基因组^[5]。

1 基因组测序

Gregory 等^[6]利用福尔根染色-图像分析法估测光滑双脐螺的基因组 DNA 质量为 $(0.95 \pm 0.01) \text{ Pg}$, 结果显示其为最小的腹足类生物基因组, 是最适合基因组测序的腹足类生物之一。研究表明光滑双脐螺的染色体有 18 对, 基因组大小为 931 Mb。2006 年, Adema 等^[3]构建了光滑双脐螺 BB02 株细菌人工染色体文库, 对基因组的分析表明其基因组 AT 含量为 64%, 其 12% 基因序列末端插入有 60~250 bp 高频率出现的序列分子(HFSE 序列), 这些序列与已报道的光滑双脐螺肌球蛋白(myoglobin)和类纤维素蛋白原(FREP2.1, FREP3.1, FREP4, FREP6, FREP7.1, FREP13.1)的全序列内含子高度同源。同时, 序列比对还发现肌球蛋白与纤维素蛋白相关基因内含子序列的部分区域同源率较高。光滑双脐螺线粒体基因长度为 13 670 bp, 含有 13 个编码蛋白的基因, 22 个 rRNA 及 2 个 tRNA(16 S 和 12 S)基因, AT 含量为 74.6%。其 M 株和 1 742 株光滑双脐螺的线粒体基因仅有 18 个碱基的差异^[7]。

2 新基因的发现

表达序列标签(EST)是从 cDNA 文库随机筛选的 5' 端或 3' 端的短序列, 它是一种快捷、有效的鉴定新基因及揭示基因组功能信息的方法^[8]。由于 EST 来源于生物体某个发育时期一个组织 mRNA 所构建的 cDNA 文库, 因此其能反映该组织中各基因在特定时期的表达。将所获得的 EST 序列与基因公共数据库中已知序列比较, 不仅有助于从分子水平研究表达基因的生物学功能, 全面了解生物体生长、发育、繁殖、遗传变异及衰老死亡等一系列生命过程, 也为发现新基因、寻找新的诊断抗原、药物靶点及候选疫苗提供了有效方法^[9]。

螺和血吸虫之间关系错综复杂, 螺类抵御外物入侵的系统被称为“内部防御系统(IDS)”^[10]。鉴定螺的 IDS 和血吸虫感

[基金项目] 国家自然科学基金(3059037); 博士后基金(20070420422)

[作者单位] 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所(上海 200025)

[作者简介] 刘琴, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 寄生虫分子生物学

染机制之间的关系对于感染的发生至关重要^[11-12]。研究表明, 在血吸虫感染螺的过程中, 螺抵御血吸虫感染的免疫应答主要通过血淋巴完成^[13-14]。为了鉴定免疫相关基因, Mitre等^[15]构建了光滑双脐螺血淋巴库, 测定了 1 707 条 EST 序列, 并分析了其中 1 613 条有效序列, 将所测基因按以下功能分为 7 大类, 分别为: ① 免疫; ② 压力应答和抗氧化; ③ 核酸和蛋白代谢及加工; ④ 细胞信号肽; ⑤ 细胞结构、形状和运动性; ⑥ 能量代谢; ⑦ 其他功能。分析后预测其中 31 个基因与天然免疫相关, 其中包括硫氧还蛋白过氧化物酶 (thioredoxin peroxidase)、丝氨酸蛋白酶阻遏物 (serine proteinase)、半乳素 (galectin)、阿米巴样细胞凝集因子 (amebocyte aggregation factor LAF)、类纤维素蛋白原 (FREPs)、与细胞吸附相关的 α 、 β 整合素先导物 (integrin α 、 β Precursor)、F 脊椎蛋白先导物 (F-spondin Precursor) 以及某些模式识别受体和其他一些黏附分子等。其中, 硫氧还蛋白过氧化物酶主要参与清除过氧化氢以及增强 NK 细胞的细胞毒性^[16]。FREPs 是一类高度相似的分子, 其基因含有 2 种类型的结构域, 即 N 末端免疫球蛋白超家族 (IgSF) 结构域和 C 末端纤维原结构域 (FBG)^[17]。有证据表明 FREPs 在螺类免疫中起重要作用, 研究显示光滑双脐螺的某些 FREPs 转录子在感染藐小棘隙吸虫时显著上调, 某些 FREPs 基因产物能参与溶解吸虫抗原和结合到孢子表面^[18-19]。除了 FREPs, 另一类特别的基因模式识别受体也参与溶解吸虫抗原和结合到孢子表面的过程。它们是一类与动物肽聚糖识别蛋白 (PGRP) 相似的基因, 是重要的天然免疫分子^[20]。LAF 是一类细胞黏附分子, 与皮连蛋白家族基因相似。研究表明光滑双脐螺的 LAF 均含有 2 个保守的内部重复单元, 即 VND₁W/F₁ 和 EDNR₁W/F₁。另一类黏附分子与哺乳动物母系蛋白相似, 含有冯德勒布兰德因子 A 型结构域 (VWA), 这种结构域介导通过金属离子依赖的结合位点 (MDAS) 的吸附^[21]。半乳素是一类含有 β 半乳糖结合位点结构域的分子, 参与细胞之间的相互作用, 且其活动不依赖金属离子, 最近被归为天然免疫分子中的一类^[22]。

3 基因差异表达的研究

1992 年, 2 个研究小组同时描述了一种研究基因差异表达的方法, 将其命名为差异显示 (different display), 又称为 RAP-PCR 即反任意引物 PCR^[23]。自此任意引物指纹及其变异技术开始成功用于分离差异表达的基因。借助于该技术, Lockyer 等^[12, 24-25]、Jones 等^[26] 利用差异显示的相关方法以及差异 cDNA 文库构建等分析了血吸虫毛蚴侵袭前后的螺组织、易感株 (NHM1742) 和抗性株 (NHM1981) 螺组织的基因表达差异情况, 获得了细胞色素 P450 基因、热休克蛋白 70 (HSP70) 基因、FREPs 3-2 先驱物的部分序列、铁蛋白、HttA2 分子, 并通过半定量 RT-PCR 证实了其基因的差异表达。与此同时, Knight 等^[27]、Miller 等^[28] 也利用该方法对光滑双脐螺抗性株和易感株的差异表达基因进行了深入研究, 相继鉴定了抗性株 (BS90) 和易感株 (M-line) 的分子标记以及抗性株 (BS90) 被曼氏血吸虫毛蚴侵袭前后的差异表达基因, 其中包括 1 个与 E. coli Trp 转座酶高度同源的分子, 此酶的作用主要是调节基因组的迁移率和不稳定性。研究表明被毛蚴侵袭的抗性株 (BS90) 头足部组织的反转录酶活性显著升高, 特别是在侵袭 24 h 后。因此, 推测可能这种酶与螺的内部防御机制密切相关^[29]。最近的研究从光滑双脐螺的肝、胰脏 cDNA 文库中鉴定了数个半胱氨酸蛋白酶分子, 证明抗性株的表达量是易感株的 3.5 倍^[30]。同

时, Schneider 等^[31] 和 Walker 等^[32] 也利用差异显示反转录 PCR (DDRT-PCR) 技术鉴定了光滑双脐螺抗性株和易感株之间差异表达的分子, 这些分子同源于丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、过氧化物酶及糖苷酶等。

4 FREPs

FREPs 被认为是参与非脊椎动物免疫防御最重要的分子之一。其分子结构典型, 在 N 末端含有 1 个或 2 个 IgSF 结构域, 在 C 末端含有 FBG 结构域^[18]。早期研究表明 FREPs 在 mRNA 和 DNA 水平存在显著的多形性, 这些多形性通过基因置换及点突变产生^[33]。

Leonard 等^[34]、Zhang 等^[35] 对光滑双脐螺的 FREPs 分子进行了一系列研究, 结果表明光滑双脐螺 FREPs 基因家族分为 14 个亚型, 分别命名为 FREP1 ~ FREP14。到目前为止, FREP2、FREP3、FREP4 和 FREP7 4 个 FREP 亚族的基因全序列被测定, 其中 FREP2、FREP4 含 1 个 IgSF, FREP3、FREP7 含 2 个 IgSF。FREP2 和 FREP4 基因组 DNA 序列均含有 4 个外含子, 第 1 个含有推测的信号肽序列, 第 2 个和第 3 个形成部分的 IgSF 为颈环结构, 第 4 个是纤维原结构域。推测 IgSF 结构域上半胱氨酸形成一个链内的颈环, 从而使 IgSF 结构域被 78 或 79 个氨基酸残基隔开, 因此其 IgSF 序列非常接近 V 型 IgG 结构域^[34]。研究表明抗性株 (BS90) 和易感株 (M-line) 被外睾吸虫 (Echinostoma paraensei) 侵袭后其 FREP2 和 FREP4 表达均显著上调, 但被曼氏血吸虫侵袭后仅抗性株 FREP2 和 FREP4 表达显著上调 (分别增加 57 倍和 4.5 倍), 而易感株表达水平没有差异^[36]。FREP3 和 FREP7 均由 2 个相连的 IgSF 结构域构成, 这 2 个 IgSF 编码区显著不同, 其中靠近 N 末端的 IgSF1 结构域由单个外显子编码, 而位于其下游的 IgSF2 结构域由 3 个外显子编码。FREP3 和 FREP7 的 IgSF2 结构域均属于 V 型 IgG 结构域; 其 FBG 编码区相对保守, 均不含内含子^[35]。FREP14 全长 cDNA 序列已被鉴定, 为编码 399 个氨基酸的分泌蛋白, 由 19 个氨基酸信号肽、134 个氨基酸 N 末端 IgSF 结构域、43 个氨基酸的连接区及 202 个 C 末端的 FBG 结构域组成。与其他 FREPs 显著不同的是, FREP14 由单个座位编码, 并且在曼氏血吸虫侵袭的早期或后期阶段并不上调表达, 仅在 E. paraensei 侵袭的后期上调表达^[37]。同时, FREP12 和 FREP13 的 99% 的 cDNA 序列已被鉴定^[38]。为进一步研究 FREPs 的功能奠定了基础。

5 小结

光滑双脐螺基因组计划为理解螺类生物学、综合鉴定水生螺类发育阶段的基因表达、螺和寄生虫共进化机制及自然选择机制、鉴定灭螺药物靶点提供了理论依据, 从而为阻断血吸虫病传播创造了契机。同时, 该基因组计划的顺利进展也为日本血吸虫中间宿主湖北钉螺的研究提供了科学参考, 为湖北钉螺基因组计划的启动奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 胡旭初, 吴忠道, 余新炳. 进入疟疾研究的后基因时代[J]. 国外医学: 寄生虫病分册, 2002, 29(2): 116-123
- [2] El-Sayed N, Bartholomew D, Ivens A, et al. Advances in schistosome genomics[J]. Trends Parasitol, 2004, 20(4): 154-157
- [3] Adema CM, Luo MZ, Hane JB, et al. A bacterial artificial chromosome library for Biomphalaria glabrata, intermediate snail host of Schistosoma mansoni[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006, 101(Suppl 1): 167-177
- [4] University of New Mexico Biomphalaria glabrata Genome Initiative

- [OI]. 2003 < http://biology.umn.edu/biomphalaria/genome >.
- [5] Raghavan N, Knäht M. The snail (*Biomphalaria glabrata*) genome project. *Trends Parasitol* 2006, 22(4): 148-151.
- [6] Griegory TR. Genome size estimates for two important freshwater molluscs, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the schistosomiasis vector snail (*Biomphalaria glabrata*) [J.]. *Genome* 2003, 46(2): 841-844.
- [7] Dejong RJ, Emery AM, Adema CM. The mitochondrial genome of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Basmatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni* [J.]. *J Parasitol* 2004, 90(5): 991-997.
- [8] 田小军, 薛燕. 表达序列标签在寄生虫功能基因组学研究中的应用 [J.]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(3): 231-233.
- [9] 杨胜, 肖建华. 表达序列标签分析在血吸虫基因组研究中的应用 [J.]. *中国热带医学*, 2003, 3(2): 422-424.
- [10] 周晓农. 实用钉螺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 230-231.
- [11] Maricon-Gondran M, Lepoint M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* [J.]. *J Invertebr Pathol* 1999, 74(3): 24-34.
- [12] Lockyer AE, SPinks J, Noble LR, et al. Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization [J.]. *Mol Biochem Parasitol* 2007, 151(1): 18-27.
- [13] Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival [J.]. *Parasitology* 2001, 123 (Supp): S159-S167.
- [14] Bayne CJ. Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptive arms of immune systems [J.]. *Integr Comp Biol* 2003, 43(2): 293-299.
- [15] Mitta G, Galinier R, Tisseyre P, et al. Gene discovery and expression analysis of immune relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes [J.]. *Dev Comp Immunol* 2005, 29(5): 393-407.
- [16] Zhang H, Evenhuis JP, Thøgersgaard GH, et al. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J.]. *Dev Comp Immunol* 2001, 25(1): 25-35.
- [17] Zhang SM, Leonard IM, Adema CM, et al. Parasiteresponsive IESF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IESF domains and a fibrinogen domain [J.]. *Immunogenetics* 2001, 53(8): 684-694.
- [18] Zhang SM, Loker ES. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences Fibrinogen-related proteins [J.]. *Dev Comp Immunol* 2003, 27(3): 175-187.
- [19] Bilej M, de Baetselier P, Van Dijk E, et al. Distinct carbohydrate recognition domains of an invertebrate defense molecule recognize Gram-negative and Gram-positive bacteria [J.]. *J Biol Chem* 2001, 276(49): 45840-45847.
- [20] Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) [J.]. *Mol Immunol* 2004, 40(12): 877-886.
- [21] Fujii N, Minetti CA, Nakhasi HL, et al. Isolation, cDNA cloning and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and an erythrocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus* [J.]. *J Biol Chem* 1992, 267(31): 22452-22459.
- [22] Saito S, Nieminen J. Seeing strangers or announcing danger: galectin3 in two models of innate immunity [J.]. *Glycoconj J* 2004, 19(7/9): 583-591.
- [23] 蔡磊, 赵青川. 差异表达基因的几种筛选方法 [J.]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(3): 682-684.
- [24] Lockyer AE, Jones CS, Noble LR, et al. Use of differential display to detect changes in gene expression in the intermediate snail host *Biomphalaria glabrata* upon infection with *Schistosoma mansoni* [J.]. *Parasitology* 2000, 120(3/4): 399-407.
- [25] Lockyer AE, Noble LR, Rollinson D, et al. *Schistosoma mansoni* resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent based differential display [J.]. *Exp Parasitol* 2004, 107(1/2): 97-104.
- [26] Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, et al. Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*—*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling [J.]. *Parasitology* 2001, 123 (Supp): S181-S196.
- [27] Knäht M, Miller AN, Patterson CN, et al. The identification of markers segregating with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata* [J.]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96(4): 1510-1515.
- [28] Miller AN, Raghavan N, FitzGerald PC, et al. Differential gene expression in hemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection [J.]. *Int J Parasitol* 2001, 31(7): 687-696.
- [29] Raghavan N, Miller AN, Gardner M, et al. Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to infection of *Schistosoma mansoni* [J.]. *Mol Biochem Parasitol* 2003, 126(2): 181-191.
- [30] Myers J, Ittiprasert W, Raghavan N, et al. Differences in cysteine protease activity in *Schistosoma mansoni* resistant and -susceptible *Biomphalaria glabrata* and characterization of the hepatopancreas cathepsin B full-length cDNA [J.]. *J Parasitol* 2008, 94(3): 659-668.
- [31] Schneider Q, Zelek UE. Differential display analysis of hemocytes from schistosome resistant and schistosome susceptible intermediate hosts [J.]. *Parasitol Res* 2001, 87(6): 489-491.
- [32] Walker AJ, Rollinson D. Specific tyrosine phosphorylation induced in *Schistosoma mansoni* in infection by hemolymph from schistosome susceptible but not resistant *Biomphalaria glabrata* [J.]. *Parasitology* 2008, 135(3/4): 337-345.
- [33] Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, et al. Immunity related genes and gene families in *Anopheles gambiae* [J.]. *Science* 2002, 298 (5591): 159-165.
- [34] Leonard IM, Adema CM, Zhang SM, et al. Structure of two FREP genes that combine IESF and fibrinogen domains with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata* [J.]. *Gene* 2001, 269(1/2): 155-165.
- [35] Zhang SM, Leonard IM, Adema CM, et al. Parasiteresponsive IESF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IESF domains and a fibrinogen domain [J.]. *Immunogenetics* 2001, 53(3/4): 684-694.
- [36] Hentel LA, Adema CM, Loker ES. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma parva* [J.]. *Dev Comp Immunol* 2005, 29(4): 295-303.
- [37] Zhang SM, Njima H, Zenga Y, et al. Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection [J.]. *Dev Comp Immunol* 2008, 32(3): 1119-1130.
- [38] Zhang SM, Loker ES. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences [J.]. *Dev Comp Immunol* 2003, 27 (3): 175-187.