

西藏片形吸虫 cDNA 文库构建及免疫学筛选

赵霞玲^{1,2}, 王登云³, 次登多吉³, 唐文强^{1,2}

(1. 西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所, 西藏 拉萨 850009; 2. 省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 西藏 拉萨 850000; 3. 西藏那曲市聂荣县农牧业科技服务站, 西藏 那曲 852000)

摘要: 基于西藏地区采集的片形吸虫, 构建片形吸虫成虫噬菌体展示 cDNA 文库, 利用感染片形吸虫羊血清对该文库进行初筛和复筛。挑取阳性噬菌斑, PCR 扩增及测序, 对测序结果进行生物信息学分析; 利用所得序列设计引物, 以片形吸虫 DNA 为模板进行 PCR 扩增再次验证。结果成功构建了片形吸虫成虫 cDNA 文库, 文库滴度为 1.24×10^7 pfu/mL, 重组率为 100%, 共筛选和鉴定出 8 个免疫基因蛋白。

关键词: 片形吸虫; cDNA 文库; 免疫筛选; 西藏

中图分类号: R383.2

文献标识码: A

Construction and Immunological Screening of a *Fasciola* spp. cDNA Library from Xizang

ZHAO Xialing^{1,2}, WANG Dengyun³, Cidengduoji³, TANG Wenqiang^{1,2}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xizang Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa Xizang 850009, China; 2. State Key Laboratory of Highland Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Lhasa Xizang 850000, China; 3. Nyerong County Agricultural and Pastoral Science and Technology Service Center, Nagchu Xizang 852000, China)

Abstract: Based on *Fasciola* spp. collected from Xizang, a phage-displayed cDNA library of adult *Fasciola* spp. was constructed, and the library was primary and secondary screened using serum from sheep infected with *Fasciola* spp. Positive plaques were picked for PCR amplification and sequencing, and bioinformatics analysis was performed on the sequencing results. Primers were designed according to the obtained sequences, and PCR amplification was conducted again with *Fasciola* spp. DNA as the template for verification. The results showed that the cDNA library of adult *Fasciola* spp. was successfully constructed with a titer of 1.24×10^7 pfu/mL and a recombination rate of 100%, and a total of 8 immune gene proteins were screened and identified.

Key words: *Fasciola* spp.; cDNA library; immunological screening; Xizang

片形吸虫隶属于复殖目片形科片形属, 是一种重要的人畜共患寄生虫, 严重危害牛、羊等家畜健康^[1]。该虫感染可导致宿主肝胆系统出现病理损伤, 引起生长发育受阻、繁殖能力下降及生产性能降低, 严重时致死亡^[2]。片形吸虫病在全球广泛流行, 据估计已在 70 多个国家造成约 240 万人感染^[3], 并对畜牧业带来年均约 32 亿美元的经济损失^[4], 严重制约着牛羊养殖业

的可持续发展。因此, 加强片形吸虫病的相关研究, 不仅对畜牧业可持续发展具有重要意义, 也可对人类公共卫生安全提供重要保障^[5-6]。

西藏自治区位于我国西南边陲的青藏高原, 平均海拔在 4 000 m 以上, 自然资源丰富, 地理环境复杂。该区域雪融溪流与季节性扩张的沼泽湿地为片形吸虫的中间宿主提供了丰富且稳定的栖息场所^[7], 加之传统的四季轮牧模式, 导

收稿日期: 2025-09-22

基金项目: 西藏自治区自然科学基金项目——基于噬菌体 cDNA 文库挖掘牛、羊片形吸虫抗原基因的初步研究(XZ202401ZR0143); 西藏自治区科技计划项目——西藏地区牦牛藏羊及鸟类感染寄生虫流行病学调查及防控技术研究(XZ202401JD0012)。

作者简介: 赵霞玲(1995—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事高原牛羊寄生虫病学研究, E-mail: 1490241436@qq.com。

通信作者: 唐文强(1988—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事高原牛羊寄生虫病学研究, E-mail: 173780058@qq.com。

致家畜反复暴露于疫水环境,从而增加了片形吸虫病感染的风险。调查数据显示,西藏地区片形吸虫病感染率为 20.00%~44.30%^[8-10],呈现出高感染态势,因此开展准确的病原诊断已成为有效防控该病的关键环节。

目前,片形吸虫病的常规诊断方法主要依赖于粪便镜检虫卵,但该方法敏感性较低,且虫体从感染至成虫排卵需历时 2~3 月,待检出时往往已对宿主造成严重病理损害^[11]。早期感染阶段虫体移行可刺激机体产生特异性抗体,因此血清学抗体检测被视为实现早期诊断的有效途径^[12]。目前已开发出多种基于重组抗原的片形吸虫诊断试剂盒,但西藏地区片形吸虫可能存在遗传和抗原性上的独特性,因此,针对这一需求,本研究构建了片形吸虫的 cDNA 文库,并开展免疫学筛选,旨在为西藏片形吸虫病免疫诊断技术提供支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Advantage[®]2 PCR Kit 和 SMART[™]cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech 公司; Tissue DNA Kit 和 Total RNA Kit 购自 OMEGA

生物;polyA Spin mRNA 分离试剂盒购自上海哈灵生物科技有限公司;1 kb DNA Ladder 和硝酸纤维素膜购自碧云天生物;2×PCR Mix、DL2000 DNA Marker、Ts-GelRed 购自擎科生物科技股份有限公司;其他试剂均购自索莱宝。

1.2 片形吸虫虫体及血清采集

2023 年 11 月屠宰季期间,于本地农牧民饲养的牦牛肝脏中采集片形吸虫成虫 20 份,虫体迅速液氮冷冻,实验室-80℃冰箱长期保存;采集同一批自然感染片形吸虫病的阳性牦牛血液样本,获得血清,-20℃冰箱保存备用。

1.3 虫体分子生物学鉴定

根据 Tissue DNA Kit 说明书提取虫体全基因组 DNA,并保存于-20℃冰箱中。参照已报道片形吸虫线粒体基因 NADH dehydrogenase subunit 1(NAD1)序列^[13]设计引物(表 1),由擎科生物技术有限公司合成。经 PCR 扩增后,产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,对预期大小条带进行切胶回收,纯化后的阳性产物送擎科生物技术有限公司进行双向测序。测序拼接结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对分析。采用 MEGA 11.0 软件进行同源性分析,邻接法构建系统进化树。

表 1 PCR 引物信息

名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp	退火温度/℃
NAD1	F: AAGGATGTTGCTTTGTCGTGG R: GGAGTACGGTTACATTCACA	619	56
通用 PCR 引物	T7: TCCGAGATCTGGACGAGC T3: TAATACGACTCACTATAGGG	根据实际	54
FgCL2	F: TCCTCACGGTCGGAGTGCTTG R: TCACATAACCAGATTCACGCCAGTC	339	54
FgB II	F: ACGGCGAGTTCAACAGACATGC R: CCACCAAATCCACCACCACGAC	340	55
FgSAP2	F: TGCTGGCGGCAGTAACTTTCC R: GGCAGATTTCCGTTGTGTTGTGTTG	265	57
Fg08	F: CGCCAGAATCCATCCGTTTCATCC R: CTAAGTCTTCCACTGCTGCTTCC	297	49
FgX1	F: GTGGCCTTTCTGGTGCGATACG R: GACGACTGACCTCACTCACATTACG	353	51
Fg83	F: GATTCGTGCCTTGGTGTGCTAAC R: TCCAATGAAGGTTGCCGAGACAATC	287	55
Fg14	F: ATGAATGTACAATTCATTTTCGTCTTT R: TCAAAAACAAAACGAATACAGTCTTATC	273	54
Fg28	F: ATGTCATTGATTTTGGGCAAAGAATT R: TCATTGTGGTAGCATTTGGGGA	216	56

1.4 总 RNA 的提取和纯化

将保存于 -80 °C 冰箱中的虫体样本取出, 在液氮预冷条件下研磨成粉, 按 Total RNA Kit 说明书流程提取其总 RNA, 经变性琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。使用 polyA Spin mRNA 分离试剂盒, 从总 RNA 中分离并纯化 mRNA, 再采用 Nanodrop 核酸测定仪对纯化后的 mRNA 进行浓度与纯度检测。

1.5 cDNA 文库的构建

按照 SMART™ cDNA Library Construction Kit 说明书进行操作, 以 mRNA 为模板, 在反转录酶催化下合成 cDNA 第 1 链, 利用 PCR 扩增合成 cDNA 第 2 链。双链 cDNA 经蛋白酶 K 消化后, 通过 CHROMASPIN-400™ 柱进行离心层析, 去除接头片段及短链 cDNA。收集所得 cDNA 片段与 λTriplEx2™ 噬菌体载体连接, 并转化入宿主菌 XL1-Blue 中, 构建出包装好的初始 cDNA 文库。

1.6 cDNA 文库的免疫学筛选

用大肠杆菌裂解液预吸附自然感染混合阳性血清以去除非特异性抗体。将片形吸虫 cDNA 噬菌体文库铺板, 转印至 IPTG 预处理的 NC 膜上, 用处理后的阳性血清进行孵育, 经封闭、二抗孵育和 DAB 显色后筛选阳性噬菌斑, 复筛 3 轮。筛选出的阳性噬菌斑为 DNA 模板, 通用引物 PCR (表 1) 扩增, 送至擎科生物技术有限公司测序。

1.7 PCR 验证

根据筛选测序获得的 8 个基因序列(表 1)设计特异性引物, 以片形吸虫 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增验证上述基因是否来源于实验所用虫体。PCR 扩增程序: 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 退火 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物使用 1% 琼脂糖凝胶在 150 V 电压下电泳 15 min 进行分离和检测。

1.8 阳性克隆的生物信息学分析

对筛选到的 8 个基因蛋白进行生物信息学分析, 使用 <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0> 预测是否含有信号肽, <http://www.psорт.org/psортb/index.html> 进行亚细胞定位的预测, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 分析是否存在跨膜区。

2 结果与分析

2.1 片形吸虫分子鉴定结果

从西藏地区采集到 20 份片形吸虫成虫, 进

行 *NAD1* 基因扩增, 出现约 619 bp 条带, 与预期目的条带均相符(图 1)。测序后 BLAST 比对分析结果显示, 20 条基因序列均与大片形吸虫 *NAD1* 基因序列一致性为 99.34%~100%, 鉴定为大片形吸虫。系统进化树分析结果显示, 大片形吸虫和肝片吸虫处于两个不同的分支上, 本研究中的大片形吸虫与来自印度(GenBank: OR908783) 同源性较高(图 2)。

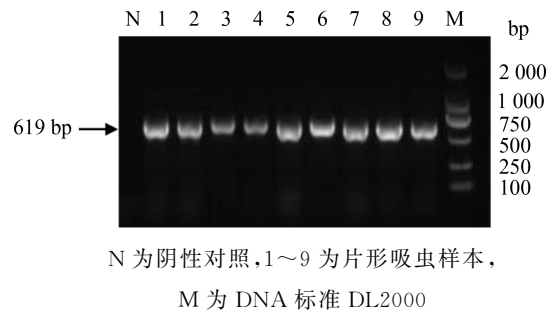


图 1 部分片形吸虫样品 *NAD1* 基因 PCR 扩增结果

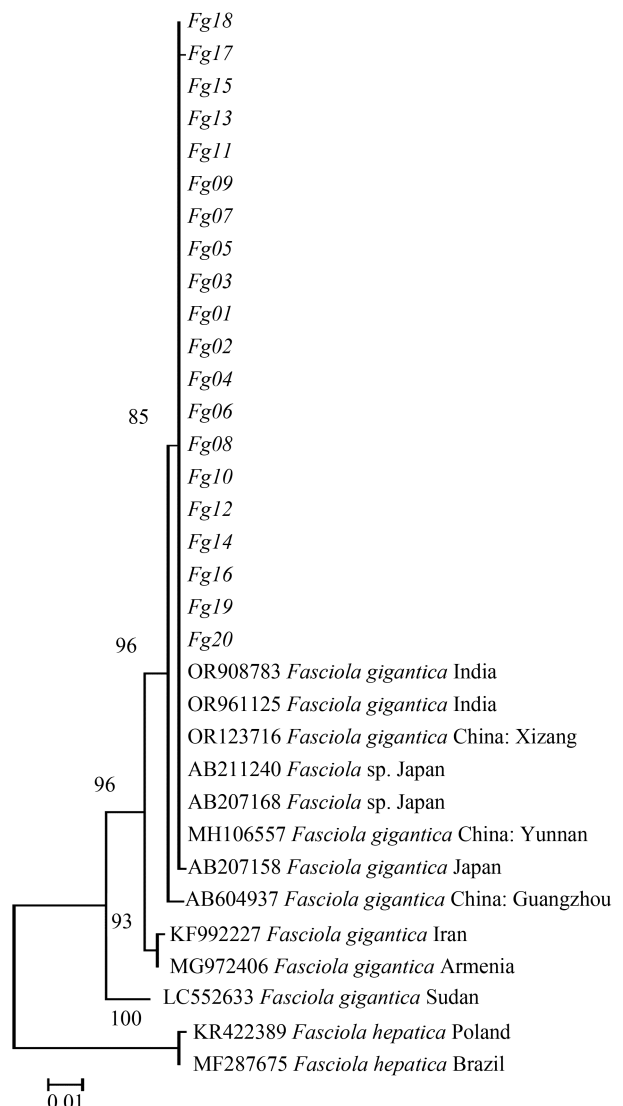
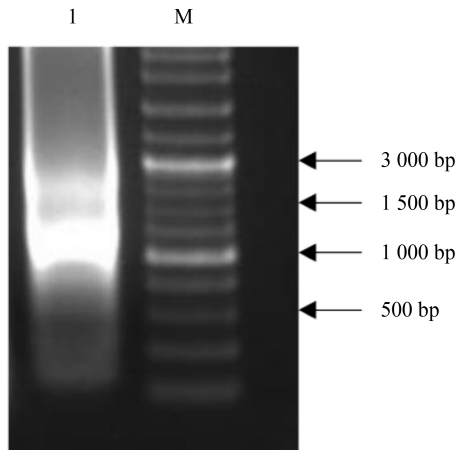


图 2 基于片形吸虫 *NAD1* 基因构建的系统进化树

2.2 片形吸虫总 RNA 质量的鉴定

提取的片形吸虫总 RNA 经 Nanodrop 核酸测定仪测定其浓度为 1 643 μg/mL, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 2.18。琼脂糖凝胶电泳结果显示清晰的 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带(图 3),表明总 RNA 质量较好,满足 cDNA 文库构建的要求。



1 为总 RNA 样品, M 为 DL 1 kb DNA Marker

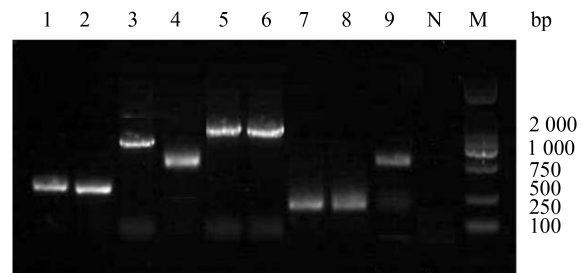
图 3 片形吸虫总 RNA 及双链 cDNA 电泳图

2.3 片形吸虫 cDNA 文库构建

构建的初级文库库容大于有效文库要求的 1×10⁶ pfu/mL,测定文库滴度为 1.24×10⁷ pfu/mL,随机选择的单克隆插入片段在 200~3 000 bp,重组率为 100%。

2.4 cDNA 文库免疫筛选与阳性克隆鉴定

用预处理的片形吸虫混合阳性血清对 cDNA 文库进行免疫筛选(图 4),筛选出孵育的 NC 膜上特有阳性斑点 14 个,复筛后获得 10 个阳性克隆,PCR 电泳和测序分析得到 8 条有效序列(表 2)。



1~9 为阳性克隆, N 为阴性对照,

M 为 DL2000 DNA Marker

图 4 部分阳性克隆的 PCR 扩增结果

表 2 免疫筛选获得的片形吸虫蛋白基因分析

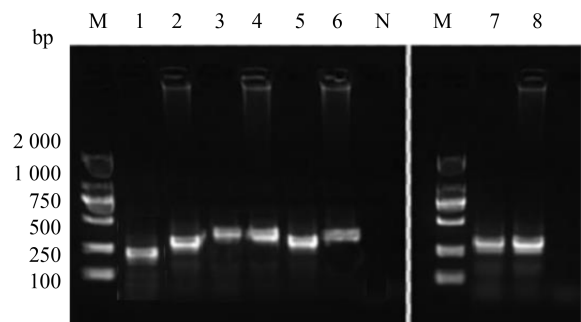
GenBank 登录号	基因注释	蛋白登录号	序列长度/bp
AF510856	组织蛋白酶 L2	AAM44832.1	1 068
EF110993.1	卵黄蛋白 B II	ABL11192.1	908
AY870255.1	鞘脂激活样蛋白 SAP-2	AAX68446.1	434
SUNJ01010311.1	假定蛋白 FGIG_06508	TPP59733.1	675
SUNJ01001586.1	假定蛋白 FGIG_02543	TPP66628.1	216
SUNJ01002206.1	镁依赖性磷酸酶 1	TPP66157.1	774
SUNJ01013826.1	假定蛋白 FGIG_04483	TPP56987.1	345
SUNJ01009074.1	假定蛋白 FGIG_08614	TPP60711.1	237

2.5 筛选基因 PCR 验证

以片形吸虫 DNA 为模板,对筛选获得的 8 个基因序列进行 PCR 扩增。结果显示,扩增产物大小与预期目的片段大小一致(图 5),表明该 8 个基因均在片形吸虫虫体中表达,进一步验证了本研究结果的可靠性。

2.6 免疫筛选的基因生物信息学分析

经预测分子,8 个蛋白中 FgCL2、FgSAP2 和假定蛋白 FGIG_06508 有信号肽,其余均无信号肽;亚单位定位都是细胞质;除了 FgSAP2 为跨膜蛋白、假定 FGIG_02543 为内膜蛋白外,其余蛋白均没有跨膜区,属于外膜蛋白(表 3)。



1 为 Fg43, 2 为 FgSAP2, 3 为 FgCL2, 4 为 FgB II, 5 为 Fg08, 6 为 FgMDP1, 7 为 Fg83, 8 为 Fg14,

N 为阴性对照, M 为 DL2000 DNA Marker

图 5 候选基因 PCR 扩增验证结果

表3 鉴定蛋白的分析

蛋白	信号肽	亚细胞定位	跨膜结构域
FgCL2	有	细胞质	外膜
FgBII	无	细胞质	外膜
FgSAP2	有	细胞质	跨膜
假定蛋白 FGIG_06508	有	细胞质	外膜
假定蛋白 FGIG_02543	无	细胞质	内膜
FgMDP1	无	细胞质	外膜
假定蛋白 FGIG_04483	无	细胞质	外膜
假定蛋白 FGIG_08614	无	细胞质	外膜

3 讨论与结论

3.1 讨论

西藏自治区是我国5大牧区之一,天然草场面积居全国首位,畜牧业在全国具有不可替代的地位。片形吸虫病是一种常见于反刍动物的寄生虫病,同时也是重要的人畜共患病。该病主要由肝片吸虫和大片吸虫引起,近年来还发现介于二者之间的杂合型^[14-15]。本研究对采集的片形吸虫样本利用线粒体 *NAD1* 基因进行分子生物学鉴定,结果采集的样本均为大片形吸虫。以往研究多基于传统形态学和血清学进行其种类鉴定,普遍认为西藏地区反刍动物感染以肝片吸虫为主^[8-10],未能从分子生物学角度来准确区分大片形吸虫与肝片吸虫。本研究通过分子生物学方法明确了大片形吸虫在该区的优势地位,为正确评估片形吸虫病的流行特征和制定防控策略提供了科学依据。

近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,cDNA文库可识别病原体关键基因和宿主标志物,为病原体诊断和疫苗开发提供理论基础,已被广泛应用于兽医基础研究的多个领域^[16]。cDNA文库的质量通常可从库容量、重组率以及插入片段长度等指标进行评价^[17-18]。本研究建立了片形吸虫的高质量cDNA文库,文库滴度为 1.24×10^7 pfu/mL,随机选择的单克隆插入片段在 200~3 000 bp,重组率为 100%,可满足后续免疫筛选的要求。

在西藏地区,目前片形吸虫病的流行情况较为严重,但对该病的研究仍停留在流行病学调查阶段,因此筛选具有诊断潜力的抗原分子为片形吸虫病的早期诊断提供了技术支持。本研究在构建片形吸虫成虫cDNA文库的基础上,通过免疫筛选成功获得8个可被片形吸虫阳性血清识

别的蛋白抗原编码基因。其中,组织蛋白酶L2和镁依赖性磷酸酶1在肝片吸虫和大片形吸虫中已有相关报道^[19-20];鞘脂激活样蛋白SAP-2在肝片吸虫中作为诊断抗原表现出良好的特异性^[21];卵黄蛋白BII具有高度保守性和组织特异性表达特征,作为一个功能未知的抗原,其潜在的功能差异、调控机制以及在疫苗开发和诊断工具中的应用价值值得进一步探索^[22]。此外,还鉴定出4个新发现的片形吸虫病候选诊断抗原,包括假定蛋白FGIG_06508、假定蛋白FGIG_02543、假定蛋白FGIG_04483和假定蛋白FGIG_08614。这些结果为建立片形吸虫病的免疫学诊断方法奠定了基础。

3.2 结论

本研究通过分子生物学鉴定,采集的片形吸虫为大片形吸虫。成功建立了cDNA文库,利用阳性血清对该文库进行免疫筛选,成功获得包括组织蛋白酶L2、卵黄蛋白BII、鞘脂激活样蛋白SAP-2、镁依赖性磷酸酶1以及多个功能未知的假定蛋白。

参考文献:

- [1] PAYKARI H, DALIMI A, MADANI R. Immunization of sheep against fasciola gigantica with glutathione S-transferase [J]. *Veterinary Parasitology*, 2002, 105(2): 153-159.
- [2] MALONE J B, GOMMES R, HANSEN J, et al. A geographic information system on the potential distribution and abundance of fasciola hepatica and *F. gigantica* in east Africa based on food and agriculture organization databases [J]. *Veterinary Parasitology*, 1998, 78(2): 87-101.
- [3] HOANG QUANG V, LEVECKE B, DO TRUNG D, et al. *Fasciola* spp. in southeast Asia: A systematic review [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2024, 18(1): e0011904.
- [4] MAS-COMA S, CAFRUNE M M, FUNATSU I R, et al. Fascioliasis in *Llama*, *Lama Glama*, in Andean endemic areas: experimental transmission capacity by the high altitude snail vector galba truncatula and epidemiological analysis of its reservoir role [J]. *Animals*, 2021, 11(9): 2693.
- [5] WILSON R A, WRIGHT J M, DE CASTRO-BORGES W, et al. Exploring the fasciola hepatica tegument proteome [J]. *International Journal for Parasitology*, 2011, 41(13-14): 1347-1359.

- [6] VAN DEN BROUCKE S, VANDECASTEELE S, VAN ESBROECK M, et al. Juvenile fasciola gigantica emerging through the skin in a returning traveller [J]. Journal of Travel Medicine, 2023, 30(6): 33.
- [7] 高先文. 西藏昌都地区牦牛肝脏片形吸虫病危害的调查 [J]. 四川畜牧兽医, 1998, 25(1): 12-13.
- [8] 龙敏, 裴晓双, 董海龙, 等. 西藏自治区拉萨市尼木县、当雄县牛羊两种吸虫感染情况调查与感染风险因素分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2025(7): 96-101.
- [9] 拉巴次旦, 吴金措姆, 蔺红玲, 等. 西藏日喀则某县牛羊肝片吸虫病的调查与综合防治技术 [J]. 西藏科技, 2014, 36(1): 50-52.
- [10] 周磊. 青藏高原牦牛、藏羊肝片吸虫血清学调查及西藏螺内寄生虫鉴定 [D]. 拉萨: 西藏大学, 2020.
- [11] 盛兆安. 大片吸虫及其分泌抗原对宿主肠道菌群与免疫应答调节机制的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- [12] 周岩, 许学年, 程娜, 等. 巨片形吸虫病快速诊断胶体金免疫层析试条的研制与评价 [J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(2): 114-118, 132.
- [13] ITAGAKI T, KIKAWA M, TERASAKI K, et al. Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in korea on the basis of dna sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial *NDI* gene [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2005, 67(11): 1115-1118.
- [14] TANG M T, ZHOU Y, LIU Y H, et al. Molecular identification and genetic-polymorphism analysis of fasciola flukes in dali prefecture, Yunnan Province, China [J]. Parasitology International, 2021, 85: 102416.
- [15] LIU G H, GASSER R B, YOUNG N D, et al. Complete mitochondrial genomes of the ‘intermediate form’ of fasciola and fasciola gigantica, and their comparison with f. hepatica [J]. Parasites & Vectors, 2014, 7(1): 150.
- [16] 孙浩, 李文龙, 杨靖卿, 等. cDNA 文库的构建及其在兽医研究中的应用 [J]. 现代畜牧科技, 2024(10): 139-141.
- [17] 卢艳, 陈家旭, 宋鹏, 等. 曼氏裂头蚅 cDNA 文库的构建及诊断候选抗原筛选 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(4): 380-386.
- [18] 吴小霞, 刘晓雷, 刘明远, 等. 细粒棘球绦虫 3 d 幼虫 cDNA 表达文库的构建及鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2025, 45(2): 305-311.
- [19] STACK C M, CAFFREY C R, DONNELLY S M, et al. Structural and functional relationships in the virulence-associated cathepsin 1 proteases of the parasitic liver fluke, fasciola hepatica [J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(15): 9896-9908.
- [20] 王晓旭. 肝片吸虫病诊断抗原的筛选及间接 ELISA 方法的建立 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [21] GOTTSTEIN B, SCHNEEBERGER M, BOUBAKER G, et al. Comparative assessment of elisas using recombinant saposin-like protein 2 and recombinant cathepsin l-1 from fasciola hepatica for the serodiagnosis of human fasciolosis [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2014, 8(6): e2860.
- [22] HOMWUTTHIWONG K, MEEPOOL A, GRAMS R, et al. Cloning, characterization, and expression of vitelline protein bi and its encoding gene in the liver fluke, fasciola gigantica [J]. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2009, 40(2): 199-210.