



汤洪宁, 吴飞, 项继忠, 童丹妮, 杜振东, 陈学秋, 马光旭, 杨怡. 捻转血矛线虫 *blister-5* 基因序列特征及表达特性分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(10): 199-207.

TANG Hongning, WU Fei, XIANG Jizhong, TONG Danni, DU Zhendong, CHEN Xueqiu, MA Guangxu, YANG Yi. Analysis of sequence characteristics and expression properties of *blister-5* in *Haemonchus contortus*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(10): 199-207.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.10.17

捻转血矛线虫 *blister-5* 基因序列特征及表达特性分析

汤洪宁¹ 吴飞¹ 项继忠² 童丹妮¹ 杜振东¹ 陈学秋¹ 马光旭¹ 杨怡^{1*}

(1. 浙江大学 动物科学学院/浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310058;

2. 湖州咩咩羊牧业有限公司, 浙江 湖州 313023)

摘要 为明确捻转血矛线虫(*Haemonchus contortus*)中 Kunitz 型蛋白 BLI-5 的表达特性, 利用生物信息学软件对其基因结构、保守结构域、进化关系和蛋白质三维结构进行分析; 基于 WormBase 数据库, 分析捻转血矛线虫发育过程各个阶段 *Hc-bli-5* 与 *Hc-bli-4* 的相对转录丰度; 通过构建原核表达载体诱导表达重组蛋白, 并制备多克隆抗体, 采用虫体组织免疫荧光试验分析目标蛋白(*Hc-BLI-5*) 在捻转血矛线虫中的组织定位情况。结果显示: 1) *Hc-bli-5* 基因全长 2 088 bp, 由 4 个外显子和 3 个内含子组成, *Hc-BLI-5* 共有 195 个氨基酸, 132~192 位氨基酸为 Kunitz-type super family 结构域, 是一种丝氨酸蛋白酶抑制因子。2) 进化树分析发现, 丝氨酸枯草杆菌蛋白酶超家族蛋白 BLI-5 在寄生线虫和自由生活线虫中均有较为密切的进化关系, 捻转血矛线虫与柏氏血矛线虫(*Haemonchus placei*) 在该基因的进化关系上最为接近, 聚集在进化树的同一小分支上。3) 蛋白质结构对比分析显示, 捻转血矛线虫和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*) BLI-5 具有一定的相似性, 尤其是 Kunitz 结构域。4) 各时期转录丰度检测显示, *Hc-bli-5* 与 *Hc-bli-4* 的表达趋势有一定的重叠, 提示二者可能互相作用、参与共同的生物学过程。5) 组织定位研究表明, *Hc-BLI-5* 蛋白主要表达于捻转血矛线虫的表皮和肌肉组织。综上, *Hc-bli-5* 可能与 *Hc-bli-4* 相互作用参与捻转血矛线虫蜕皮过程。本研究明确了 *Hc-bli-5* 的序列特征及其蛋白的表达特性, 为探索其是否参与捻转血矛线虫蜕皮过程及其作用机制提供了理论依据。

关键词 捻转血矛线虫; 蜕皮; *Hc-bli-5*; 序列特征; 表达特性

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2024)10-0199-09

文献标志码 A

Analysis of sequence characteristics and expression properties of *blister-5* in *Haemonchus contortus*

TANG Hongning¹, WU Fei¹, XIANG Jizhong², TONG Danni¹, DU Zhendong¹,

CHEN Xueqiu¹, MA Guangxu¹, YANG Yi^{1*}

(1. Zhejiang Province Key Laboratory of Animal Preventive Medicine/College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Huzhou Miemieyang Animal Husbandry Co., Ltd., Huzhou 313023, China)

Abstract The study was to identify the expression properties of the Kunitz-type protein BLI-5 in *Haemonchus contortus*. Firstly, analysis of its gene structure, conserved domain, evolutionary relationships and protein three-dimensional structure using bioinformatics software were conducted; Secondly, the relative transcript abundance of *Hc-bli-5* and *Hc-bli-4* was analyzed based on WormBase database at

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202829, 32172877); 浙江省自然科学基金项目(LZ22C180003, LQ23C180006)

第一作者: 汤洪宁(ORCID: 0009-0006-6212-7383), 硕士研究生, E-mail: 714066872@zju.edu.cn

通讯作者: 杨怡(ORCID: 0000-0003-0258-5308), 副研究员, 主要从事动物疫病防控与寄生虫学研究, E-mail: yangyi0607@zju.edu.cn

each developmental stage of *H. contortus*; Subsequently, a prokaryotic expression vector to obtain recombinant protein and prepared polyclonal antibodies were constructed, while tissue distribution of the protein candidates in the worm was analyzed by the immunolocalization assay. The results revealed that: 1) The *Hc-bli-5* gene has a total of 2 088 bp, and consisted of 4 exons and 3 introns. *Hc-BLI-5* has a total of 195 amino acids, with 132-192 aa forming a Kunitz-type super family domain, which is a serine proteinase inhibitor. 2) Phylogenetic tree showed that BLI-5 has a close evolutionary relationship in both parasitic and free-living nematodes, and the evolutionary relationship between *H. contortus* and *Haemonchus placei* is most closely aligned, clustering together on the same minor branch of the phylogenetic tree; 3) Comparative analysis of protein structures indicated that *Hc-BLI-5* and *Ce-BLI-5* shared certain similarities, especially in the Kunitz domain. 4) Transcript abundance analysis at each developmental stage showed that the expression trend of *Hc-bli-5* and *Hc-bli-4* overlapped, suggesting that they may interact with each other and participate in common biological process. 5) Immunolocalization showed that BLI-5 was distinctly expressed at the cuticle and muscle tissue of worm. In summary, *Hc-bli-5* may interact with *Hc-bli-4* and participate in the molting process of *H. contortus*. This study clarified the sequence characteristics and expression properties of *Hc-bli-5*, providing a theoretical basis for exploring its involvement in the molting process and mechanism in *H. contortus*.

Keywords *Haemonchus contortus*; molting; *Hc-bli-5*; sequence characteristics; expression property

捻转血矛线虫(*Haemonchus contortus*)属于圆线目、毛圆线虫科、血矛线虫属,广泛分布于世界各地且感染率高^[1],是牛羊等反刍动物最主要的胃肠道寄生线虫之一^[2]。捻转血矛线虫感染主要引发宿主贫血、下颌水肿、消瘦等慢性消耗症状,严重时也可导致死亡,对畜牧业造成严重的经济损失^[3]。由于目前缺乏高效的商业化疫苗,捻转血矛线虫病的防治依赖于使用抗蠕虫化学药物,但是近年来耐药虫株大量出现^[4-6],严重限制了这些药物的防治效果。如课题组前期研究发现,捻转血矛线虫ZJ株对多种常用抗蠕虫药(如伊维菌素、噻苯达唑、左旋咪唑等)产生了不同程度的耐药性^[7-9]。因此,寻找新的药物候选靶点,以此筛选或开发新型药物,是目前血矛线虫病防控的重要研究方向。

蜕皮是线虫发育必经的生物进程,参与这个过程的关键调控因子很可能是潜在的药物干预靶标。线虫生命周期中关键的过程包括虫卵孵化、幼虫蜕皮、滞育等,其中蜕皮是所有线虫最重要的发育过程之一,且从虫卵发育至成虫至少经历4次^[10]。蜕皮过程受到多种酶(如丝氨酸蛋白酶、脯氨酸羟化酶、二硫化物异构酶)及酶抑制因子(如丝氨酸蛋白酶抑制因子、胰蛋白酶抑制因子等)精准调控^[11-13]。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中存在一种丝氨酸蛋白酶抑制因子BLI-5,可能通过作用BLI-4(一种丝氨酸蛋白酶)参与蜕皮过程,并能够引起水泡样表型^[12]。Page等^[14]研究发现,秀丽隐杆线虫

*bli-5*突变体出现起泡样表型,并且过表达虫体出现严重的蜕皮缺陷,具体表现比如L1的旧表皮仍然存留在L2幼虫的头部,无法脱落。同时,Steppek等^[15]对正常的秀丽野生株进行*bli-5*干扰试验发现,其中43%的成虫表皮出现明显的起泡样表型,除此之外,当对*bli-4*突变株进行*bli-5*干扰试验,将会引起73%的成虫出现起泡样表型,从而推测这2个基因的表达产物有可能存在相互作用。课题组前期研究发现,捻转血矛线虫中存在BLI-5的同源物(*Hc-BLI-5*),但该蛋白是否在捻转血矛线虫蜕皮过程中发挥作用有待研究。基于此,本研究拟对*Hc-bli-5*序列特征以及表达特性进行分析,为后续深入研究*Hc-bli-5*在蜕皮等生物学过程中的功能以及评价其作为干预靶标的可能性奠定前期理论基础。

1 材料与方法

1.1 捻转血矛线虫虫株、质粒和菌株

捻转血矛线虫浙江株(ZJ strains)长期在湖羊体内传代由本实验室培养并保存,原核表达载体pET-32a质粒、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)TOP10和Rosetta感受态菌株均由本实验室制备并留存。

1.2 主要试剂

LA Taq酶、EcoR I限制性内切酶、Hind III限制性内切酶、pMD19-T载体购自日本TaKaRa公司;反转录试剂盒(HiScript® II Q RT SuperMix

for qPCR (+gDNA wiper))、实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测试剂盒 (ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix) 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; CY3 标记山羊抗小鼠荧光二抗 (PN0086) 购自武汉皮诺飞生物科技有限公司; 细胞核染料 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 Hc-bli-5 序列特征分析

Hc-bli-5 基因序列由实验室通过靶向筛选研究发现并获得, 利用生物信息软件对所获得的序列进行基因结构分析, 氨基酸同源性分析, 蛋白的功能域预测和系统进化树分析。用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 与 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/-sequence/>) 数据库对 *Hc-BLI-5* 蛋白序列进行功能域和活性位点预测分析, SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和肽生物信号肽分析预测可能的信号肽; 然后将捻转血矛线虫 *Hc-bli-5* 基因的氨基酸序列通过 NCBI-

BLAST 平台, 获得其同源基因并分析氨基酸相似性, 并运用 MEGA11.0 软件分析其同源基因之间的进化关系。同时, 通过 AlphaFold2 程序对 *Hc-BLI-5* 和 *Ce-BLI-5* 的蛋白三维结构及其对应的 BLI-5 Kunitz 结构域三维结构进行预测分析。

1.4 各时期转录水平分析与转录丰度检测

收集捻转血矛线虫发育过程各时期 (包括虫卵、一期 (L1)、二期 (L2)、三期 (L3)、四期 (L4) 幼虫和成虫阶段) 的样本, 分别提取 RNA 后反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 *Hc-18s* 为内参基因, 利用特异性引物进行实时荧光定量 PCR 检测, 引物序列见表 1, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 *Hc-bli-5* 基因转录水平进行相对定量分析; 采用 One-way ANOVA 和 *t* 检验分析, 当 $P>0.05$ 时差异不显著, 当 $P<0.05$ 时差异显著, 当 $P<0.01$ 时差异极显著。基于 WormBase 数据库收录的平均每一百万个转录本中对应于特定基因转录本的数量 (Transcripts per million, TPM), 分析 *bli-5* 与 *bli-4* 2 个基因分别在秀丽隐杆线虫、捻转血矛线虫发育过程各时期相对转录丰度。

表 1 本研究中的引物序列信息
Table 1 Primer sequences information in the study

引物名称 Name of primer	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	目的 Objective
<i>Hc-bli-5</i> F	GGGCAGTCAAACATCAAGCA	qPCR
<i>Hc-bli-5</i> R	TGGAGGTCCAACTTGACCAG	qPCR
<i>Hc-18s</i> F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	qPCR
<i>Hc-18s</i> R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	qPCR
<i>Hc-bli-5</i> F	GGATCCGAATTCTGTCAAACATCAAG	cDNA 扩增
<i>Hc-bli-5</i> R	CGCAAGCTTGGGCAAAGATATTTAC	cDNA 扩增
pET-32a- <i>Hc-bli-5</i> F	GAATTCGTCAAACATCAAGCAAAGAAATG	原核表达
pET-32a- <i>Hc-bli-5</i> R	AAGCTTGGGCAAAGATATTTACACAATAA	原核表达

1.5 多克隆抗体制备

以捻转血矛线虫成虫 cDNA 为模板, PCR 扩增 *Hc-bli-5* 基因, 引物序列见表 1。将扩增产物连接至 pMD19-T 载体, 转化 *E. coli* TOP 10 感受态细胞后挑取阳性克隆进行测序鉴定。构建 pET-32a-*Hc-bli-5* 表达质粒并转化 Rosetta 感受态细胞, 挑选阳性克隆单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 引物序列见表 1。使用 0.001 mol/L IPTG 诱导表达重组蛋白, 于诱导

0、2、4、6 和 8 h 收取菌液样本, 分别向诱导不同时间后的菌液加入 PBS 缓冲液进行冰浴超声波裂解, 分别收集裂解后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 蛋白电泳验证, 以确定最佳诱导时长及重组蛋白的溶解特性。扩大培养后使用亲和镍柱纯化重组蛋白, 按照常规免疫程序对 ICR 小鼠 (每组 6 只) 进行 3 次免疫, 末次免疫后第 7 天尾静脉采血, 利用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 对血清多克隆抗体效价进行检测

测,第7天眼眶采血,37℃静置1 h,4℃过夜,收集析出血清。研磨法提取*H. contortus*全虫蛋白,经蛋白质印迹法(Western blot, WB)验证抗体的结合能力。

1.6 间接荧光免疫组织化学分析

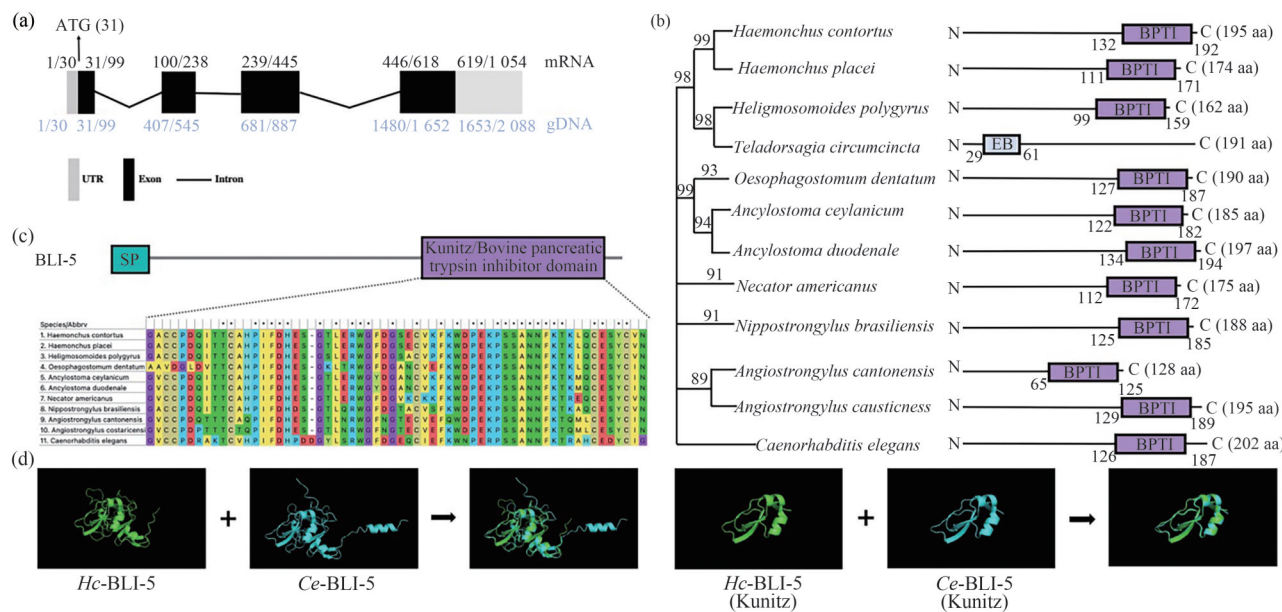
将捻转血矛线虫成虫置于4%多聚甲醛溶液中固定7 d,用不同浓度梯度的酒精逐级脱水,随后包埋于石蜡中并切割成5 μm厚度的蜡片。选取组织结构完整的切片,经二甲苯脱蜡和酒精水化后,于100℃柠檬酸盐抗原修复溶液(pH 6.0)中浸泡20 min,滴加10%山羊血清,4℃封闭过夜。滴加200倍稀释的自制多克隆抗体孵育1 h,用PBS洗涤虫体后滴加100倍稀释的CY3标记山羊抗小鼠荧光二抗(PN0086),于37℃条件下避光孵育1 h。用PBS洗涤后滴加500倍稀释的DAPI,37℃孵育20 min,以进行核染。洗涤后滴加50%甘油进行封片,使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 Hc-bli-5 序列特征

该基因 DNA 全长 2 088 bp,由 4 个外显子和

3 个内含子组成(图 1(a))。*Hc*-BLI-5 蛋白由 195 个氨基酸组成,SignalP-5.0 分析其 N 端存在一个信号肽(1-17aa: MKTALLSLILFSCHIWA),表明其为分泌型蛋白。该蛋白含有一个 Kunitz-type super family(BPTI)结构域(132~192 aa),是一种丝氨酸蛋白酶抑制因子,预示了与 BLI-4 互作的可能。经 WormBase Compara 同源基因分析,在Ⅲ类和Ⅴ类线虫中存在*Hc*-BLI-5 蛋白的同源物,包括柏氏血矛线虫(*H. placei*)、多形螺旋线虫(*Heligmosomoides polygyrus*)、环纹背带线虫(*Teladorsagia circumcincta*)、有齿食道口线虫(*Oesophagostomum dentatum*)、锡兰钩虫(*Ancylostoma ceylanicum*)、十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)、美洲板口线虫(*Necator americanus*)、广州管圆线虫(*Angiostrongylus cantonensis*)、哥斯达黎加管圆线虫(*Angiostrongylus costaricensis*)、巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)及秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)。其中,与柏氏血矛线虫(*H. placei*)的 *bli-5* 基因相似度最高,为 99.42%。进化树分析表明,捻转血矛线虫与柏氏血矛线虫的 *bli-5* 聚集在进化树的同一小分枝上(图 1(b))。其同源物的蛋白



(a) *Hc-bli-5* 基因结构示意图; (b) BLI-5 蛋白进化关系分析; (c) *Hc*-BLI-5 蛋白结构示意图及氨基酸序列同源性比对分析; (d) *Hc*-BLI-5 和 *Ce*-BLI-5 蛋白三维结构图。

(a) Schematic diagram of *Hc-bli-5* gene structure; (b) Analysis of the evolutionary relationship of BLI-5; (c) Schematic diagram of *Hc*-BLI-5 protein structure and comparison analysis of amino acid sequence homology; (d) Three-dimensional structure of *Hc*-BLI-5 and *Ce*-BLI-5.

图 1 *Hc-bli-5* 序列特征分析

Fig. 1 Sequence characteristics of *Hc-bli-5*

结构和功能域与 *Hc-BLI-5* 相似,除环纹背带线虫含有EB功能域之外,其余同源物都含有BPTI功能域(图1(c))。基于蛋白三维结构分析表明,*Hc-BLI-5*和*Ce-BLI-5*的蛋白三维结构具有一定的相似性,尤其是Kunitz结构域(图1(d))。

2.2 *Hc-bli-5* 转录特性

Hc-bli-5 与 *Hc-bli-4* 在捻转血矛线虫的各发育阶段中均有不同水平转录,并且两者具有类似的表达模式。qPCR 结果表明,*Hc-bli-5* 在捻转血矛线虫的各发育阶段中均有不同的转录水平,在 L3 阶段的转录水平最高,而成虫阶段的转录水平最低(图 2)。转录丰度分析表明,*bli-5* 与 *bli-4* 两基因在秀丽隐杆线虫和捻转血矛线虫中都具有较为类似的表达模式,这一转录特性在捻转血矛线虫中尤为明显(图 3)。这对基因在捻转血矛线虫的虫卵期、L1 期和 L3 期均出现了表达拐点,转录水平从虫卵期到 L1 期都呈现迅速下降趋势,在 L1 期出现拐点后,于 L3 期达到最高,L3 期之后又都

出现下降,不同的是,*Hc-bli-4* 在 L3 期之后仍会有起伏的增加,而 *Hc-bli-5* 在 L3 期之后一直呈下降趋势,在成虫期表达最低。由于基因的表达出现在表型发生之前,可以推测 *Hc-bli-5* 可能在捻转血矛线虫虫卵至 L3 期与 *Hc-bli-4* 共同参与捻转血矛线虫的蜕皮过程。

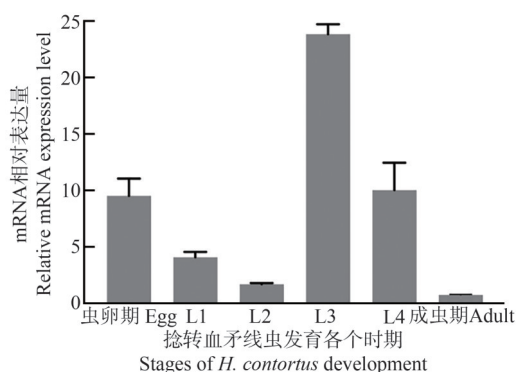


图 2 *Hc-bli-5* 转录特性分析

Fig. 2 Transcription properties of *Hc-bli-5*

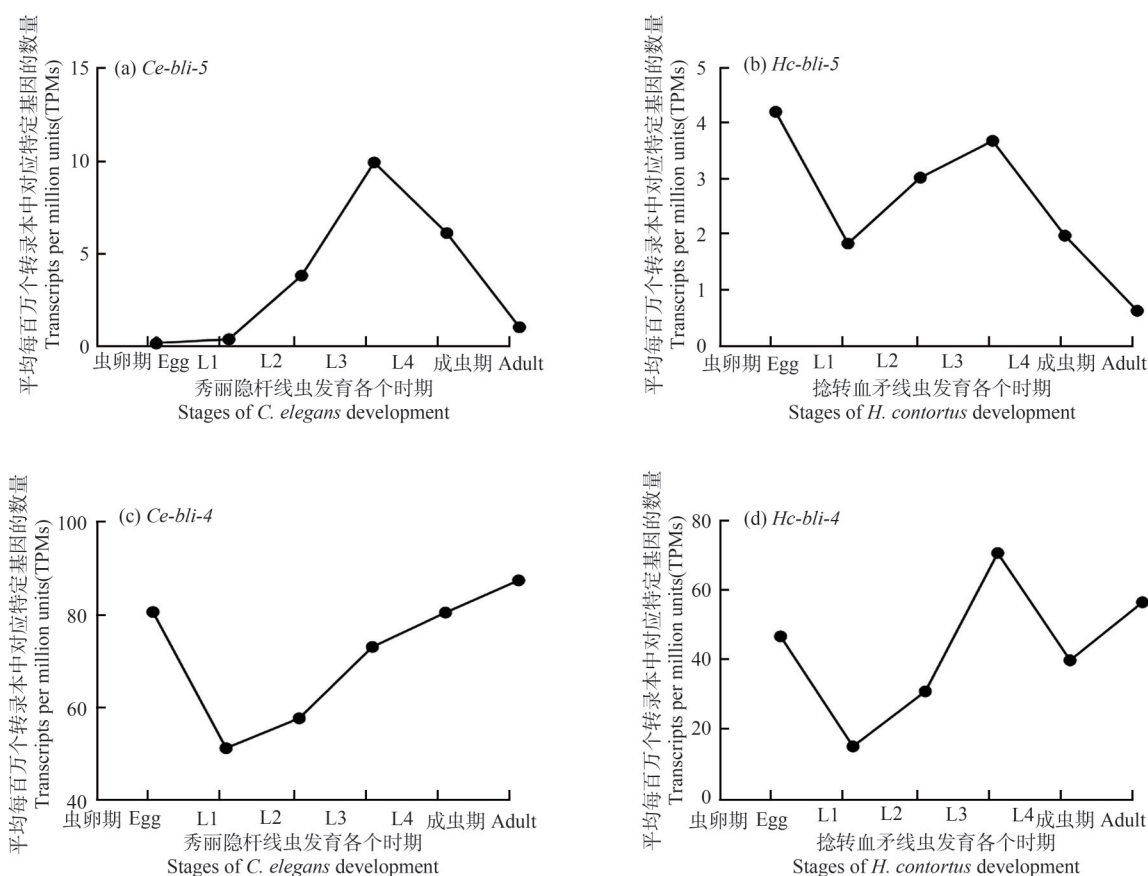


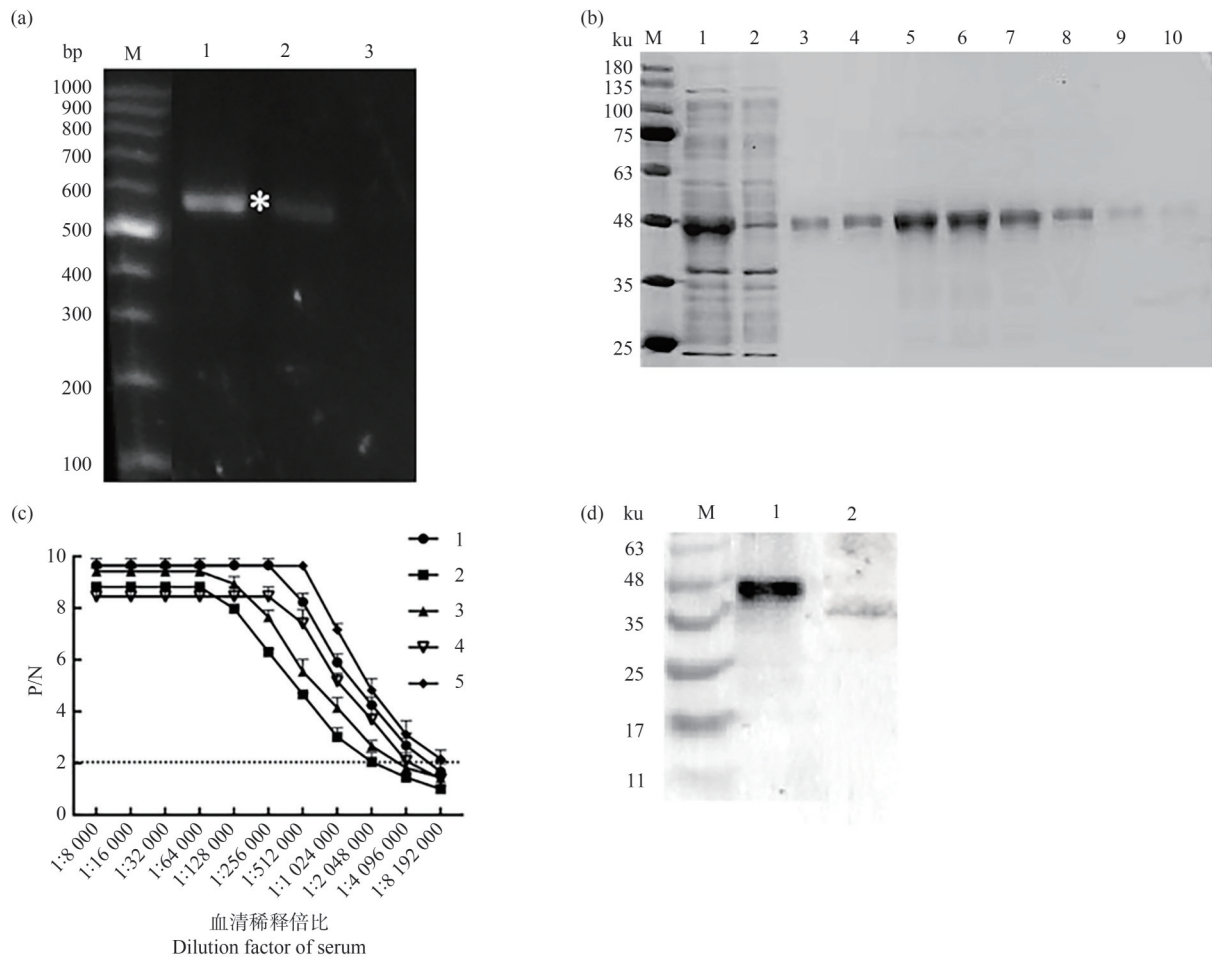
图 3 *bli-5* 和 *bli-4* 在秀丽隐杆线虫和捻转血矛线虫生命周期中的转录丰度

Fig. 3 Transcript abundance of *bli-5* and *bli-4* during the life cycle of *C. elegans* and *H. contortus*

2.3 多克隆抗体制备

克隆获得 *Hc-bli-5* 基因编码序列,长度为 588 bp(图 4(a)),成功构建 pET-32a-*Hc-bli-5* 原核表达质粒。诱导后重组蛋白 r*Hc*-BLI-5 主要表达在包涵体中,100 mmol/L 咪唑洗脱液对该重组蛋白有较好的洗脱和纯化效果(图 4(b))。ELISA 检测第 3

次免疫后,小鼠血清中 r*Hc*-BLI-5 多克隆抗体的效价为 1:2 048 000(图 4(c))。经 Western blot 证实,该多克隆抗体可以识别重组蛋白 *Hc*-BLI-5 及捻转血矛线虫天然蛋白 *Hc*-BLI-5(图 4(d)),有较好的敏感性和特异性,可用于后续基因表达特性分析。



(a) *Hc-bli-5* 基因克隆(M:DL1 000 DNA Marker;*:目的条带);(b) *Hc*-BLI-5-His 重组蛋白的诱导表达及纯化(M:预染蛋白 Marker;1:诱导后的菌液裂解沉淀;2:流穿液;3~10:各梯度浓度咪唑洗脱产物);(c) r*Hc*-BLI-5 多克隆抗体的效价测定;图例中 1~5 表示小鼠编号;(d) 多克隆抗体识别重组蛋白和天然蛋白 WB 鉴定(M:预染蛋白 Marker;1:重组蛋白;2:天然蛋白)

(a) *Hc-bli-5* gene cloning (M: DL1 000 DNA Marker; *: target band); (b) *Hc*-BLI-5-His induced expression and purification of recombinant protein (M: Marker of pre-stained protein; 1: lysis and precipitation of induced bacterial solution; 2: Flow-through; 3-10: product eluted by imidazole in each gradient concentrations); (c) Determination of the potency of polyclonal antibodies(r*Hc*-BLI-5); 1-5 in legend represent numbers of mouse (d) Identification of recombinant protein and natural protein recognized by polyclonal antibody by Western blot (M: Marker of pre-stained protein; 1: recombinant protein; 2: natural protein)

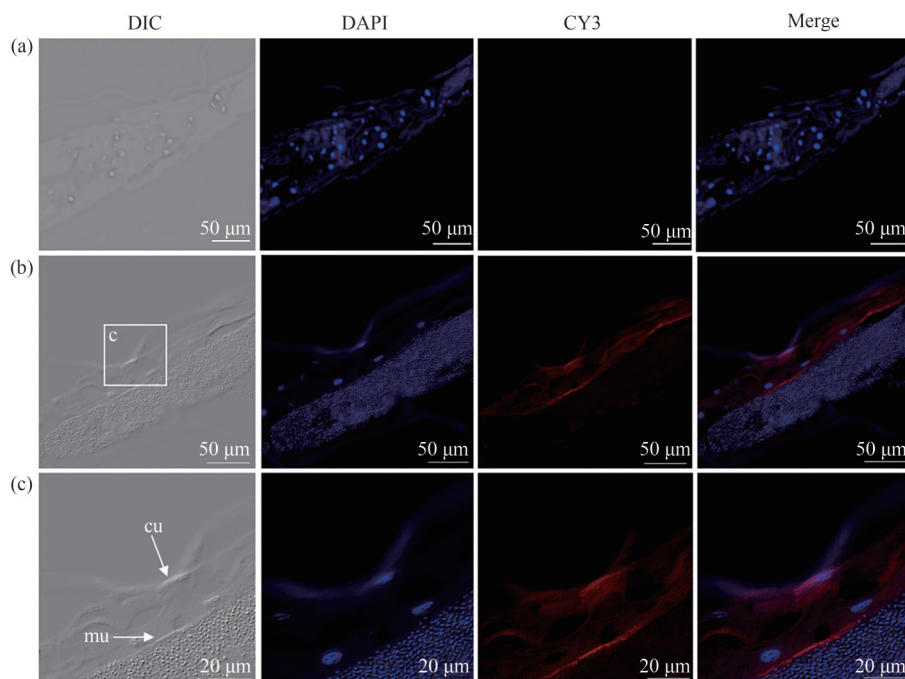
图 4 *Hc-bli-5* 基因克隆、原核表达及蛋白纯化

Fig. 4 Cloning of *Hc-bli-5*, prokaryotic expression and purification of *Hc*-BLI-5

2.4 间接荧光免疫组织化学分析

利用制备的鼠抗 r*Hc*-BLI-5 多克隆抗体进行捻转血矛线虫雌虫成虫阶段天然蛋白 *Hc*-BLI-5 的组织分布研究,结果显示在表皮有较强的

红色荧光信号,且表皮与肌肉组织的细胞核有点状蓝色荧光信号,证明 *Hc*-BLI-5 蛋白表达后主要分布于捻转血矛线虫的表皮和肌肉组织(图 5)。



DIC: 微分干涉差成像; CY3: 红色荧光蛋白; Merge: 融合成像; cu: 表皮; mu: 肌肉

(a) 阴性对照; (b) *Hc*-BLI-5 定位; (c) *Hc*-BLI-5 定位局部放大。

DIC: Differential interference contrast; CY3: The red fluorescent protein; Merge: Fusion imaging; cu: cuticle; mu: muscle

(a) Negative control; (b) Organizational orientation of *Hc*-BLI-5; (c) Local zoom.

图 5 *Hc*-BLI-5 在捻转血矛线虫雌性成虫体内的免疫荧光组织定位分析 (纵切图)

Fig. 5 IHF of *Hc*-BLI-5 in female adults of *H. contortus* (longitudinal profile)

3 讨 论

蜕皮是线虫生长发育周期中必不可少的一个环节, 包括 3 个重要部分, 即皮层溶离、新皮合成、旧皮脱落, 在这 3 个阶段均可发生蜕皮障碍。其中, 皮层溶离与新皮合成环节涉及多种蛋白酶, 在这 2 个阶段更容易发生蜕皮障碍^[10,16]。

皮层溶离作为蜕皮过程的第一步, 该过程中需要不同的蛋白酶及其抑制因子降解旧表皮与皮下组织之间的连接, 目前已知发挥该功能的蛋白酶有 BLI-4、NAS-36、NAS-37、CPZ-1、BLI-5 和 MLT-11^[16-19]。新皮合成涉及胶原合成、加工与交联, 该过程需要 DPY-18、PHY-2、PDI-2、BLI-3 和 BLI-4 和 DPY-31 等关键的酶来实现^[13,20-22]。在新皮合成这个复杂的过程中, 参与新皮合成过程的某一基因一旦缺失, 将致使虫体无法合成新皮, 从而引起蜕皮障碍。目前已知 *dpy-18* 或 *phy-2* 的缺失会引起虫体粗短, *pdi-2* 缺失会导致胚胎致死、无法孵化; *sec-23* 缺失会引起蜕皮缺陷, 即虫体的头部卡在旧的角质层内, 或是形成的新表皮十分脆弱; *bli-3* 和 *bli-4* 的

缺失均会导致成虫表皮起泡样的表型^[23]。

线虫蜕皮过程中皮层溶离和新皮合成 2 个阶段受到 *bli-5* 的调控。近年来, 在秀丽隐杆线虫中发现了 *blister-5* (*bli-5*) 基因, 其编码的蛋白 BLI-5 是一种库尼茨 (Kunitz) 型丝氨酸蛋白酶抑制因子, 在皮层溶离的过程中能够防止 BLI-4 (一种丝氨酸蛋白酶) 过度降解旧表皮和皮下组织, 进而参与秀丽隐杆线虫蜕皮过程^[14-15,24]。目前, 课题组已在捻转血矛线虫中鉴定获得了 BLI-5 的同源物, 本研究发现其与秀丽隐杆线虫的 BLI-5 序列相似性较高且蛋白结构相似, 不仅如此, 二者基因的转录模式也有类似之处, 与秀丽隐杆线虫中的 BLI-5 一样, 捻转血矛线虫中不同发育时期 *bli-5* 和 *bli-4* 的转录丰度具有相似的震荡性变化, 这预示着两者功能也存在相似的可能。除此之外, 研究表明 *Hc*-BLI-5 含有信号肽, 是分泌型蛋白, 且主要表达在表皮和肌肉组织, 说明具有分泌至指定位置参与皮层溶离和新皮合成的可能性。综上, 可以推测 *Hc*-BLI-5 与 *Ce*-BLI-5 相似, 可能通过作用于 BLI-4 而参与线虫蜕皮过程。

4 结 论

本研究明确了 *Hc-bli-5* 的序列特征与表达特性,发现 *Hc-BLI-5* 与秀丽隐杆线虫的同源物具有蛋白结构的相似性,*Hc-bli-5* 与 *Hc-bli-4* 有类似的时期转录特异性,*Hc-BLI-5* 定位于捻转血矛线虫的表皮,这些结果表明 *Hc-bli-5* 可能与 *Hc-bli-4* 相互作用参与蜕皮过程,为进一步阐明其在捻转血矛线虫及其他相关线虫中的作用机制奠定基础。

参考文献 References

- [1] Hou B, Hai Y, Buyin B H, Hasi S R. Research progress and limitation analysis of RNA interference in *Haemonchus contortus* in China [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1079676
- [2] Adduci I, Sajovitz F, Hinney B, Lichtmannsperger K, Joachim A, Wittek T, Yan S. Haemonchosis in sheep and goats, control strategies and development of vaccines against *Haemonchus contortus* [J]. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 2022, 12(18): 2339
- [3] Carson A, Reichel R, Bell S, Collins R, Smith J, Bartley D. *Haemonchus contortus*: An overview [J]. *The Veterinary Record*, 2023, 192(1): 26-28
- [4] Chaparro J J, Villar D, Zapata J D, López S, Howell S B, López A, Storey B E. Multi-drug resistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in Antioquia, Colombia [J]. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, 2017, 10: 29-34
- [5] Dos Santos J M L, Vasconcelos J F, Frota G A, de Freitas E P, Teixeira M, da Silva Vieira L, Bevilacqua C M L, Monteiro J P. Quantitative molecular diagnosis of levamisole resistance in populations of *Haemonchus contortus* [J]. *Experimental Parasitology*, 2019, 205: 107734
- [6] Duarte E R, Matias A D, Almeida Bastos G, Maia R C, Júnior V S M, Soares A C M, Dos Santos Magaço F, de Oliveira N J F, Dos Santos T A X. Anthelmintic efficacy of trichlorfon and blood parameters of young lambs infected with *Haemonchus contortus* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2019, 272: 40-43
- [7] Tuersong W, Zhou C X, Wu S M, Qin P X, Wang C Q, Di W D, Liu L, Liu H, Hu M. Comparative analysis on transcriptomics of ivermectin resistant and susceptible strains of *Haemonchus contortus* [J]. *Parasites & Vectors*, 2022, 15(1): 159
- [8] Shanley H T, Taki A C, Nguyen N, Wang T, Byrne J J, Ang C S, Leeming M G, Williamson N, Chang B C H, Jabbar A, Sleebs B E, Gasser R B. Comparative structure activity and target exploration of 1,2-diphenylethylenes in *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans* [J]. *International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 2024, 25: 100534
- [9] Rychlák N, Navrátilová M, Kohoutová E, Raisová Stuchliková L, Štěrbová K, Krátký J, Matoušková P, Szoťáková B, Skálová L. Flubendazole carbonyl reduction in drug-susceptible and drug-resistant strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: Changes during the life cycle and possible inhibition [J]. *Veterinary Research*, 2024, 55(1): 7
- [10] Lažetić V, Fay D S. Molting in *C. elegans* [J]. *Worm*, 2017, 6(1): e1330246
- [11] Koseki K, Yamamoto A, Tanimoto K, Okamoto N, Teng F, Bito T, Yabuta Y, Kawano T, Watanabe F. Dityrosine crosslinking of collagen and amyloid- β peptides is formed by vitamin B₁₂ deficiency-generated oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12959
- [12] Frand A R, Russel S, Ruvkun G. Functional genomic analysis of *C. elegans* molting [J]. *PLoS Biology*, 2005, 3(10): e312
- [13] Winter A D, Page A P. Prolyl 4-hydroxylase is an essential procollagen-modifying enzyme required for exoskeleton formation and the maintenance of body shape in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(11): 4084-4093
- [14] Page A P, McCormack G, Birnie A J. Biosynthesis and enzymology of the *Caenorhabditis elegans* cuticle: Identification and characterization of a novel serine protease inhibitor [J]. *International Journal for Parasitology*, 2006, 36(6): 681-689
- [15] Stepek G, McCormack G, Page A P. The kunitz domain protein BLI-5 plays a functionally conserved role in cuticle formation in a diverse range of nematodes [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2010, 169(1): 1-11
- [16] Davis M W, Birnie A J, Chan A C, Page A P, Jorgensen E M. A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Development*, 2004, 131(23): 6001-6008
- [17] Stepek G, McCormack G, Birnie A J, Page A P. The astacin metalloprotease moulting enzyme NAS-36 is required for normal cuticle ecdysis in free-living and parasitic nematodes [J]. *Parasitology*, 2011, 138(2): 237-248
- [18] Suzuki M, Sagoh N, Iwasaki H, Inoue H, Takahashi K. Metalloproteases with EGF, CUB, and thrombospondin-1 domains function in molting of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Biological Chemistry*, 2004, 385(6): 565-568
- [19] Hashmi S, Zhang J, Oksov Y, Lustigman S. The *Caenorhabditis elegans* cathepsin Z-like cysteine protease, *Ce-CPZ-1*, has a multifunctional role during the worms' development [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(7): 6035-6045
- [20] Novelli J, Ahmed S, Hodgkin J. Gene interactions in *Caenorhabditis elegans* define DPY-31 as a candidate procollagen C-proteinase and SQT-3/ROL-4 as its predicted major target [J]. *Genetics*, 2004, 168(3): 1259-1273
- [21] Stepek G, McCormack G, Page A P. Collagen processing and cuticle formation is catalysed by the astacin metalloprotease DPY-31 in free-living and parasitic nematodes [J]. *International Journal for Parasitology*, 2010, 40(5): 533-542
- [22] Edens W A, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade J M, Lee T, Edens H A, Tang X, Sullards C, Flaherty D B, Benian G M, Lambeth J D. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91 $phox$ [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 154(4): 879-891
- [23] Peters K, McDowall J, Rose A M. Mutations in the *bli-4* (1) locus of

Caenorhabditis elegans disrupt both adult cuticle and early larval development [J]. *Genetics*, 1991, 129(1): 95-102

[J]. *Current Biology: CB*, 2007, 17(11): R425-R434

[24] Moss E G. Heterochronic genes and the nature of developmental time

责任编辑: 秦梅



第一作者简介：汤洪宁，浙江大学动物科学学院 2021 级兽医专业硕士研究生，专业方向为动物疫病防控与公共卫生。曾获浙江大学优秀团员、优秀学生、优秀研究生、二等奖学金、一鸣“启智”奖学金等荣誉称号，曾在《动物医学进展》期刊以第二作者身份发表学术论文。



通讯作者简介：杨怡，副研究员，硕士生导师。主要从事动物疫病检测防控、动物寄生虫病学等方面的研究、教学、推广工作。现兼任浙江省畜牧兽医学会兽医公共卫生分会理事。先后主持国家自然科学基金青年项目、973 计划子课题、浙江省“三农六方”科技协作计划、浙江省基础公益研究计划等 9 项，参与国家重点研发计划、国家自然科学基金面上项目、“863”计划子课题、浙江省重大科技专项等国家级、省部级项目 10 余项，在 *PLoS Pathogens*, *mSystems*, *International Journal for Parasitology* 等国内外知名学术期刊发表论文 40 余篇，获授权专利 3 件，参编教材专著 3 部，获浙江省农业农村厅技术进步奖二等奖 1 项。