

# 细粒棘球绦虫新疆株胆汁酸钠协同转运蛋白基因的克隆及序列分析

杨梅<sup>1,2</sup>, 梁小弟<sup>2</sup>, 李军<sup>3</sup>, 李亮<sup>3</sup>, 张富春<sup>1</sup>, 张文宝<sup>3</sup>

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046
2. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆重大疾病医学重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 乌鲁木齐 830011

**摘要** 从新疆株细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*, Eg) 原头蚴中克隆胆汁酸钠协同转运蛋白 (sodium-bile acid co-transporter, EgSBACT) 基因, 进行序列测定和生物信息学分析。首先设计 EgSBACT 基因特异性引物, 用 RT 及 PCR 方法从新疆株细粒棘球绦虫原头蚴提取总 RNA, 将其反转录成 cDNA 后扩增 EgSBACT 基因并将其克隆至原核表达载体 pET30a 中, 测序鉴定序列并进行生物信息学分析。结果显示, RT-PCR 扩增出一长度约 650 bp 的基因, 测序显示其长度为 654 bp, 序列与 Genbank 公布的 EUB59978.1 完全一致, 其编码 217 个氨基酸, 预测其等电点为 9.28。同源性分析发现, EgSBACT 蛋白序列与中华枝睾吸虫 SBACT (GenBank: GAA57409.1) 同源性最高, 达到 43%。进化树分析表明, 细粒棘球绦虫的 SBACT 蛋白与吸虫纲的 SBACT 相聚集, 在进化树上处于一枝, 而与其他物种亲缘性较远。由此表明, 本研究成功克隆出细粒棘球绦虫 EgSBACT 基因。

**关键词** 细粒棘球绦虫; EgSBACT; 序列分析

包虫病是由细粒棘球绦虫 (Eg) 引起, 可导致人类相当高的致病率和死亡率, 这种全球性的疾病是很难诊断、治疗和控制的<sup>[1]</sup>。中国西北广大农牧区是细粒棘球绦虫所致囊型包虫病 (cystic echinococcosis, CE) 的主要流行区<sup>[2]</sup>。细粒棘球绦虫生活史经历虫卵—六钩蚴—原头蚴—成虫等多个阶段, 原头蚴发育阶段是引起人体包虫病的关键环节<sup>[3]</sup>。

细粒棘球绦虫生物学的一个显著特征是原头蚴有双向发育的潜能。幼虫被狗摄食后将在其肠中向有性方向发育以形成成虫。与此相反, 如果一个包虫囊泡在中间宿主或人体内破裂, 每个释放的原头蚴能够无性分化成一个新的包虫囊泡, 意味着二级囊泡的结果。在包囊中的幼虫具有一个独一无二的特征是双向发育的能力, 在狗的胃肠道发育成成虫或者在中间宿主 (人) 发育成二级包囊, 发育成成虫是受胆汁酸引发的过程<sup>[4]</sup>。已显示胆汁酸在原头蚴向成虫分化中有重要作用, 并且细粒棘球绦虫可表达胆汁酸受体和转运蛋白来刺激相关通路。已确定了几种胆汁酸通路的下游信号转导

成分, 在细粒棘球绦虫基因组或者转录组没有发现 TGR5 类似的受体, 但确定了 4 个基因作为胆汁酸信号的核激素受体候选基因 (EG\_00119、EG\_00780、EG\_04405 和 EG\_08428), 它们编码的蛋白与法尼酯 X 受体 (FXR) 和维生素 D 受体 (VDR) 有超过 20% 的氨基酸一致性并且包含一个 DNA 结合结构域和一个配体结合结构域。还发现了编码 5 种胆汁酸钠协同转运蛋白和 7 种多药拮抗蛋白 (MRPs) 的基因<sup>[5]</sup>, 还有胆汁酸代谢相关基因, 包括固醇调节元件结合蛋白 1 和胆汁酸葡萄糖苷酶相关蛋白。蜕皮激素或其他性类固醇激素可以在寄生线虫通过核激素受体<sup>[6,7]</sup>调节蜕皮, 因此假设从宿主来的外在胆汁酸以一个类似的方式在细粒棘球绦虫发育中起重要作用是合理的<sup>[1]</sup>。

胆汁酸在原头蚴分化中发挥作用, 首先转运进入细胞, 胆汁酸钠协同转运蛋白是关键蛋白。本研究从新疆株细粒棘球绦虫中克隆出一种胆汁酸钠协同转运蛋白基因 EG\_05139 (GenBank: EUB59978.1), 并进行序列测定、生物信息学分析。

收稿日期: 2015-04-13; 修回日期: 2015-06-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31260272); 新疆医科大学科研创新基金项目 (XYDCX201423)

作者简介: 杨梅, 博士研究生, 研究方向为新疆重大疾病的分子生物学机制, 电子信箱: 768144163@qq.com; 张文宝 (通信作者), 研究员, 研究方向为包虫病的防控, 电子信箱: wenbaozhang2013@163.com; 张富春 (共同通信作者), 教授, 研究方向为包虫病的防控, 电子信箱: zfcxju@xju.edu.cn

引用格式: 杨梅, 梁小弟, 李军, 等. 细粒棘球绦虫新疆株胆汁酸钠协同转运蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 科技导报, 2016, 34(2): 215-220; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.2.036

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

细粒棘球蚴和 pET30a 原核表达载体由新疆医科大学第一附属医院医学研究中心新疆包虫病基础医学重点实验室提供。总 RNA 提取试剂和反转录试剂盒均购自 Thermo Scientific 生物技术有限公司。限制性核酸内切酶、DNA 连接酶均购自大连宝生物公司。引物由上海生物工程有限公司合成。其他生物化学试剂均购自上海生物工程有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *EgSBACT* 基因全长的查找及引物设计

根据 Genbank 中已公布的 *EgSBACT* (EG\_05139, GenBank: EUB59978.1) 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计引物。合成 *EgSBACT* 上游引物 P1 (5'—cgcGGATCCATGCCATTGATGCTCTTCATCTACGGCC—3') 和下游引物 P2 (5'—ataagaatGCGGCCGCTAGGGGATTATCGTTTCAAATTTCTGATCCTTC—3', 斜体字母为酶切位点, 小写字母为保护碱基), 上下游引物总长度约 85 bp。依据选用的原核表达载体 pET-30a 的酶切位点图谱, 分析 pET-30a 多克隆位点含有 *Bam*H I 及 *Not* I 酶切位点, 且酶切效率较高, 在上下游引物 5' 端分别有 *Bam*H I 及 *Not* I 酶切位点及保护碱基, 不会对 *EgSBACT* 基因进行酶切作用而影响构建和表达。

#### 1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

从新疆绵羊包虫病肝采集得到细粒棘球蚴的原头蚴, 迅速置于液氮中冻存。用 Trizol 法提取总 RNA。总 RNA 经核酸蛋白测定仪 ND1000 定量, 由甲醛变性凝胶电泳检测纯度, 以纯度和完整性符合要求的总 RNA 为模板反转录合成 cDNA。反转录之前要将总 RNA 中残余的 DNA 用 DNase I 消化, 以排除后续 PCR 实验中的 DNA 干扰。此实验步骤基于 Thermo Scientific 公司 kit。

#### 1.2.3 *EgSBACT* 基因的扩增

取 2 μL 细粒棘球蚴 cDNA 为模板, 以合成的 *EgSBACT* 上下游引物 P1, P2 为引物, PCR 反应条件为 95°C 5 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C 7 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切胶回收目的片段。经 *Bam*H I 及 *Not* I 双酶切回收的目的片段和 pET30a 原核表达质粒后, 再经琼脂糖凝胶电泳检测及回收, 回收经双酶切的目的片段和 pET30a 质粒, 通过 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接成重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3), 进行 37°C 液体培养。取 150 μL 转化的大肠杆菌培养液涂板 (Kana<sup>+</sup>), 37°C 过夜培养, 挑选菌落进行 PCR 检测, 扩大培养阳性克隆, 从阳性克隆菌液中提取重组质粒送测序及进行双酶切鉴定, PCR 鉴定 (用 *EgSBACT* 上下游引物 P1 及 P2 扩增)。送菌液及重组质粒 pET30a-*EgSBACT* 至上海生工生物工程有限公司和华大生物有限公司测序, 确定其插入片段正确, 测序采用 Sanger 测序法, 使用 pET-30a 载体引物, 上游引物 T7: 5'—ACATC-CACTTTGCCTTTCTC—3', 下游引物 T7 TER: 5'—TGCTAGT-TATTGCTCAGCGG—3', 双向测序。

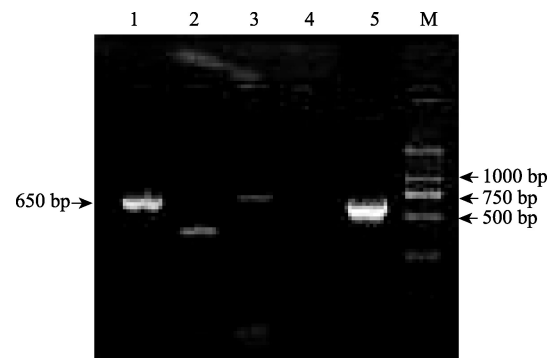
#### 1.2.4 新疆株细粒棘球蚴 *EgSBACT* 的序列分析

基因序列同源性分析采用美国国立生物信息中心 (NCBI) 网站 BLAST (basic local alignment search tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 程序完成, 进化树分析采用 Mega5 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 *EgSBACT* 基因的 RT-PCR 扩增

经 RT-PCR 扩增, 获得一条长约 650 bp 的特异性扩增条带, 与预期扩增的目的片段大小相符 (图 1)。



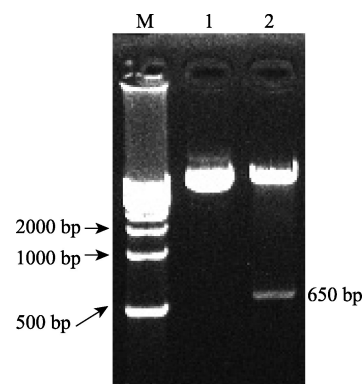
M—DNA 标准 DL 2000; 1—*EgSBACT* 基因 RT-PCR 产物; 2, 3, 5—阳性基因对照; 4—阴性水对照

图 1 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of amplification of gene by RT-PCR

### 2.2 *EgSBACT* 基因的克隆与鉴定

挑取菌落为模板, 采用菌落 PCR 方法进行阳性克隆鉴定, 得到与预期相符的约 650 bp 的特异性片段。重组质粒采用 *Bam*H I 和 *Not* I 进行双酶切, 酶切结果与预期相符 (图 2)。



M—DNA 标准 DL 2000; 1—未酶切的重组质粒 pET30a-*EgSBACT*; 2—重组质粒的 *Bam*H I / *Not* I 双酶切鉴定

图 2 重组质粒 pET30a-*EgSBACT* 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET30a-*EgSBACT* by enzyme digestion

### 2.3 *EgSBACT* 基因的序列测定

对鉴定为阳性的重组质粒插入序列进行序列测定, 结果

表明,测序结果与 Genbank 已公布的 EUB59978.1 序列完全一致(图 3)。该基因的开放阅读框由 654 bp 组成,编码 217 个氨基酸残基,预测该蛋白相对分子量约为 24 kD, pI 为 9.28。

Identities (一致性)	Gaps (缺口)	Strand (链)
654/654 (100%)	0/654 (0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGCCATTGATGCTCTTCTACCTACGGCCGCTTCTTCTCGATACCAGCCATCCACATC	60
Sbjct 1	ATGCCATTGATGCTCTTCTACCTACGGCCGCTTCTTCTCGATACCAGCCATCCACATC	60
Query 61	CCCTACACCCAAATCGCCGGCCAACTTGTACGTCGTTCCTGCTTCCCGTGTCTCGGCATG	120
Sbjct 61	CCCTACACCCAAATCGCCGGCCAACTTGTACGTCGTTCCTGCTTCCCGTGTCTCGGCATG	120
Query 121	TTGATCAAATGGCGTTTCTTAATCCGCTAAGCGCATGGTTGCGCTATTCTCGGCCA	180
Sbjct 121	TTGATCAAATGGCGTTTCTTAATCCGCTAAGCGCATGGTTGCGCTATTCTCGGCCA	180
Query 181	TTGGCTTTTCTTCTATCTTTATCATCATGGATTGGCATCTACGCAACTTGCCATC	240
Sbjct 181	TTGGCTTTTCTTCTATCTTTATCATCATGGATTGGCATCTACGCAACTTGCCATC	240
Query 241	TATGCTCTCTGGGTGCTTCTCTTCTTCTCCCATAGCGGCTGCTCTACCTGGATG	300
Sbjct 241	TATGCTCTCTGGGTGCTTCTCTTCTTCTCCCATAGCGGCTGCTCTACCTGGATG	300
Query 301	GGTCTCTCTGCTGCTACTACTGCTTTCTGTGCGGAGTTCGAGCTGAGATTCTC	360
Sbjct 301	GGTCTCTCTGCTGCTACTACTGCTTTCTGTGCGGAGTTCGAGCTGAGATTCTC	360
Query 361	ACCATATCCATCGAGCGGCATCCAGAACAATGGAATTGCTATTCTAGTACTACTCTAC	420
Sbjct 361	ACCATATCCATCGAGCGGCATCCAGAACAATGGAATTGCTATTCTAGTACTACTCTAC	420
Query 421	TCAATGCCACAACCGAGGAGACATGGAGCAGGATACCTCTCTAGTGGTTTCATC	480
Sbjct 421	TCAATGCCACAACCGAGGAGACATGGAGCAGGATACCTCTCTAGTGGTTTCATC	480
Query 481	ACACCGTTTCCGTTAATGCTTGCTTACGCGGTTGTGGCGATTAGGGAAGAAAGTGTTCG	540
Sbjct 481	ACACCGTTTCCGTTAATGCTTGCTTACGCGGTTGTGGCGATTAGGGAAGAAAGTGTTCG	540
Query 541	CAGTCTGTCGGAAGAAAAGATAACAGAGCTGGTAGAACGGATGATGAGGAACAGCAG	600
Sbjct 541	CAGTCTGTCGGAAGAAAAGATAACAGAGCTGGTAGAACGGATGATGAGGAACAGCAG	600
Query 601	AAGGGACTGAAATCCTCTCGAAGGATCAGAATTTTGAACGATAATCCCTAG	654
Sbjct 601	AAGGGACTGAAATCCTCTCGAAGGATCAGAATTTTGAACGATAATCCCTAG	654

Query—Genbank 已公布的 EUB59978.1 序列;  
Sbjct—插入序列(测序结果)

图 3 重组质粒 pET30a-EgSBACT 的插入基因序列测序结果  
Fig. 3 Sequencing results of the insertion gene sequence of recombinant plasmid pET30a-EgSBACT

### 2.4 EgSBACT 蛋白的进化树分析

采用 Mega 5 软件对用 ncbi.nlm.nih.gov/blast 所选择物种的 SBACT 蛋白进行进化树分析(图 4),从进化树看出,细粒棘球绦虫的 SBACT(EgSBACT)与吸虫纲的 SBACT 相聚集,在进化树上处于一枝,而与其他物种亲缘性较远,这与动物分类学相一致,细粒棘球绦虫属绦虫纲,绦虫纲与吸虫纲同属于

扁形动物门。人类的一种 SBACT5 与绵羊的预测 SBACT5 相聚集,在进化树上处于一枝,犬属的预测 SBACT1 同型与绵羊的预测 SBACT4 同源性相对较近,犬属的回肠 SBACT 与绵羊的预测回肠 SBACT4 相聚集,在进化树上处于一枝,同源性相对较近。脊椎动物与昆虫及寄生虫类动物的亲缘关系较远;人的 SBACT 与绵羊、犬科动物的 SBACT 家族成员相接近,但与 EgSBACT 亲缘性较远。

### 3 讨论

包虫(棘球蚴)病是由 Eg 引起的重要的人畜共患寄生虫病,呈世界性分布<sup>[8]</sup>。中国是包虫病的重灾区,全国 23 个省、自治区人畜间原发性流行,发病面积占全国总面积的 86.9%<sup>[9]</sup>,西北地区人群平均患病率为 1%~2%<sup>[10]</sup>,藏族人群的患病率可达 12%。人体包虫病以慢性消耗为主,晚期患者常常丧失劳动能力。包虫病目前的治愈手段为手术摘除包囊,国外手术死亡率为 1.7%~10.9% 不等<sup>[11]</sup>,中国手术死亡率为 0.16%。但因包虫囊结构的多样,生长的多部位性和幼虫原头蚴可在病人体内继发性感染,手术后有 12.8%~20.2% 的患者复发。包虫病手术及治疗费很高,一般肝包虫外科手术每例约需 8000 元以上。由于包虫病在中国西部地区流行非常严重,国家已将该病列入免费治疗救助计划,并给予专项经费用于防控。但几年的实践表明包虫病的控制非常困难,急需技术措施的突破。

控制包虫病,各国流行都以“切断病原循环链”为方针,从管理、教育和实施必要技术措施 3 个方面开展综合控制,其内容包括宣传教育,严格的牲畜屠宰管制和对犬的一年 8 次定期驱虫,经过 30~40 年的努力,冰岛、新西兰和澳大利亚的塔斯马尼亚岛对包虫病取得了控制,但在其他国家包虫病仍然高发流行。在中国,由于该病的流行涉入了许多社会因素,比如居民自宰自食的生活习惯等,以及庞大的中间宿主群(羊)使得这些措施很难实施。由于犬的数量远远少于中间宿主的数量,对犬进行免疫预防可以大大简化控制措施<sup>[12]</sup>。综合防治试点已经证明在病原循环链中切断终末宿主这个环节是可以控制并消灭棘球蚴病的<sup>[13]</sup>。进行犬抗 Eg 疫苗研制首先必须对 Eg 成虫的发育机制,尤其对分子调控机制作深入的研究,才能取得突破。成虫分化最重要的一个培养条件是培养基是否有犬胆汁——加入胆汁原头蚴则向成虫发育,无胆汁原头蚴则发育为包囊。而犬胆汁的主要成分是胆汁酸,胆汁酸经常以钠盐的形式存在,故也称胆汁酸盐。并且已经预测到了 Eg 专门运输胆汁酸盐的蛋白基因和胆汁酸盐作用的靶蛋白基因<sup>[1]</sup>。

人类胆汁酸池容积为 2~4 g,肝脏合成的胆汁酸分泌进入肠道后大部分被重吸收,但每天仍有约 600 mg 的胆汁酸经大便排出,为了维持胆汁酸池的平衡,肝脏每天合成大约 600 mg 的胆汁酸<sup>[14]</sup>。在肝脏胆固醇是合成胆汁酸的原料,也是体内胆固醇的主要消除方式,人体肝细胞合成胆汁酸主要有两条途径:经胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxy-

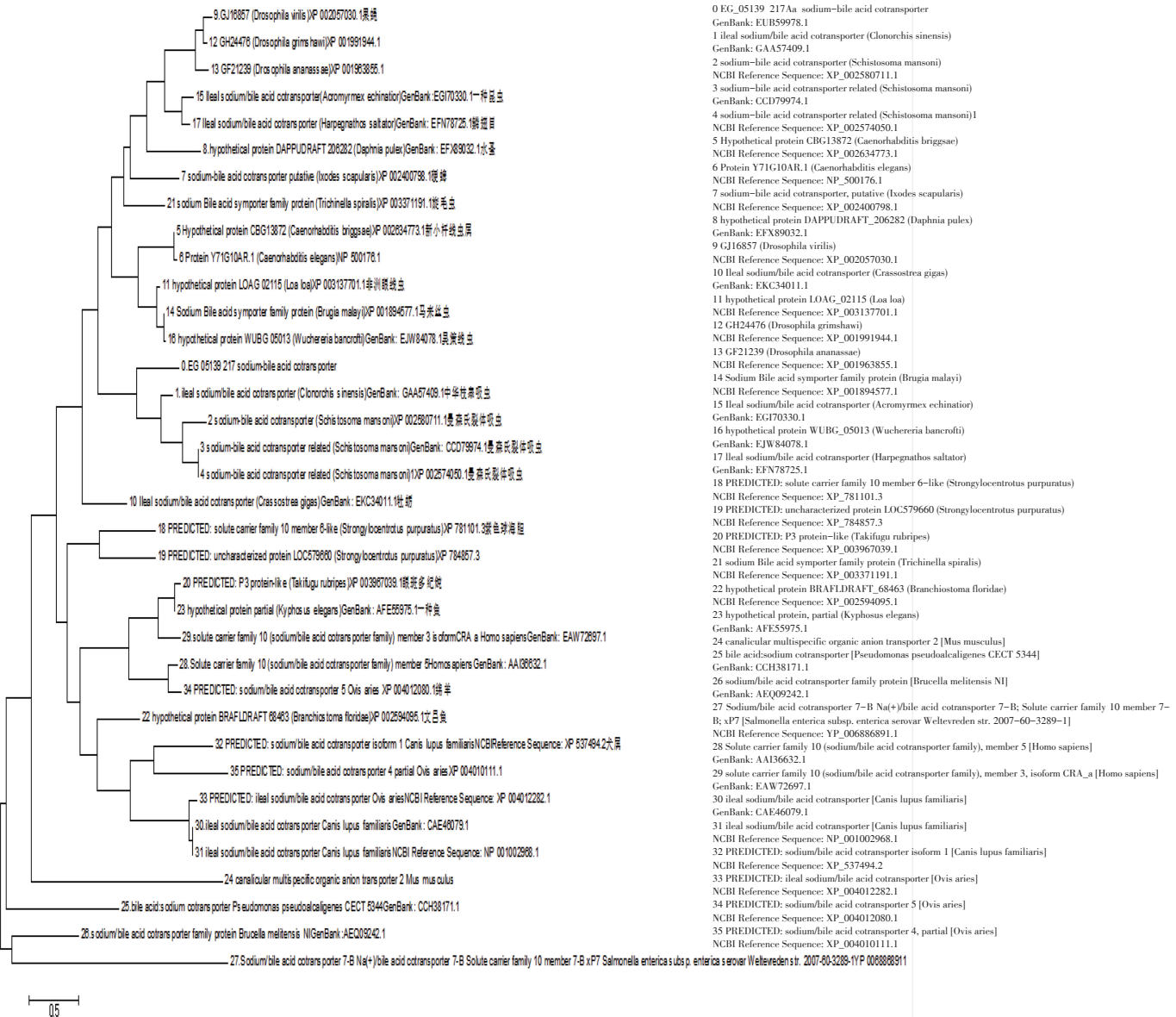


图4 不同物种SBACT蛋白的进化树分析

Fig. 4 Analysis of phylogenetic tree of SBACT protein from different species

lase, CYP7A1)的经典途径和27 $\alpha$ 羟化酶(27 $\alpha$ -hydroxylase, CYP27A1)的替代途径,成人体内90%~95%的胆汁酸由前者合成。由于结合胆汁酸以阴离子的形式存在从而不能以扩散的形式通过细胞膜,这就需要借助一些转运蛋白的帮助来完成整个循环<sup>[15]</sup>。胆盐输出泵(BSEP)、多药耐药性相关蛋白2(multidrug resistance-associated protein 2, MRP2)和多药耐药性3(multidrug resistance 3, MDR3)将肝细胞内的胆汁酸泵入胆总管,其中BSEP主要运输单价胆汁酸,MRP2运输二价胆汁酸和胆红素,MDR3运输胆汁酸与胆固醇的混合微胶粒,能将肝细胞合成的胆汁酸转运至胆管,胆汁酸进入肠道后,大多数在回肠末端依靠顶端胆汁酸钠协同转运蛋白(apical sodium bile acid transporter, ASBT)进入肠上皮细胞后与

肠道胆汁酸结合蛋白(intestinal bile acid binding protein, IB-ABP)结合,由OST $\alpha/\beta$ 同源二聚体介导进入门静脉血液,结合后的胆汁酸经门静脉入肝窦间隙由肝细胞表面具有胆汁酸高亲和力的牛磺胆酸钠转运蛋白(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)介导进入肝细胞并完成一个循环<sup>[16,17]</sup>。

在原核和真核生物都发现了溶质运输蛋白家族10(proteins of solute carrier family 10, SLC10; sodium bile acid cotransporter family, SBF);这个家族由Na<sup>+</sup>/胆汁酸协同转运蛋白(Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporters)组成。SLC10A2[SLC10成员2还称为回肠Na<sup>+</sup>/胆汁酸转运蛋白基因(ileal Na<sup>+</sup>/bile acid transporter gene, ISBT),或者称顶端钠依赖的胆汁酸盐转运

蛋白基因(apical sodium-dependent bile salt transporter gene, ASBT)定位在人13q33,并且这个基因产物在从回肠和肾脏吸收胆汁酸上起决定性作用<sup>[18]</sup>。

胆汁是一种向药性的溶液。华支睾吸虫的幼虫表现出向胆汁的趋化性和在胆汁中长成成虫。胆汁的成分被认为激活了华支睾吸虫幼虫的趋化迁移。胆汁对胃肠道寄生虫提供了一个关键的暗示。它激活了代谢通路并且增加了寄生虫的运动性是众所周知的。胆汁的作用方式尚不清楚,但认为是诱导了非特异性的刺激而导致了肌肉运动。至于华支睾吸虫的情况,在目前的研究中观察证实胆汁既增强了后囊蚴脱囊也增加了它们的运动力。这些研究结果支持以前的观点,认为胆汁是肠道寄生虫的重要激活剂之一<sup>[19]</sup>。

在细粒棘球绦虫基因组或者转录组中已发现胆汁酸的核受体候选基因和胆汁酸钠协同转运蛋白和多药拮抗蛋白(MRPs)的基因<sup>[1]</sup>。本研究组结合前期工作,已从新疆株细粒棘球绦虫中克隆出胆汁酸核受体基因,在Eg,推测胆汁酸钠协同转运蛋白可将宿主的胆汁酸转运进入Eg细胞内,从而与其细胞内的胆汁酸核受体相结合而发挥调控Eg发育分化作用。

本研究成功地从新疆株细粒棘球绦虫中克隆出EgSBACT基因,测序结果与Genbank中已公布的EgSBACT(GenBank: EUB59978.1)完全一致。同源性分析发现,EgSBACT蛋白与中华枝睾吸虫SBACT蛋白(GenBank:GAA57409.1)同源性最高,达到43%(93/214)~61%(131/214),与曼森氏裂体吸虫次之,达到41%(91/223)~60%(135/223);而与丝虫、线虫、人、及犬、绵羊同源性在26%~34%。对SBACT蛋白进行进化树分析,从进化树看出,细粒棘球绦虫的SBACT蛋白与吸虫纲的SBACT蛋白相聚集,在进化树上处于一枝,而与其他物种亲缘性较远,这与动物分类学相一致,细粒棘球绦虫属绦虫纲,绦虫纲与吸虫纲同属于扁形动物门。人的SBACT与绵羊、犬科动物的SBACT家族成员相接近,但与EgSBACT亲缘性较远,符合物种进化规律。

#### 4 结论

从新疆株细粒棘球绦虫中扩增出EgSBACT基因并克隆至原核表达载体pET30a上,测序结果与Genbank中公布的EgSBACT完全一致,显示已成功构建了原核重组表达质粒pET30a-EgSBACT。同源性分析发现,EgSBACT蛋白与中华枝睾吸虫SBACT蛋白(GenBank:GAA57409.1)同源性最高。蛋白进化树分析,EgSBACT蛋白与吸虫纲的SBACT蛋白在进化树上处于一枝。

#### 参考文献 (References)

- [1] Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(10): 1168-1175.
- [2] 余森海. 棘球蚴病防治研究的国际现状和对我们的启示[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2008, 26: 241-244.  
Yu Senhai. The international situation on prevention and treatment of echinococcosis and its enlightenment to us[J]. *Journal of Parasitic and Parasitic Diseases in China*, 2008, 26: 241-244.
- [3] Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(1): 107-135.
- [4] Smyth J D. *In vitro* Cultivation of Parasitic Helminths[M]. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- [5] Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, et al. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3)[J]. *Biology Chemistry*, 2000, 275(4): 2905-2910.
- [6] Hernández-Bello R, Ramírez-Nieto R, Muñoz-Hernández S, et al. Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 2011: 1-10.
- [7] Tzertzinis G, Egana A L, Palli S R, et al. Molecular evidence for a functional ecdysone signaling system in *Brugia malayi*[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2010, 4(3): e625.
- [8] McManus D P, Zhang W, Li J, et al. Echinococcosis[J]. *Lancet*, 2003, 362(9392): 1295-1304.
- [9] Chi P S, Fan Y L, Zhang W B, et al. The epidemic situations of cystic echinococcosis in China[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 1989, 10(1): 35-38.
- [10] Coordinating Office of the National Survey on the Important Human Parasitic Diseases. A national survey on current status of the important parasitic diseases in human population[J]. *Journal of Parasitic and Parasitic Diseases in China*, 2005, 23(Suppl 5): 332-340.
- [11] Mandal S, Deb Mandal M. Human cystic Echinococcosis: Epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2012, 5(4): 253-260.
- [12] Craig P S, Larrieu E. Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863-2002[J]. *Advances in Parasitology*, 2006, 61: 443-508.
- [13] Zhang W, Zhang Z, Yimit T, et al. A pilot study for control of hyperendemic cystic hydatid disease in China[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2009, 3(10): e534.
- [14] Johnston I, Nolan J, Pattni S, et al. New insights into bile acid malabsorption[J]. *Current Gastroenterology Report*, 2011, 13(5): 418-425.
- [15] Chiang J Y. Bile acids: Regulation of synthesis[J]. *Journal Lipid Research*, 2009, 50(10): 1955-1966.
- [16] Kusters A, Karpen S J. Bile acid transporters in health and disease[J]. *Xenobiotica*, 2008, 38(7/8): 1043-1071.
- [17] 何静宇, 雷正明, 付文广. AMPK在胆汁酸代谢中的调节作用[J]. *国际科学杂志*, 2013, 40(1): 54-57.  
He Jingyu, Lei Zhengmin, Fu Wenguang. Regulation of AMPK in bile acid metabolism[J]. *International Journal of surgery*, 2013, 40(1): 54-57.
- [18] Zou X, Wang D, Qiu G, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human *C4orf13* gene, tentatively a member of the sodium bile acid cotransporter family I[J]. *Biochemical Genetics*, 2005, 43(4): 165-173.
- [19] Li S, Kim T I, Yoo W G, et al. Bile components and amino acids affect survival of the newly excysted juvenile clonorchis sinensis in maintaining media[J]. *Parasitology Research*, 2008, 103(5): 1019-1024.

## Molecular cloning and sequence analysis of sodium–bile acid cotransporter from *Echinococcus granulosus* in Xinjiang, China

YANG Mei<sup>1,2</sup>, LIANG Xiaodi<sup>2</sup>, LI Jun<sup>3</sup>, LI Liang<sup>3</sup>, ZHANG Fuchun<sup>1</sup>, ZHANG Wenbao<sup>3</sup>

1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China
2. Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. State Key Laboratory Incubation Base of Xinjiang Major Diseases Research, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

**Abstract** Sodium–bile acid cotransporter (EgSBACT) functions in the sodium–bile acid transportation in *Echinococcus granulosus* (Eg) Protoscolex and the sequence is unknown. The specific primers for *EgSBACT* mRNA are designed and the *EgSBACT* gene is amplified by RT–PCR from Eg protoscolex total RNA. Then the *EgSBACT* gene fragment is cloned into pET30a vector which is a prokaryotic expression vector for sequencing and analyzing by bioinformatics method. The PCR products of *EgSBACT* is about 650 bp whose length is 654 bp and encodes a protein containing 217 amino acids and the pI of this protein is predicted as 9.28. Homology analysis shows that there is 43% of similarity between *EgSBACT* and the trematode SBACT (GenBank: GAA57409.1). Phylogenetic analysis shows that EgSBACT is clustered with Fluke, and has a lower homology to other species. *EgSBACT* gene is cloned from protoscolex of *Echinococcus granulosus* in Xinjiang, which lays a foundation for further study of EgSBACT function in the development and differentiation of PSCs into adult worms. This research provides a way to express the EgSBACT protein in vitro and taking advantage of this protein further research can reveal the exact functions of EgSBACT in the sodium–bile acid transportation in *Echinococcus granulosus*.

**Keywords** *Echinococcus granulosus*; EgSBACT; sequence analysis

(责任编辑 吴晓丽)