

DOI:10.13350/j.cjpb.220607

• 论著 •

多房棘球绦虫钙网蛋白的原核表达及初步鉴定*

陈路娟¹, 咸思奇¹, 闫艳¹, 徐志坚², 程喆², 于桂霞¹, 王彦海^{2**}, 赵利美^{1**}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院基础医学与法医学院病原生物学教研室, 内蒙古包头 014060;
2. 厦门大学生命科学学院寄生动物研究室)

【摘要】 目的 原核表达多房棘球绦虫钙网蛋白 *EmCRT*, 并对其免疫学功能进行初步鉴定。方法 以多房棘球绦虫囊 cDNA 为模板, PCR 扩增目的基因, 克隆至 pGEX-4T-2 载体, 构建重组质粒 pGEX-4T-2-*EmCRT*; PCR、酶切鉴定及测序正确后, 转化至表达菌 BL21(DE3), 并用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达; 运用 10% SDS-PAGE 电泳以及 Western blot 分析鉴定表达的重组蛋白 r*EmCRT*。结果 成功构建了重组质粒 pGEX-4T-2-*EmCRT*, 转化表达菌 BL21 后, 经 IPTG 诱导表达及纯化, 获得了纯度较高的可溶性重组蛋白 r*EmCRT*, 相对分子质量约为 72 ku(含表达载体序列); 通过 Stains all 染色, 表明 r*EmCRT* 具有 Ca²⁺ 结合能力; 免疫学特性鉴定表明 r*EmCRT* 具有较好的抗原特异性。
结论 成功表达多房棘球绦虫钙网蛋白 *EmCRT*, 具有免疫反应性, 可为包虫病诊断及疫苗研发提供理论基础。

【关键词】 多房棘球绦虫; 钙网蛋白; 表达和鉴定; 抗原性

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)06-0654-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Jun. ;17(6):654-659.]

The prokaryotic expression and preliminary identification of calreticulin of *Echinococcus multilocularis* (*EmCRT*)

CHEN Lu-juan¹, XIAN Si-qi¹, YAN Yan¹, XU Zhi-jian², CHENG Zhe², YU Gui-xia¹, WANG Yan-hai², ZHAO Li-mei¹ (1. Department of Pathogen Biology, School of Preclinical and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060, China; 2. Parasitology Research Laboratory, School of Life Sciences, Xiamen University)

【Abstract】 **Objective** We construct the recombinant *Echinococcus multilocularis* calreticulin (r*EmCRT*) protein by prokaryotic expression and identify its immunological function primarily. **Methods** cDNA from *E. multilocularis* vesicles was used as the template to amplify *Emcrt* gene by PCR and the amplification products were then subcloned into the pGEX-4T-2 plasmid to construct recombinant plasmids pGEX-4T-2-*EmCRT*. After PCR amplification, restriction enzymes digestion and sequence, the recombinant plasmid was transformed into BL21 (DE3) and expressed by isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) induction. The expression of r*EmCRT* was detected by 10% SDS-PAGE and Western blot. **Results** The recombinant plasmid pGEX-4T-2-*EmCRT* was transformed into BL21 after it was successfully constructed, and then the recombinant protein r*EmCRT* was induced to express by IPTG and purified. We obtained the soluble recombinant protein r*EmCRT* which has a higher purity and the molecular weight was about 72 ku (including the expression vector sequence). The r*EmCRT* was stained blue by Stains all indicating that its calcium-binding feature. Immunological characterization showed that r*EmCRT* was a highly immunogenic antigen. **Conclusion** The recombinant *Echinococcus multilocularis* calreticulin (r*EmCRT*) was expressed successfully and it has immunological function which provide an important theoretical basis for the diagnosis of echinococcosis and the development of anti-echinococcosis vaccines.

【Key words】 *Echinococcus multilocularis*; calreticulin; expression and identification; antigenicity

*** 包虫病(Echinococcosis), 又称棘球蚴病, 是由棘球绦虫幼虫感染引起的一种严重的人兽共患寄生虫病, 主要流行于北半球高纬度国家^[1], 严重危害人类健康和畜牧业生产^[2]。我国是世界上包虫病高发的国家之一, 主要有囊型包虫病(Cystic Echinococcosis, CE)和泡型包虫病^[3](Alveolar Echinococcosis, AE) 2 种, 分别由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)和多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*, Em)感染而引起, 新疆、青海、甘肃、宁夏、西藏、内蒙古和四川

等地为主要流行区^[4]。人患泡型包虫病比患囊型包虫

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81860362); 包头医学院博士科研启动基金项目(BSJJ201805); 包头医学院扬帆计划项目(No. BYJJ-YF201720)。

** **【通讯作者】** 赵利美, E-mail: zhaolimei880405@126.com; 王彦海, E-mail: wangyh@xmu.edu.cn

【作者简介】 陈路娟(1997-), 女, 甘肃平凉人, 在读硕士研究生, 研究方向: 寄生虫感染与免疫。E-mail: 13359425663@163.com

病更为严重,病死率也高,有“恶性包虫病”或“虫癌”之称^[5]。

目前对于 AE 缺乏有效的预防及早期诊断方法,多数包虫病患者确诊时已到后期,病灶可侵及肝脏各部,囊泡团块呈多囊状,有时也会出现因泡球蚴过度生长,营养供应不足而液化性坏死的情况,病灶边缘就会浸润性扩散感染邻近肝的其他组织如胰腺、胆道、下腔静脉或发生远处转移,药物治疗效果欠佳^[6],手术尚不能完全切除根治,术后疗效亦不稳定,易复发,预后较差,因此,亟待研制安全有效的包虫病疫苗。

目前研制的包虫病疫苗主要有灭活疫苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗、重组鼠伤寒沙门氏杆菌疫苗和重组抗原疫苗等。其中重组抗原疫苗具有纯度高、成分单一、易于大规模生产等优点,有着广阔的发展前景。截止目前已经有多重多房棘球绦虫候选抗原分子如 Em14-3-3^[7]、EmY162^[8]、Em18^[9] 及 Em95^[10] 等被发现。因此,加强包虫病疫苗的研发,是包虫病防治工作的重要任务。

钙网蛋白(Calreticulin, CRT)是一种高度保守的 Ca²⁺ 结合蛋白,具有多种生物学功能^[11-13]。多种寄生虫 CRT 可表达于虫体体表或分泌至体外,且一些寄生虫的 CRT 免疫动物后可产生良好的免疫保护作用,是一个具有应用前景的疫苗候选抗原分子。如猪带绦虫(*Taenia solium*) CRT 口服免疫小鼠可诱导产生 33%~44% 的保护率,且可诱导产生 Th1/Th2 混合型免疫应答^[14-16]。钩虫(*Necator americanus*) CRT 免疫小鼠后,小鼠肺部可产生达 43%~49% 的虫体减虫率,血清 IgE 水平升高^[17];曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*) CRT 可被照射致弱尾蚴免疫的小鼠血清识别,并诱导 T 细胞应答,为 T、B 细胞抗原,可作为曼氏血吸虫的一种潜在候选疫苗分子^[18]。

经同源性分析比对发现,多房棘球绦虫钙网蛋白(*Echinococcus multilocularis* calreticulin, EmCRT)与猪带绦虫、钩虫、曼氏血吸虫 CRT 的同源性分别为 88%、58%、48%,认为 EmCRT 也具有作为包虫候选抗原分子的潜能,因此本研究拟对 EmCRT 进行克隆和表达,并对其进行免疫学初步鉴定,为抗包虫病疫苗和新药的研制提供理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 虫体和菌株 多房棘球绦虫原头蚴采自内蒙古呼伦贝尔某农场,采用昆明株小鼠腹腔接种传代,保存于厦门大学寄生动物研究室^[19];原核表达载体 pGEX-4T-2 由厦门大学细胞应激生物学国家重点实验室韩家淮提供。

1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;反转录试剂盒购自艾科瑞生物公司;PCR 高保真酶、限制性核酸内切酶、ECL 化学发光试剂盒、蛋白分子质量 marker 均购自美国 Thermo scientific 公司;蛋白酶抑制剂购自康为世纪公司;IPTG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;PCR 产物纯化试剂盒、小量提取质粒试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;GST 标签蛋白纯化试剂盒购自碧云天生物技术公司;GST(91G1) rabbit mAb 购自美国 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗购自博士德生物工程有限公司;Stains all 试剂购买自美国 Sigma 公司;10% PAGE 快速凝胶试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 引物的设计与合成 根据 Uniprot 数据库中收录的多房棘球绦虫钙网蛋白 Emcrt 基因(GenBank 登录号:LN902845.1)序列,利用 Snapgene 软件设计引物。上游引物 F1: 5'- **GTTCGCGTG**GATCCATG-GAAGTTTACTTC-3', 下游引物 R1: 5'- **GCGGC-CGCTCGAGCAATTC**ATCCTTTG-3', 下划线部分为酶切位点,加粗部分为不依赖连接反应克隆(Ligation independent cloning, LIC)序列。引物由厦门铂瑞生物公司合成。

2.2 RNA 提取与 cDNA 合成 将收集到的多房棘球绦虫囊用 RNAlater 处理,按照总 RNA 提取试剂盒使用说明书提取囊总 RNA 并参照反转录试剂盒的操作说明书合成 cDNA。

2.3 Emcrt 基因的克隆 以反转录所得 cDNA 为模板,对 Emcrt 基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系(50 μ L): rTaq Mix 25 μ L, ddH₂O 17.5 μ L, cDNA 模板 5 μ L, 上、下游引物各 1.25 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 26 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 PCR 产物纯化试剂盒回收扩增片段。

2.4 重组质粒 pGEX-4T-2-EmCRT 的构建 将上述扩增片段的回收产物与事先用 BamH I、Xho I 酶切的 pGEX-4T-2 载体以 LIC 连接法^[20] 连接,反应体系(10 μ L): 载体 90 ng, PCR 回收产物 90 ng, 酶缓冲液 1 μ L, 用水补至 10 μ L, 冰浴 5 min 后加入 1 μ L Exo III 酶, 混匀, 置冰上 1 h 后加入 1 μ L EDTA(0.5 mol/L, pH8.0) 终止反应, 再于 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min、冰浴 5 min。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含有氨苄青霉素的平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 12~16 h 后进行菌落 PCR 鉴定, 将 PCR 鉴定正确的重组质粒用

*Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切鉴定,将酶切鉴定正确的质粒送至厦门铂瑞生物公司测序。

2.5 重组质粒 pGEX-4T-2-*Em*CRT 的诱导表达及可溶性分析 将测序鉴定正确的重组质粒 pGEX-4T-2-*Em*CRT 转化大肠埃希菌 BL21,菌液接种于含氨苄青霉素(终浓度为 50 μg/mL)的 LB 培养基中,37 °C 220 r/min 振荡培养至 A₆₀₀ ≈ 0.6,加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L,诱导培养 4 h。取 2 mL 菌液超声破碎菌体,离心,收集菌体蛋白。分离可溶性与不可溶性成分,进行 10% SDS-PAGE 电泳,观察电泳结果,分析重组蛋白可溶性。

2.6 重组蛋白 r*Em*CRT 的纯化及初步鉴定 按照上述诱导表达的最优条件,加 IPTG(0.4 mmol/L)诱导,大量表达蛋白,运用 GST 标签蛋白纯化试剂盒纯化蛋白。

Western blot 检测 r*Em*CRT 蛋白的表达:将 r*Em*CRT 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳,转膜后 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,以抗 GST 标签单抗为一抗及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行杂交,最后用 ECL 显色。

2.7 重组蛋白的 Ca²⁺ 结合能力鉴定(Stains all) 将 5 μg 重组 *Em*CRT、*Em*Bmi-1-GST 及 BSA 进行 10% SDS-PAGE 电泳,固定、水洗、染色后进行脱色^[21-22],直到条带对比背景清晰可见,扫描分析结果(全程需室温避光)。

2.8 重组蛋白与特异性血清的 Western blot 识别方法如 2.6 所述,不同之处在于一抗为人工感染泡球蚴小鼠血清(1 : 200)以及 r*Em*CRT 免疫小鼠产生的特异性血清 IgG(1 : 1 000 稀释),相同比例(1 : 200)稀释的正常鼠血清作为阴性对照,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 多抗(1 : 10 000)。

结果

1 *Emcrt* 基因的扩增

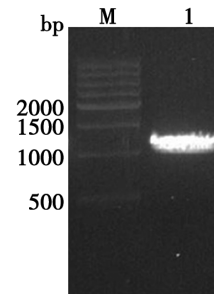
提取多房棘球绦虫囊总 RNA,反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,设计引物对 *Emcrt* 基因进行 PCR 扩增。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的基因大小约 1 100 bp,与预期值相符(图 1)。

2 重组质粒(pGEX-4T-2-*Em*CRT)的筛选和鉴定

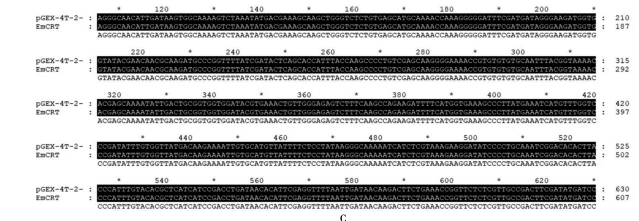
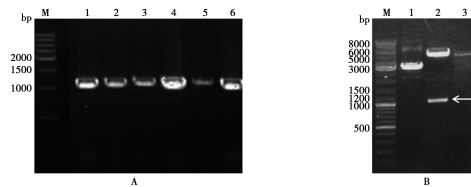
将 PCR 产物连接到原核表达载体 pGEX-4T-2(+)上,获得重组质粒,经转化 DH5α 宿主菌后,挑取单个菌落进行菌落 PCR 鉴定,目的基因大小约 1 100 bp,与预期结果相符(图 2A)。

挑取 PCR 鉴定正确的菌落,接种培养后提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,质粒经双酶切后得到大小分别约为 5.1 kb 和 1.1 kb 两个核酸片

段(图 2B),符合预期结果。将酶切鉴定及菌落 PCR 正确的质粒送去测序,测序结果经 GeneDoc 比对与 *Emcrt* 基因序列一致性达 100%(图 2C)。



M DNA 分子标准量(500 bp) 1 *Emcrt* 基因的 PCR 产物
图 1 *Emcrt* 基因的 PCR 扩增产物
M 500 bp DNA Ladder 1 PCR products of *Emcrt*
Fig. 1 PCR amplification products of *Emcrt*



A 重组质粒菌落 PCR 鉴定结果 M DNA 分子标准量(500 bp) 1~6 单克隆菌落 PCR 产物 B 重组质粒双酶切鉴定结果 M DNA 分子标准量(GeneRuler 1 kb) 1 pGEX-4T-2-*Em*CRT 2 pGEX-4T-2-*Em*CRT 双酶切(*Bam*H I 和 *Xho* I) 3 pGEX-4T-2 双酶切(*Bam*H I 和 *Xho* I) C pGEX-4T-2-*Em*CRT 测序结果

图 2 重组质粒菌落 PCR 和双酶切鉴定及测序结果

A Identification of the recombinant plasmids by PCR amplification M 500 bp DNA 1-6 PCR products of the selected monoclonal colony B Identification of the recombinant plasmids by restriction enzyme digestion M GeneRuler 1 kb DNA Ladder 1 pGEX-4T-2-*Em*CRT plasmid 2 pGEX-4T-2-*Em*CRT digested with *Bam*H I and *Xho* I 3 pGEX-4T-2 plasmid digested with *Bam*H I and *Xho* I C Sequencing results of pGEX-4T-2-*Em*CRT

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmids by PCR and restriction enzyme and sequencing results

3 重组质粒的诱导表达和可溶性分析

经 IPTG 诱导表达 4 h,收集全菌蛋白的可溶性成分和不可溶性成分,经 10% SDS-PAGE 电泳后在约 72 ku 处有一特异的表达条带,与预期大小相符(图 3A),不可溶成分即沉淀在 72 ku 处无明显的条带,证明重组蛋白 r*Em*CRT 已成功表达且主要以可溶的形式表达(图 3B)。

4 重组蛋白的纯化及初步鉴定

由于重组蛋白 r*Em*CRT 主要存在于上清当中,因此采用可溶性蛋白纯化方法。经 10% SDS-PAGE 电

泳及 Western blot 结果显示,在约 72 ku 处(含表达载体所携带的 GST 标签)有明显的单一条带,与预期一致,表明经纯化可得到纯度较高的重组蛋白(图 4)。

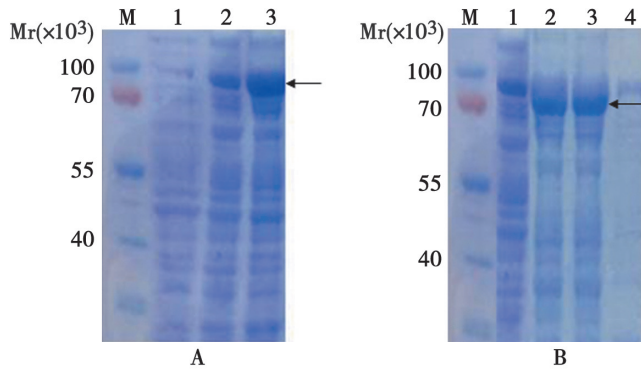


图 3 重组蛋白诱导表达及可溶与不可溶性分析的 SDS-PAGE 结果
A pGEX-4T-2-EmCRT 诱导表达结果 M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导表达的空载体 pGEX-4T-2(+)全菌蛋白 2 未诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白 3 IPTG 诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白,箭头所指为表达蛋白) B rEmCRT 可溶性分析结果 M 蛋白分子质量标准 1 未诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白 2 IPTG 诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白 3 诱导菌可溶性成分 4 诱导菌不可溶性成分(箭头所指为重组蛋白表达条带)

图 3 重组蛋白诱导表达及可溶与不可溶性分析的 SDS-PAGE 结果

A The result of induced expression from recombinant protein M Standard protein marker 1 IPTG-induced *E. coli* lysate of pGEX-4T-2 2 Uninduced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT) 3 IPTG-induced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT). (The arrow denotes the expression protein) B Solubility analysis of recombinant protein M Standard protein marker 1 Uninduced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT) 2 IPTG-induced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT) 3 Soluble composition of induced *E. coli* lysate. (The arrow denotes the expression protein)

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the rEm-CRT induced by IPTG

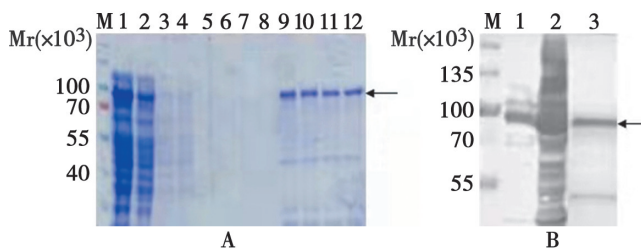


图 4 rEmCRT 纯化后的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 结果
A 纯化后的 rEmCRT SDS-PAGE 电泳结果 M 蛋白分子质量标准 1 超声后离心收集的上清 2 穿流液 3~8 洗涤 1~6 9~12 洗脱 1~4 B rEmCRT 纯化后的 Western blot 电泳结果 M 标准蛋白分子质量 1 未诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白 2 IPTG 诱导表达的 pGEX-4T-2-EmCRT 全菌蛋白 3 纯化后的 rEmCRT(箭头所指为重组蛋白表达条带)

图 4 rEmCRT 纯化后的 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 结果

A SDS-PAGE analysis of the purified rEmCRT M Standard protein marker 1 Supernatant collected by centrifugation after ultrasound 2 Flow through 3-8 Wash 1-6 9-12 Elution 1-4 B Western blot analysis of the purified rEmCRT M Standard protein marker 1 Uninduced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT) 2 IPTG-induced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2-EmCRT) 3 purified rEmCRT. (The arrow denotes the expression protein)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis and Western blot analysis of the purified rEmCRT

5 重组蛋白的 Ca²⁺ 结合功能鉴定

经染色后 rEmCRT 呈现蓝色,而 EmBmi-1-GST 作为虫体非相关对照蛋白,BSA 作为阴性对照蛋白都呈现红色,表明 rEmCRT 具有 Ca²⁺ 结合能力(图 5)。

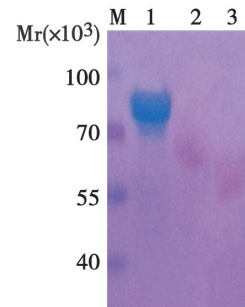


图 5 rEmCRT 的 Stains all 染色结果

M 蛋白分子质量标准 1 rEmCRT 2 BSA 3 EmBmi-1-GST

M Standard protein marker 1 rEmCRT 2 BSA 3 EmBmi-1-GST

Fig. 5 Stains all analysis of rEmCRT

6 重组蛋白的抗原特异性

将 rEmCRT 与泡球蚴感染小鼠血清以及 rEmCRT 免疫小鼠产生的特异性血清 IgG 进行 Western blot 识别,结果显示用感染泡球蚴的小鼠血清(图 6A)以及 rEmCRT 免疫小鼠制备的多克隆抗体(图 6B)作为一抗均可识别 rEmCRT,而阴性对照正常小鼠血清不能识别重组蛋白(图 6C),表明 rEmCRT 具有抗原特异性。

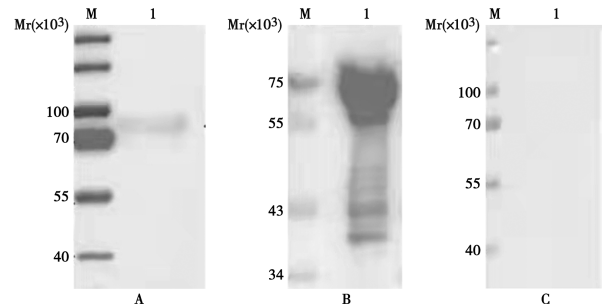


图 6 rEmCRT 与阳性血清的 Western blot 结果
A M 蛋白分子质量标准 1 泡球蚴感染小鼠血清 B M 蛋白分子质量标准 1 rEmCRT 免疫小鼠血清 C M 蛋白分子标准 1 正常小鼠血清

图 6 rEmCRT 与阳性血清的 Western blot 结果

A M Standard protein marker 1 rEmCRT recognized by sera from mice infected by *Echinococcus multilocularis* B M Standard protein marker 1 rEmCRT recognized by the specific IgG of the Balb/c mice serum which were immunized with recombinant protein rEmCRT C M Standard protein marker 1 rEmCRT recognized by sera from normal mice

Fig. 6 The antigenicity of rEmCRT by Western blot

讨论

人兽共患寄生虫病一直以来是发展中国家亟待解决的公共卫生问题,严重危害人畜健康,给畜牧业造成巨大经济损失。目前用于控制寄生虫病有效的方法仍然是疫苗接种,而研制安全有效的寄生虫病疫苗是当前研究的热点和难点。我国西北牧区包虫病流行严

重,通过免疫预防手段来防控包虫病方法有效。

研究发现,一些寄生虫的钙网蛋白免疫动物后可产生较好的免疫保护作用,是一个具有应用前景的疫苗候选抗原分子^[15-18],比如猪带绦虫、钩虫、曼氏血吸虫的CRT均可对宿主产生一定的免疫保护作用,而多房棘球绦虫CRT与其他寄生虫CRT具有较高的同源性,由此推测,多房棘球绦虫感染后其CRT可能也具有免疫调节的作用。本研究前期应用生物信息学的方法对EmCRT蛋白的理化特性、二、三级结构及T、B细胞表位进行了预测分析,发现该蛋白具有6个潜在的T、B细胞联合表位^[23]。本研究在此基础上对其免疫学功能进行进一步探究。

外源蛋白质表达系统分为原核表达系统和真核表达系统,其中常用的原核表达系统是大肠埃希菌(*E. coli*)表达系统,具有遗传背景清楚、生长繁殖速度快、转化效率高、成本低廉、可快速大规模生产目的蛋白等优点^[24]。本研究选用pGEX-4T-2作为表达载体,表达产生的重组蛋白为N端具有GST标签的融合蛋白,易于蛋白的纯化和检测。应用SignalP 4.1软件对EmCRT蛋白结构进行预测,发现其N端1-18 aa为信号肽序列,为了不影响蛋白的分泌^[25],体外在设计原核表达的引物时去除了Emcrt的信号肽。应用PCR法成功从多房棘球绦虫囊中克隆出Emcrt基因,经测序证实其与GenBank公布的Emcrt序列一致。运用基因重组技术将Emcrt基因片段插入原核表达载体pGEX-4T-2,成功构建了pGEX-4T-2-EmCRT重组质粒。将重组质粒转入大肠埃希菌BL21,SDS-PAGE及Western blot可检测到rEmCRT的表达,表明重组质粒能够在大肠埃希菌中正确表达。在重组蛋白纯化前,对蛋白的溶解性进行了检测。经可溶性分析发现,rEmCRT主要以可溶形式存在,为后续重组蛋白的功能性研究奠定了良好的基础。由于重组蛋白携带有GST标签,故运用GST单抗对纯化的rEmCRT进行Western blot鉴定,结果显示重组蛋白可被GST单抗所识别。同时Western blot显示rEmCRT可被泡球蚴感染的小鼠血清以及rEmCRT免疫小鼠产生的特异性血清IgG所识别,证明其具有抗原特异性。

体外检测Ca²⁺的方法有多种,比如电泳迁移率改变分析法、⁴⁵Ca²⁺覆盖法^[26]及全染法(Stains all),本研究采用全染法,该方法操作简单、成本较低,为Ca²⁺结合蛋白的检测提供较好的选择^[21]。经Stains all染色,重组蛋白rEmCRT呈现蓝色,表明该蛋白具有Ca²⁺结合能力。以上结果表明,经表达、纯化已成功获得具有Ca²⁺结合功能的rEmCRT。

综上所述,本研究成功克隆、表达了多房棘球绦虫

钙网蛋白EmCRT,具有较好的免疫反应性和钙离子结合特性,可为研究该蛋白在包虫病的诊断及防治中的作用提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez RC, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasitol, 2017(95): 315-493.
- [2] Venegas J, Espinoza S, Sanchez G. Estimation of costs caused by cystic echinococcosis[J]. Rev Med Chil, 2014, 142(8): 1023-1033.
- [3] 米晓云, 吐尔逊古努尔, 张壮志, 等. 四种宠物鼠作为多房棘球绦虫的中间宿主的研究[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(1): 69-72.
- [4] 伍卫平. 我国包虫病的流行与防治工作进展[J]. 中国动物保健, 2016, 18(10): 12-14.
- [5] McManus D P, Zhang W, Li J, et al. Echinococcosis[J]. Lancet, 2003, 362(9392): 1295-1304.
- [6] Stojkovic M, Junghans T. Cystic and alveolar echinococcosis[J]. Handb Clin Neurol, 2013(114): 327-334.
- [7] 李文桂, 王鸿, 朱佑明. 多房棘球绦虫重组BCG-Em14-3-3疫苗不同接种途径诱导小鼠细胞因子的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2008(01): 130-132.
- [8] Kouguchi H, Matsumoto J, Katoh Y, et al. The vaccination potential of EMY162 antigen against *Echinococcus multilocularis* infection[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(4): 915-20.
- [9] 江莉, 冯正, 薛海筹. 多房棘球蚴病特异性诊断抗原Em18的基因克隆、表达和血清学评价[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(4): 193-198.
- [10] Wang H, Zhang F, Ma X, et al. Prokaryotic expression and identification of B- and T-cell combined epitopes of Em95 antigen of *Echinococcus multilocularis*[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(8): 5117-5122.
- [11] Ferreira V, Molina M C, Valck C, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts[J]. Mol Immun, 2004, 40(17): 1279-1291.
- [12] Ramirez-Toloza G, Sosoniuk-Roche E, Valck C, et al. *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: Immune Evasion, Infectivity, and Tumorigenesis[J]. Trends Parasitol, 2020, 36(4): 368-381.
- [13] 赵利美, 诸欣平. 寄生虫钙网蛋白及其在虫体与宿主相互作用中的功能[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6): 731-733.
- [14] Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Mendlovic F, et al. Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination[J]. Methods, 2009, 49(4): 346-350.
- [15] Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Mendlovic F, et al. Immunological mechanisms involved in the protection against intestinal taeniosis elicited by oral immunization with *Taenia solium* calreticulin[J]. Exp Parasitol, 2012, 132(3): 334-340.
- [16] Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Avila G, et al. Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121321.
- [17] Winter J A, Davies O R, Brown A P, et al. The assessment of

- hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis[J]. Parasitol, 2005, 27(4):139-146.
- [18] El Gengehi N, El Ridi R, Tawab NA, et al. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin[J]. J Parasitol, 2000, 86(5):993-1000.
- [19] 唐崇惕, 崔贵文, 钱玉春. 内蒙古呼伦贝尔草原泡状棘球蚴病病原的调查[J]. 动物学报, 1988, 32(2):172-179.
- [20] 王培培, 韩榕. 利用不依赖连接反应的克隆方法构建 pCHF3-MAP65-1-YFP 和 pCHF3-MAP65-2-YFP 表达载体[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2):266-270.
- [21] Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO. Staining of the Ca²⁺-binding proteins, calsequestrin, calmodulin, troponin C, and S-100, with the cationic carbocyanine dye "Stains-all"[J]. J Biol Chem, 1983, 258(18):11267-11273.
- [22] Zhao L, Shao S, Chen Y, et al. *Trichinella spiralis* Calreticulin Binds Human Complement C1q As an Immune Evasion Strategy [J]. Front Immunol, 2017(8):636.
- [23] 陈路娟, 程喆, 王彦海, 等. 多房棘球绦虫钙网蛋白的真核表达及其 T、B 细胞表位预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12):1397-1403.
- [24] 陈晓娟, 闫少春, 邵国. 蛋白表达系统的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2014, 30(3):142-143.
- [25] 马亮, 刁玉梅, 任保彦, 等. 弓形虫 RH 株表面抗原 SAG3 去信号肽基因的蛋白原核表达及鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(1):104-108.
- [26] Oladiran A, Belosevic M. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis[J]. Dev Comp Immunol, 2010, 34(4):396-405.

【收稿日期】 2022-02-07 【修回日期】 2022-04-19

(上接 653 页)

- [20] 杨延成, 程航, 周人杰, 等. SCCmec 遗传元件及其在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子分型中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(5):442-451.
- [21] 曾凌, 邓琼, 刘洋, 等. 2017-2018 年江西地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行特征[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(9):835-841.
- [22] 胡璐璐, 李迎慧, 路滢, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌多位点序列分型与耐药性研究[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(3):289-292.
- [23] 王艳, 周丽萍, 巢国祥, 等. 金黄色葡萄球菌 MRSA 分型及分子溯源研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(20):2899-2904, 907.
- [24] Li X, Huang T, Xu K, et al. Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates in Hainan, China[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):873.
- [25] 张林吉, 张小荣, 曹永忠, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因与 MLST 及 spa 分子克隆相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(5):449-456.
- [26] 吕国平, 李亚子, 郭玉梅, 等. 金黄色葡萄球菌食物中毒株遗传特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(2):185-188.
- [27] 袁梦, 黄汉伟, 胡鹏威, 等. 2009-2015 年深圳市不同来源样本中金黄色葡萄球菌毒力耐药特征及分子分型研究[J]. 实用预防医学, 2019, 26(4):420-426.
- [28] 张婧, 张易, 施春雷. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因及其表达检测[J]. 中国食品学报, 2020, 20(1):246-251.
- [29] 袁梦, 袁月明, 罗锦雁, 等. 金黄色葡萄球菌毒力基因检测及 Spa 分型研究[J]. 疾病监测, 2016, 31(7):603-608.

【收稿日期】 2022-01-07 【修回日期】 2022-03-29