

DOI:10.13350/j.cjpb.240512

• 论著 •

细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶基因的生物信息学分析及原核表达*

赵文卿^{1,2}, 薄新文^{1,2,3}, 普娜^{2,3}, 张玉霞^{2,3}, 陈旭珂^{2,3}, 张艳艳², 孙艳², 齐萌^{1,2**}, 王正荣^{2**}

(1. 塔里木大学动物科学与技术学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室/新疆农垦科学院畜牧兽医研究所; 3. 石河子大学动物科技学院)

【摘要】 目的 了解细粒棘球绦虫的乳酸脱氢酶蛋白基因的生物信息学特性, 并进行原核表达。方法 利用 NCBI 网站登录的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶基因序列设计特异性引物和 qRT-PCR 引物, 使用 PCR 扩增细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶基因, 使用荧光定量法检测细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶在不同发育阶段的相对表达量, 使用生物信息学软件对细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶蛋白进行分析; 构建重组 pET28a-EgLDh 质粒, 转入大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 利用 SDS-PAGE 检测蛋白的表达, 并通过 Western blot 对蛋白进行免疫原性分析; 利用原核表达重组 pET28a-EgLDH 蛋白免疫小鼠制备多克隆抗体, 通过间接免疫荧光分析其在虫体上的分布。结果 生物信息学分析发现 EgLDH 全长 996 bp, 编码 331 个氨基酸, 分子式为 C₁₅₇₅H₂₅₆₁N₄₂₅O₄₇₀S₁₇, 相对分子质量为 35 516. 25, 理论等电点为 6. 32, 不稳定指数为 27. 96, 显示为稳定蛋白, 脂肪系数为 106. 83, 亲水性为 0. 236, 为疏水性蛋白, 有 13 个潜在的 B 细胞抗原表位; 通过双酶切鉴定及测序分析证明, pET28a-EgLDH 重组质粒构建成功。重组质粒 pET28a-EgLDH 转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞后使用 IPTG 成功诱导表达蛋白, 分子质量约为 40 ku, Western blot 结果显示, 重组蛋白能被感染棘球绦虫的犬阳性血清识别, 表明其均具有良好的反应原性。EgLDH 在细粒棘球绦虫阶段的相对转录水平显著高于原头蚴阶段。间接免疫荧光分析显示其定位在原头蚴的表皮层。结论 rEgLDH 具有较好的免疫活性, 是一种潜在的疫苗候选抗原。

【关键词】 细粒棘球绦虫; EgLDH 基因; 生物信息学分析; 原核表达

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)05-0555-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 May;19(5):555-561.]

Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of lactate dehydrogenase gene of *Echinococcus granulosus*

ZHAO Wenqing^{1,2}, BO Xinwen^{1,2,3}, PUNA^{2,3}, ZHANG Yuxia^{2,3}, CHEN Xuke^{2,3}, ZHANG Yanyan², SUN Yan², QI Meng^{1,2}, WANG Zhengrong^{1,2} (1. College of Animal Science and Technology, Tarim University, Key Laboratory of Tarim Animal Husbandry Science and Technology Corps, Xinjiang Production and Construction Corps, Alar 843300, Xinjiang, China; 2. State Key Laboratory of Sheep Genetic Improvement and Healthy Breeding/Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences; 3. College of Animal Science and Technology, Shihezi University) **

【Abstract】 **Objective** In order to understand the bioinformatics characteristics of the lactate dehydrogenase protein gene of *Echinococcus granulosus* and express it in prokaryotic. **Methods** Specific primers and QRT PCR primers were designed by using the lactate dehydrogenase gene sequence of *E. granulosus* logged in NCBI website. The lactate dehydrogenase gene of *E. granulosus* was amplified by PCR. The relative expression of lactate dehydrogenase in different developmental stages of *E. granulosus* was detected by fluorescence quantitative method, and the lactate dehydrogenase protein of *E. granulosus* was analyzed by bioinformatics software; The recombinant pET28a egldh plasmid was constructed and transferred into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. The expression of the protein was detected by SDS-PAGE, and the immunogenicity of the protein was analyzed by Western blot; The polyclonal antibody was prepared by immunizing mice with prokaryotic expression of recombinant pET28a egldh protein, and its distribution on the

* **【基金项目】** 国家自然科学基金(No. 32360887, 31860701), 新疆生产建设兵团重点领域科技攻关计划项目(No. 2020AB025), 新疆生产建设兵团国际科技合作(No. 2021BC008), 省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室重大专项(No. 2021ZD02), 兵团农业科技创新工程专项(No. NCG202213)。

** **【通讯作者】** 齐萌, E-mail: qimengdz@163.com; 王正荣, E-mail: wzrtiger@sina.com

【作者简介】 赵文卿(1999-), 男, 甘肃定西人, 硕士, 主要研究方向: 预防兽医学。E-mail: 2921207578@qq.com

worm was analyzed by indirect immunofluorescence. **Results** Bioinformatics analysis showed that the full length of EgLDH was 996 bp, encoding 331 amino acids. The molecular formula was $C_{1575}H_{2561}N_{425}O_{470}S_{17}$, the relative molecular mass was 35 516. 25, the theoretical isoelectric point was 6. 32, and the instability index was 27. 96. It was shown to be a stable protein, the fat coefficient was 106. 83, the hydrophilicity was 0. 236, and it was a hydrophobic protein with 13 potential B cell epitopes. The double enzyme digestion and sequencing analysis showed that the pET28a-EgLDH recombinant plasmid was successfully constructed. The recombinant plasmid pET28a-EgLDH was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells, and the expressed protein was successfully induced by IPTG. The molecular weight was about 40 ku. The results of Western blot showed that the recombinant protein could be recognized by the positive serum of dogs infected with *Echinococcus*, indicating that it had good reactogenicity. Fluorescence quantitative analysis showed that the relative transcription level of EgLDH in *E. granulosus* stage was significantly higher than that in protoscoleces stage. Indirect immunofluorescence analysis showed that it was localized in the epidermis of protoscoleces.

Conclusion The results showed that rEgLDH has good immune activity and is a potential vaccine candidate antigen.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; EgLDH gene; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

细粒棘球蚴病是由细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*) 的中绦期幼虫引起的一种地方性、自然疫源性人兽共患病, 幼虫主要寄生于人和动物肝脏和肺脏, 对机体造成较大损伤^[1]。细粒棘球蚴病呈世界性分布, 我国特别是西北地区农牧民和动物深受细粒棘球绦虫病危害严重^[2]。细粒棘球绦虫卵污染环境或食物, 被牛、羊等中间宿主摄入, 在体内移行至肝脏或肺脏等器官内形成包囊, 被犬、狼等终末宿主食入后在小肠发育为成虫, 虫卵随成熟的节片排出体外^[3]。目前, 细粒棘球蚴病尚无特效药, 病人多采用手术摘除, 但易复发和产生后遗症。疫苗免疫是预防细粒棘球蚴病的重要手段, 具有安全性高、残留少、无休药期和适宜推广等优点^[4]。目前研究较为成熟的细粒棘球蚴病疫苗抗原主要有 Eg95, 还有 EgA31、EgM、EgTpx、及 TSP3 等抗原需进一步验证其有效性^[5]。

细粒棘球绦虫无消化系统以及呼吸系统, 能量代谢主要依赖发生于表皮层的无氧糖酵解途径^[6]。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 是寄生蠕虫的重要功能酶之一, 参与糖类的无氧酵解反应, 主要作用为催化丙酮酸和乳酸的相互转化, 释放能量保证虫体所需, 还可防止乳酸堆积, 造成虫体损伤的作用^[7]。陈祖云等^[8]研究发现吡喹酮和苯并咪唑类药物可直接作用于亚洲带绦虫乳酸脱氢酶, 乳酸脱氢酶可作为抗亚洲带绦虫药物作用的靶标分子。有研究表明通过对弓形虫乳酸脱氢酶基因敲除发现体外培养的弓形虫发育减慢, 也可使小鼠模型的弓形虫囊肿的发育减缓^[9], 说明弓形虫乳酸脱氢酶对于弓形虫生长发育有着至关重要的作用。William 等^[10]通过建立了一种新的用于微小孢子虫的靶向基因敲除的方法并使用该方法成功敲除了微小孢子虫的乳酸脱氢酶基因, 而且观察到微小隐孢子虫在体外培养 56 h 时, 实验组微小隐孢子虫生长发育情况显著低于空白对照组微小隐孢子虫, 进一步证明乳酸脱氢酶对于微小隐孢子虫的生长发育具

有重要作用, Li 等^[11]通过针对微小隐孢子虫乳酸脱氢酶蛋白筛选出能够抑制微小隐孢子虫乳酸脱氢酶蛋白活性的抑制剂, 应用于微小隐孢子虫感染鼠模型, 发现可以防止肠绒毛萎缩以及微小隐孢子虫引起的粘膜侵蚀。上述研究均提示乳酸脱氢酶是体内寄生虫生长发育过程不可缺少的关键酶。

为进一步了解细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶在其发育过程中所发挥的生物学功能作用, 本研究对 NCBI 数据库中已公布的细粒棘球绦虫乳酸脱氢酶 (EgLDH) 基因进行生物信息学分析、分子克隆和重组蛋白表达, 鉴定其蛋白在原头蚴阶段的定位情况, 以期解析 EgLDH 基因在细粒棘球绦虫寄生时所发挥的生物学功能以及为细粒棘球蚴病疫苗研发提供基础数据。

材料与amp;方法

1 材料及主要试剂

细粒棘球绦虫成虫由省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室提供, 原头蚴自新疆石河子市某牛羊屠宰场患棘球蚴病的病羊肝脏中收集。大肠埃希菌 DH5 α 及 BL21(DE3) 感受态细胞、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2 \times TaqPCR MasterMix II、DNA Marker III 等均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; pMD19-T、pET-28a (+) 载体、Trizol Reagent 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司; TaqDNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶 ECOR I 和 Hind III、5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液等均购自 TaKaRa 公司; 广谱彩虹预染蛋白质分子量标准、反转录试剂盒、Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒等均购自康为世纪生物科技有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA)、DAPI、FITC 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 标记的兔抗犬 IgG 等均购自 Solarbio (北京) 公司; LightCycler 96 系统购自罗氏诊断产品 (上海) 有限公司; 激光共聚焦显微镜购自日本 Nikon 公司感

染;患棘球蚴病的犬阳性血清为省部共建绵羊遗传改良与健康养殖国家重点实验室制备并保存。

2 方法

2.1 引物设计 在NCBI数据库中,下载细粒棘球绦虫EgLDH(序列登录号:HM748917)基因序列,采用Primer5.0软件设计PCR引物,下划线部分为EcoR I和Hind III酶切位点(见表1);采用Primer3 Plus在线软件(<https://www.primer3plus.com/>)设计qRT-PCR引物,参照文献^[12]设计细粒棘球绦虫甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 序列登录号(XM_024494574)基因为qRT-PCR内参引物,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

表1 细粒棘球绦虫EgLDH的引物信息
Table 1 Primer information for *E. granulosus* EgLDH

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')	目的片段大小 Target fragment size
EgLDH-F	<u>GGAATTC</u> ATGCTGTGGAGGGTTG	996 bp
EgLDH-R	CCCAAGCTTCTTGATGCCTGCGATAAT	
qEgLDH-F	AGTTAAGCGGCTTCCACAG	174bp
qEgLDH-R	CAACGGTCACCTACTCCAT	
qGAPDH-F	CGCATCGGTCGCTTGTGTT	190bp
qGAPDH-R	CGGTAATCCTGTGGCTGTCAAT	

2.2 EgLDH基因的克隆 利用Trizol Reagent按照提取细粒棘球绦虫成虫和与原头蚴总RNA并反转录为cDNA,以其为模板,利用EgLDH-F/R扩增EgLDH基因。PCR反应体系(20 μL):2×TaqPCR MasterMix II 10 μL,上、下游引物各0.5 μL,cDNA模板1 μL,ddH₂O 8 μL。PCR反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸10 min。经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段。

将回收的目的片段连接pMD19-T载体质粒得到重组质粒pMD19-T-EgLDH,将重组质粒转化大肠埃希菌DH5α感受态细胞后涂布至含AMP的LB固体培养基,37℃过夜培养,挑取单菌落于含AMP抗性的1 mL LB液体培养基,37℃培养4 h后进行菌液PCR验证,PCR反应体系相同,对阳性菌液进行保菌和提取重组质粒,重组质粒送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2.3 EgLDH基因 在虫体不同发育阶段的表达差异反应体系为:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL,内参引物GAPDH-F和GAPDH-R各1 μL,模板(原头蚴、成虫cDNA)2 μL,ddH₂O 7 μL。每个模板设置3次重复,反应条件为:95℃预变性60 s;95℃30 s,60℃30 s,72℃30 s,共45个循环;其他按系统默认参数运行。对结果采用2^{-ΔΔCt}法

进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.4 EgLDH蛋白的生物信息学 分析利用ExPASy系统中的ProtParam在线程序(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白理化性质;利用ProtScale在线软件预测蛋白进行亲疏水性;使用Mega 7.0软件^[13],通过邻近树法(NJ)构建系统进化树,Bootstrap设置1 000次重复,使用泊松校正方法^[14]计算进化距离,以每个位点的氨基酸取代数为单位;利用TMHMM在线软件(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?>)预测蛋白跨膜区;利用SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)分析信号肽位置;利用SOPMA在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白二级结构;利用SWISS-MODEL在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三级结构;利用NCBI的Conserved Domain(ncbi.nlm.nih.gov/cdd)和Orffinder在线网站(ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)预测蛋白保守结构域和开放阅读框;利用IEDB在线软件(<http://tools.iedb.org/bcell/>)预测蛋白的B细胞抗原表位。

2.5 EgLDH基因重组质粒的构建与鉴定 将测序正确的pMD19-T-EgLDH菌液扩大培养,提取质粒,用限制性内切酶EcoR I和Hind III分别对pMD19-T-EgLDH质粒和表达载体质粒pET-28a(+)进行双酶切,经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段,连接目的片段与表达载体,构建重组质粒pET28a-EgLDH,转化至大肠埃希菌DH5α感受态细胞,对菌液PCR验证为阳性的菌株进行扩大培养,提取重组质粒进行双酶切鉴定并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.6 EgLDH蛋白的原核表达及Western blot 鉴定 将构建成功的重组质粒pET28a-EgLDH转化至大肠埃希菌BL21(DE3)感受态细胞,次日挑取单菌落,扩大培养至菌液吸光度A₆₀₀值达到0.6~0.8时,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG,分别在0 h和8 h各取1 mL菌液离心取沉淀加5×上样缓冲液煮沸,经12% SDS-PAGE检测后转至PVDF膜上,以感染棘球蚴病的犬阳性血清单克隆抗体为一抗(1:300稀释)、HRP标记的兔抗犬IgG为二抗(1:2 000稀释),通过Western blot鉴定蛋白表达。

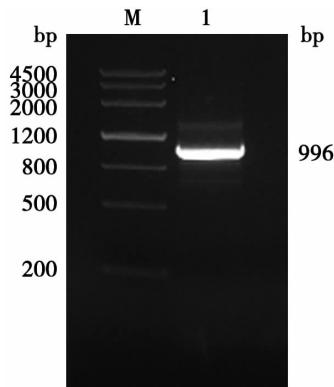
2.7 重组EgLDH蛋白多克隆抗体的制备及EgLDH蛋白间接免疫荧光定位 将重组EgLDH蛋白与佐剂QuilA 1:1混合制成重组蛋白疫苗,振荡过夜后皮下接种小鼠,1周免疫1次,共3次,免疫前及3次免疫后7 d采眼眶血,分离血清,获得多克隆抗体。

将采集的新鲜原头蚴培养过夜,移去旧培养液,用多聚甲醛固定,使用用 5% BSA 封闭,以上一步制备的多克隆抗体(1 : 200)为一抗,以 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG(1 : 2000)为二抗,经 DAPI 染色后,置于激光共聚焦显微镜下观察 EgLDH 蛋白在原头蚴上的定位,设置 PBS 对照,拍照观察,保存结果。

结果

1 EgLDH 基因 PCR 扩增及测序

以细粒棘球蚴原头蚴 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,成功扩增出约 996 bp 的目的片段(见图 1)。将扩增片段胶回收后,进行克隆转化,阳性菌液提取质粒后送测序验证,成功获得 996 bp 目的基因片段。



M DNA Marker 1 EgLDH 基因 PCR 扩增产物

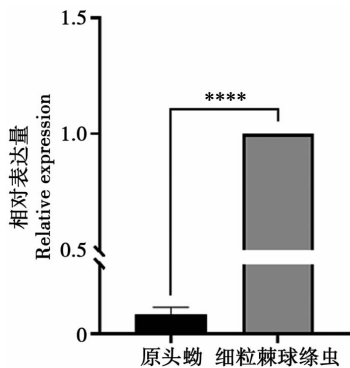
图 1 EgLDH 基因 PCR 扩增结果

M DNA Marker 1 PCR amplification products of EgLDH gene

Fig. 1 The PCR amplification results of the EgLDH gene

2 EgLDH 基因在细粒棘球蚴不同发育阶段表达差异分析

qRT-PCR 结果显示,EgLDH 基因在细粒棘球蚴原头蚴阶段和成虫阶段均有转录,经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出细粒棘球蚴原头蚴阶段和成虫阶段的平均 C_q 值,结果见图 2,得出细粒棘球蚴成虫阶段的相对转录水平显著高于原头蚴阶段($P < 0.01$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ****, ***** $P < 0.001$

图 2 EgLDH 基因在细粒棘球蚴不同发育阶段的差异表达

Fig. 2 Differential expression of the EgLDH gene at different developmental stages of *E. granulosus*

3 EgLDH 蛋白理化性质分析和蛋白进化树构建结果

ExPASy 系统中的 ProtParam 在线程序预测结果显示,EgLDH 基因全长 996 bp,编码 331 个氨基酸,分子式为 $C_{1575}H_{2561}N_{425}O_{470}S_{17}$,相对分子质量为 35 516.25,理论等电点为 6.32,不稳定指数为 27.96,显示为稳定蛋白,脂肪系数为 106.83,亲水性为 0.236,为疏水性蛋白。ProtScale 在线软件预测结果显示,EgLDH 蛋白亲疏水性预测结果如图 3。在第 255 氨基酸位点存在最大值 2.244,疏水性最强,蛋白在第 310 氨基酸位点存在最小值 -2.189,亲水性最强,而且氨基酸链各位点分值均在阈值(1.5)以下且标度值大于 0 的区比较密集,整体分析图像可以推测 EgLDH 蛋白为疏水性蛋白,与 ProtParam 在线程序预测结果一致。

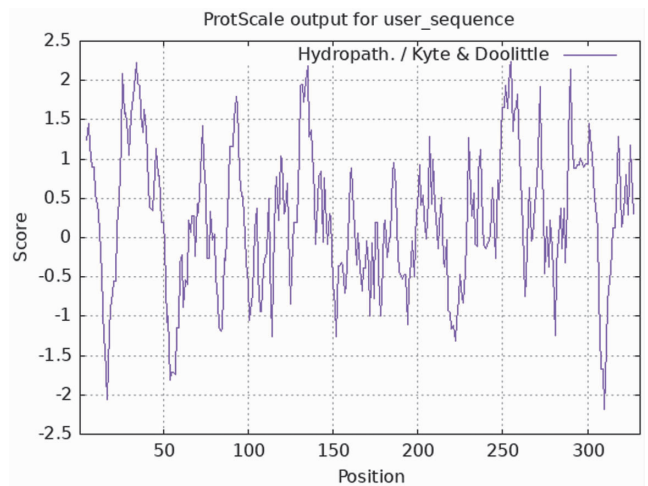


图 3 EgLDH 蛋白亲疏水性预测

Fig. 3 Pro-affinity and hydrophobicity prediction of EgLDH proteins

使用 MEGA7 软件,选择邻接法推断 EgLDH 蛋白进化史,得到分支长度之和为 2.71806895 的最佳树(图 3)。结果显示,EgLDH 与多房棘球蚴处于同一分支,进化距离接近,同源率为 93.96%,与猪带绦虫同源率为 84.71%;而与哺乳动物以及鸡进化距离较远。

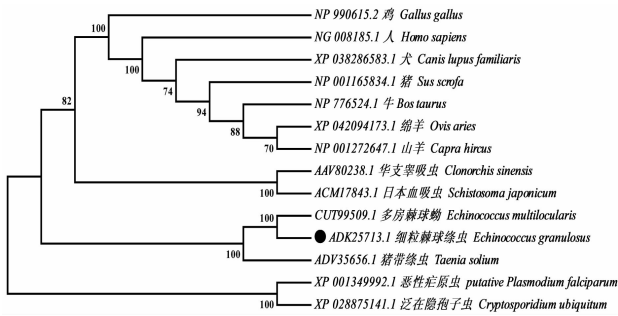
4 EgLDH 蛋白跨膜区和信号肽预测结果

TMHMM 在线软件预测结果显示,EgLDH 蛋白无跨膜区(图 4)。SignalP-5.0 预测结果显示 EgLDH 蛋白无信号肽(图 5),原核表达预测结果正确。

5 EgLDH 蛋白二级和三级结构预测

SOPMA 在线软件预测结果显示,EgLDH 蛋白二级结构中 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链、 β 转角占比分别为 42.60%、20.85%、26.67%和 8.16%(图 6)。利用 SWISS-MODEL 预测 EgLDH 蛋白的三级结构,得到以细粒棘球蚴一种 L-乳酸脱氢酶(J7F558.1)为模板使用 AlphaFold v2 方法预测的一种 EgLDH 蛋白

三级结构模型, GMQE(全球性模型质量估测)值为0.94(图7), 且模型有较多的 α -螺旋和无规则卷曲, 与二级结构预测结果一致。



注: “●”标记为本研究 EgLDH 蛋白序列。

图4 EgLDH 蛋白系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the EgLDH proteins

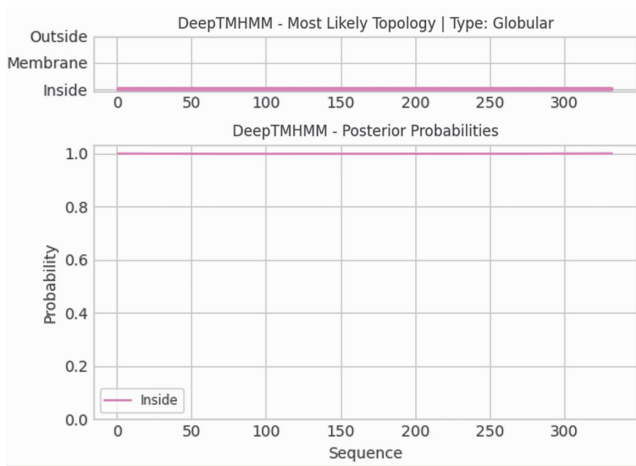


图5 EgLDH 蛋白的跨膜结构域预测

Fig. 5 Transmembrane domain prediction of EgLDH proteins

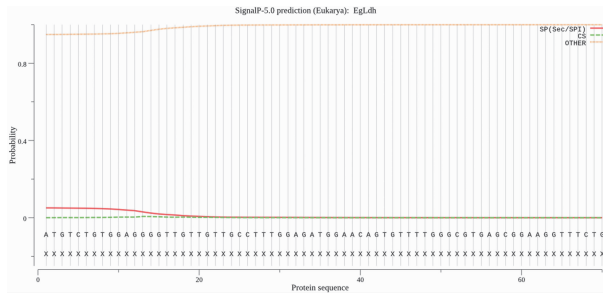


图6 EgLDH 蛋白的信号肽预测

Fig. 6 The signal peptide prediction of the EgLDH protein

6 EgLDH 蛋白保守结构域和开放式阅读框预测结果

使用 NCBI 的 Conserved Domain 在线程序预测发现, EgLDH 蛋白属于 NADB_Rossmann 超家族并分属于 Ldh1 亚组, 该家族中的蛋白质除了 NADB 结构域外还包含第二个结构域, 负责特异性结合底物并催化特定的酶促反应, EgLDH 还具有 L-lactate dehydrogenase 结构域, 负责催化糖酵解将丙酮酸转化

为 L-乳酸(图8)。使用 Orffinder 在线程序预测 EgLDH 具有开放式阅读框(图9)。



图7 EgLDH 蛋白二级结构的预测

Fig. 7 Pref secondary structures of EgLDH protein

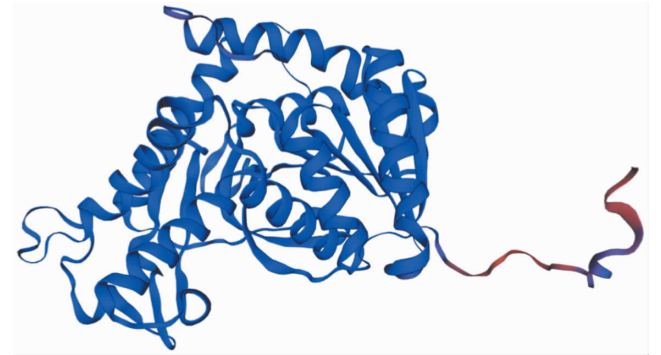


图8 EgLDH 蛋白的三级结构预测

Fig. 8 The tertiary structure prediction of the EgLDH protein

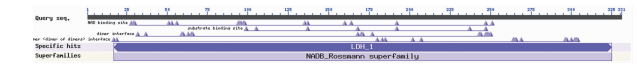


图9 EgLDH 蛋白的跨膜保守结构域预测

Fig. 9 Transmembrane-conserved domain prediction of the EgLDH protein

7 EgLDH 蛋白 B 细胞抗原表位预测结果

IEDB 在线软件预测结果显示, EgLDH 蛋白有 13 个潜在的 B 细胞抗原表位, 分别位于第 6-18、56-58、72-85、98-108、125-125、150-153、195-198、204-228、242-242、278-283、307-310、312-313、324-324 位氨基酸处(图10)。表明 EgLDH 蛋白具有较好的抗原性。

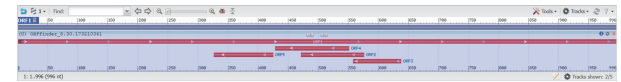


图10 EgLDH 蛋白的开放式阅读框预测

Fig. 10 Open reading frame prediction of the EgLDH protein

8 重组质粒 pET28a-EgLDH 双酶切鉴定结果

用限制性内切酶 EcoR I 和 Hind III 对构建的 pET28a-EgLDH 质粒进行双酶切, 成功得到与目的片段大小一致的插入片段(图11), 结合测序结果, 表明重组质粒 pET28a-EgLDH 构建成功。

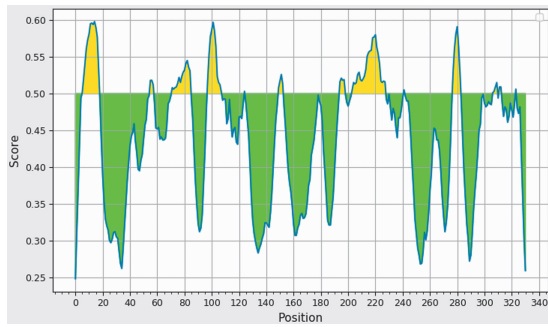
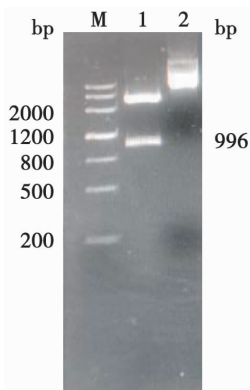


图 11 EgLDH 蛋白的 B 细胞抗原表位预测

Fig. 11 B cell antigen epitope prediction of the EgLDH protein

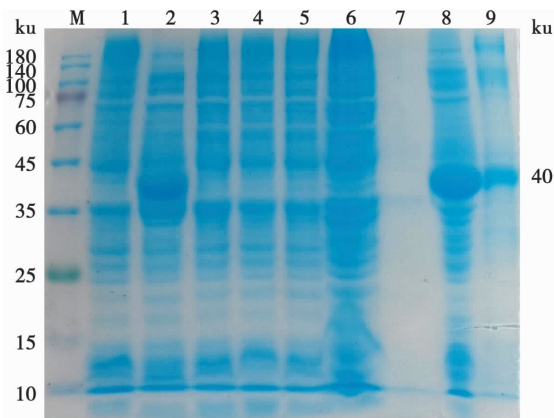


M DNA Marker III 1 重组质粒 pET28a-EgLDH 质粒双酶切产物 2 重组质粒 pET28a-EgLDH 质粒

图 12 重组质粒 pET28a-EgLDH 双酶切鉴定结果

M DNA Marker III 1 Double digestion product of recombinant plasmid pET28a-EgLDH plasmid 2 Recombinant plasmid pET28a-EgLDH plasmid

Fig. 12 Results of double digestion of recombinant pET28a-EgLDH plasmid

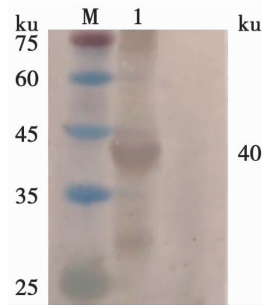


M 广谱彩虹预染蛋白质分子质量标准 1 未诱导的重组菌 2 经 IPTG 诱导的重组菌 3 未诱导的空菌 4 经 IPTG 诱导的空菌 5 未诱导的空载体菌 6 经 IPTG 诱导的空载体菌 7 超声破碎上清 8 超声破碎沉淀 9 纯化的重组 EgLDH 蛋白

图 13 EgLDH 蛋白的 SDS-PAGE 检测

M Broad-spectrum rainbow prestained protein molecular mass standard 1 Uninduced recombinant bacteria 2 Recombinant bacteria induced by IPTG 3,4 Empty bacteria induced by IPTG 5 Uninduced empty vector bacteria 6 Empty vector bacteria induced by IPTG 7 Ultrasonic crushing supernatant 8 Ultrasonic crushing supernatant 9 Purified recombinant EgLDH protein

Fig. 13 The SDS-PAGE detection of the EgLDH protein



M 广谱彩虹预染蛋白质分子质量标准 1 重组 EgLDH 蛋白与犬阳性血清反应条带

图 14 EgLDH 蛋白的 Western blot 鉴定

M Broad-spectrum rainbow prestained protein molecular mass standard 1 Recombinant EgLDH protein reacted with canine positive serum bands

Fig. 14 The Western blot characterization of the EgLDH protein

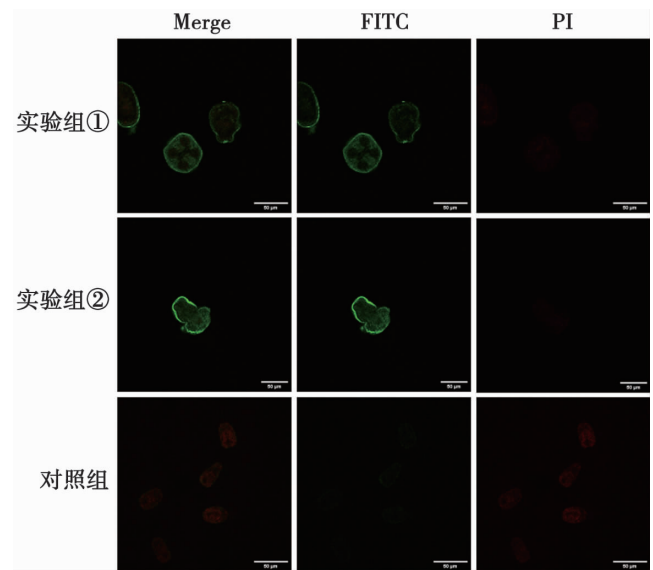


图 15 EgLDH 蛋白在原头蚴阶段间接免疫定位

Fig. 15 Indirect immunolocalization of EgLDH protein at the metacercarial stage

9 EgLDH 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

将重组质粒 pET28a-EgLDH 质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞后诱导表达, 表达产物用 12% SDS-PAGE 进行检测, 结果显示, 成功获得大小约 40 ku 的重组蛋白(图 11), 与预期大小一致, EgLDH 蛋白主要位于包涵体中。

Western blot 鉴定结果表明重组 EgLDH 蛋白能够被细粒棘球绦虫感染的犬血清识别, 显示其有着良好的免疫原性, 证明其有作为细粒棘球绦虫病疫苗抗原的潜力。

10 EgLDH 蛋白间接免疫荧光结果

原头蚴玻片经过间接免疫荧光方法检测, 通过激光共聚焦观察可见, 在原头蚴的表皮层可以看到特异性绿色荧光, 其他部位无特异性绿色荧光, 表明 EgLDH 基因主要在原头蚴的表皮层表达。

讨 论

我国是受细粒棘球绦虫威胁最严重的国家之一,危害严重^[15-16]。乳酸脱氢酶在疟原虫诊断方面有着相当大的关注度。李雪峰等^[17]用抗疟疾乳酸脱氢酶重组蛋白的单克隆抗体免疫层析试剂盒评价该试剂盒在疟疾诊断和鉴别诊断上的特异性和敏感性以及考核疟疾治疗效果,表明抗疟疾乳酸脱氢酶重组蛋白的单克隆抗体对于疟疾诊断有着良好的效果。弓形虫乳酸脱氢酶脱氢酶基因缺失株接种小鼠可以引发针对致命感染的有效免疫力,而且弓形虫乳酸脱氢酶脱氢酶基因缺失株毒力减弱,证明弓形虫 LDH 缺失突变体具有疫苗研发潜力^[18]。一种以堆型艾美尔球虫乳酸脱氢酶基因为抗原的 DNA 疫苗,接种实验鸡后进行攻虫,结果成功诱导出现保护性免疫,而且与鸡 IL-2 或 IFN- γ 共表达可增强其保护性免疫效果^[19]。乳酸脱氢酶在体内寄生虫的疫苗和诊断抗原研究备受关注。

本研究通过生物信息学分析发现 EgLDH 蛋白没有跨膜区与信号肽,是一种疏水性稳定蛋白,与 Lu 等^[20]推测 EgLDH 蛋白可能具有跨膜区的结论相悖。荧光定量 PCR 结果显示乳酸脱氢酶在成虫阶段的表达量显著高于原头蚴阶段,说明细粒棘球绦虫成虫阶段糖酵解过程激烈程度大于成虫阶段。本研究发现 EgLDH 具有 13 个潜在的抗原表位,且 Western blot 结果发现重组 EgLDH 蛋白能够被细粒棘球绦虫感染的犬血清识别,显示其有着良好的免疫原性,证明其有作为细粒棘球绦虫病疫苗抗原的潜力,可以作为终末宿主疫苗候选抗原分子继续深入研究,间接免疫荧光结果显示 EgLDH 定位于原头蚴表皮层,与 Huang 等^[21]通过对亚洲带绦虫乳酸脱氢酶蛋白间接免疫荧光实验发现其定位于成虫虫体表膜和六钩蚴的表皮层结果相一致,由于细粒棘球绦虫寄生于中间或终末宿主体内时所处环境为缺氧环境,无氧糖酵解反应是其能量来源的主要途径,因此在此过程中会产生大量丙酮酸,继而转化为乳酸,而乳酸的蓄积对虫体有害,所以需要乳酸脱氢酶将其转化为丙酮酸防止乳酸堆积对虫体产生危害,也可以为上一步反应提供原材料,维持虫体丙酮酸与乳酸之间的平衡,而且乳酸脱氢酶定位于表皮层有利于乳酸排出。

综上,EgLDH 蛋白定位于表皮层与虫体寄生过程中能量的来源有重要作用,为研发细粒棘球绦虫病疫苗候选抗原和药物靶点提供理论基础。

【参考文献】

[1] Deplazes P, Rinaldi L, Rojas C, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis[J]. Adv Parasit, 2017, 95: 315-493.

- [2] 王正荣,朱兴全,贾万忠,等. 包虫病的流行危害和防控技术[J]. 现代畜牧兽医,2019,(6):44-48.
- [3] Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al. Ecology and life cycle patterns of *Echinococcus* species[J]. Adv Parasit, 2017, 95: 213-314.
- [4] 张春霞,李鑫,欧兰欣,等. 棘球蚴疫苗及诊断试剂候选抗原研究现状[J]. 动物医学进展,2022,43(10):99-104.
- [5] 赵莉,张旭,张壮志,等. 包虫病诊断技术与预防疫苗的研究进展[J]. 疾病预防控制通报,2013,28(2):84-87.
- [6] Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, et al. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern[M]. WOA, 2001.
- [7] 王艳歌,董辉,黄兵. 寄生虫乳酸脱氢酶研究进展[J]. 中国动物传染病学,2014,22(01):80-86.
- [8] 陈祖云,戴佳琳,黄江,等. 抗亚洲带绦虫药物对乳酸脱氢酶抑制作用[J]. 中国公共卫生,2010,26(5):553-554.
- [9] Witola WH, Zhang X, Kim CY. Targeted gene knockdown validates the essential role of lactate dehydrogenase in *Cryptosporidium parvum*[J]. Int J Parasitol, 2017, 47(13):867-874.
- [10] Al-Anouti F, Tomavo S, Parmley S, et al. The expression of lactate dehydrogenase is important for the cell cycle of *Toxoplasma gondii*[J]. JBC, 2004, 279(50):52300-52311.
- [11] Li K, Nader SM, Zhang X, et al. Novel lactate dehydrogenase inhibitors with in vivo efficacy against *Cryptosporidium parvum*[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(7):e1007953.
- [12] 王艳歌,董辉,黄兵. 寄生虫乳酸脱氢酶研究进展[J]. 中国动物传染病学报,2014,22(1):80-86.
- [13] Kumar S, Stecher G, Tamur A. MEGA 7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33: 1870-1874.
- [14] Bryson V, Vogel HJ. Evolving genes and proteins[J]. SCI, 1965, 147(3653):68-71.
- [15] Budke CM, Deplazes P, Torgerson PR. Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis[J]. Em Infect Dis, 2006, 12 (2):296-303.
- [16] Wen H, Vuitton L, Tuxon T, et al. Echinococcosis: advances in the 21st century[J]. Clin Microbiol, 2019, 32(2):10.
- [17] 李雪峰,黄科生,朱燕燕,等. 疟原虫乳酸脱氢酶 Mab 在疟疾诊断和疗效考核上的应用[J]. 中国热带医学, 2006(10): 1743-1744, 1749.
- [18] Abdelbaset AE, Fox BA, Karram MH, et al. Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection[J]. PloS one, 2017, 12(3):e0173745.
- [19] Song H, Yan R, Xu L, et al. Efficacy of DNA vaccines carrying *Eimeria acervulina* lactate dehydrogenase antigen gene against coccidiosis[J]. Exp Parasitol, 2010, 126(2):224-231.
- [20] Lu G, Lu Y, Li L, et al. Identification and bioinformatics analysis of lactate dehydrogenase genes from *Echinococcus granulosus* [J]. Asian Pac J Trop Med, 2010, 3(10):757-761.
- [21] Huang J, Huang Y, Wu X, et al. Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica* [J]. Parasitol Res, 2009, 104:287-293.