

DOI:10.13350/j.cjpb.221112

• 论著 •

细粒棘球绦虫 TSP 3 基因的生物信息学分析及原核表达*

陆宝燕^{1,2}, 王宁^{1,2}, 赵鹏鹏^{1,2}, 县锦雯^{1,2}, 王正荣^{1**}, 薄新文^{1,2**}

(1. 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, 新疆石河子 832000;
2. 石河子大学动物科技学院)

【摘要】 目的 为分析细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)TSP3 基因的生物信息学特性并表达其非跨膜区蛋白。

方法 本研究利用 PCR 扩增 Eg-TSP3 全长基因及非跨膜区序列, 采用生物信息学软件对 Eg-TSP3 蛋白的理化性质、结构特点及亲缘进化关系进行分析; 利用 RT-QPCR 分析 TSP3 在细粒棘球绦虫不同发育阶段中的相对转录水平; 并构建重组质粒, 经双酶切鉴定, 将其转化至大肠埃希菌 *E. coli* BL21(DE3) 后, 采用 SDS-PAGE 检测 TSP3 蛋白的表达, 通过 western blot 对蛋白进行抗原性分析。 **结果** 生物信息学分析结果显示, Eg-TSP3 基因全长 681 bp, 编码 226 个氨基酸, 蛋白分子式为 C₁₁₁₃H₁₇₇₂N₂₇₀O₂₉₇S₂₀, 无信号肽, 有 4 个跨膜区, 理论相对分子质量约 24×10³, 含有 5 个 B 细胞抗原表位, 为稳定的胞内蛋白。 Eg-TSP3 的氨基酸序列与绦虫属的氨基酸序列一致性为 90% 以上, 进化关系中两者亲缘性极近, 与人的氨基酸序列一致性为 42.2%, 进化关系中两者亲缘性较远。 TSP3 基因在细粒棘球绦虫的原头蚴、包裹壁以及成虫阶段均有转录, 且转录水平无显著差异。 双酶切鉴定及测序分析, 证明成功构建重组质粒 pET32a-TSP3, 重组质粒转化 BL21 后成功诱导表达蛋白, Western blot 结果显示, 该蛋白具有良好的反应原性。 **结论** 本研究初步表明 Eg-TSP3 蛋白是一个具有潜在研究价值的疫苗免疫靶点, 为进一步研究囊型包虫病的疫苗候选分子奠定了基础。

【关键词】 细粒棘球绦虫; TSP3; 生信分析; 原核表达

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1297-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Nov. ;17(11):1297-1302.]

Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of TSP 3 gene of *Echinococcus granulosus*

LU Bao-yan¹, WANG Ning^{1,2}, ZHAO Peng-peng^{1,2}, XIAN Jin-wen^{1,2}, WANG Zheng-rong¹, BO Xin-wen^{1,2} (1. National Key Laboratory for Genetic Improvement and Healthy Breeding of Sheep / Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation Sciences, Shihezi 832000, Xinjiang, China; 2. School of Animal Science and Technology, Shihezi University) **

【Abstract】 **Objective** To analyze the bioinformatics characteristics of *Echinococcus granulosus* TSP3 gene and express its non-transmembrane domain protein. **Methods** In this study, the full-length gene and non-transmembrane region sequences of Eg-TSP3 were amplified by PCR, and the physicochemical properties, structural characteristics and phylogenetic relationship of Eg-TSP3 protein were analyzed by bioinformatics software. The relative transcription level of TSP3 in different developmental stages of *E. granulosus* was analyzed by RT-QPCR. The recombinant plasmid was constructed and identified by double enzyme digestion, and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expression of TSP3 protein was detected by SDS-PAGE, and the antigenicity of the protein was analyzed by western blot. **Results** Bioinformatics analysis showed that the full length of Eg-TSP3 gene was 681 bp, encoding 226 amino acids. The protein molecular formula was C₁₁₁₃H₁₇₇₂N₂₇₀O₂₉₇S₂₀, with no signal peptide and four transmembrane regions. The theoretical molecular weight was about 24 ku, and there were five B cell antigen epitopes, which were stable intracellular proteins. The amino acid sequence of Eg-TSP3 was more than 90% consistent with the amino acid sequence of Taenia. In the evolutionary relationship, the two were closely related, and the consistency with human amino acid sequence was 42.2%. In the evolutionary relationship, the two were far related. TSP3 gene was transcribed in protoscoleces, cyst walls and adult stages of *E. granulosus*, and there was no significant difference in the transcription level. Double enzyme digestion and sequencing analysis showed that the recombinant plasmid pET32a-TSP3 was successfully constructed. The recombinant plasmid was transformed into BL21 and the expression protein was successfully induced. Western blot results showed that the protein had good reactivity. **Conclusion** This study preliminarily showed that Eg-TSP3 protein was a vaccine

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 31860701); 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. 2021DZ02); 新疆农垦科学院“揭榜挂帅”项目; 新疆生产建设兵团国际科技合作项目(No. 2021BC008, 2020BC007)。

** **【通讯作者】** 王正荣, E-mail: wzrtiger@sina.com; 薄新文, E-mail: 851661263@qq.com

【作者简介】 陆宝燕(1994-), 女, 新疆乌苏市人, 硕士研究生。研究方向: 兽医寄生虫分子生物学。E-mail: 516921061@qq.com

immune target with potential research value, which laid the foundation for further study on vaccine candidate molecules of cystic echinococcosis.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; TSP3; bioinformatics analysis; prokaryotic expression

细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg) 隶属扁形动物门(Platyhelminthes), 绦虫纲(Cestoda), 圆叶目(Cyclophyllidea), 带绦虫科(Taeniidae), 棘球属(*Echinococcus*)^[1]。Eg 是独特的双宿主寄生虫, 幼虫寄生在牛、羊、人等中间宿主的肝脏和肺脏等实质性脏器内, 成虫寄生在犬、狐等终末宿主的小肠内^[2]。中间宿主可通过呼吸道、消化道或直接接触而感染, 犬科动物因误食中间宿主的脏器而感染, 以此形成恶性循环的生活史^[2-3]。Eg 是囊型包虫病(Cystic echinococcosis, CE)的主要病原, 呈全球性分布, 我国是该病的高发国家之一^[4]。CE 作为一种严重的人畜共患寄生虫病, 已危及我国 12 个省约七千万人口和六千万牲畜, 每年造成的经济损失可达 30 亿元, 该病不仅严重影响到畜牧业的发展, 还威胁着人类的安全, 对全球造成巨大的经济损失^[5]。目前, CE 已被纳入“健康中国 2030”规划中的五大寄生虫病, 同时也是我国免费救治的重大传染病之一^[6]。

四跨膜蛋白(Tetraspanin, TSP)是一类广泛存在于真核生物体内且进化保守的细胞膜蛋白, 参与细胞的增殖、分化、粘附及免疫反应等重要的生物过程^[7-8]。研究表明, TSP 家族参与吸虫外皮的发育、成熟及稳定, 并参与血吸虫的免疫逃避, 已有部分 TSP 家族成员被用于华支睾吸虫病、血吸虫病、泡型包虫病以及丝虫病的候选疫苗抗原^[9]。Dang 等^[10]报道多房棘球绦虫 TSP3 参与局部及全身的免疫反应, 具有较好的免疫原性, 是多房棘球绦虫潜在的疫苗抗原候选分子。但目前未见 Eg TSP3 相关的研究报道, 因此, 为了研究 Eg 四跨膜蛋白家族 TSP3 基因的免疫原性, 本研究旨在对 E. g 的 TSP3 核苷酸序列进行基因克隆、生物信息学分子及蛋白重组表达, 为其生物学功能、免疫原性等方面的研究奠定基础, 为抗包虫病疫苗候选分子的筛选提供理论依据。

材料与方 法

1 材料

细粒棘球绦虫原头蚴、成虫和包囊壁由本实验室保存提供。*E. coli* DH5 α 及 BL21(DE3)感受态细胞购于天根生化科技有限公司; pMD19-T 载体和 PET32a 载体购自美国 Invitrogen 公司; RNA 提取试剂盒, RNA 反转录试剂盒和 Tricine-SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; TRIZOL 试剂 Reagent 购自美国 Thermo Fisher

Scientific 公司; Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DL DNA 2000/4500 Marker, 限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Xho*I, Protein Marker, 2 \times PCR Mix 及 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液购自 TaKaRa 公司; SYBR Green Master Mix 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 质粒小提取试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自美国 Biosharp 公司。

2 方法

2.1 引物的设计及合成 应用 Primer 5.0 软件设计针对 Eg-TSP3 基因全长序列(EgrG_001077400)和非跨膜区(LEL)部分序列的 PCR 引物; 应用 Primer 3.0 软件设计针对 Eg-TSP3 的 qPCR 引物, qPCR 内参引物由本实验室保存。引物序列见表 1, 下划线部分为 *Bam*H I 和 *Xho*I 的酶切位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplification primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences (5'-3')	片段大小(bp) Fragment size
TSP3-F	ATGGCTCTTTCGTGTGGTGG	681
TSP3-R	TTAAACCTTCTCGTATTTCGTTGACC	
TSP3-F'	CGCGGATCCGCG CATGACTTTGTTCGGTCTTGTG	264
TSP3-R'	CCGCTCGAGCGG CAGAGAGGAATCCTTAATTTGCT	
qTsp3-F	TTGTGGCTGAGATCGTCTGT	
qTsp3-R	TGATGCAGGTTAGGGCTTAC	
GAPDH-F	GAGTCATGTAGGCCACG	
GAPDH-R	AGATGGAGGTGGGGATAGG	

2.2 目的基因的 PCR 扩增、克隆及测序 采用 RNA 提取试剂盒提取细粒棘球绦虫成虫总 RNA 并反转录为 cDNA, 以此为模板, 利用 TSP3-F/TSP3-R、TSP3-F'/TSP3-R' 分别扩增 TSP3 ORF 全长基因序列和非跨膜基因序列。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 共 35 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收特异性基因片段。目的基因连接至克隆载体 pMD19-T, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞后进行菌液 PCR 鉴定, 阳性重组载体送至上海生工生物工程有限公司测序。

2.3 Eg-TSP3 全长目的基因的生物信息学分析 将测序正确的 Eg-TSP3 氨基酸序列进行生物信息学分析。利用 Prot-Param (<https://web.expasy.org/>)

protparam/)在线软件分析 TSP3 基因编码蛋白的氨基酸序列及理化性质;应用 NetPhos 3.0 Server 软件预测 TSP3 蛋白的磷酸化位点;利用 DNASTAR 软件预测蛋白的抗原表位。运用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 以 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)分析该蛋白的二、三级结构;利用 SignalP 4.1 Server 在线软件预测 TSP3 蛋白的信号肽;利用在线网站(ncbi.nlm.nih.gov/cdd 和 ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/)预测 TSP3 蛋白的保守结构域和开放阅读框;利用在线软件 IEDB(<http://tools.iedb.org/bcell/>)预测 TSP3 蛋白的 B 细胞抗原表位;利用 MEGA5.0 软件分析 Eg-TSP3 编码的氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的遗传进化关系,根据同源性构建系统发育进化树。

2.4 Eg-TSP3 基因在虫体不同发育阶段转录水平测定 分别以原头蚴、成虫及包囊壁的 cDNA 为模板,以 GAPDH 为内参基因,对 TSP3 基因进行 qPCR 扩增。反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,共 45 个循环。采用相对比较 $\Delta\Delta C_t$ ($Q_r = 2^{-\Delta\Delta C_t}$)法对 TSP3 基因在原头蚴、成虫及包囊壁中的相对转录量进行分析,用 Graoh Pad5.0 对得到的数据进行统计分析作图, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2.5 Eg-TSP3 非跨膜区片段重组质粒的构建及鉴定 将测序正确的 Eg-TSP3 菌液扩大培养,采用质粒小提试剂盒提质粒,用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho*I 对 TSP3 质粒和表达载体 pET-32a 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段,连接至表达载体,构建重组质粒 pET-32a-Eg-TSP3,连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,进行菌液 PCR 鉴定,阳性重组菌扩大培养,提取质粒进行双酶切鉴定并测序。

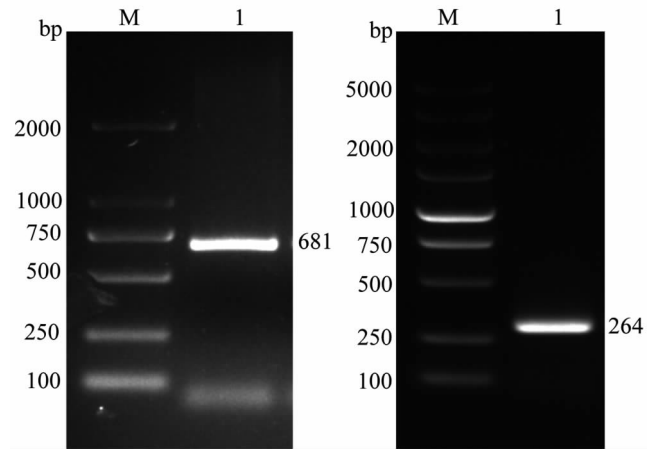
2.6 Eg-TSP3 非跨膜区蛋白的原核表达及鉴定 将构建的重组质粒 pET-32a-Eg-TSP3 转化至 BL21 (DE3) 受态细胞中,次日挑取单菌落,37 °C 扩大培养至菌液 A₆₀₀ 值达到 0.6~0.8,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,6 h 后取 1 mL 菌液裂解,进行 12% SDS-PAGE 电泳检测,再将 Eg-TSP3 蛋白转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,分别以正常犬血清和感染原头蚴的犬血清为一抗,HRP 标记的兔抗犬 IgG 为二抗(1:5000 稀释)进行 Western blot,鉴定非跨膜区表达。

结 果

1 Eg-TSP3 基因 PCR 扩增

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 扩增的目的片段大小与预期一致(图 1)。扩增片段回收后进行克

隆转化,阳性菌液送至生工生物公司测序验证,分别获得序列长为 681 bp、264 bp 的 TSP3 基因阳性转化子。



M DNA 标志物 1 TSP3 基因 PCR 产物

图 1 E. g TSP3 全长基因(左)和非跨膜区(右)PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA Marke 1 TSP3gene

Fig. 1 E. g TSP3 full-length gene (left) and non-transmembrane region (right) PCR amplification results

2 Eg-TSP3 生物信息学分析

2.1 Eg-TSP3 基因全长及编码蛋白的理化性质 利用生物信息学软件分析 Eg-TSP3 基因 cDNA 全长 681 bp,编码 226 个氨基酸。Eg-TSP3 蛋白的分子式为 C₁₁₁₃H₁₇₇₂N₂₇₀O₂₉₇S₂₀,相对分子质量为 24×10^3 ,理论等电点为 8.43。该蛋白含有 1 个潜在的 N 端糖基化位点,具有 5 个开放阅读框,含有 1 个胞外环结构,位于 25-68 个氨基酸区域。蛋白的不稳定指数为 30.58,表明为稳定蛋白。脂肪系数为 112.61,亲水性为 0.732,为亲水性蛋白,而亲水性蛋白有利于蛋白的高效率表达和抗原抗体的嵌合。

2.2 Eg-TSP3 蛋白跨膜区、信号肽及抗原表位预测 利用 TMHMM 预测 Eg-TSP3 蛋白有 4 个跨膜区,由 N-C 端分别为 12-34、49-71、83-105、194-216 个氨基酸(图 2)。该蛋白无信号肽,且为非分泌蛋白。通过 IEDB 在线软件预测 TSP3 蛋白有 5 个潜在的 B 细胞表位,分别位于 Eg-TSP3 蛋白 38-45、109-136、143-143、146-181、222-223 氨基酸区段(图 3),表明 Eg-TSP3 蛋白具有良好的抗原性。

2.3 E. g TSP3 蛋白二、三级结构 以 SWISS-MODEL 在线软件预测 Eg-TSP3 蛋白质的二、三级结构包含 56.64%的 α -螺旋,23.01%的无规则卷曲,14.16%的延伸链结构和 6.19%的 β -转角,经盘绕、折叠和卷曲等一系列复杂的过程形成的三级结构如图 4。

2.4 Eg-TSP3 氨基酸序列的比对及蛋白进化树的构建 将 Eg-TSP3 的氨基酸序列和 NCBI 数据库中其他物种的氨基酸序列进行比对,结果显示 Eg-TSP3 的

氨基酸序列与细粒棘球绦虫跨膜蛋白 CDS17981.1 的同源性为 94%，与绦虫属的同源性为 90%以上，与其他物种也具有同源性，表明 Eg-TSP3 在不同物种中均具有保守性。利用 MEGA 6.0 软件绘制 Eg-TSP3 的蛋白系统进化树，结果显示 Eg-TSP3 与多房棘球绦虫 (*Echinococcus multilocularis*)、亚洲带绦虫 (*Taenia asiatica*) 等绦虫属聚为一支，同源进化关系极近，而与人 (*Homo sapiens*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、犬狼 (*Canis lupus familiaris*) 等在同源进化关系较远 (图 5)。

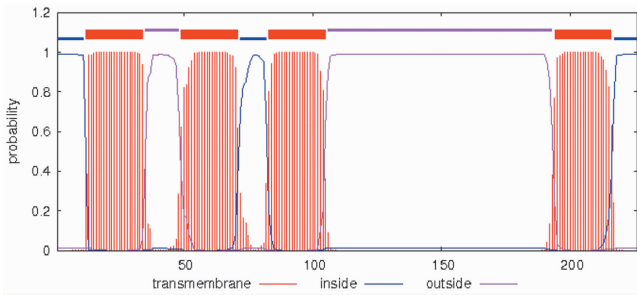


图 2 Eg-TSP3 蛋白的跨膜结构域
Fig. 2 Transmembrane domain of Eg-TSP3

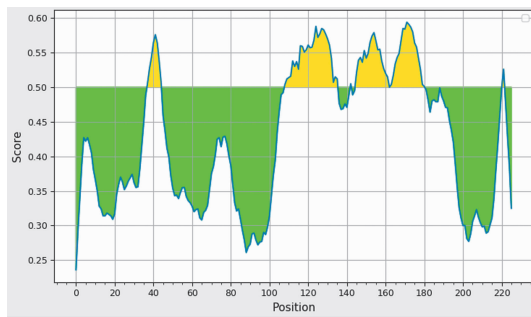


图 3 Eg-TSP3 蛋白 B 细胞抗原表位预测
Fig. 3 Prediction of B cell epitopes of Eg-TSP3

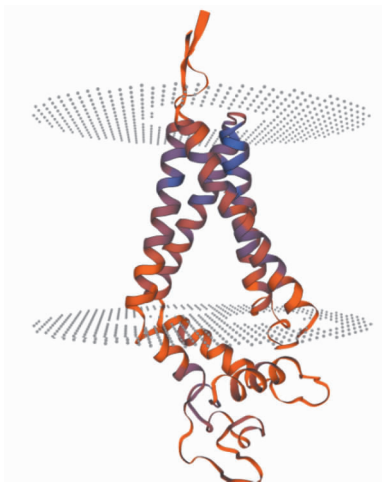


图 4 Eg-TSP3 蛋白三级结构预测
Fig. 4 Structural of Eg-TSP3 protein

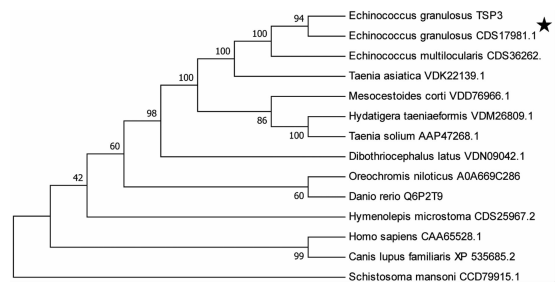


图 5 Eg-TSP3 蛋白进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of Eg-TSP3 protein experiment

3 Eg-TSP3 基因在虫体不同发育阶段的转录水平

采用 qPCR 分析 TSP3 基因在原头蚴、成虫及包裹壁中的相对转录量，结果如图 6。TSP3 基因在 Eg 原头蚴、包裹壁以及成虫阶段均有转录，且转录量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，表明 Eg-TSP3 基因可能在细粒棘球绦虫原头蚴、成虫及包裹壁的生长发育过程中均起到调控作用。

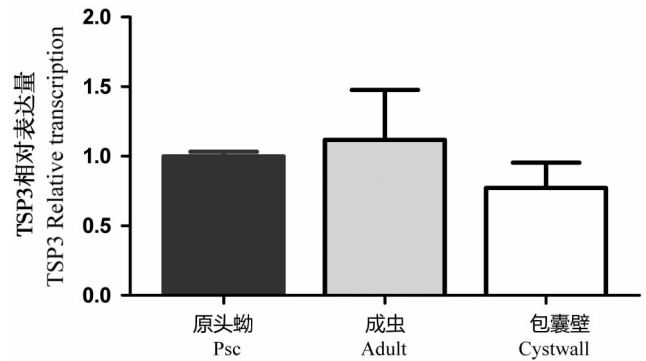


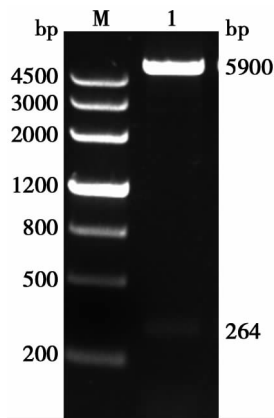
图 6 Eg-TSP3 基因在虫体不同发育阶段的转录水平
Fig. 6 Transcription level of Eg-TSP3 gene at different developmental stages of insects

4 重组 pET32a-Eg-TSP3 质粒的鉴定

将提取的重组 pET32a-Eg-TSP3 质粒进行 *BamH* I 和 *Xho* I 酶双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示插入 pET32a 片段与目的片段大小一致 (图 7)。酶切鉴定正确的重组质粒转化至表达菌 BL21，测序显示 TSP3 目的基因片段与其载体 PET32a 两端的序列及连接方向正确，表达载体构建成功。

5 重组 Eg-TSP3 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

重组质粒转化至 BL21(DE3) 后在 37 °C 进行诱导表达，表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳检测，获得 8.8 ku 的重组蛋白，与预测的 Eg-TSP3 蛋白分子质量一致。Western blot 显示 Eg-TSP3 蛋白能被感染原头蚴的犬血清识别，在 8.8 ku 处出现反应条带 (图 8)，而不与正常犬血清发生反应，表明 Eg-TSP3 具有良好的反应原性。

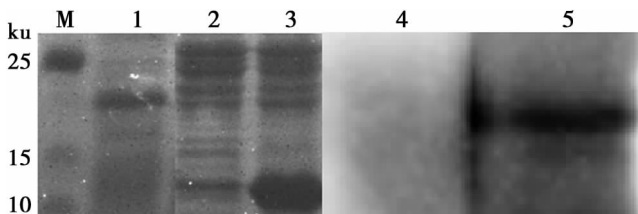


M DNA 标志物 1 pET32a-Eg-TSP3 双酶切产物

图7 重组质粒 pET32a-Eg-TSP3 的双酶切鉴定

M DNA marker 1 Products of pET32a-Eg-TSP3 double-enzyme digestion

Fig. 7 Identification of recombinant plasmid pET32a-Eg-TSP3 by double enzyme digestion



M 蛋白分子质量标准 1 经 IPTG 诱导的空载体菌 2 未经诱导的重组菌 3 重组 Eg-TSP3 蛋白 4 重组 Eg-TSP3 蛋白与正常犬血清反应对照 5 重组 Eg-TSP3 蛋白与犬阳性血清反应条带

图8 重组蛋白 Eg-TSP3 的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 鉴定

M Protein molecular weight standard 1 Empty vector bacteria induced by IPTG 2 Uninduced recombinant bacteria 3 Recombinant Eg-TSP3 protein 4 Recombinant Eg-TSP3 protein and normal dog serum 5 Reaction band of recombinant Eg-TSP3 protein with dog positive serum

Fig. 8 SDS-PAGE detection and Western blot identification of recombinant protein Eg-TSP3

讨论

蛋白质的翻译需进行多次的修饰反应,才能成为功能成熟的蛋白质。磷酸化是最常见的蛋白质修饰过程,会随着细胞外界环境的改变而变化,对蛋白有酶原激活和细胞信号传导等作用,当蛋白修饰异常时,会导致宿主发生疾病^[11]。运用生物信息学分析软件预测 Eg-TSP3 潜在的生物学特征,该蛋白含有 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点,表明 TSP3 蛋白可能参与 Eg 的生长发育过程。抗原表位的预测在研究蛋白质结构与功能中尤为重要,特定的抗原表位决定抗原的特异性,在疾病的诊断及疫苗开发具有重要意义。Eg-TSP3 有 5 个潜在的 B 细胞抗原表位,其中无规则卷曲区域在 150-178 和 125-130 位氨基酸的比例较高,显示这两个区域具有较强的抗原性,且大部分抗原表位均位于四跨膜蛋白 LEL 胞外环区域,具有高度保守的半胱氨酸序列,表明 Eg-TSP3 蛋白具有抗原潜力。 α 螺旋和 β

折叠位于蛋白质内部,是构成跨膜区域的重要结构,在维持蛋白质二级结构的稳定中到重要作用,而 β 转角和无规卷曲位于蛋白质表面,容易与配体结合,出现抗原表位的几率很高^[12-13]。Eg-TSP3 蛋白的二、三级结构以 α -螺旋为主,具有良好的稳定性,且为亲水性蛋白,蛋白质的空间构象使存在于蛋白表面的亲水残基结合溶液中的极性分子,中和蛋白质电荷,使蛋白质保持最小能量,而亲水性区域与抗原表位息息相关^[14]。

对 Eg-TSP3 的氨基酸序列进行多序列比对分析,其与人类、犬、狼的氨基酸序列同源性不高,在分子进化树中亲缘性较远,而与多房棘球绦虫同源性极近。Wang 等^[13]报道棘球绦虫表面的抗原 TSP 家族具有良好的免疫原性,Dang 等^[15]研究发现 TSP3 是棘球绦虫感染过程中产生免疫原性最好的虫体蛋白。庞明泉^[16]对多房棘球绦虫 TSP3 蛋白进行了抗原表位的预测,结果表明该蛋白可作为候选的抗原分子。刁晓艳等^[17]对多房棘球绦虫 TSP3 基因进行原核表达并获得纯化蛋白,为其免疫学相关研究奠定了基础。本研究预测 Eg-TSP3 序列中无信号肽且有 5 个 B 细胞线性表位,故可作为棘球绦虫疫苗研制的潜在靶点。通过分析 Eg-TSP3 在虫体不同阶段的转录水平,发现其在细粒棘球绦虫的每个发育阶段均稳定转录。由于细粒棘球绦虫是一种无肠道绦虫,因此其具有微绒毛的体表便成为细粒棘球绦虫吸收营养以及清除外环境废物的重要部位,TSP 家族同时调节细胞通透性,推测 Eg-TSP3 蛋白可能参与调节细粒棘球绦虫营养物质的代谢运输^[9]。本研究成功表达了 Eg-TSP3 非跨膜区蛋白,为深入了解 Eg-TSP3 的结构、功能及其在虫体生长发育过程中代谢及免疫的规律奠定了基础。

研究表明,mRNA 稳定性、密码子偏嗜性及启动密码子强度等会抑制外源基因在宿主系统中的表达^[18]。Grosjean 等^[19]报道外源蛋白在大肠埃希菌中的表达效率与外源蛋白的密码子组成有关 Sorensen 等^[20]发现稀有密码子在 mRNA 中的分布情况会导致外源蛋白在大肠埃希菌中的原核表达水平过低甚至失败。本实验室对细粒棘球绦虫 TSP 家族多个基因的全长进行原核表达,结果均未成功,分析发现 TSP 家族的基因含有较多的串联稀有密码子,导致其表达量过低,且跨膜蛋白的跨膜区域对蛋白的原核表达也有影响^[21]。“LEL”环是四跨膜蛋白重要的四跨膜网,决定了四跨膜蛋白的分子特性,也参与分子的相互作用^[22]。在对 TSP3 基因的生物信息学分析时发现,TSP3 蛋白的“LEL”区域基本包含所有主要的抗原表位,因此在本研究中截取 TSP3 非跨膜区的主要抗原区域,对 TSP3 的“LEL”区域进行原核表达。杨光友等^[9]对 Eg-TSP1 基因的 LEL 区域进行了表达并免疫

小鼠,发现重组的 LEL 区域具有较好的免疫效果。Dang 等^[10]评估了 7 种多房棘球绦虫对小鼠肺泡棘球蚴病模型的保护作用,发现 Em-TSP1 重组 LEL 诱导的包裹减少率可达到 80% 以上。本研究对 Eg-TSP3 蛋白进行了原核表达,Western blot 显示重组蛋白 Eg-TSP3 能被感染原头犬犬血清识别,而不与正常犬的血清发生反应,表明 Eg-TSP3 具有良好的反应原性,有望作为细粒棘球蚴病的诊断抗原或疫苗候选抗原。

本研究成功克隆了 Eg-TSP3 ORF 全长基因序列并表达了其主要抗原表位编码蛋白,经生物信息学预测 TSP3 可作为细粒棘球蚴免疫相关研究的重要分子,Western blot 鉴定该蛋白具有很好的反应原性,具有作为疫苗候选抗原的潜力。

【参考文献】

[1] 张文宝,张壮志,郑雪婷,等. 棘球蚴(包虫)病预防疫苗的研制与应用[J]. 中国人兽共患病学报,2018,34(9):834-838.
[2] Deplazes P, Rinaldi L, Rojas C, et al. Global distribution of alveolar and cystic echinococcosis [J]. Adv Parasitol,2017(95):315-493.
[3] Kumar MJ, Toe K, Banerjee RD. Hydatid cyst of liver [J]. Postgrad Med J,2003,79(928):113-114.
[4] 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,(06):44-48.
[5] Kern P,Silva AM,Akhan O,et al. The echinococcoses:diagnosis, clinical management and burden of disease[J]. Adv Parasitol, 2017(96):259-369.
[6] 汪天平,操治国. 中国包虫病防控进展及其存在的问题[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2018,36(3):291-296.
[7] Avril C,Rhul T,James A,et al. Comparative genomics of the major parasitic worms[J]. Nat Gene,2019,51(1):318-326.
[8] Stipp CS,Kolesnikova TV,Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins[J]. Trends Biochem Sci,2003,28(2):106-112.
[9] Hu DD,Song XJ,Xie Y , et al. Molecular insights into a tetraspanin in the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*[J].

Parasit Vectors,2015,8(1):311.
[10] Dang ZS, Feng J, Yagi K, et al. Mucosal adjuvanticity offibronectin binding peptide (FBP) fused with *Echinococcus multilocularis* tetraspanin 3: systemic and local antibody responses[J]. PLoS Negl Trop Dis,2012,6(9):e1842.
[11] 阮班军,代鹏,王伟,等. 蛋白质翻译后修饰研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(7):1027-1037.
[12] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2016:1-464.
[13] Wang F,Ye B. In silico cloning and B/T cell epitope prediction of triosephosphate isomerase from *Echinococcus granulosus* [J]. Parasitol Res,2016,115(10):3991-3998.
[14] Zhang W, Liu J, Zhao M, et al. Predicting linear B-cellepitopes by using sequence-derived structural and physicochemical features[J]. Int J Data Min Bioinform,2012,6(5):557-569.
[15] Dang ZS, Yagi K, Yuzaburo O, et al. A pilot study on developing mucosal vaccine against alveolar echinococcosis (AE) using recombinant tetraspanin 3: Vaccine efficacy and immunology [J]. PLoS Negl Trop Dis,2012,6(3):e1570.
[16] 庞明泉. 多房棘球蚴抗原蛋白 Emy162 及 TSP3 的抗原表位的预测及鉴定[D]. 西宁:青海大学,2016.
[17] 刁晓艳,周虎,李润乐,等. 多房棘球蚴蛋白 TSP3 的原核表达及分离纯化[J]. 中国高原医学与生物学杂志,2018,39(3):191-196.
[18] 尹春光,杜立新,赵桂平,等. Mx 基因稀有密码子和 mRNA 结构及大肠埃希菌表达优化[J]. 遗传,2009,31(1):75-82.
[19] Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes:the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes[J]. Gene, 1982,18(3):199-209.
[20] Sorensen MA,Kurland CG,Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli* [J]. J Mol Biol,1989,207(2):365-377.
[21] 王炜焯. 细粒棘球蚴 TSP8、TSP11 基因的原核表达及免疫学初步分析[D]. 石河子:石河子大学,2020.
[22] Seigneuret M, Conjeaud H, Zhang H, et al. Structural bases for tetraspanin functions[J]. Tetraspanins Spr,2013:1-29.

【收稿日期】 2022-05-29 【修回日期】 2022-08-20

(上接 1296 页)

[13] 杨树国. 阴道毛滴虫有症状及无症状株黏附蛋白 33 基因的克隆、序列比较和表达研究[D]. 成都:四川大学,2007.
[14] Friedman M, Xu A, Lee R, et al. The Inhibitory activity of Anthraquinones against pathogenic protozoa, pacteria, and Fungi and the relationship to structure[J]. Molecules, 2020, 25(13):3101.
[15] 王彦英,王秀菊,郭永和. 中药体外抗阴道毛滴虫的试验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志,2002,15(4):插页 20.
[16] 闫艳,陈建芳,董文杰,等. 三种中草药体外抗阴道毛滴虫作用研究[J]. 包头医学院学报,2010,26(3):6-7,10.
[17] 郭永和,刘永春,秦剑. 11 种中药体外灭阴道毛滴虫[J]. 时珍国医国药,2000,11(4):297-298.
[18] 潘玉华,徐亚利,杜秋燕,等. 八种中药体外抗滴虫试验研究[J]. 中医药研究,2002,18(3):45.
[19] 李哲敏,刘航. 滴虫性阴道炎介入单味大黄煎液治疗效果分析

[J]. 实用妇科内分泌电子杂志,2020,7(24):50-62.

[20] 孙宝清,张丽娟,谭桂莲,等. 大黄酸、大黄素和大黄酚体外抗阴道毛滴虫作用的观察[J]. 现代预防医学,2013,40(19):3654-3656.
[21] 刘晗,高云. 大黄素药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国药理学通报,2009,25(12):1552-1555.
[22] 刘德明,周春燕,吴嘉思,等. 大黄素通过线粒体通路诱导 HepG2 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(3):104-108.
[23] 邓洁,张小霞,邓晓杨,等. 大黄素上调 PPAR γ 促进 HeLa 细胞 PTEN 表达的实验研究[J]. 西部医学,2015,27(10):1456-1459.
[24] Mohammed A, Ibrahim M, Tajuddeen N, et al. Antidiabetic potential of anthraquinones: A review [J]. Phytother Res, 2020(34):486-504.

【收稿日期】 2022-05-09 【修回日期】 2022-07-20