

DOI:10.13350/j.cjpb.230112

• 论著 •

# 旋毛虫钙网蛋白的表达和生物学特性鉴定\*

白圣洁,程永康,王珍,闫树炜,刘若丹,龙绍蓉,崔晶\*\*,王中全\*\*

(郑州大学基础医学院病原生物学系,河南郑州 450001)

**【摘要】** 目的 克隆表达旋毛虫钙网蛋白(TsCRT),并对其生物学特性进行鉴定。方法 通过 RT-PCR 扩增 TsCRT 基因,构建重组质粒 pMD19T-TsCRT,测序正确后亚克隆至表达载体 pQE80L,构建重组表达载体 pQE80L-TsCRT,转化大肠埃希菌 BL21(DE3),以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,通过 Western blot、qPCR 和免疫荧光试验(IFT)鉴定 rTsCRT 的反应原性及其在不同虫期的表达与组织定位,通过动物免疫试验观察 rTsCRT 的免疫原性。结果 成功构建重组表达载体 pQE80L-TsCRT,转化 DE3 后经 IPTG 诱导表达相对分子质量为  $47 \times 10^3$  的 rTsCRT 蛋白。用纯化的 rTsCRT 免疫小鼠 3 次,血清抗体效价达  $1 : 10^5$ 。Western blot 显示,rTsCRT 可被抗 rTsCRT 血清和旋毛虫感染小鼠血清识别。qPCR 检测显示,TsCRT 在旋毛虫肌幼虫、肠道感染性幼虫、成虫和新生幼虫期均有转录和表达。IFT 试验显示,TsCRT 主要定位在旋毛虫的表皮和胚胎中。结论 TsCRT 在旋毛虫不同虫期均有表达,重组表达的 rTsCRT 具有良好的抗原性,可作为制备抗旋毛虫疫苗及血清学诊断的候选靶抗原。

**【关键词】** 旋毛虫;钙网蛋白;克隆表达;重组蛋白;鉴定

**【中图分类号】** R383.15

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)01-0063-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):63-67,72.]

## Expression and biological characteristics of a novel calreticulin from *Trichinella spiralis*

BAI Sheng-jie, CHENG Yong-kang, WANG Zhen, YAN Sgui-wei, LIU Ruo-dan, LONG Shao-rong, CUI Jing, WANG Zhong-quan (Department of Pathogens, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 4500001, China)

**【Abstract】** **Objective** To express a *Trichinella spiralis* calreticulin (TsCRT) gene and identify its biological characteristics. **Methods** The TsCRT gene was amplified by RT-PCR and the recombinant plasmid (pMD19T-TsCRT) was constructed. The TsCRT gene in recombinant plasmid was sub-cloned into the prokaryotic expression vector pQE80L and recombinant expression plasmid pQE80L-TsCRT was prepared. The pQE80L-TsCRT was transformed into an *E. coli* BL21 (DE<sub>3</sub>), and induced by IPTG. The reactivity of rTsCRT, expression and tissue localization of TsCRT at various *T. spiralis* stages was investigated by Western blot, qPCR and immunofluorescence test (IFT). The immunogenicity of rTsCRT was assessed by immunization of mice with rTsCRT. **Results** Recombinant TsCRT (rTsCRT) with relative molecular weight of  $47 \times 10^3$  was expressed by pQE80L-TsCRT constructed in this study. Serum anti-rTsCRT antibody titer of immunized groups was up to  $1 : 10^5$  after the third immunization. Western blot results showed that rTsCRT could be recognized by anti-rTsCRT immune serum and *T. spiralis*-infected mouse serum. TsCRT gene was transcribed and expressed at all various *T. spiralis* stages (muscle larvae, intestinal infective larvae, adult worms and newborn larvae). The IFT results revealed that TsCRT was principally localized in out cuticle and intrauterine embryos of female adults. **Conclusion** TsCRT has good antigenicity and can be regarded as the candidate target antigen for anti-*Trichinella* vaccines and serodiagnosis.

**【Key words】** *Trichinella spiralis*; calreticulin; expression; biological characteristics

\*\*\*旋毛虫病是一种呈全球性分布的食源性人兽共患寄生虫病,对公共卫生与肉类食品安全均构成严重威胁。2009-2020年,我国发生了8起旋毛虫病疫情,共有479人发病,2例死亡<sup>[1]</sup>。人类感染旋毛虫病是由于生食或者半生食含有旋毛虫幼虫囊包的肉类引起的<sup>[2]</sup>。幼虫囊包被宿主食入后,在消化液的作用下释放出幼虫,幼虫被胆汁激活后在小肠内发育成肠道感染性幼虫(intestinal infective larvae, IIL), IIL侵入小肠上皮内经历4次蜕皮后发育为成虫(adult worms,

AW),雌雄成虫交配后,孕雌虫产出的新生幼虫(newborn larvae, NBL)随血液和淋巴,侵入骨骼肌形

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81971952, 82172300)。

\*\* **【通讯作者】** 崔晶, E-mail: cuij@zzu.edu.cn  
王中全, E-mail: wangzq@zzu.edu.cn

**【作者简介】** 白圣洁(1994-),男,河南偃师人,硕士研究生。研究方向:旋毛虫。E-mail: shengjiebai@163.com

成囊包幼虫,从而完成旋毛虫的生活史<sup>[3-4]</sup>。旋毛虫幼虫在人体骨骼肌内可存活30年,表明旋毛虫已建立了稳定的免疫逃逸机制从而逃逸宿主免疫系统的攻击,并可保证宿主与旋毛虫的存活。旋毛虫来源的蛋白分子,尤其是其表面蛋白与排泄分泌(ES)蛋白,暴露于宿主的免疫系统,直接诱导宿主的免疫应答或参与免疫逃逸<sup>[5]</sup>,这些旋毛虫蛋白分子有可能是研制抗旋毛虫疫苗或治疗旋毛虫病新药的靶分子。

钙网蛋白(calreticulin, CRT)是一种高度保守的Ca<sup>2+</sup>蛋白,在高等生物存在于除红细胞以外的所有有核细胞中,属于内质网蛋白家族,但也分布在细胞表面。钙网蛋白具有多种生物学活性与功能,多种寄生虫的钙网蛋白具有较高的抗原性,在寄生虫与宿主的相互作用中发挥重要作用,有可能成为抗寄生虫感染的新靶标<sup>[6-7]</sup>。马来丝虫钙网蛋白通过抑制补体C1q介导的宿主免疫应答而参与丝虫感染的建立<sup>[8]</sup>。旋毛虫钙网蛋白(TsCRT)通过与宿主补体C1q的直接结合,抑制C1q介导的补体经典途径的激活与非补体途径的巨噬细胞激活,从而在旋毛虫免疫逃逸与宿主体内生存中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。

本实验在通过免疫蛋白组技术从旋毛虫新生幼虫可溶性蛋白中鉴定出一种新的旋毛虫钙网蛋白(*Trichinella spiralis* calreticulin, TsCRT; GenBank: KRY34215.1)基础上克隆表达TsCRT,并对其生物学特性进行鉴定,为进一步研究其功能及作为抗旋毛虫疫苗的靶分子奠定基础。

## 材料与方 法

### 1 材料

**1.1 旋毛虫、载体、菌株及实验动物** 旋毛虫ISS534株分离自河南省自然感染的家猪,由本实验室昆明小鼠传代保种。克隆载体pMD19-T与表达载体pQE80L购于日本Takara公司;大肠埃希菌(*E. coli*)BL21为本实验室冷冻保存;4~6周龄雌性BABL/c小鼠购于河南省实验动物中心。

**1.2 主要试剂** 限制性内切酶BamH I、Sal I购自美国Thermo Fisher公司;2×PCR Mix、和低分子量蛋白标准购自大连宝生物公司;DNA标志物(DL2000)购自日本Takara公司;DEPC、Trizol和柱式DNA胶回收试剂盒购自上海生工生物公司;HRP-羊抗鼠IgG购自北京鼎国生物技术;硝酸纤维素(NC)膜购自瑞典Amersham公司;T4 DNA连接酶购自立陶宛Fermentas公司。

### 2 方法

**2.1 TsCRT生物信息学分析** 根据NCBI上TsCRT的氨基酸序列,运用Interpro和ProtParam

分析预测TsCRT的结构,使用Jalview软件和MEGA-X软件将TsCRT序列与旋毛虫其他虫种的序列进行对比并构建进化树<sup>[10]</sup>。旋毛虫其他种及其他物种CRT的基因号如下:*T. nelsoni* (KRX21774.1), *Trichinella* T8 (KRZ90838.1), *T. patagoniensis* (KRY21440.1), *T. britovi* (KRY53845.1), *T. murrelli* (KRX49670.1), *Trichinella* T9 (KRX57785.1), *T. nativa* (KRZ57328.1), *Trichinella* T6 (KRX85206.1), *T. papuae* (KRZ77089.1), *T. zimbabwensis* (KRZ09031.1), *T. pseudospiralis* (RX94649.1), *Trichuris trichiura* (CDW57937.1), *C. elegans* (NP\_504575.1), *Homo sapiens* (NP\_004334.1), *Mus musculus* (NP\_031617.1)。

**2.2 旋毛虫的收集** 将感染旋毛虫42 d后的小鼠处死,取骨骼肌,人工消化后收集肌幼虫(ML)。另取感染旋毛虫后6 h的小鼠小肠,剖开,剪成1~2 cm长的肠段,置于37℃生理盐水中孵育1 h收集IIL;于感染旋毛虫后2 d和6 d处死小鼠,分别收集2 d和6 d成虫(AW)。取6 d成虫用含抗生素的无菌PBS洗涤后在DMEM完全培养基中培养48 h,收集新生幼虫(NBL)<sup>[11]</sup>。

**2.3 TsCRT重组表达载体的构建** 根据TsCRT序列,去除信号肽序列后使用Primer Premier 5软件设计TsCRT引物,在引物的上、下游分别引入BamH I和Sal I酶切位点(以下划线标出)。上游引物F: CGCGGATCCGAGGTTTATTTGAAAGAAACGTTCG;下游引物R: ACGCGTTCGACTTAAAGTTCGTCGTCAGCATGTTTC。使用肌幼虫cDNA作为模板,加入TsCRT特异性引物进行PCR扩增。PCR反应体系为:反应体积20 μl,其中含模板cDNA 0.5 μl, 2×TaqMix 10 μl,上下游引物各1 μl, ddH<sub>2</sub>O 7.5 μl。PCR反应程序参数为:95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 60℃退火45 s, 72℃延伸60 s(末次延伸5 min),共32个循环。用胶回收试剂盒对TsCRT基因扩增产物进行回收纯化,然后使用T4 DNA连接酶与pMD19-T载体连接,连接产物导入*E. coli* DH5α感受态细胞后进行培养,阳性菌落进行PCR鉴定及酶切鉴定并测序。

测序鉴定正确的转化菌大量培养后使用碱裂解液法提取质粒,使用BamH I和Sal I内切酶对pMD19-T/TsCRT和表达载体pQE80L分别进行双酶切,酶切片段用在T4 DNA连接酶作用下连接,构建重组表达质粒pQE80L/TsCRT并转入大肠埃希菌BL21中,对阳性菌落进行质粒PCR和双酶切鉴定。

**2.4 rTsCRT的诱导纯化及可溶性分析** 挑取重组

菌单菌落加入 LB 液体培养基培养至对数期,然后加入 0.5 mmol/L IPTG 在 25 °C 诱导 8 h,诱导后的菌液进行超声破碎,分别保留上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 分析表达蛋白的可溶性。用 Ni 柱对 rTsCRT 进行纯化<sup>[12]</sup>。

**2.5 抗 rTsCRT 血清制备及血清效价检测** 取 15 只 4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,将 rTsCRT 与 ISA 201 佐剂充分乳化后按每只小鼠 20 μg rTsCRT 的剂量皮下多点注射免疫,共免疫 3 次,每次间隔 2 周,末次免疫后 2 周尾部采血分离血清,采用间接 ELISA 检测抗 rTsCRT IgG 抗体效价<sup>[13]</sup>。

**2.6 Western blot 分析 rTsCRT 反应原性** 制备肌幼虫粗抗原与排泄分泌(ES)抗原,与 rTsCRT 分别进行 SDS-PAGE,湿转法将上述 3 种蛋白转印到 NC 膜上, TBST 洗涤后用 5% 脱脂奶粉封闭,洗涤后分别以抗 rTsCRT 血清、旋毛虫感染小鼠血清(1 : 100)为一抗, HRP-羊抗鼠 IgG(1 : 10000)为二抗进行 Western blot,用 DAB 显色<sup>[14]</sup>。试验设正常小鼠血清为阴性对照。

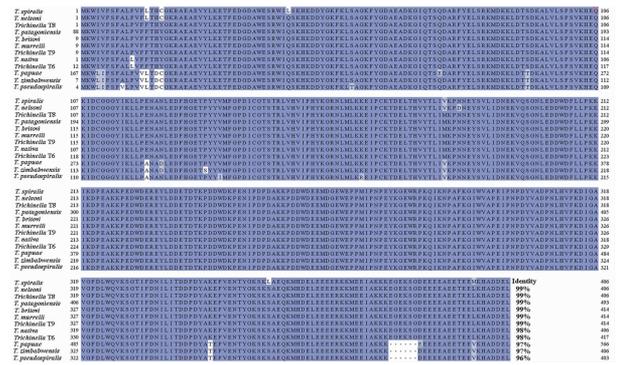
**2.7 TsCRT 在旋毛虫不同虫期的转录和表达检测** 分别收集肌幼虫、IIL、成虫和 NBL,提取虫体 RNA 进行 qPCR,以 GAPDH 作为内参基因,根据 2<sup>-(ΔΔCt)</sup> 法分析 TsCRT 在各个虫期的转录水平<sup>[15]</sup>;制备肌幼虫、IIL、成虫和 NBL 虫体可溶性抗原(粗抗原),通过 Western blot 检测 TsCRT 在不同虫期的表达<sup>[16]</sup>。

**2.8 免疫荧光试验(IFT)检测 TsCRT 在虫体的表达与定位** 分别取肌幼虫、IIL、成虫和 NBL 用 4% 多聚甲醛室温固定 20 min,石蜡包埋后切片,用 5% 山羊血清封闭。将完整虫体及切片用 PBS 洗涤后分别以抗 rTsCRT 血清、感染血清(1 : 10)为一抗,以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1 : 100)为二抗进行 IFA,显色后用 5% 甘油封片,荧光显微镜下观察结果<sup>[17]</sup>。试验设正常小鼠血清为阴性对照。

## 结果

### 1 TsCRT 的生物信息学分析

TsCRT 基因全长 1 221 bp,编码 406 aa 蛋白, pI 为 4.65,相对分子质量为 47.203 × 10<sup>3</sup>。该蛋白有信号肽,无跨膜区。将 TsCRT 和旋毛虫属内其他虫种的 CRT 进行多序列比对,结果显示 TsCRT 与其他种旋毛虫 CRT 的相似性均在 95% 以上(图 1),提示 CRT 在旋毛虫不同种间序列高度保守,可能具有相似的生物学特性与功能。TsCRT 的系统进化树显示,旋毛虫属内的 12 个虫种/基因型位于一个单系群内,该单系群又分为 2 个明显的分枝:一个是 9 种成囊型旋毛虫/基因型,另一个是 3 种非成囊型旋毛虫(图 2)。

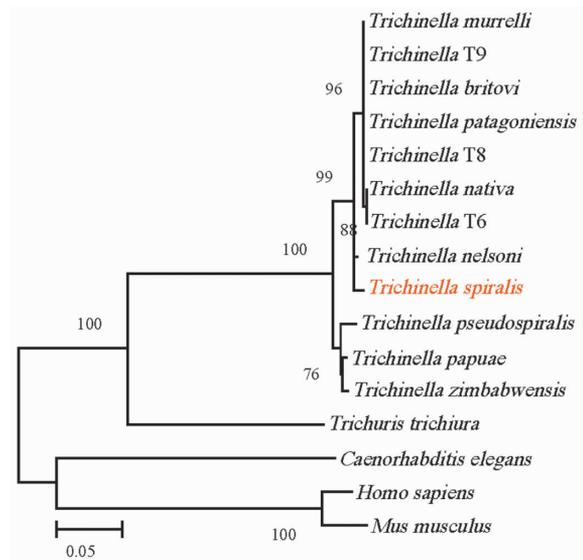


注:深蓝色部分表示序列相同,序列末尾的数字表示序列对比相似性。

图 1 TsCRT 与旋毛虫属其他虫种/基因型的多序列比对

Notes: Dark blue indicates sequence identity, and numbers at the end of the sequence indicate sequence alignment similarity

Fig. 1 Multiple sequence alignment of TsCRT with other species/genotypes of *Trichinella*



注:使用 MEGA-X 软件邻接法构建钙网蛋白系统发育进化树。成囊与非成囊型旋毛虫/基因型位于 2 个不同的进化分枝上。

图 2 TsCRT 系统发育进化树

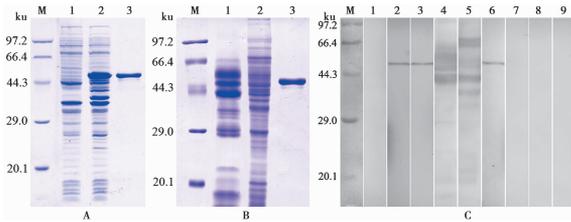
Notes: The phylogenetic tree of calreticulin of 16 organisms was constructed by neighbor-joining (NJ) method. The encapsulated and non-encapsulated *Trichinella* was localized in two different evolutionary clades of *Trichinella*.

Fig. 2 Phylogenetic tree of TsCRT

### 2 TsCRT 的表达与抗原性分析

PCR 扩增 TsCRT 后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,结果显示成功扩增出与 TsCRT 基因理论碱基数一致的片段(1 170 bp)。将 TsCRT 与克隆载体 pMD19-T 连接,然后导入 DH5α,对长出的阳性菌落提取质粒进行质粒 PCR 鉴定,片段大小与预期一致,测序显示与原始序列相似度为 100%。构建 TsCRT 表达质粒 pQE80L/TsCRT 质粒,双酶切鉴定正确后进行 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 显示表达蛋白相对分子质量约为 47 × 10<sup>3</sup>(图 3A)。旋毛虫肌幼虫粗抗原、ES 抗原及纯化后 rTsCRT 的 SDS-PAGE 分析见图 3B。

Western blot 检测显示, rTsCRT 能被抗 rTsCRT 血清和旋毛虫感染鼠血清识别; 此外, 抗 rTsCRT 血清能够识别肌幼虫粗抗原中的天然 TsCRT 蛋白, 但不识别肌幼虫 ES 抗原中的天然 TsCRT 蛋白(图 3C), 表明 TsCRT 是一种虫体蛋白, 但不是分泌蛋白。将重组菌体超声破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 结果显示 rTsCRT 在上清与沉淀中均有表达。ELISA 检测显示, rTsCRT 第 3 次免疫小鼠后 2 周, 血清抗体效价已达  $1:10^5$ 。



A rTsCRT 的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 未诱导 pQE80L/TsCRT 全菌蛋白 2 IPTG 诱导 pQE80L/TsCRT 全菌蛋白 3 纯化的 rTsCRT B 旋毛虫肌幼虫粗抗原与 ES 抗原的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 肌幼虫 ES 抗原 2 肌幼虫粗抗原 3 纯化的 rTsCRT C rTsCRT 反应原性 Western blot 鉴定 M 蛋白分子质量标准 1 肌幼虫 ES 抗原(无反应条带) 2,3 肌幼虫粗抗原中的天然 TsCRT 和 rTsCRT 与抗 rTsCRT 血清反应条带 4~6 肌幼虫 ES 抗原、粗抗原、rTsCRT 与旋毛虫感染鼠血清反应条带 7~9 肌幼虫 ES 抗原、粗抗原、rTsCRT 与正常小鼠血清无反应条带。

图 3 rTsCRT 的表达与鉴定

A SDS-PAGE analysis of rTsCRT M Protein marker 1 Uninduced pQE80L/TsCRT 2 Induced pQE80L/TsCRT 3 Purified rTsCRT B SDS-PAGE analysis of crude and ES antigens of *T. Spiralis* muscle larvae (ML) M Protein marker 1 ML ES antigen 2 ML crude antigen 3 Purified rTsCRT C Western blot identification of rTsCRT antigenicity M protein marker 1 ML ES antigen was not recognized by anti-rTsCRT serum 2,3 Native TsCRT in ML crude antigen and rTsCRT are recognized by anti-rTsCRT serum 4-6 ML ES antigen, crude antigen and rTsCRT were recognized by *T. Spiralis*-infected mouse serum 7-9 ML ES antigen, crude antigen and rTsCRT were not recognized by normal mouse serum

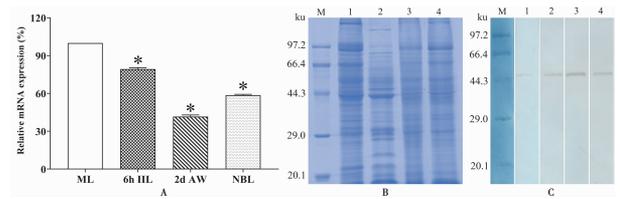
Fig. 3 Expression and identification of rTsCRT

### 3 TsCRT 在旋毛虫不同虫期的转录和表达

qPCR 检测显示, TsCRT 在旋毛虫不同虫期均有基因转录, 在 IIL 和肌幼虫期 TsCRT 的转录水平高于其他虫期 ( $F=2192.662, P<0.01$ ), 成虫期的转录水平最低(图 4A)。Western blot 显示 TsCRT 在旋毛虫的肌幼虫、IIL、成虫及 NBL 等 4 个虫期均有表达(图 4B, 4C)。

### 4 TsCRT 在不同虫期的表达与定位的 IFT 检测

旋毛虫全虫 IFT 显示, 在不同期虫体表面均存在天然的 TsCRT, 虫体皮层均能被抗 rTsCRT 血清识别, 表现为亮绿色荧光(图 5A)。虫体切片 IFT 结果表明, TsCRT 主要分布于虫体的皮层与雌虫胚胎中(图 5B)。



A TsCRT 在不同虫期转录水平的 qPCR 分析 (\* 与 ML 期相比,  $P<0.05$ ) B 旋毛虫不同虫期粗抗原的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1~4 肌幼虫、IIL、AW 及 NBL C TsCRT 在旋毛虫不同虫期表达的 Western blot 分析 M 蛋白分子质量标准 1~4 肌幼虫、IIL、AW 及 NBL 粗抗原中天然 TsCRT 与抗 rTsCRT 血清反应条带

图 4 qPCR 与 Western blot 对 TsCRT 在旋毛虫不同虫期表达的鉴定

A qPCR analysis of TsCRT transcript levels in different worm stages (\* Indicates a statistically significant difference,  $P<0.05$ ) with respect to ML B SDS-PAGE analysis of crude antigens in different stages of *Trichinella spiralis* M protein marker 1-4 ML, IIL, AW and NBL C Western blot identification of the expression of TsCRT in different stages of *Trichinella spiralis* M Protein marker 1-4 Native TsCRT in ML, IIL, AW, NBL crude antigens recognized by anti-rTsCRT serum

Fig. 4 Identification of TsCRT expression in different stages of *T. spiralis* by qPCR and Western blot

## 讨论

旋毛虫是一种肠道和组织寄生线虫, 生活史复杂, 不同的发育期既有共同抗原, 又有期特异性抗原。理想的旋毛虫疫苗应该是能阻止 IIL 侵入肠上皮, 驱出肠道内成虫, 抑制肠道内残存成虫的生殖力, 杀灭新生幼虫与肌幼虫, 完全消除免疫动物攻击感染后肌肉中的旋毛虫幼虫, 达到肉类安全标准<sup>[18-19]</sup>。然而, 现有的旋毛虫重组蛋白疫苗或 DNA 疫苗, 无论是通过皮下注射、滴鼻或口服, 以及应用佐剂, 免疫动物在攻击感染后的肌幼虫减虫率一般在 50% 左右<sup>[18-20]</sup>。因此, 需要筛选与鉴定新的旋毛虫保护性抗原, 为研究高保护效果的旋毛虫疫苗奠定基础。

Debrabant 等<sup>[21]</sup>报道, 杜氏利什曼原虫钙网蛋白 P 功能域的表达导致其分泌通路的损害, 降低巨噬细胞内的虫荷。捻转血茅线虫钙网蛋白通过与宿主 C 反应蛋白 (CRP) 的结合, 降低游离的 CRP 浓度, 而 CRP 具有抗虫活性, 或通过激发 CRP 与 C1q 结合而抑制经典补体路径的活化, 从而有利于虫体在宿主体内的生存<sup>[22]</sup>。马来丝虫钙网蛋白 (BmCRT) 与班氏丝虫钙网蛋白 (WbCRT) 具有 97% 的同源性, BmCRT 通过与 C1q 结合而阻止补体介导的虫体死亡, 将重组的 BmCRT 免疫乳鼠可诱导产生强烈的抗虫免疫与免疫保护, 攻击感染后免疫动物体内的微丝蚴与成虫荷显著降低<sup>[23]</sup>。以上表明钙网蛋白在寄生虫与宿主的相互作用中发挥了重要作用, 可能成为抗寄生虫感染疫苗的新靶标。

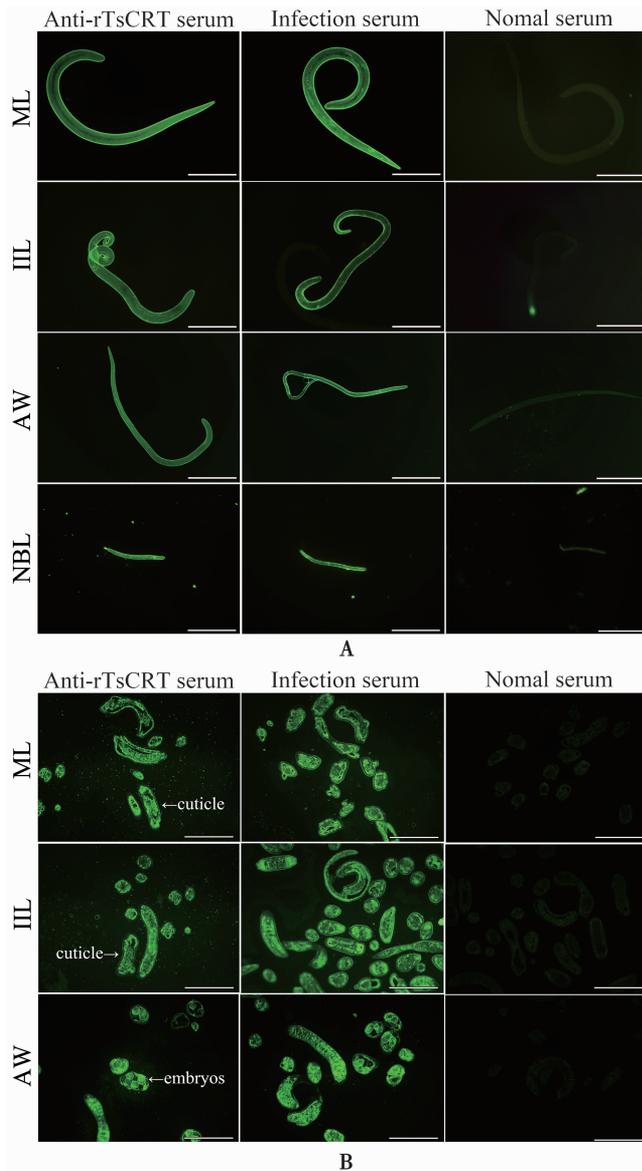


图5 TsCRT在旋毛虫不同虫期表达与定位的IFT检测

A IFT assay of TsCRT on intact worms (After incubation with anti-rTsCRT serum, bright green fluorescence was observed on the surface of each stage worms. Scale bars of ML, IIL and AW; 100 μm, and scale bars of NBL; 200 μm) B IFT assay of TsCRT on worm sections (TsCRT was mainly distributed at the cuticle of the worm and female intrauterine embryos. Scale bars; 100 μm)

Fig. 5 IFT detection of expression and localization of TsCRT in different stages of *T. spiralis*

本研究对 TsCRT 的理化性质和生物学特性进行了分析,预测 TsCRT 基因全长 1221 bp,编码 406 aa, CRT 在旋毛虫不同种间序列高度保守,提示 CRT 在旋毛虫属内的不同虫种/基因型间可能具有相似的生物学特性与功能。构建的 TsCRT 表达载体 pQE80L/TsCRT 转化 DE3 后经 IPTG 诱导,表达的 rTsCRT 免疫小鼠,诱导产生的血清抗体效价达 1 : 10<sup>5</sup>,表明

rTsCRT 具有良好的免疫原性。Western blot 检测显示,rTsCRT 可被 rTsCRT 免疫血清与旋毛虫感染鼠血清识别,表明 rTsCRT 亦具有良好的免疫反应性。qPCR、Western blot 及 IFT 结果显示,TsCRT 在旋毛虫不同发育期(ML、IIL、AW 和 NBL)均有转录和表达,且主要定位于虫体表皮和胚胎中。表明 TsCRT 可能是旋毛虫生活史中的一种必需蛋白,在幼虫侵入、发育、生存及免疫逃逸过程中可能发挥重要作用,可作为抗旋毛虫疫苗的候选靶抗原<sup>[24]</sup>。最近的研究表明,将 TsCRT DNA 疫苗口服免疫小鼠后,诱导了全身 Th1/Th2 混合型免疫应答与肠黏膜免疫应答以及部分免疫保护,肠黏膜与肌肉炎症亦显著减轻<sup>[25]</sup>。该结果为进一步研究 TsCRT 在抗旋毛虫感染中的作用奠定了基础。

【参考文献】

[1] Zhang XZ, Wang ZQ, Cui J. Epidemiology of trichinellosis in the People's Republic of China during 2009-2020[J]. Acta Trop, 2022 (229): 106388.

[2] Jiang P, Zhang X, Wang LA, et al. Survey of *Trichinella* infection from domestic pigs in the historical endemic areas of Henan province, central China[J]. Parasitol Res, 2016, 115 (12): 4707-4709.

[3] Liu RD, Wang ZQ, Wang L, et al. Analysis of differentially expressed genes of *Trichinella spiralis* larvae activated by bile and cultured with intestinal epithelial cells using real-time PCR [J]. Parasitol Res, 2013, 112(12): 4113-4120.

[4] Wang ZQ, Liu RD, Sun GG, et al. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* adult worm excretory-secretory proteins recognized by sera of patients with early trichinellosis[J]. Front Microbiol, 2017 (8): 986.

[5] Bruschi F, Ashour DS, Othman AA. *Trichinella*-induced immunomodulation: Another tale of helminth success [J]. Food Waterborne Parasitol, 2022, 27: e00164.

[6] 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.

[7] Ramirez-Tolosa G, Aguilar-Guzman L, Valck C, et al. The interactions of parasite calreticulin with initial complement components; consequences in immunity and virulence [J]. Front Immunol, 2020(11): 1561.

[8] Ferreira V, Molina MC, Valck C, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts [J]. Mol Immunol, 2004, 40(17): 1279-1291.

[9] Shao S, Hao C, Zhan B, et al. *Trichinella spiralis* calreticulin S-domain binds to human complement C1q to interfere with C1q-mediated immune functions [J]. Front Immunol, 2020 (11): 572326.

[10] Guo KX, Bai Y, Ren HN, et al. Characterization of a *Trichinella spiralis* aminopeptidase and its participation in invasion, development and fecundity [J]. Vet Res, 2020, 51(1): 78.

VP1 序列与肠道病毒的致病性密切相关,通过分析 VP1 基因分型,可分析 EV71 病毒的流行传播规律,对研究手足口病的发病机制与预防传染有重要意义。

## 【参考文献】

- [1] Yang B, Liu F, Liao Q, et al. Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EV-A71 vaccine[J]. Euro Surveill, 2017, 22(50):1.
- [2] Li W, Yi L, Su J, et al. Seroprevalence of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in Guangdong, China, in pre-and post-2010 HFMD epidemic period[J]. PLoS One, 2013, 8(12):80515.
- [3] Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2):337-339.
- [4] 朱启镛,曾玫. 手足口病的流行现状及挑战[J]. 微生物与感染, 2012, 7(2):82-88.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 手足口病诊疗指南(2018年版)[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2018, 28(6):128-136.
- [6] Ventarola D, Bordone L, Silverberg N. Update on hand, food and mouth disease[J]. Clin Dermatol, 2015, 33(3):340-346.
- [7] 龚黎明,葛琼,严菊英,等. 浙江省肠道病毒 71 型分离与 VP1 区域序列分析[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(12):971-974.
- [8] 谭玉霞. 手足口病患儿临床特征及重症危险因素 Logistic 回归分

析[D]. 山东大学, 2012.

- [9] 冯绵绵. 485 例手足口病患儿临床特点分析[D]. 华北理工大学, 2019.
- [10] Li M, Schmitt PT, Li Z, et al. Mumps virus matrix, fusion, and nucleocapsid proteins cooperate for efficient production of virus-like particles[J]. J Virol, 2009, 83(14):7261-7272.
- [11] Munster VJ, Prescott JB, Bushmaker T, et al. Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route[J]. Sci Rep, 2012, 2(1):736.
- [12] 王美芬,符甜甜,罗云娇,等. 2008-2017 年昆明地区住院手足口病患儿的临床特征研究[J]. 中国全科医学, 2021, 24(11):1410-1417.
- [13] Yang Q, Ding J, Cao J, et al. Epidemiological and etiological characteristics of HFMD in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10[J]. J Med Virol, 2015, 87(60):954-960.
- [14] 任雁. 135 例小儿手足口病发病影响因素的调查分析[J]. 调查研究, 2016, 33(3):141-144.
- [15] Fu XM, Wan ZZ, Li YP, et al. National epidemiology and evolutionary history of four hand, foot and mouth disease-related enteroviruses in China from 2008 to 2016[J]. Virol Sin, 2020, 35(1):21-33.

【收稿日期】 2022-08-07 【修回日期】 2022-11-01

(上接 67 页)

- [11] Hu YY, Zhang R, Yan SW, et al. Characterization of a novel cysteine proteinase from *Trichinella spiralis* and its role in larval intrusion, development and fecundity[J]. Vet Res, 2021(52):113.
- [12] Sun XY, Ma KN, Bai Y, et al. Molecular cloning and characterization of a novel aspartyl aminopeptidase from *Trichinella spiralis*[J]. Trop Biomed, 2021, 38(3):420-434.
- [13] Zhang XZ, Sun XY, Bai Y, et al. Protective immunity in mice vaccinated with a novel elastase-1 significantly decreases *Trichinella spiralis* fecundity and infection[J]. Vet Res, 2020, 51:43.
- [14] Bai Y, Ma KN, Sun XY, et al. Molecular characterization of a novel cathepsin L from *Trichinella spiralis* and its participation in invasion, development and reproduction[J]. Acta Trop, 2021(224):106112.
- [15] Yang F, Yang DQ, Song YY, et al. *In vitro* silencing of serine protease inhibitor suppresses *Trichinella spiralis* invasion, development and fecundity[J]. Parasitol Res, 2019, 118(7):2247-2255.
- [16] Ren HN, Liu RD, Song YY, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of molting-related proteins of *Trichinella spiralis* intestinal infective larvae[J]. Vet Res, 2019(50):70.
- [17] Lei JJ, Hu YY, Liu F, et al. Molecular cloning and characterization of a novel peptidase from *Trichinella spiralis* and protective immunity elicited by the peptidase in BALB/c mice[J]. Vet Res, 2020, 51(1):111.
- [18] Zeng J, Zhang XZ, Zhang R, et al. Vaccination of mice with recombinant novel aminopeptidase P and cathepsin X alone or in combination induces protective immunity against *Trichinella*

*spiralis* infection[J]. Acta Trop, 2021(224):106125.

- [19] Hu CX, Xu YXY, Hao HN, et al. Oral vaccination with recombinant *Lactobacillus plantarum* encoding *Trichinella spiralis* inorganic pyrophosphatase elicited a protective immunity in BALB/c mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(10):e0009865.
- [20] Tang B, Li J, Li T, et al. Vaccines as a strategy to control trichinellosis[J]. Front Microbiol, 2022, 13:857786
- [21] Debrabant A, Lee N, Pogue GP, et al. Expression of calreticulin P-domain results in impairment of secretory pathway in *Leishmania donovani* and reduced parasite survival in macrophages[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(11):1423-1434.
- [22] Suchitra S, Anbu KA, Rathore DK, et al. *Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite[J]. Parasite Immunol, 2008, 30(6-7):371-374.
- [23] Yadav S, Sharma P, Sharma A, et al. Immunization with *Brugia malayi* calreticulin protein generates robust antiparasitic immunity and offers protection during experimental lymphatic filariasis[J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(4):790-799.
- [24] Cui J, Han Y, Yue X, et al. Vaccination of mice with a recombinant novel cathepsin B inhibits *Trichinella spiralis* development, reduces the fecundity and worm burden [J]. Parasit Vectors, 2019, 12:581.
- [25] Bai SJ, Han LL, Liu RD, et al. Oral vaccination of mice with attenuated *Salmonella* encoding *Trichinella spiralis* calreticulin and serine protease 1.1 confers protective immunity in BALB/c mice[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2022, 16(11):e0010929.

【收稿日期】 2022-08-27 【修回日期】 2022-11-12