

DOI:10.13350/j.cjpb.230212

• 论著 •

pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组质粒的构建及表达产物的纯化与鉴定*

李艳敏,赵商岐,马西智,郑佳,龚巧巧,丁剑冰,周晓涛**

(新疆医科大学基础医学院免疫学教研室,新疆乌鲁木齐 830011)

【摘要】 目的 构建 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)原核表达质粒,诱导表达后纯化,获得重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4),并对其免疫学特性进行初步鉴定,对其空间结构进行预测。方法 利用 DNA 重组技术构建重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4),将测序正确的质粒转化至 *E. coli* BL21(DE) 菌株中,分别采用不同浓度的 IPTG 在不同诱导时间及温度下诱导表达重组蛋白。取菌液超声破碎,SDS-PAGE 分析上清及沉淀中蛋白的表达;通过镍柱亲和层析法纯化蛋白并进行 Western blot 鉴定。通过生物信息技术,利用 SOPMA、I-TASSER 在线数据库预测重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的空间结构。结果 成功构建 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组质粒,转化至 *E. coli* BL21(DE)后诱导表达相对分子质量为 53×10^3 的重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)。SDS-PAGE 分析 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组蛋白在 IPTG 浓度为 0.7 mmol/L,37 °C、4 h 条件下上清中表达量较高。镍柱层析纯化用 20 mmol/L 咪唑浓度洗脱的蛋白浓度及纯度较高。Western blot 检测重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)能被相应抗体识别,反应条带位于 53×10^3 处,与预期相符。生物信息学在线软件分析 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)中各蛋白均能正常折叠,未对优势表位产生影响。结论 利用原核表达成功获得 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组蛋白,并预测出该蛋白的三维结构模型,为细粒棘球蚴重组疫苗的研制提供了重要的实验依据。

【关键词】 细粒棘球蚴;重组质粒;CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4);原核表达

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)02-0185-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Feb;18(2):185-189,196.]

Construction of pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) recombinant plasmid, purification and identification of its expressed product

LI Yan-min, ZHAO Shang-qi, MA Xi-zhi, ZHENG Jia, GONG Qiao-qiao, DING Jian-bing, ZHOU Xiao-tao (The Department of Immunology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)***

【Abstract】 **Objective** To construct pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) prokaryotic expression plasmid and purify the recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) after induced expression, and to preliminarily identify the immunological characteristics of recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) and predict its spatial structure.

Methods The recombinant plasmid pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) was constructed by DNA recombination technology, and the correctly sequenced plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE) strain. The recombinant proteins were induced by IPTG with different concentrations at different induction times and temperature. The bacterial solution was crushed by ultrasound, and the expression of protein in supernatant and precipitation was analyzed by SDS-PAGE.

The protein was purified by nickel column affinity chromatography and identified by Western blot. The spatial structure of CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) was predicted using SOPMA and I-TASSER online database by bioinformatics techniques. **Results** The recombinant plasmid pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) with the length of 6666bp was successfully constructed, which was transformed into *E. coli* BL21(DE) and induced to express the recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) with the relative molecular weight of 53×10^3 . SDS-PAGE results showed that the expression of CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) recombinant protein was higher in the supernatant at 37 °C for 4 h at the IPTG concentration of 0.7 mmol/L. The concentration and purity of protein eluted by 20 mmol/L imidazole in nickel column chromatography were higher. Western blot analysis showed that the recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) could be recognized by the corresponding antibody, and the reaction band was located at 53×10^3 , which

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81760656);新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2018D01C157)。

** **【通讯作者】** 周晓涛, E-mail: xiaotaozhou9@sina.com。

【作者简介】 李艳敏(1999-),女,山东人,硕士研究生。主要研究方向:感染免疫。E-mail:1334774253@qq.com

was consistent with the expectation. Bioinformatics online software results showed that each protein in CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) could fold normally without affecting the dominant epitope. **Conclusion** The recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) was successfully obtained by prokaryotic expression, and the three-dimensional structure model of the protein was predicted, which provided an important experimental basis for the development of recombinant vaccine against *Echinococcus granulosus*.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; recombinant plasmid; CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4); prokaryotic expression

细粒棘球蚴病又称囊型包虫病(CE),是由细粒棘球绦虫的幼虫期感染人体组织导致的一类慢性人畜共患寄生虫病。细粒棘球蚴病高度流行于畜牧区,是一种全球性蠕虫病,在欧洲^[1]、加拿大^[2]、巴基斯坦^[3]等地区均有分布。我国的新疆、西藏、青海、四川等畜牧业地区有该病流行,对当地公共卫生和经济发展带来影响。其发病机制主要是细粒棘球绦虫的成虫寄生于终宿主的小肠内,其蠕虫发育成熟后产出虫卵,虫卵随粪便排到体外,人类由于误食带有虫卵的食物和水使其进入体内,进而感染包虫病。该病的发生部位较为广泛,肝脏^[4]、肺部^[5]、腿部^[6]以及眼眶^[7]等部位均有出现,其最严重的危害是导致肝脏不可逆性损伤,进而威胁宿主健康。目前,基于包虫病的诊断和治疗效果的局限性,新型候选疫苗的筛选和改进一直是人们研究的重点^[8]。曹春宝等^[9]报道细粒棘球蚴抗原EgG1Y162可能是细粒棘球蚴绦虫终末宿主的保护性抗原,极可能作为细粒棘球蚴病的有效疫苗候选分子。Zhang等^[10]根据优势T-B联合表位信息将EgG1Y162抗原分为EgG1Y162-1和EgG1Y162-2两段序列。李玉娇等^[11]的进一步研究结果表明,在刺激机体产生免疫应答的过程中EgG1Y162-2抗原较EgG1Y162-1具有更强的免疫保护效应。

细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4,CTLA-4)作为一种T细胞活化的负性调节因子以更高的亲和力与CD28竞争性结合抗原提呈细胞(APC)上的B7分子,并通过整合其配体抑制CD28介导T细胞活化^[12]。单独的CTLA-4胞外区因缺少胞内区与跨膜区而不具备免疫负性调节的特点,但其与APC特异性结合的能力仍然存在。为了增加包虫病疫苗的免疫原性与免疫反应性,本研究将4个EgG1Y162-2抗原基因通过linker序列串联后与CTLA-4胞外区进行融合,制备重组蛋白,探索其最佳诱导表达和纯化的条件,预测其三级结构,为细粒棘球蚴重组疫苗的研制奠定基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 质粒、菌株 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162, pET30a-EgG1Y162-2(4)重组质粒和 *E. coli* BL21

(DE)菌株由本实验室构建并保存。

1.2 主要试剂 DNA连接酶, EcoR I、Hand III和Sal I快切酶购自大连TaKaRa技术有限公司; DNAMarker5000购自中国赛默飞世尔科技; 质粒提取试剂盒购自北京天根有限公司; 切胶回收试剂盒MA-CHEREY-NAGEL Nucleospin Extraxt II购自德国MN公司; 蛋白质Maker购自上海臻诺生物科技有限公司; 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG, isopropyl β -D-Thiogalactoside)和SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购自北京Solarbio科技有限公司; PVDF膜购自美国默克公司; His-Tag Mouse抗体购自上海优宁维生物科技股份有限公司; goat anti-mouse抗体购自爱必信上海生物科技有限公司。

2 方法

2.1 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组质粒的构建及鉴定 利用EcoR I和Hand III对重组质粒pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162和pET30a-EgG1Y162-2(4)进行双酶切,经1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收酶切产物pET30a-CTLA-4IgV和EgG1Y162-2(4),测定浓度后使用PCR仪将pET30a-CTLA-4IgV和EgG1Y162-2(4)通过DNA连接酶16℃过夜连接,连接产物转入感受态细胞DH5 α ,37℃过夜培养。提取重组质粒pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4),用Sal I和EcoR I进行双酶切鉴定,并送上海生工生物工程股份有限公司测序。

2.2 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组蛋白诱导表达条件的优化 将测序正确的原核表达质粒pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)转入大肠埃希菌感受态细胞,挑取单克隆菌落于含有30 μ g/ml卡那霉素的LB液体培养基中37℃、220 r/min过夜培养。将含有重组质粒pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的菌液按1:50接种到含卡那霉素的LB液体培养基至A₆₀₀值为0.6~0.8,将菌液分装至12个50 ml灭菌离心管,分为3组,第1组IPTG终浓度为0.4 mmol/L,第2组IPTG终浓度为0.7 mmol/L,第3组IPTG终浓度为1 mmol/L,诱导条件分别为未诱导、28℃ 6 h、37℃ 4 h、28℃ 2 h、37℃ 2 h。4 000 r/min离心10 min,收集诱导菌体,冰浴条件下超声波破碎裂解,12 000 r/min离心10 min,分离上清与沉淀进行12%

SDS-PAGE 电泳分析,确定最佳诱导条件。

2.3 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的纯化

以最佳诱导条件 IPTG 浓度 0.7 mmol/L, 37 °C、4 h 大量诱导表达重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4), 收集菌液上清并用 0.22 μm 过滤器除去杂质。用 5 倍柱床体积无菌 ddH₂O 冲洗镍柱, 将过滤的菌液上清缓慢过柱, 重复两次, 分别得到未过柱、第 1 次过柱、第 2 次过柱蛋白, 镍柱 4 °C 过夜保存。次日, 依次用浓度为 20、40、60、80、100、200、300、400、500 mmol/L 的咪唑洗脱蛋白, 用 SDS-PAGE 检测重组蛋白分子量大小和纯度, 确定最佳纯化条件。

2.4 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的 Western blot 鉴定

将纯化的重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 通过 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至孔径为 0.45 μm 的 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 1×Tris-盐酸缓冲液(TBST)间隔 15 min, 重复洗涤 3 次; 加入鼠源 His-tag 单克隆抗体(1:1000 稀释), 4 °C 摇床孵育过夜, 1×TBST 间隔 15 min, 重复洗涤 3 次; 加入 HRP 标记绵羊抗鼠抗体(1:2000 稀释), 避光室温孵育 2 h, 1×TBST 间隔 15 min, 重复洗涤 3 次; 加入 ECL 显影, 观察并记录结果。

2.5 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组蛋白的免疫信息学分析

运用 DNAMAN 对目的基因 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 进行测序比对; 通过 SOPMA 在线软件分析重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的二级空间结构(npsa-prabi. ibcp. fr/cgi-bin/npsa_automat. pl? page = npsa_sopma. html); 利用 I-TASSER 在线数据库(https://zhanggroup.org/I-TASSER/) 建立模型, 预测重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的三级结构。

结果

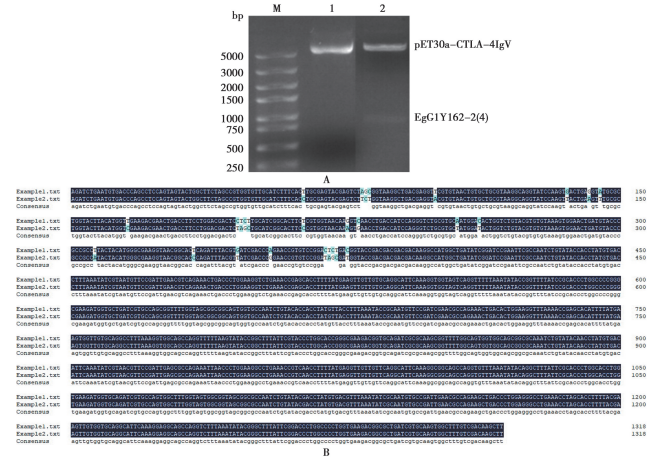
1 重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的构建及鉴定

pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162 和 pET30a-EgG1Y162-2(4) 双酶切后连接, 构建重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)。重组质粒经 Sal I 和 EcoR I 双酶切, 得到大小约为 5 722 bp、882 bp 的 2 个基因片段(图 1A), 与预期相符; 对 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 测序, 通过使用 DNAMAN 对测序结果进行序列比对, 插入的基因序列与预期结果相符, 同源性约为 97.95%(图 1B), 重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 构建正确。

2 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的诱导表达

通过不同条件探索 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

最佳诱导表达条件。SDS-PAGE 结果显示, 其表达蛋白的相对分子质量约为 53×10^3 , 与预期相符; 菌液上清蛋白在 IPTG 浓度为 0.7 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h 时表达量最高, 此条件为最佳诱导条件(图 2)。



A 重组质粒酶切分析 M DNA 标志物 1 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 2 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) Sal I、EcoR I 双酶切 B pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 测序比对

图 1 重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的酶切鉴定及序列比对

A Enzyme digestion analysis of recombinant plasmid M DNA marker 1 Recombinant plasmid pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 2 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) digested by Sal I and EcoR I B Sequencing comparison of pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

Fig. 1 Identification and sequence alignment of recombinant plasmid pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

3 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的纯化

重组蛋白上柱后用不同浓度咪唑洗脱, 探索蛋白最佳纯化条件, SDS-PAGE 结果见图 3。20 mmol/L 咪唑蛋白洗脱液中目的蛋白含量、纯度高于其它浓度, 因此确定 20 mmol/L 咪唑为蛋白洗脱最佳浓度。

4 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示, 纯化的重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 可被 His-tag 抗体识别, 反应条带位于 53×10^3 处(图 4), 表明重组蛋白具有反应原性。

5 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的空间结构预测

SOPMA 在线数据库分析该蛋白的结构特点, 结果显示 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 中 α 螺旋占 13.56%(蓝色), β-折叠占 34.25%(红色), β-转角占 14.94%(绿色), Ω 环占 37.24%(黄色)(图 5A)。通过 I-TASSER 在线数据库分析得到重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) 的三级结构模型。其 C-score = -1.25(Read more about C-score); TM-score = 0.56

±0.15;RMSD=9.9±4.6。可以看出 CTLA-4IgV 蛋白和 EgG1Y162-2(4)蛋白能克服空间位阻的影响得以正确折叠(图 5B)。

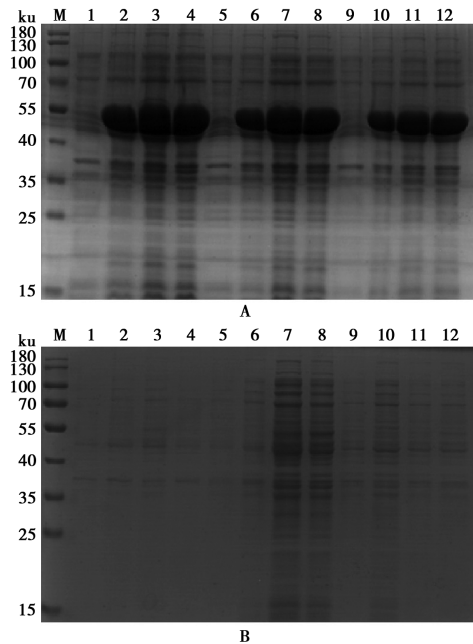


图 2 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)诱导表达的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1~4 分别为重组菌 0.4 mmol/L IPTG 诱导 37 °C 0 h,28 °C 6 h,37 °C 4 h 和 28 °C 2 h+37 °C 2 h 5~8 分别为重组菌 0.7 mmol/L IPTG 诱导 37 °C 0 h,28 °C 6 h,37 °C 4 h 和 28 °C 2 h+37 °C 2 h 9~12 分别为重组菌 1 mmol/L IPTG 诱导 37 °C 0 h,28 °C 6 h,37 °C 4 h 和 28 °C 2 h+37 °C 2 h B 菌体裂解上清液 SDS-PAGE 分析(上样顺序同沉淀液)

图 2 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)诱导表达的 SDS-PAGE 分析

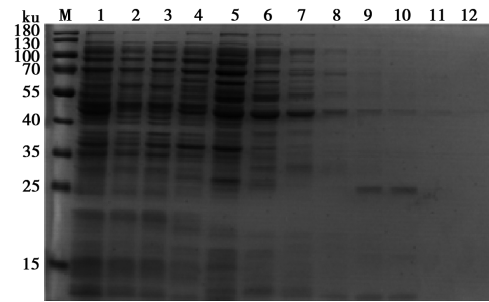
A SDS-PAGE analysis of recombinant protein precipitates M protein molecular weight marker 1~4 Induced by 0.4 mmol/L IPTG at 37 °C for 0 h,28 °C for 6 h,37 °C for 4 h and 28 °C for 2 h+37 °C for 2 h 5~8 Induced by 0.7 mmol/L IPTG at 37 °C for 0 h,28 °C for 6 h,37 °C for 4 h and 28 °C for 2 h+37 °C for 2 h 9~12 Induced by 1 mmol/L IPTG at 37 °C for 0 h,28 °C for 6 h,37 °C for 4 h and 28 °C for 2 h+37 °C for 2 h B SDS-PAGE analysis of recombinant protein supernatant (Same order as above)

图 2 SDS-PAGE analysis of induced expression of recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

讨论

包虫病是一种全球性分布的人畜共患病,在中国高度流行,并已被列入国家传染病检测项目^[13]。棘球蚴感染机体后会产生抑制免疫细胞功能的物质,从而引发机体发生免疫病理损伤,并且棘球蚴在宿主体内呈外生性生长,给病患造成极大地痛苦和经济负担。控制细粒棘球蚴病的发生是关乎人类健康的重要举措^[14]。免疫预防在控制包虫病传播中扮演着重要角色,加强疫苗预防措施可以降低细粒棘球蚴感染的风险,并有利于将流行率控制在持续传播必须水平以下^[15],而减少包虫病在医学领域和畜牧业中带来的巨大的经济损失。当前,囊型包虫病诊断方法的局限性、可用药物的低效性^[16],以及不完善的手术策略是控制

和预防包虫病的重大挑战。因此,借助分子生物学技术研发出可以刺激机体产生保护性免疫以及免疫持久的基因工程疫苗是预防包虫病的理想途径。

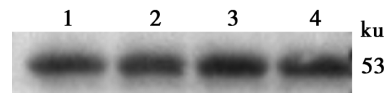


M 蛋白分子质量标准 1 未过柱蛋白 2 一次过柱蛋白 3 两次过柱蛋白 4 20 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 5 40 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 6 60 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 7 80 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 8 100 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 9 200 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 10 300mmol/L 咪唑洗脱蛋白 11 400 mmol/L 咪唑洗脱蛋白 12 500 mmol/L 咪唑洗脱蛋白

图 3 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的镍柱层析纯化

M Protein molecular weight marker 1 Unpassed protein 2 First pass column 3 Second pass column 4 20 mmol/L imidazole 5 40 mmol/L imidazole 6 60 mmol/L imidazole 7 80 mmol/L imidazole 8 100 mmol/L imidazole 9 200 mmol/L imidazole 10 300 mmol/L imidazole 11 400 mmol/L imidazole 12 500 mmol/L imidazole

图 3 Purification of recombinant CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) by nickel column chromatography

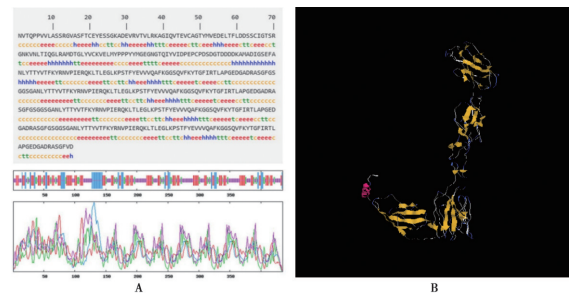


M 蛋白分子质量标准 1~4 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)与 His-tag 抗体反应条带

图 4 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的 Western blot 分析

M Protein molecular weight marker 1~4 Recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

图 4 Western blot analysis of CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)



A SOPMA 数据库分析 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)二级结构 B I-TASSER 数据库预测 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)三级结构

图 5 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)空间结构示意图

A The secondary structure of CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) was analyzed by SOPMA database B The tertiary structure of CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4) was predicted by I-TASSER database

图 5 Spatial structure diagram of recombinant protein CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)

细粒棘球蚴基因组是首批被测定的绦虫基因组之一^[17],在此基础上,曹春宝等^[9]成功克隆出

EgG1Y162 抗原基因。相关研究发现 EgG1Y162 基因含有 3 个 T-B 联合优势抗原表位,其中 EgG1Y162-2 具有两个 T-B 联合优势抗原表位,在激活机体的免疫反应过程中较 EgG1Y162-1 可以发挥更好的免疫效果^[11]。单独的 EgG1Y162-2 抗原表位少,容易导致机体的免疫耐受。因此,本研究将 EgG1Y162-2 抗原进行了连接以增加抗原表位及分子质量,以增强宿主体内 T、B 细胞的特异性识别,从而介导机体产生强烈的免疫应答能力。CTLA-4 是 T 细胞跨膜受体,包括胞外 V 区、跨膜区和胞浆内尾部^[18],单独的 CTLA-4 胞外区无法将负向调节的免疫信号传递至胞内区,但胞外区存在 B7 分子结合基序 MYPPPY,仍然具有与 APC 结合的能力。有研究表明,通过 CTLA-4 胞外区融合抗原,可增强机体的适应性免疫应答^[19]。本研究以 CTLA-4 胞外区作为抗原提呈细胞的靶向分子和新型分子佐剂,将 CTLA-4 胞外区与特异性抗原 EgG1Y162-2(4)融合,进而将其靶向结合到 APC 上,以此加强表位疫苗针对包虫病的免疫反应。在重组质粒的构建中,利用 pET30a(+)质粒上位于 Kpn I 和 EcoR I 之间的碱基序列翻译出的氨基酸序列^[20],作为连接 CTLA-4IgV 和 EgG1Y162-2(4)的 Linker 序列。在 CTLA-4IgV 与 EgG1Y162-2(4)之间形成了长达 16 个氨基酸的天然骨架 Linker 序列“GTDDDDKAMADIGSEF”,将 CTLA-4IgV 和 EgG1Y162-2(4)隔开,避免了空间位阻的干扰,从而使重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)得以正确折叠并正常发挥其免疫功能。

在重组蛋白的诱导表达中常选用大肠埃希菌表达系统,但在实验过程中发现重组蛋白高效表达过程中会形成不溶性蛋白颗粒,以包涵体形式存在于蛋白沉淀中,分离纯化这些固体颗粒过程十分繁琐与复杂,并会影响蛋白质活性和功能,故本研究未对其作进一步纯化。本实验通过不同条件诱导表达 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)重组蛋白,发现重组蛋白在不同 IPTG 浓度、时间、温度下,其表达量不同。菌体裂解上清液在 IPTG 浓度为 0.7 mmol/L,37 °C 诱导 4 h 时表达量最高。固定金属离子亲和层析(IMAC)被认为是基于组氨酸和过渡金属离子(通常为 Ni²⁺ 和 Co²⁺)之间的金属配位相互作用来分离 His 标签蛋白的最有效方法之一^[21],本实验利用其可以便捷、高效纯化 His-Tag 融合蛋白的特性,采用咪唑与 Ni 柱结合竞争性洗脱 His-Tag 蛋白的原理,将上清以最佳条件 20 mmol/L 咪唑洗脱蛋白,获得高浓度、高纯度的靶蛋白。Westernblot 验证目的蛋白具有反应原性,即能被 His-tag 抗体识别。

近年来,生物信息学的进步推动了蛋白质结构预

测功能的发展。本研究通过在线软件对 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)原核表达蛋白的空间结构进行了预测,结果表明通过 Linker 序列串联后各蛋白结构均未发生改变,且存在较多的易成表位的转角和无规则卷曲区域,因此该重组蛋白可作为包虫病的候选疫苗。

本研究成功构建了重组质粒 pET30a-CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4),表达了重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4),EgG1Y162-2 蛋白的串联及 CTLA-4 胞外区的加入不仅提高了疫苗的免疫原性,又增强了树突状细胞提呈抗原的能力,重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)的设计及制备为包虫病疫苗的改良提供了新思路。

【参考文献】

- [1] Peters L, Burkert S, Gruner B. Parasites of the liver - epidemiology, diagnosis and clinical management in the European context [J]. J Hepatol,2021,75(1):202-218.
- [2] Massolo A, Klein C, Kowalewska-Grochowska K, et al. European *Echinococcus multilocularis* identified in patients in Canada [J]. N Engl J Med,2019,381(4):384-385.
- [3] Khan A, Ahmed H, Budke CM. Echinococcosis in Pakistan; a call for research [J]. Lancet Infect Dis,2019,19(6):581.
- [4] Toledano Delgado FJ, Broncano Cabrero J, Moya Gonzalez J, et al. Isolated pericardial echinococcosis as a manifestation of hepatic hydatid disease [J]. Lancet Infect Dis,2020,20(8):992.
- [5] Casulli A. Recognising the substantial burden of neglected pandemics cystic and alveolar echinococcosis [J]. The Lancet Global Health,2020,8(4):e470-e1.
- [6] Akhtar N, Kumar V. Echinococcal Cysts in the Leg [J]. N Engl J Med,2020,383(27):2665.
- [7] Assimakopoulos SF, Marangos M. Orbital Hydatid Cyst [J]. N Engl J Med,2020,382(14):1352.
- [8] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32 (2): undefined.
- [9] 曹春宝, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 细粒棘球绦虫 egG1Y162 抗原基因的克隆及序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(2):177-179.
- [10] Zhang F, Li S, Zhu Y, et al. Immunization of mice with egG1Y162-1/2 provides protection against *Echinococcus granulosus* infection in BALB/c mice[J]. Mol Immunol,2018 (94):183-189.
- [11] 李玉娇, 王红英, 张峰波, 等. 细粒棘球绦虫 EgG1Y162-1/2 重组蛋白诱导小鼠免疫应答特点的比较[J]. 新疆医科大学学报, 2019,42(1):6-11.
- [12] Goenka R, Xu Z, Samayoa J, et al. CTLA4-Ig-based bifunctional costimulation inhibitor blocks CD28 and ICOS signaling to prevent T cell priming and effector function[J]. J Immunol, 2021,206(5):1102-1113.
- [13] Qian MB, Zhou XN. Walk together to combat echinococcosis [J]. Lancet Infect Dis,2018,18(9):946.

供可能性。

综上所述,EGR-09314 基因所编码的蛋白可能对细粒棘球蚴的生长、发育、寄生具有重要的调节作用,且含有多个 B 细胞及 T 细胞抗原表位,抗原性良好,为抗棘球绦虫感染药物的开发、疫苗的研制提供了信息基础。

【参考文献】

[1] Stojkovic M, Weber TF, Junghanss T, et al. Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art and perspectives[J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(5): 383-392.

[2] Mortezaei S, Afgar A, Mohammadi MA, et al. The effect of albendazole sulfoxide on the expression of miR-61 and let-7 in different in vitro developmental stages of *Echinococcus granulosus* [J]. Acta Trop, 2019(195): 97-102.

[3] Abdel MM, Pauklin S. TGFβ1/INHBA homodimer/nodal-SMAD2/3 signaling network: a pivotal molecular target in PDAC Treatment[J]. Mol Ther, 2021, 29(3): 920-936.

[4] Lyu S, Jiang C, Xu R, et al. INHBA upregulation correlates with poorer prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2018(10): 1585-1596.

[5] 张萌萌, 代海兵, 王茜, 等. 原发性高血压与糖基化修饰相关研究进展[J]. 中华高血压杂志, 2022, 30(2): 133-137.

[6] 易李, 郑春福. 蛋白质棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2020, 50(8): 836-848.

[7] 宋丹丹, 邓志东. RNA 二级结构预测的模糊模型[J]. 中国科学 (E 辑: 信息科学), 2007(10): 1285-1303.

[8] Bloise E, Ciarmela P, Dela Cruz C, et al. Activin A in mammalian physiology[J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 739-780.

[9] Chen ZL, Qin L, Peng XB, et al. INHBA gene silencing inhibits gastric cancer cell migration and invasion by impeding activation of the TGF-β signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18065-18074.

[10] Kiagiadaki F, Kampa M, Voumvouraki A, et al. Activin-a causes hepatic stellate cell activation via the induction of TNFα and

TGFβ in Kupffer cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(3): 891-899.

[11] Kaneda H, Arai T, Matsumoto K, et al. Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 105(8): 1210-1217.

[12] He Z, Liang J, Wang B, et al. Inhibin, beta A regulates the transforming growth factor-beta pathway to promote malignant biological behaviour in colorectal cancer [J]. Cell Biochem Funct, 2021, 39(2): 258-266.

[13] Yu Y, Wang W, Lu W, et al. Inhibin β-A (INHBA) induces epithelial-mesenchymal transition and accelerates the motility of breast cancer cells by activating the TGF-β signaling pathway [J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 4681-4696.

[14] 刘银凤, 张雷. 生物信息学数据库在医学研究中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(10): 961-962, 965.

[15] Pan W, Hao WT, Shen YJ, et al. The excretory-secretory products of *Echinococcus granulosus* protoscolices directly regulate the differentiation of B10, B17 and Th17 cells [J]. Parasit Vectors, 2017, 10(1): 348.

[16] Pang N, Zhang F, Li S, et al. TGF-β/Smad signaling pathway positively up-regulates the differentiation of Interleukin-9-producing CD4⁺ T cells in human *Echinococcus granulosus* infection[J]. J Infect, 2018, 76(4): 406-416.

[17] Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(1): 74-84.

[18] Bhattacharya M, Sharma AR, Patra P, et al. Development of epitope-based peptide vaccine against novel coronavirus 2019 (SARS-COV-2): Immunoinformatics approach[J]. J Med Virol, 2020, 92(6): 618-631.

[19] Mendoza FA, Jimenez SA. Serine/threonine kinase inhibition as antifibrotic therapy: transforming growth factor-β and Rho kinase inhibitors [J]. Rheumatology (Oxford), 2022, 61(4): 1354-1365.

【收稿日期】 2022-09-22 【修回日期】 2022-12-16

(上接 189 页)

[14] Craig PS, Hegglin D, Lightowers MW, et al. Echinococcosis: Control and prevention[J]. Adv Parasitol, 2017(96): 55-58.

[15] Flisser A. Eliminating cystic echinococcosis in the 21st century [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(7): 703-704.

[16] Norouzi R, Ataei A, Hejazy M, et al. Scolicidal effects of nanoparticles against hydatid cyst protoscolices *in vitro* [J]. Int J Nanomedicine, 2020(15): 1095-1100.

[17] Zheng H, Zhang W, Zhang L, et al. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* [J]. Nat Genet, 2013, 45(10): 1168-1175.

[18] Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in

CTLA-4 biology [J]. Trends Immunol, 2015, 36(2): 63-70.

[19] Zhang F, Li YH, Fan MW, et al. Enhanced efficacy of CTLA-4 fusion anti-carries DNA vaccines in gnotobiotic hamsters [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007(28): 1236-1242.

[20] 赵商岐, 孔慧芳, 周彦霞, 等. 细粒棘球蚴 EgG1Y162-2 与 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2 蛋白结构预测及表位分析比较[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5): 546-551.

[21] Li SW, Yang KG, Zhao BF, et al. Epitope imprinting enhanced IMAC (EI-IMAC) for highly selective purification of His-tagged protein [J]. J Mater Chem B, 2016(4): 1960-1967.

【收稿日期】 2022-08-17 【修回日期】 2022-11-01