

DOI:10.13350/j.cjpb.231008

• 论著 •

刚地弓形虫棒状体顶端表面蛋白 2 结构和功能的生物信息学分析*

马航斌,张晶,王靖惠,王帅**,田晓薇**
(新乡医学院基础医学院病原生物学系,河南新乡 453000)

【摘要】 **目的** 应用生物信息学方法预测并分析刚地弓形虫顶端表面蛋白 2(*Toxoplasma gondii* rhoptry apical surface protein 2, TgRASP2)的结构与功能,为刚地弓形虫的致病机制、药物靶点以及为疫苗的研发提供理论依据, **方法** 通过 ToxoDB 官网收集数据确定 TgRASP2 核酸序列和氨基酸序列;利用各类生物信息学在线网站分别对 TgRASP2 进行蛋白质基本理化性质、亲/疏水性、磷酸化位点、二级结构、三级结构以及抗原表位和抗原指数等进行预测和分析。 **结果** TgRASP2 蛋白共含有 437 个氨基酸,分子式为 $C_{2185}H_{3507}N_{635}O_{642}S_{23}$,分子质量为 49.682 13 ku,理论等电点为 9.30,半衰期为 30 h;蛋白不稳定系数为 50.96,脂溶性指数为 74.05,总平均亲水性系数为-0.620,属于亲水性蛋白;该蛋白无信号肽切割位点,无跨膜结构域,含有 40 个磷酸化位点;二级结构中 α 螺旋和延长链分别占 34.10%和 19.45%, β 转角和无规则卷曲分别占 7.55%和 38.90%。经 SMART 网站分析,该蛋白的结构域含有 4 个低复杂度区,无特殊结构域。该蛋白的抗原性为 0.6651,共含有 15 个 B 细胞抗原表位,18 个 CTL 抗原表位,15 个 Th 抗原表位。 **结论** 生物信息学预测 TgRASP2 蛋白具有亲水性,为可溶性蛋白。该蛋白存在多个潜在的 B、T 细胞抗原表位,具有免疫原性和反应原性,可作为弓形虫病疫苗候选蛋白。

【关键词】 刚地弓形虫;棒状体顶端表面蛋白 2;生物信息学分析

【中图分类号】 R382.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)10-1152-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Oct;18(10):1152-1157.]

Bioinformatics study of the structure and function of *Toxoplasma gondii* rhoptry apical surface protein 2

MA Hangbin, ZHANG Jing, WANG Jinghui, WANG Shuai, TIAN Xiaowei (1. Department of Pathogenic Biology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453000, China)***

【Abstract】 **Objective** In order to provide a theoretical basis for the pathogenicity and drug targets of *Toxoplasma gondii* and for the research and development of a vaccine, bioinformatics methods were applied to predict and analyze the structure and function of *Toxoplasma gondii* rhoptry apical surface protein 2 (TgRASP2). **Methods** the data were collected through the ToxoDB website to determine the nucleic acid sequence and amino acid sequence of TgRASP2; various bioinformatics online sites were used to predict and analyze the basic physicochemical properties of the protein, hydrophilicity/hydrophobicity, phosphorylation sites, secondary structure, tertiary structure, as well as antigenic epitopes and antigenic indices of TgRASP2, etc., respectively. **Results** The results show that TgRASP2 protein contains a total of 437 amino acids, the molecular formula of $C_{2185}H_{3507}N_{635}O_{642}S_{23}$, the relative molecular mass of 49.682 13 ku, the theoretical isoelectric point of 9.30, the half-life of 30h, the instability coefficient of 50.96, the lipid solubility index of 74.05 and the overall average hydrophilicity coefficient of -0.620, a hydrophilic protein. The protein has no signal peptide cleavage site and no transmembrane structural domain, and contains 40 phosphorylation sites (25 serine phosphorylation sites, 10 threonine phosphorylation sites, 5 tyrosine phosphorylation sites); the α -helix and extended strand account for 34.10% and 19.45% of the secondary structure, while the β -turned and random coiled account for 7.55% and 38.90% the secondary structure, respectively; After analysis on the SMART website, the structural domains of this protein contain four low-complexity regions and non-specific structural domains. The protein has an antigenicity of 0.6651 and contains 15 B-cell antigenic epitopes, 18 CTL cell antigenic epitopes and 15 Th cell antigenic epitopes. **Conclusion** Bioinformatics predicts that the TgRASP2 protein is hydrophilic and soluble. The presence of multiple potential B and T cell antigenic epitopes, immunogenicity and reactogenicity of this protein can be used as a candidate protein for toxoplasmosis vaccine.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; rhoptry apical surface protein 2; bioinformatics study

* **【基金项目】** 河南省自然科学基金项目(No. 232300421315)。

** **【通讯作者】** 王帅, E-mail: tongbaiws1003@163.com; 田晓薇, E-mail: tianxw2020@163.com

【作者简介】 马航斌(1998-),女,浙江诸暨人,硕士研究生。研究方向:寄生虫感染与免疫。E-mail: mhb19980710@163.com。

刚地弓形虫作为一种胞内专性寄生原虫,可导致人类和绝大多数种类的温血动物感染并引起人兽共患弓形虫病,全球范围内约有三分之一的人口感染弓形虫^[1]。不同人群感染弓形虫引起的临床表现各不相同,免疫力正常的个体感染后一般表现为无症状或轻度感染,处于妊娠期的妇女感染会发生垂直传播,引发流产、死胎、胎儿畸形等妊娠结局^[2],免疫力低下人群如 HIV 患者感染弓形虫后果严重,甚者可致命^[3-4]。

临床上尚无用于治疗弓形虫病的特效药物,常用的磺胺类药物、乙胺嘧啶、乙酰螺旋霉素^[5]副作用较大,不适用于孕妇,且疗效不尽如人意。接种疫苗是预防弓形虫感染的重要手段,但迄今为止全世界仅有 1 种减毒活速殖子疫苗被批准用于预防绵羊流产,其效果并不显著^[6]。

弓形虫作为一种胞内专性寄生虫,入侵宿主体内后细破坏宿主细胞并引起感染。在这一环节中,寄生虫顶端表面分子与宿主细胞膜上的受体分子之间的识别尤为关键。棒状体是一种梭状细胞器,是顶复亚门寄生虫独有的细胞器,存在于顶端亚门寄生虫生命周期的的大多数阶段且显示出明显的结构极性,在弓形虫和疟原虫的胞吞作用中均起重要作用^[7],还具有操纵宿主细胞的功能^[8],在棒状体介导弓形虫排泄、分泌功能过程中还会引起宿主细胞产生强烈的免疫反应^[9],是弓形虫入侵宿主细胞的关键。弓形虫顶端表面蛋白(*Toxoplasma gondii* rhoptry apical surface protein 2, TgRASP2)覆盖在速殖子棒状体的顶端,研究表明伴随着 TgRASP2 的消耗会导致棒状体分泌功能的丧失,并且能完全阻断弓形虫的入侵^[7]。虽然其在弓形虫入侵宿主细胞这一过程中发挥具体功能尚不明确,但普遍认为 TgRASP2 处于棒状体分泌复杂机制中胞外作用的第一步,表明 TgRASP2 具有成为疫苗候选分子的潜力。生物信息学是一门新兴的交叉学科,涵盖了蛋白质序列分析、空间结构预测和功能预测等诸多领域。本研究采用生物信息学方法对 TgRASP2 的可溶性、免疫原性等方面进行预测分析,为将其作为弓形虫疫苗候选分子提供一定的理论基础。

材料与方法

1 TgRASP2 蛋白及编码基因序列的获取

从 ToxoDB 官网中下载刚地弓形虫 TgRASP2 (TG GT1_315160)的编码基因及其氨基酸序列用于生物信息学分析。

2 TgRASP2 生物信息学分析

2.1 TgRASP2 蛋白质序列理化参数分析 利用蛋白质序列理化参数在线预测网站 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析 TgRASP2

蛋白的分子质量、理化等电点、原子组成、消光系数、氨基酸组成、蛋白半衰期、不稳定系数、脂肪系数及总平均亲水性。

2.2 TgRASP2 蛋白质亲、疏水性分析 利用蛋白质亲水性、疏水性在线预测网站 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)来绘制 TgRASP2 蛋白的亲水性和疏水性序列谱,观察其折叠情况,分析该蛋白的亲、疏水性。

2.3 TgRASP2 蛋白质信号肽及跨膜结构域预测 利用蛋白质信号肽在线预测网站 SignalP 5.0^[10] (<https://services.health-tech.dtu.dk/service>)预测 TgRASP2 蛋白的信号肽;利用蛋白质跨膜结构域在线预测网站 TMHMM Server v. 2.0^[11] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)预测 TgRASP2 蛋白的跨膜结构域。

2.4 TgRASP2 蛋白质磷酸化预测 利用蛋白质磷酸化位点在线预测网站 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>)预测 TgRASP2 蛋白的蛋白质磷酸化,分析其翻译后修饰情况。

2.5 TgRASP2 蛋白质二级结构及表面可及性预测 利用在线预测网站 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/>)预测 TgRASP2 蛋白的二级结构;利用在线网站 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测 TgRASP2 蛋白的结构域;利用在线网站 Bcepred^[12] (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/bcepred/>)预测 TgRASP2 蛋白的柔韧性、表面可及性、转角位点及暴露表面等。

2.6 TgRASP2 蛋白质三级结构预测 利用蛋白质三级结构在线预测网站 AlphaFold (<https://alphafold.com/>)预测 TgRASP2 蛋白的三级结构。

2.7 TgRASP2 蛋白质抗原性分析及细胞抗原表位预测 利用在线网站 (<http://www.VaxiJenv2.Oddg-pharmfac.net/>)预测 TgRASP2 的抗原性;利用蛋白质抗原表位在线网站 ABCpred (https://webs.iitd.edu/ABCpredin/raghava/abcpred/ABC_submission.html)和 Syfpeith (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>)分别预测 TgRASP2 的 B、T 细胞抗原表位。

结果

1 TgRASP2 蛋白的理化特性

经 ProtParam 预测, TgRASP2 蛋白由 437 个氨基酸组成,其分子式为 C₂₁₈₅H₃₅₀₇N₆₃₅O₆₄₂S₂₃,分子质量为 49.682 13 ku,理论等电点为 9.30,负电荷氨基酸总数为 57,正电荷氨基酸总数为 74 (表 1); TgRASP2 蛋白的不稳定指数为 50.96,脂溶性指数为

74.05。若所有的 Cys 残基对形成胱氨酸,消光系数为 48 525,在波长 280 nm 处的吸光度值为 0.977;若所有 Cys 残基均减少,消光系数为 47 900,在波长 280 nm 处的吸光度值为 0.964。在哺乳动物体外该蛋白的半衰期约为 30 h,总平均亲水性指数-0.620,为亲水性蛋白。

表 1 TgRASP2 的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of TgRASP2

氨基酸名称 Amino acid	氨基酸占比(%) Percentage of amino acids	氨基酸名称 Amino acid	氨基酸占比(%) Percentage of amino acids
丙氨酸 Ala	6.2	精氨酸 Arg	7.3
天冬酰胺 Asn	3.0	天门冬酸 Asp	5.0
半胱氨酸 Cys	2.5	谷氨酰胺 Gln	4.8
谷氨酸 Glu	8.0	甘氨酸 Gly	6.9
组氨酸 His	2.3	异亮氨酸 Ile	3.2
亮氨酸 Leu	8.9	赖氨酸 Lys	9.6
蛋氨酸 Met	2.7	苯丙氨酸 Phe	3.7
脯氨酸 Pro	4.6	丝氨酸 Ser	6.9
苏氨酸 Thr	3.7	色氨酸 Trp	1.4
酪氨酸 Tyr	2.3	缬氨酸 Val	7.1

2 TgRASP2 蛋白的亲、疏水性

将窗口大小调整为 11(默认为 9)时,ProtScale 输出图形显示 TgRASP2 蛋白存在 5 个疏水性高分值(阈值>1.5)峰,分别位于 5-7、48-52、128、194、281-286 氨基酸残基处,最高峰值位于第 283 位的丙氨酸残基处,得分为 2.556;29 个低分值(阈值<0)峰位分别位于第 29、32-33、35-44、56-63、69-77、79、85-93、96-107、112-113、116-121、131-133、143、146-175、177-191、196-197、199-211、216-223、230-231、233-239、241、243、245、248-263、266-278、289-325、327-328、330-420、422-423、427-433 氨基酸残基处,最低峰值分别位于第 357、358 位的赖氨酸、赖氨酸残基处,得分均为-3.989(图 1)。

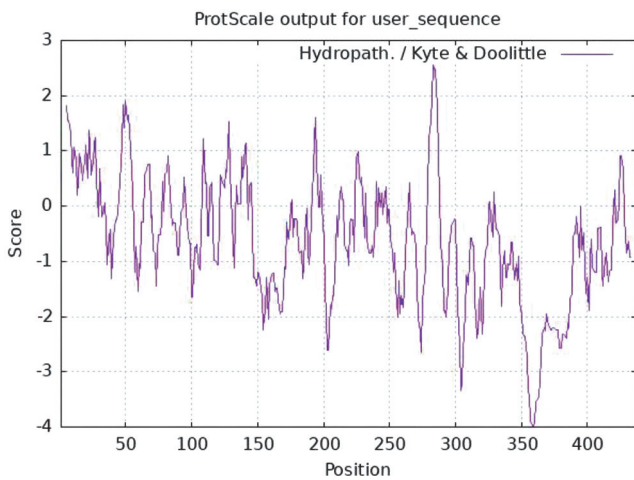


图 1 TgRASP2 蛋白的亲、疏水性分析
Fig. 1 Hydrophilia/hydrophobicity analysis of TgRASP2

3 TgRASP2 蛋白的信号肽及跨膜结构域分析

根据 SignalP 5.0 在线网站的预测,TgRASP2 蛋白亚细胞定位分析显示,分泌通路信号肽的可能性为 0.0684,其他蛋白的可能性为 0.9316。信号肽预测显示,基于 Y-max 判定 TgRASP2 蛋白无信号肽。TM-HMM Server v. 2.0 预测 TgRASP2 蛋白第 1-36 位氨基酸均为胞外区,无胞内区和跨膜区,并非跨膜蛋白(图 2,图 3)。

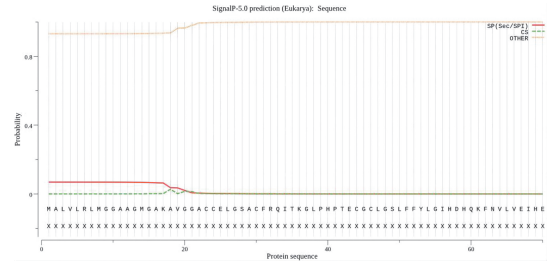


图 2 TgRASP2 蛋白的信号肽分析
Fig. 2 Protein signal peptide analysis of TgRASP2

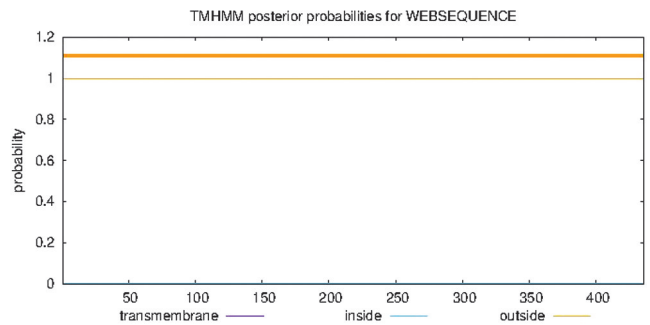


图 3 TgRASP2 蛋白的跨膜区分析
Fig. 3 Protein transmembrane domain analysis of TgRASP2

4 TgRASP2 蛋白的磷酸化分析

NetPhos 3.1 分析 TgRASP2 蛋白含有 40 个磷酸化位点,其中有 25 个丝氨酸(Serine)磷酸化位点,10 个苏氨酸(Threonine)磷酸化位点,5 个酪氨酸(Tyrosine)磷酸化位点(图 4)。

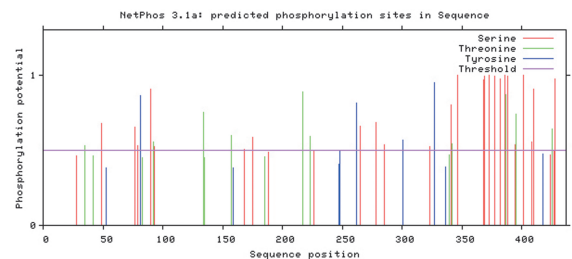


图 4 TgRASP2 蛋白质的磷酸化分析
Fig. 4 Protein phosphorylation analysis of TgRASP2

5 TgRASP2 蛋白的二级结构、结构域及表面可及性

SOPMA 分析 TgRASP2 蛋白的 α 螺旋(Alpha helix, Hh) 包含 149 个氨基酸,占全长的 34.10%;延长链(Extended strand, Ee)包含 85 个氨基酸,占全长

的 19.45%；β转角(Beta turn, Tt)包含 33 个氨基酸，占全长的 7.55%；无规则卷曲(Random coil, Cc)包含 170 个氨基酸，占全长的 38.90%(图 5)。

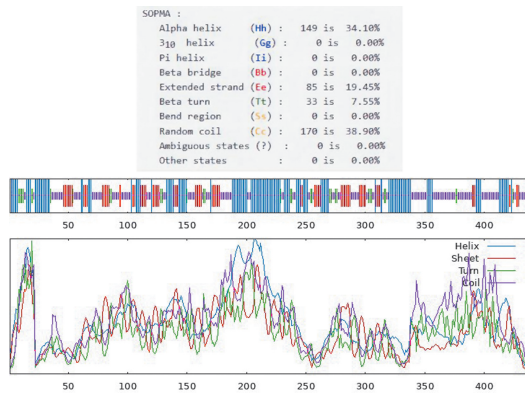


图 5 TgRASP2 蛋白的二级结构分析
Fig. 5 Prediction of the secondary-structure of TgRASP2

经 SMART 蛋白结构域在线网站分析, TgRASP2 蛋白含有 4 个低复杂性结构域, 分别位于第 1-22、309-319、348-367、368-386 氨基酸处(图 6)。

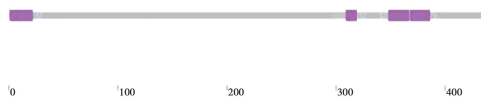


图 6 TgRASP2 蛋白的结构域分析
Fig. 6 Prediction of the protein structural domain of TgRASP2

经 Bcepred 软件分析, TgRASP2 蛋白有 10 个亲水性位点(临界值为 1.9), 分别位于 100-102、165-168、201-207、271-275、292-293、303-307、316-317、340、348-385、433-435 氨基酸残基; 14 个柔韧性位点(临界值为 2), 分别位于 72、99、151、162-166、203、269-273、289-291、313-314、341、346、351-385、405、407、424 氨基酸残基处; 34 个表面可及性位点(临界值为 1.9), 分别位于 60-61、70、73-74、91、100-102、118-120、131、136、145、148-149、152-159、162、164-170、186-187、201-208、217-220、237、254-257、271-277、290-291、301-307、314-321、334-337、339-340、344-346、348、350-366、369-389、395、397-401、404-406、408、416-418、433-434 氨基酸残基。1 个 Turn 位点(临界值为 2.4), 位于 305-308 氨基酸残基。20 个暴露表面位点(临界值为 2.3), 分别位于 100-102、148-149、152-155、157、168、170、202、207、218、257、272-274、291-294、302-307、316-317、334-335、353-364、373-375、378-379、381-384、435-437 氨基酸残基。24 个极性位点(临界值为 1.8), 分别位于 58-60、68-73、106-113、144-150、152-155、164-165、202-210、218-222、232-233、254-257、271-277、291-294、301-307、311、314-319、331-337、340、351-366、369、372-375、377-378、380-384、

397-401、417 氨基酸残基。23 个抗原倾向位点(临界值为 1.9), 分别位于 6、41、43-44、46-54、63-68、76-79、81、95-98、104-106、108、114-116、124-125、129、142-143、177、190、225-227、230、287-289、298-299、343、409、427 氨基酸残基。

6 TgRASP2 蛋白的三级结构

AlphaFold 预测 TgRASP2 蛋白的三级结构如图 7, 其中蓝色区域相似度最高。



注: 蓝色区域 pLDDT>90, 青色区域 90>pLDDT>70, 黄色区域 70>pLDDT>50, 橙色区域 pLDDT<50。

图 7 TgRASP2 蛋白的三级结构分析

Notes: pLDDT>90 for blue areasmm, 90>pLDDT>70 for cyan areasmm, 70>pLDDT>50 for yellow areasmm, and pLDDT<50 for orange areas.

Fig. 7 Prediction of protein tertiary structure of TgRASP2

7 TgRASP2 蛋白的抗原性分析及 B、T 细胞抗原表位预测

经 VaxiJenv2.0 在线预测分析, 当选定阈值为 0.5 时, 预测 TgRASP2 蛋白的抗原性指数为 0.6651; 选定阈值为 0.8 及 16 氨基酸分析时, 预测 TgRASP2 蛋白有 15 个 B 细胞表位(表 2)。

表 2 TgRASP2 蛋白的 B 细胞抗原表位分析
Table 2 Analysis results of B-cell epitopes of TgRASP2

顺序 Order	表位序列 Epitopes sequence	氨基酸起始位置 Amino acid starting position	分值 Score
1	CSLYMTIEAGRWSATS	78	0.92
2	YEFIEKLRAYRETCST	327	0.90
3	KRTWYNMKVENGKSQP	155	0.89
4	YLGHDHDKFNVLVEI	53	0.88
5	PRKSGGKKSRRPSTSP	374	0.87
6	KKRREDGEDSSGEKSP	359	0.87
7	PSQKGADGEEKKKKKK	345	0.87
8	PDRWEWCYWESAAACK	255	0.87
9	SSGEKSPRKSGGKKS	368	0.86
10	GGAAGMGAKAVGGACC	9	0.83
11	AGRWSATSQVVKVKGQ	86	0.83
12	MISTQSSVVGDEEPQT	422	0.83
13	GKSQPRINLSLHKLDP	166	0.83
14	VLVEIHELDRVPSKCS	64	0.81
15	KMTAKERLTFFSQVLE	215	0.80

使用 Syfpeith 在线预测软件,选择等位基因 HLA-A*02:01(限制性 CTL 细胞表位),选择 9 氨基酸进行分析,当 cutoff 分值为 21 时,TgRASP2 蛋白共含有 18 个 CTL 细胞表位(表 3);选择 15 氨基酸进行 MHC II 的 HLA-DRB1*0401(限制性 Th 细胞表位)分析,当临界值为 21 时,TgRASP2 蛋白共有 15 个限制性 Th 细胞表位(表 4)。

表 3 TgRASP2 蛋白的 HLA-A*02:01 限制性 CTL 抗原表位分析
Table 3 Analysis results of the potential CTL epitopes restricted by HLA-A*02:01 of TgRASP2

顺序 Order	表位序列 Epitopes sequence	氨基酸起始位置 Amino acid starting position	分值 Score
1	GLYEFIEKL	334	31
2	RLANLVLKV	145	30
3	VLEGPLERL	237	27
4	RINLSLHKL	180	26
5	HIMALVLRL	8	25
6	RLMVHIRQV	119	25
7	SLHKLDPLG	184	25
8	NVLVEIHEL	72	23
9	SATSQVVKV	99	23
10	RLHSPRAQV	407	23
11	VMISTQSSV	430	23
12	RLMGGAAGM	15	22
13	KLDPLPTN	187	22
14	SIPFLAISL	287	22
15	CLGSLFFYL	55	21
16	HIRQVDNEV	123	21
17	KIFLFKKG	132	21
18	GLPTNQSPL	191	21

表 4 TgRASP2 蛋白的 HLA-DRB1*0401 限制性 Th 抗原表位分析
Table 4 Analysis results of the potential Th cells epitopes restricted by HLA-DRB1*0401 of TgRASP2

顺序 Order	表位序列 Epitopes sequence	氨基酸起始位置 Amino acid starting position	分值 Score
1	DVFFRRVDRDRNLWS	318	28
2	LVEIHELDRVVKSCS	74	26
3	DQRVVVEERLMVHIR	111	26
4	ERLMVHIRQVDNEVK	118	26
5	MVHIRQVDNEVKIFL	121	26
6	FRRVDRDRNLWSDGL	321	26
7	RLDISTARRLHSPRA	399	26
8	SLFFYLGIHHDQKFN	58	22
9	LFFYLGIHHDQKFNV	59	22
10	AGRWSATSQVVKVKG	95	22
11	LTFQSQVLEGPLERL	231	22
12	RWEWCYWESAAACK	266	22
13	DGLYEFIEKLRAYRE	333	22
14	LRAYRETCSTRVPSQ	342	22
15	QQMYEEVMISTQSSV	424	22

讨 论

刚地弓形虫可感染人类和几乎所有种类的温血动

物^[13],传播范围广,对症药物少,且尚未有可以用于人预防的疫苗面世,因此亟需研制相关疫苗用于弓形虫感染的预防。

蛋白质可溶于水且浓度高是制备生物制剂时很重要的条件^[14],以此为参考对 TgRASP2 蛋白的理化性质进行分析,发现 TgRASP2 蛋白总平均亲水性指数为-0.620,属于亲水性蛋白。ProtScale 分析 TgRASP2 蛋白具有 29 个低分值的高亲水区,亲水区表面富集有亲水性氨基酸,如极性氨基酸、带正电荷氨基酸和带负电荷氨基酸,结合 TgRASP2 蛋白的理化性质分析结果,预测亲水性氨基酸共占 TgRASP2 氨基酸全长的 54.9%。Bcepred 软件分析 TgRASP2 蛋白有 10 个亲水区域,虽选定的阈值不同,但是与 ProtScale 分析得出的结果可以互相印证,且 TgRASP2 蛋白有 24 个极性位点。预测 TgRASP2 蛋白无跨膜区,更易于构建重组蛋白。以上信息说明 TgRASP2 蛋白为可溶性蛋白,即具有亲水性,从溶解度方面为 TgRASP2 蛋白弓形虫亚单位疫苗的研制提供了理论依据。

疫苗需要含有可被免疫系统识别的抗原,且能引起宿主体内的免疫反应^[15-16]。经 VaxiJenv2.0 在线预测分析,TgRASP2 蛋白的抗原性指数为 0.6651,表明该蛋白抗原性较强。TgRASP2 蛋白二级结构预测显示易形成抗原表位的 β 转角和无规则卷曲^[17-18] 占比 46.45%,并且经 ABCpred 和 Syfpeith 等在线网站分析 TgRASP2 蛋白有 15 个 B 细胞抗原表位,18 个 CTL 细胞表位和 15 个限制性 Th 细胞表位,均获得了理想的结果。蛋白质磷酸化是一种常见且可逆的翻译后修饰^[19],在发挥蛋白质功能中有重要作用^[20]。NetPhos 3.1 分析 TgRASP2 蛋白含有 40 个磷酸化位点。从上述结果可推测 TgRASP2 蛋白具有良好的 B、T 细胞抗原表位结构基础,适合用来设计疫苗。

综上所述,TgRASP2 蛋白为亲水性蛋白,含有较多的 B、T 细胞抗原表位,提示其具有良好的抗原性,可能是一个潜在的弓形虫预防疫苗候选分子。

【参考文献】

- [1] Khan IA, Moretto M. Immune responses to *Toxoplasma gondii* [J]. Curr Opin Immunol, 2022, 77: 102226.
- [2] Csep A, Vaida LL, Negruu BM, et al. Research on demographic, clinical and paraclinical aspects in pregnant women infected with *Toxoplasma gondii* [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(2): 123.
- [3] Marra CM. Central nervous system infection with *Toxoplasma gondii* [J]. Handb Clin Neurol, 2018, 152: 117-122.
- [4] Zineb L, Alexis M, Bruno H, et al. Targeted delivery of *Toxoplasma gondii* antigens to dendritic cells promote immunogenicity and protective efficiency against Toxoplasmosis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 317.

- [5] Ali DG, Abdolhossein D, Fatemeh G, et al. Protective immunity induced with a DNA vaccine encoding B- and T-cells multi-epitope SAG1, ROP16, MIC4, GRA12, M2AP, and multi-epitope ROP8 against acute and chronic *Toxoplasmosis* in BALB/c mice[J]. *Exp Parasitol*, 2022, 242:1083-1085.
- [6] Elzbieta HS, Justyna MG, Marcin MG, et al. Veterinary vaccines against *Toxoplasmosis* [J]. *Parasitology*, 2014, 141 (11): 1365-1378.
- [7] Catherine S, Gaelle L, Raghavendran R, et al. A lipid-binding protein mediates rhoptry discharge and invasion in *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* parasites [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):40-41.
- [8] Daniela S, Maryse L. Unraveling the elusive rhoptry exocytic mechanism of Apicomplexa [J]. *Trends Parasitol*, 2021, 37 (7): 622-637.
- [9] Roghiyeh F, Ahmad D, Shahabeddin S, et al. Vaccination against *Toxoplasma gondii* using rhoptry antigens: a systematic review [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2018, 59: 32-40.
- [10] Almagro AJJ, Tsirigos KD, Sonderby CK. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 420-423.
- [11] Krogh A, Larsson B, von Heijne G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes [J]. *Mol Biol*, 2001, 305(3): 567-580.
- [12] Saha S, G. P. S. Raghava. BcePred: prediction of continuous B-Cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties [J]. *ICARIS*, 2004, 3239: 197-204.
- [13] 李润花, 殷国荣. 刚地弓形虫病多表位疫苗的研究进展 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2022, 40(5): 661-667.
- [14] Alexander PG, Guillaume MH, Stuart AW. A simple method for improving protein solubility and long-term stability [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(29): 8933-8939.
- [15] Atanas P, Irini D. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics [J]. *Open Biol*, 2013, 3(1): 120-139.
- [16] Marlet MA, Lizbeth RS, Jazmin GM. Searching epitope-based vaccines using bioinformatics studies [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2412: 471-479.
- [17] 李敏, 朱玥洁, 胡金伟, 等. 布鲁氏菌 Omp2a-BtpB 多表位疫苗结构预测及免疫模拟 [J]. *中国医药导报*, 2022, 19(20): 5-10.
- [18] Chen ZQ, Zhu YJ, Sha T, et al. Design of a new multi-epitope vaccine against *Brucella* based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods [J]. *Epidemiol Infect*, 2021, 149: e136.
- [19] Estella AN, Elise D, Rasmus HP, et al. How phosphorylation impacts intrinsically disordered proteins and their function [J]. *Essays Biochem*, 2022, 66(7): 901-913.
- [20] 白杨, 郭旭霞, 纪爱芳, 等. 刚地弓形虫动力蛋白轻链 8a 的生物信息学分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2020, 15(4): 438-443.

【收稿日期】 2023-05-21 【修回日期】 2023-08-01

(上接 1151 页)

- [17] Zhao W, Tong J, Liu J, et al. The dose-response relationship between gamma-glutamyl transferase and risk of diabetes mellitus using publicly available data: A longitudinal study in Japan [J]. *Int J Endocrinol*, 2020, 2020: 5356498.
- [18] Karttunen TJ, Niemela S, Kerola T. Blood leukocyte differential in *Helicobacter pylori* infection [J]. *Dig Dis Sci*, 1996, 41 (7): 1332-1336.
- [19] Guclu M, Faruq AA. Association of severity of *Helicobacter pylori* infection with peripheral blood neutrophil to lymphocyte ratio and mean platelet volume [J]. *Euroasian J Hepatogastroenterol*, 2017, 7(1): 11-16.
- [20] Jafarzadeh A, Akbarpoor V, Nabizadeh M, et al. Total leukocyte counts and neutrophil-lymphocyte count ratios among *Helicobacter pylori*-infected patients with peptic ulcers: independent of bacterial CagA status [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2013, 44(1): 82-88.
- [21] Farah R, Khamisy-farah R. Association of neutrophil to lymphocyte ratio with presence and severity of gastritis due to *Helicobacter pylori* infection [J]. *J Clin Lab Anal*, 2014, 28 (3): 219-223.
- [22] Farah R, Hamza H, Khamisy-farah R. A link between platelet to lymphocyte ratio and *Helicobacter pylori* infection [J]. *J Clin Lab Anal*, 2018, 32(1): e22222.
- [23] Baxendell K, Walelign S, Tesfaye M, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and platelet indices among school-aged children in central Ethiopia: a cross-sectional study [J]. *BMJ Open*, 2019, 9(4): e027748.
- [24] Zhang H, Yang Z, Zhang W, et al. White blood cell subtypes and risk of type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2017, 31 (1): 31-37.
- [25] Tan WYT, Young BE, Lye DC, et al. Statin use is associated with lower disease severity in COVID-19 infection [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 17458.
- [26] Savarino V, Vigneri S, Celle G. The 13C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Gut*, 1999, 45 (Suppl 1): 18-22.
- [27] Graham DY, Klein PD. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori* 13C-urea breath test [J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 2000, 29(4): 885-893.
- [28] Makristathis A, Hirschl AM, Megraud F, et al. Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Helicobacter*, 2019, 24(Suppl 1): e12641.
- [29] Alzoubi H, Al-mnayyis A, Al RI, et al. The use of (13)C-urea breath test for non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in comparison to endoscopy and stool antigen test [J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(7): 448.
- [30] Lim SH, Kim N, Kwon JW, et al. Positive Association between *Helicobacter pylori* infection and metabolic syndrome in a Korean population: A multicenter nationwide study [J]. *Dig Dis Sci*, 2019, 64(8): 2219-2230.
- [31] Shiferaw G, Abera D. Magnitude of *Helicobacter pylori* and associated risk factors among symptomatic patients attending at Jasmin internal medicine and pediatrics specialized private clinic in Addis Ababa City, Ethiopia [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 118.

【收稿日期】 2023-05-11 【修回日期】 2023-08-02