

DOI:10.13350/j.cjpb.240708

• 论著 •

重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的原核表达、纯化及鉴定^{*}

米热古丽·艾乃都¹, 王卫国¹, 陈娜菲², 周彦霞², 马西智², 单文豪³, 李艳敏², 周晓涛^{2,4,*}

(1. 新疆医科大学维吾尔医学院, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学基础医学院免疫学教研室;

3. 新疆医科大学第一附属医院临床 2020-8 班; 4. 新疆地方病及分子生物学重点实验室)

【摘要】 目的 利用 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 重组质粒, 诱导表达、纯化获得 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 目的蛋白, 并对其进行鉴定, 为后续研究提供前提条件。方法 利用双酶切的方法验证 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 质粒, 并将其转化至 *E. coli* BL21(DE3) 菌株, 获得表达菌株。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, 菌液超声破碎后, 经 SDS-PAGE 检测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。结果 成功鉴定重组质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162; 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 28 °C 条件下诱导 6 h, 上清中的蛋白表达量最高; 300 mmol/L 咪唑时洗脱得到的目的蛋白较多, 洗脱效果较好; Western blot 检测重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 能被相应抗体识别, 反应条带在 35 ku 处, 与预期相符。结论 成功构建 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 重组质粒, 表达出相应重组蛋白, 为细粒棘球病重组疫苗的研究创造条件。

【关键词】 细粒棘球蚴; 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162; 蛋白表达及鉴定

【文献标识码】 A**【文章编号】** 1673-5234(2024)07-0784-05

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jul.; 19(7):784-788.]

Construction of the pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 and identification of the purified expression products

Mireguli · Ainaidu¹, WANG Weiguo¹, CHEN Nafei², ZHOU Yanxia², MA Xizhi², SHAN Wenhao³, LI Yanmin², ZHOU Xiaotao^{2,4} (1. Institute of Traditional Uygur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Department of Immunology, School of Basic Medicine Sciences, Xinjiang Medical University; 3. Class 2020-8, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University; 4. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology for Endemic Disease) **

【Abstract】 **Objective** The recombinant plasmid pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was induced to express the target protein EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162, and its purification and identification was conducted to provide the prerequisites for the subsequent studies. **Methods** The pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was validated by restriction enzyme and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain to obtain the expression 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 expressed protein in supernatant and precipitation was analyzed by SDS-PAGE. The protein was purified by nickel column affinity chromatography and identified by Western blot. **Results** The plasmids pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was successfully identified. The recombinant protein EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was induced by IPTG (0.5 mmol/L) at 28 °C for 6 hours, and the protein was expressed highly in the supernatant. When it was eluted with 300 mmol/L imidazole, more target proteins are obtained and collected. It was showed by Western blot results that the recombinant protein EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 could be recognized by the corresponding antibody, and the reaction band was located at 35 ku, which was consistent with the expectation results. **Conclusion** The pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was successfully constructed, the corresponding recombinant protein was successfully expressed, which established the conditions for the study on the recombinant vaccine for the echinococcosis.

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32260192); 新疆维吾尔自治区杰出青年基金项目(No. 2022D01E50)。

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

【作者简介】 米热古丽·艾乃都 (1978-), 女(维吾尔族), 新疆维吾尔自治区托克逊人, 硕士研究生, 讲师, 主要研究方向: 感染免疫。
E-mail: 2481593873@qq.com

【Keywords】

Echinococcus granulosus; the recombinant protein EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162; protein expression and identification

包虫病是由于中间宿主感染细粒棘球绦虫引起的一种地方性和自然疫源性的人畜共患病,在我国西北畜牧区尤为高发^[1-3]。包虫病的发生不仅威胁了人类健康,并且严重制约了畜牧业地区的经济发展^[4]。目前,治疗包虫病的方法仍较为局限,而接种疫苗可以有效预防包虫病的感染,其疫苗的研发成为当下研究的热点,该项研究在人类健康亦或是经济发展方面都具有重要意义^[5-9]。研究表明,从细粒棘球绦虫头蚴和成虫中克隆出来的细粒棘球绦虫 EgG1Y162 抗原可作为一种有效的保护性抗原,成为候选的疫苗抗原进行深入研究^[10-11]。刘晓霞等^[12-13]研究发现 EgG1Y162 抗原免疫小鼠后可使体内特异性抗体增加,促进淋巴细胞的增殖,同时参与机体的细胞免疫和体液免疫。通过对 EgG1Y162 抗原表位的生物信息学预测分析,可以看到该抗原具有丰富的抗原表位,进一步说明了其有利于宿主体内免疫细胞的识别及诱导免疫应答反应^[12]。随着科研工作者的深入研究,棘球绦虫病的疫苗研制已取得显著进展。

在本实验研究中,将两个 EgG1Y162 抗原通过 Linker 序列连接,以期通过增加抗原分子量的方式增加疫苗的免疫原性。Linker 序列的组成形式多样,我们选择的是一种短肽的柔性氨基酸,最广泛应用的是 G 和 S,其结构简单不易折叠,对蛋白的空间构象和功能影响小,空间位阻也最小,自身具备良好的柔韧性且伸展性好,可使两端序列的柔性不受影响,保证前后蛋白正确折叠^[14-15]。良好的 Linker 序列可使串联的两个蛋白正确折叠,从而保留各自的抗原表位。本课题组前期利用生物信息学方法分析重组蛋白 EgG1Y162-Linker-EgG1Y162 的 T/B 细胞联合表位及蛋白质三级结构,选择出最合适的 Linker 序列“GSGGSG”。因此,本研究中我们拟构建 pET30a-EgG1Y162-GSGGSG-EgG1Y162,并获得相应目的蛋白。

原核表达系统能够在短时间内大量获得基因表达产物,其方法简单且所需成本相对较低廉,常用于疫苗的产业化生产。根据设计的重组疫苗的基因序列,通过基因工程技术构建原核表达载体 pET30a-EgG1Y162-Linker-EgG1Y162,通过原核表达系统探索出重组蛋白 EgG1Y162-Linker-EgG1Y162 的最佳诱导表达及纯化条件,运用 Western blot 对重组蛋白鉴定。为制备重组蛋白 EgG1Y162-Linker-EgG1Y162,优化细粒棘球绦虫疫苗,为进一步重组疫苗的研制奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 质粒、菌株 质粒 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162:由上海生工公司构建合成。*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞:上海唯地生物技术有限公司。

1.2 主要试剂 LB 液体培养基和 LB 固体培养基均购自上海生工公司,琼脂糖购自美国 invitrogen 公司,质粒提取试剂盒购自北京天根有限公司,PCR 试剂盒、快切酶 EcoR I 和 Sal I 均购自大连 TaKaRa 技术公司,DNA maker2000 购自大连 TaKaRa 技术公司,预染蛋白 Marker 购自美国赛默飞世尔科技,IPTG(异丙基硫代半乳糖苷,Isopropyl β -D-Thiogalactoside),SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自 Solarbio,PVDF 膜购自 GE Healthcare,His-Tag Mouse 抗体购自 Cell Signaling Technology,Goat anti-mouse IgG-HRP 购自爱必信(上海)生物科技有限公司,Goat anti-human IgG-HRP 购自北京博奥森生物技术有限公司,高灵敏度化学发光检测试剂盒购自康为世纪生物有限公司,HisTrap 纯化柱购自美国 General Electric,RPMI 1640 培养基、胎牛血清(BI)及双抗均购自 Hyclone 公司,红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司,rmIL-4 和 rmGM-CSF 均购自美国 PEPROTECH 公司,FITC 偶联 anti-HIS 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,重组细胞因子溶解稀释液套装购自杭州联科生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 质粒的酶切鉴定 利用 EcoR I 和 Sal I 快切酶对重组质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 进行双酶切,37 °C 酶切 40 min。酶切后经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

2.2 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的诱导表达条件的优化 将 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 质粒转化入宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),挑取单克隆菌落接种于 20 mL 的含 30 μ g/mL 的卡那霉素的 LB 液态培养基中,37 °C、220 r/min 摇床振荡培养过夜,次日将此过夜的培养菌液按 1:50 接种于含 30 μ g/mL 的卡那霉素的 LB 液态培养基中扩大培养,37 °C、220 r/min 摇床振荡培养至菌液吸光度值 A 为 0.6~0.8 时,将菌液分装 6 个 50 mL 无菌离心管中,分为 3 组,第 1 组 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L,第 2 组 IPTG 终浓度为 0.8 mmol/L,诱

导条件分别为未诱导、37℃ 0 h、37℃ 6 h、28℃ 6 h。12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 收集菌体后超声破碎裂解, 12 000 r/min 离心 10 min 后分离上清与沉淀, 经 12% SDS-PAGE 电泳确定最佳诱导条件。

2.3 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的纯化 根据探索出的重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 诱导最佳条件, IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L, 28℃ 6 h 条件下大量诱导蛋白, 收集菌体沉淀并且每克菌体沉淀加入 7 mL 的 PBS 稀释混匀, 按照 1:100 的比例加入 PMSF。然后进行细胞超声破碎, 设置工作时间 5 s, 工作间隙 5 s, 全程时间 3 min, 操作三次超声破碎, 于 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min 获取上清中可溶性蛋白, 并对上清中蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 经镍柱纯化。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℃ 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, 确定最佳纯化条件。

2.4 Western blot 鉴定重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的表达 将纯化的重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 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 1.5 h, 1×Tris-盐酸缓冲液 (TBST) 间隔 15 min, 重复洗涤 3 次; 加鼠源 His-tag 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4℃ 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。

结 果

1 质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的双酶切鉴定

使用限制性内切酶 EcoR I 和 Sal I 对重组质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 进行双酶切鉴定, 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得大小分别约为 5 400 bp 和 756 bp 目的片段, 大小与预期相符 (图 1)。

2 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的诱导表达

经不同条件诱导重组蛋白, 凝胶电泳结果显示, 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 在约 35 ku 处出现蛋白表达条带, 与预期相符 (图 2A)。重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 在 IPTG

终浓度为 0.5 mmol/L, 28℃ 诱导 6 h 的条件下上清中目的蛋白的表达量最高 (图 2)。

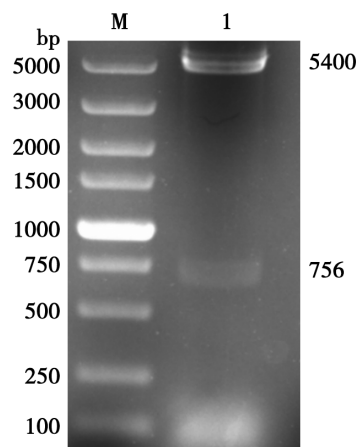
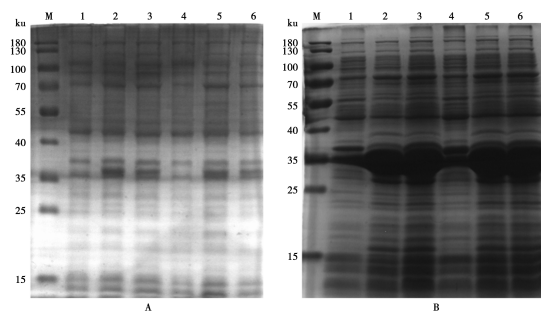


图 1 重组质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 双酶切鉴定

Fig. 1 Double-enzyme digestion of the recombinant plasmid pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 was identified



A 重组菌体裂解上清液 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子量标志物 10.5 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 0 h 20.5 mmol/L IPTG 28℃ 诱导 6 h 30.5 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 6 h 40.8 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 0 h 50.8 mmol/L IPTG 28℃ 诱导 6 h 60.8 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 6 h
B 重组菌体裂解沉淀液 SDS-PAGE 分析 (上样顺序同上清液)

图 2 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的诱导表达的 SDS-PAGE 分析

A SDS-PAGE analysis of recombinant bacteria lysis supernatants M Protein molecular weight marker 10.5 mmol/L IPTG 37℃ induction 0 h 20.5 mmol/L IPTG 28℃ induction 6 h 30.5 mmol/L IPTG 37℃ induction 6 h 40.8 mmol/L IPTG 37℃ induction 0 h 50.8 mmol/L IPTG 28℃ induction 6 h 60.8 mmol/L IPTG 37℃ induction 6 h B SDS-PAGE analysis of recombinant bacterial lysis precipitate (listed in the same order as supernatant)

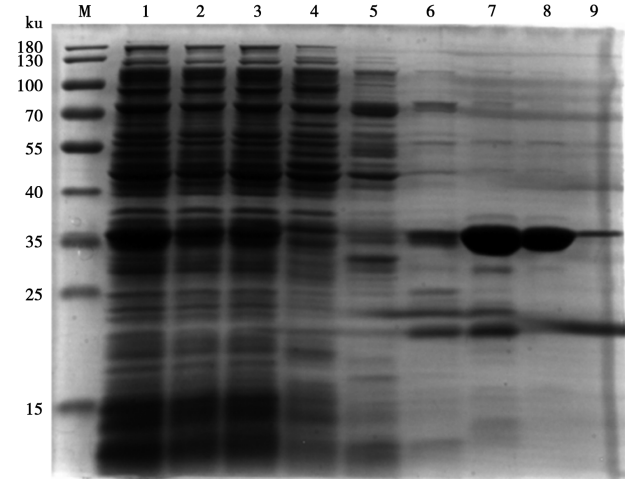
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the induced expression of the recombinant protein EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162

3 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的纯化

重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 纯化结果经 SDS-PAGE 显示, 在 300 mmol/L 咪唑洗脱蛋白效果较佳, 蛋白浓度较高, 因此确定 300 mmol/L 咪唑为蛋白洗脱最佳浓度, 见图 3。

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 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 可被 His-tag 抗体有效识别,反应条带位于 35 ku 左右,表明该重组蛋白可与相应抗体特异性结合,见图 4。

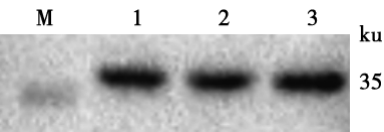


M 蛋白分子质量标准 1 未过柱蛋白 2 第 1 次过柱 3 第 2 次过柱 4 60 mmol/L 咪唑洗脱液 5 100mmol/L 咪唑洗脱液 6 200 mmol/L 咪唑洗脱液 7 300 mmol/L 咪唑洗脱液 8 400 mmol/L 咪唑洗脱液 9 500 mmol/L 咪唑洗脱液

图 3 重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的镍柱层析纯化

M Protein molecular specification 1 UnColumn 2 Pass 1: Column 3 Second pass 4 60 mmol/L imidazole effluent 5 100 mmol/L imidazole effluent 6 200 mmol/L imidazole effluent 7 300 mmol/L imidazole effluent 8 400 mmol/L imidazole effluent 9 500 mmol/L imidazole effluent

Fig. 3 Nickel-column chromatography and purification of the recombinant proteinEgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162



M 蛋白分子质量标准 1~3 重组蛋白 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2(4)与 His-Tag 抗体反应条带

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

M Protein molecular mass standard 1-3 Recombinant protein CTLA-4 IgV-EgG1Y162-2 (4) reaction band with His-Tag antibody

Fig. 4 Western blot analysis of the recombinant protein CTLA-4 IgV-EgG1Y162-2(4)

讨 论

包虫病作为一种严重的人畜共患寄生虫病,棘球蚴病流行区广泛分布在我国西部的牧区,所造成的危害也极为严重^[16-17]。在宿主感染细粒棘球蚴的慢性进程中,机体会产生不同的免疫反应,经过多次感染的患者会有不同程度的抗感染能力^[18]。患者感染细粒棘球蚴绦虫的早期,主要是 Th1 型免疫反应为主,Th1 细胞分泌的 IL-2 和 TNF-α 等细胞因子介导细胞免疫反应,进而激活增殖巨噬细胞、NK 及 CTL,同时协同抗原发挥免疫应答作用,此期早干预早预防加强免疫,可增强机体清除病原体感染能力。多年来,国内外许

多学者在包虫病免疫学和疫苗研制方面开展了大量工作,但结果并不理想^[3]。因此,有必要寻找新的疫苗候选基因,进行免疫学特性及相关功能的研究鉴定,为包虫病的防治奠定重要的基础。

EgG1Y162 是曹春宝等^[19]在细粒棘球蚴中发现的一种新基因并已送登基因库。Zhang 等^[20-21]通过 Western blot 验证了 EgG1Y162 抗原对细粒棘球蚴感染狗的血清具有良好的敏感性和特异性,相关动物实验也表明该抗原作为疫苗具有较好的免疫原性。通常抗原的分子量越大,其免疫原性就越强,所以本研究通过设计 linker 序列连接两个 EgG1Y162 分子,通过以增加重组疫苗分子量的方式来增加抗原表位,使其不易降解,从而引起较强的免疫应答反应。但是 Linker 序列过近或过远都不利于正常 EgG1Y162 分子的正常折叠,因此我们选择出合适的 Linker 序列“GSGGSG”来减少蛋白间的空间位阻,G 和 S 构成的 Linker 序列使各个结构域之间具有一定的摆动性,能够有效减少蛋白之间的相互作用及结构活性。

原核表达系统能够在短时间内大量获得基因表达产物,其方法简单且所需成本相对较低廉,常用于疫苗的产业化生产。在原核表达蛋白的过程中,通常在目的蛋白的 N 端或者 C 端加入标签蛋白,方便后期的蛋白纯化过程。目前常用的标签蛋白一般分为相对分子质量大的蛋白质分子(或者蛋白质结构域及其衍生物)和相对分子质量小的多肽片段[组氨酸标签(histidine tag, His-tag)]等。His 标签蛋白主要用于重组蛋白的亲和层析纯化,是目前广泛使用的重组蛋白纯化标签之一^[22-23]。由于其分子质量非常小,His 标签在融合蛋白结晶后对蛋白结构几乎无影响,免疫原性相对较低,表达的重组蛋白可溶性或包涵体均可用固定金属离子亲和层析(IMAC)进行纯化^[24]。本研究根据酶切位点选用了 pET30a(+)载体。pET30a(+)是目前普遍使用的一种高效原核表达载体^[25],质粒骨架 MCS 区前后有 2 个 His 标签,可以根据阅读框选择在融合蛋白的 N 端或 C 端表达 HIS 标签蛋白,并且具有 Lac/Pt7Lac 启动子,在有诱导物存在下能大量表达蛋白。

重组蛋白的诱导表达会受很多因素的影响,如 IPTG 终浓度、诱导时间以及诱导温度等等,IPTG 对蛋白的表达具有一定的毒性作用,浓度越高则易促进蛋白以包涵体的形式表达。由于 IPTG 可诱导 T7RNA 聚合酶的转录,T7 启动子在 T7RNA 聚合酶的作用下启动转录基因,从而使 T7lac 启动高效基因表达,因此高浓度 IPTG 使目的蛋白聚集成无活性的包涵体^[26]。重组质粒 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 转化后通过 IPTG 诱导表达,结果

发现在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时,在 28 ℃,6 h 诱导条件下,上清中蛋白表达量最高。重组蛋白主要存在超声破碎菌沉淀中,以包涵体蛋白的形式表达。存在于上清中的蛋白质是可溶性蛋白,易溶于水,方便提取,使用起来简单快捷;而沉淀中的蛋白质多以包涵体的形式存在,并且不易裂解及提取。以包涵体为形态特征的蛋白质分子一般不具有正确的天然三维结构以及生物活性,在后续的实验研究中必须通过复杂的操作技术对其进行复性。根据经济方便的原则,在今后研究中若想大量获得上清中蛋白时,可在 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时,28 ℃,6 h 诱导条件表达目的蛋白。在对重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 的纯化过程中,使用 300 mmol/L 咪唑洗脱液对重组蛋白的洗脱效果最佳,得到的纯化蛋白含量较多。通过纯化的蛋白进行 Western blot 鉴定,重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 能被 anti-HIS 抗体识别,表明纯化的重组蛋白具有较好的抗原性。根据重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 所探索出的最佳蛋白诱导条件和纯化条件,大量诱导纯化重组蛋白,用 His-Tag 标签进行 Western blot 鉴定,在约 35 ku 位置处出现明显反应条带。

综上所述,本研究利用原核表达 pET30a-EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162,成功诱导表达了重组蛋白 EgG1Y162-GGGGSGGG-EgG1Y162 并对其进行了纯化与鉴定,为后期实验的正常开展创造了条件。

【参考文献】

- [1] 温浩,杨文光,维通,等. 人体包虫病诊断和治疗的现状与进展[J]. 新疆医学院学报,1996(3):183-184.
- [2] 张先军. 包虫病危害与预防[J]. 畜牧兽医杂志,2012,31(1):114-6.
- [3] 朱国强,闫鸿斌,李立,等. 棘球蚴(包虫)病疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(1):59-65.
- [4] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis; Advances in the 21st Century[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [5] Zhang F, Pang N, Zhu Y, et al. CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5(+) CD4(+) T cells are positively correlated with levels of IL-21 in active and transitional cystic echinococcosis patients[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15:457.
- [6] Khazaei S, Dalimi A, Pirestani M, et al. In silico analysis of a 29 kDa *Echinococcus granulosus* protoscolex protein (p29) as a vaccine candidate against cystic echinococcosis[J]. Arch Razi Inst, 2023, 78(1):323-335.
- [7] Jazouli M, Lightowers MW, Bamouh Z, et al. Immunological responses and potency of the EG95NC (-) recombinant sheep vaccine against cystic echinococcosis[J]. Parasitol Int, 2020, 78: 102149.
- [8] Dang Z, YagI K, Oku Y, et al. Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis[J]. Vaccine, 2009, 27(52):7339-7345.
- [9] AMarir F, Rhalem A, Sadak A, et al. Control of cystic echinococcosis in the Middle Atlas, Morocco; Field evaluation of the EG95 vaccine in sheep and cesticide treatment in dogs[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(3): e0009253.
- [10] 曹春宝, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 抗原基因的克隆及蛋白质序列分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3(12): 903-906.
- [11] 孔慧芳, 张杰, 李玉娇, 等. 细粒棘球蚴重组蛋白 EgG1Y162-2 诱导表达条件的优化及其蛋白结构预测[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(9):1050-1053.
- [12] 刘晓霞, 马海梅, 朱明, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 疫苗免疫小鼠后免疫应答的研究; 第八届全国免疫学学术大会, 中国重庆, F, 2012 [C].
- [13] 刘晓霞, 马海梅, 朱明, 等. 细粒棘球蚴 egG1Y162 疫苗对小鼠免疫应答的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3):226-231.
- [14] Trinh R, Gurbaxani B, Morrison SL, et al. Optimization of codon pair use within the (GGGGS) 3 linker sequence results in enhanced protein expression[J]. Mol Immunol, 2004, 40(10): 717-22.
- [15] Zhou Z, Dang Y, Zhou M, et al. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(41): E6117-E6125.
- [16] Qian MB, Zhou XN. Walk together to combat echinococcosis[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(9):946.
- [17] Ahn CS, Kim JG, Han X, et al. Comparison of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* hydatid fluid proteome provides molecular strategies for specialized host-parasite interactions[J]. Oncotarget, 2017, 8(57):97009-97024.
- [18] Craig PS, Mcmanus DP, Lightowers MW, et al. Prevention and control of cystic echinococcosis[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(6):385-394.
- [19] 曹春宝, 马秀敏, 丁剑冰, 等. 细粒棘球蚴 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.
- [20] Zhang FB, Ma XM, Zhu YJ, et al. Identification, expression and phylogenetic analysis of EgG1Y162 from *Echinococcus granulosus*[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7:5655-5664.
- [21] Zhang FB, Li SY, Zhu YJ, 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.
- [22] Mikel P, Vasickova P, Kralik P. One-plasmid double-expression His-tag system for rapid production and easy purification of MS2 phage-like particles[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):17501.
- [23] Chen Y, Li Y, Liu P, et al. Optimized expression in *Pichia pastoris* eliminates common protein contaminants from subsequent His-tag purification[J]. Biotechnol Lett, 2014, 36(4):711-718.
- [24] Ferenc-Mrozek A, Bojarska E, Stepinski J, et al. Effect of the His-Tag location on decapping scavenger enzymes and their hydrolytic activity toward cap analogs[J]. ACS Omega, 2020, 5(19):10759-10766.
- [25] Wurm DJ, Hausjell J, Ulonska S, et al. Mechanistic platform knowledge of concomitant sugar uptake in *Escherichia coli* BL21 (DE3) strains[J]. Sci Rep, 2017, 7:45072.
- [26] Ribeiro VT, Asevedo EA, De paiva vasconcelos LTC, et al. Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania* i. chagasi expression in *E. coli* M15[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(16):6495-6504.

【收稿日期】 2024-02-08 【修回日期】 2024-04-24