

DOI:10.13350/j.cjpb.241111

• 论著 •

细粒棘球绦虫 DNA 损伤修复蛋白 Rad50 的生物信息学分析^{*}

赵金龙¹, 许少全¹, 周润¹, 夏衣旦木·吐尼亚孜¹, 麦尔哈巴·麦麦提艾力¹, 李婧¹, 杜蕴¹, 吕国栋^{1,2}, 赵军^{1,3,*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室;

3. 新疆医科大学第一附属医院药学部, 新疆药物临床研究重点实验室)

【摘要】 目的 克隆细粒棘球绦虫 DNA 损伤修复蛋白 Rad50 (DNA damage repair protein Rad50 of *Echinococcus granulosus*, EgRad50) 基因全长序列, 并进行生物信息学分析。 **方法** 利用 PCR 技术克隆 EgRad50 基因全长序列, 并通过 NCBI 蛋白数据库获取 EgRad50 的氨基酸序列, 利用 ProtParam, ProtScale, SignalP 5.0, TMHMM 和 ProtComp 9.0 预测 EgRad50 蛋白的理化性质, MotifScan 和 NetPhos 3.1 预测翻译后修饰位点, DNASTar 和 IEDB 预测抗原表位, CDD 预测结构域, SOPMA 预测二级结构, Swiss-Model 和 VMD 构建三级结构, DNAMAN 进行多序列分析, MEGA 构建系统进化树。 **结果** 克隆获得 EgRad50 基因全长序列共 4 073 bp, 生物信息学预测 EgRad50 蛋白具有亲水性, 分子质量为 156.45 ku, 无信号肽裂解位点, 无跨膜区域, 定位于细胞核和细胞质。二级结构以 α 螺旋为主, 约占 77.41%。EgRad50 蛋白包括 ATP 酶相关 (ATPases associated, AAA) 特征结构域, DNA 双链断裂修复 ATP 酶结构域和 ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 结构域。多序列比对发现该蛋白与多房棘球绦虫同源性为 92.70%, 与其他物种同源性较低。系统发育树表明 EgRad50 与智人、小鼠等哺乳动物 Rad50 亲缘关系较远。 **结论** 成功克隆并鉴定 EgRad50 基因, EgRad50 蛋白主要参与 DNA 修复、细胞进程以及端粒维持等生物过程, 是 DNA 损伤修复途径的重要蛋白。

【关键词】 细粒棘球绦虫; DNA 损伤修复蛋白 Rad50; 生物信息学分析

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2024)10-1305-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Oct.; 19(10):1305-1311.]

Preliminary validation and bioinformatics analysis of protein Rad50 in *Echinococcus granulosus*

ZHAO Jinlong¹, XU Shaoquan¹, ZHOU Run¹, Xiayidanmu · Tuniyazi¹, Maierhaba · Maimaitiali¹, LI Jing¹, DU Yun¹, LV Guodong^{1,2}, ZHAO Jun^{1,3} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Xinjiang Medical University Jointly Established the State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Diseases Highly Prevalent in Central Asia; 3. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Department of Pharmacy, Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research) ^{***}

【Abstract】 Objective The bioinformatics analysis was conducted on the cloned full-length sequence of the DNA damage repair protein Rad50 gene from *Echinococcus granulosus*. **Methods** PCR was used to clone the whole EgRad50 gene sequence. Subsequently, the amino acid sequence of EgRad50 was retrieved from the NCBI protein database. The physicochemical properties of EgRad50 were predicted using ProtParam, ProtScale, SignalP5.0, TMHMM, and ProtComp9.0. Additionally, phosphorylation sites were predicted by MotifScan and NetPhos3.1, antigenic epitopes were predicted using DNASTar and IEDB, and the domain was identified through the CDD database. The secondary structure was predicted by SOPMA, while the tertiary structure was constructed using Swiss-Model and Verify3D. Multiple sequence analysis was carried out with DNAMAN and VMD, and a phylogenetic tree was constructed using MEGA.

Results The full-length 4 073 bp of EgRad50 gene was cloned and uploaded to NCBI database (PP789594). Bioinformatics analysis predicts that the EgRad50 protein exhibits hydrophilic properties, with a molecular weight of 156.45 ku. It lacks a signal peptide cleavage site and transmembrane region, indicating its localization within the nucleus and cytoplasm. The protein's secondary structure is primarily composed of α -helices, accounting for approximately 77.41% of the structure. Furthermore, it comprises the ATPases associated characteristic domain, DNA double-strand break repair ATP enzyme Rad50 domain, and ATP-binding cassette-Rad50 domain. Additionally, Multiple sequence

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 82160700); 新疆维吾尔自治区“天山英才”医药卫生高层次人才培养项目 (No. TSYC202301A051)。

** **【通讯作者】** 赵军, E-mail: zhaojun700326@163.com

【作者简介】 赵金龙 (2000-), 男, 四川达州人, 在读研究生。研究方向: 包虫病新药研发。E-mail: 18784811849@163.com

alignment revealed that the homology of this protein with *E. multilocularis* was 92.70%, with lower homology with other species. The phylogenetic tree indicates that EgRad50 is closely related to Rad50 in mammals such as *Homo sapiens* and mice. **Conclusion** The EgRad50 gene was cloned and identified successfully. The results of bioinformatics analysis and prediction show that EgRad50 protein is mainly involved in biological processes such as DNA repair, cellular processes, and telomere maintenance. It is an important protein in the DNA damage repair pathway. This finding lays a solid foundation for further investigations into the mechanisms of DNA damage repair in *Echinococcus granulosus*.

【Keywords】 *Echinococcus granulosus*; DNA damage repair protein Rad50; bioinformatics analysis

囊型棘球蚴病(Cystic echinococcosis, CE)是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)幼虫引起的一种严重的人畜共患寄生虫病,呈全球性分布,中国的新疆、西藏、青海等省区是高流行区^[1-2]。CE每年造成的经济损失估计高达12亿美元,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)已将CE列为到2050年控制或根除的17种被忽视的热带病之一^[2]。目前外科手术是治疗CE的主要手段,但对于中晚期患者可能并不适用,故选择药物治疗^[3]。WHO推荐使用的是阿苯达唑类药物^[4],但该药物溶解性差^[5]、生物利用率低且有副作用^[6],长期服用阿苯达唑,易导致寄生虫产生耐药性^[7]。因此亟须找到新的药物靶点以提高CE的治疗效果。

Rad50是ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)超家族的成员之一^[8],在DNA双链断裂处与MRE11和NBS1形成高度保守的复合体。Rad50蛋白形成MRN复合体在DNA的修整恢复、激活下游检查点、参与重组减数分裂和保持端粒长度等方面起着关键作用^[9-10]。Rad50可以激活共济失调毛细血管扩张症突变(Ataxia telangiectasia mutated, ATM)信号通路,还能在ATM信号通路的下游发挥重要调节功能,从而对细胞周期中S期检查点和DNA损伤修复(DNA damage repair, DDR)起调控作用,达到维持基因组稳定性的作用^[11]。

随着对DDR的深入研究,抑制DDR过程成为治疗癌症和寄生虫疾病的一种策略^[12-16]。Rad50通过激活NF- κ B信号通路诱导卵巢癌的侵袭性,即Rad50可能是一种预后生物标志物和卵巢癌的潜在治疗靶点^[17]。利什曼原虫中Rad50基因的缺失导致染色体易位,严重影响其存活^[14]。然而,关于EgRad50在CE中的研究鲜有报道,且尚不清楚EgRad50能否作为CE的药物靶点。本研究旨在从*E. granulosus*中克隆EgRad50基因,并通过生物信息学技术和分子生物学手段深入探究其生物学功能,为CE新药靶位的筛选提供重要依据。

材料与方法

1 材料

1.1 *E. granulosus* 原头蚴的获取 于新疆乌鲁木齐

市某屠宰场获得感染*E. granulosus*的绵羊肝脏,在无菌条件下取包裹液,待原头蚴自然沉淀后,过滤并弃去多余的囊液,使用含双抗的生理盐水对分离的原头蚴清洗3~5次,−80℃冻存。

1.2 主要试剂 胃蛋白酶(WXBB0725)及无菌无酶水(R1600)购自美国Sigma公司;1st cDNA逆转录试剂盒(6210A),PCR反应试剂盒(RR030A),DNA切胶回收试剂盒(9762),质粒纯化试剂盒(CW0500M),pMD19-T载体(6013),DH5 α 感受态细胞(CD201),加“A”尾试剂盒(6109)以及限制性内切酶EcoRI(1615)和Hind III(1611)均购自日本Takara公司;DL8000 DNA Maker(BM121),氨苄青霉素(A1170)购自北京康为世纪公司;Trizol(15596026),琼脂糖(1110GR100)购自美国Invitrogen公司。

2 方法

2.1 *E. granulosus* 原头蚴总RNA的提取及其逆转录 在低温环境下,利用Trizol法提取*E. granulosus*原头蚴的总RNA,将总RNA逆转录成第一链cDNA,−80℃保存待用。

2.2 EgRad50基因克隆与测序 以美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中获取EgRad50基因序列(Gene ID: XM_024489613.1)为模板,使用SnapGene v6.0.2软件设计特异性引物。上游引物EgRad50-F: 5'-ATGTCTTTGCTGGAGGAGGTATG-3';下游引物EgRad50-R: 5'-TTACGTAAGTCAAGGAAGTGA TCCT-3',引物由上海生物工程股份有限公司合成。配制50 μ L的RT-PCR反应体系: TaKaRa Ex Premier DNA Polymerase Dye plus (2X) 25 μ L,上、下游引物各1 μ L,第一链cDNA 2 μ L, RNase Free dH₂O 21 μ L。根据最适宜反应条件于PCR扩增仪进行扩增,扩增条件为: 94℃预热5 min; 94℃变性30 s, 50℃退火30 s, 68℃延伸4 min,共35个循环。反应完成后取扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收与目的基因预期大小的PCR产物,纯化并加“A”尾后与pMD19-T载体连接,连接产物转入DH5 α 感受态细胞。筛选阳性克隆,获得的重组质粒交由新疆有康生物科技有限公司测序。测序结果通过

SnapGene v6.0.2 与 blast 分析。

2.3 EgRad50 以及同源氨基酸序列 获取从 NCBI 的蛋白数据库中检索以 EgRad50 氨基酸序列为模板 blast 检索同源序列: 细粒棘球绦虫 (GenBank ID: EUB65095.1)、多房棘球绦虫 (GenBank ID: CDS40165.1)、小口膜壳绦虫 (GenBank ID: CDS30244.1)、日本血吸虫 (GenBank ID: KAH8871421.1)、肝片形吸虫 (GenBank ID: THD20542.1)、布氏姜片虫 (GenBank ID: KAA0197239.1)、牛血吸虫 (GenBank ID: RTG84224.1)、华支睾吸虫 (GenBank ID: GAA50423.1)、乳头姬螺 (GenBank ID: CAB3265404.1)、小鼠 (GenBank ID: NP_033038.2)、智人 (GenBank ID: NP_005723.2)、异色纤体鱼 (GenBank ID: KFKQ02873.1)、条纹裸皮蝇 (GenBank ID: KFP90500.1)、对极巨眼蜂 (GenBank ID: KAF1500504.1)、大杜鹃 (GenBank ID: KFO70026.1)、波纹墨蛛 (GenBank ID: XP_005147338.2)、蒙古乌鸦 (GenBank ID: XP_031981266.1)、新荷兰牧蛛 (GenBank ID: XP_025974038.1)、斜齿壶嘴虫 (GenBank ID: XP_026953793.1)、驴 (GenBank ID: XP_014712259.2)、虎 (GenBank ID: XP_007087832.1)、热带爪蟾 (GenBank ID: XP_012815225.1)、大胡鲶 (GenBank ID: KAF5889211.1)、贝氏文昌鱼 (GenBank ID: KAI8486181.1)。

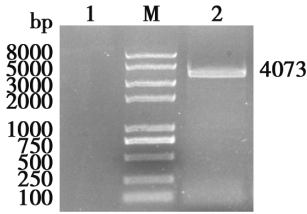
2.4 EgRad50 蛋白生物信息学分析 使用 ExPASy 在线分析网站预测细粒棘球绦虫 EgRad50 蛋白理化性质与蛋白亲疏水性^[18]。随后在 SignalP 5.0 网站^[19]氨基酸序列信号肽在线预测工具分析 EgRad50 信号肽、使用 TMHMM 2.0 网站^[20]对 EgRad50 的蛋白跨膜结构域进行预测、采用 ProtComp 9.0 和 Wolfpsort 在线软件^[21]对 EgRad50 进行亚细胞定位预测、利用 Motif Scan 和 NetPhos 3.1 网站^[22]上对 EgRad50 蛋白的磷酸化位点进行预测。通过 Conserved Domain Database (CDD) 数据库^[23]对 EgRad50 蛋白的结构域进行分析。通过 SOPMA 在线服务网站预测 EgRad50 蛋白二级结构、利用 DNA star 软件中的 Protean 程序对 EgRad50 的抗原指数、柔韧性和表面可及性进行预测分析^[24]。通过 Immune Epitope Database (IEDB) 在线预测软件预测 EgRad50 的 B 细胞抗原表位并运用 vaxijen v2.0 对其抗原性进行在线评估。通过 SWISS-MODEL 在线服务器对 EgRad50 与 HsRad50 序列进行同源建模, 并采用 VMD v1.9.4a53 软件对模型进行可视化^[25]。使用 DNAMAN v9.0.1、Clustal Omega 对 EgRad50 及同源蛋白序列进行比对分析, 通过 Jalview v2.11.3.2 软件对

EgRad50 及同源蛋白序列进行可视化及美化。使用 MEGA v11.0.13 的邻接法, 基于 EgRad50 及不同种属 EgRad50 基因构建系统进化关系^[26]。

结 果

1 EgRad50 基因 PCR 扩增及测序

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, 约 4 073 bp (图 1)。扩增片段切胶回收后进行克隆转化, 提取质粒后送测序验证, 获得序列长为 4 073 bp 的 EgRad50 基因。测序显示 EgRad50 基因开放阅读框长度为 4 073 bp, 测序结果已上传 NCBI 数据库 (登录号: PP789594)。



M DNA 标志物 1 EgRad50 基因 PCR 扩增产物

图 1 EgRad50 基因 PCR 扩增结果

M DNAMarker 1 PCR amplification product of EgRad50 gene

Fig. 1 PCR amplification result of EgRad50 gene

2 EgRad50 的生物信息学分析

2.1 EgRad50 的理化生化特征 EgRad50 化学式为 $C_{6741}H_{11133}N_{1987}O_{2173}S_{52}$, 包含 1 377 个氨基酸, 分子质量为 156.45 ku, 等电点为 5.89, 脂肪族氨基酸指数为 89.14, 不稳定指数是 48.06, 是一种不稳定蛋白。EgRad50 包含多个亲水性区域, 亲水性平均系数为 $-3.244 \sim -2.333$, 亲水性的总平均值 (GRAVY) 为 -0.590 , 属于亲水性蛋白 (图 2)。

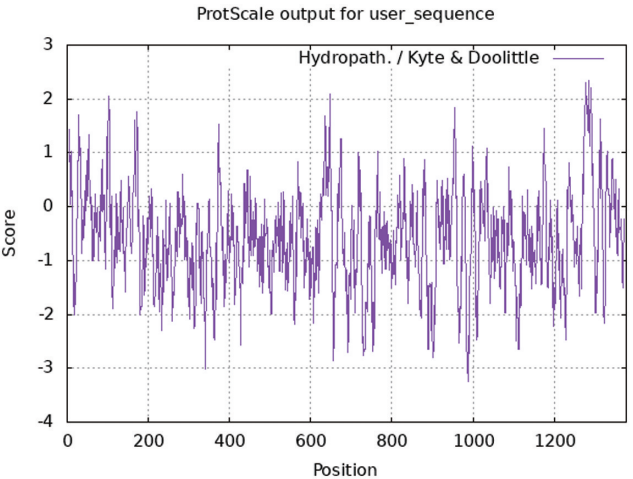


图 2 EgRad50 基因编码蛋白的亲疏水性

Fig. 2 Hydrophilicity of proteins encoded by EgRad50 gene

2.2 EgRad50 的信号肽、跨膜区域和亚细胞定位

EgRad50 的信号肽 (Sec/SPI) 为 0.0017, 无信号肽裂

解位点,也不存在跨膜区域(图3)。通过 WoLF SPoRT 和 ProtCompv. 9.0 预测亚细胞定位结果表明 EgRad50 的亚细胞定位分布部位是细胞核和细胞质。

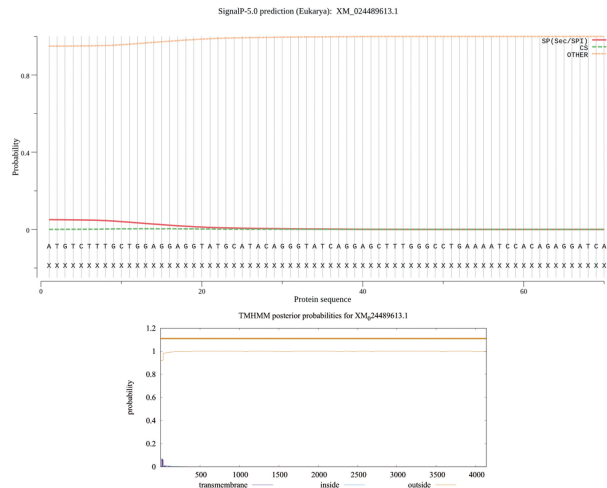
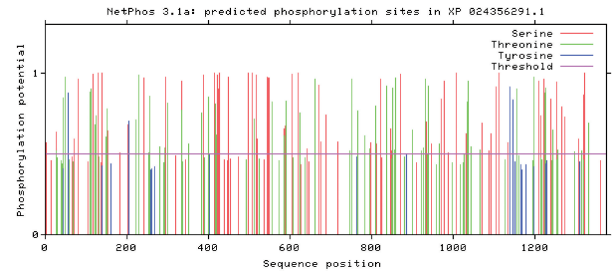


图3 EgRad50 的跨膜结构及信号肽预测

Fig. 3 Transmembrane structure and the signal peptides of EgRad50

2.3 EgRad50 的翻译后修饰位点 通过 MotifScan 和 NetPhos3.1Server 预测翻译后修饰位点 (Post-translational modification, PTM), EgRad50 中有 8 个 N-糖基化位点(位于 36~39, 342~345, 716~719, 809~812, 845~848, 857~860, 1104~1107, 1221~1224 氨基酸区段), 3 个 cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点(位于 127~130, 385~388, 1014~1017 氨基酸区段), 28 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(位于 2~5, 49~52, 242~245, 280~283, 295~298, 300~303, 351~354, 388~391, 414~417, 498~501, 512~515, 517~520, 524~527, 544~547, 621~624, 798~801, 812~815, 837~840, 852~855, 902~905, 927~930, 1008~1011, 1106~1109, 1136~1139, 1211~1214, 1258~1261, 1300~1303, 1333~1336 氨基酸区段), 8 个 N-豆蔻酰化位点(位于 37~42, 65~70, 165~170, 584~589, 936~941, 1091~1096, 1174~1179, 1247~1252 氨基酸区段), 33 个蛋白激酶 c 磷酸化位点(位于 38~40, 44~46, 109~111, 113~115, 118~120, 125~127, 139~141, 202~204, 230~232, 384~386, 400~402, 418~420, 427~429, 498~500, 548~550, 556~558, 605~607, 662~664, 688~690, 753~755, 811~813, 837~839, 859~861, 872~874, 940~942, 972~974, 1008~1010, 1037~1039, 1114~1116, 1198~1200, 1224~1226, 1228~1230, 1323~1325 氨基酸区段), 2 个酪氨酸磷酸化位点(位于 260~268, 1304~1312 氨基酸区段), 1 个亮氨酸拉链(位于 234~255 氨基酸区段)(图4)。



注:红色竖线代表丝氨酸磷酸化位点;绿色竖线代表苏氨酸磷酸化位点;蓝色竖线代表酪氨酸磷酸化位点。

图4 EgRad50 磷酸化位点

Notes: Red vertical lines represent serine phosphorylation sites; green vertical lines represent threonine phosphorylation sites; blue vertical lines represent tyrosine phosphorylation sites.

Fig. 4 EgRad50 phosphorylation site

2.4 EgRad50 结构域 EgRad50 包括 ATP 酶相关 (ATPases associated, AAA) 特征结构域, 位于 2-393 氨基酸序列, 该结构域具有高 ATP 酶活性, 特征在于保守的核苷酸磷酸结合基序; DNA 双链断裂修复 ATP 酶结构域, 位于 444-993 氨基酸序列; ATP 结合盒 (ATP-binding cassette, ABC) 结构域, 位于 1260-1362 氨基酸序列, 结构域具有保守性且发挥 Rad50 结合 ATP 的功能(图5)。

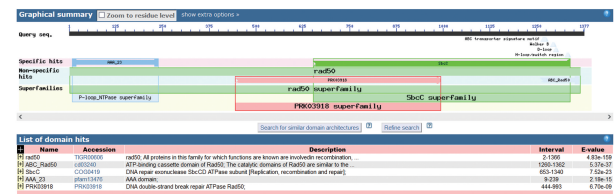


图5 EgRad50 的保守结构域

Fig. 5 Conserved Domain of EgRad50

2.5 EgRad50 二级结构 通过 SOPMA 分析 EgRad50 的二级结构(包括 α 螺旋, β 折叠, β 转角和无规卷曲)。EgRad50 氨基酸序列长度是 1377, 其中 α 螺旋约占 77.41%, β 折叠约占 6.25%, β 转角约占 2.25%, 无规卷曲约占 14.09%(图6)。

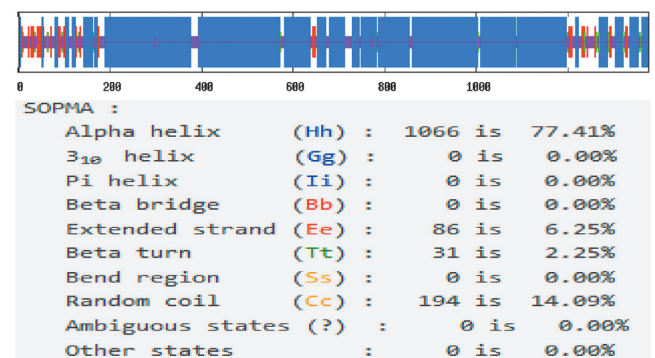
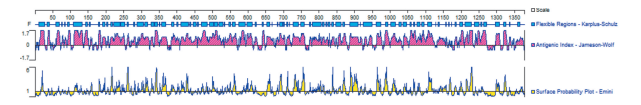


图6 EgRad50 二级结构预测

Fig. 6 Secondary structure of EgRad50

2.6 EgRad50 蛋白的抗原表位 利用 DNASTar 软件对 EgRad50 的柔性区、表面可及区和抗原指数进行预测分析(图 7),结合 IEDB 在预测软件预测其 B 细胞抗原表位有 37 条,并采用 vaxijen v2.0 评估其抗原性,得到 7 条预测表位结果见表 1。

表 1 EgRad50 B 细胞抗原表位 Table 1 EgRad50 B cell epitopes				
序号 No.	起始 位点 Start	结束 位点 End	肽段 Peptide	长度 Length
1	38	45	TGKTICTY	8
2	60	83	GELPPGSKTGASFIHDPKLAHSAE	24
3	379	411	NIHEVTKKLSNTDNMADADVET VRKYLEAALQR	33
4	940	946	TGKLEDL	7
5	959	997	TAENDKQRVTKEGSDKVAIASA EWQEWDRSRQVKEACD	39
6	1300	1306	TNLDREN	7
7	1356	1372	RNLEGLSEVQKVRMEDQ	17



注:Karplus-Schulz 法预测 EgRad50 的柔性区;Jameson-Wolf 指数法预测 EgRad50 的抗原指数;Emini 法预测 EgRad50 的表面可及性区。

图 7 EgRad50 柔韧性、抗原性指数和表面可及性分析

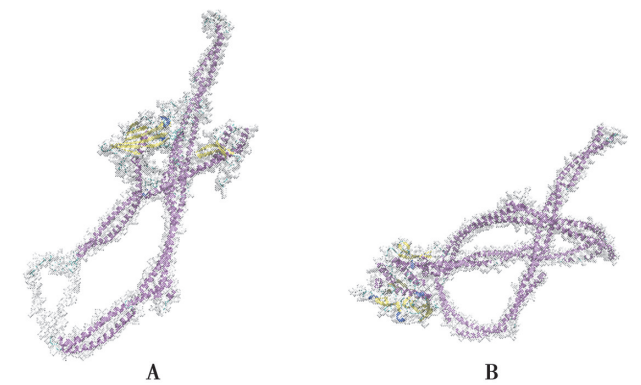
Notes: Karplus-Schulz method is used to predict the flexible region of EgRad50; The Jameson-Wolf method was used to predict the antigenic index of EgRad50; The Emini method was used to predict the surface probability plot of EgRad50.

Fig. 7 Analysis of flexible region, antigenic index and surface probability plot of EgRad50

2.7 EgRad50 的 3D 结构 通过 Swiss-Model 服务器构建的 EgRad50 3D 结构与模板序列同源性为 81.97%, GMQE 得分为 0.63。通过 Swiss-Model 服务器构建的 HsRad50 3D 结构与模板序列同源性为 92.23%, GMQE 得分为 0.83。利用 VMD 可视化软件呈现 EgRad50 和 HsRad50 的 3D 结构中的氨基酸结合位点,结果见图 8。

3 EgRad50 及其同源基因的多重序列比对

通过 DNAMAN 软件的比对分析, EgRad50 与其同源序列 (GenBank ID: CDS40165.1、CDS30244.1、KAH8871421.1、THD20542.1、KAA0197239.1、RTG84224.1、GAA50423.1、CAB3265404.1、NP_033038.2、NP_005723.2) 的相似性依次为 92.70%、58.45%、40.24%、37.49%、37.14%、37.07%、36.84%、31.74%、30.54%、29.78%, 与多房棘球绦虫 (GenBank: CDS40165.1) 相似性为 92.70%, 与智人、小鼠等其他物种的相似性为 29.78%~58.45% (图 9)。



A EgRad50 三级结构预测 B HsRad50 三级结构预测 α -螺旋 (紫色和蓝色) β -折叠 (黄色) β -转角 (青色)

图 8 EgRad50 三级结构预测

A Tertiary structure of EgRad50 B Tertiary structure of HsRad50 α -helix (purple and blue) β -fold (yellow) β -turn (cyan)

Fig. 8 Tertiary structure of EgRad50

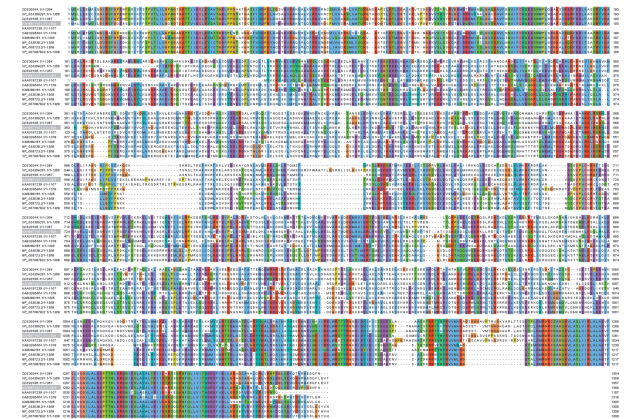


图 9 EgRad50 蛋白的多序列比对

Fig. 9 Multiple sequence alignment of EgRad50 protein

4 EgRad50 的系统进化关系

根据 MEGA11.0.13 软件对比后的结果绘制进化树。结果表明 EgRad50 具有多个分支, EgRad50 与多房棘球绦虫、小口膜壳绦虫、日本血吸虫和布氏姜片虫同属于一个分支, 进化关系较近, 与智人、小鼠进化关系较远 (图 10)。

5 蛋白互作关系

通过 String 在线软件分析 EgRad50 蛋白的互作网络, 结果显示: 该蛋白与细粒棘球绦虫 MRE11、Nibrin、ATM、ATR、Ku80、BRCA1、BRAD 等蛋白存在互作关系 (图 11)。GO 富集分析显示, EgRad50 蛋白主要参与 DNA 修复、细胞进程以及端粒维持等生物过程。

讨 论

由于目前药物治疗 CE 时存在的局限性, 迫切需要筛选新的药物靶点并开发新型药物。生物信息学作为一种高效、快速处理和分析生物数据的技术, 在药物

靶点筛选和生物学功能预测中展现出了巨大的应用潜力^[27-30]。鉴于 MRN 复合体在维持基因组稳定中的核心作用,而 Rad50 作为 MRN 复合体的关键组分,对于理解 DNA 损伤修复机制具有重要意义^[31]。Tsai 等^[32]通过基因组测序获得了 EgRad50 基因的序列信息,但尚未对 EgRad50 进行深入研究。

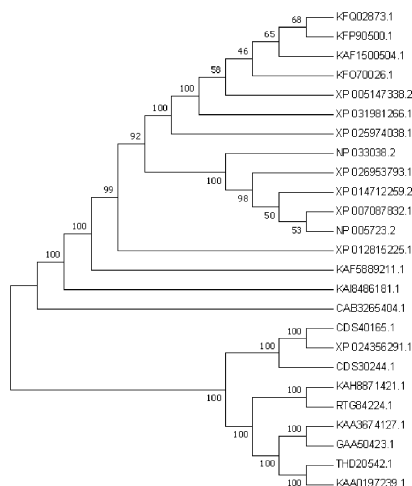
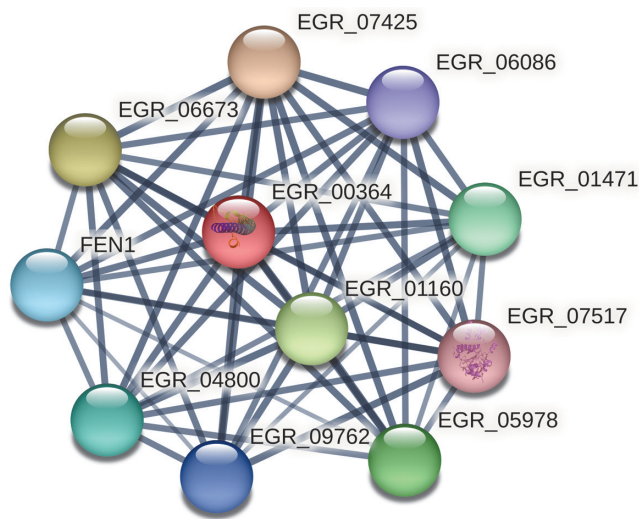


图 10 EgRad50 系统进化树
Fig. 10 Phylogenetic tree of EgRad50



注:PPI网络节点数为11,交互关系数目为54,预期交互关系数为17,局部聚类系数为0.982,PPI交互网络P值为 3.5×10^{-13} 。

图 11 EgRad50 交互蛋白分析

Notes:The number of PPI network nodes is 11,the number of interaction relationships is 54,the expected interaction relations are 17,the local clustering coefficient is 0.982 ,and the PPI interaction network Pvalue is 3.5×10^{-13} .

Fig. 11 Protein-Protein Interaction Analysis of the EgRad50

本研究成功克隆出 EgRad50 基因证明 *E. granulosus* 中存在 EgRad50 基因并分析了其编码蛋白的氨基酸序列。EgRad50 二级结构分析表明,EgRad50 蛋白中 α 螺旋占 77.41%, α 螺旋参与构成蛋白骨架,支撑蛋白的结构与构象,因此在一定程度上保证了 EgRad50 蛋白的稳定性。

DNA 损伤修复途径在寄生虫生存中发挥关键作用^[14-16]。结构域预测结果显示,EgRad50 具有 ABC-Rad50 结构域,该结构域具有保守性且发挥 Rad50 结合 ATP 的功能^[8],其有助于激活 ATM 信号通路,对细胞检验点和 DNA 损伤修复起调控作用^[33]。3D 结构预测显示,EgRad50 与智人 Rad50 在蛋白构象和功能上差异较大,同源基因序列比对分析表明 EgRad50 与智人 Rad50 的相似性仅为 29.78%。系统发育树分析显示,EgRad50 与智人、小鼠等 Rad50 亲缘关系较远,反映不同物种在进化过程中的分化和差异,提示 EgRad50 在结构和功能上的独特性。

蛋白-蛋白相互作用分析显示,EgRad50 与 DNA 损伤修复相关蛋白存在紧密的相互作用关系。EgRad50 可能通过与上述 DNA 损伤修复蛋白的协同作用,识别并修复 DNA 损伤,确保遗传信息的完整。同时参与细胞生长、细胞分裂以及端粒维持等关键进程,维持细胞正常功能^[9-10]。因此 EgRad50 可能作为 *E. granulosus* 体内 DNA 损伤修复途径的关键蛋白之一,参与维持基因组的稳定。

综上所述,本试验成功克隆并鉴定了 EgRad50 基因,生物信息学预测结果表明 EgRad50 蛋白主要参与 DNA 修复、细胞进程以及端粒维持等生物过程,是 DNA 损伤修复途径的重要蛋白,为进一步了解 *E. granulosus* 的 DNA 损伤修复机制提供了重要的研究基础。

【参考文献】

- [1] Larrieu E, Gavidia CM, Lightowlers MW. Control of cystic echinococcosis: background and prospects [J]. Zoonoses Public Health, 2019, 66(8): 889-899.
- [2] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2): e00075-18.
- [3] Rahdar M, Rafiei A, Valipour-Nouroozi R. The combination of cytokines and albendazole therapy for prophylaxis and treatment of experimental/hydatid cyst [J]. Acta tropica, 2020, 201: 105206.
- [4] Amidon G, Lennernas H, Shah V, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability [J]. Pharm Res, 1995, 12(3): 413-420.
- [5] Daniel-Mwambete K, Torrado S, Cuesta-Bandera C, et al. The effect of solubilization on the oral bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs [J]. Int J Pharm, 2004, 272: 29-36.
- [6] Horton J. Albendazole for the treatment of echinococcosis [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2003, 17(2): 205-212.
- [7] 赵雲鹏. 8-取代喹啉-2-羧酰胺类组蛋白去乙酰化酶抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2021.
- [8] Syed A, Tainer J. The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts

- the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair [J]. *Annu Rev Biochem*, 2018, 87: 263-294.
- [9] Rai R, Hu C, Broton C, et al. NBS1 phosphorylation status dictates repair choice of dysfunctional telomeres [J]. *Mol Cell*, 2017, 65(5):801-817.
- [10] Myler LR, Gallardo IF, Soniat MM, et al. Single-molecule imaging reveals how Mre11-Rad50-Nbs1 initiates DNA break repair [J]. *Mol Cell*, 2017, 67(5):891-898.
- [11] De Picciotto N, Cacheux W, Roth A, et al. Ovarian cancer: status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, 101:50-59.
- [12] Brown JS, O'Carrigan B, Jackson SP, et al. Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(1):20-37.
- [13] Zhang C, Li J, Aji T, et al. Identification of functional MKK3/6 and MEK1/2 homologs from *Echinococcus granulosus* and investigation of protoscolicidal activity of mitogen-activated protein kinase signaling pathway inhibitors *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(1):e01043-18.
- [14] Laffitte M, Leprohon P, Hainse M, et al. Chromosomal translocations in the parasite *Leishmania* by a MRE11/RAD50-independent microhomology-mediated end joining mechanism [J]. *PLoS genetics*, 2016, 12(6):e1006117.
- [15] Genois M, Paquet E, Laffitte M, et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2014, 78(1):40-73.
- [16] 李亚芬, 赵军, 吕国栋, 等. Veliparib 联合青蒿琥酯体外抗细粒棘球绦虫作用机制的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(7):733-739.
- [17] Li Y, Wang S, Li P, et al. Rad50 promotes ovarian cancer progression through NF- κ B activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(23):10961-10972.
- [18] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112:531-552.
- [19] Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sonderby CK, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4):420-423.
- [20] Chen Y, Yu P, Luo J, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT [J]. *Mamm Genome*, 2003, 14(12):859-865.
- [21] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5):1351-1362.
- [22] Rai S, Agrawal C, Shrivastava AK, et al. Comparative proteomics unveils cross species variations in *Anabaena* under salt stress [J]. *J Proteomics*, 2014, 98:254-270.
- [23] Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1):D493-d496.
- [24] Geourjon C, Delage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6):681-684.
- [25] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(W1):W296-W303.
- [26] Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, et al. Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9):1189-1191.
- [27] 颜明智, 李锦田, 刘辉, 等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK α 生物信息学分析 [J]. *新疆医科大学学报*, 2021, 44(3):266-273.
- [28] 颜明智, 库班尼沙·阿马洪, 周婧, 等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK β 基因克隆及生物信息学分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(1):65-70.
- [29] 周润, 周婧, 许少全, 等. 细粒棘球绦虫糖转运体早期响应脱水蛋白的生物信息学及系统发育分析 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2023, 18(11):1296-1302, 1310.
- [30] Wang F, Ye B. Bioinformatics analysis and construction of phylogenetic tree of aquaporins from *Echinococcus granulosus* [J]. *Parasitol Res*, 2016, 115(9):3499-3511.
- [31] Qiu S, Huang J. MRN complex is an essential effector of DNA damage repair [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(1):31-37.
- [32] Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism [J]. *Nature*, 2013, 496(7443):57-63.
- [33] Deshpande RA, Lee JH, Paull TT. Rad50 ATPase activity is regulated by DNA ends and requires coordination of both active sites [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(9):5255-5268.

【收稿日期】 2024-05-28 【修回日期】 2024-08-16

(上接 1304 页)

- [14] Han Y, An Y, Chen Q, et al. mRNA vaccines expressing homo-prototype/Omicron and hetero-chimeric RBD-dimers against SARS-CoV-2 [J]. *Cell Res*, 2022, 32(11):1022-1025.
- [15] 尤红, 王福生, 李太生, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2022 年版) [J]. *实用肝脏病杂志*, 2023, 26(3):457-478.
- [16] Nishida Y, Imamura M, Teraoka Y, et al. Serum PreS1 and HBsAg ratio reflects liver fibrosis and Predicts the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B Patients [J]. *J Viral Hepat*, 2021, 28(9):1304-1311.
- [17] Das S, Ramakrishnan K, Behera SK, et al. Hepatitis B vaccine and immunoglobulin: Key concepts [J]. *J Clin Transl Hepato*, 2019, 7(X):1-7.
- [18] Yan H, Wang C. Key Factors for "Fishing" NTCP as a functional receptor for HBV and HDV [J]. *Viruses*, 2023, 15(2):512
- [19] 解庭波. 大肠埃希菌表达系统的研究进展 [J]. *长江大学学报(自科版)医学卷*, 2008(3):77-82
- [20] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展 [J]. *生物技术*, 2012, 22(2):76-80.

【收稿日期】 2024-05-07 【修回日期】 2024-07-28