

DOI:10.13350/j.cjpb.231207

• 论著 •

# 刚地弓形虫 ME49 虫株 ROP16 蛋白的生物信息学分析<sup>\*</sup>

党甜甜<sup>1</sup>,殷荷<sup>1</sup>,李佳铭<sup>1</sup>,田婷婷<sup>2</sup>,周月<sup>2</sup>,赵志军<sup>1,3\*\*</sup>

(1. 宁夏医科大学总医院医学实验中心,宁夏银川 750004;2. 宁夏医科大学检验学院;3. 宁夏临床病原微生物重点实验室)

**【摘要】 目的** 应用生物信息学方法分析弓形虫 ME49 虫株 ROP16 蛋白(ME49-ROP16)的理化性质、结构特点等,并预测其潜在的 B、T 细胞抗原表位及其互作蛋白,为弓形虫疫苗的研究提供理论基础。 **方法** 登录 NCBI 数据库下载 ME49 虫株 ROP16 蛋白的氨基酸序列,利用在线软件 ProtParam 预测 ROP16 蛋白的理化性质;使用 ProScale 预测 ROP16 蛋白的亲水性、柔韧性、表面可及性及  $\beta$ -折叠;采用 SignalP-4.1 预测 ROP16 蛋白的信号肽;运用 TMHMM-2.0 预测 ROP16 蛋白的跨膜结构;利用 SOMPA 和 Phyre2 预测 ROP16 蛋白的二、三级结构;通过 Netphos3.1、NetNGlyc1.0、YinOYang-1.2 预测 ROP16 蛋白的磷酸化位点、N-糖基化位点和 O-糖基化位点;运用 Predicting Antigenic Peptides 预测 ROP16 蛋白的抗原决定簇;使用 IEDB 预测 ROP16 蛋白的优势 B 细胞表位;运用 SYFPEITHI 预测 ROP16 蛋白的 T 细胞优势表位;采用 STRING 预测软件分析与其相互作用的蛋白。**结果** ME49-ROP16 蛋白由 707 个氨基酸组成,分子式为  $C_{3338} H_{5350} N_{966} O_{1033} S_{21}$ ,相对分子质量  $76.21631 \times 10^3$ ,其理论等电点是 8.97,不稳定系数为 59.30,为不稳定蛋白;脂溶性指数为 79.25,总的平均亲水性为 -0.320,为亲水性蛋白;其二级结构中  $\alpha$ -螺旋占 35.64%,延伸链占 10.75%, $\beta$ -转角占 5.94%,无规卷曲占 47.67%;该蛋白含有 83 个氨基酸磷酸化位点,14 个 N-糖基化位点,无 O-糖基化位点。ME49-ROP16 蛋白具有信号肽序列,无跨膜结构;其平均抗原倾向指数为 1.0340,共有 25 个抗原决定簇区域,有 7 条 B 细胞优势表位,14 条 CTL 细胞优势表位,14 条 Th 细胞优势表位,与 ACC1、ACC2、PKG、ROP18 为互作蛋白。

**结论** 生物信息学分析 ME49-ROP16 蛋白为不稳定亲水性蛋白,含有多个 B、T 细胞优势表位,并与 ACC1、ACC2、PKG、ROP18 为互作蛋白,为以该蛋白为靶点的弓形虫疫苗研制奠定了基础。

**【关键词】** 刚地弓形虫; ROP16 蛋白; 生物信息学; 免疫原性

**【中图分类号】** R382.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)12-1401-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Dec;18(12):1401-1406.]

## Bioinformatics analysis of the ROP16 protein of *Toxoplasma gondii* strain ME49

DANG Tiantian<sup>1</sup>, YIN He<sup>1</sup>, LI Jiaming<sup>1</sup>, TIAN Tingting<sup>2</sup>, ZHOU Yue<sup>2</sup>, ZHAO Zhijun<sup>1,3</sup> (1. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Medical University College of Laboratory Science; 3. Ningxia Key Laboratory of Pathogenic Microbiology)<sup>\*\*\*</sup>

**【Abstract】 Objective** Bioinformatics methods were applied to analyse the physicochemical properties and structural features of the ROP16 protein of *Toxoplasma gondii* strain ME49 (ME49-ROP16) and to predict its potential B and T cell antigenic epitopes and its intercalating proteins, so as to provide a theoretical basis for the research of *Toxoplasma gondii* vaccine. **Methods** Log in NCBI data base to search and download the amino acid sequence of ME49-ROP16. Hydrophilicity, flexibility, surface accessibility and  $\beta$ -folding of the ROP16 protein were predicted by using ProScale; SignalP-4.1 was used to predict the signal peptide of ROP16 protein; TMHMM-2.0 was used to predict the transmembrane structure of ROP16 protein; SOMPA and Phyre2 were used to predict the secondary and tertiary structure of ROP16 protein; The phosphorylation site, N-glycosylation site and O-glycosylation site of ROP16 protein were predicted by Netphos3.1, NetNGlyc1.0 and YinOYang-1.2; The antigenic determinant clusters of ROP16 protein were predicted using Predicting Antigenic Peptides; the dominant B-cell epitopes of ROP16 protein were predicted using IEDB; the dominant T-cell epitopes of ROP16 protein were predicted using SYFPEITHI; and proteins interacting with it were analysed using STRING prediction software. **Results** ME49-ROP16 protein consists of 707 amino acids with the molecular formula  $C_{3338} H_{5350} N_{966} O_{1033} S_{21}$  and a relative molecular mass of  $76.21631 \times 10^3$ , its theoretical isoelectric point is 8.97 and its instability coefficient is 59.30, making it an unstable protein. Its lipid solubility index is 79.25, with a total average hydrophilicity of -0.320, indicating that it is a hydrophilic protein. In the secondary structure,  $\alpha$ -helix accounted for

\* 【基金项目】 宁夏自然科学基金项目(No. 2022AAC03547);宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BEG02002);宁夏医科大学总医院“新人职硕士培养”项目。

\*\* 【通讯作者】 赵志军, E-mail: z15815z@163.com

【作者简介】 党甜甜(1993-),女,硕士研究生,初级技师。研究方向:临床病原微生物与免疫学。E-mail: D080519D@163.com

35.64%，extendedchainaccountedfor 10.75%， $\beta$ -turnsaccountedfor 5.94%，randomcurlingaccountedfor 47.67%。The protein contains 83 amino acid phosphorylation sites, 14 N-glycosylation sites and no O-glycosylation sites. Its average antigenic propensity index was 1.0340, with a total of 25 antigenic determinant cluster regions, 7 B-cell-dominant epitopes, 14 CTL-cell-dominant epitopes, 14 Th-cell-dominant epitopes, and reciprocal proteins with ACC1, ACC2, PKG, and ROP18. **Conclusion** Bioinformatics analysis showed that ME49-ROP16 protein is an unstable hydrophilic protein, which contains multiple B and T cell dominant epitopes and interacts with ACC1, ACC2, PKG and ROP18, which lays the foundation for the development of *T. gondii* vaccine targeting this protein.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; ROP16 protein; bioinformatics; immunogenicity

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)简称弓形虫，属于专性细胞内寄生原虫，通常会引起人兽共患弓形虫病，能够感染几乎包括人在内的所有温血动物，据WHO统计，感染弓形虫的人数约为全球的三分之一，被认为是最成功的的弓形虫之一<sup>[1-2]</sup>。人类感染弓形虫后，会对大脑、心脏和骨骼肌造成长期不良影响，免疫功能不全的人受到感染时会引起像HIV、癌症、弓形虫脑炎和疟疾等多种疾病，还会经过胎盘垂直传播导致孕妇流产<sup>[3]</sup>。

弓形虫的生活史较为复杂，唯一终宿主是猫科类动物，目前在临幊上对该病大多采用药物治疗，还无法实现使用疫苗预防和治疗弓形虫病，而药物治疗也具有一定的毒副作用，所以研发具有保护性表位的抗原显得尤为重要<sup>[4-5]</sup>。棒状体蛋白(rhoptry proteins, ROP)家族包括多种对于研究宿主与细胞相互作用关系的蛋白，其中ROP16是很关键的作用因子，在宿主被弓形虫感染后，其会迅速侵入宿主细胞核<sup>[6-7]</sup>。根据弓形虫在小鼠中的急性毒力表型可将其分为I、II、III型三个谱系，其中与人类弓形虫病的发生密切相关，且多呈现隐匿性感染<sup>[8-10]</sup>是II型弓形虫虫株(如ME49)，呈现出中等毒性。本研究采用生物信息学方法对II型ME49虫株ROP16基因编码的蛋白进行分析，预测其结构和功能，可能的B、T细胞抗原表位及其互作蛋白，为治疗弓形虫的药物靶点及疫苗候选分子研究奠定理论基础。

## 材料与方法

### 1 ME49虫株ROP16蛋白的氨基酸序列检索

利用NCBI检索ME49虫株ROP16蛋白(ME49-ROP16)的氨基酸序列。登录号:XP\_002365373.1。

### 2 ME49虫株ROP16蛋白的生物信息学分析

通过ProtParam(<https://www.expasy.org/resources/protparam>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的氨基酸组成、分子质量、理论等电点、原子组成、不稳定系数、脂肪系数及总平均亲水性。通过ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的亲/疏水性、柔韧性、表面可及性及 $\beta$ -折叠。通过SignalP-4.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)

在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的信号肽。通过TMHMM-2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的跨膜结构。通过SOPMA([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的二级结构。通过Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的三级结构。通过NetPhos-3.1(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的磷酸化位点。通过NetNGlyc-1.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的N糖基化位点。通过YinOYang-1.2(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2/>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的O糖基化位点。通过Predicting Antigenic Peptides(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)在线预测软件分析ME49-ROP16蛋白的抗原决定簇。通过IEDB数据库(<http://tools.iadb.org/bcell/result/>)对ME49-ROP16蛋白的优势B细胞表位进行预测。通过SYFPEITHI在线数据(<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>)预测ME49-ROP16蛋白的T细胞优势表位。通过STRING(<https://cn.string-db.org/>)在线预测软件分析与ME49-ROP16蛋白相互作用的蛋白。

## 结 果

### 1 ME49-ROP16蛋白的氨基酸序列

ME49-ROP16蛋白GenBank登录号为NC\_031475.1，全长为707个氨基酸。将ME49-ROP16蛋白的登录号(NC\_031475.1)输入NCBI，获得蛋白氨基酸序列组成，结果如图1。

## rhoptry protein ROP16 [Toxoplasma gondii ME49]

NCBI Reference Sequence: XP\_002365373.1

GenPept Identical Proteins Graphics

>XP\_002365373.1 rhoptry protein ROP16 [Toxoplasma gondii ME49]  
MKVTTKGLAFALALLFCTRCATARYMSFEEAQKASEAKRQIATLPLSPDSTLSNPGSKHRNRGGSPAAGQ  
PSQSTLQPEQAAEVGLGAGGSTQQGQRTGGSAGAREERRSPSPQSAVATSSASLRGYQTQLSPSHLPP  
RSSGPQGWFTPESITFWSSPPQPLTQRKPSLSGVVTTFQEPQEYQGAASSLASSPKRYVSGASSALS  
GKAVPTPQSQENPPLPVQSVATLDGSIQGQSPQERRGSPQRQIAMSTENPADSGASQASVSSYVAVQT  
PHVKRSERIRVRVLEEGLVEVQQLKAQAAQQLLVAVPDEYAMRAVLQEAFLSEQRVATRKRKQPGAV  
ESADVEFPNPVERVMINANGVIALYNRGHLSGHGAVIKASLDDCTYAAKVPYSQIVPNADATSAE  
LEAEISSARAELVKTIRQELDVRDKLVALAKLHELGFAHGDKVLNNNMIDVHGFHMLDMGS  
EVMLLPLIDGSPNSNLVQSOPPFQFQRAVAREAIIALAKLHELGFAHGDKVLNNNMIDVHGFHMLDMGS  
VRPVDSVSEEDKYYLRLWAPELAKSQHTSQQTCLRKRGALDWALGLAIFEFVCNRLPYLSNLPSLLW  
SRVEHLRLRLSDFSAKDCNESDPAVMGIVAQFLNPNEERPELPKFVSSYTFRRQAPGVTSHLTRIPPT  
ELSSHMR

图 1 ME49-ROP16 蛋白的氨基酸序列

Fig. 1 Amino acid sequence of ME49-ROP16 protein

## 2 ME49-ROP16 蛋白的理化性质

ME49-ROP16 蛋白由 707 个氨基酸, 10 708 个原子组成, 分子式为  $C_{3338} H_{5350} N_{966} O_{1033} S_{21}$ , 相对分子质量为  $76.216 \times 10^3$ ; 理论等电点为 8.97, 为碱性蛋白。其中含有 66 个强酸性(-)氨基酸(Asp+Glu), 74 个强碱性(+)氨基酸(Arg+Lys)。当 ROP16 蛋白 N-末端是 M(Met)时, 在哺乳动物网织红细胞中的半衰期为 30 h, 在酵母菌内的半衰期大于 20 h, 在大肠埃希菌内的半衰期大于 10 h。ROP16 蛋白的不稳定系数为 59.30, 属不稳定蛋白; 脂溶性指数为 79.25, 总平均亲水性为 -0.320, 为亲水性蛋白。

## 3 ME49-ROP16 蛋白的空间结构

**3.1 二级结构** 利用在线软件 SOPMA 预测 ME49-ROP16 蛋白的二级结构, 结果如图 2。其中 252 个氨基酸残基构成了  $\alpha$ -螺旋(Alpha helix), 占比为 35.64%; 76 个氨基酸残基构成了延伸链(Extended strand), 占比 10.75%; 42 个氨基酸残基构成了  $\beta$ -转角(Beta turn), 占比 5.94%; 337 个氨基酸残基构成了无规卷曲(Random coil), 占比 47.67%。

**3.2 亲水性、柔韧性、表面可及性、 $\beta$ -折叠** 利用在线软件 ProScale 预测 ME49-ROP16 蛋白的亲水性、柔韧性、表面可及性和  $\beta$ -折叠, 结果如图 3。横坐标代表蛋白的氨基酸位置, 纵坐标代表相应预测的分数。

**3.3 三级结构** 利用在线软件 Phyre2 预测 ME49-ROP16 蛋白的三级结构, 结果如图 4。基于模板 c7li4A 建模, 266 个氨基酸残基(序列的 38%)通过单个最高评分模板以 100% 置信度建模。

## 4 ME49-ROP16 蛋白的乙酰化位点、磷酸化位点及糖基化位点预测

利用在线软件 NetPhos-3.1 预测 ME49-ROP16 蛋白共有 83 个磷酸化位点, 其中 60 个丝氨酸磷酸化位点, 17 个苏氨酸磷酸化位点, 6 个酪氨酸磷酸化位点(图 5A); 利用在线软件 NetNGlyc - 1.0 预测 ROP16 共有 14 个 N-糖基化位点(图 5B); 在线软件

YinOYang-1.2 预测 ROP16 无 O-糖基化位点(图 5C)。



图 2 ME49-ROP16 蛋白的二级结构预测  
Fig. 2 Secondary structure prediction of ME49-ROP16 protein

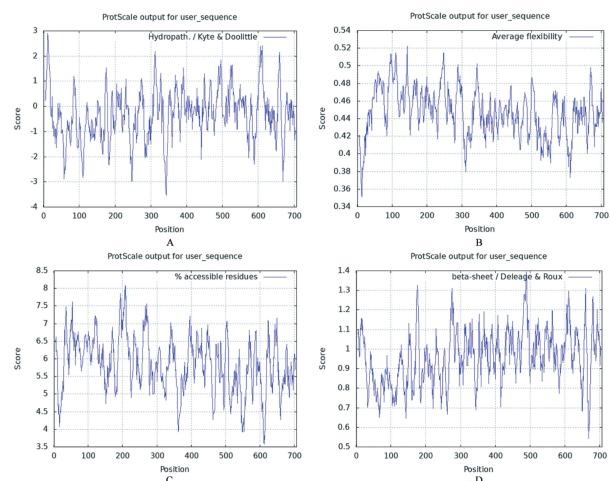


图 3 ME49-ROP16 蛋白的亲水性(A)、柔韧性(B)、  
表面可及性(C)及  $\beta$ -折叠(D)预测  
Fig. 3 Prediction of hydrophilicity (A), flexibility (B), surface accessibility (C) and  $\beta$ -folding (D) of ME49-ROP16 protein

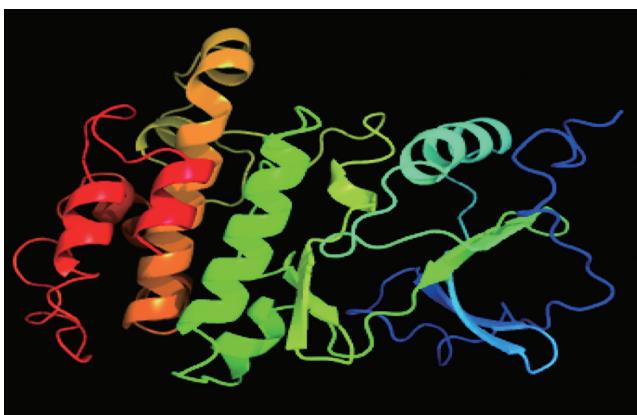


图 4 ME49-ROP16 蛋白的三级结构预测

Fig. 4 Predicted tertiary structure of ME49-ROP16 protein

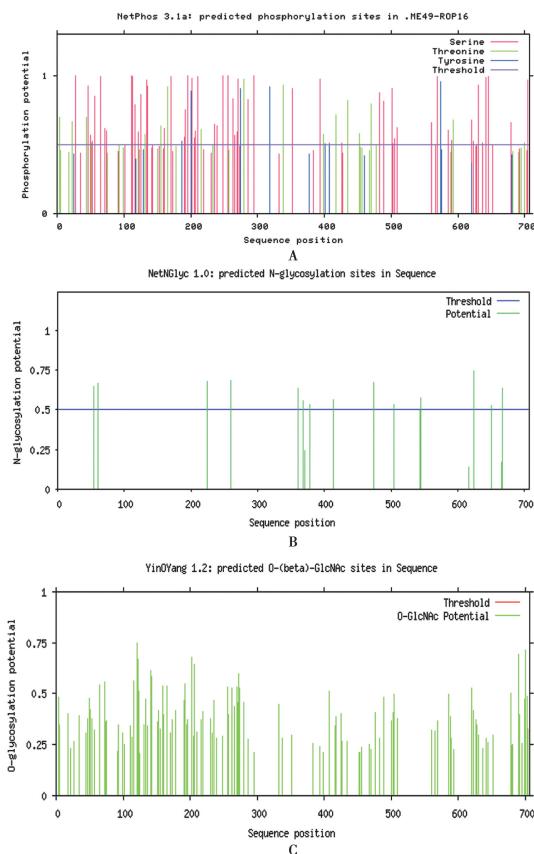
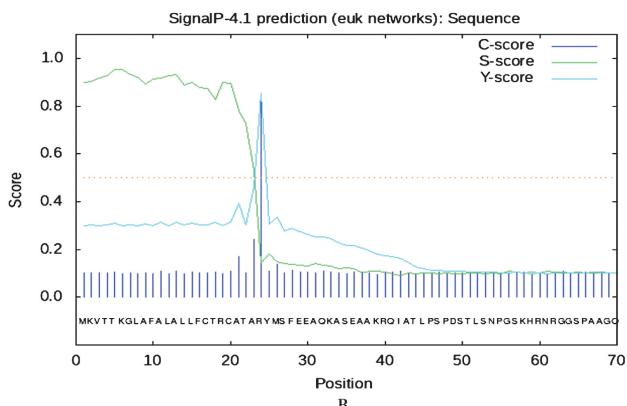
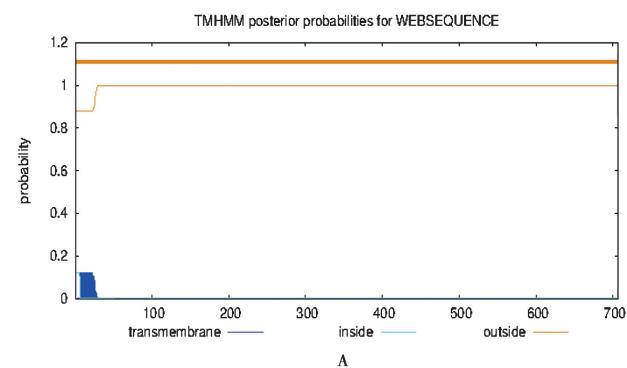


图 5 ME49-ROP16 磷酸化位点(A)、N-糖基化位点(B)及 O-糖基化位点(C)预测

Fig. 5 Prediction of ME49-ROP16 phosphorylation site (A), N-glycosylation site (B) and O-glycosylation site (C)

## 5 ME49-ROP16 蛋白跨膜结构及信号肽预测

在线软件 TMHMM-2.0 分析 ME49-ROP16 蛋白无跨膜结构(图 6A);在线软件 SignalP-4.1 分析 ROP16 的信号肽序列结果如图 6B, D = 0.865, Dcutoff=0.450,该蛋白具有信号肽序列,位于第 23 和 24 位氨基酸之间,为分泌型蛋白。



注:B图 X 轴为 ROP16 蛋白序列前 70 个氨基酸残基, Y 轴为计分(score)。C 值表示剪切位点的计分,用紫色标示;S 值为信号肽计分,用绿色显示;Y 值是基于 S 值和 C 值的综合计分值,用蓝色表示。

图 6 ME49-ROP16 蛋白跨膜结构(A)及信号肽(B)预测

Notes: The X-axis of the B-plot is the first 70 amino acid residues of the ROP16 protein sequence, the Y-axis is the score (score). The C-value indicates the score of the shear site and is marked in purple; the S-value is the score of the signal peptide and is shown in green; the Y-value is the combined score value based on the S-value and C-value and is shown in blue.

Fig. 6 Prediction of ME49-ROP16 protein transmembrane structure (A) and signal peptide (B)

## 6 ME49-ROP16 蛋白的抗原决定簇分析

利用在线软件 Predicting Antigenic Peptides 预测 ME49-ROP16 蛋白抗原决定簇,结果如图 7。ME49-ROP16 蛋白的平均抗原倾向指数为 1.0340,共含有 25 个抗原决定簇,表明 ME49-ROP16 含有较多的优势抗原表位结构,抗原倾向指数高。

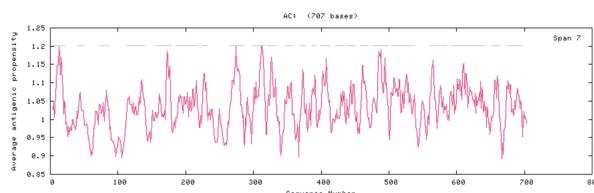


图 7 ME49-ROP16 蛋白抗原决定簇预测

Fig. 7 Antigenic determinant cluster prediction of ME49-ROP16 protein

## 7 ME49-ROP16 蛋白的抗原表位

利用在线软件 IEDB 预测 ME49-ROP16 蛋白含有 13 条 B 细胞表位(图 8),去除长度过长和过短的表

位,共选出7条B细胞优势表位(表1)。

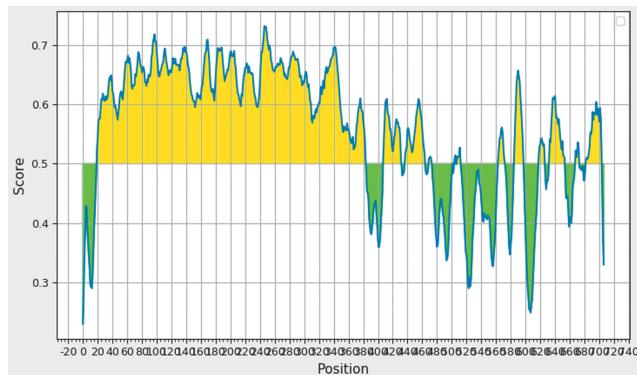


图8 ME49-ROP16蛋白B细胞优势表位预测  
Fig. 8 Prediction of B cell dominant epitopes

表1 ME49-ROP16蛋白B细胞表位预测  
Table 1 B-cell epitope prediction

| 序号<br>Order | 位置<br>Location | 序列<br>Sequence            | 长度(bp)<br>Length |
|-------------|----------------|---------------------------|------------------|
| 1           | 408-432        | SQIVPNADATSAELEAEISSARAEL | 25               |
| 2           | 438-464        | QELDVRDKLVAKGLTLTAEQYGLPL | 27               |
| 3           | 564-573        | VDSCVSEEDK                | 10               |
| 4           | 586-598        | SQHTSQQTCLKRG             | 13               |
| 5           | 619-627        | PYSLSNLPS                 | 9                |
| 6           | 633-654        | VEHLSRLRLSDFSAKDCNESDP    | 22               |
| 7           | 683-704        | FFRQAPGVTSHLTRIPTTELSS    | 22               |

利用在线软件SYFPEITHI,选择等位基因HLA-A\*0201预测ME49-ROP16蛋白的CTL细胞抗原表位,选用长度为9个氨基酸进行分析(设定阈值为23);选择等位基因HLA-DRB1\*0401预测ME49-ROP16蛋白的Th细胞抗原表位,选用长度为15个氨基酸(设定阈值为26)。采用VaxiJen2.0评估其抗原性,根据分数确定出7个CTL细胞优势表位(表2),7个Th细胞优势表位(表3)。

表2 ME49-ROP16蛋白的CTL细胞表位预测  
Table 2 Prediction of ROP16 protein CTL cell epitopes

| 序号<br>Order | 起始点<br>Initial point | 序列<br>Sequence | 分数<br>Score |
|-------------|----------------------|----------------|-------------|
| 1           | 308                  | AAAQLLVAV      | 26          |
| 2           | 470                  | TL PENKATV     | 26          |
| 3           | 125                  | SLRGYQTQL      | 25          |
| 4           | 445                  | KLVAKGLTL      | 25          |
| 5           | 575                  | YLRLWAPEL      | 25          |
| 6           | 599                  | ALDVWALGL      | 24          |
| 7           | 461                  | GLPLCQMTL      | 23          |

## 8 ME49-ROP16蛋白的互作蛋白

利用在线软件STRING预测与ME49-ROP16蛋白互作蛋白有ACC1、ACC1、PKG及ROP18蛋白(图9)。

表3 ME49-ROP16蛋白的Th细胞表位预测  
Table 3 Prediction of ROP16 protein Th cell epitopes

| 序号<br>Order | 起始点<br>Initial point | 序列<br>Sequence   | 分数<br>Score |
|-------------|----------------------|------------------|-------------|
| 1           | 184                  | QEQQYGAASSLASSPK | 28          |
| 2           | 173                  | SGVVVTEFQEPQEQQY | 26          |
| 3           | 198                  | KRYVSGASSSALSGK  | 26          |
| 4           | 319                  | YEAMRAVLQEAVALSE | 26          |
| 5           | 327                  | QEAVALSEQRVATRKR | 26          |
| 6           | 654                  | PAVMGIVAQFLNPNP  | 26          |
| 7           | 691                  | TSHLTRIPTTELSSH  | 26          |

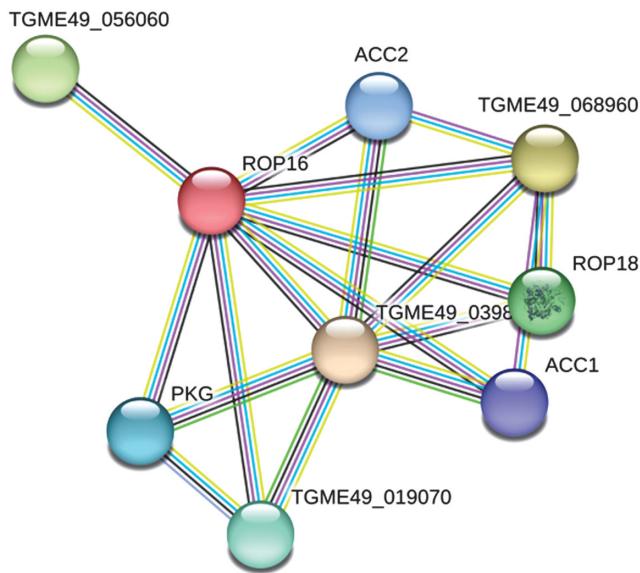


图9 ME49-ROP16蛋白的互作蛋白预测  
Fig. 9 Interacting protein prediction of ROP16 protein

## 讨 论

弓形虫依靠分泌的蛋白,如微线体蛋白、棒状体蛋白等进入宿主细胞发挥一系列重要作用,ROP16是弓形虫入侵的具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的重要蛋白,能通过调控宿主细胞的一些信号转导通路磷酸化特定蛋白,从而影响各生物进程<sup>[11-13]</sup>。且 ROP16 在弓形虫的各致病阶段均有表达,当弓形虫入侵宿主细胞后,10min内会被分泌至宿主细胞核,对宿主细胞的增殖、凋亡、炎性等生物过程产生一定影响<sup>[14]</sup>。不同类型虫株弓形虫基因序列不同,I型(GT1虫株)和Ⅲ型(VEG虫株)基因序列相似度99%以上,Ⅱ型(ME49虫株)与I/Ⅲ型序列相似度均为97%,I型和Ⅲ型氨基酸仅在115、515和661氨基酸位点存在差别,而Ⅱ型与I型和Ⅲ型的氨基酸差异位点大于30个。氨基酸位点的差异可使翻译的蛋白所表现出的功能有所不同。研究证明,I型和Ⅲ型虫株激活STAT3,导致M2巨噬细胞激活和炎症抑制,Ⅱ型虫株激活核转录因子-κB(NF-κB),从而导致M1巨噬细胞和炎症反应激活,且I型和Ⅲ型虫株的ROP16蛋白可磷酸化STAT3/6,引起巨噬细胞极化,并激活JAK-STAT信号通路,而

Ⅱ型虫株的ROP16蛋白对STAT3/6无上述作用,不能磷酸化STAT3和STAT6<sup>[15-16]</sup>。氨基酸位点的差异对蛋白功能的影响有所不同,因此分析ME49虫株ROP16蛋白的生物学信息对了解其结构与功能有重要意义。

生物信息学是一门交叉学科,能够利用多种学科的方法和技术分析蛋白的生物学数据,对疫苗的设计、病原体检测等的研究具有重要意义<sup>[17-20]</sup>。本研究通过生物信息学方法对ME49-ROP16蛋白的理化性质、二级结构、三级结构、跨膜结构、信号肽、细胞表位、互作蛋白等进行了预测分析,结果表明该蛋白为亲水性分泌型蛋白,其二级结构中 $\alpha$ -螺旋占35.64%,延伸链占10.75%, $\beta$ -转角占5.94%,无规卷曲占47.67%。预测该蛋白共有83个氨基酸磷酸化位点,其中60个丝氨酸磷酸化位点,17个苏氨酸磷酸化位点,6个酪氨酸磷酸化位点。蛋白质的翻译后修饰及功能作用与磷酸化位点有着密不可分的关系。ME49-ROP16共有14个N-糖基化位点,无O-糖基化位点。通过SignalP-4.1预测ME49-ROP16蛋白的信号肽,TMHMM-2.0预测ROP16蛋白的跨膜结构,结果显示该蛋白是一个具有信号肽序列的非跨膜结构蛋白。利用在线软件Predicting Antigenic Peptides预测ME49-ROP16蛋白的抗原决定簇,结果显示该蛋白的平均抗原倾向指数为1.0340,共含有25个抗原决定簇,表明ME49-ROP16蛋白含有较多的优势抗原表位结构,抗原倾向指数高。通过在线软件IEDB和SYFPEITHI预测分析出ME49-ROP16蛋白含有7条B细胞优势表位,7条CTL细胞优势表位和7条Th细胞优势表位,说明该蛋白具有良好的抗原性,结合ME49-ROP16蛋白的亲水性、柔韧性、表面可及性等参数推测该蛋白具有形成抗原表位的基础,可作为弓形虫预防和治疗的靶点以及弓形虫疫苗的一个候选分子。

综上所述,本研究利用生物信息学方法预测ME49-ROP16具有优势B细胞和T细胞表位,表明其具有一定的抗原性,可作为抗弓形虫疫苗的候选蛋白。

#### 【参考文献】

- [1] Kongsomboonvech AK, García-Lopez L, Njume F, et al. Variation in CD8 T cell IFN $\gamma$  differentiation to strains of *Toxoplasma gondii* is characterized by small effect QTLs with contribution from ROP16[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1130965.
- [2] Bachand N, Ravel A, Leighton P, et al. Serological and molecular detection of *Toxoplasma gondii* in terrestrial and marine wildlife harvested for food in Nunavik, Canada[J]. Parasit Vectors, 2019, 12(1): 155.
- [3] Tuladhar S, Kochanowsky JA, Bhaskara A, et al. The ROP16III-dependent early immune response determines the subacute CNS immune response and type III *Toxoplasma gondii* survival[J]. PLoS Pathog, 2019, 15: e1007856.
- [4] 陈梁元,莫娇,曾庆源,等.抗弓形虫药物研究进展[J].中国人兽共患病学报,2023,39(2):161-171.
- [5] Hiszczynska-Sawicka E, Gatkowska JM, Grzybowski MM et al. Veterinary vaccines against toxoplasmosis[J]. Parasitology, 2014, 141: 1365-1378.
- [6] Tan SJ, Tong WH, Vyas A. *Toxoplasma gondii* impact of plant-based foods and nutraceuticals on cysts: Nutritional therapy as a viable approach for managing chronic brain toxoplasmosis[J]. Front Nutr, 2022, 9: 827286.
- [7] Fan WW, Chang S, Shan XM, et al. Transcriptional profile of SH-SY5Y human neuroblastoma cells transfected by *Toxoplasma* rhoptry protein 16[J]. Mol Med Rep, 2016, 14: 4099-4108.
- [8] Kochanowsky JA, Thomas KK, Koshy AA. ROP16-Mediated activation of STAT6 suppresses host cell reactive oxygen species production, facilitating Type III *Toxoplasma gondii* growth and survival[J]. mBio, 2021, 12: undefined.
- [9] Sibley LD, Ajioka JW. Population structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps[J]. Annu Rev Microbiol, 2008, 62: 329-351.
- [10] 苏雅静,董辉,乔霞,等.弓形虫ROP16Ⅱ效应分子对宿主A549细胞基因表达谱的影响[J].中国人兽共患病学报,2018,34(4):323-329.
- [11] Yang CL, Arrizabalaga G. The serine/threonine phosphatases of apicomplexan parasites[J]. Mol Microbiol, 2017, 106: 1-21.
- [12] Ciesla J, Frańczyk T, Rode W. Phosphorylation of basic amino acid residues in proteins: important but easily missed[J]. Acta Biochim Pol, 2011, 58: 137-148.
- [13] Shi YG. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure[J]. Cell, 2009, 139: 468-484.
- [14] Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host[J]. Trends Parasitol, 2005, 21(10): 476-481.
- [15] Geissmann F, Gordon S, Hume DA, et al. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(6): 453-460.
- [16] Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1: a001651.
- [17] 张晓磊,赵利娜,郭坦达,等.刚地弓形虫P30基因的克隆及编码蛋白结构与抗原表位的生物信息学分析[J].中国病原生物学杂志,2023,18(4):411-415,420.
- [18] 马航斌,张晶,王靖惠,等.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[J].中国病原生物学杂志,2023,18(10):1152-1157.
- [19] 张晶,田晓薇,梅雪芳,等.刚地弓形虫钙网蛋白的生物信息学分析[J].中国病原生物学杂志,2022,17(3):260-265.
- [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):438-443,465.

【收稿日期】 2023-07-25 【修回日期】 2023-10-12