

DOI:10.13350/j.cjpb.241205

• 论著 •

多房棘球绦虫 EM13 蛋白生物信息学分析及原核表达载体的构建*

尚再玲¹, 王明霞¹, 乔飞¹, 李亚宁¹, 马学琳¹, 黑君虎¹, 王娅娜^{1,2**}

(1. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏回族自治区常见传染病防治重点实验室)

【摘要】 目的 构建多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*) Em13 原核表达载体并进行生物信息学分析。方法 在 NCBI 数据库中检索并下载 EM13 蛋白的氨基酸序列, 使用生物信息学软件预测 EM13 蛋白质的基本理化性质及功能。通过 PCR 方法扩增 Em13 基因。双酶切目的基因和载体质粒 pET28a, 经 T4 连接酶连接, 将连接产物转化入大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞。结果 EM13 蛋白由 426 个氨基酸组成, 包括 63 个酸性氨基酸和 56 个碱性氨基酸, 分子质量为 47 535.12, 等电点为 5.64, 为亲水性蛋白, 不含有信号肽序列和跨膜结构域, 含 F-BAR 和 SH3 结构域。磷酸化位点预测显示有 29 个丝氨酸磷酸化位点、16 个苏氨酸磷酸化位点、7 个酪氨酸磷酸化位点以及 25 个翻译后修饰位点。其二级结构 α -螺旋所占的比例为 58.45%, β -转角占 2.58%, 无规则卷曲占 35.45%。抗原表位预测显示 EM13 含有 5 个潜在的优势 B 细胞表位、24 个潜在优势细胞毒性 T 淋巴细胞表位和 14 个潜在优势辅助性 T 细胞表位。序列比对显示与多房棘球绦虫 EM13 蛋白序列同源性最高的来自细粒棘球绦虫 EG13。构建了 Em13/pET28a 重组质粒, 测序后与 NCBI 中录入的序列进行比对, 结果一致。结论 EM13 蛋白具有较多的抗原结合位点, 且构建了 Em13/pET28a 原核表达载体, 为 EM13 蛋白作为泡性棘球绦病的特异性诊断抗原或疫苗候选抗原的鉴定奠定了基础。

【关键词】 多房棘球绦虫; 生物信息学; 重组质粒; EM13 蛋白

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)12-1413-07

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Dec.; 19(12): 1413-1419.]

Bioinformatics analysis of the *Echinococcus multilocularis* antigen EM13 and construction of a prokaryotic expression vector

SHANG Zailing¹, WANG Mingxia¹, QIAO Fei¹, LI Yanning¹, MA Xuelin¹, HEI Junhu¹, WANG Yana^{1,2} (1. Basic Medical Institute of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Key Laboratory of prevention and control of Common Infectious Diseases of Ningxia Autonomous Region) ***

【Abstract】 **Objective** The prokaryotic expression vector of *Echinococcus multilocularis* Em13 was constructed and analyzed by bioinformatics. **Methods** The amino acid sequence of the EM13 protein was searched and downloaded from the NCBI database, and the basic physicochemical properties and functions of the EM13 protein were predicted using bioinformatics software. The Em13 gene was amplified by PCR. The target gene and vector plasmid pET28a were double-enzymatically cleaved, ligated by T4 ligase, and the ligation product was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. **Results** EM13 protein consists of 426 amino acids, including 63 acidic amino acids and 56 basic amino acids, with a molecular weight of 47 535.12 and an isoelectric point of 5.64. It is a hydrophilic protein, does not contain signal peptide sequences and transmembrane domains, and contains F-BAR and SH3 domains. Phosphorylation site prediction showed that EM13 protein had 29 serine phosphorylation sites, 16 threonine phosphorylation sites, 7 tyrosine phosphorylation sites and 25 post-translational modification sites. The proportion of α -helix in its secondary structure was 58.45%, β -turn was 2.58%, and random curl was 35.45%. Antigenic epitope prediction showed that EM13 contained 5 potentially dominant B-cell epitopes, 24 potentially dominant cytotoxic T-lymphocyte epitopes, and 14 potentially dominant helper T-cell epitopes. Sequence alignment showed that the highest homology with the EM13 protein sequence of *E. multilocularis* was *E. granulosus* EG13. The Em13/pET28a recombinant plasmid was successfully constructed, sequenced and compared with the sequences recorded in NCBI with consistent results. **Conclusion** EM13 protein has more antigen-binding sites and the construction of the Em13/pET28a prokaryotic expression vector, which lays the foundation for the characterization of the EM13 protein as a specific diagnostic antigen of *Alveolar echinococcosis*

* **【基金项目】** 国家自然科学基金(No. 82160399); 宁夏回族自治区重点研发项目(No. 2022BEG03117)。

** **【通讯作者】** 王娅娜, E-mail: wang-alice03@163.com

【作者简介】 尚再玲(2000-), 女, 甘肃人, 硕士研究生在读, 主要研究方向: 寄生虫感染与免疫。E-mail: 2421971131@qq.com

or a vaccine candidate antigen.

【Keywords】 *Echinococcus multilocularis*; bioinformatics; recombinant plasmid; EM13 protein

泡性棘球蚴病 (*Alveolar echinococcosis*, AE) 是一种人畜共患寄生虫病, 在北半球、亚洲西部、中部和东部地区流行, 在中国高发^[1]。人类的泡性棘球蚴病治疗难度大, 患者出现临床症状, 多数已发展到晚期, 手术切除是治愈 AE 的唯一手段^[2], 但往往存在治疗效果差, 复发率高的问题。如果无法进行手术, 药物治疗则是最有效的方法, 但是需要终身服用阿苯达唑类寄生虫抑制剂^[3-4], 副作用大, 且易导致患者产生完全依赖性^[5]。因而, 早期诊断和有效的免疫预防对降低 AE 的发病率和致死率至关重要。免疫诊断是最常用的 AE 早期诊断的方法。寻找高灵敏度和特异性抗原是提高早期诊断和治疗的重要前提。目前多房棘球绦虫不同发育阶段的抗原作为人类和其它中间宿主 AE 血清诊断的候选分子^[6], 但是多数抗原特异性不高, 难以区分 AE 和其它寄生虫感染, 尤其是分辨与 CE 的感染。EM13 具有高度的免疫原性, 且只在多房棘球绦虫幼虫期特异性表达^[7], 不在细粒棘球绦虫中表达, 是针对多房棘球蚴的一种特异性抗原。研究发现重组抗原 EM13 对多房棘球绦虫感染的血清学诊断具有高敏感性和特异性, 可诊断 CE 和 AE 的感染^[7], 具有成为 AE 血清学诊断分子的价值。但是关于 EM13 在多房棘球绦虫感染中的作用尚不清楚。

本研究利用生物信息学软件对 EM13 蛋白的理化性质、空间结构和抗原表位等进行分析, 并采用分子克隆技术构建 *Em13/pET28a* 重组表达载体, 探讨其可能的生物学作用, 为 EM13 在泡性棘球蚴病的免疫诊断及疫苗防治方面的研究提供理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 载体和菌株 原核表达载体 pET28a、大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态和多房棘球蚴的原头蚴样本均为本室保存。

1.2 主要试剂 Trizol 购于美国 Ambion 公司; 凝胶回收试剂盒购于 QIAGEN 公司; 质粒小提试剂盒, 2×Taq PCR MasterMIX 购于天根生化科技(北京)有限公司; 反转录试剂盒购于赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 氨基酸序列 获取通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线数据库检索并获取 EM13 蛋白的氨基酸序列, 其登录号为 AAA29054.1。

2.2 EM13 蛋白理化性质的预测 采用 ProtParam (<https://www.expasy.org/resources/protparam>) 预

测 EM13 蛋白的理化性质; 通过 NetSolP-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetSolP-1.0>) 预测其在大肠埃希菌中表达的可溶性。利用在线预测软件 ProtScale (<https://www.expasy.org/resources/protscale>) 中的 Hydropath. / Kyte & Doolittle 和 Hphod. / Hoop&Woods 算法预测 EM13 蛋白的亲/疏水性。

2.3 信号肽、跨膜结构域及亚细胞定位的预测 使用 SignalP5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测蛋白是否具有信号肽; 使用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测蛋白有无跨膜结构域; 通过 PSORT 网站 (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 和 Cell-PLoc 2.0 中 Euk-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/>) 预测蛋白在亚细胞中的定位。

2.4 蛋白空间结构的预测 利用 Prabi 在线预测软件 SOPMA 程序 (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测该蛋白的二级结构; 使用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 和 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测该蛋白的三级结构; 使用 Prosite 网站 (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/mydomains/>) 预测蛋白的保守结构域。

2.5 磷酸化位点及翻译后修饰位点的预测 使用 NetPhos-3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1>) 预测磷酸化位点, 使用 Motif Scan 网站 (https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan) 预测翻译后修饰位点。

2.6 抗原表位的预测

2.6.1 线性 B 细胞抗原表位预测 使用 ABCpred (https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html)、SVMTriP (<http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/prediction.php>) 和 IEDB (<http://tools.iedb.org/main/bcell/>) 预测 EM13 蛋白的线性 B 细胞抗原表位。设置: ABCpred 阈值为 0.51; SVMTriP 表位肽长度 16aa; IEDB 阈值 0.50。

2.6.2 T 细胞表位预测 使用 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>) 和 IEDB 在线网站预测 T 细胞抗原表位, 采用 HLA-DRB1 * 0701、HLA-DRB1 * 1501 和 HLA-DRB1 * 0301 预测辅助性 T 细胞 (Th)

表位,取分值 ≥ 18 分的序列。使用IEDB网站,采用HLA-A*1101、HLA-A*0201和HLA-A*0301预测细胞毒性T淋巴细胞(CTL)表位。

2.7 序列比对及进化树构建 使用NCBI中BLAST算法对绦虫纲、吸虫纲、线虫纲、哺乳动物和鸟类的EM13蛋白同源性进行分析,同时对多房棘球绦虫EM13蛋白的氨基酸序列进行比对,寻找其同源序列,筛选序列相似性最高的15个寄生虫的同源序列进行多序列比对,并使用MEGA11构建系统发育树,采用邻近连接法(Neighbor-joining Method, NJ)构建分子系统树,使用evolview进行树的美化。

2.8 引物设计及合成 根据GenBank中检索的Em13基因序列,使用Primer5.0软件设计扩增引物,上游引物添加BamH I酶切位点,下游引物添加Sal I酶切位点,由上海生物工程技术有限公司合成。F: 5'-CGGGATCCATGATTCAGGAGAGGCAGA-3'; R: 5'-GCGTCGACTCAACGTAGTTGGCGGGGAT-3'。

2.9 总RNA提取及基因的扩增与回收 用Trizol法提取总RNA并检测浓度,经逆转录获得cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增,PCR产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,对符合预期的目的条带进行切胶回收纯化。同时将pET28a空载质粒进行BamH I和Sal I双酶切,进行0.8%琼脂糖凝胶电泳,切取正确位置的条带进行凝胶回收和DNA纯化。

2.10 重组表达质粒的构建及连接转化 在T4 DNA连接酶作用下将纯化后的载体和目的片段连接,连接体系为载体片段2 μ L,目的片段14 μ L,T4连接酶2 μ L,T4 Buffer 2 μ L,16 $^{\circ}$ C连接过夜。将连接产物转入42 $^{\circ}$ C热激处理的感受态细胞BL21(DE3)中,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,均匀涂布于LB固体平板上,37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。挑取单个克隆菌落,摇菌、扩增,采用质粒提取试剂盒提取重组质粒。

2.11 重组载体的鉴定 取10 μ L重组质粒,进行目的基因的PCR扩增,PCR产物进行0.8%琼脂糖凝胶电泳分析。将重组质粒送至华大基因公司进行测序鉴定。

结 果

1 EM13蛋白的理化性质

EM13蛋白由426个氨基酸组成,包括63个酸性氨基酸和56个碱性氨基酸,分子式为 $C_{2090}H_{3278}N_{582}O_{666}S_{10}$,分子质量为47 535.12;等电点为5.64,半衰期为30 h (mammalian reticulocytes, in vitro) > 20 h (yeast, in vivo) > 10 h (*Escherichia coli*, in vivo),不稳定系数为38.04,结构稳定(表1、表

2)。EM13蛋白在大肠埃希菌中表达的可溶性为0.61。

表 1 EM13蛋白的理化性质
Table 1 Physicochemical properties of EM13

理化性质 Physicochemical properties	预测结果 Predicted results
氨基酸数(Number of amino acids)	426
分子式(Formule)	$C_{2090}H_{3278}N_{582}O_{666}S_{10}$
分子质量(Molecular weight)	47535.12
等电点(Theoretical pI)	5.64
半衰期(Estimated half-life)	30 h > 20 h > 10 h
不稳定系数(The instability index)	38.04
脂肪族指数(Aliphatic index)	69.65
亲疏水性(Grand average of hydropathicity, GRAVY)	-0.67

表 2 EM13蛋白的氨基酸组成
Table 2 Amino acid composition of EM13 protein

氨基酸 Amino acid	数量 Number	百分比(%) Percents(%)
Ala(A)	36	8.50
Arg(R)	23	5.40
Asn(N)	20	4.70
Asp(D)	26	6.10
Cys(C)	3	0.70
Gln(Q)	18	4.20
Glu(E)	37	8.70
Gly(G)	30	7.00
His(H)	6	1.40
Ile(I)	20	4.70
Leu(L)	29	6.80
Lys(K)	33	7.70
Met(M)	7	1.60
Phe(F)	16	3.80
Pro(P)	19	4.50
Ser(S)	35	8.20
Thr(T)	23	5.40
Trp(W)	4	0.90
Tyr(Y)	17	4.00
Val(V)	24	5.60
Pyl(O)	0	0.00
Sec(U)	0	0.00

2 EM13蛋白的信号肽、跨膜结构域、亚细胞定位和亲/疏水性预测

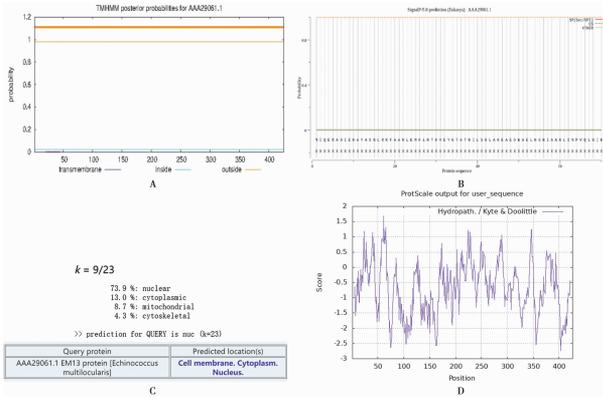
EM13蛋白不存在信号肽序列(图1A)及跨膜结构域(图1B),为非分泌、非跨膜蛋白。EM13蛋白可能定位于细胞核、细胞质或细胞膜(图1C)。该蛋白在第403个氨基酸处亲水性较强,最大值为-2.73。在第61位氨基酸处的疏水性最强,最大值为1.68(图1D)。EM13蛋白既有疏水区也有亲水区,但亲水性氨基酸区域占绝大多数。蛋白质的亲疏水性预测显示GRAVY值为-0.67,说明该蛋白为亲水性蛋白。

3 蛋白的空间结构

EM13蛋白的二级结构中 α -螺旋所占比例为

58.45%，延伸链占 3.52%，β-转角占 2.58%，无规则卷曲占 35.45% (图 2A)。EM13 蛋白的三级结构 (图 2B)，呈月牙型。该蛋白的 1-240 氨基酸处有 F-BAR 结构域，371-426 氨基酸处有 SH3 结构域 (图 2C)。

33aa, 74aa-89aa, 143aa-158aa, 121aa-131aa, 175aa-183aa (表 3)。



A EM13 蛋白信号肽的预测 B EM13 蛋白跨膜结构域的预测 C EM13 蛋白亚细胞定位的预测 D EM13 蛋白亲/疏水性的预测, 横轴代表氨基酸的位置, 纵轴代表亲(疏)水性 (正值代表疏水性, 负值代表亲水性)

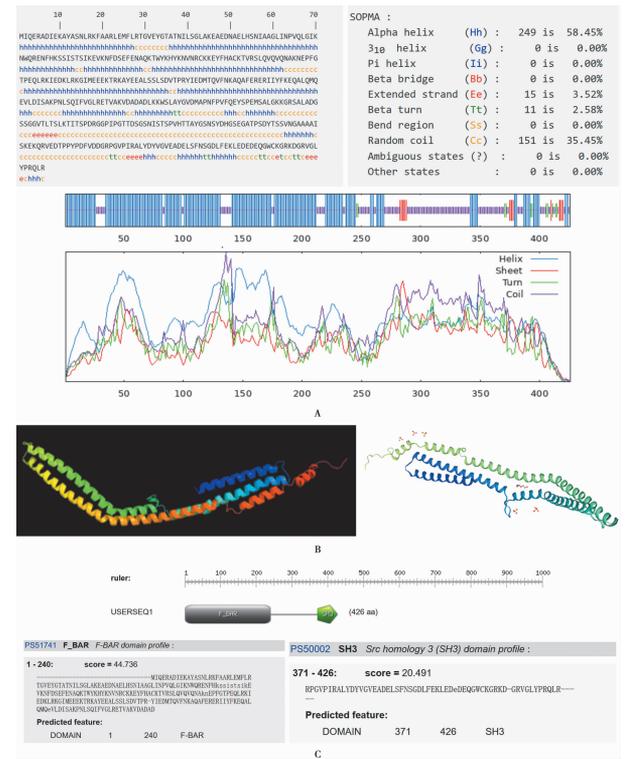
图 1 EM13 蛋白的信号肽、跨膜结构域、亚细胞定位和亲/疏水性预测

4 翻译后修饰位点

EM13 蛋白共有 29 个丝氨酸磷酸化位点 (分别位于 14、41、80、81、83、85、94、126、171、172、174、216、222、245、263、275、282、289、295、308、310、315、326、331、341、342、351、391、394 位氨基酸), 16 个苏氨酸磷酸化位点 (分布位于 29、37、84、102、123、141、162、177、185、231、288、305、314、320、335、360 位氨基酸); 7 个酪氨酸磷酸化位点 (分别位于 12、33、107、201、322、339、363 位氨基酸) (图 3)。EM13 蛋白有 2 个酰胺化位点 (269-272, 411-414), 2 个 N-糖基化位点 (220-223, 311-314), 1 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 (242-245), 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (29-32、85-88、94-97、172-175、294-297、335-338), 6 个 N-豆蔻酰化位点 (30-35、227-232、280-285、304-309、330-335、345-350), 6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (85-87、123-125、162-164、177-179、216-218、289-291), 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (5-12, 356-363)。

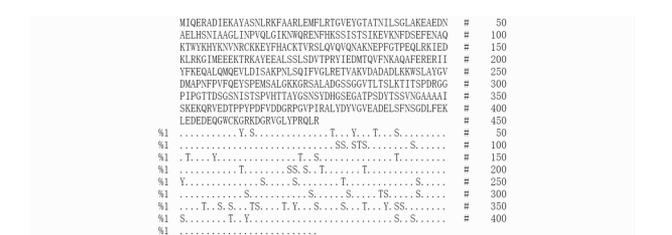
5 抗原表位预测

3 个 B 细胞抗原表位数据库的预测结果取交集, 综合分析得到 5 个 B 细胞优势抗原表位肽为 27aa-



A EM13 蛋白二级结构预测 B EM13 蛋白三级结构预测 C EM13 蛋白保守结构域预测

图 2 EM13 蛋白的二级结构、三级结构和保守性结构域预测



A 丝氨酸 T 苏氨酸 Y 酪氨酸
图 3 EM13 蛋白的磷酸化位点预测图谱
S Serine T Threonine Y Tyrosine

辅助性 T 细胞 (helper T cell, Th) 表位使用 SYFPEITHI 程序进行预测, 预测 HLA-DRB1 * 0701

的 T 细胞表位筛选出评分大于 20 的表位肽总共有 20 条;HLA-DRB1 * 1501 的表位总共有 16 条;HLA-DRB1 * 0301 的表位总共有 15 条;通过 IEDB 数据库进行预测验证,综合上述数据库的预测结果,显示 EM13 蛋白的 HLA-DRB1 * 0701 优势 CD4⁺ T 表位肽是 247aa-254aa、128aa-135aa、241aa-254aa、5aa-19aa、76aa-89aa、196aa-210aa;HLA-DRB1 * 1501 优势 CD4⁺ T 表位肽是 13aa-27aa、101aa-129aa、196aa-208aa、212aa-221aa、193aa-199aa;HLA-DRB1 * 0301 优势 CD4⁺ T 表位肽是 363aa-377aa、232aa-246aa、177aa-191aa(表 4)。

表 3 EM13 蛋白潜在的优势线性 B 细胞表位
Table 3 Potential dominant linear B cell epitopes of EM13

序号 Order	位置 Position	序列 Sequence	长度 Length
1	27-33	LRTGVEY	7
2	74-89	RENFHKSSISTSIKEV	16
3	143-158	EQLRKIEDKLRKGIME	16
4	121-131	CKTVRSLQVQV	11
5	175-183	DVTPRYIED	9

表 4 EM13 蛋白潜在的优势 Th 表位
Table 4 Potential dominant Th epitopes of EM13

序号 Order	等位基因 Allele	位置 Position	序列 Sequence	
1	HLA-DRB1 * 0701	247-254	AYGVDMAP	
2		128-135	QVQVQNAK	
3		241-254	LKKWSLAYGVDMAP	
4		5-19	RADIEKAYASNLRFK	
5		76-89	NFHKSSISTSIKEV	
6		196-210	RERIIFYFKEQALQMQ	
7	HLA-DRB1 * 1501	13-27	ASNLRFKFAARLEMFL	
8		101-129	KTWYKHYKNVNRCKKEYFHACKTVRSLQV	
9		196-208	RERIIFYFKEQALQ	
10		212-221	VLDISAKPNL	
11		193-199	AFERERI	
12		363-377	YPDFVDDGRPGVPIR	
13		HLA-DRB1 * 0301	232-246	VAKVDADADLKKWSL
14		177-191	TPRYIEDMTQVFNKA	

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)表位通过 IEDB 在线网站预测,筛选出评分 > 0.5 的表位,表 5 显示出 EM13 蛋白的 HLA-A * 1101、HLA_A * 0201 和 HLA_A * 0301 限制性 CD8⁺ T 细胞表位。

6 T、B 联合细胞表位预测

对比所预测的 EM13 的 B 细胞表位和 T 细胞表位区域,发现有部分区域重合,取其共同的区域即为 T、B 细胞联合表位。综合分析最终筛选出 4 个 T、B 细胞联合表位(76aa-89aa、121aa-131aa、151aa-158aa、175aa-183aa)(表 6)。

7 序列比对及进化树构建

不同物种的 EM13 蛋白进化树显示多房棘球绦虫 EM13 蛋白与绦虫纲的亲缘关系最近(为

92.84%),其次是吸虫纲,与线虫纲、哺乳动物和鸟类的亲缘关系较远(为 36.24%)(图 4A)。筛选与多房棘球绦虫 EM13 蛋白序列相似性最高的 15 种寄生虫进行序列比对,显示与多房棘球绦虫 EM13 蛋白序列同源性最高(92.84%)的来自细粒棘球绦虫,其次是亚洲带绦虫(图 4B)。

表 5 EM13 蛋白的 HLA-A * 1101、HLA_A * 0201 和 HLA_A * 0301 限制性 CTL 表位预测
Table 5 Parameter HLA-A * 1101,HLA_A * 0201 and HLA_A * 0301 EM13 protein CTL epitope prediction.

序号 Order	等位基因 Allele	位置 Position	序列 Sequence
1	HLA-A * 11;01	10-18	KAYASNLRK
2		342-352	SVNGAAAAISK
3		36-45	ATNILSGLAK
4		80-90	SSISTSIKEVK
5		234-243	KVDADADLKK
6		346-354	AAAAISKEK
7		171-179	SSLSDVTPR
8		79-87	KSSISTSISK
9		281-291	SSGGVTLTSLK
10		34-45	GTATNILSGLAK
11	HLA-A * 02;01	366-374	FVDDGRPGV
12		378-387	ALYDYVGVVEA
13		172-181	SLSDVTPRYI
14		227-235	GLRETVAKV
15		220-228	NLSQIFVGL
16	HLA-A * 03;01	10-18	KAYASNLRK
17		151-161	KLRKGIMEEEK
18		342-352	SVNGAAAAISK
19		61-70	LINPVQLGIK
20		36-45	ATNILSGLAK
21		60-70	GLINPVQLGIK
22		79-87	KSSISTSISK
23		234-243	KVDADADLKK
24		172-180	SLSDVTPRY

表 6 EM13 蛋白的 T、B 联合细胞表位
Table 6 T and B combined cell epitopes of EM13 protein

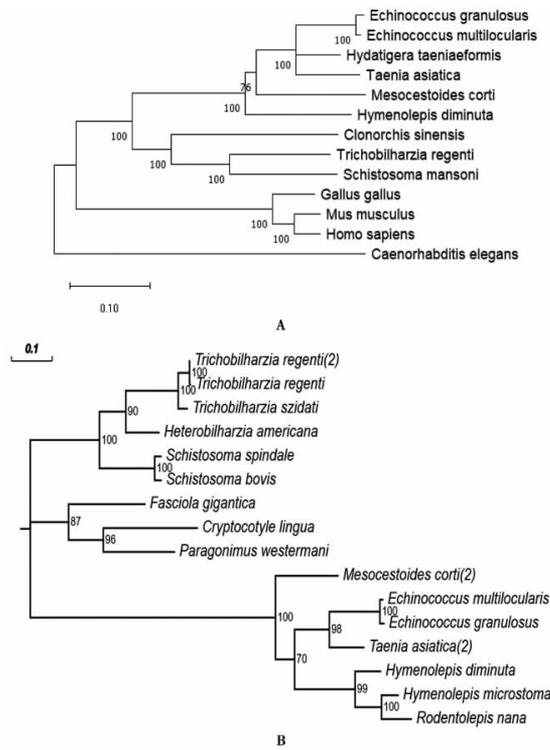
序号 Order	位置 Position	序列 Sequence	长度 Length
1	76-89	NFHKSSISTSIKEV	14
2	121-131	CKTVRSLQVQV	11
3	151-158	KLRKGIME	8
4	175-183	DVTPRYIED	9

8 Em13/pET28a 重组质粒的构建及鉴定

重组质粒经目的基因扩增鉴定,结果如图 5 所示,在大约 1 700 bp 处获得的一条线性片段与 Em13 基因片段 1 778 bp 大小相符,且无特异性条带。将重组质粒送至华大基因公司测序鉴定,测序结果与 Em13 在 NCBI 数据库公布的序列信息完全一致,表明 Em13/pET28a 构建成功。

讨论

提高泡性棘球蚴病的免疫诊断和预防的前提是寻找出具有特异性和保护性的多房棘球绦虫抗原。本研究利用生物学信息在线软件对 EM13 的理化性质和

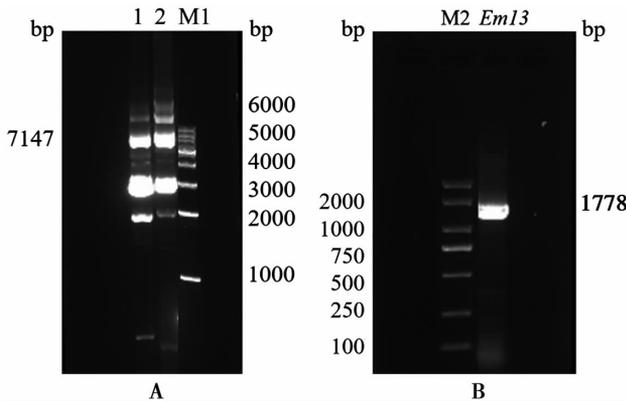


A 不同物种 EM13 蛋白系统进化树 B 不同寄生虫 EM13 蛋白系统进化树

图 4 EM13 蛋白的系统进化树

A Phylogenetic tree of EM13 proteins of different species B Phylogenetic tree of EM13 proteins of different parasites

Fig. 4 Phylogenetic tree of EM13 protein



A *Em13/pET28a* 重组质粒电泳图 B *Em13/pET28a* 重组质粒扩增图 M1 1kb DNA 标准分子质量 M2 DL2000 DNA 标准分子质量 1,2 重组质粒 *Em13/pET28a*

图 5 重组质粒扩增鉴定

A Electropherogram of *EM13/pET28a* recombinant plasmid B Amplification of *EM13/pET28a* recombinant plasmid M1 Marker of 1kb DNA standard molecular weight M2 Marker of DL2000 DNA standard molecular weight 1,2 Recombinant plasmid *Em13/pET28a*

Fig. 5 Recombinant plasmid identification

空间结构进行了分析,结果显示,在 EM13 二级结构中存在较高比例的 α -螺旋和无规则卷曲结构, α -螺旋参与蛋白骨架的构成,结构稳定,不易形成表位嵌合抗体,而无规则卷曲位于抗原的表面,结构分散容易形成抗原表位^[8-9],这些信息为后期的 T、B 细胞抗原表位

肽的筛选提供了一定的信息。此外软件分析该蛋白质不含有信号肽序列及跨膜结构域,说明该蛋白非分泌性蛋白也非膜蛋白,结合蛋白质的亚细胞定位,初步推测该蛋白位于细胞质中。EM13 蛋白含有一个 N-端的 F-BAR(Fes/CIP4 homology Bin/amphiphysin/Rvs, Fes/CIP4 同源 BAR 结构域)结构域和一个 C-端的 SH3 结构域(SRC Homology 3 Domain, Src 同源 3 结构域),属于 F-BAR 蛋白。F-BAR 蛋白参与细胞内重要的活动,如内吞作用、吞噬作用、丝状体和足小体形成等^[10]。SH3 结构域是 50-60 个氨基酸的进化保守的蛋白质-蛋白质相互作用结构域。F-BAR 蛋白通过 SH3 结构域与 N-WASP(Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein,神经 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白)结合并激活 N-WASP,参与调节 Arp2/3(actin-related proteins-2/3,肌动蛋白相关蛋白 2/3)复合物介导的肌动蛋白聚合^[11]。

翻译后修饰可以引起蛋白质性质和功能的变化,蛋白在不同的修饰作用下发挥不同的功能,在寄生虫适应宿主主体内外不断变化的环境中发挥着积极作用。蛋白质磷酸化是一种常见且广泛的翻译后修饰,它影响多种细胞过程^[12],有研究发现影响疟原虫进入宿主细胞的肌球蛋白的丝氨酸第 19 位处(S19)具有磷酸化位点,它的磷酸化能影响寄生虫的迁移^[13]。蛋白质磷酸化受到蛋白激酶和磷酸酶的竞争活性调节^[14]。其中蛋白激酶被认为是有前途的药物靶标。酪氨酸激酶 4 参与日本血吸虫的繁殖,在其配子形成的调控中发挥重要的作用^[15-16]。N-肉豆蔻酰基转移酶(NMT)对杜氏利什曼原虫、布氏锥虫的生存能力至关重要,是真核寄生虫中一个较有希望的药物靶点^[17-18]。此外,N-糖基化修饰通过影响蛋白质二级结构和物理化学性质来发挥作用^[19-20]。由此可见这些翻译后修饰的位点可以调节寄生虫蛋白参与感染宿主的过程。

本研究通过软件预测发现 EM13 蛋白含有 52 个磷酸化位点,1 个 cAMP(cyclic adenosine monophosphate,环磷酸腺苷)和 cGMP(cyclic guanosine monophosphate,环磷酸鸟苷)依赖性蛋白激酶磷酸化位点,6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,6 个 N-豆蔻酰化位点,6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,2 个酪氨酸激酶磷酸化位点及 2 个 N-糖基化位点。推测这些位点可以调控 EM13 蛋白参与多房棘球绦虫的生长发育及感染宿主引发的免疫逃逸过程,且可能是治疗泡性棘球蚴病的潜在药物靶点,在泡性棘球蚴病的治疗中有重要价值。多房棘球绦虫感染宿主引发的免疫机制复杂,包括细胞免疫及体液免疫。良好的疫苗可以诱导宿主产生保护性免疫抵御寄生虫的感染,预测蛋白的抗原表位对于分析蛋白作为疫苗候选分子的

可能性提供了信息^[21-22]。

综上,本研究构建了 *Em13/pET28a* 原核表达载体,生物信息学预测 EM13 蛋白具有较多的抗原结合位点,可为泡性棘球蚴病的特异性诊断抗原或疫苗候选抗原的鉴定提供理论基础。

【参考文献】

[1] 孟庆杨,彭婕,马淑梅,等. 超声在肝多房棘球蚴病诊疗中的应用进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2020,32(6):657-660.

[2] Hillenbrand A, Gruener B, Kratzer W, et al. Impact of safe distance on long-term outcome after surgical therapy of alveolar echinococcosis[J]. World J Surg,2016,41(4):1012-1018.

[3] Valot B, Rognon B, Prenel A, et al. Screening of antigenic vesicular fluid proteins of *Echinococcus multilocularis* as potential viability biomarkers to monitor drug response in alveolar echinococcosis patients[J]. Proteomics Clin Appl,2017,11:11-12.

[4] Brehm K, Koziol U. On the importance of targeting parasite stem cells in anti-echinococcosis drug development[J]. Parasite,2014,21:72.

[5] Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. Drug repurposing applied; activity of the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis* [J]. Int J Parasitol Drugs Drug Resist,2020,13:121-129.

[6] Carmena D, Benito A, Eraso E. The immunodiagnosis of *Echinococcus multilocularis* infection[J]. Clin Microbiol Infect,2007,13(5):460-475.

[7] Frosch PM, Geier C, Kaup F J, et al. Molecular cloning of an echinococcal microtrichal antigen immunoreactive in *Echinococcus multilocularis* disease[J]. Mol Biochem Parasitol,1993,58(2):301-310.

[8] 车纾慧,付玉荣,伊正君. 结核分枝杆菌 AccD5 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志,2017,12(9):844-847.

[9] 葛晓丽,王芬,殷国荣. 乳腺癌相关基因环氧化酶 2(COX-2) 编码蛋白的主要特性与抗原表位生物信息学分析[J]. 现代肿瘤医学,2012,20(9):1794-1798.

[10] Liu SX, Xiong XY, Zhao XX, et al. F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes—from structure to human diseases[J]. J Hematol Oncol,2015,8:47.

[11] Takenawa T. Phosphoinositide-binding interface proteins

involved in shaping cell membranes[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci,2010,86:509-523.

[12] Jacot D, Soldati-Favre D. Does protein phosphorylation govern host cell entry and egress by the Apicomplexa? [J]. Int J Med Microbiol,2012,302(4-5):195-202.

[13] Ripp J, Smyrnakou X, Neuhoff MT, et al. Phosphorylation of myosin A regulates gliding? motility and is essential for *Plasmodium transmission* [J]. EMBO reports,2022,23(7):e54857.

[14] Ardito F, Giuliani M, Perrone D, et al. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)[J]. Int J Mol Med,2017,40(2):271-280.

[15] Wheeler-Alm E, Shapiro SZ. Evidence of tyrosine kinase activity in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei* [J]. J. Protozool,1992,39(3):413-416.

[16] Ding H, Liu F, Zhu L, et al. Tyrosine kinase 4 is involved in the reproduction of the platyhelminth parasite *Schistosoma japonicum*[J]. Parasit Vect,2017,10(1):498.

[17] Price HP, Gther ML, Ferguson MA, et al. Myristoyl-CoA; protein N-myristoyltransferase depletion in trypanosomes causes avirulence and endocytic defects [J]. MolBiochem Parasitol,2010,169(1):55-58.

[18] Wright MH, Paape D, Storck EM, et al. Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani* [J]. ChemBiol,2015,22(3):342-354.

[19] Gavrillov Y, Shental-Bechor D, Greenblatt HM, et al. Glycosylation may reduce protein thermodynamic stability by inducing a conformational distortion[J]. J Phys Chem Lett,2016,6:3572-3577.

[20] Zhu J, Liu H, Zhang J, et al. Effects of Asn-33 glycosylation on the thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase [J]. J Appl Microbiol,2014,117:151-159.

[21] Azazi A, Haron FN, Chua KH, et al. Bioinformatics characterization of *Plasmodium knowlesi* apical membrane antigen 1 (PkAMA1) for multi-epitope vaccine design[J]. Trop Biomed,2021,38(3):265-275.

[22] Li XW, Zhang N, Li ZL, et al. Epitope vaccine design for *Toxoplasma gondii* based on a genome-wide database of membrane proteins[J]. Parasit Vectors,2022,15(1):364.

【收稿日期】 2024-05-08 【修回日期】 2024-08-02

(上接 1412 页)

[21] Ahor HS, Vivekanandan M, Harelimana JD, et al. Immunopathology in human pulmonary tuberculosis: Inflammatory changes in the plasma milieu and impaired host immune cell functions[J]. Immunology,2024,172(2):198-209.

[22] Lopez-Gonzalez JA, Martinez-Soto JM, Avila-Cervantes C, et al. Evaluation of systemic inflammation before and after standard anti-tuberculosis treatment in patients with active pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus[J]. Cureus,2024,2;16(3):e55391.

[23] Bernicke B, Engelbogen N, Klein K, et al. Analysis of the seasonal fluctuation of $\gamma\delta$ T cells and its potential relation with vitamin D3[J]. Cells,2022,11(9):1460.

[24] Zhuravel E, Shestakova T, Efanova O, et al. Pogrebnoy, human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells, in vitro study[J]. Exp Oncol,2011,33(3):114-120.

[25] 刘轩妙,徐俊驰,岳晓冬,等. IFN- γ 联合 IL-6 在菌阴性肺结核诊断中的应用分析[J]. 标记免疫分析与临床,2024,31(3):

450-455,475.

[26] Herwig R, Erlbacher K, Ibrahimagic A, et al. Vitamin D-Dimer: A possible biomolecule modulator in cytotoxic and phagocytosis processes[J]? Biomedicines,2022,10(8):1785.

[27] Shaikh NA, Zhang XB, Abdalla MI, et al. Enhancing human treg cell induction through engineered dendritic cells and zinc supplementation[J]. Crit Rev Immunol,2024,44(3):37-52.

[28] Gallo D, Bruno A, Gallazzi M, et al. Immunomodulatory role of vitamin D and selenium supplementation in newly diagnosed Graves' disease patients during methimazole treatment[J]. Front Endocrinol (Lausanne),2023,14(14):1145811.

[29] 王敏. 维生素 D 代谢通路异常甲基化与结核病发病风险和预后的分子流行病学研究[D]. 江苏:南京医科大学,2017.

[30] Zhang C, Liu K, Hou J. Extending the vitamin D pathway to vitamin D3 and CYP27A1 in periodontal ligament cells[J]. J Periodontol,2021,92(7):44-53.

【收稿日期】 2024-07-26 【修回日期】 2024-10-13