

DOI:10.13350/j.cjpb.220507

• 论著 •

EG14-3-3 真核表达蛋白的纯化及空间结构的 生物信息学预测*

赵商岐¹, 郑佳¹, 李艳敏¹, 张传山², 贾海英³, 龚巧巧¹, 林仁勇², 周晓涛^{1**}(1. 新疆医科大学基础医学院免疫学教研室, 新疆乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院临床研究院;
3. 新疆维吾尔自治区人民医院检验科)

【摘要】 **目的** 构建真核表达载体 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his, 经表达、纯化后获得融合蛋白 EG14-3-3-myc-his, 并通过生物信息学预测 EG14-3-3 蛋白的空间结构。 **方法** 以 pet41a-EG14-3-3 为模板 PCR 扩增 EG14-3-3 基因的 CDS 区, 经限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切后连接到真核表达质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-) 中, 构建真核表达质粒 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his。将质粒转染入 293T 细胞中表达 EG14-3-3-myc-his 蛋白, 经亲和层析纯化后进行 Western blot 鉴定, 通过在线网站对 EG14-3-3 蛋白空间结构进行生物信息学预测。 **结果** 成功构建 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 真核表达质粒, 表达产物纯化后经 SDS-PAGE 电泳分析其分子质量为 27.9 ku, 与预期一致, 且以第 3 次(4℃过夜)洗涤的靶蛋白含量较高。Western blot 检测纯化后带有 His 标签的重组蛋白 EG14-3-3-myc-his 能被 His 单克隆抗体识别。生物信息学预测 EG14-3-3 蛋白无信号肽和跨膜区, 其二级结构中的 N 端为无规则卷曲, 之后紧连两个 α 螺旋, C 末端为无规则卷曲和较短的片层结构。 **结论** 成功构建了 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 真核表达载体, 通过蛋白纯化技术获得高纯度的蛋白。表达的 EG14-3-3 蛋白含有无规则卷曲, 可能为抗原表位所在位置, 为进一步研究 EG14-3-3 蛋白的功能及应用奠定了实验基础。

【关键词】 细粒棘球蚴; EG14-3-3; 真核蛋白表达; 生物信息学预测

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0532-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 May;17(5):532-536.]

Purification and bioinformatics prediction of the spatial structure of eukaryotic expression protein EG14-3-3

ZHAO Shang-qi¹, ZENG Jia¹, LI Yan-min¹, ZHANG Chuan-shan², JIA Hai-ying³, GONG Qiao-qiao¹, LIN Ren-yong², ZHOU Xiao-tao¹ (1. *The Department of Immunology, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China*; 2. *Clinical Research Institute, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University*; 3. *Clinical Laboratory Center, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital*)^{***}

【Abstract】 **Objective** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his was constructed, and the fusion protein EG14-3-3-myc-his was expressed and purified. The spatial structure of EG14-3-3 protein was predicted by bioinformatics. **Methods** Using pet41a-EG14-3-3 as the template, the CDS region of EG14-3-3 was amplified and cleaved into the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-myc-his A(-) by restriction enzyme EcoR I and BamH I. The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his was constructed and transfected into 293T cells to express EG14-3-3-myc-his protein. The fusion protein was purified by affinity chromatography and identified by Western blot. The spatial structure of EG14-3-3 protein was predicted by bioinformatics through various online websites. **Results** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his was successfully constructed. After purification, SDS-PAGE electrophoresis results showed that there was an obvious band at 27.9 kDa, which was consistent with the expected position of the protein, and the protein content was higher after the third washing (overnight at 4℃). Western blot results showed that the purified recombinant protein EG14-3-3-myc-his could be recognized by anti-His monoclonal antibody. It is predicted by bioinformatics that EG14-3-3 protein had no signal peptide and no transmembrane region, the N-terminal of the secondary structure of EG14-3-3 protein had random coil, followed by two alpha helix, and the C-terminal had random coil and short lamellar structure. **Conclusion** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his was successfully constructed, and the high purity protein was obtained by protein purification technology. The EG14-3-3 protein had random coil, which may be the location of the antigen epitope. It provided the basis for the study on the

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81760656); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(No. 2018D01C157)。

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

【作者简介】 赵商岐(1994-), 女, 汉族, 河北沧州人, 在读硕士研究生。研究方向: 感染免疫。E-mail: 3058754214@qq.com

function and application of 14-3-3 protein in the future.

【Key words】 *Echinococcus granulosus*; EG14-3-3; Eukaryotic protein expression; Bioinformatics prediction

细粒棘球蚴病又称囊型包虫病,是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的幼虫寄生于人或动物体内而引发、具有严重危害的人畜共患疾病^[1-2]。包虫病的传播已呈全球性分布,在我国主要流行于西北牧区如青海、内蒙古、宁夏、甘肃、新疆等地^[3]。目前对于包虫病的治疗主要依靠手术和药物,但手术治疗对人体损伤极大且易复发,而药物可产生极强的毒副作用,且部分患者不耐受,效果均不理想^[4-6]。近几年在对真核细胞信号通路的研究中发现了一组关键信号蛋白 14-3-3 蛋白家族^[7],该蛋白依靠 I 型结构域通过与其配体相互作用,参与细胞生物学过程的调节^[8]。在细粒棘球绦虫不同的发育阶段均可检查到稳定存在 14-3-3 蛋白,该蛋白在其增殖分化中发挥重要的调控作用,提示 EG14-3-3 蛋白可作为疫苗工具来预防囊型包虫病感染^[9-11]。本研究通过构建真核表达质粒 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 表达重组蛋白 EG14-3-3-myc-his,并对重组蛋白进行纯化及鉴定,利用生物信息学方法对 EG14-3-3 蛋白的结构进行预测,为囊型包虫病的预防与治疗提供条件。

材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂和菌株 DNA Marker DL2000, pushion 酶,限制性内切酶 BamH I、EcoR I 及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司;NucleoSpin Gel 和 PCR Clean-up 胶回收试剂盒购自德国 MACHEREY-NAGEL 公司;Plasmid Mini Kit I 柱式质粒小量抽提试剂盒购自美国 OMEGA 公司;LBA 固体培养基和 LB 液体培养基,氨苄青霉素, IPTG 以及 anti-GST (mouse)购自美国 Sigma 公司。Liminata Crescendo Western HRP substrate 购自美国 Millipore 公司,大肠埃希菌 *E. coli* DH10B 由新疆医科大学第一附属医院中心实验室提供。

1.2 分析软件 包括 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>), PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), I-TASSE (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据细粒棘球绦虫 EG14-3-3 基因序列(登录号:KU739136.1)及质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-)的酶切图谱,利用 DNASTAR 软件辅助设

计引物,由上海 Sangon 公司合成。EG14-3-3 上游引物 P1:5'-ATTCCGGAATTCATGGCAGCTATTA CCTCTTGG-3';

EG14-3-3 下游引物 P2:5'-ATTGCGGGATCCG GAGTCGGTCTCACATTCGGAGCT-3'。

2.2 EG14-3-3 基因扩增与 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 真核表达质粒的构建 以 pet41a- EG14-3-3 为模板,以 P1 和 P2 为引物 PCR 扩增 EG14-3-3 基因。扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,共 25 个循环;72 °C 延伸 7 min。分别用 EcoR I 和 BamH I 双酶切 PCR 产物及质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-),酶切目的片段经 T4 DNA 连接酶连接后转化至感受态 DH10B 中,37 °C 培养过夜,经氨苄抗性标记筛选得到的阳性克隆酶切鉴定后交由上海 Sangon 公司测序,利用 DNASTAR 软件及 GenBank/Blast 在线工具对测序结果进行分析。

2.3 EG14-3-3-myc-his 重组蛋白的真核表达及纯化

通过转染试剂 Tubfect 将测序正确的 18 μ g 真核表达质粒 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 转染入 3 盘直径 10 cm 皿的 293T 细胞中,置于 5%CO₂ 细胞培养箱 37 °C 培养 48 h。根据细胞培养皿的面积加入适量含蛋白酶抑制剂及 PMSF 的 lysis buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 1% Triton X-100, pH8.0),反复冻融 2 次,冰上裂解 20 min,收集裂解液至 EP 管,冰上超声破碎(功率 75 W, 15 s/次,共 6 次,每次间隔 10s)。将细胞裂解液于 4 °C 以 9600g 离心 20min,收集上清至 15 ml 离心管。将细胞裂解液上清加至经过 lysis buffer 预洗涤的 Ni 柱上,于 4 °C 以 300 g 离心 10 min,反复将所有裂解液过柱 3 次。用 washing buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH8.0)洗柱 3 次,于 4 °C 以 900 g 离心 10 min,收集 3 次的过滤液,标记为 W1、W2、W3。最后加入 200 μ l Elution buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH8.0)洗脱 EG14-3-3-myc-his 融合蛋白,洗脱液反复洗脱 3 次(分别为 1、2 h 和 4 °C 过夜),收集每次的洗脱液,标记为 E1、E2、E3,并进行蛋白定量。取 20 μ l 上清(细胞裂解液、W1、W2、W3、E1、E2、E3)与等体积 2 \times SDS 上样缓冲液混合,100 °C 变性 5 min,用 12% SDS PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

2.4 EG14-3-3-myc-his 真核表达蛋白的鉴定 纯化后的蛋白加热变性后经 SDS-PAGE 分离,湿转至 PVDF 膜(0.45 μ m)上,5%脱脂奶粉 TBST 封闭 1 h,

加入 anti-his(1 : 1000)4 °C 孵育过夜,加入二抗 anti-rabbit(1 : 10000) 室温孵育 1 h,采用 Liminata Crescendo Western HRP substrate 进行显色,X 片曝光显影。

2.5 EG14-3-3 蛋白的结构预测 EG14-3-3 蛋白存于 GenBank,登录号 AMX81438.1,全长 247 个氨基酸。EG14-3-3 蛋白氨基酸序列为:msslskreenvymaklceqcerydemvkmkdvlesgadlsveernllsvayknvvgarrsswrvissieqkhdgdakmqiakkvreeierelsatckeildlldktilpaasseskiffllkmkgdyryvaefctgderkqasdnslmayksatevaegdmqthpirlglalnsvfyeyimnnpkracelarkafddavaeldtlpeesykdatlimqllrdnltlwnsdagdttaaepkpad。

通过 SignalP 预测信号肽,应用在线软件 TMHMM Server 分析重组蛋白的跨膜结构域,运用 SOPMA 在线分析软件预测蛋白的二级结构。运用 I-TASSER 建立模型,分析蛋白的三级结构。

结 果

1 EG14-3-3-myc-his 真核表达质粒的构建

以 pet41a- EG14-3-3 质粒为模板,PCR 扩增出目的基因 EG14-3-3 片段。经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,扩增片段约为 771 bp,与预计序列长度相符(图 1A)。选取构建的 5 个克隆通过 BamH I、EcoR I 进行双酶切鉴定,其中 2-4,6 号克隆均得到 771 bp 的特异性片段(图 1C)。选取鉴定正确的克隆质粒进行测序,测序结果经 DNASTAR 软件及 GeneBank/BLAST 分析,证明 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 重组表达质粒构建正确。

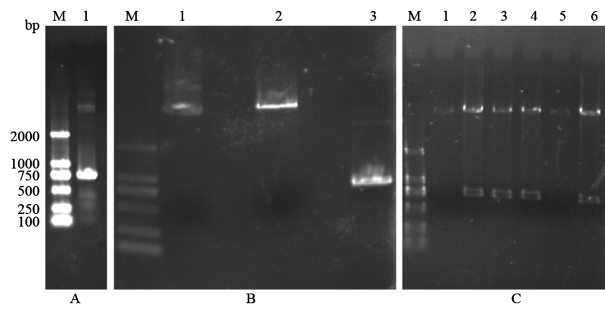


图 1 质粒 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 的构建
A EG14-3-3 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL2000) 1 EG14-3-3 PCR 产物 B 质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-)经 BamH I、EcoR I 双酶切鉴定 M DNA 标志物(DL2000) 1 质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-) 2 质粒 pcDNA3.1-myc-his A(-)经 BamH I、EcoR I 双酶切 3 EG14-3-3 PCR 产物经 BamH I、EcoR I 双酶切 CpcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 双酶切鉴定 M DNA 标志物(DL2000) 1~6 分别为 6 个 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 克隆双酶切

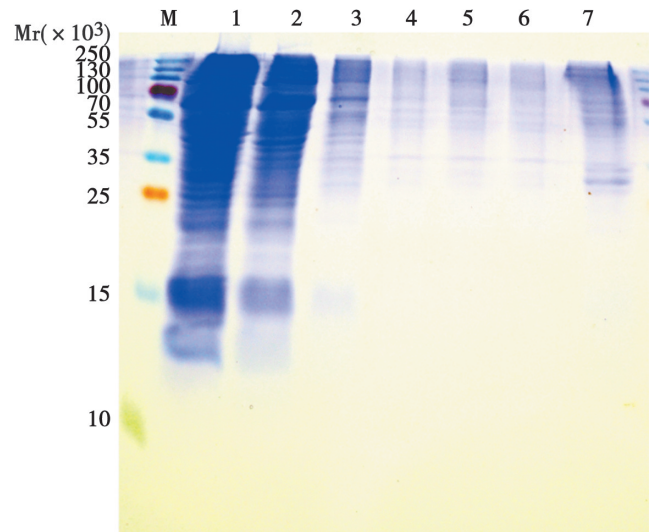
图 1 质粒 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 的构建

A M DL2000 1 EG14-3-3 PCR product B M DL2000 1 Plasmid pcDNA3.1-myc-his A(-) 2 plasmid pcDNA3.1-myc-his A(-) was double-digested by BamH, EcoR I 3 EG14-3-3 PCR product was double-digested by BamH I, EcoR I C M DL2000 1-6 Six pcDNA3.1-EG14-3-3-MYC-HIS clones were selected and identified by double digestion

Fig.1 Construction of plasmid pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his

2 EG14-3-3 的表达及纯化

EG14-3-3-myc-his 蛋白在真核细胞 293T 中表达,从图 2 可以看出 pcDNA3.1-myc-his A(-)在真核细胞中表达量满足实验需要。当使用 washing buffer 洗涤后,第 1 次洗涤可洗脱大量蛋白,但不含目的蛋白,而第 2、3 次洗脱蛋白较少。当对挂柱的蛋白使用 Elution buffer 洗涤后,第 1、2 次洗脱蛋白较少,第 3 次(4 °C 过夜法)洗脱蛋白较多,且为特异蛋白。3 次洗脱的蛋白总量依次为 0.12 μg,0.1 μg 和 2.2 μg。



M 蛋白分子质量标准 1 全细胞裂解液 2 Washing 第 1 次洗脱蛋白 3 Washing 第 2 次洗脱蛋白 4 Washing 第 3 次洗脱蛋白 5 Elution 第 1 次洗脱蛋白 6 Elution 第 2 次洗脱蛋白 7 Elution 第 3 次洗脱蛋白

图 2 重组蛋白 EG14-3-3-myc-his 的纯化

M Protein marker 1 Whole cell lysate 2 Washing first eluent 3 Wshing second eluen 4 Washing third eluent 5 Elution first eluent 6 Elution second eluent 7 Elution third eluent

Fig.2 Purification of recombinant EG14-3-3-myc-his

3 EG14-3-3 的鉴定

Western blot 显示,经表达、纯化获得的融合蛋白 EG14-3-3-myc-his 能被抗 His 单克隆抗体识别,表明其携带 His 标签,反应条带位于 27.9 ku 处,融合蛋白 EG14-3-3-myc-his 表达正确(图 3)。

4 EG14-3-3 蛋白结构预测

SignalP 和 TMHMM 预测 EM18 蛋白无信号肽和跨膜区(图 4)。PSIPRED 预测 EG14-3-3 蛋白二级结构,结果如图 5A。可以看出,EG14-3-3 蛋白蛋白 N 端为无规卷曲,之后紧连 2 个 α 螺旋,C 末端为无规则卷曲和较短的片层结构。这些无规则卷曲多数含有 5 个以上的氨基酸残基,是形成抗原表位的可能位置。利用 I-TASSER^[12-13] 对重组蛋白的三级结构进行预测,结果见图 5B。C-score=0.30(Read more about C-score); TM-score = 0.75 ± 0.10; RMSD = 5.2 ± 3.3 Å。

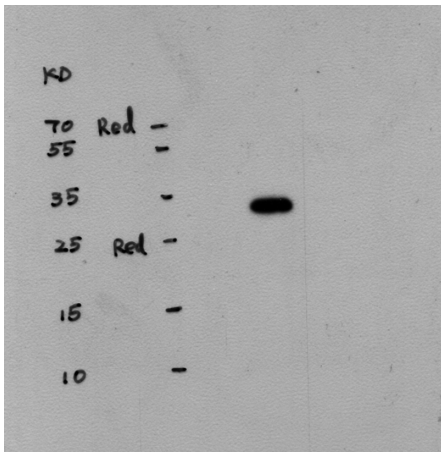
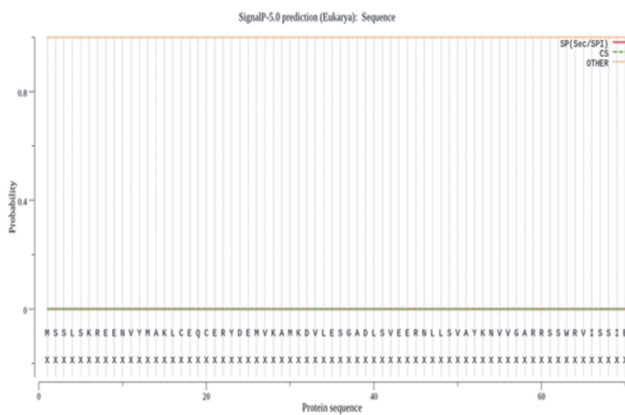


图3 重组蛋白 EG14-3-3-myc-his 的 Western blot 鉴定
Fig.3 Western blot identification of recombinant EG14-3-3-myc-his

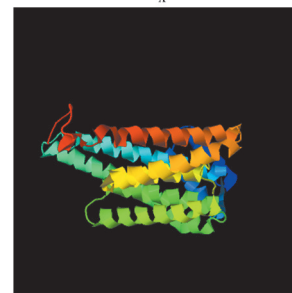
也显著缩短了控制进程^[14]。14-3-3 蛋白是一类存在于真核细胞中高度保守且广泛表达的酸性蛋白家族,在细胞的增殖、分化、凋亡及衰老中起重要作用^[15-16]。在寄生虫领域,14-3-3 蛋白在部分寄生虫中的生物学功能已经明确。李文桂等^[17]研究发现,BCG(Em-14-3-3)疫苗免疫小鼠后抗体水平均增高,提示可作为抗 EM 泡型包虫病的候选疫苗。李宗吉等^[11]用重组蛋白 EG14-3-3 免疫小鼠,4 周后采用 Eg 原头蚴攻击,小鼠血清 IgG1, IgG2a 抗体水平显著升高,表明该蛋白可诱导机体产生免疫保护效应,因此极有可能成为 Eg 的候选疫苗。王强等^[18]用纯化 EG14-3-3 蛋白免疫小鼠对细粒棘球蚴攻击感染的保护率为 85.3%。因此,对 EG14-3-3 蛋白功能的研究将有助于明确它在机体抗寄生虫感染中的作用机制。



A



B

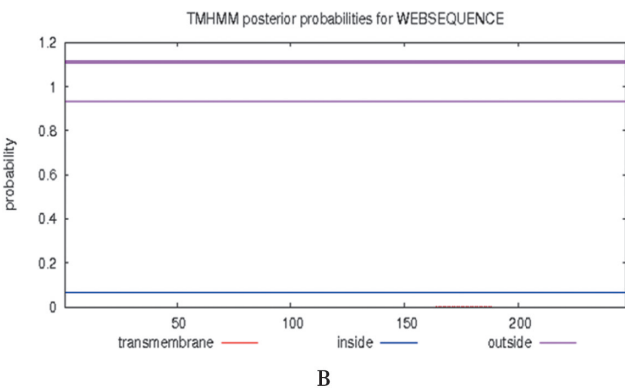


A EG14-3-3 蛋白的二级结构预测 B EG14-3-3 蛋白三级结构域预测

图5 EG14-3-3 蛋白蛋白结构预测

A Prediction of secondary structure of EG14-3-3 protein B Prediction of tertiary domain of EG14-3-3 protein

Fig.5 Protein structure prediction of EG14-3-3 protein



B

A EG14-3-3 蛋白的信号肽预测 B EG14-3-3 蛋白的跨膜结构域预测

图4 重组蛋白的信号肽与跨膜结构域预测

A Prediction of signal peptide of EG14-3-3 protein B Prediction of transmembrane domain of EG14-3-3 protein

Fig.4 Prediction of signal peptide and transmembrane domain of recombinant protein

讨论

包虫病作为一种动物源性疾病,是由棘球绦虫幼虫感染中间宿主所引起的,由于该病控制的复杂性和长期性,决定了其控制措施必须经济且有效,通过免疫预防来阻断病原循环链成为研究的主要方向,其应用

蛋白表达系统是指由载体、外源基因、宿主及辅助成分等组成的体系,通过该体系可完成外源基因在所处的宿主细胞中的持续表达。在所有的表达系统中,真核表达载体因在其基因高效表达的同时,另有翻译后加工修饰体系,表达的蛋白更加接近于天然蛋白,利于蛋白正常折叠,因此常常作为外源天然蛋白表达载体的首选。根据酶切位点,本研究选择 pcDNA3.1-myc-his A(-),且其氨基酸末端融合 6×His-tag,也为表达蛋白的纯化提供了条件,同时 6×His-tag 与分子质量约为 26 ku 的 GST-Tag^[19] 相比只有相差不到 0.84 ku,所以对与之结合的蛋白质的功能影响很小。将带有 His-Tag 的 EG14-3-3 蛋白与 Ni²⁺ 树脂相融合,当用缓冲液洗去其他杂质蛋白后再用 Elution buffer 进行洗脱,从而纯化与 Ni²⁺ 树脂有亲和作用的 EG14-3-3 蛋白。本实验在不同时间经 Elution buffer 进行

洗脱以探索最佳纯化条件,经 SDS-PAGE 分析,第 3 次(4 ℃过夜)洗脱的目的蛋白含量较高,总量为 2.2 μg。使用 18 μg 真核表达质粒转染,可得到 2.42 μg 纯化目的蛋白。对 HIS-EG14-3-3 重组蛋白进行纯化条件的优化可获得高纯度的蛋白抗原。将构建的 pcDNA3.1-EG14-3-3-myc-his 真核表达质粒转染入 293T 细胞中获得大量目的蛋白并利用融合蛋白 EG14-3-3-myc-his 的 HIS 标签对纯化的蛋白进行 Western blot 鉴定,结果显示 27.9 ku 的融合蛋白能被相应抗体识别,表明成功诱导表达纯化出目的蛋白。

近年来随着计算机生物信息学科技的发展,应用生物信息学在线软件分析可以对蛋白质结构进行预测和比对,将研究的重点从蛋白质的一级结构的分析转为更深入的蛋白质二、三级结构预测,从而更高效地对蛋白功能进行分析^[20]。I-TASSER^[21]利用同源模建和线串法两套算法进行蛋白质三级结构建模,其三维模型建立于多线路的 LOMETS 和迭代 TASSER 基础之上,推算出与 BioLiP 蛋白质功能的数据库匹配的预测模型。本研究中向 I-TASSER 提交的 EG14-3-3 蛋白序列登录号为 AMX81438.1,预测 EG14-3-3 蛋白三级结构分值 C-score 为 0.30, TM-Score 为 0.75 ± 0.10, Exp. RMSD 为 5.2 ± 3.3 Å。一般来说, TM-score 分值大于 0.5 具有预测意义。

本研究成功构建了细粒棘球绦虫 EG14-3-3 基因真核表达质粒,表达并纯化了 EG14-3-3 重组蛋白,为开展 EG14-3-3 蛋白的功能研究与细粒棘球绦虫疫苗的研制奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Sanchez-Ovejero C, Akdur E, Manzano-Roman R, et al. Evaluation of the sensitivity and specificity of GST-tagged recombinant antigens 2B2t, Ag5t and DIPOL in ELISA for the diagnosis and follow up of patients with cystic echinococcosis[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(11): e0008892.
- [2] Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, et al. Prevention and control of cystic echinococcosis[J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(6): 385-394.
- [3] Shang JY, Zhang GJ, Liao S, et al. A multiplex PCR for differential detection of *Echinococcus granulosus sensu stricto*, *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus Canadensis* in China[J]. BioMed Central, 2019, 8(1): 68.
- [4] 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.
- [5] Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 47(1): 24-41.
- [6] Gonder N, Demir IH, Klnocoglu V. The effectiveness of combined surgery and chemotherapy in primary hydatid cyst of thigh muscles, a rare localization and its management [J]. J Infect Chemother, 2021, 27(3): 533-536.
- [7] 刘小燕. 14-3-3 蛋白在卵巢子宫内异位囊肿中的表达及意义 [J]. 现代妇产科进展, 2013, 22(9): 719-722.
- [8] Zhang L, Chen J, Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(15): 8511-8515.
- [9] 单连玉. 细粒棘球绦虫成虫分泌 14-3-3 蛋白 [J]. 国外医学(寄生虫病分册), 2002(1): 37.
- [10] Li ZJ, Wang YN, Wang Q, et al. *Echinococcus granulosus* 14-3-3 Protein: A potential vaccine candidate against challenge with *Echinococcus granulosus* in mice[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(3): 352-358.
- [11] 李宗吉. 细粒棘球绦虫(中国大陆株)14-3-3 重组蛋白的免疫保护力 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(6): 676-679, 706.
- [12] Zhang Y, Skolnick J. Scoring function for automated assessment of protein structure template quality[J]. Proteins, 2004, 57(4): 702-710.
- [13] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction [J]. Nat Protoc, 2010, 5(4): 725-738.
- [14] Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans-review of current knowledge[J]. Int J Parasitol, 2014, 44(1): 9-18.
- [15] 罗波, 李想, 周必英. 寄生虫 14-3-3 蛋白的研究进展 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(2): 178-183.
- [16] 范金亮, 等. 细粒棘球绦虫 14-3-3 与 MKK2 酵母双杂交载体的构建及自激活鉴定 [J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(12): 894-897, 876.
- [17] 李文桂, 朱佑明, 王鸿. 多房棘球绦虫重组 BCG-Em II /3 疫苗免疫小鼠后脾细胞亚群的动态观察 [J]. 免疫学杂志, 2008(6): 641-643.
- [18] 王强, 王娅娜, 王程铖, 等. 细粒棘球绦虫重组蛋白 14-3-3 和 Eg10 免疫差异的初步研究 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2014, 51(3): 592-596.
- [19] 倪旭健, 孙芬芬, 冯婷婷, 等. 细粒棘球绦虫重组 GST 蛋白的原核表达及生物信息学分析 [J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(7): 565-568.
- [20] 赵商岐, 孔慧芳, 周彦霞, 等. 细粒棘球绦虫 EgG1Y162-2 与 CTLA-4IgV-EgG1Y162-2 蛋白结构预测及表位分析比较 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(5): 546-551.
- [21] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction [J]. BMC Bioinformatics, 2008(9): 40.

【收稿日期】 2022-01-11 【修回日期】 2022-04-02