

DOI:10.13350/j.cjpb.230210

· 论著 ·

# 猪囊尾蚴排泄分泌抗原 TP<sub>x</sub> 蛋白的筛选验证、 T 细胞抗原表位预测及真核表达\*

何威,李丽竹,孙晓晴,罗波,周必英\*\*

(遵义医科大学寄生虫学教研室,贵州遵义 563000)

**【摘要】** **目的** 在对猪囊尾蚴及其排泄分泌抗原(excretory secretory antigen,ESA)非标定量(label-free quantification,LFQ)蛋白质组学分析的基础上,筛选并验证具有调控 T 细胞免疫应答功能的硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase,TP<sub>x</sub>)蛋白,预测 TP<sub>x</sub> 蛋白的亲水性和 T 细胞抗原表位并进行真核表达。 **方法** 对猪囊尾蚴 ESA 差异蛋白进行基因本体论(gene ontology,GO)富集和生物学功能注释,筛选 TP<sub>x</sub> 蛋白。运用平行反应监测技术(parallel reaction monitoring,PRM)验证 TP<sub>x</sub> 蛋白。运用 Kyte & Doolittle 法预测 TP<sub>x</sub> 蛋白的亲水性,运用 Propred 软件预测 TP<sub>x</sub> 蛋白 T 细胞抗原表位。采用基于 PCR 准确合成(PCR-based accurate synthesis,PAS)方法,全基因合成 TP<sub>x</sub> 抗原编码基因并克隆至 pcDNA3.4 载体,构建重组质粒 pcDNA3.4-TP<sub>x</sub>,转染至 HEK293 细胞,表达和纯化 TP<sub>x</sub> 蛋白。 **结果** 根据 GO 富集和生物学功能注释,筛选出差异表达量最大的 TP<sub>x</sub> 蛋白。TP<sub>x</sub> 蛋白经 PRM 验证,LFQ 蛋白质组学与靶向蛋白质组学对 TP<sub>x</sub> 蛋白表达量的趋势一致。预测该蛋白为亲水性蛋白,且含有多个可能的优势 T 淋巴细胞抗原表位。重组质粒 pcDNA3.4-TP<sub>x</sub> 构建正确,经 SDS-PAGE 电泳分析和 Western blot 鉴定,在细胞培养上清获得相对分子质量约为  $26 \times 10^3$  的 TP<sub>x</sub> 蛋白,且纯化后带有 His 标签的 TP<sub>x</sub> 重组蛋白能被抗 His 单克隆抗体识别。 **结论** 成功实现了对猪囊尾蚴 ESA 中 TP<sub>x</sub> 蛋白的筛选、验证、T 细胞抗原表位预测和真核表达,且表达的 TP<sub>x</sub> 蛋白具有反应原性,为该蛋白的进一步研究奠定了基础。

**【关键词】** 猪囊尾蚴;排泄分泌抗原;硫氧还蛋白过氧化物酶;抗原表位预测;真核表达

**【中图分类号】** R383.34

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)02-0174-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Feb;18(2):174-179,184.]

## Screening, validation, T-cell antigenic epitopes prediction and eukaryotic expression of *Cysticercus cellulosae* excretory-secretory antigen thioredoxin peroxidase protein

HE Wei, LI Li-zhu, SUN Xiao-qing, LUO Bo, ZHOU Bi-ying (Department of Parasitology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** Based on the label-free quantification (LFQ) proteomics analysis of *Cysticercus cellulosae* and its excretory-secretory antigen (ESA), thioredoxin peroxidase (TP<sub>x</sub>) protein with the function of regulating T cell immune response was screened and verified. The hydrophilicity and T-cell antigenic epitopes of TP<sub>x</sub> protein were predicted and expressed in eukaryotic cells. **Methods** The gene ontology (GO) enrichment and biological function annotation of *Cysticercus cellulosae* ESA differential proteins to screen the TP<sub>x</sub> protein. The TP<sub>x</sub> protein was verified by parallel reaction monitoring (PRM). The hydrophilicity of TP<sub>x</sub> protein was predicted by the Kyte & Doolittle method, and the T-cell antigenic epitopes of TP<sub>x</sub> protein was predicted by Propred software. The TP<sub>x</sub> antigen-encoding gene was synthesized by PCR-based accurate synthesis (PAS), cloned into the pcDNA3.4 vector to construct recombinant plasmid pcDNA3.4-TP<sub>x</sub>, which was transfected into HEK293 cells to express and purify TP<sub>x</sub> protein. **Results** According to GO enrichment and biological function annotation, the highest differentially expressed TP<sub>x</sub> protein was screened. TP<sub>x</sub> protein was validated by PRM, and the trend of TP<sub>x</sub> protein expression was consistent between LFQ proteomics and targeted proteomics. The protein was predicted to be a hydrophilic protein and contained multiple possible predominant T lymphocyte antigenic epitopes. The TP<sub>x</sub> protein with relative molecular weight of  $26 \times 10^3$  was obtained in cell culture supernatant by SDS-PAGE and Western blot identification, and the purified TP<sub>x</sub> recombinant protein with His tag could be recognized by anti-His monoclonal antibody. **Conclusion** The screening, verification, T-cell antigenic epitope

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81960378);贵州省遵义市科技计划项目(遵市科合 HZ 字[2021]278 号);遵义医科大学学术新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2020]-004);遵义医科大学研究生教育创新计划项目(ZYK70)

\*\* **【通讯作者】** 周必英, E-mail: zbyzl01@126.com

**【作者简介】** 何威(1996-),男,广东梅州,硕士在读,主要研究方向:寄生虫感染与免疫。E-mail:787626157@qq.com

prediction and eukaryotic expression of the TPx protein in *Cysticercus cellulosae* ESA have been successfully achieved, and the expressed TPx protein had reactivity, laying a foundation for further study of the protein.

**【Key words】** *Cysticercus cellulosae*; excretory-secretory antigen; thioredoxin peroxidase; epitope prediction; eukaryotic expression

猪囊尾蚴病(*Cysticercosis cellulosae*)是由猪带绦虫(*Taenia solium*, Ts)的幼虫—猪囊尾蚴(*Cysticercus cellulosae*)寄生于人体皮下、肌肉、脑和眼等引起的一种严重危害人类健康和畜牧业发展的人畜共患寄生虫病<sup>[1]</sup>。该病呈全球性分布,在国外主要分布于拉丁美洲、非洲和亚洲的发展中国家,在我国主要集中在东北、华北、西北和西南的农村及少数民族地区<sup>[2-3]</sup>。研制保护性疫苗是防治猪囊尾蚴病的一种经济有效手段,鉴于猪囊尾蚴病的免疫发病机制尚未阐明,乃是制约该病疫苗研制的重要瓶颈之一<sup>[4-5]</sup>。

寄生虫在感染过程中直接排泄或分泌的混合产物称为排泄分泌抗原(excretory-secretory antigen, ESA)。研究发现,寄生虫ESA可影响宿主CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比值变化,诱导宿主产生具有免疫抑制作用的细胞及其因子,从而逃避宿主的免疫攻击<sup>[6-7]</sup>。Fan等<sup>[8]</sup>报道猪囊尾蚴ESA不仅可诱导CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T细胞比例失调,还可诱导Treg细胞数量增加及IL-10水平表达上调。此外,猪囊尾蚴ESA还可显著诱导Th2型免疫应答产生,从而发挥免疫逃避作用。为进一步寻找猪囊尾蚴ESA中参与调控T细胞免疫应答的蛋白分子,本实验在对猪囊尾蚴及其ESA的LFQ蛋白质组学分析基础上<sup>[9]</sup>,拟筛选并验证猪囊尾蚴ESA中参与调控T细胞免疫应答的硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPx)蛋白,预测其亲水性和T细胞抗原表位,并全基因合成TPx抗原编码基因,构建重组质粒pcDNA3.4-TPx,转染至HEK293细胞,表达和纯化TPx蛋白,为TPx蛋白的进一步研究打下基础。

## 材料与方 法

### 1 材 料

胰酶购于美国Promega公司;乙腈和超纯水购于美国Fisher Chemical公司;三氟乙酸购于美国Sigma-Aldrich公司;甲酸购于德国Fluka公司;碘代乙酰胺,二硫苏糖醇和尿素购自于美国Sigma公司;蛋白酶抑制剂购自于德国Calbiochem公司;EcoRI和BamHI购自日本Takara公司;大肠埃希菌Top 10感受态细胞,质粒pcDNA3.4, pfu DNA聚合酶, HEK293细胞和His标签抗体均购自中国南京钟鼎生物技术有限公司;转染试剂PEI购自美国Polyscience公司;琼脂糖购自中国上海基因公司;DNA胶纯化试剂盒和质粒抽

提试剂盒购自美国Axygen公司;胰蛋白胍和酵母抽提物购自英国Oxoid公司。

### 2 方 法

**2.1 TPx蛋白筛选** 基于猪囊尾蚴及其ESA的蛋白组学分析,对猪囊尾蚴及其ESA差异蛋白进行鉴定。将每个蛋白在多次重复样本中的相对定量值均值之比作为差异倍数(fold change, FC)。计算公式:  $FC_{A/B,k} = Mean(R_{ik}, i \in A) / Mean(R_{ik}, i \in B)$ 。其中A代表猪囊尾蚴, B代表猪囊尾蚴ESA, R表示蛋白相对定量值, i表示样本数, k表示蛋白。

将每个蛋白在比较组样本中的相对定量值进行t检验,通过计算相应的P值判断其差异的显著性。去除无定量信息和重复性不好的蛋白,选择P<0.05的蛋白。当P<0.05时,以差异倍数超过1.5作为显著上调的变化阈值,小于1/1.5作为显著下调的变化阈值。因此,猪囊尾蚴ESA的差异蛋白将在差异倍数小于1/1.5区域筛选。随后将猪囊尾蚴ESA差异蛋白进行基因本体论(gene ontology, GO)富集和生物学功能注释,筛选猪囊尾蚴ESA中TPx蛋白。

**2.2 TPx蛋白验证** 将猪囊尾蚴及其ESA进行等量酶解,用裂解液将体积调整至一致。缓慢加入终浓度20%三氟乙酸,涡旋混匀,4℃沉淀2h,4500g离心5min,弃上清,用预冷的丙酮洗涤沉淀2~3次,沉淀晾干;加入终浓度200mmol/L四乙基溴化铵,超声打散沉淀,以1:50比例(蛋白酶:蛋白, m/m)加入胰蛋白酶,酶解过夜;加入二硫苏糖醇使其终浓度为5mmol/L,56℃还原30min;加入碘乙酰胺使其终浓度为11mmol/L,室温避光孵育15min。

肽段用液相色谱流动相A(含0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液)溶解后使用EASY-nLC1000超高效液相色谱系统分离,分离物注入NSI离子源中电离后进行Q ExactiveTM Plus质谱分析。离子源电压设置为2.1kV,肽段母离子及其二级碎片均使用高分辨的Orbitrap进行检测和分析。

**2.3 TPx蛋白亲水性和T细胞抗原表位预测** 运用Kyte & Doolittle(<http://organelledb.lsi.umich.edu>)预测TPx蛋白亲水性;运用Propred软件预测分析该蛋白的T淋巴细胞抗原表位。

**2.4 TPx抗原编码基因合成和引物设计** 根据NCBI数据库猪带绦虫TPx基因序列(GenBank: AHZ89374.1)。设计全长拼接引物,在引物两端分别

引入 *Eco*R1(GAATTC)和 *Bam*HI(GGATCC)酶切位点和保护性碱基,采用基于 PCR 准确合成(PCR-based accurate synthesis, PAS)的方法<sup>[10]</sup>,全基因合成 TP<sub>x</sub>。

**2.5 pcDNA3.4-TP<sub>x</sub> 重组质粒的构建与鉴定** 将 TP<sub>x</sub> 目的基因经 *Eco*R1 和 *Bam*HI 双酶切后连接至真核表达载体 pcDNA3.4 中,构建重组质粒 pcDNA3.4-TP<sub>x</sub>,随后转化至大肠埃希菌 Top10 感受态细胞。挑取阳性克隆子,抽提质粒,进行酶切和测序鉴定。

**2.6 哺乳动物细胞瞬时转染及表达** HEK293 细胞处于对数生长期,生长至  $(1.8 \sim 2.2) \times 10^6$  cells/ml,且活力大于 95%时,将质粒 DNA 及聚乙烯亚胺转染剂加入转染缓冲液,混匀,37 °C 孵育 15 min。随后将孵育的质粒加入 HEK293 细胞中,37 °C 悬浮培养。在转染 24 h 后补充生长因子和氮源,第 6 d 进行计数,观察细胞状态,计算死亡率。取菌液 5 000 r/min 离心 15 min,分别收集细胞培养上清和细胞。用 PBS 重悬细胞沉淀,超声波破碎后分别收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析目的蛋白表达情况。

**2.7 TP<sub>x</sub> 重组蛋白的纯化** 将 Ni 柱与透析过夜的细胞培养上清在旋转孵育器 4 °C 孵育 3~4 h 后缓慢加入纯化空柱中,用 Washing Buffer(20 mmol/L 咪唑,50 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,pH 8.0)以 1 mL/min 流速冲洗,至流出液 A<sub>280</sub> 值到达基线,收集柱层析流出液和杂蛋白洗脱液。用 Elution Buffer(200 mmol/L 咪唑,50 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,pH 8.0)以 1 mL/min 流速洗脱目的蛋白,透析后进行 SDS-PAGE,分析其纯化效果。

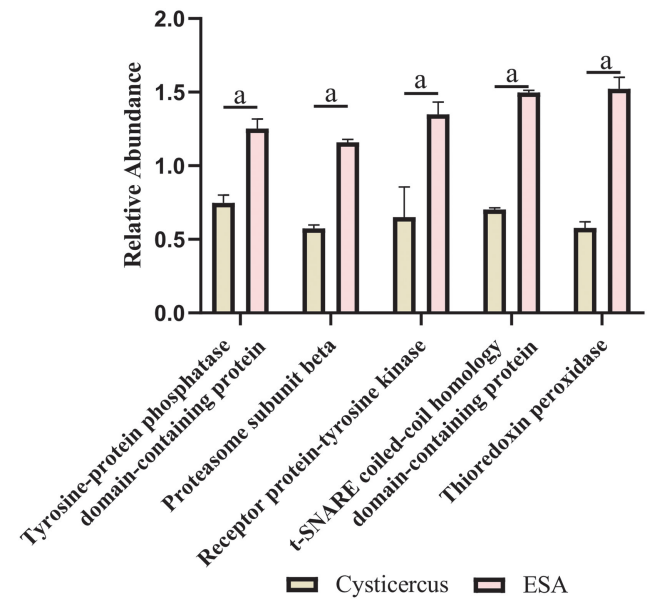
**2.8 纯化蛋白的 Western Blot 鉴定** 另将表达蛋白 SDS-PAGE 电泳后的凝胶以恒压 100 V 转膜约 1.5 h。PBS 洗涤 4 次,每次 5 min,置于 5% 脱脂奶粉中 37 °C 封闭 1 h;加入 1 : 1000 稀释的 His 标签抗体,

4 °C 过夜,37 °C PBST 洗涤 4 次,每次 5 min;加入 1 : 5000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG,37 °C 孵育 1 h,37 °C PBST 洗涤 4 次,每次 5 min,ECL 显影采集图像。

## 结 果

### 1 TP<sub>x</sub> 蛋白筛选

对猪囊尾蚴 ESA 差异蛋白进行生物学功能注释,其中含酪氨酸蛋白磷酸酶域的蛋白(tyrosine-protein phosphatase domain-containing protein)、蛋白酶体亚基 β(proteasome subunit beta)、酪氨酸激酶受体(receptor protein-tyrosine kinase)、t-SNARE 卷曲螺旋同源结构域蛋白(t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein)和 TP<sub>x</sub> 共 5 个蛋白具有调控 T 细胞免疫应答功能,选择差异表达最大的 TP<sub>x</sub> 蛋白(A0A0R3W7L6)作为重点研究对象(表 1 和图 1)。



注:a 组间比较,  $P < 0.05$

图 1 蛋白差异表达量

Note:a Comparison between groups,  $P < 0.05$

Fig.1 Differential expression of proteins

表 1 具有调控 T 细胞免疫应答功能的蛋白

Table 1 Proteins with the function of regulating T cell immune response

Protein accession	Protein description	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	FC <sub>A/B</sub>	P value
A0A0R3WDB8	Tyrosine-protein phosphatase domain-containing protein	0.7054	0.7299	0.8065	1.3211	1.1908	1.2463	0.5965	0.00049870
A0A0R3VT49	Proteasome subunit beta	0.6016	0.5615	0.5614	1.1370	1.1783	1.1601	0.4962	0.00001026
A0A158R9E3	Receptor protein-tyrosine kinase	0.5956	0.8783	0.4806	1.4320	1.2638	1.3498	0.4831	0.01361241
A0A158R8G6	t-SNARE coiled-coil homology domain-containing protein	0.6901	0.7125	0.7038	1.4868	1.4914	1.5154	0.4687	0.00000027
A0A0R3W7L6	Thioredoxin peroxidase	0.6023	0.5306	0.5999	1.5996	1.5259	1.4416	0.3794	0.00004629

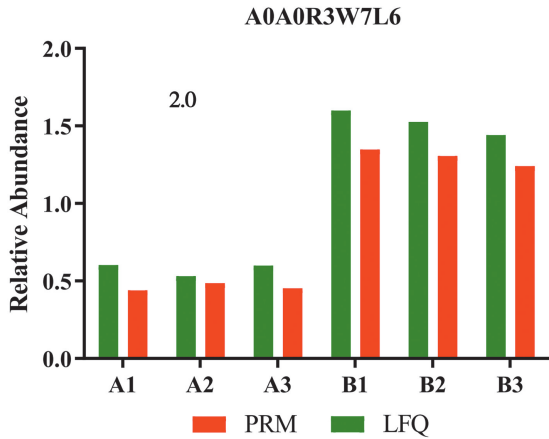
注:A 猪囊尾蚴;B 猪囊尾蚴 ESA;FC<sub>A/B</sub> 为 A 相对于 B 蛋白表达量的变化比例,比值越低说明在 ESA 中表达量越高。

Notes:A *Cysticercus cellulosae*;B *Cysticercus cellulosae* ESA;FC<sub>A/B</sub> The ratio of change in A relative to B protein expression. The lower the ratio,the higher the expression in ESA.



## 2 TPx 蛋白验证

将筛选的 TPx 蛋白采用平行反应监测技术 (parallel reaction monitoring, PRM) 进行验证, 结果如图 2, TPx 蛋白的差异表达量在 LFQ 蛋白质组学与靶向蛋白质组学 (PRM) 的变化趋势一致。



注: A 猪囊尾蚴 B 猪囊尾蚴 ESA

图 2 TPx 蛋白的验证

Note: A *Cysticercus cellulosae* B *Cysticercus cellulosae* ESA

Fig. 2 Validation of TPx protein

## 3 TPx 蛋白亲水性和 T 细胞抗原表位预测

通过 Kyte & Doolittle 法 (<http://organelledb.lsi.umich.edu>) 预测 TPx 蛋白为亲水性蛋白 (图 3); 通过 Propred 软件中 Rothbard-Taylor 方法预测分析 TPx 蛋白的 16-21、81-85、120-125、134-137、152-162 和 178-183 氨基酸区段有优势的 T 淋巴细胞抗原表位 (图 4)。

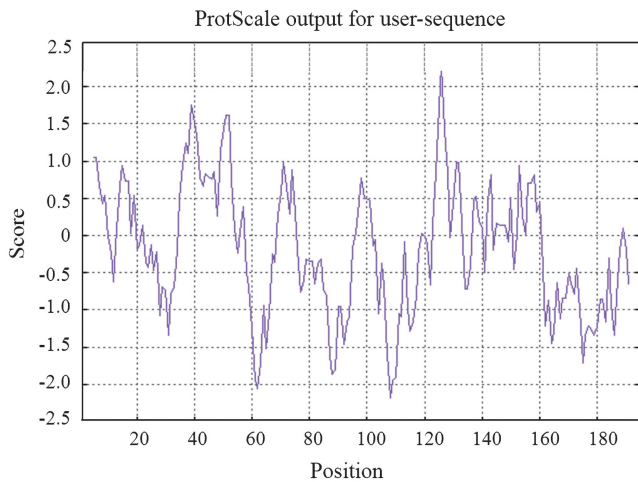


图 3 TPx 蛋白亲水性预测

Fig. 3 Hydrophobicity prediction of TPx protein

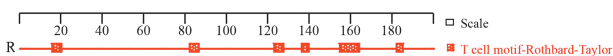


图 4 TPx 蛋白 T 细胞抗原表位预测

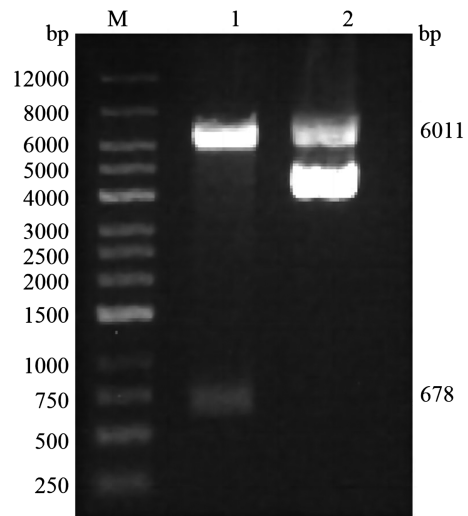
Fig. 4 T-cell antigenic epitopes prediction of TPx protein

## 4 重组质粒 pcDNA3. 4-TPx 的酶切和测序鉴定

重组质粒 pcDNA3. 4-TPx 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得 6 011 bp 的 pcDNA3. 4 载体片段和 678 bp 的 TPx 目的基因片段, 与预期相符。测序结果与预期的 TPx 基因序列进行比对, 匹配度为 100%, 重组质粒 pcDNA3. 4-TPx 构建成功 (图 5)。

## 5 TPx 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

将重组质粒 pcDNA3. 4-TPx 转染至 HEK293 细胞, 培养至第 6 d, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析表达蛋白相对分子质量约  $26 \times 10^3$ , 且主要存在于重组质粒转染细胞培养上清 (图 6, 图 7)。表达蛋白经柱层析纯化后进行 SDS-PAGE, 显示为相对单一的 26 ku 蛋白条带 (图 8)。经 Western blot 分析, 显示该蛋白可被 Anti-His 标签抗体识别, 且仍具有反应原性 (图 9)。



M DNA 标志物 1 pcDNA3. 4-TPx 双酶切 2 pcDNA3. 4-TPx

图 5 重组质粒 pcDNA3. 4-TPx 酶切鉴定

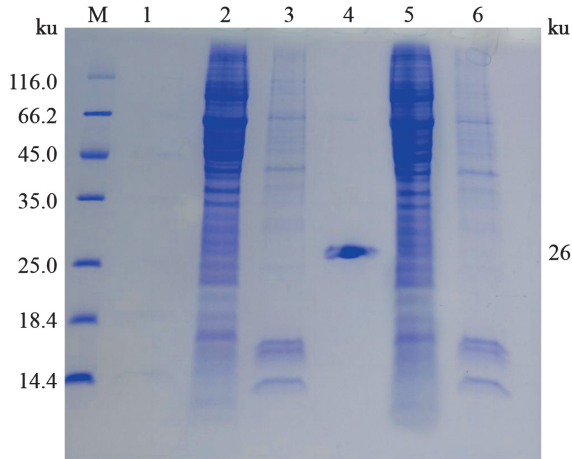
M DNA marker 1 pcDNA3. 4-TPx double enzyme digestion  
2 pcDNA3. 4-TPx

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pcDNA3. 4-TPx by enzyme digestion

## 讨论

猪囊尾蚴病是一种呈全球性分布的人畜共患寄生虫病, 其免疫发病机制较为复杂, 其中, 猪囊尾蚴 ESA 是影响宿主免疫应答的重要因素之一, 且已证明猪囊尾蚴 ESA 可参与调控 T 细胞免疫应答。为进一步寻找猪囊尾蚴 ESA 中参与调控 T 细胞免疫应答的蛋白分子, 本实验在猪囊尾蚴及其 ESA 的 LFQ 蛋白质组学分析基础上, 对猪囊尾蚴 ESA 差异蛋白进行 GO 富集和生物学功能注释, 发现其中有 5 个蛋白具有调控 T 细胞免疫应答的功能, 并筛选出差异常表达量最大的 TPx 蛋白。TPx 蛋白属于过氧化物还原蛋白超家族成员, 广泛表达于寄生虫各个生长发育阶段及其 ESA

中<sup>[11-14]</sup>。结合文献查阅,寄生虫 TPx 蛋白可参与调控宿主免疫应答,诱导宿主 CD4<sup>+</sup> T 细胞亚群分化,产生 Th 混合免疫反应<sup>[15-19]</sup>。推测 TPx 蛋白可能是猪囊尾蚴 ESA 调控 T 细胞免疫应答的主要成分之一,因此选取该蛋白作为重点研究对象。

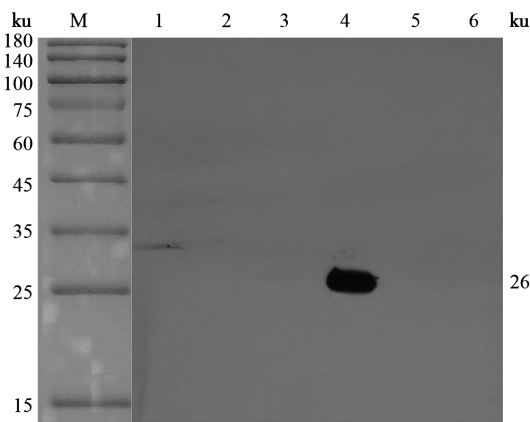


M 蛋白质分子质量标准 1 空质粒转染细胞培养上清 2 空质粒转染细胞裂解上清 3 空质粒转染细胞裂解沉淀 4 重组质粒转染细胞培养上清 5 重组质粒转染细胞裂解上清 6 重组质粒转染细胞裂解沉淀

图 6 TPx 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 Culture supernatant of empty plasmid-transformed cells 2 Lysate supernatant of empty plasmid-transformed cells 3 Lysate precipitation of empty plasmid-transformed cells 4 Culture supernatant of recombinant plasmid-transformed cells 5 Lysate supernatant of recombinant plasmid-transformed cells 6 Lysate precipitation of recombinant plasmid-transformed cells

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of TPx recombinant protein expression

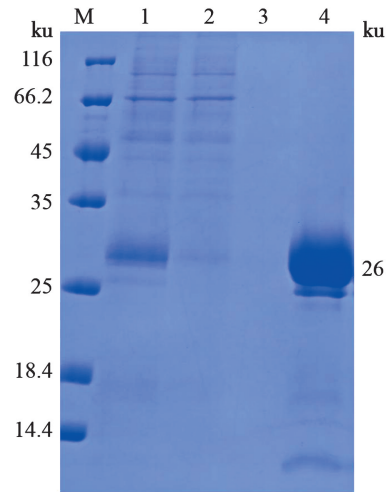


M 蛋白质分子质量标准 1 空质粒转染细胞培养上清 2 空质粒转染细胞裂解上清 3 空质粒转染细胞裂解沉淀 4 重组质粒转染细胞培养上清 5 重组质粒转染细胞裂解上清 6 重组质粒转染细胞裂解沉淀

图 7 TPx 重组蛋白表达的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1 Culture supernatant of empty plasmid-transformed cells 2 Lysate supernatant of empty plasmid-transformed cells 3 Lysate precipitation of empty plasmid-transformed cells 4 Culture supernatant of recombinant plasmid-transformed cells 5 Lysate supernatant of recombinant plasmid-transformed cells 6 Lysate precipitation of recombinant plasmid-transformed cells

Fig. 7 Western blot identification of TPx recombinant protein expression

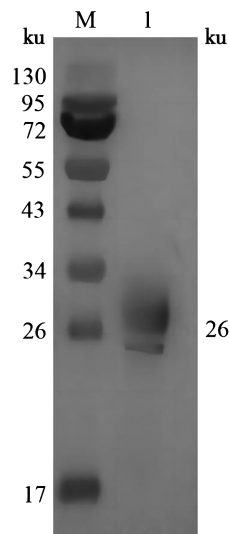


M 蛋白质分子质量标准 1 重组质粒转染细胞培养上清 2 柱层析流出液 3 杂蛋白洗脱液 4 重组蛋白洗脱液

图 8 TPx 重组蛋白的纯化

M Protein marker 1 Culture supernatant of recombinant plasmid-transformed cells 2 Column chromatography effluent 3 Heteroprotein eluate 4 Recombinant protein eluate

Fig. 8 Purification of TPx recombinant protein



M 蛋白标志物 1 纯化的 TPx 蛋白

图 9 纯化 TPx 蛋白的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1 Purified TPx protein

Fig. 9 Western blot identification of purified TPx protein

蛋白质组学技术在绦虫领域中已得到广泛研究和应用,靶向蛋白质组学已成为一种强大的蛋白质定量工具<sup>[20]</sup>,而 PRM 是靶向蛋白质组学数据采集的主流方法,基于高分辨率和高精确质谱仪的离子监测分析,通过对目标蛋白或特异性肽段进行选择检测,从而实现靶蛋白或目标肽段的定量<sup>[21]</sup>。其优点在于 PRM 具有极高的特异性,在复杂的生物样品中可提供更高的选择性,更有效地将目标肽的产物离子信号与共洗脱干扰区分开来,从而提高数据分析的质量<sup>[22-23]</sup>。鉴于猪囊尾蚴及其 ESA 成分复杂,本实验运用 PRM

技术对 TPx 蛋白进行验证。结果表明, LFQ 蛋白质组学与靶向蛋白质组学对 TPx 蛋白表达量的趋势一致。提示 TPx 蛋白在猪囊尾蚴及其 ESA 中均有表达, 且猪囊尾蚴 ESA 中 TPx 蛋白的表达量显著高于猪囊尾蚴。

经 Kyte & Doolittle 法预测 TPx 蛋白为亲水性蛋白, 该结果与 ExPASy-PortPara 法预测结果一致<sup>[24]</sup>, 本实验中检测表达蛋白也主要存在于细胞培养上清中。基于蛋白质组学分析, TPx 蛋白具有调控 T 细胞免疫应答的功能, 且 T 细胞抗原表位具有刺激机体活化 T 细胞免疫的作用<sup>[25]</sup>。为进一步了解 TPx 蛋白是否对 T 细胞具有免疫调节的功能, 对其潜在的优势 T 细胞抗原表位进行预测, 通过 ProPred 软件的 Rothbard-Taylor 方法预测 TPx 蛋白含有 6 个可能的优势 T 淋巴细胞抗原表位, 推测其具有激活 T 淋巴细胞免疫应答的能力。

采用 PCR 方法全基因合成 TPx 抗原编码基因, 克隆至 pcDNA3.4 载体, 构建 pcDNA3.4-TPx 重组质粒, 测序和酶切鉴定表明重组质粒 pcDNA3.4-TPx 构建正确。TPx 蛋白广泛存在于需氧真核生物体内, 在哺乳动物细胞系真核表达后进行蛋白质翻译修饰。为保持其生物活性, 本实验将构建的 pcDNA3.4-TPx 重组质粒转染至易于培养、转染率高的 HEK293 细胞<sup>[26]</sup>。经 SDS-PAGE 分析发现, TPx 重组蛋白主要表达于转染细胞后的培养上清, 因 SDS-PAGE 分析存在非特异性因素, 因此进一步通过特异性的 Western blot 以确定其存在于细胞培养上清液中。鉴于分泌到细胞培养上清中的 TPx-His 蛋白是无信号肽的成熟体蛋白, 具有天然的折叠结构且更加接近天然蛋白的生物学性质<sup>[27]</sup>。因此收集细胞培养上清进一步纯化 TPx 重组蛋白, 经 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定, 结果表明, 该蛋白相对分子质量约为  $26 \times 10^3$ , 与理论分子质量加上 His 标签分子质量的大小相符, 且纯化的 TPx 蛋白仍可被 Anti-His 标签抗体识别, 即仍具有反应原性。

本实验成功实现了对猪囊尾蚴 ESA 中 TPx 蛋白的筛选验证、亲水性及其 T 细胞抗原表位预测和真核表达, 为该蛋白的进一步研究奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcía M, et al. Host immune responses during *Taenia solium* neurocysticercosis infection and treatment[J]. PLoS Neg Trop Dis, 2020, 14(4): e0008005.
- [2] Dinh NN, John N, Kathleen B, et al. The epidemiology of porcine *Taenia solium* cysticercosis in communities of the central highlands in Vietnam[J]. Parasit Vectors, 2018, 11(1): 360.
- [3] 刘江水, 郭保民, 赵景娣, 等. 猪囊尾蚴病——猪囊虫病的诊治与公共卫生安全[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(Z1): 170-173.
- [4] Zhang Y, Luo B, Liu MC, et al. Analysis of immune response in BALB/c mice immunized with recombinant plasmids pMZ-X3-Ts14-3-3.3 and pMZ-X3-sp-Ts14-3-3.3 of *Taenia solium* [J]. Acta Trop, 2022(232): 106517.
- [5] Zhou BY, Sun JC, Li X, et al. Analysis of immune responses in mice orally immunized with recombinant pMG36e-SP-TSOL18/ *Lactococcus lactis* and pMG36e-TSOL18/ *Lactococcus lactis* Vaccines of *Taenia solium* [J]. J Immunol Res, 2018(2018): 9262631.
- [6] Della BC, Benagiano M, De GM, et al. T-cell clones in human trichinellosis: Evidence for a mixed Th1/Th2 response [J]. Parasit Immunol, 2017, 39(3): e12412.
- [7] Junginger J, Raue K, Wolf K, et al. Zoonotic intestinal helminths interact with the canine immune system by modulating T cell responses and preventing dendritic cell maturation [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10310.
- [8] Fan X, Zhang Y, Ouyang R, et al. *Cysticercus cellulosae* regulates T-cell responses and interacts with the host immune system by excreting and secreting antigens [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021(11): 728222.
- [9] 李丽竹. 基于蛋白质组学研究猪囊尾蚴排泄分泌抗原 LRRC15 蛋白对仔猪 T 细胞免疫应答的影响[D]. 遵义: 遵义医科大学, 2022.
- [10] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 791-797.
- [11] Wang H, Li J, Zhang C, et al. *Echinococcus granulosus sensu stricto*: silencing of thioredoxin peroxidase impairs the differentiation of protoscoleces into metacestodes [J]. Parasite, 2018(25): 57.
- [12] Dorey A, Cwiklinski K, Rooney J, et al. Autonomous non antioxidant roles for *Fasciola hepatica* secreted thioredoxin-1 and peroxiredoxin-1 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021(11): 667272.
- [13] Sangpairoj K, Changklungmoa N, Vanichviriyakit R, et al. Analysis of the expression and antioxidant activity of 2-Cys peroxiredoxin protein in *Fasciola gigantica* [J]. Exp Parasitol, 2014(140): 24-32.
- [14] Asahi H, Stadecker MJ. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection [J]. Parasitol Int, 2003, 52(4): 361-367.
- [15] Tian AL, Tian X, Chen D, et al. Modulation of the functions of goat peripheral blood mononuclear cells by *Fasciola gigantica* thioredoxin peroxidase in vitro [J]. Pathogens, 2020, 9(9): 758.
- [16] Anand SB, Rajagopal V, Kaliraj P. *Brugia malayi* thioredoxin peroxidase as a potential vaccine candidate antigen for lymphatic filariasis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167(5): 1351-1364.
- [17] Williams DL, Asahi H, Botkin DJ, et al. Schistosome infection stimulates host CD4(+) T helper cell and B-cell responses against a novel egg antigen, thioredoxin peroxidase [J]. Infect Immun, 2001, 69(2): 1134-1141.

- epithelial cell alarmins in asthma [J]. *Cells*,2022,11(7):2-26.
- [12] Kool M, Willart MM, Van NM, et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma [J]. *Immunity*,2011,34(4):527-40.
- [13] Hammad H, Chieppa M, Perros F, et al. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells [J]. *Nat Med*,2009,15(4):410-6.
- [14] Kim G, Hong M, Kashif A, et al. Der f 38 is a novel TLR4-binding allergen related to allergy pathogenesis from *Dermatophagoides farinae* [J]. *Int J Mol*,2021,22(16):110507
- [15] Janulaityte I, Januskevicius A, Kalinauskaitė-Zukauske V, et al. Asthmatic eosinophils promote contractility and migration of airway smooth muscle cells and pulmonary fibroblasts *in vitro* [J]. *Cells*,2021,10(6):1389.
- [16] Zhu X, Wang X, Wang Y, et al. Exosomal long non-coding RNA GAS5 suppresses Th1 differentiation and promotes Th2 differentiation via downregulating EZH2 and T-bet in allergic rhinitis - ScienceDirect [J]. *Mol Immunol*,2020,118(12):30-39.
- [17] Cho KA, Park M, Kim YH, et al. Th17 cell-mediated immune responses promote mast cell proliferation by triggering stem cell factor in keratinocytes [J]. *Biochem Bioph Res Co*,2017,487(4):856-61.
- [18] Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, et al. IFN- $\alpha$  and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells [J]. *J Immunol*,2001,166(9):5530-39.
- [19] Rezende RM. Cellular components and mechanisms of oral tolerance induction [J]. *Crit Rev Immunol*,2018,38(3):207-31.
- [20] Sol P, Santamaria P. Re-programming autoreactive T cells into T-regulatory type 1 cells for the treatment of autoimmunity [J]. *Front Immunol*,2021,12(4):e684240.
- [21] Giovannini CL, Marcet B, Moreilhon C, et al. Distinct epithelial gene expression phenotypes in childhood respiratory allergy [J]. *Eur Respir*,2012,39(5):1197-205
- [22] Legaki E, Arsenis C, Taka S, et al. DNA methylation biomarkers in asthma and rhinitis: Are we there yet? [J]. *Clin Transl Allergy*,2022,12(3):e12131.
- [23] Kirstin J, Wirz OF, Willem V, et al. Loss of regulatory capacity in Treg cells following rhinovirus infection [J]. *J Allergy Clin Immun*,2021,148(4):1016-29.
- [24] Tanwar S, Oguz C, Metidji A, et al. Type I IFN signaling in T regulatory cells modulates chemokine production and myeloid derived suppressor cells trafficking during EAE [J]. *J Autoimmun*,2020,115:e102525.
- [25] Yoon, Seok, Roh, et al. Toll-like receptor-7 (TLR7) signaling promotes non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting regulatory T cells in mice [J]. *AM J Pathol*,2018,188(11):2574-88.
- [26] 王沐. DDX 解旋酶家族分子功能的研究进展 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2020,27(10):1162-69.
- [27] Xu XX, Wan H, Nie L, et al. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor [J]. *Protein Cell*,2017,9(2):8.
- [28] Li Y, Begovich AB. Unraveling the genetics of complex diseases; susceptibility genes for rheumatoid arthritis and psoriasis [J]. *Semin Immunol*,2009,21(6):318-27.
- [29] 常文川,许昱. 变应性鼻炎关键基因的生物信息学分析 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2020,55(5):7.
- [30] Nejentsev S, Walker N, Riches D, et al. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes [J]. *Science*,2009,324(5925):387-89.

【收稿日期】 2022-09-08 【修回日期】 2022-11-26

(上接 179 页)

- [18] Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, et al. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages [J]. *FASEB J*,2008,22(11):4022-4032.
- [19] Jin QW, Zhang NZ, Li WH, et al. *Trichinella spiralis* thioredoxin peroxidase 2 regulates protective Th2 immune response in mice by directly inducing alternatively activated macrophages [J]. *Front Immunol*,2020(11):2015.
- [20] 李丽竹,罗波,周必英. 重要绦虫蛋白质组学研究进展 [J]. *中华地方病学杂志*,2021,40(8):684-688.
- [21] Shi T, Song E, Nie S, et al. Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research [J]. *Proteomics*,2016,16(15-16):2160-2182.
- [22] Peterson AC, Russell JD, Bailey DJ, et al. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics [J]. *Mol Cell Proteomics*,2012,11(11):1475-1488.
- [23] Sobsey CA, Ibrahim S, Richard VR, et al. Targeted and untargeted proteomics approaches in biomarker development [J]. *Proteomics*,2020,20(9):e1900029.
- [24] 尹才. 猪带绦虫硫氧还蛋白过氧化物酶的原核表达及其生物学特性分析 [D]. 兰州:甘肃农业大学,2014.
- [25] 蔡瑞琨. 高免疫原性 T 细胞抗原表位预测方法的研究 [D]. 武汉:华中科技大学,2012.
- [26] Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*,2005,51(3):187-200.
- [27] 李丽竹,周必英. 猪囊尾蚴排泄分泌抗原 LRRC15 蛋白真核表达及抗原表位预测 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*,2022,34(3):286-291.

【收稿日期】 2022-10-11 【修回日期】 2022-12-26