

DOI:10.13350/j.cjpb.230408

• 论著 •

# 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\*

张晓磊\*\*, 赵利娜, 郭坦达, 贾久祺, 薛猛, 韩新年, 刘哲, 张进顺

(河北北方学院医学检验学院, 河北张家口 075000)

**【摘要】** 目的 克隆刚地弓形虫 P30 基因, 从生物信息学角度分析 P30 基因编码蛋白的结构与抗原表位, 预测该蛋白的免疫原性。方法 提取刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) RH 株速殖子总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 NheI 和 Afl II 双酶切后与真核表达载体 PVAXI 连接, 转化后通过菌落 PCR、双酶切和测序鉴定。使用 ProtParam、ProtScale、SOSU、SWISS-MODEL、SOPMA、Bcepred 和 TMHMM 等在线分析工具, 分析 P30 蛋白的物理和化学性质、亲水性、疏水性、二级结构、表面可及性、柔韧性、细胞定位、跨膜结构域、信号肽、翻译后修饰位点、结构域、功能域、抗原表位和三级结构。结果 RT-PCR 扩增大小为 789 bp, 菌落 PCR 显示, 在约 789 bp 处出现特异性扩增片段, 与预期大小相符, 阳性 PVAXI-P30 重组质粒经 NheI 和 Afl II 双酶切获得大小为 789 bp 和 3 000 bp 的两条条带, 大小与目的基因和载体片段相等, 测序结果显示, P30 基因大小为 789 bp, 与 GenBank 的 P30 基因(登录号为 X14080.1)核苷酸序列一致性为 100%。P30 蛋白含有 336 个氨基酸, 分子式为  $C_{1525}H_{2459}N_{409}O_{477}S_{21}$ , 相对分子质量为  $34.83 \times 10^3$ , 理论等电点 (8.34), 不稳定指数 (36.70), 脂溶性指数 (80.15), 消光系数 (20970),  $A_{280}$  (0.602), P30 亲水性氨基酸分布在整条链上, 具有两亲性, 在 P30 蛋白的 336 个氨基酸中,  $\alpha$ -螺旋 (Hh) 占 22.32%,  $\beta$ -折叠 (Ee) 占 26.49%,  $\beta$ -转角 (Tt) 占 8.04%, 无规则卷曲 (Cc) 占 43.15%, 表面可及性参数得分  $\geq 1.9$  的区域是 11 个, 柔韧性参数得分  $\geq 2.0$  的区域和亲水性参数得分  $\geq 1.9$  的区域均有 6 个, 翻译后修饰位点有 6 个, 保守结构域有 5 类, 潜在 B 细胞抗原表位共 13 个, 8 个潜在限制性 CTL 细胞抗原表位, 13 个潜在辅助 T 细胞抗原表位, P30 蛋白最有可能是定位于真核细胞线粒体内的可溶性表达蛋白。结论 刚地弓形虫 P30 基因编码的蛋白为可溶性表达蛋白, 具有免疫原性, 可为弓形虫病疫苗的研制提供理论基础。

**【关键词】** 刚地弓形虫; P30; 克隆; 蛋白结构; 抗原表位

**【中图分类号】** R382.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)04-0411-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):411-415,420.]

## Cloning of P30 gene from *Toxoplasma gondii* and analyzing of encoded protein structure and antigen epitope from bioinformatics

ZHANG Xiao-lei, ZHAO Li-na, GUO Tan-da, JIA Yong-qi, XUE Meng, HAN Xin-nian, LIU Zhe, ZHANG Jin-shun (College Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** Cloning the *Toxoplasma gondii* P30 gene and analyzing the structure and epitope of *Toxoplasma gondii* P30 gene encoding protein from the perspective of bioinformatics, to predict the immunogenicity of the protein. **Methods** Total RNA was extracted from tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii*, primers were designed according to the open reading frame of the P30 gene (Accession No. X14080.1), RT-PCR amplification, the amplified product of RT-PCR was digested with double restriction enzyme NheI and Afl II, and ligated into the eukaryotic expression vector PVAXI. The recombinant plasmid was transferred into E. coli XL-Blue, the positive clones was selected through the colony-PCR and confirmed by the double restriction enzyme digestion and sequencing. Using the online biological software as ProtParam, ProtScale, SOSU, SWISS-MODEL, SOPMA, Bcepred and TMHMM, the physical and chemical properties (including molecular weight, isoelectric point, stability index, amino acid composition, extinction coefficient, etc.), hydrophilicity, hydrophobicity, secondary structure, surface accessibility, flexibility, cell location, transmembrane domain, signal peptide, post-translational modification sites, structural domain, functional domain, Epitopes (B cell epitopes, T cell epitopes) and tertiary structure of the P30 protein were analyzed. **Results** The RT-PCR products of P30 were 789 bp consistent with expected size, by agarose gel electrophoresis, the colony PCR products appear at the place of 789 bp in line with the expected size, the positive PVAXI-P30 recombinant plasmid were double

\* **【基金项目】** 河北省自然科学基金项目(No. H2013405091);河北省高等学校科学技术研究重点项目(No. ZH2012010);河北北方学院青年基金项目(No. QN2020031);河北省大学生创新创业训练计划项目(No. xj202155)。

\*\* **【通讯作者(简介)】** 张晓磊(1986-),女,河北承德人,硕士,实验师,主要从事寄生虫分子生物学方面的研究。E-mail:lxz725@163.com

digested to obtain two bands with sizes of 789 bp and 3 000 bp, which were equal to the target gene and vector fragment, sequencing results showed that obtained P30 was 789 bp, compared with the existing sequence of *Toxoplasma gondii* P30 gene on GenBank, sequence consistency of 100%. P30 protein had 336 amino acids, the molecular formula was  $C_{1525}H_{2459}N_{409}O_{477}S_{21}$ , the molecular mass was  $34.83 \times 10^3$ , the theoretical isoelectric point (8.34), the instability index (36.70), the fat solubility index (80.15), the extinction coefficient (20970),  $A_{280}$  (0.602), the P30 protein hydrophilic amino acids were distributed in the entire chain and were amphiphilic, the average hydrophobicity coefficient of the P30 protein was 0.129, among the 336 amino acids of the P30 protein,  $\alpha$ -helix (Hh) accounts for 22.32%,  $\beta$ -sheet (Ee) accounts for 26.49%,  $\beta$ -turn (Tt) accounts for 8.04%, and random coils (Cc) accounts for 43.15%, the surface area of  $\geq 1.9$  parameter score were eleven, the regions with flexibility parameter score  $\geq 2.0$  were six, the regions with hydrophilicity parameter score  $\geq 1.9$  were six, post-translational modification sites were six, conserved domain class were five, potential B cell epitopes were thirteen, potential restricted CTL cell epitopes were eight, potential helper T cell epitopes were thirteen, the P30 protein had the transmembrane region and the signal peptide sequence, and was most likely a soluble protein expressed in the mitochondria of eukaryotic cells. **Conclusion** The protein encoded by the P30 gene of *Toxoplasma gondii* is a soluble protein expressed and has immunogenicity, which lays the foundation for subsequent research on the P30 protein.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; P30; clone; protein structure; epitope

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)为专性寄生在细胞内的原虫,恒温动物感染可引起弓形虫病<sup>[1]</sup>。在我国弓形虫病的感染率为7.88%,大多为隐性感染,感染者多为免疫功能低下者和孕妇<sup>[2-4]</sup>。弓形虫P30抗原(SAG1)只存在于弓形虫速殖子期,在弓形虫缓殖子期不表达,孢子期也不表达<sup>[5-6]</sup>。P30表达的抗原具有较强的免疫原性和免疫保护性,可刺激机体产生IgG、IgA、IgM抗体及细胞因子IFN- $\gamma$ 等杀虫体,是主要的疫苗候选基因之一<sup>[7-8]</sup>。本研究通过克隆P30基因并采用生物信息学分析软件,对P30基因的二级结构特征和B细胞、T细胞抗原表位进行预测和分析,寻找优势抗原表位区域,为弓形虫病疫苗的研制提供理论基础。

## 材料与方法

### 1 材料

**1.1 材料** rTaq DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸、T4DNA连接酶、10×T4DNA连接酶缓冲液、DNA Marker均购于宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶NheI、Afl II购于Fermentas公司;RNA抽提试剂盒、第一链反转录试剂盒购于美国Invitrogen公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

### 2 方法

**2.1 引物序列和RT-PCR扩增** 根据弓形虫P30基因全长编码序列(登录号为X14080.1)的开放阅读框设计引物,引物上游:5'-CTAGCTAGCATGACGGA GAACCACTTCACT-3',引物下游:5'-CCCTTAAG CTACGCGACACAAGCTGCGATAG-3'(下划线部分分别为NheI和Afl II的酶切位点),产物长度为789

bp。Trizol提取的弓形虫总RNA反转录成cDNA, RT-PCR扩增反应体系(25  $\mu$ L)为:10×buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L(2.5 mmol/L),上、下游引物各1  $\mu$ L(10  $\mu$ M),模板60 ng, DNA聚合酶1  $\mu$ L,补水至。PCR条件为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 45 s,58  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,共循环30个;72  $^{\circ}$ C 10 min。进行0.8%琼脂糖凝胶电泳验证。

**2.2 真核表达载体的构建与鉴定** NheI和Afl II双酶切PCR产物和真核质粒PVAXI后于16  $^{\circ}$ C连接过夜,连接产物转化后进行菌落PCR、单酶切、双酶切和测序鉴定。

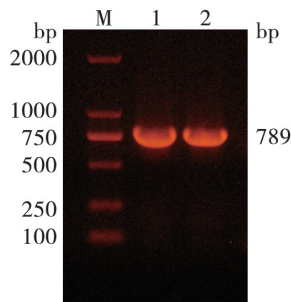
**2.3 P30蛋白生物信息学分析** 通过ProtParam(<http://.expasy.org/tools/protparam.html>)在线分析工具,分析P30的物理和化学性质(包括分子量、等电点、稳定性指数、氨基酸组成、消光系数等);通过ProtScale(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)分析P30的亲水性和疏水性;SOSUI(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosuil/>)程序分析其可溶性;通过SOPMA([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))和Bcepred(<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred>)在线程序,结合Gene Runner软件分析P30的二级结构、表面可及性、柔韧性、亲水性、疏水性;通过Expasy预测P30的超螺旋;通过TargetP 1.1 Server-prediction results预测P30的细胞定位;通过TMHMM程序(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白的跨膜结构域;通过SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)程序分析蛋白的信号肽;通过MotifScan([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan))预测P30蛋白翻译后

的修饰位点;通过 NCBI 的 Interproscan(<http://www.ebi.ac.uk/Interproscan>)预测 P30 的保守结构域及功能域通过蛋白质分析系统 EXPASY proteomic (<http://www.expasy.org/tools/#pattern>) 的 SWISS-MODEL 模型软件模拟 P30 的三级结构;通过软件 ABCpred 和 Bepipred 1.0b server 共同分析 P30 蛋白具体的 B 细胞抗原表位;通过 SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/Epitope Prediction.htm>)分析 P30 蛋白的 T 细胞抗原表位。

## 结果

### 1 弓形虫 P30 基因 RT-PCR 扩增

模板为弓形虫速殖子 cDNA,扩增后基因片段为 789 bp,与预期片段大小一致(图 1)。



M DNA 标志物 1、2 P30 基因 RT-PCR 扩增扩增产物

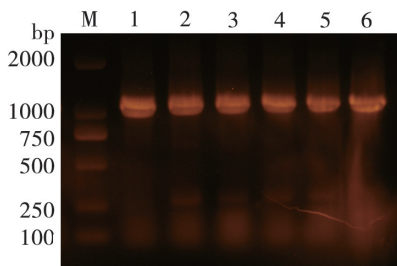
图 1 P30 基因 RT-PCR 扩增

M DL 2000 1、2 P30 gene

Fig.1 Amplification of P30 gene

### 2 PCR 扩增产物的克隆

连接产物转入感受态细胞后用卡那霉素筛选阳性克隆,得到菌落 PCR 阳性扩增产物(图 2)。



M DNA 标志物 1~5 PCR 扩增产物的克隆

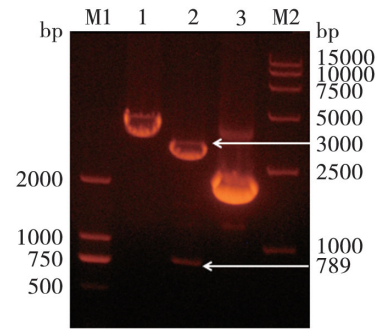
图 2 PCR 扩增产物的克隆

M DL 2000 1-5 PCR products of positive clones

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of positive clones

### 3 重组质粒的酶切结果

阳性 PVAXI-P30 重组质粒经双酶切获得大小为 789 bp 和 3 000 bp 的两条条带,大小与目的基因和载体片段相等(图 3)。



M1、M2 DNA 标志物 1 单酶切 2 双酶切 3 重组质粒

图 3 重组质粒的酶切结果

M1、M2 DNA marker 1 Single enzyme digestion 2 Double enzyme digestion 3 Recombinant plasmid

Fig.3 Identification by restriction enzymes of recombinant plasmid

### 4 弓形虫 P30 基因测序

经测序 P30 基因大小为 789 bp,与 GenBank 的 P30 基因(登录号为 X14080.1)核苷酸序列一致性为 100%。

### 5 P30 蛋白生物信息学分析

**5.1 P30 蛋白物理和化学性质** 经 ProtParam 分析, P30 蛋白由 336 个氨基酸组成,酸性氨基酸(K, R)占 28 个,碱性氨基酸(D, E)占 24 个,疏水氨基酸(A, I, L, F, W, V)为 35.4%,极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y)为 31.6%,分子式为  $C_{1525}H_{2459}N_{409}O_{477}S_{21}$ ,相对分子质量为  $34.83 \times 10^3$ ,理论等电点 8.34,不稳定指数 36.70,脂溶性指数 80.15,消光系数 20 970,  $A_{280}$  为 0.602。

**5.2 P30 蛋白亲水性和疏水性预测** 根据 protscale 软件预测结果(负值越大表示亲水性越好,正值越大表示疏水性越强),P30 亲水性氨基酸分布在整条链上,具有两性亲性;SOSUI 程序分析发现,P30 蛋白的平均疏水性系数为 0.129(图 4)。横轴为蛋白质的氨基酸位置,纵轴表示亲水性得分(疏水性用正值表示,亲水性用负值表示)。

**5.3 P30 蛋白二级结构及表面可及性、柔韧性、亲(疏)水性预测** 经 SOPMA 分析发现 P30 蛋白的 336 个氨基酸中, $\alpha$ -螺旋(Hh)占 22.32%, $\beta$ -折叠(Ee)占 26.49%, $\beta$ -转角(Tt)占 8.04%,无规则卷曲(Cc)占 43.15%。经 Bcepred 程序和 Gene Runner 分析,P30 蛋白含有亲水性参数得分  $\geq 1.9$  的区域是 6 个,分别是 62-65、106-111、165-168、224-229、259-263、287-291 位氨基酸;6 个柔韧性参数得分  $\geq 2.0$  的区域,分别是 60-62、104-105、107-108、239-240、256-261、286-288 位氨基酸;表面可及性参数得分  $\geq 1.9$  的区域有 11 个,分别是 22-23、61-65、74-76、86-87、96-98、223-228、241-243、250-255、260-261、272-274、289-293 位氨基酸。分值越高,亲水性越高,柔韧性和表面可及性也就

越好,作为潜在 B 细胞抗原表位的机会越高。

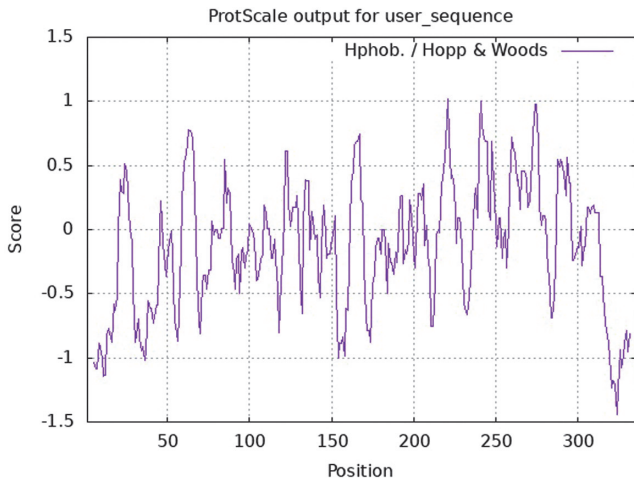


图 4 P30 蛋白的亲/疏水性(箭头表示强亲水性氨基酸所在的区域)  
Fig. 4 Hydrophilic and hydrophobic profile of the protein of P30(The arrow indicates the region where the strong hydrophilic amino acid is located)

5.4 P30 蛋白的超螺旋预测 经 ExPASy 的 Coils 分析,表明沿着序列分布 P30 蛋白形成卷曲螺旋的倾向性较小(图 5)。横轴为蛋白质的氨基酸位置,纵轴为 Coils 存在的倾向性指数。

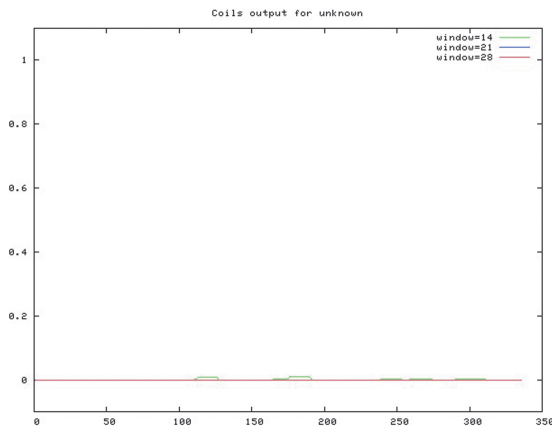


图 5 P30 蛋白的 Coils 预测结果  
Fig. 5 Prediction of the coils for P30

5.5 P30 蛋白的细胞定位预测 经 TargetP 1.1 Server - prediction results 预测 P30 在细胞内的定位,临界值为 0,P30 在线粒体的可能性为 0.819,为分泌蛋白的可能性为 0.145,以其他形式存在的可能性仅 0.054,因此 P30 最可能定位真核细胞线粒体。

5.6 P30 蛋白跨膜区及信号肽预测 TMHMM 分析结果显示,P30 蛋白存在跨膜区域(图 6),且存在信号肽序列。横轴为蛋白质的氨基酸位置,纵轴为跨膜区域存在的可能性。

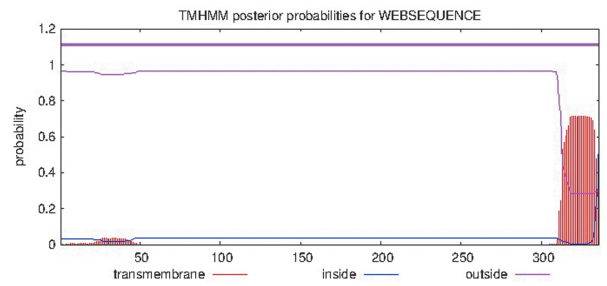


图 6 P30 蛋白的跨膜区域预测图  
Fig. 6 Prediction of the transmembrane domains in P30 protein

5.7 P30 蛋白质的翻译后修饰位点 经 MotifyScan 推测其翻译后的修饰位点有 6 个:N-糖基化位点 1 个(258-261AA),cAMP-和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点 1 个(63-66AA),酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 3 个(59-62,72-75,242-245AA),N-豆蔻酰化位点 11 个(44-49,105-110,140-145,160-165,193-198,232-237,257-262,264-269,284-289,303-308,326-331AA),蛋白激酶 C 磷酸化位点 7 个(79-81,111-113,242-244,261-263,268-270,296-298,307-309AA),酪氨酸激酶磷酸化位点 1 个(221-229AA),不含亮氨酸拉链模式。

5.8 P30 蛋白保守结构域和功能域的预测 经软件预测结果,P30 主要有 5 类保守结构区域,其中 1 个信号肽序列(1-47 位氨基酸,其中信号肽的 N-端为 1-25 位氨基酸,信号肽的 C-端为 38-47,信号肽的亲水性区域为 26-37 位氨基酸),2 个蛋白超家族(52-179 位氨基酸和 181-301 位氨基酸),2 个 SRS 区域(185-300 和 55-176 位氨基酸),8 个原虫表面抗原标志区域(分别是 68-83、143-161、170-186、265-275、187-206、208-223、243-255、275-290 位氨基酸),1 个非胞浆区域。

5.9 预测 P30 蛋白高级结构 蛋白质分析系统的模型组装软件模拟的 P30 三级结构(图 7)。

5.10 预测 P30 蛋白 B 细胞抗原表位 通过软件(Bepipred 1.0b server、ABCpred)分析 P30 的 B 细胞抗原表位,氨基酸序列的分值越高代表其抗原性越强,选取 13 个潜在抗原表位序列(预测分值 > 0.35)(表 1)。

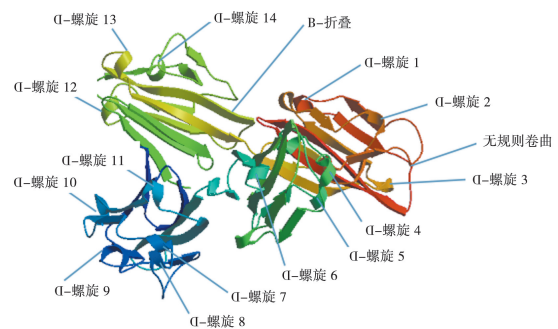


图 7 P30 蛋白的同源模建空间结构  
Fig. 7 The model of steric structure of P30

表 1 P30 氨基酸序列中潜在 B 细胞抗原表位  
Table 1 B cell epitopes of amino acid sequence of P30

顺序 order	氨基酸位置 The position of amino acids	潜在的 B 淋巴细胞抗原表位序列 The potential B epitopes Sequences of antigens
1	47-53	MASDPPLV
2	59-66	TCPDKKST
3	85-112	TALTEPPTLAYSPNRQICPAGTTSSCTS
4	122-137	PEAEDSWWTGDSASLD
5	163-168	KGDDAQ
6	192-200	YGADSTL
7	202-210	KLSAEGPTT
8	218-231	DGVKVPQDNN
9	234-238	TLTGC
10	250-266	LTENPWQGNASSDKGAT
11	273-278	AFPAES
12	286-293	TGGSPEKH
13	304-315	AAGSAKSAAGTA

5.11 P30 的 T 细胞抗原表位预测 经 SYFPEITHI 分析 P30 的限制性 CTL 细胞表位 HLA-A \* 02:01, 氨基酸序列的分值越高代表抗原性越强, 选取 8 个潜在抗原表位序列(预测分值 > 21)(表 3), 这表明 P30 蛋白能与限制性 CTL 细胞表位 HLA-A \* 02:01 较好的结合, 并且可被 HLA-DRB1 \* 0401 限制性分子递呈, 有机会作为 CTL 细胞抗原表位; 采用 SYFPEITHI 预测 P30 的 HLA-DRB1 \* 0401 限制性 Th 细胞表位, 氨基酸序列的分值越高代表抗原性越强, 选取 13 个 HLA-DRB1 \* 0401 限制性 Th 细胞表位序列(预测分值 > 21)(表 2)。

表 2 SYFPEITHI 预测 P30 的 HLA-A \* 02:01 限制性 CTL 表位  
Table 2 SYFPEITHI predicts HLA-A \* 02: 01 restricted CTL epitope of P30

顺序 order	氨基酸位置 The position of amino acids	潜在的 CTL 抗原表位序列 The potential CTL epitopes Sequences of antigens	分值 Score
1	319-327	SIFAMVIGL	26
2	135-143	SLDTAGIKL	24
3	212-220	TLVCGKDG V	23
4	323-331	MVIGLIGSI	23
5	45-53	VMASDPDLV	22
6	116-124	TLSSLIPEA	22
7	326-334	GLIGSIAAC	22
8	327-335	LIGSIAACV	22

## 讨 论

弓形虫是细胞内寄生虫, 可侵袭除红细胞外的各种细胞, 引起弓形虫病。先天性弓形虫病是胎儿在母体子宫内经胎盘而感染, 也能经胎盘污染羊水, 进入胎儿的胃肠道。据统计, 1-10/万活婴儿患有先天性弓形虫病<sup>[9]</sup>。目前, 大部分弓形虫先天性感染, 还不能通过产科设施来确诊<sup>[10]</sup>。获得性弓形虫病是出生后由外

界获得的感染, 多数为隐性感染, Anradha 等<sup>[11]</sup>研究发现 AIDS 所致的免疫损害患者中 45% 可患弓形虫脑炎。

表 3 SYFPEITHI 预测 P30 的 HLA-DRB1 \* 0401 辅助性 T 细胞表位  
Table 3 SYFPEITHI predicts HLA-DRB1 \* 0401 helper T cell epitope of P30

顺序 order	氨基酸位置 The position of amino acids	潜在的 CTL 抗原表位序列 The potential CTL epitopes Sequences of antigens	分值 Score
1	16-30	TSMFPKAVRRAVTAG	28
2	20-34	PKAVRRAVTAGVFAA	26
3	28-42	TAGVFAAPTLMSFLR	26
4	34-48	APTLMSFLRCGVMAS	26
5	98-112	NRQICPAGTTSSCTS	26
6	322-336	AMVIGLIGSIAACVA	26
7	125-139	EDSWWTGDSASLDTA	22
8	147-161	IEKFPVTTQTFVVGC	22
9	189-203	RCSYGADSTLGPVKL	22
10	240-254	EKSFKDILPKLTENP	22
11	252-266	ENPWQGNASSDKGAT	22
12	271-285	KEAFPAESKSVIIGC	22
13	298-312	KLEFAGAAGSAKSA	22

弓形虫表面抗原是一个庞大家族, 弓形虫表面抗原(SAG)在侵入宿主、逃避免疫中发挥着重要作用, 主要包括 SAG1 (P30)、SAG2 (P22)、SAG3 (P43)、SAG4 (P18)、SAG5、BSR4 (P36) 及 P35 (SRS3) 等, 随着弓形虫生活阶段的不同, 其表面抗原也不完全相同<sup>[12]</sup>。SAG1 (P30) 是弓形虫速殖子期具有特异性的主要表面抗原, 可促使抗体 (IgG、IgM、IgA 等) 和细胞因子 (IFN- $\gamma$ ) 的分泌, 诱导宿主产生免疫应答。

本实验对弓形虫 P30 基因进行 RT-PCR 扩增, 成功克隆了 P30 基因, 大小为 789 bp, PVAXI 质粒和 P30 目的片段经 NheI、Afl II 内切酶双酶切后连接, 成功构建了 PVAXI-P30 真核重组载体。经生物信息学分析后发现 P30 蛋白的氨基酸是 336 个, 分子式为 C<sub>1525</sub>H<sub>2459</sub>N<sub>409</sub>O<sub>477</sub>S<sub>21</sub>, 相对分子质量为 34.83 × 10<sup>3</sup>, 理论等电点 (8.34), 不稳定指数 (36.70), 脂溶性指数 (80.15), 消光系数 (20970), OD<sub>280</sub> (0.602), P30 亲水性氨基酸分布在整条链上, 具有两亲性, 在 P30 蛋白的 336 个氨基酸中,  $\alpha$ -螺旋 (Hh) 占 22.32%,  $\beta$ -折叠 (Ee) 占 26.49%,  $\beta$ -转角 (Tt) 占 8.04%, 无规则卷曲 (Cc) 占 43.15%, 表面可及性参数得分  $\geq 1.9$  的区域是 11 个, 6 个柔韧性参数得分  $\geq 2.0$  的区域, 亲水性参数得分  $\geq 1.9$  的区域有 6 个, 翻译后修饰位点有 6 个, 保守结构域有 5 类, 潜在 B 细胞抗原表位共 13 个, 8 个潜在限制性 CTL 细胞抗原表位, 13 个潜在辅助 T 细胞抗原表位, P30 最可能是定位于真核细胞线粒体内的可溶性表达蛋白。

(下转 420 页)

结果分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2015, 27(4): 381-385

[8] 刘道华, 汪天平, 郭见多, 等. 皖南山区学生并殖吸虫感染现状调查分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2014, 12(4): 230-233.

[9] 章乐生, 李婷婷, 张世清, 等. 安徽省休宁县并殖吸虫感染情况调查[J]. 热带病与寄生虫学, 2021, 19(6): 325-328.

[10] 王承全, 杨绍金, 潘会明, 等. 饮用水感染肺吸虫病的实验研究[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(7): 675-676.

[11] 李友松, 林金祥, 程由注. 并殖吸虫尾蚴人工感染家狗的实验观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 1986, 04: 31-33.

[12] 刘道华, 郭见多, 汪天平, 等. 2013~2016年安徽省并殖吸虫病监测结果分析[J]. 热带病与寄生虫学, 2017, 15(3): 155-158.

[13] 刘道华, 郭见多, 章乐生, 等. 安徽石台肺吸虫感染情况调查[J]. 热带病与寄生虫学, 2019, 17(2): 94-96.

[14] 林宇光. 斯氏并殖吸虫的生活史及其地理分布研究[J]. 武夷科学, 1981, 1: 95-112.

[15] 陈韶红, 周晓农, 张永年, 等. 卫氏并殖吸虫感染犬循环抗原和特异性抗体的动态观察[J]. 中国兽医寄生虫病, 2007, 15(5): 11-14.

[16] 胡文英, 保陶, 保和珍. 卫氏并殖吸虫实验感染家犬的观察[J]. 南通医学院学报, 1987, 7(3): 15-17.

[17] 高劲松, 刘约翰, 王小根, 等. 大剂量吡喹酮治疗家犬卫氏并殖吸虫感染的实验观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(3): 61-62.

[18] 朱金昌, 陈国荣, 刘明达. 家犬卫氏并殖吸虫病伴随免疫的研究[J]. 温州医学院学报, 1993, 3(1): 129-131.

[19] 章乐生, 王旗, 李清越, 等. 不同动物宿主感染卫氏并殖吸虫后的抗体动态变化[J]. 热带病与寄生虫学, 2019, 17(2): 63-65.

[20] 冯笑川, 沈一平, 蔡士椿. 感染卫氏并殖吸虫的犬和小白鼠循环抗原动态观察[J]. 上海免疫学杂志, 1989, 9(5): 267-269.

[21] 蒋作君, 沈一平, 赵慰先. 卫氏并殖吸虫囊蚴-童虫特异血清学抗原及其单克隆抗体的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1991, 7(3): 11-13.

[22] 赵凤梧, 张德才, 于吉安, 等. 并殖吸虫尾蚴直接感染动物的实验研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1989, 2(2): 93-96.

[23] 章子豪, 沈一平, 吴观陵, 等. 犬和大鼠感染卫氏并殖吸虫后的抗体反应动态[J]. 上海免疫学杂志[J]. 1982, 2(4): 6-10.

[24] 胡文庆, 刘登宇. 卫氏并殖吸虫(二倍体)在大鼠体内发育的观察[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(1): 54-56.

[25] 严涛, 李国良. 卫氏并殖吸虫童虫的生物学特性[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(6): 370-373.

[26] 李友松, 林金祥, 张子伯, 等. 福建省两型并殖吸虫混合感染的调查研究[J]. 中华传染病杂志, 1987, 5(4): 221-224

[27] 陆予云, 刘巧, 唐高兴, 等. 广东省部分地区卫氏并殖吸虫分布与DNA序列分析[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(3): 275-283.

[28] 胡坤敏, 陈韶红, 艾琳, 等. 豫皖闽浙4省溪蟹并殖吸虫囊蚴核糖体ITS2和线粒体CO1基因序列分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病学, 2020, 38(1): 87-93.

[29] 钱宝珍, 沈琦. 卫氏并殖吸虫致病品系PCR-RAPD分子标记的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(3): 249-251.

[30] 樊培方, 陈黛霞, 张子和, 等. 安徽南部卫氏并殖吸虫囊蚴和成虫研究[J]. 动物学报, 1979, 25(4): 347-352.

[31] 程由注, 程娇英, 林爱琴, 等. 卫氏并殖吸虫二倍体型子雷蚴、尾蚴活体形态观察[J]. 实用寄生虫病杂志, 1995, 3(1): 41.

【收稿日期】 2022-10-20 【修回日期】 2023-01-16

(上接 415 页)

【参考文献】

[1] 付晓莹, 冯永杰, 梁宏德, 等. 中国弓形虫分离株基因型及致病性的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(7): 669-673.

[2] Hegab SM and HL-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis [J]. Clin Exp Med, 2003, 3(2): 84-105.

[3] Rorman E, Iamir CS, Rilki I, et al. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection [J]. Reprod Toxicol, 2006, 21(4): 458-472.

[4] Hughes HP. Toxoplasmosis: the need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment [J]. Current Top Microbiol Immunol, 1985, 120(2): 105-139.

[5] Alexandre J, Jebbari H, Buiethmann H, et al. Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1996, 219(11): 188-190.

[6] 李俊华, 吴少庭, 翁亚彪, 等. 弓形虫疫苗及其保护性研究现状[J]. 中国病原生物学杂志, 2006, 1(1): 58-61.

[7] 杨雯, 田春林, 朱穗京, 等. 弓形虫表面抗原SAG1基因的克隆表达、纯化及鉴定[J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(2): 205-208.

[8] Henriquez FL, Woods S, Cong H, et al. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design [J]. Trend Parasitol, 2010, 26(11): 550-555.

[9] El Hajj H, Lebrun M, Fourmaux MN, et al. Inverted topology of the *Toxoplasma gondii* ROP5 protein provides new insights into the association of the ROP2 protein family with the parasitophorous vacuole membrane [J]. Cell Microbiol, 2007, 9(1): 54-64.

[10] Yamada H, Tairaku S, Morioka I, et al. Nationwide survey of mother-to-child infections in Japan [J]. Infect Chemother, 2014, 11(14): 387-400.

[11] Anradha B, Preethi C. Seroprevalence of *Toxoplasma* IgG antibodies in HIV positive patients in and around Khammam, Telangana State [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(9): DL01-2.

[12] 何勇, 周鹏, 尹创成, 等. 弓形虫主要表面抗原的研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(5): 95-98.

【收稿日期】 2022-10-26 【修回日期】 2023-01-08