

DOI:10.13350/j.cjpb.230711

• 论著 •

弓形虫缓殖子期抗原 1 的原核表达及其多克隆抗体制备与初步应用^{*}

幸忆恩^{1,2,3}, 吴宏宇^{1,4}, 蔡亦红^{1,2,3**}

(1. 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫, 安徽合肥 20032; 2. 安徽医科大学病原生物学安徽省重点实验室; 3. 安徽医科大学人畜共患病安徽高校省级重点实验室; 4. 安徽医科大学第一临床医学院)

【摘要】 目的 对弓形虫缓殖子期抗原 1 (BAG1) 基因进行优化、克隆、原核表达, 表达产物纯化后免疫小鼠, 制备 BAG1 多克隆抗体, 评价重组蛋白的免疫原性, 并观察 BAG1 在虫体内的定位。方法 对 bag1 基因序列进行筛选和优化, 利用生物信息学方法分析其编码蛋白的氨基酸序列结构和功能, 预测其免疫原性。将合成的 pET28a(+)-bag1 质粒转化至 BL21 感受态细胞中, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h, 用 HIS 标签蛋白纯化试剂盒纯化表达蛋白。取纯化蛋白做 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 用 BCA 法测定蛋白浓度。取 7 只 BALB/c 小鼠, 取纯化的 BAG1 蛋白与等体积的弗氏佐剂按双推法混匀, 皮下多点注射免疫小鼠, 每鼠每次注射蛋白 25 μg (第一次使用弗氏完全佐剂, 后两次均使用弗氏不完全佐剂, 每隔两周免疫一次), 末次免疫 4 d 后摘眼球取血, 分离血清, 以此为一抗, 采用 Western blot 检测碱性条件下我国流行优势基因型 Chinese 1 虫株 (TgCtwh6) 速殖子向缓殖子转化及含有 TgCtwh6 包囊小鼠脑组织中的 BAG1 蛋白, 间接免疫荧光 (IFA) 试验检测 TgCtwh6 虫株碱性诱导成为缓殖子情况。结果 预测 BAG1 含有 7 个潜在抗原表位, 具有良好的免疫原性。Western blot 显示, BAG1 多克隆抗体能识别在体外碱性培养基诱导的 TgCtwh6 和小鼠脑组织内形成的 TgCtwh6 虫株缓殖子; IFA 结果显示, BAG1 多克隆抗体能识别体外诱导的 TgCtwh6 缓殖子, 且 BAG1 蛋白主要定位在弓形虫的胞质中。结论 成功制备弓形虫 BAG1 多克隆抗体, 该抗体能识别我国优势流行虫株的 BAG1 蛋白及缓殖子, 为我国流行虫株的监测和鉴定提供了良好的手段。

【关键词】 弓形虫; Chinese 1 基因型; BAG1; 多克隆抗体

【中图分类号】 R382.5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)07-0803-05

[Journal of Pathogen Biology, 2023 Jul; 18(7): 803-807.]

Prokaryotic expression of *Toxoplasma* reticulata subphase antigen 1 and preparation and preliminary application of its polyclonal antibody

XING Yien^{1,2,3}, WU Hongyu^{1,4}, CAI Yihong^{1,2,3} (1. Department of Health Inspection and Quarantine, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. The Key Laboratory of Microbiology and Parasitology of Anhui Province, Anhui Medical University; 3. The Provincial Key Laboratory of Zoonoses of High Institutions in Anhui, Anhui Medical University, Anhui Medical University; 4. The First Academy of Clinical Medical, Anhui Medical University) ^{***}

【Abstract】 **Objective** The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigen 1 (BAG1) gene was optimized, cloned and prokaryotically expressed. The expression product was purified and immunized to mice, which to prepare BAG1 polyclonal antibody. The immunogenicity of recombinant protein was evaluated, and the localization of BAG1 in the worm was observed.

Methods The bag1 gene sequence was screened and optimized. The structure and function of its amino acid sequence was analyzed by bioinformatics to predict its immunogenicity. The synthetic pET28a(+)-bag1 plasmid was transformed into BL21 receptor cells, and the expression was induced by adding isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) to a final concentration of 1 mmol/L at 37 °C for 4 hs. The protein was purified by using HIS tag protein purification kit. The purified proteins were subjected to SDS-PAGE gel electrophoresis, and the protein concentration was determined by BCA method. The purified BAG1 protein was mixed with an equal volume of Freund's adjuvant according to the double-push method. Then, Seven BALB/c mice were immunized subcutaneously with 25 μg purified protein three times (the first time with Freund's complete adjuvant, and the next two times with Freund's incomplete adjuvant, and the mice were immunized every two weeks) by subcutaneous multi-point injection. In the 4 days after the last immunization, blood was taken from the

* **【基金项目】** 安徽省高校自然科学研究重点项目 (No. KJ2020A0153); 安徽医科大学博士基金项目 (No. XJ202005); 安徽医科大学基础和临床合作研究计划项目 (No. 2021xkjT033)。

** **【通讯作者】** 蔡亦红, E-mail: yihongcai2022@163.com

【作者简介】 幸忆恩 (1994-), 女, 广东梅州人, 硕士研究生, 研究方向: 感染与免疫。E-mail: 664106716@qq.com

eyes of the mice. The serum was separated and used as primary antibody. Western blot was used to detect the conversion to TgCtwh6 tachyzoites to retarded colonies of alkaline conditions. The BAG1 proteins of brain tissue containing TgCtwh6 encapsulated mice was detected. The alkaline induction to TgCtwh6 strains of retarded colonies was detected by indirect immunofluorescence assay. **Results** It was predicted that BAG1 had 7 potential epitopes with good immunogenicity. Western blot results showed that the BAG1 polyclonal antibody recognized the BAG1 protein induced by alkaline medium in TgCtwh6 *in vitro* and the formation of TgCtwh6 bradyzoites in mouse brain tissues. IFA results showed that the BAG1 polyclonal antibody specifically recognized the TgCtwh6 bradyzoites induced by alkaline and BAG1 protein localized in the cytoplasm of *Toxoplasma gondii*. **Conclusion** The polyclonal antibody against *Toxoplasma gondii* BAG1 was successfully prepared and specifically recognized the BAG1 protein in bradyzoite of TgCtwh6. It provides good ways for monitoring and identifying epidemic strain of China.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; Chinese 1 genotype strain; BAG1; polyclonal antibodies

刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种专性细胞内寄生原虫,可感染所有有核细胞^[1]。人主要通过摄入被猫排出的卵囊污染的食物、水、含有组织囊肿的未煮熟或生肉而感染,世界上多达三分之一的人口弓形虫血清学检测为阳性^[2-3]。弓形虫初次感染在免疫力正常的人群多为无症状或一过性发热,但在孕妇会造成不良妊娠结局^[4]。急性感染后虫体形成缓殖子依旧潜伏在宿主体内,如脑、肌肉、心脏等,当机体免疫力下调,如艾滋病患者、器官移植患者等,虫体被再激活,造成严重后果,甚至致死^[5-6]。目前尚无特效药物可清除在宿主体内寄生的弓形虫缓殖子^[7]。

弓形虫缓殖子期抗原 1 (bradyzoite antigen 1, BAG1)是一种 30 ku 细胞质蛋白,与植物的小热休克蛋白具有同源性,属于缓殖子期特异性表达蛋白^[8]。有研究表明,BAG1 可诱发 IFN- γ 介导的细胞免疫,并且在弓形虫感染小鼠体内抗 BAG1 抗体可持久存在^[9]。由此可见,BAG1 既可作为弓形虫慢性感染临床诊断的标志物,也可用于制备疫苗。本实验对 BAG1 基因进行优化、克隆、表达,表达蛋白纯化后初步检测其免疫原性,并观察 BAG1 在虫体内的定位,探讨其作为弓形虫疫苗候选抗原的可能性,为进一步研究该蛋白的生物学功能提供工具和线索。

材料与方 法

1 材 料

1.1 虫株、细胞及实验动物 非洲绿猴肾细胞(Vero)由实验室液氮保种,我国流行优势基因型 Chinese 1 虫株(TOXO DB#9)强毒株 TgCtwh3 和弱毒株 TgCtwh6 为本实验室液氮保种,复苏后直接注射于昆明鼠腹腔内传 2~3 代后用于实验。TgCtwh6 株包囊鼠由本室传代保存。BALB/c 小鼠周龄 6~8 周,购于安徽医科大学动物中心。实验动物按照安徽医科大学《研究动物护理和使用指导原则》进行饲养。

1.2 主要试剂 弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA; 货号: F5881)和弗氏不完全佐剂

(Freund's incomplete adjuvant, FIA; 货号: F5506)均购自美国 Sigma 公司; HIS 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型, 货号: P229S), 双抗, 胰酶消化液及 5 \times Loading Buffer 购自上海碧云天生物技术有限责任公司; DMEM 高糖培养基, PRMI1640 培养基和胎牛血清购自美国 BI 公司。碱性培养基: RMPI1640 培养基辅以 10 mol/L 的 NaOH, 将 pH 调节至 8.1。

2 方 法

2.1 pET28a(+)-bag1 质粒的转化、合成与表达 从 NCBI 数据库中获得弓形虫 BAG1 的蛋白编码区(Coding Sequence, CDS), 委托北京擎科生物科技有限公司合成 pET28a(+)-bag1 质粒。将 pET28a(+)-bag1 质粒转化至 BL21 感受态细胞中, 然后均匀涂布于卡那霉素 LB 平板上, 倒置培养 12~14 h。挑取单克隆菌落接种于含 1:1 000 卡那霉素 LB 培养液中, 培养至对数期至 A₆₀₀ 值约为 1.0 时, 留取 1 mL 菌液作为诱导前对照, 其余加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h。收集菌液至离心管中, 4 $^{\circ}$ C、15 000 g 离心 1 min, 弃上清, 收集沉淀, 按照 HIS 标签蛋白纯化试剂盒(耐变性剂型)说明书加入裂解液, 充分重悬菌体, 超声破碎 30 min(功率 300 W, 每超声 2 s 间歇 2 s), 按照蛋白纯化试剂盒说明书纯化目的蛋白。取洗脱蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分析纯化效果; 采用 BCA 法测定蛋白浓度。

2.2 小鼠免疫 取 7 只 BALB/c 小鼠, 将纯化的 BAG1 蛋白与等体积的弗氏佐剂按双推法混匀后皮下多点注射免疫小鼠, 每鼠每次注射蛋白 25 μ g(第一次使用弗氏完全佐剂, 后两次均使用弗氏不完全佐剂, 每隔两周免疫一次)。末次免疫 4 d 后处死小鼠, 摘眼球取血, 分离血清, 于-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 碱性条件下 TgCtwh6 速殖子向缓殖子诱导转化的检测 将 Vero 细胞消化重悬后加至 6 孔板用含有 0.1% 双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(pH 7.2)进行培养。待 Vero 细胞生长达到孔底面积的 80% 时

接种 TgCtwh6 速殖子,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。接种 24 h 后用 pH8.1 的 1640 培养基(含 2% 胎牛血清和 0.1% 双抗)进行培养,每隔 1 d 换液一次。分别于碱性培养的第 0、1、2、3、4、5 d 用 RIPA 裂解液虫体,提取总蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转印到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次(10 min/次);加入制备的 BAG1 多克隆抗体(1 : 1000)4 °C 孵育过夜,同上洗涤;将膜转至 1 : 10000 稀释的羊抗鼠二抗中室温孵育 1.5 h,用上述方法洗涤后用成像仪成像。

2.4 rBAG1 多抗 Western blot 检测 含 TgCtwh6 包囊小鼠脑组织中的 BAG1 分别取 TgCtwh3 速殖子、TgCtwh6 保种包囊鼠、正常昆明鼠脑组织的蛋白样品,经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白后转印到 PVDF 膜上,同方法 2.3 进行 Western blot,评价 rBAG1 多抗对含有 TgCtwh6 包囊小鼠脑组织中 BAG1 的识别作用。

2.5 rBAG1 多抗间接免疫荧光法(IFA)检测 TgCtwh6 缓殖子 碱性诱导 TgCtwh6 速殖子向缓殖子转化第 5d 后终止培养,PBS 洗涤 3 次,5 min/次;每孔入 500 μL 4% 多聚甲醛固定 15 min,洗涤;每孔加入 500 μL 0.2% TritonX-100 透膜 20 min,洗涤;每孔加入 500 μL 5% BSA,37 °C 封闭 1 h,洗涤;每孔加入 500 μL BAG1 多抗(1 : 800),4 °C 孵育过夜,洗涤;每孔加入 500 μL 红色荧光(波长 594)标记的羊抗鼠 IgG (1 : 1000)抗体,室温孵育 1 h,洗涤;用抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)进行封片,荧光显微镜下观察。

结 果

1 bag1 基因的优化和表位分析

通过 DNASTar 软件,采用 Karplus-Schulz 方法分析 bag1 含有 18 个柔性区域,且分布较为均匀(4-10、13-19、27-30、39-42、50-56、58-69、74-78、86-88、94-100、119-120、125-130、138-146、150-153、158-177、180-183、192-200、206-208、216-226)。使用 DNAMAN 软件分析蛋白的亲、疏水性,结果如图 1。从图中可见,红色标记所示区域具有较强的亲水性。DNAMAN 软件分析 bag1 氨基酸序列中含有 7 个潜在的抗原表位(表 1)。

2 pET28a(+)-bag1 重组质粒的酶切鉴定和测序验证

重组质粒 pET28a(+)-bag1 经菌落 EcoRI 和 XhoI 双酶切鉴定,产物大小为 702 bp;取重组质粒测序,结果与 ToxoDB 数据库中弓形虫 bag1 基因序列(TGME49_259020-t26_1)100% 匹配,重组质粒构建正确。

表 1 BAG1 潜在的抗原表位

顺序 Order	氨基酸位置 Amino acid position	潜在抗原序列 Potential antigen sequence	分值 Point
1	64-89	VRPVASQQLDYLDEVSPFAL AAYYPPP	1.133
2	5-53	PSASHPPGACPPGCTKHPATA TAISPSGVCPMRAFHPAGPHS	1.130
3	211-219	HLFVYD	1.126
4	134-143	VLRVTIKVE	1.114
5	155-161	MIILADLPGL	1.071
6	181-187	GAIVIKG	1.065
7	189-197	TERVSGY	1.053
		ARRFQLPSN	1.053

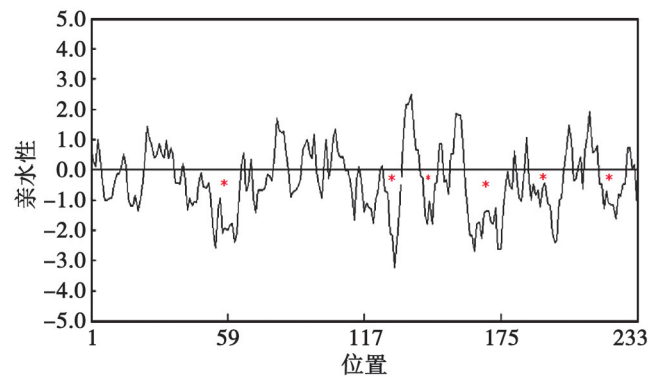


图 1 BAG1 亲疏水性预测(*表示较强亲水区域)
Fig.1 Hydrophobic profile of BAG1

3 rBAG1 蛋白的表达和纯化

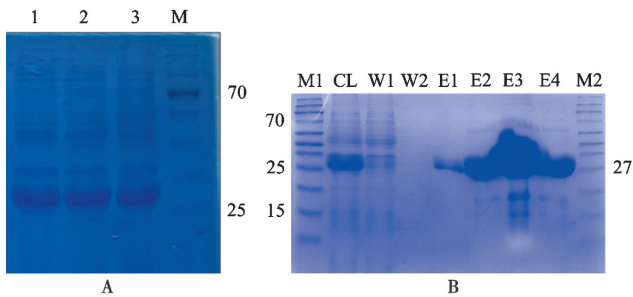
将 pET28a(+)-bag1 转化 BL21 后于 37 °C 条件下分别用终浓度为 0.5、1.0、2.0 min/L IPTG 诱导 4, 均检测到相对分子质量约 27 × 10³ 的 rBAG1 蛋白(图 2A)。rBAG1 蛋白经 HIS-tag 亲和层析纯化,获得单一电泳条带的重组蛋白(图 2B)。BCA 法测定纯化的 rBAG1 蛋白浓度为 10 μg/μL。

4 rBAG1 多克隆抗体 Western blot 检测 TgCtwh6 BAG1 蛋白

Western blot 试验结果显示,rBAG1 多抗能识别碱性培养基诱导培养 3 d 后的 TgCtwh6 BAG1 蛋白,反应条带位于 27 × 10³ 处。未诱导的 TgCtwh6 速殖子未检测到 BAG1 蛋白(图 3A)。同时检测 TgCtwh3 和 TgCtwh6 感染的小鼠脑组织,rBAG1 抗体可识别脑组织内 TgCtwh6 速殖子转化为缓殖子的 BAG1 蛋白,对照组和 TgCtwh3 组无此反应条带(图 3B)。

5 rBAG1 多克隆抗体 IFA 检测 TgCtwh6 缓殖子

IFA 结果显示,rBAG1 抗体不识别 TgCtwh6 速殖子,但可识别碱性诱导的 TgCtwh6 缓殖子,且 BAG1 主要定位在弓形虫的胞质中(图 4)。

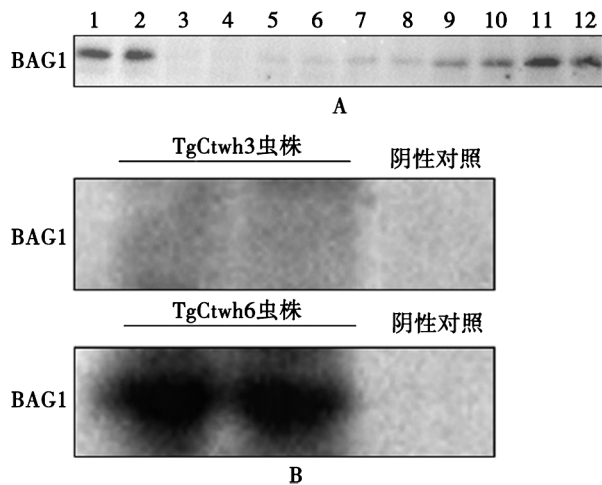


A 重组菌表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析 M 蛋白分子质量标准 1 0.5 mmol/L 终浓度 IPTG 诱导 4 h 2 1 mmol/L 终浓度 IPTG 诱导 4 h 3 2 mmol/L 终浓度 IPTG 诱导 4 h B 重组蛋白的纯化 M1, M2 蛋白分子质量标准 CL 诱导前重组菌裂解液 W1 重组菌变性裂解液洗涤 W2 重组菌变性洗涤液洗涤 E1~E4 洗脱液

图 2 重组蛋白 BAG1 的表达及其纯化的 SDS-PAGE 分析

A SDS-PAGE analysis of the recombinant protein M Protein Marker 1 0.5 mmol/L Final concentration of IPTG for 4 h 2 1 mmol/L Final concentration of IPTG for 4 h 3 2 mmol/L Final concentration of IPTG for 4 h B Purification of recombinant protein M1, M2 Protein Marker CL Bacterial lysate before induction W1 Bacterial denaturation lysate washing W2 Bacterial denaturation wash solution washing E1-E4 Eluent

Fig. 2 Expression of recombinant protein BAG1 and SDS-PAGE analysis of its purification



A 碱性诱导 TgCtwh6 的 Western blot 检测 1,2 碱性诱导第 5 d 3,4 碱性诱导第 0 d 5,6 碱性诱导第 1 d 7,8 碱性诱导第 2 d 9,10 碱性诱导第 3 d 11,12 碱性诱导第 4 d B TgCtwh3 和 TgCtwh6 感染小鼠脑组织 Western blot 检测

图 3 rBAG1 多克隆抗体 Western blot 检测 BAG1 蛋白

A Western blot detection of alkaline induced TgCtwh6 1,2 Alkaline induction on day 5 3,4 Alkaline induction on day 0 5,6 Alkaline induction on day 1 7,8 Alkaline induction on day 2 9,10 Alkaline induction on day 3 11,12 Alkaline induction on day 4 B Western blot detection of brain tissue from TgCtwh3 and TgCtwh6 infected mice

Fig. 3 Results of BAG1 protein detection by rBAG1 polyclonal antibody

讨论

目前对于弓形虫病的治疗仍以磺胺嘧啶和乙胺嘧啶联合用药为主,但是对于弓形虫慢性感染疗效差,且长期服用副作用比较大(如肝脏毒、抑制骨髓功能等)^[10]。既往很多弓形虫疫苗都是针对速殖子^[11],然

而常见的弓形虫感染是由于食入了含有缓殖子的组织包囊^[2,12],一旦缓殖子在肠道内分化为速殖子并已建立感染状态,那么由速殖子抗原诱导的保护性免疫是否可以有效控制速殖子的传播尚不清楚。因此,理想的弓形虫疫苗应针对弓形虫多感染状态的多组份疫苗。弓形虫 BAG1 蛋白作为缓殖子期特异表达的蛋白,具有成为疫苗候选分子的潜力^[9]。

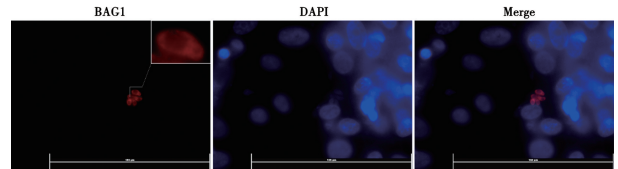


图 4 TgCtwh6 缓殖子 BAG1 多克隆抗体 IFA 检测(1000×)
Fig. 4 Results of Indirect Immunofluorescence Assay of BAG1 polyclonal antibody

一般情况下,蛋白的亲水性、柔性区域、抗原指数和表面可及性等决定了其抗原性^[13]。亲水性代表氨基酸残基在水溶液中暴露的程度,是 B 细胞抗原表位预测的常用参数之一,亲水性强的氨基酸残基易与水分子接近,暴露在蛋白表面,使之易被特异性抗体所结合^[14]。蛋白质的柔性结构使蛋白具有灵活性与可变性,能与抗体嵌合,促进 B 细胞抗原表位的形成^[15]。本研究筛选的 BAG1 氨基酸片段中存在多个大段的柔性区域,具有较强的亲水性,同时通过生物信息软件预测出该蛋白有 7 个抗原性得分较高的 B 细胞抗原表位。基于以上生物信息学分析结果,将筛选和优化的 bag1 基因片段插入原核载体 pET30a(+)的多克隆位点,构建重组质粒 pET30a(+)-bag1,转入大肠埃希菌 BL21 中,经 1 mmol/L IPTG 诱导表达相对分子质量为 27×10^3 目的蛋白,且该蛋白以可溶性的形式存在于超声裂菌后的上清中。本研究对实验条件进行反复优化,使 rBAG1 获得稳定高效的表达,为该蛋白的免疫保护性研究提供了标准化的材料。

抗体检测是实验室和临床常用的检测和诊断方法,目前针对弓形虫速殖子的检测抗体或试剂盒较多,但是对于缓殖子的检测抗体数量少且价格较高。本研究使用原核表达体系表达弓形虫 BAG1 蛋白,方法简便,价格经济,制备的抗 rBAG1 蛋白抗体能识别弓形虫 BAG1 蛋白。以此抗体为一抗,采用 Western blot 方法检测我国流行的优势基因虫株 Chinese 1 型(TOXO #9)的 TgCtwh3(毒力强且不成囊)和 TgCtwh6(毒力较弱且成囊)^[16],结果显示 rBAG1 抗体只识别体外碱性诱导成功的 TgCtwh6 缓殖子而不识别 TgCtwh3 速殖子。采用 IFA 方法检测弓形虫缓殖子,结果显示 BAG1 主要在虫体的胞质中表达。

综上所述,本研究制备的 rBAG1 多克隆抗体能识

别体外诱导和体内形成的我国流行优势基因型虫株缓殖子,具有良好的鉴定和诊断价值。建立的 Western blot 和 IFA 方法简单易行,经济实用,结果准确可靠,可作为研究 BAG1 蛋白生物学功能的工具。关于 rBAG1 的免疫原性有待进一步探讨。

【参考文献】

[1] Choi EK, Nguyen TT, Gupta N, et al. Functional analysis of SLC39A8 mutations and their implications for manganese deficiency and mitochondrial disorders[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3163.
[2] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis[J]. Lancet, 2004, 363(9425):1965-1976.
[3] Marin-Garcia PJ, Planas N, Llobat L. *Toxoplasma gondii* in foods: prevalence, control, and safety[J]. Foods, 2022, 11(16): 2542.
[4] Megli CJ, Coyne CB. Infections at the maternal-fetal interface: an overview of pathogenesis and defence[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(2): 67-82.
[5] Parmley S, Slifer T, Araujo F. Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts[J]. J Infect Dis, 2002, 185(Suppl 1): S90-5.
[6] 邱燕华,董朕,张吉丽,等. 弓形虫病的治疗研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2020; 1-15.
[7] 李博,魏峰,刘全,等. 弓形虫 ROP18 基因重组蜥蜴利什曼原虫的构建及鉴定[J]. 动物医学进展, 2012, 33(2): 1-4.

[8] Mun HS, Aosai F, Yano A. Role of *Toxoplasma gondii* HSP70 and *Toxoplasma gondii* HSP30/bag1 in antibody formation and prophylactic immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*[J]. Microbiol Immunol, 1999, 43(5): 471-479.
[9] Di Cristina M, Del Porto P, Buffolano W, et al. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection[J]. Microbes Infect, 2004, 6(2): 164-171.
[10] Ben-Harari RR, Goodwin E, Casoy J. Adverse event profile of pyrimethamine-based therapy in toxoplasmosis: A systematic review[J]. Drugs R D, 2017, 17(4): 523-544.
[11] 白冰,桑晓宇,周雅盼,等. 弓形虫疫苗研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(12): 1120-1124.
[12] 邢燕,谷俊朝. 弓形虫病研究新进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 94-98, 101.
[13] 梁瑾,王靖飞. B 细胞表位预测方法研究进展[J]. 生命科学, 2009, 21(2): 320-323.
[14] 黄江,胡旭初,黄艳,等. 牛带绦虫亚洲亚种苹果酸脱氢酶基因的生物信息学分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008(3): 225-227.
[15] Wang HW, Lin YC, Pai TW, et al. Prediction of B-cell linear epitopes with a combination of support vector machine classification and amino acid propensity identification[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011: 432830.
[16] 沈继龙,余莉,我国弓形虫病我国弓形虫病流行概况及防治基础研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, 31(1): 71-76.

【收稿日期】 2023-02-20 【修回日期】 2023-05-10

(上接 802 页)

[15] Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. Polish J Microbiol, 2010, 59(3): 145-155.
[16] Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(12): 760-773.
[17] Van den Berg B, Silale A, Basle A, et al. Structural basis for host recognition and superinfection exclusion by bacteriophage T5[J]. Proc Natl Aca Sci U S A, 2022, 119(42): e2211672119.
[18] Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(12): 760-773.
[19] Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, et al. Modeling the architecture of depolymerase-containing receptor binding proteins in *Klebsiella* Phages[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 2649.
[20] Biemann R, Habann M, Eugster MR, et al. Receptor binding proteins of *Listeria monocytogenes* bacteriophages A118 and P35 recognize serovar-specific teichoic acids[J]. Virology, 2015, 477: 110-118.
[21] Lan M, Yap, Michael G, et al. Structure and function of bacteriophage T4[J]. Future Microbiol, 2014, 9(12): 1319-1327.
[22] Maghsoodi A, Chatterjee A, Andricioaei I, et al. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dy-

namic pathway[J]. Proc Nat Aca Sci, 2019, 116(50): 201909298.
[23] Jin J, Li ZJ, Wang SW, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 1-8.
[24] Jing J, Li ZJ, Wang SW, et al. Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-14.
[25] Miller ES, Elizabeth K, Gisela M, et al. Bacteriophage T4 genome[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 199-201.
[26] Pawlik, Krzysztof, Bock, et al. Recognition of bacterial lipopolysaccharide using bacteriophage-adhesin-coated long-period gratings[J]. Biosensors Bioelectronics, 2015, 67: 93-99.
[27] Taslem Mourosi J, Awe A, Guo W, et al. Understanding bacteriophage tail fiber interaction with host surface receptor: The key "blueprint" for reprogramming phage host range[J]. Internat J Mol Sci, 2022, 23(20): 12146.
[28] Suga A, Kawaguchi M, Yonesaki T, et al. Manipulating Interactions between T4 phage long tail fibers and *Escherichia coli* receptors[J]. Applied Environ Microbiol, 2021, 87(13): e0042321.
[29] Hyman P, van Raaij M. Bacteriophage T4 long tail fiber domains[J]. Biophysical Rev, 2018, 10(2): 463-471.

【收稿日期】 2023-02-15 【修回日期】 2023-05-10