

张梦凯, 张泽栋, 梅杰, 等. 弓形虫与宿主 IL-12 结合蛋白的筛选 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 105-114.

ZHANG M K, ZHANG Z D, MEI J, et al. Screening of potential interacting molecules of *Toxoplasma gondii* with host IL-12 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 105-114.

弓形虫与宿主 IL-12 结合蛋白的筛选

张梦凯, 张泽栋, 梅杰, 刘越, 宋小凯, 严若峰, 徐立新, 李祥瑞, 陆明敏*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210014)

摘要: 旨在探索是否存在直接与宿主白细胞介素 (IL)-12 结合并调节其功能的弓形虫蛋白, 以进一步解析弓形虫免疫逃逸的分子机制。通过免疫沉淀技术 (IP) 联合液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 分析, 从弓形虫速殖子中筛选出 39 种能与小鼠 IL-12 结合的候选分子。根据基因注释与功能分析, 从 39 种候选分子中选定弓形虫 14-3-3、延伸因子-1 α (EF-1 α)、Ras 相关蛋白 1a (Rab1a)、 β -微管蛋白 (β -tubulin) 及假定蛋白 (HYP) 进行结合验证。分别构建 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、 β -tubulin、HYP 以及 IL-12 的真核重组蛋白表达系统并进行正反向免疫共沉淀, 发现 14-3-3、Rab1a 与小鼠 IL-12 未产生直接结合, 而 β -tubulin、EF-1 α 可与 IL-12 产生正向结合, 但无反向结合信号。此外, 弓形虫 HYP 在人胚肾细胞 (HEK 293T) 表达系统不表达。本研究首次较为系统地探索了弓形虫蛋白与宿主 IL-12 的直接结合关系, 为解析弓形虫免疫调控网络及开发相关干预策略提供了新视角。

关键词: 弓形虫; 细胞因子; 白细胞介素-12; 蛋白结合; 免疫逃避

中图分类号: S855.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)11-0105-10

Screening of potential interacting molecules of *Toxoplasma gondii* with host IL-12

ZHANG Mengkai, ZHANG Zedong, MEI Jie, LIU Yue, SONG Xiaokai, YAN Ruofeng,

XU Lixin, LI Xiangrui, LU Mingmin*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

Abstract: This study aimed to determine whether any *Toxoplasma gondii* protein directly interacts with host interleukin-12 (IL-12) and regulates IL-12 signaling, thereby providing further insight into the molecular mechanism of *T. gondii* immune evasion. By performing immunoprecipitation (IP) combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), we identified 39 IL-12-interacting candidates from *T. gondii* tachyzoites. Based on the gene annotation and functional analysis, five proteins were selected for further validation, namely *T. gondii* 14-3-3, elongation factor-1 α (EF-1 α), small Ras-related protein 1a (Rab1a), β -tubulin, and the hypothetical protein (HYP). We successfully established the eukaryotic recombinant expression systems for each of these proteins, as well as for IL-12; and we conducted bidirectional co-immunoprecipitation assays for verification. The results demonstrated no direct interaction between 14-3-3/Rab1a and IL-12. Intriguingly, β -tubulin and EF-1 α exhibited unidirectional interaction signals in forward co-IP assays but not in reverse assays. Notably, HYP failed to express in the HEK 293 cell system. This study has systematically and, for the first time, explored the direct interactions between *T. gondii* proteins and host IL-12, offering novel insights into parasite-driven immune modulation and potential therapeutic strategies.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; cytokine; IL-12; protein-protein interaction; immune evasion

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 为顶复门寄生原虫, 可入侵所有有核细胞并在其胞内复制, 引起包括人在内的几乎所有温血动物的感染。流行病学研究显示, 全球将近四分之一的人口感染过弓形虫。虽然多数患者为慢性感染且无明显临床症状, 但对免疫

功能低下者 (如艾滋病患者) 威胁较大, 导致较高死亡率^[1]。刚地弓形虫可分为 I、II、III 三种基因型, 其中 I 型虫株 (如 RH 虫株) 毒力最强, 感染后短期内可造成小鼠死亡; 而 II 型虫株毒力中等, 可引起部分死亡; III 型虫株毒力最弱, 几乎不会造成小鼠死亡^[2]。

宿主对弓形虫的免疫清除过程极其复杂, 往往会激活先天免疫, 而后诱导获得性免疫反应。在先天免疫中, Toll 样受体、Nod 样受体和 C 型凝集素等模式识别受体检测病原感染后会诱导促炎类细胞因子的产

收稿日期: 2025-03-24; 修回日期: 2025-09-09

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800200)

作者简介: 张梦凯, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 陆明敏, 男, 副教授, 主要从事兽医寄生虫分子与

免疫、兽医公共卫生研究, E-mail: mingmin.lu@njau.edu.cn.

生,包括肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-12等,其中,IL-12已被证明在抗弓形虫免疫中发挥重要作用。由树突状细胞和巨噬细胞产生的IL-12可刺激自然杀伤(NK)细胞、CD4⁺T细胞和细胞毒性CD8⁺T细胞增殖,并诱导大量干扰素(IFN)- γ 的产生;而IFN- γ 可刺激被感染细胞表达数百种受IFN调控的基因,抑制弓形虫的生长和复制^[3-4]。尽管如此,弓形虫可通过其产生的某些效应蛋白间接操控IL-12产生的信号通路,削弱宿主免疫应答,以在宿主体内存活、复制并建立持续感染^[5]。例如,棒状体蛋白(ROP)16在弓形虫感染早期被释放到宿主细胞质中,通过磷酸化人和小鼠细胞中的STAT3和STAT6,抑制IL-12的产生,负向调节抗弓形虫免疫^[6]。然而,目前尚未明确是否存在能够直接与宿主IL-12结合并调节其功能的弓形虫蛋白。因此,本研究旨在通过免疫沉淀技术(IP)结合液相色谱-串联质谱(LS-MS/MS)分析,筛选可与宿主IL-12结合的潜在结合分子,初步探究弓形虫中是否存在与IL-12互作的蛋白,为阐明弓形虫与宿主间的互作关系提供新的依据。

1 材料与方 法

1.1 虫株、菌株、质粒与细胞

刚地弓形虫RH虫株、人包皮成纤维细胞(HFF)和人胚肾细胞(HEK 293T)由南京农业大学兽医寄生虫病教研室保存。大肠杆菌DH5 α 、pcDNA3.1质粒保存于本实验室-80℃冰箱中。

1.2 主要试剂

Phanta Max高保真酶、Tag酶、TRIzol试剂、DL2000 DNA Marker和同源重组试剂盒购于南京诺唯赞公司;DNA限制型内切酶EcoR I、Hind III购于宝生物TaKaRa(大连)有限公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、去内毒素质粒提取试剂盒购于Omega公司;DMEM高糖培养基、胰酶、反转录试剂盒、转染试剂Lipofectamine 2000、青霉素-链霉素、磁珠购于Thermo Fisher Scientific公司;胎牛血清购于Cytiva公司;小鼠抗His标签抗体、小鼠抗Flag标签抗体以及HRP标记的山羊抗小鼠抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;蛋白酶与磷酸酶抑制剂、无血清细胞冻存液购于苏州新赛美公司;T25或T75细胞培养瓶、12孔细胞培养板、6孔细胞培养板购于Nest公司;冻存管、细胞刮刀、15 mL离心管、50 mL离心管购于甄选公司;IP/WB裂解液购于碧云天公司;ECL发光液购于天能公司。

1.3 细胞的复苏、传代与冻存

复苏:将细胞冻存管取出置于37℃水浴锅中,而后加入1 mL完全培养基(含10%胎牛血清与1%青霉素-链霉素的DMEM培养基),1 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入适量培养基吹打混匀后移至T25细胞培养瓶,置于含5% CO₂的37℃细胞培养箱培养。

传代:胰酶消化生长至80%~90%的细胞,终止消化后1 000 r/min离心5 min,弃上清液,重悬后移至细胞培养瓶或细胞培养板培养。

冻存:将胰酶消化清洗后细胞用1 mL无血清冻存液重悬,使用梯度降温盒冻存后放入液氮中长期保存。

1.4 弓形虫的复苏、纯化与冻存

复苏:将装有弓形虫的冻存管置于37℃水浴锅中,加入1 mL含10%胎牛血清的DMEM培养基,3 500 r/min离心10 min,弃上清液后加入1 mL培养基,吹打混匀后移至长有HFF细胞的培养瓶中进行培养。

纯化:当弓形虫溢出细胞30%~50%时,使用细胞刮刀刮取细胞与虫体,将刮取液使用5 mL注射器吹打5~8遍,经5 μ m滤器过滤后3 500 r/min离心10 min,沉淀即为纯化后的虫体。

冻存:用1 mL无血清冻存液重悬纯化后的虫体并进行冻存。

1.5 重组质粒的构建

根据NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中各基因序列设计上下游引物,并交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表1)。使用TRIzol从小鼠脾脏与RH速殖子中提取RNA并将其分别反转录为cDNA模板。根据Phanta酶说明书配备相应PCR体系与反应程序。确认PCR产物大小与目的基因大小一致后,用胶回收试剂盒获取纯化的目的片段。使用双酶切连接法或同源重组法构建重组质粒,并转化至DH5 α 感受态细胞。单克隆阳性菌落经验证后送至擎科生物公司测序,测序结果使用SnapGene软件进行比对。

1.6 质粒转染

使用Opti-MEM减血清培养基稀释Lipofectamine 2000脂质体转染试剂与重组质粒,混匀后室温孵育5 min(体积质量比为3:1),加入HEK 293T细胞中(培养至90%左右)转染后培养36 h。转染前将完全培养基更换为Opti-MEM减血清培养基。

表 1 PCR 引物序列

NCBI 登录号	目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
NM_001303244.1	白细胞介素-12 (IL-12)	IL-12-F	CCAAGCTTGCCACCATGTGTCTCAGAAGCTAAC	1 032
		IL-12-R	CGGAATTCCTAGTGGTATGATGATGGGATCGGACCTGCAG	
KYF40741.1	14-3-3	14-3-3 -F	CGGGATCCGCCACCATGGTGAGCACGGATATAGCATTTTC	1 012
		14-3-3 -R	CCCTCGAGTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTGATCAGCTTGTCTGCGG	
KFG65617.1	假定蛋白 (HYP)	HYP-F	CGCGGATCCGCCACCATGTTGGCAGCGCTAAATGTG	401
		HYP-R	CCCTCGAGTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCAGAAAATTGCAGGACACTGG	
XP_002369991.1	β -微管蛋白 (β -tubulin)	β -tubulin-F	ctagcgtttaaacttaagcttGCCACCATGCGTGAGATCGTCCACATC	1 417
		β -tubulin-R	ggatctgcagaattcTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTGCTTCGCTTCGGC	
KAF4646195.1	延伸因子 1 α (EF-1 α)	EF-1 α -F	CGGGATCCGCCACCATGGGTAAGGAAAAGACTCACATTAAC	1 387
		EF-1 α -R	CCCTCGAGTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTCTTGGCGGCCTTGAC	
XP_002370798.1	Ras 相关蛋白 1a (Rab1a)	Rab1a-F	CGGGATCCGCCACCATGAAGCCTGAATACGACTATCTTTTC	649
		Rab1a-R	CCCTCGAGTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGCAACAACCCGAAGAGAC	

注:序列中小写字母表示同源臂。

1.7 弓形虫与细胞全蛋白的提取

用提前预冷的 PBS 将纯化后的 RH 速殖子或转染后的 HEK 293T 细胞清洗 3 遍, 分别用 IP/WB 裂解液 4 ℃ 孵育 10~20 min 后, 4 ℃ 离心 (13 000 r/min) 10 min。取上清液放入新的离心管中, 添加蛋白酶与磷酸酶抑制剂 (体积比为 1 : 100) 用于下一步试验。

1.8 IP 试验

取 50 μ L 磁珠加入转染有重组 pcDNA3.1-IL-12 质粒的细胞裂解液, 并分别与 1 : 100 稀释的小鼠抗 HisTag 抗体 (IP-IL-12 组)、小鼠正常 IgG (IP-IgG 对照组) 共孵育。4 ℃ 过夜后收样, 磁珠清洗后加入弓形虫全蛋白提取物, 4 ℃ 孵育 5 h。磁珠清洗后, 加入 5 \times SDS-PAGE Protein Loading Buffer, 煮样、离心并收集上清液。免疫沉淀复合物样品一式三份, 分别进行 SDS-PAGE、Western blot、质谱分析。在 Western blot 检测中, 小鼠抗 His 标签抗体用作一抗, 将其 1 : 10 000 稀释后与转印膜 4 ℃ 孵育过夜。洗膜后, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体 (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h。洗膜后进行 ECL 发光、显影。

1.9 质谱鉴定与潜在结合蛋白的筛选

将免疫沉淀复合物送至上海生科新生命公司进行质谱鉴定。基于 ToxoDB 数据库 (<https://toxodb.org/toxo/app/>), 使用 Mascot 2.2 软件对质谱鉴定原始数据进行分析。参数设定: 指定羧甲基化 (C) 为固定修饰, 氧化 (M) 为动态修饰, 允许最多 2 个漏切位点。所有鉴定到的肽段均通过错误发现率 (FDR \leq 0.01) 和 Mascot 得分 (\geq 20) 双重筛选。经上述多重分析后, 选定在 3 个生物学重复中均检测到 \geq 2 条

独特肽段的蛋白用于下一步分析。将 IP-IL-12 组与 IP-IgG 对照组中鉴定出的蛋白进行比对, 选定 IP-IgG 对照组中未出现的高丰度蛋白为潜在结合蛋白, 并通过免疫共沉淀 (co-IP) 进行验证。

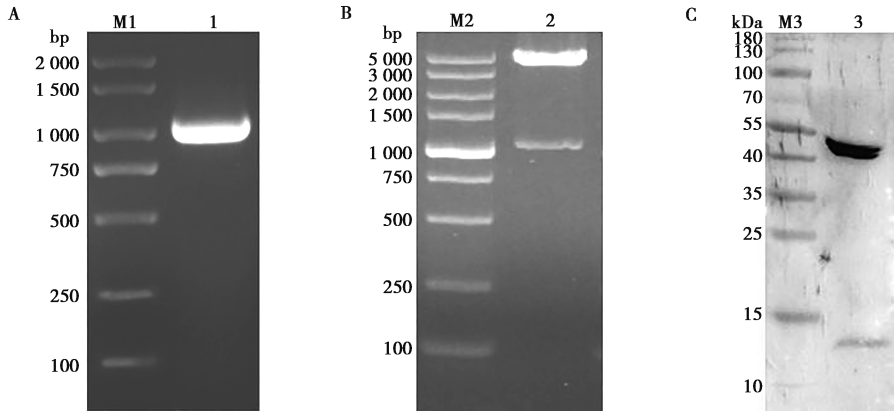
1.10 co-IP 试验

将 25 μ L 的磁珠加入共转染有 pcDNA3.1-IL-12 以及潜在质粒的细胞裂解液后, 分别与小鼠抗 His 标签抗体、小鼠抗 Flag 标签抗体或小鼠正常 IgG (对照) 4 ℃ 过夜共孵育。磁珠清洗后, 重悬、煮样、离心并收集上清液。样品经 SDS-PAGE 后转印, Western blot 检测两种蛋白是否存在正反向结合。正向 co-IP 中使用小鼠抗 Flag 标签单抗为一抗, 反向 co-IP 中使用小鼠抗 His 标签单抗为一抗。

2 结果与分析

2.1 小鼠 IL-12 载体的构建与蛋白表达

提取小鼠脾脏 RNA, 将其反转录为 cDNA 并以 IL-12 引物配定 PCR 体系。琼脂糖凝胶检测结果显示, PCR 产物大小为 1 032 bp 左右 (含添加的 His 标签序列), 与预期相符 (图 1A)。将 IL-12 扩增产物与 pcDNA3.1 载体双酶切连接后构建成重组载体 pcDNA3.1-IL-12。双酶切验证结果显示 5 000 bp 与 1 032 bp 左右均出现相应大小的目的条带 (图 1B), 且测序结果无误。将重组质粒转染至 HEK 293T 细胞后, 对细胞裂解液进行 Western blot 检测。结果显示在分子量 40~55 kDa 之间出现目的条带 (图 1C), 表明由 pcDNA3.1-IL-12 质粒编码的重组 IL-12 蛋白可在 HEK 293T 细胞中正确表达。



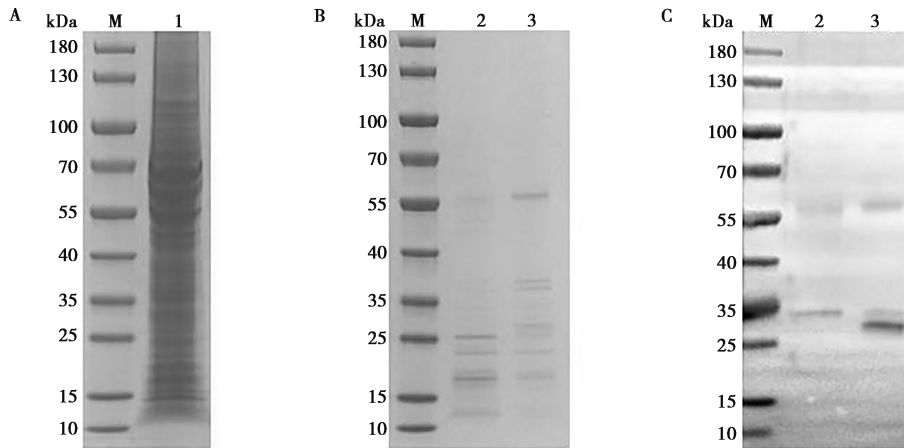
M1. DNA 分子量标准 DL2000; 1. IL-12 的 PCR 扩增产物; M2. DNA 分子量标准 DL5000; 2. pcDNA3.1-IL-12 的双酶切产物; M3. 蛋白质标准分子量; 3. pcDNA3.1-IL-12 在 HEK 293T 细胞中的表达情况。

图 1 小鼠 IL-12 的基因扩增 (A)、重组质粒双酶切 (B) 及 Western blot 验证 (C)

2.2 弓形虫速殖子全蛋白中与 IL-12 结合的蛋白检测

SDS-PAGE 结果显示, 弓形虫速殖子全蛋白分布范围为 10~180 kDa, 符合后续试验的需要 (图 2A)。将表达有 IL-12 的细胞裂解液与弓形虫速殖子全蛋白裂解液进行 IP 试验, 并对获取的免疫沉淀复

合物进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。与使用小鼠正常 IgG 的对照组相比, IP-IL-12 组的免疫沉淀复合物中具有较为明显的差异条带 (图 2B), 而在使用大鼠抗弓形虫速殖子全蛋白抗体作为一抗的 Western blot 检测中也观察到了相同的结果 (图 2C)。



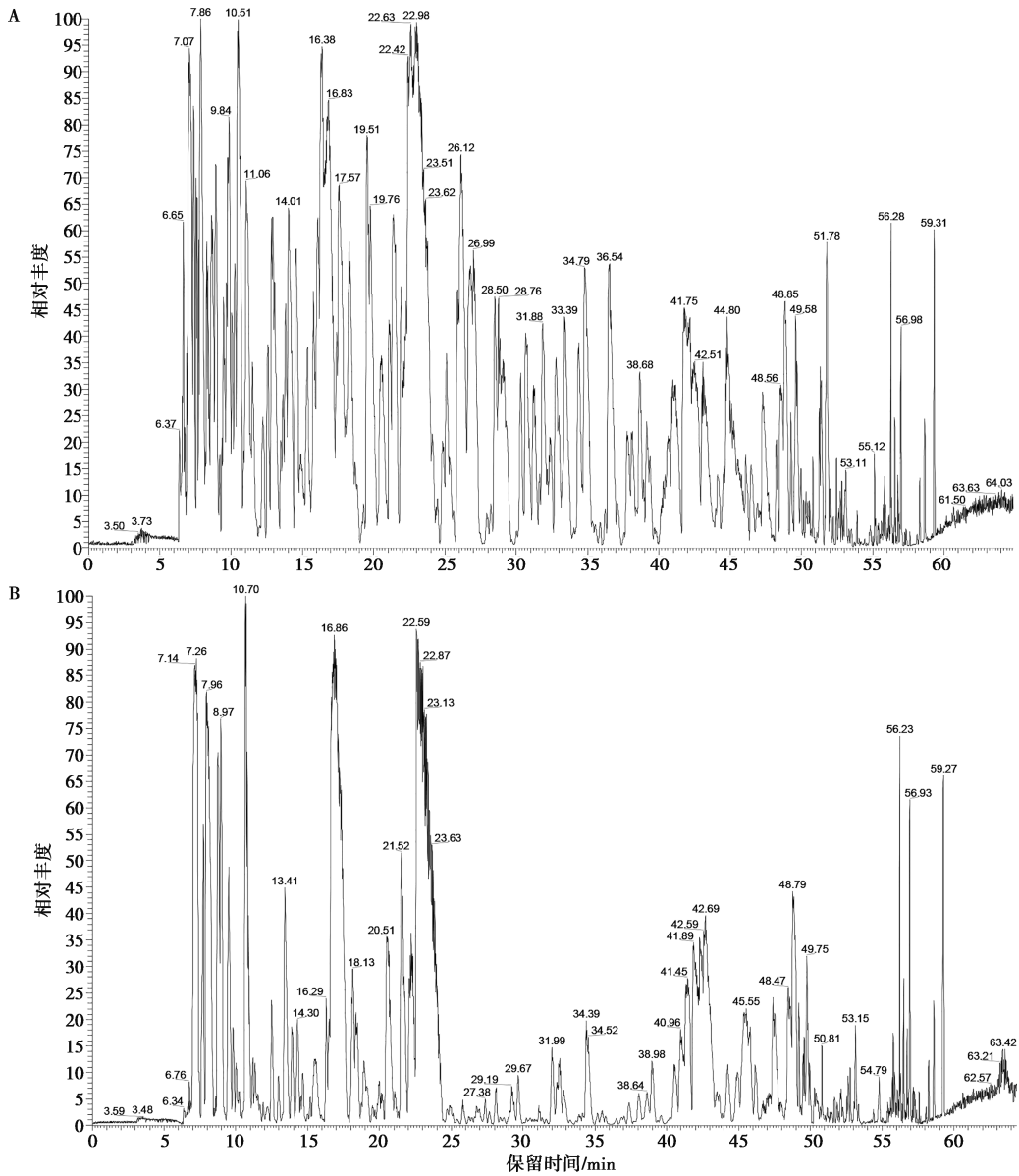
M. 蛋白质标准分子量; 1. 弓形虫 RH 速殖子全蛋白; 2. IP-小鼠正常 IgG 复合物; 3. IP-小鼠抗 His 标签抗体复合物。

图 2 弓形虫全蛋白与免疫沉淀复合物考马斯亮蓝染色 (A、B) 及 Western blot 验证 (C)

2.3 质谱鉴定与蛋白筛选

免疫沉淀复合物经胰酶消化富集后, 使用谱图计数的方法对分离肽段进行提取及定量分析, 进而鉴定蛋白种类。质谱 Base Peak 图谱显示, IP-IL-12 组以及 IP-IgG 对照组中的每个质谱扫描点中强度最高的离子峰分布均匀, 提示肽段色谱分离效果较好, 可用于下一步分析 (图 3)。对鉴定出唯一肽段进行搜库

分析, IP-IL-12 组中鉴定出 155 种蛋白, 而 IP-IgG 对照组中鉴定出 116 种蛋白。以 IP-IgG 对照组质谱结果为参照进行比对, 选定 IP-IgG 对照组中未出现的高丰度蛋白为差异蛋白, 共获得 39 种潜在结合蛋白 (表 2)。此外, 结合基因注释及功能分析进行筛选, 选定弓形虫 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、HYP、 β -tubulin 进行下一步结合验证。



A. IP-IL-12 组; B. IP-IgG 组。

图 3 LC-MS/MS 分析胰酶消化富集的肽鉴定

表 2 与 IL-12 潜在结合的弓形虫蛋白

名称	英文全称	登录号	肽段总数	唯一肽段数	肽段覆盖率/%	分子质量/kDa	等电点
含 hect 结构域 (泛素转移酶) 蛋白	HECT-domain (ubiquitin-transferase) - containing protein	EPR57942.1	5	4	0.20	1 312.0	6.69
组织型纤溶酶原激活剂 sentrin 特异性蛋白酶 3	TPA; sentrin-specific protease 3	CEL75758.1	4	4	1.16	329.9	5.06
假定蛋白	hypothetical protein	XP_018636901.1	4	4	0.50	690.5	8.34
Ras 相关蛋白 1a	Ras-related protein 1a, partial	KFG62242.1	4	4	16.83	22.9	7.6
假定蛋白	hypothetical protein	KFG65617.1	6	3	6.00	13.6	10.84
组蛋白 H2Bv	histone H2Bv	EPR57863.1	3	3	0.187	13.7	10.55
推定的钙调蛋白结合羧基末端驱动蛋白样家族蛋白	putative calmodulin-binding carboxy-terminal kinesin-like family protein	EPR59352.1	3	3	3.61	86.3	5.4

续表2

名称	英文全称	登录号	肽段 总数	唯一 肽段数	肽段覆 盖率/%	分子质量/ kDa	等电点
翻译起始因子 eIF3 亚基 135	translation initiation factor eIF3 subunit 135, partial	KFG38842.1	3	3	0.006	422.0	6.12
假定蛋白	hypothetical protein	KFH03092.1	3	3	0.0069	316.3	7.83
假定蛋白	hypothetical protein	KFH13227.1	3	3	0.99	223.5	9.76
热休克蛋白	heat shock protein	KYF40383.1	3	3	2.75	78.3	6.84
翻译延伸因子 2 家族蛋白	putative translation elongation factor 2 family protein	PIM02405.1	3	3	2.42	106.6	6.67
假定蛋白	hypothetical protein	RQX67346.1	3	3	2.30	112.5	8.82
β 微管蛋白	β -tubulin	XP_002369991.1	3	3	7.35	0.1	4.72
含 RNA 识别基序的蛋白	RNA recognition motif-containing protein	RQX67811.1	3	3	1.83	124.7	9
假定蛋白	hypothetical protein	EPT30649.1	7	2	0.59	259.4	8.42
含 RNA 识别基序的蛋白	RNA recognition motif-containing protein	EPT27737.1	6	2	0.70	160.2	8.71
假定蛋白	hypothetical protein	PIM01300.1	5	2	0.91	215.8	6.69
假定蛋白	hypothetical protein	EPT30195.1	4	2	1.17	152.1	8.7
极光激酶	aurora kinase	KAF4642871.1	4	2	0.64	298.2	9.24
14-3-3 蛋白	14-3-3 protein	BAA25996.1	4	2	6.77	30.7	4.7
延伸因子-1 α	putative elongation factor-1 α (EF-1 α)	KAF4646195.1	4	2	7.59	49.0	9.02
神经丝三联体蛋白 M	putative neurofilament triplet protein M, partial	RQX68373.1	4	2	1.02	160.3	9.7
假定蛋白	hypothetical protein	EPT30153.1	3	2	0.83	187.6	4.94
假定蛋白	hypothetical protein	KAF4639747.1	3	2	0.94	364.3	6.54
假定蛋白	hypothetical protein	KFG30883.1	3	2	1.10	117.5	9.24
PF2 arrest 特异性蛋白	putative PF2 arrest specific protein 8/11	KFG46549.1	3	2	4.28	54.6	6.52
含 WD 结构域、G- β 重复序列的蛋白	WD domain, G- β repeat-containing protein	KFH07733.1	3	2	0.81	132.0	8.48
假定蛋白	hypothetical protein	KFH14028.1	3	2	0.31	653.4	8.87
假定蛋白	hypothetical protein	KYF43672.1	3	2	0.47	253.7	4.88
假定蛋白	hypothetical protein	PIM04376.1	3	2	4.59	33.3	9.31
跨膜蛋白	putative transmembrane protein	PUA84069.1	3	2	0.43	374.8	5.13
伴侣蛋白 BiP	chaperonin protein BiP	RQX72552.1	3	2	3.59	73.3	5.23
假定蛋白	hypothetical protein	XP_018637115.1	3	2	2.25	68.6	5.94
组蛋白 H3.3 变体	histone H3.3 variant	AAM95790.1	2	2	8.09	15.4	11.29
组织型纤溶酶原激活剂: 假定蛋白	TPA: hypothetical protein	CEL72521.1	2	2	5.15	46.0	8.66
组织型纤溶酶原激活剂: 假定蛋白	TPA: hypothetical protein	CEL73092.1	2	2	0.27	504.9	5.83
组织型纤溶酶原激活剂: 假定蛋白	TPA: hypothetical protein	CEL73093.1	2	2	1.25	108.9	5.84
含 alveolin 结构域的中 间丝	TPA: alveolin domain containing interme- diate filament IMC14	CEL74317.1	2	2	3.41	83.3	8.65

2.4 潜在结合分子真核重组表达质粒构建

提取弓形虫速殖子 RNA, 反转录获取 cDNA 并进行 PCR。经琼脂糖凝胶检测, 结果显示 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、HYP、 β -tubulin 基因的 PCR 产物大小分别为 649、1 390、401、1 387、1 012 bp 左右

(含添加的 Flag 标签序列) (图 4A)。分别将 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、HYP 等 4 种基因的扩增产物与 pcDNA3.1 载体进行双酶切, 并构建成 4 种重组真核表达质粒 (图 4B)。对 β -tubulin 基因则使用同源重组法构建重组表达质粒。测序结果显示 5 种重组表达

质粒均构建成功。

2.5 IL-12 潜在结合蛋白的真核表达

将5种重组质粒转染至 HEK 293T 细胞后,使用 Western blot 检测重组蛋白表达情况。结果显示,转染有 pcDNA3.1-Rab1a、pcDNA3.1- β -tubulin、pcDNA3.1-EF-1 α 、pcDNA3.1-14-3-3 重组质粒的

细胞裂解产物可被小鼠抗 Flag 标签抗体识别,分别在 23、51、49、31 kDa 处出现目的条带(图 5),而转染有 pcDNA3.1-HYP 重组质粒的细胞裂解物未被识别。以上结果表明,弓形虫 Rab1a、 β -tubulin、EF-1 α 、14-3-3 蛋白均可在 HEK 293T 细胞中表达,而 HYP 蛋白则不表达。

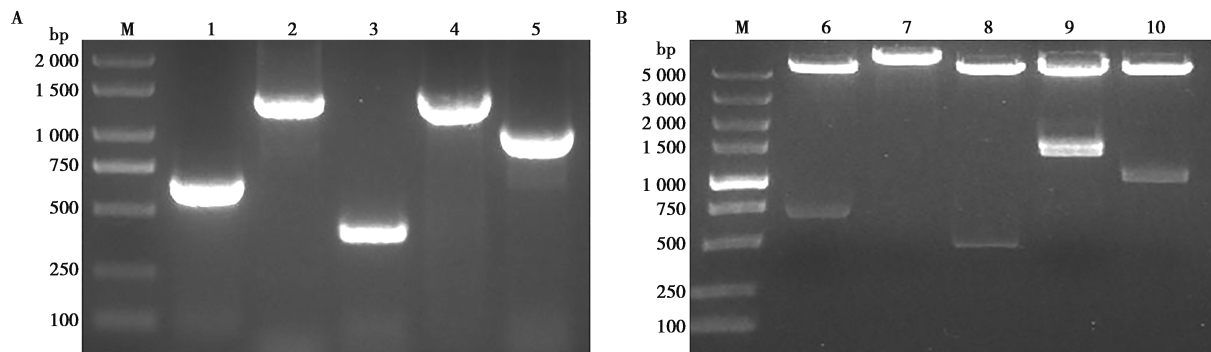


图4 IL-12 潜在结合蛋白的基因扩增 (A) 及重组质粒双酶切 (B) 验证
M1. DNA 分子量标准 DL2000; 1. Rab1a; 2. β -tubulin; 3. HYP; 4. EF-1 α ; 5. 14-3-3; M2. DNA 分子量标准 DL5000; 6. pcDNA3.1-Rab1a; 7. pcDNA3.1- β -tubulin; 8. pcDNA3.1-HYP; 9. pcDNA3.1-EF-1 α ; 10. pcDNA3.1-14-3-3。

图4 IL-12 潜在结合蛋白的基因扩增 (A) 及重组质粒双酶切 (B) 验证

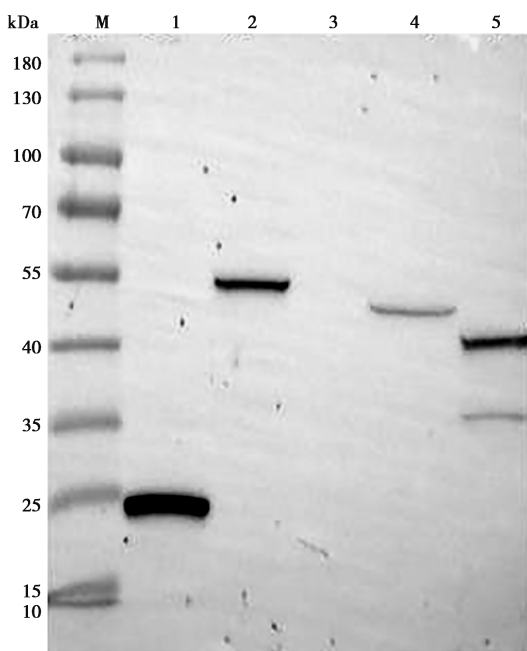


图5 Western blot 验证 5 种重组质粒在 HEK 293T 细胞中的表达
M. 蛋白质标准分子量; 1. pcDNA3.1-Rab1a; 2. pcDNA3.1- β -tubulin; 3. pcDNA3.1-HYP; 4. pcDNA3.1-EF-1 α ; 5. pcDNA3.1-14-3-3。

图5 Western blot 验证 5 种重组质粒在 HEK 293T 细胞中的表达

2.6 潜在结合分子与小鼠 IL-12 的 co-IP 验证

分别将 4 种重组表达质粒与 pcDNA3.1-IL-12 质粒共转染,使 4 种潜在结合分子 (Rab1a、 β -tubulin、EF-1 α 以及 14-3-3) 与小鼠 IL-12 共表达于 HEK 293T 细胞中。分别使用小鼠抗 His 标签抗体或小鼠抗 Flag 标签抗体进行正反向 co-IP,配合以小鼠正常 IgG 为阴性对照。Western blot 检测显示,在

Rab1a、14-3-3 与 IL-12 的 co-IP 验证中,正反向 co-IP 条带均未被检出(图 6A、6C)。而在 EF-1 α 、 β -tubulin 与 IL-12 的 co-IP 验证中,可在正向 co-IP 中检测出 EF-1 α 与 β -tubulin 的相应条带,而在反向 co-IP 中未检测出与 IL-12 结合的条带(图 6B、6D)。以上结果显示,4 种弓形虫蛋白均未能与小鼠 IL-12 产生明显结合。

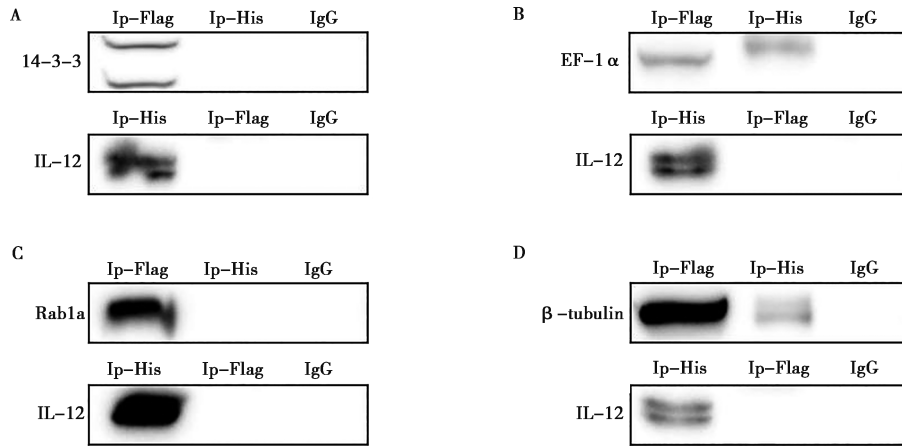


图 6 4 种弓形虫蛋白与小鼠 IL-12 结合的 co-IP 验证

3 讨论

在弓形虫感染中,宿主通过先天性与获得性免疫对入侵虫体进行防御清理,涉及 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-13 以及 IL-12 等多种细胞因子的协同作用^[3]。这些细胞因子不仅在激活和调节免疫细胞的功能方面发挥关键作用,还在平衡促炎与抗炎反应之间维持免疫稳态,确保宿主能够有效清除病原体的同时,避免自身组织的过度损伤^[7]。与此同时,弓形虫也可通过调节细胞因子及其受体功能而实现多层次、多维度的免疫逃避。现有研究证明,弓形虫可通过棒状体、致密颗粒等细胞器产生效应蛋白操控细胞因子信号通路,削弱宿主免疫应答,以在宿主体内建立持续感染^[8]。IL-12 是一种促炎类异二聚体细胞因子,可诱导 IFN- γ 的产生,促进 Th1 细胞的分化,是先天抵抗和适应性免疫之间的重要纽带^[9-10]。现有研究证实 IL-12 在抗弓形虫免疫中发挥着重要作用,其在启动针对弓形虫的保护性 Th1 免疫反应中起核心作用^[4,11-12]。使用 IL-12 抗体中和其功能后,肠道免疫系统中 LP 和 MLN 细胞产生的 IFN- γ 大幅减少^[12]。在弓形虫感染中,IL-12 的免疫清除功能可被某些效应蛋白间接调控且抑制,如 ROP16 蛋白。然而,在宿主与弓形虫的相互作用中,是否存在直接作用于 IL-12 的分子,相关调控机制如何仍未知。因此,本研究聚焦于筛选、鉴定出能够直接与宿主 IL-12 结合并可能调节其功能的弓形虫蛋白。

通过 IP 配合质谱分析,本研究共鉴定出 39 种可与宿主 IL-12 结合的潜在结合分子。结合基因注释及功能分析进一步筛选,选定了 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、 β -tubulin、HYP 进行验证。14-3-3 家族蛋白是在所有真核细胞中普遍表达。作为二聚化接头蛋白,它们可调控多种细胞过程,包括迁移、凋亡和细

胞周期等^[13]。弓形虫中 14-3-3 蛋白被发现在卵囊和速殖子阶段有较高丰度表达,且定位于虫体胞质、纳虫泡膜以及虫体分泌排泄抗原中 (ESA)^[14]。研究表明,速殖子 ESA 中的 14-3-3 蛋白能够刺激免疫系统,诱导细胞免疫和体液免疫^[15]。此外,该蛋白可引起被寄生的小胶质细胞和树突状细胞产生过度迁移,提示其具有劫持宿主细胞迁移实现虫体传播的功能^[16]。此外,免疫重组 14-3-3 蛋白可引起较强免疫应答,被认为是适用于抗弓形虫疫苗的开发潜在候选分子^[17]。值得注意的是,尽管先前的研究已发现弓形虫 14-3-3 可与宿主 hCG1821272 以及 eIF5B 分子互作^[18],但在本研究中,14-3-3 与宿主 IL-12 的正反向 co-IP 验证中均未检测到相应 IP 条带,提示 14-3-3 不是宿主 IL-12 的结合受体。

Rab 家族蛋白均为 GTP 酶,是 Ras 超家族单体 G 蛋白成员。作为膜相关蛋白,Rab 蛋白参与囊泡运输的多个环节,包括囊泡初始形成、沿细胞骨架的运输过程,以及囊泡与靶膜最终的膜融合事件^[19]。弓形虫基因组编码 15 种 Rab GTP 酶,其中 12 种在速殖子阶段表达并主要定位于早期和晚期分泌系统^[20]。值得注意的是,Rab5a 和 Rab5c 是调控微线体和棒状体运输的关键因子,而 Rab6 则负责高尔基体后致密颗粒细胞器与高尔基体间的蛋白质转运^[20-21]。Rab11b 在子代虫体的内膜复合体 (IMC) 的生物合成中不可或缺,而 Rab11a 介导的囊泡运输对 IMC 成熟以及新生质膜向子细胞的递送至关重要^[22-23]。近期研究发现 Rab1b 参与内吞运输及囊泡向棒状体球部的分选,该过程受蛋白质异戊烯化修饰调控^[24-25]。然而,目前弓形虫 Rab1a 的生物学功能尚无报道。在本研究中,通过 IP 及质谱鉴定,发现 Rab1a 具有与宿主 IL-12 结合的潜力,但后续验证发现其不可与 IL-12 互作。

蛋白翻译是将氨基酸残基在核糖体上组装成多肽

链的生物学过程, 包含起始、延伸和终止三阶段。在延伸阶段, mRNA 与 tRNA 在核糖体的两个活性位点 (A 位和 P 位) 完成配对, 而多个真核延伸因子参与调控该过程。EF-1 α 通过结合 GTP 并与氨基酰-tRNA 相互作用, 促进氨基酰-tRNA 向核糖体 A 位的募集。GTP 水解后, GDP 结合形式的 EF1a 从核糖体解离, 随后由 EF1b 催化重新转化为具有活性的 GTP-EF1a^[26]。此外, EF-1 α 还参与细胞增殖、运动、蛋白质周转及信号转导等过程^[27]。近年研究更揭示其参与 DNA 复制及细胞凋亡密切相关^[28-29]。EF-1 α 已被证实在多种原虫的致病中发挥作用, 如肠贾第虫 EF-1 α 蛋白在滋养体阶段定位于核区, 但在入侵宿主细胞过程中会发生亚细胞转位, 重定位于细胞质; 而定位于孢子表面及顶质体内膜下方的微小隐孢子虫 EF-1 α 可参与宿主细胞的入侵^[30-31]。尽管目前对弓形虫 EF-1 α 尚无系统性研究, 但其家族同系物 EF2 已被证实调节弓形虫氧感应蛋白 PHYb 介导的翻译延伸过程。此外, 弓形虫 PHYb 蛋白虽非弓形虫入侵、复制或逸出所必需, 但其对维持高效裂殖生长及胞外存活至关重要^[32]。在本研究中, 弓形虫 EF-1 α 在 co-IP 中与 IL-12 产生正向结合, 但在反向 co-IP 中未被检测出相应 IP 条带。

微管蛋白超家族包含 6 个亚组, 均具有 [S/A/G]-G-G-T-G-[S/A]-G 保守基序, 其中 α 、 β 及 γ -微管蛋白在所有真核细胞中高度保守, δ 、 ϵ 、 ζ -微管蛋白则参与基体与中心粒构建, 仅存在于具有这类结构的生物中^[33]。基于微管蛋白的细胞骨架结构对顶复门原虫具有关键作用, 被认为是疫苗或药物研发的重要靶点^[34]。在弓形虫中, 微管蛋白对虫体分裂、入侵、鞭毛形成等生命周期核心过程不可或缺, 其基因组内包含 3 个 α -tubulin 同种型 ($\alpha 1$ -TGME49_316400、 $\alpha 2$ -TGME49_231770、 $\alpha 3$ -TGME49_231400) 和 3 个 β -tubulin 同种型 ($\beta 1$ -TGME49_266960、 $\beta 2$ -TGME49_221620、 $\beta 3$ -TGME49_212240)^[35]。全基因组 CRISPR 筛选显示, $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 微管蛋白为体外速殖子存活所必需, 而 $\alpha 3$ 和 $\beta 3$ 则非必需基因^[36]。3 个 β -tubulin 同种型氨基酸序列同一性为 96.4%~96.9%、相似性达 98%~98.7%, 主要差异集中于 C 端最后 8 个氨基酸中的 7 个位点; 而 3 个 α -tubulin 同种型间同一性为 35.5%~68.3%、相似性 52.7%~79.4%, 其中 $\alpha 3$ 型与其他二者差异显著^[35]。RNA 测序分析表明, 3 种 β -tubulin 的 mRNA 存在于速殖子、缓殖子及卵囊等所有生命周期, 而 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 的 mRNA 在速殖子阶段缺失^[37]。在本研究中, 通过 IP 配合质谱分析, 鉴定出的能够与宿主 IL-12 结合的潜在互作分子 β -

tubulin 为 $\beta 2$ 同种型。尽管在后续 co-IP 验证中 β -tubulin 可与宿主 IL-12 产生正向结合, 但其反向结合中却未能观察到相应 IP 结果, 提示可能存在中间分子连接 β -tubulin 与 IL-12 的互相作用, 但需要进一步研究。

IL-12 不仅是介导宿主抗弓形虫免疫防御的核心效应因子, 还可作为细胞因子佐剂提升疫苗免疫效能。研究证实, 以弓形虫 MIC8 蛋白联合 IL-12 作为免疫原, 可显著诱导感染小鼠血清 IgG/IgG2a 抗体滴度升高, 并引起脾细胞 IFN- γ 分泌水平上调, 从而显著延长感染宿主的生存周期^[38]。目前, 弓形虫通过产生效应蛋白劫持宿主免疫调控网络的分子机制仍存在诸多盲区。聚焦效应蛋白对 IL-12 信号通路的靶向干预, 不仅可系统解析弓形虫免疫逃逸的分子策略, 更可为开发靶向阻断型疫苗或药物提供理论依据。本研究基于 IP 联合质谱分析, 初步鉴定出 39 种能够与小鼠 IL-12 结合的潜在结合分子, 并验证了弓形虫 14-3-3、EF-1 α 、Rab1a、 β -tubulin、HYP 与 IL-12 的互作可能性。尽管正反向 co-IP 试验未能验证其直接相互作用, 但可能存在弓形虫效应蛋白通过非经典途径调控宿主 IL-12 的功能。后续研究可整合基因编辑技术、组学技术与生物信息学技术, 进一步系统筛选 IL-12 结合蛋白并解析其功能特性, 重点阐明其对 IL-12 信号通路的调控节点及分子机制, 为开发靶向 IL-12 通路的抗弓形虫治疗策略提供新思路。

参考文献:

- [1] MATTA S K, RINKENBERGER N, DUNAY I R, et al. *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19 (7): 467-480.
- [2] BEHNKE M S, DUBEY J P, SIBLEY L D. Genetic mapping of pathogenesis determinants in *Toxoplasma gondii* [J]. Annu Rev Microbiol, 2016, 70: 63-81.
- [3] SASAI M, YAMAMOTO M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection [J]. Exp Mol Med, 2019, 51 (12): 1-10.
- [4] MAHMOUDZADEH S, NOZAD CHAROUDEH H, MARQUES C S, et al. The role of IL-12 in stimulating NK cells against *Toxoplasma gondii* infection; a mini-review [J]. Parasitol Res, 2021, 120 (7): 2303-2309.
- [5] HUNTER C A, SIBLEY L D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors [J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10 (11): 766-778.
- [6] LIMA T S, LODOEN M B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii* [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 103.
- [7] WONG Z S, BORRELLI S L S, COYNE C C, et al. Cell type- and species-specific host responses to *Toxoplasma gondii* and its

- near relatives [J]. *Int J Parasitol*, 2020, 50 (5): 423–431.
- [8] SASAI M, YAMAMOTO M. Anti-*Toxoplasma* host defense systems and the parasitic counterdefense mechanisms [J]. *Parasitol Int*, 2022, 89: 102593.
- [9] VIGNALI D A A, KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13 (8): 722–728.
- [10] TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3 (2): 133–146.
- [11] CHANDRASEKARAN S, KOCHANOWSKY J A, MERRITT E F, et al. IFN- γ stimulated murine and human neurons mount anti-parasitic defenses against the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 4605.
- [12] SNYDER L M, DOHERTY C M, MERCER H L, et al. Induction of IL-12p40 and type 1 immunity by *Toxoplasma gondii* in the absence of the TLR-MyD88 signaling cascade [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17 (10): e1009970.
- [13] SLUCHANKO N N, GUSEV N B. 14-3-3 proteins and regulation of cytoskeleton [J]. *Biochemistry*, 2010, 75 (13): 1528–1546.
- [14] ASSOSSOU O, BESSON F, ROUAULT J P, et al. Subcellular localization of 14-3-3 proteins in *Toxoplasma gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 224 (2): 161–168.
- [15] ASSOSSOU O, BESSON F, ROUAULT J P, et al. Characterization of an excreted/secreted antigen form of 14-3-3 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234 (1): 19–25.
- [16] WEIDNER J M, KANATANI S, UCHTENHAGEN H, et al. Migratory activation of parasitized dendritic cells by the protozoan *Toxoplasma gondii* 14-3-3 protein [J]. *Cell Microbiol*, 2016, 18 (11): 1537–1550.
- [17] MENG M, HE S, ZHAO G, et al. Evaluation of protective immune responses induced by DNA vaccines encoding *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and 14-3-3 protein in BALB/c mice [J]. *Parasit Vectors*, 2012, 5: 273.
- [18] LI F C, LIU Q, ELSHEIKHA H M, et al. Identification of two novel host proteins interacting with *Toxoplasma gondii* 14-3-3 protein by yeast two-hybrid system [J]. *Parasitol Res*, 2018, 117 (4): 1291–1296.
- [19] ZERIAL M, MCBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2 (2): 107–117.
- [20] KREMER K, KAMIN D, RITTWEGER E, et al. An overexpression screen of *Toxoplasma gondii* Rab-GTPases reveals distinct transport routes to the micronemes [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9 (3): e1003213.
- [21] STEDMAN T T, SUSSMANN A R, JOINER K A. *Toxoplasma gondii* Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (7): 5433–5443.
- [22] AGOP-NERSESIAN C, EGARTER S, LANGSLEY G, et al. Biogenesis of the inner membrane complex is dependent on vesicular transport by the alveolate specific GTPase Rab11B [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6 (7): e1001029.
- [23] AGOP-NERSESIAN C, NAISSANT B, BEN RACHED F, et al. Rab11A-controlled assembly of the inner membrane complex is required for completion of apicomplexan cytokinesis [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (1): e1000270.
- [24] WANG Q Q, SUN M, TANG T, et al. Functional screening reveals *Toxoplasma* prenylated proteins required for endocytic trafficking and rhoptry protein sorting [J]. *mBio*, 2023, 14 (4): e0130923.
- [25] WANG Q Q, HE K, ALEEM M T, et al. Prenyl transferases regulate secretory protein sorting and parasite morphology in *Toxoplasma gondii* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (8): 7172.
- [26] BROWNE G J, PROUD C G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269 (22): 5360–5368.
- [27] RIDGLEY E L, XIONG Z H, KAUR K J, et al. Genomic organization and expression of elongation factor-1 α genes in *Trypanosoma brucei* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 79 (1): 119–123.
- [28] TOUEILLE M, SAINT-JEAN B, CASTROVIEJO M, et al. The elongation factor 1A: a novel regulator in the DNA replication/repair protein network in wheat cells [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45 (2): 113–118.
- [29] LAMBERTI A, LONGO O, MARRA M, et al. C-Raf antagonizes apoptosis induced by IFN- α in human lung cancer cells by phosphorylation and increase of the intracellular content of elongation factor 1A [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14 (5): 952–962.
- [30] SKARIN H, RINGQVIST E, HELLMAN U, et al. Elongation factor 1-alpha is released into the culture medium during growth of *Giardia intestinalis* trophozoites [J]. *Exp Parasitol*, 2011, 127 (4): 804–810.
- [31] MATSUBAYASHI M, TERAMOTO-KIMATA I, UNI S, et al. Elongation factor-1 α is a novel protein associated with host cell invasion and a potential protective antigen of *Cryptosporidium parvum* [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (47): 34111–34120.
- [32] LIS A, BAPTISTA C G, DAHLGREN K, et al. Identification of *Toxoplasma* calcium-dependent protein kinase 3 as a stress-activated elongation factor 2 kinase [J]. *mSphere*, 2023, 8 (4): e00156–23.
- [33] FINDEISEN P, MÜHLHAUSEN S, DEMPEWOLF S, et al. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family [J]. *Genome Biol Evol*, 2014, 6 (9): 2274–2288.
- [34] FERREIRA J L, FRISCHKNECHT F. Parasite microtubule arrays [J]. *Curr Biol*, 2023, 33 (16): R845–R850.
- [35] DELGADO I L S, GONÇALVES J, FERNANDES R, et al. Balancing act: tubulin glutamylation and microtubule dynamics in *Toxoplasma gondii* [J]. *Microorganisms*, 2024, 12 (3): 488.
- [36] SIDIK S M, HUET D, GANESAN S M, et al. A genome-wide CRISPR screen in *Toxoplasma* identifies essential apicomplexan genes [J]. *Cell*, 2016, 166 (6): 1423–1435.
- [37] TELL I PUIG A, SOLDATI-FAVRE D. Roles of the tubulin-based cytoskeleton in the *Toxoplasma gondii* apical complex [J]. *Trends Parasitol*, 2024, 40 (5): 401–415.
- [38] ZHAO H G, HUANG F Y, GUO J L, et al. Evaluation on the immune response induced by DNA vaccine encoding MIC8 co-immunized with IL-12 genetic adjuvant against *Toxoplasma gondii* infection [J]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 2013, 31 (4): 284–289.