

姚文浩, 吴兴隆, 秦志博, 等. 大片吸虫磷酸丙糖异构酶基因的克隆表达和免疫原性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 39-45.

YAO W H, WU X L, QIN Z B, et al. Cloning, expression and immunogenicity of triosephosphate isomerase of *Fasciola gigantica* (FgTPI) [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 39-45.

大片吸虫磷酸丙糖异构酶基因的克隆表达和免疫原性分析

姚文浩, 吴兴隆, 秦志博, 李文豪, 朱惠丽, 王磊, 胡建和, 韩艳辉*

(河南科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 磷酸丙糖异构酶 (TPI) 是生物体糖酵解的一种关键酶, 对大片吸虫获取能量而赖以生存有着十分重要的作用。本试验根据肝片吸虫 TPI (GenBank: KC164346.1) 的基因序列, 设计带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 作为酶切位点的引物, 以大片吸虫的 cDNA 为模板, 扩增大片吸虫磷酸丙糖异构酶 (FgTPI) 基因。结果: FgTPI 基因开放阅读框为 762 bp, 编码 253 个氨基酸, 理论等电点 pI 为 8.07; 构建的重组表达质粒 FgTPI-pET-28a (+) 成功在大肠杆菌中表达, 重组蛋白的分子量约为 32 kDa; 重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 收取多克隆抗体, ELISA 检测结果显示, rFgTPI 能诱导较高的 IgG 抗体水平; 用感染大片吸虫动物的血清检测重组蛋白的免疫原性, Western blot 分析表明, 重组蛋白 rFgTPI 具有良好的免疫原性; 生物信息学预测显示, FgTPI 主要以 α 螺旋和 β 折叠为主, β 转角较少, 有 3 个较长的无规则卷曲; 通过 α -磷酸甘油脱氢酶偶联法测定其活性, 发现 FgTPI 酶促反应最佳 pH 值为 7.5, 最适温度为 35 $^{\circ}$ C。本试验结果为深入研究 FgTPI 的生物学功能、评价其作为抗大片吸虫病疫苗候选分子奠定了基础。

关键词: 大片吸虫; 磷酸丙糖异构酶; 克隆; 表达; 酶活性分析

中图分类号: S855.9.9 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)01-0039-07

Cloning, expression and immunogenicity of triosephosphate isomerase of *Fasciola gigantica*

YAO Wenhao, WU Xinglong, QIN Zhibo, LI Wenhao, ZHU Huili, WANG Lei, HU Jianhe, HAN Yanhui*

(Henan University of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Triosephosphate isomerase (TPI) is a key glycolytic enzyme that exists in the organisms and plays an important role in obtaining energy for the life of *Fasciola gigantica*. In this study, the full-length cDNA encoding FgTPI was cloned according to the gene sequence of TPI from *Fasciola gigantica*, and the primer with *Bam*H I and *Xho* I as enzyme digestion sites was designed. The cDNA from *Fasciola gigantica* was used as a template. The results were as follows: The open reading frame (ORF) of FgTPI was 762 bp, encoding 253 amino acids with an isoelectric point of 8.07. The ORF of was sub-cloned into pET-28a (+) vectors and expressed in *Escherichia coli* with a molecular weight of 32 kDa. The BALB/c mouse was injected with the purified recombinant of FgTPI, and the polyclonal antibodies were prepared. ELISA assay analysis showed that rFgTPI could induce high levels of anti-rFgTPI-specific IgG antibodies. The result of western blotting showed that recombinant FgTPI had good antigenicity by using the serum from the sheep infected with *Fasciola gigantica*. The recombinant protein showed the optimal activity of TPI at pH 7.5 and temperature of 35 $^{\circ}$ C, according to α -glycerol phosphate dehydrogenase coupling method. The above results indicated that FgTPI could be a potential candidate for vaccine against Fascioliasis, which would provide basis for further investigation into the biological function of FgTPI.

Keywords: *Fasciola gigantica*; triosephosphate isomerase; cloning; expression; enzymatic activity analysis

片形吸虫病是大片吸虫 (*Fasciola gigantica*) 和肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 寄生于反刍动物和人的

肝脏、胆管中引起的一种人兽共患寄生虫病^[1-2]。片形吸虫病是一种食源性寄生虫病, 人类是偶感宿主, 通过饮用受污染的水或水生植物而感染。该病影响全球超过 75 个国家的 240 万人, 感染了全球数百万反刍动物, 每年造成超过 30 亿美元的经济损失^[3]。近年来, 农田灌溉面积扩大、湿地改造等人为活动使片形吸虫病的感染率呈上升趋势^[4], 世界卫生组织将其归类为一种被忽视的热带疾病^[5]。目前, 三氯苯

收稿日期: 2022-11-16; 修回日期: 2023-10-31

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFD1301200); 中原科技创新领军人才项目 (224200510024)

第一作者: 姚文浩, 男, 学士

* 通信作者: 韩艳辉, 博士, 讲师, 主要研究方向为人兽共患寄生虫病学, E-mail: han2019hknjxy@126.com。

达唑 (TCBZ) 是治疗片形吸虫病的首选药物, 然而过度使用会导致耐药性的产生, 荷兰、智利、土耳其和秘鲁等地均出现了抗 TCBZ 虫株, 这对该病的预防和控制产生了巨大影响^[6], 开发新的抗片形吸虫病疫苗候选分子迫在眉睫。

大片吸虫主要依赖糖酵解获取能源赖以生存^[7], 而磷酸丙糖异构酶 (TPI) 是糖酵解过程中必不可少的酶, 它可以将磷酸二羟丙酮转化为 3-磷酸甘油醛^[8]。TPI 作为糖酵解的关键酶, 广泛存在于各类生物中, 科学家已从多种生物体中克隆并成功表达出该基因^[9]。有研究显示, TPI 可用于开发药物或疫苗, 不仅用于克服华支睾吸虫病, 还包括其他人畜共患的蠕虫病^[10]。目前, 对大片吸虫 TPI (FgTPI) 的研究微乎其微。本试验以大片吸虫的 TPI 为研究对象, 对该基因的生物学特性进行了初步分析, 为评价其作为抗大片吸虫病疫苗候选分子的潜在能力, 以及深入研究 FgTPI 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒、实验动物

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)、表达质粒 pET-28a (+) 和大片吸虫 cDNA 模板均由河南科技学院动物科技学院实验室保存; 6 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠购自河南斯克贝斯生物有限公司。

1.2 主要试剂和酶

DNA 凝胶回收试剂盒 (离心柱型)、高纯度质粒 DNA 小提试剂盒 (离心柱型)、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶、DNA 标志物均购自 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京全式金生物技术有限公司; Ni Sepharose excel 购自美国 General Electric 公司。酶活性测定试剂均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 引物的设计与合成

参照 NCBI 收录的肝片吸虫基因 (No. KC164346.1) 核苷酸序列, 通过软件设计含有限制性酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I 的引物, 引物由 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.4 目的基因的克隆

以大片吸虫的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。95 °C 预变性 5 min; 95 °C 50 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。凝胶电泳鉴定并回收目的片段。目的片段与 pMD19-T 连接过夜, 按照转化说明书将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞中, 培养过夜, 挑取单克隆, PCR 鉴定并测序。

1.5 FgTPI 基因的序列测定及生物信息学分析

对鉴定正确的质粒进行生物信息学分析。用 BLAST 软件进行基因序列分析, 并进行序列相似性比较。运用在线网站 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对 FgTPI 蛋白序列进行亲疏水性分析, 并在网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 上进行参数分析, 最后利用在线网站 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测其三级结构。运用 DNASTar 软件分析 FgTPI 的蛋白分子量和理论等电点 (PI)。

1.6 重组质粒 FgTPI-pET-28a (+) 的构建

对 1.4 中的测序正确样品提取质粒, 并进行双酶切, 并与双酶切的 pET-28a (+) 质粒 16 °C 连接过夜, 构建重组表达质粒 FgTPI-pET-28a (+)。

1.7 重组质粒在大肠杆菌中的表达与表达产物的纯化

按照转化说明书将 1.6 中的连接产物转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 经 PCR 扩增、酶切及测序鉴定正确后, 大量扩增, 并进行诱导表达。获得可溶性重组蛋白 rFgTPI, 用 Ni Sepharose excel 进行蛋白的纯化, SDS-PAGE 验证纯化效果。

1.8 动物免疫与免疫血清制备

选择 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 30 只, 随机分成 3 组, 分别为免疫组 (FgTPI-Adjuvant)、佐剂对照组 (206-Adjuvant) 和空白对照组 (PBS)。免疫组每次每只注射 100 μ L 含 206 佐剂和 20 μ g 纯化的重组蛋白 rFgTPI 的乳化剂; 佐剂对照组每次每只注射 100 μ L 含 206 佐剂和 PBS 的乳化剂; 空白对照组每次每只注射 100 μ L 的 PBS。3 组均腹腔注射, 每隔 1 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。小鼠免疫之前 (阴性血清) 以及每次免疫之后 1 周采血, 分离并收集血清, 备用。

1.9 重组蛋白的 Western blot 分析

将 10 μ g 重组蛋白 rFgTPI 进行 SDS-PAGE, 后转移至硝酸纤维素膜上, 加入 0.5% 的 PBST-脱脂奶粉, 4 °C 封闭过夜。随后分别与感染大片吸虫羊的血清 (1:500)、未感染的阴性血清 (1:500) 共孵育, 室温静置 2 h, PBST 洗涤 3 次, 与兔抗羊 IgG-HRP (1:2000) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 用自动化学发光图像分析系统进行成像分析。

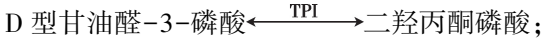
1.10 ELISA 检测特异性 IgG 抗体水平

以纯化的重组蛋白 rFgTPI 为抗原包被 ELISA 板, 以 1.8 中制备的免疫血清为一抗, 检测 3 组小鼠免疫前后血清中抗 rFgTPI 特异性抗体 IgG 的效价变化。以包被缓冲液稀释抗原浓度至 10 μ g/mL, 每孔 100 μ L, 4 °C 过夜。用 PBST 洗涤 3 次后, 每孔加入 150 μ L PBST-1.5% 牛血清白蛋白进行封闭, 37 °C 孵

育 1 h。PBST 洗涤 3 次，每孔加入 100 μL 被检血清 (1 : 100)，37 °C 孵育 2 h。PBST 洗涤 3 次，加入羊抗小鼠 IgG-HRP (1 : 1 000) 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次，然后加入可溶性 TMB 底物 100 μL，避光显色 5 min，加入 2 mol/L H₂SO₄ (50 μL/孔) 终止反应，用 BioTek 公司的酶标仪测定 450 nm 处的吸光值。

1.11 重组蛋白的酶活性分析

采用 α-磷酸甘油脱氢酶偶联法对该重组蛋白进行酶活性研究^[11]，偶联反应式如下：



反应的溶液为 TE 缓冲液 (100 mmol/L 三乙醇胺，10 mmol/L EDTA) 添加 0.2 mmol/L 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)，0.9 个单位的 α-磷酸甘油脱氢酶 (α-GDH) 和 1 mmol/L D 型甘油醛-3-磷酸 (GAP)。加入 5 ng/mL 的 FgTPI 开始反应。以质粒 pET-28a(+) 作为阴性对照。

1.11.1 pH 值对酶活性的影响

调节反应体系 pH 值依次为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0。分别测定上述反应体系在各个 pH 条件下 3 min 内 340 nm 处吸光度的变化情况。

1.11.2 温度对酶活性的影响

选用 20、25、30、35、40、45 和 50 °C 共 7 个温度点，分别测定上述反应体系在各温度条件下 3 min 内 340 nm 处吸光度的变化情况。

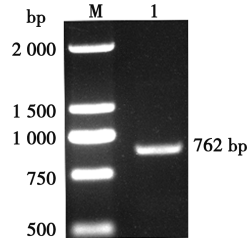
1.11.3 动力学参数测定

反应混合物的最终体积为 1 mL 的 TE 缓冲液，含有 GAP (1 mmol/L)、NADH (0.2 mmol/L)、0.9 单位的 α-GDH 和 5 ng/mL 的 FgTPI。通过在最佳温度和最佳 pH 值下改变 GAP 浓度 (0~3 mmol/L)，测量初始速度，然后采用双倒数法作图，确定 GAP 的米氏常数和最大反应速度。

2 结果

2.1 FgTPI 基因扩增

PCR 克隆基因 FgTPI，DNA 凝胶电泳显示，在 762 bp 处可见明显片段 (图 1)。



M. DNA 分子质量标准；1. FgTPI PCR 产物。

图 1 FgTPI 基因的 PCR 扩增

2.2 相似物种 TPI 的 BLAST 分析

选择分别来自肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*, 简称 FhTPI) 253 aa (GenBank: AGJ83762.1)，捻转血矛线虫 (*Haemonchus contortus*, 简称 HcTPI) 247 aa (GenBank: ADR66027.1)，日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, 简称 SjTPI) 252 aa (GenBank: AAC47855.1)，曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*, 简称 SmTPI) 252 aa (GenBank: XP_018647623.1)，马来丝虫 (*Brugia malayi*, 简称 BmTPI) 247 aa (GenBank: XP_001897269.1)，秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*, 简称 CelTPI) 247 aa (GenBank: NP_001366651.1) 和人 (*Homo sapiens*, 简称 HsTPI) 249 aa (GenBank: AAH17917.1) 7 个物种的 TPI 与所得大片吸虫的 TPI 序列进行比对，结果显示 FgTPI 编码的氨基酸序列与其他物种 TPI 基因相似性分别为 99.60% (肝片吸虫)、68.25% (人)、67.86% (血吸虫)。用 DNASTar 软件将该 ORF 所编码的氨基酸序列与上述 GenBank 中已经公布的其他物种的 TPI 氨基酸序列进行分析，发现该序列含有 TPI 活性功能位点序列 AYEPVWAIGTG (图 2)。

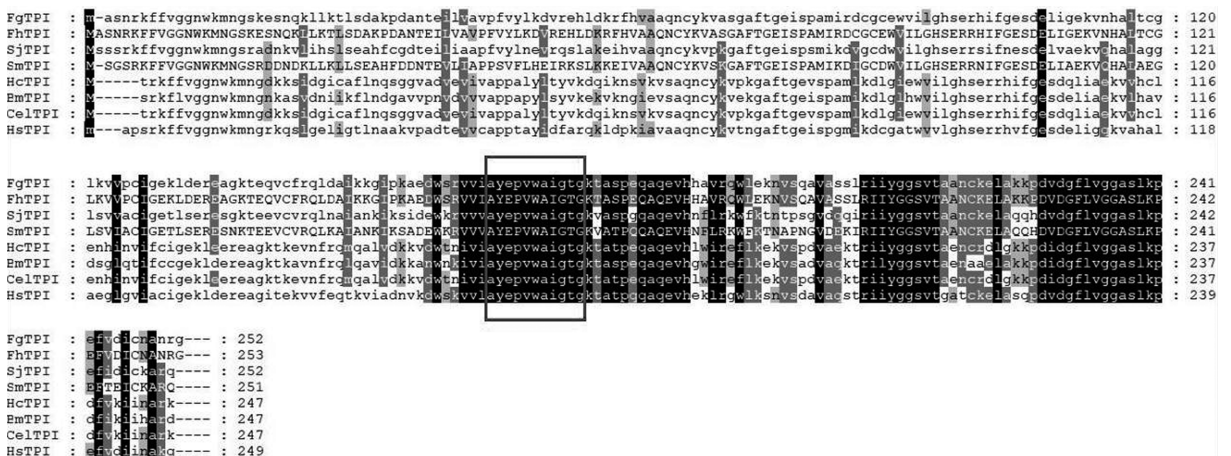


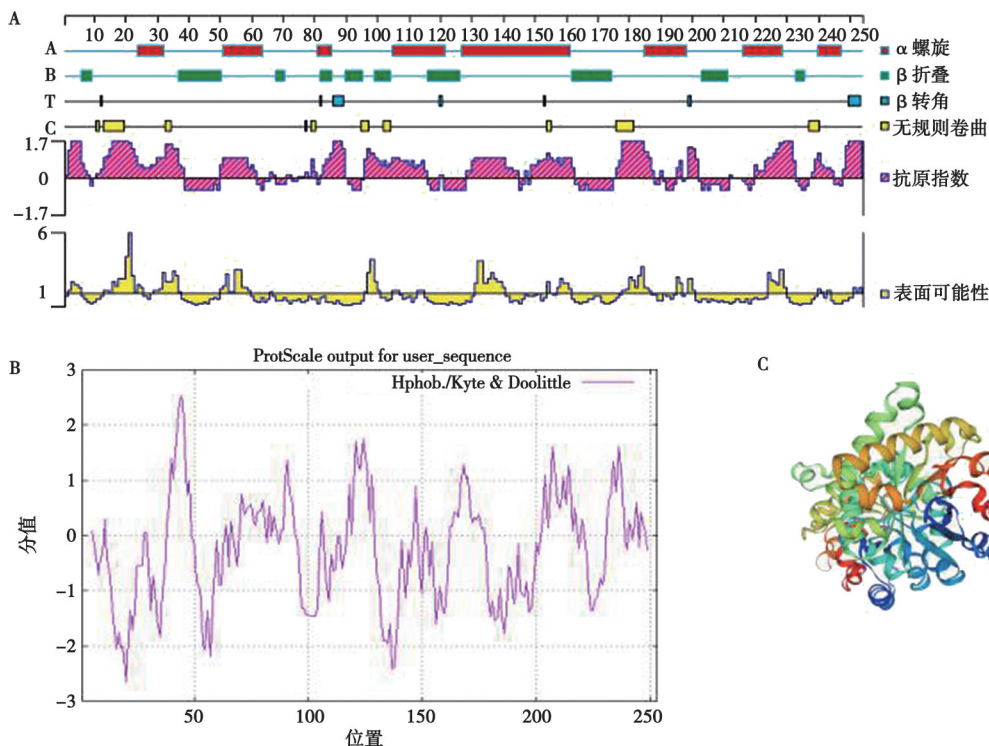
图 2 大片吸虫 TPI 基因编码的氨基酸序列与其他物种 TPI 序列比对分析

2.3 FgTPI 基因编码蛋白的分析

FgTPI 基因开放阅读框为 762 bp, 编码 253 个氨基酸, 如图 3A 所示。分析 FgTPI 的二级结构, 发现该蛋白以 α 螺旋为主, 分别位于 24~32、51~63、81~85、105~121、127~161、185~198、216~228、240~247; β 折叠相对 α 螺旋较少, 主要位于 37~50、90~95、99~104、116~126、162~174、203~211; β 转角区较少; 较长的无规则卷曲分别位于

13~19、176~181。结合柔性区域和表面可及性的预测结果表明, FgTPI 蛋白主要含有 6 个线性 B 细胞抗原表位, 分别位于氨基酸序列的第 3~5、16~20、86~88、178~184、229~231、250~253 位。此外, 对目的蛋白亲疏水性 (图 3B) 以及三级结构预测 (图 3C) 均进行了分析。

DNASar 分析显示, 该蛋白分子量为 27 794.81 Da, 理论等电点 pI 为 8.07。



A. 二级结构与 B 细胞抗原表位分析; B. 疏水性分析; C. 三级结构预测。

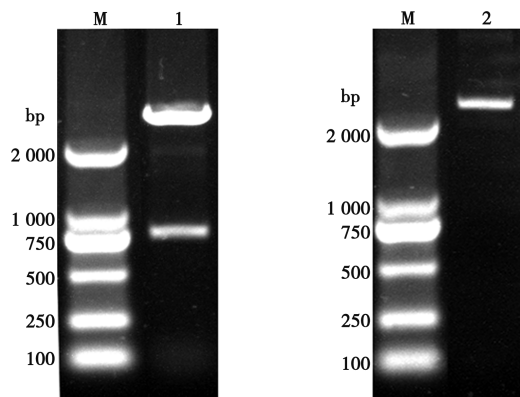
图 3 FgTPI 蛋白的生物信息学分析

2.4 重组质粒 FgTPI-pET-28a (+) 的鉴定

重组质粒 FgTPI-pET-28a (+) 酶切鉴定分别能得到 762 bp 的目的基因和相应大小的重组质粒片段, 说明该重组质粒构建成功 (图 4)。

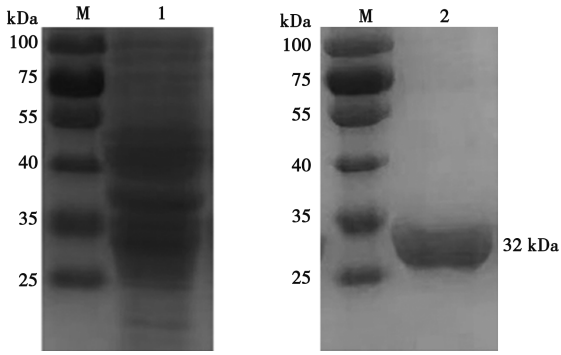
2.5 rFgTPI 纯化

大量扩增的重组菌液 OD_{600} 值为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 30 °C 诱导 6 h, 此时上清液表达量最高。菌液 12 000 r/min 离心 20 min, 收取上清液, 用 Ni Sepharose excel 纯化柱进行蛋白纯化。SDS-PAGE 分析表明, 在上清液中收集到了重组蛋白 rFgTPI (图 5)。



M. DNA 标准分子量 DL2000; 1. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 FgTPI-pET-28a (+) 质粒; 2. 未酶切的 FgTPI-pET-28a (+) 质粒。

图 4 重组质粒 pMD19-T-TPI 酶切鉴定

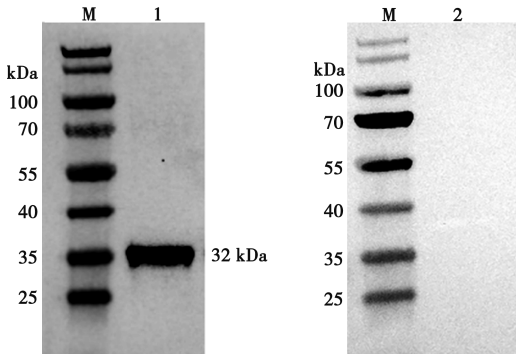


M. 蛋白分子量标准; 1. 未纯化的 rFgTPI; 2. 纯化后的 rFgTPI。

图5 重组蛋白 rFgTPI 的纯化

2.6 重组蛋白的 Western blot 分析

将重组蛋白进行 SDS-PAGE 之后进行 Western blot 分析, 结果显示, 用感染大片吸虫的羊血清作为一抗时, 32 kDa 处有一明显的识别条带, 而阴性对照组在 32 kDa 处未有条带出现, 表明重组蛋白具有良好的免疫反应性 (图6)。



M. 蛋白分子量标准; 1. 一抗为大片吸虫感染羊的血清; 2. 一抗为阴性血清。

图6 重组蛋白 rFgTPI 的 Western blot 分析

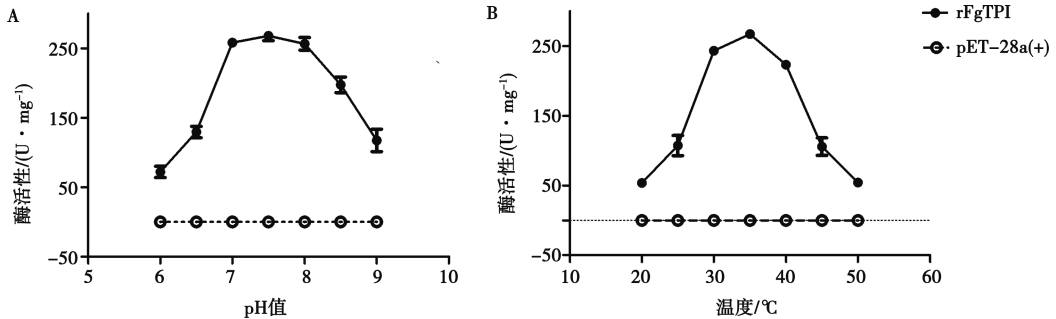


图8 pH值 (a) 和温度 (b) 对 TPI 酶活性的影响

3 讨论

随着现代社会的进步, 人们对粮食的需求不断提高, 绿色食品、人与自然和谐共存的概念已成为当今时代的主流, 因此, 大片吸虫病作为一种重要的食源

2.7 小鼠血清抗 rFgTPI 蛋白特异性抗体的检测

ELISA 检测 3 组小鼠免疫前后血清中抗体 IgG 的效价变化。结果显示, 重组蛋白一免、二免、三免后特异性抗体水平较 206 佐剂组和空白对照组显著升高 ($P < 0.01$), 在三免后其抗体水平达到最大值; 而佐剂对照组和空白对照组血清中抗 rFgTPI 的特异性 IgG 抗体水平均未出现明显变化 (图7)。

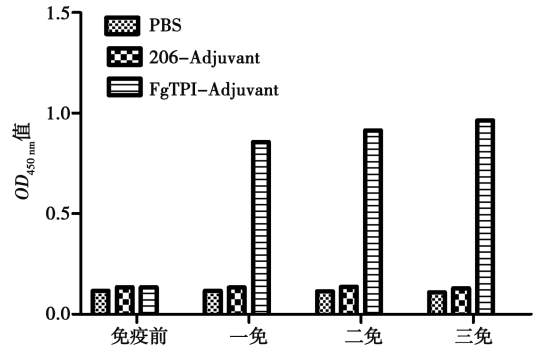


图7 ELISA 检测小鼠抗 rFgTPI 特异性 IgG 抗体水平

2.8 酶活性的测定

采用 α -磷酸甘油脱氢酶偶联法对 rFgTPI 进行酶活性的测定, 并进一步研究了 pH 值和温度对其活性的影响。结果显示 (图8), 重组蛋白 rFgTPI 具有一定的 TPI 活性, 其酶促反应最佳 pH 值为 7.5, 最佳温度为 35 °C; pET-28a (+) 空载体蛋白不具有 TPI 活性。

酶促反应动力学结果显示, 米氏常数和最大反应速度分别为 (0.57 ± 0.1) mmol/L 和 3 102.4 mmol/ (min · L)。

性疾病引起了人们的广泛关注^[12]。吸虫感染是许多发展中国家人类残疾和死亡的主要原因, 并且仍然是 21 世纪医学面临的最重要挑战之一^[7]。诊断片形吸虫病有 2 种常见的方法: 一种是依赖于被屠宰动物肝组织中成虫的宏观鉴定, 另一种是基于粪便样本中寄

生虫虫卵的显微镜检测。然而,这2种方法准确性较低且具有一定的缺点:第1种方法局限性在于不能应用于人类疾病的检测;第2种方法的缺点在于直到感染晚期才能检测到虫卵,而且虫卵会间歇性地从胆管中分泌出来^[13]。近年来,与粪便标本的常规显微镜检查相比,免疫学技术变得更加敏感和特异,并且更受青睐^[14]。TCBZ为苯并咪唑类中专门用于治疗片形吸虫病的药物,对片形吸虫有明显驱杀效果,对牛和鹿大片吸虫病等均有效^[15]。然而,TCBZ耐药性虫株的出现给本病的防治带来了极大困难,因此,对单一药物治疗大片吸虫病的依赖性是该病未来面临的严峻挑战。寻求抗大片吸虫病候选疫苗成为一种新的治疗方法。

TPI是糖酵解途径中的一种关键酶,几乎存在于所有类型的细胞中^[16]。在高等动物中缺乏TPI酶可能会引起溶血性贫血,严重的甚至会导致生物个体死亡。目前,在生物体内,TPI的酶学活性没有其他酶类可以替代。TPI属于较古老的一类酶家族,其在真核原核分化之前就已经形成^[17]。本文成功地克隆了FgTPI基因,并且重组质粒FgTPI-pET-28a(+)在大肠杆菌中呈现可溶性表达。运用BLAST对比,FgTPI与肝片吸虫TPI的基因相似度高达99.60%。生物信息学分析显示,该重组蛋白B细胞抗原表位较多,表达的分子量为27 794.81 Da,理论等电点pI为8.07。TPI的酶活性位点附近的残基序列具有很高的保守性,目前已知的TPI都具有高度保守的序列特征^[17]。生物信息学分析发现,FgTPI活性功能位点序列为AYEPVWAIGTG。

目前,TPI在血吸虫的研究中较为深入,被WHO/TDR推荐为曼氏血吸虫病的6种候选抗原基因之一^[18]。Shomemaker等^[19]从曼氏血吸虫中分离出一段与TPI序列同源的全长cDNA,并在大肠杆菌中表达了SmTPI,通过免疫亲和纯化可溶性表达产物,又进一步证明该表达产物具有TPI活性,且能被具有免疫保护作用的单克隆抗体(McAb)M.1所识别,说明SmTPI是非常有前景的血吸虫候选疫苗。此外,日本血吸虫TPI已经被成功地克隆并表达。Dai等^[20]和Zhu等^[21]克隆并优化了日本血吸虫磷酸丙糖异构酶(SjTPI)的密码子,同时构建了不同类型的疫苗,包括DNA疫苗(pcDNA3.1-SjTPI、pcDNA3.1-SjTPI.opt)、重组蛋白疫苗(rSjTPI)和重组腺病毒疫苗(rAdV-SjTPI.opt),均诱导了很好的减虫率和减卵率。本试验Western blot结果显示,重组抗原rFgTPI具有较好的抗原性;ELISA结果指出,与佐剂对照组和空白对照组相比,rFgTPI诱导小鼠产生了较高水平的特异性IgG抗体,推测重组蛋白在宿主体

内可以诱导一定的免疫保护效果,为以后的动物免疫保护试验及DNA疫苗的制备提供依据。

TPI可以催化3-磷酸甘油醛与二羟丙酮磷酸之间的可逆反应,这一转换过程存在于几乎所有包括三糖磷酸脂代谢途径中,如糖酵解、糖异生、磷酸戊糖途径及脂肪酸的生物合成等^[22]。关于TPI的酶活性分析, α -磷酸甘油脱氢酶偶联法是常用的一种研究该酶活性的方法,本试验运用此方法对rFgTPI进行了酶活性测定,结果显示,FgTPI酶活性测定的最佳反应条件为pH=7.5、温度35℃,而阴性对照pET-28a(+)并未显示有TPI的活性;酶促反应动力学分析显示,米氏常数和最大反应速度分别为(0.57±0.1)mmol/L和3 102.4 mmol/(min·L)。本试验结果与之前报道的其他物种TPI的酶活性分析有一定的相似性,例如,肝片吸虫TPI(pH=7.6,37℃)^[23],日本血吸虫TPI(pH=7.5,37℃)^[24],贾第虫TPI(pH=7.4,25℃)^[25],猪带绦虫TPI(pH=7.5,25℃)^[26]和尖孢镰刀菌TPI(pH=8.0,37℃)^[27]。

综上所述,本文成功克隆表达了FgTPI,并对其抗原性进行了初步分析,为深入研究rFgTPI的生物学功能及评价其作为大片吸虫病疫苗候选的潜力奠定基础。

参考文献:

- [1] TRAN D H, PHUNG H T T. Detecting *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* microRNAs with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. J Parasit Dis, 2020, 44 (2): 364-373.
- [2] LAN Z, LIU X L, LV Q B, et al. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products co-immunoprecipitated using time course infection sera [J]. Pathogens, 2021, 10 (6): 749.
- [3] CWIKLINSKI K, O'NEILL S M, DONNELLY S, et al. A prospective view of animal and human *Fasciolosis* [J]. Parasite Immunol, 2016, 38 (9): 558-568.
- [4] 吕庆博,李娟,常巧呈,等.片形吸虫病免疫学诊断技术研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2019(17):34-37.
- [5] BEESLEY N J, WILLIAMS D J, PATERSON S, et al. *Fasciola hepatica* demonstrates high levels of genetic diversity, a lack of population structure and high gene flow: possible implications for drug resistance [J]. Int J Parasitol, 2017, 47 (1): 11-20.
- [6] KELLEY J M, ELLIOTT T P, BEDDOE T, et al. Current threat of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* [J]. Trends Parasitol, 2016, 32 (6): 458-469.
- [7] FERRARO F, CORVO I, BERGALLI L, et al. Novel and selective inactivators of triosephosphate isomerase with anti-trematode activity [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 2587.
- [8] ROLAND B P, STUCHUL K A, LARSEN S B, et al. Evidence of a triosephosphate isomerase non-catalytic function crucial to behavior and longevity [J]. J Cell Sci, 2013, 126 (Pt 14): 3151-3158.

- [9] 徐剑, 周君, 刘晓红, 等. 蜜蜂丙糖磷酸异构酶基因及其编码蛋白的生物信息学分析及分子进化研究 [J]. 江苏农业学报, 2009, 25 (2): 270-275.
- [10] SON J, KIM S, KIM S E, et al. Structural analysis of an epitope candidate of triosephosphate isomerase in *Opisthorchis viverrini* [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 15075.
- [11] RATHINASABAPATHI B, WU S, SUNDARAM S, et al. Arsenic resistance in *Pteris vittata* L.: identification of a cytosolic triosephosphate isomerase based on cDNA expression cloning in *Escherichia coli* [J]. Plant Mol Biol, 2006, 62 (6): 845-857.
- [12] NYINDO M, LUKAMBAGIRE A H. Fascioliasis: an ongoing zoonotic trematode infection [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 786195.
- [13] SAADH M J, TANASH S A, ALMAAYTAH A M, et al. Immunodiagnosis of cattle fascioliasis using a 27 kDa *Fasciola gigantica* antigen [J]. Vet World, 2021, 14 (8): 2097-2101.
- [14] BEYHAN Y E, YILMAZ H. Seroprevalence of fascioliasis in the eastern region of Turkey: an eight-year investigation [J]. Turk J Gastroenterol, 2020, 31 (11): 746-751.
- [15] 要瑞丽. 牛羊用抗肝片形吸虫复方三氯苯达唑颗粒的研究与应用 [J]. 兽药市场指南, 2020 (9): 4.
- [16] RODRÍGUEZ-BOLAÑOS M, MIRANDA-ASTUDILLO H, PÉREZ-CASTAÑEDA E, et al. Native aggregation is a common feature among triosephosphate isomerases of different species [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1): 1338.
- [17] 吴华俊. 松墨天牛磷酸丙糖异构酶基因的克隆及表达分析 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [18] 汪世平, 陈秀春, 高冬梅. 我国血吸虫疫苗研究进展及应用前景 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009 (5): 402-411.
- [19] SHOEMAKER C, GROSS A, GEBREMICHAEL A, et al. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89 (5): 1842-1846.
- [20] DAI Y, ZHAO S, TANG J, et al. Evaluation of protective efficacy induced by different heterologous prime-boost strategies encoding triosephosphate isomerase against *Schistosoma japonicum* in mice [J]. Parasit Vectors, 2017, 10 (1): 111.
- [21] ZHU Y, LU F, DAI Y, et al. Synergistic enhancement of immunogenicity and protection in mice against *Schistosoma japonicum* with codon optimization and electroporation delivery of SjTPI DNA vaccines [J]. Vaccine, 2010, 28: 5347-5355.
- [22] 苏会敏. 捻转血矛线虫磷酸丙糖异构酶基因克隆、表达、酶活性分析及重组谷氨酸脱氢酶活性测定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [23] ZINSSER V L, HOEY E M, TRUDGETT A, et al. Biochemical characterisation of triose phosphate isomerase from the liver fluke *Fasciola hepatica* [J]. Biochimie, 2013, 95 (11): 2182-2189.
- [24] SUN W, LIU S, BRINDLEY P J, et al. Bacterial expression and characterization of functional recombinant triosephosphate isomerase from *Schistosoma japonicum* [J]. Protein Expr Purif, 1999, 17 (3): 410-413.
- [25] HERNÁNDEZ-OCHOA B, NAVARRETE-VÁZQUEZ G, NAVAZUAZO C, et al. Novel giardicidal compounds bearing proton pump inhibitor scaffold proceeding through triosephosphate isomerase inactivation [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 7810.
- [26] JIMÉNEZ L, VIBANCO-PÉREZ N, NAVARRO L, et al. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium* [J]. Int J Parasitol, 2000, 30 (9): 1007-1012.
- [27] HERNÁNDEZ-OCHOA B, GÓMEZ-MANZO S, ALCARAZ-CARMONA E, et al. Gene cloning, recombinant expression, characterization, and molecular modeling of the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase from *Fusarium oxysporum* [J]. Microorganisms, 2019, 8 (1): 40.