

[文章编号] 1671-587X(2025)06-1595-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250615

弓形虫硫氧还蛋白20的表达纯化、抗体制备和亚细胞定位分析

施玉怡¹, 甘盛琦¹, 刘 澈¹, 程子文², 程 廓², 杨宝玲², 王大为¹

(1. 锦州医科大学畜牧兽医学院基础兽医学教研室, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州医科大学基础医学院病原生物学教研室, 辽宁 锦州 121000)

[摘要] **目的:** 对弓形虫硫氧还蛋白20 (Trx20) 进行表达纯化、抗体制备和亚细胞定位分析, 为弓形虫疫苗的研制提供参考。**方法:** 采用生物信息学相关网站及软件对 Trx20 蛋白进行生物信息学分析, 设计特异性引物进行目的片段扩增和原核表达载体构建, 进行蛋白质的体外表达和纯化。免疫实验动物进行抗体制备, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测多克隆抗体效价, Western blotting 法验证抗体的特异性和灵敏度以及确定该蛋白的天然表达情况, 间接免疫荧光法 (IFA) 分析蛋白的亚细胞定位。**结果:** 生物信息学分析, Trx20 蛋白是一种较稳定的亲水性蛋白, 分子式为 $C_{2172}H_{3412}N_{548}O_{616}S_{20}$, 含有 424 个氨基酸, 预测相对分子质量为 47 700, 理论等电点为 8.55; 预测该蛋白存在 1 个信号肽, 无跨膜区, 含有 1 个名为 “Thioredoxin like Superfamily” 的结构域, 并含 35 个磷酸化位点、1 个 N-糖基化位点和 17 个抗原决定簇; 二级结构中 α 螺旋占氨基酸总数的 41.51%, 无规则卷曲占 39.86%; 成功构建重组质粒 pET-28a-Trx20 和 pGEX-4T-1-Trx20, 实现了可溶性重组蛋白的表达和纯化; 成功制备多克隆抗体, 效价高达 1:64 000, 且对 Trx20 蛋白具有特异性识别能力; 亚细胞定位, Trx20 蛋白在虫体细胞质中广泛分布。**结论:** 刚地弓形虫 Trx20 蛋白是一种含有磷酸化/糖基化修饰位点和硫氧还蛋白结构域, 且为定位于虫体胞质中的分泌型蛋白质。

[关键词] 刚地弓形虫; 硫氧还蛋白20; 亚细胞定位; 蛋白纯化; 多克隆抗体

[中图分类号] S855.9 **[文献标志码]** A

Expression purification, antibody preparation, and subcellular localization analysis of *Toxoplasma gondii* thioredoxin 20

SHI Yuyi¹, GAN Shengqi¹, LIU Che¹, CHENG Ziwen², CHENG Kuo², YANG Baoling², WANG Dawei¹

(1. Department of Basic Veterinary Medicine, School of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China; 2. Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

ABSTRACT Objective: To express, purify, prepare antibodies, and analyze the subcellular localization of *Toxoplasma gondii* thioredoxin 20 (Trx20), and to provide the reference for the development of *Toxoplasma gondii* vaccine. **Methods:** Bioinformatics-related websites and software were used to perform bioinformatics analysis of the Trx20 protein; specific primers were designed to amplify the target fragment and construct the prokaryotic expression vector; the protein was expressed *in vitro* and purified; experimental animals

[收稿日期] 2024-10-26 [录用日期] 2025-03-01

[基金项目] 辽宁省教育厅青年基金项目 (JYTQN2023433, JYTQN2023435)

[作者简介] 施玉怡 (2000—), 女, 广东省汕尾市人, 在读硕士研究生, 主要从事人兽共患寄生虫病等方面的研究。

[通信作者] 王大为, 讲师, 硕士研究生导师 (E-mail: wangdawei0817@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

were immunized to prepare antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the titer of the polyclonal antibodies; Western blotting method was used to verify the specificity and sensitivity of the antibodies and to determine the natural expression of the protein; immunofluorescence assay (IFA) was used to analyze the subcellular localization of the protein. **Results:** The bioinformatics analysis results showed that Trx20 protein was a relatively stable hydrophilic protein with a molecular formula of $C_{2172}H_{3412}N_{548}O_{616}S_{20}$, containing 424 amino acids, a predicted relative molecular mass of 47 700, and a theoretical isoelectric point of 8.55; it was predicted that the protein had one signal peptide, no transmembrane region, contained one domain named "Thioredoxin like Superfamily", and had 35 phosphorylation sites, one N-glycosylation site, and 17 antigenic determinants; in the secondary structure, alpha-helices accounted for 41.51% of the total amino acids, and random coils accounted for 39.86%; the recombinant plasmids pET-28a-Trx20 and pGEX-4T-1-Trx20 were successfully constructed, and the soluble recombinant protein was expressed and purified; polyclonal antibodies were successfully prepared with a titer as high as 1:64 000, and they specifically recognized the endogenous Trx20 protein in *Toxoplasma gondii*; the subcellular localization results showed that Trx20 protein was widely distributed in the cytoplasm of the parasite. **Conclusion:** *Toxoplasma gondii* Trx20 protein is a secretory protein containing phosphorylation/glycosylation modification sites and a thioredoxin domain, and it is localized in the cytoplasm of the parasite.

KEYWORDS *Toxoplasma gondii*; Thioredoxin 20; Subcellular localization; Protein purification; Polyclonal antibody

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 属顶复门原虫, 是一种单细胞专性细胞内寄生原生动植物, 具有有性和无性生殖周期, 可感染大多数动物的有核细胞, 其成功寄生的关键在于可以逃避宿主的免疫机制, 从而导致慢性或终身感染^[1-2]。弓形虫感染宿主细胞后会激活先天免疫反应, 随后适应性免疫反应被启动, 其中包括抗原呈递以及特异性T淋巴细胞和B淋巴细胞反应的激活, 尽管免疫反应通常能够控制急性感染, 但无法清除组织内的包囊或阻止再次感染^[3]。作为一种重要的人兽共患病, 弓形虫感染不仅对人类健康造成威胁, 对畜牧业的发展也可造成极大的经济损失^[4]。临床上常用乙胺嘧啶联合磺胺嘧啶或克林霉素进行治疗, 磺胺类药物对急性弓形虫病有效, 但对慢性弓形虫病疗效有限^[5]。此外, 在采用磺胺类药物时应考虑其不良反应, 因此开发有效的疫苗或新的治疗方法迫在眉睫^[6]。

弓形虫硫氧还蛋白20 (thioredoxin 20, Trx20) 是一种在生物体内广泛存在、相对分子质量较小的氧化还原类蛋白质, 可与硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TrxR) 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 组成硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 系统^[7]。Trx作为一种抗氧化酶, 在生物体抵抗氧化应激中发挥重要作用, 同时也参与其他生物过程如

蛋白质折叠、DNA合成、细胞凋亡调控和蛋白质运输等关键生物过程^[8-10]。本研究通过生物信息技术分析刚地弓形虫 Trx20 (TGME49_209950) 的理化性质、空间结构和修饰位点等信息, 通过原核表达获得目的蛋白, 经纯化后免疫实验动物以制备特异性抗体, 进而利用该抗体对目的蛋白进行亚细胞定位分析, 为弓形虫疫苗的研制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物、寄生虫、细胞、主要试剂和仪器

20只6周龄昆明雌性小鼠, 由锦州医科大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号: SYXK [辽]2019-0007, 实验动物处置符合动物伦理学标准。弓形虫 RH 株速殖子由沈阳农业大学陈启军教授惠赠, 锦州医科大学病原学实验室传代与保存。Vero 细胞、原核表达载体 pET-28a 和 pGEX-4T-1 均由锦州医科大学病原生物学实验室保存。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 购自上海生工生物有限公司。PCR 扩增酶、反转录试剂盒、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Not* I 以及 T4 连接酶均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 胶回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 质粒提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside,

IPTG)、溶菌酶和HRP鼠二抗均购自北京索莱宝生物科技有限公司,弗氏(不)完全佐剂购自上海碧云天生物技术有限公司。恒温CO₂培养箱购自美国NUAIRE公司,PCR仪购自美国BIO-RAD公司,超声波细胞破碎仪购自宁波新芝生物技术有限公司,台式恒温摇床购自天津莱玻特瑞仪器设备有限公司。

1.2 Trx20蛋白的生物信息学分析

在弓形虫数据库(ToxoDB数据库)(<https://toxodb.org/toxo/app>中检索Trx20),下载其氨基酸序列,通过蛋白质理化性质预测平台(ProtParam软件)(<http://web.expasy.org/protparam>)分析Trx20蛋白的理化性质、亲水性和疏水性;分别通过蛋白质结构预测网站(Self-Optimized Prediction Method with Alignment, SOPMA)(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html和SWISS-MODEL网站(<https://swissmodel.expasy.org>)预测Trx20蛋白的二级和三级结构;通过蛋白质磷酸化位点预测网站(NetPhos-3.1网站)(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1>)分析Trx20蛋白的磷酸化位点;通过蛋白质糖基化位点预测网站(NetNGlyc-1.0网站)(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0>)和YinOYang-1.2网站(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/YinOYang-1.2>)分析Trx20蛋白的N-糖基化位点和O-糖基化位点;利用信号肽预测网站(SignalP-4.1网站)(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1>)预测Trx20蛋白的信号肽;利用跨膜区预测网站(TMHMM-2.0网站)(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)预测Trx20蛋白的跨膜区;通过抗原决定簇预测网站(Immunomedicine Group网站)(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenipl>)分析Trx20蛋白的抗原决定簇;利用结构域预测网站(Conserved domain Search网站)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测Trx20蛋白的结构域。

1.3 总RNA提取、引物设计和基因扩增

采用TRIzol方法由弓形虫RH菌株中提取RNA,并按逆转录试剂盒的方法将其逆转录为cDNA。在弓形虫数据库ToxoDB下载Trx20基因全长序列,运用Premier 5.0软件,根据载体pET-28a和pGEX-4T-1的克隆位点选择适宜的酶切位点进行引物设计。重组表达载体的引物设计见表1,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。以cDNA为模板进行PCR扩增,将PCR扩增产物通过0.7%琼脂糖凝胶电泳(恒压100 V、30 min)进行条带检测,以验证PCR扩增有效性、鉴定产物大小与特异性,为后续重组质粒构建提供合格模板。

1.3 总RNA提取、引物设计和基因扩增

1.4 Trx20重组表达载体构建

利用胶回收试剂盒纯化PCR产物后,分别使用BamH I和Not I限制性内切酶对目的片段Trx20及表达载体pET-28a和pGEX-4T-1进行双酶切,酶切产物经纯化后,在T4 DNA连接酶作用下分别构建重组质粒pET-28a-Trx20和pGEX-4T-1-Trx20。将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞中,37℃培养12 h后挑取单菌落进行PCR初步筛选,提取阳性克隆质粒进行BamH I和Not I双酶切验证,经琼脂糖凝胶电泳检测,呈现2条清晰且无明显杂带的特异性条带,最后将重组质粒送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

1.5 Trx20重组蛋白的表达、纯化和鉴定

1.5 Trx20重组蛋白的表达、纯化和鉴定

将经测序正确的重组质粒pET-28a-Trx20和pGEX-4T-1-Trx20转化至BL21(DE3)表达感受态细胞,37℃过夜培养。次日挑取单个菌落加入到含氨苄西林(ampicillin, Amp)或卡那霉素(kanamycin, Kana)抗性的液体LB中,37℃、200 r·min⁻¹摇床培养,培养12 h直至菌液呈现浑浊状态。首先进行pET-28a-Trx20和pGEX-4T-1-Trx20蛋白质的小量诱导表达:吸取10 μ L菌液按1:100比例将菌液接种到Amp或Kana抗性液体LB中,37℃,200 r·min⁻¹摇至菌液吸光度(A)值达到0.6~0.8时,加入终浓度为0.1 mmol·L⁻¹

表1 Trx20原核表达引物序列

Tab. 1 Primer sequences for prokaryotic expression of Trx20

Primer	Sequence(5'-3')	Product length(bp)
Trx20(BamH I)-F	AAGGATCCATGGCGCCTCTGCGTGTGT	1 200
Trx20(Not I)-R	TTGCGGCCGCCAGTTCGTCTTCTTGTC	

1.4 Trx20重组表达载体构建

1.5 Trx20重组蛋白的表达、纯化和鉴定

IPTG, 再依据诱导温度和时间不同, 设2组菌落实验条件分别为22℃、12 h和16℃、16 h继续培养, 同时设置不加IPTG的对照组。离心后收集沉淀, 冰上超声破碎菌体, 分别收集未诱导全菌、诱导全菌、诱导上清和诱导沉淀, 进行SDS-PAGE电泳。通过比较不同蛋白质诱导条件的SDS-PAGE图谱, 根据目的条带大小, 选取蛋白质表达量最大的条件进行后续pET-28a-Trx20和pGEX-4T-1-Trx20蛋白质的大量诱导表达。根据上述确定的最佳温度和时间扩大培养并收集菌体沉淀, 重悬于30 mL预冷Binding buffer中, 加入300 μL溶菌酶和60 μL蛋白酶抑制剂, 冰上静置30 min后超声破碎, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min收集上清。将上清液分别与适量Ni-Agarose Resin (pET-28a-Trx20纯化)或Sephacrose 4B (pGEX-4T-1-Trx20纯化)孵育, 采用不同浓度咪唑(pET-28a-Trx20纯化)或还原型谷胱甘肽(pGEX-4T-1-Trx20纯化)进行洗脱, 收集洗脱组分并通过SDS-PAGE电泳检测洗脱效果; 将含目的蛋白的洗脱液进一步透析、浓缩, 测定蛋白浓度后分装并于-80℃冻存备用。为确认Trx20融合蛋白的免疫原性及纯化效果, 最后采用Western blotting法对纯化后的Trx20蛋白进行鉴定。分别以pET-28a-Trx20和pGEX-4T-1-Trx20纯化产物为样品, 使用抗GST或抗His标签鼠单克隆抗体作为一抗(1:3 000), 以HRP标记山羊抗鼠IgG抗体作为二抗(1:3 000), 经ECL显影系统显色, 在目的条带大小处出现单一、清晰的特异性条带, 且无非特异性条带或杂带, 表明蛋白纯化效果好、特异性高。

1.6 Trx20多克隆抗体制备和效价检测

采用纯化的pET-28a-Trx20重组蛋白质免疫小鼠。将20只6周龄SPF级雌性昆明小鼠随机分为4组, 每组5只小鼠。免疫前采集未免疫小鼠血清作为阴性对照。将蛋白质与等体积的弗氏佐剂混匀后, 采用背部多点皮下注射的方式对每只小鼠免疫100 μg蛋白质; 每2周免疫1次, 共免疫4次。首次免疫使用弗氏完全佐剂, 后3次的免疫使用弗氏不完全佐剂; 第4次免疫结束后1周采尾静脉血样收集血清, 并按照酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)说明书进行效价检测。实验中将pGEX-4T-1-Trx20蛋白作为包被抗原, 把免疫所得血清及阴性血清按照按1:64 000~1:500不同倍比稀释, 每个样品设置

3个重复孔, 同时设置空白对照孔, 于450 nm波长下测定A值, 以血清稀释度为横坐标, A(450)值为纵坐标绘制效价曲线, 用以判定抗体效价。若抗体效价均大于1:64 000后继续饲养1周再行眼球采血, 血样37℃放置2 h后3 500 r·min⁻¹离心10 min, 收集血清置于-80℃保存。

1.7 Trx20多克隆抗体灵敏度和特异性鉴定

利用Western blotting法检测抗体灵敏度和特异性。灵敏度检测: 将纯化的pGEX-4T-1-Trx20融合蛋白用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)进行梯度稀释, 分别设置90、180、360、720和1 440 ng 5个上样量进行SDS-PAGE电泳并转膜; 转印后膜片以1:3 000稀释的Trx20免疫小鼠抗血清作为一抗, HRP标记山羊抗鼠IgG抗体(1:3 000)作为二抗进行孵育与化学发光显影。通过重复3次独立实验, 确定能够产生可辨识特异性信号的最低蛋白上样量, 即检测限(limit of detection, LOD), 以此评价抗体的灵敏度。特异性检测: 于同一块凝胶上分别加入IPTG诱导后的菌液和未诱导菌液, 同样以免疫所得血清作为一抗, HRP标记山羊抗鼠IgG抗体作为二抗, 在预期相对分子质量处出现单一清晰条带, 且阴性对照无相应条带和无杂带为非特异性结合。

1.8 Trx20虫体内天然表达验证

常规方式培养细胞, 待细胞汇合度达70%~80%时, 取液氮中冻存的弓形虫于37℃水浴快速复苏, 接种至细胞中, 待细胞破裂释放大量弓形虫时收集上清, 经5 μm滤器过滤虫体后加入PBS缓冲液, 2 500 r·min⁻¹离心10 min后, 洗涤2次以纯化弓形虫。在纯化虫体中加入适量苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)后超声破碎, 4℃、10 000 r·min⁻¹离心10 min收集上清液, 加入上样缓冲液煮沸后上样, 采用Western blotting法检测Trx20在弓形虫体内的天然表达情况。实验组采用Trx20多克隆抗体血清作一抗(1:1 000), 阴性对照组采用未免疫鼠血清作一抗(1:1 000); 二抗为HRP标记山羊抗鼠IgG抗体(1:3 000)。

1.9 间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)分析Trx20虫体内亚细胞定位

IFA法分析Trx20在弓形虫速殖子内的亚细胞定位。虫体经4%多聚甲醛固定、0.1% Triton X-100透化及3% BSA封闭后, 分别以Trx20多克隆

抗体(实验组, 1:100)和未免疫鼠血清(阴性对照, 1:100)作为一抗进行孵育, 随后Alexa Fluor 488标记山羊抗鼠IgG(1:500)二抗避光反应, DAPI复染细胞核, 封片后于荧光显微镜下观察荧光分布以确定蛋白质在虫体内的定位。

2 结果

2.1 Trx20蛋白的生物信息学分析

2.1.1 Trx20蛋白的理化性质 经ProtParam软件预测, Trx20蛋白氨基酸总数为424个, 其中异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸水平较高, 酪氨酸、半胱氨酸和组氨酸水平较低(表2); 预估相对分子质量为47 700, 理论等电点为8.55, 为碱性蛋白; 其中含有54个强酸性氨基酸(天冬氨酸和谷氨酸), 59个强碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)。Trx20分子式为 $C_{2172}H_{3412}N_{548}O_{616}S_{20}$; 当Trx20蛋白的N端为甲硫氨酸时, 该蛋白于哺乳动物网织红细胞内的半衰期达30 h, 在酵母中的半衰期为20 h, 而在大肠杆菌中的半衰期在10 h以上。结果显示: Trx20蛋白具有较高的稳定性, 其稳定性可达26.62; 脂溶性指数(疏水)达82.87, 表明此蛋白质具有较好的耐热性; 该蛋白总的平均亲水性为-0.320, 鉴于负值对应亲水性, 正值对应疏水性, 由此可认为Trx20蛋白具有亲水性。

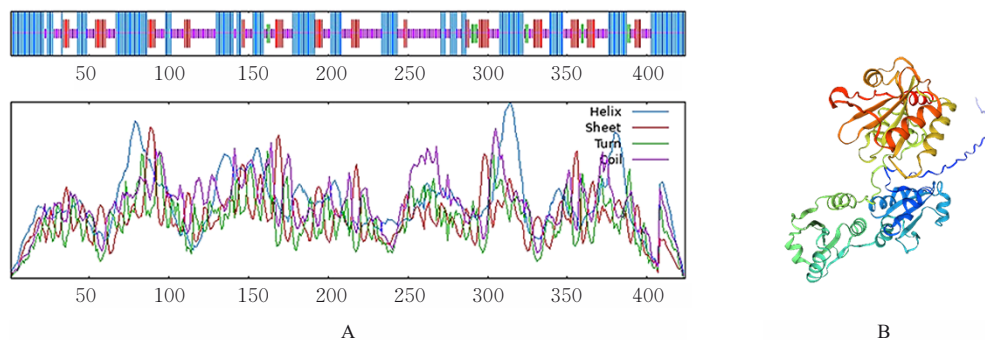
2.1.2 Trx20蛋白的空间结构 通过SOPMA软件预测Trx20蛋白的二级结构, 有176个氨基酸形成了 α 螺旋结构, 占总氨基酸数量的41.51%; 67个氨基酸残基则构成了延伸链, 占总氨基酸的15.80%; 此外, 12个氨基酸残基参与了 β 转角

表2 Trx20蛋白氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid compositions of Trx20 protein ($\eta/\%$)

Amino acid	Content
Alanine	7.1
Arginine	2.8
Asparagine	2.4
Aspartic acid	6.6
Cysteine	1.9
Glutamine	2.8
Glutamic acid	6.1
Glycine	4.2
Histidine	1.9
Tryptophan	3.1
Leucine	9.9
Isoleucine	11.1
Lysine	2.8
Methionine	7.1
Phenylalanine	6.4
Proline	6.8
Threonine	5.2
Tyrosine	0.7
Serine	2.4
Valine	8.7

达到2.83%; 而无规则卷曲在整体中的比例最高, 含有169个氨基酸, 占总氨基酸的39.86%, 易形成抗原表位(图1A)。SWISS-MODEL在线软件预测Trx20蛋白三级结构(图1B), 基于模板AOA086LUY3.1.A建模, 全球模型质量估计(global model quality estimate, GMQE)值为0.85, 置信度为100%。



A: Prediction of secondary structure of Trx20 protein; B: Prediction of tertiary structure of Trx20 protein.

图1 Trx20蛋白的二级和三级结构预测结果

Fig. 1 Prediction results of secondary structure and tertiary structure of Trx20 protein

2.1.3 Trx20的亲水和疏水性 利用在线工具 ExPASy 预测 Trx20 蛋白的亲水性和疏水性, 结果见图 2。该图以蛋白的氨基酸位置为横坐标, 预测的分数为纵坐标, 其中正值代表疏水性, 负值则代表

亲水性。第 16 位的谷氨酰胺残基显示出最高的疏水性峰值, 达到 2.744; 而第 412 位的谷氨酰胺残基则呈现出最低的亲水性峰值, 数值为 -3.433, 表明该蛋白为亲水蛋白质。

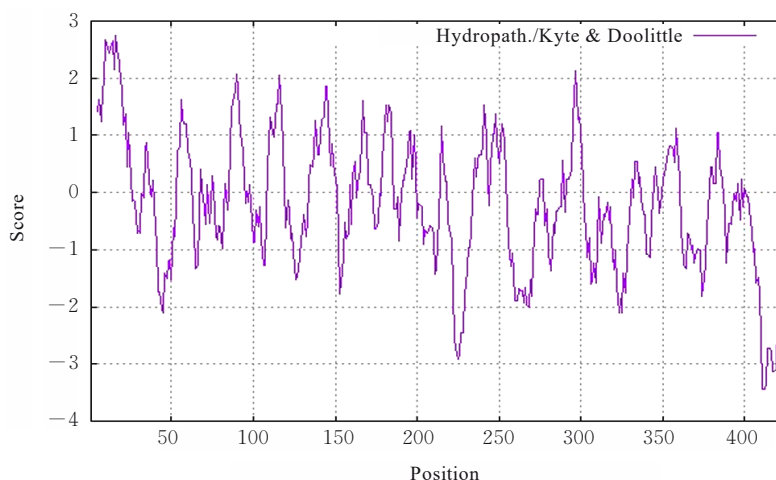


图 2 Trx20 蛋白亲水性/疏水性线性权重变化

Fig. 2 Linear weight changes of hydrophilicity/hydrophobicity of Trx20 protein

2.1.4 Trx20 蛋白的磷酸化位点和糖基化位点 利用在线软件 NetPhos-3.1 预测 Trx20 蛋白磷酸化位点, 结果显示: 丝氨酸磷酸化位点有 35 个, 苏氨酸磷酸化位点有 16 个, 酪氨酸磷酸化位点有 2 个 (图 3A); 利用在线软件 NetNGlyc-1.0 预测 Trx20 蛋白共有 1 个 N-糖基化位点 (图 3B); 在线软件 YinOYang-1.2 预测 Trx20 蛋白无 O-糖基化位点 (图 3C)。

2.1.5 Trx20 蛋白的跨膜区和信号肽 经 TMHMM-2.0 程序分析, Trx20 蛋白含有 1 个信号肽 (1~26 aa), 无跨膜区; N 端在膜的细胞质一侧的概率为 0.698 98; 该蛋白为膜外蛋白 (图 4A)。在线软件 SignalP-4.1 分析 Trx20 蛋白的信号肽序列结果见图 4B, $D=0.850$, $D\text{-cutoff}=0.450$, 该蛋白质 1~23 aa 的氨基酸序列为一段信号肽序列, 剪切位点位于第 23 和 24 位氨基酸之间, 为分泌型蛋白。

2.1.6 Trx20 蛋白的抗原决定簇 利用在线软件 Immunomedicine Group 预测 Trx20 蛋白的抗原决定簇, 获取抗原表位信息 (图 5)。Trx20 蛋白包含 17 个抗原决定簇, 其抗原倾向指数为 1.042 3, 表明该蛋白具有良好的免疫原性, 是一种潜在的疫苗候选分子。

2.1.7 Trx20 蛋白的结构域 CDD 预测 Trx20 蛋白结构域, 分析结果显示: 该蛋白于 38~138 氨基

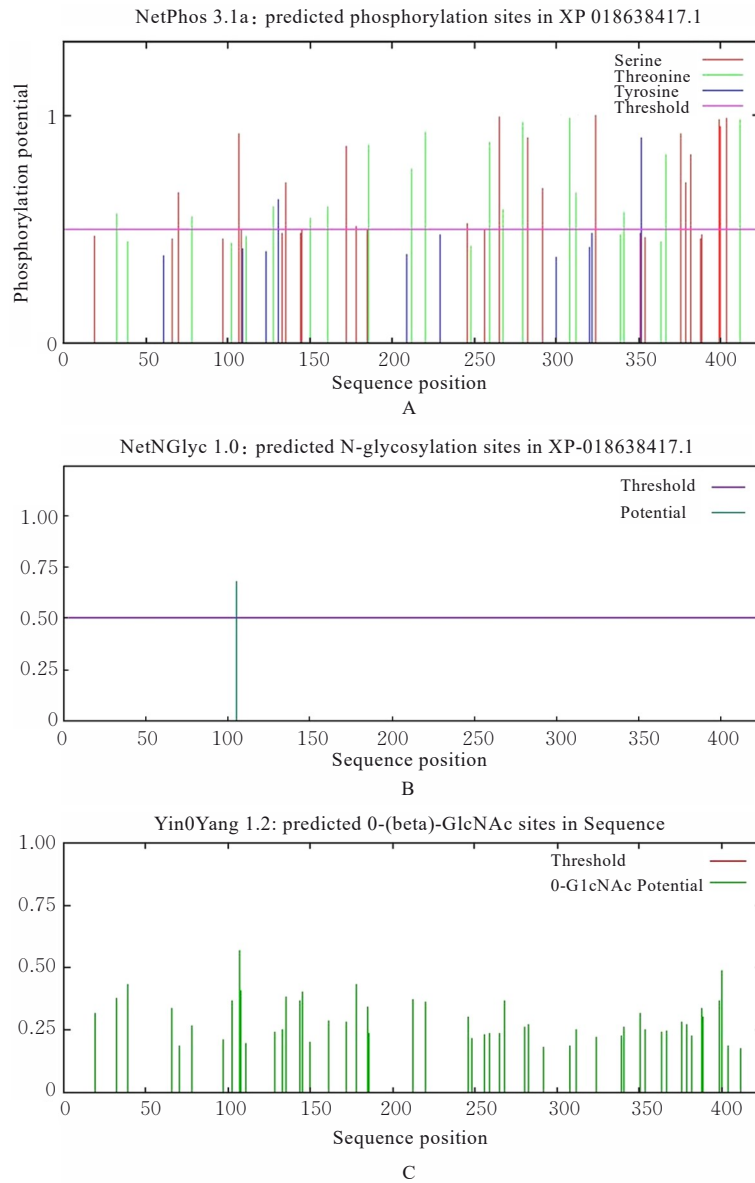
酸有 1 个名为 “Thioredoxin like Superfamily” 的结构域, 相关蛋白质主要通过典型的 “-CXXC-” 基序执行氧化还原功能, 其活性位点的二硫键可通过可逆氧化的方式来改变靶蛋白质的氧化还原状态, 以保护其他蛋白质免受机体内的氧化损伤。提示弓形虫 Trx 同样具备氧化还原功能, 并参与机体内的氧化还原过程。见图 6。

2.2 目的基因扩增和重组质粒构建

成功扩增出 Trx20 目的基因, 核酸电泳结果显示: 于 1 200 bp 处可见单一清晰条带, 与预期大小相符 (图 7A)。对重组质粒 pET-28a-Trx20 和 pGEX-4T-1-Trx20 分别进行双酶切验证, 电泳结果显示: 分别于 5 369 和 1 200 bp 以及 4 900 bp 和 1 200 bp 处各有 1 条特异性条带 (图 7B 和 7C), 且测序结果正确, 成功构建出重组质粒 pET-28a-Trx20 和 pGEX-4T-1-Trx20。

2.3 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

将测序正确的重组质粒 pET-28a-Trx20 和 pGEX-4T-1-Trx20 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞中, IPTG 诱导后, 成功在上清中诱导出 Trx20-His 和 Trx20-GST 重组蛋白, 相对分子质量约为 49 000 (图 8A) 和 73 000 (图 8B); 后续经 Ni-Agarose Resin 或 Sepharose 4B 亲和层析成功纯化出特异性蛋白 Trx20-His (图 8C) 和 Trx20-GST (图 8D);



A: Prediction of phosphorylation sites of Trx20; B: Prediction of N-glycosylation sites of Trx20; C: Prediction of O-glycosylation sites of Trx20.

图3 Trx20磷酸化位点预测、N-糖基化位点预测及O-糖基化位点预测

Fig. 3 Prediction of phosphorylation sites, N-glycosylation sites, and O-glycosylation sites for Trx20

Western blotting 法结果显示: 鼠源抗 His 抗体可在相对分子质量 49 000 处特异性识别重组蛋白 Trx20-His, 条带单一, 其大小与重组蛋白质 Trx20-His 大小一致 (图 8E); 鼠源抗 GST 抗体在 73 000 处可特异性识别重组蛋白 Trx20-GST (图 8F), 上述结果证实 2 种重组蛋白质表达正确且特异性良好。

2.4 Trx20 鼠源多克隆抗体效价

将采集的小鼠尾尖血用于 ELISA 效价检测, 结果显示: 小鼠血清效价达到较高水平, 全部小鼠血清效价均大于 1:64 000 (图 9), 符合制备要求, 表明重组蛋白 Trx20 具有良好的免疫原性。随后对小

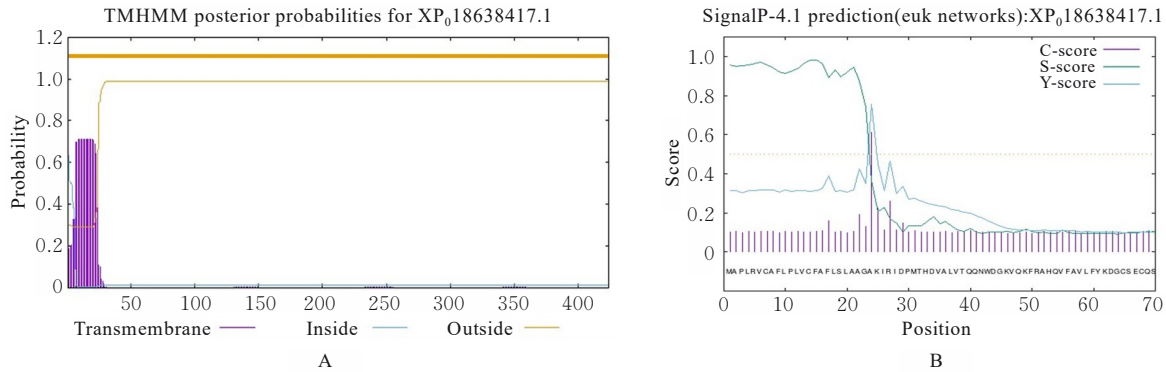
鼠进行血液采集及血清分离, 以作为后续实验的抗体。

2.5 Trx20 多克隆抗体特异性和灵敏度

对免疫所得的抗体进行 Western blotting 分析, 结果显示: 其在相对分子质量 73 000 处识别出单一特异性条带 (图 10), 与 Trx20-GST 重组蛋白质大小一致, 无杂带; 且抗体稀释 3 000 倍后能够检测到 90 ng 的 Trx20 蛋白, 证实所制备的多克隆抗体具有高灵敏度和特异性。

2.6 Trx20 蛋白在弓形虫体内的天然表达

Western blotting 法检测结果显示: 免疫获得的抗体血清能够在弓形虫自然生长状态下成功识别到



A: Prediction of transmembrane regions of Trx20 protein; B: Prediction of signal peptides of Trx20 protein.

图4 Trx20蛋白的跨膜区和信号肽

Fig. 4 Transmembrane regions and signal peptides for Trx20 protein

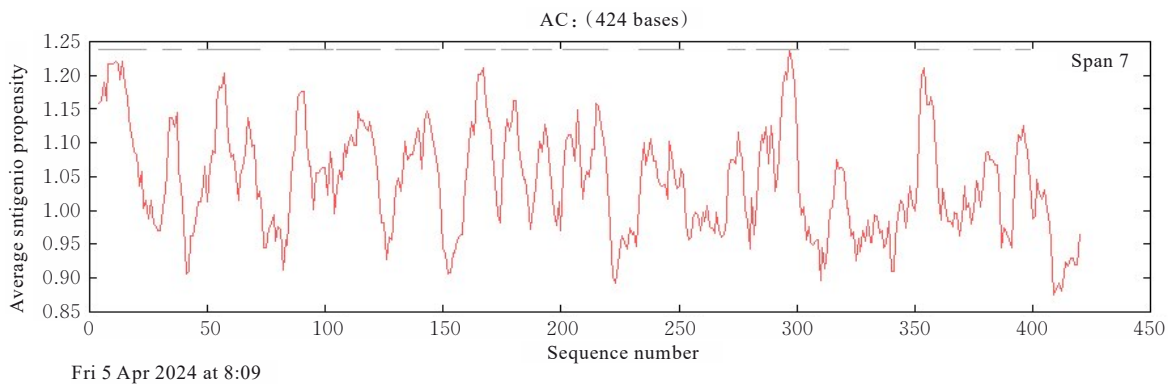


图5 Trx20蛋白的抗原决定簇

Fig. 5 Antigenic determinants of Trx20 protein

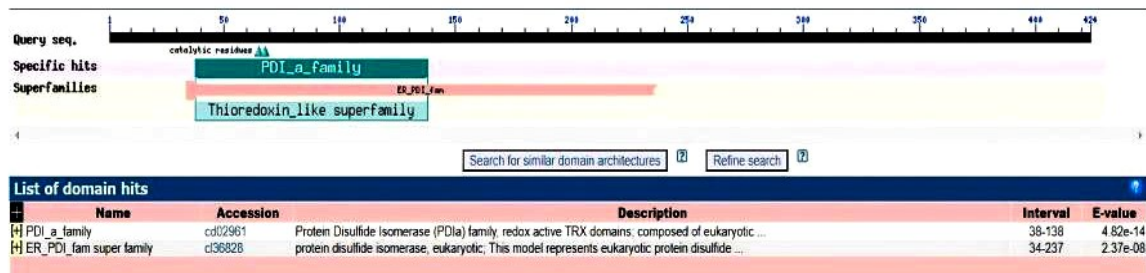


图6 Trx20蛋白的结构域

Fig. 6 Domains of Trx20 protein

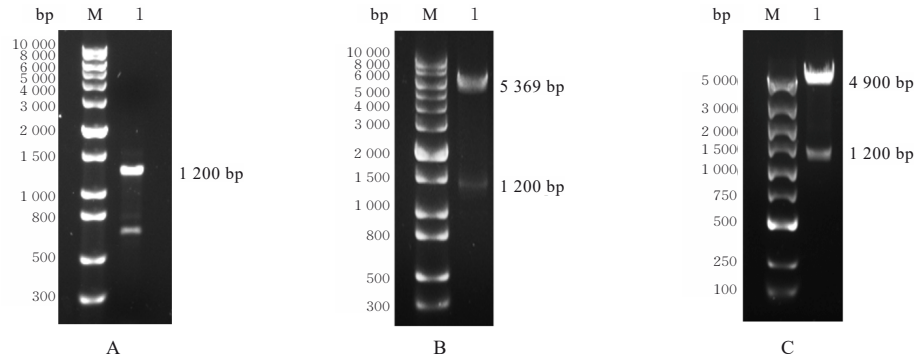
虫体中的目标蛋白，条带单一且位置相对分子质量约为 47 700，而对照组未出现条带，表明 Trx20 蛋白可以在虫体中自然表达。见图 11。

2.7 Trx20 蛋白在弓形虫速殖子中的亚细胞定位

IFA 法结果显示：弓形虫 Trx20 蛋白（绿色荧光）分散于虫体胞质环境中，但未呈现出与特定细胞器紧密相连或在某一特定细胞器处集中分布的现象。见图 12。

3 讨论

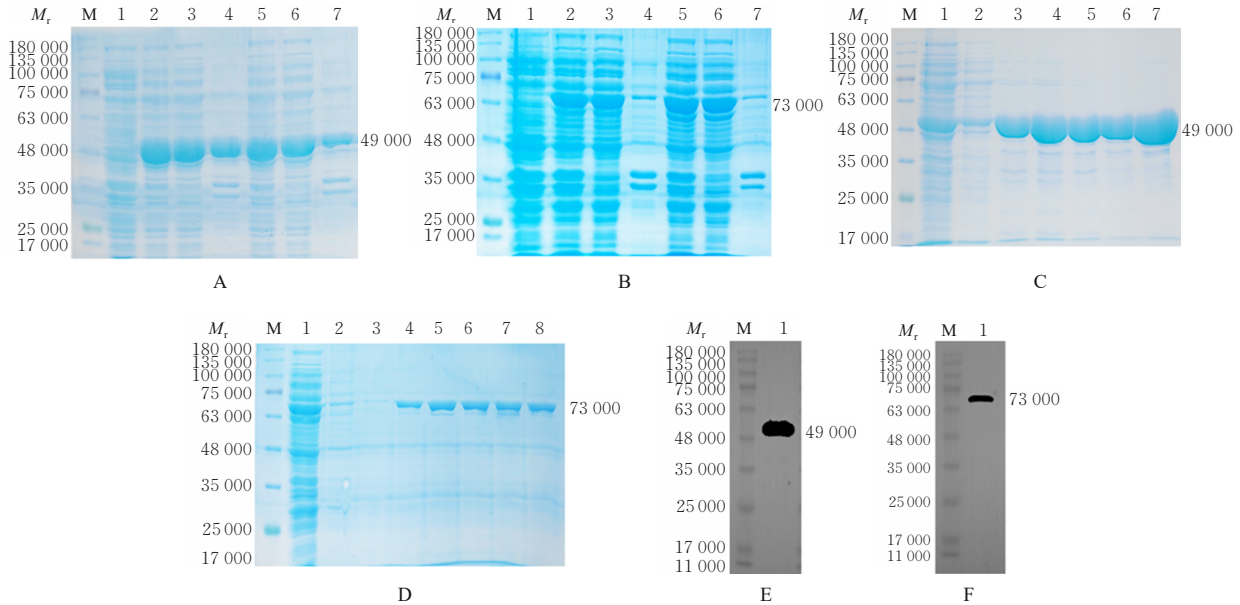
弓形虫病是由弓形虫引起的一种严重的全球性公共卫生问题，其在全球范围内高度流行的原因可能在于该寄生虫既具有有性繁殖也具有无性繁殖的传染性，能引发慢性感染并终生保持传染性^[11-12]。然而大部分感染者未表现出临床症状，存在潜在免疫缺陷的感染者可能会出现严重的影响。例如，约 45% 获得性免疫缺陷综合征相关免疫功能低下个



A: PCR amplification results of *Trx20* gene (M: Marker; Lane 1: *Trx20* gene amplification product); B: pET-28a-Trx20 enzymatic digestion results using *Bam*H I and *Not* I restriction enzymes (M: Marker; Lane 1: Enzymatic digestion product); C: pGEX-4T-1-Trx20 enzymatic digestion results using *Eco*R I and *Xho* I restriction enzymes (M: Marker; Lane 1: Enzymatic digestion product).

图7 *Trx20*基因PCR扩增结果和重组质粒双酶切验证结果

Fig. 7 PCR amplification results of *Trx20* gene and enzymatic digestion verification results of recombinant plasmid



A: Induced expression of recombinant protein pET-28a-Trx20 (M: Marker; Lane 1–7: Uninduced, whole bacteria at 22 °C, supernatant at 22 °C, pellet at 22 °C, whole bacteria at 16 °C, supernatant at 16 °C, pellet at 16 °C); B: Induced expression of recombinant protein pGEX-4T-1-Trx20 (M: Marker; Lane 1–7: Uninduced, whole bacteria at 22 °C, supernatant at 22 °C, pellet at 22 °C, whole bacteria at 16 °C, supernatant at 16 °C, pellet at 16 °C); C: Purification of recombinant protein pET-28a-Trx20 (M: Marker; Lane 1–2: Protein wash fractions; Lane 3–7: Protein elution fractions with imidazole concentrations of 40, 60, 80, 100 and 250 mmol·L⁻¹ respectively); D: Purification of recombinant protein pGEX-4T-1-Trx20 (M: Marker; Lane 1: protein wash fractions; Lane 2–3: Washing buffer; Lane 4–8: Elution solution); E: Western blotting results of pET-28a-Trx20 recombinant protein (M: Marker; Lane 1: pET-28a-Trx20 protein); F: Western blotting results of pGEX-4T-1-Trx20 recombinant protein (M: Marker; Lane 1: pGEX-4T-1-Trx20 protein).

图8 *Trx20*重组蛋白的表达、纯化和鉴定

Fig. 8 Expression, purification, and identification of *Trx20* recombinant protein

体可能发生弓形虫脑炎^[13]。弓形虫疫苗的开发一直是预防和控制弓形虫病的重点, 因此制定疫苗战略和开发疫苗对于减轻全球潜在疾病负担至关重要^[14-15]。疫苗的使用显著提高了人类和其他动物的生活质量, 并挽救了无数生命, 生物信息学分析通

过借助计算机工具预测病原体表位, 解析免疫应答机制并指导疫苗设计, 显著提升候选分子的靶向性和有效性, 同时缩短研发周期^[16]。

根据小鼠感染模型, 弓形虫有3个主要谱系^[17], I型虫株(如RH株、CAST株和GT1株)毒力最强,

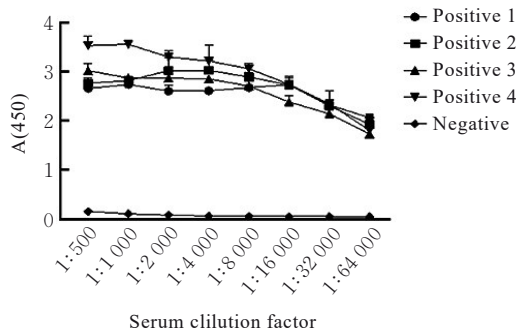
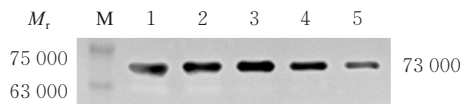


图9 Trx20多克隆抗体效价

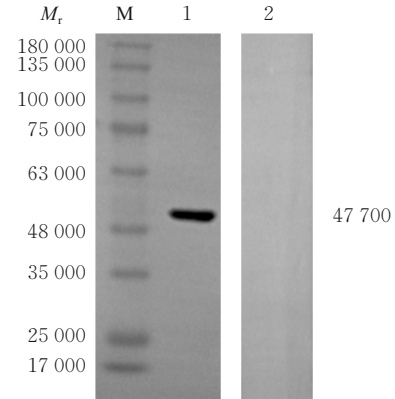
Fig. 9 Polyclonal antibody titers for Trx20



M: Protein marker; Lane 1: pGEX-4T-1-Trx20 1 440 ng; Lane 2: pGEX-4T-1-Trx20 720 ng; Lane 3: pGEX-4T-1-Trx20 360 ng; Lane 4: pGEX-4T-1-Trx20 180 ng; Lane 5: pGEX-4T-1-Trx20 90 ng.

图10 Western blotting法检测Trx20多克隆抗体特异性和灵敏度电泳图

Fig. 10 Electrophoregram of specificities and sensitivities of polyclonal antibodies detected by Western blotting method



M: Protein marker; Lane 1: Experimental group; Lane 2: Negative control.

图11 Western blotting法检测Trx20蛋白在刚地弓形虫中表达的电泳图

Fig. 11 Electrophoregram of expression of Trx20 protein in *Toxoplasma gondii* detected by Western blotting method

II型虫株(如ME49株、HART株和WIL株)毒力中等, III型虫株(如VEG株、SOU株和MOO株)被认为无毒^[18]。在全球各地还存在许多表现出I型、II型和III型虫株特征的非典型基因型, 相关多样性导致宿主的免疫系统产生不同反应, 引发多种生化

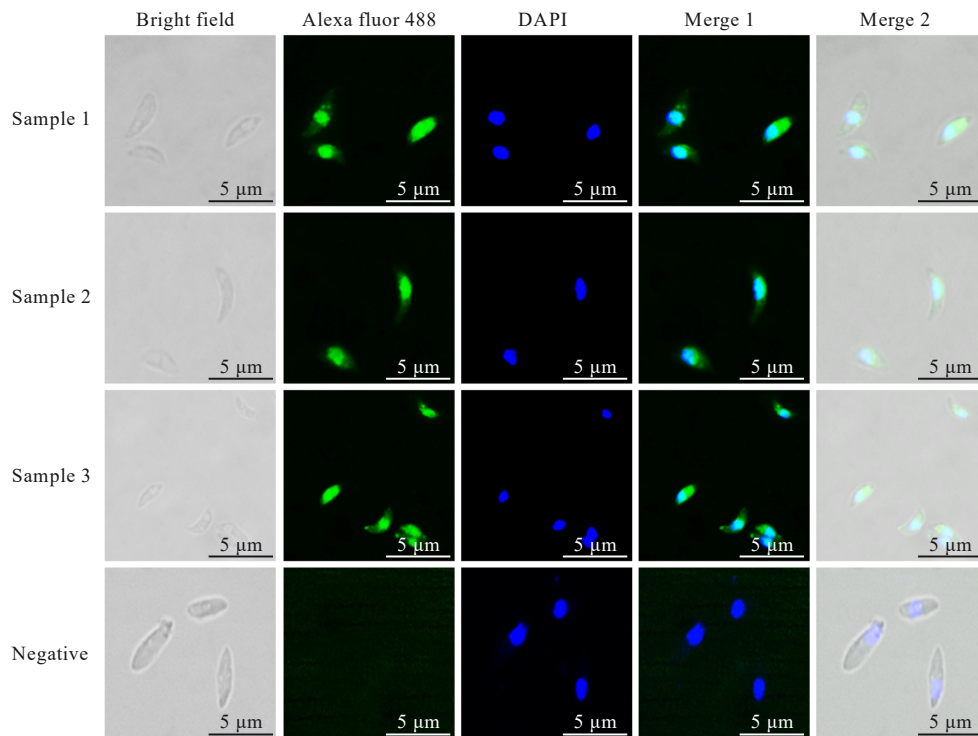


图12 Trx20蛋白在刚地弓形虫速殖子中的定位

Fig. 12 Localization of Trx20 protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites

改变和临床疾病^[19]。弓形虫具备高度特化的顶端分泌细胞器, 此类细胞器包括顶质体、致密颗粒体和微线体, 参与其对宿主细胞的侵袭^[20-21]。特殊的分泌细胞器, 尤其是致密颗粒体, 在寄生虫有效入侵和调节宿主感染反应中发挥重要作用, 有助于限制寄生虫的清除并建立急性感染, 导致弓形虫成功地避免早期清除, 同时在宿主体内建立持续的慢性感染, 对于其传播到新宿主至关重要^[22]。研究^[23]发现: 在弓形虫的顶质体中鉴定出2个Trx, 即顶复门原虫Trx1 (apicomplexan Trx1, ATrx1) 和顶复门原虫Trx2 (apicomplexan Trx2, ATrx2), 条件性敲低*ATrx1*或*ATrx2*导致寄生虫生存严重缺陷, 形成少量斑块。

本研究结果显示: Trx20蛋白属于分泌型蛋白, 具有较稳定的亲水性质; 蛋白的二级结构中, α 螺旋占41.51%, 延伸链占15.80%, β 转角占2.83%, 无规则卷曲占39.86%。经预测此蛋白含有35个磷酸化位点, 具体包括17个丝氨酸磷酸化位点、16个苏氨酸磷酸化位点和2个酪氨酸磷酸化位点, 蛋白质的翻译后修饰及功能作用与磷酸化位点有着密不可分的关系。Trx20蛋白共有1个N-糖基化位点, 无O-糖基化位点。通过SignalP-4.1预测Trx20蛋白的信号肽, TMHMM-2.0预测蛋白的跨膜结构, 结果显示: Trx20蛋白是一个具有信号肽序列的非跨膜结构蛋白。

通过CDD在线分析软件预测Trx20蛋白具有1个名为“Thioredoxin like Superfamily”的结构域, 氨基酸序列具有经典氧化还原活性基序“-CXXC-”和与底物结合所需的关键残基, 推测Trx20蛋白在参与氧化还原反应的过程中发挥了重要的抗氧化功能。相关抗氧化机制能够帮助虫体抵御氧自由基的损伤, 保护其细胞和组织免受氧化应激的危害, 从而维持虫体的正常生理功能和生存能力^[24]。本研究结果显示: Trx20蛋白的平均抗原倾向指数为1.0423, 并且共含有17个抗原决定簇, 提示Trx20蛋白含有数量较多的优势抗原表位结构, 其抗原倾向指数处于较高水平。利用原核表达系统进行该蛋白质的体外表达, 成功制备了效价高达1:64000的多克隆抗体。经特异性与灵敏度鉴定, 该抗体稀释3000倍后仍能有效检测90 ng的Trx20蛋白, 可精准识别目标蛋白。Trx20蛋白在弓形虫自然生长过程中于虫体内得以自然表达, 且该蛋白在弓形虫速殖子胞质中呈分散分布的特征。

综上所述, 本研究成功实现了刚地弓形虫Trx20蛋白的原核表达和纯化, 获得了具有良好免疫原性的重组蛋白。利用Trx20蛋白免疫小鼠, 成功制备出效价高、特异性强的多克隆抗体, 同时该抗体能有效识别天然状态下的弓形虫Trx20蛋白, 并进一步明确了该蛋白质在虫体内的亚细胞定位。本研究系统建立了Trx20蛋白的表达、抗体制备和定位分析技术体系, 为深入探讨Trx20在弓形虫抗氧化应激、增殖及致病机制中的生物学功能提供了关键工具和实验依据, 并为推动以该蛋白为靶点的弓形虫疫苗研发提供了参考。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

施玉怡参与实验操作、数据分析和论文撰写, 甘盛琦和刘澈参与绘制图表, 程子文和程廓参与论文修改, 杨宝玲和王大为参与实验设计、选题、指导及论文审阅。

[参考文献]

- [1] DUBEY J P, MILLER N L, FRENKEL J K. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces[J]. *J Exp Med*, 1970, 132(4): 636-662.
- [2] AHMADPOUR E, BABAIE F, KAZEMI T, et al. Overview of apoptosis, autophagy, and inflammatory processes in *Toxoplasma gondii* infected cells [J]. *Pathogens*, 2023, 12(2): 253.
- [3] MÉVÉLEC M N, LAKHRIF Z, DIMIER-POISSON I. Key limitations and new insights into the *Toxoplasma gondii* parasite stage switching for future vaccine development in human, livestock, and cats [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 607198.
- [4] NAYERI T, SARVI S, MOOSAZADEH M, et al. Global prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the aborted fetuses and ruminants that had an abortion: a systematic review and meta-analysis[J]. *Vet Parasitol*, 2021, 290: 109370.
- [5] DUNAY I R, GAJUREL K, DHAKAL R, et al. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(4): e00057-17.
- [6] ZENG Y B, ZHU S H, DONG H, et al. Great efficacy of sulfachloropyrazine-sodium against acute murine toxoplasmosis[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(1): 70-75.
- [7] ZHANG Z W, WANG M, SUN L X, et al. Trx4, a novel thioredoxin protein, is important for *Toxoplasma*

- gondii* fitness[J]. Parasites Vectors, 2024, 17(1): 178.
- [8] VAZQUEZ D, DELFINO J, SANTOS J. Thioredoxin from *Escherichia coli* as a role model of molecular recognition, folding, dynamics and function[J]. Protein Pept Lett, 2015, 22(9): 801-815.
- [9] SHARMA A, SHARMA A, DIXIT S, et al. Structural insights into thioredoxin-2: a component of malaria parasite protein secretion machinery [J]. Sci Rep, 2011, 1: 179.
- [10] BIDDAU M, BOUCHUT A, MAJOR J, et al. Two essential Thioredoxins mediate apicoplast biogenesis, protein import, and gene expression in *Toxoplasma gondii*[J]. PLoS Pathog, 2018, 14(2): e1006836.
- [11] ZHANG Z C, LI Y H, XIE Q, et al. The molecular characterization and immunity identification of rhopty protein 22 of *Toxoplasma gondii* as a DNA vaccine candidate against toxoplasmosis [J]. J Eukaryot Microbiol, 2019, 66(1): 147-157.
- [12] 冶赓博, 陈功富, 崔紫烟, 等. 多房棘球蚴源性外泌体对巨噬细胞极化的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(4): 876-884.
- [13] GRIGG M E, GANATRA J, BOOTHROYD J C, et al. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis [J]. J Infect Dis, 2001, 184(5): 633-639.
- [14] ZHANG N-Z, CHEN J, WANG M, et al. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: new developments and perspectives[J]. Expert Rev Vaccines, 2013, 12(11): 1287-1299.
- [15] SAADATNIA G, GOLKAR M. A review on human toxoplasmosis[J]. Scand J Infect Dis, 2012, 44(11): 805-814.
- [16] OLI A N, OBIALOR W O, IFEANYICHUKWU M O, et al. Immunoinformatics and vaccine development: an overview[J]. ImmunoTargets Ther, 2020, 9: 13-30.
- [17] WANG L, CHEN H, LIU D H, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53483.
- [18] FLEGR J, PRANDOTA J, SOVIČKOVÁ M, et al. Toxoplasmosis-a global threat. correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90203.
- [19] HUNTER C A, SIBLEY L D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(11): 766-778.
- [20] AYUB F, AHMED H, SOHAIL T, et al. Bioinformatics-based prediction and screening of immunogenic epitopes of *Toxoplasma gondii* rhopty proteins 7, 21 and 22 as candidate vaccine target [J]. Heliyon, 2023, 9(7): e18176.
- [21] BLACK M W, BOOTHROYD J C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(3): 607-623.
- [22] THIND A C, MOTA C M, GONÇALVES A P N, et al. The *Toxoplasma gondii* effector GRA83 modulates the host's innate immune response to regulate parasite infection[J]. mSphere, 2023, 8(5): e00263-23.
- [23] 张雪, 王晨成, 黄爱萍, 等. 以大量腹腔积液和血小板减少为主要表现的TAFRO综合征1例报告[J]. 中国实用内科杂志, 2024, 44(1): 86-88.
- [24] JIANG T T, GODINEZ-MACIAS K P, COLLINS J E, et al. Identification of fungal natural products with potent inhibition in *Toxoplasma gondii* [J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(4): e04142-23.