

DOI:10.13350/j.cjpb.250102

· 论著 ·

多房棘球蚴 Calpain A 基因克隆、表达 及其多克隆抗体制备*

李慧敏^{1,2}, 张少华^{2**}, 张月玥², 王帅², 生鸿鹏¹, 李雅琪², 王得先², 蒋佳颖^{1**}

(1. 青海大学医学部, 青海西宁 810000; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃省动物寄生虫病重点实验室)

【摘要】 目的 分析并克隆多房棘球蚴 Calpain A (Em-Calpain A) 基因开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 序列, 进行体外诱导表达并制备兔多克隆抗体。方法 从 WormBase 数据库下载多房棘球蚴 Em-Calpain A 基因 ORF 序列。采用 ProtParam、SMART 等在线工具对其理化性质、蛋白结构域等进行分析 and 预测; 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法构建系统进化树。提取原头蚴总 RNA 并反转录为 cDNA, PCR 扩增 Calpain A 基因, 构建 pET28a-Em-Calpain A 原核表达载体, 经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达重组蛋白, 纯化后免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 采用 10% SDS-PAGE、Western blot 和 ELISA 对重组蛋白纯度和抗体滴度及反应性进行鉴定。结果 序列分析表明 Em-Calpain A 基因 ORF 长度为 2 469 bp, 编码 822 个氨基酸, 推测理论分子质量约 92.13 ku, 等电点为 5.3。蛋白结构分析显示 Em-Calpain A 具有 1 个高度保守的钙蛋白酶样硫醇蛋白酶结构域 (CysPc)、1 个钙蛋白酶 III 结构域 (Calpain III) 和 2 个 E、F 的螺旋-环-螺旋结构 (EF-hand), 说明其属于钙蛋白酶家族。系统进化分析显示 Em-Calpain A 序列与带科绦虫聚于一类, 与肝片吸虫、日本血吸虫、人、犬、牛及原虫亲缘关系较远。重组蛋白主要以包涵体形式表达, 蛋白分子质量约为 93 ku, 与预测分子质量大小基本一致。ELISA 检测结果显示制备的多克隆抗体效价达 1:262 144; 该抗体可特异性识别 His-Em-Calpain A 和原头蚴天然 Calpain A 蛋白。结论 成功构建 Em-Calpain A 基因的原核表达系统并制备了其多克隆抗体, 为研究该基因的功能奠定了基础。

【关键词】 多房棘球蚴; Calpain A; 序列分析; 基因克隆; 表达纯化; 多克隆抗体

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2025)01-0008-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Jan.; 20(01): 8-13.]

Cloning, prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of Calpain A gene of *Echinococcus multilocularis*

LI Huimin^{1,2}, ZHANG Shaohua², ZHANG Yueyue², WANG Shuai², SHENG Hongpeng¹, LI Yaqi², WANG Dexian², JIANG Jiaying¹ (1. Medical College of Qinghai University, Xining 810000, China; 2. State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences)***

【Abstract】 **Objective** To analyze and clone the open reading frame (ORF) sequence of calpain A gene from the larval stage of *Echinococcus multilocularis* (Em-Calpain A), then express fusion protein in vitro and produce its polyclonal antibody. **Methods** The coding sequence of Em-Calpain A was obtained from WormBase database. Some sequence characteristics of Em-Calpain A (physicochemical properties and protein structural domains, etc.) were predicted using online analysis tools, such as ProtParam and SMART. The phylogenetic tree was constructed through the neighbor-joining method in MEGA 7.0 software. Total RNA was extracted from protoscolex and then used to synthesize cDNA. Calpain A gene was amplified by PCR. The prokaryotic expression plasmid pET28a-Em-Calpain A was constructed and induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to express the recombinant protein. His-Em-Calpain A proteins were recovered from PAGE gel and used as the immunogen to produce rabbit polyclonal antibody. The purity of His-Em-Calpain A protein, antibody reactivity and titer were examined by using 10% SDS-PAGE, Western blot and ELISA, respectively. **Results** Sequence analysis showed that the coding sequence of Em-Calpain A gene was 2 469 bp in length, encoding 822 amino acids, with a predict theoretical molecular weight of about 92.13 ku and an isoelectric point of 5.3.

* **【基金项目】** 国家重点研发计划项目 (No. 2022YFD1302102-06); 国家自然科学基金项目 (No. 31772726); 青海大学医学部中青年科技项目 (No. 2023-ky-2)。

** **【通讯作者】** 蒋佳颖, E-mail: 451076811@qq.com; 张少华, E-mail: zhangshaohua01@caas.cn

【作者简介】 李慧敏 (1997-), 女, 山西长治人, 硕士研究生, 主要研究方向: 寄生虫与宿主相互作用。E-mail: 2506442638@qq.com

The structure prediction results indicated that Em-Calpain A had a highly conserved calpain-like thiol protease structural domain (CysPc), a calpain III domain (CalpainIII) and two E and F helix-cyclo-helix structures (EF-hand), suggesting that it belongs to the calpain family. Phylogenetic analysis showed that the Em-Calpain A was clustered with the parasites of the Taeniidae family and more distantly related to *Fasciola hepatica*, *Schistosoma japonicum*, human, dog, cattle, and protozoan. The recombinant protein was mainly expressed in the form of inclusion bodies with a band at about 93 ku, which is consistent with the predicted molecular weight. The antiserum titer was 1 : 262 144. The antibody could specifically recognize His-Em-Calpain A and the native Calpain A protein in protoscolex. **Conclusion** The prokaryotic expression system of Em-Calpain A gene was successfully constructed and its polyclonal antibody was produced, which provided a basis for the further study of the function of Em-Calpain A gene.

【Keywords】 *Echinococcus multilocularis* larvae; Calpain A; sequence analysis; gene cloning; expression and purification; polyclonal antibody

棘球蚴病(*echinococcosis*)是由棘球绦虫的中绦期幼虫引起的一种严重危害人体健康以及畜牧业发展的人兽共患寄生虫病。对人类致病的棘球绦虫主要是细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)和多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)^[1]。我国是棘球蚴病最严重的国家之一,主要在西藏、四川、青海、宁夏、甘肃、新疆等地区流行。目前棘球蚴病的治疗方法主要采取手术切除和药物辅助治疗,但手术治疗风险大,易复发,而药物治疗效果不佳^[2]。采取疫苗接种阻断传播途径是较理想途径,但因棘球绦虫生活史复杂,中间宿主种类繁多,目前仍未研制出能对终末宿主(犬类)和中间宿主(牛、羊、人等)具有完全免疫原性的高效疫苗^[3-4],因此棘球蚴病的防治仍面临巨大挑战。研发新型疫苗候选分子及诊断和药物靶标对于有效控制棘球绦虫感染及提高包虫病诊疗效果具有重要意义。

钙蛋白酶(Calpain)是一种主要存在于细胞质中的半胱氨酸蛋白酶^[5],被钙离子激活后可以对多种蛋白质底物进行水解进而调节蛋白质的活性^[6],与细胞增殖、细胞凋亡和分化等过程有关^[7]。Siddiqui等^[8-9]的研究表明,钙蛋白酶与血吸虫逃避宿主免疫反应有关,用血吸虫钙蛋白酶免疫小鼠,可诱导宿主产生Th1型免疫应答,并且与人和其他脊椎动物钙蛋白酶不会产生交叉免疫反应,因此钙蛋白酶可以作为血吸虫病的候选疫苗靶点之一。Zhang等^[10-11]对钙蛋白酶的表位进行分析,表明钙蛋白酶可能作为血吸虫病的免疫诊断靶标。此外,Gomes等^[12]发现利用钙蛋白酶特异抑制剂可以降低恶性疟原虫钙蛋白酶的表达,降低恶性疟原虫的存活率,证明钙蛋白酶可能是潜在抗疟靶点,可用于挖掘疟疾新型药物。王芬等^[13]对细粒棘球蚴Calpain蛋白进行生物信息学分析,为研制基于Calpain的棘球蚴病疫苗提供了理论基础。寄生虫来源的钙蛋白酶可能作为疾病的免疫诊断靶标以及疫苗的靶点已有研究,但目前关于多房棘球绦虫钙蛋白酶(Em-Calpain A)的生物学功能研究尚鲜有报道。

本研究对Em-Calpain A基因进行分子克隆和体

外诱导表达,并免疫新西兰大白兔制备抗Calpain A多克隆抗体,以期后续Em-Calpain A生物学功能鉴定及其在棘球绦虫生长发育和致病性相关研究提供研究基础和参考。

材料与方法

1 材料

1.1 虫体、质粒及菌株 原头蚴和pET28a载体由本室保存;大肠埃希菌(*Escherichia coli*)感受态细胞Top10和BL21(DE3)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 主要试剂 总RNA快速提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA纯化回收试剂盒、高敏型ELC化学发光检测试剂盒均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Bam*H I和*Xho* I限制性内切酶购自美国NEB公司; TMB显色液购于美国Promega公司; HRP标记的山羊抗兔IgG购于生工生物工程股份有限公司; HRP标记的抗His标签抗体(anti-His-HRP)购于美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验动物 健康新西兰大白兔,3只,雌性,由中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SCXK(甘)2020-0010。

2 方法

2.1 Em-Calpain A基因序列特征分析 从Wormbase数据库(Version: WBPS19)以及NCBI蛋白数据库中下载多房棘球绦虫Em-calpain A基因序列(EmuJ_000911200)、细粒棘球绦虫、亚洲带绦虫、牛带绦虫、肝片吸虫、日本血吸虫、恶性疟原虫以及人、犬、牛的钙蛋白酶蛋白氨基酸序列。采用在线分析工具对基因结构、氨基酸同源性、蛋白理化性质、功能结构域等进行预测和分析(表1)。选择与Em-Calpain A蛋白氨基酸序列同源性最高且>40%的模型作为同源建模的模板,利用分子模拟系统(Discovery studio 2018)预测Em-Calpain A的三级结构。通过MEGA7.0软件中的邻接法构建Em-calpain A和其

他物种的系统进化树,bootstrap 设为 2000。

表 1 在线软件
Table 1 Online software

名称 Name	网址 Website
Wormbase	https://parasite.wormbase.org/
Signal P 6.0	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/
TMHMM	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/
SMART	https://smart.embl.de/
SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html

2.2 引物的设计与合成 参照 Em-calpain A 核苷酸序列(Wormbase:EmuJ_000911200),利用 SnapGene 软件设计编码基因带有同源臂的特异性上、下游引物及菌液鉴定引物 T7-F 和 T7-R(表 2),均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

名称 Name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
pET28a-Calpain A-F	GTGGACAGCAAAATGGGTGCGGATCCATG GTTAGCGTGGGTGGACTCATAACTATTC (下划线为 <i>BamH</i> I 酶切位点)
pET28a-Calpain A-R	CAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGCAG GTAGAGCAGGATGTTGAGAAGCTGGGCACC (下划线为 <i>Xho</i> I 酶切位点)
T7-F	TCAAGACCCGTTTAGAGG
T7-R	GCGAAATTAATACGACTCAC

2.3 Em-Calpain A 基因的克隆与原核表达载体构建

参照总 RNA 快速提取试剂盒说明书提取原头蚴总 RNA 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板 PCR 扩增 Calpain A 基因。PCR 体系:1 μ L cDNA,上、下游引物各 1 μ L,2 \times pfu PCR Mix 25 μ L,22 μ L ddH₂O。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 90 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。使用内切酶 *BamH* I 和 *Xho* I 对 pET28a 载体进行酶切后,与回收的 Calpain A 基因片段利用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物转化至 *E. coli* TOP10 感受态细胞,挑取单个菌落接种至 LB 培养基培养。经酶切鉴定,阳性克隆菌液送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序验证。

2.4 Em-Calpain A 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

将重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)中,涂至含终浓度 50 μ g/mL 卡那霉素(kan⁺)的 LB 固体培养基上,于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养,挑取单个菌落加入 LB 液体培养基(kan⁺)中,37 $^{\circ}$ C 摇菌培养至对数生长期后加终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,诱导 8 h 后收

集菌液并进行超声破碎,离心后分别收集上清及包涵体,采用 10% SDS-PAGE 电泳分析。切下目的条带进行蛋白胶回收^[14],并使用丙酮沉淀蛋白后用 PBS 复溶,重组蛋白转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,洗涤;加入 1 : 2000 稀释的 anti-His-HRP 抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗涤 3 次后滴加 ECL 化学显色液曝光。

2.5 多克隆抗体的制备及效价测定 随机选取 3 只新西兰大白兔,注射前采集兔阴性血清。采用纯化后的 Em-Calpain A 蛋白皮下多点注射免疫实验兔,共免疫 4 次,首次注射时采用蛋白+弗氏完全佐剂,21 d 后用蛋白+弗氏不完全佐剂进行加强免疫,末次免疫后第 10 d 心脏采血制备血清。采用 ELISA 检测抗体效价,以 1 : 32~1 : 1 048 576 倍比稀释的多抗血清和兔阴性血清为一抗,1 : 2 000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗,反应完成后用酶标仪检测 450 nm 处吸光值,分析多克隆抗体效价。

2.6 多抗血清的 Western blot 分析 采用液氮研磨和裂解法提取原头蚴总蛋白^[15]。将原头蚴蛋白和 His-Em-Calpain A 蛋白进行 SDS-PAGE 后,使用转膜仪转移至 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,洗涤;分别以 1 : 200 稀释的多抗血清和兔阴性血清作为一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤 5 次;以 1 : 2 000 稀释的山羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤 3 次后滴加 ECL 化学显色液曝光。

结 果

1 Em-Calpain A 基因的生物信息学分析

1.1 Em-Calpain A 理化性质、信号肽及跨膜结构域

Em-Calpain A 基因 CDS 大小为 2 469 bp,编码 822 个氨基酸,其中主要氨基酸为亮氨酸(Leu,8.5%)、甘氨酸(Gly,8.3%)、丝氨酸(Ser,7.8%)和天冬氨酸(Asp,7.1%);分子质量为 92.13 ku,分子式为 C₄₀₉₁H₆₃₂₄N₁₁₂₆O₁₂₃₃S₃₅;理论等电点为 5.30;不稳定系数为 42.01,脂溶指数和总平均疏水指数分别为 76.40 和 -0.344,表明 Em-Calpain A 蛋白可能为亲水蛋白,稳定性低。此外,Em-Calpain A 无信号肽、不含跨膜结构域。

1.2 Em-Calpain A 蛋白结构域 Em-Calpain A 蛋白含有 1 个钙蛋白酶样硫醇蛋白酶结构域(CysPc)、1 个钙蛋白酶 III 结构域(Calpain III)、1 个低度重复序列区域(lowcomplexity)、2 个 E、F 的螺旋-环-螺旋结构(EF-hand),分别位于 98-420 aa、426-575 aa、642-657 aa、704-732 aa 和 734-762 aa(图 1)。

1.3 Em-Calpain A 蛋白二级结构 Em-Calpain A 蛋白二级结构中含有 α 螺旋、延伸链、无规则卷曲和 β

转角,占比分别为 30.54%、18.61%、44.77% 和 6.08%(图 2)。

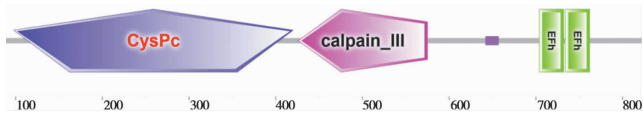


图 1 Em-Calpain A 蛋白结构域预测

Fig. 1 The predicted structural domains of Em-Calpain A protein

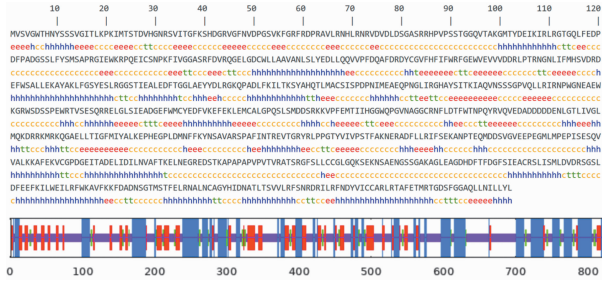
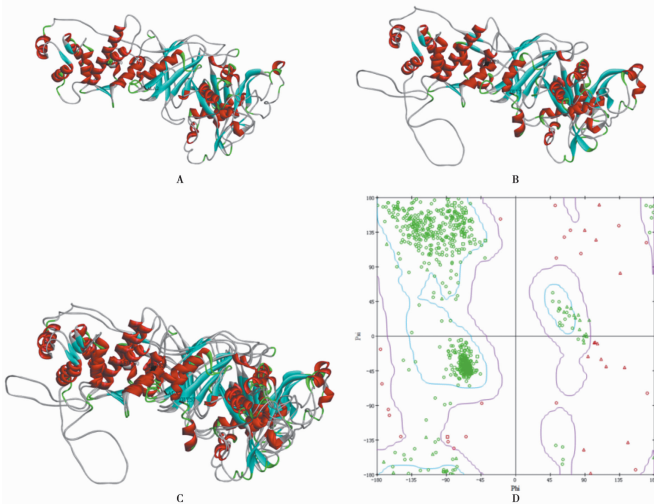


图 2 Em-Calpain A 蛋白二级结构预测

Fig. 2 Secondary structure prediction of Em-Calpain A protei

1.4 Em-Calpain A 蛋白三级结构 Blast 搜索 PDB-nr95 数据库结果表明,人 m-Calpain A 蛋白(PDB: 1KFU_L)与 Em-Calpain A 序列同源性最高,为 41.0%,与 Em-Calpain A 序列的叠合长度为 719,可作为 Em-Calpain A 同源建模的模板。利用 Discovery Studio 构建的 3D 结构显示,Em-Calpain A 的三级结构主要有 α 螺旋以及无规则卷曲,且 Em-Calpain A 较模板多一个 loop 环(图 3A-C)。从 Ramachandran Plot 显示预测模型拉氏评分为 92.1%(图 3D),表明该模型预测质量较好。



A 模板 1KFU_L 3D 模型 B Em-Calpain A 3D 模型 C 1KFU_L 与 Em-Calpain A 3D 结构拟合图 D Em-Calpain A 3D 模型拉氏图

图 3 Em-Calpain A 蛋白三级结构预测

A Template 1KFU_L 3D model B Modeled Em-Calpain A 3D structure C Superimposing of 1KFU_L and Em-Calpain A 3D structures D Ramachandran plot of Em-Calpain A 3D structure

Fig. 3 Tertiary structure prediction of Em-Calpain A protein

2 Em-Calpain A 同源性分析

将 Em-Calpain A 与其他物种氨基酸序列进行多重比对,通过 MEGA 7.0 软件对不同物种来源的 Calpain A 蛋白构建进化树(图 4)。Em-Calpain A 序列与带科绦虫聚于一类,与细粒棘球绦虫、亚洲带绦虫和牛带绦虫亲缘关系较近,核苷酸序列的同源性分别为 98.7%、88.4% 和 86.8%,氨基酸序列的一致性分别为 99%、88.1% 和 85.5%;与肝片吸虫、日本血吸虫、人、犬、牛及原虫亲缘关系较远,核苷酸序列的同源性低于 52.0%,氨基酸序列的一致性低于 45.0%。

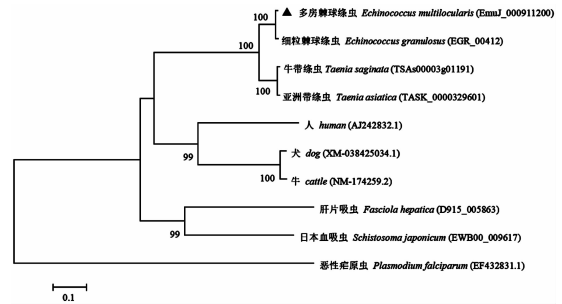
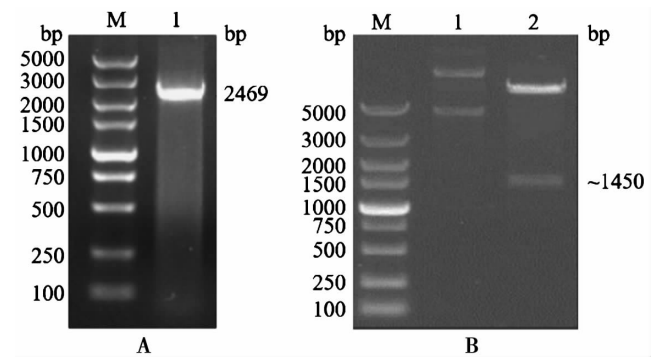


图 4 Em-Calpain A 蛋白进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of Em-Calpain A

3 Em-Calpain A 基因克隆与原核表达载体构建

PCR 扩增出约 2 469 bp 的目的条带,与预期目的条带大小一致(图 5A)。pET28a-Em-Calpain A 重组质粒经 Xho I 单酶切后出现约 1 450 bp 条带,符合实验预期结果(图 5B),说明 pET28a-Em-Calpain A 原核表达载体构建成功。



A Em-Calpain A 基因 PCR 扩增结果 M DNA 分子质量标准 1 PCR 扩增产物 B pET28a-Em-Calpain A 质粒酶切鉴定 M DNA 分子质量标准 1 pET28a-Em-Calpain A 质粒 2 质粒的 Xho I 酶切产物

图 5 Em-Calpain A 基因凝胶电泳结果

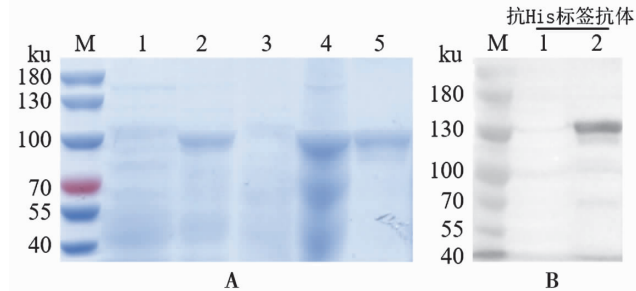
A PCR product of Em-Calpain A gene M DL5000 DNA Marker 1 PCR product B Enzyme digestion and identification of plasmid pET28a-Em-Calpain A M DL5000 DNA Marker 1 pET28a-Em-Calpain A plasmid 2 pET28a-Em-Calpain A plasmid digested by Xho I

Fig. 5 Gel electrophoresis of Em-Calpain A gene

4 pET28a-Em-Calpain A 蛋白的诱导表达及纯化

pET28a-Em-Calpain A/BL21 菌液经 0.5 mmol/L IPTG 诱导后成功表达目的蛋白 His-Em-Calpain

A;目的蛋白主要存在于菌体裂解沉淀中,以包涵体形式表达;切胶回收的目的蛋白为单一条带,大小约 93 ku,均与预测分子质量基本一致(图 6A)。Western blot 分析结果显示,纯化后的 His-Em-Calpain A 可被 His 标签抗体识别,在约 93 ku 处有明显条带(图 6B),His-Em-Calpain A 重组蛋白成功表达和纯化。



A 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白质分子质量标准 1 诱导的 pET28a/BL21 菌液 2 诱导的 pET28a-Em-Calpain/BL21 全菌 3 诱导后上清 4 诱导后沉淀 5 纯化蛋白 B Western blot 分析 M 蛋白质分子质量标准 1 pET28a/BL21 菌液对照 2 重组蛋白

图 6 Em-Calpain A 重组蛋白的 10% SDS-PAGE 及 Western blot 分析

A SDS-PAGE analysis M Protein molecular weight Marker 1 Induced pET28a/BL21 2 Induced expression of pET28a-Em-Calpain/BL21 3 Supernatant 4 Precipitation 5 Purified recombinant protein B Western blot analysis M Protein molecular weight Marker 1 pET28a/BL21 control 2 Recombinant protein

Fig. 6 10% SDS-PAGE and Western blot analysis of Em-Calpain A recombinant protein

5 抗体效价的测定

ELISA 检测结果表明,1~3 号免疫兔血清自 1 : 32 开始倍比稀释至 1 : 1048576 进行抗体检测,以 P/N>2.1 判定为阳性值,血清效价均达 1 : 262144(图 7)。

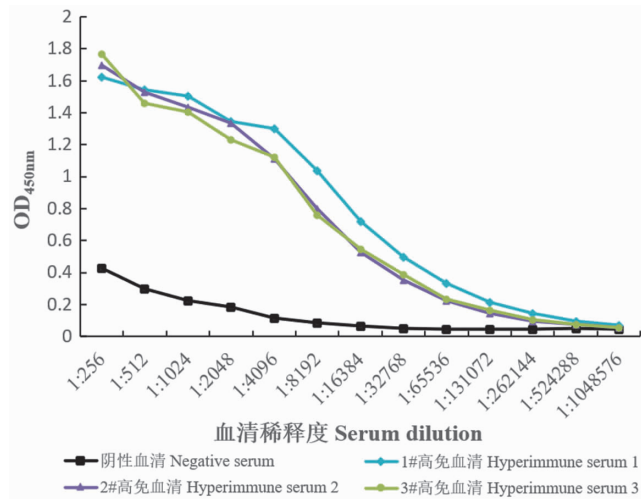


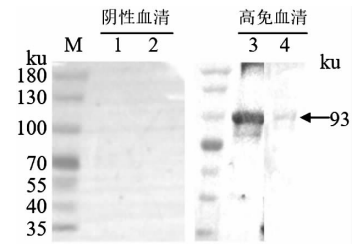
图 7 兔血清抗体效价的 ELISA 测定

Fig. 7 The titers of rabbit sera detected by ELISA

6 多抗血清的 Western blot 分析

Western blot 分析免疫兔阳性血清可特异性识别

重组蛋白和天然蛋白,均在约 93 ku 左右处出现反应条带,阴性血清则无反应(图 8)。



M 蛋白质分子质量标准 1,3 重组蛋白 2,4 天然蛋白

图 8 多抗血清的 Western blot 分析

M Protein molecular weight Marker 1,3 Recombinant protein 2,4 Native protein

Fig. 8 Western blot analysis of polyclonal antibody

讨论

钙蛋白酶是一类具有重要生物学功能的蛋白酶,寄生虫中的许多钙蛋白酶对生物体的致病性和活力发挥重要作用;靶向这些钙蛋白酶是对抗疾病的一种有效方法^[16],研究表明钙蛋白酶可作为疟疾^[17]、锥虫病^[18]、血吸虫病^[19]等疾病的潜在治疗靶点。经典的钙蛋白酶结构包括位于 N 端的 α 螺旋结构(结构域 I)、CysPc 结构(结构域 II)、C2 结构(结构域 III)和 EF-hand 结构(结构域 IV)。结构域 I 及结构域 III 调节钙蛋白酶活性;结构域 II 为催化活性中心,是钙蛋白酶的水解活性的关键部位;结构域 IV 是钙离子的结合部位。非经典的钙蛋白酶无 C2 结构(结构域 III)和 EF-hand 结构(结构域 IV)^[20]。本研究对多房棘球绦虫钙蛋白酶进行了生物信息学分析,发现 Em-Calpain A 存在典型的 C2 结构域及 EF-hand 结构,属于经典钙蛋白酶。EF-hand 结构域是一种螺旋-中央环-螺旋的结构,具有钙结合位点,EF-hand 结构对日本血吸虫病及细粒棘球绦虫病有潜在的诊断价值^[21-22]。基于人 m-Calpain A(1KFU_L)蛋白构建 Em-Calpain A 蛋白三级结构模型,使用 Ramachandran Plot 验证模型质量^[23],拉氏评分表明预测模型质量较好,从模板 1KFU_L 与 Em-Calpain A 三级结构拟合图可以看到多房棘球绦虫 Calpain A 较模板多一个由无规则卷曲形成的 loop 环,由于 loop 环无规则结构,因此具有较高的灵活性和可塑性,可能在蛋白的构象和功能活性中发挥重要作用。

原核表达系统因缺乏一些蛋白质折叠所需的辅助因子,无法对表达的蛋白进行适当的修饰和折叠,因此蛋白多以不可溶的包涵体方式表达^[24]。目前主要采用镍(Ni)亲和层析法对带 His 标签的包涵体蛋白进行纯化;但本研究在重组蛋白前期纯化时发现,采用 0.2%、1%、2% 的脱氧胆酸钠(DOC)洗涤包涵体,用温和型变性剂十二烷基肌氨酸钠(SKL)进行变性溶

解,或者采用强变性剂 4~8 mol/L 尿素进行变性溶解 3 h,均不能有效溶解 His-Em-Calpain A 包涵体,对后续亲和层析纯化蛋白造成了困难。研究表明 SDS-PAGE 电泳已成为分离和制备蛋白质的有效方法,从凝胶中回收的蛋白可成功用于制备抗体或蛋白测序等^[14]。本研究采用切胶洗脱回收 His-Em-Calpain A 包涵体蛋白,再将蛋白用丙酮沉淀处理,获得了高纯度重组蛋白;以其免疫新西兰大白兔获得了高效价多克隆抗体,可特异识别 His-Em-Calpain A 和原头蚴的 Calpain A 天然蛋白;说明切胶回收蛋白方法简单可行,纯化的目的蛋白具有良好的免疫原性和反应性,适用于后续蛋白功能的研究。此外,切胶回收蛋白较 Ni 亲和纯化法操作简便,避免了尿素对实验的干扰;结合丙酮沉淀后可得到较高纯度的蛋白并可以保护蛋白质的结构和活性,而且成本较低、作用时间短、回收率高,应用范围更广,适用于绝大多数蛋白质的纯化^[25]。

综上所述,本研究对多房棘球蚴 Calpain A 蛋白进行了生物信息学分析、基因克隆和表达纯化;使用纯化蛋白免疫新西兰大白兔制备了 Calpain A 多克隆抗体,多抗效价达 1:262 144,并且制备的多抗可与重组蛋白和天然蛋白反应,为进一步探讨多房棘球蚴 Calpain A 的生物学功能提供了理论参考。

【参考文献】

- [1] Sven B, Shi R, Liu WY, et al. Worldwide literature on epidemiology of human alveolar echinococcosis: a systematic review of research published in the twenty-first century[J]. *Infection*, 2019, 47(5):703-727.
- [2] McManus DP, Gray DJ, Zhang W, et al. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis[J]. *BMJ*, 2012, 344:e3866.
- [3] Thompson RC. Biology and Systematics of *Echinococcus*[J]. *Adv Parasitol*, 2017, 95:65-109.
- [4] 于涛,王利磊,赵慧卿,等. 细粒棘球蚴病疫苗的研制现状[J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19(1):107-112.
- [5] Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The calpain system[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3):731-801.
- [6] Spinozzi S, Albini S, Best H, et al. Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2021, 1869(5):1406-16.
- [7] Perrin BJ, Huttenlocher A. Calpain[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(7):722-725.
- [8] Siddiqui AA, Siddiqui SZ. Sm-p80-Based schistosomiasis vaccine: preparation for human clinical trials[J]. *Trends Parasitol*, 2017, 33(3):194-201.
- [9] Ohta N, Kumagai T, Maruyama H, et al. Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate[J]. *Parasitol Int*, 2004, 53(2):175-181.
- [10] Zhang R, Suzuki T, Takahashi S, et al. Cloning and molecular characterization of calpain, a calcium-activated neutral proteinase, from different strains of *Schistosoma japonicum*[J]. *Parasitol Int*, 2000, 48(3):232-242.
- [11] Chaimon S, Limpanont Y, Reamtong O, et al. Molecular characterization and functional analysis of the *Schistosoma mekongi* Ca²⁺-dependent cysteine protease (calpain)[J]. *Parasit Vectors*, 2019, 12(1):383.
- [12] Gomes MM, Budu A, Ventura P-D, et al. Specific calpain activity evaluation in *Plasmodium* parasites[J]. *Anal Biochem*, 2015, 468:22-46827.
- [13] 王芬,陈林,赵明才,等. 细粒棘球蚴 Calpain 蛋白的生物信息学分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2019, 14(10):1171-1177.
- [14] 康彬童哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 5(2):210-211.
- [15] 李红,李艳萍,刘婷丽,等. 多房棘球蚴感染对小鼠肝脂质代谢的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(1):263-271.
- [16] Ono Y, Saido TC, Sorimachi H. Calpain research for drug discovery: challenges and potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(12):854-876.
- [17] Chandramohanadas R, Davis PH, Beiting DP, et al. Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells[J]. *Science*, 2009, 324(5928):794-797.
- [18] Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites[J]. *J Mol Evol*, 2005, 61(6):742-757.
- [19] Karmakar S, Zhang W, Ahmad G, et al. Use of an Sm-p80-based therapeutic vaccine to kill established adult schistosome parasites in chronically infected baboons[J]. *J Infect Dis*, 2014, 209(12):1929-1940.
- [20] Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2011, 87(6):287-327.
- [21] Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006, 47(1):24-41.
- [22] 卢艳,徐斌,鞠川,等. 日本血吸虫含 EF-手型结构域钙结合蛋白的克隆表达与免疫诊断分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012, 30(3):165-169.
- [23] Chhabra G, Sharma P, Anant A, et al. Identification and modeling of a drug target for *Clostridium perfringens* SM101[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(7):278-289.
- [24] Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*[J]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2010, 5(1):5-24.
- [25] 范贵荣,杨致邦,田一玲,等. 两种纯化幽门螺旋杆菌 VacA-HpaA 融合蛋白包涵体方法的比较[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(2):81-84.

【收稿日期】 2024-07-25 【修回日期】 2024-10-15