

叶欣, 欧璇, 黄仪娟, 等. 猪等孢球虫顶膜抗原蛋白 AMA1 的生物信息学分析及原核表达 [J]. 华南农业大学学报, 2024, 45(4): 469-476.  
YE Xin, OU Xuan, HUANG Yijuan, et al. Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of apical membrane antigen protein AMA1 of *Isospora suis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2024, 45(4): 469-476.

# 猪等孢球虫顶膜抗原蛋白 AMA1 的生物信息学分析及原核表达

叶 欣<sup>1</sup>, 欧 璇<sup>1</sup>, 黄仪娟<sup>2</sup>, 陆 肖<sup>2</sup>, 翁亚彪<sup>2</sup>, 林瑞庆<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 佛山市正典生物技术有限公司, 广东 佛山 528138)

**摘要:**【目的】预测分析猪等孢球虫顶膜抗原蛋白 AMA1 的生物学特性、结构及功能, 并构建 *AMA1* 基因的原核表达载体, 表达、纯化 *AMA1* 蛋白。【方法】本研究从 NCBI 数据库中获得猪等孢球虫 *AMA1* 基因序列, 使用相关生物信息学预测工具对 *AMA1* 基因编码的蛋白进行分析。构建原核表达载体 pET23a-*AMA1*, 并将其转入至大肠埃希菌表达菌株 BL21 (DE3) 中, 对诱导时间、温度及 IPTG 浓度进行优化, 确定最佳诱导表达条件。采用镍柱亲和层析法进行蛋白纯化, 获得 *AMA1* 重组蛋白并进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定分析。【结果】生物信息学预测显示, *AMA1* 蛋白由 317 个氨基酸组成, 蛋白分子式为  $C_{1512}H_{2310}N_{394}O_{490}S_{14}$ , 是不稳定的亲水性蛋白; 其二级结构  $\alpha$  融合占 17.74%,  $\beta$  折叠占 30.65%, 转角占 30.65%, 无规则卷曲占 20.96%; 属于无信号肽的跨膜蛋白, 具有 5 个 B 细胞抗原表位。成功构建 pET23a-*AMA1* 重组表达质粒, 经诱导表达条件优化后, 确定最佳诱导表达条件为 0.2 mmol/L IPTG 浓度下于 28 °C 诱导 12 h, 主要以可溶性蛋白形式存在, 蛋白相对分子质量约为 25 800, 纯化蛋白质量浓度为 0.25 mg/mL。【结论】阐明了猪等孢球虫 *AMA1* 蛋白的结构特征, 通过原核诱导表达获得了重组蛋白, 为建立猪等孢球虫病的免疫学诊断方法奠定了基础, 并为后续疫苗的研发提供了新的候选基因。

**关键词:** 猪等孢球虫; 顶膜抗原; *AMA1*; 原核表达; 生物信息学

中图分类号: S852.72

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2024)04-0469-08

## Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of apical membrane antigen protein AMA1 of *Isospora suis*

YE Xin<sup>1</sup>, OU Xuan<sup>1</sup>, HUANG Yijuan<sup>2</sup>, LU Xiao<sup>2</sup>, WENG Yabiao<sup>2</sup>, LIN Ruiqing<sup>1</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Foshan Standard BIO-TECH Co., Ltd., Foshan 528138, China)

**Abstract:**【Objective】To predict and analyze the biological characteristics, structure and function of the apical membrane antigen 1 (AMA1) in *Isospora suis*, as well as construct the prokaryotic expression vector of *AMA1* gene to express and purify AMA1 protein. 【Method】The *AMA1* gene sequence of *I. suis* was obtained from NCBI database, and the protein encoded by *AMA1* gene was analyzed using relevant bioinformatics

收稿日期: 2023-08-31 网络首发时间: 2024-05-13 11:58:24

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20240511.1644.004>

作者简介: 叶 欣, 硕士研究生, 主要从事兽医寄生虫学研究, E-mail: [xinye060@163.com](mailto:xinye060@163.com); 通信作者: 林瑞庆, 副研究员, 博士, 主要从事兽医寄生虫学研究, E-mail: [rqlin@scau.edu.cn](mailto:rqlin@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省重点领域研发计划(2019B020218004)

prediction tools. The recombinant prokaryotic expression vector pET23a-AMA1 was constructed and transferred into the expression strain BL21 (DE3) of *Escherichia coli*. The induction time, temperature and IPTG concentration were optimized to determine the optimal induction expression conditions. The recombinant AMA1 protein was purified by nickel column affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western blot.

**【Result】** Bioinformatics prediction showed that AMA1 protein was composed of 317 amino acids, and its molecular formula was  $C_{1512}H_{2310}N_{394}O_{490}S_{14}$ , which was an unstable hydrophilic protein. The secondary structure prediction of the AMA1 protein yielded a profile consisting of 17.74%  $\alpha$  helix, 30.65%  $\beta$  folding, 30.65% rotation, and 20.96% random coil. It was a transmembrane protein without signal peptide and had five B cell epitopes. At the same time, pET23a-AMA1 recombinant expression plasmid was successfully constructed, and the optimal induction expression condition was 0.2 mmol/L IPTG inducing for 12 h at 28 °C, which mainly existed in the form of soluble protein. The relative molecular mass of recombinant protein was about 25 800, and the mass concentration of purified protein was 0.25 mg/mL. **【Conclusion】** The results of this study elucidate the structural characteristics of AMA1 protein of *I. suis* and the recombinant protein is obtained through prokaryotic induction expression, which lays a foundation for the establishment of immunological diagnosis of *I. suis* and provides a new candidate gene for the development of subsequent vaccines.

**Key words:** *Isospora suis*; Apical membrane antigen; AMA1; Prokaryotic expression; Bioinformatics

猪等孢球虫 *Isospora suis* 属于等孢属球虫，主要寄生于猪的空肠和回肠，是猪球虫中致病力最强的虫种，主要危害 7~15 日龄仔猪，是哺乳期仔猪患球虫病的主要病原。仔猪感染猪等孢球虫会导致肠黏膜损伤，引起厌食、腹泻、体瘦甚至死亡等严重症状。猪等孢球虫病已经成为生猪养殖行业内一种常见的寄生虫病，在国内外均广泛流行，感染率 5%~100%，且呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。此外，感染球虫的仔猪因肠道黏膜屏障被破坏，而仔猪自身免疫力又尚未完全建立，此时易继发其他细菌性或病毒性的肠道疾病，严重损害猪场的经济效益<sup>[3]</sup>。

对病原的组学研究将有助于发掘和阐明病原的重要功能基因，并建立相应的诊断方法以及制定疾病防控措施。近年来，随着高通量测序技术的不断发展，研究者开始从生物的基因组、转录组以及蛋白质组寻找更优质的抗原基因。2017 年，利用新一代测序技术，获得了猪等孢球虫全基因组序列（≈84 Mb），同时对 11 000 多个蛋白质编码基因进行人工修饰注释，并筛选出 1 168 个疫苗候选基因，其中 69% 的基因的功能是未知的<sup>[4]</sup>。2020 年，杨守深等<sup>[5]</sup>运用 iTRAQ 技术，并结合液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS) 分析比较了猪等孢球虫孢子化卵囊与未孢子化卵囊之间差异表达的蛋白质，为阐明猪等孢球虫孢子化发育机制以及发现新的生物标志物提供了参考。

顶膜抗原 (Apical membrane antigen, AMA) 是一类由微线体分泌、在顶复门寄生虫中高度保守的

跨膜蛋白，其中 AMA1 是虫体入侵宿主细胞的移动连接 (Moving junction, MJ) 复合体的重要组成部分。MJ 复合体是一种电子致密的环状结构，形成于活动的寄生虫顶端的质膜和目标宿主细胞之间<sup>[6]</sup>。在早期对疟原虫<sup>[7]</sup> 和刚地弓形虫<sup>[8]</sup> 的研究中，表明了 AMA1 基因在寄生虫入侵宿主细胞过程中起关键作用，在刚地弓形虫中，其部分敲除导致寄生虫侵入宿主细胞的能力下降了 83%，显著降低了寄生虫的侵袭性<sup>[9]</sup>。在对鸡球虫 AMA1 蛋白的研究中，发现基于巨型艾美耳球虫 AMA1 重组蛋白的亚单位疫苗能够提供部分免疫保护力<sup>[10]</sup>；同样，以柔嫩艾美耳球虫 AMA1 蛋白构建的 2 种真核表达质粒对柔嫩艾美耳球虫感染也有一定的免疫保护力<sup>[11]</sup>。

然而，相比疟原虫、弓形虫和鸡球虫，对猪等孢球虫 AMA1 的研究非常有限。因此，解析 AMA1 在猪等孢球虫感染中的作用，对今后研究猪等孢球虫入侵宿主细胞的机制有着重要的意义。本研究从 NCBI 数据库收录的猪等孢球虫基因组 contig\_6458 重叠群中获得 AMA1 基因序列，并进一步对 AMA1 基因编码的蛋白进行生物信息学分析，了解其结构特征和功能，通过原核诱导表达和纯化获得重组 AMA1 蛋白，为猪等孢球虫病诊断方法的建立和疫苗的研发提供新的候选基因和参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

pET-23a(+) 表达质粒由佛山市正典生物技术有

限公司保存和提供, 大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α、BL21 感受态细胞均购自广州擎科生物技术有限公司。基因序列引物合成、测序均由北京六合华大基因科技有限公司完成。

## 1.2 主要试剂及仪器

2× Phanta® Flash Master Mix 购自诺唯赞生物技术有限公司, DNA 限制性内切酶、蛋白 marker 购自 Thermo Fisher 公司, 氨苄青霉素、IPTG 购自广州健阳生物科技有限公司, PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自广州先度生物科技有限公司, Anti-His Mouse、HRP 羊抗鼠 IgG 二抗购自北京全式金生物技术有限公司, 考马斯亮蓝超速染色液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 恒温培养箱购于上海一恒科学仪器有限公司, 全温振荡培养箱购于上海知楚仪器有限公司, 超声波细胞破碎仪购于宁波新芝生物科技股份有限公司, 电泳仪、水平/垂直电泳槽、转印槽均购于 Bio-Rad 公司, 全自动化学发光图像分析系统购于上海天能科技有限公司。

## 1.3 AMA1 蛋白生物信息学分析

NCBI 数据库猪等孢球虫基因组 contig\_6458 重叠群 (GenBank: MIGC01006447.1) 中, *AMA1* 基因位置为 35 814—38 425 bp, 编码蛋白的登录号为 PHJ16215.1。使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *AMA1* 蛋白的理化性质, 利用 NCBI 中 BLASTP 程序对 *AMA1* 蛋白进行序列相似性检索; 使用 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 和 TMHMM2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白的信号肽和跨膜结构域; 使用 DNAstar7.1 protean 和 Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 软件预测蛋白的二、三级结构; 使用 DNAsstar7.1 protean 和 IEDB (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 软件对蛋白的优势 B 细胞抗原表位进行预测分析; 使用 NetPhos3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 和 NetNGlyc1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 对蛋白的磷酸化和 N-糖基化位点进行预测分析。

## 1.4 *AMA1* 基因片段的获得

经生物信息学分析选取主要抗原片段交由无锡傲锐东源生物科技有限公司 (OriGene) 进行密码子优化及基因合成。根据优化后 *AMA1* 基因碱基序列, 设计 *AMA1* 基因片段引物为 *AMA1-F*: 5'-GCCATATGCACCATCATCATCACAAATGAA-3', *AMA1-R*: 5'-CGACGCGTTAGCCGGTATTGCTGCCG-3'(下划线处分别为 *Nde* I 和 *Mlu* I 酶

切位点)。使用 2× Phanta® Flash Master Mix 和 *AMA1-F/AMA1-R* 引物, 以公司合成的 *AMA1* 基因克隆质粒为模板, PCR 扩增获得 *AMA1* 片段, 将鉴定正确的扩增产物进行胶回收纯化。

## 1.5 重组表达质粒的构建及鉴定

*AMA1* 基因和 pET-23a(+) 质粒经双酶切后, 通过 T4 连接酶进行连接得到重组质粒 pET23a-*AMA1*。将 pET23a-*AMA1* 转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 经过含有 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 琼脂板筛选后, 挑取阳性克隆摇菌并提取质粒, 进行 PCR 鉴定、*Nde* I 和 *Mlu* I 双酶切鉴定和 *Nde* I 单酶切鉴定, 取鉴定正确的重组质粒进行测序。将序列鉴定正确的重组阳性质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态中, 并均匀涂至含有 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 琼脂板上, 37 °C 倒置过夜培养, 挑取单克隆菌落接种于 LB 液体培养基, 并以其为模板, 以 *AMA1-F/AMA1-R* 为引物进行 PCR 鉴定, 并制作甘油菌保存于 -80 °C。

## 1.6 重组蛋白的诱导表达及条件优化

分别挑取 12 个单克隆菌落, 分别接种到 5 mL 含有 Amp<sup>+</sup> 抗性的 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 振摇至  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6~0.8。分为 3 组, 每 4 管为 1 组, 各管均加入 0.5 mmol/L IPTG, 第 1~3 组分别置于 18、28 和 37 °C 条件下, 均分别诱导培养 4、8、12 和 16 h。通过 SDS-PAGE 检测在不同诱导条件下目的蛋白的表达情况, 并使用 ImageJ 软件量化 SDS-PAGE 条带灰度值, 以确定最佳诱导温度和时间。最后, 以最佳诱导温度和时间优化诱导剂 IPTG 的浓度, IPTG 浓度分别设为 0、0.2、0.5、0.8 和 1.0 mmol/L。

## 1.7 重组蛋白的大量表达及纯化

以最佳诱导条件进行 1 L 菌液的 IPTG 诱导。诱导结束后, 将菌液于 4 °C、6 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 并用 20 mL 0 mmol/L 咪唑溶液重悬, 使用超声波细胞粉碎机裂解菌体。于 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 0.45 μm 过滤器过滤后, 使用镍柱亲和层析法进行蛋白纯化。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白质的纯度, 并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定重组蛋白浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 *AMA1* 生物信息学分析

2.1.1 *AMA1* 蛋白理化性质及相似性分析 一级结构预测结果显示: *AMA1* 蛋白由 317 个氨基酸组成, 其中强碱性 (+) 氨基酸 (K、R) 有 26 个, 强酸性 (-) 氨基酸 (D、E) 有 51 个; 蛋白分子式为 C<sub>1512</sub>H<sub>2310</sub>

$N_{394}O_{490}S_{14}$ ; 理论等电点 (pI) 为 4.39; 平均亲水系数 (GRAVY) 为 -0.431, 属于亲水性蛋白; 不稳定指数为 50.11, 大于 40, 蛋白不稳定。与犬新孢子虫、刚地弓形虫、贝氏贝诺孢子虫、堆型艾美耳球虫中的 AMA1 蛋白氨基酸序列分别具有 56.29%、55.66%、53.14%、34.58% 的相似性。

**2.1.2 AMA1 蛋白信号肽和跨膜结构域预测分析**  
采用 SignalP-5.0 对 AMA1 蛋白进行信号肽预测, 结果显示 AMA1 蛋白 N 端无信号肽序列 (图 1); TMHMM 2.0 预测结果显示, 在第 231—253 位氨基酸位置有 1 个跨膜结构域 (图 2), 属于无信号肽的跨膜蛋白。

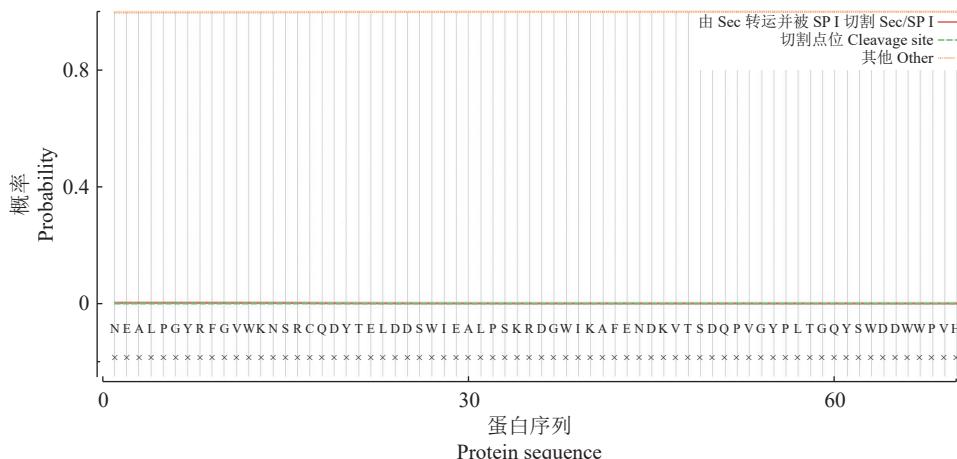


图 1 信号肽预测

Fig. 1 Prediction of signal peptide

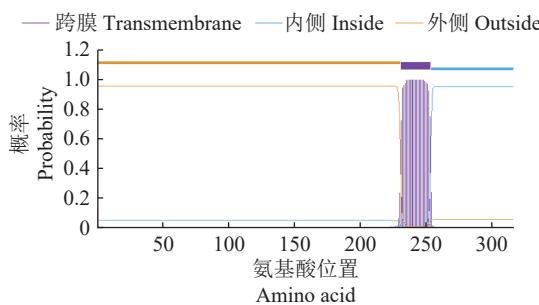


图 2 跨膜结构域预测

Fig. 2 Prediction of transmembrane domain

**2.1.3 二、三级结构预测** 二级结构预测结果显示: 该蛋白共含有 11 个  $\alpha$  螺旋 (Alpha), 占 17.74%; 19 个  $\beta$  折叠 (Beta), 占 30.65%; 19 个转角 (Turn), 占 30.65%; 13 个无规则卷曲 (Coil), 占 20.96% (图 3)。其中, 无规则卷曲含量较高, 蛋白容易与抗体结合, 从而发挥抗原作用。经 Swiss-model 同源建模法分析其三级结构如图 4 所示,  $\beta$  折叠和转角含量较高, 与二级结构预测相符。

图 3 二级结构预测

Fig. 3 Prediction of secondary structure

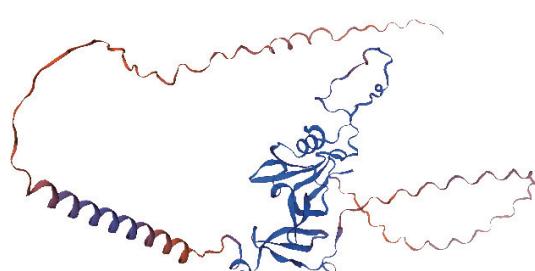


图 4 同源建模法分析 AMA1 蛋白三级结构

Fig. 4 Tertiary structure analysis of AMA1 protein by homologous modeling

**2.1.4 AMA1 蛋白 B 细胞抗原表位预测** 通过 IEDB 软件预测, AMA1 蛋白具有 6 个 B 细胞抗原表位 (阈值设定为 0.5, >0.5 表示具有潜在的 B 细胞抗原表位), 分别位于第 12—26、28、42—82、91—132、136—225、256—307 位氨基酸之间 (图 5)。经 DNASTar Protean 软件预测分析, AMA1 蛋白有多个蛋白骨架柔韧性较高的区域, 且在蛋白骨架两侧有多个亲水性区域, 氨基酸最可能呈现在蛋白表面的区域也主要富集在蛋白两侧, 同时含有多个抗

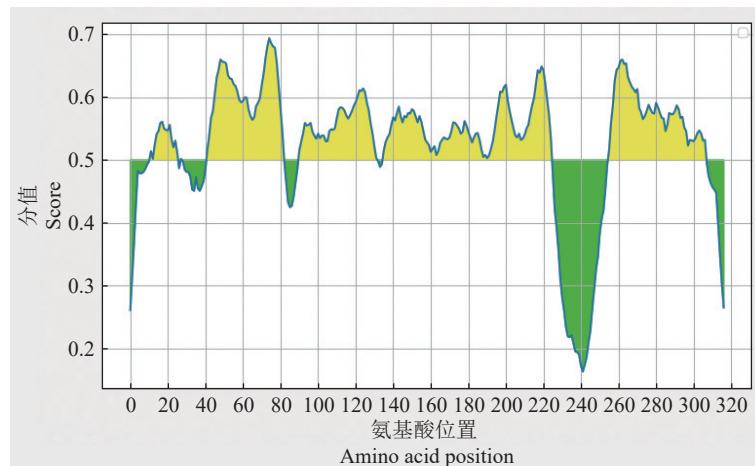


图5 B细胞抗原表位预测结果  
Fig. 5 Prediction result of B cell epitope

原指数较高的区域,通过对柔韧性、亲水性、表面可及性以及 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠结构较少、转角和无规则卷曲较多等因素综合分析,预测B细胞抗原表位可能在12—15、73—75、136—139、171—173、263—264位氨基酸上(图6),并且这5个抗原表位均在IEDB预测结果内,可能是AMA1蛋白的优

势B细胞抗原表位。

#### 2.1.5 AMA1蛋白磷酸化和糖基化位点预测分析

分别使用NetPhos3.1和NetNGlyc1.0在线软件预测AMA1蛋白的磷酸化和N-糖基化位点,预测结果显示,AMA1蛋白含有20个丝氨酸、4个苏氨酸和3个酪氨酸磷酸化位点(图7),无糖基化位点。

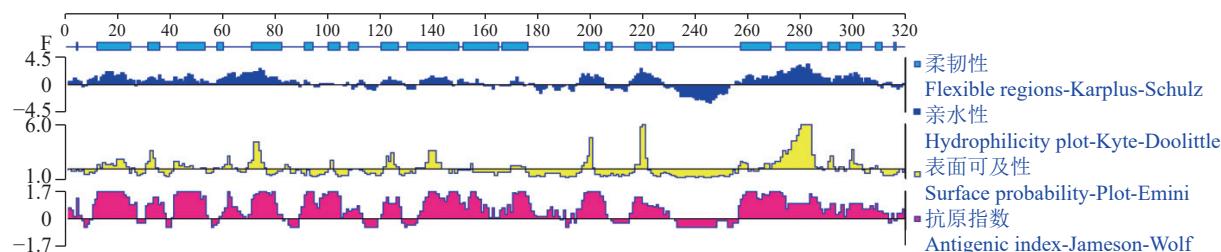


图6 分子结构和功能预测  
Fig. 6 Prediction of molecular structure and function

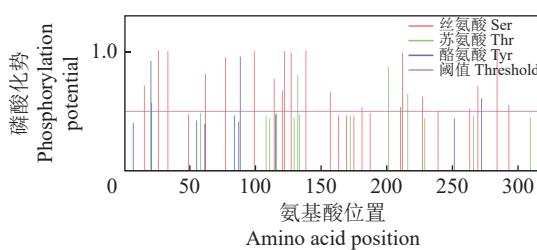


图7 磷酸化位点预测

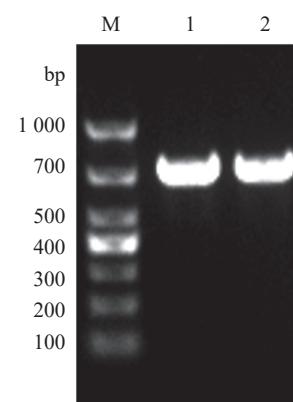
Fig. 7 Prediction of phosphorylation site

综合AMA1蛋白生物信息学分析结果,去跨膜区后选取Met1—Gly230,此部分包含4个主要的B细胞抗原表位,在N端加6×His标签,采用大肠埃希菌表达系统进行重组表达。

#### 2.2 AMA1基因片段的扩增及重组表达质粒的鉴定

经过PCR扩增出1条723 bp左右的单一条带,与预期片段大小一致(图8)。重组质粒pET23a-

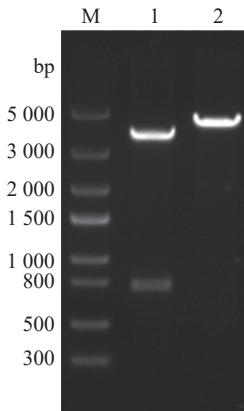
AMA1经Nde I和Mlu I双酶切后,得到1条3 599 bp的载体条带和1条723 bp的目的条带,经Nde I



M: DNA marker DL2000; 1、2为AMA1基因扩增产物  
M: DNA marker DL2000; 1 and 2 were amplified products of AMA1 gene

图8 AMA1基因PCR产物电泳图  
Fig. 8 Electrophoresis of PCR product of AMA1 gene

单酶切后得到 4 322 bp 的条带(图 9)。使用 AMA1-F/AMA1-R 引物对阳性克隆菌落进行 PCR 鉴定,结果显示,在约 700 bp 处得到特异性目的条带(图 10)。通过单酶切、双酶切和菌落 PCR 鉴定,表明重组质粒构建成功。

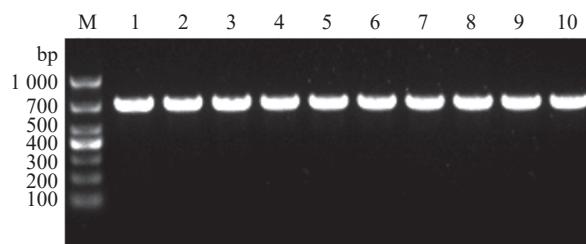


M: DNA marker DL5000; 1: *Nde* I 和 *Mlu* I 双酶切 pET23a-AMA1, 2: *Nde* I 单酶切 pET23a-AMA1

M: DNA marker DL5000; 1: pET23a-AMA1 was digested by *Nde* I and *Mlu* I, 2: pET23a-AMA1 was digested by *Nde* I

图 9 重组质粒 pET23a-AMA1 酶切鉴定

**Fig. 9 Digestion identification of recombinant plasmid pET23a-AMA1**



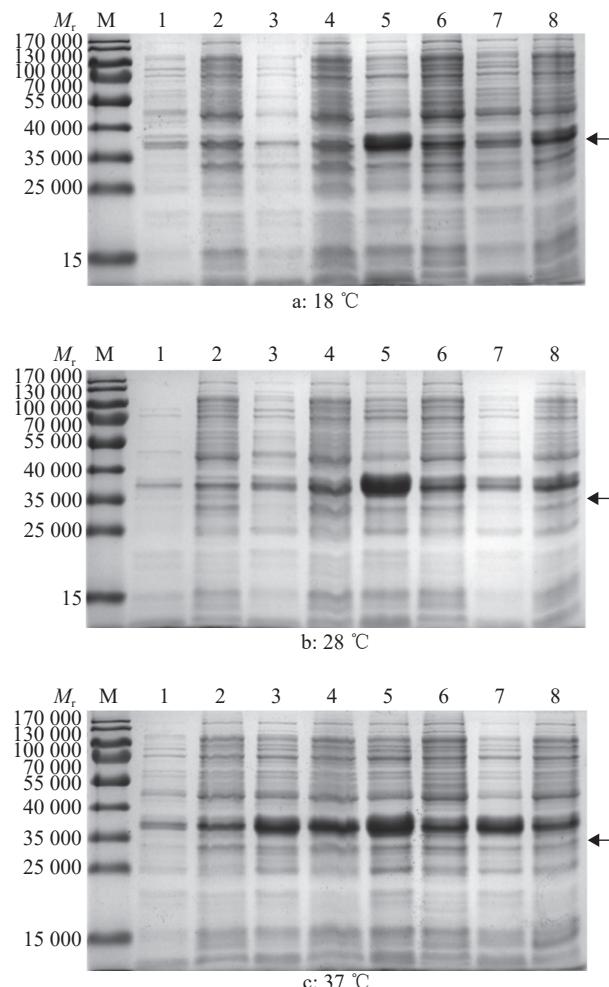
M: DNA marker DL2000; 1~10 均为  $\text{Amp}^+$  抗性平板上单克隆菌落  
M: DNA marker DL2000; 1~10 were monoclonal colonies on  $\text{Amp}^+$  resistant plates

图 10 重组质粒 pET23a-AMA1 阳性菌 PCR 鉴定

**Fig. 10 PCR identification of positive bacterium of recombinant plasmid pET23a-AMA1**

### 2.3 重组蛋白诱导表达条件的优化

不同诱导条件下, AMA1 重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE 结果如图 11~12 所示。3 个诱导温度对比来看,在 37 °C 诱导条件下,目的蛋白表达量更高,且可溶性蛋白较多;4 个诱导时间对比来看,随着诱导时间的延长,目的蛋白表达量并不是一直在升高。在 3 个诱导温度中,均显示在诱导时间为 12 h 时,蛋白表达量更高,且在上清液中表达。在 18、28 和 37 °C 诱导培养 12 h 上清液中,使用 ImageJ 软件测定目的蛋白灰度值与总灰度值占比,分别为 35.17%、46.03% 和 45.14%,由此确定 AMA1 重组蛋白最佳可溶性表达条件为 28 °C 诱导 12 h。在此条件下,对 IPTG 浓度进行了优化,



各小图中,  $M_r$ : 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1、3、5、7 分别为诱导 4、8、12、16 h 上清液, 2、4、6、8 分别为诱导 4、8、12、16 h 沉淀

In each figure,  $M_r$ : Relative molecular mass; M: Protein marker; 1, 3, 5, 7 were induced supernatant, and 2, 4, 6, 8 were induced precipitation respectively for 4, 8, 12, 16 h

图 11 18、28、37 °C 诱导不同时间结果

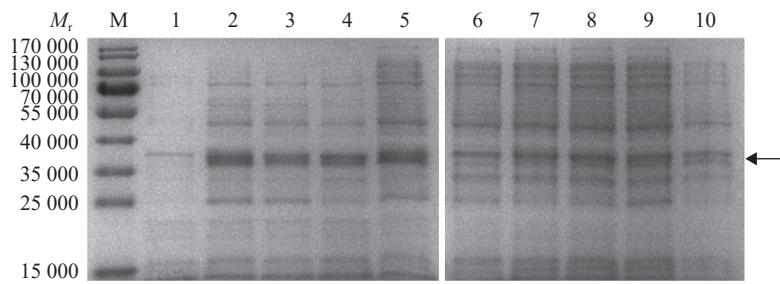
**Fig. 11 Result of different induction time under 18, 28, 37 °C**

结果显示,当 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 时目的蛋白条带灰度值最高,因此最佳 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L。

### 2.4 重组蛋白的大量表达及纯化

按照最佳可溶性表达条件进行重组蛋白的大量表达,采用镍柱亲和层析法纯化重组蛋白 AMA1,收集不同浓度梯度的咪唑洗脱液并进行 SDS-PAGE 鉴定,结果显示:该蛋白主要在 200 mmol/L 咪唑浓度下被大量洗脱下来,且无其他杂质蛋白(图 13)。通过对 200 mmol/L 咪唑洗脱液中的目的蛋白进行 Western blot 鉴定,结果显示,AMA1 蛋白与抗 His 标签的单克隆抗体发生特异性反应(图 14),表明 AMA1 重组蛋白纯化成功。

根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒使用说明,绘制蛋白标准曲线:  $y = 0.6547x + 0.1155$ , 测定

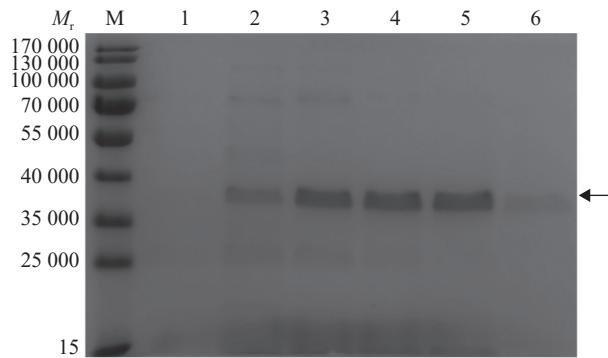


$M_r$ : 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1~5 分别为 0, 0.2, 0.5, 0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导上清液, 6~10 分别为诱导沉淀

$M_r$ : Relative molecular mass; M: Protein marker; 1~5 were induced supernatant and 6~10 were induced precipitation respectively by 0, 0.2, 0.5, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG

图 12 不同 IPTG 浓度诱导结果

Fig. 12 Induction result of different IPTG concentrations

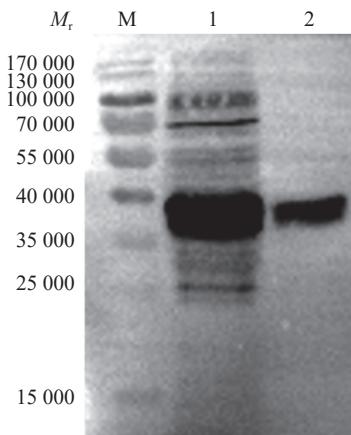


$M_r$ : 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1~6 分别为 20, 50, 100, 150, 200 和 250 mmol/L 咪唑洗脱液

$M_r$ : Relative molecular mass; M: Protein marker; 1~6 were 20, 50, 100, 150, 200 and 250 mmol/L imidazole eluents, respectively

图 13 不同浓度梯度的咪唑洗脱液的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 13 Identification of imidazole eluents with different concentration gradients by SDS-PAGE



$M_r$ : 相对分子质量; M: 蛋白 marker; 1: 全菌蛋白; 2: 200 mmol/L 咪唑洗脱液

$M_r$ : Relative molecular mass; M: Protein marker; 1: Whole bacterial protein; 2: 200 mmol/L imidazole eluent

图 14 纯化重组 AMA1 蛋白的 Western blot 鉴定分析

Fig. 14 Identification of purified recombinant AMA1 protein by Western blot

AMA1 重组蛋白  $D_{562 \text{ nm}}$ , 代入公式中  $y$  值, 得到 AMA1 蛋白质量浓度为 0.25 mg/mL。BSA-BCA 法测定的蛋白标准曲线见图 15。

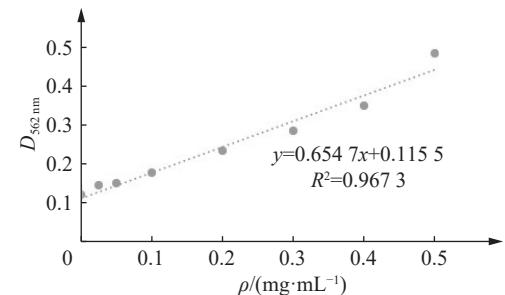


图 15 BSA-BCA 法蛋白浓度标准曲线

Fig. 15 Standard curve of protein concentration by BSA-BCA method

### 3 讨论与结论

目前, 仍未开发出针对猪等孢球虫病免疫学上的检测方法和疫苗, 不利于猪等孢球虫病的防控。而筛选出结构稳定、免疫原性强的抗原蛋白, 是建立免疫学检测方法及疫苗研发的关键。在对疟原虫<sup>[7]</sup>、弓形虫<sup>[9]</sup>和巴贝斯虫<sup>[12]</sup>等顶复门原虫的研究中, 发现 AMA1 蛋白具有作为诊断标识、药物靶点和疫苗候选抗原的潜力。

猪等孢球虫 AMA1 蛋白生物信息学显示, AMA1 蛋白属于亲水性蛋白, 但不稳定系数为 50.11(>40), 属于不稳定蛋白, 与犬新孢子虫、刚地弓形虫、贝氏贝诺孢子虫亲缘性较近, 与艾美耳球虫亲缘关系较远。AMA1 蛋白二级结构具有较多易发生扭曲、盘旋及折叠的转角和无规则卷曲, 这些结构常位于蛋白表面, 这些区域极有可能作为一种抗原表位发挥抗原作用。此外, IEDB 软件预测 AMA1 蛋白具有 5 个 B 细胞抗原表位, 结合蛋白质二级结构特点, 我们认为猪等孢球虫 AMA1 蛋白的 B 细胞抗原表位可能在 12—15、73—75、136—139、171—173、263—264 位氨基酸, 这些肽段具有较高的柔韧性、亲水性及表面可及性, 更利于蛋白与抗体嵌合<sup>[13]</sup>, 表明 AMA1 蛋白可能具有较强的免疫原性, 有望成为猪等孢球虫疫苗的靶点。蛋白质磷酸化是调节和

控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍，也是最重要的机制，AMA1 蛋白预测到多个磷酸化位点，可能介导宿主细胞间的信号转导通路过程，调节其磷酸化状态<sup>[14]</sup>。

此外，本研究对 *AMA1* 基因进行原核表达，成功构建了重组阳性质粒，为提高 *AMA1* 重组蛋白的表达量，对诱导温度、时间及诱导剂浓度进行了优化，结果发现：在诱导温度为 37 ℃ 时，*AMA1* 可溶性蛋白和包涵体蛋白均较多，可能是由于在大肠埃希菌最适生长温度下，产生的菌量较高；在一定范围内，*AMA1* 蛋白表达量随诱导时间的延长而升高，在 12 h 诱导时间下，3 个温度下的可溶性蛋白均表达较高，在 16 h 时呈下降趋势。通过对灰度值，发现在 28 ℃ 诱导 12 h 的条件下，蛋白可溶性较高，在此条件下，对 IPTG 浓度进行优化发现，最佳 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L，在最佳诱导条件下纯化获得 *AMA1* 重组蛋白，可作为建立免疫学诊断方法和疫苗研制的潜在抗原<sup>[15]</sup>。目前，对其他顶复门原虫 *AMA1* 蛋白的研究较多，发现其与虫体入侵宿主细胞有关，但对于 *AMA1* 在猪等孢球虫感染过程中发挥的作用尚不明确，仍需进一步研究。本研究结果阐明了猪等孢球虫 *AMA1* 蛋白的结构特征以及通过原核诱导表达获得了重组蛋白，为建立猪等孢球虫病的免疫学诊断方法奠定了基础，为后续疫苗的研发提供了新的候选基因。

#### 参考文献：

- [1] DIONE M, MASEMBE C, AKOL J, et al. The importance of on-farm biosecurity: Sero-prevalence and risk factors of bacterial and viral pathogens in smallholder pig systems in Uganda[J]. *Acta Tropica*, 2018, 187: 214-221.
- [2] 刘丽. 猪球虫病的流行病学、临床症状、诊断、鉴别及防治[J]. 现代畜牧科技, 2021(2): 121-122.
- [3] GONG Q L, ZHAO W X, WANG Y C, et al. Prevalence of coccidia in domestic pigs in China between 1980 and 2019: A systematic review and meta-analysis[J]. *Parasites & Vectors*, 2021, 14(1): 248.
- [4] PALMIERI N, SHRESTHA A, RUTTKOWSKI B, et al. The genome of the protozoan parasite *Cystoisospora suis* and a reverse vaccinology approach to identify vaccine candidates[J]. *International Journal for Parasitology*, 2017, 47(4): 189-202.
- [5] 杨守深, 孙晓双, 邱云飞, 等. 猪囊等孢球虫孢子化与未孢子化卵囊的差异表达蛋白质组学分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(9): 2216-2226.
- [6] CRAWFORD J, TONKIN M L, GRUJIC O, et al. Structural characterization of apical membrane antigen 1 (*AMA1*) from *Toxoplasma gondii*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(20): 15644-15652.
- [7] TRIGLIA T, HEALER J, CARUANA S R, et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38(4): 706-718.
- [8] HEHL A B, LEKUTIS C, GRIGG M E, et al. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12): 7078-7086.
- [9] MITAL J, MEISSNER M, SOLDATI D, et al. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(9): 4341-4349.
- [10] 罗伏兵, 刘晓冬, 梁琳, 等. 巨型艾美耳球虫 *AMA1* 蛋白单克隆抗体的制备及其功能鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(11): 34-36.
- [11] 王晔, 赵其平, 朱顺海, 等. 柔嫩艾美耳球虫 *AMA1* 基因 DNA 疫苗的免疫保护效果[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(6): 1-9.
- [12] NIU Q, LIU Z, YANG J, et al. Molecular cloning, characterization and antigenicity of *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) (*Babesia* cf. *motasi*) apical membrane antigen-1 (*AMA1*)[J]. *Parasitology*, 2017, 144(5): 641-649.
- [13] CAZZANIGA G, MORI M, CHIARELLI L R, et al. Natural products against key *Mycobacterium tuberculosis* enzymatic targets: Emerging opportunities for drug discovery[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 224: 113732.
- [14] WAN W Y, BOYER-GUITTAUT M, DODSON M, et al. Regulation of autophagy by protein post-translational modification[J]. *Laboratory Investigation*, 2015, 95(1): 14-25.
- [15] XIAO J, ZHENG R, BAI X, et al. Preliminary evaluation of the protective effects of recombinant *AMA1* and *IMP1* against *Eimeria stiedae* infection in rabbits[J]. *Parasites & Vectors*, 2022, 15(1): 400.

【责任编辑 李庆玲】