



聂林冲,袁浩,杨子鹏,何厚劲,李文豪,杨留禄,金梦圆,袁子国. 锡兰钩虫 *ASP4* 基因的表达与免疫保护效果分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(11): 102-111.

NIE Linchong, YUAN Hao, YANG Zipeng, HE Houjin, LI Wenhao, YANG Liulu, JIN Mengyuan, YUAN Ziguo. Expression of *ASP4* gene in *Ancylostoma ceylanicum* and immunprotective effect analysis of recombinant protien[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(11): 102-111.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.11.11

锡兰钩虫 *ASP4* 基因的表达与免疫保护效果分析

聂林冲 袁浩 杨子鹏 何厚劲 李文豪 杨留禄 金梦圆 袁子国*

(华南农业大学 兽医学院, 广州 510642)

摘要 为克隆锡兰钩虫 *ASP4* 基因 (*Ace-ASP4*), 评估其重组蛋白在小鼠体内诱导的免疫保护效果, 先扩增 *Ace-ASP4* 基因序列, 并对其编码蛋白的氨基酸序列进行生物信息学分析, 并原核表达 *ASP4* 蛋白。将重组蛋白免疫小鼠, 然后利用 CCK-8 法和间接 ELISA 方法分别检测小鼠脾淋巴细胞增殖能力和血清中 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平。同时检测首免后小鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 L-10 水平。最后, 在三免后 14 d 经口感染 500 条 L3 幼虫, 48 h 后检测肺、胃肠道和肌肉的虫体数量, 计算减虫率, 以评估其免疫保护效果。结果表明: 1) *Ace-ASP4* 基因的 ORF 全长为 750 bp, 编码 249 个氨基酸。生物信息学分析显示, *Ace-ASP4* 编码蛋白为亲水性蛋白, 具有信号肽序列且无跨膜结构, 其三维结构模型质量良好 (GMQE 值为 0.9)。2) *Ace-ASP4* 蛋白分子大小为 27 ku, 在上清和沉淀中均有表达, 但主要以包涵体形式富集于沉淀中, 并具有良好的免疫反应性。3) *Ace-ASP4* 重组蛋白可诱导免疫小鼠 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体显著上升, 并极显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖 ($P < 0.01$)。与 PBS 对照组相比, 在首免后第 35 天用 *Ace-ASP4* 重组蛋白免疫小鼠后其体内的 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 L-10 显著升高 ($P < 0.05$)。4) 攻虫后, 与 PBS 对照组小鼠相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ 重组蛋白免疫小鼠在肺中获得了 52% 的减虫率, 在胃肠道中获得了 46% 的减虫率, 在肌肉中获得了 61% 的减虫率。综上, 本研究成功克隆表达了 *Ace-ASP4* 蛋白, *Ace-ASP4* 蛋白能使免疫小鼠产生抗体, 促进其脾淋巴细胞增殖等, 为进一步研究 *ASP4* 基因的生物学功能奠定基础, 也为研制锡兰钩虫疫苗提供参考数据。

关键词 锡兰钩虫; *ASP4* 基因; 原核表达; 免疫保护效果分析

中图分类号 S855.9+9

文章编号 1007-4333(2024)11-0102-10

文献标志码 A

Expression of *ASP4* gene in *Ancylostoma ceylanicum* and immunprotective effect analysis of recombinant protien

NIE Linchong, YUAN Hao, YANG Zipeng, HE Houjin, LI Wenhao, YANG Liulu,
JIN Mengyuan, YUAN Ziguo*

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

Abstract To clone the *ASP4* gene from *Ancylostoma ceylanicum* (*Ace-ASP4*) and evaluate the immune protective effect induced by its recombinant protein in mice, the *ASP4* gene sequence was firstly amplified, and the amino acid sequence of its encoded protein was subjected to bioinformatics analysis. The recombinant protein was then expressed in prokaryotic cells to immunize mice. The proliferatin ability of mouse spleen lymphocyte proliferation ability and serum IgG, IgG1 and IgG2a antibody levels were detected using CCK-8 and indirect ELISA methods, respectively. In addition, the levels of IFN- γ , IL-2, IL-4

收稿日期: 2024-06-07

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2023A1515011795); 国家自然科学基金项目 (31972707); 广东省林业科学院项目 (2023CG171)

第一作者: 聂林冲 (ORCID: 0009-0006-7939-6424), 硕士研究生, E-mail: nlc202317770368892@163.com

通讯作者: 袁子国 (ORCID: 0000-0002-3592-474), 教授, 主要从事肠道寄生虫适应性的机制和寄生虫抗肿瘤发展等机理的研究, E-mail: ziguo@scau.edu.cn

and IL-10 in the serum of mice after the first immunization were also detected. Finally, after three immunizations, the L3 larvae were orally infected at 500 larvae per mouse 48 h later. The number of larvae in the lungs, gastrointestinal tract, and muscles were counted 48 h post-infection, and the reduction rate was calculated to evaluate its immunoprotective effect. The results showed that: 1) The ORF of *Ace-ASP4* gene was 750 bp long, encoding 249 amino acids. Bioinformatics analysis showed that *Ace-ASP4* encoded a hydrophilic protein with a signal peptide sequence and no transmembrane structure, and its three-dimensional structure model had a good quality with a GMQE value of 0.9. 2) The molecular weight of *Ace-ASP4* protein was 27 ku, and it could be expressed both in the supernatant and precipitate, but mainly enriched in the formed of inclusion bodies in the precipitate and had good immunoreactivity. 3) The *Ace-ASP4* recombinant protein can induce significant increase of IgG, IgG1 and IgG2a antibodies in immunized mice and promote the proliferation of spleen lymphocytes in immunized mice ($P < 0.001$). Compared with the PBS control group, levels of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 in mice immunized with *Ace-ASP4* recombinant protein on the 35th day after the first immunization were significantly increased ($P < 0.05$). 4) After challenge, compared with mice immunized with PBS, mice immunized with 50 $\mu\text{g/mL}$ of recombinant protein achieved a 52% reduction rate in the lungs, a 46% reduction rate in the gastrointestinal tract, and a 61% reduction rate in the muscles. In conclusion, *Ace-ASP4* protein was successfully expressed, and can induce strong immune response in immunized mice, which lays a foundation for further study of the biological function of *ASP4* gene and provides reference data for the development of *A. ceylanicum* vaccine.

Keywords *Ancylostoma ceylanicum*; *ASP4* gene; prokaryotic expression; immune protection effect

钩虫是一种寄生于人和犬、猫等动物肠道中的土源性寄生蠕虫。人类感染钩虫的主要方式是通过直接接触感染性幼虫,或摄入被感染性幼虫污染的食物和水^[1]。钩虫病是一种广泛流行但常被忽视的肠道寄生虫病,虽然其致死率较低,但能够给某些贫困地区及国家带来严重的公共安全问题 and 经济损失^[2]。钩虫成虫可在宿主的小肠内存活多年,并在小肠中吸血液。当宿主肠道内出现大量成虫时,可能会导致个体出现缺铁性贫血。锡兰钩虫(*Ancylostoma ceylanicum*)是一种通过土壤传播的人畜共患寄生虫,主要感染犬猫并可通过犬猫传播至人类,并能在人体内发育为成虫。锡兰钩虫被认为是亚太地区感染人类的第二大常见钩虫,其感染病例占总钩虫感染病例的6%~23%^[3-4]。多项研究表明,锡兰钩虫已在中国、泰国和老挝等地的人类和家畜之间传播,并且在犬猫等伴侣动物中尤为流行。据文献报道,在泰国和老挝家养和社区饲养的狗和猫中,其阳性率分别为53%~92%和69%;而在中国广州的流浪猫中阳性率则为20.4%^[5-8]。这些数据均揭示了锡兰钩虫感染人类的潜在风险。目前,钩虫病的防治主要依赖于定期服用驱虫药,然而长期使用驱虫药会导致钩虫产生耐药性,进而降低药物治疗效果^[9]。此外,钩虫对于宿主的重复感染也会使药物的效果受到影响。因此,开发钩虫

疫苗已逐渐成为控制钩虫感染的重点。但目前尚未有针对该病的有效疫苗,仍需持续深入研究,以找到更有效的疫苗候选分子,从而实现对锡兰钩虫病的防控。

钩虫分泌蛋白是幼虫激活过程中分泌的主要蛋白,在钩虫生长发育过程中起关键作用^[10]。研究表明,激活相关蛋白(Activation-associated proteins)在钩虫入侵宿主、通过组织迁移、附着在肠壁和取血过程中有免疫调节功能。到目前为止,在已经被鉴定出的3种由钩虫L3释放的分子中,有2种属于钩虫分泌蛋白的多肽家族,分别是ASP1和ASP2。研究表明,用明矾沉淀的rAc-ASP1免疫小鼠,能使免疫小鼠对L3期幼虫的感染产生部分保护效果,可降低免疫小鼠50%~80%的荷虫量^[11]。研究表明,ASP蛋白具有良好的疫苗抗原潜力。Loukas等^[12]研究表明,使用Quil A配制的rAc-ASP2免疫仓鼠可显著减少肠道荷虫量和缩小钩虫体型,而rAc-ASP1未显示保护作用。Sen等^[13]通过犬钩虫同源ASP1和ASP2蛋白进行疫苗接种试验,发现明矾沉淀的rAc-ASP1能显著降低免疫小鼠肺部钩虫荷虫量。此外,使用其他钩虫物种表达的ASP1同系物在小鼠中也能产生交叉保护作用。虽然Siwińska等^[14]和Wiśniewski等^[15]报道了锡兰钩虫ASP4的cDNA的克隆和特性,并且对ASP4及其相关基因家族进

行了序列比对分析,但该基因表达蛋白生物学功能尚未被研究。基于此,本研究克隆了锡兰钩虫 *Ace-ASP4* 基因,并对其编码蛋白的氨基酸序列进行生物信息学分析,并对 *Ace-ASP4* 蛋白免疫原性及免疫保护效果进行分析,为进一步研究该蛋白的生物学功能及作为钩虫疫苗候选分子的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 虫体及菌株

锡兰钩虫 3 期幼虫(L3 幼虫)从犬粪便中分离所得,成虫通过 L3 幼虫人工感染仓鼠后获得。将经鉴定的锡兰钩虫虫体置于 RNA 样品保存液中,于 -80°C 保存备用。大肠杆菌 DH5 α 、BL21,表达质粒 pET-28a 均由华南农业大学寄生虫教研室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性核酸内切酶 *Bam*HI 和 *Hind* III 为 TaKaRa 公司产品;弗氏佐剂为上海 Sangon 生物工程公司产品;胎牛血清、刀豆蛋白、RPMI 1640 培养基、细胞筛均购自广州市凯阁生物科技有限公司;改良 BCA 蛋白浓度测定试剂盒、CCK-8 试剂盒、兔抗犬 IgG1-HRP、兔抗鼠 IgG1-HRP 和鼠 His 标签单克隆抗体(MAb)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒、小鼠 IL-2 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒、小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与反转录

参照 Trizol(Invitrogen)方法提取锡兰钩虫成虫的总 RNA,用分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度,并通过琼脂糖变性电泳确保 RNA 的完整性。按照 TaKaRa RNA PCR Kit 3.0 试剂盒的说明书合成 cDNA 第一链。

1.2.2 *Ace-ASP4* 基因的扩增与测序

根据 GenBank 收录的锡兰钩虫 *Ace-ASP4* 基因序列(AY423766.1)设计特异性引物,*ASP4-F*:5'-CGGGATCCATGGCTGGACCAAGCTGCG-3';*ASP4-R*:3'-CCAAGCTTTGGTTTT TAGACACAATC-5'。以合成的 cDNA 第一链为模板,*ASP4-F* 和 *ASP4-R* 为引物,经 PCR 扩增 *Ace-ASP4* 基因,反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;92 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,

59 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物正确后回收目的片段。对纯化回收的目的基因 PCR 产物和 pET-28a,使用 *Bam*HI 和 *Hind*III 进行双酶切,经 T4 连接酶连接,构建重组质粒 pET-28a-*Ace-ASP4*,并经双酶切鉴定,阳性克隆由生工生物(上海)有限公司测序。

1.2.3 *Ace-ASP4* 编码蛋白的生物信息学

利用在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析该蛋白的分子量大小、氨基酸组成、等电点(PI)等性质;分别利用在线软件 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMMServer2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和 ProtScale(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)对该蛋白的信号肽序列、跨膜结构域与疏/亲水性进行分析;利用 SWISS-MODEL 预测软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)预测并构建该蛋白的三维结构模型。

1.2.4 *Ace-ASP4* 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达、纯化及鉴定

将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3)中,构建重组表达菌。将 pET-28a-*ASP4* 重组表达菌在氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行培养,当 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,添加终浓度 1.0 mmol/L 的 IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$,140 r/min 振荡培养 8 h。收集菌体,经 PBS 重悬、超声破碎后,取上清和沉淀通过 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白的表达情况。将离心收集的包涵体置于 8 mol/L 尿素溶液中溶解过夜,以去除杂蛋白。在变性条件下,利用 Ni-NTA His Bind Resin 层析柱纯化重组蛋白,并使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定其浓度。对纯化的 *Ace-ASP4* 蛋白用鼠抗 His 标签单克隆抗体(1:6 000)作为一抗,兔抗鼠 IgG-HRP(1:20 000)为二抗,经 Western blot 进一步分析其纯化效果。

1.2.5 *Ace-ASP4* 的反应原性分析

经锡兰钩虫感染犬和健康犬前肢静脉采血,分离血清。以感染犬血清(1:5 000)和健康犬血清(1:5 000)为一抗,兔抗犬 IgG1-HRP(1:20 000)为二抗,通过 Western blot 分析 *Ace-ASP4* 的反应原性。

1.2.6 小鼠的分组、免疫和攻虫

将 36 只 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠随机分

为 3 组: *Ace*-ASP4 (25 $\mu\text{g/mL}$) 组、*Ace*-ASP4 (50 $\mu\text{g/mL}$) 组和 PBS 对照组, 每组 12 只。首免时分别与弗氏完全佐剂 1:1 混合, 二免和三免时以弗氏不完全佐剂替换弗氏完全佐剂, 间隔为 7 d。试验组小鼠在每次免疫后眼眶静脉丛采血, 收集血清, 在第 35 天 (第 3 次免疫后的第 3 周) 进行最后一次采血。

在第 35 天 (第 3 次免疫后的第 3 周), 将试验小鼠进行眼眶静脉丛采血, 随后对 *Ace*-ASP4 (50 $\mu\text{g/mL}$) 免疫组和 PBS 对照组的 9 只小鼠分别经口感染 500 条 L3 锡兰钩虫, 48 h 后将所有小鼠断颈处死, 分别检测肺、胃肠道和肌肉的减虫率。

1.2.7 免疫鼠脾淋巴细胞增殖试验

末次采血后, 将 3 组中的 3 只小鼠进行脱颈处死, 无菌取脾, 制备脾细胞悬液。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。于 96 孔细胞培养板中培养细胞, 每孔加入 50 μL 淋巴细胞悬液。阴性对照组的小鼠脾淋巴细胞, 使用 PBS 缓冲液作为刺激物。阳性对照组的小鼠脾淋巴细胞, 使用刀豆蛋白 (ConA 蛋白, 10 $\mu\text{g/mL}$) 作为刺激物。试验组使用 *Ace*-ASP4 (10 $\mu\text{g/mL}$) 蛋白作为刺激物。每组试验设置 3 个平行。分别置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h, 使用 CCK-8 反应增强液再培养 1 h, 最后用酶标仪检测 OD₄₅₀ 处读数。

1.2.8 总 IgG、IgG1 和 IgG2a 水平的检测

每组小鼠分别于第 1 次免疫后 (0 d)、第 2 次免疫后 (7 d)、第 3 次免疫后 (14 d) 及第 3 次免疫后两周 (35 d), 眼眶静脉丛采血, 收集血清。用间接 ELISA 法检测 *Ace*-ASP4 (25 $\mu\text{g/mL}$) 组、*Ace*-ASP4 (50 $\mu\text{g/mL}$) 组、PBS 对照组小鼠的血清总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的抗体水平。

1.2.9 ELISA 小鼠体内细胞因子检测

每组小鼠第 0 天和第 35 天眼眶静脉丛采血, 在收集血清后使用 ELISA 试剂盒检测 3 组小鼠血清中 IFN- γ 、IL-2、IL-4 和 IL-10 水平。

1.2.10 测定肺、胃肠道和肌肉减虫率

在 L3 幼虫感染 48 h 后断颈处死小鼠 (*Ace*-ASP4 (50 $\mu\text{g/mL}$) 免疫组和 PBS 对照组), 收集小鼠肺、胃肠道和肌肉的虫体并计数, 计算减虫率。

肺脏荷虫量: 通过切除其肺和气管。将每个肺在含有 10~15 mL RPMI 1640 的培养皿中用剪刀

切碎, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下震荡 1~2 h 后, 在 10 倍放大倍数下对幼虫进行计数。

胃肠道荷虫量: 通过用剪刀对胃肠道进行机械剪切, 然后用含 0.5% 胃蛋白酶和 0.7% HCl 的 PBS 进行化学消化, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下持续振荡 2 h。将消化的胃肠道放入贝尔曼装置中 6 h 回收 L3, 然后进行计数。

肌肉荷虫量: 其收集方式和胃肠道收集虫体方式相同, 但主要是从小鼠骨骼肌中回收。

[减虫率 = (1 - 免疫组平均虫荷数 / 对照组平均虫荷数) $\times$ 100%]

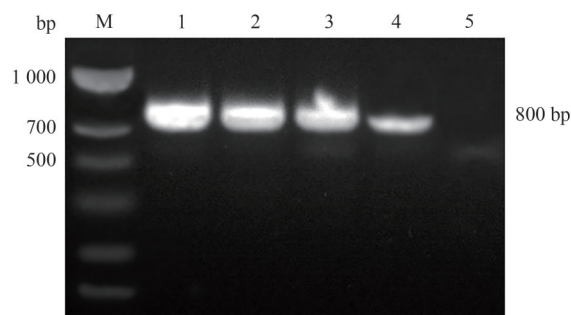
1.2.11 统计分析

GraphPad Prism 8 软件用于对收集的数据进行统计学处理及分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P > 0.05$ 为差异不显著。采用 t 检验对不同组别小鼠之间的抗体水平、淋巴细胞平均刺激指数和细胞因子水平进行两两比较。

2 结果与分析

2.1 *Ace*-ASP4 基因的 PCR 扩增

以锡兰钩虫的 cDNA 作为模板, 通过 PCR 扩增得到了全长为 750 bp (约 800 bp) 的 *Ace*-ASP4 基因序列, 其大小与预期目的片段相符 (图 1)。



M: DNA 标准 DL1 000; 1~3: ASP4 基因扩增产物; 4: 阳性对照 (ASP4 基因); 5: 阴性对照 (ddH₂O)。

M: DL1 000 DNA Maker; 1-3: Products of ASP4 gene; 4: Positive control (ASP4 gene); 5: Negative control (ddH₂O)。

图 1 ASP4 基因 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of ASP4 gene

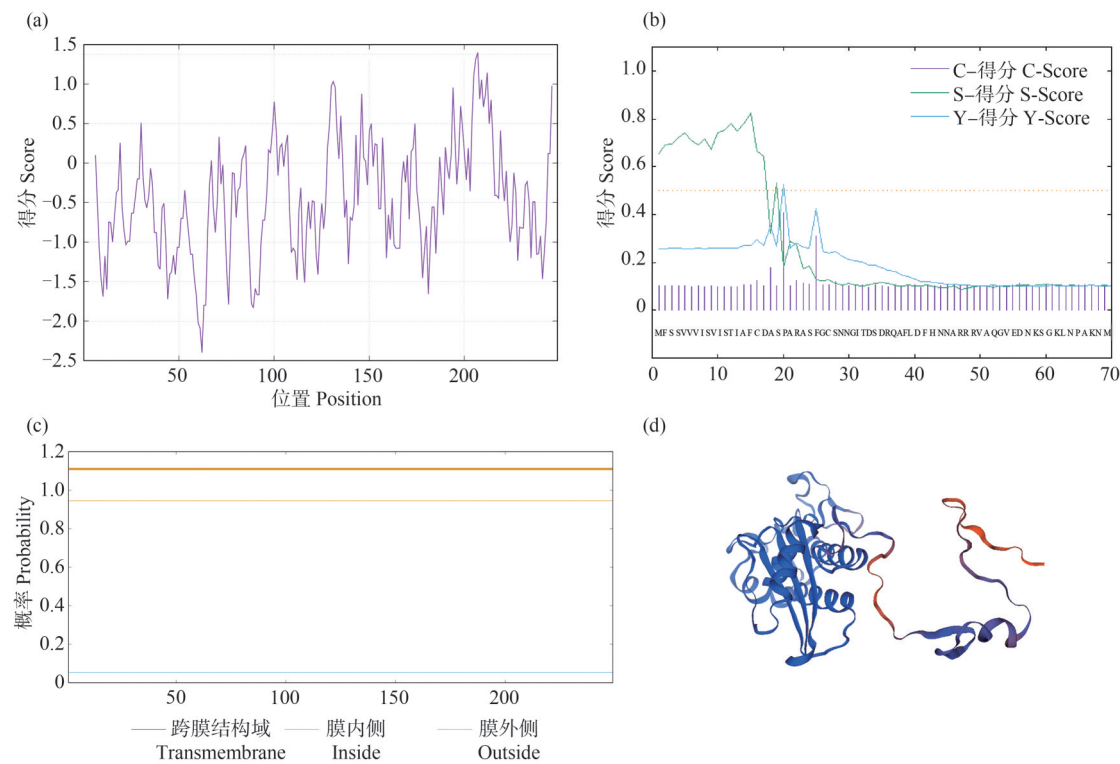
2.2 *Ace*-ASP4 基因编码蛋白的生物信息学分析

根据 Prot-Param 软件分析, 该蛋白的分子式为 C₁₁₆₄H₁₈₂₈N₃₀₄O₃₉₀S₂₂, 分子质量为 27 ku, 理论等电点 pI 为 4.72。锡兰钩虫 ASP4 蛋白由 20 种常见氨基酸组成, 其中丙氨酸含量最高 (10.8%), 精氨酸、组

氨酸和色氨酸含量最低(0.8%);负电荷残基(Asp+Glu)为34个,正电荷残基(Arg+Lys)为24个(表1)。Ace-ASP4蛋白的总平均疏水系数为-0.402,推测其为亲水性蛋白(图2(a))。根据图2(b)和图2(c)显示,该蛋白有信号肽序列,但不含跨膜结构域;其三维结构模型结果显示(图2(d)),且该蛋白以单体形式存在。Ace-ASP4编码的蛋白的全球性模型质量估值(GMQE值)为0.9,质量良好。

表1 锡兰钩虫ASP4蛋白的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of ASP4 protein in *Ancylostoma ceylonensis*

氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率/% Frequency	氨基酸 Amino acid	数量 Number	频率/% Frequency
丙氨酸 Ala (A)	27	10.8	亮氨酸 Leu (L)	14	5.6
精氨酸 Arg (R)	2	0.8	赖氨酸 Lys (K)	22	8.8
天冬酰胺 Asn (N)	11	4.4	蛋氨酸 Met (M)	7	2.8
天冬氨酸 Asp (D)	22	8.8	苯丙氨酸 Phe (F)	3	1.2
半胱氨酸 Cys (C)	15	6.0	脯氨酸 Pro (P)	11	4.4
谷氨酰胺 Gln (Q)	10	4.0	丝氨酸 Ser (S)	12	4.8
谷氨酸 Glu (E)	12	4.8	苏氨酸 Thr (T)	25	10.0
甘氨酸 Gly (G)	14	5.6	色氨酸 Trp (W)	2	0.8
组氨酸 His (H)	2	0.8	酪氨酸 Tyr (Y)	14	5.6
异亮氨酸 Ile (I)	7	2.8	缬氨酸 Val (V)	17	6.8



(a)ASP4蛋白亲水性分析;(b)ASP4蛋白信号肽分析;(c)ASP4蛋白跨膜区预测;(d)ASP4蛋白三级结构预测。
(a)Hydrophilic analysis of ASP4 protein;(b)Analysis of ASP4 protein signal peptide;(c)Prediction of ASP4 protein transmembrane region;(d) Prediction of tertiary structure of ASP4 protein.

图2 ASP4蛋白的生物信息学分析

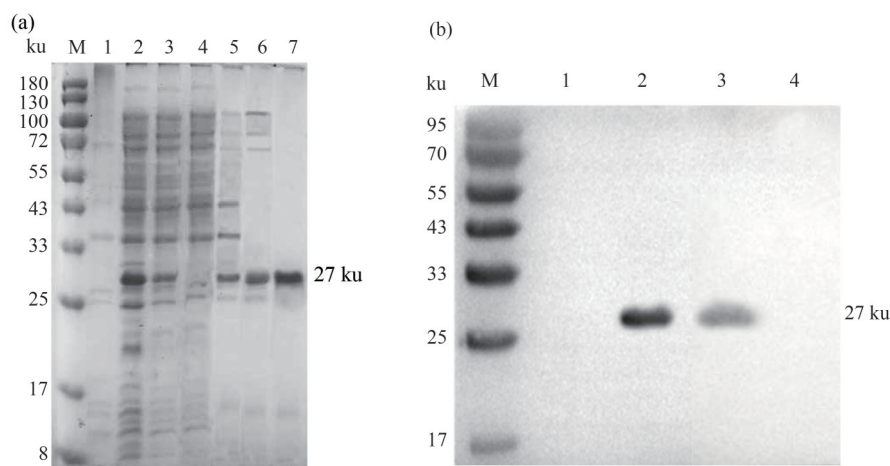
Fig. 2 Bioinformatics analysis of ASP4 protein

2.3 Ace-ASP4 蛋白的表达、纯化及 Western blot 鉴定

将重组质粒 pET-28a-ASP4 转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 后对其进行诱导表达, 并经 Ni-NTA 亲和层析法纯化。对诱导前后的菌液进行超声破碎, 将破碎后的沉淀和上清经 10% SDS-PAGE 检测, 结果显示: pET-28a-ASP4 菌诱导后在 27 ku 处出现特征蛋白带, 与预期相符, 且该蛋白在上清和沉淀

中均有表达, 但主要在沉淀中以包涵体形式存在 (图 3(a))。

Western blot 结果显示, 该重组蛋白能被鼠抗 His 标记单克隆抗体识别, 在 27 ku 有特异性条带 (图 3(b))。该蛋白能被锡兰钩虫阳性犬的血清所特异性识别 (图 3(c)), 与健康犬血清反应未出现特异性条带。上述结果表明, 锡兰钩虫重组蛋白 Ace-ASP4 具有良好的反应原性。



(a) Ace-ASP4 的原核表达产物; M: 蛋白质分子质量标准; 1: BL21-pET-28a-ASP4 诱导前菌体; 2: BL21-pET-28a-ASP4 诱导后沉淀; 3: BL21-pET-28a-ASP4 诱导后上清; 4: BL21-pET-28a-ASP4 包涵体溶于 2 mol/L 尿素; 5: BL21-pET-28a-ASP4 包涵体溶于 4 mol/L 尿素; 6: BL21-pET-28a-ASP4 包涵体溶于 8 mol/L 尿素; 7: 纯化复性后的 ASP4 蛋白。(b) Ace-ASP4 与锡兰钩虫阳性血清和鼠抗 His 标签单抗的 Western blot 结果; M: 蛋白分子质量标准; 1: ASP4 蛋白与健康犬血清的反应; 2: ASP4 蛋白与感染犬阳性血清的反应; 3: ASP4 蛋白; 4: pET-28a 空载体诱导产物。

(a) SDS-PAGE result of Ace-ASP4 prokaryotic expression products; M: Protein molecular quality standards; 1: BL21-pET-28a-ASP4 preinduction thallus; 2: BL21-pET-28a-ASP4 induced precipitation; 3: BL21-pET-28a-ASP4 induced supernatant; 4: The BL21-pET-28a-ASP4 inclusion body is soluble in 2 mol/L urea; 5: The BL21-pET-28a-ASP4 inclusion body is soluble in 4 mol/L urea; 6: The BL21-pET-28a-ASP4 inclusion body is soluble in 8 mol/L urea; 7: ASP4 protein after purification. (b) Western blot results of Ace-ASP4 with positive *Ancylostoma ceylanicum* dog serum and mouse anti-His label monoclonal antibody; M: Protein molecular quality standards; 1: Reaction of ASP4 protein with healthy dog serum; 2: Reaction of ASP4 protein with positive serum of infected dogs; 3: ASP4 protein; 4: pET-28a empty carrier induced product.

图 3 Ace-ASP4 蛋白的表达、纯化及 Western blot 鉴定

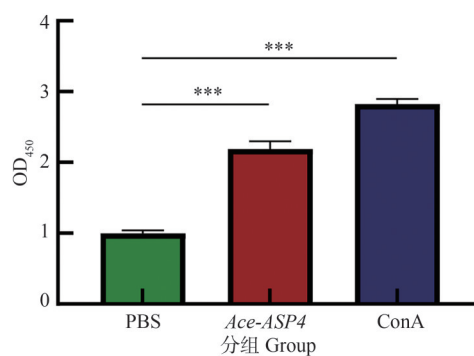
Fig. 3 Identification, expression and purification of Ace-ASP4 recombinant plasmid and results of rASP4 Western blot analysis

2.4 小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力分析

免疫小鼠淋巴细胞增殖试验结果显示: 用 rAce-ASP4 蛋白对小鼠进行免疫后, 淋巴细胞平均刺激指数较对照组显著升高 ($P < 0.01$), 促进了小鼠脾脏淋巴细胞的增殖 (图 4)。

2.6 小鼠血清中抗体水平的检测

用间接 ELISA 法检测 3 组 BALB/c 小鼠免疫后血清中总 IgG、IgG1 和 IgG2a 的水平。结果显示, 与 PBS 组相比, 用重组蛋白免疫小鼠后, 小鼠体内 IgG、IgG1 和 IgG2a 抗体水平均在第 7 天之后显著升高 ($P < 0.05$) (图 5(a)~5(c))。与 25 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组别相比, 50 $\mu\text{g/mL}$ 的重组蛋白剂量组别在第



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. 下同。

图 4 免疫小鼠脾脏淋巴增殖试验结果

Fig. 4 Results of splenic lymphocyte proliferation test in immune mice The same below.

7天和14天能够在小鼠体内产生更高的IgG、IgG1和IgG2a抗体水平($P<0.05$)。在第35天,与25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组别相比,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组蛋白剂量组免疫

小鼠能够引起小鼠体内产生更高的IgG和IgG1抗体水平($P<0.01$);但两者之间产生的IgG2a抗体水平无显著差异($P>0.05$)。

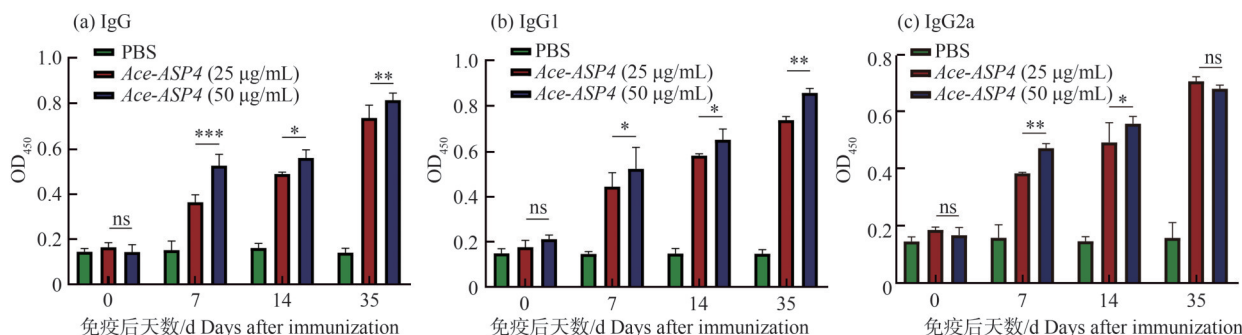


图5 小鼠血清抗rAce-ASP4抗体水平变化

Fig. 5 Changes of serum anti-rAce-ASP4 antibody levels in mice

2.7 ELISA检测小鼠体内细胞因子变化

用Ace-ASP4重组蛋白免疫小鼠后,血清中Th1型细胞因子IFN- γ 和IL-2, Th2型细胞因子IL-4和IL-10水平的变化如图7所示。在第0天,重组蛋白免疫组与PBS对照组相比,小鼠体内产生的

IFN- γ 、IL-2、IL-4和IL-10水平均无显著差异($P>0.05$) (图6(a))。在第35天,与PBS对照组相比,用rAce-ASP4重组蛋白免疫小鼠后其体内的IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10显著升高($P<0.05$) (图6(b))。

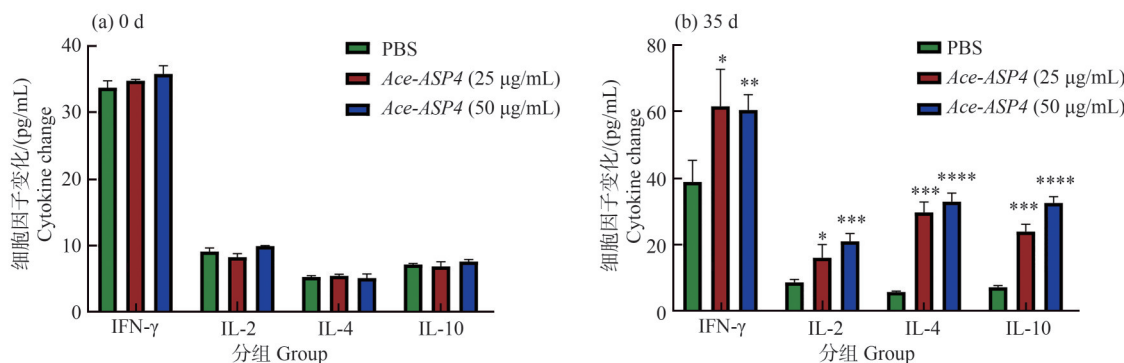


图6 重组蛋白Ace-ASP4免疫小鼠后不同时间对细胞因子分泌水平的影响

Fig. 6 Effects of Ace-ASP4 on cytokine secretion level at different time points after immunization in mice

2.8 rAce-ASP4在小鼠体内诱导的免疫保护效果分析

由表2可知, PBS对照组肺平均虫体数是(55.42 $\pm$ 6.39)条/鼠, 胃肠道平均虫体数是(58.50 $\pm$ 5.90)条/鼠, 肌肉平均虫体数是(50.92 $\pm$ 6.46)条/鼠。与PBS对照组小鼠相比, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组蛋白免疫小鼠在肺中获得52%的减虫率, 差异不显著($P>0.05$), 在胃肠道和肌肉中分别获得46%和61%的减虫率($P<0.05$)的减虫率。

3 讨论

钩虫是一种土源性蠕虫 (Soil-transmitted helminthiasis), 是最易被忽视的人兽共患寄生虫之一^[16]。钩虫病的慢性感染会导致宿主发生腹痛、腹泻、食欲不振、体重减轻和缺铁性贫血等症, 对人类以及猫和狗等伴侣动物的健康构成潜在的威胁^[17]。近年来, 人们越来越关注基于病原体、病原

表 2 rASP4 免疫 BLAB/c 小鼠诱导的免疫保护效果
Table 2 Immune protection induced by rASP4 in BLAB/c mice

组别 Group	器官 Organ	荷虫量 Worm burden	减虫率/% Percent reduction in worm burden
PBS	肺	55.42±6.39	-
	胃肠道	58.50±5.90	-
	肌肉	50.92±6.46	-
Ace-ASP4 (50 μg/mL)	肺	26.83±4.22	52
	胃肠道	31.33±6.15	46
	肌肉	20.08±5.60	61

体-宿主相互作用以及分子和免疫学水平对钩虫疾病的了解,开发新的控制钩虫疾病的方法。寄生虫外表面的分子和排泄/分泌(ES)产物是蠕虫的重要分子^[18]。ES 产物是寄生虫通过口腔或外表面分泌的蛋白质、脂质和碳水化合物的混合物,是蠕虫与其宿主之间交互的主要界面。钩虫的 ES 产物包含多种结构和功能不同的分子,这些分子能与宿主蛋白反应,在寄生虫的生存、发育以及宿主-寄生虫关系中发挥重要作用^[19]。同时,它们在虫体对宿主的渗透、组织迁移、营养、繁殖和逃避宿主免疫等功能中至关重要。这些分子通过抑制炎症反应、促进效应细胞凋亡和扭曲免疫反应表型,帮助寄生虫存活并逃避宿主免疫反应^[20]。

目前,许多钩虫的 ES 产物已被证明是有效的钩虫候选疫苗^[21]。从犬钩虫的排泄/分泌(ES)产物中已识别出 6 种激活相关蛋白(ASP-1 至 ASP-6)^[22-24]。这些钩虫分泌蛋白在寄生虫的宿主选择性、生长发育、入侵与锚定、营养获取、改造宿主环境和免疫逃避中都发挥重要作用^[25]。ASP4 主要由幼虫或成虫在感染初期分泌,虽然其详细的生物学功能尚未完全明了,但研究表明它可能对调节宿主的免疫反应具有重要作用。最近的研究证实,犬钩虫 ASP4 定位于成虫钩虫的角质层表面^[24],这表明它可能在钩虫的皮肤入侵和局部免疫调节中起作用。然而,针对 ASP4 在锡兰钩虫中的位置和功能,还需要进一步研究来揭示其在宿主-寄生虫相互作用中的具体机制。

本研究间接 ELISA 结果显示,Ace-ASP4 能诱导小鼠体内的 IgG 抗体水平显著升高,且随着免疫次数增加,IgG 抗体水平呈上升趋势,推测 Ace-ASP4 在小鼠体内诱导产生的高水平 IgG 抗体可能与其诱导的免疫保护效果有关。与 25 μg/mL 剂量

组相比,50 μg/mL 剂量的 Ace-ASP4 能显著提升小鼠体内的 IgG 抗体水平。这一发现提示,在本研究测试的 2 个剂量下,更高剂量的 Ace-ASP4 可能更有效地促进了 IgG 的产生,这一趋势的普遍性和剂量-反应关系的确定还需要通过进一步的研究来验证。有研究表明 IgG2a 主要激活 Th1 型辅助细胞,而 IgG1 主要促进 Th0 前体细胞向 Th2 细胞转化^[26]。本研究结果显示,仅在 50 μg/mL 重组蛋白的剂量下,小鼠在第 14 天和 35 天体内产生 IgG1 水平显著高于 IgG2a。因此,我们推测 Ace-ASP4 可能诱发小鼠产生以 Th2 型为主、抗锡兰钩虫感染的 Th1/Th2 混合型免疫应答。此外,不同的免疫剂量可能会影响抗体亚型的产生,进而影响 Th1 和 Th2 平衡。于是,在本研究中,对各组别小鼠在第 0 天和第 35 天,对其血清中的 Th1 型细胞因子和 Th2 型细胞因子进行 ELISA 检测。结果显示,不同浓度的 Ace-ASP4 重组蛋白能引起小鼠体内的 IFN-γ、IL-2、IL-4 和 IL-10 水平显著升高,且 Th2 型细胞因子的上升趋势更为显著。本研究结果证明 Ace-ASP4 诱发小鼠产生以 Th2 型为主的免疫应答。

对于未来的研究方向,考虑到不同动物模型可能对免疫原性有不同反应,建议采用多种动物模型进行测试,以更全面地评估 Ace-ASP4 的免疫效果和安全性。此外,探索不同的联合免疫策略,如结合使用免疫佐剂或其他钩虫特异性蛋白,可能会进一步增强免疫效果并提高疫苗的实用性。此外,长期免疫保护的评估对于疫苗研发至关重要。未来研究应关注免疫后数月甚至数年的抗体持续性和记忆免疫细胞的功能。此外,考虑不同的免疫途径,例如黏膜给药,可能有助于优化免疫反应和应答的局部化,这对于肠道寄生虫感染尤

其重要。

4 结 论

本研究克隆了锡兰钩虫 *Ace-ASP4* 基因, 对其编码的氨基酸序列进行了生物信息学分析后, 诱导表达并纯化了 *Ace-ASP4*, 对其免疫学特性进行了初步分析, 以 *ASP4* 蛋白进行小鼠抗锡兰钩虫免疫保护试验, 结果表明 *ASP4* 重组抗原在小鼠体内诱导产生了一定的免疫保护效果, 肺、胃肠道和肌肉减虫率均达到了 45% 以上, 为钩虫病的血清学诊断及钩虫疫苗候选分子的筛选与功能学等研究奠定了基础。

参考文献 References

- [1] Brooker S, Bethony J, Hotez P J. Human hookworm infection in the 21st century[M]. *Advances In Parasitology*, 2004; 197-288
- [2] Loukas A, Hotez P J, Diemert D, Yazdanbakhsh M, McCarthy J S, Correa-Oliveira R, Croese J, Bethony J M. Hookworm infection [J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2016, 2: 16088
- [3] Carroll S M, Grove D I. Experimental infection of humans with *Ancylostoma ceylanicum*: clinical, parasitological, haematological and immunological findings[J]. *Tropical and Geographical Medicine*, 1986, 38(1): 38-45
- [4] Traub R J. *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis [J]. *International Journal for Parasitology*, 2013, 43(12,13): 1009-1015
- [5] Hu W, Yu X G, Wu S, Tan L P, Song M R, Abdulahi A Y, Wang Z, Jiang B, Li G Q. Levels of *Ancylostoma* infections and phylogenetic analysis of *cox 1* gene of *A. ceylanicum* in stray cat faecal samples from Guangzhou, China[J]. *Journal of Helminthology*, 2016, 90(4): 392-397
- [6] Setasuban P, Vajrasthira S, Muennoo C. Prevalence and zoonotic potential of *Ancylostoma ceylanicum* in cats in Thailand [J]. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 1976, 7(4): 534-539
- [7] Traub R J, Inpankaew T, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Thompson R C. PCR-based coprodiagnostic tools reveal dogs as reservoirs of zoonotic ancylostomiasis caused by *Ancylostoma ceylanicum* in temple communities in Bangkok[J]. *Veterinary Parasitology*, 2008, 155(1/2): 67-73
- [8] Scholz T, Uhlirová M, Ditrich O. Helminth parasites of cats from the Vientiane province, Laos, as indicators of the occurrence of causative agents of human parasitoses[J]. *Parasite*, 2003, 10(4): 343-350
- [9] Albonico M, Bickle Q, Ramsan M, Montresor A, Savioli L, Taylor M. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 2003, 81(5): 343-352
- [10] Cantacessi C, Campbell B E, Visser A, Geldhof P, Nolan M J, Nisbet A J, Matthews J B, Loukas A, Hofmann A, Otranto D, Sternberg P W, Gasser R B. A portrait of the "SCP/TAPS" proteins of eukaryotes: developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 376-388
- [11] Ghosh K, Hawdon J, Hotez P. Vaccination with alum-precipitated recombinant *Ancylostoma*-secreted protein 1 protects mice against challenge infections with infective hookworm (*Ancylostoma caninum*) larvae[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1996, 174(6): 1380-1383
- [12] Loukas A, Bethony J M, Mendez S, Fujiwara R T, Goud G N, Ranjit N, Zhan B, Jones K, Bottazzi M E, Hotez P J. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs[J]. *PLoS Medicine*, 2005, 2(10): e295
- [13] Sen L, Ghosh K, Bin Z, Qiang S, Thompson M G, Hawdon J M, Koski R A, Shuhua X, Hotez P J. Hookworm burden reductions in BALB/c mice vaccinated with recombinant *Ancylostoma* secreted proteins (ASPs) from *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma caninum* and *Necator americanus*[J]. *Vaccine*, 2000, 18(11-12): 1096-1102
- [14] Siwińska A M, Bąska P, Daniłowicz-Luebert E, Januszkiewicz K, Długosz E, Wędrychowicz H, Cappello M, Wiśniewski M. Cloning and molecular characterization of cDNAs encoding three *Ancylostoma ceylanicum* secreted proteins[J]. *Acta Parasitol*, 2013, 58(1): 112-118
- [15] Wiśniewski M, Łapiński M, Daniłowicz-Luebert E, Jaros S, Długosz E, Wędrychowicz H. Vaccination with a cocktail of *Ancylostoma ceylanicum* recombinant antigens leads to worm burden reduction in hamsters [J]. *Acta Parasitol*, 2016, 61(3): 556-561
- [16] Bottazzi M E. The human hookworm vaccine: recent updates and prospects for success [J]. *Journal of Helminthology*, 2015, 89(5): 540-544
- [17] Hewitson J P, Grainger J R, Maizels R M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2009, 167(1): 1-11
- [18] Pearson M S, Tribollet L, Cantacessi C, Periago M V, Valero M A, Jariwala A R, Hotez P, Diemert D, Loukas A, Bethony J. Molecular mechanisms of hookworm disease: stealth, virulence, and vaccines [J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2012, 130(1): 13-21
- [19] Loukas A, Prociv P. Immune responses in hookworm infections [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4): 689-703
- [20] Chen C C, Louie S, McCormick B A, Walker W A, Shi H N. Helminth-primed dendritic cells alter the host response to enteric bacterial infection [J]. *Journal of Immunology*, 2006, 176(1): 472-483
- [21] Hawdon J M, Jones B F, Hoffman D R, Hotez P J. Cloning and characterization of *Ancylostoma*-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(12): 6672-6678
- [22] Hawdon J M, Narasimhan S, Hotez P J. *Ancylostoma* secreted protein 2: Cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999, 99(2): 149-165
- [23] Zhan B, Liu Y, Badamchian M, Williamson A, Feng J, Loukas A, Hawdon J M, Hotez P J. Molecular characterisation of the *Ancylostoma*-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2003, 33(9): 897-907
- [24] Van Loon L C, Van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, 55(2): 85-97
- [25] 杨妙贤, 黄灏, 黄一诺, 吕志跃. 天冬氨酸蛋白酶与寄生虫[J]. 热带医学杂志, 2019, 19(7): 932-936
- Yang M X, Huang H, Huang Y N, Lu Z Y. Aspartic proteases and

- parasites[J]. *Journal of Tropical medicine*, 2019, 19(7): 932-936
- [26] Finkelman F D, Holmes J, Katona I M, Urban J F, Beckmann Jr M P, Park L S, Schooley K A, Coffman R L, Mosmann T R, Paul W E.

Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection [J]. *Annual Review of Immunology*, 1990, 8: 303-333

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 聂林冲, 硕士研究生。本科就读于宜春学院, 研究生就读于华南农业大学, 专业为兽医学, 主要是寄生虫方向。在本科期间认真学习专业知识, 取得了不错的成绩, 并顺利通过四级考试, 普通话水平测试等。研一期间获得华南农业大学三等奖学金。通过本科及研究生目前阶段的学习, 已初步具备分析数据, 科研绘图, 阅读文献等能力。



通讯作者简介: 袁子国, 博士生导师, 现为华南农业大学教授。广东省千百十“省级”培养对象, 广州市首批“珠江科技新星”获得者。广东省寄生虫学会理事、广东省畜牧兽医学会会员、广东省免疫学会会员, 中国畜牧兽医学会兽医寄生虫学分会会员。目前从事野生动物病毒遗传进化和肠道寄生虫适应性的机制、病原跨越血脑屏障的机制、弓形虫抗猪病毒病免疫调控及寄生虫抗肿瘤发展等机理的研究, 同时课题组也从事野生动物病毒检测方法、临床寄生虫的检测方法、免疫制剂和临床抗寄生虫药效评价等应用的研究。入选国家科技特派团专家团队, 担任国家科技部“国家重点研发计划政府间重点专项项目”评审专家, 中组部“青年拔尖人才支持计划”项目的评审专家; “国家自然科学基金项目”评审专家, “国家留学基金委公派研究生留学项目和访学项目”评审专家, “广东省自然科学基金项目”评审专家, “广东省农业厅产业园项目”评审专家、“广东省兽药 GMP”现场评审专家等; 申报发明专利 16 项, 授权专利 6 项; 软件著作权 4 项; 实用新型专利 1 项。制订“猪场伪狂犬病净化方案”及“猪场寄生虫综合防控方案”等企业标准 6 项; 参编教材《新编人兽共患病学》《兽医寄生虫学·第九版》《兽医寄生虫学·案例版》《弓形虫病学》, 参译《兽医寄生虫》论著。参加了中国动物卫生与流行病学中心组织的国际动物卫生法典和手册的翻译工作(负责寄生虫章节)。担任中国畜牧兽医学会兽医寄生虫分会理事、广东省寄生虫学会理事、广东省健康科普促进会生物安全分会委员。