

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.03.009

犬弓首蛔虫 *Tc*-PEBP 的 分子特性及组织表达分析

李芳, 陈绍基, 谭纯, 梅四鹏, 贾红菓, 周荣琼

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为研究犬弓首蛔虫 *Toxocara canis* 磷脂酰乙醇胺结合蛋白(*Tc-pebp*)基因的分子特性, 本试验根据 *Tc-pebp* 基因的编码序列(GenBank No: AAC46843.1)设计引物, 克隆、鉴定 *Tc-pebp* 全长基因, 并进行多重序列比对和种系发育进化树分析; 采用 qRT-PCR 检测 *Tc-pebp* 基因在雌、雄虫中的组织差异表达。结果显示 *Tc-pebp* 全长基因为 789 bp, 共编码 262 个氨基酸; 功能结构域显示 *Tc*-PEBP 蛋白包含 1 个 PBP 保守结构域(第 123~257 位)和 2 个 ShKT 结构域(第 22~58 位、第 59~94 位)。多重序列比对分析表明 *Tc*-PEBP 蛋白的氨基酸序列与贝拉中杆线虫、秀丽隐杆线虫、异尖线虫和猪蛔虫均具有 PBP 保守结构域。种系发育分析发现 *Tc*-PEBP 与贝拉中杆线虫进化关系较近。组织差异表达分析发现 *Tc-pebp* 基因在雌虫各组织中均有较高水平的表达; 其中卵巢的表达量最高, 表明 *Tc-pebp* 基因可能参与了 *T. canis* 的繁殖和发育过程。

关键词: 犬弓首蛔虫; *Tc-pebp* 基因; 分子特性; 转录分析

中图分类号: S852.7

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2022)03-0075-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Molecular Characterization and Tissue Transcription Analysis of Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein of *Toxocara canis*

LI Fang, CHEN Shaoji, TAN Chun,

MEI Sipeng, JIA Hongguo, ZHOU Rongqiong

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: To study the molecular characteristics of *Toxocaracanis* phosphatidylethanolamine binding protein (*Tc*-PEBP), primers were designed according to the coding sequence of *Tc-pebp* (GenBank No: AAC46843.1) to clone and identify the full-length of *Tc-pebp* gene. The multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis were analyzed. qRT-PCR was used to measure the differential transcription levels of *Tc-pebp* in tissues of male and female adult worms. The results showed that the full-length se-

收稿日期: 2021-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672541, 31172313).

作者简介: 李芳, 硕士研究生, 主要从事寄生虫分子生物学研究。

通信作者: 周荣琼, 教授。

quence of phosphatidylethanolamine binding protein gene of *T. canis* (*Tc-pebp*) was 789 bp, which encoded a 262-amino-acid polypeptide. Functional domain analysis indicated that the *Tc*-PEBP protein contained a conserved PBP domain (aa 123-257) and two ShKT domains (aa 22-58 and aa 59-94). Multiple alignment analysis revealed that the amino acid sequence predicted from *Tc-pebp* shared a conserved PBP domain with that of sequence in *Ascaris suum*, *Caenorhabditis elegans*, *Mesorhabditis belari*, and *Anisakis simplex*. Phylogenetic analysis suggested *Tc*-PEBP was closely related to the sequence of PEBP of *M. belari*. Tissue expression analysis revealed that the high transcription level of *Tc-pebp* was detected in tissues of the female adult worm, particularly in the ovary of the female adult worm, indicating that *Tc-pebp* may be involved in the reproduction and development of *T. canis*.

Key words: *Toxocara canis*; *Tc-pebp* gene; molecular characteristics; transcription analysis

犬弓首蛔虫 *Toxocara canis* 是一种寄生在犬及犬科动物小肠内的寄生虫,其感染性虫卵或幼虫是弓首蛔虫病(Toxocariasis)的病原体^[1]. 弓首蛔虫病是一种人兽共患寄生虫病,人和其他哺乳动物主要通过意外摄入含有 *T. canis* 感染性幼虫或虫卵的食物而感染^[2]. 作为非特异性宿主,人感染后感染性虫卵可以在小肠内发育成为 L2 幼虫,但不能发育为成虫, L2 幼虫穿过宿主小肠壁黏膜,通过循环系统移行进入机体肺脏、肝脏、肌肉和大脑等各种器官、组织中,造成器官和组织的损伤,引发宿主的免疫和炎症反应^[3-4],从而出现不同的临床症状,如隐性弓首蛔虫病(covert toxocariasis, CT)、神经弓首蛔虫病(neurological toxocariasis, NT)、内脏幼虫移行症(visceral larva migrans, VLM)及眼睛幼虫移行症(ocular larva migrans, OLM)等^[5-6],严重危害人类的身体健康.

磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP)是一个高度保守的多功能碱性胞质蛋白,其表面具有一个狭窄的空腔,是重要的配体结合位点,可结合膜磷脂、核苷酸、三磷酸腺苷等多种物质,参与维持细胞稳态,调节细胞分化、迁移和黏附等多种生物学功能^[7-9]. 在寄生虫中,磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)可参与细胞的生长、发育、繁殖和信号传导等. 如寄生恶性疟原虫 PEBP 能促进虫体的生长、发育和繁殖等^[10-11]; 肝片吸虫磷脂酰乙醇胺结合蛋白通过与 CD14 受体进行结合来抑制 p38 蛋白、细胞外调节蛋白激酶(ERK)和应激活化蛋白激酶(JNK)的磷酸化,从而抑制 LPS 诱导的炎症反应,具有免疫调节特性^[12]. 犬弓首蛔虫磷脂酰乙醇胺结合蛋白(*Tc*-PEBP)的研究未见报道,本研究通过克隆、鉴定 *Tc-pebp* 全长基因,采用 qRT-PCR 技术对犬弓首蛔虫各组织进行转录差异水平分析,以期探讨 *Tc*-PEBP 蛋白的功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 犬弓首蛔虫样本

犬弓首蛔虫虫体样本采自西南大学动物医学院动物医院某患病犬. 虫体用 37 °C 灭菌的生理盐水洗涤去除杂质后,经形态学鉴定,将成熟的 *T. canis* 雌虫卵巢进行解剖,收集虫卵,在 37 °C 培养箱中培养 3~4 周后,虫卵发育为 L2 期幼虫^[13].

1.1.2 主要试剂

DH5 α 、EasyPure ©胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech(全式金)公司; T-Vector pMD19(simple)、PrimeScript™ 反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen(赛默飞)公司.

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与反转录

通过形态学和分子生物学的方法对雌、雄虫进行鉴定,解剖和分离雌、雄虫的肠道,肌肉,体壁,

生殖道等各个组织. 取出液氮提前预冷研钵, 分别加入雌、雄虫体各组织和 L2 幼虫, 在液氮中充分研磨成粉末. 取研磨好的粉末放入无 RNA 酶离心管中, 使用传统的 Trizol 法分别提取犬弓首蛔虫成虫、L2 期幼虫及各组织的 RNA; 采用 Eppendorf 核酸蛋白测定仪检测得到总 RNA 的浓度和纯度. 以提取的 *T. canis* 及各组织的总 RNA 为模板, 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录试剂盒说明书来反转录合成 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.2.2 *Tc-pebp* 基因的克隆及分析

(1) 引物的设计与合成

根据 *Tc*-PEBP 全长基因序列 (GenBank No: AAC46843.1), 用 Primer Premier 6.0 和 Primer-BLAST 软件设计基因特异性引物并克隆其完整编码序列. 引物序列信息为 F: 5'-TTAGGCCT-GCGATCGATAGAA-3'; 5'-AAGATAGCTAGCGTCCGGATT-3'. 引物序列送擎科兴业生物技术有限公司(重庆)进行合成.

(2) *Tc-pebp* 基因的 PCR 扩增

以反转录合成的 *T. canis* 成虫及 L2 期幼虫的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增. 扩增体系为 50 μL : 上、下游引物(10 μM)各 1 μL ; Mg^{2+} (25 mM) 5 μL ; 10 \times PCR buffer(不含 Mg^{2+}) 4.0 μL ; dNTPs(2.5 mM) 4 μL ; 模板(cDNA) 2 μL ; r \times Taq 酶(5 U/ μL) 1 μL ; dd H₂O 32.0 μL [14].

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 扩增产物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

(3) 克隆及测序

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 按照 EasyPure © 胶回收试剂盒说明书对目的 PCR 产物进行回收. 将回收得到的目的基因片段与 pMD19-T(simple) 载体进行连接, 并转化至 DH5 α 感受态细胞中. 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 的条件下震荡培养 60~90 min, 培养结束后使用“L”型涂菌棒涂布于 LB/Amp⁺ 固体培养基上(含有 X-Gal 和 IPTG), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置 30 min 后倒置, 过夜培养 12~16 h. 培养结束后, 在平板上用接种环挑取单个白色菌落于含有 900 μL LB/Amp⁺ 液体培养基的 EP 管中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 的摇床中过夜培养 14~16 h.

(4) 序列分析

重组菌液经 PCR 鉴定为阳性菌液的, 将其送至擎科兴业生物技术有限公司(重庆)进行测序. 将测序结果通过生物大分子序列比对搜索工具(BLAST)进行同源性比对; 登录美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站查找 *Tc*-PEBP 蛋白序列, 并使用 MAFFT, Clustal Omega 和 MUSCLE 等软件对 *Tc-pebp* 基因进行多重序列比较, 通过使用 MEGA 7.0 软件中的邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)来对 *Tc*-PEBP 蛋白序列进行系统发育进化树的构建, 用 Bootstrap 对进化树的可靠性进行分析, 共 1 000 个重复; 并使用蛋白数据库 SMART、PORTER 和 I-TASSER 等软件预测 *Tc*-PEBP 蛋白的二级结构和功能结构域.

1.2.3 *Tc-pebp* 基因的组织表达分析

根据 *T. canis* 基因组数据 (GenBank: AAC46843.1), 用 Primer Premier (Version 6.0) 软件设计特异性引物并克隆其完整编码序列, 引物序列信息为 F: 5'-CGCATGTCAGTTGTACACAAA-3', R: 5'-GGTTAGGCCTGCGATCGATAGAA-3'. 以 18S 1: 5'-AAAGGGCAGGGACGTAGTCAA-3'; 18S 2: 5'-AATTGTTGGTCTTCAACGAGGA-3' 作为内参基因 [15]. 引物序列由擎科兴业生物技术有限公司(重庆)合成.

以雌、雄虫的肌肉、体壁、肠道及生殖道等各组织的 cDNA 为模板, 分别用 *Tc*-PEBP 和 18S rRNA 引物进行实时荧光定量 PCR. 反应体系为 50 μL : 包括 25 μL 的 SYBR Premix Ex Taq I; 4 μL 的 cDNA; 上、下游引物各 2.0 μL ; 17 μL 的 ddH₂O. PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 32 s, 共 40 个循环, 循环结束后收集数据进行分析.

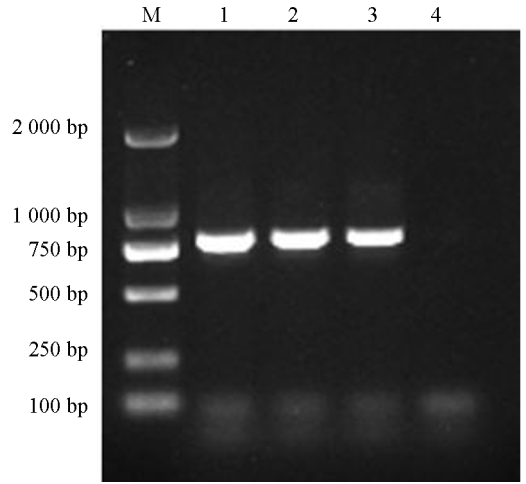
2 结果与分析

2.1 *Tc-pebp* 基因的克隆及鉴定

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, *Tc-pebp* 在约 800 bp 处可见相应条带, 与理论大小相符; 阴性对照没有条带出现(图 1)。将测序获得的碱基序列进行分析, 结果显示 *Tc-pebp* 基因的完整编码区序列为 789 bp, 该序列含有一个完整编码区, 共编码 262 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量为 2.6×10^4 , 功能结构域分析结果显示 1~20 个氨基酸为信号肽, 第 22~58 位、第 59~94 位为 2 个重复的 ShKT 结构域, 第 123~257 位有 PBP 保守结构域(图 2)。

2.2 多重序列比对及种系发育分析

通过 WormBase ParaSite^[16] 和 GenBank 检索, 将 *Tc-PEBP* 蛋白氨基酸序列与 4 个线虫的 PEBP 蛋白氨基酸序列进行多重序列比对。这些序列分别是猪蛔虫 *Ascaris suum* (GenBank No. AEUI03000057.1)、贝拉中杆线虫 *Mesorhabditis belari* (GenBank No. UZWA01000301.1)、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (GenBank No. NP_001300105.1)、异尖线虫 *Anisakis simplex* (GenBank No. UYRR01001265.1), 结果发现均具有 PBP 保守结构域(图 3)。



M: 2 000 bp DNA 相对分子质量标准;
1. 雄虫; 2. 雌虫; 3. L2 期幼虫; 4. 阴性对照。

图 1 *Tc-pebp* 基因的 PCR 扩增结果

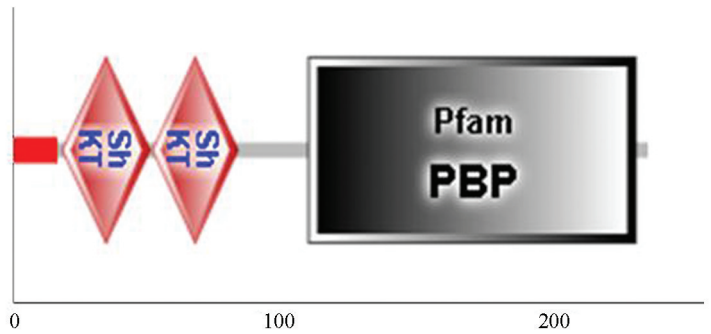


图 2 *Tc-PEBP* 蛋白的结构域预测

	ShKT	ShKT	
<i>T.canis</i>	MSVVHKA... QCMDSASDC ... CRDEANNC ... RCOKTCGLG ...GCGGIS	MSVVHKA... QCMDSASDC ... CRDEANNC ... RCOKTCGLG ...GCGGIS	100
<i>A.suum</i>MSIGLISRPLTTYLLASSRLLVQN.....LRLCSGMS...ADAFKK	41
<i>M.belari</i>MLPSNQSALFSLCTSILLLCVSGAG.....LDSGIS	31
<i>C.elegans</i>MISHRMVVLVTRSLLPALFFASRAPFAAATT.....SARFQRLATHAAEAFTK	49
<i>A.simplex</i>MA...ASEAFQK	9
Consensus		PBP	
<i>T.canis</i>	SGIVPDLVVT.SAPSRRVSVTFANVQVNCGNLTITACVANCFTVTUEAQPNDRYTLIHVDPDFPSAANGQQGQRLHUUVINIPGNNIAGETTAAAFQPST	SGIVPDLVVT.SAPSRRVSVTFANVQVNCGNLTITACVANCFTVTUEAQPNDRYTLIHVDPDFPSAANGQQGQRLHUUVINIPGNNIAGETTAAAFQPST	199
<i>A.suum</i>	HGVVDPVWP.NGPSKLVKAVFDGVEVDCGNLITPTQVKNPKVSDAEPGVLYTLINTDDPAPSRETTPKFRWHHLITNIPGNDISKGEVLSEYISSA	HGVVDPVWP.NGPSKLVKAVFDGVEVDCGNLITPTQVKNPKVSDAEPGVLYTLINTDDPAPSRETTPKFRWHHLITNIPGNDISKGEVLSEYISSA	140
<i>M.belari</i>	SGIVPDLVVT.SPPQSVLQNTYNGLTVNFGNELSRQCHNRFPSVWADPNLSYTLIFDDPAPSRANPTSRFRHVVVWVNIIPGNVTCQGEVAGYRPAQ	SGIVPDLVVT.SPPQSVLQNTYNGLTVNFGNELSRQCHNRFPSVWADPNLSYTLIFDDPAPSRANPTSRFRHVVVWVNIIPGNVTCQGEVAGYRPAQ	130
<i>C.elegans</i>	HEVIPDLVLSNPPSKVSVKFNQVGEANLGNLITPTQVKTPEVYRDAEPGALYTLIKDDPAPSRRKPTREWHHLVWVNIIPGNDIAKGDITLSEYIGAG	HEVIPDLVLSNPPSKVSVKFNQVGEANLGNLITPTQVKTPEVYRDAEPGALYTLIKDDPAPSRRKPTREWHHLVWVNIIPGNDIAKGDITLSEYIGAG	149
<i>A.simplex</i>	HQVVPDVS.KGPSKLVKAVFDGVEVDCGNLITPTQVKNPKVSDAEGQVLYTLINTDDPAPSRRKDPKFRWHHLITNIPGNDISKGEVLSEYISSA	HQVVPDVS.KGPSKLVKAVFDGVEVDCGNLITPTQVKNPKVSDAEGQVLYTLINTDDPAPSRRKDPKFRWHHLITNIPGNDISKGEVLSEYISSA	108
Consensus	p v p	gn l q p v a y r r a p a p s n s n p g n y	
<i>T.canis</i>	PAANTGLHRYVFLVYKCPAAINSPLLNLLVQDSELRFCGTTAATQFNLGSPYAGNFRSQA.....	PAANTGLHRYVFLVYKCPAAINSPLLNLLVQDSELRFCGTTAATQFNLGSPYAGNFRSQA.....	262
<i>A.suum</i>	PPNTGLHRYVFLVYKCSGKVSDEPHGLPGNSGKRRGCFKAAEFKKNLGDPIAGNFQAEYDDVYVEVYKLG.....	PPNTGLHRYVFLVYKCSGKVSDEPHGLPGNSGKRRGCFKAAEFKKNLGDPIAGNFQAEYDDVYVEVYKLG.....	216
<i>M.belari</i>	PQGSGLHRYVFLVYKQNRKIDAGFN.TPSKSTDRPFPNTINGAQQKQTLVAGNLFQGEFGLANTKCCKNESGLARTRAEFESVLQNKSPVLKNKS	PQGSGLHRYVFLVYKQNRKIDAGFN.TPSKSTDRPFPNTINGAQQKQTLVAGNLFQGEFGLANTKCCKNESGLARTRAEFESVLQNKSPVLKNKS	228
<i>C.elegans</i>	PPPKTGLHRYVFLVYKCSGRIEDAEGRLTNTSGDRGGVKAADQVAKHRLGAPVFGNLQAEYDDVYVILNRQLGA.....	PPPKTGLHRYVFLVYKCSGRIEDAEGRLTNTSGDRGGVKAADQVAKHRLGAPVFGNLQAEYDDVYVILNRQLGA.....	226
<i>A.simplex</i>	PPPDGLHRYVFLVYKCSGKVSDEPAHGHLPGNSGDRGGCFKAAEFKKNLGDPIVAGNLQVRF.FAHHYFRILE.....	PPPDGLHRYVFLVYKCSGKVSDEPAHGHLPGNSGDRGGCFKAAEFKKNLGDPIVAGNLQVRF.FAHHYFRILE.....	182
Consensus	p g n r y l y q	l g l l	
<i>T.canis</i>	262
<i>A.suum</i>	216
<i>M.belari</i>	QSLARTRVRSCKNKSPV	245
<i>C.elegans</i>	226
<i>A.simplex</i>	182
Consensus			

图 3 *Tc-PEBP* 蛋白氨基酸序列多重比对

将 *Tc-pebp* 编码的氨基酸序列与通过 WormBase ParaSite^[16] 和 GenBank 收录的十二指肠钩虫 *Ancylostoma duodenale* (GenBank No. KIH55180.1)、猪蛔虫 *A. suum* (GenBank No. AEUI03000057.1)、秀丽隐杆线虫 *C. elegans* (GenBank No. NP_001300105.1)、有齿食道口线虫 *Oesophagostomum dentatum* (GenBank No. KHJ93726.1)、贝拉中杆线虫 *M. belari* (GenBank No. UZWA01000301.1)、异尖线虫 *A. simplex* (GenBank No. UYRR01001265.1)、中华按蚊 *Anopheles sinensis* (GenBank No. KFB38652.1)、家蝇 *Musca domestica* (GenBank No. AFP60570.1)、环纹背带线虫 *Teladorsagia circumcincta* (GenBank No. PIO76166.1)、致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (GenBank No. EDS31592.1)、锡兰钩虫 *Ancylostoma ceylanicum* (GenBank No. EPB80812.1)、毛首鞭形线虫 *Trichuris trichiura* (GenBank No. CDW52734.1) 和猪鞭虫 *Trichuris suis* (GenBank No. KHJ46160.1) 进行多重序列比对并构建进化树, 结果发现 *Tc*-PEBP 与贝拉中杆线虫 *M. belari* (GenBank No. PRJEB30104) 形成一个单独的分支, 其进化关系较近(图 4)。

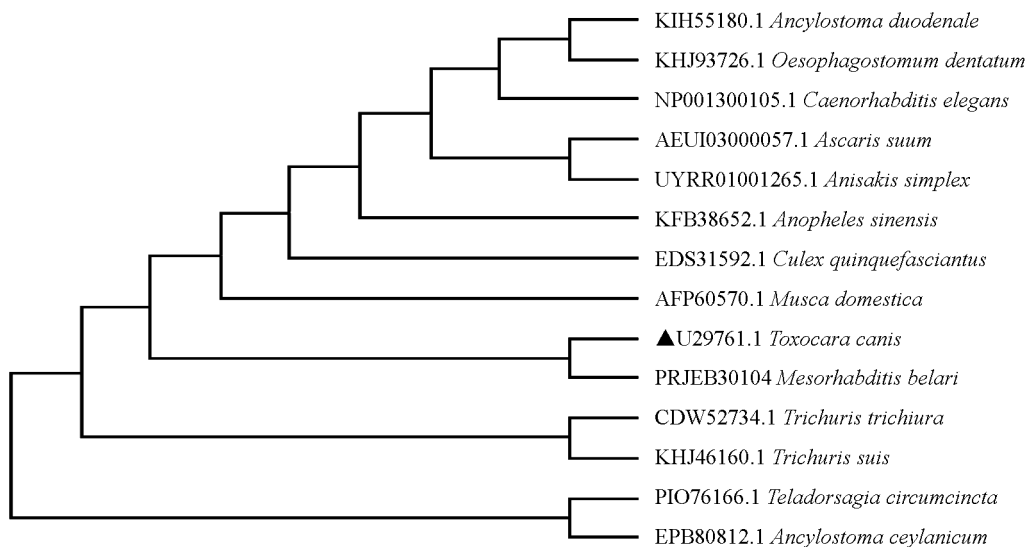
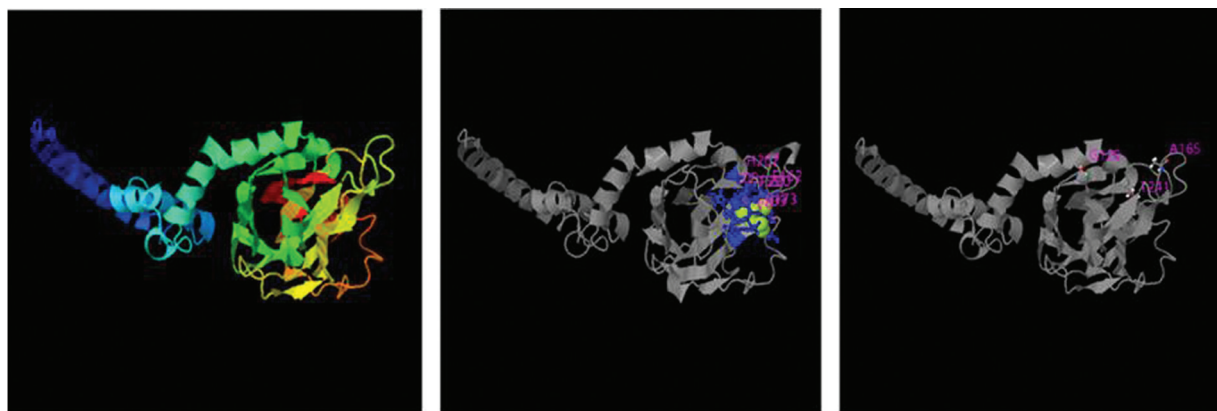


图 4 *Tc-pebp* 编码氨基酸序列的系统发育关系分析

2.3 结构及功能预测

利用 I-TASSER 构建 *Tc*-PEBP 蛋白的三维空间, 其 TM 最高值为 0.69 ± 0.12 , 标准差为 $6.3 \pm 3.8 \text{ \AA}$ (图 5a)。根据 I-TASSER 显示的空间结构及功能注释, 发现 *Tc*-PEBP 蛋白的结合位点为 D159, F162, R173, H175, S198, T199, P200, H207 和 Y209 (图 5b)。酶活性位点为 G129, A165 和 T241 (图 5c)。基因本体论注释表明 *Tc*-PEBP 蛋白的分子功能为结合磷脂酰乙醇胺 (GO: 0008429), 生物学过程为调控有丝分裂 (GO: 0045840) 和蛋白磷酸化 (GO: 0001933), 细胞组分为粗面内质网的必要组分 (GO: 0005791)。



a. *Tc*-PEBP 蛋白模型的构建

b. 配体结合位点预测

c. 活性位点预测

图 5 *Tc*-PEBP 蛋白的结构和功能预测

2.4 *Tc-pebp* 的组织差异表达

使用 18S rRNA 引物作为内参基因,对 *T. canis* 雌、雄虫的肌肉、体壁、肠道及生殖道等各个组织中 *Tc-pebp* 基因的转录水平进行分析,结果发现在雌虫的卵巢、输卵管、子宫、体壁、肠道和肌肉中均检测到 *Tc-pebp* 基因的表达,其中卵巢的转录水平最高,其次是输卵管,肌肉最低(图 6a);雄虫的 *Tc-pebp* 基因在肠道中表达量最高,在贮精囊中转录水平较低(图 6b)。

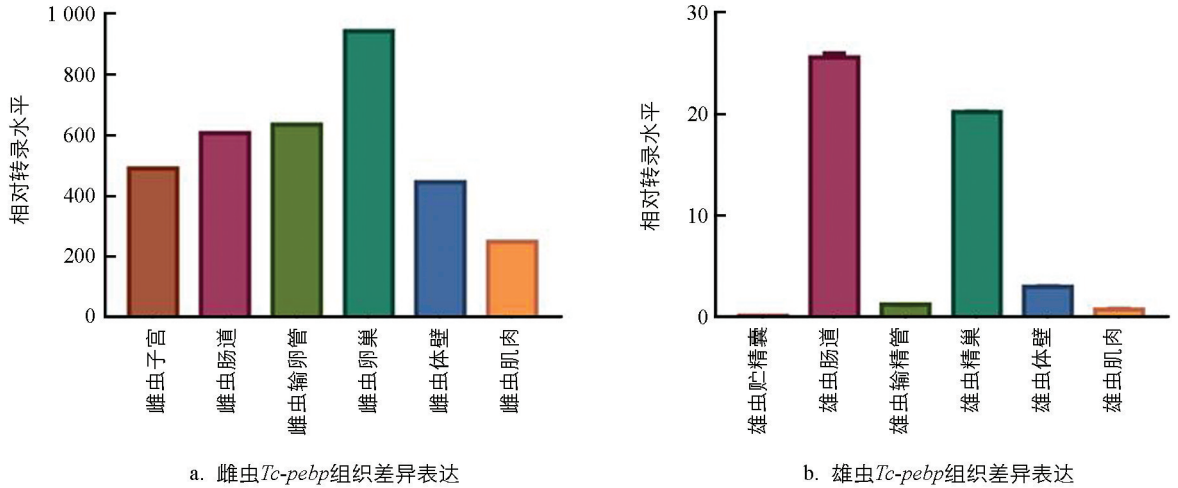


图 6 犬弓首蛔虫 *Tc-pebp* 组织差异表达分析

3 结语

磷脂酰乙醇结合蛋白(PEBP)在许多生理和病理过程中有着重要的作用.如在哺乳动物体内,PEBP 作为一种内源性 Raf-1 激酶抑制蛋白,可通过抑制细胞外调节蛋白激酶(ERK)通路的激活并与核转录因子- κ B(NF- κ B)上游信号分子进行结合,从而参与细胞的增殖、迁移、分化和机体的免疫防御反应等^[17-19].在植物体内,PEBP 蛋白能够长距离运输,在顶端分生组织中诱导植物的开花并调控植物的生长发育^[20-22].在昆虫体内,PEBP 可抵御外界微生物的入侵,被证明与昆虫的先天免疫防御有关^[23].

本研究发现, *Tc*-PEBP 具有 ShKT 结构域(ShKT domain)和 PBP 结构域(PBP domain)(图 3). ShKT 结构域由 6 个保守的半胱氨酸(SXC)组成,能够促进其他分泌蛋白如黏蛋白的形成和聚合,参与寄生虫的免疫逃避^[24].多重序列比对显示, *Tc*-PEBP 与猪蛔虫 *A. suum*、秀丽隐杆线虫 *C. elegans*、贝拉中杆线虫 *M. belari*、异尖线虫 *A. simplex* 等均具有保守的 PBP 结构域,但 N,C 末端的保守性较差,这可能与不同物种与小分子物质结合有关^[25]. PEBP 可通过与膜结合对脂质进行转运^[26],而 *T. canis* 中 PEBP 的结构和功能预测显示 *Tc*-PEBP 在脂质运输中具有一定的作用,这为今后 *Tc*-PEBP 的功能研究奠定了基础.

磷脂酰乙醇胺结合蛋白在寄生虫的生长、繁殖和胚胎发育过程中发挥着重要作用.在秀丽隐杆线虫中 PEBP 存在于虫体的肌肉、体壁、阴道等部位,推测其参与早期虫体的生长发育及外阴形态的发生^[27].在曼氏血吸虫中,磷脂酰乙醇胺结合蛋白分布于雌虫子宫、卵巢、输卵管等部位,表明其与虫体的发育繁殖有关^[28];在猪蛔虫体内,磷脂酰乙醇胺结合蛋白存在于雌虫的子宫、卵巢等生殖组织中,参与维持胚胎的稳态发育^[29-31].在本试验中,qRT-PCR 结果显示雌虫体内 *Tc-pebp* 在卵巢中大量表达,说明 *Tc-pebp* 参与了 *T. canis* 雌虫的繁殖过程.此外,在 *T. canis* 雌、雄虫肠道中均检测到 *Tc-pebp* 的表达. Gobert 等^[32]在日本血吸虫体内发现磷脂酰乙醇胺结合蛋白也存在于成虫肠道中,主要起摄取、运输宿主体内脂质的作用,而 *Tc-pebp* 是否参与对虫体脂质的摄取、运输过程,有待后续进一步研究.

参考文献:

- [1] OVERGAAUW P A M, VAN ZUTPHEN L, HOEK D, et al. Zoonotic Parasites in Fecal Samples and Fur from Dogs and Cats in the Netherlands [J]. *Veterinary Parasitology*, 2009, 163(1/2): 115-122.
- [2] CHEN J, LIU Q, LIU G H, et al. Toxocariasis: a Silent Threat with a Progressive Public Health Impact [J]. *Infectious Diseases of Poverty*, 2018, 7(1): 1-13.
- [3] PAWLOWSKI Z. Toxocariasis in Humans: Clinical Expression and Treatment Dilemma [J]. *Journal of Helminthology*, 2001, 75(4): 299-305.
- [4] RUBINSKY-ELEFANT G, HIRATA C E, YAMAMOTO J H, et al. Human Toxocariasis: Diagnosis, Worldwide Seroprevalences and Clinical Expression of the Systemic and Ocular Forms [J]. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2010, 104(1): 3-23.
- [5] FINSTERER J, AUER H. Asymptomatic Neurocysticercosis over 15 Years Between Transitory Ischemic Attack as Initial and Epilepsy as Second Manifestation [J]. *Acta Neurologica Belgica*, 2013, 113(2): 203-204.
- [6] NICOLETTI A. Toxocariasis [M] // *Neuroparasitology and Tropical Neurology*. Amsterdam: Elsevier, 2013.
- [7] TANG H H, PARK S, SUN S C, et al. RKIP Inhibits NF- κ B in Cancer Cells by Regulating Upstream Signaling Components of the I κ B Kinase Complex [J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(4): 662-668.
- [8] YEUNG K C, ROSE D W, DHILLON A S, et al. Raf Kinase Inhibitor Protein Interacts with NF-kappaB-Inducing Kinase and TAK1 and Inhibits NF-kappaB Activation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(21): 7207-7217.
- [9] KROSLAK T, KOCH T, KAHL E, et al. Human Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Protein Facilitates Heterotrimeric G Protein-Dependent Signaling [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(43): 39772-39778.
- [10] 郭杨, 陈立新, 姜海鹏, 等. 大豆胞囊线虫病抗性候选基因 GmPEBP4-1 克隆及表达分析 [J]. *东北农业大学学报*, 2020, 50(10): 10-19.
- [11] TROTTEIN F, COWMAN A F. The Primary Structure of a Putative Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Protein from *Plasmodium falciparum* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995, 70(1/2): 235-239.
- [12] FIGUEROA-SANTIAGO O, ESPINO A M. *Fasciola hepatica* Fatty Acid Binding Protein Induces the Alternative Activation of Human Macrophages [J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(12): 5005-5012.
- [13] 江艾耘, 李芳, 陈绍基, 等. 犬弓首蛔虫 MUC-1 基因的克隆及序列分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(3): 81-87.
- [14] 黄汉成, 江艾耘, 罗永莉, 等. 犬弓首蛔虫 *abcg-5* 基因的克隆及序列分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(3): 23-29.
- [15] 罗永莉, 朱宏宏, 江艾耘, 等. 犬弓首蛔虫卵黄原蛋白 DUF1943 结构域的克隆及原核表达 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2018, 40(1): 15-20.
- [16] HOWE K L, BOLT B J, SHAFIE M, et al. WormBase ParaSite -a Comprehensive Resource for Helminth Genomics [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2017, 215(7): 2-10.
- [17] BIAN J M, WU N, SU R B, et al. Opioid Receptor Trafficking and Signaling: What Happens after Opioid Receptor Activation? [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2012, 32(2): 167-184.
- [18] GAO Y L, ZHONG J, JIANG L. Raf Kinase Inhibitor Protein Protects Microglial Cells Against 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Induced Neuroinflammation in Vitro [J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 372(2): 108-117.
- [19] LIU R P, ZOU M, WANG J Y, et al. Paroxetine Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Microglia Activation via Differential Regulation of MAPK Signaling [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2014, 11(1): 36-47.
- [20] SU L, ZHANG R, CHEN Y, et al. Raf Kinase Inhibitor Protein Attenuates Ischemic-Induced Microglia Cell Apoptosis and Activation through NF- κ B Pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 41(3): 1125-1134.
- [21] ZHAO S, WEI Y, PANG H, et al. Genome-Wide Identification of the PEBP Genes in Pears and the Putative Role of PBFT in Flower Bud Differentiation [J]. *PeerJ*, 2020, 8(7): e8928.
- [22] JIN S, NASIM Z, SUSILA H, et al. Evolution and Functional Diversification of Flowering Locus T/Terminal Flower 1

- Family Genes in Plants [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2021, 109(5): 20-30.
- [23] JIN H, TANG X, XING M, et al. Molecular and Transcriptional Characterization of Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Proteins in Wild Peanuts *Arachis Duranensis* and *Arachis Ipaensis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 468-484.
- [24] DONG J, HAN L, WANG Y, et al. Transcript Expression Bias of Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein Gene in Bumblebee, *Bombus Lantschouensis* (Hymenoptera: Apidae) [J]. *Gene*, 2017, 627(1): 290-297.
- [25] LOUKAS A, HINTZ M, LINDER D, et al. A Family of Secreted Mucins from the Parasitic Nematode *Toxocara Canis* Bears Diverse Mucin Domains but Shares Similar Flanking Six-Cysteine Repeat Motifs [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(50): 39600-39607.
- [26] IBÁÑEZ-SHIMABUKURO M, REY-BURUSCO M F, GABRIELSEN M, et al. Structure and Ligand Binding of As-P18, an Extracellular Fatty Acid Binding Protein from the Eggs of a Parasitic Nematode [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(7): 1-16.
- [27] VALLÉE B, TEYSSIER C, MAGET-DANA R, et al. Stability and Physicochemical Properties of the Bovine Brain Phosphatidyl Ethanolamine-Binding Protein [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, 266(1): 40-52.
- [28] FERNANDEZ A P, GIBBONS J, OKKEMA P G. C. *Elegans* Peb-1 Mutants Exhibit Pleiotropic Defects in Molting, Feeding, and Morphology [J]. *Developmental Biology*, 2004, 276(2): 352-366.
- [29] GOBERT G N. Immunolocalization of Schistosome Proteins [J]. *Microscopy Research and Technique*, 1998, 42(3): 176-185.
- [30] MEI B S, KENNEDY M W, BEAUCHAMP J, et al. Secretion of a Novel, Developmentally Regulated Fatty Acid-Binding Protein into the Perivitelline Fluid of the Parasitic Nematode, *Ascaris Suum* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(15): 9933-9941.
- [31] IBÁÑEZ-SHIMABUKURO M, REY-BURUSCO M F, COOPER A, et al. Resonance Assignment of As-P18, a Fatty Acid Binding Protein Secreted by Developing Larvae of the Parasitic Nematode *Ascaris Suum* [J]. *Biomolecular NMR Assignments*, 2014, 8(1): 33-36.
- [32] GOBERT G N, STENZEL D J, JONES M K, et al. Immunolocalization of the Fatty Acid-Binding Protein Sj-FABPc within Adult *Schistosoma Japonicum* [J]. *Parasitology*, 1997, 115(1): 33-39.

责任编辑 夏娟