

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.01.007

犬弓首蛔虫黏蛋白 2 的原核表达 及多克隆抗体的制备

贾红菓, 谭纯, 王冰楠, 梅四鹏,
孙雪, 杨晓伟, 周荣琼

西南大学 动物医学院, 重庆 荣昌 402460

摘要: 根据犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)黏蛋白 2 的基因组数据(GenBank: AF167707), 以 *T. canis* 成虫的基因组 DNA 为模板扩增 *Tc-muc-2* 基因并进行序列分析; 同时构建 *Tc-muc-2*/pCold TF 原核表达载体, 采用 IPTG 诱导表达, 对重组蛋白进行纯化并制备多克隆抗体。结果显示 *Tc-muc-2* 基因全长序列为 549 bp, 共编码 183 个氨基酸; 多重序列比对发现犬弓首蛔虫的黏蛋白均具有 SKhT 保守结构域, 且含有不同串联重复序列组成的黏蛋白结构域; 种系发育分析结果显示与猪蛔虫进化关系较近; SDS-PAGE 结果表明重组蛋白 *Tc-MUC-2* 相对分子质量为 7.5×10^4 , 以可溶性形式表达; 利用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白, 以 250 mmol/L 咪唑进行洗脱时可获得高纯度目的蛋白; 将纯化后的重组蛋白免疫新西兰大白兔以制备多克隆抗体, 间接 ELISA 结果显示其多克隆抗体效价大于 1:512 000, 表明重组蛋白的免疫原性较好, SDS-PAGE 结果显示纯化后的抗体纯度高于 95%, Western Blot 结果显示抗体能与 *Tc-MUC-2* 蛋白特异性结合, 表明抗体特异性高。

关键词: 犬弓首蛔虫; 黏蛋白 2; 克隆; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.7 文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)01-0066-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of *Toxocara canis* Mucin-2

JIA Hongguo, TAN Chun, WANG Bingnan, MEI Sipeng,
SUN Xue, YANG Xiaowei, ZHOU Rongqiong

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

Abstract: The *Toxocara canis* mucin-2 (*Tc-muc-2*) gene was amplified with the adult worm as template according to the genomic data of *Tc-muc-2* (GenBank: AF167707) and analyzed. The prokaryotic expression vector *Tc-muc-2*/pCold TF was constructed and induced by IPTG. The recombinant protein was purified and polyclonal antibody was prepared. The results showed that the full-length sequence of the *Tc-muc-2* gene was 549 bp, which encoded 183-amino-acid. Multiple alignment found that the mucins of

收稿日期: 2022-03-31

基金项目: 重庆自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxm2338); 中央高校基本科研业务费资助项目(XDJK2020RC001).

作者简介: 贾红菓, 硕士, 主要从事寄生虫分子生物学研究。

通信作者: 周荣琼, 教授。

T. canis contained a conserved SKhT domain and a mucin domain which composed of different tandem repeats. The phylogenetic tree analysis suggested that *Tc*-MUC-2 was closely related to the sequence of *Ascaris suum*. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the recombinant protein *Tc*-MUC-2 was about 7.5×10^4 and in soluble form. The protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography column by eluting with 250 mmol/L imidazole. The purified recombinant protein was used to immunize the New Zealand white rabbits to prepare polyclonal antibody. Indirect ELISA result showed the titer of the polyclonal antibody was higher than 1 : 512 000, indicating that the recombinant protein had good immunogenicity. The SDS-PAGE result showed that the purity of antibody was higher than 95%, and the Western Blot result showed that antibody could specifically recognize *Tc*-MUC-2, indicating that the antibody had good specificity.

Key words: *Toxocara canis*; MUC-2; clone; prokaryotic expression; polyclonal antibody

犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)是犬科动物和猫科动物中最普遍的胃肠道寄生线虫,其感染性虫卵进入终末宿主的小肠内可发育为成虫^[1-2].人类及其他转续宿主摄入则无法完成其生命周期,幼虫在组织内迁移数月或数年,对宿主机体造成严重损害.人类弓首蛔虫幼虫移行损害的主要器官有肝脏、肺、眼、脑等,引起眼睛和内脏幼虫移行症、神经弓首蛔虫病、隐性弓首蛔虫病等,表现为持续的嗜酸性粒细胞增多,出现视网膜炎、哮喘、癫痫、脑膜炎等症状^[3-5],严重危害人类健康.

黏蛋白(Mucins, MUCs)是一类高分子量糖蛋白,其分子由主链和糖基侧链通过 O-糖苷键连接组成,主链富含丝氨酸和苏氨酸作为糖基化连接的位点. MUCs 包含膜结合型黏蛋白(MUC1, MUC4, MUC16)和分泌型黏蛋白(MUC2, MUC5AC, MUC5B),广泛分布于哺乳动物黏膜表面为其提供保护,并参与细胞分化、粘附、信号转导和免疫反应等多种生物学过程,其异常表达或过表达与肿瘤的发生有关^[6-7].此外,该蛋白在宿主-寄生虫相互作用的过程中也发挥重要作用.例如,克氏锥虫的黏蛋白通过与宿主巨噬细胞的 L-选择素相结合,抑制白细胞介素-2 的产生和 T 细胞受体相关信号转导蛋白的酪氨酸磷酸化,从而抑制宿主的炎症反应^[8];在曼氏血吸虫中,分泌型黏蛋白 MUC2 形成可脱落的表面涂层,保护寄生虫免受抗体和嗜酸性粒细胞的攻击^[9].

目前,对于犬弓首蛔虫黏蛋白 2 的研究较少.本研究运用分子生物学技术,首先克隆 *Tc*-*muc*-2 基因并进行序列分析;同时构建 *Tc*-*muc*-2/pCold TF 原核表达载体并制备多克隆抗体,以期为进一步研究 *Tc*-MUC-2 的生物学功能奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

T. canis 采自西南大学荣昌校区动物医院的患病犬,鉴定后于液氮中保存.

PremixTaq DNA 聚合酶、pMD19-T (simple) Vector、限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物小量回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;Ni-NTA 纯化树脂预装柱、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自 Sangon Biotech 公司;Protein A+G Agarose 抗体纯化试剂盒购自碧云天生物技术公司.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 *T. canis* 基因组数据(GenBank: AF167707),利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)和 Primer-Premier 对 *Tc*-*muc*-2 进行特异性引物设计(F: 5'-CCGCTCGAGATGAACGTTCGTGTCGTCA-3',引入酶切位点 *Xho* I; R: 5'-CCCAAGCTTTTAGCAGAATCCGCAAGTA-3',引入酶切位点 *Hind* III),送至重庆擎科生物科技有限公司进行合成.

1.2.2 总 RNA 的提取与反转录

采用 TRIzol 法提取 *T. canis* 成虫的总 RNA,核酸蛋白测定仪检测其浓度和纯度;以提取的总 RNA 为模板,按反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA.

1.2.3 目的基因的 PCR(聚合酶链反应)扩增

以合成的 *T. canis* 成虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增^[10], PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min、94 °C 变性 30 s、54 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min; 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶成像系统扫描并记录结果。

1.2.4 PCR 产物的克隆、测序及分析

按照北京全式金胶回收试剂盒说明书切胶回收 PCR 产物, 按说明书将回收产物与 pMD19-T (simple) Vector 载体进行连接, 全部连接产物转化至 100 μ L 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含 IPTG 和 X-gal 的 LB/Amp⁺ 琼脂平板中, 于 37 °C 恒温培养箱正置培养 30 min, 再倒置培养 16 h. 将菌液 PCR 鉴定为阳性的重组菌液送至重庆擎科兴业生物技术有限公司测序, 测序结果利用 Clustal Omega 和 MUSCLE 软件进行多重序列比对; 用 MEGA 5.0 邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)构建系统进化树, 并用 Bootstrap 进行进化树可靠性分析, 共 1 000 个重复。

1.2.5 原核表达载体的构建

按质粒提取试剂盒说明书提取阳性重组质粒 *Tc-muc-2*/pMD19-T 和 pCold TF 质粒, 经限制性内切酶 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切, 切胶回收目的基因 *Tc-muc-2* 与 pCold TF 质粒、DNA Ligation Kit 进行连接反应。在冰上配制连接反应液: Digested pCold TF DNA 1 μ L, *Tc-muc-2* 4 μ L, Ligation Mix 5 μ L; 16 °C 反应 1 h. 重组表达质粒转化至 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 挑取白色单个菌落接种于 LB/Amp⁺ 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min 培养 14~16 h. 提取质粒, 进行 PCR、双酶切及测序鉴定。

1.2.6 目的蛋白的表达和纯化

挑选阳性菌, 提取质粒, 并将其转化至 *Escherichia coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 挑单菌落接种于 LB/Amp⁺ 液体培养基, 37 °C, 180 r/min 振荡培养 6 h, OD_{600} 值约为 0.8, 加入 0.8 mmol/L 的 IPTG 15 °C 诱导 24 h; 将菌液置于 15 °C, 4 500 r/min 离心 15 min, 收集菌体沉淀, 用生理盐水洗涤后, 再用 Washing Buffer 重悬菌体, 并进行超声破碎, 分别取破碎上清液和破碎沉淀进行 SDS-PAGE 电泳检测; 采用 Ni-NTA 纯化树脂预装柱纯化目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 电泳检测纯化结果。

1.2.7 多克隆抗体的制备及鉴定

利用透析袋去除纯化蛋白中的咪唑, 并采用冷冻真空干燥机浓缩蛋白。将 250 μ g 重组蛋白与弗氏完全佐剂 1:1 混合, 乳化后以颈背部皮下多点注射的方式对两只健康的新西兰大白兔进行首免; 每间隔 2 周, 以 200 μ g 重组蛋白与弗氏不完全佐剂 1:1 混合, 乳化后进行加强免疫; 为激活免疫系统, 首免剂量较大, 4 次免疫后收集血清并检测。

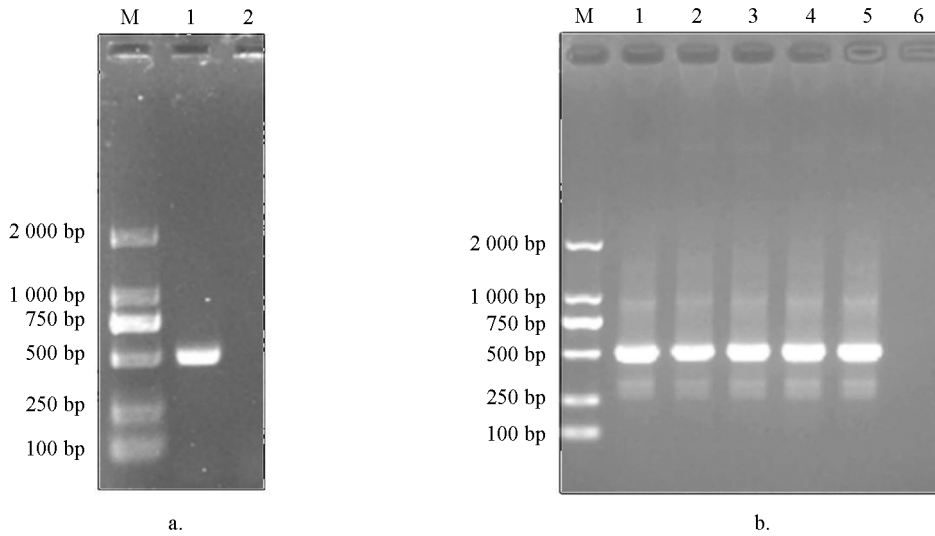
将纯化后的重组蛋白用包被液稀释为 5 μ g/mL, 4 °C 包被 12~16 h, PBST(磷酸盐吐温缓冲液)洗 3 次; 加入 100 μ L BSA(牛血清白蛋白)封闭液 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗 3 次; 将获得的兔血清 1:10 000 稀释后, 进行 2 倍倍比稀释, 免疫前血清作为阴性对照, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 加入 HRP(辣根过氧化物酶)标记的山羊抗兔 IgG(1:50 000), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗 3 次; 最后加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-Tetra methyl benzidine, TMB)显色液, 显色 15 min 后加入终止液终止反应; 酶标仪检测 OD_{450} 值, 当检测孔与阴性孔的比值大于(等于)2.1 时的最大稀释倍数为该血清的抗体效价。

达到所需效价后采血制备、纯化多克隆抗体, SDS-PAGE 电泳检测抗体纯化结果。取表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, PVDF(聚偏二氟乙烯)膜平铺至电泳胶, 利用转膜缓冲液进行转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST(Tris 盐吐温缓冲液)清洗 3 次, 兔抗 *Tc-MUC-2* 多克隆抗体(1:10 000)4 °C 孵育 12 h, TBST 清洗 3 次, HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:8 000)室温孵育 12 h, TBST 清洗 3 次, 滴加 DBA(二氨基联苯胺)反应液, 成像。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及重组质粒鉴定结果

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在约 549 bp 处可见明亮条带, 与理论值大小相符; 阴性对照没有条带出现(图 1a)。阳性克隆的菌液经 PCR 扩增后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 *Tc-muc-2*/pMD19T 在 511 bp 处有特异目的条带, 阴性对照没有条带出现(图 1b)。



a. PCR 扩增; 1. 成虫 *Tc-muc-2* PCR 产物, 2. 阴性对照; b. 1~5: *Tc-muc-2/pMD19T* 质粒的 PCR 检测, 6: 阴性对照; M: Marker.

图 1 *Tc-muc-2/pMD19T* 克隆质粒的构建

2.2 多重序列比对及种系发育进化树

将测序获得的 *Tc-MUC-2* 氨基酸序列与犬/猫弓首蛔虫的其他黏蛋白 *Tc-MUC-1* (GenBank NO. AAB05820), *Tc-MUC-3* (GenBank NO. AAD49340.1), *Tc-MUC-4* (GenBank NO. AAD49341.1), *T. cati-MUC-1* (GenBank NO. AZJ17292.1), *T. cati-MUC-3* (GenBank NO. AZJ17291.1) 氨基酸序列进行多重序列比对, 结果显示犬弓首蛔虫的黏蛋白均含有高度保守的 ShKT 结构域, 该结构域共有 36 个氨基酸, 含有 6 个保守的半胱氨酸和许多其他保守的残基(图 2). 此外, 犬弓首蛔虫黏蛋白还具有串联重复序列组成的黏蛋白结构域.

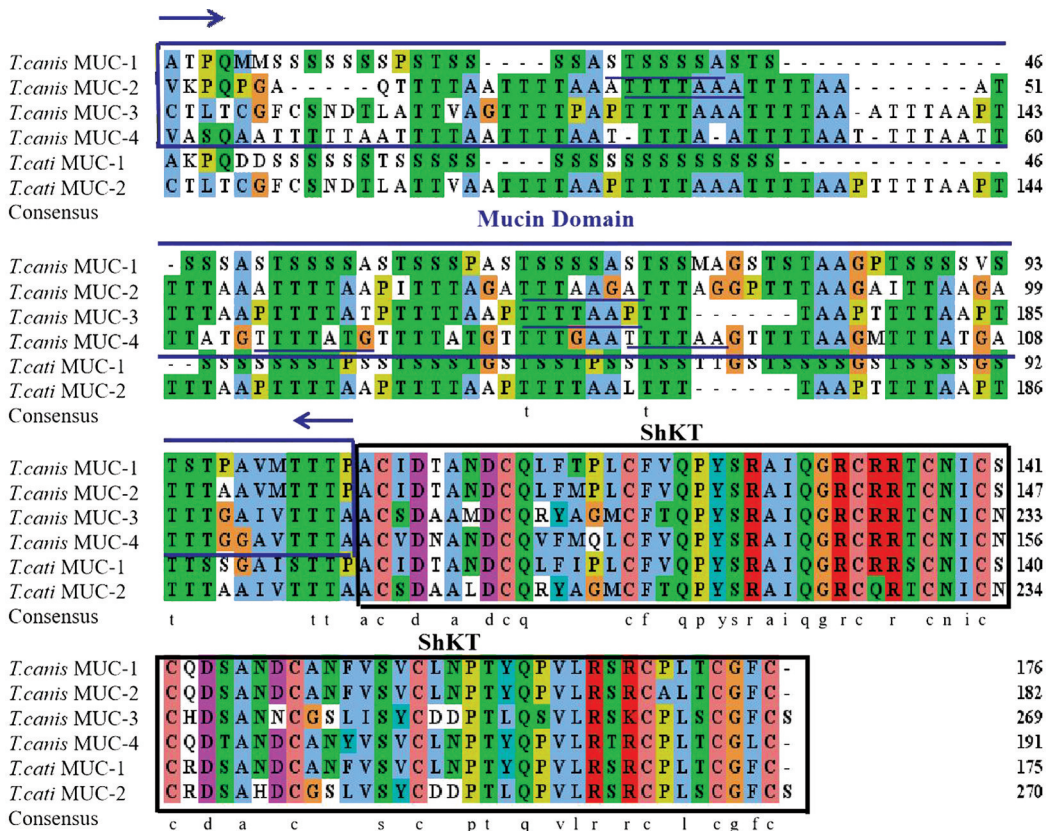


图 2 *Tc-MUC-2* 蛋白氨基酸序列多重序列比对

将 *Tc-muc-2* 编码的氨基酸序列与 Warmbase Parasite 和 GenBank 收录的贝氏蛔虫 (*Baylisascaris procyonis*, GenBank NO. ADR51554)、松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*, GenBank NO. CAD5235767)、小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*, GenBank NO. TKR66794)、筒线虫 (*Gongylonema pulchrum*, GenBank NO. VDN19323)、蠕形住肠线虫 (*Enterobius vermicularis*, GenBank NO. VDD98007)、燕麦滑刃线虫 (*Aphelenchus avenae*, GenBank NO. KAH7717973)、鲑鱼海虱 (*Lepeophtheirus salmonis*, GenBank NO. XP_040563239)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, GenBank NO. NP_491509.1)、多孔鹿角珊瑚 (*Acropora millepora*, GenBank NO. XP_029188544)、鼠类圆线虫 (*Strongyloides ratti*, GenBank NO. XP_024500113)、日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*, GenBank NO. PRJEA34885)、猪蛔虫 (*Ascaris suum*, GenBank NO. PRJNA62057)、大西洋蛙 (*Salmo salar*, GenBank NO. XP_014016473.2) 氨基酸序列进行比对并构建进化树(图 3), 结果显示 *Tc-MUC-2* 与猪蛔虫 (*A. suum*, GenBank NO. PRJNA62057) 形成单独分支, 进化关系较近。

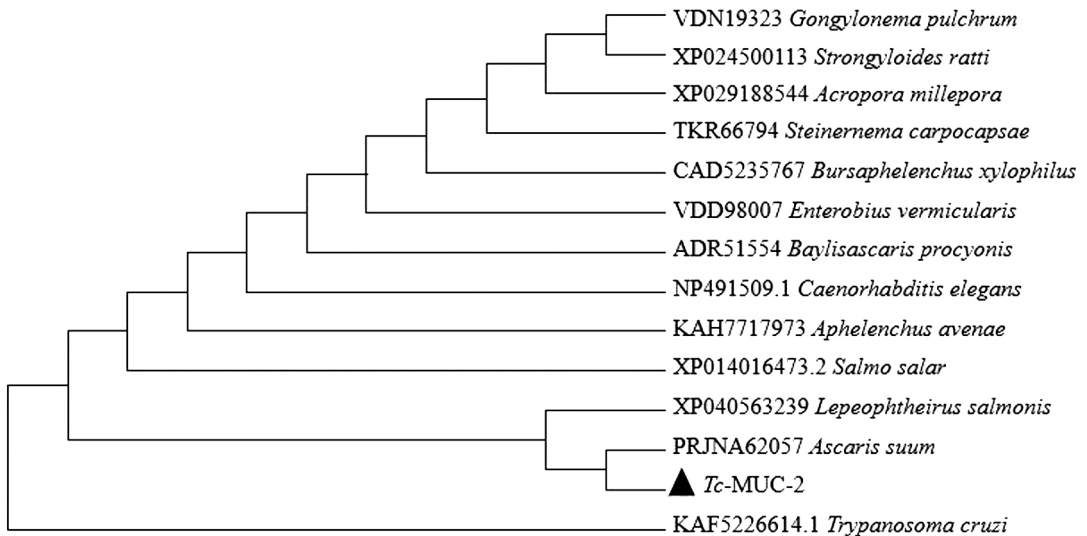


图 3 *Tc-MUC-2* 编码的氨基酸序列系统发育关系分析

2.3 *Tc-muc-2*/pCold TF 表达质粒的构建(图 4)

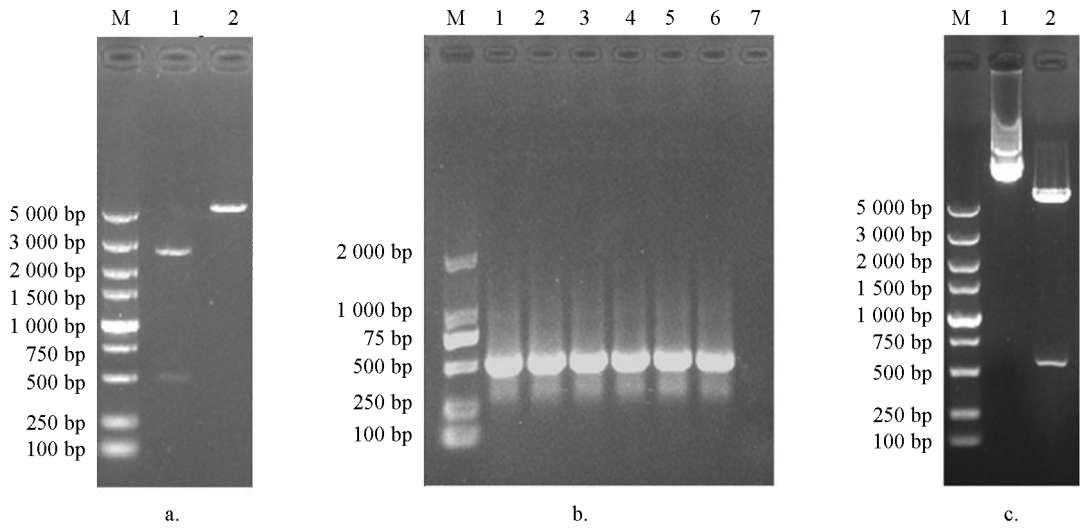
将测序成功的 *Tc-muc-2* 序列亚克隆至 pCold TF 表达载体, 经菌液 PCR 检测, 可见 1% 琼脂凝胶电泳结果具有清晰明亮的条带, 且大小与预期相符(图 4b); 经双酶切鉴定, 结果表明已成功连接至 pCold TF 表达载体(图 4c)。

2.4 重组蛋白的诱导表达及纯化

将阳性重组质粒转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞后, 经 IPTG 体外诱导表达, 产物大部分以可溶性蛋白的形式存在, 少量形成包涵体; 重组蛋白 *Tc-MUC-2*/pCold TF 相对分子质量约为 7.5×10^4 ; 利用 Ni-NTA 对重组蛋白进行纯化, 纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 检测无杂带, 具有较高的浓度和纯度(图 5)。

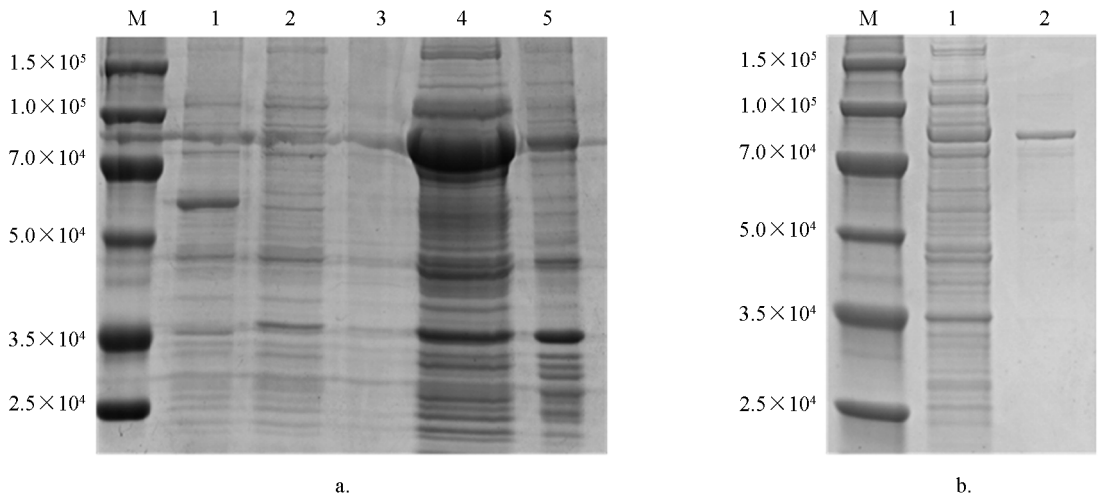
2.5 多克隆抗体的纯化及鉴定

将纯化后的重组蛋白 *Tc-MUC-2* 包被 96 孔板, 利用间接 ELISA 法测定兔抗 *Tc-MUC-2* 多克隆抗体的效价, 结果显示其抗体效价大于 $1:512\,000$, 可用于后续试验(表 1)。



a. 1: *Tc-muc-2*/pMD19T(simple) 双酶切, 2: pCold TF 质粒双酶切; b. 1~6: *Tc-muc-2*/pCold TF 质粒 PCR 检测, 7: 阴性对照; c. 1: *Tc-muc-2*/pCold TF 质粒检测, 2: *Tc-muc-2*/pCold TF 质粒双酶切; M: Marker.

图 4 *Tc-muc-2*/pCold TF 表达质粒的构建



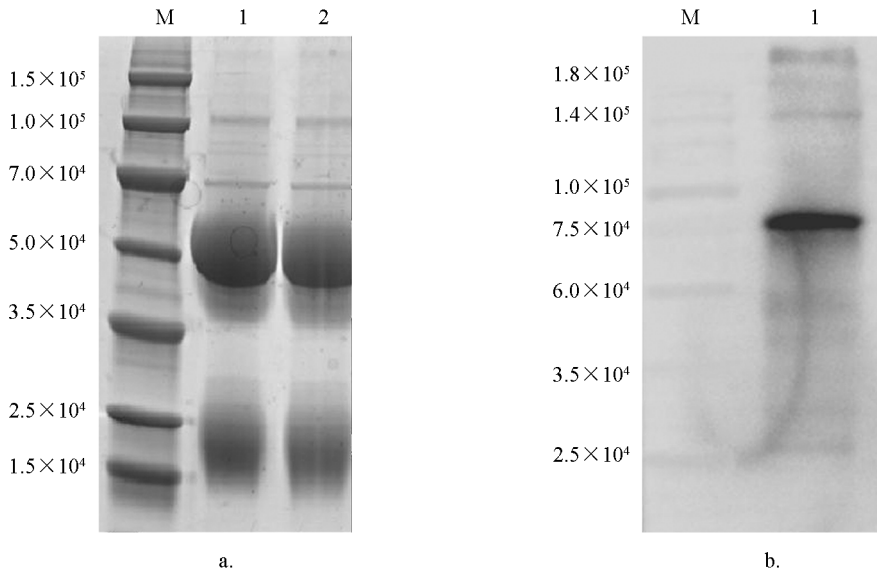
a. *Tc-MUC-2* 的表达形式(M: Marker; 1: 空载体 pCold TF; 2: *Tc-muc-2*/pCold TF 未诱导菌液; 3: *Tc-muc-2*/pCold TF 菌液上清液; 4: 超声破碎后的上清液; 5: 超声破碎后的沉淀) b. *Tc-MUC-2* 的纯化(M: Marker; 1: *Tc-muc-2*/pCold TF 超声破碎后的上清液; 2: 250 mmol/L 咪唑洗脱).

图 5 *Tc-MUC-2* 重组蛋白的表达形式及纯化

表 1 多克隆抗体效价测定

编号	稀释度	A280 nm		编号	稀释度	A280 nm	
		<i>Tc-MUC-2</i>				<i>Tc-MUC-2</i>	
1	500	3.62		7	32 000	3.13	
2	1 000	3.54		8	64 000	3.05	
3	2 000	3.52		9	128 000	3.01	
4	4 000	3.44		10	256 000	2.85	
5	8 000	3.32		11	512 000	2.83	
6	16 000	3.23		12	空白	0.05	

采用碧云天 Protein A+G Agarose 抗体纯化试剂盒对兔抗 *Tc-MUC-2* 多克隆抗体进行纯化, 然后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示多克隆抗体含有重链和轻链, 无明显杂带, 纯度大于 95% (图 6a); Western Blot 检测结果显示兔抗 *Tc-MUC-2* 多克隆抗体能与 *Tc-MUC-2* 蛋白特异性结合, 表明其特异性良好 (图 6b).



a. 多克隆抗体的纯化(M: Marker; 1~2: 纯化后的抗血清); b. 多克隆抗体的特异性检测。

图 6 多克隆抗体的纯化及特异性检测

3 讨论

黏蛋白 2(MUC-2)是一种高度糖基化的分泌型黏蛋白,由杯状细胞分泌,被包装成颗粒运输到细胞表面并最终释放入肠腔,作为肠黏液层的主要组成部分,其 O-型糖基化程度决定黏蛋白对肠粘膜的保护作用^[11-13]. Bergstrom 等^[14]发现 MUC-2 串联重复序列的密集糖基化使其能够作为保护屏障,在生物体和外部环境之间形成物理、化学和免疫学阻断. Nieuw 等^[15]发现 MUC-2 聚糖的硫酸化修饰可直接抑制细菌糖苷酶的活性,在宿主肠道内发挥保护作用.

本研究发现犬弓首蛔虫黏蛋白(*Tc*-MUC-2)具有黏蛋白结构域(Mucin domain)和 ShKT 结构域(ShKT domain). 多重序列比对显示 Mucin domain 由不同串联重复序列组成,如 *Tc*-MUC-1 含有 11 个串联重复的 STSSSSA, *Tc*-MUC-2 含有 6 个串联重复的 TTTTAAA/TTTAAGA, *Tc*-MUC-3 含有 10 个串联重复的 TTT-TAAP, *Tc*-MUC-4 含有 6 个串联重复的 TTTTAA/TTTTATG. ShKT 结构域是来自海葵(*Stichodactyla helianthus*)的 I 型钾通道毒素,Shafee 等^[16]证明 ShKT 结构可有效阻断电压门控钾(K_v)1.3 通道,该通道调节 T 细胞的膜电位,促进和维持 Ca^{2+} 信号转导,在效应 T 细胞和记忆 T 细胞活化中起关键作用. Chhabra 等^[17]报道马来布鲁线虫(*Brugia malayi*)的 ShK 样结构域对大鼠和人类 T 细胞具有免疫调节功能.

原核表达系统常用载体有 pET30a, pET28a, pET28b 和 pET32a 等^[18],诱导表达的产物主要以包涵体的形式存在,因此蛋白纯化时必须利用尿素进行变性处理,操作复杂且导致蛋白活性降低. pCold TF 是一种冷休克表达载体,其低温诱导条件可控制蛋白表达的浓度,使蛋白有充分的空间进行折叠,且 Trigger Factor(TF)能促进新生肽链的共翻译折叠,有效提高蛋白的溶解度^[19-20]. 本试验成功构建了原核表达质粒 *Tc-muc-2/pCold TF*,在 OD_{600} 为 0.8 的菌液中加入 IPTG, 15 °C 诱导 24 h 获得大量可溶性的目的蛋白,其纯化条件为非变性条件,可以保证蛋白的完整性,并降低了试验中的操作难度.

多克隆抗体的评价主要有抗体效价和抗体特异性两个因素. 在抗体效价方面,本试验采用弗氏佐剂降低重组蛋白的释放速率,从而加大机体的吸收率,同时增强了 *Tc*-MUC-2 的免疫原性. 在抗体特异性方面,本试验对重组蛋白的纯化条件进行了优化,经过对比 50 mmol/L, 100 mmol/L, 250 mmol/L 和 500 mmol/L 不同浓度咪唑的洗脱效果,最终选择了 250 mmol/L 浓度咪唑进行洗脱,该条件获得的蛋白具有较高的浓度和纯度,进一步保证了多克隆抗体的特异性. 间接 ELISA 结果显示多克隆效价大于 1 : 512 000, Western Blot 结果显示制备的多克隆抗体能特异性识别 *Tc*-MUC-2. 本试验制备的重组蛋白及多克隆抗体,为后续研究 *Tc*-MUC-2 的生物学功能奠定了基础.

参考文献:

- [1] MAIZELS R M, TETTEH K K, LOUKAS A. *Toxocara canis*: Genes Expressed by the Arrested Infective Larval Stage of a Parasitic Nematode [J]. International Journal for Parasitology, 2000, 30(4): 495-508.
- [2] SANTOS L M D, DE MOURA M Q, AZEVEDO M L, et al. Reactivity of Recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in Experimentally Infected Mice [J]. Parasite Immunology, 2018, 40(8): e12568.
- [3] 李芳, 陈绍基, 谭纯, 等. 犬弓首蛔虫 *Tc*-PEBP 的分子特性及组织表达分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2022, 44(3): 75-82.
- [4] LU C Y, LAI S C, LEE H H, et al. Matrix Metalloproteinases Activation in *Toxocara canis* Induced Pulmonary Pathogenesis [J]. Journal of Microbiology, Immunology, and Infection, 2021, 54(6): 1147-1153.
- [5] WANGCHUK P, LAVERS O, WISHART D S, et al. Excretory/Secretory Metabolome of the Zoonotic Roundworm Parasite *Toxocara canis* [J]. Biomolecules, 2020, 10(8): 1157.
- [6] DEA YAMASHITA M S, MELO E O. Mucin 2 (MUC2) Promoter Characterization: an Overview [J]. Cell and Tissue Research, 2018, 374(3): 455-463.
- [7] JONCKHEERE N, SKRYPEK N, FRÉNOIS F, et al. Membrane-Bound Mucin Modular Domains: From Structure to Function [J]. Biochimie, 2013, 95(6): 1077-1086.
- [8] NUNES M P, FORTES B, SILVA-FILHO J L, et al. Inhibitory Effects of *Trypanosoma cruzi* Sialoglycoproteins on CD4⁺ T cells are Associated with Increased Susceptibility to Infection [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77568.
- [9] GUZMAN ARANGUEZ A, ARGÜESO P. Structure and Biological Roles of Mucin-Type O-glycans at the Ocular Surface [J]. The Ocular Surface, 2010, 8(1): 8-17.
- [10] 刘琳, 郭晓银, 何彦侠, 等. 腹泻仔猪肠道大肠杆菌分离鉴定与毒力基因及耐药分析 [J]. 东北农业大学学报, 2022, 53(6): 65-75.
- [11] 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.
- [12] ROKHSEFAT S, LIN A F, COMELLI E M. Mucin-Microbiota Interaction During Postnatal Maturation of the Intestinal Ecosystem: Clinical Implications [J]. Digestive Diseases and Sciences, 2016, 61(6): 1473-1486.
- [13] YANG S W, YU M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity [J]. Journal of Inflammation Research, 2021, 14: 3171-3183.
- [14] BERGSTROM K S B, XIAL L. Mucin-Type O-Glycans and Their Roles in Intestinal Homeostasis [J]. Glycobiology, 2013, 23(9): 1026-1037.
- [15] NIEUW AMERONGEN A V, BOLSCHER J G, BLOEMENA E, et al. Sulfomucins in the Human Body [J]. Biological Chemistry. 1998, 379(1): 1-18.
- [16] SHAFEE T, MITCHELL M L, NORTON R S. Mapping the Chemical and Sequence Space of the ShKT Superfamily [J]. Toxicon, 2019, 165: 95-102.
- [17] CHHABRA S, CHANG S C, NGUYEN H M, et al. Kv1.3 Channel-Blocking Immunomodulatory Peptides From Parasitic Worms: Implications for Autoimmune Diseases [J]. FASEB Journal, 2014, 28(9): 3952-3964.
- [18] 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.
- [19] HAYASHI K, KOJIMA C. pCold-GST Vector: a Novel cold-shock Vector Containing GST Tag for Soluble Protein Production [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 62(1): 120-127.
- [20] LI J H, HAN Q, ZHANG T, et al. Expression of Soluble Native Protein in *Escherichia Coli* using a Cold-Shock SUMO Tag-Fused Expression Vector [J]. Biotechnology Reports, 2018, 19: e00261.