

• 基础实验研究论著 •

# 华支睾吸虫表膜蛋白 TP31.8 的克隆、表达及免疫活性\*

姚淑雯<sup>1</sup>, 胡旭初<sup>2</sup>, 徐 劲<sup>2</sup>, 余新炳<sup>2</sup>, 周珍文<sup>1△</sup>

(1. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东广州 510120; 2. 中山大学中山医学院病原生物学教研室, 广东广州 510080)

**摘 要:**目的 从华支睾吸虫 cDNA 文库扩增表膜蛋白 31.8 kDa(TP31.8) 基因, 克隆入表达载体 pGEX-4T-1, 诱导表达重组蛋白, 纯化重组蛋白免疫大鼠获得特异性抗体, 为后续功能研究奠定基础。方法 以华支睾吸虫 cDNA 文库为模板, 设计一对特异性引物, 扩增华支睾吸虫 TP31.8 基因, 扩增产物经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后与做相应酶切的 pGEX-4T-1 连接, 转化大肠杆菌 BL21, 提取质粒进行双酶切鉴定, IPTG 诱导重组蛋白表达, 并对基因进行测序及比对分析。融合蛋白经谷胱甘肽 Sepharose 4B 柱纯化后, 用凝血酶去除谷胱甘肽疏基转移酶(GST)。获得纯化的重组蛋白, 使用重组蛋白皮下注射免疫大鼠, ELISA 检测抗 TP31.8 的特异性 IgG 抗体滴度。结果 TP31.8 基因成功扩增, 重组 pGEX-4T-1-TP31.8 双酶切鉴定可见目的片段。测序结果显示 TP31.8 在正确阅读框中, TP31.8 开放阅读框长 828 bp, 编码相对分子质量为  $31.8 \times 10^3$  的蛋白, 等电点为 4.7。TP31.8 与其他蠕虫的表膜蛋白具同源性, 与日本血吸虫表膜蛋白 Sm20 的一致性为 41%, IPTG 诱导后, pGEX-4T-1-TP31.8/BL21 有相对分子质量  $57.8 \times 10^3$  融合蛋白的表达。融合蛋白经凝血酶酶切后得到相对分子质量  $31.8 \times 10^3$  的重组蛋白。使用重组蛋白免疫大鼠, ELISA 检测抗重组蛋白的特异的 IgG 抗体滴度为 1 : 25 600。结论 成功克隆了华支睾吸虫表膜蛋白 TP31.8 基因, 并获得重组蛋白的表达。重组 TP31.8 具免疫原性, 免疫大鼠获得的特异性抗体滴度为 1 : 25 600, 为其后续功能研究奠定了基础。

**关键词:** 华支睾吸虫; 重组蛋白质类; 克隆, 生物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)02-0129-04

## Cloning, expression and immunogenicity of TP31.8 of *Clonorchis sinensis*\*

Yao Shuwen<sup>1</sup>, Hu Xuchu<sup>2</sup>, Xu Jin<sup>2</sup>, Yu Xinbing<sup>2</sup>, Zhou Zhenwen<sup>1△</sup>

(1. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Pathogen, Medical School of Sun Yat Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

**Abstract:** **Objective** To amplify *Clonorchis sinensis* tegumental proteins 31.8 kD(TP31.8) gene from cDNA library, clone into the expression vector pGEX-4T-1, induce expression of recombinant protein, and used purified recombinant protein to immune rats for specific antibodies, in order to make the foundation for subsequent function study. **Methods** A pair of specific primer was designed according to TP31.8 sequences. Using *Clonorchis sinensis* cDNA library as template, TP31.8 gene was obtained by PCR. After digested by *EcoR* I and *Xho* I, the PCR production was ligated with pGEX-4T-1 which digested with the same enzyme, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21. Recombinant plasmid was identified by double enzyme digestion and sequence analysis, and the sequence results were compared with gene sequence in the GenBank. Expression of recombinant protein was induced by IPTG. Fusion protein was purified by glutathione Sepharose 4B column, thrombin was used to excise GST, recombinant protein was used to immune rats subcutaneously, and TP31.8 specific IgG antibody was detected by using ELISA. **Results** TP31.8 gene was amplified successfully, and objective fragment was obtained by double enzyme identification of recombinant pGEX-4T-1-TP31.8 plasmid. Sequencing results showed TP31.8 was in correct reading frame, and the open reading frame was 828 bp, which encoded a  $31.8 \times 10^3$  protein with isoelectric point of 4.7. Amino acid search (BLAST-X) showed that this predicted protein was a homologue to tegumental protein from other platyhelminth parasites, with 41% identity to *Schistosoma japonicum* Sm20. After IPTG induction, fusion protein expressed in the corresponding molecular weight  $57.8 \times 10^3$ , and recombinant protein was obtained by thrombin enzyme digestion. Using recombinant protein as antigen to immunize rats, TP31.8 specific antibody was obtained, and the TP31.8 specific IgG antibody titer was 1 : 25 600 detected by ELISA. **Conclusion** *Clonorchis sinensis* TP31.8 was cloned and expressed successfully, and recombinant TP31.8 had immunogenicity. The serum specific IgG antibody titer was 1 : 25 600 after immunizing rats by recombinant protein, which laid a solid foundation for subsequent function study.

**Key words:** *Clonorchis sinensis*; recombinant proteins; cloning, organism

华支睾吸虫成虫寄生在人和食鱼类哺乳动物的肝胆管内, 引起的华支睾吸虫病(肝吸虫病)是一种严重的人兽共患寄生虫病。

吸虫表膜是宿主免疫系统与虫体接触的界面, 分子组成复杂, 包括蛋白、多肽、糖蛋白、糖脂、脂肪酸等。因此, 表膜相关

抗原对宿主的免疫、致病起重要作用<sup>[1]</sup>。目前对血吸虫表膜蛋白的研究较多, 在血吸虫病疫苗的研发和免疫诊断方法的建立等方面有重要作用<sup>[2]</sup>。本研究在对华支睾吸虫成虫 cDNA 质粒文库进行随机测序筛选时, 发现了一种与其他物种表膜相关抗原高度同源的新基因, 暂时将其命名为华支睾吸虫表膜蛋白

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671831); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2006AA02Z422)。 作者简介: 姚淑雯, 女, 主管技师, 主要从事临床检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: zzw6248@126.com。

31.8 kDa(TP31.8)。本研究对其进行了原核克隆及表达,并使用纯化的重组蛋白免疫大鼠,获得了抗 TP31.8 的特异性抗体,为其后续功能研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂与仪器** pGEX-4T-1 质粒载体、谷胱甘肽 Sepharose 4B 纯化柱、凝血酶购自法马西亚公司;Ex-Taq DNA 聚合酶、*EcoR* I、*Xho* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 等购自 Takara 公司。胰蛋白酶、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司。使用的仪器主要有德国 Biometra 公司 PCR 仪、英国 uvitec 公司 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统、上海力申公司 HF safe-1200 型生物安全柜、德国 Sorvall 公司 micro 17R 台式高速冷冻离心机。

## 1.2 方法

**1.2.1 TP31.8 基因的扩增** 根据华支睾吸虫 cDNA 文库测序获得的 TP31.8 序列,设计特异性引物一对,P1:5'-CGG GAA TTC ATG GAT GCT TTT ATC G-3'引物加入保护性碱基 CGG 和 *EcoR* I 酶切位点;P2:5'-GGC TCG AGT CAA TAA TAT GGT GTC TTG-3'引物加入保护性碱基 GG 和 *Xho* I 酶切位点,由 Invitrogen 公司合成。以含目的基因的测序质粒为模板,Extra Taq 酶进行 PCR 扩增。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定。

**1.2.2 TP31.8 克隆入 pGEX-4T-1 载体** PCR 产物纯化后,用 *EcoR* I、*Xho* I 做双酶切。将酶切后的产物与经相同酶切的 pGEX-4T-1 连接,转化大肠杆菌 BL21。挑取经氨苄青霉素筛选的菌落提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定。

**1.2.3 TP31.8 的序列分析** 将鉴定含有 pGEX-4T-1-TP31.8 的 BL21/DE3 中工程菌送 Invitrogen 公司采用双脱氧链末端终止法在 ABI PRISM DNA 序列分析仪上测定插入片段的核苷酸序列。登陆 <http://ncbi.nlm.nih.gov> 网站,将测序结果进行 BLAST 比对分析,分析其与其他已知序列的同源性。

**1.2.4 pGEX-4T-1-TP31.8 在大肠杆菌 BL21/DE3 的诱导表达** 将含有 pGEX-4T-1-TP31.8 的 BL21/DE3 工程菌接种于含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/mL)的 LB 琼脂板,培养过夜后挑单菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右,加 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 30  $^{\circ}$ C 诱导表达 5 h。8 000 r/min,4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集菌体,SDS-PAGE 电泳鉴定。

**1.2.5 菌体的裂解** 将 250 mL 培养物的细菌沉淀悬于 10 mL 的 PBS,-20  $^{\circ}$ C 冷冻 30 min,37  $^{\circ}$ C 放置 20 min,反复冻融 3 次,加入溶菌酶至终浓度 1 mg/mL,冰上放置 30 min。按每克细菌加入 20  $\mu$ L DNase I (1 mg/mL),搅匀后室温放置至裂解液不再黏稠。将裂解液冰上超声破碎。8 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集上清液和沉淀,SDS-PAGE 电泳鉴定。

**1.2.6 重组蛋白的亲亲和层析纯化** 使用 PBS(pH 7.3)平衡谷胱甘肽 Sepharose 4B 亲和层析柱。吸取裂解上清液加入柱内,流速 0.2~1 mL/min,10 mL PBS 洗涤后,用 10 mL 洗脱缓冲液洗脱,分管收集洗脱液,SDS-PAGE 电泳鉴定。将纯化融合蛋白用凝血酶于室温(22~25  $^{\circ}$ C)放置 16 h 进行酶切,重复亲和和层析步骤除去谷胱甘肽疏基转移酶(GST),获得纯化的重组蛋白。

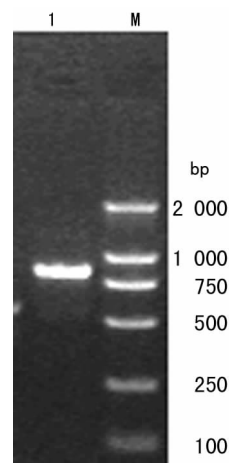
**1.2.7 多抗的制备及鉴定** 以 100  $\mu$ g 纯化的重组 TP31.8 与等体积弗氏完全佐剂混匀,通过背部、足垫部位皮下注射免疫 SD 大鼠;相同方法,间隔 2 周进行第 2 次加强免疫(以相同剂

量加不完全弗氏佐剂);间隔 2 周进行最后一次加强免疫。末次免疫后 1 周采集血液,于血清中加入诱导表达的 pGEX-4T-1/BL21 产物超声裂解液,4  $^{\circ}$ C 吸附过夜。ELISA 检测血清效价。

**1.2.8 Western blot 分析** 将纯化的表达产物经 SDS-PAGE 电泳后电转移至 PVDF 膜,以小鼠 TP31.8 血清为一抗(1:1 000 稀释),羊抗大鼠 IgG 为二抗行 Western blot 鉴定。

## 2 结果

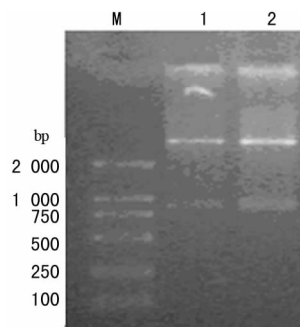
**2.1 华支睾吸虫 TP31.8 基因的扩增** 以含 TP31.8 基因的测序质粒为模板,以特异性引物 PCR 扩增 TP31.8 基因。1% 琼脂糖凝胶电泳显示,在预期位置(828 bp)有目的条带,见图 1。



泳道 M:DNA 分子量标记 DL2000;泳道 1:TP31.8 基因 PCR 产物。

图 1 TP31.8 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

**2.2 重组 pGEX-4T-1-TP31.8 质粒的鉴定** 挑取转化后氨苄青霉素抗性 LB 平板上生长的单克隆,提取质粒,以重组质粒为模板,用 TP31.8 特异性引物进行 PCR,获得与目的基因片段大小一致的片段。将筛选出的重组质粒进行 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定,切下大小约 828 bp 的目的片段,与 TP31.8 基因的片段大小一致,见图 2。



泳道 M:DNA 分子量标记 DL2000;泳道 1~2:经双酶切的重组质粒 pGEX-4T-1-TP31.8。

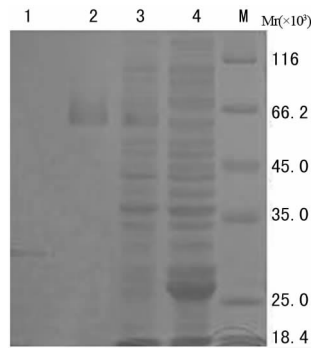
图 2 重组质粒 pGEX-4T-1-TP31.8 的双酶切鉴定

**2.3 阳性克隆测序** 测序结果显示,TP31.8 含有一个 828 bp 的开放阅读框,起始密码为 ATG,终止密码为 TGA,编码 275 个氨基酸。其理论相对分子质量和等电点分别为  $31.8 \times 10^3$  和 4.7,其序列已登录 Genbank(登录号:EF077217)。Interpro Scan 程序进行保守功能域搜索发现该序列同时含动力蛋白轻链 1(Dynein light chain type 1)功能域及钙结合功能的 EF-hand 功能域。

TP31.8 基因核苷酸序列进行同源性比对发现:该序列与血吸虫表膜蛋白有一定同源性,与日本血吸虫表膜蛋白 Sm20 的同源性最高,氨基酸一致性达 41% (115/275)。与曼氏血吸虫表膜蛋白 Sm20.8 和埃及血吸虫膜相关抗原 22.6 kDa 有一定同源性。

**2.4 TP31.8 在大肠杆菌中的表达、纯化** 重组表膜蛋白 30 ℃ IPTG 诱导表达 6 h,裂解上清都见可溶性表达。使用不同浓度 IPTG (0.2~1.0 mmol/L) 观察重组表膜蛋白的表达情况。结果显示,IPTG 浓度从 0.2 mmol/L 增至 1.0 mmol/L,重组蛋白表达量的比例未见明显变化。本研究选用了 0.2 mmol/L IPTG 浓度进行大量诱导表达。

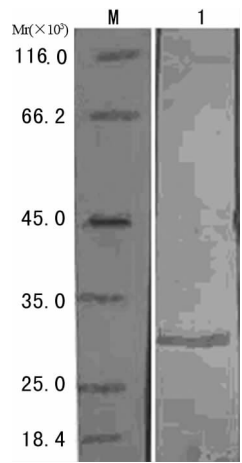
经谷胱甘肽柱纯化后,SDS-PAGE 电泳显示,在对应的相对分子质量位置可见与 GST 融合表达的重组蛋白条带(图 3)。融合蛋白经过凝血酶酶切后,得到去除 GST 的纯化表膜蛋白 1 mL,蛋白浓度为 1.8 mg/mL。纯化蛋白分装后于-70 ℃ 保存备用。



泳道 M:蛋白分子量标记物;泳道 1:重组融合蛋白经凝血酶酶切纯化的 TP 31.8;泳道 2:重组融合蛋白经谷胱甘肽柱纯化得到的 GST-TP 31.8;泳道 3:pGEX-4T-1-TP31.8 IPTG 诱导表达裂解产物;泳道 4:空表达载体 pGEX-4T-1 IPTG 诱导表达裂解产物。

图 3 重组 TP31.8 的 15% SDS-PAGE 分析

**2.5 重组 TP31.8 的活性鉴定** 从重组 TP31.8 免疫的大鼠获得了含高滴度特异性抗体的血清。使用纯化的重组 TP31.8 包被 ELISA 板,检测 IgG 抗体,滴度为 1:25 600,表明重组蛋白具免疫原性,可诱导大鼠产生高滴度抗体。用大鼠血清抗体作为一抗进行 Western blot 分析,发现重组蛋白能被血清中的特异性 IgG 识别,重组蛋白具反应原性,见图 4。



泳道 M:蛋白分子量标记物;泳道 1:重组 TP31.8 与含特异性抗体的大鼠血清孵育的结果。

图 4 重组表膜蛋白的 Western blot 分析

### 3 讨论

华支睾吸虫在宿主体内虽然寄生在肝胆管,不像血吸虫、疟原虫那样直接与血液接触,但其发育成熟过程中,虫体生长代谢所需的糖和氨基酸也可以通过体表从宿主获得,从表膜脱落的分子可以进入到血液循环,作为循环抗原刺激宿主机体产生抗体;作为与宿主的肝胆管直接接触的虫体表膜可以引起胆管局部的黏膜免疫反应和全身的免疫应答<sup>[3-5]</sup>。

通过对华支睾吸虫全长 cDNA 文库的大规模测序,本研究获得了 8 900 多个 EST 序列,归并为 1 775 个 Unigene<sup>[6]</sup>,笔者从中选出表膜蛋白 TP31.8 进行研究。华支睾吸虫 TP31.8 与血吸虫表膜蛋白具同源性。此表膜蛋白具钙结合功能的 EF-hand 保守功能域及动力蛋白轻链 1 功能域。含 EF-hand 结构域的蛋白功能大致分两类,调节蛋白和结构蛋白。前者与钙离子的结合会引起构象改变,促进酶学反应,后者主要通过维持细胞内钙水平从而维持结构。曼氏血吸虫、日本血吸虫、疟原虫、肝片形吸虫等的表膜蛋白也具有 EF-hand 结构域<sup>[7]</sup>,其功能属于后者,推测 TP31.8 也有类似功能,需通过钙结合实验证明。

TP31.8 具动力蛋白轻链 1 功能域。动力蛋白轻链是动力蛋白复合物和肌球蛋白 V 的组分,参与以微管和肌动蛋白为基础的分子驱动器作用,与两种运动蛋白的导向和调节作用有关,其在种属间高度保守。动力蛋白为向微管负端运输的马达蛋白,其功能包括细胞核的迁移、有丝分裂纺锤体定位以及细胞间期和有丝分裂的细胞骨架再组装<sup>[8]</sup>。现发现血吸虫多个表膜蛋白具动力蛋白轻链功能域,用动力蛋白轻链单克隆抗体检测到曼氏血吸虫成虫及肺期童虫体表动力蛋白轻链的表达,但在尾蚴、毛蚴中未见表达<sup>[9]</sup>。跨膜螺旋预测显示 TP31.8 具跨膜区,提示它们为膜结合蛋白。

为验证生物信息学分析结果,笔者选用 pGEX-4T-1 表达载体对目的基因进行大肠杆菌原核克隆表达。pGEX-4T-1 表达载体含 tac 启动子、lac 操纵基因,所表达的蛋白为含有 GST 的融合蛋白,具有易表达、表达量高、易纯化的特点。本研究中 TP31.8 有明显可溶表达,纯化后重组蛋白浓度达 1.8 mg/mL,为后续工作奠定了良好基础。

使用重组蛋白皮下注射免疫大鼠,获得含特异性抗体的血清,滴度达 1:25 600,表明重组 TP31.8 具免疫原性。使用大肠杆菌裂解液对血清进行反复吸附,除去可能存在的抗大肠杆菌抗体,尽可能地消除使用该血清进行免疫检测的非特异性背景。使用大鼠含特异性抗体的血清进行 Western blot 分析,重组 TP31.8 能被识别,验证了其反应原性。

总之,本研究对华支睾吸虫的表膜蛋白基因 TP31.8 进行了克隆、表达、纯化。结果显示重组 TP31.8 具免疫原性及反应原性,为其后续功能研究奠定了基础。

### 参考文献

[1] Xaviex EM, Lueena-Silva N, Werkhauser RP, et al. The tegument of schistosoma mansoni: genes, antigens and the host-parasite relationship[J]. Merm Inst Oswaldo Cruz, 2008, 93 (Suppl 1): 85-86.

[2] Zhang Z, Xu H, Gan W, et al. Schistosoma japonicum calcium-binding tegumental protein SjTP22.4 immunization confers praziquantel schistosomulmicide and antifecundity effect in mice[J]. Vaccine, 2012, 30(4): 5141-5150.

[3] 黄复深, 易新元. 寄生虫的粘膜免疫研究进展[J]. 国外医学寄生虫分册, 2004, 31(3): 105-108.

(下转第 133 页)

离氨的定量关系,即得游离氨浓度在 10~200  $\mu\text{mol/L}$  的定量线性范围(图 1)。注射黄曲霉毒素 B1 一定时间后(2、4、6、8、10 周)采血,测定 OD<sub>630</sub>,计算血氨浓度(表 1),随着时间的推移毒素组的血氨浓度呈上升趋势。用生理盐水对照组的小鼠血氨浓度作分母,毒素组的血氨浓度作分子柱状图分析(图 2)。结果也显示随着时间的推移毒素组的血氨浓度相对于对照组呈上升趋势。

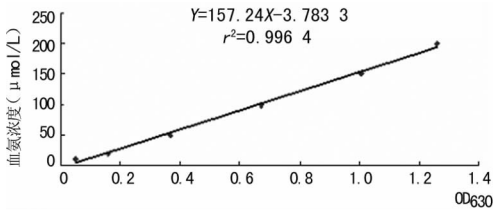


图 1 血氨标准曲线

表 1 黄曲霉毒素组血氨浓度的变化

注射时间(周)	血氨浓度( $\mu\text{mol/L}$ )
0	40.76 $\pm$ 6.54
2	68.55 $\pm$ 9.56
4	75.36 $\pm$ 5.05
6	98.95 $\pm$ 11.04
8	119.91 $\pm$ 14.09
10	172.33 $\pm$ 13.98

3 讨 论

黄曲霉毒素又称肝脏毒素,其毒害作用主要是损害肝脏。秦雪等<sup>[9]</sup>通过差异蛋白组学推测黄曲霉毒素 B1 会损害肝脏,一定程度干扰尿素循环。尿素循环的功能是将有毒的氨合成无毒的尿素,从而避免高氨血症的发生。本研究通过黄曲霉毒素 B1 注射昆明鼠,注射量约 50  $\mu\text{g/次}$ ,建立紫外分光光度法检测血液中的氨浓度,测定血氨浓度的动态变化。实验显示,毒素组小鼠血氨浓度从 40  $\mu\text{mol/L}$  上升到 170  $\mu\text{mol/L}$ ,同时,随着时间的推移毒素组小鼠的血氨浓度相对对照组呈上升趋势,结果与其他相关推测一致,表明黄曲霉毒素 B1 干扰了尿素循环。

血氨浓度测定是本研究的一个关键技术。标本放置时间

越长,其血氨浓度越高,主要原因可能是血液细胞自身代谢或部分微生物代谢后产生氨致使其血氨浓度升高<sup>[10-12]</sup>。本实验研究中,每次采血后用肝素抗凝,立即低温分离血浆进行血氨浓度测定,避免了血氨假阳性升高。

总之,本实验通过黄曲霉毒素 B1 注射小鼠,发现小鼠血氨浓度持续上升,推测黄曲霉毒素 B1 干扰了尿素循环,为下一步研究黄曲霉毒素 B1 与尿素循环障碍关系的研究奠定了基础。

参考文献

[1] 白路. 黄曲霉毒素的危害[J]. 吉林农业, 2012, 263(1): 178-178.

[2] 魏丽莉. 黄曲霉毒素对食品的污染及防治措施[J]. 粮油加工, 2008, 9(1): 86-89.

[3] 安虹, 邹广迅. 黄曲霉毒素毒性效应机制的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(24): 15007-15012.

[4] 庄振宏, 黄绿缘, 张峰, 等. 黄曲霉毒素 B1 对小鼠肝脏蛋白质组影响的初步研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 2072-2079.

[5] 庄振宏, 郑传琦, 汪世华. 黄曲霉培养条件的优化及黄曲霉毒素 B1 的提取[J]. 应用于环境生物学报, 2010, 16(5): 724-729.

[6] 申海涛, 张祥宏, 黄向华, 等. 黄曲霉毒素 G1 长期灌胃对 NIH 小鼠肺泡上皮细胞 SP2C 和 PCNA 表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 3(3): 325-327.

[7] 刘福, 曾芝兰. 血氨浓度测定方法学研究[J]. 儿科药学杂志, 2007, 13(1): 22-25.

[8] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 134.

[9] 秦雪, 代智, 崔杰峰, 等. 黄曲霉毒素 B1 诱发树鼯肝癌过程中的差异表达蛋白质分析及意义[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 538-542.

[10] 盛太平, 徐元宏, 李涛, 等. 血氨检测的临床适应证及其价值探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 565-567.

[11] 李晓光, 于永光, 王丽艳, 等. 血氨检测在临床肝脏疾病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(11): 1340-1342.

[12] 陆铭, 刘国珍. 重型肝炎、肝硬化血氨的检测及其临床意义[J]. 肝脏, 2007, 12(5): 427-428.

(收稿日期: 2013-08-13)

(上接第 131 页)

[4] Zhou Z, Hu X, Huang Y, et al. Molecular cloning and identification of a novel Clonorchis sinensis gene encoding a tegumental protein[J]. Parasitol Res, 2007, 101(6): 737-742.

[5] Zhou Z, Xia H, Hu X, et al. Oral administration of a Bacillus subtilis Spore-based vaccine expressing Clonorchis sinensis tegumental protein 22. 3kDa confers protection against Clonorchis sinensis [J]. Vaccine, 2008, 26(15): 1817-1825.

[6] 徐劲, 胡旭初, 应康, 等. 华支睾吸虫成虫全长基因表达文库的构建和基因表达谱的建立[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(5): 383-386.

[7] Arantxa D, Ruiz DE, Angeles M, et al. Cloning and expression in

Escherichia coli of a Fasciola hepatica gene encoding a calcium-binding protein [J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 101 (1/2): 13-21.

[8] Hoffmann KF, Strand M. Molecular characterization of a 20. 8 kDa Schistosoma mansoni antigen; Sequence similarity to tegumental associated antigens and dynein light chains [J]. J Biol Chem, 2007, 272(23): 14509-14515.

[9] Fitzsimmons CM, Stewart TJ, Hoffmann KF, et al. Human IgE response to the Schistosoma haematobium 22. 6 kDa antigen [J]. Parasite Immunol, 2008, 26(2): 371-376.

(收稿日期: 2013-08-11)