

免疫蛋白质组学技术在血吸虫病研究中的应用

马安 刘晓龙 干小仙*

【摘要】 蛋白质组学技术与现代免疫学相结合形成了一门新兴交叉学科——免疫蛋白质组学 (immunoproteomics)。日本血吸虫和曼氏血吸虫的基因组、转录组研究积累了大量生物信息资料,使血吸虫免疫蛋白质组研究成为可能。该文对近几年来免疫蛋白质组学技术在血吸虫病研究中的应用进行综述。

【关键词】 血吸虫病;免疫蛋白质组学

Application of immunoproteomics techniques in schistosomiasis research MA An, LIU Xiao-long, GAN Xiao-xian*. Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

* Corresponding author; GAN Xiao-xian, Email: xiaoxian_gan@hotmail.com

Supported by grant from Science and Technology Department of Zhejiang Province (2007F10029)

【Abstract】 Immunoproteomics is a newly emerging branch, derived from the combination of proteomics technology with modern immunology. A wealthy of bioinformation was accumulated along with the progress of *Schistosoma* genome and transcriptome. The release of *Schistosoma* database opens the opportunities to immunoproteomics. This article reviews the recent practical application of immunoproteomics in schistosomiasis research.

【Key words】 Schistosomiasis; Immunoproteomics

为了探索血吸虫新基因及其特性,寻找新的候选疫苗抗原和药物靶分子,世界卫生组织 (WHO) 于 1994 年启动曼氏血吸虫和日本血吸虫基因组计划^[1-2]。2009 年曼氏血吸虫和日本血吸虫的全基因组草图完成。对血吸虫转录组已进行诸多研究,蛋白质组方面也开展了一些研究^[3-6],标志着血吸虫生物学研究已进入后基因组时代。

蛋白质组 (proteome) 是指一种细胞、一种组织或一种生物的基因在一特定条件下表达的所有蛋白质。蛋白质组学 (proteomics) 是从整体角度分析细胞、组织或生物体内动态变化的蛋白质组成、表达水平差异与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,提示蛋白质功能与细胞活动规律^[7]。Jungblut 等^[8-9]率先将双向凝胶电泳 (two dimensional gel electrophoresis, 2-DE)、质谱等蛋白质组学技术和 Western blot 联合应用成功鉴定出伯氏疏螺旋体的抗原性蛋白质,并于 2001 年提出免疫蛋白质组

学 (immunoproteomics) 概念,此后广泛应用于肿瘤、自身免疫性疾病和细菌、病毒、寄生虫等病原体研究中,成为一门新兴交叉学科。免疫蛋白质组学是利用基因组学、转录组学及蛋白质组学等相关技术和生物信息资料分析研究抗原谱或免疫应答分子谱,研究不同类型的免疫应答以及其过程中不同阶段特异的免疫性蛋白质组。随着血吸虫全基因组测序完成,转录组、蛋白质组研究不断深入,积累的庞大血吸虫生物信息资料为免疫蛋白质组研究创造了条件。现将免疫蛋白质组学技术在血吸虫病研究中的应用作一综述。

1 血吸虫免疫蛋白质组研究方法

免疫蛋白质组研究依赖于蛋白质组学和免疫学两方面的技术。蛋白质组学技术包括蛋白质分离技术和鉴定技术,蛋白质分离技术分经典的凝胶体系和新近发展的非凝胶体系两大类,蛋白质鉴定通常采用质谱联合生物信息检索。免疫学检测方法有 Western blot、ELISA、蛋白芯片等,已应用于血吸虫病的免疫蛋白质组研究方法归纳为以下 3 种。

1.1 凝胶分离技术联合 Western blot 检测

蛋白质凝胶分离体系有 SDS-PAGE、2-DE 和毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE)。2-DE 是目前最成熟也是最常用的蛋白质分离技术,最初由 O' Farrell's 于 1975 年创建,其原理是根据蛋白质的两个一级属性等电点 (pI) 和相对分子质量 (M_r) 的特异性,将不同的蛋白质向等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 和 SDS-PAGE 两个方向进行分离^[10]。近十几年来 2-DE 在分离效率、可操作性、重复性、自动化分析等方面不断得到改善,分辨率从最初一块胶分离约 1 000 个蛋白,发展到现在可分离 10 000 个^[11-13]。2-DE 联合 Western blot 是当前最常用的免疫蛋白质组研究方法,一个蛋白质样品同时做多块平行胶,一块胶作染色,其他胶用于电转印及免疫学检测,根据 Western blot 检测到的阳性反应点位置,在染色胶上找到匹配抗原蛋白质点,然后再行切胶和质谱鉴定等。

待研究的抗原蛋白质组不同,Western blot 检测时选用的抗体也不同。日本血吸虫成虫可溶性抗原 (adult worm antigen, AWA) 经 2-DE 分离获得 200 多个蛋白质点,电转印至硝酸纤维素膜上,用感染兔血清 IgG 作 Western blot 检测,获得 30 个阳性反应点,在平行的染色胶图上找到 10 个匹配抗原蛋白点,用 LC-MS/MS 成功鉴定出 10 个抗原蛋白质^[14]。牛血吸虫雌雄成虫体被蛋白提取物经 2-DE 分离后,用抗肌动蛋白、抗烯醇酶、抗磷酸甘油醛脱氢酶单克隆抗体 Western blot 检测,选取阳性抗原蛋白质点做质谱分析,成功鉴定出 13 个体被蛋白质^[15]。

2-D 虽然分辨率高,但不适于分离疏水性蛋白、极酸性和极碱性蛋白、 M_r 过大 ($>200\ 000$) 和过小 ($<10\ 000$) 的蛋白,而且灵敏度不高,多数低丰度蛋白难以检出,导致 Western blot 膜上阳性反应点与胶图蛋白质点匹配率低。与 2-DE 相比,单向 SDS-PAGE 样本处理和操作简单快速、重复性好、对疏水性蛋白质分离有一定的优势。Liu 等^[16] 将日本血吸虫排泄分泌产物用单向 SDS-PAGE 凝胶分离后电转印至硝酸纤维素膜上,用感染兔血清作 Western blot 检测,获得 11 条阳性反应条带,在平行染色胶上找到相匹配蛋白条带,经 LC/MSD Trap XCT 成功鉴定出 101 个抗原蛋白质。缺点是单向 SDS-PAGE 分辨率低,挑选出的阳性条带仍是多种蛋白质混合物。双向毛细管电泳是最新发展起来的凝胶分离技术,具有样品用量少、分析时间短、重复性好、自动化程

度高等优点,尚未见应用于血吸虫免疫蛋白质组研究的相关报道。

1.2 二维液相色谱与 dot-ELISA 联用

二维色谱是近年发展起来的非凝胶类蛋白质分离技术,具有分辨率高、重复性好、自动化程度高、能与质谱在线联用等优点。色谱分离蛋白质的范围广,无论是疏水性还是亲水性、极酸性还是极碱性、相对分子质量大或小、高丰度还是低丰度的蛋白质,均能得到有效分离。ProteomeLab PF-2D 系统是一种二维液相色谱,第一维高效液相聚焦色谱 (high performance chromatofocusing, HPCF) 根据蛋白质的等电点不同进行分离,收集的馏分再行第二维高效反相色谱 (high resolution reversed phase chromatography, HPRP) 分离。日本血吸虫成虫可溶性抗原 (soluble worm antigen preparation, SWAP)、虫卵可溶性抗原 (soluble egg antigen, SEA) 注入 PF-2D 第一维强阴离子交换 HPCF 分离柱,经 pH 8.5 ~ 4.0 梯度洗脱,用 96 孔板收集馏分,并按一定顺序点样到 PVDF 膜上,用照射致弱尾蚴 (radiation attenuated cercariae, RAC) 免疫的猪血清 IgG 抗体作 dot-ELISA 筛检,检测阳性的馏分分别进行第二维 HPRP 分离,用同样的方法收集和免疫筛检,阳性者中剔除能与正常尾蚴感染猪血清 IgG 反应的蛋白质,余下的蛋白质均是 RAC 免疫猪血清 IgG 特异性识别的抗原,然后用 N-末端氨基酸测序和数据库检索鉴定之。SEA 和 SWAP 经第一维 HPCF 分离各收集 42 个馏分,用 dot-ELISA 分别筛选出 26 个 (61.9%) 和 15 个 (35.7%) 能与辐射致弱尾蚴免疫血清反应馏分。SEA 和 SWAP 中筛选到的阳性馏分进入第二维 HPRP 分离,分别获得 2 496 个和 1 440 个馏分,再用 dot-ELISA 筛选,最后获得 71 个 RAC 特异性识别的具有疫苗研究价值的抗原蛋白质^[17]。与 2-DE 分离相比,PF-2D 不仅分辨率高,而且蛋白质混合物经第一维 HPCF 分离后采用 dot-ELISA 筛检,仅需将阳性馏分进行第二维 HPRP 分离,大大提高分离效率,同时节省分离成本。

1.3 捕捉法联合质谱鉴定 (immunocapture MS)

利用抗体将相应的抗原从蛋白质混合物中预分离出来,再行凝胶分离和质谱鉴定,称之为反向免疫蛋白质组学 (inverse immunoproteomics)。在血吸虫蛋白质组研究中,利用生物素 (biotin) 和亲和素 (avidin) 结合的专一性和高亲和力等特点,将血吸

虫成虫暴露于宿主的体被外质膜蛋白质分离出来,再进行凝胶分离和质谱鉴定分析。Braschi 等^[18]采用间隔臂长短不同的两种磺胺基琥珀酰亚胺生物素标记曼氏血吸虫成虫体被蛋白,长臂生物素穿透力低,标记的蛋白质位于体被最外层,是潜在的诊断抗原、疫苗或药物靶标;短臂生物素穿透力强,标记的蛋白质位于深层一些,以结构性蛋白质为主。当生物素与活的曼氏血吸虫成虫一起孵育培养,暴露在外的体被蛋白质全部标记上生物素,洗涤后用反复冻融法制备体被蛋白质混合物,然后用亲和素琼脂糖微球捕获被标记的蛋白质,洗脱回收后再用 SDS-PAGE 分离和 LC-MS/MS 鉴定。Mulvenna 等^[19]用相同的生物素标记法预分离日本血吸虫体被外质膜蛋白质,洗脱回收捕获的蛋白质再用 OFF-GEL 电泳联合 HPLC 分离和电喷雾 QTRAP-MS/MS 鉴定。

蛋白质样本在凝胶电泳分离前,利用抗原抗体、受体配基结合的专一性和高亲和力特点,将待研究的蛋白质组进行预分离或富集,可使蛋白质分离效率、分辨率大大提高,同时还可以避免 2-DE 灵敏度低和 SDS 凝胶电泳中蛋白质三维结构被破坏失去抗原性而漏检等问题。

2 血吸虫免疫蛋白质组研究

免疫蛋白质组学将蛋白质组学高通量的分离、鉴定手段与免疫学技术相结合,从整体角度研究一种细胞、组织或生物体的免疫原性蛋白质组,为发现血吸虫病疫苗候选抗原、诊断抗原及药物靶分子及免疫逃避机制等方面的研究开辟了新途径。

2.1 新的候选疫苗抗原蛋白质的筛选与鉴定

早在 20 世纪 70 年代已发现照射致弱的活尾蚴或童虫能诱导啮齿类、灵长类等多种动物产生很强的抗血吸虫免疫保护作用。但是,活虫体的来源、制备、运输、保存等均存在局限性,难以开发应用。此后三十多年虽一直努力寻找新的血吸虫候选疫苗,迄今尚未获得保护力可以和照射致弱尾蚴相比的抗原。蛋白质组学技术的发展加上血吸虫生物信息数据库的不断完善,为发现新疫苗抗原开辟了新途径。

Abdel-Hafeez 等^[17]采用 PF-2 蛋白质分离与 dot-ELISA 免疫检测相结合,高效率地从由几千个蛋白质组成的 SWAP、SEA 粗抗原中筛选出 71 个 RAC 免疫血清 IgG 特异性识别的候选疫苗抗原蛋白质,

选择了其中 4 个蛋白进行 N 末端氨基酸序列测定和 NCBI 数据库检索,成功获得候选抗原基因序列。根据基因序列构建重组质粒,诱导表达的重组抗原有 2 个与 RAC 免疫猪血清反应非常强,有很好的疫苗研究价值。血吸虫体被直接暴露于宿主免疫系统,推测体被蛋白中有潜在的候选疫苗抗原。Sepulveda 等^[20]构建曼氏血吸虫免疫小鼠抗体可变区(scFv)噬菌体展示库,筛选到 5 个能特异性识别表膜抗原表位的阳性克隆(Teg1、Teg4、Teg5、Teg20 和 Teg37)。血吸虫表膜蛋白粗提液经 SDS-PAGE 分离后,用这些阳性克隆抗体筛检,获得 Teg4 抗体特异性识别的蛋白条带,经 MS/MS 鉴定由 4 个蛋白质组成,其中之一是曼氏血吸虫表膜蛋白 Sm29。先前已有研究证明 Sm29 具有很强的免疫保护力,是目前最有研究意义的曼氏血吸虫病候选疫苗^[21-22]。免疫蛋白质组学采用高分辨率、高效率的蛋白质分离技术、鉴定技术与高通量的免疫学检测相结合,使抗原筛选效率大大提高,必将加快新的有价值的候选疫苗抗原的发现。

2.2 血吸虫病诊断抗原的筛选与鉴定

目前用于现场查病的诊断方法大多使用血吸虫成虫或虫卵可溶性粗抗原,虽然敏感性高,但成分复杂,特异性较差。筛选、鉴定特异性诊断抗原分子是解决血吸虫病诊断问题的关键技术。Zhong 等^[14]从 200 多个 AWA 蛋白质点中筛检并鉴定出 10 个阳性抗原蛋白质,证明这些蛋白质分别为 SjFBPA4、SjLAP、SjGST、Sj22.6 及其亚型,表达的 SjLAP、SjFBPA 重组抗原检测血吸虫病血清抗体,显示较高的敏感性,证明具有潜在的诊断价值。用日本血吸虫感染患者唾液抗体筛选日本血吸虫虫卵 cDNA 文库,发现 2 个阳性克隆开放读框编码同一个 116 个氨基酸组成的蛋白,与日本血吸虫数据库中 AY222893 的氨基酸序列同源性为 100%,推定是血吸虫属特异的 M_r 13 000 分泌蛋白(Sj13),重组蛋白 reSj13 检测患者唾液中抗日本血吸虫抗体,其敏感性和特异性均较高,证明 Sj13 是潜在的诊断抗原^[23]。免疫蛋白质组相关技术在肿瘤、自身免疫性疾病的生物标志物发现及诊断中的应用已有较多报道^[24]。在血吸虫病诊断中应用尚在起步阶段,相关报道较少。虫卵在慢性血吸虫病免疫中起重要作用,SEA 具有较好的诊断价值,尾蚴和童虫特异性抗原可能具有早期诊断意义,有待于应用免疫蛋白质组学技术开发利用虫卵等诊断抗原的潜在价

值。多维色谱无需对蛋白变性处理即可进行分离,保证了蛋白的天然构象,且具有分离范围广、分辨率高等优点;捕捉法联合质谱鉴定可将待研究的蛋白质组进行预分离或富集,分离效率及分辨率均较 2-DE 高。与 2-DE 相比,多维色谱、捕捉法联合质谱鉴定等研究方法更适于血吸虫病诊断抗原蛋白的分离、筛选,值得进一步研究。

2.3 血吸虫免疫逃避机制相关蛋白质研究

血吸虫成虫在哺乳动物宿主的血液系统中能生存几年甚至几十年而不受免疫系统攻击的影响,可见虫体拥有独特有效的免疫逃避机制。体被是血吸虫与宿主直接接触和相互作用的界面,在免疫逃避中起关键作用,因此体被的结构、功能、分子组成等一直是研究热点。近几年体被蛋白质组研究已有较多报道,成功鉴定了一些蛋白质,但这些研究多是以整个个体被为研究对象^[25]。对体被亚结构如外质膜、膜萼进行细化分离、鉴定,对免疫逃避机制研究具有更重要的价值。

应用生物素活体标记法已成功分离、鉴定出 28 个暴露于宿主血液系统的曼氏血吸虫体被蛋白质,其中包括膜蛋白酶、运输蛋白、结构蛋白、胞浆蛋白、皮脊等细胞骨架成分,一个分泌蛋白。鉴定发现补体受体关联蛋白因子 (complement receptor-related protein gene, Crry) 具有衰变加速因子与膜辅蛋白的活性,参与 C3 的灭活。此外还发现 3 个来源于宿主的免疫球蛋白重链和 1 个补体 C3 片段,血吸虫体被上出现宿主 C3 降解片段,提示经典补体途径受阻,可能是血吸虫免疫逃避措施的主要因素^[18]。用相同的生物素活体标记法研究日本血吸虫成虫体被蛋白质组,成功鉴定出 54 个暴露于宿主免疫系统的体被蛋白质,其中包括糖转运蛋白、氨基酸透明质酸酶、亮氨酸氨基肽酶、运输蛋白、热激蛋白、新的免疫活性蛋白和四跨膜家族蛋白,还发现一个与 Sm29 同源性很高的蛋白质。通过电子显微镜实时监测生物素标记的血吸虫表面蛋白,发现标记蛋白迅速从被膜表面发生内陷并被运输到胞质桥,从而将远端被膜细胞质与细胞体下层相连,这种表膜蛋白迅速内陷可能是虫体逃避宿主免疫系统攻击的途径之一^[19]。用抗肌动蛋白、抗烯醇酶、抗磷酸甘油醛脱氢酶抗体筛选牛血吸虫体被蛋白提取物,共鉴定出 13 个体被蛋白质,其中有 2 种肌动蛋白亚型、6 种烯醇酶亚型及 5 种磷酸甘油醛脱氢酶亚型,并通过免疫荧光及共聚焦显微镜分

析,发现肌动蛋白及磷酸甘油醛脱氢酶在血吸虫体被膜上的表达量较烯醇酶丰富,且烯醇酶只存在雄虫被膜上^[15]。蛋白质组学技术的应用使得越来越多的体被蛋白质得以鉴定,但其在血吸虫免疫逃避机制中的作用还有待进一步研究。应用免疫蛋白质组研究方法实现体被亚结构蛋白质组的分离和鉴定,有助于揭示血吸虫免疫逃避机制。

3 血吸虫免疫蛋白质组研究面临的挑战及发展方向

3.1 血吸虫蛋白质组的复杂性

血吸虫基因组计划从 1994 年启动到 2009 年全基因组测序完成历时 15 年,现预测血吸虫有编码基因 15 000 ~ 20 000 个,考虑到转录调控、翻译后修饰等,估计蛋白质数是编码基因数的几倍,并且蛋白质表达还随着时间、空间、生理状态而变化,因此,血吸虫蛋白质组研究挑战性更大。此外,血吸虫复杂的生活史和免疫逃避机制决定其蛋白质组、免疫蛋白质组也复杂多变。不同发育期转录组、蛋白质组存在差异已有较多研究报道^[5,26],日本血吸虫 SWAP、SEA 中能被 RAC 血清抗体识别的抗原蛋白质差异非常大^[17],提示不同发育期免疫蛋白质组差异也很大。毛蚴、母胞蚴、子胞蚴、皮肤期童虫不能通过体外培养来获得,加上个体小,要取得足够量的研究材料非常困难。

3.2 免疫蛋白质组学技术上的缺陷

一些蛋白质组学技术应用于免疫蛋白质组研究存在局限性。2-DE 分离技术灵敏度较低,常会发生免疫印迹图上一些强阳性反应点,在胶图上找不到匹配的蛋白质点,两者匹配率低,往往是一些低丰度蛋白抗原性特别强;膜蛋白是重要的疫苗候选抗原,但其多为疏水性蛋白,可溶性较低,也不适合使用 2-DE 进行分离;SDS-PAGE 电泳使样本中所有蛋白质分子的二硫键打开成为线性分子,部分抗原决定簇被破坏而失去抗原性,在免疫筛检时被漏检。在蛋白质鉴定技术上,通常根据质谱获得的肽质量指纹图谱 (peptide mass fingerprinting, PMF) 与已知生物信息数据库中一个蛋白的理论期望蛋白酶肽段进行比较分析,按匹配程度推测这个蛋白质是否为数据库中理论推测的蛋白质,因此很大程度上依赖于血吸虫基因组、转录组等生物信息资料的准确性和完整程度。但是,当前的血吸虫生物信息资料还有待于进一步完善。

3.3 展望

蛋白质组学的发展使人类能高效率地、全方位地深入了解蛋白质的生物学功能,免疫蛋白质组学的发展则加快了生物标志物的发现。近几年来,蛋白质组学技术发展迅速,多维色谱、2-D 差异标记凝胶电泳(two-dimensional difference gel electrophoresis, 2-D DIGE)等可望弥补 2-DE 在抗原性蛋白质分离中的不足;优化组合蛋白质芯片、噬菌体展示、亲和层析等高通量分析技术,将不断加快免疫蛋白质组学发展。随着血吸虫蛋白质组研究的推进,蛋白质数据库的信息资料也将不断充实,加速新的候选疫苗抗原、诊断抗原、药物靶分子的发现。

参 考 文 献

- [1] Franco GR, Valadão AF, Azevedo V, et al. The *Schistosoma* gene discovery program: state of the art [J]. Int J Parasitol, 2000, 30(4): 453-463.
- [2] Ashton PD, Curwen RS, Wilson RA. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins [J]? Trends Parasitol, 2001, 17(4): 198-202.
- [3] Berriman M, Haas BJ, LoVerde PT, et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni* [J]. Nature, 2009, 460(7253): 352-358.
- [4] *Schistosoma japonicum* genome sequencing and functional analysis consortium. The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay [J]. Nature, 2009, 460(7253): 345-351.
- [5] Liu F, Lu J, Hu W, et al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum* [J]. PLoS Pathog, 2006, 2(4): e29.
- [6] Chuan J, Feng Z, Brindley PJ, et al. Our wormy world genomics, proteomics and transcriptomics in East and southeast Asia [J]. Adv Parasitol, 2010, 73: 327-371.
- [7] 魏开华, 应天翼, 胡良平, 等. 蛋白质组学实验技术精编 [M]. 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 1-7.
- [8] Jungblut PR, Grabher G, Stoffler G. Comprehensive detection of immunorelevant *Borrelia burgdorferi* antigens by two-dimensional electrophoresis [J]. Electrophoresis, 1999, 20(18): 3611-3622.
- [9] Jungblut PR. Proteome analysis of bacterial pathogens [J]. Microbes Infect, 2001, 3(10): 831-840.
- [10] O'Fhairell PH. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. Biol Chem, 1975, 250(10): 4007-4021.
- [11] Smith R. Two-dimensional electrophoresis: an overview [J]. Methods Mol Biol, 2009, 519: 1-16.
- [12] Marcus K, Joppich C, May C, et al. High-resolution 2DE [J]. Methods Mol Biol, 2009, 519: 221-240.
- [13] Zabel C, Klose J. High-resolution large-gel 2DE [J]. Methods Mol Biol, 2009, 519: 311-338.
- [14] Zhong ZR, Zhou HB, Lia XY, et al. Serological proteome-oriented screening and application of antigens for the diagnosis of schistosomiasis japonica [J]. Acta Trop, 2010, 116(1): 1-8.
- [15] Pérez-Sánchez R, Valero ML, Ramajo-Hernández A, et al. A proteomic approach to the identification of tegumental proteins of male and female *Schistosoma bovis* worms [J]. Mol Biochem Parasitol, 2008, 161(2): 112-123.
- [16] Liu F, Cui SJ, Hu W, et al. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum* [J]. Mol Cell Proteomics, 2009, 8(6): 1236-1251.
- [17] Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, et al. Proteome approach for identification of schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen [J]. Parasitol Int, 2009, 58(1): 36-44.
- [18] Braschi S, Wilson RA. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation [J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(2): 347-356.
- [19] Mulvenna J, Moertel L, Jones MK, et al. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument [J]. Int J Parasitol, 2010, 40(5): 543-554.
- [20] Sepulveda J, Jacqueline M, DeGnore JP, et al. *Schistosoma mansoni* host-exposed surface antigens characterized by sera and recombinant antibodies from schistosomiasis-resistant rats [J]. Int J Parasitol, 2010, 40(12): 1407-1417.
- [21] Cardoso FC, Pacifico RN, Mortara RA, et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies [J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(3): 382-391.
- [22] Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, et al. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2008, 2(10): e308.
- [23] Zhou YP, Wu ZD, Yang LL, et al. Cloning, molecular characterization of a 13-kDa antigen from *Schistosoma japonicum*, Sj13, a putative salivary diagnosis candidate for schistosomiasis japonica [J]. Parasitol Res, 2009, 105(5): 1435-1444.
- [24] Tjalsma H, Schaeps RM, Swinkels DW. Immunoproteomics: from biomarker discovery to diagnostic applications [J]. Proteomics Clin Appl, 2008, 2(2): 167-180.
- [25] 钱门宝, 胡薇. 血吸虫体被的结构功能及其蛋白质组研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(6): 466-471.
- [26] Gobert GN, Moertel L, Brindley PJ, et al. Developmental gene expression profiles of the human pathogen *Schistosoma japonicum* [J]. BMC Genomics, 2009, 10: 128.

(收稿日期:2011-04-29)

(本文编辑:姬晓云)