

文章编号: 1000-7423(2013)-06-0438-05

【论著】

## 细粒棘球蚴抗原 B 亚单位多表位重组抗原的血清学诊断评价

江莉<sup>1\*</sup>, 冯正<sup>2</sup>, 张耀光<sup>1</sup>, 王真瑜<sup>1</sup>

**【摘要】 目的** 对 6 个细粒棘球蚴抗原 B (AgB) 亚单位多表位重组抗原和 3 个 AgB 亚单位抗原进行血清学平行比较分析, 评价多表位抗原的诊断价值。 **方法** 在多表位重组抗原 MEA-26 中插入一段 Linker 序列, 成为 MEA-49 抗原。用 I-TASSER 在线服务器模拟分析蛋白质三维结构, 比较 2 个目标序列相同但三维结构不同的重组抗原 (MEA-26 和 MEA-49) 在样品检测中反应性的差异。用间接 ELISA 方法对 6 个多表位抗原 (MEA-8、MEA-20、MEA-26、MEA-36、MEA-49 和 MEA-52)、3 个亚单位抗原 (AgB1、AgB2 和 AgB4) 和 2 个对照抗原 (Trx 和 Linker) 平行检测 232 份血清样品 (细粒棘球蚴病患者血清 112 份、多房棘球蚴病患者血清 35 份、囊尾蚴病患者血清 43 份和健康人血清 42 份), 并用 ROC 曲线分析不同抗原对细粒棘球蚴病患者血清的诊断价值。 **结果** 三维模型预测结果显示, MEA-26 的表位区域相互靠近, 呈平行排列; MEA-49 表位区域相互分离形成独立的结构域。用 MEA-49 抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的反应性 (2.88±2.02)、敏感性 (92%) 和诊断效率 (89%) 等均高于 MEA-26 抗原 (2.54±2.02, 78%, 82%)。ELISA 结果显示, MEA-20 (2.24±1.31)、MEA-26 (2.54±2.02)、MEA-36 (2.44±1.51)、MEA-49 (2.88±2.02) 和 MEA-52 (2.50±1.37) 等 5 个抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的反应性均高于 AgB1 抗原 (2.15±1.26)。多表位抗原检测多房棘球蚴病患者血清的反应性与 AgB1 抗原的比较, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。MEA-52 抗原检测囊尾蚴病患者血清 (1.27±0.70) 的反应性显著高于 AgB1 抗原 (0.95±0.13) ( $P<0.01$ )。6 个多表位抗原检测健康人血清的反应性仅 MEA-8 抗原的反应性 (1.04±0.15) 与 AgB1 抗原 (0.89±0.07) 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。ROC 曲线结果显示, 3 个亚单位抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的敏感性以 AgB1 抗原最高, 为 77%; MEA-49 (92%)、MEA-36 (92%)、MEA-52 (87%) 和 MEA-26 (78%) 等 4 个多表位抗原的检测敏感性均高于 AgB1 抗原。 **结论** 多表位抗原的总体反应性优于亚单位抗原, MEA-49 抗原对不同患者血清的反应性均强于目标序列相同但三维结构不同的 MEA-26 抗原。

**【关键词】** 细粒棘球蚴; AgB 抗原亚单位; 多表位重组抗原; 血清学分析

中图分类号: R383.33 文献标识码: A

### Serodiagnosis of the Recombinant Multi-epitope Antigens from Antigen B Subunits of *Echinococcus granulosus*

JIANG Li<sup>1\*</sup>, FENG Zheng<sup>2</sup>, ZHANG Yao-guang<sup>1</sup>, WANG Zhen-yu<sup>1</sup>

(1 Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai Institutes of Preventive Medicine, Shanghai 200336, China; 2 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】 Objective** To evaluate the diagnostic value of six recombinant multi-epitope antigens and three AgB subunit antigens from antigen B subunit of *Echinococcus granulosus*. **Methods** A linker sequence was inserted into the sequence of MEA-26 to make it an MEA-49. I-TASSER on-line server was used to analyze protein structure. The reactivity of two multi-epitope recombinant antigens with the same target sequence but in different tertiary structure was compared. The reactivity of six multi-epitope antigens (MEA-8, MEA-20, MEA-26, MEA-36, MEA-49, and MEA-52), 3 subunit antigens (AgB1, AgB2, and AgB4), and 2 control antigens (Trx and linker) was determined by indirect ELISA. The assays were performed on 232 serum samples separated as follows: 112 sera from patients with cystic echinococcosis, 35 sera from individuals with alveolar echinococcosis, 43 sera from patients with cysticercosis and 42 sera from healthy

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30872211)

作者单位: 1 上海市疾病预防控制中心, 上海市预防医学研究院, 上海 200336; 2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: jlsh\_819@163.com

individuals. Their diagnostic performance was assessed by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis. **Results** Tertiary structure prediction showed that the epitope regions of MEA-26 were closer to each other and aligned in parallel, while that in MEA-49 were farther apart from each other and formed two independent domains. Serological analysis revealed that the mean P/N value ( $2.88\pm 2.02$ ), sensitivity (92%) and diagnostic efficiency (89%) of MEA-49 were higher than that of MEA-26 ( $2.54\pm 2.02$ , 78% and 82%). MEA-20 ( $2.24\pm 1.31$ ), MEA-26 ( $2.54\pm 2.02$ ), MEA-36 ( $2.44\pm 1.51$ ), MEA-49 ( $2.88\pm 2.02$ ) and MEA-52 ( $2.50\pm 1.37$ ) showed a high reactivity to the sera from patients with cystic echinococcosis, which was superior to that of AgB1 ( $2.15\pm 1.26$ ). There was no significant difference in the reactivity to sera from individuals with alveolar echinococcosis between multi-epitope antigens and AgB1 ( $P>0.05$ ). MEA-52 showed a high diagnostic sensitivity in cysticercosis cases ( $1.27\pm 0.70$ ), superior to that of AgB1 ( $0.95\pm 0.13$ ) ( $P<0.01$ ). The reactivity of MEA-8 ( $1.04\pm 0.15$ ) to sera from healthy individuals was significantly higher than that of AgB1 ( $0.89\pm 0.07$ ) ( $P<0.01$ ). ROC analysis showed in the cases of cystic echinococcosis, the diagnostic sensitivity accomplished with AgB1, AgB2, and AgB4 was 77%, 55%, and 66%, respectively; the multi-epitope antigens of MEA-49 (92%), MEA-36 (92%), MEA-52 (87%), and MEA-26 (78%) revealed a higher sensitivity than AgB1. **Conclusion** The reactivity of multi-epitope antigens is superior to that of AgB subunit antigens. The reactivity of MEA-49 is higher than that of MEA-26 which has the same target sequence but in different tertiary structure.

**[Key words]** *Echinococcus granulosus*; Antigen B subunit; Multi-epitope antigen; Serological analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30872211)

\* Corresponding author, E-mail: jlsh\_819@163.com

AgB抗原是细粒棘球蚴囊液中含有丰富的主要抗原, 约占粗抗原的90%<sup>[1]</sup>, 具有高度的免疫原性和较好的特异性。AgB抗原是由多个亚单位组成的聚合体蛋白<sup>[2]</sup>, 目前已鉴定的AgB亚单位基因共有5个<sup>[3-5]</sup>。AgB基因的表达受虫株来源、宿主种类和寄生虫发育阶段的影响, 导致不同研究者报告天然AgB抗原的敏感性和特异性差异较大<sup>[6-10]</sup>。如果将各亚单位抗原的特异性优势表位组合在一个抗原分子中, 可能会弥补因各亚单位表达量差异造成的天然抗原不稳定的缺点, 进而提高AgB抗原的诊断效率。本课题组在前期的研究中对AgB抗原家族的5个亚单位抗原对棘球蚴患者血清的反应性进行了分析<sup>[11]</sup>, 结果表明, 来源于棘球蚴不同虫种的相同亚单位(垂直同源亚基, orthologous subunit)的氨基酸序列同源性较高(83.1%~96.7%), 对棘球蚴病患者血清的反应性也基本一致。而种内不同亚单位(平行同源亚基, paralogous subunit)由于序列差异较大(27.5%~70.0%), 对患者血清的识别反应性差异也较大。其中, 以AgB1、AgB2和AgB4抗原的反应性较强, AgB3和AgB5抗原的反应性较弱。提示AgB3和AgB5两个亚单位不是刺激机体产生特异性抗体的有效抗原, 或者因表达量较少, 致使其相应的抗体应答不足。因此, 本课题组认为AgB抗原家族中与诊断相关的主要亚单位是AgB1、AgB2和AgB4, 其中诊断价值以AgB1最高。该研究还证实多个亚单位的组合抗原可提高阳性检出率<sup>[11]</sup>。

随后, 本课题组又对AgB1、AgB2和AgB4这3个亚单位的抗原表位进行了分析。根据已有的文献资料

和对AgB各亚单位抗原表位的预测分析<sup>[12]</sup>, 合成了5个多肽用于分析3个亚单位的表位区域<sup>[13]</sup>。基于上述研究, 本课题组选择3个亚基和4个表位的序列作为合成多表位抗原的源序列。用I-TASSER在线服务器对拟进行组合的亚基和表位的57种不同连接方式进行了结构预测, 选择预测结构最佳的6种组合进行重组和表达, 获得了6个多表位重组抗原<sup>[14]</sup>。本研究对这6个多表位重组抗原的血清学反应性进行分析和评价。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 主要试剂和仪器 牛血清白蛋白、吐温-20和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人IgG均购自美国Sigma公司, 四甲基联苯胺底物(TMB)购自德国Merck公司。全自动酶标仪(Multiskan spectrum 1500-342)为芬兰Thermo公司产品。

1.2 抗原 所用的抗原均为前期研究获得。3个AgB亚单位重组抗原为细粒棘球蚴来源的AgB1、AgB2和AgB4<sup>[12,15]</sup>; 6个多表位重组抗原(MEA-8、MEA-20、MEA-26、MEA-36、MEA-49和MEA-52)的合成和表达参见文献<sup>[14]</sup>, 其中, 在MEA-26抗原中插入一段Linker序列, 使其三维结构发生变化, 成为MEA-49抗原。6个多表位重组抗原为分别含有2~5个AgB亚单位或表位的组合抗原(表1)。由于在所有的重组抗原中, 除了含有AgB亚单位基因序列外, 还含有Trx(thioredoxin protein, 硫氧还蛋白)融合蛋白序列。为分析这些非AgB基因来源序列的表达蛋白在重组抗

原中的反应性,选择Trx抗原(为pET32a+空载体诱导表达后纯化的标签蛋白)和Linker抗原(一段来源于细粒棘球蚴基因的单独表达蛋白)为对照抗原,以观察待测血清样品与重组抗原中Trx蛋白和Linker蛋白的反应性。

表1 6个多表位重组抗原中AgB亚单位或表位不同组合方式  
Table 1 The different combination of AgB subunits or epitopes in six multi-epitope antigens

抗原 Antigen	AgB全序列(亚单位) Complete sequence of AgB (subunit)	AgB部分序列(表位) Partial sequence of AgB (epitope)	融合蛋白 Fusion protein
MEA-8		AgB2、AgB4	Trx
MEA-20	AgB4、AgB1		Trx
MEA-26	AgB1	AgB2、AgB4	Trx
MEA-36	AgB4、AgB1、AgB2		Trx
MEA-49	AgB1	AgB2、AgB4	Trx、Linker
MEA-52	AgB1、AgB4、AgB1	AgB2、AgB4	Trx

1.3 血清 来源于新疆、青海和四川的流行区,经手术或临床确诊的棘球蚴病患者。其中,细粒棘球蚴病(cystic echinococcosis)患者血清112份,多房棘球蚴病(alveolar echinococcosis)患者血清35份,囊尾蚴病(cysticercosis)患者血清43份。健康人血清42份,来自流行区(新疆20份)和非流行区(上海市22份)。上述所有血清样品均排除了其他寄生虫感染,且经过囊液粗抗原检测证实抗体为阳性(棘球蚴病血清)或阴性(健康人血清)。

## 2 方法

2.1 蛋白结构对抗原反应性的影响 使用I-TASSER在线服务器(<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>)<sup>[16-18]</sup>模拟分析多表位重组抗原MEA-26和MEA-49的三维结构,并分析该2个目标序列相同但三维结构不同的抗原在血清样品检测中反应性的差异。

2.2 ELISA检测抗原的反应性 采用间接ELISA方法分析11个抗原(3个亚单位重组抗原AgB1、AgB2和AgB4,6个多表位重组抗原MEA-8~52以及2个对照抗原Trx和Linker)与多房棘球蚴病、细粒棘球蚴病和囊尾蚴病患者血清,以及健康人血清4组共232份的反应性。步骤如下:以本室保存的标准阳性血清和阴性血清作为不同批次检测实验的质控血清。将稀释至工作浓度的抗原(5 μg/ml)包被96孔板,每孔100 μl,4℃过夜,用含0.05%吐温-20的PBS洗板3次,1%牛血清白蛋白37℃封闭1h,同上洗涤3次,加入1:200稀释的待检血清100 μl,37℃孵育1h,同上洗板3次,加入羊抗人HRP-IgG(1:2500)100 μl,37℃孵育1h。洗涤后,TMB显色20 min,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,

全自动酶标仪测定吸光度(A<sub>450</sub>值)。不同批次检测数据用P/N比值(P为检测血清样品的A<sub>450</sub>值,N为阴性质控血清A<sub>450</sub>均值)进行标准化。

2.3 受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析 应用SPSS 13.0软件包中的受试者工作特征曲线综合评价ELISA检测中不同抗原对细粒棘球蚴病患者血清的诊断价值,计算各种抗原检测样品的临界值(敏感性与特异性之和为最大值时的P/N值)和线下面积(即诊断效率)。ROC曲线下的面积表示诊断系统中阳性和阴性诊断结果分布的重叠程度,反映诊断试验价值的大小,面积越大表明诊断价值越高,并通过计算ROC曲线下面积(范围0.5~1)作定量分析。

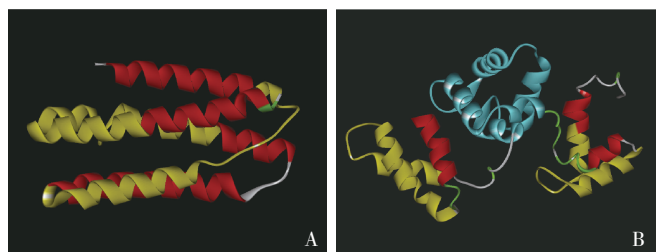
## 3 统计学分析

对不同抗原检测分组血清的P/N均值进行比较,由于样本数据非正态分布,采用非参数统计方法,检验水准α=0.05。

## 结 果

### 1 蛋白结构对抗原反应性的影响

I-TASSER在线服务器预测多表位抗原MEA-26和MEA-49的三维结构模型结果显示,表位区域在2个蛋白中的结构明显不同,MEA-26抗原的表位区域相互靠近,呈平行排列;MEA-49抗原由于Linker序列的插入,表位区域相互分离形成独立的结构域(图1)。血清学分析结果显示(表2),MEA-49抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的P/N平均值(2.88±2.02)、敏感性(92%)和诊断效率(89%)等均高于MEA-26抗原(2.54±2.02, 78%, 82%)。



A: MEA-26; B: MEA-49。

注:黄色显示表位区域,蓝色为linker序列。

Note: Yellow parts showed the reactive epitopes, blue part showed the linker sequence.

图1 MEA-26和MEA-49抗原的三维结构预测模型

Fig. 1 Tertiary structural models of MEA-26 and MEA-49 antigens

### 2 ELISA检测结果

3个亚单位重组抗原AgB1、AgB2和AgB4,6个多



表位组合抗原以及2个对照抗原Trx和Linker共11个抗原分别检测细粒棘球蚴病、多房棘球蚴病和囊尾蚴病患者血清, 以及健康人血清的ELISA结果显示, Trx和Linker对照抗原与4组血清的反应均值相近, 无统计学差异 ( $P>0.05$ )。6个多表位抗原检测健康人血清的反应性仅MEA-8抗原的反应性 ( $1.04\pm 0.15$ ) 与AgB1抗原差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 提示MEA-8抗原的非特异性反应较高。MEA-20 ( $2.24\pm 1.31$ )、MEA-26 ( $2.54\pm 2.02$ )、MEA-36 ( $2.44\pm 1.51$ )、MEA-49 ( $2.88\pm 2.02$ ) 和MEA-52 ( $2.50\pm 1.37$ ) 等5个多表位抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的反应性均高于AgB1抗原 ( $2.15\pm 1.26$ ), 其中, MEA-49和MEA-52抗原的反应性与AgB1抗原的差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。仅MEA-8抗原 ( $1.62\pm 1.04$ ) 低于AgB1抗原, 但无统计学差异 ( $P>0.05$ )。多表位抗原检测多房棘球蚴病患者血清的反应性与AgB1抗原的比较, 差异无统计学 ( $P>0.05$ )。MEA-52抗原检测囊尾蚴病患者血清 ( $1.27\pm 0.70$ ) 的反应性显著高于AgB1抗原 ( $0.95\pm 0.13$ ) ( $P<0.01$ ) (表2)。

表2 ELISA法检测亚单位重组抗原和多表位重组抗原的反应性  
Table 2 Reactivities of subunit antigens and multi-epitope antigens from AgB subunits of *Echinococcus granulosus* detected by ELISA

抗原 Antigen	细粒棘球蚴病 患者血清 Serum from patients with cystic echinococcosis	多房棘球蚴病 患者血清 Serum from patients with alveolar echinococcosis	囊尾蚴病 患者血清 Serum from patients with cysticercosis	健康人 血清 Serum from healthy persons
AgB1	2.15±1.26	1.36±0.61	0.95±0.13	0.89±0.07
AgB2	1.40±0.68	1.02±0.36	0.97±0.20	1.03±0.14
AgB4	1.93±1.23	1.32±0.44	1.14±0.22	1.12±0.10
MEA-8	1.62±1.04	1.25±0.46	0.94±0.12	1.04±0.15**
MEA-20	2.24±1.31	1.47±0.93	0.83±0.25	0.89±0.28
MEA-26	2.54±2.02	1.31±0.94	0.95±0.17	0.94±0.09
MEA-36	2.44±1.51	1.66±1.11	0.85±0.23	0.92±0.19
MEA-49	2.88±2.02**	1.58±1.26	0.99±0.51	0.83±0.16
MEA-52	2.50±1.37**	1.85±1.22	1.27±0.70**	0.97±0.10
Linker	1.17±0.30	0.97±0.30	1.10±0.48	1.02±0.12
Trx	1.12±0.31	1.04±0.28	0.96±0.15	0.94±0.11

注: 与 AgB1 比较, \*\*  $P<0.01$ 。Note: vs. AgB1, \*\*  $P<0.01$ .

### 3 诊断价值分析

ROC曲线结果显示, 3个亚单位抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的敏感性以AgB1最高, 为77%; MEA-49 (92%)、MEA-36 (92%)、MEA-52 (87%) 和MEA-26 (78%) 等4个多表位抗原的检测敏感性均高于AgB1; MEA-8 (63%) 和MEA-20 (61%) 的敏感性低于AgB1 (表3)。

表3 不同抗原检测血清的诊断价值分析

Table 3 Diagnostic value of different antigens in sera from cystic echinococcosis patients

抗原 Antigen	阴性对照 血清 Negative control serum	临界值 Cut-off value	敏感性/% Sensitivity/%	特异性/% Specificity/%	线下面积 Area under ROC curve
AgB1	0.89	1.60	77	83	0.87
AgB2	1.03	1.45	55	89	0.75
AgB4	1.12	1.49	66	83	0.77
MEA-8	1.04	1.48	63	84	0.81
MEA-20	0.89	1.50	61	89	0.83
MEA-26	0.94	1.59	78	82	0.82
MEA-36	0.92	1.62	92	70	0.88
MEA-49	0.83	1.64	92	73	0.89
MEA-52	0.97	1.56	87	69	0.85

## 讨 论

由于本研究使用的重组抗原中均含有融合蛋白<sup>[14]5</sup>, 因此将重组抗原中的非AgB成分Trx和Linker蛋白单独表达作为对照抗原, 观察它们与各血清样品的反应性, 结果显示, Trx和Linker对照抗原与4组血清的反应均值相近, 无显著差异 ( $P>0.05$ ), 表明重组抗原中的Trx和Linker序列对特异性检测无明显影响。因此, 可排除重组抗原中包含的Trx蛋白和Linker蛋白与各血清样品的非特异性反应, 而重组抗原与不同组别血清反应的差异可认为是由于目的序列 (AgB序列) 不同而产生的。

本研究结果显示, 在6个多表位抗原中, MEA-8是惟一不含AgB1序列的多表位抗原, 在平行检测中, AgB2和AgB4亚单位对细粒棘球蚴病患者血清的检测敏感性分别为55%和66%。含有AgB2和AgB4 2个亚单位的多表位抗原MEA-8保持AgB2和AgB4亚单位的检测敏感性 (63%), 但敏感性仍低于AgB1抗原 (77%), 检测健康人血清的非特异性也偏高 ( $1.04\pm 0.15$ ); 在平行检测中, 检测细粒棘球蚴病患者血清敏感性最高的亚单位是AgB1, 为77%; 5个含有AgB1抗原表位的多表位组合抗原检测细粒棘球蚴病患者血清的P/N均值均高于AgB1, 且4个多表位抗原的检测敏感性也高于AgB1亚单位抗原, 其中检测敏感性最高 (MEA-36和MEA-49) 可达92%。上述2个多表位抗原中, 除了含有AgB1亚单位基因外, 还含有AgB2和AgB4亚单位 (MEA-36) 或者表位 (MEA-49), 提示AgB2和AgB4抗原表位可协同AgB1表位提高检出率。本课题组也尝试合成了多重表位的抗原MEA-52, 即含有2个AgB1、2个AgB4和1个AgB2共5个表位, 血清学测试表明MEA-52抗原与囊尾蚴病患者血清的非特异性反应性较高, 结果并不理想。

AgB1 抗原是 3 个亚单位抗原中反应性最高的抗原<sup>[1]</sup>，因此，本研究在对多表位重组抗原反应性的统计学分析中，选择 AgB1 作为比较的对照组抗原，以观察多表位重组抗原的反应性是否优于 AgB 亚单位抗原。分析显示，MEA-20、MEA-26、MEA-36、MEA-49 和 MEA-52 等 5 个多表位抗原检测细粒棘球蚴病患者血清反应性 (P/N 均值) 均高于 AgB1。本研究 ROC 曲线分析结果显示，MEA-49、MEA-36、MEA-52 和 MEA-26 等 4 个抗原敏感性均高于 AgB1 抗原。提示多表位抗原的总体反应性优于亚单位抗原。该结果证实了本研究的假设，即将各亚单位抗原的特异性优势表位组合在一个抗原分子中，可能弥补因各亚单位表达量差异造成的天然抗原不稳定的缺点，进而提高 AgB 抗原的诊断效率。同时也为 AgB 抗原在棘球蚴病诊断中的进一步应用和抗原的标准化制备带来一线希望。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Musiani P, Piantelli M, Lauriola L, *et al.* *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids[J]. *J Clin Pathol*, 1978, 31(5): 475-478.
- [ 2 ] Lightowlers MW, Liu D, Haralambous A, *et al.* Subunit composition and specificity of major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, 37(2): 171-182.
- [ 3 ] Haag KL, Alves-Junior L, Zaha A, *et al.* Contingent, non-neutral evolution in a multicellular parasite: natural selection and gene conversion in the *Echinococcus granulosus* antigen B gene family[J]. *Gene*, 2004, 333: 157-167.
- [ 4 ] Mamuti W, Sako Y, Bart JM, *et al.* Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa-subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6 [J]. *Parasitol Int*, 2007, 56(4): 313-316.
- [ 5 ] Mamuti W, Sako Y, Xiao N, *et al.* *Echinococcus multilocularis*: developmental stage-specific expression of antigen B 8-kDa subunits[J]. *Exp Parasitol*, 2006, 113(2): 75-82.
- [ 6 ] Barbieri M, Fernández V, González G, *et al.* Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis [J]. *Parasite Immunol*, 1998, 20(2): 51-61.
- [ 7 ] Ito A, Ma L, Schantz PM, *et al.* Differential serodiagnosis for cystic and alveolar echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (EM18) [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 60(2): 188-192.
- [ 8 ] Lorenzo C, Ferreira HB, Monteiro KM, *et al.* Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(6): 2764-2770.
- [ 9 ] de la Rue ML, Yamano K, Almeida CE, *et al.* Serological reactivity of patients with *Echinococcus* infections (*E. granulosus*, *E. vogeli*, and *E. multilocularis*) against three antigen B subunits [J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(3): 741-745.
- [10] Tawfeek GM, Elwakil HS, El-Hoseiny L, *et al.* Comparative analysis of the diagnostic performance of crude sheep hydatid cyst fluid, purified antigen B and its subunit (12 kDa), assessed by ELISA, in the diagnosis of human cystic echinococcosis[J]. *Parasitol Res*, 2011, 108(2): 371-376.
- [11] Jiang L, Zhang YG, Liu MX, *et al.* Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis[J]. *Exp Parasitol*, 2012, 131(1): 85-91.
- [12] 江莉, 冯正, 胡薇, 等. 棘球蚴AgB抗原家族基因的克隆及抗原表位的预测分析 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2010, 28(5): 368-371.
- [13] 江莉, 李雄, 张耀光, 等. 用合成多肽分析细粒棘球蚴AgB抗原亚单位的反应性表位[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2011, 29(6): 404-409.
- [14] 江莉, 张耀光, 蒋守富, 等. 细粒棘球蚴抗原B表位结构的预测分析和多表位重组抗原的构建 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2012, 30(4): 279-283.
- [15] 江莉, 冯正, 许学年, 等. 细粒棘球蚴AgB亚单位抗原的基因克隆和表达系统的优化[J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(6): 539-542.
- [16] Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(4): 725-738.
- [17] Roy A, Xu D, Poisson J, *et al.* A protocol for computer-based protein structure and function prediction [J]. *J Vis Exp*, 2011, (57): e3259.
- [18] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 40.

(收稿日期: 2013-04-09 编辑: 张争艳)