

简单异尖线虫 D-天冬氨酸蛋白酶基因的克隆和表达

倪芳, 徐世三, 王逸难, 余长茂, 罗大民*

【摘要】目的 克隆简单异尖线虫 期幼虫(L₃)的 D-天冬氨酸蛋白酶基因(*AsAP*)全长, 研究其表达蛋白的特性。方法 根据 GenBank 中简单异尖线虫 D-天冬氨酸蛋白酶基因表达序列标签的部分信息, 设计特异引物并用 cDNA 末端快速扩增技术得到 *AsAP* 全长序列, 分析推导的蛋白序列特征, 并预测其三级结构。用 RT-PCR 扩增简单异尖线虫 L₃ 的 *AsAP* 基因编码序列, 产物用 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切, 连入表达载体 pET32a(+), 转化大肠埃希菌 (*E. coli*) BL21 (DE3), 以异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 表达产物经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测。结果 简单异尖线虫 L₃ 的 *AsAP* 基因全长 1 753 bp, 编码 453 个氨基酸, 与锡兰钩虫 (*Ancylostoma ceylanicum*) 的 D-天冬氨酸蛋白酶相似性达 65%。该蛋白具有两个保守的催化域, 1 个活性中心翼环, S2 和 S3 亚位点各 1 个; 具有由 20 个氨基酸组成的 N 端信号肽, 构成疏水性强的跨膜域。不同浓度的 IPTG (0.2~1.6 mmol/L) 诱导对 *AsAP* 表达的影响较小, 1.0 mmol/L IPTG 诱导 2 h 后表达量达到最高水平。结论 克隆并表达了简单异尖线虫的 D-天冬氨酸蛋白酶。

【关键词】 简单异尖线虫; D-天冬氨酸蛋白酶; 克隆; 原核表达

中图分类号: R941.524 文献标识码: A

Cloning and Expression of D-like Aspartic Protease of *Anisakis simplex*

NI Fang, XU Shi-san, ZHANG Shao-lei, XU Chang-mao, LUO Da-min*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

【Abstract】 **Objective** To clone and express the full length of D-like aspartic protease gene (*AsAP*) of the third stage larvae of *Anisakis simplex*. **Methods** According to the partial information of D-like aspartic protease encoding gene of *A. simplex* from GenBank, specific primers were designed to amplify 3' end and 5' end of *AsAP* gene using rapid amplification of cDNA ends (RACE), and the full length of the D-like aspartic protease gene was obtained. Using total RNA of the third-stage larvae of *A. simplex*, coding sequence of the *AsAP* gene was amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR). The PCR product was digested by *EcoR* and *Sal*, and cloned into pET32 vector. The recombinant plasmid was checked by double enzyme digestion and sequencing, and the positive recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Expression of the protein induced by IPTG under gradient concentration and different time was conducted. **Result** A 1 753 bp full length of *AsAP* was obtained, which contained 30 bp 5'UTR, 361 bp 3'UTR and a 1 362 bp open reading frame (ORF) encoding 453 amino acids with a predicted molecular mass of *M_r* 50 726. It showed 65% identity with the D-like aspartic protease of *Ancylostoma ceylanicum*. The predicted amino acid sequence contains two conserved catalytic motif, an active site flap, an S2 subsite and an S3 subsite. A 20 amino acids signal peptide was found in the N-terminus, with significant hydrophobic property. Different concentration of the IPTG (0.2~1.6 mmol/L) showed little effect on the expression, and the production of the protein was up to maximum after 2 hours induction. **Conclusion** The *AsAP* gene has been cloned and expressed.

【Key words】 *Anisakis simplex*; D-like aspartic protease; Cloning; Prokaryotic expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171595) and the Natural Science Fund of Fujian Province (No. 2010J01229).

* Corresponding author, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

简单异尖线虫 (*Anisakis simplex*) 第 期幼虫

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81171595); 福建省自然科学基金 (No. 2010J01229)

作者单位: 厦门大学生命科学院, 厦门 361005

* 通讯作者, E-mail: dmluo@xmu.edu.cn

(L₃)是可引起异尖线虫病的病原线虫之一^[1,2], 在中国台湾海峡约有 21.3% 的鱼类感染简单异尖线虫 L₃^[3], 人食用含有简单异尖线虫 L₃ 的生鱼片或未煮熟的鱼后, L₃ 侵入肠胃粘膜等处, 并释放分泌/排泄蛋白, 引起

人体 IgE 介导的过敏反应^[4,5]。目前,围绕诊断与治疗该病而寻找抗原和过敏原蛋白的研究日渐增多,已在简单异尖线虫中找到 9 种与该病有关的蛋白^[6]。天冬氨酸蛋白酶存在于多种寄生和非寄生物种体内,如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[7]、日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)^[8]、犬钩虫(*Ancylostoma caninum*)^[9]、美洲钩虫(*Necator americanus*)^[10,11]和南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)^[12]等。该蛋白酶对寄生虫入侵宿主组织、摄食、诱导细胞坏死和衰老等都起着重要作用^[7,10,11,13],因而是研制寄生虫疫苗的潜在候选分子^[9]。本研究拟克隆表达简单异尖线虫的天冬氨酸蛋白酶,分析其结构并探讨该蛋白酶在寄生过程中的作用,同时为寻找宿主表达的对应的酶抑制剂或药物靶标提供依据。

材料与方 法

1 实验材料

从厦门市场购买的新鲜海鱼内脏,分离获得简单异尖线虫 L₃。大肠埃希菌(*E. coli*) BL21 (DE3) 和 DH5 α 均由本实验室保存。

2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒 (RNAPrep pure Tissue)、质粒提取试剂盒 (TIANprep Mini Plasmid Kit) 和 2 \times Taq 酶混合物 (2 \times Taq Plus PCR MasterMix) 购自天根生物技术(北京)有限公司; Taq 酶、Sal^I、EcoR^I、3' cDNA 末端快速克隆 (RACE) 试剂盒 (3'-Full RACE Core Set Ver 2.0)、cDNA 合成试剂盒 (1st Strand cDNA Synthesis Kit)、DNA 标志物和 T₄ 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、过硫酸胺、N,N,N',N'-四甲基二乙胺(TEMED)、胶回收试剂盒(EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit) 均购自生工生物工程(上海)有限公司。PCR 仪(C1000™ Thermal Cycler) 产自日本,凝胶成像分析系统(BIO-RAD)产自美国,水平电泳仪(DYY-8C)产自北京市六一仪器厂,垂直蛋白电泳仪(SE 250)产自美国。

3 简单异尖线虫 L₃ 的 AsAP 基因全长克隆

参考 GenBank 中简单异尖线虫的 EST 序列(EH005287) 设计特异引物, AsAP-F: 5'-GGAGACAT-CACCTGCTAAA-3', AsAP-R: 5'-TGAGGAGGAGTT-CCAATC-3'。取 5 条简单异尖线虫 L₃ 提取总 RNA; 取 5.5 μ l 总 RNA, 用 3'RACE 试剂盒反转录; 取产物 4 μ l 加 AsAP-F 和 3'RACE 外引物 (5'-TACCGTCGT-

TCCACTAGTGATTT-3') 各 1.5 μ l, 加入 25 μ l 2 \times Taq 酶混合物, 反应总体积为 50 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。取 43.5 μ l 总 RNA 用 5'RACE 试剂盒进行反转录, 取产物 0.8 μ l 加 AsAP-R 和 5'RACE 外引物 (5'-CATGGCTACATGCTGACAGCCTA-3') 各 0.5 μ l, 加入 7.5 μ l 2 \times Taq 酶混合物, 加入 ddH₂O 至总体积为 15 μ l。除 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环外, 其他步骤和条件同前。取第 1 轮 PCR 产物 (1:100) 为模板, 以 AsAP-F 和 3'RACE 内引物 (5'-CGCGGA-TCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'); AsAP-R 和 5'RACE 内引物 (5'-CGCGGATCCACAGCCTACTGAT-GATCAGTCGATG-3') 进行第 2 轮 PCR, 反应体系和条件同上。后续 PCR 产物凝胶电泳、回收、连接 pMD18-T 载体和测序等均为常规方法。用分子生物学综合应用软件(DNAMAN)拼接 3'和 5'RACE 测序结果后得到 AsAP 基因全长。

4 简单异尖线虫 L₃ 的 AsAP 基因及蛋白的分析

在线预测该基因表达的蛋白序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), 并用 SignalP 3.0 分析蛋白的信号肽。将推导的蛋白质序列进行 BLASTP 比对数据库, 并应用 ClustalW2 与相似性较高的其他物种的天冬氨酸蛋白酶序列进行比对, 结合在线软件 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>和 <http://www.expasy.org/prosite/> 预测蛋白的结构域, 用 Swiss-Model 模拟三级结构, 找出各结构域在三级结构中的空间位置。

5 pET32a-AsAP 重组质粒的构建

根据 AsAP 设计表达成熟多肽的正向引物 (ExAsAP-F): 5'-CCGGAATTCAGAAGCCGTCGTGTC-CAT-3', 反向引物 (ExAsAP-R): 5'-ACGCGTCGACC-TATCAAGCGTCACTCCG-3'。同前, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA。取 cDNA 5 μ l, 加入 5 μ l 10 \times 缓冲液, 8 μ l 脱氧核苷三磷酸 (dNTP, 2.5 mmol/L), ExAsAP-F 和 ExAsAP-R (10 mmol/L) 各 4 μ l, 1 μ l Taq 酶 (5 U/ μ l), 6 μ l MgCl₂ (25 mmol/L) 至总体积 50 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。取 PCR 产物 42 μ l、10 \times H 缓冲液 5 μ l、EcoR^I 和 Sal^I 各 2 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h; 同时取 16 μ l pET32a 载体、10 \times H 缓冲液 2 μ l、EcoR^I 和 Sal^I 各 1 μ l, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h。产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段。取 14 μ l 双酶切的 PCR 产物、2 μ l 双酶切的 pET32a(+) 载体、2 μ l T₄ 连接酶、2 μ l 10 \times 连

接缓冲液，16℃连接过夜。连接产物转入 *E. coli* DH5 α 感受态，LB 平板筛选、挑取单克隆、摇菌过夜，提取质粒、双酶切鉴定、测序。将构建好的 pET32a (+)-*AsAP* 重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3)，用 LB 平板过夜筛选。

6 重组蛋白的表达

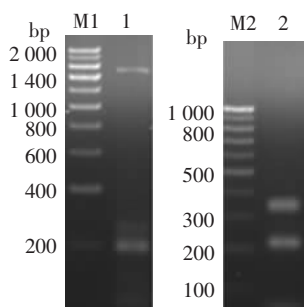
挑取阳性克隆，37℃摇菌过夜，接种至新的 LB 培养基，再摇至吸光度 (A_{600} 值) 0.6~0.8。取 9 支试管，每支加 2 ml 活化菌液，再分别加入终浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)，37℃ 180 r/min 摇菌 4 h。每管分别取 1 ml 诱导的菌液，12 000 $\times g$ 离心 1 min，收集菌体加入 50 μ l 1 \times SDS 上样缓冲液悬浮菌体，沸水浴 5 min，12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳、染色。同时另取 50 ml 活化菌液，加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L，37℃ 180 r/min 摇菌，每 0.5 h 取 1 ml 菌液，一共取 8 次并进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白表达量。

结 果

1 RACE 扩增结果

经 PCR 扩增，3'RACE 得到一条约 1 500 bp 目的片段和两条 200~300 bp 的条带；5'RACE 得到约 350、200 和小于 100 bp 的条带 (图 1)。将约 1 500 bp 和 350 bp 的片段回收测序，测序结果为 1 511 bp 和 386 bp，3'端有多聚 A 出现。用 DNAMAN 拼接 3'RACE 和 5'RACE 所得的序列，得到全长 1 753 bp 的简单异尖线虫 *AsAP* 基因，上传至 GenBank，登录号为 GU073453。

2 简单异尖线虫 *AsAP* 基因和蛋白的特征分析

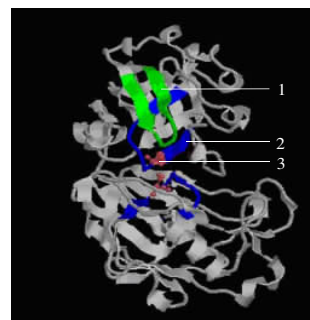


M1: DNA 标记物 (200 bp); 1: 3'RACE PCR 产物; M2: DNA 标记物 (100 bp); 2: 5'RACE PCR 产物。

M1: DNA marker (200 bp), 1: PCR products of 3'RACE; M2: DNA marker (100 bp), 2: PCR products of 5'RACE.

图 1 *AsAP* 基因 3'RACE 和 5'RACE 的 PCR 产物
Fig. 1 Electrophoresis of *AsAP* gene 3'RACE and 5'RACE PCR products

AsAP 包括 30 bp 的 5'UTR 和 361 bp 的 3'UTR，其编码 453 个氨基酸，前 20 位为信号肽。通过 BLASTP 比对，简单异尖线虫的天冬氨酸蛋白酶与钩虫的组织蛋白酶 D-天冬氨酸蛋白酶相似性较高，如与锡兰钩虫 (*Ancylostoma ceylanicum*) 的天冬氨酸蛋白酶序列相似性达到 65%。结构域预测表明，在 123~134 位 (VIFDTGSSNLWV) 和 310~321 位 (AIADTGTSLIAG) 有两个保守的催化域，是该酶的活性部位，在每个活性部位中有 1 个天冬氨酸作为活性中心，另外在 167~178 位 (QIQYGTGSMKG) 有一段由 11 个氨基酸构成的活性中心翼环。在 107 位的谷氨酰胺 (Q107) 形成了 S3 亚位点，在 389~391 位 (MGI) 形成了 S2 亚位点。三级结构显示，2 个保守的活性部位是一个深宽的裂缝，形成 β -发夹结构，2 个天冬氨酸残基均位于活性部位的裂缝中心 (发夹结构的底部)；11 个氨基酸构成的活性中心翼环也形成了一个 β -发夹结构 (图 2)。



1: 催化域 Catalytic motif; 2: 活性中心翼环 Active site flap; 3: 催化中心的天冬氨酸残基 Catalytic residue.

图 2 组织蛋白酶 D-天冬氨酸蛋白酶三级结构
Fig. 2 3D structure of the D-like aspartic protease

3 重组表达载体 pET32a(+)-*AsAP* 双酶切鉴定

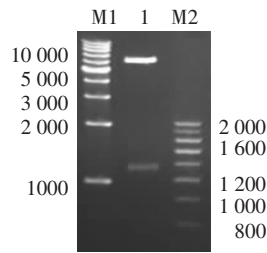
EcoR 和 *Sal* 双酶切表达基因和 pET32a，回收产物并连接，转入 *E. coli* DH5 α ，提取质粒，经 *EcoR* 和 *Sal* 双酶切后有 2 条带，1 条约为 6 000 bp，另 1 条约为 1 300 bp (图 3)，与目的基因大小基本相符，证明重组表达载体构建成功。

4 重组蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 结果显示，不同浓度的 IPTG (0.2~1.6 mmol/L) 诱导的结果基本相同，均在相对分子质量 (M_r) 约 60 000 处出现一表达条带 (图 4)，且与目的蛋白大小相符，未经诱导的对照组无此条带。以 1.0 mmol/L IPTG 诱导后 2 h，表达量最高 (图 5)。

讨 论

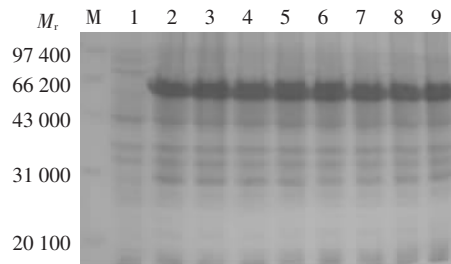
异尖线虫病主要是由于异尖线虫幼虫的分泌/排泄



M1, M2: DNA 标记物; 1: 重组质粒 pET32a(+)-AsAP 双酶切结果。
M1, M2: DNA marker; 1: pET32a(+)-AsAP digested by *EcoR*I and *Sal*I.

图 3 重组质粒 pET32a(+)-AsAP 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pET32a(+)-AsAP by restriction endonuclease

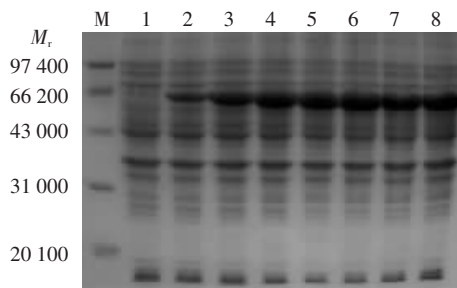


M: 蛋白标志物; 1~9: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mmol/L IPTG 分别诱导。

M: Protein Marker; 1~9: Induced with 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, and 1.6 mmol/L IPTG respectively.

图 4 重组蛋白不同浓度 IPTG 诱导表达 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein induced with different concentration of IPTG



M: 蛋白标志物; 1~8: 1mmol/L IPTG 分别诱导 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 h。

M: Protein marker; 1~8: After 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, and 3.5 h induction with 1 mmol/L IPTG respectively.

图 5 诱导不同时间重组蛋白表达量的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein expression at different time

蛋白所引起的 IgE 介导的过敏反应, 这些蛋白似乎有利于异尖线虫的寄生。在简单异尖线虫中已经报道的抗原和过敏原有肌钙蛋白 C Ani s 1^[14,15], 副肌球蛋白 Ani s 2^[16], 原肌球蛋白 Ani s 3^[17], 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Ani s 4^[4,18], SXP/RAL-2 蛋白质家族的 Ani s 5^[19], Ani s 8^[19,20] 和 Ani s 9^[6], 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Ani s 6^[19], 过敏原 Ani s 7^[21]。

组织蛋白酶 D-天冬氨酸蛋白酶, 在寄生虫的生长发育、宿主致病、免疫逃避和组织入侵中均起重要的作用。例如, 以血液为食的血吸虫和钩虫的天冬氨酸蛋白酶能够水解血红蛋白和皮肤大分子^[11,13]。在麝猫后睾吸虫 (*Opisthorchis viverrini*) 的不同发育时期以及同一发育期的不同组织中和分泌物中也均发现了天冬氨酸蛋白酶, 说明其可能是一种多功能蛋白酶^[22]。天冬氨酸蛋白酶还被认为是潜在的疫苗候选分子。用天冬氨酸重组蛋白所做的疫苗能防止狗感染钩虫后的血液流失和贫血, 并能显著降低狗粪便中钩虫卵的数量^[23]。因此, 借助重组蛋白的表达研究, 可以进一步从事病原免疫诊断和探究致病机制的研究。

本研究中得到的 D-天冬氨酸蛋白酶 N 端具有 20 个氨基酸残基构成的信号肽, 为蛋白酶分泌到体外提供了一个信号。三级结构表明, D-天冬氨酸蛋白酶的两个保守的催化中心是高度对称的, 这两个天冬氨酸残基表现为“催化二联体”的作用。活性中心翼环延伸到活性部位上, 帮助活性部位固定底物, 活性部位形成的发夹式的裂缝提供了一个特殊的底物结合位点。S3 (107) 亚位点的谷氨酰胺是一个非常保守的位点, 在底物与酶结合的过程中起重要作用。S2 亚位点 (389~391) 是由 Met-Gly-Ile 3 个氨基酸残基结构的, 在不同的物种中有所变化, 如在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和斑马鱼 (*Danio rerio*) 是 Met-Gly-Leu; 哺乳动物和美洲钩虫中是 Met-Gly-Met, 日本血吸虫中则为 Ile-Gly-Met, 在鸡中为 Ser-Gly-Leu。S2 亚位点也在底物与酶的结合过程中起重要作用, 结构的变化则表示不同物种的天冬氨酸蛋白酶催化的特异性^[8]。

参 考 文 献

- [1] Moneo I, Caballero ML. *Anisakis simplex* larvae release allergens during a short incubation in diluted acid which can be used for clinical diagnosis [J]. *Alergol Immunol Clin*, 2002, 17(4): 201-207.
- [2] Farjallah S, Slimane BB, Busi M, et al. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the north African coasts of Mediterranean sea [J]. *Parasitol Res*, 2008, 102(3): 371-379.
- [3] Luo DM, Fang WZ. Study on infestation and dynamic of anisakiasis pathogen in marine fishes from Taiwan Strait [J]. *J Oceanography Taiwan Strait*, 2000, 19(2): 218-222. (罗大民, 方文珍. 异尖线虫病病原线虫在台湾海峡鱼类中的分布及动态 [J]. 台湾海峡, 2000, 19(2): 218-222.)
- [4] Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Munoz M, Gomez-Aguado F, et al. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor [J]. *Int J Parasitol*, 2007, 37(8/9): 907-917.
- [5] Scala E, Giani M, Pirota L, et al. Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex* [J]. *Eur J Dermatol*, 2001, 11(3): 249-250.
- [6] Rodriguez-Perez R, Moneo I, Rodriguez-Mahillo A, et al. Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2008, 159(2): 92-97.

[7] Samara C, Tavernarakis N. Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C. elegans* [J]. Ageing Res Rev, 2003, 2(4): 451-471.

[8] Becker MM, Harrop SA, Dalton JP, et al. Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation [J]. J Biol Chem, 1995, 270(41): 24496-24501.

[9] Yang YR, Wei H, Qin Weiwen, et al. Expression and characterization of aspartic protease gene in eggs and larvae stage of *Ancylostoma caninum* [J]. Parasitol Res, 2009, 104(6): 327-1333.

[10] Brown A, Girod N, Billett EE, et al. *Necator americanus* (human hookworm) aspartyl proteinases and digestion of skin macromolecules during skin penetration [J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 60(5): 840-847.

[11] Williamson AL, Bridley PJ, Loukas A. Hookworm cathepsin D aspartic proteases: contributing roles in the host-specific degradation of serum proteins and skin macromolecules [J]. Parasitology, 2003, 126(2): 179-185.

[12] da Rocha Fragozo R, Lourenco IT, Nogueira Batista JA, et al. *Meloidogyne ingognita*: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a cathepsin D-like aspartic proteinase [J]. Exp Parasitol, 2009, 121(2): 115-123.

[13] Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JYM, et al. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D [J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 112(1): 103-112.

[14] Moneo I, Caballero ML, Gómez F, et al. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(1): 177-82.

[15] Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, et al. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Anis 1 [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 107(2): 263-268.

[16] Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, et al. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex* [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2000, 123(2): 120-129.

[17] Asturias JA, Eraso E, Martínez A. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 108(2): 263-267.

[18] Moneo I, Caballero ML, Gonzalez-Munoz M, et al. Isolation of a heat resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex* [J]. Parasitol Res, 2005, 96(5): 285-289.

[19] Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, et al. Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex* [J]. Parasitol Res, 2007, 100(6): 1233-1241.

[20] Kobayashi Y, Shimakura K, Ishizaki S, et al. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex* [J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 155(2): 138-145.

[21] Puente P, Anadón AM, Rodero M, et al. *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption [J]. Exp Parasitol, 2008, 118(2): 271-274.

[22] Suttiprapa S, Mulvenna J, Huong TN, et al. Ov-APR-1, an aspartic protease from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: Functional expression, immunolocalization and subsite specificity [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(5): 1148-1156.

[23] Loukas A, Bethony JM, Mendez S, et al. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs [J]. PLoS Med, 2005, 2(10): 1008-1017.

(收稿日期: 2012-02-29 编辑: 衣凤芸, 盛慧锋)

文章编号: 1000-7423(2012)-04-0298-03

【研究简报】

胆囊结石研碎镜检法对华支睾吸虫感染检出率的研究

马瑞红, 乔铁*, 罗小兵

【摘要】 收集 2010 年 1~6 月于广州市番禺区第二人民医院普外科实施内镜微创取石保胆术的 179 例患者的血清、粪便、胆汁和胆囊结石标本, 分别采用胶体金免疫层析法检测华支睾吸虫 IgG 抗体, 粪便直接涂片法、胆汁离心沉渣镜检法和胆囊结石研碎镜检法检查华支睾吸虫虫卵, 并进行比较分析。结果显示, 胶体金免疫层析法检测华支睾吸虫 IgG 抗体的阳性率为 51.4% (92/179), 粪便直接涂片法、胆汁离心沉渣镜检法和胆囊结石研碎镜检法华支睾吸虫卵阳性检出率分别为 30.7% (55/179)、44.7% (80/179) 和 69.8% (125/179), 粪便直接涂片法检出率最低, 胆囊结石研碎镜检法检出率最高 (均 $P < 0.05$)。其中粪便直接涂片法和胆汁离心沉渣镜检法检测结果为阳性的患者, 其结石研碎镜检法的检测结果也均为阳性。

【关键词】 华支睾吸虫; 胆囊结石; 虫卵

中图分类号: R532.23 文献标识码: B

Detection of *Clonorchis sinensis* Eggs in the Ground Gallbladder Stones by Microscopy

MA Rui-hong, QIAO Tie*, LUO Xiao-bing

(The Second People's Hospital of Panyu District; Institute of Gallbladder Diseases, National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center of MOH; Gallbladder Diseases Institute of Panyu District, Guangzhou 511470, China)

作者单位: 广州市番禺区第二人民医院, 卫生部肝胆肠外科研究中心胆囊疾病研究所, 广州市番禺区胆囊病研究所, 广州 511470

* 通讯作者, E-mail: fqj1958@163.com