

学校编码: 10384
学号: 200426130

分类号

密级
UDC

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

犬钩虫天冬氨酸蛋白酶和组织蛋白酶B
基因的克隆、表达和鉴定

Cloning, Expressing and Identification of Aspartic Protease
Gene and Cathepsin B Protease Gene from *Ancylostoma*
caninum in *E.coli*

作者姓名: 韦华

指导教师姓名: 杨玉荣 副教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2007 年4月

论文答辩时间: 2007 年7月

学位授予日期: 2007 年9月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2007 年 4 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
所写语对照表.....	5
第一章 前言.....	6
1.1 钩虫概况.....	6
1.2 钩虫研究进展.....	7
1.2.1 成虫分泌蛋白.....	7
1.2.2 成虫消化道膜上的蛋白.....	8
1.2.3 感染期幼虫(L3)分泌的蛋白.....	9
1.2.4 钩虫病的分子诊断.....	9
1.3 钩虫防治.....	10
1.4 本论文研究的目的和意义.....	11
1.5 本论文研究的技术路线.....	12
第二章 材料与仪器.....	13
2.1 材料.....	13
2.1.1 犬钩虫及实验动物.....	13
2.1.2 菌株.....	13
2.1.3 质粒.....	13
2.1.4 限制性内切酶及工具酶.....	13
2.1.5 试剂盒.....	13
2.1.6 核酸及蛋白质分子量标准.....	13
2.1.7 主要试剂.....	13
2.1.8 引物设计与合成.....	14
2.1.9 主要培养基.....	14
2.1.10 主要溶液.....	14
2.2 主要仪器.....	15

第三章 结果与讨论	17
第一节 厦门市儿童肠道线虫感染调查及宠物犬犬钩虫的调查 和形态观察	17
3.1.1 厦门市儿童肠道线虫感染调查.....	17
3.1.2 宠物犬犬钩虫的调查及形态观察.....	24
第二节 犬钩虫不同发育时期蛋白质组分及成虫抗原组分分析	29
3.2.1 方法.....	29
3.2.2 结果与分析.....	31
3.2.3 讨论.....	36
第三节 犬钩虫Asp基因的克隆和表达研究	37
3.3.1 方法.....	37
3.3.2 结果与分析.....	41
3.3.3 讨论.....	48
第四节 组织蛋白酶B(AcaB)基因的克隆与表达	50
3.4.1 方法.....	50
3.4.2 结果与分析.....	52
3.4.3 讨论.....	59
结论及今后努力方向	60
参考文献	61
致谢	66

CONTENTS

Abstract in Chinese	1
Abstract in English.....	3
Abbreviation.....	5
Chapter 1 Preface.....	6
1.1 Introduction of hookworm	6
1.2 Advances in hookworm research.....	7
1.2.1 Adult hookworm secreted molecules.....	7
1.2.2 Molecules lining the brush border membrane.....	8
1.2.3 Third-stage infective larval(L3) of hookworm secreted proteins.....	9
1.2.4Molecular diagnosis of hookworm	9
1.3 Strategies for control	10
1.4 Purpose and significance of the thesis.....	11
1.5 Strategies of the research	12
Chapter 2 Materials and Machines	13
2.1 Materials.....	13
2.1.1 <i>Ancylostoma caninum</i> and experimental animals	13
2.1.2 Bacteria.....	13
2.1.3 Plasmids.....	13
2.1.4 Enzymes.....	13
2.1.5 Kits.....	13
2.1.6 DNA and proteins markers.....	13
2.1.7 Reagent.....	13
2.1.8 Primers	14
2.1.9 Culture Medium	14
2.1.10 Solutions	14
2.2 Machines	15

Chapter 3 Results and Discussion	17
Section 1 Study on intestinal nematodes in children and study on	
<i>Ancylostoma caninum</i> in dogs of Xiamen.....	17
3.1.1 Study on intestinal nematodes in children	17
3.1.2 Study on <i>Ancylostoma caninum</i> in dogs and the observation of	
life cycle.....	24
Section 2 The analysis of the proteins expressing in different stages of	
<i>Ancylostoma caninum</i> and antigens in	
adults	29
3.2.1 Methods.....	29
3.2.2 Results and Analysis.....	31
3.2.3 Discussion	36
Section 3 Cloning and expression of Asp gene from <i>Ancylostoma</i>	
<i>caninum</i>	37
3.3.1 Methods	37
3.3.2 Results and Analysis	41
3.3.3 Discussion	48
Section 4 Cloning and expression of AcaB gene from <i>Ancylostoma</i>	
<i>caninum</i>	50
3.4.1 Methods.....	50
3.4.2 Results and Analysis.....	52
3.4.3 Discussion	59
Conclusion and future Directions	60
References.....	61
Acknowledgments	66

摘 要

钩虫是重要的人兽共患寄生虫,寄生于人体可导致贫血,儿童感染钩虫后造成发育迟缓,为了解肠道线虫在儿童中的流行情况和开展儿童肠道线虫病的防治,我们于 2004 年 7 月至 10 月间进行了厦门市儿童肠道线虫感染调查。通过收集儿童粪便,采用饱和盐水漂浮法收集虫卵并镜检计数,以透明胶纸拭擦法检查蛲虫卵。调查发现厦门市儿童肠道线虫感染率为 13.79%,全为蛔虫感染;蛲虫感染率为 8.87%。岛内儿童的感染率为 11.96%,岛外儿童的感染率为 15.32%。各幼儿园的感染率有明显的差别。蛔虫感染中,感染率最低为 5.00%,最高为 26.67%;蛲虫感染中,感染率最高为 25.93%。蛔虫感染中,男童感染率为 12.24%,女童感染率为 15.98%,无显著差别。蛲虫感染中,男童感染率为 6.67%,女童感染率为 12.24%,女童感染率明显高于男童。此次调查发现蛔虫和蛲虫感染仍是儿童肠道线虫感染的重要虫种,厦门市儿童的蛔虫和蛲虫感染都属于轻度感染。

同时我们对厦门市宠物狗的犬钩虫感染也进行了调查,收集宠物狗粪便,饱和盐水漂浮法检查发现,厦门市 30 只宠物犬犬钩虫感染率为 3.33% (1/30),蛔虫感染率为 10.00% (3/30)。并通过人工感染对犬钩虫生活史各期的形态进行了观察。

运用 SDS-PAGE 凝胶电泳对犬钩虫不同发育时期 L3、L4 和雌、雄虫的可溶性蛋白组分进行了分析,结果发现, L3 期幼虫有 22 条蛋白带, L4 期有 17 条蛋白带,雄虫有 22 条,雌虫有 22 条,各期既有共同的蛋白条带也有期特异性的蛋白条带。其中 L3 期蛋白条带较多, L3、L4 期幼虫的蛋白条带和成虫的蛋白质条带有较大差别,而雌雄虫之间差别很小。运用 western blot 对成虫抗原组分进行分析,发现 40KDa 的蛋白条带是成虫共有的蛋白条带并有很强的阳性反应,为进一步开展钩虫致病和期特异性抗原的免疫保护机制以及以抗原为基础的免疫学诊断研究奠定了基础。

为了解犬钩虫天冬氨酸蛋白酶 (Asp) 和组织蛋白酶 B (AcaB) 基因的功能,我们对犬钩虫的这两个基因进行了克隆和表达鉴定,我们利用 RT-PCR 技术对犬钩虫天冬氨酸蛋白酶 (Asp) 基因和组织蛋白酶 B (AcaB) 基因的 cDNA

进行了扩增，获得的 cDNA 片段大小分别为 1200bp 和 800bp。分别构建表达重组质粒 pET-asp 和 pGEX-acaB 并转入大肠杆菌 DH5 a 中，重组菌在含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基平皿上进行筛选，提取质粒 DNA 并进行酶切验证和测序。正确的重组质粒重新转化到 BL21 (DE3) 中并利用 IPTG(1mmol/L)进行了诱导表达，运用 SDS-PAGE 凝胶电泳对表达结果进行了分析，发现重组蛋白 Asp 分子量大小为 40KDa，AcaB 分子量大小为 30KDa。并进行了重组蛋白的纯化鉴定和免疫获得了相应的抗体。利用 western blot 分析了这两个蛋白在不同发育时期的表达情况，发现 Asp 和 AcaB 在犬钩虫的第三期幼虫和雌雄成虫中均有表达，Asp 在雌虫体内表达较多，而在幼虫体内表达较小，AcaB 在各个时期表达量无明显差别。

关键词：犬钩虫；天冬氨酸蛋白酶；组织蛋白酶 B；克隆；表达

ABSTRACT

Hookworm is a important intestinal parasitic nematodes in human, in order to ensure children grow healthily and to study the infection of the intestinal nematodes in the children, 406 children's faeces were collected and checked in the laboratory. We floated the eggs by saturated NaCl solution and counted the number of the eggs under the microscope. And the pinworm's eggs were collected by transparent adhesive tape. The results showed that the rate of the intestinal nematode infection is 13.79%, all are ascarid. The rate of pinworm infection is 8.87%. The rate of the ascarid's infection in children inside Xiamen Island is 11.96%, for the rate of infection in children of outside the island is 15.32%. The rates of infection varied in different kindergarten. For the rate of ascarid infection, the lowest is 5.00%, the highest is 26.67%; for the rate of pinworm infection, the lowest is 0.00%, the highest is 25.93%. For the rate of ascarid infection, the boys is 12.24%, and the girls is 15.98%; for the rate of pinworm infection, the boys is 6.67%, and the girls is 12.24%, the rate of female is higher than that of male. It concludes that ascarid and pinworm infection are still the important intestinal nematodes for the children in China, but the rate of infection is low in Xiamen.

30 dogs faces were collected and checked in the laboratory, the eggs were floated by saturated NaCl solution and incubated on the "T" filter paper. One dog has found infected with *Ancylostoma caninum*. The results indicate that the infection rate of *Ancylostoma caninum* is 3.33%, and *Ascaris lumbricoides* is 10.00% in dogs, respectively. The experimental dogs were infected by infective larvae from skin and mouth. The parasites were collected from small intestine at different time of post-infection and observed via microscope. And the different stages of *Ancylostoma canium* were observed.

SDS-PAGE was used to analyze the protein expression of L3, L4 and adults of *Ancylostoma canium*. The results show that L3 has 22 bands, L4 has 17 bands, male and female also have 22 bands. The L3 has more protein bands than L4, the reasons may be that L3 is infective larva, and secretes more active proteins and enzymes in order to penetrate the skins of hosts and escape the immune system. There are many different bands between larvae and adults, whereas there are high similar bands between male and female, the reason maybe that the larva must pass

through molting and germline development during developing into the adults. Western blot was done by using antiserum of adult worm, the results showed that they both have 40KDa protein band with strong immunogenicity. This study would be applied in the immunology and molecular mechanism of *Ancylostoma caninum* infection.

Two proteinase genes, the aspartic protease (Asp) and cathepsin B protease (AcaB) from *Ancylostoma caninum* were cloned and expressed in *E. coli*. In order to provide the foundation of the diagnosis of *Ancylostoma* as well as for the development of anti-hookworm vaccine, the genes encoding protease Asp and AcaB were amplified from the total RNA by using RT-PCR. The cDNA of *asp* is about 1200bp and cDNA of *acaB* is 800bp. The amplified cDNA products were cloned initially into pMD18-T vector and then into expression vector of pET-32a and pGEX-4T-3 respectively, then transformed into *E. coli* DH5a strain and cultured on LB plus ampicillin (100 μ g/ml) plates. Colonies containing the recombinations were selected by PCR and the plasmids DNA were extracted and digested with enzymes. Plasmids containing the right insert were sequenced to confirm their identities, and then the right recombinants were retransformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain. Bacterial lysates from cultures induced with IPTG (1mmol/L) were directly loaded onto SDS-PAGE gel, and the proteins on the SDS-PAGE gel were transferred to nitrocellulose membrane, and detected with antisera against Asp and AcaB respectively. Through these procedures, a specific protein with a molecular mass of 40KDa in Asp western blot could be visualized on membrane, and in AcaB western blot, 30KDa band could be visualized on membrane. The results show that these proteins are expressed in L3, male and female adult worms. These proteins can be used for further studies in the detection of the effectiveness of immunity and the preparation of antigen and antibodies of Asp and AcaB in large scale.

Key words: *Ancylostoma caninum*; aspartic protease; cathepsin B protease; cloning; expression

缩写语对照表

Alc 乙醇

DAB 二氨基联苯二胺

g, mg, μ g, ng 克, 毫克, 微克, 纳克

h, min, sec 小时, 分钟, 秒

HRP-IgG 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG 抗体

L, mL, μ L 升, 毫升, 微升

PBS 磷酸缓冲液

rpm 转/分

SDS 十二烷基磺酸钠

SDS- PAGE SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Tris 三羟甲基氨基甲烷

Western blot 免疫印迹

第一章 前言

钩虫 (hookworm) 是钩口科线虫的统称, 寄生于人体小肠, 引起钩虫病。钩虫是危害人民健康的重要寄生虫病之一。在肠道线虫感染中钩虫感染造成的危害最严重, 不但可损伤肠黏膜, 造成消化道功能紊乱, 而且可使人体长期慢性失血, 重度感染者会造成严重贫血。目前, 全世界钩虫感染人数约 9 亿 [1, 2, 3,], 我国的感染人数在 2 亿左右。

犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*) 属于人兽共患的寄生虫, 随着人民生活水平的提高, 宠物犬越来越多走进人类生活中, 家庭养狗无论在城市还是在农村越来越普遍。特别是在卫生状况不好的农村, 养狗会造成钩虫感染等人兽共患病的流行。为控制钩虫病的流行和进一步开展钩虫致病和宿主免疫保护机制研究以及为免疫诊断研究奠定基础, 我们进行了这方面的课题研究。

1.1 钩虫概况

钩虫属于世界性分布, 主要分布于撒哈拉沙漠以南的非洲、中国南部、太平洋地区和东南亚 [4]。从钩虫种类和分布上看, 美洲钩虫呈现世界性分布, 十二指肠钩虫呈地方性分布。美洲钩虫主要分布于中国南部和西南部、印度南部、东南亚、撒哈拉沙漠以南的非洲地区和美洲中南部的沿海地区, 在这些地区美洲钩虫感染率很高 [5]。十二指肠钩虫主要分布于中国和印度更高纬度的地区。此外十二指肠钩虫也分布在埃及和澳大利亚北部以及拉丁美洲的一些地区, 包括阿根廷北部、巴拉圭、秘鲁等。就全世界范围看, 美洲钩虫和十二指肠钩虫混合感染比较常见。

在钩虫病高发地区, 美洲钩虫和十二指肠钩虫的 L3 期幼虫不断通过皮肤感染可以导致皮肤病, 俗称地痒, 主要发生在手部和脚部。与人钩虫相比, 动物钩虫如巴西钩虫 L3 期幼虫还可以引起皮肤移行症 (CLM), 通常发生在脚部、屁股和腹部 [6]。其它动物钩虫如犬钩虫能否引起皮肤移行症目前还不清楚。但实验室感染试验表明, 用 200 条犬钩虫 L3 期幼虫进行感染并没有出现明显的皮肤移行症 [7]。L3 期幼虫侵入人体后, 随血液循环移行到肺部, 人体会出

现咳嗽、喉咙疼痛和高烧[8]。钩虫幼虫在肺部移行可引起嗜曙红细胞(eosinocyte)渗透导致轻微咳嗽,这种咳嗽可持续一个多月。当钩虫幼虫从肺部移行到小肠寄生时,嗜曙红细胞开始分解,等到L3期幼虫移行到小肠时,幼虫通常已蜕皮发育为成虫,会造成感染的人腹部疼痛[9]。

由于钩虫成虫直接消化血浆会引起蛋白损失和造成缺铁性贫血。在钩虫高发区,大量钩虫感染可造成人体蛋白严重损失,从而导致血液蛋白不足,引起水肿甚至全身性水肿,由钩虫感染引起的蛋白丧失会造成体重下降。钩虫吸附在小肠内,撕裂小肠绒毛,导致毛细血管和小动脉破裂,引起失血。肠道失血是钩虫病的主要临床表现。严重的钩虫感染引起人体铁和蛋白的流失,临床表现为缺铁、小红细胞和血红蛋白过少。此外钩虫分泌的Xa因子、VIIa/TF抑制因子和抗血小板蛋白使钩虫吸附部位的血液不能凝固,保持自由流出[10,11]。

由于哺乳期的妇女、孕妇还有儿童需要补铁和营养,因此他们感染了钩虫更容易引起贫血症。一般40到160条钩虫就可以导致贫血。这主要取决于宿主的含铁量和感染钩虫的种类[5,12]。由于在怀孕期间对铁的生理需求增加,孕妇特别容易得钩虫贫血症。很多发展中国家,孕妇严重贫血是导致母体死亡的重要原因,特别是在分娩过程中更是如此。钩虫引起的贫血还会影响妇女的健康,出现疲劳、呼吸困难等症状,难以进行工作和哺育孩子等[13],严重的钩虫性贫血会降低出生婴儿的存活率。

1.2 钩虫研究进展

近年来,已经有很多种分子从钩虫中发现并克隆表达出来。这些分子大致可以分为以下三种:(1)成虫分泌蛋白;(2)位于成虫消化道膜上的蛋白;(3)L3期感染性幼虫分泌蛋白。它们在钩虫感染的发病机理和钩虫与宿主之间的相互关系方面有重要的作用,有些还是疫苗的候选分子。

1.2.1 成虫分泌蛋白

近20年的研究发现,钩虫在口囊和肠粘膜吸附部位处会分泌出很多种分子,阻碍宿主对钩虫的作用。钩虫的头腺和食道腺是主要的分泌源。

Zhan等人的研究表明,钩虫分泌的大量蛋白和哺乳动物中的金属蛋白酶的

组织抑制因子 (TIMP) 相似。钩虫的TIMP是一个相对分子量为16KDa的蛋白, 目前还没有发现其具有蛋白酶抑制因子的活性。过去10年的研究发现, 有很多哺乳动物的TIMP也没有蛋白抑制因子的功能。Guedez [14]发现哺乳动物的TIMP可以调节B细胞中白介素10 (IL-10) 的含量。测量钩虫感染的人体中IL-10的水平, 发现IL-10含量非常高, 说明钩虫的TIMP起到免疫调节的作用。因此TIMP在钩虫的蜕皮发育和下调宿主的免疫力方面起作用。

钩虫还分泌其它的蛋白, 这些蛋白包括肿瘤抑制因子 (NIF), NIF是宿主CD11b/CD18的克星 [15, 16, 17]、calreticulin与宿主C1q相互作用 [18]、视黄醇结合蛋白 [19]、胶原结合蛋白 [20]、C型凝集素 [21]、乙酰胆碱酯酶 [22]、谷胱甘肽S-转移酶 [23]、Cu/Zn超氧化物歧化酶 [24]、还有一些诱导T细胞的蛋白 [25]。此外成虫至少分泌四种不同的钩虫分泌蛋白 (Ancylostom secreted proteinase, Asps), 这些Asps和L3期的两种分泌蛋白Asps在结构上是类似的 [26]。实验研究表明, Asps也有免疫调节的作用。

钩虫还分泌具有药物活性的多肽以便于钩虫吸血。这些多肽中大多数是丝氨酸蛋白酶抑制剂, 通过抑制Xa因子 [27]和VIIa/TF因子 [28]来达到抗凝血的目的。Xa因子抑制剂参与VIIa/TF因子抑制剂的作用 [29], 通过Xa因子抑制剂与VIIa/TF因子相结合形成复合物, VIIa/TF因子抑制剂与复合物再结合达到抑制的作用。与Xa因子抑制剂的高亲和力是VIIa/TF因子抑制剂有生物活性的关键。Xa因子抑制剂的抗凝血活性也很强 [30], 而锡兰钩虫的抗凝血肽在抗凝血方面并不是很有效 [27], 这是由于锡兰钩虫与十二指肠钩虫和犬钩虫相比较, 不太依赖于吸血取食 [31]。除了抗凝血肽, 钩虫还分泌血小板抑制剂, 与integrin受体糖蛋白IIb/IIa和GPIa/IIa结合 [11]。

为了便于侵入小肠绒毛, 钩虫还分泌几种粘连组织水解酶, 包括金属蛋白酶 (MTP-2), 属于虾红素类, 与L3期的MTP-1相似 [32]、半胱氨酸蛋白酶 (CP-1)、天冬氨酸蛋白酶 (APR-1) [33]和透明质酸酶 [34]。钩虫还分泌Kunitz型的蛋白酶抑制子, 其功能目前还不清楚 [35]。

1.2.2 成虫消化道膜上的蛋白

成虫消化道膜上的蛋白属于蛋白水解酶, 有几种类型: 锌金属蛋白酶

(MEP-1) [36]、天冬氨酸蛋白酶 (APR-2) [32, 37]、半胱氨酸蛋白酶 [37]。Angela Williamson和Alex Lonkax研究发现, 这些酶的功能是降解血红蛋白, 和血吸虫、疟原虫降解血红蛋白的途径类似 [32, 37]。在动物实验中, 用抗体抑制该途径就能够达到抗钩虫感染的目的 [38, 39]。

1.2.3 感染期幼虫 (L3) 分泌的蛋白

近10年的研究表明, L3期幼虫在以宿主血清和谷胱甘肽为培养基, 37℃下孵育, 可以分泌几种蛋白 [40]。这些分子被认为是在钩虫从外界进入寄生环境的过程中和选择宿主方面起作用 [40]。

L3期分泌的蛋白中最多的两种钩虫分泌蛋白 (Ancylostom secreted proteinase, Asps) Asp1和Asp2 [40, 41, 42]。这两种蛋白是富含半胱氨酸的分泌蛋白 (CRIPs), 属于PRP家属。Asp-1分子量为45KDa, 有两个PRP结构域, Asp-2分子量为24KDa, 有一个PRP结构域。各种钩虫Asp的氨基酸顺序有很高的相似性。如美洲板口线虫Asp-1 (Na-Asp-1) 的氨基酸顺序与犬钩虫Asp-1 (Ac-Asp-1) 的氨基酸顺序有97%的相似性。目前Asp的生物学功能还不清楚, 推测Asp有抗原的特性。用天然的Asp去免疫羊和猪能够对 *H. contortus* 的感染有抵抗力。这种保护作用是通过抗Asp的IgE的高水平表达实现的。在大肠杆菌中表达含有Ac-Asp-1或Na-Asp-1的96~484氨基酸蛋白来免疫老鼠可引起免疫应答, 并可抑制犬钩虫向肺移行。在中国海南和巴西疫区感染的人群中发现, 体内抗Asp结构域的抗体滴度很高。

在宿主的刺激下, L3期幼虫还分泌虾红素类的金属蛋白酶 (MTP-1) [43]。不同的动物实验研究表明, MTP-1是抗钩虫疫苗的候选分子, 而且抗这些蛋白的抗体在体内可以阻止幼虫的入侵 [44]。最有可能成为疫苗的是Asp-2, 用Asp-2免疫实验动物鼠和狗, 都能使实验动物获得保护性 [45]。

1.2.4 钩虫病的分子诊断

目前有几种标准的定量技术来估计钩虫的产卵量, 包括Kato-Katz厚涂片法。这些方法可以提供钩虫感染量的直接证据, 对流行病学的研究具有很大的作用。抗钩虫抗原的IgG4抗体可作为钩虫感染的血清学标记, 但目前还没有作为临床可靠的检测方法 [46]。

十二指肠钩虫和美洲钩虫的卵在形态上几乎一样，目前利用针对分子标记——cAMP依赖性的蛋白激酶的引物进行聚合酶链反应（PCR），随后进行限制性片段长度多态性（RFLP）分析，已成功的将这两种钩虫卵区分开[47]。另一种针对于线粒体色素氧化酶I基因的RFLP也已经成功区分出这两种钩虫[48]。对ITS rDNA的PCR和RFLP分析也可以成功地区分出犬钩虫、巴西钩虫和锡兰钩虫[49, 50]。目前钩虫的研究还有许多方面有待深入，如宿主的免疫反应以及对钩虫与宿主基因组学的研究寻找新的分子标记等。

1.3 钩虫防治

钩虫病与其它蠕虫病不一样，宿主并不能抵抗钩虫的再次感染，相反随着年龄的增大，感染度还加深。其它肠道线虫的感染一般是Th2反应来调节，Th2反应中IL-4和IL-5发挥着重要的作用。钩虫感染虽然也表现出Th2反应的一些特点，如IgE和局部嗜曙红细胞增多等，但在大多数感染的人群中并没有出现这些反应，不能保护这些人群免受钩虫的感染。目前其中的原因还不清楚。最近的研究结果显示，可能存在免疫交叉调节机制。

钩虫防治目前已经从消除钩虫转变为控制发病率，通过化学治疗、卫生健康教育、提高饮用水的质量、改善卫生设施来控制钩虫病。钩虫的防治是应用苯并咪唑进行化学治疗。目前有三类药物用来治疗钩虫病：阿苯达唑、左咪唑和甲苯咪唑。此外抗钩虫疫苗的研究也取得一定的进展。

用放射线处理的L3期幼虫去免疫实验动物可起到免疫保护的效果[51, 52, 53]，说明开发抗钩虫疫苗具有可行性。由于在GMP规定下，L3期幼虫不能生产应用到人体，因此目前都是生产L3期幼虫分泌的重组抗原来代替[44]。除了分泌性抗原外，还有L3期幼虫的表面抗原[54]。

从不同钩虫种类中获得的重组Asp-2已克隆并在毕赤酵母(锡兰钩虫)和SA9昆虫细胞(犬钩虫)中表达出来。从毕赤酵母中表达出的锡兰钩虫Asp-2与Quil A佐剂混合免疫老鼠，产生的抗体滴度超过1:10000。用锡兰钩虫L3期幼虫从口腔感染免疫过的老鼠，和只用佐剂免疫的老鼠相比，虫体大小和失血量都有明显下降。从昆虫细胞中表达出的犬钩虫Asp-2以GS30作为佐剂，也可产生很高的抗体滴度，可以用来作为狗抗钩虫的疫苗。用犬钩虫L3期感染性幼虫去感染

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库