

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620121152302

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

广州管圆线虫天冬氨酸蛋白酶抑制剂基因的
克隆、表达及各期组织定位分析

Cloning, Expression and Immunolocalization of Aspartyl
Protease Inhibitor Gene of *Angiostrongylus cantonensis*

曹斌斌

指导教师姓名: 罗大民 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016年04月

论文答辩时间: 2016年05月

学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章前言	1
1.1 广州管圆线虫及广州管圆线虫病.....	1
1.2 天冬氨酸蛋白酶抑制剂研究现状.....	4
第二章 AcAPI 基因的克隆及生物信息学分析	8
2.1 材料与方法.....	8
2.1.1 实验材料.....	8
2.1.2 试剂与仪器.....	8
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 Top10 感受态细胞制备.....	9
2.2.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成.....	10
2.2.3 广州管圆线虫天冬氨酸蛋白酶抑制剂基因特异性片段的克隆.....	11
2.2.4 RACE 扩增 AcAPI 基因全长.....	13
2.2.5 AcAPI 基因及蛋白结构功能分析.....	17
2.3 实验结果.....	18
2.3.1 RNA 提取及特异性片段检测.....	18
2.3.2 RACE 克隆结果.....	19
2.3.3 生物信息学分析.....	20
2.4 讨论.....	26
第三章广州管圆线虫 API 蛋白表达和免疫荧光定位	28
3.1 材料与方法.....	28
3.1.1 实验材料.....	28
3.1.2 试剂与仪器.....	28
3.1.3 实验方法.....	31
3.2 实验结果.....	38

3.2.1 重组表达载体的构建.....	38
3.2.2 重组蛋白诱导和纯化.....	39
3.2.3 重组蛋白纯化及蛋白浓度测定结果.....	40
3.2.4 Western 杂交结果	40
3.2.5 幼虫中的天冬氨酸蛋白酶抑制剂的抗体染色.....	41
3.3 讨论	47
第四章广州管圆线虫 API 基因差异表达研究.....	50
4.1 实验材料和方法	50
4.1.1 实验材料.....	50
4.1.2 试剂和仪器.....	50
4.1.3 实验方法.....	51
4.2 实验结果	55
4.2.1 常规 PCR.....	55
4.2.2 荧光定量 PCR.....	55
4.2.3 荧光定量 PCR 检测人工胃液及人工肠液对 L1、L3 的影响	57
4.3 讨论	59
参考文献.....	61
致谢.....	67

Contents

Abstracts	IV
Chapter 1 Introduction	1
1.1 <i>Angiostrongylus cantonensis</i> and Angiostrongyliasis	1
1.2 The research progress of aspartyl protease inhibitor	3
Chapter 2 Cloning and bioinformatics analysis of AcAPI gene of <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	8
2.1 Materials and methods	8
2.1.1 Experiment material	8
2.1.2 Reagents and instruments	8
2.2 Experiment methods	9
2.2.1 Preparing Top10 competent cells	9
2.2.2 Extraction of total RNA and synthesis of cDNA	10
2.2.3 Cloning of specific fragment of AcAPI	11
2.2.4 Amplify the full-length of AcAPI by RACE	13
2.2.5 Analysis of the structure and function of protein AcAPI	17
2.3 Results	18
2.3.1 RNA extraction and detection of specific fragment	18
2.3.2 Result of RACE	19
2.3.3 Bioinformatics analysis of <i>AcAPI</i>	20
2.4 Discussion	26
Chapter 3 Expression of AcAPI and its immunofluorescence localization in each stage of <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	28
3.1 Materials and methods	28
3.1.1 Materials	28
3.1.2 Reagents and instruments	28
3.1.3 Experiment methods	32

3.2 Result	39
3.2.1 Construction of recombinant plasmid of <i>AcAPI</i>	39
3.2.2 Expression of recombinant AcAPI.....	39
3.2.3 Purification and concentration determination of recombinant AcAPI..	40
3.2.4 Specificity test of the AcAPI antibodies	41
3.2.5 Immunofluorescence localization of AcAPI in each stage of larva.....	41
3.3 Discussion	47
Chapter 4 Expression differency of <i>AcAPI</i> in each period	50
4.1 Materials and methods	50
4.1.1 Materials	50
4.1.2 Reagents and instruments	50
4.1.3 Experiment methods	51
4.2 Results	55
4.2.1 Conventional PCR detection.....	55
4.2.2 Real-time PCR	56
4.2.3 Real-time PCR detect the influence of artificial gastric juice and artificial intestinal juice on L1 and L3.....	57
4.3 Discussion	59
Chapter 5 Reference	61
Acknowledgement	67

摘要

广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 是一种人畜共患自然疫源性寄生虫, 能引起人的嗜酸性粒细胞增多性脑膜炎, 也被称为广州管圆线虫病。其中间宿主是软体动物, 例如福寿螺、玛瑙螺等, 并以啮齿类动物等作为其终宿主。人类是广州管圆线虫的偶然宿主, 因误食寄生有广州管圆线虫的第三期幼虫(L3)的福寿螺等而引起广州管圆线虫病。

寄生虫的天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (aspartyl protease inhibitor, API) 在寄生虫的寄生生活中起着重要的作用, 包括寄生虫的营养摄取, 组织入侵, 免疫逃避, 生长发育等等。本论文以广州管圆线虫为研究对象, 以 API 基因作为研究的目的基因, 对目的基因进行克隆、表达和各期虫体定位定量分析。通过序列比对的方法, 在 NCBI 上找到广州管圆线虫 API 基因的部分序列, 再用 RACE 扩增技术扩增 5'和 3'端部分, 获得基因全长序列, 利用 NCBI, signalP 等多种在线分析软件预测其 API 蛋白的结构及进行功能分析。用 primer 5 设计特异性引物, 以线虫 mRNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行体外扩增, 并将得到序列构建表达载体, 之后分别转入大肠杆菌 BL21 表达菌中大量诱导培养, 获得重组蛋白并纯化, 然后将这些纯化后重组蛋白免疫小鼠, 制备多克隆抗体。将得到的抗体作为一抗, Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG 作为二抗对广州管圆线虫做各期虫体的免疫组化研究。为测定 API 在各期虫体中的差异表达, 我们进行了 API 在广州管圆线虫第一期幼虫 (L1)、L3、第五期虫 (L5) 和雄性成虫、雌性成虫中实时荧光定量 PCR。获得 API 基因全长克隆后, 已将序列上传至 GenBank, AcAPI 基因序列号为 KX138274, 广州管圆线虫 API 基因全长 887 bp 包含 678 bp 的编码阅读框(99-776 bp), 包含 98 bp 的 5'UTR 和 113 bp 的 3'UTR, 编码 226 个氨基酸, 有信号肽序列, 无跨膜结构。各期广州管圆线虫中对 API 的免疫组化结果显示, API 在 L1 中肠道表达量较高, 在神经环和角质层上也有表达, 其他区域表达量较低; L3 特异表达在侧翼上, 角质层及体壁肌肉层也有表达; 雌雄虫主要表达在生殖腺中, 我们推测 API 与线虫成虫的生殖作用有关, 并且线虫通过分泌 API 到体外, 抑制宿主体内相关酶的活性来适应宿主体内生活。

实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 结果显示广州管圆线虫 API 在 L1、L3、

L5、雌雄虫中均有表达，在 L3 期的表达量最低，雌虫的表达量最高。我们推测 API 的表达量可能与线虫的生殖作用有关，并且可能和该期虫体所在的宿主有关。

关键词：广州管圆线虫；天冬氨酸蛋白酶抑制剂；免疫荧光定位

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Angiostrongylus cantonensis is a serious zoonoses parasite that causing parasitic, can cause eosinophilic meningitis, also known as Angiostrongyliasis. its intermediate host is mollusca, such as apple snails, achatina fulica and so on. And parasitic on *Glires* as its final host. Human is the occasional host of this nematode, can catch the *Angiostrongyliasis cantonensis* by eating its infective third stage.

The aspartyl protease inhibitor of the parasites play important roles in their parasitism such as nutrition intake, tissue invasion, immune evasion, growth, development and so on. In this paper we choose *A. cantonensis* as research object and the aspartyl protease inhibitor gene as the target gene.

We cloned, expressed the protein, and then detected the position, expression difference of the aspartyl protease inhibitor in each period. Through the method of sequence alignment, according to the partial sequence of *A. cantonensis* aspartyl protease inhibitor (*AcAPI*) found in the NCBI, we amplified 3' terminal and 5' terminal through the method of RACE, and then obtaining the full length of the aspartyl protease inhibitor gene. The structure and functional analysis of *AcAPI* gene was forecast by some online software such as NCBI, SignalP4.1. Specific primers were designed according to the full length of the gene by primer 5. Then we amplified the cDNA by reverse transcription of the worm's mRNA. And constructed the expression vectors, then transduced the vectors into the *E.coli BL21* to induce expression the recombinant protein. After that the recombinant protein were collected and purified, they were used to immunize the mice to obtain polyclonal antibodies. Finally, the *AcAPI* were immunofluorescence located in larvae of each period and adult worm by using the polyclonal antibodies as primary antibody and Goat Anti-mouse IgG/Cy3 as secondary antibody. In order to compare the stages expression difference of *AcAPI* among L1, L3, L5, male and female worm, we did real-time quantitative PCR experiments.

The sequence of the full-length of *API* gene was uploaded to the GenBank and got a sequence number of KX138274. The result showed that the full length of *AcAPI* gene is 887 bp include 678 bp encoding reading frame (99-776 bp), include 98bp 5' UTR and 113 bp 3' UTR, encoding 225 amino acids, have signal peptide, and have no transmembrane domain.

The results of immunofluorescence localization showed that *AcAPI* was distributed in the whole body of L1, but abundantly expressed in intestine, cuticle and nerve ring. In Larva 3, it was specific expression in lateral fin and cuticle, in addition, it was equally distributed in intestine, muscle, and also had specific expression on the wall; It was mainly detected in the sex organ and coelom of adult worm. In this result, we suspected that *AcAPI* may play an important role in the worm's reproduction, and nematodes secreted API to external, then inhibit the activity of the host's related enzymes to adapt to the life of the host's inner environment.

The result of Real-time PCR showed that the expression of *AcAPI* could be detected in L1, L3, L5, female and male. The expression level of *AcAPI* is the lowest in L3, in contrary, female is the highest. We included that *AcAPI* is inextricably linked to worm's reproduction, and possibly to the host where that stage of the worm stays.

Keywords: *Angiostrongylus cantonensis*; aspartyl protease inhibitor; immunolocalization;

第一章前言

1.1 广州管圆线虫及广州管圆线虫病

广州管圆线虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 隶属于圆线虫目, 后圆线虫科, 后圆线虫亚科, 管圆线虫属, 由我国学者陈心陶于 1933 年首次在鼠肺动脉中发现, 又称为广州肺线虫^[1], 后由 Matsumoto 于 1937 年在台湾报道, 到 1946 年才由 Dougherty 订正为广州管圆线虫^[2]。主要分布在热带、亚热带地区。广州管圆线虫病是由广州管圆线虫引起的一种人兽共患病^[3-5], 可引起嗜酸性粒细胞增多性脑膜脑炎等病症, 啮齿类动物, 如褐家鼠、黑鼠, 为广州管圆线虫的主要终宿主, 许多螺类, 如福寿螺、褐云玛瑙螺, 白玉蜗牛等, 是广州管圆线虫的中间宿主, 人和小白鼠等是偶然宿主, 该病是因进食了含有广州管圆线虫感染性 L3 的螺肉或由其幼虫污染的食物而感染的, 人被意外感染后, L3 经血液循环系统, 穿过血脑屏障进入大脑中, 只能发育到第四期幼虫 (L4) 或童虫, 并滞留在脑内^[6], 引发脑膜炎和脑炎、脊髓膜炎和脊髓炎, 使人发生急剧的头痛、视觉模糊、缓慢进行性感觉中枢损害、全身酸痛、脑组织损伤及肉芽肿炎症反应、颈项强直, 可伴有颈部运动疼痛、恶心呕吐、低度或中度发热, 极个别感染虫体数量多者, 可致死亡, 或留有后遗症, 广州管圆线虫甚至可以寄生在病人眼中, 引起不可逆的病变^[4,5], 该病主要在东南亚及太平洋各岛屿流行, 近年来, 在澳大利亚和美国南部也出现流行^[7,8]。台湾省及广东、广西、上海、浙江、福建、辽宁、北京等省市均有病例报道。截止到 1992 年, 已有超过 3000 例感染广州管圆线虫的病例被报道^[9]。随着人们饮食习惯的改变和水陆交通日趋发达, 该病的流行呈上升趋势^[7,9,10]。近年福建和浙江的大规模的爆发使得该病愈发引起人们的重视, 而且这两次爆发都和福寿螺相关^[11]。目前治疗本病尚无理想的特效药, 主要使用一些常见杀虫药物阿苯达唑, 且阿苯达唑和甲苯达唑连用可通过血脑屏障杀灭颅内幼虫。

预防广州管圆线虫病就是要不吃生或半生的螺、生菜、生水, 加大灭鼠力度。因为广州管圆线虫病的症状通常与普通脑膜炎非常相似, 所以快速的确诊广州管圆线虫感染对病症的治疗有着重要的作用。而错误的诊断往往会延误治疗的最佳

时机,可能导致严重的医疗事故。一般的诊断方法有流行病学资料:有吞食或接触本虫中间宿主或转续宿主的经历,症状和体征:神经系统受损,实验室检查:白细胞总数明显增多,其中嗜酸性粒细胞超 10% (正常 1-2%),免疫学检查:用 ELISA 检测病人血清中特异性抗体从脑脊液中查出幼虫或发育期的寄生虫。对广州管圆线虫病的确诊主要依靠从病人脑脊液中检测到线虫,但检获率很低。新的诊断方法主要是基于 PCR 技术和免疫学技术的方法。PCR 和 Real Time qPCR 等技术被用于检测广州管圆线虫的 rRNA、ITS 等保守核酸序列以确定感染情况。然而常规 PCR 的方法易出现假阳性,而 real time qPCR 的方法成本较高。运用免疫学的诊断方法主要有间接荧光抗体试验(IFAT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、斑点免疫金渗滤法等。这些手段主要以整个虫体或虫体的某个组织作为粗抗原,虽然比较灵敏,但是也存在交叉反应。因此寻找准确特异的诊断该病的新思路和新方法具有重要意义。

治疗:在中国以及泰国,临床治疗中使用广谱驱虫药如阿苯达唑等收到了良好的效果,而糖皮质激素类药物被用来缓解疼痛和炎症。然而,在另外一些使用驱虫药治疗的病例中,被杀死的线虫尸体导致了中枢神经系统症状的恶化。因此,新的靶向性的高效治疗策略的研发对于治疗该类蠕虫的感染具有重要意义。

广州管圆线虫的生活史概述:

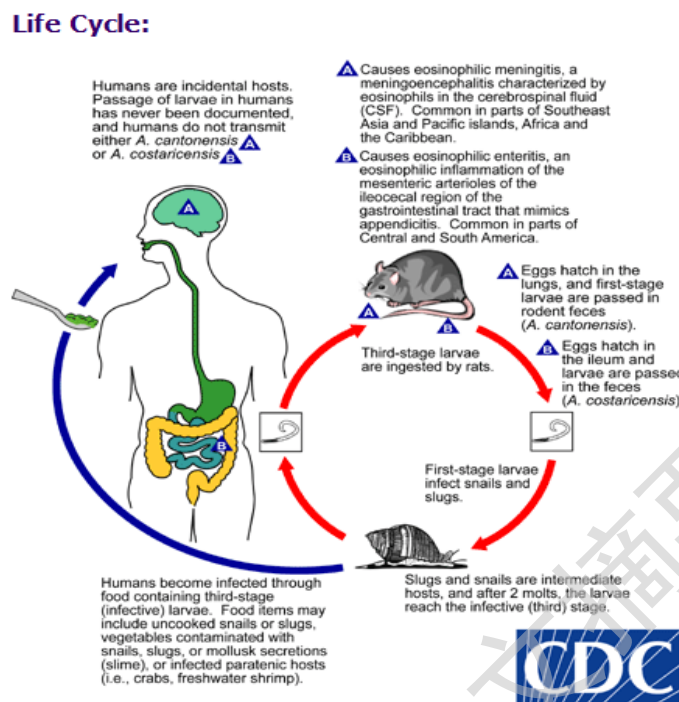


图 1.1 广州管圆线虫生活史

(源自: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/13/11/07-0367-f1.htm>)

广州管圆线虫的生活史如图 1.1 所示: 成虫寄生于终末宿主褐家鼠及多种野鼠等的肺动脉及心脏中, 雌雄成虫交配后, 雌虫产出的虫卵在肺动脉, 在肺毛细血管中发育孵化出 L1, 幼虫穿过毛细血管和肺泡壁向上逆行至气管, 经咽部入消化道随粪便排出。被中间宿主(福寿螺、玛瑙螺、蜗牛等)吞食后, L1 即可进入中间宿主的肺及腹足中, 大约 1 周后, 蜕皮发育至第二期幼虫(L2), 再经两周后, 二次蜕皮发育为 L3 感染期幼虫^[12], 此时的中间宿主被鼠类等终末宿主吞食后或被食用了 L3 污染的食物和水源也是引起感染的重要原因^[13, 14], L3 经食道、胃到达小肠后, 穿过肠壁进入血液循环系统, 穿过血脑屏障进入脑中, 在脑部经过两次蜕皮后第四期幼虫(L4)和 L5, L5 再穿过血脑屏障经静脉进入到肺动脉中, 并在此发育至雌雄成虫, 雌雄成虫交配产出虫卵完成生活史。一般在感染 5-7 周后终末宿主的粪便中检出 L1^[15-18]。含有 L3 的中间宿主也可被蟾蜍、蛙、鱼、虾等吞食并在其中长期寄生(转续宿主)。人因为食入含有广州管圆线虫幼虫的中间宿主或转续宿主感染^[19]。

1.2 天冬氨酸蛋白酶抑制剂研究现状

天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (aspartyl protease inhibitors, API 或 Aspins) 是生物体内参与调节天冬氨酸蛋白酶活性的重要因子。存在于许多蠕虫中并有重要的生物学意义。

首先了解一下天冬氨酸蛋白酶的一些性质, 天冬氨酸蛋白酶是一类在酸性 pH 下有活性的蛋白水解酶^[20], 广泛分布于真核生物以及微生物中, 也是酶学史上最早记载的蛋白酶。该家族蛋白酶拥有较高的序列相似性和以 C2 为对称轴的两个双叶型三级结构^[21]。所有哺乳动物的天冬氨酸蛋白酶都是以酶原的形式合成, 然后再被激活为有功能的活性形式^[22]。天冬氨酸蛋白酶的主要功能是降解蛋白、抗原和促进其他酶的活化等。除此之外, 该家族不同的蛋白酶间还具有一些不同的分子特性, 如哺乳动物中的胃蛋白酶主要与食物消化有关, 肾素能调节血压水平, 过量表达的组织蛋白酶 D 酶原能促进肿瘤细胞的生长, 而组织蛋白酶 E 却能抑制肿瘤细胞的生长; 植物中天冬氨酸蛋白酶还存在特有的促进蛋白裂解的序列。

常见的天冬氨酸蛋白酶抑制剂有三种, 分别是 Pepstatin A, EPNP [1, 2-epox-y-3-(p-nitrophenoxy) propane] 和 DAN (diazoacetyl-DL-norleucine methylester)。Pepstatin A 是天冬氨酸蛋白酶催化作用的过渡态类似物, 可以广泛抑制该家族蛋白酶的催化活性^[23], 能抑制酸性蛋白酶类, 例如胃蛋白酶, 组织蛋白酶 D, 蛋白酶 B, 牛凝乳蛋白酶等, 该抑制剂对于底物的抑制作用是特异的, 对于苏氨酸丝氨酸蛋白酶等没有抑制作用。EPNP 可以酯化酶的特定羧基, 其抑制作用不可逆^[24]; DAN 可以酯化特定的天冬氨酸残基, 在胃蛋白酶中该残基是 Asp-215^[25-26], 除以上三种常见的抑制剂外, 不同的蛋白酶还有其特异的抑制剂, 如乳清蛋白可以部分抑制凝乳酶水解酪蛋白的过程^[27]; 而从蛔虫肠道提取的胃蛋白酶抑制剂 PI-3 (pepsin inhibitor 3) 虽然对组织蛋白酶 D 没有抑制作用, 但却可以和多种天冬氨酸蛋白酶形成复合体^[28]; 阿利克仑 (aliskiren) 是临床上常用的肾素抑制剂^[29], 目前已应用于临床的 HIV PR 抑制剂有沙奎那韦

(saquinavir, SQV) 利托那韦 (ritonavir, RTV) 等, 其中多数药物是依据 HIV PR 切割 HIV 前体蛋白质上的活性位点序列为模板设计开发的^[30]。植物蛋白酶抑

制剂可能在植物的天然抵抗昆虫系统中起着重要作用^[31,32]。近些年来,人工合成的天冬氨酸蛋白酶抑制剂也越来越多。

广州管圆线虫的天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (AcAPI) 尚未有文献报道。目前,已从多种寄生线虫中分离到 API 或其类似物, Aspins, 一种只属于寄生虫的天冬氨酸蛋白酶抑制剂^[33], 包括猪蛔虫 (*Ascaris suum*)^[34]、旋盘尾丝 (*Onchocerca volvulus*)^[35]、薄副鹿圆线虫 (*Parelaphostrongylus tenuis*)^[36]、犬恶丝虫 (*Dirofilaria immitis*)^[37,38]、魏氏棘唇线虫 (*Acanthocheilonema viteae*)^[39]、蛇形毛圆线虫 (*Trichostrongylus colubriformis*)^[33]、奥氏奥斯特线虫 (*Ostertagia ostertagi*)^[40]、犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*)^[41]、锡兰钩虫 (*Ancylostoma ceylanicum*) 等寄生线虫中分离到 API。它们可能在寄生线虫适应宿主体内寄生生活中发挥重要作用。

API 是免疫显性的过敏原, 在猪蛔虫、犬恶丝虫和旋盘尾丝虫等寄生虫中可以诱导产生 IgE^[34,37,38], 其是通过刺激产生 II 型细胞因子来影响淋巴细胞的功能。这种现象与线虫在免疫逃避过程中, 宿主的 II 型细胞因子的表达是一致的。人蛔虫的天冬氨酸蛋白酶抑制剂可以特异的抑制组织蛋白酶 E 的活性来抑制 B 淋巴细胞处理抗原呈递过程。

猪蛔虫的 PI3 保守性与人蛔虫的 API 很相近^[42], PI3 与胃蛋白酶、胃亚蛋白酶^[42]和组织蛋白酶 E 是紧密结合的^[43-45], 用 X-射线衍射的方法解析 PI3 与胃蛋白酶的作用结构, 发现其有两个主要的作用位点^[46], 显示 PI3 对于抑制天冬氨酸蛋白酶的作用机制是很特殊的。猪蛔虫的 PI-3^[47]和旋盘尾丝虫的 Ov33^[48]在体外可以抑制胃蛋白酶和组织蛋白酶 E^[36,42,49-52]等蛋白酶的活性, 组织蛋白酶 E 被认为是在免疫系统中的抗原呈递的过程具有重要作用^[53], 从而逃避宿主的免疫攻击; 而在蛇形毛圆线虫中天然蛋白或重组蛋白对于猪胃蛋白酶则没有相关的抑制活性^[33]。利用 IgG 的免疫检测寄生线虫的天冬氨酸蛋白酶抑制剂的方法, 已经发展为检测寄生线虫是否在宿主体内感染一种方法, 已经报道了有在人体内的旋盘尾丝虫^[35]、狗和猫的犬恶丝虫^[38]和在红鹿体内寄生的薄副鹿圆线虫^[36]。然而, 对于 IgE 的应答作用还没有深入的研究, 虽然在旋盘尾丝虫中有研究, 但是其研究的是在体外诱导易感人群的外周血单核细胞产生的特异的 IgE 和 IgG4; 而蛇形毛圆线虫是在宿主体内检测, 研究发现宿主的抗性系产生的 IgE 显著高于易感系和对照组, western 实验可以发现用抗性系的血清可以清楚的检测出 31KD 的

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.