

猪带绦虫 45W 基因家族 cDNA 克隆和序列分析

贾万忠, 郑亚东, 王佩雅, 陈 涓, 程晓红, 景志忠, 才学鹏

(中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

摘要: 根据猪带绦虫 45W 基因序列设计引物, 用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 对六钩蚴总 RNA 进行 cDNA 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离、纯化、回收, 与载体 pGEM T-easy Vector 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆, 测序。结果显示, 已成功克隆到重要保护性抗原 45W 基因 B 型转录本 cDNA, 完整开放阅读框 (ORF) 的大小为 459 bp。序列同源性分析与比较表明, 所获得的 9 个 B 型转录本 cDNA 除 TSO45W-4B-1 和 TSO45W-4B-2 与已报道的 TSO45W-4B 同源外, 其余均属于首次报道的 45W 基因家族新成员。各 cDNA 克隆之间核苷酸序列的差异性为 1.5%~19.8%, 氨基酸序列之间的差异性为 2.6%~29.7%, 后者比前者的差异程度更大。

关键词: 猪带绦虫; 45W 基因; cDNA

Cloning and Sequencing of Complementary DNA of 45W Gene Family from *Taenia solium*

JIA Wan-zhong, ZHENG Ya-dong, WANG Pei-ya, CHEN Juan, CHENG Xiao-hong, JING Zhi-zhong, CAI Xue-peng

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046)

Abstract: Complementary DNAs (cDNAs) of 45W gene family were amplified from total RNA of hatched and activated *Taenia solium* oncosphere using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The agarose gel electrophoresis of the PCR products showed that the target DNA fragments were specifically amplified. The fragments (492 bp) were purified using DNA purification kit, inserted into pGEM-T Easy Vector, and transformed into JM 109 and then sequenced. The relative sequences were retrieved from GenBank and aligned with our data by DNASTAR software. The results showed that the cDNAs of 9 B-type transcripts of *T. solium* have been obtained with a 459 bp open reading frame. These transcripts belonged to the *T. solium* 45W gene family with 1.5%–19.8% nucleotide divergence and 2.5%–29.7% amino acid residue divergence. 7 of 9 transcripts were the new members reported at the first time, while the others almost had the same sequences as TSO45W-4B reported in GenBank.

Key words: *Taenia solium*; 45W gene; cDNA sequence

猪囊尾蚴 (*Cysticercus cellulosae*) 病是一种由猪带绦虫 (*Taenia solium*) 幼虫引起的严重危害畜牧业生产和人类身体健康的人畜共患寄生虫病, 是目前世界范围内公认的社会、政治、经济病^[1, 2]。猪囊虫在猪 (中间宿主) 和人 (唯一终末宿主) 之间循环, 人同时可作为中间宿主。药物防治存在潜在抗药性危险和残留等问题, 因而深入揭示本病免疫机理, 研制和开发疫苗尤其是基因工

程疫苗已成为目前猪囊虫病研究的热点。囊尾蚴病的免疫预防研究开展较早, 全囊虫匀浆抗原、六钩蚴抗原、六钩蚴排泄/分泌抗原、囊尾蚴体外培养的分泌代谢抗原和组织培养的细胞抗原等已用于免疫保护性试验。结果表明, 这些抗原作为疫苗均能取得良好的预防效果, 可使免疫动物获得抗虫卵攻击感染的坚强抵抗力, 多数动物能得到完全保护。并且免疫保护作用主要是抗体介导的体液免疫应答,

收稿日期: 2002-09-05

基金项目: 国家重点基础研究“973”发展规划资助项目

作者简介: 贾万忠 (1964-), 男, 甘肃武威人, 副研究员, 博士, 主要从事寄生虫病学研究。Tel: 0931-8342716, 8342670; E-mail: jwanzhong@yahoo.com.cn。才学鹏为通讯作者, Tel: 0931-8342575; E-mail: caixp@public.lz.gs.cn

这表明疫苗防治具有良好的应用前景^[3]。囊尾蚴病的免疫预防之所以一直困扰着兽医工作者,主要原因是抗原来源问题。虽然全囊虫抗原、六钩蚴抗原能产生良好的免疫保护作用,但这些抗原的共同特点是均来自虫体自身,不能通过体外繁殖而大量获取,用这些抗原制备疫苗远远不能满足实际生产的需要。囊尾蚴组织细胞虽然已在体外培养成功,免疫保护作用也很好,但至今尚未解决生长缓慢的问题,因而能提供的抗原也十分有限。自羊囊虫基因工程疫苗问世以来,牛囊虫基因工程疫苗也已相继问世^[4,5],其中羊囊虫苗业已商品化生产^[6]。猪囊虫基因工程疫苗的研制正在进行中,相信不久也将研制成功。

本研究根据 Charles 等发表的 45W 基因序列^[7],设计引物,利用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)从猪带绦虫六钩蚴 RNA 中特异性地扩增目的基因片段,分析以获得目的基因,为今后猪囊虫基因工程疫苗研制、基因结构与功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪带绦虫由吉林农业大学囊虫病研究所刘德惠教授提供。RNA 分离与纯化试剂盒、测序质粒载体 pGEM T-easy Vector System、*E. coli* JM109 菌株、限制性内切酶 EcoRI、T4 DNA 连接酶、PCR 反应体系等为 Promega 产品。引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 虫卵孵化与激活 用灭菌生理盐水冲洗虫体 3~4 次后,用剪刀剪碎虫体。离心,4 000 r/min,10 min。沉淀用生理盐水离洗 3~4 次(4 000 r/min,10 min),用虫卵计数器在显微镜下计数。将分离的虫卵放入培养皿中,加入次氯酸钠溶液,使虫卵胚膜破裂,在所有虫卵的胚膜破裂后立即加入硫代硫酸钠溶液终止反应。用生理盐水离洗 4 次。取沉淀,用少量生理盐水悬浮,加入人工胰液,37℃ 水浴 1 h,以激活六钩蚴。用生理盐水离洗 4 次。沉淀用少量生理盐水悬浮,在液氮中冷冻备用。

1.2.2 总 RNA 的提取 按 Promega 公司 Total RNA Isolation System 的试剂盒说明操作。

1.2.3 双链 cDNA 扩增 引物设计参照 45W 基因核苷酸序列,用 Oligo 软件设计引物对。上游引物 F 从编码区起始密码子开始,下游引物 R 为 3' 端非编码

区序列。上、下游引物之间所扩增片段包括了 45W 蛋白基因的全部开放性阅读框架。以总 RNA 为模板,用 RT-PCR 合成 cDNA 第一链;以 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增双链 cDNA,扩增循环条件:95℃,变性 40 s;52℃,退火 30 s;72℃,延伸 45 s。

1.2.4 目的片段与载体的连接、转化及重组质粒鉴定 用 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物后与载体 pGEM T-easy 连接,采用 TSS 法^[8]转化 *E. coli* JM109。用无菌牙签从 LB 平板挑取白色单菌落(阳性克隆),接种于含氨苄青霉素的 LB(100 μg·ml⁻¹ Amp⁺)培养液中,37℃ 剧烈振荡(250 r/min)培养 12~16 h。按碱裂解法^[9]提取质粒,用 EcoR I 或 Not I 对质粒 DNA 进行酶切鉴定,同时用 PCR 扩增进行鉴定。

1.2.5 重组质粒的序列测定 将 PCR 扩增、酶切鉴定均为阳性的克隆,转动培养扩增。菌液由上海晶泰生物技术有限公司用 LICOR-NEN 红外全自动测序仪测序。

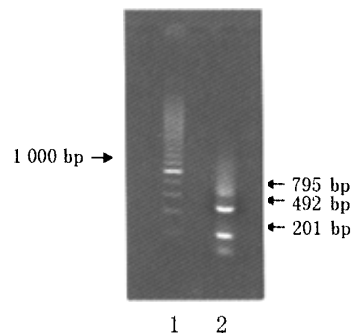
2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增产物(双链 cDNA)的电泳分析

猪带绦虫 45W 基因的 RT-PCR 产物的电泳分析见图 1。由于 45W 基因在形成成熟 mRNA 时有不同的剪接形式,因此可扩增出 3 个片段,每个片段代表一种转录本。从图谱看,各片段大小与预期的一致,从小到大依次为 201(C 型转录本)、492(B 型转录本)和 795 bp(A 型转录本)。

2.2 B 型转录本 cDNA 阳性克隆的筛选

将回收的 492 bp 大小的 DNA 片段与载体连接后

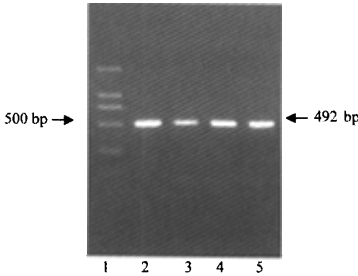


泳道 1. 200 bp 阶梯 DNA 标准分子; 泳道 2. PCR 扩增产物
Lane 1. 200 bp ladder DNA, markers; Lane 2. PCR product

图 1 猪带绦虫六钩蚴 45W 基因 cDNA 电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of 45W cDNAs from *T. solium* oncosphere

转化 *E. coli* JM109, 挑选白色菌落进行 PCR 和酶切鉴定, 将初筛的阳性克隆进行序列测定, 其中 PCR 鉴定结果见图 2。



泳道 1. DNA 分子标准, 从大到小依次为 2 000、1 000、750、500、250 和 100bp; 泳道 2~5. TS045W-B1、B2、B3 和 4B-1 Lane 1. DNA markers(2 000, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp); Lane 2-5. Positive colonies B1, B2, B3 and 4B-1

图2 重组质粒 PCR 扩增产物的电泳分析图谱

Fig.2 Electrophoresis of PCR products of recombinant plasmids

2.3 阳性克隆的核苷酸序列测定

经过同源性分析, 共获得 9 个目的阳性克隆, 分别命名为 TS045W-B1、TS045W-B2、TS045W-B3、TS045W-B8、TS045W-B9、TS045W-B10、TS045W-B11、TS045W-4B-1 和 TS045W-4B-2, 其 ORF 核苷酸序列结果见图 3, 在 GenBank 的登录号分别为 AF523829、AF523868、AF523830、AF523869、AF523870、AF523871、AF523831、AY379478 和 AY379479。TS045W-4B-1 和 TS045W-4B-2 的序列的 ORF 中第 148 位分别为 A 和 G, 430 位均为 C; 而参考序列 TS045W-4B (AF267119 和 AF762124) 的 ORF 中第 148 位和 430 位分别为 G 和 T, 其余位置上的碱基相同。

2.4 目的克隆阅读框推测的氨基酸序列

目的克隆开放性阅读框(ORF)长度为 459 bp, 编码 152 个氨基酸残基组成的多肽。由目的克隆 ORF 推测的氨基酸序列见图 4。

2.5 序列的同源性分析与比较

B 型 cDNA 的核苷酸和氨基酸序列间同源性和变异大小比较结果用 DNASTAR 软件的 sequence distance 表示(表 1)。

2.6 外显子 3 氨基酸序列同源性比较

TS045W-B2 与 B8, B1 与 B3 的外显子 3 之间氨基酸序列同源性最高, 约为 95%(93/98)。B8 与 4B-1 和 4B-2 外显子 3 氨基酸之间差异性最大, 约为

33.7% (33/98)。除 4B-1 和 4B-2 外, 其它 B 型转录本中 B1、B2 外显子 3 之间氨基酸序列差异最大, 约为 17.3%(17/98)。

3 讨论

3.1 羊囊虫 45W 基因组成一个基因家族^[10], Charles 等^[7]的研究结果表明, 猪带绦虫 45W 基因也构成基因家族, 每一基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 基因的转录产物在形成 mRNA 时采用顺式剪接, 且按 3 种形式进行剪接, 形成 3 种大小不同的转录本。图 1 的结果与此相符, 其中 B 型转录本由外显子 I、III 和 IV 组成。外显子 I 长为 70 bp, 外显子 III 长为 291 bp, 外显子 IV 长为 98 bp, 完整的开放性阅读框大小为 459 bp, 编码 152 个氨基酸组成的多肽, 分子量约为 16 kD。通过序列同源性比较, 除 4B-1 和

	[1	---外显子1(exon1)---	60]
TS045W-B1	ATGGGCTCTCAGTTC	CACTTGATTCTATTGCTGACTTCAATTTGGCTGGAAACCA	CAAG
TS045W-B2	-----	-----	-----
TS045W-B3	-----	-----	-----
TS045W-B8	-----	-----	-----
TS045W-B9	-----	-----	-----
TS045W-B10	-----	-----	-----
TS045W-B11	-----	-----	-----
TS045W-4B-1	-----C-A--GTC-C-C--G--G--G--A--TTGG--T--GA		
TS045W-4B-2	-----C-A--GTG-C-C--G--G--G--A--TTGG--T--GA		
TS045W-4B	-----C-A--GTC-C-C--G--G--G--A--TTGG--T--GA		

	[61		120]
TS045W-B1	GCAACATCTACAGAAATCTA7GAAAACTACTTCCACTAGGTCCTCCCTGACTAATCAA		
TS045W-B2	-----TGA-G-G-A--T--		
TS045W-B3	-----		
TS045W-B8	-----TGA-G-G-A--T--		
TS045W-B9	-----		
TS045W-B10	-----T--G-G--T--		
TS045W-B11	-----		
TS045W-4B-1	-A-T-CAT-AG--GG-A--CC-CT-TT-----T-T-----T-		
TS045W-4B-2	-A-T-CAT-AG--GG-A--CC-CT-TT-----T-T-----T-		
TS045W-4B	-A-T-CAT-AG--GG-A--CC-CT-TT-----T-T-----T-		

	[121	---外显子3(exon3)---	180]
TS045W-B1	TTCAGTCAAGTAAGTTGGATACAGCAAAATCCGGGAAGAAGTCTATGATAGTCA		
TS045W-B2	-----T-GAC--T--C--CGG-G--		
TS045W-B3	-----		
TS045W-B8	-----T-GAC--T--C--CGG-G--		
TS045W-B9	-----T-GAC--T--C--CGG-G--		
TS045W-B10	-----G-C--T--C--CGG-G--		
TS045W-B11	-----T-GAC--T--C--CGG-G--		
TS045W-4B-1	-----T-AT--A--AC-C-CAA-GC--A--		
TS045W-4B-2	-----T-GAT--A--AC-C-CAA-GC--A--		
TS045W-4B	-----T-GAT--A--AC-C-CAA-GC--A--		

	[181		240]
TS045W-B1	TTGACGACAGATGCTTCTACCCXCCAGTGTGGAAGATCGGACTCTCACGCTTCACT		
TS045W-B2	-----T--C--G--		
TS045W-B3	-----		
TS045W-B8	-----T--C--G--		
TS045W-B9	-----T--C--G--		
TS045W-B10	-----T--C--G--		
TS045W-B11	-----		
TS045W-4B-1	C-----A-----G--G--GA-		
TS045W-4B-2	C-----C-----G--G--GA-		
TS045W-4B	C-----A-----G--G--GA-		

	[241		300]
TS045W-B1	GTAGAGATATCATCTTGTGACGACTGATCCXCCAGCACTATATATTGCACTGTGACC		
TS045W-B2	-----AT--AA		
TS045W-B3	-----AT--AA		
TS045W-B8	-----AT--AA		
TS045W-B9	-----AT--AA		
TS045W-B10	-----AT--AA		
TS045W-B11	-----C-----		
TS045W-4B-1/2	--G--GA-G--C--G--		
TS045W-4B	--G--GA-G--C--G--		

```

[301                                360]
TS045W-B1  GCATTGGAGATGGACGCAATTCTCAGTTCACACAGACAGACTCGAACACTGAAAAC
TS045W-B2  -T--A-----G-----
TS045W-B3  -T--A-----G-----
TS045W-B8  -T--A-----G-----
TS045W-B9  -T--A-----G-----
TS045W-B10 -T--A-----G-----
TS045W-B11 -T--A-----G-----
TS045W-4B-1 -T--C--G--G--G--T--AC--AA--T-----G--G-
TS045W-4B-2 -T--C--G--G--G--T--AC--AA--T-----G--G-
TS045W-4B  -T--C--G--G--G--T--AC--AA--T-----G--G-

[361                                420]
---外显子4(exon4)---
TS045W-B1  GCCCATGGCGGAGTAACAGCTGGACGACTAGTGATCTGGTATAGCCTCCGCAATACT
TS045W-B2  -----
TS045W-B3  -----
TS045W-B8  -----
TS045W-B9  -----
TS045W-B10 -----
TS045W-B11 -----
TS045W-4B-1 -----
TS045W-4B-2 -----
TS045W-4B  -----

[421                                459]
TS045W-B1  GGACTCTCTTCACTTGCAGCTGACGACTAGTCTGCTTCA
TS045W-B2  -----
TS045W-B3  -----
TS045W-B8  -----
TS045W-B9  -----
TS045W-B10 -----
TS045W-B11 -----
TS045W-4B-1 -----
TS045W-4B-2 -----
TS045W-4B  -----

```

“-”表示与TS045W-B1序列相同的核苷酸,斜体字母部分为外显子3所在区域

Positions of nucleotide acid identity with TS045W-B1 shown as “-”; exon 3 indicated by italic letters

图3 B型转录本目的克隆ORF核苷酸序列

Fig.3 Nucleotide sequences for ORF of positive target colonies from B-type transcripts

```

[1                                80]
---外显子1(exon1)---
TS045W-B1  MASQPHILLLLFTSLAGHRKATSITV/MCVYFHWGPTVQSTIQVSDQQLVGEENSWVPT
TS045W-B2  -----EIAK-----LD-V-A-GR--
TS045W-B3  -----EIAK-----LD-V-A-GR--
TS045W-B8  -----EIAK-----LD-V-A-GR--
TS045W-B9  -----EIAK-----LD-V-A-GR--
TS045W-B10 -----IA-----V--A-AR--
TS045W-B11 -----IA-----LD-V-A-GR--
TS045W-4B-1 -LC--V--V--LDVRESLS-E-PLF--Y-----LD-E-TRVA-I-
TS045W-4B-2 -LC--V--V--LDVRESLS-E-PLF--Y-----LD-E-TRVA-I-
TS045W-4B  -LC--V--V--LDVRESLS-E-PLF--Y-----LD-E-TRVA-I-

[81                                120]
---外显子3(exon3)---
TS045W-B1  LTAFMASVNSVRESASRFSWGRITVYGLMPDTLYIATVLEIKGKPLISTRIITVLYKT
TS045W-B2  -----LVV-K--K-----
TS045W-B3  -----LVV-K--K-----
TS045W-B8  -----LVV-K--K-----
TS045W-B9  -----LVV-K--K-----
TS045W-B10 -----LVV-K--K-----
TS045W-B11 -----LVV-K--K-----
TS045W-4B-1 -----VD--EV-----T-G-----V-QE--R--FV-K-Y---ES
TS045W-4B-2 -----VD--EV-----T-G-----V-QE--R--FV-K-Y---ES
TS045W-4B  -----VD--EV-----T-G-----V-QE--R--FV-K-Y---ES

[121                                152]
---外显子4(exon4)---
TS045W-B1  GHRGVTVYVTSNGSGLASALLGLLVTCTVLA
TS045W-B2  -----
TS045W-B3  -----
TS045W-B8  -----
TS045W-B9  -----
TS045W-B10 -----
TS045W-B11 -----
TS045W-4B-1 -----L-----
TS045W-4B-2 -----L-----
TS045W-4B  -----L-----

```

“-”表示与TS045W-B1序列相同的氨基酸残基,斜体字母部分为外显子3所编码的氨基酸区域

Positions of amino acid identity with TS045W-B1 shown as “-”; exon 3 indicated by italic letters

图4 目的克隆开放性阅读框推测的氨基酸序列

Fig.4 Deduced amino acid sequence of ORF of target colonies

表 B型转录本cDNA之间核苷酸序列和氨基酸序列比对分析结果

Table PAM250 residue weight table of sequence distances of TS045W cDNA using clustal method

	氨基酸差异性(%) Divergence in amino acid								cDNA克隆名称 Name of cDNA clone	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
核苷酸差异性(%) Nucleotide divergence	1	~	11.2	3.3	7.9	8.6	8.6	3.9	27.6	TS045W-B1
	2	6.1	-	7.9	3.3	2.6	3.3	7.2	28.3	TS045W-B2
	3	1.5	4.5	-	11.2	5.3	5.3	7.2	28.3	TS045W-B3
	4	4.5	1.5	6.1	-	5.9	7.2	3.9	28.9	TS045W-B8
	5	4.5	1.5	2.9	3.1	-	3.9	4.6	17.6	TS045W-B9
	6	4.3	1.8	2.7	3.3	2.0	-	8.6	29.7	TS045W-B10
	7	2.4	4.0	4.0	2.4	2.4	4.5	-	26.3	TS045W-B11
	8	18.9	19.5	18.9	19.5	18.4	19.8	18.1	-	TS045W-4B-1 or 2

4B-2与已报道的4B同源外,其余转录本的核苷酸序列与已发表的1B和5B序列以及由2A和3A推测的2B和3B序列均不同^[7](数据在本文中未列出),为新发现的45W基因家族成员,属国内外首次报道。

3.2 从核苷酸序列(如图3和表所示)看,TS045W-4B-1和TS045W-4B-2与其它45W基因序列差异很大(18.1%~19.8%),具有特殊性。除45W-4B-1和45W-4B-2外,其它序列间差异为1.5%~6.1%。除4B外,B型转录本cDNA序列外显子I和外显子IV核苷

酸序列很保守,截止目前尚未发现碱基有变异现象。而外显子III除91~144、171~196、205~231和241~293之间的核苷酸相对保守外,其它部位变异很大,尤其是第72~90、145~170、197~204和294~307位碱基变化很大,为45W基因的高变区。TS045W-4B-1和TS045W-4B-2的外显子III与其它45W基因外显子III核苷酸之间的差异为19.2%~21.9%,其它45W基因的外显子III之间核苷酸差异性为2.5%~10%。

3.3 Charles等^[7]认为,外显子I和IV编码45W

抗原的疏水区,氨基酸序列比较保守。而外显子Ⅲ编码Ⅲ型纤链蛋白(fibronectin type Ⅲ),氨基酸序列变异较大。图4和表均表明,B型转录本cDNA的氨基酸差异性为2.6%~29.7%,其中外显子Ⅲ之间氨基酸差异性为5%~33.7%(如结果2.5所示),氨基酸序列的变异程度的确较大,而且氨基酸水平上的变异程度明显高于核苷酸水平上的变异,这种现象在抗原基因中比较少见。

3.4 Plancarte A等^[2]用 *T. ovis* 45W、16和18 kD重组抗原混合疫苗免疫猪可使猪体获得显著的交叉免疫保护作用。猪带绦虫45W拥有羊带绦虫VTVVTT主要保护性抗原决定簇(图4),这构成了交叉免疫的分子基础^[11]。RotheI等^[12]将45W基因分别克隆至真核质粒表达载体pcDNA3和羊腺病毒载体(DNA200)构建成pcDNA3核酸疫苗和DNA200重组活病毒疫苗都能使免疫羊获得抗虫卵攻击感染的强抵抗力。这表明,带绦虫六钩蚴45W抗原是一种重要的保护性抗原,用作疫苗前景喜人^[5,6,13]。从理论上讲,如果使用猪带绦虫45W重组抗原用于猪囊虫免疫防治,效果将更为理想。因此,笔者的研究成果将为今后开发猪带绦虫45W基因工程重组抗原疫苗或基因疫苗打下了良好的基础。

3.5 带绦虫45W基因的转录产物和翻译产物数量较多,各产物之间在分子大小、核苷酸和氨基酸组成和排列等方面存在差异(另文报道),推测45W蛋白的抗原性可能变异很大。据文献报道,45S与45W之间只有3个氨基酸的差异,但免疫原性却相差很大。此外,45W抗原主要在六钩蚴侵入机体的感染阶段表达,虫卵孵化和激活时表达量增加,这可能与六钩蚴侵入宿主的肠道粘膜相关^[10,11]。因此,45W抗原结构与功能方面的研究将为其它寄生虫重要抗原的研究提供一个实验模型。

致谢:本研究得到了课题组其他成员以及尚佑军、刘湘涛、周继章等同志的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

References

- [1] 马云祥. 当前我国猪带绦、囊虫病防治研究中的问题和对策. 中国寄生虫病防治杂志, 2000, 13(1): 1-4.
Ma Y X. Current problems and strategy to control *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in China. *China Journal of Parasitic Disease Control*, 2000, 13(1): 1-4. (in Chinese)

- [2] Plancarte A, Flisser A, Gauci C G, Lightowlers M W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombination oncosphere antigens. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29: 643-647.
- [3] Lightowlers M W, Flisser A, Gauci C G, Heath D D, Jensen O, Rolfe R. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitology Today*, 2000, 16: 191-196.
- [4] Johnson K S, Harrison G B, Lightowlers M W, O'Hoy K L, Cogle W G, Dempster R P, Lawrence S B, Vinton J G, Heath D D, Richard M D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*, 1989, 338(13): 585-587.
- [5] Lightowlers M W, Rolfe R, Gauci C G. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Experimental Parasitology*, 1996, 84: 330-338.
- [6] Rickard M D, Adolph A J. Vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens collected during short-term *in vitro* incubation of activated *Taenia ovis* oncospheres. *Parasitology*, 1977, 75: 183-188.
- [7] Gauci C G, Lightowlers M W. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2001, 112: 173-181.
- [8] 颜子颖, 王海林译. 一步法制备和转化感受态细菌. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 2001: 23.
Yan Z Y, Wang H L (Translated). Prepare and transform competent bacterial using a single step. *Short Protocols in Molecular Biology*. Beijing: Scientific Press, 2001: 23. (in Chinese)
- [9] 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德译. 质粒DNA的小量制备(碱裂解法). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 19-21.
Jin D Y, Li M F, Hou Y D (Translated). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Beijing: Scientific Press, 1999: 19-21. (in Chinese)
- [10] Waterkeyn J G, Lightowlers M W, Coppel R, Cowman A F. Characterization of the gene family encoding a host-protective antigen of the tapeworm *Taenia ovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995, 73: 123-131.
- [11] Lightowlers M W, Waterkeyn J G, RotheI J S, Gauci C G, Harrison G B L. Host-protective fragments and antibody binding epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 1996, 18: 507-513.
- [12] RotheI J S, Boyle D B, Both G W, Pye A D, Waterkeyn J G, Wood P R, Lightowlers M W. Sequential nucleic acid and recombinant adenovirus vaccination induces host-protective immune responses against *Taenia ovis* infection in sheep. *Parasite Immunology*, 1997, 19: 221-227.
- [13] Lightowlers M W. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29: 811-817.

(责任编辑 林鉴非)