

华支睾吸虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶重组蛋白的纯化、酶学活性及免疫学研究

张咏莉^{1,2}, 吴德², 余新炳^{2*}

【摘要】 目的 体外制备华支睾吸虫 3-磷酸甘油醛脱氢酶重组蛋白 (CsGAPDH), 分析其酶学活性及免疫学特性。方法 常规表达重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH, 用谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 亲和纯化试剂盒纯化重组蛋白, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 用凝血酶和纯化柱酶切、纯化的 CsGAPDH 免疫 BALB/c 小鼠, 制备抗血清。ELISA 检测抗 IgG 抗体滴度, 浓缩型 S-P 免疫组化 3 步法检测 CsGAPDH 抗原在免疫小鼠体内的分布和表达。蛋白质印迹法 (Western blotting) 鉴定其抗血清的特异性。建立酶反应体系测定重组蛋白 CsGAPDH 的酶催化活性。结果 纯化蛋白样品呈单一条带。免疫动物获取 CsGAPDH 抗血清, 在免疫过程中抗体滴度呈连续上升趋势。CsGAPDH 抗原分布和表达于小鼠肌细胞膜部位。免疫小鼠血清具有抗 CsGAPDH 特异性抗体。重组蛋白 CsGAPDH 具有酶生理活性, 其酶活力单位为 $2\ 872\ \text{U}\ \text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。结论 制备的重组蛋白 CsGAPDH 具有较好的酶活性和免疫原性。

【关键词】 华支睾吸虫; 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 蛋白质印迹法; 免疫原性

中图分类号: R532.21; R392.11

文献标识码: A

Purification, Enzyme Activity and Immunology Study of Recombinant Protein Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of *Clonorchis sinensis*

ZHANG Yong-li, WU De, YU Xin-bing

(Department of Medical biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

【Abstract】 Objective To produce prokaryotic recombinant protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Clonorchis sinensis* (CsGAPDH), analyze its enzyme activity and immunological function. **Methods** The recombinant CsGAPDH was purified according to the protocol of GST-Bind™ kit and was digested with thrombin proteinase and eluted with wash buffer. The BALB/c mice were inoculated with the purified protein. The antisera collected from the mice were used to detect the titres of IgG antibodies by ELISA, and Western blotting was used to identify the specificity of the antisera with the purified CsGAPDH. S-P immunohistochemistry method was used to confirm the expression and distribution of CsGAPDH in adult *Clonorchis sinensis* with the polyclonal antibodies from immunized BALB/c mice. The CsGAPDH catalytic activity was evaluated employing the conventional substrate glyceraldehydes-3-phosphate (3-GAP). **Results** SDS-PAGE showed a single purified protein band. Gel scanning analysis revealed that the protein purity of CsGAPDH was 90%. ELISA analysis showed an increased IgG value. S-P immunohistochemistry analysis demonstrated that the recombinant plasmid pGEX-4T-1-GAPDH expressed and distributed in muscle cell membrane of immune mice. Western blotting result suggested that CsGAPDH protein contained essential epitopes with high antigenic activities. This protein CsGAPDH could catalyzed 3-GAP with enzymatic active unit of $2\ 872\ \text{U}\ \text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$. **Conclusion** The recombinant protein CsGAPDH shows a proper enzymatic activity and immunogenicity.

【Key words】 *Clonorchis sinensis*; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); Western blotting; Immunogenicity

Supported by the Natural Science Fund of Guangdong Province (No.20003026); Guangdong Province "211 Project" Fund (No.98169); Doctoral Spot of the Ministry of Education (No.93-186)

* Corresponding author, E-mail: yuxb@gzsums.edu.cn

病原体某些生理代谢酶用于研究疫苗和药物的重

要靶分子, 已引起极大关注。如: 有关寄生原虫, 锥形虫和利什曼原虫的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH), 已在基因水平上进行深入研究^[1,2]。GAPDH 作为疟原虫糖酵解过程中的关键酶, 其基因的体外重组克隆、表达研究亦有相关报道^[3-5]。本研究采用分子生物学和免疫学方法对华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*) GAPDH 重组蛋白 (CsGAPDH) 进

基金项目: 广东省自然科学基金团队资助项目 (No. 20003026);

"211" 重点学科建设基金 (No. 98169);

国家教育部博士点基金 (博教 No. 93-186)

作者单位: 1 广东药学院基础学院生物教研室, 广州 510224;

2 中山大学基础医学院病原生物学部寄生虫教研室, 广州 510089

* 通讯作者, E-mail: yuxb@gzsums.edu.cn

行大量纯化、酶学、免疫学鉴定,将为华支睾吸虫病诊断性或保护性抗原疫苗的开发提供材料,为进一步了解华支睾吸虫代谢和致病作用提供参考。

材料与方 法

1 菌株和表达载体

大肠埃希菌菌株 BL21、原核表达载体 pGEX-4T-1 为本室保存。

2 主要试剂

酶活性分析试剂 D 型 3-磷酸甘油醛、腺苷酸 (AMP)、焦磷酸钠、二硫苏糖醇 (DTT), 购自美国 Sigma 公司。谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 标签蛋白纯化试剂盒 (GST-Bind™ Purification kit) 购自美国 Novagen 公司, S-P 免疫组化染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

3 动物

雄性 BALB/c 清洁级小鼠 30 只 (中山大学实验动物中心提供), 6~8 周龄。随机分为 3 组: PBS 阴性对照组、重组蛋白 CsGAPDH 免疫组、重组蛋白 CsGAPDH 与重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH 混合免疫组。

4 方 法

4.1 pGEX-4T-1-GAPDH 基因克隆、重组质粒构建
由本研究室提供。

4.2 重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH 的大规模表达
将重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH 的单菌落接种至 20 ml 含氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 rpm/min 振荡过夜。取其 20 ml 接种至 6L LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 250 rpm/min 振荡至吸光度 (A_{600} 值) 约为 0.7 时, 取其 1 ml 作为诱导前阴性对照物, 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。剩余菌液加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.2 mmol/L, 26 $^{\circ}\text{C}$ 250 rpm/min 诱导过夜, 取其 1 ml 作为诱导对照物, 用于 SDS-PAGE 分析。诱导过夜后立即将菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 \times g 离心 20 min 收集沉淀 (菌体), -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

4.3 重组蛋白 CsGAPDH 亲和层析纯化及酶切

4.3.1 pGEX-4T-1-GAPDH 表达蛋白的纯化 将 -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜的细菌沉淀置于冰上溶解 15 min, 按每克细菌湿重加入 5 ml 细胞裂解液 [50 mmol/L Tris·HCl 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 100 mmol/L NaCl pH 8.0] 重悬菌体, 加入溶菌酶 (lysozyme) 至终浓度 1 mg/ml, 冰浴 30 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 功率 150 W, 破菌 4 min, 加

入 RNA 酶 A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, DNA 酶 I 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$, 冰浴 10~15 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 \times g 离心 20 min, 重复 2 次, 收集上清, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌。取其 5 μl 进行 SDS-PAGE 分析, 检查重组蛋白可溶性。按照 GST 标签蛋白纯化试剂盒 (美国 Novagen 公司) 操作说明纯化重组蛋白, 收集样品, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

4.3.2 pGEX-4T-1-GAPDH 表达蛋白的酶切 将上述蛋白洗脱液注入 GST 亲和层析柱, 注入 10 ml 吸附液使之平衡。40 μl 凝血酶 (thrombin) 溶于 1 ml 冰浴的 PBS, 缓慢加入层析柱, 将层析柱放置室温下酶切 14~18 h。后继续注入 4 ml 吸附液并收集样品, 取其样品 5 μl 进行 SDS-PAGE 分析, 鉴定酶切效果。

4.3.3 重组蛋白 CsGAPDH 浓度测定 采用 Bradford 法分别测定牛血清白蛋白 (BSA) 标准蛋白 100~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 系列浓度及阴性空白管吸光度 (A_{595} 值), 绘制标准曲线, 计算重组蛋白 CsGAPDH 浓度^[6]。

4.4 BALB/c 小鼠免疫实验 重组蛋白 CsGAPDH 免疫组, 每鼠皮下多点注射重组蛋白 CsGAPDH 抗原 50 μg , 辅以完全福氏佐剂 (乳化剂量为 1:1)。2 周后同法重复 1 次, 辅以不完全福氏佐剂 (乳化剂量为 1:1)。再隔 2 周, 同法免疫 1 次, 无佐剂。分别与免疫前 (第 0 天) 及免疫后 20 d 尾部取血, 40 d 眼球取血, 分离血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。重组蛋白 CsGAPDH 与重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH 混合免疫组, 在重组蛋白免疫的同时, 小鼠每次于股四头肌注射 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ 重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH, 并于免疫前 3 d 腹部皮下注射 0.5 mg/ml 盐酸利多卡因 100 μl 预处理。阴性对照组, 注射 PBS 100 μl , 同步进行。

4.5 ELISA 检测小鼠血清 IgG 抗体 参考文献 [7] 方法制备免疫小鼠特异性抗血清。重组蛋白 CsGAPDH 抗原用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 包被入 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 18~24 h。用生理盐水-吐温 20 (NS-Tween20) 洗板。免疫小鼠血清特异性抗血清用 PBS-Tween20-BSA 稀释至 1:125, 每孔加 100 μl , 室温 2~3 h。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗小鼠 IgG (1:400) 每孔加 100 μl , 室温 2~3 h, 洗涤方法同前。每孔加新配制的邻苯二胺 (OPD) 溶液 100 μl 显色, 酶标仪测定吸光度 (A_{490} 值)。

4.6 免疫组化检测 CsGAPDH 蛋白抗原在免疫小鼠的分布 常规方法制作免疫小鼠股四头肌肌组织厚约 5 μm 石蜡切片, 采用生物素标记的第 2 抗体和浓缩型 S-P 免疫组化 3 步法测定华支睾吸虫 CsGAPDH 蛋白抗原的分布情况。具体操作步骤按 S-P 免疫组化染色试剂盒操作说明进行。

4.7 Western blotting 分析 用电转印仪 (美国 Bio-

Rad 公司)于 100 mA 4 °C 转移 1 h,将 SDS 胶面蛋白转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜),氨基黑染色 3~5 min 观察膜转印效果。5%脱脂奶粉-PBS-吐温 20 4 °C 封闭过夜。NC 膜转入免疫小鼠特异性抗血清 (1:125),4 °C 结合 2 h, PBS 洗 3 次, Tris 缓冲液 (TBS) 洗 3 次。后与二抗 HRP 标记羊抗小鼠 IgG (1:333) 室温结合 1 h, TBS 洗 3 次。二氨基联苯胺 (DAB) 显色 5 min, 后将 NC 膜移入 PBS 液, 终止反应。

4.8 CsGAPDH 重组蛋白体外酶活力分析 按 Zhang 等^[8]方法略加修改, 反应系统 (共 3 ml) 含 10 mmol/L 焦磷酸钠 (pH8.5), 20 mmol/L 磷酸钠, 0.25 mmol/L 氧化型辅酶 I (NAD⁺), 1 mmol/L DTT 与纯化的 CsGAPDH 酶 (10~30 μg), 25 °C 保温 5 min, 测定 A₃₄₀ 值。加入 0.25 mmol/L 3-磷酸甘油醛 (3-GAP), 记录 0~5 min 不同时段 A₃₄₀ 值。产生 1 μmol NADH/min 时为 1 个酶活力单位, 依据 Zhang 等^[8]方法计算酶活力。当体系中底物浓度 3-GAP 大于 CsGAPDH 时, 选择不同 3-GAP 浓度, 测定 CsGAPDH 与催化底物转化量的关系。选择不同 AMP 浓度作用于前述酶反应体系, 测定 AMP 对催化底物转化量还原型辅酶 I (NADH) 的影响。

结 果

1 重组质粒 pGEX-4T-1-GAPDH 的表达与蛋白纯化

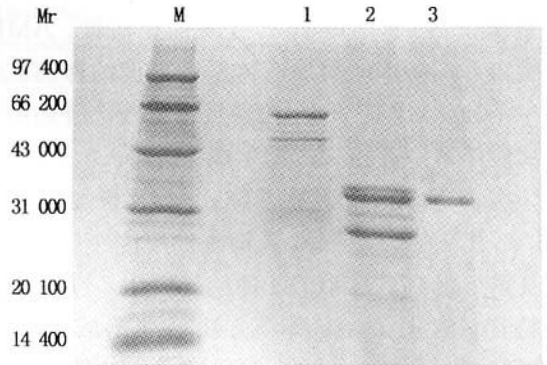
1.1 表达 将表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示, 诱导菌表达出与分子量 Mr 66 200 相接近的蛋白条带。

1.2 重组蛋白 CsGAPDH 亲和纯化及酶切 使用 GST 亲和层析柱纯化重组蛋白, 凝血酶酶切重组蛋白, 再次用冲洗液洗脱过柱, SDS-PAGE 鉴定收集液。结果显示酶切纯化后的重组蛋白 CsGAPDH 样品呈现单一条带, 凝胶扫描分析显示重组蛋白 CsGAPDH 纯度达 90% (图 1)。

1.3 蛋白浓度测定 Bradford 法测定重组蛋白 CsGAPDH 浓度为 0.35 ± 0.03 mg/ml。

2 重组蛋白 CsGAPDH 免疫血清 IgG 抗体水平测定

以纯化后的重组蛋白 CsGAPDH 免疫小鼠, 分别于免疫前及免疫后 20 d、40 d 测定各组血清中 IgG 抗体滴度。结果显示各实验组抗体滴度明显增高, CsGAPDH 组 A₄₉₀ 值分别为 0.0900 ± 0.0020、0.3773 ± 0.0178、0.4333 ± 0.0200, 混合免疫组 A₄₉₀ 值分别为 0.0787 ± 0.0125、0.6913 ± 0.0106、0.8943 ± 0.0162。



1: pGEX-4T-1-GAPDH 的表达蛋白, 2: 酶切的重组蛋白, 3: 纯化的目的重组蛋白 CsGAPDH, M: 标志物。

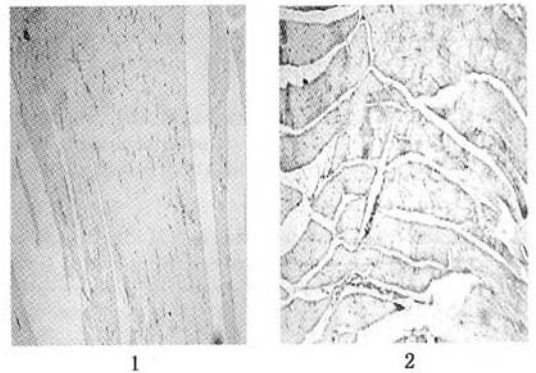
Lane 1: Expressed protein pGEX-4T-1-GAPDH, Lane 2: Digested recombinant protein, Lane 3: Purified protein CsGAPDH, M: Marker.

图 1 重组蛋白 CsGAPDH 的酶切及纯化

Fig. 1 Digestion and purification of recombinant protein CsGAPDH

3 免疫组化法评价免疫效果

小鼠注射处股四头肌肌膜表面显示阳性杂交信号, 表明此处存在重组蛋白 CsGAPDH 的表达和分布, 证实免疫动物实验效果可靠 (图 2)。



1: 对照组, 2: 实验组。1: Control, 2: Experiment.

图 2 免疫小鼠股四头肌的免疫组化反应

Fig. 2 Immunohistochemistry reaction in quadriceps femoris muscle with the serum of mice vaccinated

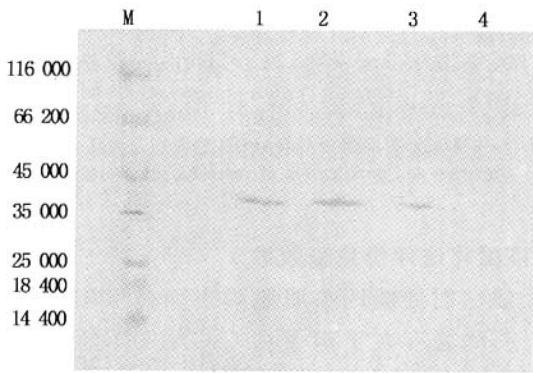
4 Western blotting

结果显示, 重组蛋白 CsGAPDH 抗血清既能识别重组蛋白 CsGAPDH, 又能识别华支睾吸虫成虫分子量约为 Mr 39 000 处的可溶性虫源蛋白。而阴性对照组则无此现象发生 (图 3)。

5 重组蛋白 CsGAPDH 的酶活力分析

表 1 显示, 在重组蛋白 CsGAPDH 的酶反应体系中, 加 3-GAP 或不加 3-GAP, 其 A₃₄₀ 值明显不同。A₃₄₀ 值随重组蛋白 CsGAPDH 加入量的增多而增高。表明所获重组蛋白 CsGAPDH 具有酶催化活性。AMP 对重组蛋白 CsGAPDH 酶反应体系吸光度的影响, 反应体

系中不加 AMP 时, A_{340} 较高且呈持续上升趋势。表明其反应体系中有相应产物生成。当加入 0.5 mmol/L AMP 时, 体系 A_{340} 值明显下降; AMP 量加大至 0.75 mmol/L, A_{340} 值继续下降, 其抑制作用进一步增强。表明所获重组蛋白 CsGAPDH 的酶反应体系符合酶学动力学特征。依据 Zhang 等^[8]方法计算酶活力单位为 $2\ 872\ U\ min^{-1}\ ml^{-1}$ 。



M: 蛋白质标志物, 1, 2: 纯化的重组蛋白 CsGAPDH, 3: 华支睾吸虫成虫的可溶性抗原, 4: 阴性对照血清。
M: Marker, Lanes 1, 2: Purified recombinant protein CsGAPDH, Lane 3: Soluble antigen of adult *Clonorchis sinensis*, Lane 4: Negative control.

图 3 重组蛋白 CsGAPDH 与其免疫小鼠血清的 Western blotting
Fig. 3 Western blotting analysis on the polyclonal antibodies of mice vaccinated with the CsGAPDH protein

表 1 重组蛋白 CsGAPDH 的酶反应体系吸光度 (A_{340} 值 $\bar{x} \pm s$)
Table 1 The A_{340} value of enzymatic reactive system of CsGAPDH

反应时间 Reactive time (min)	体系反应条件 Enzymatic reactive system		
	CsGAPDH (15 μ g)	CsGAPDH (15 μ g) + 3-GAP (0.25mmol/L)	CsGAPDH (30 μ g) + 3-GAP (0.25 mmol/L)
对照组 Control	0.121 \pm 0.002	0.128 \pm 0.004	0.494 \pm 0.002
0	0.130 \pm 0.002	0.341 \pm 0.002	0.505 \pm 0.003
1	0.129 \pm 0.003	0.335 \pm 0.001	0.508 \pm 0.002
2	0.132 \pm 0.001	0.345 \pm 0.003	0.522 \pm 0.004
3	0.135 \pm 0.002	0.356 \pm 0.003	0.556 \pm 0.003
4	0.133 \pm 0.003	0.378 \pm 0.004	0.634 \pm 0.003
5	0.134 \pm 0.002	0.392 \pm 0.003	0.652 \pm 0.004

注: 各组蒸馏水对照组, A_{340} 值均为 0.000。

Note: Distilled water control in each group, A_{340} = 0.000.

讨 论

GAPDH 广泛存在于原核和真核生物中, 在糖代谢中具有重要作用。最近发现, 哺乳动物 GAPDH 除了具有酶活性外, 还参与膜转运、微管装配、核 RNA 转运、甚至基因表达的翻译调控等过程^[9, 10]。为大量获取高纯度重组蛋白 CsGAPDH, 用于生物学功能及免疫学鉴定, 作者采用本室构建的重组质粒 pGEX-

4T-1-GAPDH 进行原核表达体系的诱导表达和纯化。本实验尝试, 诱导表达温度降为 26 $^{\circ}C$, 延长诱导时间至过夜, 以及降低 IPTG 的浓度至 0.2 mmol/L 等, 达到预定标准。

以纯化的特异性重组蛋白 CsGAPDH 为抗原, 制备免疫小鼠抗血清对重组蛋白鉴定结果表明, 能与重组蛋白 CsGAPDH 发生反应, 随免疫后时间延长其免疫抗体滴度呈连续动态上升趋势, 其中, 混合免疫组与阴性对照组相比, A 值呈极显著升高 ($P < 0.01$)。重组蛋白 CsGAPDH 组与阴性对照组相比 A 值显著升高 ($P < 0.05$)。混合免疫组与重组蛋白 CsGAPDH 免疫组相比 A 值有显著升高 ($P < 0.05$)。表明混合免疫可诱发机体产生更好的抗体应答, 免疫效果更优。Western blotting 结果显示该抗血清具有抗重组蛋白 CsGAPDH 特异性。在 Western blotting 结果中, 由 CsGAPDH 免疫血清能够识别华支睾吸虫成虫可溶性抗原, 表明重组蛋白 CsGAPDH 具有华支睾吸虫成虫天然蛋白 GAPDH 的免疫原性, 同时也间接证明了此重组蛋白 CsGAPDH 很好地保持了天然蛋白 GAPDH 的抗原表位且具有良好的抗原活性。上述结果为重组蛋白 CsGAPDH 可作为华支睾吸虫病诊断候选抗原提供了免疫学依据。至于重组蛋白 CsGAPDH 是否就是一种完全意义上的种属特异性保护性抗原, 有待进一步研究。

本实验中制备了免疫小鼠股四头肌肌组织石蜡切片, 以动物免疫实验所获得的重组蛋白 CsGAPDH 抗血清为第 1 抗体, 生物素标记的羊抗小鼠 IgG 为第 2 抗体, 采用链霉菌抗生物素-过氧化物酶液和 DAB 底物显色系统检测华支睾吸虫特异性 CsGAPDH 蛋白抗原的表达。结果显示, 重组质粒在免疫小鼠股四头肌肌细胞膜下有分布和表达。另有文献报道, 某些物种的 GAPDH 蛋白是定位于细胞膜表面和某些病原体表面, 属于膜表面 GAPDH 分子家族的成员^[11]。这也是研究者致力于 GAPDH 分子疫苗和药物研究的原因。免疫小鼠的免疫组化实验也证实了 CsGAPDH 分布和表达于小鼠的肌细胞膜部位。推测 CsGAPDH 可能是通过分布于细胞膜或其表面而影响细胞膜的呼吸链反应, 从而参与细胞内很多生理代谢过程。纯化的重组蛋白 CsGAPDH 酶活性功能测定结果显示, 未加入 3-GAP 底物时所建立的体系无反应发生。加入 3-GAP 时, 体系生成产物的反应速度随纯化的重组蛋白 CsGAPDH 浓度增大而增大。在 AMP 的竞争性抑制反应中, 随体系中 AMP 浓度的增高, 抑制产物生成的作用也逐渐增强。此结果显示, 重组蛋白 CsGAPDH 符合酶促动力学反应基本特征, 具有 3-磷酸甘油醛代谢酶

生理活性。

作者认为,如果能够成功制备华支睾吸虫重组蛋白 CsGAPDH 特异性单克隆抗体,将会极大地提高免疫检测的敏感性和特异性。本研究获得的重组蛋白 CsGAPDH 抗原和免疫小鼠多抗,为进一步研究重组蛋白 CsGAPDH 生物学活性、华支睾吸虫病诊断候选抗原(疫苗)提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Hannaert V, Opperdoes FR. Glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of the enzyme [J]. Protein Expression and Purification, 1995, 6 :244.
- [2] Hannaert V, Blaauw M, Kohl L, et al. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 55 :115.
- [3] 江钢锋, 洪佳冬. 恶性疟原虫 FCC1/HN 株 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的序列测定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20 :55-56.
- [4] Daubenberger CA, Polt-Frank F, Jiang G, et al. Identification and re-

combinant expression of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* [J]. Gene, 2000, 246 :255.

- [5] Campanale N, Nickel C, Daubenberger CA, et al. Identification and characterization of heme-interacting proteins in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum* [J]. J Biol Chem, 2003, 278 :27354-27361.
- [6] Bradford MM. Silicone thermoplastic sheeting for treatment of facial scars: an improved technique [J]. Anal Biochem, 1988, 72 :248.
- [7] 萨姆布鲁克, EF 佛里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 科学出版社, 1998. 856-860.
- [8] Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89 :9382-9385.
- [9] Brode AE, Ree DJ. Reversible oxidation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cell by hydrogen peroxidase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1987, 148 :120-125.
- [10] Kawamoto RM, Caswell AH. Autophosphorylation of glyceraldehydes phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes [J]. Biochem, 1996, 25 :657-661.
- [11] Daubenberger CA, Tisdale EJ, Curcic M, et al. The N'-terminal domain of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the apicomplexan *Plasmodium falciparum* mediates GTPase Rab2-dependent recruitment to membranes [J]. Biol Chem, 2003, 384 :1227-1237.

(收稿日期:2005-03-13 编辑:富秀兰)

文章编号:1000-7423(2005)04-0235-01

【病例报告】

眼结膜吸吮线虫感染一例

孙惠珍, 常正山

中图分类号:R532.18

文献标识码:B

患者,女性,26岁,江苏省张家港市人,现在上海市工作。2004年6月20日起右眼结膜有异物感,持续月余。7月21日右眼上结膜异物感难忍,用手揉出1条长约1.3cm白色线状虫体,当即去眼科医院就诊。B超检查未见明显异常,诊断为右眼结膜炎。给予0.9%氯化钠注射液和硫酸庆大霉素交替冲洗右眼,泰利必妥眼药水滴注。次日中午,右眼再度出现异物感,并充满整个结膜。再次去医院就诊,予生理盐水棉签擦拭眼结膜,检出6条虫体,异物感症状消失。

隔日患者带着其中4条虫体前来咨询鉴定。显微镜观察,虫体均为乳白色、圆柱状11~14mm×0.4~0.7mm,平均12.5×0.5mm。表皮有明显横纹,头端细小、缺唇,有1个小的长方形口囊以及具有大小乳突的内环。阴门开口于虫体前

端,在食道中横线水平之后。食道短呈圆筒状。与文献对照,符合结膜吸吮线虫雌虫形态特点。眼结膜吸吮线虫病是一种动物源性寄生虫病。多见于亚洲地区,又称为东方眼线虫病。该虫通常寄生在犬和猫等动物的泪管和眼结膜囊内,人体偶可感染结膜吸吮线虫,多为单侧眼感染。寄居的虫体多为1至数条,最长达20余条。由于虫体体表及分泌物的刺激,以及虫体头端口囊吸附对眼结膜的机械损伤,常引起眼结膜炎,可引发细菌感染形成溃疡、肉芽肿病变等。重症累及角膜,引起视力障碍等严重后果。用1%可卡因或的卡因溶液滴眼,虫体可从眼角爬出。显微镜观察鉴定虫体是确诊本病的依据。眼结膜吸吮线虫病由于蝇的机械携带而得到传播感染。注意个人及环境卫生,保持眼的清洁卫生,重视防蝇灭蝇,是预防本病的关键。豢养犬、猫等宠物应注意防范。

(收稿日期:2005-05-24 编辑:富秀兰)

作者单位:中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心,上海 200025