

文章编号: 1000-7423(2009)-04-0313-05

【论著】

猪囊尾蚴特异性抗原的筛选、鉴定和生物信息学分析

方文¹, 包怀恩^{2*}, 肖靛靛², 牟荣²

【摘要】 目的 对猪囊尾蚴的特异性抗原进行筛选、鉴定和生物信息学分析。方法 四川省雅江县呷拉乡猪带绦虫病患者, 口服槟榔-南瓜子驱虫, 收集、制备虫卵悬液 (8 万个/ml)。将 6 头 20 d 龄三元杂交乳猪均分实验组和空白对照组, 实验组每猪灌胃虫卵悬液 1 ml。40 d 后, 分别制备实验组心脏血混合血清及对照组心脏血混合血清; 收集、制备实验组猪囊尾蚴蛋白, 进行双向电泳 (2-DE) 分析。将凝胶蛋白斑点转移至聚偏氟乙烯膜 (PVDF 膜), 用实验组混合血清及对照组混合血清 (均为 1:10) 为一抗, 羊抗猪 HRP-IgG (1:200) 为二抗, 进行蛋白质印迹 (Western blotting) 分析, 比较两组杂交蛋白点的差异, 确定猪囊尾蚴抗原抗体阳性杂交斑点, 据此挖取双向电泳与之对应的蛋白点, 用电喷雾离子阱型质谱仪 (ESI-Trap MS) 进行质谱鉴定。搜索美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站信息进行生物信息学分析。结果 双向电泳凝胶共检测到 207±9 个蛋白质斑点, 相对分子质量为 M_r 14 400~94 000, 等电点 (pI) 为 3.0~10.0。筛选出 7 个特异性抗原, 其中的 4 个分别为 AF239799-1 膜联蛋白 (AF239799-1 annexin)、细胞支架肌动蛋白-2 (cytoskeletal actin-2)、原肌球蛋白 (tropomyosin) 和肌动蛋白-1 (actin-1)。前 1 个蛋白已被鉴定为猪带绦虫特异性抗原, 后 3 个蛋白抗原与 NCBI 网上登录的亚洲带绦虫成虫蛋白一致, 为猪囊尾蚴特异性抗原。结论 共获得 3 个猪囊尾蚴特异性抗原, 即细胞支架肌动蛋白-2、原肌球蛋白和肌动蛋白-1。

【关键词】 猪带绦虫; 囊尾蚴; 抗原; 双向电泳; 蛋白质印迹; 质谱

中图分类号: R383.34

文献标识码: A

Screening, Identification and Bioinformatic Analysis of *Taenia solium* Cysticercus

FANG Wen¹, BAO Huai-en^{2*}, XIAO Liang-liang², MU Rong²

(1 Department of Clinical Laboratory Sciences, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2 Department of Parasitology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 **Objective** To screen and identify specific antigens of *Taenia solium* cysticercus, and predict the function of target proteins using bioinformatics method. **Methods** Patients infected with *Taenia solium* were dewormed by decoction arecae and pumpkin seeds to collect worms, and eggs were then prepared. Six three-way crossed hybrid pigs were randomly divided into experimental group and control group, and each experimental pig was infected with 80 000 *T. solium* eggs. Serum samples were collected at 40 days after infection. The total protein of *T. solium* cysticercus was separated by two-dimensional electrophoresis, and Western blotting was performed to find out distinct antigens. Proteins from the two groups were identified by ESI-Trap MS. Query in NCBI database was made to confirm function of the proteins. **Results** 207±9 spots were detected through Coomassie brilliant blue-stained gels with M_r 14 400~94 000 and pI 3.0~10.0. Western blotting showed 7 specific antigen spots with pool sera of infected pigs. Four of the 7 antigens with known functions were respectively ascribed to cytoskeletal actin-2 (adult-specific), tropomyosin (cysticercus-specific), AF239799-1 annexin (cysticercus-specific) and actin-1 (cysticercus-specific). **Conclusions** Three specific antigens of *Taenia solium* cysticercus have been identified.

【Key words】 *Taenia solium*; Cysticercus; Antigen; Two-dimensional electrophoresis; Western blotting; MS/MS spectrometry

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30660168)

* Corresponding author, E-mail: bhe@gmc.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30660168)

作者单位: 1 贵阳医学院医学检验系, 贵阳 550004; 2 贵阳医学院寄生虫学教研室, 贵阳 550004

* 通讯作者, E-mail: bhe@gmc.edu.cn

猪带绦虫病是一种在世界范围内流行、危害人类健康的肠道蠕虫病,猪带绦虫的幼虫既可寄生于中间宿主猪,也可寄生于人体,引起严重的囊尾蚴病。给养殖业带来巨大经济损失,给人民健康带来严重威胁。因此,开展猪带绦虫病的研究并控制其流行具有重要意义。本文运用双向电泳、蛋白质印迹和质谱技术分析猪囊尾蚴特异性抗原,为研制抗猪囊尾蚴病疫苗、新的治疗药物及诊断抗原提供实验依据。

材料与方 法

1 材 料

主要试剂有固相 pH 梯度 (immobilized pH gradient, IPG)干胶条(pH 3~10, 7 cm)、IPG 缓冲液(pH 3~10)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二硫苏糖醇(DTT)、硫脲(Thi-ourea)、十二烷基硫酸钠(SDS)、超纯脲(ultra urea)、四甲基乙二胺(TEMED)、丙基硫酸盐(CHAPS)、碘乙酰胺(iodoacetamide)、蛋白酶抑制剂(protease inhibitor cocktail)、脱氧核糖核酸酶(Dnase)和核糖核酸酶(Rnase)均购自美国 General Electric 公司。低分子量蛋白质标志物购自北京天根生化科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG(HRP-IgG)购自北京索来宝生物技术有限公司,聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜)及化学发光(ECL)试剂盒(产品编号为 EK1004)购自武汉博士德生物技术有限公司。其余试剂均为国产分析纯。

2 方 法

2.1 虫体的来源和虫卵悬液的制备 猪带绦虫成虫,采自四川省雅江县呷拉乡猪带绦虫病患者(女性,27岁),口服槟榔-南瓜子驱虫^[1],服药后排出 1 条绦虫,鉴定为猪带绦虫成虫。收集孕节虫卵于生理盐水中。取虫卵悬液 1 ml 进行胆汁孵育试验,用台盼蓝染色计数六钩蚴法^[2]检测虫卵存活率为 80%。取虫卵悬液 0.1 ml,光镜下计数虫卵(重复操作 6 次,取平均值),计算虫卵总数。用生理盐水稀释虫卵悬液浓度约 10 万个/ml,其中的存活虫卵数约为 8 万/ml(10 万×80%)。

2.2 实验动物感染 20 d 龄三元杂交乳猪 6 头,雌雄各半,体重 6.5~7 kg,由贵州大学农学院动物养殖中心提供,经粪检和间接血凝试验(IHA)证实,未感染猪囊尾蚴和其他寄生虫。6 头猪随机均分为 2 组,实验组每猪灌胃 1 ml 虫卵(8 万个/ml),对照组不感染。两组乳猪均以专用膨化颗粒饲料饲养,隔离圈养于水泥地面的清洁饲养宅内,防止自然感染。

2.3 猪囊尾蚴和感染血清的采集 感染猪带绦虫卵

后第 40 天,处死乳猪,小心剥离实验组猪前后肢和躯干肌肉寄生的囊尾蚴。采集猪心脏血,分别制备实验组混合血清和对照组混合血清,-80℃保存备用。

2.4 猪囊尾蚴蛋白的制备 取上述收集的猪囊尾蚴 50 mg(约 12 个),用 1 ml 裂解液[含 7 mol/L 超纯脲、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、40 mmol/L DTT、2% IPG 缓冲液(pH 3~10),临用前加 1%蛋白酶抑制剂]冰浴匀浆,分装于 1.5 ml 离心管,加 20 μg/ml Dnase 和 5 μg/ml Rnase 置 4℃ 15 min,于 4℃ 40 000×g 离心 1 h,收集上清,用双向电泳沉淀剂(2D clean-up)试剂盒(Ettan™ Sample Preparation Kits and Reagents,美国 Amersham Biosciences 公司)处理。考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白浓度,分装后-80℃保存。

2.5 猪囊尾蚴蛋白双向电泳分析 猪囊尾蚴总蛋白溶液于 4℃融化、8 000×g 离心 10 min。加入上样缓冲液(7 mol/L 超纯脲、2 mol/L 硫脲、2% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.5% pH 3~10 IPG 缓冲液和痕量溴酚蓝),每胶条上样 300 μg(体积为 125 μl),将两根 IPG 胶条(7 cm)分别置于溶胀槽中再泡胀至少 12 h,再转入等电聚焦仪(型号为 Ettan IPGphor III,美国 General Electric 公司)进行第一向等电聚焦(依次为 250 V 40 min,500 V 40 min,4 000 V 3 h,4 000 V 20 000 v h)。胶条经两次平衡后进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),取其中 1 块胶作为制备胶,用于质谱分析,经考马斯亮蓝染色,用扫描仪(型号为 UNISCAN e100,中国清华紫光股份有限公司)进行透射扫描,用双向电泳图像分析软件(ImageMaster 2D platinum 5.0)对图像进行强度校正、点检测、背景消减和点匹配等。用二维校正法确定蛋白质等电点(pI)和相对分子质量(Mr)。重复 3 次。另一块胶用于蛋白质印迹(Western blotting)分析。

2.6 Western blotting 分析 采用半干转膜技术(参照 TE77 PWR 半干转仪器说明书)将双向电泳凝胶蛋白转至 PVDF 膜(与凝胶同样大小)(1.0 mA/cm²室温转移 1 h)。用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h, TBST(含 20 mmol/L Tris·HCl pH 7.6,140 mmol/L NaCl 和 0.1% Tween-20)洗 3 次(10 min/次,下同)。一抗为实验组混合血清或对照组混合血清(均为 1:10),室温孵育 3 h, TBST 洗膜 3 次。二抗为羊抗猪 HRP-IgG(1:200)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次。干燥 1~2 min。用化学发光试剂盒将 PVDF 膜进行胶片曝光显影、定影,流水冲洗、干燥,扫描保存杂交图像。比较两组杂交蛋白点的差异,确定猪囊尾蚴抗原抗体阳性杂交斑点。

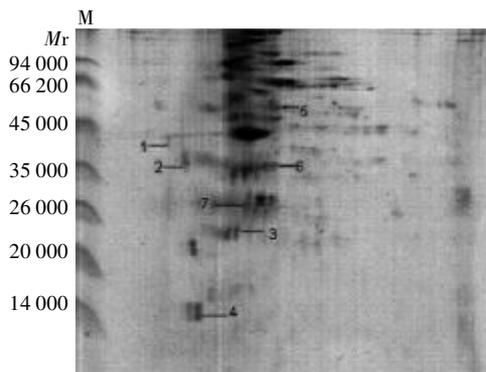
2.7 目的蛋白斑点的质谱分析 将 Western blotting

分析与双向电泳比对确定的目的蛋白斑点，转移至含 1.0 ml 保存液(50%去离子水，50%乙氰)的离心管，寄送北京中科院动物所生物膜与膜生物工程国家重点实验室。样品胶内酶切后，经高效液相色谱系统(HPLC)分离导入质谱仪(型号为 LCQ DECA XP Plus, 美国 Thermo Finnigan 公司)，用 SEQUEST 软件检索美国国家生物技术信息中心(NCBI)蛋白数据库，分析鉴定蛋白样品。在抗原蛋白的串联质谱图中，b 和 y 离子是肽段的 N-末端和 C-末端，据此推测检测到的肽段序列。相对丰度为两个丰度的比值(%)，统计参数肽段数及综合得分是用 SEQUEST 统计软件生成。

结 果

1 猪囊尾蚴蛋白双向电泳

3 块制备胶经考马斯亮蓝染色后用扫描仪获取图像，再用双向电泳图像分析软件进行分析，结果表明蛋白斑点数为 207±9，相对分子质量为 M_r 14 400~94 000，pI 为 3.0~10.0。其中 153±4 个蛋白斑点的 pI 为 4.0~7.0，在极酸性(pH 3)和极碱性(pH 10)区域也出现少量蛋白斑点(图 1)。

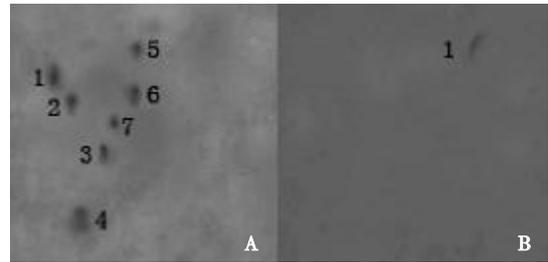


M: 蛋白质标志物，1~7: 双向电泳与蛋白质印迹比对后的对应蛋白斑点。
M: Protein marker, 1~7: Protein spots corresponding to the image of Western blotting.

图 1 猪囊尾蚴蛋白双向电泳图谱
Fig.1 Two-dimensional gel electrophoresis images of protein from *Taenia solium cysticerci*

2 Western blotting 分析

结果显示，实验组特异性抗原抗体杂交斑点 7 个，对照组非特异性抗原抗体杂交斑点 1 个(图 2)。经双向电泳图像分析软件分析，初步确定具有抗原性的 7 种蛋白的 pI 和相对分子质量(pI/ M_r)分别为 4.1/40 000、4.3/36 200、5.2/21 900、4.5/14 400、6.1/53 500、5.9/35 000、5.4/28 400。



1~7: 蛋白质印迹与双向电泳比对后对应的杂交斑点，A: 实验组混合血清，B: 对照组混合血清。

1~7: Protein spots corresponding to the image of 2-D PAGE, A: Sera of infected pigs, B: Sera of healthy pigs.

图 2 猪囊尾蚴蛋白 Western blotting 分析
Fig.2 Western blotting analysis of protein from *Taenia solium cysticerci*

3 质谱鉴定结果

将上述 7 个目的蛋白斑点依次进行胶内酶解和串联质谱(MS/MS)分析，共获得 4 个猪囊尾蚴特异性抗原(表 1)。从 1 号抗原蛋白前体离子质荷比[离子的质量(m)与其所带电荷(Z)之比]为 978.05 的串联质谱图推测检测到的肽段为 VAPEEHPVLLTEAPLNPK，覆盖 NCBI 蛋白数据库身份号(ID): 124783429 序列第 98~115 位氨基酸。其匹配的肽段数为 5 条，综合得分为 51.09，鉴定为细胞支架肌动蛋白-2 (cytoskeletal actin-2); 2 号抗原蛋白匹配上肽段数为 3 条，综合得分为 30.89，鉴定为原肌球蛋白; 6 号抗原蛋白匹配上的肽段数为 3 条，综合得分为 30.47，鉴定为 AF239799-1 膜联蛋白; 7 号抗原蛋白匹配上的肽段数为 3 条，蛋白综合得分为 31.75，鉴定为肌动蛋白-1(图 3)。4 个蛋白匹配的肽段数均多于 3 条，综合得分均超过 30 分，结果可信。另外 3 个蛋白匹配的肽段数均为零，未能鉴定。

4 生物信息学分析

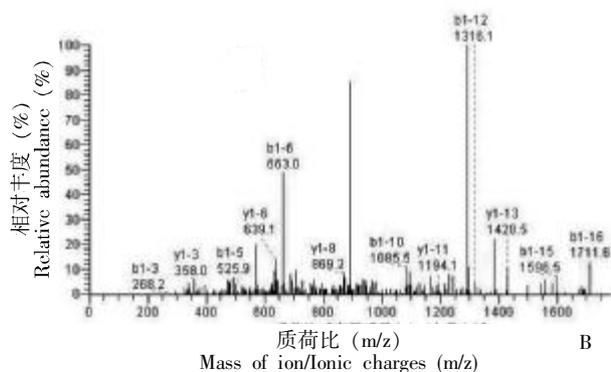
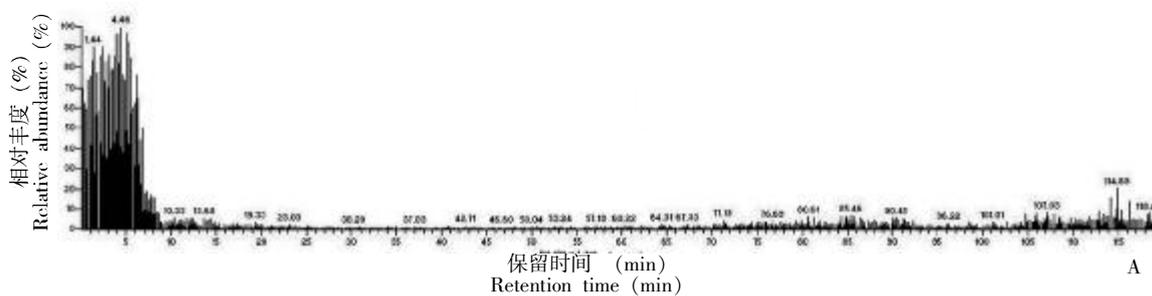
将 4 个目的蛋白所获肽段序列进行 blastn 分析，结果显示抗原 1、2、7 和 6 分别与 NCBI 蛋白数据库中的亚洲带绦虫细胞支架肌动蛋白-2 (4783429)、原肌球蛋白 (124783830)、肌动蛋白-1(124783335) 和猪带绦虫 AF239799-1 膜联蛋白 (7578879) 序列一致性较高，其中 AF239799-1 膜联蛋白已由美国研究者鉴定为猪带绦虫抗原。

讨 论

有关蛋白质双向电泳技术应用于寄生虫学的研究除见秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、某些原虫和少数吸虫的研究报道外^[3]，用于带绦虫研究的不

表 1 猪囊尾蚴特异性抗原的质谱鉴定结果
Table 1 Specific antigens of *Taenia solium* cysticercus identified by LC-MS/MS

抗原 Antigen	登录号 Accession number	蛋白名称 Protein name	匹配的肽段数 No. peptides hits	综合得分 Score	检测肽段 Peptide sequence
1	124783429	细胞支架肌动蛋白-2 Cytoskeletal actin-2	5	51.09	-VAPEEHPVLLTEAPLNPK- -VAPEEHPVLLTEAPLNPK- -VAPEEHPVLLTEAPLNPK- -VAPEEHPVLLTEAPLNPK- -VAPEEHPVLLTEAPLNPK-
2	124783830	原肌球蛋白 Tropomyosin	3	30.89	-AINLENQLKEK- -SISDDERMAQLEEQVKEAK- -SISDDERMAQLEEQVKEAK-
6	7578879	AF239799_1 膜联蛋白 AF239799_1 annexin	3	30.47	-AIIDILGNR- -AIIDILGNR- -VVNPLGLAETDAKELYAC-
7	124783335	肌动蛋白-1 Actin-1	3	31.75	-TTGIVLDSGDGVSHVPIYEGYALPHAILR- -TTGIVLDSGDGVSHVPIYEGYALPHAILR- -RFRCPEALYQPNF-



A: 总离子流图, B: 前体离子质荷比为 978.05 的串联质谱图。
A: Total ion current chromatogram, B: MS/MS analysis of the doubly charged ion at m/z 978.05.

图 3 1 号抗原蛋白的串联质谱分析
Fig.3 MS/MS profile analysis of No.1 antigen

多。Mayta 等^[4]运用 PH4-7 的 IPG 胶条分离猪带绦虫六钩蚴蛋白, 得到 Tso31 蛋白的 3 个亚基。认为 Tso31 蛋白对于猪带绦虫中间宿主具有保护作用, 能抵抗囊尾蚴感染。Levine 等^[5]用双向电泳结合蛋白质印迹分析, 从猪带绦虫成虫的分泌和排泄物中分离并鉴定两个猪带绦虫病诊断抗原 TSES33 和 TSES38。关于猪囊尾蚴的较全面的蛋白质组学研究迄今仍未见报道。

本研究首次运用双向电泳技术获得猪囊尾蚴的总蛋白图谱, 经分析, 3 块凝胶图谱中蛋白质斑点数为 207±9, Mr 为 14 400~94 000, pI 为 3.0~10.0, 其中 153±4 个蛋白质斑点的 pI 为 4.0~7.0, 表明构成猪囊尾蚴的蛋白质主要偏酸性, 但也有少量蛋白质斑点出现在极酸性和极碱性区域。

鉴定寄生虫提取物或蛋白质图谱中的免疫原性蛋白, 可用该寄生虫感染的动物宿主血清, 也可用特制的超免疫血清作蛋白质印迹分析^[6]。本研究的目的是对猪囊尾蚴特异性抗原进行初步筛查, 故选用了实验家猪感染混合血清, 得到 7 个特异性抗原抗体杂交斑点, 而用阴性对照家猪混合血清仅见 1 个非特异性抗原抗体杂交斑点。将 Western blotting 检测的 7 个抗原抗体杂交斑点与原双向电泳凝胶斑点比对, 均找到对应蛋白斑点, 表明用该法可成功获取抗原蛋白。

质谱鉴定 7 个抗原蛋白, 其中的 4 个分别为细胞支架肌动蛋白-2、原肌球蛋白、肌动蛋白-1 和 AF239799-1 膜联蛋白。经 NCBI 蛋白数据库信息查询, AF239799-1 膜联蛋白已由美国研究者 Teale 等发布在 NCBI 网站, 并明确为猪带绦虫抗原, 但未提及抗原的来源和细节。本研究是通过双向电泳、蛋白质印迹和质谱技术对猪囊尾蚴抗原筛查时发现, 具有明

显的抗原性,与 Teale 等的鉴定结果相符。

Stephen^[7]指出,膜联蛋白家族是一类钙依赖性磷脂结合蛋白超家族,存在于大多数真核生物细胞内(酵母和原核生物中未发现),有十分广泛且重要的生理功能,如参与细胞骨架运动、调节细胞生长、形成膜离子通道、参与细胞信号转导等。这类蛋白结构具有明显特征,C 端保守区大多由 α 螺旋组成,其中含有主要的 Ca^{2+} 磷脂结合活性位点;N 端为可变区,不同家族成员 N 端序列组成及长度各不相同。孙树汉等^[8]从猪囊尾蚴 cDNA 文库中筛选出一个新基因 AnnexinB1,现有研究证实其属于 annexin 家族。

本研究通过双向电泳、蛋白质印迹及质谱技术鉴定出 3 种猪囊尾蚴蛋白,即细胞支架肌动蛋白-2、肌动蛋白-1 和原肌球蛋白,与黄江等(2006)上传 NCBI 蛋白数据库亚洲带绦虫的 3 种蛋白一一对应,黄江等是通过表达序列标签(EST)对亚洲带绦虫成虫的基因表达进行分析,获得上述 3 种蛋白全长 cDNA 序列的基础上,通过生物信息学方法对这些基因编码的蛋白质结构和功能特性(如相对分子质量、pI、氨基酸组成等)进行预测及理论推导的。本研究结果表明这 3 种蛋白在虫体内的存在,也表明这 3 种蛋白很可能为带绦虫成虫和囊尾蚴所共有。

细胞支架肌动蛋白-2 和肌动蛋白-1 属于肌动蛋白家族,肌动蛋白普遍存在于真核细胞,存在于肌原纤维细丝中,是细胞骨架的主要成分,是肌肉运动及细胞运动的重要蛋白质。Ambrosio 等^[9]研究了肌动蛋白在猪囊尾蚴中的组织分布及其亚型,发现其有 7 个亚型,表明肌动蛋白拥有一个基因家族。原肌球蛋白(tropomyosin)存在于肌动蛋白细丝,起中介物作用,可调控肌动蛋白和肌球蛋白反应^[10]。原肌球蛋白 A 为副肌球蛋白,猪囊尾蚴副肌球蛋白及谷胱甘肽-S-转移酶(GST)被认为是希望的猪带绦虫疫苗候选抗原^[11]。

本研究 Western blotting 分析结果显示,猪囊尾蚴特异性抗原有 7 个,但质谱仅鉴定出 4 个蛋白,其他 3 个蛋白未能鉴定的原因可能是:① NCBI 蛋白数据库(2008 年 8 月 22 日更新)中猪带绦虫和亚洲带绦虫的蛋白序列较少(397 个),无该蛋白的理论序列,无法比对;② 样品蛋白与其他分子形成复合物

或共价修饰,使肽段产生质量偏移,不能在检索中形成质量匹配;③ 样品制备过程中的问题。质谱鉴定单位认为,如蛋白匹配的肽段数达到 3 条,综合得分超过 30 分方可保证结果可信度。而这 3 个抗原蛋白匹配的肽段数均为零,因而未能鉴定。

双向电泳结合蛋白质印迹分析和质谱鉴定技术,可用于筛选寄生虫特异性抗原、发现新抗原类物质、构建新疫苗和筛选新药物。本研究发现的 4 个特异性抗原的免疫原性有待深入研究,以便为研制抗囊尾蚴病疫苗提供参考。

参 考 文 献

- [1] Li YL. Human Parasitology[M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 146. (in Chinese) (李雍龙. 人体寄生虫学[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 146.)
- [2] Wang IC, Ma YX, Kuo CH, et al. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs[J]. Int J Parasitol, 1997, 27(11): 1311-1314.
- [3] Cheng GF, Lin JJ, Cai YM. Progress on proteomics technology and its application in parasitology[J]. Biotechnol Bull, 2003, (2): 1-5. (in Chinese) (程国锋, 林娇娇, 蔡幼民. 蛋白质组学研究技术及其在寄生虫学中的应用[J]. 生物技术通报, 2003, (2): 1-5.)
- [4] Mayta H, Hancock K, Levine MZ, et al. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen [J]. Mol Biochem Parasitol, 2007, 156(2): 154-161.
- [5] Levine MZ, Calderón JC, Wilkins PP. Characterization, cloning and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection[J]. J Parasitol, 2004, 90(3): 631-638.
- [6] Neumann NF, Pon WS, Nowicki A, et al. Antigens of adults and 3rd stage larvae of the meningeal worm *Paralaphostrongylus tenuis* (Nematoda, Metastrongyloidea)[J]. J Vet Diagn Invest, 1994, 6(2): 222-229.
- [7] Moss SE, Morgan RO. The annexins[J]. Genome Biol, 2004, 5(4): 219.
- [8] Sun SH, Yan HL, Chen RW, et al. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus celluloae*[J]. Mol Biochem Parasitol, 2002, 119(1): 1-5.
- [9] Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, et al. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci(cestoda): tissular distribution and detection of isoforms[J]. Cell Biol Int, 2003, 27(9): 727-733.
- [10] 江桥节郎. 中国伟大的生化学家曹天钦博士——“原肌球蛋白”先生[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(6): 615-617.(in Japanese)
- [11] Pan WQ, Tang LH. Molecular Parasitology[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 2004: 258. (in Chinese) (潘卫庆, 汤林华. 分子寄生虫学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 258.)

(收稿日期: 2009-03-23 编辑: 富秀兰)