

DOI:10.13350/j.cjpb.230309

• 论著 •

肝片吸虫候选检测抗原基因筛选及假定蛋白 D915_000128 的鉴定*

刘少雄, 张楠, 王晓岑, 李新, 李建华, 宫鹏涛, 张西臣**

(吉林大学动物医学学院人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林 长春 130062)

【摘要】 目的 筛选肝片吸虫 cDNA 表达文库, 获得肝片吸虫感染候选检测抗原基因, 经对筛选结果分析后选取假定蛋白 D915_000128 基因进行表达和反应原性鉴定。方法 利用绵羊肝片吸虫感染阳性血清对肝片吸虫 cDNA 表达文库进行筛选, 以阳性噬菌斑为模板进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物测序并进行生物信息学分析和比较。通过 PCR 技术将选取的候选检测抗原基因片段进行扩增, 并与原核表达载体 pET-32a 连接, 构建重组表达质粒, 经酶切鉴定正确后转化 BL21 感受态细胞, 以异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 应用 SDS-PAGE 和 Western blot 对重组蛋白的大小及其反应原性进行分析和鉴定。结果 通过对肝片吸虫 cDNA 表达文库的筛选, 成功获得了肝片吸虫候选检测抗原基因 12 个, 其中 2 个为已报道的检测抗原基因(GenBank: PIS79729.1, ABC66278.1), 10 个为新发现的可用于肝片吸虫感染检测的候选抗原基因(GenBank: AYA57790.1, THD19001.1, TPP64335.1, PIS88126.1, AAA80273.1, THD26809.1, THD19926.1, TPP60711.1, THD26810.1, THD29021.1)。成功构建假定蛋白 D915_000128 基因原核表达载体, 其诱导表达产物经 SDS-PAGE 分析为 85×10^3 的重组融合蛋白, Western blot 分析该重组蛋白可被绵羊肝片吸虫自然感染阳性血清识别, 即具有反应原性。结论 筛选获得 12 个肝片吸虫候选检测抗原基因, 分析比较选取了肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 基因, 构建的原核表达载体表达的重组蛋白具有良好的反应原性。

【关键词】 肝片吸虫; 免疫学筛选; 候选检测抗原基因; 原核表达

【中图分类号】 R383.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)03-0293-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Mar;18(3):293-296,302.]

Screening of candidate antigen genes for *Fasciola hepatica* and identification of hypothetical protein D915_000128

LIU Shao-xiong, ZHANG Nan, WANG Xiao-cen, LI Xin, LI Jian-hua, GONG Peng-tao, ZHANG Xi-chen (Key Laboratory of Zoonosis Research, Ministry of Education, College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)***

【Abstract】 **Objective** The cDNA expression library of *Fasciola hepatica* was screened to obtain candidate antigen genes for detection of *F. hepatica* infection. After analysis of screening results, the hypothetical protein D915_000128 gene was selected for expression and reactivity identification. **Methods** A sheep *F. hepatica* infection positive serum was used to screen the *F. hepatica* cDNA expression library. Positive phage spots were used as templates for PCR amplification, and the PCR products were sequenced and subjected to bioinformatic analysis and comparison. The selected candidate detection antigen gene fragment was amplified by PCR and ligated with the prokaryotic expression vector pET-32a to construct a recombinant expression plasmid, which was transformed into BL21 competent cells after correct enzymatic identification and expression was induced with isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG). The molecular weight and reactivity of the recombinant protein were analyzed and characterized by applying SDS-PAGE and Western blot. **Results** Through screening of the *F. hepatica* cDNA expression library, 12 candidate antigen genes for detection of *F. hepatica* were successfully obtained, of which 2 were reported detection antigen genes (GenBank: PIS79729.1, ABC66278.1) and 10 were newly discovered candidate antigen genes that could be used for detection of *F. hepatica* infection (GenBank: AYA57790.1, THD19001.1, TPP64335.1, PIS88126.1, AAA80273.1, THD26809.1, THD19926.1, TPP60711.1, THD26810.1, THD29021.1). We successfully constructed a prokaryotic expression vector for the hypothetical protein D915_000128 gene. The recombinant protein was analyzed by SDS-PAGE as 85×10^3 , and the Western blot showed that the recombinant protein could be recognized by sheep *F. hepatica* positive sera. **Conclusion**

* **【基金项目】** 吉林省科技发展计划项目(No. 20200402044NC, 20190103075JH)。

** **【通讯作者】** 张西臣, E-mail: xc Zhang@jlu.edu.cn

【作者简介】 刘少雄(1994-), 男, 河北人, 硕士, 博士在读, 研究方向: 疫病防控。E-mail: 2287003511@qq.com

Twelve candidate antigen genes of *F. hepatica* were selected, and the hypothetical protein D915_000128 gene of *F. hepatica* was selected. The recombinant protein expressed by the constructed prokaryotic expression vector has good reactivity.

【Key words】 *Fasciola hepatica*; immunological screening; candidate detection antigen gene; prokaryotic expression

肝片吸虫病是由肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)感染引起的一种重要的人畜共患病^[1]。该病呈世界性分布^[2],遍及81个国家^[3]。肝片吸虫的易感对象主要为反刍类动物,以绵羊感染率较高^[4]。绵羊感染肝片吸虫后会出现呈急性或慢性的肝炎和胆管炎。目前针对肝片吸虫病还没有安全有效的疫苗。肝片吸虫病主要是利用三氯苯达唑、肝蛭净、氯氰碘柳胺钠等药物进行治疗^[5-7]。肝片吸虫感染的检测是防治肝片吸虫病的关键,在早发现早治疗,减少治疗成本的同时,更能达到最佳的治疗效果^[8]。

目前用于检测肝片吸虫感染的方法主要有病原学检测方法、分子生物学检测方法和免疫学检测方法等^[9]。病原学检测方法(如粪便检查法)存在漏检的可能,分子生物学检测方法(如PCR)对检测仪器设备要求高。免疫学检测方法具有稳定性好、敏感性高和特异性强等优点,在临床实践中被广泛使用^[10]。目前虽然已经有了用于检测肝片吸虫的特异性抗原蛋白基因,如半胱氨酸蛋白酶^[11]、组织蛋白酶L^[12]和谷胱甘肽S转移酶^[13-14]等,但相对较少。为了继续发掘新的肝片吸虫候选检测抗原基因,本研究通过对肝片吸虫cDNA表达文库的筛选,并对候选检测抗原基进行表达,对表达蛋白进行反应原性鉴定,为建立肝片吸虫感染检测方法提供新的候选抗原基因。

材料与方法

1 材料

肝片吸虫成虫cDNA表达文库(库容量为 2×10^7 pfu/800 μ L)菌液^[11],肝片吸虫cDNA和绵羊肝片吸虫自然感染阳性血清均为本实验室制备并保存;XL1-Blue大肠埃希菌和pET-32a质粒均为本实验室保存;DNA连接酶均购自宝生物技术有限公司;HRP标记的兔抗羊IgG二抗和DAB显色试剂均购自于武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 肝片吸虫cDNA表达文库的筛选 将XL1-Blue菌接种于加有1%四环素的LB液体培养基中,37℃摇床培养12h左右,至 $A_{600} = 1.0$ 。菌液以12 000 g室温离心5 min,用200 μ L 10 mmol/L $MgSO_4$ 重悬后加入到4 ml离心管中,再加入10 μ L用SM Buffer稀释 10^5 倍的肝片吸虫cDNA表达文库菌液,混匀,37℃孵育15 min。将温度约为50℃的NZY顶层琼脂

加入孵育的cDNA表达文库菌液中,吹吸混合均匀后倒入37℃预热的NZY琼脂板中。待平板琼脂凝固后37℃培养6 h。将NC膜浸没在10 mmol/L IPTG溶液中10 min后覆盖在琼脂表面,37℃孵育6 h,4℃预冷30 min;取下NC膜,用TNT Buffer冲洗后移入含1%脱脂奶粉的TNT Buffer中,室温封闭2 h,冲洗;依次加入经去除交叉反应抗体处理的绵羊肝片吸虫自然感染阳性血清(1:200稀释)和HRP标记的兔抗羊IgG二抗(1:5000稀释),在室温中分别孵育3 h和1 h,冲洗;加入DAB显色试剂室温避光15~30 min后显色,NC膜上周围深,中央浅的环形斑即为阳性噬菌斑,做好标记以备取样。于1.5 mL离心管中加入200 μ L无菌SM Buffer,挑取已标记的阳性噬菌斑置于SM Buffer中,室温放置1 h后按照以上步骤进行复筛。

将溶解有阳性噬菌斑的SM Buffer作为模板,加入用于噬菌体测序的通用引物,PCR扩增目的片段。上游引物:5'-CTCGGAAGCGGCCATTGTGTTGGT-3';下游引物:5'-ATACGACTCACTATAGGGCGA-ATTGGC-3'。

PCR反应体系:模板1 μ L,上、下游引物各1 μ L,2 \times Master Mix 10 μ L, dd H₂O 8 μ L。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性60 s,61℃退火60 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸10 min,PCR产物采用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2 肝片吸虫假定蛋白D915_000128基因的表达

根据GenBank中肝片吸虫假定蛋白D915_000128的核苷酸序列,设计携带有BamH I和EcoR I限制性酶切位点的上游和下游引物,引物由库美生物科技有限公司合成。上游引物:5'-CGCGGATCCATGGAAT-CAACTTCACAGTCC-3'(下划线部分为BamH I酶切位点);下游引物:5'-ACGCGTGCACAAATCCGAGTGGAACTTCTT-3(下划线部分为EcoR I酶切位点)。

以肝片吸虫cDNA作为模板PCR扩增该基因。PCR产物由1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。回收的PCR产物与pET-32a空载体质粒经BamH I和EcoR I双酶切后切胶回收,并用DNA连接酶进行连接,连接产物转化DH5 α 感受态后挑取单克隆菌落,37℃培养过夜。提取质粒,通过双酶切鉴定筛选阳性表达载体质粒,命名为pET-32a-D915_000128,标记后送

库美生物公司测序。

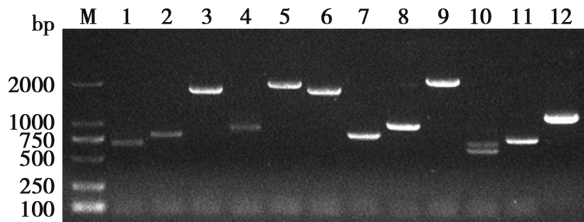
将测序正确的阳性表达载体质粒转化至 BL21 感受态中,同时以转化 pET-32a 空载体质粒的 BL21 作为对照(空载体组)。挑取单菌落,37 °C 培养过夜,取培养的菌液接种入新的 LB 培养基中 37 °C 进行培养,当菌液 A₆₀₀ 值达到约 0.6 时加入 IPTG 诱导剂(诱导组全菌),同时设置不加 IPTG 诱导剂的未诱导组。将温度调至 16 °C 培养 6 h,12 000 g,4 °C 离心 5 min,弃上清。菌体用 PBS 重悬后超声破碎,10 000 g,4 °C 离心 10 min,收集的上清与沉淀设置为诱导组上清和诱导组沉淀。各组均取 40 μL 加入 SDS 上样 Buffer 进行 SDS-PAGE 分析。

2.3 肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 重组蛋白的鉴定重组蛋白经 SDS-PAGE 后转印 PVDF 膜,用含 1% 脱脂奶粉的 TBST Buffer 4 °C 封闭过夜;加入绵羊肝片吸虫自然感染阳性血清(1 : 200 稀释),37 °C 孵育 1h, TBST Buffer 洗涤 3 次;加入 HRP 标记的兔抗羊 IgG 二抗(1 : 5000 稀释),37 °C 孵育 1 h, TBST Buffer 洗涤 3 次后上机显色并拍照留存。

结果

1 肝片吸虫 cDNA 表达文库的筛选

以溶解有阳性噬菌斑 SM Buffer 为模板,加入通用引物,设定 PCR 程序,扩增筛选获得的阳性噬菌体插入片段。结果显示有 12 条大小在 400~2 000 bp、条带明显单一的基因片段(图 1)。



M DNA 标志物(DL2000) 1~12 阳性噬菌斑的目的基因 PCR 产物

图 1 阳性噬菌斑免疫筛选 PCR 结果

M DNA marker(DL2000) 1-12 PCR products of positive phages

Fig. 1 PCR results of immune screening

经过比对分析,其中 10 个为新发现的肝片吸虫候选检测抗原基因(编号:1-10),可作为建立肝片吸虫感染检测方法的候选抗原基因。2 个为已报道的抗原基因(编号:11-12)(表 1)。

2 肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 基因的表达

如图 2 所示,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,目的基因 PCR 产物约为 1 509 bp。测序后与 GenBank (THD29021.1)公布的肝片吸虫 D915_000128 蛋白基因序列进行比对,同源率为 100%。

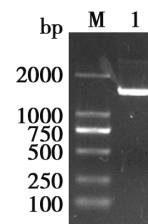
构建的表达载体质粒双酶切后获得 1 509 bp 大

小的目的基因片段,表明表达载体构建正确(图 3)。

SDS-PAGE 显示,诱导组全菌、诱导组上清与诱导组沉淀中的目的蛋白相对分子质量约 85×10^3 ,表明该重组蛋白以包涵体及溶解 2 种形式存在(图 4)。

表 1 免疫筛选获得的肝片吸虫蛋白基因分析

编号 No.	名称 Name	GenBank	大小 (bp) Length
1	amoebapore-like protein	AYA57790.1	306
2	FHAP protein	THD19001.1	243
3	putative uncharacterized protein	TPP64335.1	306
4	Keratin-associated protein 6-2 family protein	PIS88126.1	525
5	unknown,partial	AAA80273.1	201
6	Hypothetical protein D915_002430	THD26809.1	480
7	Hypothetical protein D915_009428	THD19926.1	3135
8	Hypothetical protein FGIG_08614	TPP60711.1	270
9	Hypothetical protein D915_002431	THD26810.1	525
10	Hypothetical protein D915_000128	THD29021.1	1509
11	Sapoin-like type B, region 1	PIS79729.1	435
12	secreted sapoin-like protein SAP-3	ABC66278.1	306

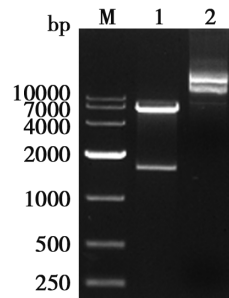


M DNA 标志物(DL2000) 1 D915_000128 基因 PCR 产物

图 2 D915_000128 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA marker(DL2000) 1 PCR product of D915_000128

Fig. 2 PCR product of D915_000128



M DNA 标志物(DL10000) 1 pET-32a-D915_000128 BamH I 和 EcoR I 双酶切 2 pET-32a-D915_000128 对照

图 3 pET-32a-D915_000128 双酶切鉴定

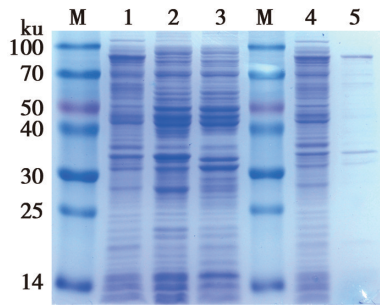
M DNA marker(DL10000) 1 Identification of pET-32a-D915_000128 with BamH I and EcoR I digestion 2 pET-32a-D915_000128 control

Fig. 3 Double endonuclease digestion identification of pET-32a-D915_000128

3 肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 重组蛋白的 Western blot 鉴定

如图 5 所示,经 Western blot 鉴定,肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 重组蛋白可被绵羊肝片吸虫自然

感染血清识别,反应条带位于约 85×10^3 处,表明目的蛋白具有反应原性。

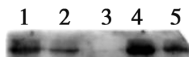


1 IPTG 诱导重组菌全菌 2 重组菌未诱导 3 空载体对照
4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 5 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀

图 4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

1 Induced group whole bacteria 2 Uninduced group 3 Empty vector 4 Induction group supernatant 5 Induced group precipitation

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein



1 IPTG 诱导重组菌全菌与绵羊肝片吸虫自然感染血清反应条带
2 重组菌 IPTG 未诱导对照 3 空载体对照 4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清与绵羊肝片吸虫自然感染血清反应条带 5 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀与绵羊肝片吸虫自然感染血清反应条带

图 5 重组蛋白 D915_000128 的 Western blot 分析

1 Induced group whole bacteria 2 Uninduced group 3 Empty vector 4 Induction group supernatant 5 Induced group precipitation

Fig. 5 Western Blotting analysis of recombinant protein D915_000128

讨论

筛选出特异性强,敏感性高的肝片吸虫诊断抗原基因是建立肝片吸虫感染免疫学检测方法的基础。目前,抗原基因筛选的方法包括基于质谱的蛋白质组学、生物信息学、多组学技术联合和 cDNA 表达文库的筛选方法。质谱的蛋白质组学方法可从整体水平对寄生虫的抗原分子进行鉴定和筛选^[15-17],但目前寄生虫蛋白质数据库尚不完整,技术尚不成熟。多组学技术联合方法可通过差异性数据高效精确筛选抗原基因^[18],但寄生虫的公共数据库较少,限制了该技术在寄生虫方面的应用。cDNA 表达文库的筛选方法是将细胞内所有的 mRNA 反转录为 cDNA,经克隆后与载体连接转化后形成重组 DNA 克隆群,称为 cDNA 表达文库,主要用于新基因的发现及基因功能的研究^[19]。在寄生虫领域,cDNA 表达文库筛选技术已广泛用于诊断抗原的筛选及基因功能鉴定等研究^[20]。刘太峰等^[21]采用该方法对肝片吸虫 cDNA 表达文库进行了筛选,获得了 16 个候选检测抗原基因,据分析均为具有潜在应用价值的肝片吸虫病候选诊断抗原基因。表明该技术作为筛选抗原基因的方法具有可行性。

cDNA 表达文库技术虽然是一种简单有效的筛选抗原基因的方法^[22]。但在正式试验前需要对试验条件和材料进行优化和处理:(1)cDNA 表达文库溶液浓度过大时,噬菌斑的数量会非常多,甚至完全覆盖整个培养皿,导致不能挑取单克隆噬菌斑。浓度过小时,培养后只有零星的数个噬菌斑,对实验材料是一种浪费,所以在正式筛选前对噬菌体表达文库原液做不同梯度的稀释,确定了 cDNA 表达文库菌液的最佳浓度,本试验中 cDNA 表达文库菌液最佳的稀释倍数为 1×10^5 。(2)绵羊肝片吸虫自然感染的血清中存在和大肠埃希菌发生交叉免疫反应的抗体,在筛选过程中会增加假阳性的发生,所以在筛选之前需要去除血清中的免疫交叉抗体。

本研究通过对筛选结果进行比对分析,选取最佳的抗原基因。通过 NCBI 比对发现假定蛋白 D915_000128 基因特异性较强。ProtScale 软件分析该蛋白由 504 个氨基酸组成,相对分子质量为 53.8×10^3 ,为亲水性蛋白;TMHMM 软件分析该蛋白且无跨膜区;SignalP 5.0 软件分析其 1-27 个碱基为信号肽序列,故推测该蛋白为分泌型蛋白。分泌蛋白是寄生虫与宿主相互作用的主要分子,由于其直接暴露于宿主免疫系统,因此是寄生虫病诊断试剂主要的候选分子。所以根据筛选结果分析表明肝片吸虫假定蛋白 D915_000128 基因可作为肝片吸虫病的候选诊断抗原基因。

本实验通过肝片吸虫 cDNA 表达文库的筛选,获得了一种新的肝片吸虫感染候选检测抗原基因,为肝片吸虫病诊断方法的建立奠定了理论基础。

【参考文献】

[1] Maggio L, Tirloni L, Uhl M, et al. Serpins in *Fasciola hepatica*: insights into host-parasite interactions[J]. Int J Parasitology, 2020, 50(12):931-933.

[2] Perrodin S, Walti L, Gottstein B, et al. *Fasciola hepatica* in a country of low incidence: a tricky diagnosis[J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2019, 8(6):597-603.

[3] Ashrafi K, Bargues MD, O'Neill S, et al. Fascioliasis: A worldwide parasitic disease of importance in travel medicine[J]. Travel Med Infect Dis, 2014, 12(6):636-649.

[4] 刘永东,张瑞雪,李兵军. 甘肃省临洮县及周边县区绵羊肝片吸虫感染情况调查[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(9):4.

[5] 郭兆宇. 羊肝片吸虫病的流行特点,临床症状,诊断与防治[J]. 现代畜牧科技, 2022, 86(2):95-96.

[6] 要瑞丽. 牛羊用抗肝片形吸虫复方三氯苯达唑颗粒的研究与应用[J]. 兽药市场指南, 2020(9):9-12.

[7] 道海宝. 应用肝蛭灵治疗牛羊肝片吸虫病效果分析[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2020, 63(3):10-11.

[8] 刘国平,丁继业,尹勇. 一例羊肝片吸虫病的诊治体会[J]. 今日畜牧兽医, 2020, 36(4):92-94.

[9] 吴立元,王根所. 羊肝片吸虫病的诊断与治疗[J]. 中国动物保健, 2022, 24(4):48-50.

differentiation and motility. [J]. BMB Rep, 2018(51):356-361.

[7] Struckhoff EC, Lundquist EA. The actin-binding protein UNC-115 is an effector of Rac signaling during axon pathfinding in *C. elegans* [J]. Development, 2003(130):693-704.

[8] Zheng QH, Zhao Y. The diverse biofunctions of LIM domain proteins: determined by subcellular localization and protein-protein interaction [J]. Biol Cell, 2007(99):489-502.

[9] Yang Y, Lundquist EA. The actin-binding protein UNC-115/abLIM controls formation of lamellipodia and filopodia and neuronal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. Mol Cell Biol, 2005(25):5158-5170.

[10] Astick M, Tubby K, Mubarak WM, et al. Central topography of cranial motor nuclei controlled by differential cadherin expression [J]. Curr Biol, 2014(24):2541-2547.

[11] Brayshaw LL, Smith RCG, Badaoui M, et al. Lanthanides compete with calcium for binding to cadherins and inhibit cadherin-mediated cell adhesion [J]. Metallomics, 2019(11):914-924.

[12] Na Y, Calvo-Jimenez E, Kon E, et al. Fbxo45 binds SPRY motifs in the extracellular domain of N-cadherin and regulates neuron migration during brain development [J]. Mol Cell Biol, 2020(40):undefined.

[13] Li JXHe, Tang VW, Briehier WM. Actin protrusions push at apical junctions to maintain E-cadherin adhesion [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020(117):432-438.

[14] Tiwari P, Mrigwani A, Kaur H, et al. Structural-mechanical and biochemical functions of classical cadherins at cellular junctions: A review and some hypotheses [J]. Adv Exp Med Biol, 2018(1112):107-138.

[15] 朱亚洲, 吕咏雪, 杜先才, 等. 细粒棘球绦虫 Calmodulin 蛋白的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(8):897-901.

[16] 李莎莎, 陶佳, 吕咏雪, 等. 细粒棘球绦虫原头节抗原 Eg-00512 的生物信息学分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(1):71-74, 113.

【收稿日期】 2022-08-10 【修回日期】 2023-02-

(上接 292 页)

[15] 张丽, 丰俊, 张少森, 等. 2017 年全国消除疟疾进展及疫情特征分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2018, 36(3):201-209.

[16] 张丽, 丰俊, 张少森, 等. 2016 年全国疟疾疫情分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(6):515-519.

[17] 尹建海, 张丽, 涂宏, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情期间全国疟疾病例监测与响应分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2021, 39(4):461-465.

[18] 张维嘉. 山东省蚊虫分布及蚊传虫媒病毒调查 [D]. 济南: 山东大学, 2018:1-88.

[19] 朱国鼎, 高琪, 曹俊. 取不易守更难: 我国巩固消除疟疾成果面临的挑战 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2022, 34(2):109-111, 114.

[20] Danis K, Baka A, Lenglet A, et al. Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011 [J]. Euro Surveill, 2011, 16(42):

19993.

[21] Santa-Olalla Peralta P, Vazquez-Torres MC, Latorre-Fandos E, et al. First autochthonous malaria case due to *Plasmodium vivax* since eradication, Spain, October 2010 [J]. Euro Surveill, 2010, 15(41):19684.

[22] 朱国鼎, 曹俊. 新型冠状病毒肺炎疫情对我国消除疟疾工作的挑战及应对策略 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2020, 32(1):7-9.

[23] 许艳, 王用斌, 孔祥礼, 等. 山东省寄生虫病防治技术竞赛结果分析 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2014, 26(2):203-205, 208

[24] 许艳, 王用斌, 张本光, 等. 基于竞赛的山东省专业技术人员寄生虫病防控能力评估 [J]. 中华地方病学杂志, 2021, 40(6):464-469.

【收稿日期】 2022-11-18 【修回日期】 2023-01-15

(上接 296 页)

[10] 米玛卓嘎. 羊肝片吸虫病的诊断与防治 [J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(8):27.

[11] 王钊, 王好, 钱爱东, 等. 新型免疫检测方法在五中寄生虫疾病诊断中的应用进展 [J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(7):63-69.

[12] 王熙凤, 孟庆玲, 乔军, 等. 肝片吸虫 CatL1D 蛋白的免疫原性研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2019, 47(5):1-6.

[13] Lopez Corrales J, Cwiklinski K, De Marco Verissimo C, et al. Diagnosis of sheep fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* using cathepsin L enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [J]. Veterinary Parasitol, 2021, 298:109517.

[14] 闻晓波, 冉旭华, 王春仁, 等. 肝片形吸虫重组谷胱甘肽-S-转移酶对 SD 大鼠的免疫原性分析 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(1):46-48.

[15] Aguayo V, Valdes B, Espino AM. Assessment of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase as an antigen for serodiagnosis of human chronic fascioliasis [J]. Acta Trop, 2018, 186:41-49.

[16] 刘天, 李新, 宫鹏涛, 等. 肝片吸虫 cDNA 文库构建及诊断候选抗

原基因筛选 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1):27-31.

[17] 王欣悦, 张莉. 蛋白质组学及蛋白质翻译后修饰在畜牧领域中的应用研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(4):1063-1073.

[18] 刘晓龙, 王越, 干小仙. 免疫蛋白质组学技术在寄生虫病诊断抗原筛选中的应用 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(12):1212-1216.

[19] Wang Y, Bai X, Zhu H, et al. Immunoproteomic analysis of the excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis* adult worms and newborn larvae [J]. Parasites Vectors, 2017, 10(1):579.

[20] 胡双, 吴志蕾, 邹丰才, 等. 代谢组学技术及其在寄生虫学中的应用 [J]. 养殖与饲料, 2016(9):10-12.

[21] 刘太峰, 孟庆峰, 段小波, 等. cDNA 文库构建方法的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(7):40-43.

[22] 凌家俭, 张耀娟, 章子豪. 寄生虫 cDNA 文库的研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2001, 14(4):299-302.

【收稿日期】 2022-08-15 【修回日期】 2022-11-06