

DOI:10.13350/j.cjpb.181108

• 论著 •

两种片形吸虫成虫抗原组分分析及其免疫学鉴定*

陈凤¹, 艾琳², 陈家旭^{2**}, 沈慧敏², 赵银娇¹, 刘榆华¹, 陈绍荣¹, 罗家军¹, 罗天鹏¹, 周晓农²

(1. 云南省大理州血吸虫病防治研究所, 云南大理 671000; 2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 国家热带病研究中心, 卫生部寄生虫与病原生物学重点实验室, 世界卫生组织热带病合作中心)

【摘要】 目的 应用 SDS-PAGE 对肝片形吸虫和巨片形吸虫成虫蛋白组分进行比较分析, 并 Western blot 检测其特异性蛋白分子。 **方法** 分别收集肝片形吸虫和巨片形吸虫成虫, 冰上研磨匀浆, 提取上清蛋白, 采用 SDS-PAGE 分析肝片形吸虫和巨片形吸虫差异蛋白组分; 应用 Western blot 检测特异蛋白组分。 **结果** 虫体蛋白经 SDS-PAGE 后采用 Gel Doc XR+ 凝胶成像系统对电泳图像进行高灵敏度分析, 巨片形吸虫和肝片形吸虫成虫均有 37 条带, 低灵敏度分析显示肝片形吸虫成虫蛋白主要 7 条带, 巨片形吸虫成虫蛋白主要有 6 条带, 相对分子质量集中在 $10 \times 10^3 \sim 70 \times 10^3$ 。 Western blot 检测巨片形吸虫有 6 条反应带, 分别在 150×10^3 、 100×10^3 、 75×10^3 、 50×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 等位置; 肝片形吸虫 5 条反应带, 分别在 55×10^3 、 37×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 、 15×10^3 等位置。与血吸虫、囊虫、广州管圆线虫、旋毛虫的交叉反应蛋白为 75×10^3 、 100×10^3 、 75×10^3 组分(巨片形吸虫)和 60.34×10^3 组分(肝片形吸虫)。 **结论** 肝片形吸虫成虫与巨片形吸虫成虫蛋白组成有差异不明显, 抗原特异的蛋白在 23×10^3 、 15×10^3 等位置, 且 $22 \times 10^3 \sim 24 \times 10^3$ 组分占比较大(在肝片形吸虫占 48.4%, 巨片形吸虫占 77.3%)。其特异的蛋白酶类有待经质谱分析后用于诊断抗原及疫苗研究, 而 15×10^3 组分可能是肝片形吸虫特有的可区别于巨片形吸虫的蛋白。

【关键词】 片形吸虫; 抗原; SDS-PAGE; Western blot

【中图分类号】 R383.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2018)11-1211-05

[Journal of Pathogen Biology. 2018 Nov; 13(11): 1211-1215.]

Analysis and immunological identification of antigenic components of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* adults

CHEN Feng¹, AI Lin², CHEN Jia-xu², SHEN Hui-min², ZHAO Yin-jiao¹, LIU Yu-hua¹, CHEN Shao-rong¹, LUO Jia-jun¹, LUO Tian-peng¹, ZHOU Xiao-nong² (1. Institute of Schistosomiasis Control, Dali Prefecture, Yunnan Province, Dali Yunnan, China 671000; 2. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Chinese Center for Tropical Disease Research, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center of Tropical Disease, Shanghai, China 200025) **

【Abstract】 Objective To use SDS-PAGE to compare the protein components of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in order to identify specific molecular bands using immunoblotting. **Methods** Adults of *F. hepatica* and *F. gigantica* were collected separately and homogenized on ice to obtain a homogenate. The supernatant was assayed for protein contents and analyzed using SDS-PAGE to ascertain the difference in the molecular mass of components of both trematodes and their macromolecular protein bands. Moreover, specific protein bands were selected using Western blotting. Positive bands were selected for comparison to protein bands on SDS-PAGE gels. **Results** After different proteins were separated using SDS-PAGE, 37 bands produced by both *F. hepatica* and *F. gigantica* were analyzed with a high level of sensitivity using the Gel Doc XR+ gel imaging system. Seven bands produced by *F. hepatica* and 6 produced by *F. gigantica* with a relative molecular mass of 10–70 kDa were analyzed with a low level of sensitivity. *F. gigantica* produced 6 main bands with a molecular mass of approximately 150, 100, 75, 50, 34, and 23 kDa, and *F. hepatica* produced 5 main bands with a molecular mass around 55, 37, 34, 23, and 15 kDa. *F. gigantica* components with a molecular mass of 75, 100, and 75 kDa and an *F. hepatica* component with a molecular mass 60.34 kDa cross-reacted with proteins from *Schistosoma*, *Cysticercus*, *Angiostrongylus cantonensis*, and *Trichinella spiralis*. **Conclusion** The protein components of adult *F. hepatica* and *F. gigantica* did not differ significantly. Antigens produced specific protein bands at 23 kDa and 15

* **【基金项目】** 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室开放课题(No. WSBKTKT-201602)。

** **【通讯作者】** 陈家旭, E-mail: chenjiayu1962@163.com

【作者简介】 陈凤(1978—), 女, 云南洱源人, 大学本科, 副主任医师。研究方向: 血吸虫病和寄生虫病防治研究。
E-mail: yndlcf@126.com

kDa; a large proportion of these bands was at 22–24 kDa (48.4% for *F. hepatica* and 77.3% for *F. gigantica*). Specific proteases need to be used to identify antigens and vaccines using mass spectrometry. However, a protein band at 15 kDa may be produced by a protein specific to *F. hepatica* that can be used to distinguish it from *F. gigantica*.

【Key words】 *Fasciola*; antigen; SDS-PAGE; Western blotting

片形吸虫病是一古老的疾病,是最早被发现的人体寄生吸虫病,距今已有 200 多年的历史。肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*)发现于 1758 年,巨片形吸虫(*Fasciola gigantica*)发现于 1855 年,在全世界均有分布,受威胁人口为 1.6 亿。近年来我国片形吸虫病发病率呈上升趋势,云南省自 2012 年宾川县暴发疫情之后^[1–2]陆续有散发病例被确诊。2012–2018 年 7 月大理州血防所接诊 40 余例片形吸虫临床诊断病例中,经病原学确诊为片形吸虫病 10 余例,病例来自大理、普洱、保山、昆明、德宏、临沧等地区。

由于该病为重要家畜寄生虫病,人类感染偶然。片形吸虫囊蚴可随食物或饮水经口进入人体并侵入肝脏,在胆管内发育为成虫。其中童虫可游走于肝组织内、引起发热、腹痛等症状,临床症状表现复杂多样,易发生误诊、误治。而一经确诊,应用三氯苯达唑即可治愈或缓解。粪便查病原体可明确诊断,但感染早期易发生漏检。快速有效的免疫诊断方法可弥补粪检的不足,但目前国内尚无片形吸虫诊断试剂盒供应^[3]。

研究片形吸虫成虫不同种属的抗原差异性,如通过蛋白质组学方法研究其蛋白组学的差异及其免疫反应性的差异,可为区分不同虫种的感染提供依据,同种生物蛋白在不同地域及在宿主的不同时期的表达均有差异。本研究以大理本地肝片形吸虫成虫和广西巨片形吸虫成虫为对象,比较两种虫体蛋白组分及其免疫反应性差异,探寻可能的特异性诊断标志物,为建立新的片型吸虫病诊断及疫苗研制奠定依据。

材料与方法

1 材料

1.1 片形吸虫成虫和免疫血清来源 肝片形吸虫成虫取自大理市泰兴农贸市场牛肝胆管,虫体经形态及 PCR 扩增鉴定^[4];巨片形吸虫成虫由广西大学提供,片形吸虫患者血清 32 份,采自 2012 年宾川县爆发病例;血吸虫、囊虫、广州管圆线虫、旋毛虫患者血清各 10 份,由大理州血防所提供,健康人血清 10 份由中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所健教中心提供。

1.2 主要试剂与器材 肝片形吸虫 IgG 检测试剂盒,购于德国 DRG 公司;20×PBS 购于(上海生工;组织蛋白提取液购于美国 Thermo Scientific 公司;SDS-PAGE 电泳液及 WESTERN 转膜液购于上海碧云天

生物技术有限公司;预制凝胶购于上海天能科技有限公司;标准蛋白购于立陶宛 Fermentas 公司;硝酸纤维素膜购于德国 BIO-RAD;羊抗人 IgG 购于美国 SIGMA-ALDRICH 公司;HRP-DAB 显色系统购于北京天根生化科技有限公司。通用电泳仪购于德国 BIORAD 公司;凝胶成像系统购于美国 BIO-BAD 公司;蛋白浓度测定仪和酶标仪购于美国 THERMO 公司。

2 方法

2.1 片形吸虫虫体抗原制备

2.1.1 肝片形吸虫成虫可溶性抗原的制备 取肝片形吸虫成虫 10 条加 PBS 7 ml 在冰上研磨至匀浆,分装 1.5 ml 离心管,每管 1 ml,4 °C,8 000 r/min(离心半径 2.25 cm)离心 10 min;取上清液转移至另一 1.5 ml 离心管,每管 1 ml,同上离心 10 min,取上清液即为虫体粗抗原,测蛋白浓度为 26.8 mg/ml。

2.1.2 大片形吸虫成虫可溶性抗原的制备 取大片形吸虫成虫 2 条平铺于平皿内,用 PBS 洗 3 次,用剪刀剪碎虫体,每条虫加入 1 ml 组织蛋白提取液,研磨后分装 1.5 ml 离心管,4 °C,12 000 r/min(离心半径 2.25 cm)离心 5 min,取上清液即为大片吸虫成虫粗抗原,测蛋白浓度为 1.25 mg/ml。

2.2 片形吸虫免疫血清的筛选 用德国肝片形吸虫 IgG 检测试剂盒检测 32 份片形吸虫患者血清,确定阳性 A 值高于阳参的免疫血清,取 10 份混合为片形吸虫阳性血清混合备用;另取 10 份慢性血吸虫患者血清,10 份囊虫患者血清,10 份旋毛虫患者,9 份广州管圆线虫患者血清用于交叉反应试验。10 份已排除寄生虫感染的健康人血清为阴性对照。

2.3 片形吸虫抗原 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

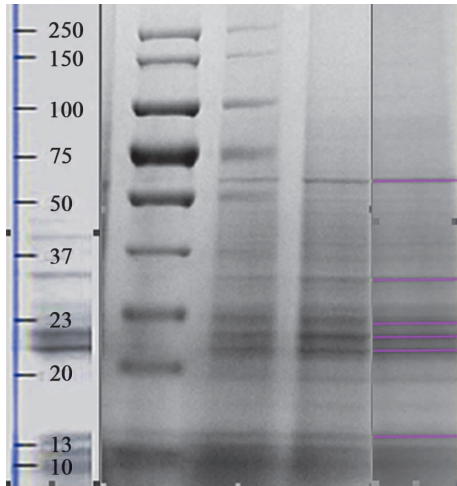
分别用两块天能预制凝胶板,一块用于分离肝片形吸虫可溶性抗原,一块用于分离巨片形吸虫可溶性抗原。抗原与 buffer 按 1:1 混合,大片形吸虫抗原直接使用原液,肝片形吸虫作 1:10 稀释,使两种抗原的蛋白浓度接近,每孔上样量 20 μl,含蛋白 30~50 μg;上样液置 100 °C 水浴 10 min;上样后 80 V 电泳 30 min,120 V 电泳约 1 h。切下一半胶进行考马斯亮蓝染色,并在 BIO-BAD 凝胶成像系统下进行蛋白定量分析;另一半转印至 NC 膜(0.45 μm);封闭后切为 0.3 mm 小条,分别注明肝片形吸虫、巨片形吸虫;进行 Western blot。一抗(血清)稀释度 1:100,二抗(羊抗人 IgG 全分子)稀释度(1:4 000)。显示剂为 DAB,

中止反应后将 NC 膜置于滤纸上晾干,观察结果。

结 果

1 片形吸虫抗原 SDS-PAGE 分析

肝片形吸虫和巨片形吸虫可溶性抗原经 SDS-PAGE,得到蛋白组分,相对分子质量(M_r) $10\times 10^3\sim 200\times 10^3$,经高灵敏条带分析检测巨片形吸虫和肝片形吸虫均有 37 个条带,低灵敏度分析,分别有 6 个和 7 个明显条带(图 1,图 2)。



M 蛋白分子质量标准 1~3 巨片吸虫成虫可溶性抗原(其中 1 有浸染,2 为正常电泳条带,3 为条带分析结果)

图 1 巨片形吸虫可溶性抗原 SDS-PAGE 电泳分析

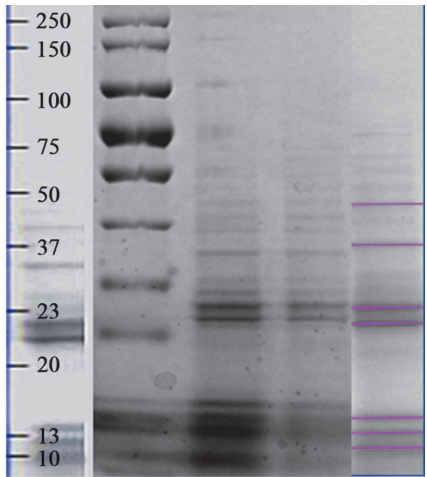
M Protein marker 1~3 The soluble antigen of *Fasciola gigantica* adult (1 of which was dip-dyed, 2 was the normal electrophoresis band, and 3 was the band analysis result)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the soluble antigen of *Fasciola gigantica*

2 片形吸虫蛋白组分条带定量分析

根据 Gel Doc XR+凝胶成像系统 Image Lab Gel

Doc XR+With zimage lab software 图像分析,得出肝片形吸虫成虫和巨片形吸虫成虫 SDS-PAGE 蛋白分布曲线(图 3 和图 4),所测吸光度、百分数、迁移率、相对分子质量等见表 1 和表 2。其中巨片吸虫成虫主要蛋白组分分子质量分别为 63.0×10^3 、 32.3×10^3 、 24.7×10^3 、 23.3×10^3 、 22.0×10^3 、 15.3×10^3 ; $22\times 10^3\sim 24\times 10^3$ 组分占 77.3%。肝片形吸虫成虫主要蛋白组分分子质量分别为 40.7×10^3 、 32.6×10^3 、 23.5×10^3 、 22.1×10^3 、 15.3×10^3 、 12.6×10^3 、 10×10^3 ; $22\times 10^3\sim 23\times 10^3$ 组分占 48.4%。



M 蛋白分子质量校准 1~3 肝片吸虫成虫可溶性抗原(其中 1 有浸染,2 为正常电泳条带,3 为条带分析结果)

图 2 可溶性抗原 SDS-PAGE 电泳分析

M Protein marker 1~3 The soluble antigen of *Fasciola hepatica* adult (1 of which was dip-dyed, 2 was the normal electrophoresis band, and 3 was the band analysis result)

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the soluble antigen of *Fasciola hepatica*

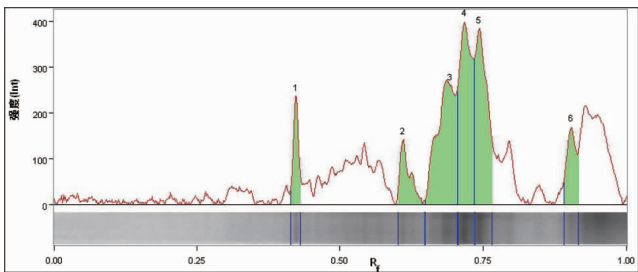


图 3 SDS-PAGE 分析巨片形吸虫成虫可溶性抗原

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the soluble antigen of *Fasciola gigantica*

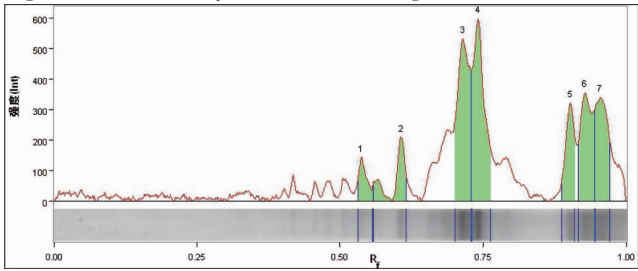


图 4 SDS-PAGE 分析肝片形吸虫成虫可溶性抗原

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the soluble antigen of *Fasciola hepatica*

表1 巨片形吸虫成虫 SDS-PAGE 蛋白组分参数

Table 1 Protein component parameters of *Fasciola gigantica* by SDS-PAGE

条带 Band No.	相对分子质量($\times 10^3$) Molecular weight	迁移率 Relative Front	体积 Volume(Int)	条带百分比 Band(%)
1	63.0	0.424	140,087	6.6
2	32.3	0.610	156,001	7.3
3	24.7	0.692	574,364	27.0
4	23.3	0.717	567,064	26.6
5	22.0	0.743	504,722	23.7
6	15.3	0.904	186,953	8.8

表2 肝片形吸虫成虫 SDS-PAGE 蛋白组分

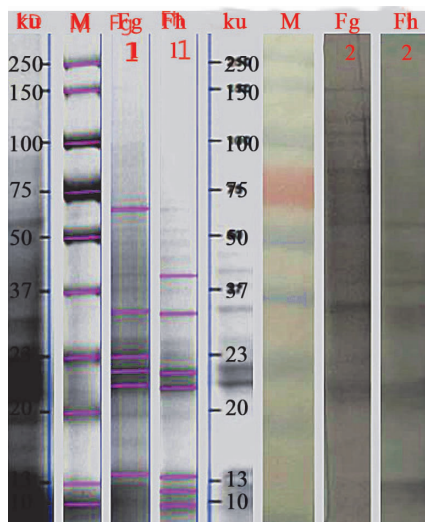
Table 2 Protein component parameters of *Fasciola hepatica* by SDS-PAGE

条带 Band No.	相对分子质量($\times 10^3$) Molecular weight	迁移率 Relative Front	体积 Volume(Int)	条带百分比 Band(%)
1	40.7	0.537	119,282	4.2
2	32.6	0.607	214,255	7.5
3	23.5	0.714	672,111	23.6
4	22.1	0.741	706,421	24.8
5	15.3	0.902	273,677	9.6
6	12.6	0.928	438,949	15.4
7	10.0	0.953	419,969	14.8

所得的分子质量数据导入 SPSS17.0, 并进行 F 检验, 肝片形吸虫和大片形吸虫比较差异无统计学意义 ($F=0.525, P>0.05$)。

3 片形吸虫抗原免疫反应性分析

Western blot 检测显示, 巨片形吸虫成虫抗原与相应抗体反应的蛋白组分为: 150×10^3 、 100×10^3 、 75×10^3 、 50×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 蛋白; 肝片形吸虫成虫抗原与相应抗体反应的主要组分为 55×10^3 、 37×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 、 15×10^3 蛋白(图 5)。



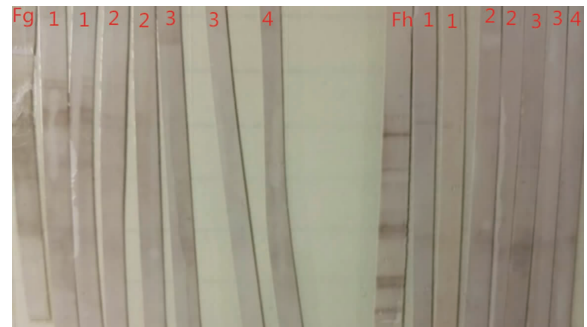
M 蛋白分子质量校准 Fg 巨片形吸虫成虫可溶性抗原 Fh 肝片形吸虫成虫可溶性抗原

图5 片形吸虫成虫抗原 SDS-PAGE(1)与 Western blot(2)结果
M Protein Marker Fg Soluble antigen of *Fasciola gigantica* adult
Fh Soluble antigen of *Fasciola hepatica* adult

Fig. 5 SDS-PAGE of adult *Fasciola* antigen (1) and results of Western blot (2)

巨片形吸虫抗原 75×10^3 、 100×10^3 组分与日本血吸虫患者血清发生交叉反应, 75×10^3 组分与囊虫

病患者血清发生交叉反应, 与旋毛虫、广州管圆线虫病患者血清及健康人血清无交叉反应。肝片形吸虫抗原 60×10^3 、 34×10^3 与日本血吸虫病及囊虫病患者血清发生交叉反应, 30×10^3 组分与旋毛虫病、广州管圆线虫病患者血清发生微弱交叉反应(图 6)。



1 一抗为慢性血吸虫患者血清 2 一抗为囊虫患者血清 3 一抗为旋毛虫患者血清 4 一抗为广州管圆线虫患者血清

图6 巨片形吸虫成虫可溶性抗原(Fg)和肝片形吸虫成虫可溶性抗原(Fh) Western blot 交叉反应结果

1 Serum from chronic schistosomiasis patient 2 Serum from cysticercosis patient 3 Serum from patient infected with *Trichinella spiralis*
4 Serum from patient infected with *Angiostrongylus cantonensis*

Fig. 6 Cross-reaction result of Western blot of soluble antigen from adult *Fasciola gigantica* and *Fasciola hepatica*

讨论

片形吸虫的免疫诊断及疫苗研究多见于在预防兽医学领域, 如使用虫体提取物或排泄分泌抗原 ELISA 诊断肝片形吸虫病^[5], 用重组肝片形吸虫抗原 ELISA 检测马特定抗体^[6]; 用巨片形吸虫抗原预防兔片形吸虫病^[7]; 片形吸虫疫苗对抗片形吸虫病和血吸虫病, 用天然抗原或重组片形吸虫抗原免疫减少动物发病或死亡, 以阻止其传播^[8]。在人体免疫诊断方面, 周岩等^[9]已研制出利用重组抗原研制出免疫胶体金试条, 但尚未进行大规模流行病学验证。

利用重组技术制备敏感特异的蛋白酶解产物是进行免疫诊断和疫苗研究的理想目标, 但由于蛋白质的种类和数量处在一个新陈代谢的动态过程中, 同一细胞的不同周期及不同的生长条件下所表达的蛋白质不尽不同。蛋白质组作为一个整体, 在时间和空间上是动态变化的^[10], 特别是经过 2-DE 分离的蛋白质和重组表达蛋白质, 往往因蛋白质的空间构象发生改变, 导致抗原性变弱甚至完全丧失而失去诊断效能。寄生虫是多细胞的生物, 由此介导的免疫反应复杂多样, 不同病期状态下病人体内相应抗体的分布也会呈不同的上调和下调。况且在已报道的寄生虫免疫蛋白质组研究中筛选到的抗原种类数量仍然远低于实际值。因此, 利用寄生虫特有的蛋白组织制备抗原有其特定意义。

片形吸虫 SDS-PAGE 和 Western blot 免疫诊断研究中证实, 150×10^3 、 29×10^3 、 63×10^3 、 17×10^3 、 $20 \times 10^3 \sim 23 \times 10^3$ 、 24×10^3 、 33×10^3 、 39.5×10^3 、 42×10^3 、 $25 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 组分为特异性蛋白, 其中 $33 \times$

10^3 蛋白为主要特异组分^[11]。使用 SDS-PAGE 和 Western blot 技术用人工感染巨片形吸虫的 Fat-tailed 绵羊血清识别 3 周的新生幼虫和 6、9 周成虫萃取的蛋白质抗原, 46×10^3 、 47×10^3 组分具有免疫反应性, 但需要血清学方法加以验证^[12]。Gaudier 等^[13] 用感染肝片形吸虫 4 周的兔混合血清免疫筛选识别出肝片形吸虫成虫 cDNA 文库编码为 16.5×10^3 的蛋白 FhTP16.5, 免疫组化显示该蛋白定位于不同发育阶段虫体表面及成虫实质组织。寄生虫皮层表面功能的重要性是显而易见的, 皮层蛋白作为潜在的靶既可用于疫苗的研制, 又可用作诊断抗原。研究表明, 吸虫皮层抗原具有高度物种特异性, 故本实验选取片形的成虫进行抗原免疫筛选。

片形吸虫成虫比较容易获得且虫体较大, 制备抗原产量高, 可通过 SDS-PAGE 能够分离出皮层特有的蛋白。运用生物学定量软件对 SDS-PAGE 胶图进行分析, 将电泳条带的分子质量和灰度进行量化处理, 转换为可用于统计分析的数据也是一种成熟的技术, 可利用系统通过拍摄凝胶图像, 计算样品条带的积分吸光度值和迁移率而实现对蛋白质的定性和定量分析^[14]。本研究对片形吸虫成虫可溶性虫体蛋白的 SDS-PAGE 结果结合胶图分析软件进行了分子质量比较的蛋白组学初步分析, 两种抗原组分的显著不同, 且各组占比不同。电泳图像显示巨片形吸虫和肝片形吸虫高灵敏分析均有 37 条带, 低灵敏分析显示肝片形吸虫蛋白主要 7 条带, 巨片吸虫成虫有 6 条主带, 分子质量分别为 150×10^3 、 100×10^3 、 75×10^3 、 50×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 等。肝片形吸虫筛出 5 条主带, 分子质量分别为 55×10^3 、 37×10^3 、 34×10^3 、 23×10^3 、 15×10^3 。2 种片形吸虫的 23×10^3 、 15×10^3 组分可能具有特异性, 而 100×10^3 、 75×10^3 、 60×10^3 、 34×10^3 、 30×10^3 组分与日本血吸虫、囊虫、旋毛虫、广州管圆线虫等的感染有交叉反应。Okananth 等^[15] 使用 Western blot 分析巨片形吸虫、扩展巨盘吸虫 (*Gigantocotyle explanatum*)、梭形血吸虫 (*Schistosoma spindale*) 以及包虫囊壁中的交叉抗原, 结果证明在巨片形吸虫和原头蚴抗原中存在 34×10^3 交叉反应性组分。本研究中肝片形吸虫 34×10^3 蛋白与血吸虫和囊虫感染者血清有交叉反应, 而巨片形吸虫 $75 \times 10^3 \sim 100 \times 10^3$ 组分与血吸虫和囊虫感染者血清有交叉反应, 因此在纯化抗原时应加以去除。

巨型吸虫和肝片型吸虫成虫 23×10^3 抗原蛋白的免疫反应性较强, 而 $22 \times 10^3 \sim 24 \times 10^3$ 组分在肝片形吸虫占 48.4%, 在巨片形吸虫占 77.3%。如此高的蛋白含量有利蛋白的纯化, 可根据筛选的敏感组分的分子质量及质谱分析结果选择合适的抗原纯化方法,

以提高诊断试验的特异性, 也可经 2D 电泳更精确地寻找反应蛋白点。另外可根据免疫筛选结果纯化 $22 \times 10^3 \sim 24 \times 10^3$ 蛋白, 以此为抗原建立 ELISA 和 DOT-ELISA 方法以用于进行临床应用及流行病学调查。

目前, 片形吸虫蛋白质组学研究方法尚处于起步阶段, 免疫蛋白质组学作为新兴的学科也在不断发展之中。随着蛋白分析方法和分离技术的提高及生物信息数据库的完善, 疫苗的制备及诊断抗原和药物靶点的筛选将更加高效, 这对片形吸虫病的防治具有重要意义。

致谢: 大理州血吸虫病防治研究所中心实验室管理员张剑平同志帮助收集片形吸虫成虫, 方文主任医师赠送广西巨片形吸虫成虫, 在此一并致谢!

【参考文献】

- [1] 陈家旭. 我国爆发片形吸虫群体感染事件的警示[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(6): 593-4.
- [2] 陈木新, 艾琳, 许学年. 云南省大理州大片形吸虫群体感染 26 例分析[J]. 中国地方病学杂志, 2012, 31(6): 595-8.
- [3] 艾琳, 陈木新, 陈韶红. 3 种 ELISA 试剂盒检测片形吸虫病的效果评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(2): 177-81.
- [4] 方文, 李天美, 李科荣. 大理地区肝片形吸虫感染中间宿主实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(4): 285-8.
- [5] Aizamora-Gonzales L, Vallejos R C. Development of indirect sandwich ELISA for determination of excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica*[J]. Revista Peruana DE Biología, 2016, 23(1): 47-52.
- [6] Arias MS, Pineiro P, Vhillyer G. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area[J]. Parasitol RES, 2012, 110(2): 1001-7.
- [7] Younis M, Rabia I, Deeb SE, et al. *Fasciola gigantica* excretory/secretory antigens as possible vaccine candidates[J]. J Med Sci, 2014, 14(1): 1-11.
- [8] Hillyer G V. *Fasciola* antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis[J]. J Helminthol, 2005(79): 241-7.
- [9] 周岩, 许学年, 程娜, 等. 巨片形吸虫病快速诊断胶体金免疫层析试条的研制与评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(2): 114-8.
- [10] Gerlai R. Phenomics; fiction or the future? [J]. Trends Neurosci, 2002, 25(10): 506-9.
- [11] Gonenc B, Sarimehmetoglu HO. Comparison of crude and Excretory/secretory/Secretory antigens for the diagnosis of *Fasciola hepatica* in sheep by western blotting[J]. Turk J Vet Anim Sci, 2004, 5(28): 943-9.
- [12] Widjajanti SS. Characterisation of protein antigen from *Fasciola* [J]. J Ilmu Ternak Dan Veteriner, 1999, 4(1): 60-4.
- [13] Gaudier J F, Caban-Hernandez K, Osuna A. Biochemical characterization and differential expression of a 16.5-Kilodalton tegument-associated antigen from the liver fluke *fasciola hepatica*[J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(3): 325-33.
- [14] 胡蝶飞. 一维凝胶电泳技术在血清差异蛋白质组学中的应用研究[D]. 广西: 广西医科大学, 2010.
- [15] Okanant S, Ghosh S, Gupta SC. Characterization of specific and cross-reacting antigens of *Fasciola gigantica* by immunoblotting[J]. Parasitol Res, 2005, 97(6): 41-8.

【收稿日期】 2018-07-27 【修回日期】 2018-09-25