

## 十二指肠钩虫 ASP-2 基因密码子优化及在大肠杆菌中高效表达

夏晓玲\*, 俞敏, 孙炜

(盐城卫生职业技术学院, 江苏 盐城 224000)

**[摘要]** 目的: 获得十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)分泌蛋白 2(mAd-ASP-2)编码基因, 构建其高效表达的大肠杆菌表达体系。方法: 以 RT-PCR 的方法得到克隆了编码 mAd-ASP-2 的成熟肽全基因序列, 克隆入原核表达载体 pET-22b(+)中, 组装成表达载体 pET-22b-mAd-ASP-2。利用大肠杆菌偏爱密码子和 GenScript rare codon analysis 软件获得优化密码子优化的 mAd-ASP-2\* 基因序列并人工合成该基因, 将其克隆入原核表达载体 pET-22b(+), 组装成表达载体 pET-22b-mAd-ASP-2\*。将这 2 个表达载体分别转化入大肠杆菌表达菌株 Rosetta-gami-2(DE3)中, 经 IPTG 诱导表达。结果: 同样条件下, 密码子优化的 mAd-ASP-2\* 基因比优化前能够获得较高的表达, 且以可溶形式存在。利用 His Trap HP 亲和柱获得了纯化的重组蛋白 mAd-ASP-2\*, 确定了纯化重组蛋白咪唑洗脱液最佳浓度为 200 mmol/L。Western blot 分析结果进一步显示, 该融合蛋白可与鼠抗 His-tag 抗体发生特异性结合, 说明表达蛋白为目的蛋白。结论: 通过密码子优化实现了十二指肠钩虫 ASP-2 的高效表达, 为进一步研究 Ad-ASP-2 的功能和以其作为血清学诊断抗原或保护性疫苗奠定了基础。

**[关键词]** 十二指肠钩虫; ASP-2 成熟蛋白; 密码子优化; 原核表达

**[中图分类号]** R738.21

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-627-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140518

## A study on codon optimization and expression of mature *Ancylostoma*-secreted protein 2 of *Ancylostoma duodenale* in *Escherichia coli*

Xia Xiaoling\*, Yu Min, Sun Wei

(Yancheng Institute of Health Science, Yancheng 224000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To obtain the cDNA encoding *Ancylostoma*-secreted protein 2 of *Ancylostoma duodenale* (mAd-ASP-2) and construct the expression system of mAd-ASP-2 in *E. coli*. **Methods:** The cDNA encoding of the mature *Ancylostoma*-secreted protein 2 of *Ancylostoma duodenale* (mAd-ASP-2) was cloned by RT-PCR. The mAd-ASP-2 was inserted into the pET-22b(+) vector to construct prokaryotic expression plasmid pET-22b-mAd-ASP-2. An optimized codon mAd-ASP-2 gene, designated mAd-ASP-2\*, was designed and synthesized based on optimization of synonymous codon bias of *E. coli*, without modification of amino acid sequence, and inserted into pET-22b(+) to construct prokaryotic expression plasmid pET-22b-mAd-ASP-2\*. The two expression plasmids were transformed into *E. coli* Rosetta-gami-2(DE3) cells. **Results:** SDS-PAGE analysis showed that the expected recombinant mAd-ASP-2 fusion protein was expressed in *E. coli* Rosetta-gami-2(DE3) cells induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and the mAd-ASP-2\* with the optimized codon was more highly expressed than the original mAd-ASP-2 in the soluble fraction of *E. coli* cell lysates. The recombinant mAd-ASP-2\* fusion protein was purified using His Trap HP affinity column. Western blot analysis showed that the recombinant mAd-ASP-2\* protein was combined with mouse anti-His-Tag. So the expressed protein was definitely confirmed to be the target protein. **Conclusion:** The expression system of mAd-ASP-2 in *E. coli* was constructed successfully, which provided a fundamental basis for further studies on subunit vaccine for prevention of hookworm infections.

**[Key words]** *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma*-secreted protein 2, Optimized code, prokaryotic expression

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 627-633]

**[基金项目]** 盐城市科技发展计划(YK2008080)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xiaxiaoling2000@163.com

钩虫是钩口科线虫的统称, 在寄生人体消化道的线虫中, 钩虫的危害性最严重, 由于钩虫的寄生, 可使人体长期慢性失血, 临床上以贫血、营养不良、

胃肠功能失调为主要表现。寄生人体的钩虫,主要有十二指肠钩虫 (*Ancylostomaduodenale dubini*),美洲钩虫 (*Necator americanus*)和偶尔可寄生人体的锡兰钩口线虫 (*Ancylostoma ceylanicum*),其中十二指肠钩虫较美洲钩虫对人体的危害更大<sup>[1-5]</sup>。据估计,全世界钩虫感染人数达9亿左右。在我国,钩虫病仍是严重危害人民健康的寄生虫病之一<sup>[6-8]</sup>。目前,治疗钩虫主要依赖苯并咪唑类驱虫药,但部分感染者在使用该类药物后仍然会再次被感染,并且在钩虫感染人群中已出现对苯并咪唑类驱虫药的耐药<sup>[1]</sup>。因此,迫切需要找到一种新的方法控制钩虫病。疫苗是根除感染性疾病的有效途径,近年来研究表明,L3感染期十二指肠钩虫在宿主刺激下释放两种主要的分泌蛋白(ancylostoma-secreted proteins, ASP): ASP-1和ASP-2,是钩虫排泄分泌抗原的主要成分,被认为是最有前景的钩虫疫苗候选抗原分子,并且认为ASP-2的效果更好<sup>[9-10]</sup>。目前,关于ASP-2外源表达的研究主要集中在美洲板口线虫和锡兰钩口线虫,而对十二指肠钩虫ASP-2外源表达的报道较少<sup>[11-12]</sup>。本研究从十二指肠钩虫L3中克隆了ASP-2成熟蛋白(mature Ad-ASP-2, mAd-ASP-2)基因编码序列,并构建原核表达载体,对其进行表达,研究结果将为进一步研制钩虫基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)为从感染者体内经药物驱虫获得。pGEM-T-Easy Vector (Promega公司,美国);原核表达质粒pET-22b(+),大肠杆菌Rosetta-gami-2(DE3)和DH5 $\alpha$ 为本研究室保存。

TRIzol (Invitrogen公司,中国);Taq DNA聚合酶、RT-PCR试剂盒RNA PCR Kit (AMV)Ver 3.0、T4-DNA连接酶、限制性内切酶和蛋白质分子量标准(大连宝生物工程公司);琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、DNA分子量标准、鼠抗6-His-Tag抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠IgG、HRP-DAB底物显色试剂盒、预染蛋白质分子量标准(中国天根生化科技有限公司);1 ml His Trap HP预装柱(GE公司,美国);其他常规化学试剂均为国产或进口分装分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 十二指肠钩虫Ad-ASP-2蛋白的生物信息学分析

根据NCBI GenBank所收录的Ad-ASP-2氨基

酸序列(AAP41951),利用SignalP 4.0 Server和NCBI站点上分别信号肽序列的位置和保守功能域在线搜索分析。

#### 1.2.2 mAd-ASP-2成熟蛋白基因的克隆

十二指肠钩虫总RNA提取参照TRIzol(Invitrogen)方法。根据GenBank所收录的ASP-2基因序列(AY288088)和生物信息学分析,分析设计和合成了1对引物用于克隆mAd-ASP-2成熟蛋白基因(69 bp-668 bp),上下游分别引入Nco I与Xho I酶切位点,命名为:ASP-2F:5'-CACCATGGCTATGAGAT-GCGGAAATA ATG-3'(划线部分为Nco I酶切位点);ASP-2R:5'-TCCTCGAGCTGCACGATG CAAA-GCGCCTC-3'(划线部分为Xho I酶切位点),引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成,序列测定由日本TaKaRa公司完成。根据TaKaRa RNA PCR Kit 3.0说明书合成cDNA第一链,并以合成的cDNA第一链为模板,ASP-2F和ASP-2R为引物,PCR扩增mAd-ASP-2基因片段,反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性5 min后进入循环,循环参数为94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,循环数为40。循环后72 $^{\circ}$ C延伸5 min,电泳鉴定扩增产物的大小正确后切胶回收目的片段。将RT-PCR产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后与pGEM-T-Easy连接,构建克隆载体pGEM-mAd-ASP-2。通过转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,并涂布于含100 mg/L氨苄青霉素的LB固体培养基上,37 $^{\circ}$ C培养过夜,挑取菌落,利用pGEM-T-Easy测序引物进行菌落PCR鉴定,筛选出阳性克隆后进行测序(上海英骏生物技术有限公司),将测序正确的克隆载体命名为pGEM-mAd-ASP-2。

#### 1.2.3 十二指肠钩虫Ad-ASP-2基因密码子优化和合成

根据GenScript rare codon analysis tool([http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon\\_analysis](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis))和大肠杆菌的偏爱密码子,在不改变氨基酸序列的基础上,对GenBank所收录的Ad-ASP-2(69-665 bp)基因密码子进行优化。为了方便将优化后的基因片段克隆到原核表达载体,在该片段5'和3'两端分别引入Nco I与Xho I位点。并委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成并插入pUC57克隆载体中,命名为pUC-Ad-ASP-2\*。

#### 1.2.4 mAd-ASP-2基因密码子优化前后两种原核表达载体的构建与鉴定

分别将pGEM-mAd-ASP-2和pUC-Ad-ASP-2质粒用Nco I与Xho I双酶切后与同样酶切的原核表

达载体 pET-22b(+) 在 16℃ 下用 T4-DNA 连接酶连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 并涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养过夜, 挑取菌落, 提取重组质粒进行酶切鉴定, 并由上海英骏生物技术有限公司测序, 测序正确的重组质粒分别命名为 pET-22b-mAd-ASP-2 和 pET-22b-mAd-ASP-2\*。将鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta-gami-2 (DE3), 挑取菌落, 以 ASP-2F 和 ASP-2R 为引物, 利用 1.2.1 中 PCR 反应条件的进行鉴定。

### 1.2.5 重组 mAd-ASP-2 的诱导表达

将上述鉴定正确的重组表达菌株分别接种至含有 100 mg/L Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 活化过夜, 再按 1:100 稀释到 50 ml 含 Amp 的新鲜 LB 液体培养基中, 于 37℃ 摇床培养至  $D(600 \text{ nm})$  值在 0.6~0.8。把上述菌液分成 2 份, 一份利用 0.1 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 另一份作为未诱导的对照。30℃ 继续培养, 在诱导的不同时间 (2、4、6 h), 分别取 1 ml 样品于 1.5 ml 离心管, 于室温 5 000 g 离心 5 min 收集菌体。重悬于 50 mmol/L PBS (pH7.4) 中, 然后冰浴进行超声破碎, 最后 4℃, 12 000 g 离心 10 min, 收集上清, 于 100℃ 加热变性 5 min, 进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.2.6 mAd-ASP-2 重组蛋白的纯化和 Western blot 分析

将上述转化 pET-22b-mAd-ASP-2\* 重组表达菌株经 IPTG 诱导后的菌体上清溶液 5 ml, 利用 His-Trap HP 亲和柱纯化重组蛋白, 分别用 50、100、150、200 mmol/L 的咪唑洗脱液进行洗脱, 最后将收集到的目的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 确定最佳洗脱浓度。将纯化后的 mAd-ASP-2 重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至硝酸纤维素膜上, 硝酸纤维素膜浸泡于封闭液中, 室温封闭 2 h。再加入鼠抗 6-His-Tag (一抗) 与之反应, 二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (IgG-HRP), 最后用 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色至有清晰的目标条带为止。

## 2 结果

### 2.1 Ad-ASP-2 信号肽和保守功能域分析

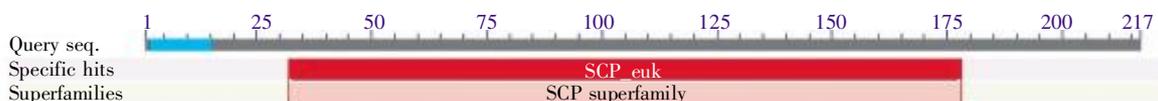


图 2 Ad-ASP-2 保守功能域分析

Figure 2 Conserved domain analysis of Ad-ASP-2

利用 SignalP4.0 Server 对推导得到的蛋白序列在线搜索, 发现在第 1~70 aa 内有明显的 1 个信号肽, 在 18~19 aa 处为信号肽的断点 (图 1)。在 NCBI 网站上对 Ad-ASP-2 进行保守功能域搜索分析结果表明, 该蛋白具有一个真核生物类甾体运输蛋白 (Sterol carrier protein type, SCP) 结构功能域 (SCP-like extracellular protein domain) (图 2), 这种结构域主要存在动植物病原相关蛋白 (Pathogenesis-related protein) 中。

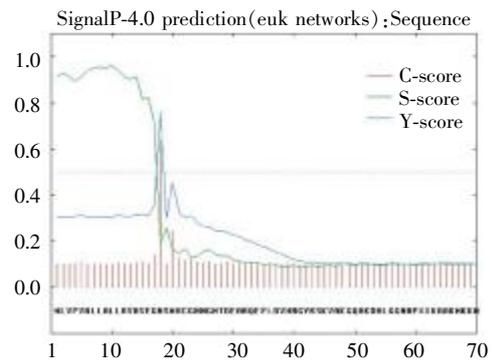


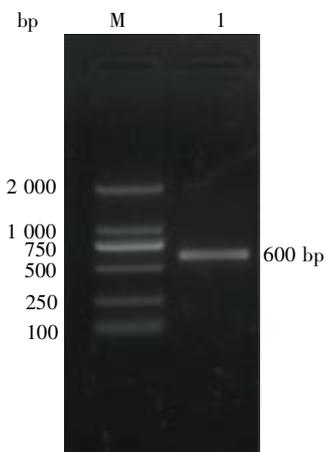
图 1 Ad-ASP-2 信号肽分析

Figure 1 Signal prediction of Ad-ASP-2

### 2.2 mAd-ASP-2 成熟蛋白基因的克隆及原核表达载体的构建

根据 GenBank 所收录的 ASP-1 基因序列 (AF077402), Ad-ASP-1 成熟蛋白基因片段大小为 600 bp, RT-PCR 扩增结果证实获得了预期大小的片段 (图 3)。将 PCR 回收产物和克隆载体 pGEM-T-Easy 连接构建 pGEM-T- mAd-ASP-2, 经 *Nco* I 与 *Xho* I 酶切鉴定得到的片段与预期插入片段大小一致, 初步证明克隆载体构建成功 (图 4)。测序结果表明, 所克隆获得的 mAd-ASP-2 与 GenBank 所公布基因序列完全一致。将 *Nco* I 与 *Xho* I 双酶切得到的 ASP-2 片段与同样酶切的原核表达载体 pET-22b (+) 连接构建成表达 C 端融合了 6-His-Tag 的 mAd-ASP-1 原核表达载体 pET-22b-mAd-ASP-1, 经 *Nco* I 与 *Xho* I 酶切鉴定初步证明原核表达载体构建成功 (图 5)。测序结果也证明 mAd-ASP-2 插入位置的开放阅读框架正确。将鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta-gami-2 (DE3), 菌落 PCR 的结果表明成

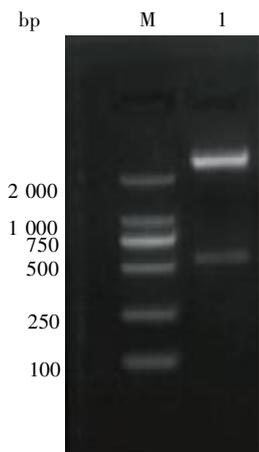
功筛选到了含有 pET-22b-mAd-ASP-2 的原核表达工程菌株(图 6)。



M:DL 2 000 分子量标准; 1: Ad-ASP-2 RT-PCR 扩增产物。

图 3 RT-PCR 扩增 Ad-ASP-2

Figure 3 RT-PCR Amplification of Ad-ASP-2



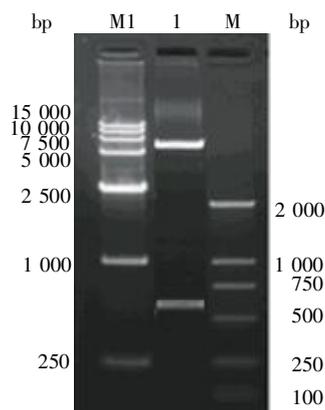
M:DL 15 000 分子量标准; 1:pGEM-T-Ad-ASP-2 双酶切(*Nco* I / *Xho* I) 鉴定。

图 4 pGEM-T-Ad-ASP-2 克隆载体酶切鉴定

Figure 4 Digesting analysis of cloning vectors with *Nco* I and *Xho* I

### 2.3 mAd-ASP-2 基因密码子的优化

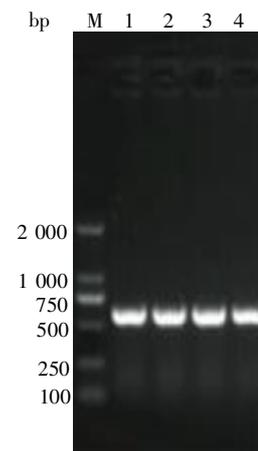
在不改变氨基酸序列的基础上,根据 GenScript rare codon analysis tool ([http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon\\_analysis](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis)) 和大肠杆菌的偏爱密码子,并兼顾低水平的 GC 含量(不超过 50%),对 mAd-ASP-2 基因进行密码子优化,获得的优化序列命名为 Ad-ASP-2\*, 优化前后的基因序列对比如图 7。在优化序列的两端分别引入 *Nco* I 与 *Xho* I 位点的酶切位点,便于原核表达载体构建。设计好的优化序列由南京金斯瑞生物科技有限公司进行全基因合成并插入 pUC57 克隆载体中,命名为 pUC-Ad-



M1:DL 15 000 分子量标准; M:DL 2 000 分子量标准; 1: pET-22b-Ad-ASP-2 双酶切(*Nco* I / *Xho* I) 鉴定。

图 5 pET-22b-Ad-ASP-2 载体酶切鉴定

Figure 5 Digesting analysis of pET22b-Ad-ASP-2 vector with *Nco* I and *Xho* I



M:DL 2 000 分子量标准; 1-4: 阳性克隆。

图 6 Ad-ASP-2 原核表达菌株菌液 PCR 鉴定

Figure 6 Identification of positive clone of prokaryotic expression strain by colony PCR

ASP-2\*。

### 2.4 密码子优化 mAd-ASP-2 基因原核表达载体的构建

将 pUC-Ad-ASP-2\* 利用 *Nco* I 与 *Xho* I 双酶切得到的 Ad-ASP-2\* 片段与同样酶切的原核表达载体 pET-22b(+ ) 连接构建成表达 C 端融合了 6-His-Tag 的 mAd-ASP-2 原核表达载体 pET-22b- Ad-ASP-2\*, 经 *Nco* I 与 *Xho* I 酶切鉴定初步证明原核表达载体构建成功(图 8)。测序结果也证明 Ad-ASP-2\* 插入位置的开放阅读框架正确。将鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta-gami-2( DE3 ), 菌落 PCR 的结果表明成功筛选到了含有 pET-22b-Ad-ASP-2\* 的原核表达工程菌株(图 9)。

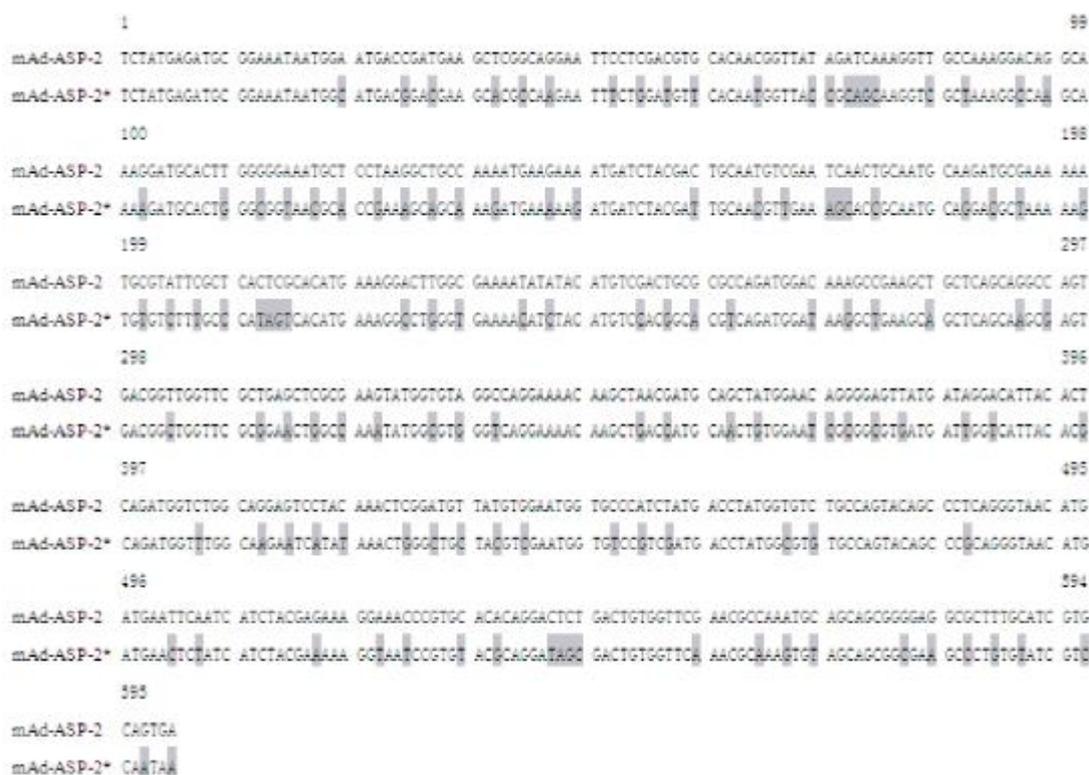
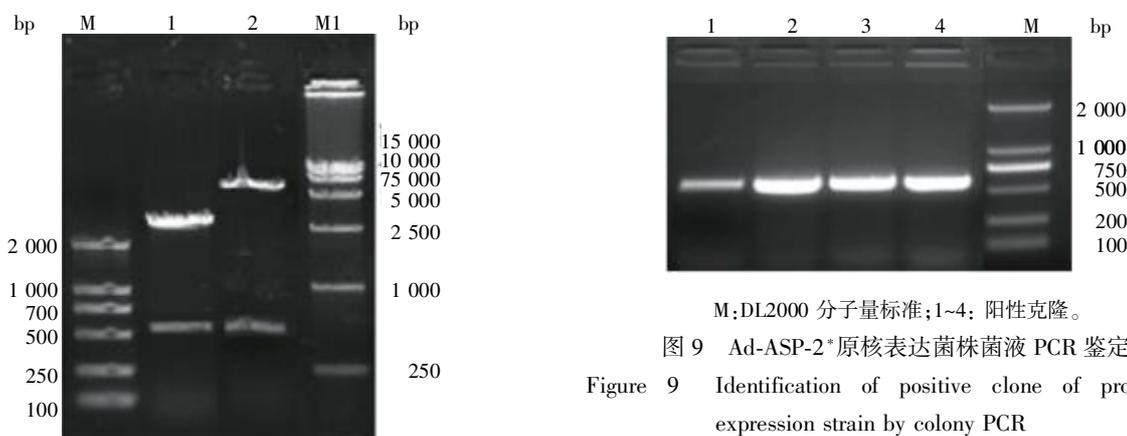


图 7 mAd-ASP-2 基因密码子优化前后的比对分析(阴影部分为优化后的碱基)

Figure 7 Comparison of codon optimization of mAd-ASP-2 gene(The optimized bases are indicated by shading)



M;DL2000 分子量标准;1~4; 阳性克隆。

图 9 Ad-ASP-2\*原核表达菌株菌液 PCR 鉴定  
Figure 9 Identification of positive clone of prokaryotic expression strain by colony PCR

M1:DL 15 000 分子量标准; M:DL 2 000 分子量标准;1:pUC-Ad-ASP-2\* 双酶切(*Nco* I/*Xho* I)鉴定;2:pET-22b- Ad-ASP-2\* 双酶切(*Nco* I/*Xho* I)鉴定。

图 8 pUC-Ad-ASP-2\* 和 pET-22b-Ad-ASP-2\* 载体酶切鉴定  
Figure 8 Digesting analysis of pET22b-Ad-ASP-2\* vector with *Nco* I and *Xho* I

### 2.5 mAd-ASP-2 基因密码子优化前后的诱导表达

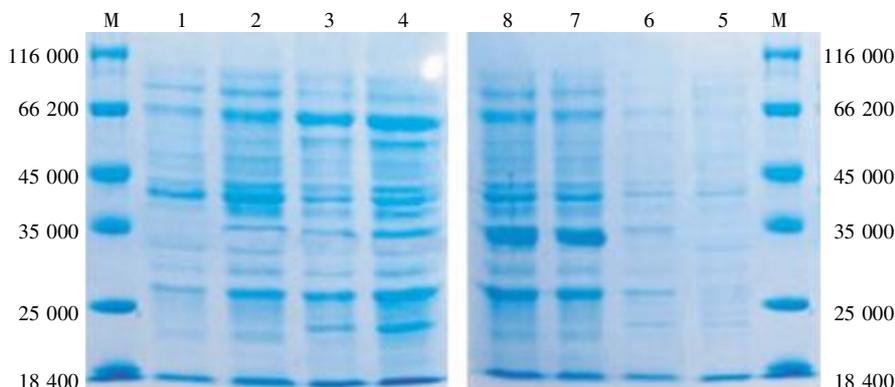
将 PCR 检测阳性的重组菌经 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达,将不同诱导时间(0、2、4、6 h)后的重组菌进行超声波破碎,分离上清进行 SDS-PAGE 检测发现,结果表明:mAd-ASP-2 和其基因密码子优化后

的 Ad-ASP-2\* 都可以在大肠杆菌中以可溶形式表达预期约 34 000 的目的蛋白,且密码子优化后的 Ad-ASP-2\* 有较明显表达带(图 10)。

### 2.6 重组 mAd-ASP-2 的 Western blot 分析

利用 HisTrap HP 亲和柱纯化重组蛋白,确定了重组蛋白在 200 mmol/L 咪唑的洗脱下能够被较好的纯化出来(图 11)。将纯化后的 Ad-ASP-2 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后电转移到硝酸纤维素膜上,以鼠抗兔 His-Tag 为一抗,山羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗,HRP-DAB 显色进行 Western blot 分析,结果

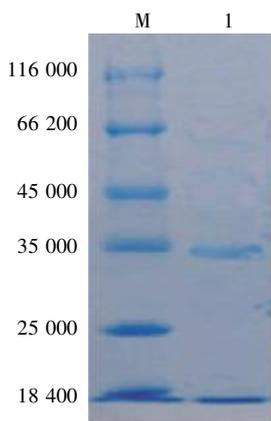
分析表明,出现了一条明显的特异条带,大小与预期 Ad-ASP-2\*重组蛋白大小一致(图 12)。



M:分子蛋白 Marker;1:转化 pET-22b-Ad-ASP-2 重组菌未诱导超声裂解上清;2~4:转化 pET-22b-Ad-ASP-2 重组菌诱导 2、4、6 h 超声裂解上清;5:转化 pET-22b-Ad-ASP-2\*重组菌未诱导超声裂解上清;6~8:转化 pET-22b-Ad-ASP-2\*重组菌诱导 2、4、6 h 超声裂解上清。

图 10 SDS-PAGE 分析 Ad-ASP-2 的诱导表达

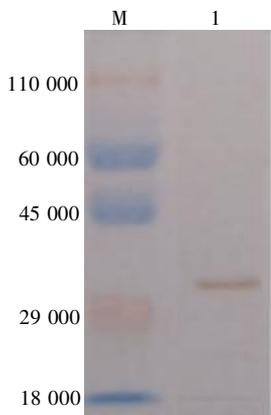
Figure 10 SDS-PAGE analysis of expression of the Ad-ASP-1 protein and purified Ad-ASP-1 protein



M:分子蛋白 Marker;1:Ad-ASP-2\*纯化蛋白(200 mmol/L 咪唑)。

图 11 Ad-ASP-1 纯化蛋白 SDS-PAGE 分析

Figure 11 SDS-PAGE analysis of the purified Ad-ASP-2\* protein



M:预染蛋白 Marker;1:Ad-ASP-2\*纯化蛋白。

图 12 Ad-ASP-1 纯化蛋白 Western blot 分析

Figure 12 Western blot analysis of the purified Ad-ASP-2\* protein

### 3 讨论

已有研究表明 ASP-2 是最有前景的钩虫疫苗候选抗原分子<sup>[13-14]</sup>。根据本研究在 NCBI 站点上对 mAd-ASP-1 进行保守功能域搜索分析结果表明,该蛋白具有一个真核生物病原相关蛋白结构域 SCP-like extracellular protein domain(图 1),因此,外源表达 mAd-ASP-2 成熟蛋白基因编码序列应该具有更好的免疫源性。结合对 mAd-ASP-2 蛋白序列信号肽在线分析,本研究从十二指肠钩虫 L3 中克隆了 ASP-2 成熟蛋白基因编码序列,并选用 pET 系统进行表达。基因的密码子优化程度直接影响外源基因在宿主细胞的表达水平<sup>[15]</sup>,为了提高重组 mAd-ASP-2 表达量,本研究依据根据 GenScript rare codon analysis tool ([http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare\\_codon\\_analysis](http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/rare_codon_analysis)) 和大肠杆菌的偏爱密码子,在不改变氨基酸序列的基础上,降低 GC 含量,优化 Ad-ASP-2 基因密码子,结果显示,密码子优化可以明显提高 Ad-ASP-2 基因的表达水平。这为将来制备低成本 Ad-ASP-2 重组蛋白,使其在临床上应用创造了必要条件。

由于 mAd-ASP-2 是富含半胱氨酸的分泌蛋白,为了提高重组 mAd-ASP-2 的活性和可溶性表达,本研究选用含有周质定位作用果胶酶 pe1B 信号肽的质粒 pET-22b(+ )作为原核表达载体,信号肽与目的蛋白的融合可以促进目的蛋白从细胞质转运到大肠杆菌的周质中,可以促进重组 mAd-ASP-2 的生成,从而增加蛋白质的可溶性和蛋白活性。同时,本研究选用可以降低宿主胞质的还原性的氧化型突变大肠

杆菌菌株 Rosetta-gami-2 (DE3), 也利于重组 mAd-ASP-2 二硫键的形成。本研究的诱导表达结果也表明了重组 mAd-ASP-2 绝大部分存在于裂解液中以可溶形式存在,说明该蛋白可定位细胞周质(指革兰氏阴性细菌中,位于内膜和外膜之间的结构部分)。本实验采用了亲和层析,并通过 Western blot 鉴定,获得了纯度较高的目的蛋白。这为进一步研究钩虫保护性疫苗提供基础。

#### [参考文献]

- [1] Bungiro R, Cappello M. Hookworm infection; new developments and prospects for control [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2004, 17(5): 421-426
- [2] Schneider B, Jariwala AR, Periago MV, et al. A history of hookworm vaccine development [J]. *Hum Vaccin*, 2011, 7(11): 1234-1244
- [3] 邓莉, 邵正, 许琴英, 等. 十二指肠钩虫金属蛋白酶组织抑制剂同源物 Ad-TIMPL-1 基因克隆及原核表达 [J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(8): 866-869
- [4] 邵正, 邓莉, 何庆丰, 等. 十二指肠钩虫巨噬细胞迁移因子基因克隆和表达 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(5): 354-356
- [5] 付汉维, 邓莉, 何庆丰, 等. 十二指肠钩虫锰超氧化物歧化酶基因的克隆与表达 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(9): 663-666
- [6] 全国人体重要寄生虫病现状调查办公室. 全国人体重要寄生虫病现状调查报告 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2005, 239(5): 332-339
- [7] 夏晓玲, 孙炜. 十二指肠钩虫 ASP-1 成熟蛋白基因的克隆、原核表达及纯化 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(2): 144-154
- [8] 黄庆斌. 十二指肠钩虫症 89 例内镜诊断治疗的临床体会 [J]. *河北医学*, 2013, 19(5): 682-685
- [9] Loukas A, Bethony J, Brooker S, et al. Hookworm vaccines: past, present, and future [J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(11): 733-741
- [10] Diemert DJ, Bethony JM, Hotez PJ. Hookworm vaccines [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(2): 282-288
- [11] Goud GN, Zhan B, Ghosh K, et al. Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant Ancylostoma-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from *Ancylostoma ceylanicum* [J]. *J Infect Dis*, 2004, 189(5): 919-929
- [12] Bower MA, Constant SL, Mendez S. Necator americanus: the Na-ASP-2 protein secreted by the infective larvae induces neutrophil recruitment in vivo and in vitro [J]. *Exp Parasitol*, 2008, 118(4): 569-575
- [13] Fujiwara RT, Bethony J, Bueno LL, et al. Immunogenicity of the hookworm Na-ASP-2 vaccine candidate: characterization of humoral and cellular responses after vaccination in the Sprague Dawley rat [J]. *Hum Vaccin*, 2005, 1(3): 123-128
- [14] Bethony JM, Simon G, Diemert DJ, et al. Randomized, placebo-controlled, double-blind trial of the Na-ASP-2 hookworm vaccine in unexposed adults [J]. *Vaccine*, 2008, 26(19): 2408-2417
- [15] Thangadurai C, Suthakaran P, Barfal P, et al. Rare codon priority and its position specificity at the 5' of the gene modulates heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Biochem [J]. Biophys Res Commun*, 2008, 376(4): 647-652

[收稿日期] 2013-04-27