

研究报告

# 日本血吸虫磷酸甘油酸变位酶 *SjPGAM* 基因的克隆、表达及功能分析

周岩<sup>1,2</sup>, 林矫矫<sup>1</sup>, 姚利晓<sup>1</sup>, 王欣之<sup>1</sup>, 石耀军<sup>1</sup>, 陆珂<sup>1</sup>, 刘金明<sup>1</sup>, 傅志强<sup>1</sup>, 陶丽红<sup>1</sup>

1 中国农业科学院上海兽医研究所 国家防治动物血吸虫病专业实验室 农业部动物寄生虫学重点开放实验室, 上海 200232

2 上海师范大学, 上海 200234

**摘要:** 磷酸甘油酸变位酶(Phosphoglycerate mutas)是糖酵解过程中的一种重要酶, 主要催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸。利用 PCR 技术从日本血吸虫 19 d 童虫中首次扩增到一个 PGAM 家族基因, 序列分析表明该基因的完整编码框含 753 bp, 编码 250 个氨基酸, 理论分子量 28.26 kD, 理论等电点 7.01。同源性分析结果表明, 该基因的氨基酸序列具有典型 PGAM 家族特征, 推测为血吸虫的 PGAM 基因, 命名为 *SjPGAM*(GenBank Accession No. EU374631)。实时定量 PCR 分析显示该基因在 14 d 和 19 d 童虫中的表达量明显高于其他发育阶段, 42 d 雄虫中的表达量高于雌虫。构建了该基因的原核重组表达质粒 pET-28a(+)-PGAM, 在大肠杆菌系统中成功获得了表达, 重组蛋白以包涵体形式存在, Western blotting 显示表达产物能被日本血吸虫成虫粗抗原免疫血清所识别。*SjPGAM* 基因及其表达产物的获得, 为探索 PGAM 基因家族在血吸虫能量代谢过程中碳水化合物转运、新陈代谢调节和生长发育提供了重要基础。

**关键词:** 日本血吸虫, 糖酵解, 磷酸甘油酸变位酶, 克隆

## Cloning, Expressing and Characterizing of a Phosphoglycerate mutas Gene of *Schistosoma japonicum*

Yan Zhou<sup>1,2</sup>, Jiaojiao Lin<sup>1</sup>, Lixiao Yao<sup>1</sup>, Xinzhi Wang<sup>1</sup>, Yaojun Shi<sup>1</sup>, Ke Lu<sup>1</sup>, JinMing Liu<sup>1</sup>, Zhiqiang Fu<sup>1</sup>, and Lihong Tao<sup>1</sup>

1 National Laboratory of Animal Schistosomiasis Control, Key Laboratory of Animal Parasitology Ministry of Agriculture, Shanghai Veterinary Research Institute of CAAS, Shanghai 200232, China

2 Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

**Abstract:** Phosphoglycerate mutase (PGAM) is a key enzyme in glycolytic pathways. With PCR technique based on an EST identified in our lab, a novel gene named *SjPGAM* (GenBank Accession No. EU374631) was cloned. Sequence analysis revealed that the ORF of *SjPGAM* gene contained 753 nucleotides, encoding 250 amino acids, and the molecular weight was about 28.26 kD. Real-time PCR analysis showed that the mRNA level of *SjPGAM* was much higher in the 14 days and 19 days schistosomula than other stages, suggesting that the gene was a schistosomula stage differential expression gene. The *SjPGAM* cDNA fragment was subcloned into an expression vector pET-28a (+) and transformed into *Escherichia coli* BL21 cells. In the presence of IPTG, the 31 kD fusion protein was expressed in included bodies. Western blotting revealed that the fusion protein could be recognized by the rabbit serum anti-*Schistosoma japonicum* adult worm antigen preparation. The study provides important basis for investigating the mechanism of the PGAM in the glycolytic pathways of *Schistosoma japonicum*.

**Received:** January 11, 2008; **Accepted:** April 8, 2008

**Corresponding author:** Jiaojiao Lin. Tel: +86-21-54083234; E-mail: caassp@public.sta.net.cn

**Keywords:** *Schistosoma japonicum*, glycolysis, phosphoglycerate mutase, clone

血吸虫病 (Schistosomiasis) 是由血吸虫 (Schistosome) 感染引起的一种分布广泛、危害严重的人畜共患寄生虫病。据世界卫生组织统计, 目前全球仍有 74 个国家和地区流行血吸虫病, 有 6.5 亿人受到威胁, 约 1.93 亿人感染血吸虫病<sup>[1]</sup>。血吸虫的能量主要是通过糖酵解过程获得的。磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase PGAM) 是糖酵解过程中的一个重要酶, 主要催化 3-磷酸甘油酸转化为 2-磷酸甘油酸。该酶在血吸虫能量代谢过程中与碳水化合物转运、新陈代谢调节和生长发育等有关<sup>[2]</sup>。磷酸甘油酸变位酶的多样性和编码这种酶基因序列的多变性使之成为研究生物多样性和分子进化的重要对象<sup>[3,4]</sup>。但至今, 对编码这种酶的基因表达调控研究仍很少, 尤其是在日本血吸虫方面, 更待进一步的探索<sup>[5,6]</sup>。本实验利用 PCR 技术首次克隆到编码日本血吸虫 PGAM 蛋白的含 ORF 的 cDNA 序列, 分析了该基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体中的表达情况, 应用大肠杆菌系统进行了表达, 并对表达产物进行了抗原性测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂和酶

Trizol、GeneRacer™ Kit 购自 Invitrogen 公司; Ex Taq Hot Start DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I、荧光定量 PCR 检测试剂盒和随机引物购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司; 联苯二胺(DAB)、DEPC 购自上海生工生物工程公司; 硝酸纤维素膜购自上海维编科贸有限公司; 逆转录酶购自 Stratagen 公司; RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司; SYBR Green I 和 Calibration 购自 BIO-RAD 公司。荧光定量 PCR 的标准品购自复旦悦达生物技术有限公司; 羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司; 日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清由本所提供。

#### 1.1.2 菌种、质粒及实验动物

pET28a(+)菌液/大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 由本所保存。新西兰白兔(雄性, 2.5~3 kg)购自上海罗泾飞达实验动物养殖场。日本血吸虫中国大陆株尾蚴由中国农科院上海兽医研究所钉螺室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 虫体的收集

新西兰白兔分别以腹部贴片法感染 20 000、8000、5000、2000 条血吸虫尾蚴, 在 7 d、14 d、19 d、27 d、32 d 和 42 d 后剖杀, 以肝门静脉灌注法收集虫体, 液氮冻存备用。

#### 1.2.2 总 RNA 的提取

取液氮中冻存的日本血吸虫 19 d 童虫 200 mg, 按 TRIzol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取。

#### 1.2.3 引物设计和含 ORF cDNA 片段的扩增

首先利用本实验室在双向电泳结合肽质量指纹图谱分析基础上获得的一个在童虫期呈现高表达的 PGAM 蛋白的一段序列, 以此肽序列为询问序列, 在日本血吸虫 EST 库中搜索到 1 个日本血吸虫的相应 EST 片段(GenBank Accession No. AAL30898.2)。根据该 EST 序列, 设计特异引物, 应用 PCR 技术进行 cDNA 片段的扩增。上游引物 *SjPGAMs*: 5'-GCGAAGCTTCAGATTGTATGGCTCCCTAC-3' (下划线处为 *Hind* III 酶切位点); 下游引物 *SjPGAMr*: 5'-AGACTCGAGTCTTCTTTCCTTGATTCGC-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点), 由上海英骏生物技术有限公司合成。取 1  $\mu$ L 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C、30 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、45 s, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 酶切纯化后与用同样酶切的 pET28a(+) 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 选单个菌落扩大培养, 提取质粒进行酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pET28a(+)-*SjPGAM* 并送英骏生物技术有限公司测序。

#### 1.2.4 生物信息学分析

将测序得到的 cDNA 在 NCBI 上进行同源性比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>); 利用 NCBI 上的 ORF finder 软件找出新基因的读码框, 再利用瑞士生物信息学研究所 (<http://tw.expasy.org/>) 提供的 ProtParam 软件对氨基酸残基数目、组成、蛋白质相对分子质量(Mr)、理论等电点等参数进行在线分析。利用 ProtScale 软件([www.expasy.ch/tools/pscale](http://www.expasy.ch/tools/pscale))进行蛋白质的疏水性分析。利用 Clustalw 软件对不同物种

PGAM 蛋白进行多重比对。抗原肽位点分析利用 DNAMAN 软件, 蛋白的跨膜区预测利用 Tmpred 软件(www.ch.embnet.org/software/TMPRED\_form.html), 信号肽预测利用 SignalP 软件(www.cbs.dtu/services/Singnalp)。

### 1.2.5 荧光实时定量 PCR

试验中选择血吸虫持家基因  $\alpha$ -微管蛋白 ( $\alpha$ -tubulin) 为内参<sup>[7,8]</sup>。分别提取 7 d、14 d、19 d、27 d、32 d 虫体及 42 d 雄虫、雌虫总 RNA, 去除基因组 DNA 后利用随机引物合成 cDNA 第一链。*SjPGAM* 荧光定量 PCR 引物: *SjPGAM FP*: 5'-ATG GCTCCCTACAAAATTGTATTCA-3', *SjPGAM RP*: 5'-ATCGAGTTTGTGCTAAAACAAAGTTT-3', 扩增 *SjPGAM* 基因片段长度为 220 bp;  $\alpha$ -tubulin 荧光定量 PCR 引物 S1: 5'-CTGATTTTCCATTCGTTT-3', S2: 5'-GTTGTCTACCATGAAGGCA-3', 片段扩增长度 213 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。采用荧光染料法进行实时定量 PCR, 反应体系包括: 5× R-PCR Buffer 5  $\mu$ L, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 引物 1.0  $\mu$ L, 25×SYBR Green I 1.0  $\mu$ L, 10<sup>-3</sup>× Calibration 1.0  $\mu$ L, 5 u/ $\mu$ L Ex Taq HS 0.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 14.7  $\mu$ L, 模板 cDNA 1.0  $\mu$ L, 共 25  $\mu$ L。反应参数: 95°C 90 s, (95°C 5 s, 58°C 30 s)40 个循环, 其中 58°C 30 s 结束时间为荧光信号检测点。每个反应均做 3 孔重复。采用 BIO-RAD 公司 iCycler™ IQ version 3.0 软件进行计算分析, 以  $\alpha$ -tubulin 为内参标化反应结果, 得出相对于每百万持家基因的目的基因含量。

### 1.2.6 重组表达质粒的构建

根据 *SjPGAM* 基因的 cDNA 序列设计引物, 在其扩增序列的 5'端和 3'端分别引入 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点, 通过 PCR 扩增得到含完整 ORF 的 *SjPGAM* 基因序列, 将该序列定向克隆于原核表达载体 pET28(+) 的多克隆位点区, 构建重组质粒 pET28a(+)-*SjPGAM*, 并转化表达宿主菌 BL21 (DH5 $\alpha$ )。

### 1.2.7 在大肠杆菌中的表达

将鉴定好的 pET28a(+)-*SjPGAM*/ BL21(DH5 $\alpha$ ) 接种于 LB 培养基, 37°C 振荡培养, OD<sub>600</sub> 时加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达。在 IPTG 诱导后 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 分别收集菌体, 应用 SDS-PAGE 分析菌体蛋白, 确定最佳诱导时间。

### 1.2.8 Western blotting 检测

将高表达时相菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳, 转移到硝酸纤维素膜上, 用经 pET28a(+)/BL21 大肠杆菌蛋白吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫兔血清作一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 作为底物进行显色。

## 2 结果

### 2.1 *SjPGAM* 基因的克隆及生物信息学分析

本研究对本实验室孙安国等在双向电泳技术和质谱技术基础上获得的 19 d 血吸虫童虫差异表达蛋白 phosphoglycerate mutase (GenBank Accession No. AAL30898.2) 进行了深入研究, 设计特异性引物, 应用 PCR 技术得到了编码日本血吸虫 PGAM 的 EST。经生物信息学分析该 EST 长度为 1003 bp。利用 NCBI 的 Blast 软件对该序列进行同源性搜索, 结果显示该基因序列与血吸虫其它已知基因无显著同源性, 为血吸虫新基因。氨基酸序列的相似性比较结果显示该基因编码蛋白与 PGAM 家族蛋白具有高度同源性, 具有十分典型的 PGAM 家族蛋白特征。在其保守区域同源性为 100%, 大部分为催化位点及组氨酸结合域。在 183~190 氨基酸处为磷酸甘油酸结合位点。具有 3 个糖基化位点。选择了分别来自华支睾吸虫 (GenBank Accession No. AY796059)、人 (GenBank Accession No. AAH53356)、小鼠 (GenBank Accession No. NP\_059024)、植物干酵母 (GenBank Accession No. CAA41595)、大肠杆菌 (GenBank Accession No. NP\_415276), 5 个物种的 PGAM 蛋白进行氨基酸序列的多重比对, 结果显示, 该基因所编码氨基酸序列与华支睾吸虫的 PGAM 相似性最高, 达 79% (E=4e-116), 与人 PGAM 的相似性为 58%, 其余皆在 51%~54% 之间。据此, 推测该基因编码的蛋白为日本血吸虫 PGAM 蛋白, 将该基因命名为日本血吸虫 PGAM (*SjPGAM*) (GenBank Accession No. EU374631)。

对该基因编码的氨基酸序列进行生物信息学分析结果表明, *SjPGAM* 基因的 ORF 含 753 bp 的核苷酸序列, 由 250 个氨基酸残基组成, 理论分子量为 28 257.2, 理论等电点为 7.01, 酸性氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 共为 31 个, 碱性氨基酸残基总数 (Arg+Lys) 共为 31 个。*SjPGAM* 蛋白的 N 端不具有信号肽,

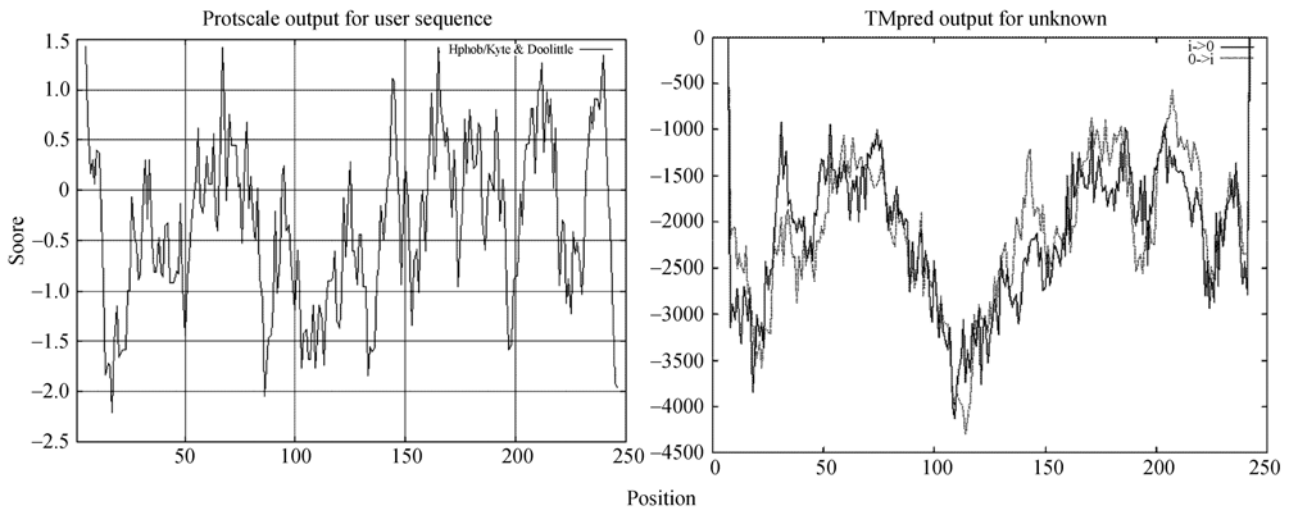


图 1 *SjPGAM* 编码蛋白的疏水性(左)和跨膜区(右)分析  
**Fig. 1 Analysis of the hydrophobicity (left) and transmembrane (right) region about *SjPGAM* protein**

也不存在跨膜区结构(图 1)。*SjPGAM* 蛋白的疏水性区域分布比较均匀, 并且该蛋白具有多个抗原肽位点, 显示具有良好的免疫原性。

**2.2 *SjPGAM* 基因的期别、性别表达分析**

为了了解 *SjPGAM* 基因在日本血吸虫不同发育阶段虫体的表达情况, 提取 7 d、14 d、19 d、27 d、32 d 虫体及 42 d 雄虫、雌虫虫体总 RNA, 选择持家基因  $\alpha$ -tubulin 作为内参, 利用荧光定量 PCR 法检测该基因在日本血吸虫几个不同发育阶段虫体的表达情况。实验结果表明, *SjPGAM* 在日本血吸虫 19 d 和 14 d 童虫中表达量最高, 42 d 雄虫中的表达量比雌虫高(图 2)。

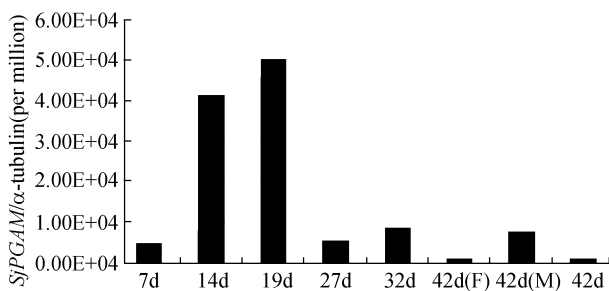


图 2 实时定量 PCR 检测 *SjPGAM* 基因在日本血吸虫不同期别和性别虫体中的表达

**Fig. 2 Stage and gender differential expression of *SjPGAM* in *Schistosoma japonicum* by real-time PCR**

7 d: 7 days schistosomula; 14 d: 14 days schistosomula; 19 d: 19 days schistosomula; 27 d: 27 days worms; 32 d: 32 days worms; 42 d (F): 42 days female adult worms; 42 d (M): 42 days male adult worms; 42 d: 42 days adult worms

**2.3 重组原核表达质粒 pET28a(+)-*SjPGAM* 的构建**

经 PCR、*Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 3)和测序证实重组表达质粒构建成功。

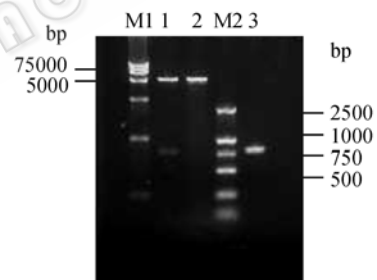


图 3 重组质粒 pET28a(+)-*SjPGAM* 双酶切及 PCR 鉴定  
**Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET28a(+)-*SjPGAM* by restriction enzyme analysis and PCR**

M1: DNA marker DL15 000; 1: pET28a(+)-*SjPGAM* digested with *Hind* III and *Xho* I; 2: pET28a(+) digested with *Hind* III and *Xho* I; M2: DNA marker DL2 000; 3: product of PCR

**2.4 *SjPGAM* 基因在大肠杆菌中的表达**

重组表达质粒 pET28a(+)-*SjPGAM* 在大肠杆菌 BL21(DH5 $\alpha$ )中获得表达, SDS-PAGE 电泳结果显示, 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 达到最大表达量; 重组蛋白分子量约为 31 kD, 与预期结果相符(*SjPGAM* 蛋白推测分子量约为 28.26 kD, 载体表达蛋白 3 kD)(图 4)。重组蛋白以包涵体形式存在, 溶解于 8 mol/L 尿素的 PBS。

**2.5 表达产物抗原性的鉴定**

以重组表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 经电转移至 NC 膜上, 用经 pET28a(+)/BL21 大肠杆菌蛋白

吸附的日本血吸虫成虫抗原免疫血清作一抗进行 Western blotting 分析, 结果在 31 kD 处有一明显的识别条带(图 5), 表明重组表达产物蛋白具有良好的抗原性。

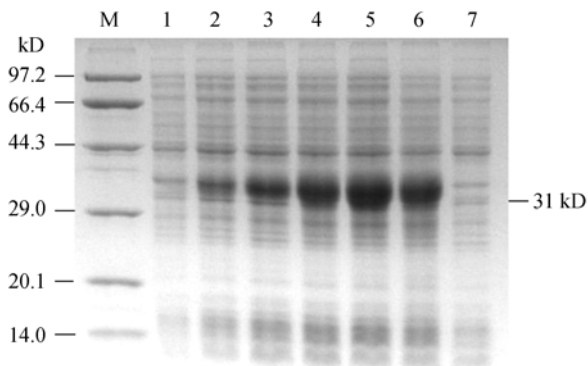


图 4 SDS-PAGE 分析 pET28a(+)-*SjPGAM*/BL21(DH5 $\alpha$ ) 不同时期的表达蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression products of pET28a(+)-*SjPGAM*/BL21(DH5 $\alpha$ ) in *E. coli*

M: low-molecular protein marker; Lane 1~6: pET28a (+)-*SjPGAM*/BL21 (DH5 $\alpha$ ) induced with 1mmol/L IPTG for 0h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h; 7: pET28a(+)-*SjPGAM*/BL21(DH5 $\alpha$ ) without IPTG for 6 h

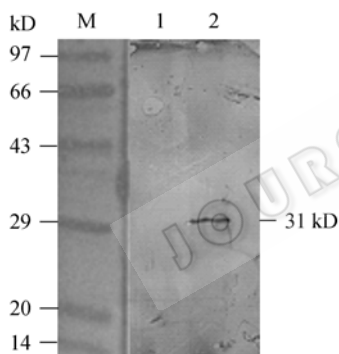


图 5 pET28a(+)-*SjPGAM* 重组蛋白的 Western blotting 分析  
Fig. 5 Western blotting analysis of *SjPGAM* expression product

M: marker; 1: expressed product of pET28a(+)-*SjPGAM* uninduced with IPTG; 2: expressed product of pET28a(+)-*SjPGAM* induced with IPTG. Recombinant protein was probed with the serum from rabbit immunized with *Schistosoma japonicum* adult worm antigen preparation

### 3 讨论

血吸虫病是一个严重的世界性的公共卫生问题。血吸虫病防治已持续数十年, 全面控制血吸虫病传播的前景仍不容乐观, 血吸虫病疫苗的研究与发展已被置于防治研究的重要地位<sup>[9,10]</sup>。血吸虫童虫

是血吸虫在终宿主体内发育的早期阶段也是虫体发育最关键的阶段, 虫体小, 较成虫脆弱, 对宿主的免疫应答特别敏感, 容易受到免疫攻击; 尤其是肺期、肝期童虫是其个体发育、性别分化的关键性阶段, 也是宿主免疫系统攻击的重要靶标<sup>[11]</sup>。一些血吸虫童虫具有的差异表达蛋白可能与童虫的生长、发育、性别分化等息息相关, 加强这些差异表达蛋白的研究, 可为研究高效的抗感染的分子疫苗提供基础<sup>[12]</sup>。

本研究所克隆的日本血吸虫 PGAM 基因 (*SjPGAM*) 属于 PGAM 基因家族的成员之一。PGAM 是糖酵解过程中的一个重要酶。糖酵解过程存在于几乎所有类型的细胞(包括真核细胞和原核细胞)。一般认为, 在血吸虫细胞中, 糖酵解主要发生在胞质 (cytosol) 中, 经过很多步骤的酶促反应使葡萄糖分解为丙酮酸, 终产物丙酮酸再进入线粒体中作为起始物参与三羧酸循环, 产生大量的高能分子 ATP, 供血吸虫生长发育之需。其具有分子内转移酶活性, 和碳水化合物转运、新陈代谢、催化活性及生长发育有关。PGAM 广泛地存在于大肠杆菌、酵母、细菌、以及人类等生物, 但对编码这种酶的基因表达调控研究和生长、发育、能量代谢相关研究仍很少, 尤其是在日本血吸虫方面。日本血吸虫 PGAM 基因的成功克隆, 不仅丰富了 PGAM 基因家族的普遍生物学知识, 更为开展对血吸虫能量代谢、生长发育机制的研究提供了切入点, 具有重要的价值。故本文选择这一个在童虫期呈现高表达、同时又是糖酵解途径关键酶 *SjPGAM* 进行了克隆、表达等研究。

研究结果表明 *SjPGAM* 基因在日本血吸虫感染宿主后第 14 d 和 19 d 童虫的表达要显著高于 7 d、27 d、32 d 虫体及 42 d 雄虫和雌虫; 与此同时, 该基因在 42 d 雄虫中的表达高于 42 d 雌虫。这与本课题组之前在蛋白质组学研究得到的结果相符。童虫是血吸虫在终宿主体内生长发育最旺盛的时期, 虫体发育需要摄取大量的能量, 在本试验中, 该基因在 14 d 和 19 d 童虫中呈现高表达, 也是该基因童虫生长发育快速、能量需求量最大的一个很好的佐证。从过去的研究已知: PGAM 不仅在糖酵解途径, 葡萄糖异生作用中是个重要的酶, 它在别的代谢途径中也有重要作用<sup>[13]</sup>。但该基因在血吸虫方面仍未见任何相关报道, 至今仍是空白。研究表明在秀丽线

虫中当通过 RNAi 技术降低 PGAM 活性, 可导致其多样性发展缺陷, 如胚胎致死, 幼虫致死, 机体形态学变异。在以孢子形式出现的敏感性杆状菌中, 如果去除 iPGAM 基因, 则导致生长极其缓慢并且不能产生孢子。在番茄的假单胞菌中, 如果在失活的 iPGAM 基因位点插入一个转位子则可能导致极度突变, 从而该基因无法生长或感染番茄。因此, 如果能通过对 PGAM 结构功能的研究, 寻找可抑制该酶活性、干扰血吸虫的糖酵解酶系、影响虫体糖酵解生化代谢和能量供给的功能分子, 通过人为干预, 抑制血吸虫 PGAM 的表达或者以 PGAM 蛋白为药靶抑制它的活性, 从而控制血吸虫糖酵解途径, 对减轻血吸虫病的病理损害及阻断传播将有重要意义<sup>[14,15]</sup>。Western blotting 结果表明本研究获得的重组表达产物具有良好的抗原性, 值得进一步探讨其作为抗血吸虫病疫苗的潜力。

本研究首次克隆和表达了日本血吸虫 PGAM 基因, 为探索 PGAM 基因家族在血吸虫能量代谢过程中碳水化合物转运、新陈代谢调节和生长发育提供了重要基础。

## REFERENCES

- [1] Acestor N, Masina S, Walker J, *et al.* Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania proteomes*. *Proteomics*, 2002, **2**(7): 877–879.
- [2] Ashton PD, Curwen RS, Wilson RA. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. *Trends Parasitol*, 2001, **17**(4): 198–202.
- [3] Barrett J, Jefferies JR, Brophy PM. Parasite proteomics. *Parasitol Today*, 2000, **16**(9): 400–403.
- [4] Bente M, Harder S, Wiesgigl M, *et al.* Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*, 2003, **3**(9): 1811–1829.
- [5] Bergquist NR, Colley T. Schistosomiasis vaccine: research to development. *Parasitol Today*, 1998, **14**(3): 99–104.
- [6] Boonmee S, Imtawil K, Wongkham C, *et al.* Comparative proteomic analysis of juvenile and adult liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Acta Tropica*, 2003, **88**: 133–238.
- [7] Bromley E, Leeds N, Clark J, *et al.* Defining the protein repertoire of microneme secretory organelles in the apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Proteomics*, 2003, **3**(8): 1553–1561.
- [8] Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, *et al.* Proteomics analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics*, 2005, **5**: 511–521.
- [9] Clegg JA, Smithers SR, Terry RJ. Acquisition of human antigens by *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Nature*, 1971, **232**(5313): 653–654.
- [10] Cohen AM, Rumpel K, Coombs GH, *et al.* Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomics of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*, 2002, **32**(1): 39–51.
- [11] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* Gapped BLAST and PSI2BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(17): 3389–3402.
- [12] Chander M, Setlow PE, Lamani M, *et al.* Structural studies on a 2,3-diphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. *Struct Biol*, 1999, **126**: 156–165.
- [13] Chander M, Setlow B, Setlow P. The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from gram positive endospore forming bacteria requires Mn<sup>2+</sup> and is pH sensitive. *Microbiol*, 1998, **44**: 759–767.
- [14] Charles SB, White MF, Hunter WN. Mechanistic implications for *Escherichia coli* cofactor dependent phosphoglycerate mutase based on the high resolution crystal structure of a vanadate complex. *Biol*, 2002, **316**: 1071–1081.
- [15] Currie PD, Sullivan DT. Structure, expression and duplication of genes which encode phosphoglyceromutase of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1994, **138**: 353–363.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved. Printed in China. This journal is registered with the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923. Organizations in the USA who are also registered with the C.C.C. may therefore copy material (beyond the limits permitted by sections 107 and 108 of US copyright law) subject to payment to C.C.C. of the per copy fee of \$12.00. This consent does not extend to multiple copying for promotional or commercial purposes. ISI Tear Sheet Service, 3501 Market Street, Philadelphia, PA 19104, USA, is authorized to supply single copies of separate articles for private use only. Organizations authorized by the Copyright Licensing Agency may also copy material subject to the usual conditions. For all other use, permission should be sought from Cambridge or the Cambridge University Press. This journal is registered with the International Federation of Agricultural Librarians and Documentalists. Organizations in the USA who are also registered with the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, may therefore copy material (beyond the limits permitted by sections 107 and 108 of US copyright law) subject to payment to C.C.C. of the per copy fee of \$12.00. This consent does not extend to multiple copying for promotional or commercial purposes. ISI Tear Sheet Service, 3501 Market Street, Philadelphia, PA 19104, USA, is authorized to supply single copies of separate articles for private use only. Organizations authorized by the Copyright Licensing Agency may also copy material subject to the usual conditions. For all other use, permission should be sought from Cambridge or the Cambridge University Press. This journal is registered with the International Federation of Agricultural Librarians and Documentalists.

## 本期广告索引

企业	版位	企业	版位
GE Healthcare 公司	封底	杭州博日科技有限公司	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	伯乐生命医学产品(上海)有限公司	内页
纽英伦生物技术(北京)有限公司	封三	上海国强生化工程装备有限公司	内页
富士胶片(中国)投资有限公司	内页	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	赛默飞世尔科技有限公司	内页
生物谷网站	内页	汕头大学多学科研究中心招聘启事	内页