

斯氏副柔线虫 *SHR* 基因表达载体的构建及生物信息学分析

赵学亮¹ 王姝懿² 呼和巴特尔¹ 冯陈晨¹ 孙柯¹ 王文龙^{1*}

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院/农业农村部动物疾病临床诊疗技术重点实验室,呼和浩特 010018;

2. 内蒙古自治区综合疾病预防控制中心,呼和浩特 010031)

摘要 为探讨斯氏副柔线虫免疫相关 *SHR* 基因作为疫苗候选抗原及早期诊断抗原的可能性,提取斯氏副柔线虫的总 RNA,用 RT-PCR 技术扩增 *SHR* 基因,并将 PCR 产物克隆到 pMD19-T 载体,构建原核表达载体 pET-30a(+)-*SHR*,利用在线软件对该基因编码蛋白序列进行生物信息学分析。结果表明:克隆获得 *SHR* 基因全长 1 083 bp,编码 360 个氨基酸,理论等电点为 6.09,无信号肽和跨膜区;磷酸化预测含有 29 个磷酸化位点;结构分析发现, α -螺旋构成二级结构的主要成分,亲水性氨基酸比例超过 60%;抗原表位预测表明,*SHR* 蛋白是一种抗原性较高的亲水性蛋白。推测 *SHR* 有望用作斯氏副柔线虫的免疫诊断抗原和疫苗候选抗原。

关键词 原核表达载体; *SHR* 基因; 抗原表位; 生物信息学

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2019)00-0116-08

文献标志码 A

Bioinformatic analysis of *Parabronema skrjabini* *SHR* gene and construction of its prokaryotic expression vector

ZHAO Xueliang¹, WANG Shuyi², Huhebateer¹, FENG Chenchen¹, SUN Ke¹, WANG Wenlong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in

Animal Disease of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Inner Mongolia Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010031, China)

Abstract The possibility of *SHR* gene as a vaccine candidate antigen and early diagnostic antigen was preliminary discussed in this research. The total RNA was extracted from *Parabronema skrjabini* and *SHR* gene was cloned by RT-PCR. The PCR product was cloned into pMD19-T and a prokaryotic expression vector pET-30a(+)-*SHR* was then constructed. The protein structure and antigenic epitopes of *SHR* gene were analyzed by using online bioinformatics software. The results indicated that *SHR* gene was 1 083 bp in length, encoding 360 aminoacids and its theoretical pI is 6.09. Transmembrane structure and signal peptide analysis showed that the *SHR* protein contained a type of hydrophilic no transmembrane domains and signal peptide region and 29 phosphorylation sites. The secondary structure of *SHR* was mainly composed of alpha helix and the proportion of hydrophilic amino was over 60%. The antigenic epitopes prediction results indicated that *SHR* protein was a hydrophilic protein with high antigenicity. These results suggested that the *SHR* antigen has strong potential to be a candidate for immune diagnostics and used as a vaccine against *P. skrjabini*.

Keywords prokaryotic expression vector; *SHR* gene; antigenic epitopes; bioinformation analysis

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260603); 内蒙古自然科学基金项目(2016MS0341); 内蒙古自治区研究生科研创新资助项目(S20171012913)

第一作者: 赵学亮, 硕士研究生, E-mail: zhaoxueliang92@sina.com

王姝懿, 主管检验技师, 主要从事人兽共患病研究, E-mail: shuyi1986721@163.com

通讯作者: 王文龙, 副教授, 博士, 主要从事寄生虫组学与分子免疫学研究, E-mail: wwl.imau@163.com

双峰驼 (*Camelus bactrianus*) 属于脊索动物门 (Chordata)、骆驼科 (Camelidae)、骆驼属 (*Camelus*)，是分布在我国中西部地区主要的驼种。中国是世界上双峰驼的主要分布区域之一，其中 60% 以上在内蒙古自治区^[1]。双峰驼以其突出的抗旱、抗寒、抗灾能力开辟出一条东起长安、西至罗马的“丝绸之路”，为东西方文明的交流做出了巨大的贡献。另外，双峰驼具有极高的经济价值，可以生产出优质的绒、乳和肉等，是内蒙古自治区西部地区农牧民生产生活的依靠和脱贫致富的重要经济来源。但是，近年来，内蒙古自治区双峰驼主产地养驼业的发展呈现出逐年萎缩的态势，骆驼存栏数量急剧减少。有研究分析双峰驼存栏数量锐减的原因，除环境恶化、生产方式的改变以外，斯氏副柔线虫 (*Parabronema skrjabini*) 病的发生严重制约着养驼业的发展，威胁着双峰驼的健康^[2]。

斯氏副柔线虫属于旋尾目，副柔属^[3]，寄生在骆驼、牛和羊等反刍动物皱胃，偶见于小肠，其中骆驼是其最适宜的宿主^[4-5]。当骆驼大量感染斯氏副柔线虫时，可引起腹泻、贫血甚至死亡。据报道，我国部分牧区双峰驼斯氏副柔线虫感染率高达 80% 以上，有的地方甚至达到 100%，感染强度从几千条至上万条^[6]，严重威胁着骆驼的健康。由于绝大多数骆驼都分布在第三世界国家的落后地区，所以时至今日，国内外关于双峰驼斯氏副柔线虫病的研究报道较少。1924 年斯氏副柔线虫被发现，并对其命名和形态学描述^[3]，迄今为止，还没有建立一种快捷有效的鉴别诊断方法，只能通过宰杀解剖在皱胃中查找虫体。因此，开展骆驼斯氏副柔线虫分子生物学研究，寻找有效的生前诊断方法和制定新的防治措施对于解决斯氏副柔线虫对骆驼的危害具有十分重要的意义。

近年来，随着高通量测序的不断发展，生物信息学技术被广泛应用到动植物的研究中^[7-8]。本研究基于高通量测序转录组数据，参考已报道的线虫免疫学诊断抗原的特点，筛选出免疫相关基因 *SHR* (Steroid hormone receptor)^[9]。通过克隆斯氏副柔线虫 *SHR* 基因，构建原核表达载体 pET30a-SHR，并利用生物信息学方法对该基因进行系统的生物信息学分析，旨在为骆驼斯氏副柔线虫新药物靶点发掘、疫苗分子和诊断标志物的筛选提供一定理论依据，同时也为斯氏副柔线虫病生前诊断方法的探索提供方法和思路。

1 材料与方法

1.1 虫体和菌株

斯氏副柔线虫样本保存于内蒙古农业大学寄生虫实验室液氮中；*E. coli* DH5 α 、BL21(DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司；克隆载体 pMD19-T simple vector，购自大连宝生物工程有限公司，表达载体 pET-30a，由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus, Primer ScriptTM RT reagent Kit 为宝生物工程有限公司产品；质粒小提试剂盒，DNA 凝胶回收试剂盒为 AXYGEM 公司产品；DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司；NanoDROD 核酸浓度测定仪 (Thermo, 美国)；BDA 凝胶成像仪 (BioDocAnalyze, 美国)；Milli-Q Bloccel 超纯水系统仪 (Millipore, 美国) 等。

1.3 Total RNA 提取与反转录

斯氏副柔线虫总 RNA 提取按照 RNAiso Plus (Trizol 法) 说明书操作。将获得的 RNA 进行浓度和纯度检测后，利用反转录试剂盒合成 cDNA。

1.4 引物设计及目的基因扩增

根据筛选的免疫学诊断和免疫学防治的抗原候选基因 *SHR*，利用 Oligo6.24 和 Primer Primer5.0 软件设计引物，同时在引物序列中加入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I，引物由华大基因有限公司合成，预期扩增目的片段 1 083 bp。引物序列，上游引物：5'-CCGGAATTCATGAGCAGAGATGCG GTGAA-GT-3'；5'-CCGCTCGAGTCAGGATGATGGTGG TGAGAAG-3' (下划线为 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 扩增条件：95 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环；72 °C 延伸 10 min，4 °C 保存。将 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。用胶回收试剂盒回收纯化的 PCR 扩增产物，与 pMD19-T simple vector 连接，连接产物转化至大肠杆菌 *DH5 α* 中，PCR 及双酶切鉴定为阳性菌株后，送华大基因公司进行双向测序。将测序正确的菌株命名为 pMD19T-SHR。

1.5 pET30a-SHR 原核表达载体的构建

从测序正确的 pMD19T-SHR 菌株中提取质粒，将重组质粒与表达载体 pET30a(+) 分别用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后，以凝胶回收试

剂盒回收载体和目的片段,用 T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接构建 *SHR* 基因原核表达载体,转化大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞。在含有卡那霉素的固体 LB 培养基培养后,挑取单个菌落分别进行质粒双酶切和 PCR 鉴定,阳性菌株送华大基因公司进行双端测序。将测序正确的菌株命名 pET30a-SHR。

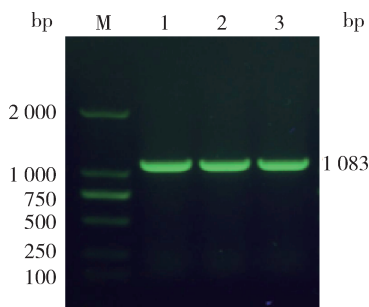
1.6 SHR 蛋白序列的生物信息学分析

使用 EditSeq 推导斯氏副柔线虫 *SHR* 基因的氨基酸序列,利用 ORF Finder 寻找开放式阅读框,利用 Prot-Param 在线软件预测分析 *SHR* 蛋白的氨基酸序列组成及理化性质;利用 ProtScale 进行 *SHR* 蛋白亲/疏水性预测分析^[10];利用 SignallP 4.1 Server^[11]和 TMHMM Server^[12]预测分析 *SHR* 蛋白的跨膜区及信号肽;利用 NetPhos3.1 Server^[13]预测磷酸化位点;利用 SOPMA^[14]在线软件预测该蛋白二级结构等。

2 结果与分析

2.1 SHR 基因 PCR 扩增结果

以斯氏副柔线虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示:成功扩增出 1 083 bp 特异性条带(图 1),与预期结果一致。



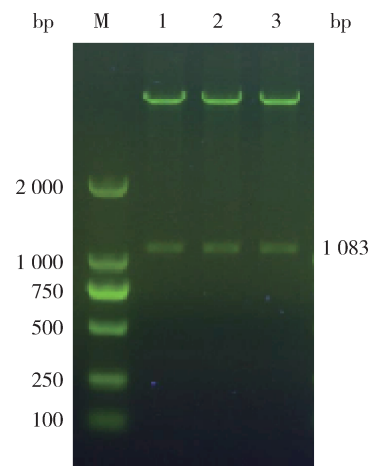
M, DL2000 DNA 分子量标准;1~3, *SHR* 基因扩增产物
M, DL2000 DNA Marker; 1~3, Products of *SHR* gene

图 1 *SHR* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of *SHR* gene

2.2 pET30a-SHR 原核表达载体的构建

对 PCR 鉴定为阳性的重组表达菌提取质粒经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切,在 1 083 和 5 422 bp 处各出现 1 条特异性条带(图 2),表明 *SHR* 基因已插入到表达载体 pET30a(+),成功构建了原核表达载体 pET30a(+)-SHR。



M, DL2000 DNA 分子量标准;1-3,重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切

M, DL2000 DNA Marker; 1-3, Recombinant plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I

图 2 重组表达质粒 pET30a(+)-SHR 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant expression plasmid pET30a(+)-SHR

2.3 SHR 基因的生物信息学分析

2.3.1 SHR 基因的理化性质分析

将斯氏副柔线虫 *SHR* 基因克隆载体和表达载体测序结果同转录组测序基因序列进行比较,结果表明 *SHR* 基因序列与转录组测序的序列完全一致。利用 NCBI 中的 ORF Finder 和 DNASTar 对 *SHR* 基因序列进行分析发现,SHR 含有一个完整的开放式阅读框,在 1 bp 有起始密码子 ATG,在 1 083 bp 存在终止密码子 TGA,共编码 360 个氨基酸。

根据在线软件 Prot-Param 分析表明,SHR 蛋白分子量约为 39.4 ku,理论等电点 pI 为 6.09,共包括 5 515 个原子,分子式为 $C_{1753}H_{2740}O_{482}N_{526}S_{14}$;在组成 SHR 蛋白的 20 种氨基酸中,丙氨酸(Ala)所占的比例最高为 14.2%,色氨酸(Trp)所占的比例最低为 0.6%,带正电荷数(精氨酸+赖氨酸)为 31 个,带负电荷数(天冬氨酸+谷氨酸)为 35 个;SHR 蛋白质总平均亲水指数为 -0.154,是亲水性蛋白质,不稳定指数为 53.49,属于不稳定蛋白质。

2.3.2 SHR 蛋白质亲/疏水性分析

亲水性氨基酸位于蛋白质的表面,连续在一起形成抗原表位,同时也是判断 B 细胞抗原表位的主要参数;疏水性氨基酸位于蛋白质三级结构和稳定等方面起着举足轻重的作用。应用 ProtScale 软件

分析 SHR 蛋白质的亲疏水性,SHR 蛋白质的疏水性在 14 位点有最小值 -2.956,在 211 位点有最大值 2.644(图 3)。根据氨基酸分值越高疏水性越强,

氨基酸分值越低亲水性越强的规律分析,表明 SHR 蛋白质是亲水性蛋白质,与 Port-Param 软件分析结果相一致。

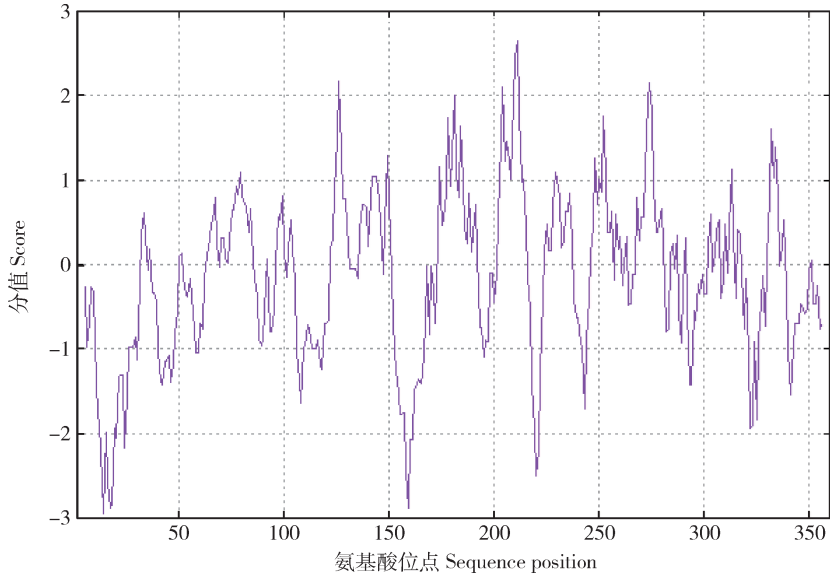


图 3 SHR 蛋白疏水性分析

Fig. 3 Analysis of hydrophobicity of SHR protein

2.3.3 SHR 蛋白质磷酸化位点预测

蛋白质磷酸化是翻译后修饰中最广泛的共价修饰形式,同时也是原核生物和真核生物中最重要、最复杂的调控修饰形式之一。细胞内参与磷酸化的氨基酸主要有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸,利

用在线软件 NetPhos3.1 server 对 SHR 蛋白质进行磷酸化位点预测,当潜在磷酸化位点阈值为 0.5 时,SHR 蛋白质存在 29 个潜在磷酸化位点,包括 17 个丝氨酸位点,6 个苏氨酸位点和 6 个酪氨酸位点(图 4)。

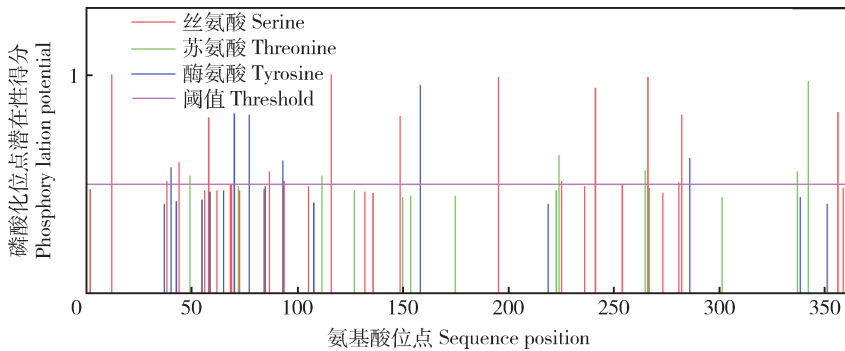


图 4 SHR 蛋白质磷酸化位点预测结果

Fig. 4 Prediction of SHR protein phosphorylation sites

2.3.4 SHR 蛋白质信号肽和跨膜区预测

信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链,在蛋白质翻译过程中或翻译后的定位发挥指导作用。利用 SignallP 4.1 Server 预测分析 SHR 蛋白质信号肽,并得到 3 种 C、Y、S 值计算结果,对于一个典型的信号肽,C 值和 Y 值趋向于

1,S 值在剪切位点之前高,而在剪切位点之后变低,C 值为 0.109,Y 值为 0.104,S 值为 0.114,SHR 蛋白质不含有信号肽序列(图 5)。利用 TMHMM Server 软件预测分析 SHR 蛋白质的跨膜区,结果显示,SHR 编码蛋白质不具有跨膜结构(图 6)。

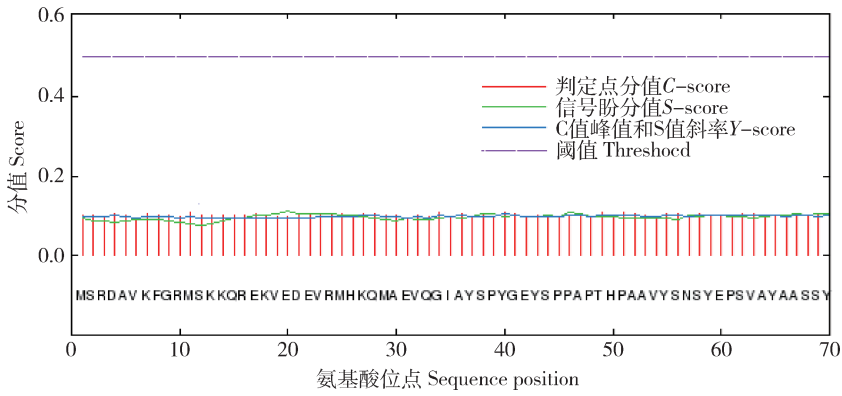


图5 SHR蛋白质信号肽预测结果

Fig. 5 Prediction of signal peptide sequence of SHR protein

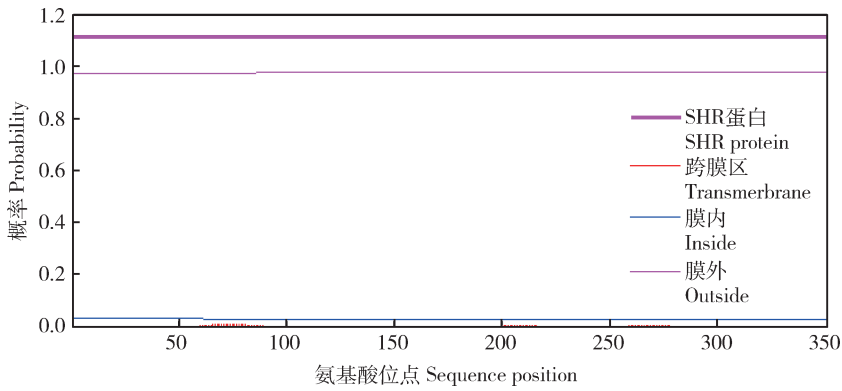


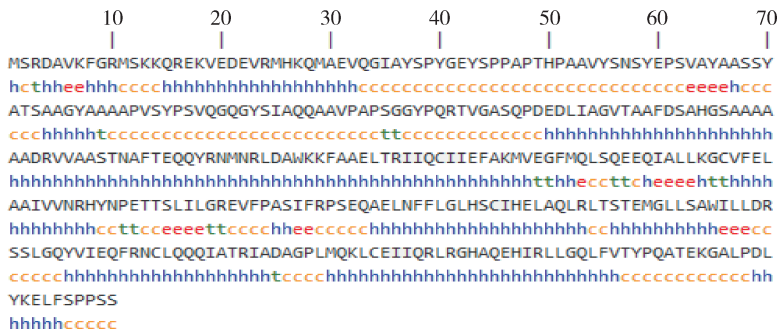
图6 SHR蛋白跨膜区预测结果

Fig. 6 Prediction of SHR protein transmembrane domain

2.3.5 SHR蛋白质二级结构预测

通过在线软件 SOPMA 对斯氏副柔线虫 SHR 基因编码蛋白质二级结构进行预测,结果显示 SHR 蛋白质中参与 α 螺旋形成的氨基酸为 225 个,占 62.50%;参与无规则卷曲形成的氨基

酸为 86 个,占 23.89%;参与 β 折叠形成的氨基酸为 24 个,占 6.67%;参与延伸链形成的氨基酸为 25 个,占 6.94%(图 7)。对 SHR 蛋白质二级结构的预测可为后续的免疫学研究提供必要的理论基础。



h, α -螺旋; e, 延伸链; t, β -转角; c, 自由卷曲

h, Alpha helix; e, Extended strand; t, Beta turn; c, Random coil

图7 SHR蛋白质二级结构预测

Fig. 7 Secondary structure prediction of SHR protein

2.3.6 SHR 蛋白抗原表位预测分析

利用 DNASTar 中 Prostein 预测分析 SHR 蛋白的亲水性、柔韧性、可能性及抗原性。斯氏副柔线虫 SHR 蛋白亲水性残基比例大于疏水性残基, 推测 SHR 蛋白整体表现为亲水性, 与 ProtScale 软件预测结果一致(图 8); SHR 蛋白柔韧性分布较均匀, 编码蛋白整体较稳定不易断裂, 柔韧性区域主要位于 9~21、39~49、103~121、339~352 等氨基酸残基及附近; 根据 Plot-Emini 方法预测表面可能性, 在 9~29、38~50、162~170、217~223、338~361 等氨基酸残基及附近; 根据 Jameson-Wolf 方法预测 SHR 蛋白的抗原性系数, 该蛋白含有较多潜

在的 B 细胞抗原表位, 主要位于 1~31、38~50、55~63、85~93、103~123、150~174、195~201、217~225、237~245、278~295、318~329、339~361 等氨基酸残基及附近, 提示 SHR 蛋白有较多的抗原表位区域, 且与亲水性、柔韧性和可能性区域出现较多的重叠, 有利于抗原抗体的自由结合, 综合分析该蛋白抗原表位, 在 1~31、38~50、103~123、150~174、217~225、237~245 位氨基酸残基区域亲水性、柔韧性和表面可行性指数较高(图 8), 且含有较多 β 转角和不规则卷曲结构, 这些区域可能是抗原位点的富集区, 推测作为 B 细胞抗原表位的可能性较好。

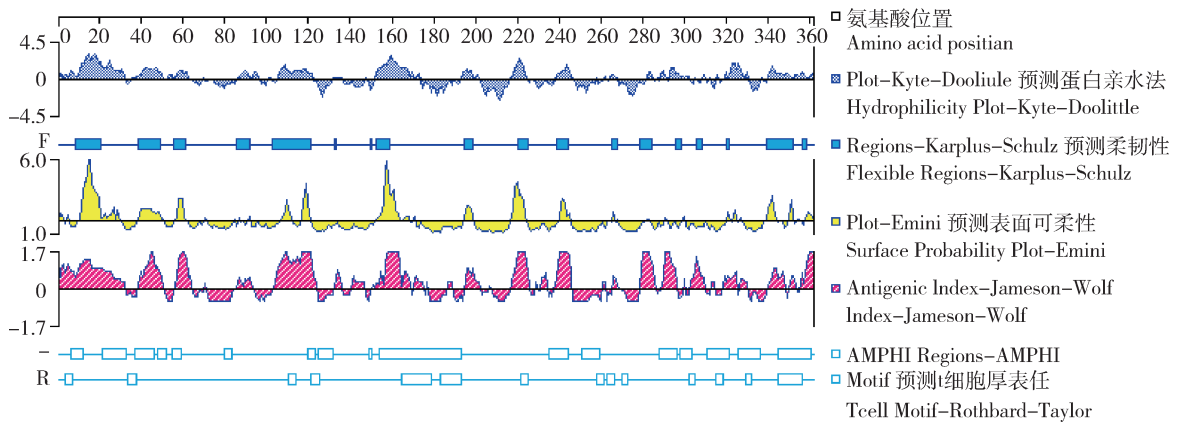


图 8 SHR 蛋白亲水性、柔韧性、可能性及抗原性预测

Fig. 8 Prediction of hydrophilicity, flexibility and antigenicity of SHR protein

3 讨论

斯氏副柔线虫的感染不仅导致骆驼消瘦、贫血, 同时造成皱胃消化不良, 异常代谢产物增多, 进而破坏皱胃黏膜完整性, 导致皱胃发生一系列的病理学变化。当大量虫体寄生时, 可导致骆驼死亡, 严重威胁骆驼的健康。目前, 多数研究都集中在斯氏副柔线虫的流行病学调查、传播媒介和形态学的问题上^[15]。虽然该病的研究取得了一定的进展, 但是由于骆驼地域分布的特殊性, 至今还没有建立一种快捷有效的鉴别诊断方法, 亦没有有效的疫苗用于该病的防治, 因此研制预防斯氏副柔线虫的疫苗是今后防治的重点研究方向之一。为此, 本试验通过扩增 *SHR* 基因的编码区序列, 构建原核表达载体 pET-30a(+)-SHR, 利用生物信息学技术对 SHR 蛋白进行系统的生物信息学预测, 为更好筛选和探索斯氏副柔线虫新型疫苗、药物靶标和诊断抗原奠

定基础。

随着大数据时代的到来, 各种测序分析的相关研究琳琅满目, 寄生虫转录组学测序与分析方兴未艾, 促进了寄生虫领域的快速发展^[16]。生物信息学技术已广泛应用于揭示遗传信息^[17-18]及抗原表位的筛选^[19-20], Song 等^[21]通过对日本血吸虫 AQP-3 蛋白的生物信息学学预测分析, 揭示了 SJAQP-3 是日本血吸虫表皮的完整膜蛋白, 有 6 个潜在的表位, 它可能是疫苗开发的潜在分子靶点。Zhou 等^[22]利用生物信息学方法预测弓形虫 ROP48 蛋白的理化性质及抗原表位, 结果表明该蛋白是一种潜在的抗弓形虫并的候选 DNA 疫苗。Cui 等^[23]通过生物信息学方法对旋毛虫 AQP 基因进行表位预测评估, 表明该蛋白含有 6 个潜在的 B 细胞抗原表位和 4 个潜在的 T 细胞抗原表位, 推测 *TsAQP* 可能是抗旋毛虫的抗原候选基因。目前, 基于斯氏副柔线虫疫苗候选抗原及免疫诊断抗原生物信息学分析的研究鲜

有报道^[24]。

本试验首次采用 RT-PCR、基因克隆获得了斯氏副柔线虫免疫相关基因 SHR 的 CDS 核苷酸序列,构建原核表达载体,并利用生物信息学方法对该基因进行系统的预测和分析,为揭示 SHR 基因的抗原性提供了有价值的理论依据。序列分析结果表明:SHR 蛋白具有完整的 ORF,编码 360 个氨基酸,分子质量为 39.4 ku,理论等电点 pI 为 6.09,分子式为 $C_{1753}H_{2740}O_{482}N_{526}S_{14}$;是一种不稳定的亲水性蛋白,亲水性蛋白有利于蛋白的高效表达,利于抗原抗体的嵌合。磷酸化位点预测结果表明,SHR 蛋白存在 29 个潜在磷酸化位点,包括 17 个丝氨酸位点,6 个苏氨酸位点和 6 个酪氨酸位点,推测 SHR 蛋白在翻译后可能受到磷酸化修饰的调控。利用 SignallP 4.1 Server 和 TMHMM Server 预测分析 SHR 蛋白信号肽和跨膜区发现,SHR 蛋白不具有信号肽和跨膜区,推测该蛋白是膜外蛋白且在细胞合成后直接发挥生物学作用。二级结构富含 α -螺旋、无规卷曲,提示其很可能为重要的编码斯氏副柔线虫信息传递分子的基因。抗原表位预测表明,SHR 蛋白含有较多的 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位,具有较好的抗原性,符合斯氏副柔线虫疫苗候选抗原及早期诊断抗原候选基因的特点。推测 SHR 有望用作斯氏副柔线虫的免疫诊断抗原和疫苗候选抗原,本研究为进一步探索斯氏副柔线虫早期鉴别诊断方法和 DNA 疫苗的研制提供理论基础。

4 结 论

成功扩增斯氏副柔线虫免疫相关基因 SHR 的 CDS 区,并构建原核表达载体 pET30a-SHR,其 cDNA 序列全长共 1 083 bp,编码 360 个氨基酸,推导 SHR 蛋白分子质量约为 39.4 ku,理论等电点 pI 为 6.09。结构分析发现, α 螺旋构成二级结构的主要组分,亲水性氨基酸超过 60%;抗原性预测分析表明,SHR 是一种抗原性较高的亲水性蛋白。推测 SHR 有望用作斯氏副柔线虫的疫苗候选抗原和免疫学诊断抗原。

参考文献 References

[1] 萨仁图娅,斯仁达来,付龙霞,刘强德,吉日本图. 中国双峰驼种质资源保护调查研究[J]. 中国草食动物科学,2015,35(6):

62-65

Sa R T Y, Si R D L, Fu L X, Liu Q D, Ji R M T. Investigation on the protection of bactrian camel germplasm resources in China[J]. *China Herbivore Science*, 2015, 35(6): 62-65 (in Chinese)

- [2] 赵治国,杨晓野,杨莲茹,王瑞,王海艳,赵林立,敖威华,郭铁箴. 内蒙古双峰驼斯氏副柔线虫病的流行病学调查[J]. 中国兽医科学,2012,42(12):1309-1314
Zhao Z G, Yang X Y, Yang L R, Wang R, Wang H Y, Zhao L L, Ao W H, Guo T Z. Epidemiological investigation of *Camelus bactrianus* parabronchitis in Inner Mongolia[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(12): 1309-1314 (in Chinese)
- [3] Mehlhor H. *Encyclopedic Reference of Parasitology*[M]. 2nd ed. Berlin: Springer, 2001: 637-678
- [4] Seyed S H. Molecular characterization of the first internal transcribed spacer of rDNA of *Parabronema skrjabini* for the first time in sheep[J]. *Annals of Parasitology*, 2015, 61(4): 241-246
- [5] Hasheminasab S S, Jalousian F, Meshgi B. Molecular and morphological characterization of *Parabronema skrjabini* of sheep and goats at three different geographical zones in Iran[J]. *Annals of Parasitology*, 2016, 62(1): 55-61
- [6] 杨莲茹,杨晓野,刘珍莲,张连生,张文彬. 内蒙古地区骆驼斯氏副柔线虫病调查[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2004, 25(1): 43-45
Yang L R, Yang X Y, Liu Z L, Zhang L S, Zhang W B. Investigation of *Parabronema skrjabini* of camels in Inner Mongolia Region[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2004, 25(1): 43-45 (in Chinese)
- [7] Alolea P J, Alonso A, Baugh L, Paisie C, Ramasamy G, Sekar A, Sur A, Jiménez M, Molina R, Larraga V, Myler P J. RNA-seq analysis reveals differences in transcript abundance between cultured and sand fly-derived *Leishmania infantum* promastigotes[J]. *Parasitology International*, 2018, 67(4): 476-480
- [8] Zhu C H, Li X F, Zheng J Y. Transcriptome profiling using Illumina- and SMRT-based RNA-seq of hot pepper for in-depth understanding of genes involved in CMV infection[J]. *Gene*, 2018, 666: 123-133.
- [9] 冯陈晨. 斯氏副柔线虫转录组学和蛋白质组学研究及免疫相关基因鉴定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017
Feng C C. Transcriptomic and proteomic analysis of *Parabronema skrjabini* and identification of immune-related genes[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agriculture University, 2017 (in Chinese)
- [10] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J C, Williams K L, Appel R D. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1999, 112: 531-552
- [11] Petersen T N, Brunak S, Heijne G V, Nielsen H. SignalP 4.1: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J].

- Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786
- [12] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294(5): 1351-1362
- [13] Moller S, Croning M D, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(7): 646-653
- [14] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1995, 11(6): 681-684
- [15] 杨波. 角蝇生活习性及其斯氏副柔线虫感染情况的调查研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014
Yang B. Investigation of horn flies habits and their infection of *Parabronema skrjabini* [D]. Huhhot: Inner Mongolia Agriculture University, 2014 (in Chinese)
- [16] Blazie S M, Babb C, Wilky H, Rawls A, Jin G P, Mangone M. Comparative RNA-Seq analysis reveals pervasive tissue-specific alternative polyadenylation in *Caenorhabditis elegans* intestine and muscles [J]. *BMC Biology*, 2015, 13: 4
- [17] 孙雪婧, 杜晓华, 杨孝朴, 罗玉柱, 刘霞. 牦牛 *CYGB* 基因 CDS 区克隆与生物信息学分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2690-2698
Sun X J, Du X H, Yang X P, Luo Y Z, Liu X. Cloning and bioinformatics analysis on CDS of *CYGB* gene in yak [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2690-2698 (in Chinese)
- [18] 孙伟, 李达, 苏锐, 马月辉, 关伟军, 张有法, 陈玲, 吴文忠, 周洪. 绵羊 *YAP1* 基因全长 cDNA 克隆及生物信息学分析 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(8): 1725-1735
Sun W, Li D, Su R, Ma Y H, Guan W J, Zhang Y F, Chen L, Wu W Z, Zhou H. Cloning and bioinformatics analysis of full-length cDNA sequence of *YAP1* gene in sheep [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(8): 1725-1735 (in Chinese)
- [19] Li Y H, Liu X F, Zhu Y J, Zhou X T, Cao C B, Hu X A, Ma H M, Wen H, Ma X M, Ding J B. Bioinformatic prediction of epitopes in the Emy162 antigen of *Echinococcus multilocularis* [J]. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 2013, 6(2): 335-340
- [20] Zhang T, Li H, Lan X, Zhang C, Yang Z, Cao W, Fen N, Liu Y, Yan Y, Ya S A, Ma X. The bioinformatics analyses reveal novel antigen epitopes in major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* [J]. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2017, 35(4): 522-528
- [21] Song J, He Q. Bioinformatics analysis of the structure and linear B-cell epitopes of aquaporin-3 from *Schistosoma japonicum* [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2012, 5(2): 107-109
- [22] Zhou J, Wang L, Zhou A, Lu G, Li Q H, Wang Z L, Zhu M Y, Zhou H Y, Cong H, He S Y. Bioinformatics analysis and expression of a novel protein ROP48 in *Toxoplasma gondii* [J]. *Acta Parasitologica*, 2016, 61(2): 319-328
- [23] Cui J M, Zhang N Z, Li W H, Yan H B, Fu B Q. Cloning, identification, and bioinformatics analysis of a putative aquaporin TsAQP from *Trichinella spiralis* [J]. *Genetics & Molecular Research: GMR*, 2015, 14(4): 12699-12709
- [24] 王文龙, 赵学亮, 孙柯, 冯陈晨, 王姝懿, 王梦雅, 刘春霞. 斯氏副柔线虫 *CAMK/TSSK* 蛋白激酶基因的克隆及其蛋白质结构与抗原表位预测分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(3): 644-651
Wang W L, Zhao X L, Sun K, Feng C C, Wang S Y, Wang M Y, Liu C X. Cloning, Protein structure analysis and antigenic epitopes prediction of immune-related gene, *CAMK/TSSK* protein kinase gene of *Parabronema skrjabini* [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2018, 49(3): 644-651 (in Chinese)

责任编辑: 王燕华