

噬菌体展示日本血吸虫 SSj14 单抗的模拟抗原表位及其免疫保护性研究 Studies on Phage Displayed Mimotopes of a Protective Monoclonal Antibody (SSj14) Against *Schistosoma japonicum*

王欣之^{1,2}, 傅志强^{1*}, 黄劭鹏¹, 朱国强², 蔡幼民¹, 林矫矫¹

WANG Xin-Zhi^{1,2}, FU Zhi-Qiang^{1*}, HUANG Shao-Peng¹, ZHU Guo-Qiang², CAI You-Min¹ and LIN Jiao-Jiao¹

1 中国农业科学院上海家畜寄生虫病研究所农业部动物寄生虫学重点开放实验室 上海动物生物技术研究中心, 上海 200232

2 扬州大学兽医学院, 扬州 225009

1 Shanghai Institute of Animal Parasitology, Key Laboratory of Animal Parasitology, Ministry of Agriculture, CAAS, Shanghai Research Center for Animal Biotechnology, Shanghai 200232, China

2 Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

摘 要 为获得日本血吸虫保护性单抗 SSj14 的模拟抗原表位, 研究其对日本血吸虫的免疫保护作用。用纯化的 SSj14 单抗筛选噬菌体随机 12 肽库, 对 33 个克隆进行 ELISA 验证, 获得 30 个阳性克隆, DNA 序列分析表明这 30 个克隆分属 11 个多肽序列, 分析比较发现这些多肽具有“H-N/Q-X-S-P/F-X-X-L-A-T”的相似基序。进而选取 3 个阳性单克隆及混合阳性噬菌体克隆进行 Western-blotting 实验, 证明都有良好的抗原性。用它们免疫 BALB/c 鼠, 并攻击血吸虫尾蚴, 观察免疫鼠抗血吸虫感染的保护效果和 IL-12 的变化, 结果表明: 筛选获得的噬菌体阳性克隆具有良好的免疫原性, 能诱导免疫鼠产生高滴度的抗血吸虫的特异性抗体; 和对照组鼠相比, 免疫小鼠, 分别获得 13.84% ~ 52.83% 的减虫率, 34.17% ~ 65.47% 的肝脏减卵率以及 28.89% ~ 73.78% 的粪便减卵率; 三次免疫之后, 和对照组相比, 免疫小鼠体内 IL-12 水平均有升高。为发展日本血吸虫疫苗提供了新思路、新途径。

关键词 日本血吸虫, 噬菌体展示, SSj14 单抗, 模拟抗原, 白细胞介素 12

中图分类号 R392 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0119-06

Abstract To obtain peptides mimicking epitope of a protective McAb SSj14 specific to *Schistosoma japonicum* and investigate their immuno-protection effects. A phage random 12 peptide library was screened using purified McAb SSj14, 33 clones were picked up for specificity identification by ELISA. The epitope of each positive clones were detected by the sequencing analysis technique. The antigenicity of three positive clones (P1, P2 and P11) and their mixture cock-tail were further confirmed by Western-blotting, and their protective efficiency were evaluated by mice vaccination experiment. IL-12 level between the vaccinated mice and control mice were compared. 30 positive phage clones were obtained, which represented 11 different

Received: July 25, 2005; Accepted: August 31, 2005.

This work was supported by the grants from the Youth Natural Sciences Foundation of China (No.30100138), Shanghai Important Science and Technology Key Program of China (No.03DZ19231), Shanghai Program for Phosphor Plan of China (No.04QMX1462) and National Natural Science Foundation of China (No. 30270311).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54082675; E-mail: fuzhiqiang@smmail.cn

国家青年自然科学基金(No.30100138)、上海市重大科技攻关项目(No.03DZ19231)、上海市启明星计划(No.04QMX1462)、国家自然科学基金(No. 30270311)资助。

epitopes respectively, there were a similar sequence "H-N/Q-X-S-P/F-X-X-L-A-T" among all of the epitopes. Western-blotting showed that all of the three tested clones were recognized by McAb SSj14. Significant adult worm reduction (13.84% ~ 52.83%), liver tissue egg reduction (34.17% ~ 65.47%) as well as fecal egg reduction (28.89% ~ 73.78%) were observed in mice vaccinated with phages of P1, P2, P11 and mixture of three clones when compared with those of the blank control group, among them, the mice vaccinated with the mixture of phage clones got higher protection than any of the mice injected with only one kind of clone phages. At the same time, the IL-12 level in serum of vaccinated mice was found higher than those of the blank control one, this suggest that IL-12 may correlate with the protective efficiency induced by the clone phages. The study provides a new way for developing an effective vaccine against *S. japonicum*.

Key words *Schistosoma japonicum*, phage display, McAb SSj14, mimicking epitope, IL-12

血吸虫病是我国危害最严重的人畜共患寄生虫病之一。全世界有 76 个国家和地区流行血吸虫病,被感染的人口达 2 亿,受威胁人群约 5 ~ 6 亿,严重影响着人类的健康和社会经济的发展^[1]。尽管吡喹酮等化学药物对血吸虫病防治发挥了重要作用,但药物不能阻止重复感染,并存在药物副反应等问题,而牛、羊作为日本血吸虫重要的保虫宿主,其重复感染又不断成为新的传染源,因此抗日本血吸虫病疫苗,特别是家畜用抗日本血吸虫病疫苗的研发显得尤为重要。

日本血吸虫特异性单克隆抗体 SSj14 为本实验室研制,该单抗在 BALB/c 小鼠和昆明系小鼠被动转移试验中诱导了 38.4% ($P < 0.02$) 和 68.59% ($P < 0.001$) 的减虫率的良好免疫效果^[2]。进一步应用该单抗免疫 BALB/c 小鼠,制备了十株针对该单抗的抗独特型抗体,在小鼠免疫试验中也获得了较高的减虫率 [44.67% ($P < 0.05$) ~ 47.28% ($P < 0.01$)]^[3],说明该单抗识别的功能抗原表位或模拟抗原表位在小鼠抗血吸虫病中可诱导较高的免疫保护作用。为此,本研究利用噬菌体随机展示 12 肽库筛选日本血吸虫保护性单抗 SSj14 的模拟表位,并对其诱导小鼠抗日本血吸虫的免疫保护效果及作用机理进行研究,为发展血吸虫疫苗开拓新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

4 ~ 6 周龄的雄性 BALB/c 小鼠购自复旦大学医学院试验动物部。日本血吸虫中国大陆株感染的阳性钉螺购自中国疾病预防控制中心寄生虫病控制所,尾蚴从阳性钉螺释放收集。以丝状噬菌体 M13 为载体,构建的随机 12 肽库 (Ph. D-12.TM Phage Display Peptide Library) 购自 New England Biolabs 公司,肽库滴度为 1.5×10^{13} pfu/mL, 随机多样性为 2.7×10^9 , 受体菌为 *E. coli* ER2738 (tet 抗性); 生物素

标记试剂盒 (Biotin Labeling Kit) 购自 Roche 公司,链霉亲和素 (streptavidin, SA) 购自 Promega 公司; 白细胞介素 IL-12 检测试剂盒购自 Biosource 公司。

1.2 方法

1.2.1 SSj14 单抗和日本血吸虫可溶性虫卵抗原 (SEA) 的制备: SSj14 单抗和 SEA 本室自行制备。用饱和硫酸铵沉淀法纯化 SSj14 单抗小鼠腹水,紫外分光光度法测蛋白浓度,并测单抗效价。纯化的单抗按照生物素标记试剂盒说明书进行生物素标记。

1.2.2 噬菌体的扩增和滴度测定: 参照文献 [4] 进行,按 pfu/mL 来计算噬菌体滴度。

1.2.3 亲和筛选: 参照文献 [4] 进行。以链霉亲和素包被聚苯乙烯平皿,进行了三轮筛选。筛选后的噬菌体回收率 = (洗脱的噬菌体克隆数 ÷ 洗脱前噬菌体克隆数) × 100%

1.2.4 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆: 随机挑取 33 个三轮筛选得到的单个噬菌体克隆,按步骤 1.2.3 进行扩增和滴度测定。100 μ L/孔噬菌体 (约含 10^{12} pfu) 包被 ELISA 板,以 1:1000 稀释 SSj14 单抗及 1:5000 稀释兔抗鼠酶标二抗进行反应,四甲基联苯胺 (TMB) 显色后,测定 OD_{450} 值。用 BSA 作阴性对照,SEA 为阳性对照,测试样品 OD 值与阴性对照 OD 值的比值 ≥ 2.1 判定为阳性。

1.2.5 噬菌体插入肽段的 DNA 测序: 取 500 μ L 单个阳性噬菌体克隆培养上清,加入 200 μ L PEG/NaCl 沉淀 10min 后离心,弃上清加入 100 μ L 碘化物缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 4 mol/L NaI) 和 250 μ L 无水乙醇洗涤,室温 10min,离心弃上清,70% 乙醇洗涤数次,30 μ L TE 溶解沉淀,由上海博亚生物技术公司测序。

1.2.6 Western-blotting 验证: 将阳性噬菌体克隆进行 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白电转移到 NC 膜上,BSA 封闭后,以 1:400 稀释 SSj14 单抗及 1:500 稀释兔抗鼠酶标二抗反应, DAB 显色后,观察结果。

1.2.7 小鼠日本血吸虫病免疫保护试验:4~6 周龄的雄性 BALB/c 小鼠随机分为 6 组,每组 10 只。试验组免疫原依次为 P1、P2、P11 噬菌体克隆和阳性混合噬菌体克隆, FCA 为佐剂,按 0.15mL(含有 10¹¹ pfu)/鼠,每两周皮下免疫 1 次,共免疫 3 次^[5]。对照组分别注射等剂量的原始肽库和 TBS。第 3 次免疫后 2 周每鼠经腹部贴片感染 40 条日本血吸虫尾蚴,感染后 6 周门静脉灌注冲虫,计数虫荷及肝卵数和粪卵数,试验结果用 *t* 检验进行差异显著性分析。

1.2.8 血清抗 SEA 抗体测定:末次免疫 2 周之后,用常规 ELISA 法检测各组中抗 SEA 的抗体滴度。以 5μg/孔 SEA 包被 ELISA 板,常规方法检测各组免疫组中抗 SEA 的抗体滴度。

1.2.9 小鼠血清中 IL-12 含量测定:本研究分别在小鼠每轮免疫后 2 周及攻击感染后 2 周、4 周、6 周眼眶窦采血,分离血清,-20℃保存备用。试验时取 20μL 血清按 Biosource 公司 IL-12 检测试剂盒说明书检测血清中 IL-12 的浓度。

2 结果

2.1 单抗的生物素标记及抗体效价测定

用饱和硫酸铵法对 SSj14 单抗进行抗体纯化后,SDS-PAGE 电泳在 78kD 处可 SSj14 单抗的条带以及 22.5kD 和 65kD 处可见单抗裂解产物条带。经透析后测定单抗浓度为 1.72mg/mL。进行生物素标记后,用 SEA 包被酶标板测得纯化后的抗体滴度高于 1:2¹⁴,说明纯化后的单抗中存在高效价抗血吸虫抗原的抗体,可以保证肽库筛选效率。生物素标记后的单抗的浓度为 0.5mg/mL。

2.2 亲和筛选和产物富集

用上述 SSj14 单抗与噬菌体随机展示 12 肽库进行亲和筛选,经三轮筛选后,收集相结合的噬菌体,噬菌体由第一轮的 7.6 × 10⁶ pfu/mL 增加到第三轮的 3.1 × 10⁸ pfu/mL,富集了 250 倍。各轮富集效果见表 1。

2.3 噬菌体阳性克隆的鉴定

随机挑取第三轮筛选铺板后的 33 个克隆,分别

感染 *E. coli* ER2738,扩增噬菌体,ELISA 检测噬菌体克隆和 SSj14 单抗结合的能力,BSA 为阴性对照,SEA 为阳性对照,结果显示,所挑选的 33 个克隆中,30 个与 SSj14 单抗反应呈阳性,测试样品 OD 值与阴性对照 OD 值的比值 ≥ 2.1 判定为阳性,阳性率达到 90%。说明获得的噬菌体克隆可为单抗可特异性识别,具有相应的模拟表位。

2.4 模拟抗原表位的多肽序列分析

经 ELISA 鉴定的 30 个阳性噬菌体克隆通过 DNA 测序,获得 ssj14 单抗模拟抗原表位的 11 个多肽序列,记为 P1~P11。其中 P1 出现频率 9 次,P2 出现 8 次,P3 出现 3 次,P4 和 P5 各出现 2 次,其余各一次。氨基酸 H、N/Q、S、L、P/F、L、A、T 在大多数序列中的一定位置出现。脯氨酸(P)和苯丙氨酸(F)均为疏水性氨基酸,分子结构极为相似,天冬氨酸(N)和谷氨酰胺(Q)分子结构也极为相似,对比发现具有“H-N/Q-X-S-P/F-X-X-L-A-T”的相似基序。分析结果见图 1。

No.	Sequence												Rate
P1	H	N	N	S	P	F	L	K	L	A	T	F	9/30
P2	H	Q	L	S	P	F	I	S	L	A	T	H	8/30
P3	H	N	R	S	P	S	I	K	L	V	T	H	3/30
P4	R	Q	Y	S	F	F	D	S	L	S	T	S	2/30
P5	M	H	R	N	P	S	F	M	G	L	L	E	2/30
P6	T	Y	L	S	F	T	S	K	L	A	T	D	1/30
P7	S	N	I	S	P	T	S	M	L	I	T	V	1/30
P8	W	V	E	N	R	S	P	E	R	V	L	A	1/30
P9	H	Q	T	S	P	H	I	W	L	A	T	V	1/30
P10	R	H	Q	H	Y	P	H	M	K	D	L	T	1/30
P11	H	H	Q	H	S	P	F	W	R	D	A	T	1/30

图 1 阳性噬菌体的序列和表达分析

Fig. 1 Analysis of the sequence and mimotope of peptides from tested phage clones

2.5 Western blotting 验证

根据测序结果,选取代表性的 P1、P2、P11 菌体克隆和三轮筛选得到的混合噬菌体克隆与 SSj14 单抗作用进行验证,原始肽库为阴性对照,结果如图 2 所示,进一步证明了阳性噬菌体克隆对单抗的识别。

2.6 三次免疫后日本血吸虫特异性抗体滴度测定

用阳性噬菌体克隆 3 次免疫 BALB/c 小鼠后,攻击感染前一天采血,ELISA 检测各组免疫血清与虫卵可溶性抗原 SEA 的反应性。如图 3 所示,各免疫组小鼠均诱导产生了高滴度的抗体,效价达到 1:6400。

2.7 动物保护试验

用噬菌体克隆免疫 BALB/c 小鼠,在第三次免

表 1 噬菌体各轮富集效果

Table 1 Recovery rate of phage clones during biopanning(%)

Rounds of biopanning	Phages added / (pfu/mL)	Phages eluted / (pfu/mL)	Recovery/%
1	2 × 10 ¹¹	7.6 × 10 ⁶	3.8 × 10 ⁻⁵
2	2 × 10 ¹¹	5.5 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁻⁴
3	2 × 10 ¹¹	3.1 × 10 ⁸	1.5 × 10 ⁻³

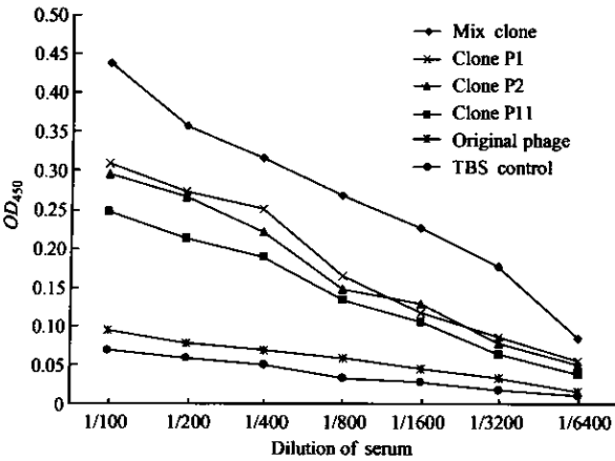


图2 噬菌体免疫印迹分析
Fig. 2 Western-blotting analysis

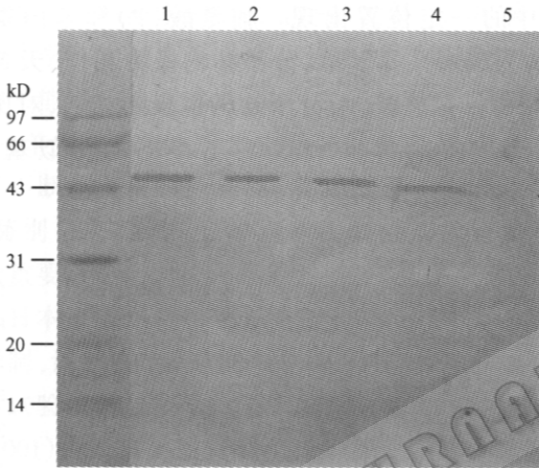


图3 噬菌体三次免疫小鼠后SEA的特异性抗体滴度
Fig. 3 The titer of antibodies specific to SEA in the sera of mice after three times immunization with phage clones

1: mixed clones of 3 round of biopanning; 2: p1 phage clone; 3: P2 phage clone; 4: p11 phage clone; 5: original phage library control.

疫后2周以每鼠 40 ± 1 条尾蚴进行攻击感染,6周后冲虫计数虫体并计算减虫率,同时取肝脏进行每克肝虫卵计数(LEPG)。留剖杀前一周小鼠粪便,计数每克粪便中虫卵数(EPG)。结果见表2所示。

2.8 小鼠血清中IL-12水平检测

分别在免疫前和阳性噬菌体克隆一免后2周,

二免后2周,三免后2周采血,检测小鼠体内IL-12的变化。免疫前各组BALB/c小鼠血清中IL-12的量无统计学差别,第三次免疫后,P11,P1,P2免疫组小鼠血清中IL-12量增加,平均分别为20.43pg/mL,25.75 pg/mL,22.02 pg/mL,而对照组小鼠IL-12水平变化不大,试验组明显高于对照组小鼠($P < 0.05$),混合免疫组小鼠平均IL-12量达30.34pg/mL,更显著高于对照组小鼠(P 均 < 0.01),见表3。

表3 BALB/c小鼠血清IL-12含量在免疫前后的比较
Table 3 Comparison of IL-12 level in serum of BALB/c mice before and after immunization

Group	No. of mice	IL-12/(pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)	
		Pre-immunization	Post-immunization
P11 clone	10	15.47 \pm 1.14	20.43 \pm 1.81
P1 clone	10	14.82 \pm 0.98	25.75 \pm 2.97
P2 clone	10	13.48 \pm 0.83	22.02 \pm 2.14
Mix clones	10	13.17 \pm 1.69	30.34 \pm 4.19
Original library phage	10	14.34 \pm 1.76	18.44 \pm 2.68
TBS Control	10	12.98 \pm 2.13	15.36 \pm 1.88

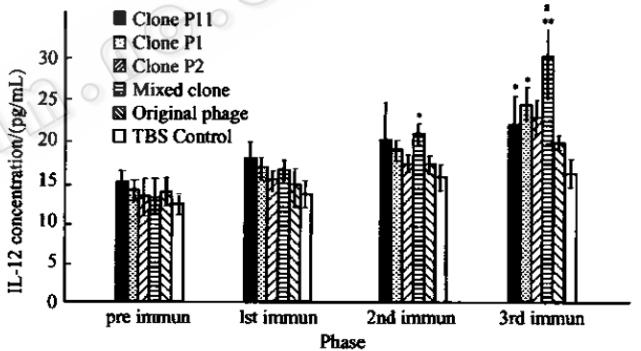


图4 小鼠血清IL-12水平的动态分析
Fig. 4 Comparison of IL-12 level in serum of tested mice

3 讨论

噬菌体展示技术是在20世纪90年代快速发展起来的一项技术,此技术被广泛用于蛋白功能和结构的鉴定^[7]、多种疾病的诊断^[8]和疫苗抗原表位^[9]的研究。利用噬菌体展示技术对特定的配基进行亲

表2 免疫小鼠的减虫、肝、粪减卵效果
Table 2 Reduction in worm burden and egg load in livers and fecal of vaccinated mice

Groups	No. of mice	Worm recovery (\pm SD)	Worm reduction rate/%	LEPG $\times 10^4$ (\pm SD)	Egg reduction Rate/%	EPG $\times 10^4$ (\pm SD)	Rate/%
P11 clone	10	16.44 \pm 6.3	13.84 [#]	1.83 \pm 0.263	34.17 [*]	1.6 \pm 0.159	28.89 [*]
P1 clone	10	14.75 \pm 5.8	22.69 [#]	1.43 \pm 0.127	48.56 [*]	1.24 \pm 0.264	44.89 [*]
P2 clone	10	14.6 \pm 4.29	23.48 [#]	1.47 \pm 0.249	47.23 [*]	1.12 \pm 0.341	51.32 [*]
Mix clone	10	9 \pm 5.27	52.83 [*]	0.96 \pm 0.128	65.47 ^{**}	0.59 \pm 0.182	73.78 ^{**}
Original library phage	10	18.22 \pm 6.16	----	2.65 \pm 0.325	----	2.13 \pm 0.244	----
TBS control	10	19.08 \pm 4.12	----	2.78 \pm 0.284	----	2.25 \pm 0.373	----

$P < 0.05$; * $P < 0.01$; ** $P < 0.001$

和筛选,可以将表达的相应外源蛋白或抗原决定簇的噬菌体筛选出来,所获得的噬菌体克隆具有良好的抗原性及免疫原性。在日本血吸虫病研究方面,噬菌体展示技术已应用于日本血吸虫尾蚴模拟抗原和人血吸虫病阳性血清针对的模拟抗原筛选,得到的短肽分子已证明能诱导一定程度的保护性免疫^[5,10]。本文利用该技术成功的筛选了日本血吸虫单克隆抗体的模拟抗原表位。

本研究采用单抗作为靶分子筛选噬菌体随机肽库,获得了 SSj14 单抗的模拟抗原表位的 11 个多肽序列。单克隆抗体是针对某抗原特定表位制备而成。本研究利用噬菌体展示技术所获得的模拟抗原表位的肽序列虽然不尽相同,但所得多肽序列都具有类似的特征,即都具有“H-N/Q-X-S-P/F-X-X-L-A-T”相似基序。这说明了本研究所获得的 SSj14 单抗的模拟抗原表位结果是可靠的。在 NCBI 上进行同源性搜索,结果发现 11 个序列均可搜索到同源性基因,大部分与多种生物体的蛋白激酶和蛋白的跨膜区域相关。其中 P1 与日本血吸虫 NCBI 上登陆的一段序列有同源性([*Schistosoma japonicum*] ACCESSION AAX24739),但该段基因序列的功能尚不清楚。

表位(epitope)是位于配体(ligand)表面上的决定簇,受体(receptor)与它进行特异接触。如果配体是蛋白,表位有时是连续的,由一级序列上邻近的几个关键氨基酸组成,但是更多的是不连续的构象型表位,针对 SSj14 单抗的抗原表位是否是构象型表位尚待进一步研究确认。

根据检测结果,我们选取代表性的噬菌体阳性克隆 P1、P2 及 P11 和三轮筛选得到的混合噬菌体克隆阳性克隆免疫 BALB/c 小鼠,结果显示免疫组均得到了良好的减虫率和减卵率,其中混合噬菌体免疫组减虫率高于单个噬菌体克隆,我们推测,可能由于混合噬菌体克隆可以更多覆盖靶位点^[11],从不同角度最大可能地模拟了单抗的抗原表位,而诱发了高效的免疫效应。本研究中,阳性混合噬菌体的减虫率高达 52.83%,令人注目,值得深入研究。

IL-12 主要作用于 Th0 细胞,促进 Th0 细胞向 Th1 型细胞分化。曾有研究表明,免疫应答向 Th1 型应答优势转化对于抗血吸虫病理作用有效,Th1 细胞免疫在诱导血吸虫免疫中发挥作用^[12,13]。为此本研究也分析了免疫小鼠后其体内血清中 IL-12 含量的变化,结果发现,三次免疫之后,阳性噬菌体克隆 P11、P1、P2 免疫组血清中 IL-12 浓度升高,分别为

20.43 pg/mL, 25.75 pg/mL, 22.02 pg/mL, 与 TBS 和原始肽库对照组比较有显著差异($P < 0.05$),混合噬菌体免疫组 IL-12 平均浓度达 30.34 pg/mL,更显著高于对照组($P < 0.01$),说明 IL-12 升高可能是 SSj14 单抗的抗原表位能诱导机体产生保护力的原因之一。

和单抗的被动免疫保护相比,模拟 SSj14 单抗的模拟抗原表位的噬菌体克隆可以刺激机体产生主动免疫,具有较好的免疫保护效果。同时噬菌体制备简单,工艺流程易于标准化,为疫苗的研制提供了一种新的途径。

本研究结果表明,我们用免疫筛选的方法从噬菌体随机 12 肽库中获得了 SSj14 单抗抗原表位的模拟短肽,这些短肽不仅有较好的抗原性,同时有较强的免疫原性,可以诱导小鼠产生较高的减虫率和减卵率,对发展血吸虫病疫苗具有重要意义。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Pan Handing, Huang Desheng, Wang Ketai. Approach to surveillance and consolidation during past 15 years after elimination of schistosomiasis in Shanghai. *Acta Tropica*, 2002, **82**(2): 301 - 303
- [2] Tian E(田镔), Ye P(叶萍), Lin JJ(林娇娇) et al. The establishment and characterization of the monoclonal anti-idiotypic antibody of *Schistosoma japonicum*. *Chin J Schisto Control*(中国血吸虫病防治), 1994, **6**(5): 269 - 273
- [3] Ye P(叶萍), Tian E(田镔), Lin JJ(林娇娇) et al. Preliminary studies on the synergistic effect of monoclonal antibody and drugs in killing adult worms of *Schistosoma japonicum*. *Chin J Schisto Control*(中国血吸虫病防治), 1994, **6**(6): 327 - 330
- [4] Smith GP, Scott JK. Libraries of peptides and proteins displays on filamentous phage. *Methods Enzymol*, 1993, **217**: 228 - 257
- [5] Shu XH(舒新华), Yi XY(易新元), Zeng XF(曾宪芳) et al. Immunoscreening of phage random peptide library with Sera from patients with *Schistosomiasis japonica*. *Cell Mol Immunol*(细胞和分子免疫学), 2000, **16**(2): 109 - 112
- [6] Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 1990, **249**: 386 - 390
- [7] Kotz JD, Bond CJ, Cochran AG. Phage-display as a tool for quantifying protein stability determinants. *Eur J Biochem*, 2004, **271**(9): 1609 - 1614
- [8] Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets*, 2004, **5**(1): 1 - 15
- [9] Naz RK. Human synthetic peptide vaccine for contraception targeting sperm. *Arch Androl*, 2004, **50**(2): 113 - 119
- [10] Yuan SS(袁仕善), Yi XY(易新元), Zeng XF(曾宪芳) et al. Protective immunity against *Schistosoma japonicum* induced by epitopes mimicking *Cercariae* antigens of *Schistosoma japonicum*. *China Tropical Medicine*(中国热带医学), 2002, **2**(3): 291 - 294

- [11] Burritt JB, Bond CW, Doss KW *et al.* Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal Biochem*, 1996, **238**(1):1 - 13
- [12] Hogg KG, Kumkate S, Anderson S *et al.* Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c + and F4/80 + cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun*, 2003, **71**(6):3563 - 3571
- [13] Hoffmann KF, Caspar P, Cheever AW *et al.* IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J Immunol*, 1998, **161**(8):4201 - 4210