

转染技术在顶复门原虫研究中的应用

闫文朝¹, 王天奇¹, 索 勋², 赵战勤¹, 韩利方¹

(¹河南科技大学动物科技学院, 河南洛阳 471003; ²中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 自 1993 年转染技术首次在弓形虫中成功报道以来, 顶复门原虫的转染研究得到了快速发展, 不仅在弓形虫、疟原虫和住肉孢子虫等实现了稳定转染, 而且在体外细胞上生长效率较低的柔嫩艾美耳球虫也相继实现了瞬时转染和稳定转染。顶复门原虫转染技术的日渐成熟及其在顶复门原虫研究中的应用, 为顶复门原虫基因功能和免疫学等领域研究提供了新思路 and 新的有力工具。本文结合本课题组近年来的研究成果, 综述了转染技术及其在顶复门原虫基因表达调控、基因功能、耐药性分子机理、药物敏感性试验和免疫学等研究中应用的最新进展。

关键词: 转染; 顶复门原虫; 基因功能; 活载体疫苗

Transfection Technology and Its Application in the Investigation of Apicomplexan Protozoa

YAN Wen-chao¹, WANG Tian-qi¹, SUO Xun², ZHAO Zhan-qin¹, HAN Li-fang¹

(¹College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, He'nan;

²College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: Since transient transfection of *Toxoplasma gondii* was first reported in 1993, stable transfections of apicomplexa such as *T. gondii*, *Plasmodium* species and *Sarcocystis neurona* have been achieved later, moreover, both the *in vitro* transient and *in vivo* stable transfection systems of *Eimeria tenella*, which do not undergo re-cycling of any life cycle stages, has been developed successfully. With the rapid development of transfection technology in Apicomplexan parasites, genetic manipulation provides a powerful tool for the study of the biochemical and cell biology of Apicomplexa. This paper has reviewed the latest progress of transfection technology and its application in gene regulation, the function of gene, the nature of drug resistance, drug sensitivity test and immunology of Apicomplexan parasites in combination with the related researches in authors' laboratory in past years.

Key words: transfection; apicomplexan protozoa; function of gene; live vaccine vector

1 引言

1993 年首次报道刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*, *T. gondii*) 和鸡疟原虫 (*Plasmodium gallinaceum*, *P. gallinaceum*) 的瞬时转染后^[1-2], 刚地弓形虫和疟原虫不同物种的稳定转染也成功实现^[3-4]。刚地弓形虫的转染效率高达 50%, 转染技术比较成熟, 非常容易实现外源基因在刚地弓形虫内的稳定表达^[5-7]。而在疟原虫中, 只有啮齿类疟原虫如伯氏疟原虫 (*Plasmodium berghei*, *P. berghei*) 的转染效率较高, 基因操作比较容易可行, 而其它疟原虫特别是恶性疟原虫

(*Plasmodium falciparum*, *P. falciparum*) 虽然实现了瞬时转染和稳定转染, 但由于在红细胞外期的裂殖子存活的生命周期较短, 多采用红细胞内裂殖生殖阶段进行转染, 而转染载体需要通过 4 层膜 (红细胞膜、带虫空泡膜、虫体细胞膜和虫体核膜) 屏障才能到达虫体的细胞核内, 因此转染效率极低, 仅为 10^{-6} , 严重制约着转染技术在疟原虫基因功能和细胞生物学特性研究中的应用^[8-10]。另外, 目前在顶复门原虫的其它种中, 脑住肉孢子虫 (*Sarcocystis neurona*, *S. neurona*)、柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*, *E. tenella*) 等也成功实现了稳定转染^[11-13], 犬新孢子虫 (*Neospora*

收稿日期: 2008-10-13; 接受日期: 2009-07-22

基金项目: 国家“863”计划专题课题项目 (2006AA02Z458)、河南科技大学博士科研启动基金 (09001350)

作者简介: 闫文朝 (1978—), 男, 河南浙川人, 博士, 研究方向为原虫分子遗传学与免疫学。E-mail: ywchao11@126.com。通信作者索 勋 (1963—), 男, 河北张家口人, 教授, 研究方向为寄生虫免疫学。E-mail: suoxun@cau.edu.cn

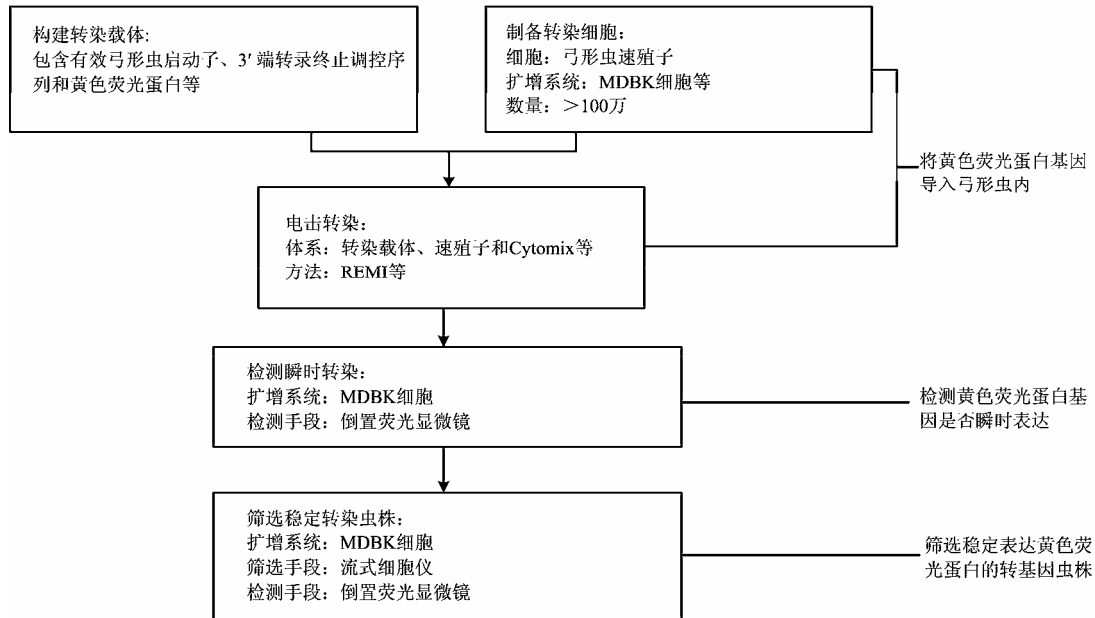
caninum, *N. caninum*)、环形泰勒虫(*Theileria annulata*, *T. annulata*)、牛巴贝斯虫(*Babesia bovis*, *B.*

bovis)和尼氏艾美耳球虫(*Eimeria nieschulzi*, *E. nieschulzi*)等也成功实现了瞬时转染^[14-18]。不同顶复门原虫转染取得突破和进展,使转染技术成为研究顶复门原虫入侵、致病性、宿主特异性、代谢等相关基因功能、研制新型疫苗(如活载体疫苗和DNA疫苗)和筛选新的药物靶基因等方面的有力工具。

2 转染技术

转染技术是将外源基因导入真核细胞内,并在细胞内表达的一种技术。转染技术通常可分为两大类,一类是瞬时转染,另一类是稳定转染。前者外

源基因不整合到宿主染色体内,宿主细胞内可存在多个拷贝,产生高水平表达,但持续时间短。瞬时转染多用环形质粒转染和报告分子(如黄色荧光蛋白)。后者外源基因既可整合到宿主染色体内,也可作为一种游离体(episome)存在。往往线性外源片段比环形质粒整合效率高,另外还需要选择性标记分子(主要包括药物筛选基因和荧光蛋白基因)和相应的筛选手段,才能实现稳定转染。转染技术是研究基因表达调控和基因功能等方面有力的工具。转染载体和转染方法是转染技术的两大核心部分,合理构建转染载体和选择合适的转染方法对转染研究的成功至关重要。重组刚地弓形虫表达黄色荧光蛋白的转染技术路线如下:



2.1 转染载体

用于疟原虫、弓形虫和其它原虫的一般转染载体是由顶复门原虫的启动子、3'端转录终止调控序列以及在二者之间的一个完整的开放阅读框组成^[3,11,19]。根据研究目标可以选择持续性表达的强启动子,也可以选择阶段特异性表达的启动子;对3'端转录终止调控序列要求不太严格,只要用于同一个虫种的转染,不同基因启动子可以共用一个3'端转录终止调控序列;插入的外源基因必须在启动子和3'端转录终止调控序列之间形成一个正确的开放阅读框,避免移码问题。将以上顶复门原虫转染载体必需元件通过分子生物学方法插入原核克隆载体如pUC19、pBluescript SK(+/-)中,形成原核生物和顶复门原虫之间的穿梭载体,这

种载体可以在大肠杆菌如DH5α内复制扩增,可以方便地构建、检测和扩增正确的顶复门原虫转染载体。插入的外源基因可以是报告分子(如黄色荧光蛋白)或药物抗性基因(如hDHFR-TS),在报告基因或药物抗性基因的5'或3'端可融合其它外源蛋白基因,通过用荧光显微镜、流式细胞仪检测转染体或进行药物筛选,方便地筛选出阳性的转染克隆。另外,可以在启动子的3'端融合信号肽序列,引导报告分子、外源蛋白或报告分子与外源蛋白的复合体分泌或打靶到虫体的不同部位^[20]。这种常规的转染载体转染虫体后得到的阳性克隆,往往是随机整合到宿主的染色体基因组内;而用环形质粒转染,则在药物压力下能以附加体形式在宿主细胞内进行复制、转录和表达^[21]。

为了实现转染载体在原虫基因组内定点整合，达到特定基因突变或替换目标，需要在上述常规转染载体启动子和 3'端转录终止调控序列两侧插入与虫体目标基因序列相同的 DNA 片段，长度为 600~3 000 bp，转染后使转染载体与虫体基因组序列通过单交换或双交换进行同源重组，整合到原虫基因组的特定区域。据文献报道，线性载体比环形载体的同源重组效率高。相对于随机整合的转染载体，同源重组载体的转染效率较低，但为了进行特异位点的整合，使用同源重组载体仍不失为一种好方法^[22]。另外，利用转座系统如 *piggyBac* 也可以实现转染载体在宿主细胞基因组中的定点整合，并且转染效率较高^[23]。

对单表达框载体来说，如果在启动子后面插入多个基因，可能会导致开放阅读框太大，影响外源蛋白表达；或者由于多个蛋白距离较近，在空间折叠等方面相互干扰，影响蛋白的活性或功能。为了克服以上缺点，可以把多个外源基因分配到同一载体的 2 个表达框内。在疟原虫和住肉孢子虫研究中就有成功的设计。在脑住肉孢子虫转染研究中，2 个表达框分别载有黄色荧光蛋白和弓形虫的乙胺嘧啶抗性基因，成功获得了稳定转染^[11]。这种载体特别适于稳定转染，一个表达框表达报告基因或药物筛选基因，另一个表达框表达外源蛋白，通过流式细胞仪或药物筛选，可以很快拿到稳定转染虫系。

2.2 转染方法

目前转染方法很多，主要有电穿孔转染、脂质体转染、磷酸钙转染、病毒介导的转染、显微注射、基因枪等方法^[15,19,24]。电穿孔转染和脂质体转染适用于所有细胞，转染效率高，但前者需要 DNA 和细胞数量较大，后者转染时需去除血清且转染效率随细胞类型变化大。病毒介导的转染以逆转录病毒和腺病毒为主，可用于难转染的细胞、原代细胞，体内细胞等，但携带基因大小受限，且存在安全问题。显微注射多用于工程改造或转染动物的胚胎细胞，但转染细胞数量和大小受限制，而且转染效率较低。基因枪目前多用于 DNA 疫苗的动物接种，在体外细胞转染方面稳定性差，且对细胞损伤较大。磷酸钙转染操作简单，但重复性差，不适用于原代细胞。在顶复门原虫转染研究中应用最多，转染效率最高的还是电穿孔转染。最近报道，基于电穿孔转染的 AMAXA nucleofector® 转染系统能大大提高不同类型细胞和疟原虫等转染效率^[25]。目前电转仪器主要有 2 种型号：Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad, Hercules,

California) 和 BTX ECM 630 electroporator (Genetronics, San Diego, CA, USA)。基于电穿孔转染，通过优化转染试剂、转染策略和改进转染载体等途径，探索出适合不同虫种和不同研究目标的转染方法，其中限制性内切酶介导的整合转染 (REMI) 和两个或两个以上转染载体共转染由于操作简单，转染效率高并且稳定可靠，在原虫转染中应用最广。

3 转染技术在顶复门原虫研究中的应用

3.1 基因转录表达调控研究

通过对顶复门原虫的瞬时转染，根据宿主细胞表达报告分子（如 β -半乳糖苷酶、GFP 和 YFP 等）的时间点和表达强度，可以筛选到阶段特异性表达的优秀启动子和持续性表达基因的强启动子，间接推测出顶复门原虫不同发育阶段发挥主要功能的基因和持家基因。如弓形虫的微管蛋白 *Tublin1* 启动子能调控黄色荧光蛋白持续表达，说明 *Tublin1* 在弓形虫完整的发育过程中发挥功能^[26]。鸡疟原虫的 *PFS16* 基因启动子能驱动 CAT 和 LUC 在蚊子体内的配子生殖和禽体内的红细胞外裂殖生殖阶段表达，而属于同一家族的 *PFS25* 基因启动子仅在配子生殖阶段调控 CAT 和 LUC 的表达，说明 *PFS25* 基因在有性生殖阶段特异性表达而发挥功能作用^[27]。柔嫩艾美耳球虫的组蛋白 4 基因启动子能驱动黄色荧光蛋白在球虫孢子生殖、裂殖生殖和配子生殖阶段持续性地高表达^[13,28]；另外，通过瞬时转染，可以鉴定大量的种特异性或种间保守的启动子和 3'端转录终止调控序列，为进一步稳定转染和基因功能研究提供更多可选择的优秀转录表达调控序列。

3.2 基因功能研究

随着顶复门中恶性疟原虫、约氏疟原虫 (*P. yoelii*)、刚地弓形虫 (*T. gondii*)、微小隐孢子虫 (*C. parum*)、双芽巴贝斯虫 (*B. bigemina*) 和环形泰勒虫 (*T. annulata*) 全基因组测序的完成以及柔嫩艾美耳球虫、犬新孢子虫等基因组测序计划正在进行，寄生虫学工作者能方便地获得越来越多的基因序列。但在众多基因序列当中，弄清功能的仅有部分基因，大部分基因序列的功能和注解信息还是未知的^[7,29-30]。

转染技术成为基因功能研究的有力工具^[8]。顶复门原虫在入侵、运动和代谢等方面有共同特点，但在入侵宿主或细胞特异性和致病性等方面不同虫种又有

很大差异。从分子水平上弄清控制入侵、运动、代谢、致病性和宿主特异性等生物学功能的主要基因,对进一步掌握这些危害人类和动物的病原微生物的生物特性,研制新型有效的疫苗和新的药物,更好地控制这些疾病的危害至关重要。通过基因敲除、基因突变、基因缺失和基因互补等策略,借助转染技术,可以分析鉴定相关基因序列的功能。例如通过构建 Actin 点突变的转染载体,转染弓形虫后获得弓形虫突变体,这种突变体丧失了运动入侵的能力,从基因水平上确定了 Actin 是控制弓形虫运动的关键基因^[31]。通过基因缺失和转染技术,验证 TRAP 基因功能域是伯氏疟原虫感染蚊子唾液腺和哺乳动物肝细胞所必需的部分^[32]。相对于伯氏疟原虫,恶性疟原虫转染效率低的主要原因之一就是其红细胞外期的裂殖子存活时间太短,如果能确定控制红细胞外期发育的关键基因,通过基因突变延长红细胞外期的裂殖子存活时间,进而大大提高其转染效率,可为进一步研究危害人类最严重的病原—恶性疟原虫提供有力的工具。

通过转染技术,可以直观准确地了解相关功能蛋白在虫体细胞内的定位与分布。通过在报告分子如 YFP 的 5'端融合顶复门原虫分泌性信号肽、核定位序列和细胞骨架引导肽等信号肽序列,可以观察到黄色荧光蛋白被打靶到虫体的不同部位。如 *T. gondii* 的不同信号肽序列能将黄色荧光蛋白打靶到速殖子的核、细胞膜、线粒体、顶质体、高尔基体和带虫空泡内等不同部位^[20]。柔嫩艾美耳球虫组蛋白 4 基因的核定位序列能将黄色荧光蛋白定位到球孢子、裂殖子、未孢子化卵囊等阶段虫体的核上^[13,28]。另外,顶复门原虫内不同种属间的信号肽序列具有保守性。比如疟原虫的 GRA8 分泌性信号肽序列在柔嫩艾美耳球虫内仍能够把黄色荧光蛋白分泌到带虫空泡内^[33],柔嫩艾美耳球虫的组蛋白 4 基因核定位序列在刚地弓形虫内仍能够把黄色荧光蛋白定位到弓形虫的核上(数据待发表)。

3.3 耐药性和筛选新药物作用靶基因研究

耐药性的出现是顶复门原虫中的普遍现象^[34-37],而疟疾、弓形虫病和鸡球虫病等疾病依然威胁着人类和动物的健康,并且可利用的疫苗有限,因此揭示耐药性分子机理,筛选新的药物靶点和研制新型药物依然迫切。而转染技术是揭示原虫耐药性机理和筛选新药物靶点的有效手段。

通过转染技术,可以揭示耐药性分子机理^[38]。例如通过对弓形虫 DHFR-TS 诱发 2~3 个点突变,然后

通过转染手段获得转染虫系,而转染虫系就能抵抗弓形虫的特效药——乙胺嘧啶(pyrimethamine)的杀伤^[39]。由于顶复门原虫与脊椎动物进化关系久远,代谢途径差别也很大,选取调控虫体代谢的主要基因作为药物作用的靶点,生产的药物对动物和人不会产生副作用。如顶复门原虫普遍不能自身合成嘌呤,依靠从宿主细胞摄取嘌呤,其中疟原虫主要通过嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)/HGXPRT 途径,而疟原虫的 PNP 是一种六聚体分子,明显不同于脊椎动物真核细胞内的三聚体分子,这种分子结构上的巨大差异可以作为化学治疗药物的靶点^[38,40]。球虫的脂肪酸代谢途径与经典真核细胞也不同,这些调控代谢的基因或分子均可以作为新药物靶点的候选分子^[41]。

3.4 药物敏感性分析

由于耐药性的产生,单用一种药物很难有效控制疾病的发生,而且研制新药物周期长、成本高,因此进行简单可行的药物敏感性试验显得尤为必要。不像细菌,顶复门原虫不能在体外进行有效的药物敏感性试验,但是通过转染技术能获得稳定表达黄色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶的转染虫系,应用特定的读数仪器可以方便地检测虫体生长状态,用之筛选敏感药物。结合体外培养技术,可以在体外进行顶复门原虫的药物敏感性试验。如稳定高表达黄色荧光蛋白的弓形虫能在 384 孔培养板内的细胞上生长,其发出的荧光强度与虫体数量呈正相关,通过在培养液内加入不同浓度的乙胺嘧啶、细胞松弛素和氯林可霉素,可以筛选到抑制效果最好的药物和浓度,与稳定表达 β -半乳糖苷酶的弓形虫相比,在高密度虫体条件下,其准确性更高^[26]。稳定表达黄色荧光蛋白或 β -半乳糖苷酶的转染脑住肉孢子虫也能用于筛选乙胺嘧啶、地克珠利(diclazuril)和妥曲珠利(toltrazuril)等药物的最佳抑制浓度^[11]。

3.5 顶复门原虫免疫学研究

顶复门原虫为细胞内寄生,能刺激机体产生有效的保护性免疫应答^[42-43]。研究顶复门原虫不同种属刺激机体产生保护性免疫应答的类型和分子机制对疫苗研制的控制原虫感染具有重要的免疫学指导意义。但是顶复门原虫生物学特性和抗原类型比较复杂,而且相关蛋白的抗原表位未知,研究难度大。而利用模型抗原如 OVA 或 BSA,通过转染技术获得表达模型抗原或其部分 T、B 细胞表位的重组虫体,通过动物接种试验,可以从抗体水平、T 细胞亚群数量和细胞因子水平分析原虫感染产生的免疫应答类型和动态变化。

通过转染技术获得以分泌形式表达部分 OVA 的重组刚地弓形虫能刺激小鼠产生特异性 CD4+T 细胞, 同时也能有效刺激特异性 CD4+T 细胞产生 IFN- γ , 并且特异性 CD4+T 细胞能给 IFN- γ ^{-/-} 基因敲除小鼠提供免疫保护; 而在细胞质内表达 OVA 的重组刚地弓形虫不能产生有效的免疫保护^[44]。另外, 分泌性表达 β -gal CD8+T 细胞表位的重组弓形虫速殖子能刺激小鼠产生保护性 CD8+ T 细胞和 IFN- γ , 而在细胞质内表达 β -gal 的重组弓形虫却不能提供保护^[45]。说明抗原性质、抗原输送载体和抗原存在形式等对疫苗的保护功效起决定作用。

活载体疫苗因其在免疫原性和生产成本上的独特优势。而成为控制重大疫病的有效手段。以顶复门原虫为活载体的疫苗, 能模仿顶复门原虫自身刺激机体产生保护性的细胞免疫或粘膜免疫, 抵抗其它细胞内病原感染^[46-48]。例如表达伯氏疟原虫 CSP 抗原的重组致弱弓形虫能刺激机体产生 CD8+ T 细胞保护性免疫应答^[46]。另外, 弓形虫还能有效表达犬新孢子虫和微小隐孢子虫的抗原蛋白。弓形虫属于真核生物, 相对于原核生物, 能对表达的外源蛋白进行翻译后糖基化等修饰, 表达的蛋白活性和免疫原性更强, 弓形虫同属于顶复门原虫, 表达顶复门其它原虫蛋白不存在密码子偏爱性问题。同理, 顶复门其它原虫也有同样的优势。例如柔嫩艾美耳球虫寄生于肠道上皮细胞内, 能激发机体产生有效的保护性细胞免疫和粘膜免疫应答, 而且不像弓形虫, 柔嫩艾美耳球虫为自限性感染, 只感染鸡不感染动物和人。如果通过转染技术把柔嫩艾美耳球虫改造为禽类其它重大疫病病原如禽流感的活载体疫苗, 理论上将会给鸡提供有效的细胞免疫和粘膜免疫保护, 而且生物安全性高^[49-51]。

通过在外源蛋白一侧或两侧融合分泌性信号肽, 转染后, 转染顶复门原虫能将表达的外源蛋白分泌到虫体外, 与 MHC I 分子结合通过内源性途径递呈到细胞表面, 更有效地激起机体产生以细胞免疫为主的保护性免疫应答。总之, 转染技术是研究顶复门原虫免疫学和研制新型疫苗的有力工具。

4 展望

随着顶复门原虫基因组计划的开展和深入, 越来越多的基因序列和基因注释可以从互联网上获得, 这大大加快了转染研究的发展, 同时也为转染技术开辟了更广阔的应用平台。顶复门原虫中, 大量未知基因的功能研究及筛选新的药物靶基因和保护性抗原基因

离不开转染技术, 把细胞内寄生激发宿主产生保护性细胞免疫应答的顶复门原虫改造成一种新型的活载体疫苗也需要转染技术。总之, 在研究顶复门原虫基因功能和免疫学中, 转染技术是一种强大的工具。

References

- [1] Goonewardene R, Daily J, Kaslow D, Sullivan T J, Duffy P, Carter R, Mendis K, Wirth D. Transfection of the malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(11): 5234-5236.
- [2] Soldati D, Boothroyd J C. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science*, 1993, 260(5106): 349-352.
- [3] Sibley L D, Messina M, Niesman I R. Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(12): 5508-5512.
- [4] van Dijk M R, Waters A P, Janse C J. Stable transfection of malaria parasite blood stages. *Science*, 1995, 268(5215): 1358-1362.
- [5] Messina M, Niesman I, Mercier C, Sibley L D. Stable DNA transformation of *Toxoplasma gondii* using phleomycin selection. *Gene*, 1995, 165(2): 213-217.
- [6] Kim K, Boothroyd J C. *Toxoplasma gondii*: stable complementation of sag1 (p30) mutants using SAG1 transfection and fluorescence-activated cell sorting. *Experimental Parasitology*, 1995, 80(1): 46-53.
- [7] Kim K, Weiss L M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. *International Journal for Parasitology*, 2004, 34(3): 423-432.
- [8] Balu B, Adams J H. Advancements in transfection technologies for *Plasmodium*. *International Journal for Parasitology*, 2007, 37(1): 1-10.
- [9] Menard T V R. Gene targeting in *Plasmodium berghei*. *Methods in Molecular Medicine*, 2002, 72: 317-331.
- [10] Sidhu A B, Verdier-Pinard D, Fidock D A. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcr mutations. *Science*, 2002, 298(5591): 210-213.
- [11] Gaji R Y, Zhang D, Breathnach C C, Vaishnav S, Striepen B, Howe D K. Molecular genetic transfection of the coccidian parasite *Sarcocystis neurona*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2006, 150(1): 1-9.
- [12] Hao L, Liu X Y, Li J D, Zhou X Y, Li J D, Suo X. Transient transfection of *Eimeria tenella* using yellow or red fluorescent protein as a marker. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2007, 153(2):

- 213-215.
- [13] Yan W C, Liu X Y, Shi T Y, Hao L L, Tomley F M, Suo X. Stable transfection of *Eimeria tenella*: constitutive expression of the YFP-YFP molecule throughout the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39(1): 109-117.
- [14] Howe D K, Sibley L D. Development of molecular genetics for *Neospora caninum*: A complementary system to *Toxoplasma gondii*. *Methods*, 1997, 13(2): 123-133.
- [15] Adamson R, Lyons K, Sharrard M, Kinnaird J, Swan D, Graham S, Shiels B, Hall R. Transient transfection of *Theileria annulata*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2001, 114(1): 53-61.
- [16] Schneider I, Haller D, Kullmann B, Beyer D, Ahmed J S, Seitzer U. Identification, molecular characterization and subcellular localization of a *Theileria annulata* parasite protein secreted into the host cell cytoplasm. *Parasitology Research*, 2007, 101(6): 1471-1482.
- [17] Suarez C E, McElwain T F. Transient transfection of purified *Babesia bovis* merozoites. *Experimental Parasitology*, 2008, 118(4): 498-504.
- [18] Kurth M, Entzeroth R. Reporter gene expression in cell culture stages and oocysts of *Eimeria nieschulzi* (Coccidia, Apicomplexa). *Parasitology Research*, 2009, 104(2): 303-310.
- [19] Waters A P, Thomas A W, van Dijk M R, Janse C J. Transfection of malaria parasites. *Methods*, 1997, 13(2): 134-147.
- [20] Joiner K A, Roos D S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *Journal of Cell Biology*, 2002, 157(4): 557-563.
- [21] Janse C J, Waters A P. Episomal transformation of *Plasmodium berghei*. *Methods in Molecular Medicine*, 2002, 72: 305-315.
- [22] Mota M M, Thathy V, Nussenzweig R S, Nussenzweig V. Gene targeting in the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2001, 113(2): 271-278.
- [23] Balu B, Shoue D A, Fraser M J. High-efficiency transformation of *plasmodium falciparum* by the lepidopteran transposable element piggyBac. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(45): 16391-16396.
- [24] Skinner-Adams T S, Lawrie P M, Hawthorne P L, Gardiner D L, Trenholme K R. Comparison of *Plasmodium falciparum* transfection methods. *Malaria Journal*, 2003, 2: 19.
- [25] Jongco A M, Ting L M, Thathy V, Mota M M, Kim K. Improved transfection and new selectable markers for the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2006, 146(2): 242-250.
- [26] Gubbels M J, Li C, Striepen B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy*, 2003, 47(1): 309-316.
- [27] Krnjanski Z, Gilberger T W, Walter R D, Cowman A F, Müller S. Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *Journal of Biology Chemistry*, 2002, 277(29): 25970-25975.
- [28] Liu X Y, Shi T Y, Ren H B, Su H L, Yan W C, Suo X. Restriction enzyme-mediated transfection improved transfection efficiency in vitro in Apicomplexan parasite *Eimeria tenella*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2008, 161: 72-75.
- [29] Worthey E A, Myler P J. Protozoan genomes: gene identification and annotation. *International Journal for Parasitology*, 2005, 35(5): 495-512.
- [30] <http://www.genedb.org/genedb/seqSearch.jsp?organism=etenella>.
- [31] Dobrowolski J M, Sibley L D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, 1996, 84(6): 933-939.
- [32] Sultan A A, Thathy V, de Koning-Ward T F, Nussenzweig V. Complementation of *Plasmodium berghei* TRAP knockout parasites using human dihydrofolate reductase gene as a selectable marker. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2001, 113(1): 151-156.
- [33] Shi T Y, Yan W C, Ren H B, Liu X Y, Suo X. Dynamic development of parasitophorous vacuole of *Eimeria tenella* transfected with the yellow fluorescent protein gene fused to different signal sequences from apicomplexan parasites. *Parasitology Research*, 2009, 104(2): 315-320.
- [34] Naudé B, Brzostowski J A, Kimmel A R, Wellems T E. Dictyostelium discoideum expresses a malaria chloroquine resistance mechanism upon transfection with mutant, but not wild-type, *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Journal of Biology Chemistry*, 2005, 280(27): 25596-22603.
- [35] Bray P G, Martin R E, Tilley L, Ward S A, Kirk K, Fidock D A. Defining the role of PfCRT in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(2): 323-333.
- [36] Shirley M W, Smith A L, Blake D P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*, 2007, 25(30): 5540-5547.
- [37] Williams R B. Tracing the emergence of drug-resistance in coccidia (*Eimeria* spp.) of commercial broiler flocks medicated with decoquinate for the first time in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 2006, 135(1): 1-14.
- [38] Woodrow C J, Krishna S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cell Molecular Life Science*, 2006, 63(14): 1586-1596.
- [39] Wu Y, Kirkman L A, Wellems T E. Transformation of *Plasmodium*

- falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(3): 1130-1134.
- [40] Kicska G A, Evans G B, Furneaux R H, Murkin A S, Schramm V L. Transition state analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase from *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(5): 3219-3225.
- [41] Zhu G. Current progress in the fatty acid metabolism in *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2004, 51(4): 381-388.
- [42] Swinkels W J, Post J, Cornelissen J B, Engel B, Boersma W J, Rebel J M. Immune responses to an *Eimeria acervulina* infection in different broilers lines. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2007, 117(1-2): 26-34.
- [43] Brake D A. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *International Journal for Parasitology*, 2002, 32(5): 509-515.
- [44] Pepper M, Dzierszynski F, Crawford A, Hunter C A, Roos D. Development of a system to study CD4+-T-cell responses to transgenic ovalbumin-expressing *Toxoplasma gondii* during toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 2004, 72(12): 7240-7246.
- [45] Kwok L Y, Lütjen S, Solttek S, Soldati D, Busch D, Deckert M, Schlüter D. The induction and kinetics of antigen-specific CD8 T cells are defined by the stage specificity and compartmentalization of the antigen in murine toxoplasmosis. *Journal of Immunology*, 2003, 170(4): 1949-1957.
- [46] Charest H, Sedegah M, Yap G S, Gazzinelli R T, Caspar P, Hoffman S L, Sher A. Recombinant attenuated *Toxoplasma gondii* expressing the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein provides highly effective priming for CD8+ T cell-dependent protective immunity against malaria. *Journal of Immunology*, 2000, 165(4): 2084-2092.
- [47] Shen H, Miller J F, Fan X, Kolwyck D, Ahmed R, Hartly J T. Compartmentalization of bacterial antigens: differential effects on priming of CD8 T cells and protective immunity. *Cell*, 1998, 92(4): 535-545.
- [48] Garg N, Nunes M P, Tarleton R L. Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *Journal of Immunology*, 1997, 158(7): 3293-3302.
- [49] Yun C H, Lillehoj H S, Lillehoj E P. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, 24(2-3): 303-324.
- [50] Lillehoj H S, Choi K D. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development *in vitro* and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Diseases*, 1998, 42(2): 307-314.
- [51] Long P L. *The Biology of the Coccidia*. London: Edward Arnold Press. 1982: 41-43.

(责任编辑 林鉴非)