

莫氏巴贝斯虫裂殖子 cDNA 表达文库的构建及免疫学筛选

王锦明, 刘军龙, 刘爱红, 马米玲, 牛庆丽, 任巧云, 杨吉飞, 刘志杰, 李有全,
罗建勋, 殷宏*, 关贵全*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室,
兰州 730046)

摘要: 为了构建莫氏巴贝斯虫(*Babesia motasi*)裂殖子 cDNA 表达文库, 从中筛选和鉴定功能基因, 利用差速离心法从莫氏巴贝斯虫感染的红细胞中纯化裂殖子, 提取总 RNA 并纯化 mRNA。在合成的双链 cDNA 两端加上含 *EcoR* I 和 *Hind* III 定向接头后连接到 λ SCREEN 载体上。通过体外包装形成完整的噬菌体颗粒, 并用之转染 ER1647, 构建莫氏巴贝斯虫裂殖子的 cDNA 表达文库。用莫氏巴贝斯虫阳性血清筛选 cDNA 文库, 获得的阳性克隆, 经过测序和 Blast 软件分析鉴定, 然后利用末端快速扩增技术(RACE)对筛选到的功能基因片段进行全长扩增。结果表明构建的 cDNA 表达文库其初级库容量约为 1.0×10^6 PFU, 扩增文库为 3.5×10^9 PFU; 通过免疫学筛选, 获得 50 个阳性克隆。测序和 Blast 分析后, 鉴定出 10 个莫氏巴贝斯虫基因片段, RACE 扩增获得了其中 8 个基因的全长。本试验构建的莫氏巴贝斯虫裂殖子的 cDNA 表达文库和筛选到的 10 个结构和功能基因, 为研究巴贝斯虫生物学特性、筛选疫苗与诊断用抗原及药物靶位奠定了基础。

关键词: 莫氏巴贝斯虫; cDNA 表达文库; 免疫筛选; RACE

中图分类号: S852.723

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)12-1931-07

Construction and Immunoscreening of a Merozoites cDNA Expression Library of *Babesia motasi*

WANG Jin-ming, LIU Jun-long, LIU Ai-hong, MA Mi-ling, NIU Qing-li, REN Qiao-yun,
YANG Ji-fei, LIU Zhi-jie, LI You-quan, LUO Jian-xun, YIN Hong*, GUAN Gui-quan*
(State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province/ Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The objective of this study was to obtain functional genes of *Babesia motasi*, a cDNA expression library of the merozoites was constructed and immunoscreened with positive sera from sheep infected with *B. motasi*. The merozoites of *B. motasi* were purified from red blood cell with differential centrifugation. The mRNA was purified from extracted total RNA. Synthesized double-strand cDNA was added directional *EcoR* I / *Hind* III linkers and ligated to the *EcoR* I / *Hind* III arms of λ screen vector. To produce a primary cDNA library of *B. motasi*, the phages DNA was packaged *in vitro* and transfected into ER1647. The positive clones were obtained by immunoscreening with the positive sera against *B. motasi* and amplified with rapid amplification

收稿日期: 2012-06-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072130; 30800820; 30972182; 31001061); 甘肃省重点项目(0801NKDA033; 1002NKDA035); “973”项目(2010CB530206); “948”项目(2010-S04); 国家肉牛牦牛产业体系项目(CARS-38); 科技部合作专项; 欧盟 EPIZONE(FOOD-CT-2006-016236); ASFRISK(211691); ARBOZOONET(211757); PIROVAC(KBBE-3-245145)

作者简介: 王锦明(1983-), 山西吕梁人, 硕士生, 主要从事寄生虫分子生物学的研究, E-mail: wjm0403@gmail.com, Tel: 0931-8342681

* 通讯作者: 殷宏, 研究员, E-mail: ttbdcn@public.lz.gs.cn; 关贵全, 副研究员, E-mail: guanguiquan@163.com

of cDNA ends (RACE). The titers of the primary and amplified cDNA expression library were 1.0×10^6 PFU and 3.5×10^9 PFU \cdot mL⁻¹, respectively. The results showed that 10 genes of *B. motasi* were identified and the full-length of 8 genes were amplified by RACE. The cDNA expression library and genes screened provide an important material for screening and identifying candidate antigens of vaccination and diagnosis, drug targets as well studying biological characteristics of *Babesia*.

Key words: *B. motasi*; cDNA expression library; immunoscreening; RACE

羊巴贝斯虫病(Babesiosis)是由媒介蜱传播的血液原虫病;感染动物表现发热、贫血、黄疸、血红蛋白尿等临床症状,严重感染时甚至会引起死亡。目前已经报道和命名的羊巴贝斯虫病病原有 5 种,即莫氏巴贝斯虫(*B. motasi*)、绵羊巴贝斯虫(*B. ovis*)、粗糙巴贝斯虫(*B. crassa*)、叶状巴贝斯虫(*B. foliata*)和泰氏巴贝斯虫(*B. taylori*)。中国对羊巴贝斯虫病的研究起步较晚,最早在四川(1982年)^[1]和黑龙江(1986年)^[2]有过相关报道。之后,在云南、山西、河南和甘肃等省份也有零星的报道,但一直没有分离到病原。直到 1996 年,本实验室在甘肃东部地区由羊巴贝斯虫致死的小尾寒羊体内分离到第 1 株巴贝斯虫病病原,即莫氏巴贝斯虫宁县株(*B. motasi* Ningxian)^[3]。此后,又从河北、辽宁、甘肃、新疆、湖北和甘肃等地分离到 8 株羊的巴贝斯虫,并通过分子分类学和生物学特性(传播媒介、形态学和致病性等)研究显示这些病原可以分为 2 个种,即莫氏巴贝斯虫和新疆巴贝斯虫未定种^[4-7]。同时也建立了各种分子生物学和血清学检测技术,通过流行病学调查工作显示,中国羊巴贝斯虫病阳性率为 11.2%~31.7%,在甘肃甘南牧区高达 82.38%^[8-11]。这些数据表明,羊巴贝斯虫病在中国普遍分布,对养羊业的健康持续发展造成严重的影响。

然而,截至目前为止,对巴贝斯虫的一些生命活动机制(如细胞入侵、运动和出胞等)、免疫机理的研究甚少,防控技术不够完善。主要原因是对病原生物学特征、药物靶位、疫苗用抗原等方面的研究不够深入。而构建 cDNA 文库是获得、保存、开发生物基因资源、发现新基因和研究基因功能的一项重要技术,同时也为研究生物的生长发育、生殖、免疫机制等分子机理的研究提供材料^[12]。到目前为止,国内外已经构建了多个顶复门原虫的 cDNA 文库。通过恶性疟原虫滋养体 cDNA 文库的构建和筛选,获得了 17 个特异性免疫反应的 cDNA 克隆^[13]。从弓形虫速殖子 cDNA 文库中筛选到了具有抗弓形

虫感染作用的新基因和与棒状体蛋白、致密颗粒同源的基因^[14-16]。柔嫩艾美耳球虫裂殖子连续多个发育阶段 cDNA 文库的构建,为挖掘侵袭和发育相关的基因提供了材料^[17]。从吕氏泰勒虫 cDNA 文库中发现了 30 个新基因^[18]。

在巴贝斯虫中,只有吉氏巴贝斯虫、东方巴贝斯虫和牛巴贝斯虫有 cDNA 文库构建的报道^[19-21],目前尚未见到国内外有关莫氏巴贝斯虫裂殖子 cDNA 文库的报道。本研究为了便于筛选莫氏巴贝斯虫生命活动调节和免疫原性基因,构建了莫氏巴贝斯虫裂殖子 cDNA 表达文库,并应用免疫学筛选技术获得了多个可能参与莫氏巴贝斯虫入侵、运动、蛋白折叠和转运调控、DNA 损伤修复和基因表达调控等生命活动的基因,以及一些可能是药物开发的靶位和可用于诊断、疫苗候选抗原的基因,为将来深入探索莫氏巴贝斯虫的生命活动特征及防控技术的研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

mRNA 纯化试剂盒(Amersham); OrientExpress™ Oligo(dT) cDNA Synthesis Kit (Novagen); λSCREEN™ EcoR I / Hind III Arms Kit plus PhageMaker® Kit (Novagen); SMART™ RACE cDNA amplification kit (Clontech Laboratories)。

1.2 虫种和抗血清

用于 cDNA 文库免疫筛选的阳性血清和莫氏巴贝斯虫临潭株单克隆株 G7 由兰州兽医研究所寄生虫病研究室提供^[22-23]。

1.3 莫氏巴贝斯虫裂殖子的纯化与 RNA 的提取

莫氏巴贝斯虫临潭株单克隆株 G7 的体外培养和裂殖子的纯化参照关贵全等报道的方法进行^[23-24]。总 RNA 的提取采用 TRIZOL 法。利用 Amersham 公司的 mRNA 纯化试剂盒纯化 mRNA,操作步骤按说明书进行。获得的 mRNA 用微量核酸蛋白检测仪测定浓度,并对其进行凝胶分析。

1.4 cDNA 表达文库的构建

以 mRNA 为模板, Oligo(dT) 为引物, 合成双链 cDNA。并在双链 cDNA 的两端分别加上含有 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点的定向接头。用 *EcoR* I、*Hind* III 对含有酶切位点的 cDNA 进行双酶切, 通过柱层析筛选大片的 cDNA 并与 λ SCREEN 载体臂进行连接, 通过体外包装, 转染宿主菌 ER1647, 构建成莫氏巴贝斯虫裂殖子初级 cDNA 文库。采用平板计数法测定初级文库的库容量。将初级文库噬菌体与 ER1647 混匀, 再铺平板, 当噬斑长到肉眼可见时, 用 10 mL SM 缓冲液洗脱噬菌体。收集平板中所有 SM, 加 0.5 mL 氯仿摇匀。3 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除琼脂糖残渣, 将上清转入另一干净管中, 取 5 μL 测定扩增库容量。其余加 DM-SO 至终浓度为 7%, 每管 200 μL 分装, -70°C 保存。

1.5 文库重组率的测定

从测定库容量的平板上随机挑取 50 个噬斑, 溶于 25 μL SM 溶液中, 室温静置 1 h。99 $^\circ\text{C}$ 加热处理 5 min。分别取 5 μL 上清作为模板, 以 SP6 启动子和 T7 终止子为靶序列合成特异性引物进行 PCR 扩增。扩增条件: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 55 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 35 个循环后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 6 min。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小并计算文库的重组率。

1.6 cDNA 文库的免疫学筛选及阳性克隆的鉴定

将适当稀释的扩增 cDNA 文库与 BL21(DE3) pLysE 菌液混合, 37 $^\circ\text{C}$ 静置培养 30 min 后, 将此混合物与顶层琼脂糖迅速混匀后平铺于 $2 \times \text{YT}$ 固体培养基平板上。倒置培养 7 h。将标记好的 NC 膜覆盖于顶层琼脂糖表面, 于 37 $^\circ\text{C}$ 倒置培养 3 h 后取出平板, 4 $^\circ\text{C}$ 放置 30 min。取膜并在 TBST 中漂洗

5 min, 按照 Western blot 方法, 依次用 1% 的明胶封闭 30 min、与阳性血清反应、碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG 作用、NBT/BCIP 显色, 待蓝紫色阳性信号出现后用水终止反应。根据膜上阳性信号的位置, 挑取平板上的相应噬斑浸泡于 1 mL SM 中, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜。将此噬菌体溶液适当稀释重新铺板, 按照上述操作进行复筛至整个膜上均为阳性信号。所得阳性噬菌体转染宿主菌 BM25.8 使之自动亚克隆为重组质粒, 用亚克隆的质粒转化宿主菌 JM109 并提取重组质粒进行测序。获得的测序结果应用 Lasergene 软件中的 MegAlign 进行序列比对分析, 剔除重复的阳性克隆, 然后引用 BLAST 与 GenBank 中的序列进行序列分析。

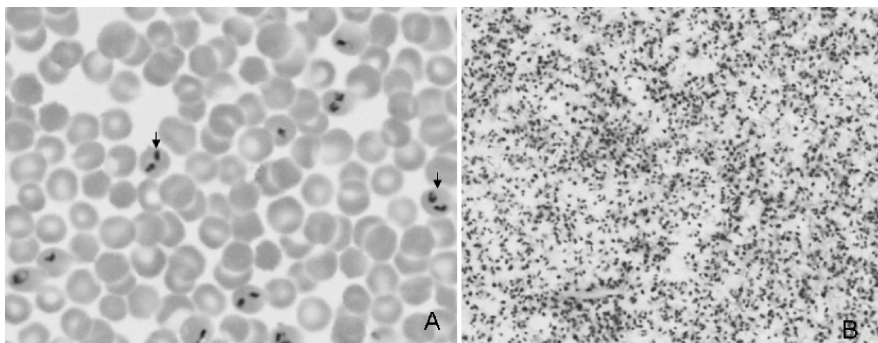
1.7 利用 RACE 扩增基因的全长 CDS 及基因的序列分析

根据获得的基因片段, 用 Prime5.0 设计 RACE 扩增的特异性引物。利用 SMARTTM cDNA amplification kit (Clontech) 扩增基因的全长 CDS, 具体操作按说明书进行。对 RACE 扩增后的序列拼接, 获得基因全长。用 BLAST 与 GenBank/NCBI 中的序列进行同源性比较, 并将所获基因登录 GenBank/NCBI, 获取登录号。

2 结果

2.1 莫氏巴贝斯虫的培养及纯化

用渗透压法裂解莫氏巴贝斯虫感染的红细胞 (图 1A), 通过差速离心法从裂解物中分离纯化莫氏巴贝斯虫裂殖子。光学显微镜观察表明, 纯化的莫氏巴贝斯虫裂殖子保持良好的形态 (图 1B)。



A. 细胞内巴贝斯虫(箭头); B. 纯化的巴贝斯虫裂殖子

A. *B. motasi* in RBC (arrowing); B. The purified merozoites of *B. motasi*

图 1 莫氏巴贝斯虫裂殖子

Fig. 1 The merozoites of *B. motasi*

2.2 莫氏巴贝斯虫裂殖子 cDNA 文库构建

纯化得到的 mRNA 电泳检测呈良好的 smear 分布,表明 mRNA 质量良好,可以用于 cDNA 的合成及文库的构建(图 2)。构建的文库初始库容量约为 1.0×10^6 PFU,扩增库容量为 3.5×10^9 PFU。

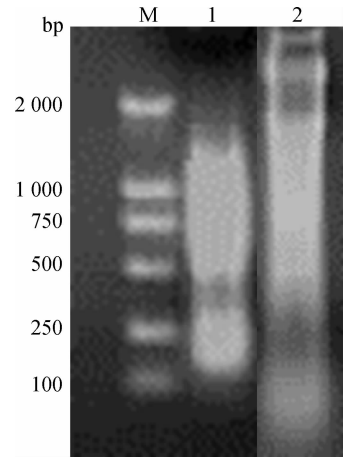
2.3 用 PCR 方法鉴定 cDNA 文库的重组率

对随机挑取的 50 个噬斑进行 PCR 鉴定,表明构建的 cDNA 表达文库的重组率为 100%;大多数插入片段位于 250~2 000 bp(图 3)。

2.4 免疫学筛选、鉴定及全长扩增

通过对筛选到的 50 个阳性克隆进行序列比较分析,获得 10 个与其它贝斯虫有同源性的 EST。依次编号为 BLT-01~BLT-10,其中多数 EST 序列没有完整的开放阅读框。利用 RACE 扩增技术对 BLT-01~BLT-10 的末端进行扩增,除了 BLT-03 和 BLT-04 尚未获得基因的全长 CDS 外,其它 8 个基因均已扩增到全长。将 BLT-01~BLT-10 的基因序列用 BLASTN/P 软件进行同源性分析,开放

阅读框预测及基因特性分析。结果见表 1。

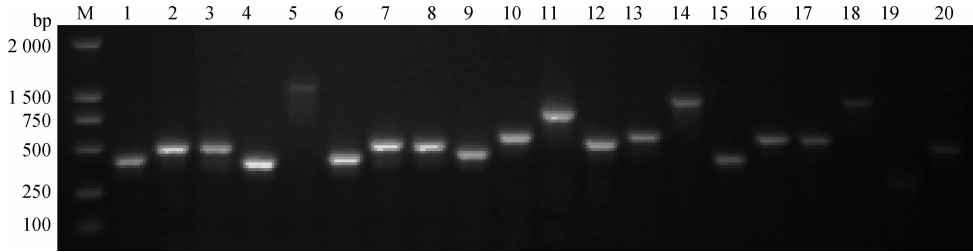


M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. cDNA; 2. 纯化的 mRNA

M. 2000 bp DNA marker; 1. cDNA; 2. Purified mRNA

图 2 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Analysis of synthesized cDNA by agarose gel electrophoresis



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~20. 随机挑选的噬菌斑的 PCR 产物

M. 2000 bp DNA marker; 1-20. The PCR product of random Phages

图 3 PCR 鉴定 cDNA 表达文库的重组率

Fig. 3 The recombinant rate of cDNA library by PCR

表 1 基因的序列分析

Table 1 Sequence analysis of genes

阳性克隆编号 No. of positive clones	相关序列的相似性比较/% The homology with <i>Babesia</i> spp	基因长度/bp cDNA of genes	Full length	开放阅读框长度/bp Size of ORF for genes	登录号 Locus
BLT01	<i>B. bovis</i> Rab1b,75%	758		669	JX091082
BLT02	<i>B. bovis</i> Hsp90,81%	2 392		2 154	GQ397856
BLT03	<i>B. bigemina</i> p200,76%	643▲			JX091085
BLT04	<i>B. bovis</i> Histone H2A protein,77%	332▲			JX091084
BLT05	<i>B. bovis</i> gliding-associated protein 45,79%	664		579	JQ864083
BLT06	<i>B. bigemina</i> cyp gene for cyclophilin,91%	749		624	JX091079
BLT07	<i>B. bovis</i> Hypothetic protein 1,26%	1 140		936	GU014487
BLT08	<i>B. bovis</i> membrane protein,70%	901		648	JX091080
BLT09	<i>B. bovis</i> RNA recognition motif containing protein, 70%	1 359		1 125	JX091081
BLT10	<i>B. bovis</i> Hypothetic protein 2	714		636	JX091083

“▲”表示基因的部分序列,“▲” the partial sequence of genes

3 讨 论

自 1888 年, Babes 在调查罗马尼亚发生的无名高热时发现巴贝斯虫至今, 全世界报道的巴贝斯虫已经超过 100 种。由于巴贝斯虫病流行范围广、危害大, 而且某些病原, 如田鼠巴贝斯虫 (*B. microti*) 和分歧巴贝斯虫 (*B. divergens*) 等可以感染人, 因此受到人们的广泛关注。本研究利用渗透压差法对莫氏巴贝斯虫裂殖子进行纯化; 提取总 RNA, 构建 cDNA 表达文库, 通过免疫学筛选、测序、RACE 扩增和 Blast 分析, 从 cDNA 表达文库中筛选到 10 个功能基因, 将这些基因登录 GenBank/NCBI 并获取登录号。其中, BLT02 基因与牛巴贝斯虫热休克蛋白 (Heat Shock Protein, HSP) 90 在氨基酸水平上有 92% 的相似性, 属于 HSP 家族成员。HSP 普遍存在于细菌、植物和哺乳动物中, 且在进化过程中高度保守^[25]。依据基因序列的相似性、大小及功能将 HSP 分为不同的家族, 如 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40 和小的 HSP 等^[26]。HSP 在机体内具有多种功能; 如参与蛋白质的折叠、调节蛋白合成与降解的平衡、增强细胞对应激的耐受程度等。HSP90 具有执行核苷酸结合、ATP 酶活性、分子伴侣等功能的保守结构域。因此, 特异性结构域的抑制物可能是寄生虫病治疗的潜在药物靶位^[27-28]。

BLT05 与牛巴贝斯虫滑动相关蛋白 45 (Gliding-associated protein, GAP) 基因的相似性为 79%。GAP45 是顶复门原虫滑动装置-滑动体 (Glideosome) 的重要组分; 滑动体是由血小板反应蛋白相关匿名蛋白 (Thrombospondin related anonymous proteins, TRAP)、醛缩酶 (Aldolase)、肌动蛋白 (Actin)、肌球蛋白 A (Myosin A, Myo A)、肌球蛋白轻链 (Myosin light chain, MLC) 以及滑动相关蛋白 (Gliding associated protein, GAP) 45 和 50 组成^[29]。顶复门原虫没有纤毛、鞭毛样的运动器官, 它们不能像锥虫等原生动物的那样进行游动, 也不同于通过细胞变形形成伪足的阿米巴虫和脊椎动物细胞那样进行爬动, 而是以一种支撑物依赖型的滑动方式移动, 现在普遍称其为滑行运动 (Gliding motility)^[30]。顶复门原虫的这种滑行运动与滑动体密切相关。正是由于顶复门原虫具有共同的运动方式, 它们可能具有相似的运动装置^[29,31]。因此, 巴贝斯虫中也可能存在与弓形虫和疟原虫滑动体相似

的结构。该基因的发现为今后开展巴贝斯虫滑动装置的结构组成、运动和入侵机理的研究奠定了基础。

BLT07 与牛巴贝斯虫 T2BO 的假定蛋白 (A7ASD6) 在氨基酸水平上只有 26% 的一致性; BLT07 基因编码的蛋白经验证为天然无折叠蛋白质 (Natively unfolded protein, NUP), 也称为固有非结构蛋白质 (Intrinsically unstructural protein, IUP) 或固有非有序化蛋白质 (Intrinsically disordered protein)。NUP 结构松散, 肽链以伸展的状态存在。这类蛋白质中的亲水氨基酸 (E、K、R、G、Q、S 和 P) 含量高, 疏水氨基酸 (I、L、V、W、F、Y、C 和 N) 含量较低^[32-33]。BLT07 基因编码的蛋白预测相对分子质量为 35 ku, 而试验研究显示其重组蛋白在 SDS-PAGE 电泳中发生异常迁移, 出现在 50 ku 附近。通过对该基因结构的研究, 发现该基因没有内含子^[23]。BLT07 编码蛋白的特异性抗体, 与泰勒虫、牛巴贝斯虫、边缘无浆体不发生交叉反应; 表明该蛋白是莫氏巴贝斯虫血清学检测的潜在抗原。

BLT01 与牛巴贝斯虫 (*B. bovis*) Rab1b 基因的相似性为 75%。Rab 蛋白家族属于 GTP (三磷酸鸟苷) 结合蛋白超家族 (由 Ras、Rho/Rac/Cdc42、Ran、Sar/Arf、Rab 等家族组成) 中的成员^[34], 与蛋白质的合成和囊泡的转运调控有关^[35-36]。BLT03 与双芽巴贝斯虫 P200 相似性为 76%。在双芽巴贝斯虫血清学检测中被用来作为诊断抗原^[37]。BLT04 在氨基酸水平上与牛巴贝斯虫核心组蛋白 H2A 的相似性达 77%。目前已知的 H2A 的主要功能是参与 DNA 的损伤修复和基因的转录调控^[38-39]。BLT06 与牛巴贝斯虫亲环素氨基酸水平的相似性达 91%。亲环素是重要的免疫抑制剂-环孢霉素 A (Cyclosporin A, CsA) 的受体, 可能成为研制抗顶复门寄生虫药物的靶位。BLT08 与牛巴贝斯虫膜蛋白具有同源性。疟原虫膜蛋白 P36 基因缺失的疟原虫免疫动物, 可以使动物机体获得对野生型疟原虫的抵抗力; 小泰勒虫膜蛋白 P67 也能够产生免疫保护作用^[40-42]。BLT09 为 RNA 识别基序 (RNA recognition motif, RRM), 也称为 RNA 结合结构域 (RNA binding domain, RBD) 或核糖核蛋白结构域 (Ribonucleoprotein domain, RNP)。具有该结构域的蛋白从细菌到真核的植物和动物中广泛存在, 是一类在生物进化过程中高度保守的蛋白^[43-44]。它们在基因表达的转录后调控 (如 pre-mRNA 的剪切、编辑、运输、稳定和降解、翻译等) 中

发挥作用^[45]。

综上所述,本研究构建的巴贝斯虫裂殖子 cDNA 文库和筛选到的基因为研究参与巴贝斯虫入侵、运动、繁殖等生命活动提供了生物材料,同时为开展巴贝斯虫诊断、免疫预防和药物治疗等方面的工作提供了数据。另外,对本研究已筛选获得基因功能的确定和巴贝斯虫诊断和防控中的应用尚待进行深入的研究和探索。

参考文献:

- [1] 陈德明. 绵羊焦虫病调查报告[J]. 兽医科技杂志, 1982, (03): 33-34.
- [2] 赵锡荣, 李翠茹, 闵友贵, 等. 绵羊巴贝斯焦虫病的调查[J]. 中国兽医科技, 1986, (01): 28-29.
- [3] YIN H, LU W S, LUO J X. Babesiosis in China[J]. *Trop Anim Health Pro*, 1997, 29(4): 11s-15s.
- [4] NIU Q, LUO J, GUAN G Q, et al. Differentiation of two ovine *Babesia* based on the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences[J]. *Exp Parasitol*, 2009, 121(1): 64-68.
- [5] LIU A H, YIN H, GUAN G Q, et al. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China[J]. *Vet Parasitol*, 2007, 147(3-4): 246-251.
- [6] GUAN G Q, YIN H, LUO J X, et al. Transmission of *Babesia* sp to sheep with field-collected *Haemaphysalis qinghaiensis* [J]. *Parasitol Res*, 2002, 88(13 Suppl 1): S22-24.
- [7] GUAN G Q, MA M L, MOREAU E, et al. A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma anatolicum anatolicum* [J]. *Exp Parasitol*, 2009, 122(4): 261-267.
- [8] GUAN G Q, CHAUVIN A, LUO J X, et al. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China [J]. *Exp Parasitol*, 2008, 120(1): 39-44.
- [9] GUAN G Q, CHAUVIN A, ROGNIAUX H, et al. Merozoite proteins from *Babesia* sp BQ1 (Lintan) as potential antigens for serodiagnosis by ELISA [J]. *Parasitology*, 2010, 137(6): 927-938.
- [10] GUAN G Q, MA M L, LIU A H, et al. A recently identified ovine *Babesia* in China; Serology and sero-epidemiology[J]. *Parasitol Int*, 2012, 61(4): 532-537.
- [11] NIU Q L, LUO J X, GUAN G Q, et al. Detection and differentiation of ovine *Theileria* and *Babesia* by reverse line blotting in China [J]. *Parasitology Research*, 2009, 104(6): 1417-1423.
- [12] SIM G K, KAFATOS F C, JONES C W, et al. Use of a cDNA library for studies on evolution and developmental expression of the chorion multigene families [J]. *Cell*, 1979, 18(4): 1303-1316.
- [13] 王燕妮. 恶性疟原虫(海南株)CDNA 表达文库的构建及鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, (1): 21-25.
- [14] 吴翔, 蒋立平, 舒衡平, 等. 抗弓形虫单克隆抗体免疫筛选弓形虫速殖子 cDNA 文库[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, (04): 288-290.
- [15] 王丹静, 蔡力汀, 蒋立平, 等. 免疫筛选弓形虫速殖子 cDNA 文库[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, (01): 7-10.
- [16] 杨秋林, 陆惠民, 邬敏辰, 等. 弓形虫昆山分离株速殖子期表达型 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, (05): 25-27.
- [17] 王建民, 张伟, 陈通, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫 cDNA 文库构建与表达序列标签分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, (06): 1357-1362.
- [18] 李有全, 罗建勋, 高金亮, 等. 吕氏泰勒虫 cDNA 表达文库的构建及其抗原基因的免疫筛选[J]. 中国农业科学, 2009, (01): 331-339.
- [19] 陈启军, 李德昌, 闫仲堂. 吉氏巴贝斯虫 cDNA 文库的构建[J]. 中国兽医学报, 1995, (01): 38-42.
- [20] RUEF B J, DOWLING S C, CONLEY P G, et al. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 105(1): 1-12.
- [21] 刘琴. 东方巴贝斯虫 cDNA 文库构建及其应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [22] GUAN G Q, MOREAU E, BRISSEAU N, et al. Determination of erythrocyte susceptibility of Chinese sheep (Tan mutton breed) and French sheep (Vendéen breed) to *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) by in vitro culture [J]. *Vet Parasitol*, 2010, 170(1-2): 37-43.
- [23] GUAN G Q, MOREAU E, LIU J L, et al. BQP35 is a novel member of the intrinsically unstructured protein (IUP) family which is a potential antigen for the sero-diagnosis of *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) infection [J]. *Vet Parasitol*, 2012, 187(3-4): 421-430.
- [24] GUAN G Q, CHAUVIN A, YIN H, et al. Course of infection by *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) and *B. divergens* in sheep depends on the production of IFN-

- gamma and IL10 [J]. *Parasite Immunol*, 2010, 32 (2): 143-152.
- [25] GULLO C A, TEOH G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question [J]. *Immunol Lett*, 2004, 94(1-2): 1-10.
- [26] BUCHANAN K L. Stress and the evolution of condition-dependent signals [J]. *Trends Ecol Evol*, 2000, 15(4): 156-160.
- [27] KUMAR R, MUSIYENKO A, BARIK S. The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin [J]. *Malar J*, 2003, 2: 30.
- [28] ECHEVERRIA P C, MATRAJT M, HARB O S, et al. *Toxoplasma gondii* Hsp90 is a potential drug target whose expression and subcellular localization are developmentally regulated [J]. *J Mol Biol*, 2005, 350(4): 723-734.
- [29] BAUM J, RICHARD D, HEALER J, et al. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (8): 5197-5208.
- [30] DOBROWOLSKI J M, CARRUTHERS V B, SIBLEY L D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii* [J]. *Mol Microbiol*, 1997, 26 (1): 163-173.
- [31] GASKINS E, GILK S, DEVORE N, et al. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii* [J]. *J Cell Biol*, 2004, 165 (3): 383-393.
- [32] DUNKER A K, LAWSON J D, BROWN C J, et al. Intrinsically disordered protein [J]. *J Mol Graph Model*, 2001, 19(1): 26-59.
- [33] DYSON H J, WRIGHT P E. Intrinsically unstructured proteins and their functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(3): 197-208.
- [34] JANOO R, MUSOKE A, WELLS C, et al. A Rab1 homologue with a novel isoprenylation signal provides insight into the secretory pathway of *Theileria parva* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 102 (1): 131-143.
- [35] ZHOU J, MULENGA A, YAMASAKI M, et al. *Babesia gibsoni*: molecular cloning and characterization of Rab6 and Rab11 homologues [J]. *Exp Parasitol*, 2002, 101(4): 210-214.
- [36] STENMARK H, OLKKONEN V M. The Rab GT-Pase family [J]. *Genome Biol*, 2001, 2 (5): REVIEWS3007.
- [37] TEBELE N, SKILTON R A, KATENDE J, et al. Cloning, characterization, and expression of a 200-kilodalton diagnostic antigen of *Babesia bigemina* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2240-2247.
- [38] PETTER M, LEE C C, BYRNE T J, et al. Expression of *P. falciparum* var genes involves exchange of the histone variant H2A.Z at the promoter [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(2): e1001292.
- [39] DALMASSO M C, ONYANGO D O, NAGULESWARAN A, et al. *Toxoplasma* H2A variants reveal novel insights into nucleosome composition and functions for this histone family [J]. *J Mol Biol*, 2009, 392(1): 33-47.
- [40] GARDNER M J, BISHOP R, SHAH T, et al. Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes [J]. *Science*, 2005, 309 (5731): 134-137.
- [41] BRAYTON K A, LAU A O, HERNDON D R, et al. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(10): 1401-1413.
- [42] PAIN A, RENAULD H, BERRIMAN M, et al. Genome of the host-cell transforming parasite *Theileria annulata* compared with *T. parva* [J]. *Science*, 2005, 309(5731): 131-133.
- [43] MCLAUGHLIN K J, JENKINS J L, KIELKOPF C L. Large favorable enthalpy changes drive specific RNA recognition by RNA recognition motif proteins [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(9): 1429-1431.
- [44] MARIS C, DOMINGUEZ C, ALLAIN F H. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression [J]. *FEBS J*, 2005, 272(9): 2118-2131.
- [45] CLERY A, BLATTER M, ALLAIN F H. RNA recognition motifs: boring? Not quite [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2008, 18(3): 290-298.