

微小隐孢子虫 *Cp16* 基因真核表达载体的构建及其免疫保护性研究

肖 丹,殷 驰,李建华,官鹏涛,张西臣

(吉林大学 畜牧兽医学院,吉林 长春 130062)

【摘 要】 **【目的】**构建微小隐孢子虫黏附蛋白相关基因 *Cp16* 的真核表达载体 pVAX1-*Cp16*,并检测其对小鼠的免疫保护效果。**【方法】**用 PCR 方法扩增微小隐孢子虫 *Cp16* 基因,构建其真核表达载体 pVAX1-*Cp16*,并用脂质体介导法将其转染 Hela 细胞,用间接免疫荧光技术、SDS-PAGE 及 Western-blot 检测 *Cp16* 蛋白在转染细胞中的表达情况;分别用真核表达载体 pVAX1-*Cp16*、pVAX1 空载体及 PBS 肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,共免疫 3 次,检测血清 IgG 抗体水平及 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞亚群的变化,并用微小隐孢子虫卵囊感染免疫小鼠(剂量为 1×10^6 个/只),研究真核表达载体 pVAX1-*Cp16* 对隐孢子虫感染小鼠的免疫保护作用。**【结果】**成功构建了 pVAX1-*Cp16* 真核表达载体;Western-blot 和间接免疫荧光检测结果显示,*Cp16* 基因可以在 Hela 细胞中表达,且表达产物具有反应原性。pVAX1-*Cp16* 免疫小鼠(试验组)血清中抗体水平及 CD4⁺ 与 CD8⁺ T 细胞数目比值升高,与各对照组(pVAX1 和 PBS 对照组)相比差异显著($P < 0.05$)。各组小鼠经口感染微小隐孢子虫卵囊后,试验组与各对照组相比,卵囊排出量均减少了 63.97%,持续排出卵囊时间缩短了 2 d。**【结论】**构建了微小隐孢子虫黏附蛋白相关基因 *Cp16* 的真核表达载体 pVAX1-*Cp16*,其能刺激机体产生一定的免疫保护作用。

【关键词】 隐孢子虫;*Cp16* 基因;真核表达质粒;免疫保护性

【中图分类号】 S852.72⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)12-0025-06

Construction of eukaryotic expression vector of *Cryptosporidium parvum* *Cp16* gene and its immunoprotective effect

XIAO Dan, YIN Chi, LI Jian-hua, GONG Peng-tao, ZHANG Xi-chen

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, JiLin 130062, China)

Abstract: **【Objective】**In this study, the eukaryotic vector pVAX1-*Cp16* was constructed by PCR, and its in vivo efficacies were tested in BALB/c mice. **【Method】**The DNA sequence of *Cryptosporidium parvum* adhesion gene(*Cp16*) was amplified and then cloned into pVAX1 vector to form the recombinant plasmids pVAX1-*Cp16*. Hela cells were transfected by plasmid pVAX1-*Cp16* with lipofection strategy. Recombinant protein expression from the plasmid in HeLa cells was confirmed by indirect immunofluorescence staining and Western-blot analysis. The plasmid pVAX1-*Cp16*, pVAX1 and PBS was respectively used to immunize BALB/c mouse by injection in thigh muscle. Two weeks after the third immunization, the humoral and cellular responses BALB/c in each group were tested and approximately challenged with 1×10^6 oocysts to observe the immunoprotective efficacy. **【Result】**The results showed that the *Cp16* protein has been successfully expressed in Hela cells which was detected by Immunofluorescence staining or Western-blot with coat anti-*C. parvum* serum. The results indicated that the group of pVAX1-*Cp16* elicited signifi-

* [收稿日期] 2010-10-29

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(20007BAD40B05);国家“863”计划重点支持项目(2006AA10A207)

[作者简介] 肖 丹(1981—)女,吉林省白山市人,在读博士,主要从事人兽共患寄生虫病研究。E-mail:xd7403@sina.com

[通信作者] 张西臣(1965—)男,山东省菏泽市人,教授,博士生导师,主要从事人兽共患寄生虫病研究。

E-mail:zhangxichen2008@yahoo.com.cn

cant antibody responses and specific cellular responses when compared to control mice that received vector only or PBS($P<0.05$). The experiment that the BALB/c mice were inoculated with *C. parvum* oocysts showed pVAX1-Cp16 had immuno-protective effect on *C. parvum* infection in mice. The amount of evacuated oocysts in experiment group was decreased by 63.97%, Oocyst discharge shortened by two days. 【Conclusion】 The eukaryotic vector pVAX1-Cp16 was constructed and it could provide partial immune protection against *Cryptosporidium parvum* challenge.

Key words: *C. parvum*; Cp16 gene; eukaryotic expression plasmid; immunoprotectiveness

隐孢子虫病是由微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)引起的一种人兽共患寄生性原虫病^[1],该病自 1975 年报道以来,已有 200 余种药物被试用,但至今尚无有效防治方法^[2]。免疫预防已成为防治隐孢子虫病主要的研究方向,其关键在于了解候选靶抗原的结构和功能特性^[3]。有研究表明,隐孢子虫卵囊表面蛋白,如 GP900,CSL, gp40(或 gp45、S45),gp15(或 Cp17、S16),p23(或 p27)和 Cp12 等^[4-7],具有高免疫原性,可以诱导保护性免疫。随着分子生物学技术在寄生虫学领域的广泛应用,隐孢子虫疫苗候选分子的鉴定、基因克隆及表达等研究取得了较快进展^[8]。国内姚龙泉等^[9]构建了微小隐孢子虫 T7 噬菌体展示文库,并利用犊牛小肠上皮细胞筛选了黏附相关基因(Cp12),为了解候选靶抗原的结构和功能奠定了基础。Cp16 基因是作者采用 Caco2 细胞黏附筛选隐孢子虫核糖体展示文库时,获得的黏附相关基因序列,为了进一步研究其对隐孢子虫的免疫效果,本研究构建了 Cp16 基因的真核表达载体,并通过肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠,观察其对隐孢子虫的免疫保护作用,以期对微小隐孢子虫核酸疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

牛源微小隐孢子虫卵囊、大肠杆菌 DH5 α 、Hela 细胞、微小隐孢子虫基因组 DNA、真核表达载体 pVAX1、羊抗微小隐孢子虫免疫血清等,由吉林大学畜牧学院寄生虫研究室保存;pMD-18-T 载体、EcoR I 和 Hind III 酶,购自大连宝生物工程有限公司;无内毒素质粒抽提纯化试剂盒、FAS、兔抗山羊 IgG-HRP、T4 DNA 连接酶等,购于 Takala 公司;DNA 分子量 Marker、蛋白分子量 Marker,购于 MBI 公司;BALB/c 小鼠购于长春生物制品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Cp16 基因的扩增 根据 Cp16 基因核苷酸

序列,设计 1 对含有 EcoR I 和 Hind III 酶切位点的引物,P1: 5'-GTATACGAATTCATGGGAGGAAACAGCGGACC-3';P2:5'-GGCCGAAAGCTTAAACCATGATAAAAAGC-3',从隐孢子虫基因组中扩增 Cp16 基因。引物由上海生工生物有限公司合成。PCR 反应体系为 100 μ L:10 $\times$ PCR buffer 10 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 8 μ L, P1、P2 (100 μ mol/L) 各 1 μ L,隐孢子虫基因组 DNA(2 μ g)1 μ L,LA Taq (10 U/ μ L) 1 μ L,加 dH₂O 至 100 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,54 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,终止反应。扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

1.2.2 PCR 产物的 TA 克隆 将回收纯化的 Cp16 片段 PCR 产物连接到 pMD-18-T 载体上,转化至 DH5 α 感受态细胞中,接种含 X-gal (40 μ g/mL)、IPTG(0.5 mmol/L)及 Amp(100 μ g/mL)的琼脂平板上进行筛选,挑取白色菌落,接种于含 Amp(100 μ g/mL)的 6 mL LB 液体培养基培养。采用无内毒素质粒抽提纯化试剂盒提取质粒 DNA,分别进行 PCR 及 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定,并挑选阳性克隆质粒送上海生工测序,将测得的序列用 BLAST 软件与 GenBank 报道的序列进行比较。

1.2.3 真核重组质粒 pVAX1-Cp16 的构建 采用无内毒素质粒抽提纯化试剂盒,分别提取 pVAX1 质粒和 Cp16 TA 克隆质粒,用 EcoR I 和 Hind III 双酶切后,在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳。切胶回收酶切后的 pVAX1 片段和 Cp16 片段,用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,构建 pVX1-Cp16,将反应体系全部转化大肠杆菌 DH5 α ,涂布含 Kan(100 μ g/mL)、X-gal(40 μ g/mL)及 IPTG(0.5 mmol/L)的琼脂平板上进行筛选,挑取白色菌落接种于含 Kan(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基培养。提取重组质粒 pVAX1-Cp16,分别进行 PCR 及 EcoR I 和

Hind III 双酶切鉴定。

1.2.4 真核重组质粒 pVAX1-*Cp16* 转染 HeLa 细胞 将 HeLa 细胞按 3×10^5 个/孔的量接种于 6 孔板中,培养 24 h 使其融合度达到 60%~70% 备用。取真核重组质粒 pVAX1-*Cp16* 5~10 μg ,加入无血清 1640 培养基至总体积为 500 μL ,混匀后温育 30 min;另取 2 mg/mL 脂质体 10 μL ,加入无血清 1640 培养基至总体积为 500 μL ,混匀后温育 30 min。将质粒和脂质体混合物(1 000 μL)加入到备用的 HeLa 细胞中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 10~12 h 后,补加 3 mL 含体积分数 10% FAS 的 1640 细胞培养液培养,转染后 30 h 取样,用间接免疫荧光法检测目的蛋白 *Cp16* 在 HeLa 细胞中的瞬时表达情况。同时设立 pVAX1 空载体质粒转染 HeLa 细胞及正常的 HeLa 细胞作为阴性对照组。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析 转染后 72 h,更换无血清 1640 培养基为 G418 选择培养基进行筛选。约 1 周后,试验组有阳性克隆形成,待其增大后扩大培养,并分别将转染 pVAX1-*Cp16*、pVAX1 及未转染的 HeLa 细胞裂解产物,进行 SDS-PAGE 和 Westen-blot 分析,具体操作参照文献[10]的方法进行。山羊抗隐孢子虫免疫血清按体积比 1 : 2 000 倍稀释,兔抗山羊 IgG-HRP 按体积比 1 : 2 500 倍稀释,用 DAB 显色。

1.2.6 试验动物的分组与免疫 将供试小鼠随机分成 3 组(每组 20 只),其中质粒 pVAX1 对照组和重组质粒 pVAX1-*Cp16* 免疫组小鼠分别肌肉注射免疫空载体 pVAX1 及 pVAX1-*Cp16* 100 μg /只(质粒与司

苯甘油佐剂体积比为 1 : 0.5),PBS 对照组肌肉注射 PBS 100 μL /只,共免疫 3 次,每次间隔 2 周。

1.2.7 小鼠血清 IgG 抗体及 CD4^+ 和 CD8^+ T 细胞亚群的测定 分别于首免前及每次免疫后的 14 d,各组随机取 10 只小鼠,尾静脉采血,收集血清备检。以微小隐孢子虫卵囊裂解抗原包被反应板(5 μg /孔),用 ELISA 法测血清 IgG 抗体滴度,二抗为 HRP 标记山羊抗鼠 IgG(1 : 5 000 稀释)。第 3 次免疫后 2 周,取小鼠脾脏,加 2 mL PBS,在孔径 0.55 mm 网筛上研磨,用流式细胞仪测定研磨后液体中的 T 淋巴细胞亚群数目。

1.2.8 免疫保护性试验 第 3 次免疫 2 周后,将各组剩余的 10 只 BALB/c 小鼠灌胃接种微小隐孢子虫卵囊,接种量为 1×10^6 个/只。于接种后第 3,5,7,⋯,23 天收集小鼠粪便,称质量,并采用蔗糖密度梯度离心法提取、纯化粪便中的卵囊,检测卵囊排出情况,计算平均每克粪便中的卵囊数。

2 结果与分析

2.1 *Cp16* 基因的扩增

Cp16 基因 PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,在约 400 bp 左右出现明显的条带,未见非特异扩增条带(图 1),与理论预测结果相符。

2.2 重组质粒 pMD-18-T-16 的双酶切鉴定及 DNA 序列分析

重组质粒 pMD-18-T-16 的双酶切鉴定结果见图 2。

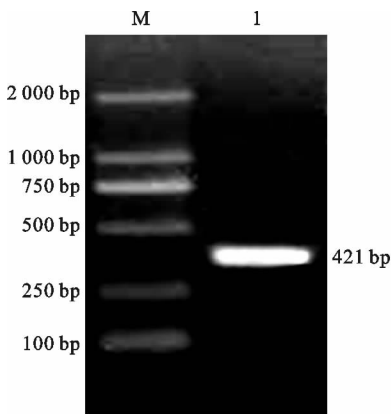


图 1 微小隐孢子虫 *Cp16* 基因的 PCR 扩增产物电泳结果

M. DNA 标准 DL2000;1. *Cp16* 基因扩增产物

Fig. 1 The electrophoretic analysis result of *C. parvum* *Cp16* gene amplified by PCR

M. DNA MarkerDL 2000;1. PCR product of *Cp16* gene

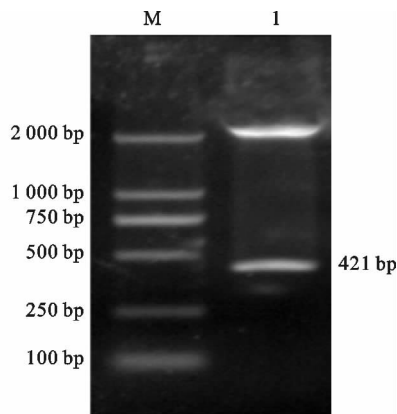


图 2 微小隐孢子虫 *Cp16* 基因重组质粒 pMD-18-T-16 的双酶切鉴定结果

M. DNA 标准 DL2000;1. pMD-18-T-16

Fig. 2 Identification of the pMD-18-T-16 plasmid of *C. parvum* *Cp16* gene by restriction enzyme digestion

Lane M. DNA MarkerDL 2000;Lane 1. pMD-18-T-16

由图 2 可知,重组质粒 pMD-18-T-16 经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切后,在 400 bp 左右产生 1 条明显的条带,与 *Cp*16 基因 PCR 产物的长度一致。将测得的 *Cp*16 序列(GenBank 号:AAEE01000002)与 GenBank 报道的序列进行比较,同源性为 100%。说明微小隐孢子虫 *Cp*16 基因已成功插入 pMD-18-T-16 质粒中。

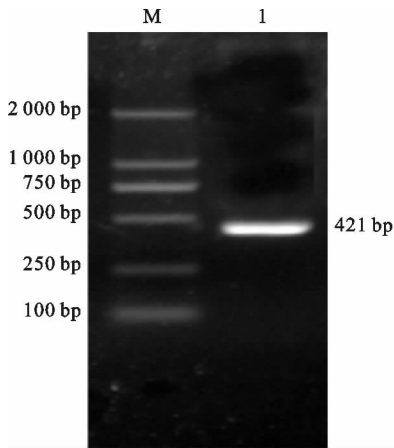


图 3 微小隐孢子虫 *Cp*16 基因重组质粒 pVAX1-Cp16 的 PCR 鉴定结果

M, DNA 标准 DL2000;1. pVAX1-Cp16

Fig. 3 Identification of the pVAX1-Cp16 plasmid of *C. parvum* *Cp*16 gene by PCR

M, DNA Marker DL 2000;1. pVAX1-Cp16

2.4 Cp16 蛋白表达的间接免疫荧光检测

结果显示,真核表达载体 pVAX1-Cp16 转染的 Hela 细胞表面有绿色荧光,而空质粒 pVAX1 转染

2.3 真核表达载体 pVAX1-Cp16 的 PCR 及酶切鉴定

PCR 鉴定结果显示,扩增到 400 bp 左右的条带(图 3),与目的片段长度一致。*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切鉴定结果显示,得到了 2 500 和 400 bp 左右的 2 条片段(图 4),说明目的基因片段已成功地克隆到 pVAX1 载体上。

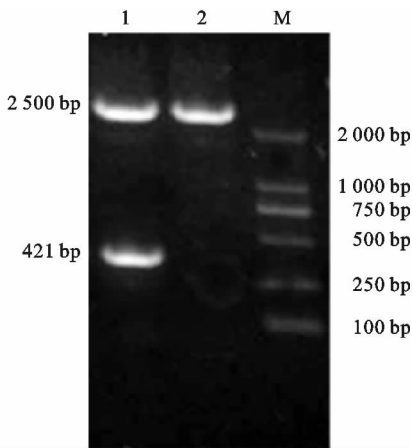


图 4 微小隐孢子虫 *Cp*16 基因重组质粒 pVAX1-Cp16 的双酶切鉴定结果

M, DNA 标准 DL 2000;1. pVAX1-Cp16;2. pVAX1

Fig. 4 Identification of the pVAX1-Cp16 plasmid of *C. parvum* *Cp* 16 gene by restriction enzyme digestion

M, DNA MarkerDL 2000;1. pVAX1-Cp16;2. pVAX1

的 Hela 细胞和正常 Hela 细胞表面均无绿色荧光(图 5)。

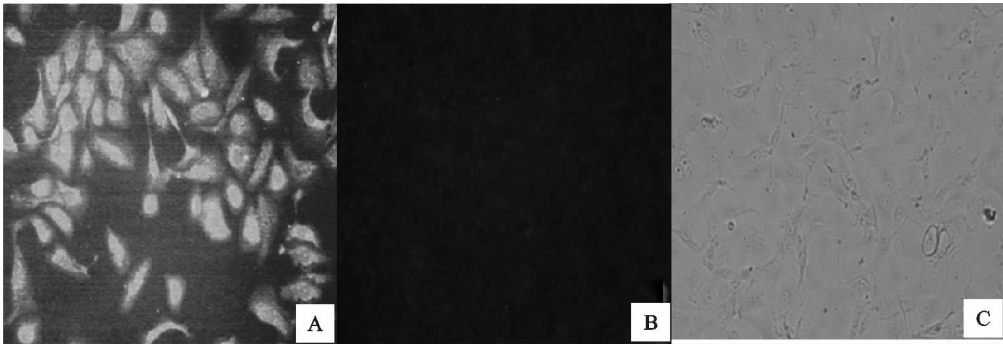


图 5 转染 Hela 细胞内 *Cp*16 蛋白表达的间接免疫荧光检测

A. pVAX1-Cp16 转染的 Hela 细胞;B. pVAX1 转染的 Hela 细胞;C. 正常的 Hela 细胞

Fig. 5 Detection of protein expression in transfected Hela cells by indirect immunofluorescence assay

A. Hela cells transfected by pVAX1-Cp16;B. Hela cells transfected by pVAX1;C. Normal Hela cell

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析

分别将转染 pVAX1-Cp16、pVAX1 及未转染的 Hela 细胞裂解产物进行 SDS-PAGE 和 Westen-blot

分析。结果显示,pVAX1-Cp16 质粒转染 Hela 细胞的裂解产物在约 16 ku 处有特异性蛋白条带出现(图 6),该蛋白能被山羊抗微小隐孢子虫高免疫血

清识别(图 7),且条带分子质量大小与预测值相符,而 pVAX1 质粒转染 HeLa 细胞及未转染 HeLa 细胞的裂

解产物无特异性条带。说明 *Cp16* 基因可在 HeLa 细胞中表达,且表达产物具有良好的反应原性。

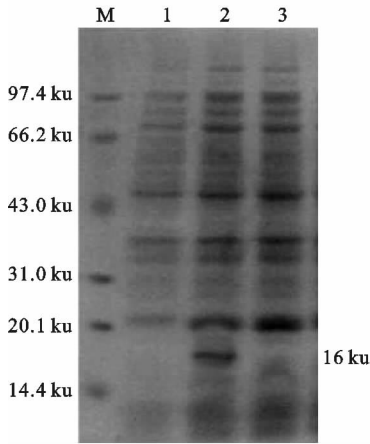


图 6 *Cp16* 基因在 HeLa 细胞中表达产物的 SDS-PAGE 分析
M. 低分子质量蛋白 Marker;1. 未转染 HeLa 细胞裂解产物;

2. pVAX1-Cp16 质粒转染 HeLa 细胞裂解产物;
3. pVAX1 质粒转染 HeLa 细胞裂解产物

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the *Cp16* gene expressed in HeLa cells

- M. Low MW protein Marker;1. Lysis of normal HeLa cell;
2. Lysis of HeLa cells transfected with the pVAX1-Cp16;
3. Lysis of HeLa cells transfected with the pVAX1 plasmid

2.6 免疫小鼠血清中特异性抗体 IgG 的检测

由图 8 可看出,pVAX1-Cp16 重组质粒免疫组小鼠首次免疫后血清 IgG 水平变化不大;第 2 次免疫后抗体水平逐渐上升;第 3 次免疫后小鼠血清中特异性 IgG 水平与 pVAX1 对照组和 PBS 对照组差异极显著 ($P<0.01$),而 pVAX1 对照组与 PBS 对照组小鼠血清中特异性 IgG 水平差异不显著 ($P>0.05$)。

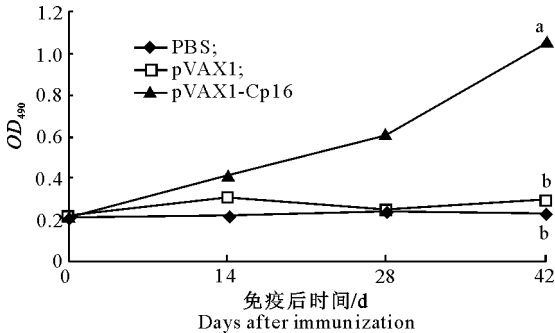


图 8 免疫小鼠血清中特异性抗体 IgG 的 ELISA 检测
不同小写字母表示差异极显著 ($P<0.01$);
相同小写字母表示差异不显著 ($P>0.05$)

Fig. 8 IgG titers determined by ELISA in the sera of immunized mice

The different small letters mean significant difference extremely ($P<0.01$);the same small letters mean no significant difference ($P>0.05$)

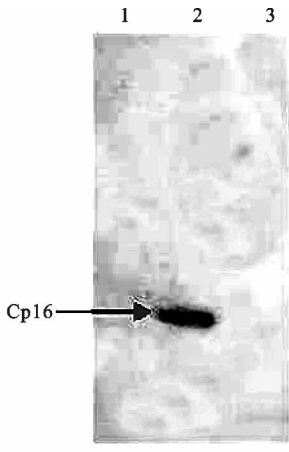


图 7 *Cp16* 基因在 HeLa 细胞中表达产物的
Western-blot 分析

1. pVAX1 质粒转染 HeLa 细胞裂解产物;2. pVAX1-Cp16 质粒转染 HeLa 细胞裂解产物;3. HeLa 细胞裂解产物

Fig. 7 Western-blot analysis of the *Cp16* gene expressed in HeLa cells

1. Lysis of HeLa cells transfected with the pVAX1 plasmid;
2. Lysis of HeLa cells transfected with the pVAX1-Cp16;
3. Lysis of normal HeLa cell

2.7 免疫小鼠 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞亚群的测定

由表 1 可知,第 3 次免疫后,pVAX1-Cp16 组小鼠 T 淋巴细胞亚群发生显著变化, $CD4^+$ T 细胞比例及 $CD4^+$ 与 $CD8^+$ T 细胞数比值 ($CD4^+/CD8^+$) 与空载体 pVAX1 组、PBS 组差异均显著 ($P<0.05$),而 pVAX1 组与 PBS 组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞比例及 $CD4^+/CD8^+$ 差异均不显著。

表 1 pVAX1-Cp16 免疫小鼠脾脏 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞亚群的变化

Table 1 The kinetic changes of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocyte subgroup of BALB/c mice in group immunization with pVAX1-Cp16

组别 Group	$CD4^+/\%$	$CD8^+/\%$	$CD4^+/CD8^+$
pVAX1-Cp16	52.25 $\pm$ 1.62 a	15.32 $\pm$ 2.31 b	3.41 a
pVAX1	26.03 $\pm$ 2.04 b	13.38 $\pm$ 2.31 b	1.95 b
PBS	27.54 $\pm$ 1.29 b	13.10 $\pm$ 1.45 b	2.06 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著。

Note: Different small letters in the same columne mean significant difference ($P<0.05$)

2.8 pVAX1-Cp16 对小鼠免疫保护效果的检测

由图 9 可以看出,用微小隐孢子虫卵囊对各组小鼠攻虫(剂量为 1×10^6 个/只),pVAX1 及 PBS 对照组的小鼠从攻虫后第 3 天开始排出卵囊,第 13 天达高峰,之后逐渐下降,到 23 d 时粪便中查不出

卵囊;pVAX1-Cp16 免疫组小鼠从攻虫后第 3 天开始排出卵囊,第 11 天到达高峰,之后逐渐下降,到 21 d 时粪便中查不出卵囊。与 pVAX1 和 PBS 对照组相比,pVAX1-Cp16 免疫组卵囊总排出量均减少了 63.97%,差异达显著水平($P<0.05$),且卵囊持续排出时间缩短了 2 d。

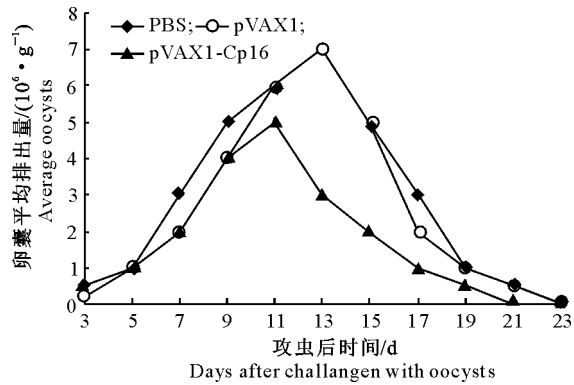


图 9 pVAX1-Cp16 对小鼠的免疫保护效果

Fig. 9 Immunoprotective effect of the mice immunized with pVAX1-Cp16

3 讨 论

核酸疫苗可诱导机体产生全面的免疫应答,并且对不同亚型的病原体具有交叉防御作用,同时又具有安全、可靠、生产方便等优点,很多学者在核酸疫苗的研究上进行了大量探索^[11]。目前,已有多种针对寄生虫的核酸疫苗问世,并在多种试验动物中取得了良好的免疫效果,其中疟原虫核酸疫苗已被批准进入Ⅱ期临床试验,但对隐孢子虫核酸疫苗的研究还处于起步阶段^[12]。陶艳琳等^[13]报道,隐孢子虫保护性抗原的真核表达质粒可减轻隐孢子虫感染后的卵囊排出量。薛霞等^[14]将 *Cpgp40/15* 基因插入载体 pXAX1 中,用 pVAX1Cpgp40/15 重组质粒 DNA 免疫小鼠,结果发现重组质粒可诱导机体发生细胞及体液免疫应答,产生一定的免疫保护力。何宏轩等^[15]将 *gp15* 基因插入载体 pCR3.1(+)中,构建重组载体 pCR-gp15,用其免疫小鼠可诱导机体产生细胞及体液免疫,攻虫感染后试验组小鼠卵囊排出量减少了 70% 左右,卵囊持续排出时间缩短了 4 d ($P<0.05$)。

Cp16 基因是笔者采用 Caco2 细胞黏附筛选隐孢子虫核糖体展示文库时获得的黏附相关基因序列,经搜索 GenBank 和隐孢子虫数据库证实,其为隐孢子虫的一个含有信号肽和 1 个跨膜区的新基因,该基因含有 1 个阅读框架,长度为 421 bp,编码

135 个氨基酸(蛋白质分子质量为 16 ku)。免疫荧光定位试验证实,Cp16 是一个膜分子,具有较好免疫原性,这与生物信息学分析结果一致,其基因可以作为疫苗候选基因。在本试验中,作者构建了 *Cp16* 基因真核表达载体(pVAX1-Cp16)用,其免疫小鼠可产生较高的体液免疫和细胞免疫水平,3 次免疫后小鼠卵囊排出量减少了 63.97%,卵囊持续排出时间缩短了 2 d。表明 pVAX1-Cp16 核酸疫苗能刺激机体产生一定的免疫保护作用,但是不能完全抑制卵囊感染,因此还需要在抗隐孢子虫感染的免疫机制方面作进一步的研究。

[参考文献]

[1] Tyzzer E E. *Cryptosporidium parvum*, a coccidium found in the small intestine of the common mouse [J]. Arch Protistenkd,1912,26:348-351.

[2] MacKenzie W R. An of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool [J]. Epidemiol-Infect,1995,115:545-553.

[3] Arrowood M J, Sterling C R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients [J]. Parasitol,1987,73:314-319.

[4] Watts A M, Kennedy R C. DNA vaccination strategies against infectious diseases [J]. Int Parasitol,1999,29(8):1149-1163.

[5] Sagodira S, Iochmann S, Mevelec M N, et al. Nasal immunization of mice with *Cryptosporidium parvum* DNA induces systemic and intestinal immune responses [J]. Parasitol immunol,1997,35:217-238.

[6] 徐卫东,孔庆昌,张西臣,等.微小隐孢子虫 cDNA 文库的构建及 *P23*/*CP15/60* 基因的克隆 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,20(5):281-284.

Xu W D, Kong Q C, Zhang X C, et al. Construction of *Cryptosporidium parvum* cDNA library and cloning of *P23*/*CP15/60* [J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, 2002,20(5):281-284. (in Chinese)

[7] Toyoguchi A, Omata Y, Koyama T, et al. Specific IgA antibody response to coproantigens of *Cryptosporidium parvum* in serum and saliva of calves after experimental infection [J]. Vet Parasitol,2001,96(3):213-220.

[8] Jenkins, M C, Brien, C O, Trout, J, et al. Hyper immune bovine colostrum specific for recombinant *Cryptosporidium parvum* antigen confers partial protection against cryptosporidiosis in immuno suppressed adult mice [J]. Vaccine, 1999, 17: 2453-2460.

[9] 姚龙泉,尹继刚,张西臣,等.微小隐孢子虫 T7 噬菌体展示文库的构建 [J]. 中国人兽共患病学报,2006,22(1):27-28.

Yao L Q, Yin J G, Zhang X C, et al. Construction of T7 phage display library from *Cryptosporidium parvum* [J]. Chinese Journal of Zoonoses,2006,22(1):27-28. (in Chinese)