

网络出版时间:2013-07-18 16:05

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130718.1605.034.html>

微小隐孢子虫 cDNA 文库的构建与免疫学筛选

高依然, 张 静, 韩福松, 陆慧君, 姜 宁, 陈启军, 尹继刚

(吉林大学 人兽共患病研究所, 人兽共患病研究教育部重点实验室, 吉林 长春 130062)

【摘 要】 【目的】构建微小隐孢子虫 cDNA 文库, 以筛选出可替代天然抗原用于诊断的重组抗原。【方法】首先纯化微小隐孢子虫卵囊, 用 Trizol Reagent 提取总 RNA, 构建全长 cDNA; 分别用蛋白酶 K 与 *Sfi* 消化、酶切处理 cDNA, 采用 Column Spin H-1000 分离柱分离 cDNA, 连接 λ TriplEx2 载体, 构建 cDNA 文库。扩增 cDNA 文库, 用兔抗微小隐孢子虫血清作探针对 cDNA 文库进行初筛和复筛, 将复筛得到的阳性克隆连接 PMD18-T 载体, 测序后进行序列比对。【结果】微小隐孢子虫 cDNA 文库噬菌斑插入片段长度为 1.5 kb 左右, 库容大于 10^7 。经过筛选共获得了 20 个微小隐孢子虫阳性克隆, 测序后从中选出了 4 个主要免疫识别抗原蛋白, 分别为 MUCIN 蛋白、乳酸脱氢酶、微管相关蛋白和孢子抗原蛋白。【结论】成功构建了微小隐孢子虫 cDNA 文库, 并筛选出了 4 个主要免疫识别抗原蛋白, 为隐孢子虫的血清学诊断提供了重组抗原。

【关键词】 微小隐孢子虫; cDNA 文库构建; 免疫学筛选

【中图分类号】 S852.72⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)08-0007-06

Construction and immunoscreening of cDNA library of *Cryptosporidium parvum*

GAO Yi-ran, ZHANG Jing, HAN Fu-song, LU Hui-jun,
JIANG Ning, CHEN Qi-jun, YIN Ji-gang

(Laboratory for Zoonosis Research, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China)

Abstract: 【Objective】A cDNA expression library of *Cryptosporidium parvum* was constructed to select recombinant antigens which would replace the natural antigens for diagnosis of cryptosporidiosis. 【Method】*Cryptosporidium parvum* oocysts were purified by percoll centrifugation. Total RNA was extracted with Trizol Reagent for constructing cDNA with full-length. cDNA was digested with proteinase K and *Sfi* and separated with Column Spin H-1000. cDNA was ligated into λ TriplEx2 vector to construct the expression library. The library was amplified and screened with rabbit anti-*Cryptosporidium parvum* serum. Inserted fragments from positive clones were connected to PMD 18-T and sequenced for analysis. 【Result】The mean size of the inserted cDNA fragments was 1.5 kb, the capacity of the library was greater than 10^7 , and 20 positive clones of *Cryptosporidium parvum* were identified by immunological screening. Four gene sequences, including MUCIN protein, Lactate dehydrogenase, Microtubule-associated protein and Sporozoite antigen protein, were identified. 【Conclusion】*Cryptosporidium parvum* cDNA expression library was successfully constructed and screened, and four candidate immunodominant proteins were identified which would be used for diagnosis of cryptosporidiosis.

* [收稿日期] 2012-11-23

[基金项目] 国家“十一五”传染病重大专项(2008ZX10004-011); 国家自然科学基金项目(31025025, 31272549)

[作者简介] 高依然(1987—), 女, 山西大同人, 在读硕士, 主要从事预防兽医学公共卫生研究。

E-mail: GAOYIRAN1987@163.com

[通信作者] 尹继刚(1969—), 男, 吉林长春人, 教授, 主要从事隐孢子虫病研究。E-mail: yinjg0924@sina.com

Key words: *Cryptosporidium parvum*; cDNA library construction; immunological screening

隐孢子虫(*Cryptosporidium*)属顶复门原虫,从致病性方面分类这种寄生虫属于机会性原虫,虫体主要寄生于胃肠道上皮细胞的微绒毛边缘,感染宿主后症状表现轻重不一^[1]。隐孢子虫是公认的引起发展中国家儿童腹泻的重要病原之一^[2],也是艾滋病患者和免疫力低下者主要的致死原因^[3]。目前已发现的隐孢子虫种有 24 个,其中感染人的主要虫种为微小隐孢子虫(*C. parvum*)和人隐孢子虫(*C. hominis*)^[4]。美国将微小隐孢子虫列为 B 类生物武器。隐孢子虫病缺乏明显的临床特征,与其他病原体引起的肠炎相比,在症状和体征上无明显区别^[5]。目前,检测隐孢子虫的方法主要有病原学、免疫学和分子生物学方法,其中病原学方法费时、费力,镜检敏感性差、干扰因素多;分子生物学方法对仪器要求较高,不宜普及;免疫学方法具有较高的特异性和敏感性,适用于临床诊断与流行病学调查。但国内目前尚无标准化的重组抗原诊断试剂盒,急需寻找新的敏感且特异的重组抗原。为此,本试验构建了微小隐孢子虫 cDNA 文库,并对 cDNA 文库进行了免疫学筛选,旨在为隐孢子虫病的免疫学诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 虫株与菌株 牛源微小隐孢子虫株(4℃保存)、大肠埃希菌 XL-Blue 和感受态大肠埃希菌 DH5 α 由本研究室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 SMART cDNA Library Construction Kit 试剂盒购自 Clontech 公司,Trizol 购自 Invitrogen 公司,凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司,PMD18-T 载体、ExTaq、dNTPs、Sfi、BSA、Tween-20 购自 TaKaRa 公司,异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)为 Amresco 公司产品,琼脂糖为 Promega 公司产品,蛋白胨和酵母提取物为 Oxoid 公司产品,氯仿、异丙醇、体积分数 70%乙醇等常用试剂均为国产分析纯。主要仪器有 PCR 仪(ABI 9700),水平摇床(北京六一仪器厂)和凝胶成像仪(Benchtop UV transilluminator)。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 微小隐孢子虫卵囊的纯化 将纯化的保存于 25 g/L 重铬酸钾溶液中的微小隐孢子虫卵囊,

2 500 g 离心 10 min,弃掉上清液,向沉淀中加入 2 倍体积的生理盐水和 1 倍体积的乙酸乙酯,振荡 1 min,静置 10 min,加质量分数 5%的次氯酸钠杀菌 25 min,沉淀过 percoll 梯度液,2 500 g 离心 30 min,离心后最上层凝固状物即为卵囊,取 1 滴镜检。

1.2.2 总 RNA 的提取与 cDNA 文库的构建 取微小隐孢子虫卵囊于液氮预冷研钵中,研磨成粉末,移到含 1 mL Trizol 的离心管内,室温放置 5 min,加 200 μ L 氯仿,振荡后 14 000 r/min 离心 5 min;取上清液 700 μ L,加 560 μ L RNA 沉淀缓冲液,4℃、10 000 g 离心 10 min,弃上清液,用 DEPC 处理水溶解沉淀 RNA,加 200 μ L 氯仿/酚混合液,剧烈振荡,14 000 r/min 离心 5 min,取上清液加入 600 μ L 无水乙醇,冰浴,14 000 r/min 离心 5 min,取上清液,加入 1 mL 体积分数 70%乙醇,于超净工作台中吹干。分别取 1 和 2 μ L 总 RNA 进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,再取 1 μ L 总 RNA 用紫外分光光度法测定 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀。

cDNA 文库构建采用 SMART cDNA Library Construction Kit 试剂盒进行,取 1 μ g RNA 反转录合成 cDNA 第一链,取 2 μ L cDNA 第一链产物合成 cDNA 第二链,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:2 μ L 第一链产物,2 μ L CDS III/3' PCR Primer,2 μ L 5' PCR Primer,2 μ L 10 mmol/L dNTP,1 μ L 10 $\times$ Extending Reagent,10 μ L 10 $\times$ Advatage2 Buffer,2 μ L 50 $\times$ Advatage2 DNA polymerase 和 71 μ L ddH₂O;PCR 反应程序为:96℃ 1 min;96℃ 10 s,68℃ 6 min,18 个循环。取 5 μ L PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,检测合成的 cDNA 质量。分别用蛋白酶 K 及 Sfi 消化、酶切处理 PCR 产物,过 Column Spin H-1000 分离柱分离 cDNA 后,连接噬菌体表达载体 λ TriplEx2,再用 Epicentre 进行体外包装,即获得 cDNA 文库。分别取 0.5,0.25,0.05,0.025,0.005,0.000 5 μ L cDNA 文库,平铺于培养基上,次日观察平皿,统计噬菌斑数量,计算库容(库容=(噬菌体斑量/体积) $\times$ 700 μ L)。为了防止原始文库滴度下降,用大肠埃希菌 XL-Blue 对 cDNA 文库进行扩增,并计算扩增后的文库滴度(扩增后文库滴度=噬菌斑数量 $\times$ 文库稀释倍数 $\times$ 10³/加入文库的库容)。然后随机挑取 20 个噬菌斑于 96 孔 PCR 板中,加 25 μ L 反应液进行 PCR 检测,PCR 反应体系为:0.5 μ L 上游引物(5'-TCCGAGATCTG-

GACGAGC-3'), 0.5 μ L 下游引物 (5'-TAATAC-GACTCACTATAGGG-3'), 0.5 μ L 10 mmol/L dNTP, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 0.5 μ L rTaq Polymerase, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序为: 96 $^{\circ}$ C 30 s; 96 $^{\circ}$ C 5 s, 54 $^{\circ}$ C 5 s, 68 $^{\circ}$ C 2.5 min, 34 个循环。文库重组率由 PCR 结果得出。将扩增后得到 cDNA 文库在 4 $^{\circ}$ C 保存于体积分数 0.3% 的氯仿中。

1.2.3 大肠埃希菌裂解液与兔抗隐孢子虫血清的制备 将大肠埃希菌 XL-Blue 接种到含 10 mmol/L MgSO₄ 和 2 g/L 麦芽糖的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇菌过夜至 OD₆₀₀ 为 2.0, 4 $^{\circ}$ C、550 g 离心 10 min。沉淀中加入 50 mmol/L Tris-HCl 和 10 mmol/L EDTA, 稀释至 OD₆₀₀ = 0.5, -80 与 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 超声(工作时间 4 s, 间歇时间 4 s, 功率 200 W, 4 $^{\circ}$ C) 裂解, -80 $^{\circ}$ C 储存, 备用。

兔抗隐孢子虫血清的制备: 将超声后获得的隐孢子虫全虫抗原, 肌肉多点注射家兔, 第 1 次与弗氏完全佐剂混合, 第 2, 3 次与不完全佐剂混合, 每隔 2 周免疫 1 次, 最后心脏采血, 37 $^{\circ}$ C 静置 1 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 吸取上清液, 3 000 r/min 离心 10 min, 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 cDNA 文库的筛选 用 10 $\times$ lambda dilution Buffer 缓冲液 (1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L MgSO₄ · H₂O, 0.35 mol/L Tris-HCl (pH 为 7.5)) 稀释 cDNA 文库, 至形成 10 000 个噬菌斑。取 2 μ L cDNA 文库与 200 μ L 大肠埃希菌 XL-Blue 混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后加入 7 mL 45 $^{\circ}$ C 的顶层琼脂, 平铺于直径 150 mm 平皿中, 42 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 这时噬菌斑长至直径 1 mm 左右。将直径为 135 mm 硝酸纤维素膜浸泡在 0.01 mol/L IPTG 中, 20 min 后平铺到上述平皿上, 做标记, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后, 揭下硝酸纤维素膜, 用 TBST 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl (pH 为 8.0)、150 mmol/L NaCl、0.05% Tween-20) 洗涤 3 次, 每次 10 min。取出硝酸纤维素膜, 置于封闭液 (含 10 g/L BSA 的 TBS) 中, 在 60 r/min 水平摇床上于室温条件下封闭 40 min, 洗膜 (方法同上)。用大肠埃希菌 XL-Blue 裂解液孵育兔抗隐孢子虫血清 (稀释倍数 1 : 50) 30 min, TBST 稀释 (稀释倍数 1 : 400), 在 60 r/min 水平摇床上于室温条件下孵育 1 h, 洗硝酸纤维素膜 (方法同上)。结合二抗: 用 TBST 稀释羊抗兔血清稀释 (稀释倍数 1 : 2 000), 在 60 r/min 水平摇床上于室温条件孵育 1 h, 洗膜 (方法同上)。显色 (底物显色剂: 1 $\times$ AP Buffer (1 mol/L Tris-HCl (pH 为 9.5)、1

mol/L NaCl、50 mmol/L MgCl₂)、NBT 75 mg/mL、BCIP 50 mg/mL) 10 min, 无菌水终止显色, 将颜色对比明显的噬菌斑, 作为初筛阳性噬菌斑。

将初筛阳性噬菌斑挑入 1 mL 10 $\times$ lambda dilution Buffer 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 保存, 再进行复筛 (方法同初筛)。随机取 20 个复筛阳性克隆, 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 0.5 μ L 上游引物 (引物序列同 1.2.2), 0.5 μ L 下游引物 (引物序列同 1.2.2), 0.5 μ L 10 mmol/L dNTP, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 0.5 μ L ExTaq DNA 聚合酶, 2.5 μ L 噬菌体 DNA, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 34 个循环。取 PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段, 将其与 PMD18-T 载体连接, 克隆后送天津华大基因科技有限公司进行测序。将测序结果用基本局部比对搜索工具 (BLAST) 进行分析, 结果得到 4 个不同的微小隐孢子虫相关蛋白质, 分别是 MUCIN 蛋白、乳酸脱氢酶、微管相关蛋白和子孢子抗原蛋白, 分析这 4 个蛋白质的基因序列, 并且根据这 4 个基因序列设计引物, 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为: 0.5 μ L 上游引物, 0.5 μ L 下游引物, 0.5 μ L 10 mmol/L dNTP, 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 0.5 μ L ExTaq DNA 聚合酶, 2.5 μ L 噬菌体 DNA, 加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 30 个循环。

2 结果与分析

2.1 微小隐孢子虫总 RNA 浓度和纯度的检测

从总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果中可观察到清晰的 28S 和 18S rRNA 条带 (图 1); OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 值为 1.92, OD₂₃₀ / OD₂₆₀ 值为 2.10, 说明提取的总 RNA 质量较好。

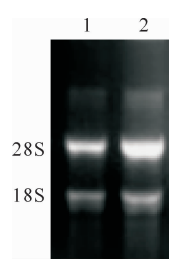


图 1 微小隐孢子虫总 RNA 的电泳图谱
1.1 μ L 总 RNA; 2.2 μ L 总 RNA
Fig. 1 Total RNA electrophoresis pattern of *Cryptosporidium parvum*
1.1 μ L total RNA; 2.2 μ L total RNA

2.2 微小隐孢子虫反转录后 cDNA 的 PCR 鉴定

PCR 检测结果显示,合成的 cDNA 长度为 1~2 kb (图 2),符合单细胞生物 cDNA 的分布。

2.3 微小隐孢子虫 cDNA 文库的库容与扩增后文库滴度

表 1 显示,微小隐孢子虫 cDNA 文库库容>10⁷,经计算扩增后 cDNA 文库滴度为 8.34×10⁹ pfu/mL。

2.4 微小隐孢子虫 cDNA 文库噬菌斑插入载体片段长度及重组率的检测

图 3 表明,cDNA 插入片段长度为 1.5 kb 左右,重组率>95%。

2.5 微小隐孢子虫阳性克隆的序列分析及 PCR 扩增结果

MUCIN 蛋白、微管相关蛋白、乳酸脱氢酶和孢子抗原蛋白基因条带清晰,长度分别为1 584,

745,534 和 489 bp,与预计长度相符(图 4)。对 4 个阳性克隆序列进行分析,结果见表 2。

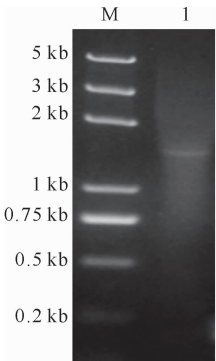


图 2 微小隐孢子虫 cDNA 的电泳图谱
M, DL5000 DNA Marker;1. 双链 cDNA

Fig.2 cDNA electrophoresis pattern of *Cryptosporidium parvum*

M, DL5000 DNA Marker;1. Double-stranded cDNA

表 1 微小隐孢子虫 cDNA 文库库容

Table 1 *Cryptosporidium parvum* cDNA library capacity

项目 Item	文库体积/ μ L Volume library					
	0.5	0.25	0.05	0.025	0.005	0.000 5
噬菌斑数量 Plaque	∞	∞	2 160	1 120	340	320
库容/($\times 10^7$) Library capacity	—	—	3.0	3.1	4.8	4.5

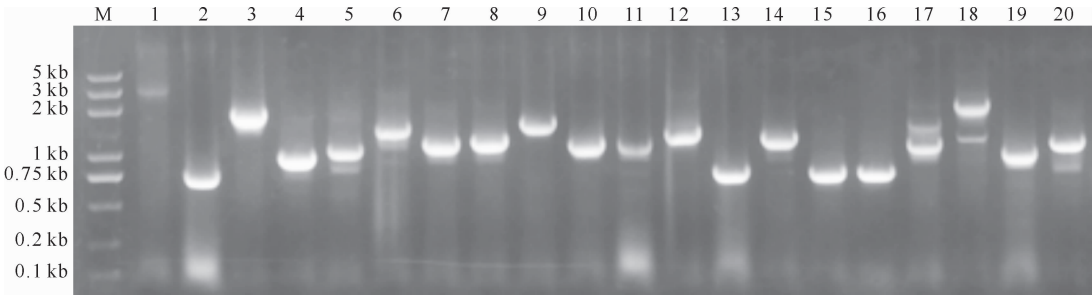


图 3 微小隐孢子虫 cDNA 文库噬菌斑插入片段长度的 PCR 检测结果

M, DL5000 DNA Marker;1~20. 噬菌斑 PCR 产物

Fig.3 PCR amplification of plaque insert fragment in cDNA library of *Cryptosporidium parvum*

M, DL5000 DNA Marker;1~20. PCR products of plaque

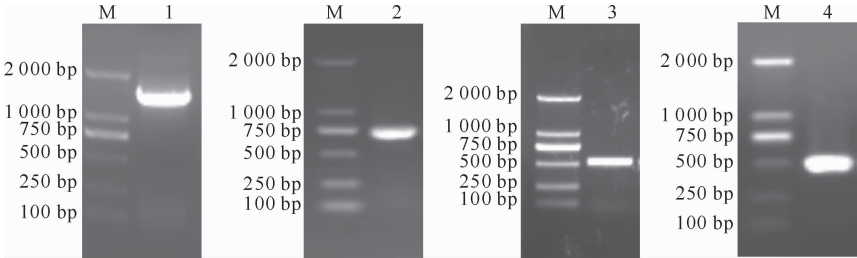


图 4 微小隐孢子虫 4 个基因的 PCR 扩增结果

M, DL2000 DNA Marker;1. MUCIN 蛋白基因;2. 微管相关蛋白基因;3. 乳酸脱氢酶基因;4. 孢子抗原蛋白基因

Fig.5 PCR amplification of four genes from *Cryptosporidium parvum*

M, DL2000 DNA Marker;1. Mucin protein gene;2. Microtubule-associated protein gene;
3. Lactate dehydrogenase gene;4. Sporozoite antigen protein gene

表 2 微小隐孢子虫 4 个阳性克隆的序列分析

Table 2 Four positive clones sequence analysis of *Cryptosporidium parvum*

蛋白质 Protein	GenBank 登录号 GenBank No. accession	基因全长/bp Full-length of gene	cDNA 插入片段长度/bp Length of cDNA insert fragment
Mucin 蛋白 Mucin protein	AF068065.1	7 600	1 584
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase	XM_628236.1	1 014	534
微管相关蛋白 Microtubule-associated protein	XM_627682.1	1 395	745
孢子抗原蛋白 Sporozoite antigen protein	cgd3_1570	489	489

3 讨 论

构建 cDNA 文库的方法很多,如 Cap-trapper 方法^[6]、Oligo-capping 方法^[7]、Vector-Capping^[8]方法和 SMART 方法。本试验选择 SMART 方法构建微小隐孢子虫 cDNA 文库,而采用该方法构建 cDNA 文库时需要高质量的 RNA,以提高 cDNA 合成效率。由于 RNase 稳定存在于提取 RNA 的样品与环境中,所以要想获得高质量的 RNA,提取过程中就要避免 RNase 污染,抑制 RNase 活性。而且 RNase 会降解 RNA,质量差的 RNA 不能有效地合成 cDNA,SMART 方法中所用的 MMLV 反转录酶会使 RNase 发生突变,进一步防止了 RNA 降解,且还能合成较长的 cDNA。构建文库时,SMART 方法直接用 RNA 合成 cDNA,不需要提取 mRNA,简化了试验步骤^[9-10]。合成双链 cDNA 后,经过 Column Spin H-1000 分离柱,可以除去 400 bp 以下的 cDNA 片段,有效地得到了大片段 cDNA。本试验选用的 λTriplEx2 噬菌体表达载体更适用于大片段 cDNA 的连接。本试验构建的隐孢子虫 cDNA 文库噬菌斑插入片段长度为 1.5 kb 左右,文库库容>10⁷,表明构建的 cDNA 文库质量较好。

本试验采用兔抗微小隐孢子虫血清对构建好的 cDNA 文库进行免疫学筛选,为了降低非特异性噬菌斑的出现,使用大肠埃希菌 XL-Blue 裂解液孵育血清抗体。初筛 cDNA 文库得到的阳性噬菌斑经过复筛验证,去除了非特异性噬菌斑。微小隐孢子虫 cDNA 文库筛选过程中,要求噬菌斑大小适中,噬菌斑之间不能融合,否则阳性克隆难以辨别。对文库进行复筛可以减少假阳性克隆,挑出单一克隆,为下一步 PCR 做准备。

自从文库构建技术广泛应用到隐孢子虫基因的研究中之后,国内外很多学者通过构建隐孢子虫文库筛选到了诸多有价值的基因。Tosini 等^[11]构建了微小隐孢子虫基因组文库,用兔抗微小隐孢子虫血清筛选出了 3 个阳性克隆,将其分别命名为 SA20、SA35 和 SA40。目前,这 3 个多肽已用于抗

隐孢子虫抗体的检测。Jenkins 等^[12]构建了微小隐孢子虫基因组 DNA 文库,用抗 41 ku 抗原的抗体筛选出一个特异性卵囊壁蛋白基因 CP41,用大肠杆菌表达的该基因已用于隐孢子虫的血清学检测。Perryman 等^[13]构建了微小隐孢子虫 cDNA 文库,用 C6B6 和 7D10 单克隆抗体从文库中筛选出了一种编码大小约为 23 ku 的孢子表面蛋白 P23;经 Western-blotting 分析表明,P23 蛋白与阳性血清中的 IgG1 和 IgA 反应强烈,该重组蛋白已用于隐孢子虫感染的血清学检测。本试验对 cDNA 文库经过初筛和复筛后获得的阳性克隆测序后分析发现,阳性克隆中 31%是微小隐孢子虫的结构蛋白,除去重复序列并且考虑阳性克隆的信号强弱,选出阅读密码框(ORF)大于 300 bp 的 4 个基因序列分别是 MUCIN 蛋白基因、乳酸脱氢酶基因、微管相关蛋白基因和孢子抗原蛋白基因。

MUCIN 蛋白是隐孢子虫孢子和裂殖子表面的一种蛋白,也是一个 N 末端丰富糖基化的蛋白^[14]。已经有报道证明,单克隆抗体 4D10、2A3 和 9C9 识别微小隐孢子虫重组 MUCIN 蛋白中 395 个氨基酸片段^[14-15]。但是将 MUCIN 蛋白作为隐孢子虫的检测抗原还未见报道,如果将其制备为重组抗原,则有望成为隐孢子虫诊断抗原。

Senkovich 等^[16]初步分析后认为,微小隐孢子虫乳酸脱氢酶的结构是一个晶体结构,据此结果可以将此酶与宿主内的酶区分开来,作为寄生虫入侵机体的抑制剂。Maltha 等^[17]研究结果表明,乳酸脱氢酶可用于疟疾的快速诊断。据此推测乳酸脱氢酶有可能成为检测隐孢子虫感染的诊断抗原。

微管是生物体细胞中的重要结构。Schwartz 等^[18]详细分析了微管相关蛋白在虫体中组装的过程。目前还没有关于微小隐孢子虫微管相关蛋白的研究报道。希望将来微管相关蛋白可以作为检测隐孢子虫病的候选抗原。

本试验从微小隐孢子虫 cDNA 文库中筛选出来的 4 种蛋白均没有作为隐孢子虫检测抗原的报道,后续试验将要进一步验证它们是否可以作为检

测抗原,为隐孢子虫的诊断提供依据。

[参考文献]

- [1] Xiao L, Fayer R, Ryan U, et al. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(1): 72-97.
- [2] Molbak K, Højlyng N, Gottschau A, et al. Cryptosporidiosis in infancy and childhood mortality in Guinea Bissau, west Africa [J]. British Medical Journal, 1993, 307(6901): 417-420.
- [3] Fayer R. *Cryptosporidium*: A water-borne zoonotic parasite [J]. Vet Parasitol, 2004, 126(1/2): 37-56.
- [4] Skotarczak B. Progress in the molecular methods for the detection and genetic characterization of *Cryptosporidium* in water samples [J]. Ann Agric Environ Med, 2010, 17(1): 1-8.
- [5] 卢良安, 张文生, 李碧波, 等. 隐孢子虫病的病原学诊断及病例对照研究 [J]. 当代医学, 2009, 15(13): 150.
- Lu L A, Zhang W S, Li B B, et al. Etiological diagnosis and case-control study of *Cryptosporidiosis* [J]. Contemporary Medicine, 2009, 15(13): 150. (in Chinese)
- [6] Carninci P, Kvam C, Kitamura A, et al. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper [J]. Genomics, 1996, 37(3): 327-336.
- [7] Maruyama K, Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides [J]. Gene, 1994, 138(1/2): 171-174.
- [8] Kato S, Ohtoko K, Ohtake H, et al. Vector-capping: A simple method for preparing a high-quality full-length cDNA library [J]. DNA Res, 2005, 12(1): 53-62.
- [9] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A. SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones [J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 36.
- [10] Suzuki Y, Yoshitomo-Nakagawa K, Maruyama K, et al. Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library [J]. Gene, 1997, 200(1/2): 149-156.
- [11] Tosini F, Caccio S, Tamburrini A, et al. Identification and characterisation of three antigenic proteins from *Cryptosporidium parvum* sporozoites using a DNA library expressing poly-histidine tagged peptides [J]. Int J Parasitol, 1999, 29(12): 1925-1933.
- [12] Jenkins M C, Trout J, Murphy C. Cloning and expression of a DNA sequence encoding a 41-kilodalton *Cryptosporidium parvum* oocyst wall protein [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(6): 912-920.
- [13] Perryman L, Jasmer D, Riggs M. A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 80(2): 137-147.
- [14] Barnes D A, Bonnin A, Huang J X, et al. A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion [J]. Mol Biochem Parasitol, 1998, 96(1/2): 93-110.
- [15] Sturbaum G D, Schaefer D A, Jost B H, et al. Antigenic differences within the *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* surface proteins P23 and GP900 defined by monoclonal antibody reactivity [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2008, 159(2): 138-141.
- [16] Senkovich O, Speed H, Grigorian A. Crystallization of three key glycolytic enzymes of the opportunistic pathogen *Cryptosporidium parvum* [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1750(2): 166-172.
- [17] Maltha J, Gillet P, Cnops L. Malaria rapid diagnostic tests: Plasmodium falciparum infections with high parasitedensities may generate false positive plasmodium vivax pLDH lines [J]. Malar J, 2010, 9: 198.
- [18] Schwartz C L, Heumann J M, Dawson S C, et al. A detailed, hierarchical study of Giardia lamblia's ventral disc reveals novel microtubule-associated protein complexes [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e43783.