

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0210-05

【论著】

东方巴贝虫 cDNA 文库的构建与免疫学筛选

刘琴^{1,2,3}, 周丹娜^{2,3}, 周艳琴², 张颖^{2,3}, 贺兰^{2,3}, 姚宝安², 赵俊龙^{2,3*}

【摘要】 目的 构建东方巴贝虫(*Babesia orientalis*)cDNA 文库, 从中筛选免疫学阳性的克隆。方法 用东方巴贝虫感染牛, 提纯红细胞内虫体的总 RNA, 反转录合成 cDNA, PCR 扩增后将其连接于噬菌载体 (λ TripIEx2), 通过体外包装, 建成东方巴贝虫 cDNA 文库, 并进行扩增。用兔抗东方巴贝虫的血清筛选 cDNA 文库, 阳性克隆经大肠埃希菌 BM25.8 自身环化酶将噬菌体重组子 λ TripIEx2 转化为相应的质粒重组子 pTripIEx2, PCR 鉴定插入片段大小, 并测序, 用 Blast 对测序结果进行同源性分析, 并对序列编码的氨基酸序列进行结构和功能的预测。结果 未扩增文库的滴度为 2.0×10^6 pfu/ml, 重组率为 98.8%, 文库插入片段大小为 500~3 000 bp, 扩增后的滴度为 5.8×10^8 pfu/ml。从东方巴贝虫 cDNA 文库中筛选得到 3 个阳性克隆 B04、B05 和 B41, 插入片段大小分别约为 1 300、1 000 和 2 400 bp, 3 个片段均包含开放阅读框, 分别与多种原虫的核动蛋白、功能未知的假定蛋白和热激蛋白 70 具有较高的同源性。B04、B05 和 B41 分别编码 310、192 和 647 个氨基酸, 相对分子质量(Mr) 分别约为 34 000、21 000 和 70 700。结论 构建了较高质量的东方巴贝虫 cDNA 文库, 并发现 3 个东方巴贝虫阳性克隆。

【关键词】 东方巴贝虫; cDNA 文库; 免疫学筛选; 序列分析

中图分类号: R382.9 文献标识码: A

Construction and Immunoscreening of cDNA Library of *Babesia orientalis*

LIU Qin^{1,2,3}, ZHOU Dan-na^{2,3}, ZHOU Yan-qin², ZHANG Ying^{2,3},
HE Lan^{2,3}, YAO Bao-an², ZHAO Jun-long^{2,3*}

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 3 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Objective To construct a cDNA library for *Babesia orientalis* and screen immunologically positive clones. Methods Total RNA of *B. orientalis* in red blood cells from an infected calf was isolated. cDNA was synthesized by reverse transcriptase, amplified by PCR and ligated into λ TripIEx2 vector. The recombinant vectors were packaged and the unamplified cDNA library was constructed. The cDNA library was then amplified and immunologically screened with rabbit anti-*B. orientalis* serum. The recombinant λ TripIEx2 of positive clones were converted to the corresponding recombinant pTripIEx2. The inserted fragments were identified by PCR amplification. The plasmids were sequenced and compared against GenBank database by Blast. Results The titer of the unamplified library was 2.0×10^6 pfu/ml. The inserted fragment length of the library ranged from 500 to 3 000 bp, and the recombination efficiency accounted for 98.8%. The titer of the amplified library was 5.8×10^8 pfu/ml. Three positive clones were selected by serum immunological screening and named B04, B05, and B41, respectively. The inserted fragments of the B04, B05 and B41 were about 1 300 bp, 1 000 bp, and 2 400 bp, respectively. Sequence analysis revealed that the 3 clones contained open reading frames. Blast results showed that they were highly homologous to the nuclear movement protein gene, the hypothetical protein gene and the heat shock protein 70 (HSP70) gene, respectively. The deduced amino acid sequences of B04, B05 and B41 contained 310, 192 and 647 amino acid residues, with Mr of 34 000, 21 000, and 70 700, respectively. Conclusion A qualified cDNA library of *B. orientalis* has been constructed and three positive clones of *B. orientalis* discovered.

【Key words】 *Babesia orientalis*; cDNA library; Immunoscreening; Sequence analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30070572, 30671575) and the New Century Excellent Talents Project, Ministry of Education (No. NCET-06-0668)

* Corresponding author, E-mail: zhaojunlong@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30070572, 30671575); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0668)

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025; 2 华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070; 3 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

* 通讯作者, E-mail: zhaojunlong@mail.hzau.edu.cn

东方巴贝虫 (*Babesia orientalis*) 是一种蜱传性的血液原虫, 寄生于红细胞, 引起严重的水牛巴贝虫病, 目前已将其定为一个独立的虫种^[1]。在中国的中部和中南部, 该虫是引起水牛疾病的重要病原之一, 且呈地方性流行^[2]。水牛巴贝虫病的主要症状表现为食欲减退、发热、贫血、黄疸和血红蛋白尿等, 病情严重的可致死亡, 给畜牧业造成重大的经济损失^[3]。

随着现代分子生物学的发展, 基因工程技术已成为免疫诊断和疾病治疗研究的重要手段。cDNA 文库是获得功能基因的基础工具之一^[4]。采用免疫学方法调取文库中的 cDNA 片段, 是研究寄生虫疫苗及免疫诊断分子抗原的有效途径之一^[5]。本研究通过构建东方巴贝虫 cDNA 文库, 免疫学筛选, 获得阳性克隆, 并对阳性克隆进行克隆、测序和 Blast 分析。

材料与方 法

1 材 料

1.1 虫株和实验动物 东方巴贝虫株由华中农业大学寄生虫病实验室保存。1 岁水牛犊购自水牛巴贝虫病非疫区, 耳静脉血涂片吉氏染色镜检确认无血液原虫感染, 在无蜱条件下饲养, 实验前约 30 d 手术切脾。雄性成年新西兰大白兔, 2~3 kg, 购自湖北省实验动物中心。大肠埃希菌 (*E. coli*) XL1-Blue 和 BM25.8 均由华中农业大学寄生虫学教研室保存。

1.2 主要试剂和仪器 E.Z.N.A™ 血液 RNA 提取试剂盒购自美国 Omega Bio-tek 公司, SMART™ cDNA 文库构建试剂盒购自美国 Clontech 公司, Gigapack® III 噬菌体包装试剂盒购自美国 Stratagene 公司, 噬菌体表面展示肽库试剂盒购自美国 NEB 公司, 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal)、4-氯-1-萘酚和 Hybond 蛋白杂交膜购自美国 Promega 公司, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (HRP-IgG)、福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司。其他试剂为国产分析纯。核酸扩增仪 (PTC-200) 为德国 BioRad 公司产品, 凝胶成像系统 (Kadak Gel Logic 100) 为美国 Kodak 公司产品。

2 方 法

2.1 cDNA 文库的构建 按文献^[1]的方法将东方巴贝虫感染牛, 收集纯化含虫红细胞, 用 E.Z.N.A™ 血液 RNA 提取试剂盒, 按操作说明提取总 RNA。

用 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒构建 cDNA 文库, 以总 RNA 为模板, 合成双链 cDNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定双链 cDNA 分布范围。cDNA 经酶切消化后, 通过预装微型凝胶过滤柱分级分离, 收集前 3

个含有 cDNA 的组分, 乙醇沉淀回收。按 cDNA 与噬菌体载体 (λ Triplex2)1.5:1 进行连接, 用 Gigapack® III 噬菌体包装试剂盒将连接产物进行体外包装, 构建东方巴贝虫 cDNA 未扩增文库, 测定未扩增文库的滴度。采用蓝白筛选以计算重组效率。

2.2 cDNA 文库的扩增 取 20 个灭菌离心管, 分别加入 500 μ l 重悬的 *E. coli* XL1-Blue 菌液与 20 μ l 初始文库混匀, 37 °C 孵育 10~15 min, 加入 20 个上层琼脂铺平板, 37 °C 倒置培养 6~18 h 至噬菌斑清晰可见。无菌条件下收集所有的噬菌体裂解液。加入终浓度为 7% 的二甲基亚砜, -80 °C 保存备用, 并用上述方法测定扩增后的滴度。

2.3 噬菌体 DNA 提取和文库 PCR 鉴定 按噬菌体表面展示肽库试剂盒提供的方法提取噬菌体 DNA。根据载体克隆位点两端的序列设计引物, 5' 引物 T3: 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3', 3' 引物 T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (由北京奥科生物有限公司合成)。以噬菌体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件: 96 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 100 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

2.4 兔抗东方巴贝虫血清的制备和预吸收 裂解含虫红细胞, 收集、纯化虫体, 制备东方巴贝虫全虫抗原粗提物^[6], 临用前将其与等量的佐剂充分乳化。在 4 只新西兰大白兔 (经琼脂扩散试验^[7]检测东方巴贝虫抗体为阴性) 背部两侧皮下分点注射, 每 2 周 1 次, 共 3 次, 剂量为虫体蛋白质 0.5 mg/(只·次)。第 1 次用福氏完全佐剂, 第 2、第 3 次用福氏不完全佐剂。每次免疫后 7 d 自耳静脉采血, 分离血清, 以琼脂扩散实验和 ELISA^[7]检测东方巴贝虫特异性抗体。抗体滴度达到要求 (琼脂扩散试验抗体滴度 $\geq 1:32$, 且 ELISA 抗体滴度 $\geq 1:500$; 若末次免疫后抗体滴度达不到要求则静脉直接缓慢注射东方巴贝虫粗提抗原 0.5 mg, 10 d 后检测抗体滴度, 若抗体滴度仍未达到要求则弃之) 后, 禁食 24 h, 无菌操作颈动脉放血, 收集血液, 37 °C 放置 1 h, 4 °C 过夜, 1 500 \times g 离心 15 min, 分离血清。

根据文献^[8]方法裂解 *E. coli* XL1-Blue, 利用该裂解液对抗血清进行吸附, 去除抗 *E. coli* 抗体。

2.5 cDNA 文库的免疫学筛选 挑取单个 XL1-Blue 菌落接种入 15 ml LB 培养基 (含硫酸镁, 麦芽糖), 37 °C 振荡培养过夜, 4 000 \times g 离心 5 min, 弃上清, 用 10 mmol/L 硫酸镁 7.5 ml 重悬沉淀。将 1:10 000 稀释的 cDNA 文库 20 μ l 与上述菌悬液 200 μ l 混匀, 37 °C 孵育 10~15 min, 用直径为 90 mm 的平板, 以每板约 1 000 个噬菌斑的密度铺板, 共约 5.0 $\times 10^4$ 个噬

菌体, 42 ℃培养 3.5 h。覆盖硝酸纤维素膜 (NC 膜), 继续培养 4~6 h 后, 做不对称的位置标记, 剥离 NC 膜。经 PBS-T 漂洗 3 次后于 5% 脱脂奶粉中封闭过夜, 置于经预吸收的抗血清中室温孵育 2 h, 漂洗 3 次, 浸入羊抗兔 HRP-IgG (1:5 000) 室温孵育 2 h, 漂洗 3 次, 经 4-氯-1-萘酚底物显色。根据 NC 膜上阳性反应环的位置, 挑取 LB 平板上相应的噬菌斑^[9], 重复上述步骤进行复筛, 直至 NC 膜上所有斑点均为阳性。

2.6 插入片段核苷酸序列测定和同源性分析 按 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒操作说明, 把阳性克隆噬菌体重组子 λTriplEx2 由 BM25.8 菌自我环化转化为质体重组子 pTriplEx2。对阳性克隆插入片段的大小进行 PCR 鉴定, 引物及扩增条件同 2.3。根据 pTriplEx2 载体序列, 合成一段测序引物 5'-CGGGAAGCGCGCCATTGTGTT-3', 进行 DNA 序列测定 (测序由北京奥科生物有限公司完成)。用 Blast 进行核苷酸同源性比对。

2.7 阳性克隆编码的氨基酸序列预测和分析 采用 DNASTAR 软件预测阳性克隆编码的氨基酸序列和理论相对分子量(Mr)等, SignalP 3.0 软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)预测分析蛋白是否含有信号肽, SubLoc v1.0 软件 (<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>) 预测蛋白的亚细胞定位, Scanprosite 软件(<http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>) 分析蛋白的功能位点和蛋白质结构域, TMPred 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析蛋白的跨膜区, SOPMA (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 预测蛋白的二级结构。

结 果

1 cDNA 文库的构建及扩增

合成的双链 cDNA 集中于 500~4 000 bp, 呈瀑布状(图 1)。未扩增文库滴度为 2.0×10^6 pfu/ml, 重组效率为 98.8%。扩增文库滴度为 5.8×10^8 pfu/ml。

2 cDNA 文库的 PCR 鉴定

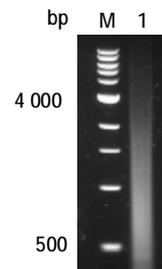
PCR 鉴定结果显示, λTriplEx2 重组子插入片段的大小为 500~3 000 bp (图 2)。

3 cDNA 文库的免疫学筛选

初筛获得 18 个克隆, 经过 2 次复筛, 得到 3 个符合要求的阳性克隆, 分别为 B04、B05 和 B41。

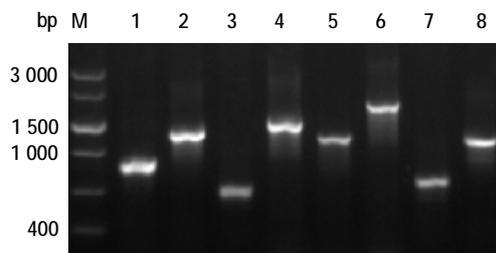
4 阳性克隆的 PCR 鉴定

PCR 鉴定结果显示, 插入片段大小分别约为 1 300、1 000 和 2 400 bp(图 3)。



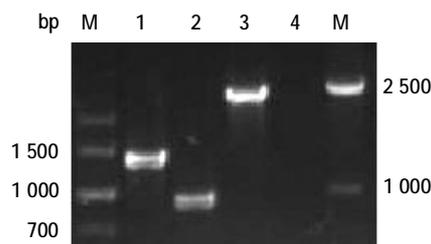
M: DNA 标志物, 1: 双链 cDNA。
M: DNA marker, 1: Double-strand cDNA.

图 1 双链 cDNA 琼脂糖凝胶电泳
Fig.1 Electrophoresis of double strand cDNA



M: DNA 标志物, 1~8: λTriplEx2 重组子 PCR 产物。
M: DNA marker, 1-8: PCR products of recombinant λTriplEx2 clones.

图 2 cDNA 文库重组子的 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of recombinant clones of cDNA library by PCR



M: DNA 标志物, 1: B04, 2: B05, 3: B41, 4: 阴性对照。
M: DNA marker, 1: B04, 2: B05, 3: B41, 4: Negative control.

图 3 阳性克隆 PCR 鉴定结果
Fig.3 Identification of recombinant plasmid of positive clones by PCR

5 阳性克隆测序结果和同源性分析

测序结果表明, B04、B05 和 B41 等 3 个阳性克隆插入 cDNA 片段长度分别为 1 088、732 和 2 192 bp, 均包含开放性读码框。同源性分析表明, B04 插入的 cDNA 序列与牛巴贝虫(*Babesia bovis*)、环形泰勒虫(*Theileria annulata*)、小泰勒虫(*T. parva*) 和人隐孢子虫(*Cryptosporidium hominis*) 等的核动蛋白基因 (登录号分别为 XP001611385、XP954250、XP766039 和 XP667917) 同源性较高, 序列一致性分别为 69%、54%、53%和 39%; B05 插入的 cDNA 序列与牛巴贝虫、小泰勒虫和环形泰勒虫等的一个保守的功能未知的假定蛋白基因 (登录号分别为 XP001610114、

XP765127 和 XP952153) 同源性较高, 序列一致性分别为 68%、27%和 28%; B41 插入的 cDNA 序列与牛巴贝虫和羊巴贝虫 (*B. ovis*) 等的热激蛋白 70 (HSP70) 基因(登录号分别为 AF107118 和 BAF02618) 同源性较高, 序列一致性分别为 96%和 97%。B04、B05 和 B41 等 3 个阳性克隆插入的 cDNA 序列均已登录 GenBank, 登录号分别为 FJ222760、FJ222761 和 EF512547 (表 1)。

表 1 东方巴贝虫 cDNA 文库阳性克隆核苷酸序列分析
Table 1 Nucleotide sequence analysis of positive clones in *B. orientalis* cDNA library

编号 Code	登录号 No. accession	cDNA 片段长度 Length of cDNA (bp)	读码框大小 Length of the open reading frame (bp)	同源基因 Identified gene
B04	FJ222760	1 088	933	核动蛋白 Nuclear movement protein
B05	FJ222761	732	579	假定蛋白 Hypothetical protein
B41	EF512547	2 192	1 944	热激蛋白 70 Heat shock protein 70

6 阳性克隆编码的氨基酸序列预测和分析

B04 插入片段编码 310 个氨基酸, 理论值约为 Mr 34 000; 二级结构 α 螺旋占 43.6%, 无规卷曲占 38.1%,

延伸链占 12.9%, β 转角占 5.5%; 含 5 种类型的特定功能位点, 分别为 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、4 个 N-肉豆蔻酸化位点、1 个 N-糖基化位点和 1 个酰胺化位点; 包含核动蛋白的结构域的模式序列 PS51203。

B05 插入片段编码 192 个氨基酸, 理论值约为 Mr 21 000; 二级结构 α 螺旋占 31.3%, 无规卷曲占 44.3%, 延伸链占 16.2%, β 转角占 8.3%; 含 4 种类型的特定功能位点, 分别为 8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、6 个 N-肉豆蔻酸化位点、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点与 2 个环磷酸腺苷 (cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 依赖性蛋白激酶磷酸化位点。

B41 插入片段编码 647 个氨基酸, 理论值约为 Mr 70 700; 二级结构 α 螺旋占 41.3%, 无规卷曲占 33.5%, 延伸链占 19.2%, β 转角占 6.0%; 含 7 种类型的特定功能位点, 分别为 16 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、12 个 N-肉豆蔻酸化位点、9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、6 个 N-糖基化位点、2 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、1 个酰胺化位点与 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点; 包含 HSP70 家族结构域的 3 个模式序列, 分别为 PS00297、PS00329 和 PS01036 (表 2)。

表 2 东方巴贝虫 cDNA 文库阳性克隆编码的氨基酸序列预测与分析
Table 2 Prediction and analysis of the amino acid sequences coded by the positive clones in *Babesia orientalis* cDNA library

编号 Code	编码的氨基酸 Amino acids	相对分子质量 Mr	等电点 Isoelectric point	信号肽 Signal peptide	跨膜区 Transmembrane domain	亚细胞定位 Subcellular localization
B04	310	34 000	5.03	无 None	1 个 (153-172)	细胞核 Nucleus
B05	192	21 000	4.95	无 None	2 个 (62-78, 154-175)	细胞核 Nucleus
B41	647	70 700	5.27	无 None	3 个 (1-20, 392-415, 615-638)	细胞质 Cytoplasm

讨 论

本研究采用 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒, 直接从总 RNA 中合成 cDNA, 摒弃了传统 cDNA 文库构建的复杂操作, 不需要纯化 polyA⁺ mRNA, 而且获得了长片段 cDNA, 大大地简化了操作过程。而且构建的 cDNA 文库的滴度达到 5.8×10^8 pfu/ml, 重组效率达到 98.8%, 插入片段大于 500 bp, 各项参数均达到理想要求, 文库质量较高。

东方巴贝虫是本实验室发现的一个新种^[1], 有关其基因序列的研究还很少。本研究通过 3 次免疫学筛选得到 3 个阳性克隆 B04、B05 和 B41, 插入的 cDNA 片段分别与多种原虫的核动蛋白、未知功能的假定蛋白和 HSP70 的同源性较高。

经预测, B04 编码的氨基酸序列包含核动蛋白的结构域的模式序列 PS51203。核动蛋白基因起源于细胞生长早期诱导有丝分裂应答的相关基因^[10]。核动蛋白与动力蛋白和肌动蛋白组成生物化学复合体, 在神经干细胞分化过程中起着核易位的作用; 在细胞的有丝分裂和减数分裂过程中, 核动蛋白调节着微管的纺锤体中间区和中体^[11]。目前, 核动蛋白在寄生虫中的作用仍不清楚。B05 编码的氨基酸序列的结构域和功能目前尚不清楚。B41 编码的氨基酸序列包含 HSP70 家族结构域的 3 个模式序列, 分别为 PS00297、PS00329 和 PS01036, 提示此克隆可能是东方巴贝虫 HSP70 基因序列。

HSP70 蛋白约为 Mr 70 000, 它作为一种分子伴

侣, 通过与多种不同的分子蛋白和多肽组成分子伴侣的复合物。它广泛分布于细胞核、细胞质、内质网、线粒体和叶绿体等部位, 作为分子伴侣参与细胞内蛋白质的合成和定位, 蛋白质的成熟, 以及错误折叠蛋白质的降解和调控等过程^[12]。HSP70 在细胞增殖和调节细胞功能方面也起着重要的作用^[13]。此外, HSP70 是许多细菌和寄生虫的主要抗原之一^[14]; 参与日本血吸虫和恶性疟原虫等寄生虫在宿主体内的免疫逃避和虫体增殖的过程^[15]。另一方面, 寄生虫通常需要应对环境温度的突然变化, 如利什曼原虫的体外培养实验显示, 当环境温度突然从 25 °C 上升到 37 °C 时, 病原体的 HSP70 表达显著升高, 表明 HSP70 参与了该热激应答^[16]。

因此, 本研究获得的东方巴贝虫阳性克隆 B41 的插入片段可能是编码 HSP70 的 cDNA, 该蛋白有可能成为水牛东方巴贝虫病疫苗的候选分子, 其生物学特性、血清学诊断价值和免疫保护作用有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Liu Q, Zhao JL, Zhou YQ, et al. Study on some molecular characterization of *Babesia orientalis*[J]. *Vet Parasitol*, 2005, 130(3-4): 191-198.
- [2] Zhao JL, Liu ZL, Yao BA, et al. Study on the in vitro cultivation of *Babesia* from buffaloes [J]. *Trop Anim Hlth Prod*, 1997, 29(S4): 37-39.
- [3] Liu Q, Zhou YQ, Zhou DN, et al. Semi-nested PCR detection of *Babesia orientalis* in its natural hosts *Rhipicephalus haemaphysaloides* and buffalo[J]. *Vet Parasitol*, 2007, 143(3-4): 260-266.
- [4] Wang SH, Liu Y, Gong WY, et al. Library construction and large-scale sequencing of human fetal periosteum full-length cDNA [J]. *J Med Mol Biol*, 2007, 4(4): 319-323. (in Chinese) (王绍海, 刘勇, 宫伟雁, 等. 人胎儿骨膜全长 cDNA 文库的构建及测序[J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(4): 319-323.)
- [5] Yang YP, Zhu XP, Yang J, et al. Immunoscreening and sequence analysis of a cDNA library of adult *Trichinella spiralis*[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2002, 20(5): 270-273. (in Chinese) (杨雅平, 诸欣平, 杨静, 等. 旋毛虫成虫 cDNA 文库免疫筛选及序列分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2002, 20(5): 270-273.)
- [6] Chen QJ, Li DC, Yan ZT. mRNA magnetic isolation and cDNA synthesis of *Babesia gibsoni*[J]. *Chin J Vet*, 1993, 13(3): 214-217. (in Chinese) (陈启军, 李德昌, 阎仲堂. 吉氏巴贝斯虫 mRNA 的磁性分离及 cDNA 合成[J]. *中国兽医学报*, 1993, 13(3): 214-217.)
- [7] Bao JF, Shen JG. *Experimental Technology of Immunology*[M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2006: 21-42. (in Chinese) (鲍建芳, 沈建根. *免疫学实验技术*[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2006: 21-42.)
- [8] Shu QF, Li WB, Zhang LM, et al. Immunoscreening of cDNA libraries[J]. *J Agr Biotechnol*, 1996, 5(1): 54-57. (in Chinese) (舒群芳, 李文彬, 张利明, 等. cDNA 文库的免疫筛选[J]. *农业生物技术学报*, 1996, 5(1): 54-57.)
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Translated by Jin DY, Li MF. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1998: 583-587. (in Chinese) (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *分子克隆实验指南* [M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 第 2 版. 北京: 北京科学出版社, 1998: 583-587.)
- [10] Morrisa SM, Yu-Lee L. Expression of RNUDC, a potential nuclear movement protein, in mammalian cells: localization to the Golgi apparatus[J]. *Exp Cell Res*, 1998, 238(1): 23-32.
- [11] Aumais JP, Williams SN, Luo WJ, et al. Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(10): 1991-2003.
- [12] Li YB, Fu XB, Bao ED. The research review of heat shock protein[J]. *Anim Husb Vet Med*, 2004, 36(11): 36-40. (in Chinese) (李玉保, 付旭彬, 鲍恩东. 热休克蛋白研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2004, 36(11): 36-40.)
- [13] Zhen GY. The research review of heat shock protein[J]. *J Kashgar Teacher Coll*, 2003, 24(6): 56-59. (in Chinese) (郑光宇. 热休克蛋白研究进展[J]. *喀什师范学院学报*, 2003, 24(6): 56-59.)
- [14] Daubenberger C, Heussler V, Gobright E, et al. Molecular characterization of a cognate 70 kDa heat shock protein of the protozoan *Theileria parva* [J]. *Mol Biochem Parasit*, 1997, 85(2): 265-269.
- [15] Jayasena SMT, Chandrasekharan NV, Karunanayake EH. Molecular characterisation of a hsp70 gene from the filarial parasite *Setaria digitata*[J]. *Int J Parasitol*, 1999, 29(4): 581-591.
- [16] Rafati S, Gholami E, Hassani N, et al. *Leishmania major* heat shock protein 70 (HSP70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients[J]. *Vaccine*, 2007, 25(21): 4159-4169.

(收稿日期: 2008-10-10 编辑: 瞿麟平)