

# 柔嫩艾美耳球虫 Cathepsin B 基因的克隆表达及活性研究

刘任强<sup>1</sup>, 蔡建平<sup>2\*</sup>, 汪明<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学动物医学院 国家原虫实验室, 北京 100193; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 兰州 730046)

**摘要:** 旨在利用同源克隆法从柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)中克隆组织蛋白酶 B 基因(*Etcab*), 为进一步研究其基因表达和基因功能奠定基础。选用未孢子化的柔嫩艾美耳球虫 Houghton 株, 通过对已公布的柔嫩艾美耳球虫序列进行分析, 利用 RT-PCR 的方法克隆 *Etcab* 基因的 cDNA 序列, 并将其重组于 transE1 原核表达载体中, 鉴定后, 重组质粒转入大肠杆菌 Rosetta 进行诱导表达。利用纯化所得 *Etcab* 蛋白制备兔抗多抗, 同时利用明胶酶谱法初步验证其活性。利用 Real-time PCR 和 Western blot 的方法检测 *Etcab* 在球虫发育不同阶段和孢子化不同阶段的表达水平。成功克隆得到一个长度为 1 539 bp 的 *Etcab* 基因, 并重组表达了球虫的组织蛋白酶 B。SDS-PAGE 电泳结果显示, 在 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 37 °C 诱导 4 h 下, 主要以包涵体的形式表达; 4 °C 过夜诱导可以使之转为可溶性表达。表达产物在低 pH、有还原剂存在的环境中, 可以降解明胶, 初步证明重组表达的酶具有一定的活性, *Etcab* 在配子体和裂子体时期表达较高, 未孢子化和子孢子阶段表达相对较低, 孢子化过程中表达逐步增加。*Etcab* 基因的克隆和表达研究, 为进一步探究该基因在鸡球虫入侵及其他生物学功能中所起的作用提供了理论基础。

**关键词:** 柔嫩艾美耳球虫; 组织蛋白酶 B; 克隆; 表达

中图分类号: S852.723

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)10-1838-06

## Cloning, Expression and Activity of Cathepsin B in *Eimeria tenella*

LIU Ren-qiang<sup>1</sup>, CAI Jian-ping<sup>2\*</sup>, WANG Ming<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The aim of the present study was to clone the cathepsin B (*Etcab*) gene involved in *E. tenella* using homologous method, and lay the the foundation for further gene expression and gene function study. Through analysis of *E. tenella* sequence published, the cDNA sequence of *Etcab* was cloned by RT-PCR from unsporulated *E. tenella* Houghton strain. The *Etcab* was recombined in trans-E1 prokaryotic expression vector. After sequence identification, the recombinant plasmid was transfected into *E. coli* rosetta to induce expression. The purified protein was used to immunize rabbits to produce polyclonal antibody, which was verified by ELISA, and was also analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gelatin zymography. With the method of real-time PCR and Western blot, we detected the expression of *Etcab* and *Etcab L* at different stage. Results showed that an 1 539 bp gene was obtained, which encoded 512 amino acid residues. The *Etcab* cDNA fragment was sub-cloned into the prokaryotic expression vector trans-E1. After inducing in 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG at 37 °C for 4 h, SDS-PAGE electrophoresis showed it was expressed mainly in the form of inclusion bodies; while at 4 °C overnight

收稿日期: 2014-12-31

作者简介: 刘任强(1986-), 男, 江西南昌人, 博士, 主要从事禽类免疫和球虫入侵机制的研究, E-mail: lrq29134@163.com

\* 通信作者: 汪明, 教授, E-mail: vetdean@cau.edu.cn; 蔡建平

the protein was induced into soluble expression. With the presence of reducing agent at low pH, the recombinant protein can degradate the gelatin, which proved that the recombinant enzyme having a certain activity. Etcathepsin B was higher in the phase of gametophyte and merozoite, and gradually increased during sporulation process. Cloning and expression the cathepsin B in *E. tenella*, provides theoretical basis for further exploration of the role of the gene in chicken coccidia invasion and other biological functions.

**Key words:** *Eimeria tenella*; cathepsin B; clone; expression

鸡球虫病是由顶复合门艾美尔属球虫引起的一种寄生虫病,可对养禽业造成重大的经济损失。目前对鸡球虫病的控制措施主要依赖于化学药物预防,但目前抗药性和药物残留日趋严重,急需开发新药或找到新的药物靶点。

组织蛋白酶 B (cathepsin B) 是一类半胱氨酸类蛋白酶,属于木瓜蛋白酶家族,研究表明在寄生虫的生存、与宿主细胞的相互作用、致病性以及逃逸诸多过程中都发挥了重要的作用<sup>[1]</sup>。在与球虫相似的其他顶复合门的寄生虫中,已经发现并克隆了类组织蛋白酶 B 蛋白,他们在虫体入侵和入侵相关蛋白质的成熟加工中发挥着重要的作用<sup>[2-4]</sup>。

顶复门原虫作为专性胞内寄生虫,游离的虫体在宿主胞外不能长时间存活。其入侵过程一般在很短时间内完成,组织蛋白酶对于胞外的虫体快速入侵宿主细胞有重要作用。入侵相关蛋白质的成熟以及在形成纳虫空泡后从宿主细胞膜上分离的过程中都涉及大量蛋白酶的参与<sup>[5-7]</sup>。一旦完成入侵,寄生虫将利用宿主蛋白质进行新陈代谢,合成自身生长繁殖所需营养物质。这一过程也涉及多种蛋白酶的参与,由于虫体与宿主细胞的代谢过程不尽相同,因此在抗寄生虫药物筛选中,这些蛋白酶作为潜在目标被广泛研究。寄生虫的蛋白酶在维持虫体蛋白质稳态、蛋白质运输以及重塑宿主细胞等方面也均发挥作用,因而具有药物靶点的潜在价值<sup>[8-9]</sup>。可见,组织蛋白酶对寄生虫完成其生活史具有重要作用,因此抑制这些蛋白酶活性可在感染过程的不同阶段抑制寄生虫发育。

半胱氨酸蛋白酶对于许多寄生虫疾病都是重要的免疫优势抗原,能刺激宿主产生较好的细胞和体液免疫。该类蛋白质还存在种属特异性,因此作为一种较好的候选诊断抗原也有重要意义。同时,由于蛋白酶的酶活性位点与小分子物质可发生相互作用,蛋白酶作为药物开发的靶位点,开发多种小分子蛋白酶抑制剂,越来越受人们关注。随着寄生虫的半胱氨酸蛋白酶研究的深入,半胱氨酸蛋白酶日益瞩目,相关领域的研究不仅揭示了寄生虫与宿主相

互作用的具体机制,也为寄生虫病的诊断与防治开辟了新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 卵囊的分离与纯化

*E. tenella* Houghton 株未孢子化卵囊的分离、纯化:用  $1.0 \times 10^4$  *E. tenella* Houghton 株卵囊感染鸡后,在感染的第 7 天收集盲肠,用组织匀浆器捣碎后 100 目网过滤,然后用饱和盐水漂浮,洗涤后再用 10% 次氯酸钠处理,离心沉淀后回收,加  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  亚硫酸氢钠,置于  $4^\circ\text{C}$  备用。

### 1.2 总 RNA 的提取和反转录

*E. tenella* Houghton 株未孢子化卵囊总 RNA 的提取:取  $5 \times 10^7$  冻存的卵囊块加入研磨器液氮充分研磨,加入 1 mL Trizol (Invitrogen) 中,室温静置 5 min,提取总 RNA。反转录采用 TransScript 反转录试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),cDNA 存于  $-20^\circ\text{C}$ 。

### 1.3 引物的设计

利用弓形虫中报道的 Cathepsin B 的序列,与 *E. tenella* 的数据库 (<http://www.genedb.org/Homepage/Etenella>) 进行 BlastP 比对,在数据库中找到序列 (Supcontig\_23) 可编码具有 cathepsin B 类蛋白特征的开放阅读框 (ORF)。用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对引物, F1:  $5'$ -ATGAG-GATGGGAAGCTGTGGGCC- $3'$ ; R1:  $5'$ -TCAT-AGGTCCTGCGCTGACGGCAG- $3'$ 。

### 1.4 *Etc*at B 基因序列克隆及分析

以 cDNA 为模板,扩增条件:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94^\circ\text{C}$  20 s,  $60^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  100 s, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸 10 min。将 Etcathepsin B (*Etc*at B) PCR 产物连接到 T 载体(北京全式金生物技术有限公司),以 PCR 及序列测定筛选阳性克隆 (pEAST-T1-Etc at B),用 DNAMAN 进行序列分析。

### 1.5 *Etc*at B 的原核表达

利用 SignalIP2.0 对序列进行分析,去除信号

肽,用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对引物, F2: 5'-ATGCCCTCCGATGATTTGGGCGGCGCT-3'; R2: 5'-TCATAGGT-CCTGCGCTGACGGCAG-3'。将 PCR 产物连接到表达载体(北京全式金生物技术有限公司), PCR 及序列测定筛选阳性克隆(pEAST-E1-Etcat B)。取阳性表达菌接种到 LB (含 Amp) 中, 37 °C 200 r · min<sup>-1</sup> 扩大培养, 菌液浓度增至 OD 值 0.6, 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导, SDS-PAGE 分析, 确定表达条件。使用 Ni-NTA 柱(Qiagen) 进行纯化。

### 1.6 Etcat B 的活性检测

将蛋白质加入等量非变性 SDS 电泳上样缓冲液中(2% SDS, 0.125 mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 0.001% 溴酚蓝), 经含 0.1% 明胶的 10% SDS-PAGE 电泳终止后, 凝胶置于漂洗液(含 50 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸钠, 10 mmol · L<sup>-1</sup> 半胱氨酸, 100 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 2.5% Triton X-100) 漂洗 1 h, 蒸馏水洗 3 遍, 孵育于底物缓冲液(50 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸钠, 1.212 g 半胱氨酸, 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA), 37 °C 孵育 24 h, 1% 考马斯亮蓝染色, 脱色后可见具明胶酶活性处为清晰透明条带。

### 1.7 Etcat B 多克隆抗体的制备

首先将纯化好的 Etcat B 重组蛋白质与等体积的弗氏完全佐剂混匀后(0.5 mg · kg<sup>-1</sup>) 对成年健康家兔进行背部多点皮下及肌肉注射, 2 周后再用 Etcat B 重组蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀(2 mg · kg<sup>-1</sup>) 背部多点皮下及肌肉注射, 此后每隔 1 周用蛋白质样品(2 mg · kg<sup>-1</sup>) 皮下及肌肉注射。四免后采集血液, 用间接 ELISA 测定抗体效价。用 Etcat B 蛋白(10 μg · mL<sup>-1</sup>) 包被 ELISA 板, 每孔 100 μL。4 °C 过夜后弃液体, PBST(0.05%) 洗涤 3 次。在用 5%(m/v) 脱脂奶粉进行封闭, 37 °C 1 h; PBST 洗涤后分别加入不同稀释度的抗血清, 同时以免疫前血清作为阴性对照, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次后加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 1 h; 加底物 TMB 37 °C 显色 15 min, 终止反应后, 读取 450 nm 吸光值。

### 1.8 Western blot 和 Real-time PCR 检测

取 10<sup>7</sup> 个 *E. tenella* 的子孢子、裂殖子、配子体分别加入 1 mL TRIzol 中充分混匀, 室温作用 5 min, 取 10<sup>7</sup> 个未孢子化卵囊和孢子化不同时间卵囊于液氮中研磨, 研磨好的样品加入 1 mL TRIzol 中充分混匀, 室温作用 15 min 并提取 RNA, 剩余油相用异丙醇沉淀蛋白质。每使用 1 mL TRIzol 加 1.5 mL 异丙醇, 室温放置 10 min, 4 °C 12 000 × g 离心 10 min 弃上清。用含 0.3 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸胍的 95%

乙醇洗涤蛋白质沉淀, 每使用 1 mL TRIzol 加 2 mL 洗涤液, 室温放置 20 min, 2~8 °C 7 500 × g 离心 5 min, 弃上清, 共洗 2 次。用 2 mL 无水乙醇同样方法再洗一次。真空抽干蛋白质沉淀 10 min, 用 1% SDS 溶解蛋白质, 反复吸打, 50 °C 温浴使其完全溶解。

SDS-PAGE 蛋白电泳后, 选用 PVDF 膜, 用 Bio-Rad 湿转装置, 60 v 电转 2 h。把 PVDF 膜浸入 5% 脱脂奶粉, 37 °C 封闭 1 h; PBST(0.05%) 洗涤后分别加入 1:2 000 的一抗, 37 °C 孵育 1 h; 加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 5 次后, 用 ECL-plus 来检测蛋白质。

Real-time PCR 使用的引物为 FcatB(5'-CT-GGGGAAGCCGGCCAGCTGTTAGC-3')、RcatB(5'-CGTTCAGCTGTTCACAGCTAGCCAG-3'); 选用的内参为 *βactin*, 引物为 Factin(5'-CACCAC-CgCCgAgAAAgA-3') 和 Ractin(5'-gAACAA-CATTgCCgTAgAgg-3')

反应体系: cDNA 模板 2 μL, Power SYBR Green PCR Master Mix 10 μL, 上/下游引物(25 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, H<sub>2</sub>O 7 μL, 总体积 20 μL。

反应程序: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s; 50 °C 30 s; 72 °C 40 s(读板), 共 45 个循环。

利用 GraphPad Prism 5 软件对数据进行分析 and 绘图。利用 SPSS 软件采用 Duncan's multiple range test 进行各组数据显著性分析。

## 2 结果

### 2.1 Etcat B 基因扩增及序列分析

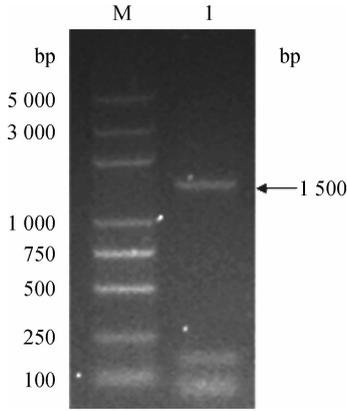
琼脂糖凝胶电泳(图 1) 显示有 1 条约 1 500 bp 条带, 与预计大小一致。测序结果显示基因大小为 1 539 bp, 与 sanger 上所得的序列(Supcontig\_23) 完全一致。序列分析得知 *Etcat B* 编码区(CDS) 编码 512 个氨基酸, 其蛋白质相对分子质量为 56.86 ku, 理论 pI 为 5.82。氨基端含有 21 个氨基酸构成的信号肽, 羧基端有典型的 cathepsin B 的结构特征。与弓形虫报道的 cathepsin B 相似性为 57%。

### 2.2 Etcat B 原核表达载体的构建和表达条件优化

SDS-PAGE 电泳结果显示, 在 1 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 条件下, 与对照组相比, 诱导组均表达了 57 ku 大小的特异带(图 2, 泳道 3、4 和 5), 与预测的相对分子质量相符(图 2)。表达结果显示, 37 °C 诱导 4 h, 该蛋白质主要以包涵体的形式表达; 4 °C 过夜诱导转为可溶性表达。

### 2.3 重组 Etcat B 活性检测

明胶酶谱法试验结果(图 3) 显示, 在不同质量

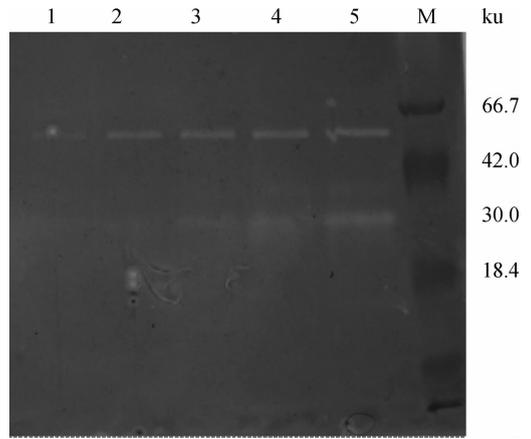


M. DL2000 plus 相对分子质量标准;1. *EtcB* 基因 PCR 结果

M. DL2000 plus marker;1. PCR result of *EtcB* gene

图 1 *EtcB* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *EtcB* gene

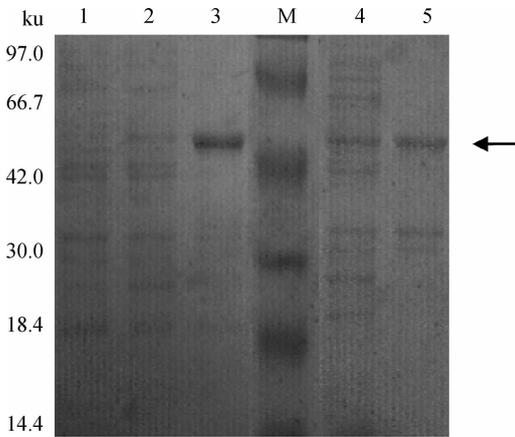


1~5. 0.03,0.06,0.12,0.25,0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  蛋白质明胶酶谱图;M. 蛋白质相对分子质量标准

1-5. The result of gelatin zymography in 0.03,0.06,0.12,0.25,0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  respectively;M. Protein marker

图 3 采用 SDS-PAGE 明胶酶谱法检测重组蛋白酶活性

Fig. 3 Activities of recombinant protein by SDS-PAGE gelatin zymography



1. Trans-E1-EtcB 质粒转化 rosetta 菌诱导 0 h 的融合蛋白质;2,3. Trans-E1-EtcB 质粒转化 rosetta 菌 37 °C 诱导 6 h 的融合蛋白质上清和沉淀; M. 蛋白质相对分子质量标准;4,5. Trans-E1-EtcB 质粒转化 rosetta 菌 4 °C 过夜诱导的融合蛋白质上清和沉淀

1. The *E. coli* transformed by Trans-E1-EtcB induced with IPTG for 0 hours;2. The supernatant proteins induced with IPTG in 37 °C for 6 hours;3. The inclusion bodies induced with IPTG in 37 °C for 6 hours;M. Protein marker;4. The supernatant proteins induced with IPTG in 4 °C overnight;5. The inclusion bodies induced with IPTG in 4 °C overnight

图 2 *EtcB* 原核表达 SDS-PAGE 电泳分析

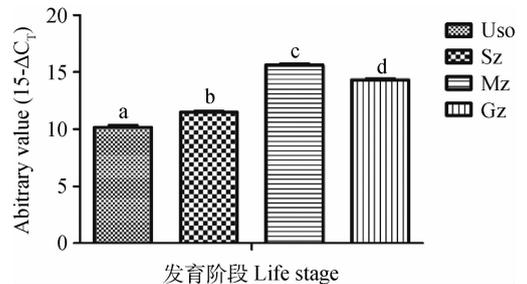
Fig. 2 Analysis of expressed protein by SDS-PAGE

浓度的酶作用下,均能不同程度的降解明胶,57 和 35 ku 出现特异性透明条带,且蛋白质质量浓度越高,降解越彻底,条带越明显。

2.4 多克隆抗体制备和 Western blot 及 Real-time PCR 检测

间接 EILSA 显示兔抗 *EtcB* 血清效价在  $10^7$  以上,表明重组蛋白质具有良好的免疫原性。以 *E.*

*tenella* Houghton 株配子体、未孢子化卵囊、子孢子和裂殖子 cDNA 为模板,同时检测 *EtcB* 和参照基因( $\beta$ actin)的表达,计算各阶段 *EtcB* 基因表达的相对水平,结果显示 *EtcB* mRNA 水平在配子体和裂殖体要高于未孢子化卵囊和子孢子阶段(图 4)。分别以上述 *E. tenella* 四种不同阶段总蛋白质为模板,同时检测 *EtcB* 和参照蛋白质(tubulin)的表达,结果显示 *EtcB* 以未成熟和成熟两种形式均在,蛋白质大小分别为 57 和 35 ku,*EtcB* 在配子体和裂殖子时期表达较高,未孢子化和子孢子阶段表达相对较低(图 5)。以孢子化不同阶段(0、6、12、18、24 和 48 h)cDNA 为模板,同时检测 *EtcB* 和参照基因( $\beta$ actin)的表达,计算孢子化不同阶段 *EtcB* 基因表达的相对水平,结果显示

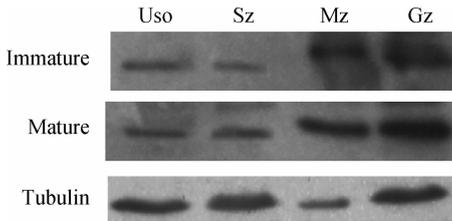


Gz. 配子体;Uso. 未孢子化卵囊;Sz. 子孢子;Mz. 裂殖子

图 4 *E. tenella* Houghton 株各发育阶段 *EtcB* mRNA 水平

Fig. 4 The mRNA levels of *EtcB* in *E. tenella* Houghton strain in difference life stage

*Etc*at B mRNA 水平在孢子化过程中,基本保持一致(图 6)。以孢子化不同阶段(3、6、12、18、24 和 48 h)总蛋白为模板,同时检测 *Etc*at B 和参照蛋白(tubulin)的表达,结果显示 *Etc*at B 在孢子化过程中,未成熟蛋白质和成熟蛋白质的水平略有上升趋势(图 7)。



Uso. 未孢子化卵囊; Sz. 子孢子; Mz. 裂殖子; Gz. 配子体  
Uso. Unsporulated oocysts; Sz. Sporozoites; Mz. Merozoites; Gz. Gametocytes

图 5 *E. tenella* Houghton 株各发育阶段 *Etc*at B Western blot 结果

Fig. 5 The result of Western blot of *Etc*at B in *E. tenella* Houghton strain in difference life stage

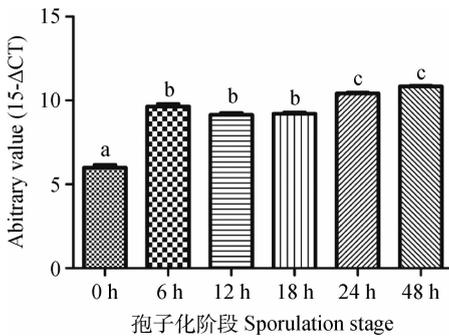


图 6 *E. tenella* Houghton 株孢子化不同阶段 *Etc*at B mRNA 水平

Fig. 6 The mRNA levels of *Etc*at B in *E. tenella* Houghton strain during sporulation

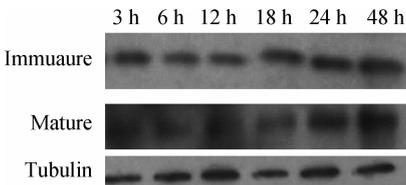


图 7 *E. tenella* Houghton 株孢子化不同阶段 *Etc*at B Western blot 结果

Fig. 7 The result of Western blot of *Etc*at B in *E. tenella* Houghton strain during sporulation

### 3 讨论

蛋白酶是寄生虫的一种重要的毒力因子,它们在感染宿主的过程中起了关键作用,可作为预防和治疗寄生虫的新型药物靶点,因此越来越受到大家

的重视。研究表明,在 *S. mansoni* 中,组织蛋白酶 B 可分泌到肠腔中,帮助虫体降解血红蛋白<sup>[10]</sup>。*G. lamblia* 含有 3 个组织蛋白酶 B,在虫体的脱囊和成囊过程中发挥作用<sup>[11]</sup>。*T. brucei* 的组织蛋白酶 B 参与对吞噬的宿主蛋白的降解,且为生存所必需的蛋白质<sup>[12-13]</sup>。有研究表明在艾美尔球虫的生活史中,蛋白酶参与了诸如宿主细胞入侵<sup>[14]</sup>和卵囊壁形成等重要的生理过程<sup>[15]</sup>。但组织蛋白酶 B 在其中具体参与了何种生理过程及对球虫防控的影响尚不明确。

本课题组通过 RT-PCR 手段与国外两家实验室<sup>[16-17]</sup>几乎同时克隆并表达柔嫩艾美尔球虫的组织蛋白酶 B,通过 pBLAST 比较发现,柔嫩艾美耳球虫的组织蛋白酶 B(*Etc*at B)与 *T. gondii*(Ac. No. EPR63374. 1)相似性最高,可达 49%,与其相似性较高的寄生虫还有 *E. siliculosus*(Ac. No. CBN78981. 1)、*T. spiralis*(Ac. No. XP\_003379650. 1)、*S. mansoni*(Ac. No. XP\_002574974. 1),相似性分别是 43%、40%、39%。与禽类相比(Ac. No. AAA87075. 1),尽管在保守区域相似性较高(可达 40%),但 *Etc*at B 全长含有 512 个氨基酸,而鸡的 cathepsin B 仅含有 340 个氨基酸,两者对比发现,在组成结构上,特别是 N 端起调节作用的结构域上区别很大,研究表明,cathepsin B 的这一结构域不仅在蛋白质加工折叠中起作用,也可以抑制蛋白酶的活性<sup>[18]</sup>。由此可见,二者的亲缘关系较远,这为以其作为设计药物治疗或者免疫预防奠定了基础。

本试验中,利用大肠杆菌原核表达系统成功表达重组蛋白质 *Etc*at B。该蛋白质在 37 °C 诱导 6 h 条件下以包涵体的形式存在,虽然包涵体对表达产物纯化和表达产量提高非常有利,但难以获得活性良好的包涵体蛋白,为了后期进行蛋白质活性检测,试验中对表达条件进行了优化,发现在 16 °C 过夜诱导的条件下蛋白质可以部分以上清的形式表达。通过明胶酶谱法我们确定所得蛋白质有一定的活性,结果显示不仅在 57 和 35 ku 有两条特异性条带,推测分别是 *Etc*at B 未成熟和成熟形式。

作者对重组蛋白质进行酶动力学研究,通过荧光 ELISA 的方法,利用 Z-Phe-Phe-AMC 检测低浓度的 *Etc*at B 活性,结果显示原核表达的重组蛋白质的活性较低,这一结果和 M. Schaeffer 等<sup>[19]</sup>的结果一致。M. Schaeffer 通过试验表明,酵母系统表达所得产物具有较好的蛋白酶活性,说明 *Etc*at B 蛋白结构的适度糖基化和修饰对其发挥活性至关重要。

2012年, M. Katrib 等<sup>[20]</sup>首次利用半定量的方式对 EtcB 不同时期的表达进行了初步分析, 2013年, A. Rieux 等<sup>[16]</sup>用测定酶活的方法进一步确定了 EtcB 孢子化过程中的表达水平。随后 M. Matsubayashi 等<sup>[17]</sup>用半定量法分析了 EtcB 在孢子化过程中的表达, 并用 Western blot 的方法检测了不同发育阶段的表达情况。本试验中, 作者利用 Real-time PCR 和 Western blot 的方法进一步检测了 EtcB 在球虫发育不同阶段和孢子化不同阶段的表达水平, 结果显示 EtcB 在配子体和裂子体时期表达较高, 子孢子和未孢子化阶段表达相对较低, 孢子化过程中变化不明显。本研究为探讨 EtcB 在球虫的发育和入侵中的功能及寻找与其互作蛋白质, 并为寻找其合适的特异性抑制药物等奠定了基础。

#### 参考文献 (References):

[1] MCKERROW J H, CAFFREY C, KELLY B, et al. Proteases in parasitic diseases[J]. *Annu Rev Pathol*, 2006, 1:497-536.

[2] KIM K. Role of proteases in host cell invasion by *Toxoplasma gondii* and other Apicomplexa[J]. *Acta Trop*, 2004, 91(1):69-81.

[3] QUE X, NGO H, LAWTON J, et al. The cathepsin B of *Toxoplasma gondii*, toxopain-1, is critical for parasite invasion and rhoptry protein processing[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(28):25791-25797.

[4] ROSENTHAL P J. Falcipains and other cysteine proteases of malaria parasites[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 712:30-48.

[5] COWMAN A F, CRABB B S. Invasion of red blood cells by malaria parasites[J]. *Cell*, 2006, 124(4):755-766.

[6] SOLDATI D, DUBREMETZ J F, LEBRUN M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii* [J]. *Int J Parasitol*, 2001, 31(12):1293-1302.

[7] HUYNH M H, HARPER J M, CARRUTHERS V B. Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes [J]. *Parasitol Res*, 2006, 98(5):389-395.

[8] CZESNY B, GOSHU S, COOK J L, et al. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10):4080-4085.

[9] AMINAKE M N, SCHOOF S, SOLOGUB L, et al.

Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4):1338-1348.

[10] CAFFREY C R, RUPPEL A. Cathepsin B-like activity predominates over cathepsin L-like activity in adult *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* [J]. *Parasitol Res*, 1997, 83(6):632-635.

[11] YU D, WANG C C, WANG A L. Maturation of giardavirus capsid protein involves posttranslational proteolytic processing by a cysteine protease [J]. *J Virol*, 1995, 69(5):2825-2830.

[12] SCORY S, CAFFREY C R, STIERHOF Y D, et al. Trypanosoma brucei; killing of bloodstream forms *in vitro* and *in vivo* by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2 [J]. *Exp Parasitol*, 1999, 91(4):327-333.

[13] MACKAY Z B, O'BRIEN T C, GREENBAUM D C, et al. A cathepsin B-like protease is required for host protein degradation in *Trypanosoma brucei* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(46):48426-48433.

[14] BELLI S I, SMITH N C, FERGUSON D J. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! [J]. *Trends Parasitol*, 2006, 22(9):416-423.

[15] FULLER A L, MCDUGALD L R. Reduction in cell entry of *Eimeria tenella* (Coccidia) sporozoites by protease inhibitors, and partial characterization of proteolytic activity associated with intact sporozoites and merozoites [J]. *J Parasitol*, 1990, 76(4):464-467.

[16] RIEUX A, GRAS S, LECAILLE F, et al. Eimeripain, a cathepsin B-like cysteine protease, expressed throughout sporulation of the apicomplexan parasite *Eimeria tenella* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e31914.

[17] MATSUBAYASHI M, HATTA T, MIYOSHI T, et al. Localization of eimeripain, an *Eimeria tenella* cathepsin B-like cysteine protease, during asexual and sexual intracellular development in chicken ceca [J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(4):531-537.

[18] WIEDERANDERS B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides [J]. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50(3):691-713.

[19] SCHAEFFER M, SCHROEDER J, HECKEROTH A R, et al. Identification of lead compounds targeting the cathepsin B-like enzyme of *Eimeria tenella* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(3):1190-1201.

[20] KATRIB M, IKIN R J, BROSSIER F, et al. Stage-specific expression of protease genes in the apicomplexan parasite, *Eimeria tenella* [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13:685.