

安氏隐孢子虫 ABC2 基因的克隆表达与营养物质转运

王菊花¹ 王佳明¹ 刘丹丹¹ 王攀¹ 周杰¹ 薛秀恒^{2*}

(1. 安徽农业大学 动物科技学院, 合肥 230036;

2. 安徽农业大学 茶与食品学院, 合肥 230036)

摘要 为探究安氏隐孢子虫(*Cryptosporidium andersoni*) ATP 结合盒转运蛋白基因(*CaABC2*)对营养物质的转运功能,以安氏隐孢子虫基因组作为模板,设计合成 *CaABC2* 基因特异性引物,进行 PCR 扩增,获得 *CaABC2* 基因。将克隆的重组质粒 *CaABC2* 基因与真核表达质粒 pEGFP-C1 双酶切后再连接,构建重组真核质粒载体 pEGFP-C1-*CaABC2*;再采用脂质体转染法将重组质粒 pEGFP-C1-*CaABC2* 转入小鼠肠上皮细胞(Intestinal epithelial cells, IEC),检测不同组 IEC 细胞对总胆固醇、还原型谷胱甘肽、葡萄糖和碱性磷酸酶的转运效果。结果表明:扩增出 778 bp 的 *CaABC2* 基因,测序分析与预期片段大小一致;重组真核质粒载体 pEGFP-C1-*CaABC2* 转染小鼠 IEC 细胞后,观察到转染后的对照组和转染组 IEC 有绿色荧光;检测到在细胞内液中,转染组、对照组和空白组的总胆固醇浓度分别为 15.99 ± 0.12 、 11.80 ± 0.35 和 12.43 ± 0.16 mmol/L;还原型谷胱甘肽浓度分别为 15.24 ± 0.44 、 10.48 ± 0.35 和 11.04 ± 0.75 mmol/L;在细胞外液中,转染组、对照组和空白组的总胆固醇浓度分别 10.67 ± 0.17 、 14.82 ± 0.06 和 15.84 ± 0.17 mmol/L;还原型谷胱甘肽浓度分别为 10.20 ± 0.79 、 14.60 ± 0.45 和 15.60 ± 2.50 mmol/L。转染组总胆固醇、还原型谷胱甘肽浓度均显著大于空白组和对照组($P < 0.05$),而在细胞外液中,转染组总胆固醇、还原型谷胱甘肽的浓度均显著小于空白组和对照组($P < 0.05$)。在细胞内液和外液中,空白组与对照组总胆固醇、还原型谷胱甘肽的浓度之间均未见显著性差异($P > 0.05$);转染组、对照组和空白组之间的葡萄糖和碱性磷酸酶浓度均没有统计学差异($P > 0.05$)。*CaABC2* 基因具有协助转运总胆固醇、还原型谷胱甘肽、葡萄糖和碱性磷酸酶的作用,其中转运总胆固醇效果最为明显。

关键词 安氏隐孢子虫;ATP 结合盒式转运蛋白 2;克隆表达;营养转运

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2017)10-0097-06

文献标志码 A

Cloning expression and nutrient transportation of *Cryptosporidium andersoni* ATP-binding cassette 2 gene

WANG Juhua¹, WANG Jiaming¹, LIU Dandan¹, WANG Pan¹, ZHOU Jie¹, XUE Xiuheng^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China;

2. College of Tea & Food Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract To study the transportation function of *Cryptosporidium andersoni* ATP-binding cassette (*CaABC*) 2 gene, *C. andersoni* genome was used as PCR template, the primers for *CaABC2* gene were designed according to information obtained from GenBank. The amplification of *CaABC2* gene was conducted by PCR. The recombinant plasmid *CaABC2* and linear pEGFP-C1 vector were prepared by double enzyme digestion and linked by T4 DNA ligase. The pEGFP-C1-*CaABC2* recombinant plasmid was obtained, was then transfected and expressed in mouse IEC by liposome transfection. The concentration of nutrient (total cholesterol, reduced glutathione, glucose and alkaline phosphatase) in intracellular and extracellular fluids was analyzed. The results showed that, *CaABC2* gene of 778 bp was obtained. The recombinant plasmid pEGFP-C1-*CaABC2* was successfully transfected mouse IEC. Green fluorescence was observed in the control group and the transfect group. The concentrations of total cholesterol in the transfected group, the control

收稿日期: 2016-10-12

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1708085MC81); 国家自然科学基金项目(31001019)

第一作者: 王菊花, 副教授, 主要从事动物营养生理学研究, E-mail: wjhxxh@163.com

通讯作者: 薛秀恒, 副教授, 主要从事动物食品质量安全研究, E-mail: xuexiuheng@126.com

group and the blank group were respectively 15.99 ± 0.12 , 11.80 ± 0.35 and 12.43 ± 0.16 mmol/L. The concentrations of reduced glutathione were respectively 15.24 ± 0.44 , 10.48 ± 0.35 and 11.04 ± 0.75 mmol/L in intracellular fluid. The concentrations of total cholesterol in the transfected group, the control group and the blank group were respectively 10.67 ± 0.17 , 14.82 ± 0.06 and 15.84 ± 0.17 mmol/L; The concentrations of reduced glutathione were respectively 10.20 ± 0.79 , 14.60 ± 0.45 and 15.60 ± 2.50 mmol/L in extracellular fluid. The concentrations of total cholesterol and reduced glutathione in the transfected group were significantly higher than those in the control group and the blank group in intracellular fluid ($P < 0.05$). However, the concentrations of total cholesterol and reduced glutathione in the transfected group were significantly less than those in the control group and the blank group in extracellular fluid ($P < 0.05$). No significant differences in the concentrations of total cholesterol and reduced glutathione were observed between the control group and the blank group ($P > 0.05$). The concentrations of glucose and alkaline phosphatase displayed no significant differences among the transfected group, control group and the blank group ($P > 0.05$). In conclusion, CaABC2 assisted the transportations of total cholesterol, reduced glutathione, glucose and alkaline phosphatase and its transporting effect on total cholesterol was most obvious.

Keywords *Cryptosporidium andersoni*; ATP-binding cassette 2 gene; cloning expression; nutrient transportation

隐孢子虫病(Cryptosporidiosis)是由隐孢子虫(*Cryptosporidium*)侵入宿主后引起的人兽共患暴发性传染病^[1-2]。当隐孢子虫寄生在宿主胃肠道上皮细胞时,会影响上皮细胞营养物质的转运,进而导致患病的人和动物长期腹泻,致使营养不良、体重下降和生长发育迟缓^[3]。因此,研究ATP结合盒(ATP-binding cassette, ABC)转运蛋白的靶点和有效的转运抑制剂,确定特异性治疗隐孢子虫病的药物,在临床上具有重要的意义。迄今为止,人们通过多种方法研究治疗隐孢子虫病的药物^[4-7],但仍未取得突破性的进展。究其原因,发现寄生在胃肠道的隐孢子虫有新的简化代谢途径,能依靠虫体与纳虫空泡交界处的进食器膜上ABC转运蛋白对营养物质进行转运调节;也可依赖ATP的跨膜药物外排泵的功能,将药物逆浓度从细胞内泵出到细胞外^[8],从而产生多向抗药性的特性^[9],致使许多疫苗和药物均难以成功防治隐孢子虫病。

安氏隐孢子虫(*C. andersoni*)作为隐孢子虫的一个重要虫种,主要感染不同生长阶段的牛,导致牛体质变弱,奶牛产奶量下降^[10],对宿主造成严重危害。至今国内外对安氏隐孢子虫ABC(CaABC)转运蛋白对营养物质转运的研究报道甚少。本研究团队曾研究CaABC蛋白基因1,3对营养物质的转运作用^[11-12],但因ABC蛋白基因存在保守性,可能存在多个保守性功能区,跨膜转运不同的营养物质。本研究以安氏隐孢子虫为研究对象,扩增CaABC蛋白基因,转染小鼠肠道上皮细胞(Intestinal epithelial cells, IECs)后,探究其对营养物质转运与代谢特点,旨在为后期研制抑制CaABC蛋白营养

物质转运的特异性药物,控制安氏隐孢子虫体营养吸收和药物外排作用,为治疗安氏隐孢子虫病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因组来源

安氏隐孢子虫基因组cDNA,保存于安徽农业大学动物科技学院寄生虫实验室。

1.2 小鼠IEC培养液的配制

DMEM-F12培养液中添加:10%胎牛血清(FBS)+2 mmol/L谷氨酰胺(Gln)+10 ng/mL表皮生长因子(EGF)+100 IU/mL青霉素+100 μg/mL链霉素+5 μg/mL胰岛素(INS)。

1.3 CaABC2基因的克隆

根据Genbank中获得的CaABC2基因序列,利用Premier Primer 5.0软件设计特异性引物。

上游引物:5'-CCCTCGAGATGGGTGCTTCTTCCCTTCA-3'

下游引物:5'-GCTCTAGATGATCCACAGCCTGGTTCTC-3'

PCR反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,52.5℃ 35 s,72℃ 45 s,共35个循环;72℃延长10 min。反应结束后,于混有1%溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳成像观察,拍照记录。观察预期克隆片段大小。

1.4 重组克隆质粒pMD19-T Simple-CaABC2的构建

利用试剂盒回收并纯化PCR产物后,与pMD19-T克隆载体连接,转化DH5α感受态细胞后,接种于含氨苄青霉素的LB液体培养基中,于

37 °C 振荡培养 8 h, 将 PCR 鉴定为阳性的重组大肠杆菌菌液, 测序鉴定后, 提取测序正确的克隆大量培养, 再提取重组克隆质粒 pMD19-T Simple-CaABC2。

1.5 真核表达质粒载体 pEGFP-C1-CaABC2 的构建

重组克隆质粒 pMD19-T Simple-CaABC2 与真核表达载体 pEGFP-C1 均用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Xho*I 进行双酶切, 用试剂盒回收目的基因, T4 连接酶 16 °C 反应 6 h 后, 转化感受态细胞, 经过 PCR 鉴定测序分析后, 鉴定真核表达重组质粒载体 pEGFP-C1-CaABC2 的构建情况。

1.6 pEGFP-C1-CaABC2 转染小鼠 IEC 细胞

转染前 24 h 解冻 IEC 原代细胞, 铺于 1% 明胶包被的 24 孔板, 细胞密度为 2×10^5 个/mL, 培养至细胞铺满培养皿达 80%~90% 后, 以 400 μ g/mL 脂质体转染的质粒浓度进行转染。实验分为 3 组: 空白组(未转染质粒的 IEC 细胞); 对照组(转染空质粒 pEGFP-C1 的 IEC 细胞); 转染组(转染目的重组质粒 pEGFP-C1-CaABC2 的 IEC 细胞)。转染步骤参照 Wang 等^[11] 的方法。转染细胞经不同处理后, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 荧光显微镜下观察报告基因 pEGFP 荧光表达, 拍照记录转染情况。

1.7 pEGFP-C1-CaABC2 转染 IEC 后细胞内外营养物质浓度的变化

IEC 细胞经过不同处理后, 培养 24 h, 分别收集 3 组细胞的培养液作为细胞外液; 细胞用 PBS 冲洗后, 胰酶消化, 3 倍体积 IEC 细胞培养液终止消化, 300 g 离心 5 min 后弃上清, 再用超纯水重悬细胞, 超声波破碎细胞制成悬液作为细胞内液^[11]。通过

酶切位点 *Xho* I 和起始子 (Restriction enzyme sites of *Xho* I and initiator)

```

CCCTCGAGATGGGTGCTTCTTCCCTTCAGGAATCCTTTCTGGTAGGAATGGACAAGATAAGTCTGA
ATCGCATGAAATACCATCTGCAACTTCCGCTGTTCTGTCCGAACCTCCGTCATCATCGGCC
TGGCATTGCTCGTAGGTTTCGGGGGTGGCGACGTGAAACTGCTGGTGGGTGTCCTTTGCCGTTGCCGCC
TTCCGACTATTGCCTGCCTTGC GCGGCATCCTTTT CAGGATGGACACAATAACAGAACGTGTCTTTCTGC
CTGGATACTATCGAGCAAGGATTGGAAGAGGAGCACACGAAGAGAAGCTCCGGAAGGAGAGGAC
GTCACCTTTCTGCCGGCAATAACGATAGAGAATCTGACGTATGCCTACCCGGACAGCGGAAACGTCT
GGAACATTTTCGATTGCAGGATAGCCAAAGGCGAATATGTAGGTTTCCGCGGATACAGTGGGGCGGGCA
AATCCACGCTTTCAATCTGCTGATAGGTTTTCTGGTACCGGGTTCGGGAGAAATACGGATTGACGATA
CACCGCTGACTGCGAAAAACCGCACCTCATGGATCCGCCACATAGGATATGTACCGAAGAAGTCTAT
ATCTTCAACGGTACCTTGGCAGAAAACATCGCCTGGGAAACAAAGAGGTGGACAGAAGCAGGATAG
CGCATATCTCCAACAAGTGAGCCTGGAAAATTGGGCCAAGGAAC TCCCGAAGGGATAGATACGGTT
CTGGGAGAACCAGGCTGTGGAAGTCTAGAGC

```

终止子和酶切位点 *Xba* I (Terminator and restriction enzyme sites of *Xba* I)

图 2 PCR 扩增产物测序结果

Fig. 2 The sequencing result of PCR amplification product

试剂盒分别检测各组细胞内液和外液中总胆固醇、还原型谷胱甘肽、葡萄糖和碱性磷酸酶的浓度变化。

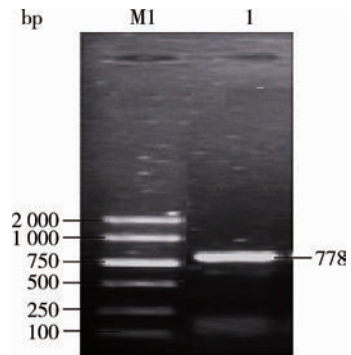
1.8 统计分析

结果用 SPSS 16.0 软件进行差异显著性分析, 浓度采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 两组均数的比较采用 *t* 检验, 检验水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 CaABC2 PCR 扩增结果鉴定

以安氏隐孢子虫基因组为模板, PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳成像后, 观察到扩增产物大小约为 778 bp, 与预期片段大小一致(图 1)。



M1, DNA 标志物; 1, CaABC2 PCR 产物。

M1, DNA marker; 1, CaABC2 product.

图 1 安氏隐孢子虫的 PCR 扩增产物

Fig. 1 *Cryptosporidium andersoni* PCR product

2.2 CaABC2 PCR 产物测序分析

PCR 产物测序结果表明目的片段大小为 778 bp, 去除限制性内切酶位点、起始子和终止子的 22 bp, 目的基因片段序列为 756 bp, 如图 2 所示。

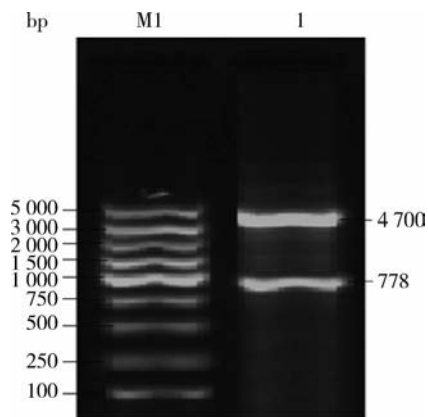
目的基因核苷酸序列翻译成 252 个氨基酸,将产物氨基酸序列和微小隐孢子虫 ABC 蛋白 (*CpABC*) 通过 BLAST 进行序列比对分析可知,氨基酸序列 N 端 Walker A 模体的 9 个氨基酸和 C 端 Walker B 的 10 个氨基酸与 *CpABC* 完全相同,且存在一段由 9 个氨基酸组成的 ABC 蛋白家族特有的核苷酸结合位点。确定本次 PCR 所扩增出的核苷酸产物为安氏隐孢子虫 ABC 蛋白基因序列功能区,命名为 *CaABC2* 基因。

2.3 pEGFP-C1-*CaABC2* 重组质粒的 PCR 鉴定

将构建的重组真核表达质粒用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 进行双酶切反应后,于 1% 琼脂糖凝胶电泳成像后,出现大小分别约为 778 bp 和 4.7 kb 的 2 条条带,前者为目的基因 *CaABC2* 条带,后者为线性 pEGFP-C1 质粒条带,均与预期大小一致,见图 3。并结合测序结果进行分析,证实重组真核表达质粒 pEGFP-C1-*CaABC2* 构建成功。

2.4 pEGFP-C1-*CaABC2* 重组质粒转染小鼠 IEC

重组质粒载体 pEGFP-C1-*CaABC2* 转染小鼠 IEC 细胞 24 h 后,观察到细胞生长状态良好。在荧光显微镜下观察发现:空白组细胞没有绿色荧光



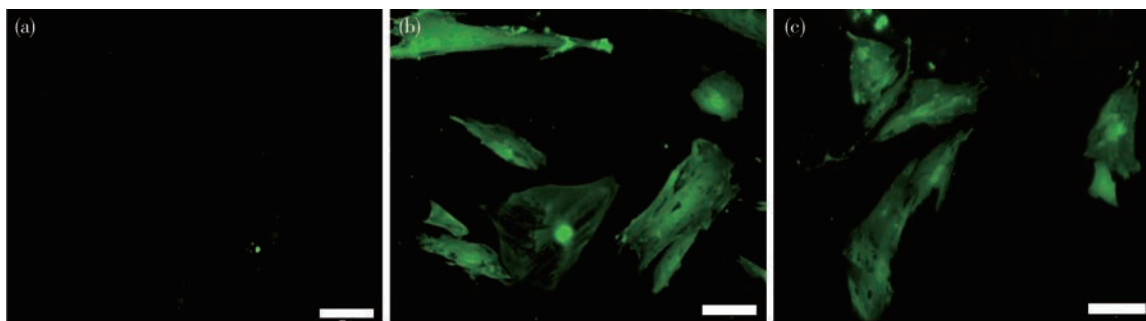
M1, DNA 标志物; 1, *CaABC2* 基因电泳条带和线性 pEGFP-C1 质粒条带。

M1, DNA marker; 1, *CaABC2* gene and pEGFP-C1 plasmid PCR products.

图 3 重组真核质粒 pEGFP-C1-*CaABC2* 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Electrophoresis of pEGFP-C1-*CaABC2*

(图 4(a)); 对照组和转染组出现绿色荧光(图 4(b), (c))。可知绿色荧光是由质粒中的报告基因 EGFP 表达所发出,重组质粒表达载体 pEGFP-C1-*CaABC2* 成功转染 IEC 细胞。



(a) 空白组 Blank group; (b) 对照组 Control group; (c) 转染组 Transfect group; 标尺=100 μm Bar=100 μm.

图 4 EGFP 在不同 IEC 组的表达

Fig. 4 Detection of EGFP expression in different IEC groups

2.5 *CaABC2* 对小鼠 IEC 的跨膜转运

由表 1 可知,在细胞内液中,转染组、对照组和空白组的总胆固醇浓度分别为 15.99 ± 0.12 、 11.80 ± 0.35 和 12.43 ± 0.16 mmol/L;还原型谷胱甘肽浓度分别为 15.24 ± 0.44 、 10.48 ± 0.35 和 11.04 ± 0.75 mmol/L。转染组总胆固醇、还原型谷胱甘肽浓度均显著大于空白组和对照组 ($P < 0.05$),而在空白组与对照组之间未见显著性差异 ($P > 0.05$);转染组、对照组和空白组之间的葡萄糖和碱性磷酸

酶浓度均没有统计学差异 ($P > 0.05$),表明转染组细胞转染 *CaABC2* 基因后,对总胆固醇、还原型谷胱甘肽具有显著的转运功能,而对葡萄糖和碱性磷酸酶的转运效果不明显。

在细胞外液中,转染组、对照组和空白组的总胆固醇浓度分别为 10.67 ± 10.67 、 14.82 ± 0.06 和 15.84 ± 0.17 mmol/L;还原型谷胱甘肽浓度分别为 10.20 ± 0.79 、 14.60 ± 0.45 和 15.60 ± 2.50 mmol/L。转染组总胆固醇、还原型谷胱甘肽的浓度均显著小

于空白组和对照组 ($P < 0.05$), 而空白组与对照组之间也未见显著性差异 ($P > 0.05$); 转染组、对照组和空白组之间的葡萄糖和碱性磷酸酶浓度也未见统计学差异 ($P > 0.05$), 表明 *CaABC2* 基因对总胆固

醇、还原型谷胱甘肽具有较强的转运功能, 而对葡萄糖和碱性磷酸酶的转运效果不明显, 说明 *CaABC2* 基因能够将细胞外液中总胆固醇、还原型谷胱甘肽协助转运到细胞内。

表 1 细胞内液、外液中总胆固醇、还原型谷胱甘肽、葡萄糖和碱性磷酸酶浓度的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of the content of total cholesterol, reduced glutathione, glucose and alkaline phosphatase in intracellular and extracellular fluid ($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别 Group	总胆固醇 Total cholesterol	还原型谷胱甘肽 Reduced glutathione	葡萄糖 Glucose	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase
细胞内液 Intracellular fluid				
空白组 Blank group	12.43 ± 0.16 a	11.04 ± 0.75 a	122.55 ± 0.73 a	28.71 ± 0.30 a
对照组 Control group	11.80 ± 0.35 a	10.48 ± 0.35 a	124.75 ± 0.18 a	29.17 ± 0.67 a
转染组 Transfect group	15.99 ± 0.12 b	15.24 ± 0.44 b	130.48 ± 0.97 a	42.78 ± 0.09 a
细胞外液 Extracellular fluid				
空白组 Blank group	15.84 ± 0.17 a	15.60 ± 2.50 a	133.79 ± 0.43 a	34.41 ± 0.77 a
对照组 Control group	14.82 ± 0.06 a	14.60 ± 0.45 a	131.08 ± 1.25 a	32.88 ± 1.05 a
转染组 Transfect group	10.67 ± 0.17 b	10.20 ± 0.79 b	122.86 ± 0.71 a	28.18 ± 0.79 a

注: 同一列细胞内液和细胞外液分别比较, 字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

Note: Values of intracellular and extracellular fluid are respectively compared within same column. Different superscript letters represent significant differences ($P < 0.05$), while with same letters represent no significant differences ($P > 0.05$).

3 讨论

3.1 *CaABC2* 基因的鉴定

ABC 转运蛋白广泛存在于各种生物体内。对多种生物的 ABC 蛋白功能结构的研究证实 ABC 蛋白在核苷酸结合域内有 1 个长约 200 aa 的保守片段, 包含 3 个模体 (Motif), 分别为 Walker A 模体 (P-loop)、Walker B 模体和 Walker C 模体, Walker C 模体位于前 2 个模体中间, Walker A 和 B 模体为所有的 ABC 蛋白所共有, 而 Walker C 模体是特征性模体^[13-14]。本研究以安氏隐孢子虫基因组为模板, 设计引物, 扩增产物基因序列, 通过氨基酸序列分析后, 发现扩增的基因包含 ABC 蛋白的典型结构: 模体 Walker A-“GSGKST” 和 Walker B-“VLLMDE”, 同时兼有 1 个 ABC 蛋白特征性模体 “LSGGMQQRVG”。因此, 确定本研究中 PCR 所扩增出的产物为安氏隐孢子虫 ABC 蛋白在核苷酸结合域内的保守片段, 并命名为 *CaABC2* 基因。

3.2 *CaABC2* 基因的转运功能

隐孢子虫膜上 ABC 蛋白种类较多, 分属于 ABC 转运蛋白家族中的不同亚类^[15], 与细胞的物质转运有关。研究证实 ABC 转运蛋白存在于隐孢子虫的虫体与宿主肠上皮细胞的纳虫空泡交界处膜

上, 参与多种物质分子的跨膜转运^[16]。ABC 转运蛋白每个成员具有高度保守的 ATP 核苷酸结合域, 可识别不同底物分子, 完成对这些物质的跨膜运输。对微小隐孢子虫的研究证实, 膜上参与营养物质转运的 ABC 蛋白主要是 *CpABC1*, *CpABC2* 与 *CpABC3*^[9,15]; *CpABC1* 存在于寄生虫与宿主细胞的边界, 是虫体进食器膜上的主要运载体, 转运与谷胱甘肽、葡萄糖、氨基酸、硫化物相结合的底物, 参与氨基酸的摄取^[17]; *CpABC2* 是隐孢子虫孢子顶端的蛋白质, 参与隐孢子虫蛋白质从头合成的补救途径^[18]; *CpABC3* 蛋白是氯化物进出隐孢子虫膜的主要转运蛋白, 可抑制宿主小肠绒毛上皮细胞对氯离子、钠离子等的正常吸收, 导致腹泻的发生^[18]。然而 *CaABC* 对大部分营养物质的转运功能还不确定, 本研究室前期研究证实 *CaABC1* 基因具有协助转运 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 离子的作用, 其中转运 Ca^{2+} 效果最明显, 转运功能类似于 *CpABC3* 蛋白基因^[12]。为了进一步研究 *CaABC* 的转运功能, 本研究克隆了 *CaABC2* 基因, 并构建重组表达质粒 pEGFP-C1-*CaABC2*, 转染小鼠 IEC 后进行表达, 发现 *CaABC2* 基因对总胆固醇、还原型谷胱甘肽、葡萄糖和碱性磷酸酶具有转运作用, 其中转运胆固醇效果最明显。结果类似于 *CpABC1* 蛋白基因的功能

能^[17]。总之,生物体 ABC 转运蛋白存在于细胞的各种膜状结构以及细胞膜上,主要功能是利用水解 ATP 所获的能量转运细胞内外的各种物质,泵入细胞所需的各种营养物质、泵出细胞代谢产物以及参与抵抗药物进入细胞过程^[8-12]。

4 结 论

CaABC2 基因具有转运总胆固醇、还原型谷胱甘肽营养物质的作用。研究 *CaABC* 营养物质转运,可以发现其转运靶点,为合理设计有效的隐孢子虫抑制剂提供了理论依据。

参考文献 References

- [1] 向毅,杨凤坤,李懿宏,姬红,舒晶,张唯哲,刘爱芹. 哈尔滨一牛源赖氏隐孢子虫分离株的分子鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2010,26(2):144-146
- Xiang Y, Yang F K, Li Y H, Ji H, Shu J, Zhang W Z, Liu A Q. Molecular identification of *Cryptosporidium ryanae* isolate from dairy cows in Harbin[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2010,26(2):144-146 (in Chinese)
- [2] Singh B B, Sharma R, Kumar H, Banga H S, Aulakh R S, Gill J P, Sharma J K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves[J]. *Veterinary Parasitology*, 2006, 140(1/2):162-165 (in Chinese)
- [3] 杨建伟,李国清,刘霞,张媛媛,徐前明. 基于 ITS-1 基因序列的隐孢子虫种群分类[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(4): 275-278
- Yang J W, Li G Q, Liu X, Zhang Y Y, Xu Q M. Population classification of the *Cryptosporidium* spp based on ITS-1 gene sequences [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009,31(4): 275-278 (in Chinese)
- [4] 朱民,张述义,何艳燕,潘彩娥,魏梅雄. 隐孢子虫感染小鼠动物模型的建立[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2003,16(1):13-15
- Zhu M, Zhang S Y, He Y Y, Pan C E, Wei M X. An animal model for *Cryptosporidium parvum* in mice [J]. *Chinese Journal of Parasitology Disease Control*, 2003,16(1):13-15 (in Chinese)
- [5] Morgan-Ryan U M, Fall A, Ward L A, Hijawi N, Sulaiman I, Fayer R, Thompson R C, Olson M, Lal A, Xiao L. *Cryptosporidium hominis* n sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2002,49(6):433-440
- [6] Hijawi N S, Meloni B P, Ryan U M, Olson M E, Thompson R C A. Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: Evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*[J]. *International Journal for Parasitology*, 2002,32(14):1719-1726
- [7] Le Chevallier M W, Di Giovanni G D, Clancy J L, Bukhari Z, Bukhari S, Rosen J S, Sobrinho J, Frey M M. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of

- Cryptosporidium* spp in source waters [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003,69(2):971-979
- [8] Ambudka S V, Kim I W, Sauna Z E. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABC1) [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 27(5): 392-400
- [9] Bonafonte M T, Romagnoli P A, McNair N, Shaw A P, Scanlon M, Leitch G J, Mead J R. *Cryptosporidium parvum*: Effect of multi-drug reversing agents on the expression and function of ATP-binding cassette transporters [J]. *Experimental Parasitology*, 2004,106(3/4):126-134
- [10] Paul S, Chandra D, Tewari A K, Banerjee P S, Ray D D, Raina O K, Rao J R. Prevalence of *Cryptosporidium andersoni*: A molecular epidemiological survey among cattle in India [J]. *Veterinary Parasitology*, 2009,161(1/2):31-35
- [11] Wang J H, Xue X H, Zhou J, Fan C Y, Xie Q Q, Wang P. Cloning and iron transportation of nucleotide binding domain of *Cryptosporidium andersoni* ATP-binding cassette (*CaABC*) gene[J]. *Korean Journal of Parasitology*, 2015, 53(3): 345-349
- [12] 王菊花,王攀,刘传欢,孙秀梅,解倩倩,薛秀恒. 安氏隐孢子虫 ATP 结合盒式转运蛋白 1 基因的克隆与离子转运[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2016,34(4):326-330
- Wang J H, Wang P, Liu C H, Sun X M, Xie Q Q, Xue X H. Cloning and ion transportation of *Cryptosporidium andersoni* ATP-binding cassette gene 1 [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2016,34(4):326-330 (in Chinese)
- [13] Perkins M E, Volkman S, Wirth D F, Le Blancq S M. Characterization of an ATP-binding cassette transporter in *Cryptosporidium parvum* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997,87(1):117-122
- [14] Walker J E, Saraste M, Runswick M J, Gay N J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold[J]. *EMBO Journal*, 1982,1(8):945-951
- [15] Gardner M J, Tettelin H, Carucci D J, Cummings L M, Smith H O, Fraser C M, Venter J C, Hoffman S L. The malaria sequencing project: Complete sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome[J]. *Parasitologia*, 1999,41(1-3):69-75
- [16] Klokouzas A, Shahi S, Hladky S B, Barrand M A, van Veen H W. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003, 22(3):301-317
- [17] Strong W B, Nelson R G. Preliminary profile of the *Cryptosporidium parvum* genome: An expressed sequence tag and genome survey sequence analysis [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000,107(1):1-32
- [18] Philippe L, Michel P, Anne F P. Overexpression, purification and characterization of a hexahistidine-tagged recombinant extended nucleotide-binding domain 1 (NBD1) of the *Cryptosporidium parvum* CpABC3 for rational drug design [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007, 152(1): 101-107