

郭长明, 袁 橙, 张步彩, 等. 柔嫩艾美耳球虫烯醇化酶基因的克隆表达和抗原性分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 642-648.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.023

柔嫩艾美耳球虫烯醇化酶基因的克隆表达和抗原性分析

郭长明^{1,2}, 袁 橙^{1,2}, 张步彩², 朱善元², 严若峰¹, 徐立新¹, 宋小凯¹, 李祥瑞¹

(1.南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095; 2.江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术重点实验室, 江苏 泰州 225300)

摘要: 从纯化的柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子中提取总 RNA, 应用 RT-PCR 技术克隆获得了烯醇化酶基因 (GenBank Accession No. GU169333)。烯醇化酶基因开放阅读框长 1 338 bp, 编码 445 个氨基酸。应用 DNASTAR 软件对氨基酸序列的亲水区域和疏水区域的分布、抗原指数及 T 细胞基序进行分析, 结果显示该蛋白质亲水性较强, 抗原指数高, 含较多 T 细胞表位。同时构建了烯醇化酶原核表达重组质粒 pET-28a(+)-ENO。用 IPTG 对重组质粒 pET-28a(+)-ENO 进行诱导表达, SDS-PAGE 结果显示表达的融合蛋白大小约为 5.17×10^4 , 主要存在于裂解上清中。Western blotting 结果显示该重组蛋白可被抗柔嫩艾美耳球虫的多克隆抗体识别, 表明该蛋白质具有较好的免疫原性。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; 烯醇化酶; 克隆; 表达; 免疫原性

中图分类号: S858.312.72⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0642-07

Cloning, expression and antigenic analysis of enolase gene of *Eimeria tenella*

GUO Chang-ming^{1,2}, YUAN Cheng^{1,2}, ZHANG Bu-cai², ZHU Shan-yuan², YAN Ruo-feng¹, XU Li-xin¹, SONG Xiao-kai¹, LI Xiang-rui¹

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College/Jiangsu Provincial Veterinary Bio-pharmaceutical High-tech Key Laboratory, Taizhou 225300, China)

Abstract: Enolase gene of *Eimeria tenella* (GenBank Accession No. GU169333) (*EtENO*) was amplified from total RNA extracted from *E. tenella* second-generation merozoites by RT-PCR. The sequence of *EtENO* contains an open reading frame of 1 338 bp and encodes 445 amino acid. DNASTAR software analysis showed that *EtENO* has high antigenic index, lots

of hydrophilicity plots and T cell motif. The recombinant plasmid pET-28a (+)-ENO was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL₂₁ (DE3) for expression. SDS-PAGE indicated that the fusion protein (5.17×10^4) was expressed in the supernatant after induction by IPTG. Western blotting revealed that the protein was specifically recognized by polyclonal antibodies against *E. tenella*, suggesting that the fusion protein is antigenic.

Key words: *Eimeria tenella*; enolase; cloning; expression; immunogenicity

收稿日期: 2016-12-27

基金项目: 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(NSFC-PSF, 中巴)(31661143017); 国家自然科学基金面上项目(31372428, 31672545); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 郭长明(1984-), 男, 山东临朐人, 博士, 讲师, 主要从事预防兽医学(寄生虫分子免疫和病原微生物方向)研究。
(E-mail) gcmscience@126.com

通讯作者: 李祥瑞, (E-mail) lixiangrui@njau.edu.cn

鸡球虫病是严重危害养禽业的寄生虫病,每年造成巨大的经济损失。生产实践表明,加强饲养管理可以减少鸡舍内、外球虫卵囊的数量,但仅仅依靠此项措施不能有效地控制鸡球虫病的发生。因此,抗球虫药物的使用是当前养鸡业中球虫病的主要防治手段^[1-3]。由于药物治疗花费较大和耐药虫株的出现,通过疫苗免疫来预防鸡球虫病已成为一项重要的手段^[4]。现阶段用于鸡球虫病防治的疫苗主要有球虫活疫苗和亚单位疫苗。近年来,开发了 Immuncox、Coccivac 和 EimerivacPlus 等活疫苗^[5]。但活卵囊疫苗具有以下缺点:(1)生产成本相对较高;(2)强毒疫苗的毒性较高;(3)减毒株疫苗存在毒力返强的可能;(4)某些虫株抗原变异,疫苗效果存在地理株的差异。已有研究表明,亚单位疫苗预防鸡球虫病可获得良好的效果^[6-11],成为球虫疫苗研究的热点。

迄今为止,已报道的具有一定免疫原性球虫基因的来源主要包括柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)、堆型艾美耳球虫(*E. acervulina*)、毒害艾美耳球虫(*E. necatrix*)和巨型艾美耳球虫(*E. maxima*)。其中 *E. tenella* 的抗原基因有 5401、S07、LPMC-61f、GX3262、Et7b2、EtIAI、Etrop/5 和 EtS3a^[12-14];而 *E. acervulina* 的抗原基因有 3-IE、9S4、EalA、MAI、EAMZp30-40 和 MA16 等^[15-16]。这些基因编码的抗原蛋白都具有良好的免疫原性,为鸡球虫亚单位疫苗的研究提供了重要的基础。

Labbé 等^[17]从裂殖体 cDNA 文库中克隆了柔嫩艾美耳球虫烯醇化酶(*EtENO*)基因,发现 *EtENO* 基因在子孢子阶段有表达,在缺氧的裂殖生殖过程中表达量增加。在激活的条件下,*EtENO* 存在于子孢子内部和细胞外,也存在于子孢子和裂殖体的细胞核中。以上结果提示 *EtENO* 不仅在糖酵解过程中发挥作用,而且可能参与了球虫入侵机体的过程,或可作为鸡球虫亚单位疫苗的候选蛋白。但 *EtENO* 的免疫原性尚未见研究报道。

本研究利用 RT-PCR 的方法,以纯化的 *E. tenella* 第二代裂殖子为材料,克隆 *EtENO* 基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF),用 DNASTAR 生物学软件对其序列进行了抗原性分析,同时构建原核表达载体 pET28a(+)-*ENO*,在大肠杆菌中表达 *EtENO* 融合蛋白,并对其抗原性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 球虫卵囊 *E. tenella* 卵囊由本实验室(南京农业大学兽医寄生虫分子与免疫实验室)保存。

1.1.2 细菌和载体 宿主菌 *E. coli* DH_{5α}、BL₂₁(DE3)、表达载体 pET28a(+)由本实验室保存, pMD18-T vector 克隆载体购自大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司。

1.1.3 试剂 Trizol 试剂为 Promega 公司产品, DEPC 为 Amresco 公司产品,反转录酶 AMV、Oligo(dT) 18、rTaq 酶、dNTP、DNA 分子量标准物 DL2000、T4 DNALigase、限制性内切酶 *Eco* RI、限制性内切酶 *Sal* I、水饱和酚和琼脂糖胶回收试剂盒均为大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司产品, His 标签蛋白纯化柱(His Trap™ FF crude)购自 GE Healthcare 公司,蛋白质 Marker 购自 Thermo 公司,鸡抗 *E. tenella* 多克隆抗体由本实验室保存,兔抗鸡二抗购自 Sigma 公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *E. tenella* 第二代裂殖子的分离和纯化 用 *E. tenella* 孢子化卵囊以每羽 1×10^5 个经口接种 14 日龄无球虫感染的三黄鸡,120 h 后扑杀取盲肠,参照文献[18]的方法分离和纯化第二代裂殖子。

1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取适量上述纯化好的 *E. tenella* 第二代裂殖子置于 DEPC 处理过的玻璃匀浆器中,加入 1 ml Trizol 试剂,研磨 10 min,采用一步法^[19]提取总 RNA。以 Oligo(dT) 18 为引物进行反转录合成 cDNA:总 RNA 1.0 μg、Oligo(dT) 18 1.0 μl 混匀后 75 °C 变性 5 min,立即置冰上冷却,再加入 dNTP (10 mmol/L) 2.0 μl、5×RT buffer 4.0 μl、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μl、RNasin 1.0 μl、AMV (5 U/μl) 1.0 μl,加 DEPC 处理过的 ddH₂O 至 20 μl,混匀,42 °C 水浴反应 1 h,然后 95 °C 灭活 5 min。

1.2.3 *EtENO* 基因的 RT-PCR 扩增 根据已发表的 *EtENO* 基因序列(GenBank 登录号:AAK38886.1),应用 PrimerPremier5.0 软件合成 1 对克隆引物。上游引物(P1)添加 *Eco* RI 酶切位点:5'-GAATTCATGGTG-GCCATAGTCGAGGTC-3';下游引物(P2)添加 *Sal* I 酶切位点:5'-GTCGACCTAGTTGGAGGGGTTTCGGA-3'。引物由上海英俊生物技术有限公司合成。以 cDNA

为模板,用 *rTaq* 酶扩增 *EtENO* 基因,PCR 条件为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,70 ℃ 到 50 ℃ 梯度退火 45 s,每个循环降落 1 ℃,72 ℃ 延伸 120 s,20 个循环;94 ℃ 变性 45 s,50 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 120 s,15 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后,取扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳并观察结果。紫外灯下切下含目的条带的琼脂糖凝胶,用胶回收试剂盒纯化目的片段备用。

1.2.4 *EtENO* 基因的鉴定 将回收的 *EtENO* PCR 产物与 pMD18-T 载体连接并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,按常规方法培养,提取质粒并用 *Eco* R I 和 *Sal* I 酶切鉴定和 PCR 扩增鉴定。将 3 个鉴定正确的克隆送上海英俊生物技术有限公司进行测序。将测序结果用 DNASTAR 软件进行编辑,并与 GenBank 的 *EtENO* 基因序列进行 BLAST 分析。

1.2.5 *EtENO* 基因的原核表达 用 *Eco* R I、*Sal* I 分别双酶切 pMD18-T-*ENO* 和 pET28a (+) 质粒,用胶回收试剂盒回收 *EtENO* 目的基因和 pET28a (+) 大片段,连接构建 pET28a (+)-*ENO* 重组质粒,转化 BL₂₁(DE3) 感受态细胞,在卡那霉素抗性平板上选择性培养后,按方法 1.2.4 筛选、鉴定阳性克隆。挑取阳性菌落,37 ℃ 振荡培养过夜,将菌液按 1:100 的比例接种于含 60 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$,加入 IPTG (终浓度 1 mmol/ml) 进行诱导表达,分别收集 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min、75 min 的菌液各 1 ml 进行 SDS-PAGE 分析。将菌体重悬于 PBS 溶液,在冰浴中超声破碎,12 000 r/min 离心 5 min,分别收集上清和沉淀,用 SDS-PAGE 分析表达蛋白在菌体中的分布。重组蛋白的纯化参照 His 标签蛋白纯化柱说明书进行。

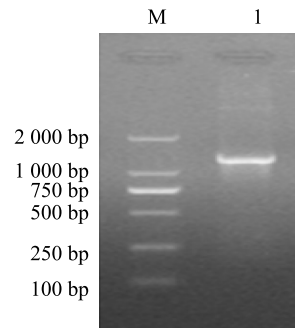
1.2.6 Western blot 分析 镍柱纯化的表达产物和转化有 pET28a (+) 的 BL21(DE3) 菌体蛋白对照经 SDS-PAGE 后,以 Bio-RAD 系统电转移至 PVDF 膜上,经牛血清白蛋白封闭后,依次加入兔抗鸡 gIgG 抗体,最后在联苯胺(DAB)溶液中显色,观察结果。

2 结果

2.1 *EtENO* 基因 RT-PCR 扩增

利用合成的特异引物,以 *E. tenella* 第二代裂殖子 cDNA 为模板,进行 RT-PCR。PCR 产物的 1% 琼

脂糖凝胶电泳结果显示,在约 1 500 bp 处有一特异性目的条带,大小与预期 1 338 bp 一致(图 1)。



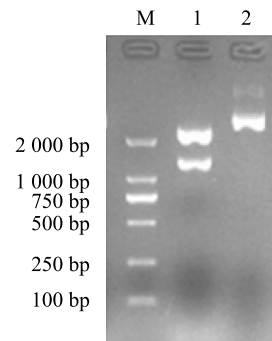
M:DL2000 分子质量标准;1:RT-PCR 产物。

图 1 PCR 扩增 *EtENO* 基因

Fig.1 Amplification of *EtENO* gene by PCR

2.2 *EtENO* 基因的酶切鉴定及 PCR 鉴定

PCR 产物连接 pMD18-T 克隆载体获得 pMD18-T-*ENO* 重组质粒,*Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切结果显示,在约 1 338 bp 处有一目的条带,与预期大小一致(图 2)。以重组质粒 pMD18-T-*ENO* 为模板,用克隆引物进行 PCR 鉴定,结果与酶切鉴定结果一致(图 3)。



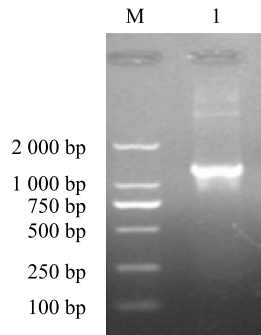
M:DL2000 分子质量标准;1:*Eco* R I/*Sal* I 双酶切;2:pMD18-T-*ENO* 质粒。

图 2 重组质粒 pMD18-T-*ENO* 的双酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*ENO* by *Eco*R I/*Sal* I digestion

2.3 *EtENO* 基因序列测定及分析

将酶切及 PCR 鉴定均正确的重组质粒进行测序,结果显示克隆片段含一个长 1 338 bp 的开放阅读框(ORF),与 Labbé 等^[17]报道的 *EtENO* 基因(登录号:AF353515)的同源性为 99%;编码 445 个氨基酸,理论分子量为 4.80×10^4 。该序列已提交 GenBank,登录号为 GU169333。



M:DL2000 分子质量标准;1:pMD18-T-*ENO*。

图3 重组质粒 pMD18-T-*ENO* 的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-*ENO* by PCR

2.4 EtENO 蛋白抗原性分析

应用 DNASTar 软件对 EtENO 氨基酸序列的亲水区域 (Hydrophilicity plot) 的分布、抗原指数 (Antigenic index) 及 T 细胞表位 (T cell motif) 进行分析 (图 4)。*EtENO* 基因编码的蛋白质片段有大量的亲水区域,并且连续分布;氨基酸区域抗原指数较高且连续分布,有 8 个区域抗原指数达到 3 以上,其中在 12~22 位、301~313 位氨基酸抗原指数最高,达到 3.4;EtENO 蛋白质共有 19 个 T 细胞表位,连续分布。从以上结果可以看出,EtENO 蛋白质片段亲水性较强,抗原指数高,含较多 T 细胞表位,这些为进一步研究 EtENO 的生物学功能提供了参考,利用该基因构建 DNA 疫苗可能会有较好的保护效果。

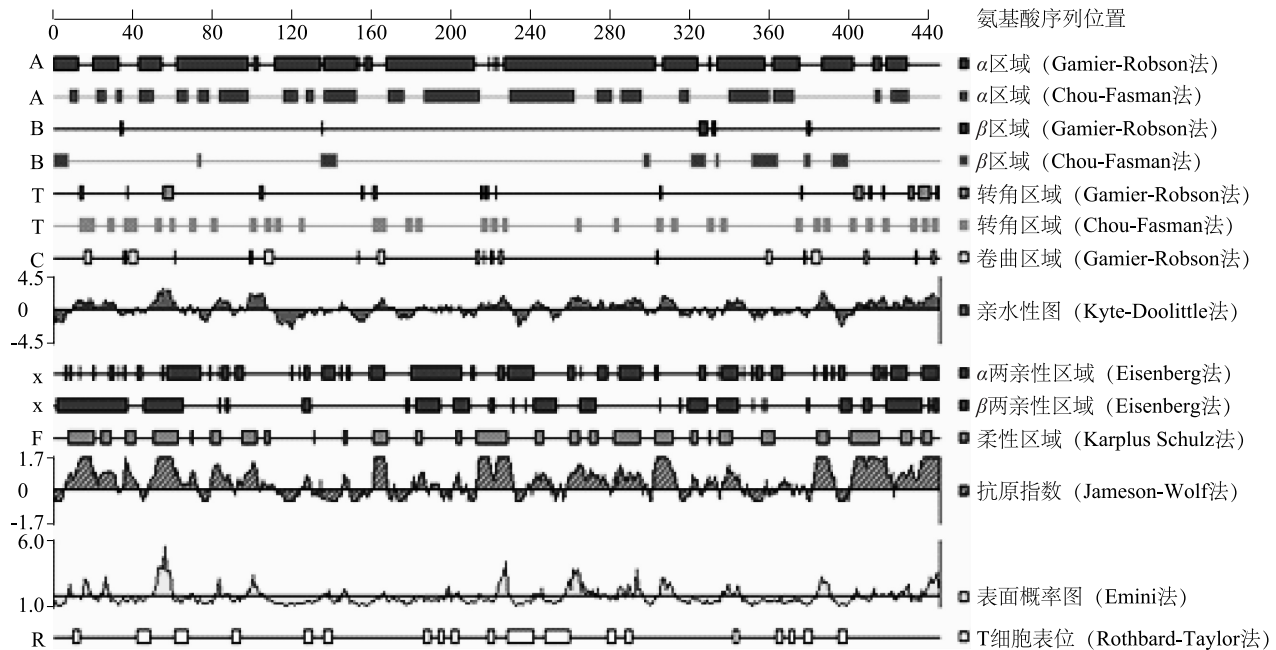


图4 EtENO 蛋白质结构及抗原性分析

Fig.4 Analysis of structure and antigenic index of EtENO protein

2.5 EtENO 基因原核表达质粒的构建

用 *Eco* R I、*Sal* I 对提取的重组表达质粒 pET28a(+)-*ENO* 进行酶切鉴定,切出 1 338 bp 左右的片段,与预计大小相符 (图 5)。

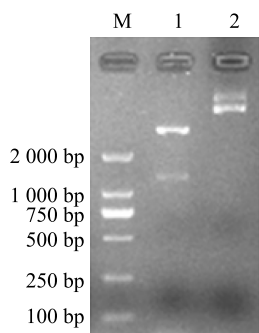
2.6 重组表达质粒 pET28a(+)-*ENO* 在大肠杆菌中的表达

鉴定为阳性的重组单菌落用 IPTG 诱导表达,分别收集 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min、75

min 的诱导表达菌。SDS-PAGE 电泳结果表明,EtENO 融合表达蛋白大小在 5.17×10^4 左右 (其中 EtENO 为 4.80×10^4 , pET28a 载体为 3.7×10^3),诱导后 45 min 表达量最高 (图 6)。超声波破碎后的沉淀与上清的 SDS-PAGE 分析结果表明,大部分重组蛋白以可溶性蛋白质形式表达 (图 7)。

2.7 重组 EtENO 蛋白质的纯化

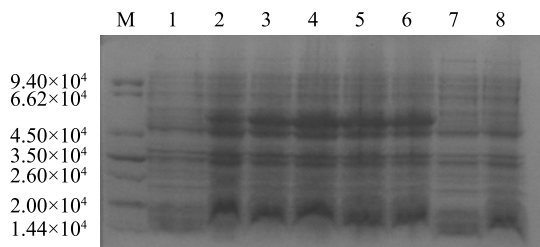
细菌裂解上清经过蛋白质纯化柱纯化后,进行



M: DL2000 分子质量标准; 1: *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切; 2: 重组质粒 pET28a(+)-*ENO*。

图 5 重组质粒 pET28a(+)-*ENO* 双酶切鉴定

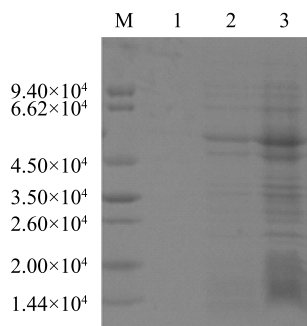
Fig.5 Analysis of the recombinant plasmids pET28a(+)-*ENO* digested with restriction endonucleases



M: 蛋白质分子量标准; 1~6: pET28a(+)-*ENO* 分别诱导 0 min、15 min、30 min、45 min、60 min、75 min 后的菌液; 7: 空载体 pET28a(+)-IPTG 诱导前菌液; 8: 空载体 pET28a(+)-IPTG 诱导 75 min 后的菌液。

图 6 pET28a(+)-*ENO* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of expression products of pET28a(+)-*ENO*

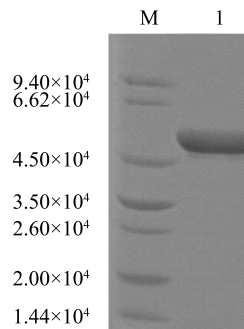


M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导表达菌液裂解沉淀; 2: 诱导表达菌液裂解上清; 3: 诱导表达 45 min 的菌液。

图 7 重组 EtENO 蛋白质可溶性的 SDS-PAGE 分析

Fig.7 SDS-PAGE analysis of solubility of recombinant EtENO protein

SDS-PAGE 分析, 结果显示得到了纯化的重组蛋白 (图 8)。



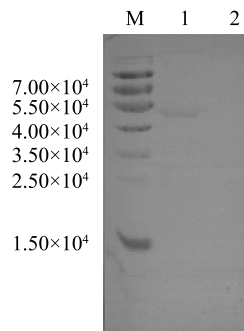
M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化后的蛋白质。

图 8 纯化重组 EtENO 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig.8 SDS-PAGE of recombinant EtENO protein after purification

2.8 Western blot 分析重组 EtENO 蛋白质的抗原性

纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜上进行蛋白质印迹分析 (图 9)。从图 9 中可见在分子量 5.17×10^4 处有一条明显的蛋白质印迹带, 说明该重组蛋白具有反应原性和球虫抗原性。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 纯化后的蛋白; 2: 转化有 pET28a(+)-BL21(DE3) 菌体蛋白对照。

图 9 Western blot 分析重组 EtENO 蛋白质的抗原性

Fig.9 Antigenicity analysis of recombinant EtENO protein by Western blot

3 讨论

烯醇化酶是糖酵解途径中催化 2-磷酸甘油酸与磷酸烯醇式丙酮酸之间转化的酶, 是一种比较保守的蛋白质。很多研究者发现烯醇化酶定位于细

菌、真菌、原虫^[20]、蠕虫^[21]的表面。它是一种多功能蛋白质,能与细胞骨架蛋白质和多聚核苷酸结合,具有热休克蛋白的功能^[22-24],还是纤溶酶原及层粘连蛋白的受体^[25],在感染和免疫中可作为抗体作用的靶分子^[26],在寄生虫侵袭宿主组织过程中发挥作用^[20]。

Labbé 等^[17]首次对 EtENO 特性进行了研究,发现在子孢子阶段就能检测到 *EtENO* 基因的表达,并且发现在缺氧的第一代裂殖生殖过程中,*EtENO* 基因的表达量增加了。在激活的条件下,烯醇化酶不仅存在于子孢子内部,并且一部分分泌到细胞外。另外,烯醇化酶也存在于子孢子和裂殖体的细胞核中。De 等^[27]通过实验证明 EtENO 作为免疫原性蛋白存在于子孢子阶段。Liu 等^[28]研究发现 EtENO 贯穿于柔嫩艾美耳球虫生活史的始终。这些研究结果提示烯醇化酶不仅在糖酵解过程中发挥作用,还可能参与寄生虫入侵机体的过程,并且可能有调节基因表达的功能,可作为开发新型疫苗的候选蛋白。

本研究利用国外已报道的 *EtENO* 基因序列设计一对特异性引物,利用 RT-PCR 方法从 *E. tenella* 第二代裂殖子表面成功克隆出 *EtENO* 基因 ORF,通过测序得知该基因 ORF 长 1 338 bp,编码 445 个氨基酸。用 DNASTAR 生物学软件进行分析,发现本研究所克隆的 *EtENO* 基因 ORF 与国外公布的 *EtENO* 基因 ORF 核苷酸同源率为 99%,仅有 1 个碱基发生突变,说明这个基因在不同地理株之间有很高的保守性,推测突变原因可能是由于不同地理株发生变异造成的。本研究采用基因工程技术获得大量纯度较高的重组 EtENO 蛋白,抗原性分析结果显示,该蛋白反应原性和球虫抗原性较好,是一个在鸡球虫亚单位疫苗和基因工程疫苗研发中具有研究价值的球虫抗原蛋白。这为进一步研究 *E. tenella* 烯醇化酶的生物学功能以及免疫保护性奠定了基础。

参考文献:

- [1] SANGSTER N, BATTERHAM P, CHAPMAN H D, et al. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis[J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32(5):637-653.
- [2] VERMEULEN A N, SCHAAP D C, SCHETTERS T P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination[J]. Veterinary Parasitology, 2001, 100(1/2):13.
- [3] KHEIRABADI K P, KATADJ J K, BAHADORAN S, et al. Comparison of the anticoccidial effect of granulated extract of *Artemisia sieberi*, with monensin in experimental coccidiosis in broiler chickens[J]. Experimental Parasitology, 2014, 141(1):129-133.
- [4] SHAH M A A, YAN R F, XU L X, et al. A recombinant DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 induces immunity against experimental *E. tenella* infection[J]. Veterinary Parasitology, 2010, 169(1/2):185-189.
- [5] 索 勋. 鸡球虫晚熟虫株活苗研制成功[J]. 中国家禽, 1998, 20(9):44.
- [6] CRANE M S, GOGGIN B, PELLEGRINO R M, et al. Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen[J]. Infection & Immunity, 1991, 59(4):1271-1277.
- [7] PEEK H W, LANDMAN W J. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies[J]. Veterinary Quarterly, 2011, 31(3):143-161.
- [8] PROFOUS-JUCHELKA H, LIBERATOR P, TURNER M. Identification and characterization of cDNA clones encoding antigens of *Eimeria tenella*[J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 1988, 30(3):233-241.
- [9] SMITH N C, WALLACH M, PETRACCA M, et al. Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella* [J]. Parasitology, 1994, 109(5):551-557.
- [10] SMITH N C, WALLACH M, MILLER C M, et al. Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*; western blot analysis of protective antibodies induced by infection[J]. Infection & Immunity, 1994, 62(11):4811-4817.
- [11] SONG X K, XU L X, YAN R F, et al. Construction of *Eimeria tenella*, multi-epitope DNA vaccines and their protective efficacies against experimental infection[J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2015, 166(3/4):79-87.
- [12] DALLOUL R A, LILLEHOJ H S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development[J]. Expert Review of Vaccines, 2006, 5(1):143-163.
- [13] OUARZANE M, LABBÉ M, PÉRY P. *Eimeria tenella*: cloning and characterization of cDNA encoding a S3a ribosomal protein [J]. Gene, 1998, 225(1/2):125-130.
- [14] FRIED M, MENCHER D, SAR-SHALOM O, et al. Developmental gene expression of a 230-kilodalton macrogamete-specific protein of the avian coccidial parasite, *Eimeria maxima*[J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 1992, 51(2):251-262.
- [15] LAURENT F, BOURDIEU C, YVORÉ P, et al. Cloning and expression of cDNA encoding an *Eimeria acervulina* 70 kD asporozoite protein which is related to the 70 kDa heat-shock protein family [J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 1994, 66(2):349.
- [16] LILLEHOJ H S, CHOI K D, JENKINS M C, et al. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis [J]. Avian Diseases, 1999, 44(2):379-389.

- [17] LABBÉ M, PÉROVAL M, BOURDIEU C, et al. *Eimeria tenella* enolase and pyruvate kinase: a likely role in glycolysis and in others functions[J]. International Journal for Parasitology, 2006, 36(14):1443-1452.
- [18] 刘立恒,李俊,徐立新,等. 柔嫩艾美耳球虫第二代裂殖子的分离纯化[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(12):38-40.
- [19] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:522.
- [20] PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases[J]. Cellular & Molecular Life Sciences Cmls, 2001, 58(7):902.
- [21] JOLODAR A, FISCHER P, BERGMANN S, et al. Molecular cloning of an α -enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen[J]. Biochimica Et BiophysicaActa, 2003, 1627(2/3):111.
- [22] WILLIAMS L A, DING L, HORWITZ J, et al. τ -crystallin from the turtle lens: Purification and partial characterization[J]. Experimental Eye Research, 1985, 40(5):741-749.
- [23] TAKEI N, KONDO J, NAGAIKE K, et al. Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase[J]. Journal of Neurochemistry, 1991, 57(4):1178-1184.
- [24] AL-GIERY A G, BREWER J M. Characterization of the interaction of yeast enolase with polynucleotides[J]. Biochimica Et BiophysicaActa, 1992, 1159(2):134-140.
- [25] CARNEIRO C R, POSTOL E, NOMIZO R, et al. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*[J]. Microbes & Infection, 2004, 6(6):604-608.
- [26] TERRIER B, DEGAND N, GUILPAIN P. Alpha-enolase: A target of antibodies in infectious and autoimmune diseases[J]. Autoimmunity Reviews, 2007, 6(3):176-182.
- [27] DE V P, CHICH J F, FAIGLE W, et al. Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry[J]. International Journal for Parasitology, 2004, 34(12):1321-1331.
- [28] LIU L H, XU L X, YAN F B, et al. Immunoproteomic analysis of the second-generation merozoite proteins of *Eimeria tenella*[J]. Veterinary Parasitology, 2009, 164(2-4):173.

(责任编辑:张震林)