

柔嫩艾美耳球虫孢子发育阶段虫体抑制性消减文库的构建 Construction of Subtractive cDNA Libraries of the Sporogony Stage of *Eimeria tenella* by Suppression Subtractive Hybridization

韩红玉 林矫矫 赵其平 董 辉 姜连连 王 鑫 韩静芳 黄 兵*

HAN Hong-Yu ,LIN Jiao-Jiao ,ZHAO Qi-Ping ,DONG Hui ,JIANG Lian-Lian ,WANG Xin ,HAN Jing-Fang and HUANG Bing*

中国农业科学院上海兽医研究所 ,农业部动物寄生虫学重点开放实验室 ,上海 200232

Key Laboratory for Animal Parasitology of Ministry of Agriculture / Shanghai Veterinary Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Shanghai 200232 ,China

摘 要 为了分离鉴定柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)孢子发育阶段虫体的差异表达基因,分别以柔嫩艾美耳球虫未孢子化卵囊和孢子化卵囊为驱动组、子孢子为实验组,或未孢子化卵囊为驱动组、孢子化卵囊为实验组,利用抑制性消减杂交(SSH)技术,构建了 2 个子孢子 cDNA 消减文库和 1 个孢子化卵囊 cDNA 消减文库。随机从 3 个 cDNA 消减文库中分别挑取 50 个克隆,经 PCR 鉴定 2 个子孢子 cDNA 消减文库的重组率都为 96%,孢子化卵囊 cDNA 消减文库的重组率为 98%。从每个文库中随机挑取 50 个克隆测序,并进行同源性比较分析,结果显示:从孢子化卵囊 cDNA 消减文库中获得了 13 个单一有效序列,其中 8 个 EST 与已知蛋白同源性很高,从 2 个子孢子 cDNA 消减文库中共获得了 40 个单一有效序列,其中 9 个 EST 与已知蛋白同源,其余可能为柔嫩艾美耳球虫的新基因。这些结果为分离柔嫩艾美耳球虫新功能基因和进一步探索防治球虫病的方法提供了理论基础。

关键词 柔嫩艾美耳球虫,未孢子化卵囊,孢子化卵囊,子孢子,抑制性消减杂交

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)06-1005-06

Abstract In order to clone and identify differentially expressed genes in the sporogony stage of *Eimeria tenella*, the cDNAs from unsporulated oocysts and sporulated oocysts of *E. tenella* were used as driver, respectively, the cDNAs from sporozoites of *E. tenella* was used tester. Two subtractive cDNA libraries of sporozoites were constructed by using the technique of suppression subtractive hybridization(SSH). the cDNAs from unsporulated oocysts was used driver, the cDNAs from sporulated oocysts was used tester, one subtractive cDNA library of sporulated oocysts was constructed. PCR amplification revealed that the two subtractive cDNA libraries of sporozoites and one subtractive cDNA library of sporulated oocysts contained approximated 96%, 96% and 98% recombinant clones, respectively. Fifty positive clones were sequenced and analyzed in GenBank with Blast search from three subtractive cDNA libraries, respectively, thirteen unique sequences were found from the subtractive cDNA

Received : February 26 , 2007 ; Accepted : May 16 , 2007 .

This work was supported by the grants from the National Natural Technology Resource Sharing Platform (No. 2005DKA21205-4) and the National High Technology Research and Development Program (863 Program , No. 2006AA10A207-1) .

* Corresponding author . Tel : + 86-21-54113251 ; E-mail : huangbing232@163.com

国家自然科学基金资源共享平台项目(No. 2005DKA21205-4)和国家高技术研究发展计划(863 计划, No. 2006AA10A207-1)资助。

library of sporulated oocysts, eight ESTs shared significant identity with previously described. A total of forty unique sequences were obtained from the two subtractive cDNA libraries, nine ESTs shared significant identity with previously described, the other sequences represent novel genes of *E. tenella* with no significant homology to the proteins in Genbank. These results have provided the foundation for cloning new genes of *E. tenella* and further studying new approaches to control coccidiosis.

Key words *Eimeria tenella*, unsporulated oocysts, sporulated oocysts, sporozoite, suppression subtractive hybridization

鸡球虫病是由几种艾美耳球虫寄生于鸡肠道所引起的一种危害极其严重的全球性寄生虫病,严重危害鸡的生长发育,据报道全世界每年饲养的鸡因球虫病造成的损失大约 30 亿美元^[1]。目前,鸡球虫病的控制主要还是依赖于抗球虫药,但随着鸡球虫抗药性问题的日趋严重以及人们对食品安全的日益关注,人们期待用更理想的方法来替代抗球虫药物的使用。球虫活疫苗的应用提供了一种替代药物控制鸡球虫病的技术手段,但活疫苗不可避免地存在保存难、散毒及潜在的致病威胁等缺点,未能在鸡场得到广泛使用,所以目前迫切需要寻找新的防治手段来控制球虫病。从长远看,无论是用药物、疫苗,还是两者交替结合使用来控制球虫病,挖掘、发现鸡球虫新的作用靶标非常重要,对新靶标的研究将为新型疫苗的研制和新药的筛选提供理论基础。

鸡球虫生活史比较复杂,各发育阶段虫体基因表达都存在一些差异,到目前为止国内外已克隆和分离了不同发育阶段虫体的一些基因片段,有的基因全长序列已被克隆和测序,功能也初步得到了研究,其中一些基因已被证明是某个发育阶段所特有的,如入侵相关蛋白(Invasion-Related Protein)基因^[2,3]等。虽然国内外的研究者已对各发育阶段的差异基因作了一些初步的探索,但尚没有全面地对差异基因进行系统地研究分析,而这些发育阶段的差异基因可能与鸡球虫的入侵、生长、发育和增殖等有关。全面系统地分离鉴定鸡球虫不同发育阶段的差异表达基因,并探讨其功能,有可能为鸡球虫病免疫预防和新治疗药物的研究开发提供理论基础,寻找到控制鸡球虫病的有效作用靶标。柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)是一种分布广、在几种鸡艾美耳球虫中致病性最强的球虫,是研究鸡球虫病的一种模式物种。为了全面系统地分析 *E. tenella* 孢子发育阶段差异表达基因,本研究采用抑制性消减杂交技术(SSH)首次构建了柔嫩艾美耳球虫孢子与孢子化卵囊和子孢子与未孢子化卵囊两个消减 cDNA 文库,构建了孢子化卵囊与未孢子化卵囊的消减 cDNA 文库,为进一步筛选 *E. tenella* 主要发育阶段的差异表达基因、研究其功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

柔嫩艾美耳球虫(*E. tenella*)卵囊,编号:CAAS 21111601,由中国农业科学院上海兽医研究所保存提供。

1.2 主要试剂

提取总 RNA 的试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。Oligotex[®] mRNA Mini Kit 和 QIAquick[®] Gel Extraction kit 购自 QIAGEN 公司。PCR-Select[™] cDNA Subtraction kit 和 Advantage[™] cDNA PCR Kit 购自 CLONTECH 公司。pGEM-T-easy vector 购自 Promega 公司。

1.3 方法

1.3.1 柔嫩艾美耳球虫未孢子化卵囊、孢子化卵囊、子孢子的制备:卵囊的制备和纯化参照蒋建林^[4]等的虫体纯化方法略做修改。取 4℃ 保存的 *E. tenella* 孢子化卵囊接种 14 日龄无球虫鸡,接种后第 8 天,杀鸡取盲肠,收集未孢子化卵囊。收集的未孢子化卵囊一部分纯化后液氮保存备用;另一部分放入 2.5% 的重铬酸钾溶液中于 28℃ ~ 30℃ 培养箱中进行孢子化,待卵囊孢子化后,再纯化收集孢子化卵囊,收集的孢子化卵囊一部分液氮保存备用,另一部分用于收集子孢子。参照宋翠萍等^[5]建立的方法进行子孢子的制备,在操作过程中作了相应的修改。将纯化的孢子化卵囊,用玻璃匀浆器破碎卵囊,PBS 洗涤离心后收集孢子囊,收集的孢子囊用 PBS 悬浮后加入 5% ~ 10% 的鸡胆汁和 0.25% ~ 1% 的胰蛋白酶,混匀后 40℃ 消化直至 90% 的子孢子溢出,离心收集含子孢子的粗提液,PBS 悬浮后,依次用 G3 漏斗和 G4 漏斗抽滤,收集滤液离心洗涤后即获得所需的子孢子,纯化的子孢子收集后液氮保存备用。

1.3.2 柔嫩艾美耳球虫未孢子化卵囊、孢子化卵囊和子孢子总 RNA 的提取和 mRNA 的分离:取纯化的未孢子化卵囊、孢子化卵囊和子孢子,按 Trizol 试剂盒说明书操作,分别提取 *E. tenella* 3 个阶段虫体的 Total RNA,紫外分光光度计测定其浓度并分析其纯度,符合要求后用于分离 mRNA。mRNA 的分离按照

Oligotex[®] mRNA Mini Kit 说明书操作,用同样的方法测定 mRNA 的浓度。

1.3.3 抑制性消减杂交 利用 Clontech 公司的 PCR-Select[™] cDNA Subtraction kit 通过抑制性消减杂交的方法构建 *E. tenella* 3 个不同发育阶段的抑制性消减文库。在实验过程中,分别以未孢子化卵囊的 cDNA 作为 Driver(驱动组),孢子化卵囊的 cDNA 作为 Tester(实验组),或以未孢子化卵囊的 cDNA 作为 Driver(驱动组),子孢子的 cDNA 作为 Tester(实验组)或以孢子化卵囊的 cDNA 作为 Driver(驱动组),子孢子的 cDNA 作为 Tester(实验组)。具体实验步骤按照试剂盒说明书操作。

1.3.4 柔嫩艾美耳球虫孢子发育阶段 cDNA 消减文库的构建及文库的扩增和保存:用 QIAquick[®] Gel Extraction kit 对消减杂交后的第二次 PCR 扩增产物进行纯化回收,具体步骤参照说明书,回收后的 PCR 扩增产物分别与 pGEM-T-easy vector 在 T₄ DNA 连接酶作用下于 4℃ 连接过夜。取连接产物 10 μ L 转化新鲜制备的大肠杆菌 JM109 受体菌,涂含 X-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素 LB 固体平板后过夜培养,全部白色菌落用甘油保存。每个消减文库随机挑取过夜培养的白色菌落 50 个于 LB(含氨苄青霉素)液体培养基中过夜培养,用 pGEM-T-easy vector 两端的通用引物进行 PCR 扩增,观察文库的重组率以及插入片段的大小和分布范围。

1.3.5 阳性克隆的序列测定及同源性分析:分别从柔嫩艾美耳球虫孢子发育阶段 3 个 cDNA 消减文库中,随机挑取 50 个阳性克隆送上海博星基因芯片有限责任公司进行测序,测序结果在 GenBank 上进行同源性分析比较(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)。

2 结果

2.1 *E. tenella* 未孢子化卵囊、孢子化卵囊和子孢子 Total RNA 的提取

用 Trizol 试剂提取了 3 个阶段的 Total RNA,经紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 的比值均大于 1.9 符合纯度要求。在甲醛变性凝胶电泳上,可见明显的 28S 和 18S 两个条带(如图 1 所示),表明提取的 Total RNA 质量良好,可用于后续实验。

2.2 双链 cDNA 的合成和 *Rsa* I 酶切效率的分析

E. tenella 未孢子化卵囊、孢子化卵囊、子孢子总 RNA 经反转录后合成 cDNA,使用的反转录引物带有 *Rsa* I 酶切位点,因此合成的双链 DNA 3' 端带

有一个 *Rsa* I 酶切位点。经 *Rsa* I 酶切后,方可与带有同样 *Rsa* I 酶切位点的 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 连接。合成的双链 cDNA 经 *Rsa* I 酶切后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果合成的 ds cDNA 经酶切后片段大小分布在 0.1~2.0kb,说明酶切比较完全(如图 2 所示)。

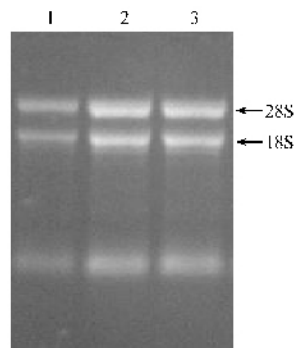


图 1 *E. tenella* 孢子发育阶段虫体总 RNA 的提取

Fig.1 Isolation of total RNA from sporogony stage of *E. tenella* 1: total RNA of sporozoites; 2: total RNA of unsporulated oocysts; 3: total RNA of sporulated oocysts.

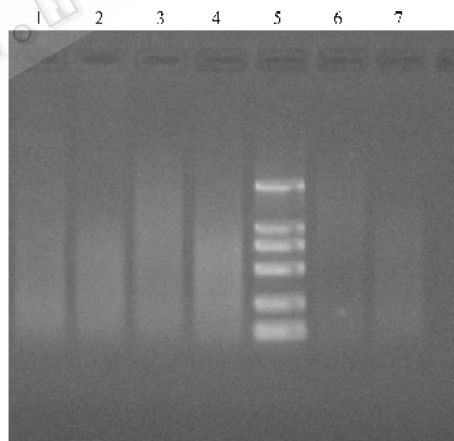


图 2 双链 cDNA 及双链 cDNA 经 *Rsa* I 酶切

Fig.2 Double strands cDNA and double strands cDNA after *Rsa* I digestion

1: ds cDNA of sporulated oocysts; 2: ds cDNA of sporulated oocysts after *Rsa* I digestion; 3: ds cDNA of unsporulated oocysts; 4: ds cDNA of unsporulated oocysts after *Rsa* I digestion; 5: DNA size markers (DL2000, from up to down: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp); 6: ds cDNA of sporozoites; 7: ds cDNA of sporozoites after *Rsa* I digestion.

2.3 消减文库的构建和鉴定

利用 pGEM-T-easy Vector 与纯化的二次消减 PCR 产物连接,转化大肠杆菌 JM109 受体菌,涂板后 37℃ 过夜培养,将培养的单克隆菌挑出后,置 96 孔细胞培养板培养后于 -70℃ 保存,获得柔嫩艾美耳球虫 3 个孢子发育阶段的抑制性消减文库。从保存

的文库中分别随机挑取 50 个克隆,利用 pGEM-T-vector 的引物进行 PCR 分析,结果孢子化卵囊与未孢子化卵囊、子孢子与未孢子化卵囊、子孢子与孢子

化卵囊的抑制性消减文库的重组率分别为 98%、96%、96%(如图 3 所示)。

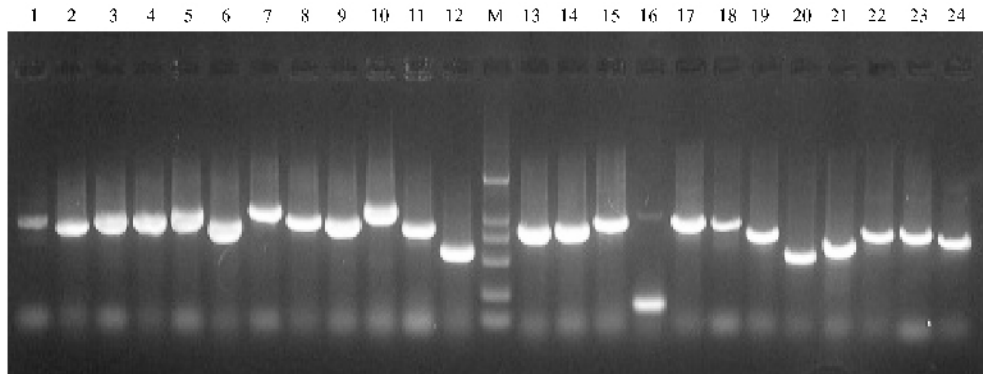


图 3 3 个消减文库部分重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of recombinant plasmids from three subtractive cDNA libraries

M marker DL2000 (DL2000, from up to down: 2000 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp);

1~16: the two subtractive cDNA libraries of sporozoites; 17~24: the subtractive cDNA library of sporulated oocysts.

2.4 阳性克隆序列分析及同源性比较

从孢子化卵囊的消减文库中随机挑取的 50 个克隆经测序 unigene 归并后获得了 13 个单一有效序列, BLASTX 同源性检索后发现, 有 8 个单一序列与已知的蛋白同源性很高(见表 1), 其余 5 个单一序列没有发现同源蛋白, 可能为柔嫩艾美耳球虫的新基因, 已知的同源蛋白主要为柔嫩艾美耳球虫微线

蛋白和 TA4 抗原蛋白等。从 2 个子孢子的消减文库中测序 100 个克隆后获得了 40 个单一有效序列, BLASTX 同源性比较后发现, 有 9 单一序列与已知的蛋白有一定的同源性(见表 2), 这些同源蛋白主要为疟原虫的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶、钙依赖性蛋白激酶、柔嫩艾美耳球虫 SERPIN1 蛋白等, 其余的 31 个 EST 可能为柔嫩艾美耳球虫的新基因。

表 1 孢子化卵囊消减文库部分克隆基因与 GenBank 同源序列比较结果

Table 1 Comparison of some clones in subtractive cDNA libraries of sporulated oocysts by sequence homologization in GenBank

Clone	Homologous proteins	Clone number
BW1-A01	Mucin-associated surface protein (MASP) [<i>Trypanosoma cruzi</i>]	2
BW1-A06	<i>E. tenella</i> mRNA for acidic microneme protein	17
BW1-A09	Microneme protein precursor Etmic-1 [<i>E. tenella</i>]	7
BW1-B02	Small heat shock protein 21 [<i>Toxoplasma gondii</i>]	1
BW1-B05	TA4 antigen protein [<i>E. tenella</i>]	8
BW1-E03	<i>E. tenella</i> mRNA for surface antigen 13	4
BW1-E06	Putative PDI-like protein [<i>Toxoplasma gondii</i>]	1
BW1-G08	Hypothetical protein expressed [<i>Toxoplasma gondii</i>]	1

表 2 子孢子两个消减文库部分克隆基因与 GenBank 同源序列比较结果

Table 2 Comparison of some clones in two subtractive cDNA libraries of sporozoites by sequence homologization in GenBank

Clone	Homologous proteins	Clone number
ZB1-A08	Serine/threonine phosphatases [<i>Polaromonas</i> sp.]	8
ZB1-H07	Calcium-dependent protein kinase α (PFCDPK2) [<i>P. falciparum</i>]	2
ZB1-H08	Hypothetical protein PFL0830w [<i>P. falciparum</i> 3D7]	1
ZB10-A04	Cleavage polyadenylation specificity factor, subunit [<i>Theileria annalata</i> Strain Ankara]	1
ZB10-B04	Hypothetical protein e2017b09, tmp004 [<i>E. tenella</i> str. Honghton]	1
ZB10-E05	Sphingomyelin/ lysocholinephospholipid-phospholipase C-related [<i>Plasmodium yoelii</i>]	1
ZW10-A06	Cystathionine beta-synthase (Serine sulfhydrylase) [Beta-thionase]	1
ZW1-B07	SERPIN1 protein precursor [<i>E. tenella</i>]	3
ZW10-D09	ABC transporter, substrate-binding protein [<i>Bordetella avium</i> 197N]	1

3 讨论

SSH 技术是一种广泛用于分离两个密切相关 DNA 样品之间差异表达基因的方法,建立在抑制 PCR 基础上,结合了均一化和消减的方法^[6]。均一化步骤的目的在于使目标群体中 DNA 片段丰度均等化,消减步骤的目的在于排除了两个群体中的共有序列。该技术与其他差异基因筛选技术相比,具有高度特异性、高度灵敏性、速度快、效率高等优点,已成功用于细胞分化、发育、再生、衰老等的研究和分离不同组织器官之间、同一种株不同发育阶段以及受外界因子作用而差异表达的基因等方面,主要集中在医学等相关领域的研究。该方法在寄生虫学研究中的应用还不是很多,文献报道也很有限,但已经陆续有了一些报道,至今主要集中在几种危害严重的寄生虫研究上,如疟原虫^[7]、利氏曼原虫^[8]、血吸虫^[9]和球虫^[10]等。寄生虫的生活史比较复杂,需经过几个不同发育阶段来完成整个循环过程,每个阶段的虫体有不同的形态特征,具有不同的生活环境,同时也都有其特异或差异基因的表达。到目前为止,寄生虫学者已利用该技术发现了一些危害较为严重的寄生虫的不同发育阶段差异表达基因,如 Matuschewski 等^[11]利用 SSH 技术分析了疟原虫孢子在按蚊卵内和唾液腺内的差异表达基因,为分析疟原虫入侵宿主细胞、激发期特异免疫应答以及了解其特定的生化过程具有重要作用。运用 SSH 技术寻找寄生虫不同生活史阶段的差异表达基因,研究基因结构和功能关系,寻找与寄生虫生长发育密切相关的基因,或者寻找寄生虫用药前后的差异表达基因,研究其抗药性的产生机制,将为防治寄生虫病提供一定的理论依据。

SSH 技术在使用过程中需注意样本的选择:选取的两个样本应具备可比性,两者具有相同的或相似的遗传背景及生活环境,才能筛选出表型密切相关的差异表达基因。本研究选择的样本为 *E. tenella* 生活史的三个不同发育阶段,其遗传背景相同,只是生活环境不同,因此,可利用该技术筛选不同发育阶段虫体的差异表达基因。

总 RNA 不能直接用于此法的检测,因为大量的 rRNA 存在,使得 cDNA 能有效合成。与其他差减杂交方法一样,SSH 法也需要一定量的完整的 mRNA,其起始量只需 1~2 μ g,远远低于 DDRT-PCR 和 cDNA 差减杂交。在 SSH 技术中还需要注意杂交时间,第一步杂交时间一般为 6~12h,不能超过 12h,如果杂交时间大于 12h,几乎所有的单链分子彼此都会互

相结合,因而无法在第二步杂交过程中形成双链。如果时间过短,Tester 单链尚未完全均等化,一些稀有表达的差异基因就会被丢失。在第二步杂交反应中,杂交时间一般为 12~24h,以使浓度较低的单链 cDNA 通过延长杂交时间也能形成双链杂交体。因此,根据文献资料,本研究选择第一次杂交时间为 10h,第二次杂交时间为 20h。从最终构建的消减 cDNA 文库质量可以发现,所选择的杂交时间是可行的。

本研究从孢子化卵囊 cDNA 消减文库中分离丰度最高的基因为微线蛋白基因。微线蛋白位于顶复器门寄生虫的微线上,是由虫体入侵宿主细胞过程中分泌的,在寄生虫与宿主细胞的黏附过程中起重要作用^[12]。在分离到的微线蛋白中以微线蛋白 2 (EtMIC-2) 的丰度尤为高,微线蛋白 2 是一个 50kD 的酸性蛋白,由 Tomely^[13]在柔嫩艾美耳球虫孢子化和裂殖子的微线内发现,并且发现该蛋白只在柔嫩艾美耳球虫孢子化阶段和裂殖生殖阶段虫体的表面表达。在入侵宿主细胞过程中,该蛋白集中在虫体入侵的顶端,由虫体与宿主相互接触面分泌,在入侵过程中或入侵后,迅速散布在整个感染细胞的表面,当孢子进入细胞后 1h 就没有在宿主细胞的表面检测到该蛋白,说明该蛋白在虫体入侵宿主细胞的过程中起重要作用。Ryan 等^[14]在对柔嫩艾美耳球虫微线基因的研究中发现,微线基因的表达是在卵囊孢子化 12h 时才被检测到,持续表达至 24h,但在未孢子化卵囊中未检测到微线基因的表达。

从孢子 cDNA 消减文库中获得丰度最多的同源蛋白为疟原虫丝/苏氨酸磷酸酶。丝/苏氨酸蛋白磷酸酶是一种调节蛋白质可逆磷酸化的酶蛋白,在细胞代谢、DNA 复制、基因转录、RNA 剪接、信号转导、细胞分化及凋亡、癌基因转化等细胞活动过程中发挥重要作用。早期的研究表明疟原虫在细胞内的发育受宿主和寄生虫蛋白磷酸化的调节。Li 等^[15]从恶性疟原虫分离了一个丝/苏氨酸磷酸酶 (PPPJ) 基因,研究表明这一基因只在有性生殖阶段—红内期表达,说明该蛋白可能参与疟原虫的有性生殖。Dobson 等^[16]发现 PPPJ 只在疟原虫裂殖体、环状体和滋养体阶段表达,其中滋养体最高,裂殖体最低。这些结果显示,丝/苏氨酸蛋白磷酸酶是受疟原虫不同发育阶段调控的。目前,虽然还没有球虫丝/苏氨酸磷酸酶的有关报道,但 *E. tenella* 和疟原虫都是顶复器门原虫,因此,球虫的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶可能也在球虫某些阶段特异表达,且参与了孢子入侵、增殖等生长发育的调控。这些结果进一步

证明我们利用 SSH 技术构建的 cDNA 消减文库可用于分离鉴定不同发育阶段的差异表达基因,利用该技术获得的 *E. tenella* 孢子化卵囊和子孢子阶段虫体特异性表达或高表达基因,对探讨这些差异表达基因在球虫的入侵、生长、发育和增殖中的作用将有重要意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shirley MW, Ivens A, Gruber A, et al. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. *Trends Parasitol* 2004, **20**(5):199 - 201.
- [2] Peroval M, Pery P, Labbe M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. *Int J Parasitol* 2006, **36**(10 - 11): 1205 - 1215.
- [3] Wiersma HI, Galuska SE, Tomley FM, et al. A role for coccidian cGMP-dependent protein kinase in motility and invasion. *Int J Parasitol* 2004, **34**(3): 369 - 380.
- [4] Jiang JL (蒋建林), Jiang JS (蒋金书). A improved method for purification *Eimeria tenella* oocysts, sporozoites and second generation merozoites. *Journal of China Agriculture University*(中国农业大学学报), 1996, **5**(1): 99 - 102.
- [5] Song CP (宋翠萍), Shen YL (沈永林), Wang ZK (汪志楷). Cultivation of *Eimeria tenella* in vitro. *Chinese Journal of Veterinary Science*(兽医学报), 1998, **18**(2): 48 - 52.
- [6] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6025 - 6030.
- [7] Dessens JT, Margos G, Rodriguez MC, et al. Identification of differentially regulated genes of *Plasmodium* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology Today* 2000, **16**(8): 354 - 356.
- [8] Bellatin JA, Murray AS, Zhao M, et al. *Leishmania mexicana*: identification of genes that are preferentially expressed in amastigotes. *Exp Parasitol* 2002, **100**(1): 44 - 53.
- [9] Nowak TS, Woodards AC, Jung Y, et al. Identification of transcripts generated during the response of resistant *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection using suppression subtractive hybridization. *J Parasitol* 2004, **90**(5): 1034 - 1040.
- [10] Han HY (韩红玉), Zhao QF (赵其平), Jiang LI (姜连连), et al. Construction of subtractive cDNA libraries of *Eimeria tenella* to Maduramycin and Diclazuril by suppression subtractive hybridization. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, **38**(8): 1712 - 1716.
- [11] Matuschewski K, Ross J, Brown SM, et al. Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J Biol Chem* 2002, **277**(44): 41948 - 41953.
- [12] Tomley FM, Soldati DS. Mix and match module: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends in Parasitology* 2001, **17**: 81 - 88.
- [13] Tomley FM, Bumstead JM, Billington KJ, et al. Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, **79**(2): 195 - 206.
- [14] Ryan R, Shirley M, Tomley FM. Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*. *Int J Parasitol*, 2000, **30**: 1493 - 1499.
- [15] Li JL, Baker DA. Protein phosphatase beta, a putative type-2A protein phosphatase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*, 1997, **249**(1): 98 - 106.
- [16] Dobson S, Bracchi V, Chakrabarti D, et al. Characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase (PIPPIJ) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2001, **115**