

巴贝虫棒状体蛋白的研究进展

杨春利,蔡玉春,陈家旭*

[摘要] 巴贝虫是一类专性的细胞内寄生的顶复门原虫,是人和动物的重要病原。这类原虫具有相似的亚细胞结构并能分泌与入侵相关的保守蛋白,尤其是在入侵宿主细胞阶段分泌的棒状体相关蛋白被认为是保护寄生虫入侵和繁殖的关键分子,其在虫体入侵的纳虫空泡形成过程中发挥重要作用。随着基因组学和蛋白质组学技术的不断发展,其相关研究也越来越深入。因此,本文就目前研究较多的牛巴贝虫、羊巴贝虫、吉氏巴贝虫、双芽巴贝虫和东方巴贝虫等棒状体相关蛋白的研究现状进行了综述。

[关键词] 巴贝虫;棒状体相关蛋白;入侵;免疫

[中图分类号] S852.7 **[文献标识码]** A

Research progress of *Babesia* rhoptry associated proteins

YANG Chun-li, CAI Yu-chun, CHEN Jia-xu*

National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory for Parasitology and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Center for Tropical Diseases, National Center for International Research on Tropical Diseases, Shanghai 200025, China

* Corresponding author

[Abstract] *Babesia* parasites are obligate intracellular apicomplexan protozoa and important pathogens causing babesiosis of humans and animals. They have conserved subcellular structures and invasion mechanism. Rhoptry-associated proteins, which are released into the host cell, are considered to be the key molecules of invasion and replication of parasites in the host cell and are immunosuppressive factors of the host cell mediated immunity in the stage of parasitophorous vacuole (PV) formation. The knowledge about rhoptry-associated proteins has made a great progress with the development of genomics and proteomics, so we review the research progress in rhoptry-associated proteins of different *Babesia* including *Babesia bovis*, *B. ovine*, *B. gibsoni*, *B. bigemina* and *B. orientalis*, etc.

[Key words] *Babesia*; Rhoptry-associated protein; Invasion; Immune

巴贝虫(*Babesia*)是一种人兽共患的寄生原虫,传播媒介是蜱^[1],寄生在红细胞内。巴贝虫病被认为是动物第二常见的血液源性疾病^[2-3],可经胎盘、围产期和输血途径致人与人之间传播^[4-5]。巴贝虫病,尤其是输血传播的巴贝虫病已成为公共卫生安全的重要威胁^[6],同时给我国畜牧业带来了较大的经济损失,因此巴贝虫病也日益受到重视。

巴贝虫入侵红细胞的过程是寄生虫蛋白和宿主红细胞表面分子进行的复杂有序的相互作用过程,包括定位、黏附、再定位、连接和入侵。早期研究认为,在入侵过程中各个蛋白顺序释放,发挥作用^[7],但是最近的研究则认为是不同细胞器分泌的各个蛋白形成复合物,并共同发挥作用^[8]。近年来研究发现棒状体和微线体在虫体入侵宿主红细胞的过程中可释放分泌物,即棒状体分泌棒状体相关蛋白(Rhoptry-associated pro-

tein, RAP)和微线体分泌微线体顶端膜抗原(Microneme protein apical membrane antigen, AMA1)形成运动结合体,在入侵过程中发挥重要作用^[8]。微线体分泌蛋白在肌动蛋白-肌球蛋白复合物中起到黏附作用,与宿主细胞发生黏附,虫体进入宿主细胞,随后棒状体分泌的相关脂质和蛋白共同作用形成纳虫空泡(Parasitophorous vacuole, PV)^[9]。其中棒状体蛋白对于虫体入侵起关键作用,是该类寄生虫原虫的主要毒力因子。因此本文就目前研究较多的牛巴贝虫(*Babesia bovis*)、羊巴贝虫(*Babesia ovine*)、吉氏巴贝虫(*Babesia gibsoni*)、双芽巴贝虫(*Babesia bigemina*)、东方巴贝虫(*Babesia orientalis*)、田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)和莫氏巴贝虫(*Babesia motasi-like*)等RAP的研究现状进行综述,旨在为后续相关研究提供参考。

[基金项目] 公益性卫生行业科研专项(201202019);上海市卫生计生委青年基金项目(20154Y0155)

[作者单位] 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室,世界卫生组织热带病合作中心,国家级热带病国际联合研究中心(上海 200025)

[作者简介] 杨春利,女,硕士研究生。研究方向:免疫学

*通信作者 E-mail:chenjiaxu1962@163.com

[数字出版日期] 2017-03-22 10:15

[数字出版网址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.R.20170322.1015.001.html>

1 RAP

RAP是一个超基因家族蛋白。可以根据其在棒状体的定位,将其分为位于棒状体基部的基部蛋白ROPs和位于棒状体颈部的颈部蛋白RONs。目前在牛巴贝虫、二联巴贝虫、分歧巴贝虫、犬巴贝虫、类莫氏巴贝虫、东方巴贝虫和吉氏巴贝虫中均发现了RAP^[10-15],包括5个羊巴贝虫RAP基因,4个双芽巴贝虫RAP基因,4个分歧巴贝虫RAP基因,2个牛巴贝虫RAP

基因,1个犬巴贝虫、田鼠巴贝虫和马巴贝虫RAP基因^[6, 16],已表达的巴贝虫RAP有多种(表1)。以上发现的RAP基因高度保守,在不同种巴贝虫间有30%~45%的一致性,保守区包括4个半胱氨酸残基、1个由14个氨基酸组成高度保守的模序(PLSLPNPYQLDAAF)和几个寡肽模序,且通常RAP-1的N端比C端保守^[17]。基因保守表明该基因在红细胞入侵过程中发挥着重要作用,同时也可用于巴贝虫物种鉴定和分类^[18]。

表1 巴贝虫棒状体相关蛋白表达情况^[6, 19-24]

巴贝虫 虫株	基因 名称	长度 (bp)	氨基 酸数	分子量 (kDa)	基因 库
分歧巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 164	387	51.7	CAA899970.1
	棒状体颈部蛋白2	4 053	1 350		GU198499.2
牛巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 635	545	69.5	AAB84270.1
	棒状体颈部蛋白2	4 095	1 365		XP_001608815
双芽巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 380	460	59.0	AAA65583.11
卵形巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 428	476	60.8	AAA27805.1
田鼠巴贝虫	棒状体颈部蛋白2	4 443	1 480	165.3	XP_012649548
类莫氏巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 359	452	52.0	KC953701
	棒状体相关蛋白1a	1 740	475	52.0	DQ386864
吉氏巴贝虫	棒状体相关蛋白1b	1 452	484	53.0	AB480715
	棒状体相关蛋白1c	1 311	437		AB480716
东方巴贝虫	棒状体相关蛋白1	1 434	478	52.5	JX993940

不同巴贝虫种的RAP基因不仅序列同源性较高,而且都有可发生中和反应的B细胞、T细胞表位,用天然双芽巴贝虫RAP-1蛋白和重组牛巴贝虫RAP-1蛋白可产生保护性免疫反应。抗双芽巴贝虫和牛巴贝虫的RAP-1单克隆抗体的进一步实验证实其可抑制巴贝虫裂殖子和子孢子的入侵^[25-26]。因此,在牛巴贝虫、羊巴贝虫、吉氏巴贝虫、双芽巴贝虫和马巴贝虫中,RAP已被广泛用于候选疫苗和候选诊断抗原的研究^[13, 27-29]。在牛巴贝虫、双芽巴贝虫、马巴贝虫和羊巴贝虫中,已有针对RAP-1的ELISA血清学诊断方法,可用于血清流行病学调查^[30-31]。

1.1 牛巴贝虫RAP 牛巴贝虫可感染牛等家畜,给我国畜牧业带来了较大的经济损失。牛巴贝虫RAP-1的研究报道主要集中在20世纪末,以往研究发现RAP-1可作为牛巴贝虫有效抗原,并在体外研究中证实其可抵抗巴贝虫入侵^[25]。

1988年,Goff等^[32]首次报道描述了牛巴贝虫RAP-1基因。1991年,Suarez等^[33]首次报道了牛巴贝虫RAP-1基因全长。随后,他们又发现牛巴贝虫RAP-1具有显著的B细胞表位,可保护动物抵抗巴贝虫入侵^[34]。1999年,有研究发现棒状体蛋白是抗牛巴贝虫病的首要疫苗候选靶标^[17]。2002年,有报道认为RAP-1在牛巴贝虫子孢子上表达,在整个无性繁殖期均可被检测,RAP-1抗体能够抵抗牛巴贝虫子孢子的入侵,从而起到免疫保护作用^[25]。2003年,Norimine等^[35]指出重组牛巴贝虫RAP-1免疫可加强Th1细胞的体液免疫和IgG的体液免疫,

保护免疫接种动物牛抵抗牛巴贝虫的入侵,这又一次证实了RAP-1的免疫保护作用。一直以来,研究者对其重组疫苗的研究表现出了浓厚的兴趣,并发现这些蛋白抗原也可产生保护性免疫反应,其中牛巴贝虫RAP-1^[36]和双芽巴贝虫的RAP-1^[37]的T/B细胞的免疫原性都很高,即其有高免疫原性,在TH细胞的作用下,产生TH1免疫反应和部分保护性免疫反应^[38-39],并且研究发现其在牛巴贝虫不同地理株间相对保守,还通过ELISA方法进一步研究发现其高表达γ-干扰素,低表达或者不表达IL-2、IL-4和IL-10。该研究预示牛巴贝虫RAP-1是较好的疫苗靶标,可引起机体较强、持续保护的I型免疫反应。研究发现特异性的抗RAP1抗体和保护性免疫并不持续相关^[39],提示免疫激发和CD4⁺细胞的免疫辅助功能更复杂。此外,保护性免疫效应机制的抗原传递系统亟待研究。

另外,2010年,一项新研究发现一种未知蛋白可能有棒状体蛋白生物源性,被暂时命名为BboRhop68^[40],其具体功能及特性仍有待进一步研究。2011年,Suarez等^[41]科学家研究证实RAP-1的相关抗原(RAP-1 related antigen, RRA)在体外可显著抑制牛巴贝虫入侵红细胞,从而证实该蛋白在巴贝虫入侵过程中发挥重要作用。

以上研究均认为RAP-1在巴贝虫入侵过程中发挥作用,RAP-1是抗巴贝虫病的潜在候选疫苗和候选诊断抗原。

1.2 羊巴贝虫RAP 羊巴贝虫病是小型反刍动物的一种最重要的蜱传疾病,在我国内蒙、新疆、河南、山西、云南、四川、黑

龙江和青海等省份均有羊巴贝虫病的报道^[19, 42-44]。根据羊巴贝虫 18 s rRNA、ITS、28S 及 RAP-1 基因的进化树分析, 可将其分为不同的亚型, 其中莫氏巴贝虫中国株, 即类莫氏巴贝虫 (*Babesia motasi-like*) 在中国甘肃、河北和辽宁省有报道^[45-46]。在羊巴贝虫中, 类莫氏巴贝虫 RAP-1 基因位点与双芽巴贝虫位点相似, 其中 3 个不同的基因亚型 (RAP-1a、RAP-1b 和 RAP-1c), 5 个完全相同的 RAP-1b 基因拷贝和 RAP-1c 基因单拷贝位于基因位点末端^[11]。针对该蛋白的动力学分析显示, 在羊巴贝虫感染过程中, 不同种群绵羊可产生不同的体液免疫反应。在感染动物中, 抗 RAP-1 抗体先增加后减少, 感染后 3 周抗类莫氏巴贝虫的特异性抗体持续增加, 感染后 6 周和 9 周抗体达到峰值, 随后持续减少^[23]。

1.3 吉氏巴贝虫 RAP 吉氏巴贝虫主要引起犬巴贝虫病, 可在世界范围内流行^[47]。吉氏巴贝虫棒状体蛋白 RAP-1 基因全长为 1 740 bp, 开放框架为 1 425 bp, 可编码 475 bp, 对应蛋白分子量为 45 kDa, 与马巴贝虫、犬巴贝虫和牛巴贝虫棒状体 RAP-1 基因同源性分别为 39%、34% 和 33%, C-端含 5 个重复序列, N-端含 4 个半胱氨酸残基。N-端保守的氨基酸模序, 表明该区域在功能上可能有重要作用, 这与其他研究结果一致^[35]。

Zhou 等^[13]成功构建了 pGEX-4T-3/BgRAP-1 重组质粒, 并在 *Ecoli* BL21 成功表达, 重组蛋白经间接荧光抗体试验 (Indirect fluorescent antibody test, IFAT) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 验证有较好的结果, 吉氏巴贝虫感染后 8 d 可发生明显 ELISA 反应, 抗体滴度一直持续到感染后 207 d。根据以上结果可以认为, Bg-RAP1 诊断犬吉氏巴贝虫的显性抗原, 在抵抗寄生虫感染的免疫反应中可能发挥了重要作用。

2009 年, Terkawi 等^[16]根据 cDNA 文库, 在 EST 数据库筛选了 3 个 RAP-1 基因, 随后将 3 个基因全长及分别对应的 C-端截断型基因 (329-474aa、334-484aa 和 337-437aa) 克隆至 pGEX-4T-3 *Ecoli* 重组株, 利用 BL21 重组表达并纯化, 并用 IFAT 和 ELISA 方法验证。生物信息学分析发现, 1-21aa 为信号肽, N-端富含丝氨酸, 无跨膜区; 在 156aa 位置发现细胞黏附模序; 在 313aa 位置发现 KKNV 的保守序列, 1991 年已有研究发现 RAP 具有人类红细胞结合活性^[48]。Western-blotting 结果证实 3 种重组蛋白均可发生特异性免疫反应。免疫反应性试验说明, 全长的 rBgRAP 交叉反应强于部分截断的 rBgRAP 蛋白, 后者更适于作为候选诊断抗原。裂殖子 RNA 转录分析发现 RAP-1a 基因表达量最高; IFAT 定位分析发现这 3 个 BgRAP-1s 蛋白均位于靠近入侵位置的红细胞外裂殖子顶端, 在裂殖子的不同阶段均有 BgRAP-1 的存在, 随后在感染红细胞的细胞质和吉氏巴贝虫的培养上清中也有 BgRAP-1s 的发现, 只是该分泌蛋白只在巴贝虫感染裂殖子早期发现。

1.4 双芽巴贝虫 RAP 双芽巴贝虫主要感染牛, 引起巴贝虫病, 导致牲畜产量降低, 带来经济损失。1987 年, McElwain 等^[49]凭借裂殖子抗原的单克隆抗体首次发现双芽巴贝虫的 RAP-1 基因。1991 年, Mishra 等^[50]发现了双芽巴贝虫 RAP-1 全基因序列。同年, 研究者 McElwain 等^[51]证实双芽巴贝虫 RAP-1 或其重组结构均有免疫保护作用。

随后, 研究者在体外研究中发现, RAP-1 特异性抗体在虫体入侵过程中具有抑制作用^[52], 这也与上述研究结果一致。2003 年, Suarez 等^[53]研究认为 RAP-1 在双芽巴贝虫中的裂殖子阶段表达分泌, 随后 Boonchit 等^[24]在感染红细胞的细胞质中也发现了双芽巴贝虫 RAP-1, 并针对该基因做了全长和 C-端截断的表达, 用 ELISA 方法证实其具有较好的免疫反应, 认为双芽巴贝虫 RAP-1 可用做检测特异抗体, 用于诊断巴贝虫病, 说明双芽巴贝虫 RAP-1 具有免疫反应性。此外, Machado 等^[54]用纯化的 RAP-1 免疫牛, 发现可产生相关的抗体起到免疫保护作用, 因此认为 RAP-1 可能是双芽巴贝虫的潜在疫苗, 说明其具有免疫原性, 可刺激机体产生免疫反应, 从而起到免疫保护作用。

这些研究均与上述吉氏巴贝虫的相关研究结果一致, 在双芽巴贝虫 RAP 的研究中, 也认为其可作为研究疫苗靶点, 但是巴贝虫 RAP 与红细胞细胞膜和红细胞跨膜骨架之间相互作用的机制仍然有待进一步研究。

1.5 东方巴贝虫 RAP 东方巴贝虫是一种由扇头硬蜱 (*Rhipicephalus haemaphysalooides*) 传播的顶复门原虫, 仅感染水牛^[55], 我国中部和南部有发现东方巴贝虫病的报道。

2014 年, Yu 等^[15]等根据 cDNA 表达文库, 首次对东方巴贝虫 RAP-1 (BoRAP-1) 进行了克隆表达, 随后以 IFAT 试验证实 RAP-1 在东方巴贝虫裂殖子阶段显示强免疫信号, 且在巴贝虫不同阶段均有显示。其在研究中发现 BoRAP-1 与其他巴贝虫 RAP-1 基因高度同源, 和牛巴贝虫 RAP-1 基因同源性达 71%, 和其他巴贝虫种保守区分析结果一致, 包括 N-端前 300 个氨基酸高度保守, 1-21 位信号肽, 含 4 个半胱氨酸残基和 1 个 14 个氨基酸组成的模序。只是此模序中, 巴贝虫属的第 7 位为脯氨酸, 而在 BoRAP-1 中为丙氨酸。抗原表位预测显示抗原表位主要分布在 N-端。

2 结语

巴贝虫病分布广泛, 人兽共患, 可经血液和血制品传播, 威胁人类健康, 应引起足够重视。而在顶复门 RAP 的研究中, 弓形虫、疟原虫和柔嫩艾美耳球虫的 RAP 研究较深入^[56-58], 但是涉及巴贝虫 RAP 的研究相对较少。目前分子生物学、生物信息学、蛋白质组学技术的丰富和发展, 为在分子水平上详细解析 RAP 在巴贝虫入侵过程中复杂的作用机制、分子结构及生物功能提供了重要手段。现有的研究主要集中在 RAP 蛋白宿主入侵功能等的初步验证, 尚无宿主信号转导的调控, 及其对宿主细胞的相互作用影响的文献发表, 由此本课题组下一步将注重对蛋白结构、蛋白功能及其免疫学效应的研究。目前控制巴贝虫的化学药物主要分为两类, 针对媒介硬蜱或者针对巴贝虫本身, 但仍无特效药物, 且还存在耐药性、药物毒副作用等问题, 因此需要寻找替代疗法及新型候选疫苗分子, RAP 则是较为理想候选疫苗靶点, 有待进一步研究。总之, 根据以往的研究成果, RAP 在抵抗虫体入侵和免疫保护反应方面起到了重要的作用, 也将是未来疫苗研究和诊断抗原研究的重要方向。相信随着 RAP 分子特性和功能研究的深入发展, 必将为阐明巴贝虫入侵、致病机理奠定基础, 甚至为顶复门原虫的防治提供新的思路和方法。为了更好地了解巴贝虫

的病理生理及其他生物特性、研制更好的疫苗和更有效的治疗方法,科研工作依然任重道远。

【参考文献】

- [1] Vannier E, Krause PJ. Human babesiosis [J]. N Engl J Med, 2012, 366(25): 2397-2407.
- [2] Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, et al. Babesiosis [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3): 451-469.
- [3] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(11): 1219-1237.
- [4] Zhao Y, Love KR, Hall SW, et al. A fatal case of transfusion-transmitted babesiosis in the State of Delaware [J]. Transfusion, 2009, 49(12): 2583-2587.
- [5] Sethi S, Alcid D, Kesarwala H, et al. Probable congenital babesiosis in infant, New Jersey, USA [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(5): 788-791.
- [6] Ord RL, Rodriguez M, Cursino-Santos JR, et al. Identification and characterization of the rhoptry neck protein 2 in *Babesia divergens* and *B. microti* [J]. Infect Immun, 2016, 84(5): 1574-1584.
- [7] Bannister LH, Mitchell GH. The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion [J]. J Protozool, 1989, 36(4): 362-367.
- [8] Straub KW, Cheng SJ, Sohn CS. Novel components of the *Apicomplexan* moving junction reveal conserved and coccidia-restricted elements [J]. Cell Microbiol, 2009, 11(4): 590-603.
- [9] Soldati D, Foth BJ, Cowman AF. Molecular and functional aspects of parasite invasion [J]. Trends Parasitol, 2004, 20(12): 567-574.
- [10] Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, et al. Characterisation of a family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 57(2): 181-192.
- [11] Niu QL, Valentin C, Bonsergent CA. Strong conservation of rhoptry-associated-protein-1 (RAP-1) locus organization and sequence among *Babesia* isolates infecting sheep from China (*Babesia motasi*-like phylogenetic group) [J]. Infect Genet Evol, 2014, 28: 21-32.
- [12] Skuce PJ, Mallon TR, Taylor SM. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 77(1): 99-102.
- [13] Zhou JL, Ha HL, Nishikawa Y, et al. *Babesia gibsoni* rhpotry-associated protein 1 and its potential use as a diagnostic antigen [J]. Vet Parasitol, 2007, 145(1/2): 16-20.
- [14] Bhoora R, Quan M, Zweygarth E, et al. Sequence heterogeneity in the gene encoding the rhpotry-associated protein-1 (RAP-1) of *Babesia caballi* isolates from South Africa [J]. Vet Parasitol, 2010, 169(3/4): 279-288.
- [15] Yu Q, He L, Zhang WJ, et al. Molecular cloning and characterization of *Babesia orientalis* rhpotry-associated protein 1 [J]. Vet Parasitol, 2014, 205(3/4): 499-505.
- [16] Terkawi MA, Amornthep A, Ooka H, et al. Molecular characterizations of three distinct *Babesia gibsoni* rhpotry-associated protein-1s (RAP-1s) [J]. Parasitology, 2009, 136(10): 1147-1160.
- [17] Brown WC, Palmer GH. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina* [J]. Parasitol Today (Regul Ed), 1999, 15(7): 275-281.
- [18] Suarez CE, Thompson SM, McElwain TF, et al. Conservation of oligopeptide motifs in rhpotry proteins from different genera of erythroparasitic protozoa [J]. Exp Parasitol, 1994, 78(2): 246-251.
- [19] Niu QL, Liu ZJ, Yang JF, et al. Expression of sheep pathogen *Babesia* sp. Xinjiang rhpotry-associated protein 1 and evaluation of its diagnostic potential by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Parasitology, 2016, 143(14): 1990-1999.
- [20] Niu QL, Liu ZJ, Yu PF, et al. Genetic characterization and molecular survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Babesia ovata* in cattle, dairy cattle and yaks in China [J]. Parasit Vectors, 2015, 8: 518.
- [21] 袁利芹. 巴贝斯虫RAP-1C基因的克隆、表达及双芽巴贝斯虫病间接ELISA诊断方法的建立[D]. 石河子大学, 2014.
- [22] Niu QL, Liu ZJ, Yang JF, et al. Genetic diversity and molecular characterization of *Babesia motasi*-like in small ruminants and ixodid ticks from China [J]. Infect Genet Evol, 2016, 41: 8-15.
- [23] Niu QL, Liu ZJ, Yang JF, et al. Expression analysis and biological characterization of *Babesia* sp. BQ1 (Lintan) (*Babesia motasi*-like) rhpotry-associated protein 1 and its potential use in serodiagnosis via ELISA [J]. Parasit Vectors, 2016, 9(1): 313.
- [24] Boonchit S, Alhassan A, Chan B, et al. Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhpotry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Vet Parasitol, 2006, 137(1/2): 28-35.
- [25] Mosqueda J. *Babesia boris* merozoite surface antigen 1 and rhpotry-associated protein 1 are expressed in sporozoites, and specific antibodies inhibit sporozoite attachment to erythrocytes [J]. Infect Immun, 2002, 70(3): 1599-1603.
- [26] Yokoyama N, Suthisak B, Hirata H, et al. Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhpotry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity [J]. Infect Immun, 2002, 70(10): 5822-5826.
- [27] Boonchit S, Xuan XN, Yokoyama N, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhpotry-associated protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3771-3775.
- [28] Ikadai H, Osorio CR, Xuan XN, et al. Detection of *Babesia caballi* infection by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant 48-kDa merozoite rhpotry protein [J]. Int J Parasitol, 2000, 30(5): 633-635.
- [29] Terkawi MA, Thekiso OM, Katsande C, et al. Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa [J]. Vet Parasitol, 2011, 182(2/4): 337-342.
- [30] Romero-Salas D, Mira A, Mosqueda JA, et al. Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field [J]. Vet Parasitol, 2016, 217: 101-107.
- [31] Dalrymple BP, Casu RE, Peters JM, et al. Characterisation of a

- family of multi-copy genes encoding rhoptry protein homologues in *Babesia bovis*, *Babesia ovis* and *Babesia canis* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 57(2): 181-192.
- [32] Gof WL, Davi WC, Palme GH, et al. Identification of *Babesia bovis* merozoite surface antigens by using immune bovine sera and monoclonal antibodies [J]. Infect Immun, 1988, 56(9): 2363-2368.
- [33] Suarez CE, Palmer GH, Jasmer DP, et al. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes [J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 46(1): 45-52.
- [34] Suarez CE, Palmer GH, Hines SA, et al. Immunogenic B-cell epitopes of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 are distinct from sequences conserved between species [J]. Infect Immun, 1993, 61(8): 3511-3517.
- [35] Norimine J, Mosqueda J, Suarez C, et al. Stimulation of T-helper cell gamma interferon and immunoglobulin G responses specific for *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP-1) or a RAP-1 protein lacking the carboxy-terminal repeat region is insufficient to provide protective immunity against virulent *B. bovis* challenge [J]. Infect Immun, 2003, 71(9): 5021-5032.
- [36] Brown WC, McElwain TF, Ruef BJ, et al. *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cells of immune cattle and contains T-cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains [J]. Infect Immun, 1996, 64(8): 3341-3350.
- [37] Rodriguez SD, Palmer GH, McElwain TF, et al. CD4⁺ T-helper lymphocyte responses against *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 [J]. Infect Immun, 1996, 64(6): 2079-2087.
- [38] Ruef BJ, Tuo WB, Rodriguez SD, et al. Immunization with *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 induces a type 1 cytokine response [J]. J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(1): 45-54.
- [39] Ushe TC, Palmer GH, Sotomayor L, et al. Antibody response to a *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 surface-exposed and neutralization-sensitive epitope in immune cattle [J]. Infect Immun, 1994, 62(12): 5698-5701.
- [40] Baravalle ME, Thompson C, Torioni De Echaide S, et al. The novel protein BboRhop68 is expressed by intraerythrocytic stages of *Babesia bovis* [J]. Parasitol Int, 2010, 59(4): 571-578.
- [41] Suarez CE, Laughery JM, Bastos RG, et al. A novel neutralization sensitive and subdominant RAP-1-related antigen (RRA) is expressed by *Babesia bovis* merozoites [J]. Parasitology, 2011, 138(7): 809-818.
- [42] 杨自军, 龙塔, 焦娜, 等. 小尾寒羊巴贝西虫病的治疗试验 [J]. 河南农业科学, 2003, 32(12): 58-59.
- [43] 胡宏伟. 一起羔山羊梨形虫病的诊治[J]. 现代农业科技, 2011(14): 364-364.
- [44] 吐尔洪·努尔, 谷文喜, 刘丽娅, 等. 山羊传染性胸膜肺炎和巴贝斯虫混合感染的诊治[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(1): 50-51.
- [45] 关贵全, 殷宏, 罗建勋, 等. 羊的大型巴贝虫未定种的形态学和致病性初步研究 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31(11): 35-36.
- [46] Liu AH, Yin H, Guan GQ, et al. At least two genetically distinct large *Babesia* species infective to sheep and goats in China [J]. Vet Parasitol, 2007, 147(3/4): 246-251.
- [47] Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2003, 33(4): 885-904, viii.
- [48] Calvo M, Guzman F, Perez E, et al. Specific interactions of synthetic peptides derived from *P. falciparum* merozoite proteins with human red blood cells [J]. Pept Res, 1991, 4(6): 324-333.
- [49] McElwain TF, Perryman LE, Davis WC, et al. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites [J]. J Immunol, 1987, 138(7): 2298-2304.
- [50] Mishra VS, Stephens EB, Dame JB, et al. Immunogenicity and sequence analysis of recombinant p58: a neutralization-sensitive, antigenically conserved *Babesia bigemina* merozoite surface protein [J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 47(2): 207-212.
- [51] McElwain TF, Perryman LE, Musoke AJ, et al. Molecular characterization and immunogenicity of neutralization-sensitive *Babesia bigemina* merozoite surface proteins [J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 47(2): 213-222.
- [52] Figueroa JV, Buening GM, Kinden DA, et al. Identification of common surface antigens among *Babesia bigemina* isolates by using monoclonal antibodies [J]. Parasitology, 1990, 100(2): 161.
- [53] Suarez CE, Palmer GH, Florin-Christensen M, et al. Organization, transcription, and expression of rhptry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus [J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 127(2): 101-112.
- [54] Machado RZ, McElwain TF, Pancracio HP, et al. *Babesia bigemina*: immunization with purified rhoptries induces protection against acute parasitemia [J]. Exp Parasitol, 1999, 93(2): 105-108.
- [55] Liu Z, Zhao J, Ma L, et al. Studies on buffalo babesiosis in Hubei Province, China [J]. Trop Anim Health Prod, 1997, 29(4 Suppl): 33S-36S.
- [56] Parker ML, Penarete-Vargas DM, Hamilton PT, et al. Dissecting the interface between apicomplexan parasite and host cell: Insights from a divergent AMA-RON2 pair [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(2): 398-403.
- [57] 赵禹, 孙晓林, 朱兴全, 等. 顶复门原虫棒状体颈部蛋白研究的新进展 [J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(8): 766-770.
- [58] Lee WK, Ahn HJ, Yu YG, et al. Rhoptry protein 6 from *Toxoplasma gondii* is an intrinsically disordered protein [J]. Protein Expr Purif, 2014, 101: 146-151.