

DOI:10.13350/j.cjpb.230411

• 论著 •

新孢子虫天冬氨酰蛋白酶 ASP5 功能研究

张云瀚, 李新, 王晓岑, 张旭, 张西臣, 宫鹏涛, 张楠, 李建华, 杜博亚*

(吉林大学动物医学学院, 吉林长春 130062)

【摘要】 目的 制备抗新孢子虫 NcASP5 多克隆抗体, 对 NcASP5 蛋白进行亚细胞定位; 构建 NcASP5 基因敲除虫株 (Δ NcASP5), 探究 NcASP5 蛋白在虫体入侵、生长及致病中的作用。方法 原核表达 NcASP5 蛋白, 纯化后免疫小鼠, 制备抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体, 免疫荧光法观察 NcASP5 蛋白亚细胞定位; 运用 CRISPR-cas9 技术构建 Δ NcASP5 虫株, 通过噬斑试验、入侵试验、增殖试验、逸出试验和动物试验探究 NcASP5 蛋白在虫体入侵、生长及致病中的作用。

结果 成功制备抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体, 免疫荧光法观察 NcASP5 蛋白定位于虫体细胞质; 成功构建 Δ NcASP5 虫株, 其噬斑面积、入侵率和逸出率与野生虫株比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 增殖率 Δ NcASP5 虫株在含 1 个与 8 个速殖子的纳虫空泡的数量所占百分比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与感染野生虫株小鼠相比, 感染 Δ NcASP5 虫株小鼠死亡时间延长 2~4 d, 组织中荷虫量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 敲除 NcASP5 基因对新孢子虫虫体增殖有显著影响, 而对虫体的生长、入侵及毒力等无显著影响, 这为揭示新孢子虫致病机制和新孢子虫病防控提供了理论依据。

【关键词】 新孢子虫; NcASP5; CRISPR-cas9; 基因功能

【中图分类号】 R382.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)04-0427-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Apr;18(4):427-431.]

Study of function of aspartyl protease protein in *Neospora caninum*

ZHANG Yun-han, LI Xin, WANG Xiao-cen, ZHANG Xu, ZHANG Xi-chen, GONG Peng-tao, ZHANG Nan, LI Jian-hua, DU Bo-ya (College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

【Abstract】 **Objective** Preparation of anti-*Neospora* NcASP5 polyclonal antibody and subcellular localization of NcASP5 protein; construction of NcASP5 knockout strain (Δ NcASP5) and investigation of the role of NcASP5 protein in parasite invasion, growth and pathogenesis. **Methods** The NcASP5 protein was expressed in the nucleus, purified and immunized in mice, and anti-NcASP5 polyclonal antibodies were prepared. The subcellular localization of NcASP5 protein was observed by immunofluorescence; the Δ NcASP5 strain was constructed by CRISPR-cas9 technology, and the role of NcASP5 protein in the invasion, growth and pathogenesis of the parasite was investigated by spot-eating assay, invasion assay, proliferation assay, escape assay and animal assay. **Results** The anti-NcASP5 protein polyclonal antibody was successfully prepared and the NcASP5 protein was localized in the cytoplasm of the parasite by immunofluorescence; the Δ NcASP5 strain was successfully constructed and the differences in phagocytic area, invasion rate and escape rate were not statistically significant when compared with the wild-type strain (all $P > 0.05$), and the proliferation rate of the Δ NcASP5 strain was statistically significant in the number of nacreous vacuoles containing one versus eight tachyzoites. The difference in percentage was statistically significant ($P < 0.05$). Mice infected with the Δ NcASP5 strain had a 2-4 d longer time to death compared to mice infected with the wild-type strain, and the difference in the amount of holothuria in the tissues was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Knockdown of the NcASP5 gene had a significant effect on the proliferation of *Neospora*, but not on the growth, invasion and virulence of the worm, which provides a theoretical basis for unraveling the pathogenesis of *Neospora* and the prevention and control of *Neospora*.

【Key words】 *Neospora caninum*; NcASP5; CRISPR-cas9; function of gene

*新孢子虫 (*Neospora caninum*) 是顶复亚门原虫, 在宿主的有核细胞内寄生, 由新孢子虫引起的新孢子虫病在世界各地均有分布。犬科动物是新孢子虫的终末宿主, 牛、羊、鹿、马、犬、兔等多种动物是新孢子虫的中间宿主^[1-2], 其中对牛的危害不容忽视, 严重影响养牛业的健康发展^[3]。新孢子虫主要寄生在动物的脑、肌肉和肝脏等组织, 可引起母畜的生殖障碍、流产、死

胎、木乃伊胎^[4-5]和幼畜脑膜炎及运动障碍等, 使养殖业经济损失巨大^[6]。

新孢子虫致病机制是疫苗和药物研究的基础^[7],

* **【通讯作者】** 杜博亚, E-mail: 1207176503@qq.com

【作者简介】 张云瀚 (1998-), 男, 山东青岛人, 硕士。主要研究方向: 预防兽医学。E-mail: 250857000@qq.com

目前仍缺乏防治新孢子虫的有效药物及商品化疫苗,主要是由于人们对新孢子虫与感染宿主之间的免疫机制尚不完全清楚。随着研究的深入,越来越多的虫体蛋白如致密颗粒蛋白^[8-10]和虫体表面抗原^[11]等参与新孢子虫对宿主细胞的入侵过程、纳虫空泡形成等致病过程,蛋白功能研究成为新孢子虫病防治研究的热点。

天冬氨酰蛋白酶 5 (aspartyl protease, ASP5) 是一种真核动物体内常见的蛋白水解酶,主要参与生物体新陈代谢以及生物调控作用^[12-13]。在顶复门原虫,如疟原虫^[14]、锥虫^[15]、弓形虫^[16]和隐孢子虫^[17]等体内,ASP5 主要参与虫体外分泌蛋白的转运以及结构变化等。在寄生虫病防治中,ASP5 是一种寄生虫药物靶点蛋白^[18],但鲜有关于新孢子虫 ASP5 功能的研究报道。

本研究拟制备抗新孢子虫 NcASP5 多克隆抗体,对 NcASP5 蛋白进行亚细胞定位,并构建 NcASP5 基因敲除虫株(△NcASP5),探究 NcASP5 蛋白在虫体入侵、生长及致病中的作用。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 细胞与虫株 VERO 细胞系、HTERT 细胞系及新孢子虫速殖子来源于本实验室。

1.2 主要试剂 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 与 DL10,000 DNA Marker 购自日本 TAKARA 公司;6×Protein Loading Buffer 及 Blue Plus II Protein Marker(14-120kDa)购自北京全式金生物技术有限公司;PCR 产物回收试剂盒购自生工生物工程股份有限公司;质粒小提试剂盒、无内毒素质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技有限公司;Q5Site-Directed Mutagenesis Kit 购自英国 Biolabs 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 BI 公司;TRIzol 和 DAPI 购自美国 Life Technologies 公司;吉林省库美生物科技有限公司提供引物合成服务。

2 方法

2.1 细胞培养与新孢子虫速殖子培养 在 HTERT 细胞培养瓶中加入含有 12%FBS 的 DMEM 培养基进行培养,在 VERO 细胞培养瓶中加入含有 10%FBS 的 1640 培养基进行培养。细胞贴壁长满后使用胰酶进行传代。接种新孢子虫速殖子后 HTERT 细胞改换为含有 1%FBS 的 DMEM 培养基培养;VERO 细胞改换为 1%FBS 的 1640 培养基培养。

2.2 抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体的制备 待大部分新孢子虫从细胞中逸出,纯化后提取总 RNA,使用试剂盒反转录成 cDNA,通过 PCR 扩增 NcASP5 基因,上下游引物分别为 NcASP5-F:5'-CCGGAATTCTCT

CTCTCGCCGGAATTCTCTCTCTCGAATGACGCGCC-3';NcASP5-R:5'-CCCAAGCTTTGGGGAACAAGCTGCTC-3'。回收扩增产物,将产物双酶切后,与 pET-28a 表达载体相连接,转入 DH5α 感受态细胞,提质粒后分别进行 PCR 鉴定、双酶切鉴定及测序鉴定。将鉴定正确的质粒转入表达菌 Transetta, IPTG 诱导后通过 SDS-PAGE 和 Western blot 对表达的重组蛋白进行鉴定。将重组蛋白纯化后,首次免疫用纯化蛋白与弗氏完全佐剂混合后皮下注射 BALB/c 小鼠,二免三免用纯化蛋白与弗氏不完全佐剂混合后皮下注射,三次免疫之间分别间隔 14、7、7 d,三免后采血收集血清。

2.3 NcASP5 蛋白在虫体中的定位 在 24 孔板的圆形盖玻片上加入 HTERT 细胞,待细胞单层长满后加入纯化后的速殖子,24 h 后向圆形盖玻片中加入多聚甲醛进行固定,随后依次使用 Triton×100 溶液进行透化,3%BSA 进行封闭。用 BSA 稀释抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体作为一抗对圆形盖玻片进行孵育;以 BSA 稀释的羊抗鼠荧光标签 IgG 作为二抗孵育圆形盖玻片,我们采用间接免疫荧光的方法来确定 NcASP5 蛋白定位。

2.4 基因敲除质粒的构建和 DHFR 同源重组基因片段制备 使用 ToxoDB 网站(<https://toxodb.org/toxo/app/>)查询 NcASP5 基因序列,筛选包含 PAM 序列的前间隔序列,通过 NEBaseChanger 网站(<https://nebasechanger.neb.com/>)设计 protospacer 前后同源序列(引物序列见表 1);利用 Q5 点突变试剂盒合成 Nc-pSAG1-Cas9:U6-SgUPRT-NcASP5 载体,通过 PCR 及测序鉴定。通过数据库查询 NcASP5 基因信息,在其开放阅读框前后 5' 和 3'UTR 区分别设计引物,在所设计引物的 5' 端插入 DHFR 序列。以 pNC-DHFR 为模板设计引物(引物序列见表 1),进行 PCR 扩增。将产物进行回收,测序鉴定。

表 1 NcASP5 基因敲除质粒构建和 DHFR 同源重组基因片段制备所用引物

Table 1 The primers for construction of NcASP5 gene knockout plasmids and DHFR homologous recombinant gene fragments

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence
NcASP5-CRISPR	F:CACGCTCTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
	R:CTCTGAAGACAAAACAACAATGTCCTTTG
NcASP5-DHFR	F:GCAGCGTCTGTCGTCTCTAGACAAGTTTGT ACAAAAAAGCAGGCT
	R:ACACACGCGCATGGTTAGAGACCACTTTGT ACAAGAAAGCTGGGT

2.5 NcASP5 基因敲除虫株(△NcASP5)的构建及鉴定 将 6 μg 重组质粒与 2 μg 同源重组片段混匀后加入 100 μL Cytomix 缓冲液中。将新孢子虫速殖子纯

化计数并稀释至 1×10^7 个/ $300 \mu\text{L}$, 与上述溶液混匀。将 4 mm 电转杯提前置于 -20°C 预冷, 将混合液于电转杯中电穿后迅速转移至含有 $1 \mu\text{mol/L}$ 乙胺嘧啶的 HFF 细胞中。待虫体逸出后, 改为使用加入 $1 \mu\text{mol/L}$ 乙胺嘧啶的 DMEM 培养基进行培养。将速殖子加入长满 HTERT 细胞的 96 孔板中, 筛选单克隆敲除虫株, 随后分别进行 PCR 鉴定、Western blot 鉴定及 IFA 鉴定。NcASP5-validate PCR 引物 F: $5'$ -AAGC GTCGTCTTCCTCCGTCTTCC- $3'$; R: $5'$ -GAGAAT GTCGAGGAAGTAGTAGGCG- $3'$ 。

2.6 噬斑试验、入侵及增殖试验和逸出试验 在 6 孔细胞培养板的圆形盖玻片中加入 HTERT 细胞, 待每孔长满, 将 100 个纯化后的新孢子虫速殖子加入其中, 放于 37°C 恒温培养箱中培养 7 d, 取出后每孔加入无水乙醇, 静置 20 min。将乙醇吸除, 将 2% 结晶紫染液加入每孔, 染色 30 min, 吸除染液后加入蒸馏水缓慢清洗细胞培养板, 倒扣于滤纸上室温干燥过夜。

将 VERO 细胞加入至 12 孔细胞培养板的圆形盖玻片, 待每孔细胞长满后加入 3×10^6 个纯化后的新孢子虫速殖子, 置于 37°C 恒温培养箱培养 4 h。取出 12 孔板后每孔使用 PBS 晃洗 3 次; 加入 1% FBS 的 1640 培养基, 再次置于 37°C 恒温培养箱中培养 18 h, 取出后 PBS 清洗 1 次; 使用兔抗新孢子虫 SAG1 多克隆抗体对圆形盖玻片进行间接免疫荧光染色, 观察细胞内侵入的虫体数、纳虫空泡数及细胞总数。

将 HTERT 细胞加入至 12 孔细胞培养板的圆形盖玻片, 待每孔细胞长满; 每孔加入 5×10^4 个纯化后的新孢子虫速殖子, 置于 37°C 恒温培养箱培养 24 h, 将培养板取出每孔加入 PBS 小心清洗 3 次; 更换培养基, 并加入终浓度为 $8 \mu\text{mol/L}$ 的 A23187, 置于 37°C 恒温培养箱培养 3 min; 通过间接免疫荧光试验观察统计所有视野中纳虫空泡数量及已有虫体逸出的纳虫空泡数量, 计算逸出率。

2.7 毒力试验 将 40 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠随机分成两组, 其中 20 只向腹腔接种 2.5×10^7 个纯化后的 ΔNcASP5 虫株速殖子, 另 20 只每只腹腔接种 2.5×10^7 个纯化后的新孢子虫野生型虫株速殖子。任选其中 10 只野生型虫株接种小鼠与 ΔNcASP5 虫株接种小鼠为一组, 观察小鼠生存情况。剩余 20 只小鼠 5 d 后安乐死, 分别取心、肝、脾、肺、肾和脑组织, 研磨后提取组织基因组 DNA, 采用绝对荧光定量 PCR 检测小鼠各组织器官荷虫量。NC5 引物 F: $5'$ -ACTG GAGGCACGCTGAACAC- $3'$; R: $5'$ -AACAATGCTT CGCAAGAGGAA- $3'$ 。

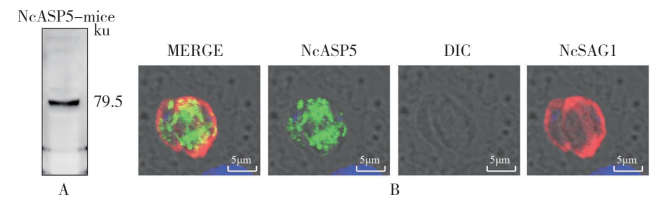
2.8 统计学分析 实验数据用均数 \pm 标准差或散点图表示, 采用方差分析 (ANOVA) 和多重比较试验对

各种检测条件进行评价, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 NcASP5 蛋白亚细胞定位

将纯化后的 NcASP5 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 三免后收集血清。以 ASP5 血清作为一抗, 进行 Western blot, 反应条带分别位于 79.5×10^3 处 (图 1A), 表明制备的多克隆抗体能特异性识别新孢子虫 NcASP5 蛋白。间接免疫荧光实验以制备的 ASP5 血清作为一抗, 镜下可见 NcASP5 蛋白定位于速殖子细胞质 (图 1B)。



A 抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体的 Western blot 鉴定 B NcASP5 蛋白在新孢子虫的免疫荧光定位

图 1 抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体的鉴定及其亚细胞定位
A Western blot identification of polyclonal antibodies against NcASP5 B Immunofluorescence localization of NcASP5 protein in *N. caninum*

Fig. 1 Subcellular localization of NcASP5 proteins

2 ΔNcASP5 虫株的构建及鉴定

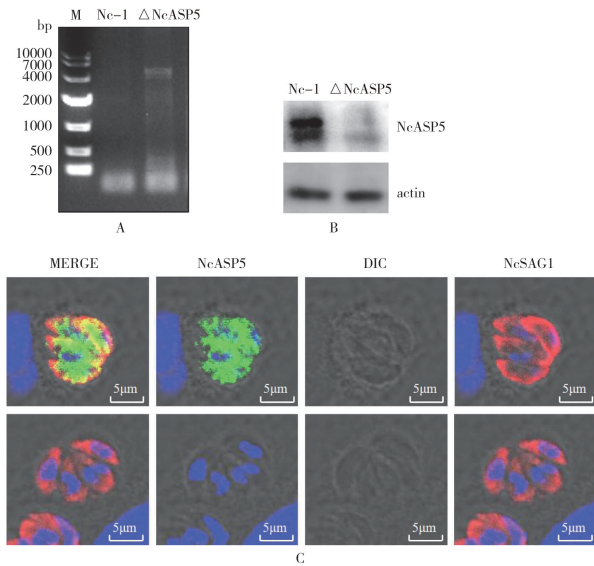
将经过乙胺嘧啶筛选后的速殖子纯化, 提取基因组 DNA, 利用先前设计的鉴定引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳显示目的片段大小正确 (图 2A)。使用制备的抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体与新孢子虫总蛋白进行 Western blot 鉴定, 使用抗 NcASP5 蛋白多克隆抗体进行 IFA 鉴定, 结果见图 2B、2C。 ΔNcASP5 虫株不表达 NcASP5 蛋白, 表明 NcASP5 基因敲除成功。

3 ΔNcASP5 虫株的生长、入侵、增殖和逸出

用新孢子虫野生型虫株和 ΔNcASP5 虫株各 1×10^2 个速殖子感染长满六孔板的 HTERT 单层细胞, 在感染后第 7 d 分析形成噬斑的大小和数量, 结果如图 3A。与野生型虫株株相比, ΔNcASP5 虫株对形成的噬斑大小与数量均无显著影响 (均 $P > 0.05$)。

用新孢子虫野生型虫株和 ΔNcASP5 虫株感染长满 12 孔板的 VERO 细胞, 使用荧光显微镜观察并记录入侵与增值率, 结果如图 3B。与野生型虫株相比, ΔNcASP5 虫株对新孢子虫入侵能力无显著影响 ($P > 0.05$)。与野生型虫株相比, ΔNcASP5 虫株在只有 1 个与 8 个速殖子的纳虫空泡的数量所占百分比差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$, 图 3C)。表明 NcASP5 敲除后对新孢子虫增殖有一定影响。

用新孢子虫野生型虫株和 Δ NcASP5 虫株感染长满单层 HTERT 细胞的 12 孔板,记录速殖子从细胞内逸出的时间,结果如图 3D。 Δ NcASP5 虫株对新孢子虫逸出能力无显著影响($P>0.05$)。



A Δ NcASP5 虫株 PCR 鉴定 B Δ NcASP5 虫株 Western blot 鉴定 C Δ NcASP5 虫株免疫荧光鉴定

图 2 Δ NcASP5 虫株鉴定

A PCR identification of Δ NcASP5 strain B Western blot identification of Δ NcASP5 strain C Immunofluorescence identification of Δ NcASP5 strain

Fig. 2 Identification of Δ NcASP5 strain

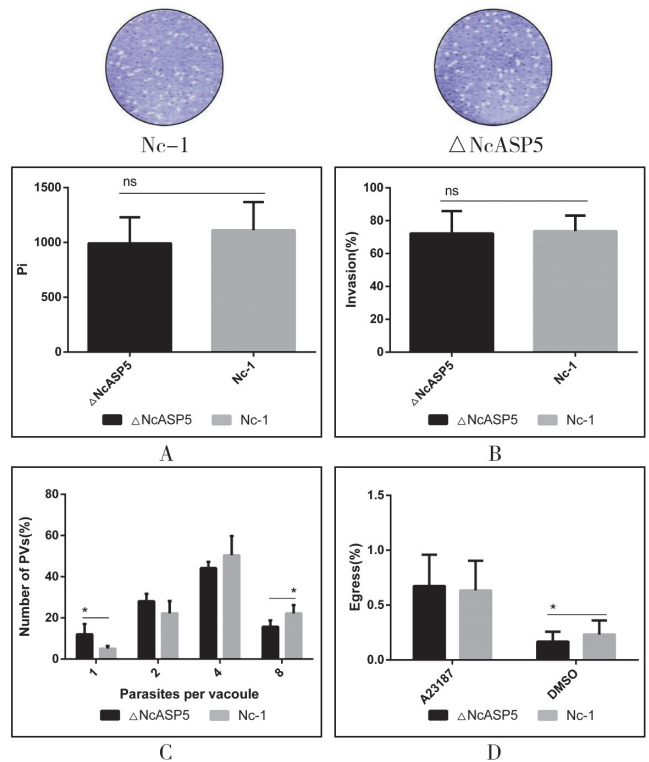
4 Δ NcASP5 虫株的毒力

分别用新孢子虫野生型虫株和 Δ NcASP5 虫株感染小鼠,记录感染小鼠的生存率,并检测小鼠内脏荷虫量。结果发现,感染 Δ NcASP5 虫株的小鼠死亡时间与感染野生虫株小鼠相比仅延长 2~4 d,表明新孢子虫敲除 NcASP5 基因后毒力并未显著降低(图 4A)。与感染野生虫株相比,感染 Δ NcASP5 虫株小鼠的心、肝、脾、肺、肾和脑荷虫量并无显著变化,差异无统计学意义(均 $P>0.05$,图 4B)。

讨论

天冬氨酰蛋白酶广泛存在于动物、植物、真菌与细菌中^[19]。人类基因组中编码有 8 种功能活跃的天冬氨酰蛋白酶,包括胃蛋白酶、胃亚蛋白酶、肾素、组织蛋白酶 D、组织蛋白酶 E、天冬氨酰蛋白酶 A、 β -淀粉样前体蛋白裂解酶、 β 位点 APP 裂解酶 2^[20]。

通过基因组序列分析显示,顶复门原虫中,包括疟原虫、球虫、锥虫、弓形虫和隐孢子虫等也有天冬氨酰蛋白酶同源基因^[21]。Coombs 等^[22]报道,ASP5 是一种寄生虫治疗药物靶标基因,且在虫体中具有重要作用。Boonyalai 等^[23]的研究显示,疟原虫 ASP5 蛋白可剪切虫体外分泌蛋白中的疟原虫输出原件(PEXEL),

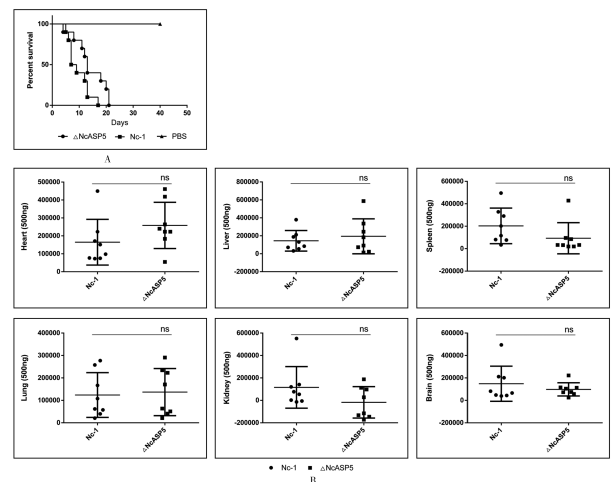


A Δ NcASP5 虫株生长率 B Δ NcASP5 虫株入侵率 C Δ NcASP5 虫株增殖率 D Δ NcASP5 虫株逸出率 (a 组间比较, $P<0.05$)

图 3 Δ NcASP5 虫株生长、入侵、增殖和逸出

A Growth rates of Δ NcASP5 strain B Invasion rates of Δ NcASP5 strain C Proliferation rates of Δ NcASP5 strain D Egression rates of Δ NcASP5 strain $P<0.05$

Fig. 3 Growth, invasion, proliferation and egression rates of Δ NcASP5 strain



A Δ NcASP5 虫株生存试验 B Δ NcASP5 虫株感染小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑荷虫量 (a 组间比较, $P<0.05$)

图 4 Δ NcASP5 虫株毒力检测

A Survival rates of Δ NcASP5 strain B Parasite number burdens in heart, liver, spleen, lung, kidney and brain of BALB/c mice infected by Δ NcASP5 strain $P<0.05$

Fig. 4 Virulence of Δ NcASP5 strain

随后外分泌蛋白构象发生变化,并从虫体中分泌到红细胞中发挥作用。Curt-Varesano 等^[24]的研究显示,

弓形虫 ASP5 蛋白与疟原虫 ASP5 蛋白有相似作用,可剪切弓形虫部分外分泌蛋白如 GRA16、GRA24 等蛋白中 PEXEL 同源氨基酸片段,随后外分泌蛋白构象改变,可进入纳虫空泡并被转运到宿主细胞中发挥作用。本研究显示,NcASP5 蛋白在新孢子虫中亚细胞定位于虫体细胞质且 NcASP5 基因敲除后对虫体的生长、入侵和毒力等无显著影响,但对虫体的增殖有显著影响。

以上表明,NcASP5 蛋白分别定位于速殖子细胞质,参与虫体增殖过程,而敲除 NcASP5 基因对虫体的生长、入侵和毒力等无显著影响。这为揭示新孢子虫致病机制和新孢子虫病防控提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] Dubey JP. Neosporosis in cattle[J]. J Parasitol,2003(89):42-56
- [2] Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals[J]. Korean J Parasitol,2003(41):1-16
- [3] 宋新刚,赵辉,李辰龙,田野. 犬新孢子虫抗原的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息,2013(1):6-9.
- [4] Mitrea IL,Enachescu V,Ionita M. *Neospora caninum* infection in dogs from Southern Romania: coproparasitological study and serological follow-up[J]. J Parasitol,2013(99):365-367.
- [5] Oren B, Collantes-Fernandez E, Villa A, et al. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions[J]. Vet Parasitol,2012(187):312-318.
- [6] Williams DJ, Hartley C S, Bjorkman C, et al. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*-how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease[J]. Parasitology,2009,136(14):1895-1900.
- [7] 杜博亚,李新,王晓岑,等. 新孢子虫 GRA16 和 MYR2 基因功能的初步研究[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(5):533-540.
- [8] Dong J, Li J, Wang J, et al. Identification and characterization of GRA6/GRA7 of *Neospora caninum* in MDBK cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2017,49(4):361-366.
- [9] Liddell S, Parker C, Vinyard B, et al. Immunization of mice with plasmid DNA coding for NcGRA7 or NcsHSP33 confers partial protection against vertical transmission of *Neospora caninum* [J]. J Parasitol, 2003,89(3):496-500.
- [10] Nishikawa Y, Shimoda N, Fereig RM, et al. *Neospora caninum* dense granule protein 7 regulates the pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response [J]. Appl Environ Microbiol,2018,84(18):e01350-18.
- [11] Bezerra MA, Pereira LM, Baroni L, et al. The soluble fraction of *Neospora caninum* treated with PI-PLC is dominated by NcSRS29B and NcSRS29C [J]. Exp Parasitol, 2019 (204): 107731.
- [12] 王晓丹. 新型的天冬氨酰蛋白酶抑制剂 YF-0200R-A 和 B 的合成和研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2016.
- [13] Mandujano-Gonzalez V, Tellez-Jurado A, Anducho-Reyes MA, et al. Purification and characterization of the extracellular aspartyl protease APSm1 from the phytopathogen fungus *Stenocarpella maydis* [J]. Protein Expr Purif, 2016(117):1-5.
- [14] Pino P, Caldelari R, Mukherjee B, et al. A multistage antimalarial targets the plasmepsins IX and X essential for invasion and egress [J]. Science, 2017, 358(6362):522-528.
- [15] Castilho V, Goncalves K, Rebello KM, et al. Docking simulation between HIV peptidase inhibitors and *Trypanosoma cruzi* aspartyl peptidase [J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1):825.
- [16] Dogga SK, Mukherjee B, Jacot D, et al. A druggable secretory protein maturase of *Toxoplasma* essential for invasion and egress [J]. Elife, 2017(6):e27480.
- [17] Zardi EM, Picardi A, Afeltra A. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts [J]. Chemotherapy, 2005, 51(4): 193-196.
- [18] Haldar K. Protein trafficking in apicomplexan parasites: crossing the vacuolar Rubicon [J]. Curr Opin Microbiol, 2016 (32): 38-45.
- [19] Salehi M, Aghamaali MR, Sajedi RH, et al. Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit [J]. Int J Biol Macromol, 2017 (98): 847-854.
- [20] Navia MA, McKeever BM. A role for the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in the orchestration of virus assembly [J]. Ann N Y Acad Sci, 1990 (616):73-85.
- [21] Jean L, Long M, Young J, et al. Aspartyl proteinase genes from apicomplexan parasites: evidence for evolution of the gene structure [J]. Trends Parasitol, 2001, 17(10):491-498.
- [22] Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, et al. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets [J]. Trends Parasitol, 2001, 17(11):532-537.
- [23] Boonyalai N, Collins CR, Hackett F, et al. Essentiality of *Plasmodium falciparum* plasmepsin V [J]. PLoS One, 2018, 13 (12):e207621.
- [24] Curt-Varesano A, Braun L, Ranquet C, et al. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells [J]. Cell Microbiol, 2016, 18(2):151-167.

【收稿日期】 2022-11-21 【修回日期】 2023-02-15