

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.02.03

# 三种隐孢子虫钙依赖蛋白激酶的生物信息学分析

张学勇<sup>1,2</sup>, 简莹娜<sup>1,2</sup>, 马利青<sup>1,2\*</sup>

(1. 青海大学畜牧兽医科学院, 西宁 810016;

2. 青海省畜牧兽医科学院, 西宁 810016)

**摘要:**对三种隐孢子虫(*C. parvum Iowa II*, *C. hominis TU502* 和 *C. muris RN66*)钙依赖蛋白激酶(Calcium-dependent protein kinases, CDPKs)进行生物信息学分析,探索该蛋白的结构并预测其功能,为其基因功能的研究提供一定的理论基础。通过隐孢子虫基因组数据库收集数据,获得三种隐孢子虫 CDPKs 蛋白的序列信息,通过生物信息学软件进行分析,预测该蛋白的理化性质、翻译后修饰位点、功能域、亚细胞定位、二级结构、亲/疏水性、抗原表位等。隐孢子虫 CDPKs 的蛋白性质不稳定,理论分子量从 59.76 kDa 到 76.63 kDa, pI 值为 5.33~6.09, CDPKs 不具有跨膜区和信号肽,不是跨膜分泌性蛋白,都具有蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪氨酸激酶 II 磷酸化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点、cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点、N-端糖基化位点、N-端肉豆蔻酰化位点和 EF-hand 钙结合域,二级结构主要以  $\alpha$  螺旋和无规卷曲为主; CDPKs 主要存在虫体细胞内,均有 20 多个潜在的抗原表位。在隐孢子虫中,CDPKs 蛋白不仅可单独发挥作用,而且还能通过相互结合发挥其生物学效应;同时,CDPKs 有望成为候选疫苗及潜在药物靶点。

**关键词:**隐孢子虫;钙依赖蛋白激酶;生物信息学;蛋白结构;功能预测

**中图分类号:**Q51 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2016)02-078-06

## Function analysis of Calcium-dependent protein kinases in *Cryptosporidium* based on bioinformatics

ZHANG Xueyong<sup>1,2</sup>, JIAN Yingna<sup>1,2</sup>, MA Liqing<sup>1,2\*</sup>

(1. The Academy of Animal and Veterinary Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Academy of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Xining 810016, China)

**Abstract:** The propose of this study is to conduct bioinformatics analysis about the calcium-dependent protein kinases of *Cryptosporidium* (*C. parvum Iowa II*, *C. hominis TU502* and *C. muris RN66*), and to explore the structures and predict the functions of the protein family for the studies of genetic function of *Cryptosporidium* offering theoretical basis. The protein sequences of *Cryptosporidium* CDPKs were obtained from the Genome Database and then the bioinformatics softwares were used to analyze and predict the physico-chemical properties of the proteins, such as post-translational modification sites, functional domains, subcellular localization, secondary structure, hydrophilicity/hydrophobicity and epitopes. The proteins had unstable physico-chemical characteristics. The theoretical molecular weight of the deduced proteins were from 59.76 to 59.76 kDa, theoretical pI from 5.33 to 6.09, no transmembrane regions and signal peptides, all had N-glycosylation sites, protein kinase C phosphorylation sites, casein kinase II phosphorylation sites, Tyrosine kinase phosphorylation sites, N-myristoylation sites, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites and EF-hand calcium-binding domains; Secondary structure mainly were alpha helix and random coil; CDPKs mainly exist in body cells, had more than 20 potential antigen epitopes. In *Cryptosporidium*, CDPKs were able to work alone, but also through mutual supports exert biological effects, meanwhile CDPKs will promise to be vaccine candidates and potential drug targets.

**Keywords:** *Cryptosporidium*; Calcium-dependent protein kinases; Bioinformatics; Protein structure; Function prediction

收稿日期:2016-03-06;修回日期:2016-04-15.

基金项目:国家外专局“外专千人计划”专项基金项目(No.WQ20136300172)。

作者简介:张学勇,男,执业兽医师,硕士,研究方向:动物疫病的诊断和防治;E-mail:zhang\_xyong@163.com.

\*通信作者:马利青,男,研究员,研究方向:动物疫病的诊断和防治;E-mail:maliq67@hotmail.com.

隐孢子虫 (*Cryptosporidium spp.*) 是一种呈世界性分布的人兽共患寄生性原虫, 已成为世界范围内水源性传播疾病中的重要病原体, 它们能感染人、家畜和野生动物, 严重威胁着人类和动物的健康及畜牧业的发展<sup>[1]</sup>。因为隐孢子虫是机会性致病病原体, 在免疫功能低下的个体中常常出现暴发性或慢性、长期性感染, 严重时可引发死亡, 且目前尚无有效的预防治疗方法<sup>[2]</sup>。随着三株隐孢子虫 (*C. parvum Iowa II*, *C. hominis TU502* 和 *C. muris RN66*) 全基因组测序工作的完成<sup>[3-4]</sup>, 这将更有利于对其基因结构和功能的研究。

钙依赖蛋白激酶 (Calcium-dependent protein kinases, CDPKs) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 此激酶接收并传导  $Ca^{2+}$  信号且其活性受  $Ca^{2+}$  的调控而不依赖钙调素和磷脂。典型的 CDPK 分子是由四个结构域组成的多肽链, 包括 N 末端的可变结构域 (N-terminal variable domain)、激酶活性结构域 (Kinases domain)、连接结构域 (Junction domain, JD) 和 C 末端钙调素类似结构域 (CaM-like domain, CLD)<sup>[5]</sup>, 其参与多种生命活动的调控。

由于哺乳动物中不存在 CDPKs 的同源蛋白, 所以 CDPKs 是理想的抗隐孢子虫的候选药靶。为了更好地分析这类蛋白激酶的功能及对隐孢子虫的重要意义, 本文对隐孢子虫 CDPKs 蛋白的结构和特征进行全面的生物信息学分析, 为进一步研究其生物学功能及其在疫苗和药靶研究中的应用提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据收集

在隐孢子虫基因组数据库 (<http://cryptodb.org/cryptodb/>) 中“Gene Text Search”信息栏输入并搜索 CDPK, 收集 *C. parvum Iowa II*, *C. hominis TU502* 和 *C. muris RN66* 基因组中的 CDPKs, 获取各蛋白相对应的核苷酸序列及蛋白序列。

### 1.2 结构域分析与验证

将搜索获得的蛋白序列输入到 NCBI 结构域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 中进行各蛋白的结构域搜索, 以进一步确定分析 CDPKs 结构域; 而后用在线搜索工具 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 验证结构域搜索结果。

### 1.3 蛋白质特性预测

将各个蛋白序列输入到 ExPASy (<http://www.expasy.org/>) 数据分析系统中, 进行蛋白特性预测。采用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 程序计算蛋白质的分子量、等电点和氨基酸组成等

理化性质; 采用 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序分析亚细胞定位序列等特征序列; 分泌信号肽、质体、线粒体和过氧化物酶体等; 采用 Motif Scan ([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) 程序预测糖基化、磷酸化、脂酰化、cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点及 EF-hand 钙结合域等修饰位点和模序。

### 1.4 蛋白质的二级结构和抗原表位分析

利用 DAS-TMfilter server (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html>)、HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php>) 和 TMHMM-2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 分析蛋白的跨膜区域, 应用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的亲/疏水性。采用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 软件进行蛋白二级结构预测; 利用 Predicted Antigenic Peptides (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) 进行抗原表位分析。

### 1.5 序列比对与构建系统发育树

通过 NCBI 提供的 BLAST 在线搜索服务软件获取顶复门寄生原虫弓形虫 (*Toxoplasma gondii ME49*)、疟原虫 (*Plasmodium reichenowi*)、巴贝斯虫 (*Babesia bovis*)、球虫 (*Eimeria tenella*) 及隐孢子虫 (*C. parvum Iowa II*, *C. hominis TU502* 和 *C. muris RN66*) CDPKs 的氨基酸序列。使用 MEGA5.05 软件的系统发育树构建功能对这些氨基酸序列进行分析, 选择邻近法 (Neighbor-Joining method, NJ) 构建系统发育树, 并使用自展值 (Bootstrap) 检验其可靠性, 重复次数为 2 000, 分析不同顶复门寄生原虫 CDPKs 基因间的进化关系。

## 2 结果分析

### 2.1 含 CDPK 结构域蛋白的初筛和确定

在隐孢子虫基因组数据库的全基因组中搜索获得 15 个含有 CDPK 的结构域蛋白, 根据注释描述分析发现 5 个假设蛋白 (Hypothetical/putative protein), 除去这些假设蛋白, 将剩余的 10 个蛋白序列输入到 NCBI 结构域网站中搜索 CDPK 结构域后, 只有 6 个蛋白是真正的 CDPK 蛋白, 为进一步确认淘汰的是否是 CDPK 蛋白, 将其输入到 pfam 结构域搜索, 结果仍不是 CDPK 蛋白。因此, 对这 6 个真正的 CDPK 蛋白进行深入分析。

## 2.2 蛋白基本性质分析

经过 ExpASy 在线系统分析,如表 1 所示这些蛋白的基本性质:其在氨基酸长度、分子量大小和等电点上差异不大,其氨基酸长度在 523~677 aa,分子量从 59.76 kDa 到 76.63 kDa, pI 值从 5.33~6.09, 呈现着明显的区别。带正(12.35%~14.91%)、负(14.03%~16.25%)电荷氨基酸残基数占氨基酸总数比例基本一致,且带正电荷氨基酸残基比带负电荷氨基酸残基多。假定所有的半胱氨酸都形成二硫键,CDPKs 在 280 nm 处的摩尔消光系数:46 215~

87 500 L/mol·cm 及 0.1% 浓度(1 g/L)的 Abs 值:0.773~1.128;假定所有的二硫键打开时,蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数:45 840~86 750 L/mol·cm 及 0.1% 浓度(1 g/L)的 Abs 值为:0.767~1.119,可见其吸光性质有所差别。CDPKs 在溶液中的不稳定指数为:37.46~45.06,除 Cgd5\_820 外均高于阈值 40,推测 CDPKs 为不稳定蛋白。CDPKs 的脂肪族指数为:84.38~87.58,亲水性平均系数:-0.397~-0.486,蛋白总体亲水性较低。

表 1 CDPKs 基本性质分析

Table 1 Analysis of basic properties of CDPKs

基因	氨基酸长度(aa)	分子量大小(kDa)	等电点	负电荷氨基酸残基数及比例(%)	正电荷氨基酸残基数及比例(%)	A* 摩尔消光系数/Abs 值	B* 摩尔消光系数/Abs 值	不稳定指数	脂肪族指数	亲水性平均系数(GRAVY)
Chro.70214	675	77.30	5.33	105/15.56	87/12.89	86 010/1.113	85 260/1.103	45.06	84.50	-0.412
Chro.20142	677	76.63	6.09	95/14.03	87/12.85	57 145/0.746	56 270/0.734	44.10	87.30	-0.428
Cmu.009030	664	75.54	6.05	94/14.16	82/12.35	60 375/0.799	59 250/0.784	40.16	86.08	-0.397
Cgd2_1300	677	76.62	5.97	96/14.18	86/12.70	57 145/0.746	56 270/0.734	44.60	87.58	-0.417
Cgd5_820	523	59.76	5.96	85/16.25	78/14.91	46 215/0.773	45 840/0.767	37.46	87.23	-0.486
Cgd7_1840	676	77.55	5.38	105/15.53	88/13.02	87 500/1.128	86 750/1.119	44.60	84.38	-0.428

注:A\*:假定所有的半胱氨酸都形成二硫键,蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数值(L/mol·cm)及 0.1% 浓度(1 g/L)的 Abs 值;

B\*:假定所有的二硫键打开时,蛋白在 280 nm 处的摩尔消光系数值(L/mol·cm)及 0.1% 浓度(1 g/L)的 Abs 值。

## 2.3 翻译后修饰和结构特征性序列分析

模序分析潜在的翻译后修饰位点显示(如表 2),CDPKs 蛋白含有糖基化位点:1~3 个,糖基化位点保证 CDPKs 能够正确折叠且可以传导信号。蛋白激酶 C 磷酸化位点:6~9 个;酪氨酸激酶 II 磷酸化位点:11~14 个;酪氨酸激酶磷酸化位点:1~2 个;cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点:1~3 个;这可以促进和其他蛋白质相互作用而形成多蛋白复合体,再进一步促进蛋白质的磷酸化。N 端肉豆蔻酰化位点:2~5 个;EF-hand 钙结合域:7~8 个;EF-hand 结构域能与 Ca<sup>2+</sup> 离子结合而改变构象,进而暴露靶结合位点而发挥生物学功能。这些结构特征性序列如表 2 所示,表明 CDPKs 具有重要的生物学功能。

## 2.4 蛋白的亚细胞定位、抗原表位和二级结构预测与分析

对 CDPKs 的信号肽和信号肽酶剪切位点的预测显示(如表 3),它们的序列信号肽预测分值为:0.043~0.280,cutoff 预测值均为 0(< 0.9),表明 CDPKs 序列无信号肽和信号肽酶剪切位点。CDPKs 的亚细胞定位分析发现,CDPKs 序列定位于线粒体的部分得分为:0.063~0.274(< 0.9),而定位于其

他部分的得分为:0.678~0.954(> 0.95),说明 CDPKs 序列没有线粒体等定位序列,且该预测具有较高可信度。CDPKs 的二级结构预测分析发现  $\alpha$  螺旋比例为:34.62%~49.33%, $\beta$  折叠比例为:7.53%~11.66%,无规则卷曲比例为:23.14%~34.17%,延伸链比例为:13.86%~21.30%,可见 CDPKs 的二级结构以无规则卷曲为主。对 CDPKs 蛋白的氨基酸序列中潜在的抗原表位做进一步分析,显示有 20~29 个潜在的抗原表位,且平均抗原倾向性均大于 1.000,CDPKs 蛋白含有较多的优势抗原表位结构,可作为一种免疫原性蛋白。

## 2.5 系统发育树的构建

通过 MAGE5.05 软件构建的 NJ 树如图 1 所示,其中用于构建系统发育树的 3 种隐孢子虫分析序列分为 3 个类群,有意思的是它们均与 *Toxoplasma gondii* ME49 聚为一支,可见在系统发育树上发现它们之间的进化距离最近。并且 Chro.20142、cgd2\_1300 和 Chro.70214、cgd7\_1840 一致性最高,可见 *C. parvum Iowa II* 和 *C. hominis TU502* 的亲缘关系较近。这为后续从分子遗传学角度探索 CDPKs 的功能及其作为候选药靶和疫苗提供了新的思路。

表 2 翻译后修饰和结构特征性序列分析

Table 2 Analysis of posttranslational modification and structure characteristic sequence

名称	N 端糖基化位点	蛋白激酶 C 磷酸化位点	酪氨酸激酶 II 磷酸化位点	酪氨酸激酶 磷酸化位点	N 端肉豆蔻酰化位点	cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点	EF-hand 钙结合域
Chro.70214	115-118 533-536	047-049 120-122	034-037 156-159 197-200				
		137-139 196-198	215-218 268-271 283-286	044-052	165-170		516-528 587-599
		443-445 466-468	405-408 419-422 511-514	132-138	228-233	665-668	628-640 503-538
		517-519 606-608	517-520 524-527 559-562		531-536		543-573 574-609
Chro.20142	025-028 524-527 593-596	668-670	595-598 612-615				615-650
		093-095 119-121	093-096 108-111 132-135		194-199	090-093	503-515 540-552
		156-158 278-280	145-148 263-266 411-414	120-127	208-213	426-429	576-588 614-626
		336-338 404-406	429-432 500-503 511-514		659-664	654-657	490-525 527-562
Cmu.009030	576-579 636-639	411-413	584-587 604-607				563-598 601-636
		037-039 071-073	076-079 091-094 106-109		107-112 177-182		486-498 523-535
		133-135 261-263	115-118 246-249 412-415	063-069	191-196 476-481	073-076	559-571 597-609
		319-321 378-380	471-474 483-486 494-497		623-628		473-508 510-545
Cgd2_1300	025-028 524-527 593-596	387-389	658-661				546-581 584-619
		093-095 119-121	093-096 108-111 132-135		194-199	090-093	503-515 540-552
		122-124 156-158	145-148 263-266 411-414	120-127	208-213	026-429	576-588 614-626
		278-280 336-338	429-432 500-503 511-514		659-664	654-657	490-525 527-562
Cgd5_820	286-289	404-406 411-413	584-587 604-607				563-598 601-636
		021-023 052-054	084-087 264-267 323-326		010-015	094-097	379-391 423-435
		303-305 323-325	327-330 363-366 399-402	270-277	048-053	305-308	459-471 493-505
		347-349 484-486	413-416 467-470 484-487			324-327	366-401 410-445
Cgd7_1840	115-118 534-537	490-493 494-497 514-517	490-493 494-497 514-517				446-481 483-515
		047-049 120-122	035-038 156-159 198-201		166-171		517-529 588-600
		137-139 197-199	216-219 269-272 284-287	044-052	532-537	666-669	629-641 504-539
		444-446 467-469	406-409 420-423 512-515	1132-138	593-598		544-574 575-610
		518-520 607-609	518-521 525-528 560-563				616-651
		669-671	596-599 613-616				

表 3 亚细胞定位和抗原表位分析及二级结构预测与分析

Table 3 Analysis and prediction of subcellular localization, antigenic epitope and secondary structure of CDPKs

名称	α 螺旋比例 (%)	β 折叠比例 (%)	无规则卷曲比例 (%)	延伸链比例 (%)	潜在抗原表位的个数及平均抗原倾向性	信号肽预测分值 (SP)/cutoff 值 (specificity >0.95)	线粒体位置预测值 (mTP)/cutoff 值 (specificity >0.95)	定位于其他位置 (specificity >0.95)
Chro.70214	34.81	10.81	33.33	21.04	26/ 1.017 9	0.257/0.000	0.101/0.780	0.678/0.730
Chro.20142	48.30	7.98	29.25	14.48	28/ 1.020 9	0.061/0.000	0.077/0.780	0.941/0.730
Cmu.009030	47.14	10.24	28.77	13.86	29/ 1.026 3	0.052/0.000	0.063/0.780	0.954/0.730
Cgd2_1300	49.04	7.53	28.95	14.48	28/ 1.022 2	0.062/0.000	0.078/0.780	0.932/0.730
Cgd5_820	49.33	11.66	23.14	15.87	20/ 1.020 1	0.043/0.000	0.274/0.780	0.819/0.730
Cgd7_1840	34.62	9.91	34.17	21.30	26/ 1.018 7	0.280/0.000	0.093/0.780	0.693/0.730

### 3 讨论

CDPKs 是一类属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在各种植物和原生动物中广泛存在并参与多种生命活动的调控。如在植物中,CDPKs 参与离子泵/离子通道的开合、基因转录、细胞骨架构建、基因转录和新陈代谢等过程的调控<sup>[6]</sup>。随着原生生物基因组测序工作的开展,在弓形虫、疟原虫等顶复门原虫中发现了多个 CDPKs 同源蛋白<sup>[5]</sup>。在弓形虫和疟原虫

研究中发现,CDPKs 参与调控弓形虫虫体入侵细胞、运动、分化和蛋白分泌等生理过程;疟原虫的 CDPKs 可调控其入侵按蚊小肠上皮细胞和在宿主体内发育等过程。Manja Etzold 等实验研究表明,隐孢子虫的 CDPKs 具有阶段性表达特征,CDPKs 在隐孢子虫的生长发育以及进化过程中均发挥了重要作用<sup>[7]</sup>。同时,研究表明在哺乳动物中不存在 CDPKs,所以 CDPKs 可以作为有效的疫苗和药靶研究候选分子<sup>[8-9]</sup>。



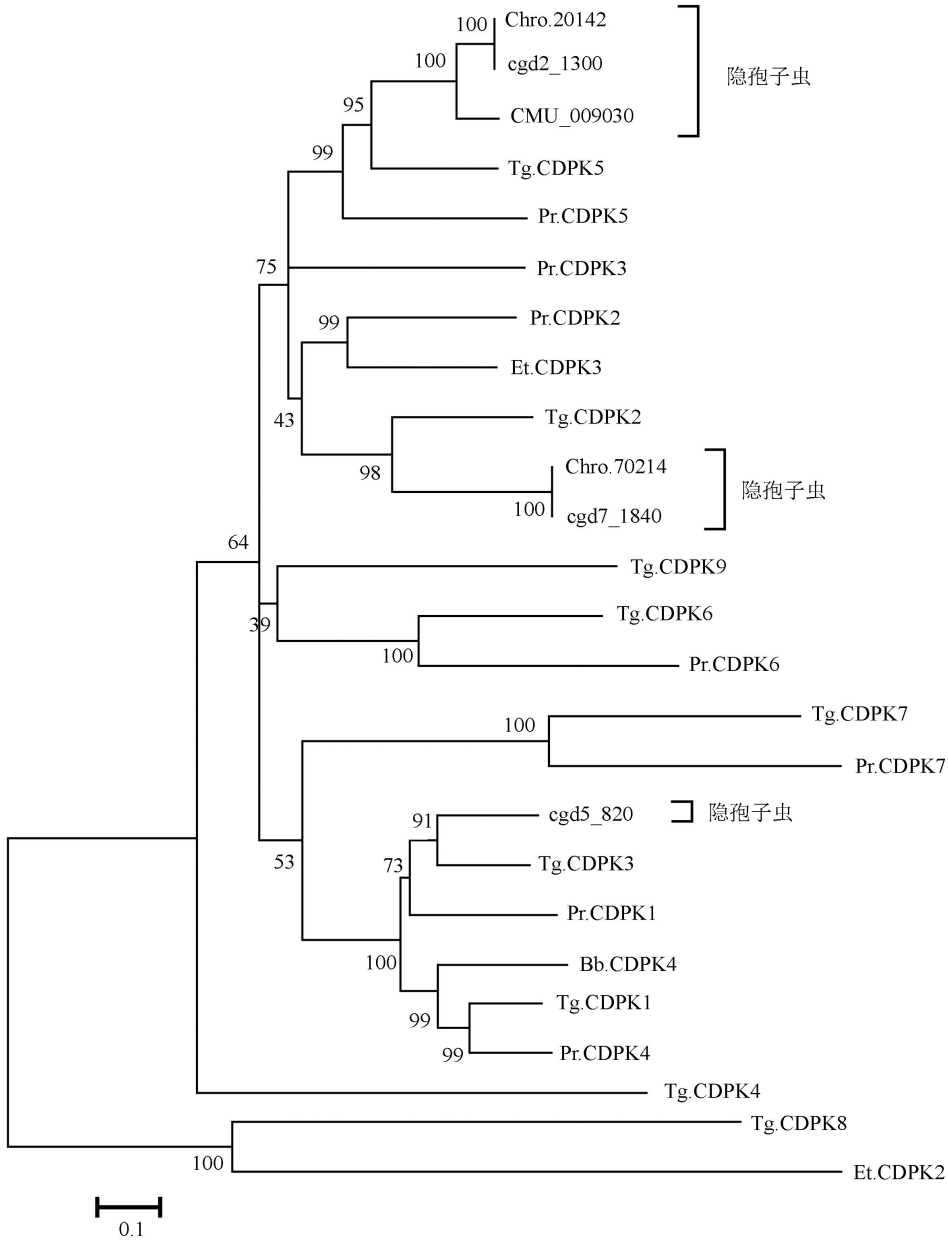


图 1 隐孢子虫与其他顶复门寄生原虫 CDPKs 的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic relationship analysis between cryptosporidium and other apicomplexan parasites based on CDPKs

通过分析发现隐孢子虫的 CDPKs 是不具备分泌信号肽的疏水性蛋白,推测其在细胞内合成后可以发挥生物学功能。蛋白的多肽链合成后,不具有生物学活性,翻译完成后需要经过一系列的加工形成相对稳定的空间结构,从而发挥生物学功能;通过预测蛋白的二级结构发现,CDPKs 由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲构成。多项研究表明,蛋白质的去磷酸化和磷酸化对于细胞内信号传导十分重要,可以调控多种细胞过程活动<sup>[10]</sup>;对隐孢子虫的 CDPKs 分析发现,CDPKs 具有多个磷酸化位点,如蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪氨酸激酶 II 磷酸化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点和 cAMP 和 cGMP 依赖蛋白激酶磷酸化位点。同时,N-端糖基化位点与物质转运和蛋白定位粘附密切相关<sup>[11]</sup>,N-端肉豆蔻酰化位点也参与

蛋白的定位过程<sup>[12]</sup>;对隐孢子虫的 CDPKs 研究发现,其具有 N-端糖基化位点和 N-端肉豆蔻酰化位点。同时 CDPKs 均具有 EF-hand 结构域,其能与  $\text{Ca}^{2+}$  结合从而促使 CDPKs 的构象改变,从而发挥  $\text{Ca}^{2+}$  依赖蛋白激酶蛋白的各种功能<sup>[13]</sup>。本研究对 CDPKs 的抗原表位预测发现,均具有 20 多个,可能成为抗隐孢子虫感染疫苗的有效成分之一。因此,对 CDPKs 的理化性质、二级结构和功能位点的预测和分析,在该蛋白功能的进一步研究具有重要意义。

## 4 结论

本研究通过生物信息学方法分析了三种隐孢子虫的 CDPKs 的基本性质,蛋白翻译后的修饰和结构

特征性序列,及其亚细胞定位、抗原表位和二级结构等特征;此外,通过遗传关系比较分析,三种隐孢子虫的CDPKs均与弓形虫的聚在一起,可借鉴弓形虫的相关成果来研究隐孢子虫的CDPKs。研究发现,在疟原虫(*Plasmodium reichenowi*)、巴贝斯虫(*Babesia bovis*)、球虫(*Eimeria tenella*)等顶复门原虫中都存在CDPKs蛋白,同时,该蛋白与虫体对宿主细胞的粘附和入侵及其生长发育密切相关。因此,CDPKs基因有望成为研制隐孢子虫基因工程疫苗的候选基因以及抗隐孢子虫的潜在药物靶点。

## 参考文献

- [1] O'DONOGHUE P J. *Cryptosporidium* and *cryptosporidiosis* in man and animals[J]. International Journal for Parasitology, 1995, 25(2): 139-195.
- [2] COLFORD J M J R, TAGER I B, HIROZAWA A M, et al. *Cryptosporidiosis* among patients infected with human immunodeficiency virus. factors related to symptomatic infection and survival[J]. The American Journal of Epidemiology, 1996, 144(9): 807-816.
- [3] ABRAHAMSEN M S, TEMPLETON T J, ENOMOTO S, et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*[J]. Science, 2004, 304(5669): 441-445.
- [4] XU P, WIDMER G, WANG Y, et al. The genome of *Cryptosporidium hominis*[J]. Nature, 2004, 431(7012): 1107-1112.
- [5] BILLKER O, LOURIDO S, SIBLEY L D. Calcium-dependent signaling and kinases in apicomplexan parasites[J]. Cell Host Microbe, 2009, 5(6): 612-622.
- [6] HARMON A C, GRIBSKOV M, HARPER J F. CDPKs-a kinase for every  $Ca^{2+}$  signal? [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(4): 154-159.
- [7] ETZOLD M, LENDNER M, DAUGSCHIES A, et al. CDPKs of *Cryptosporidium parvum*-stage-specific expression in vitro[J]. Parasitology Research, 2014, 113(7): 2525-2533.
- [8] CASTELLANOS-GONZALEZ A, WHITE A C J R, OJO K K, et al. A novel calcium-dependent protein kinase inhibitor as a lead compound for treating *cryptosporidiosis* [J]. The Journal of Infectious Diseases, 2013, 208(8): 1342-1348.
- [9] KEYLOUN K R, REID M C, CHOI R, et al. The gatekeeper residue and beyond: homologous calcium-dependent protein kinases as drug development targets for veterinary Apicomplexa parasites[J]. Parasitology, 2014, 141(11): 1499-1509.
- [10] JOHNSON L N. The regulation of protein phosphorylation [J]. Biochemical Society Transactions, 2009, 37(4): 627-641.
- [11] BUTEAU H, PEZET A, FERRAG F, et al. N-glycosylation of the prolactin receptor is not required for activation of gene transcription but is crucial for its cell surface targeting [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 1998, 12(4): 544-555.
- [12] LI L B, CHEN N, RAMAMOORTHY S, et al. The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(20): 21012-21020.
- [13] MORENO S N, DOCAMPO R. Calcium regulation in protozoan parasites [J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(4): 359-364.