

Pengenalpastian Protein Membran Putatif dalam Sporozoit *Eimeria tenella* Melalui Penyaringan Imuno

(Identification of Putative Membrane Proteins in *Eimeria tenella* Sporozoites by Immunoscreening)

PUAY-ENG SOON, FIONA M. TOMLEY,
MOHD. SANUSI JANGI & KIEW-LIAN WAN

ABSTRAK

Dalam parasit intrasel obligat seperti *Eimeria tenella*, protein membran dipercayai memainkan peranan yang penting dalam pegecaman dan pelekatan pada sel perumah supaya proses penyerangan parasit ke dalam sel perumah dapat disempurnakan. Untuk mengenalpasti protein pada membran *E. tenella*, penyaringan imuno telah dilakukan dengan menggunakan antiserum terhadap fraksi subsel yang telah diperkayakan dengan protein membran sporozoit. Usaha penyaringan imuno ini berjaya memencilkan 21 klon positif. Daripada jumlah ini, 13 klon menunjukkan pepadanan bermakna dengan jujukan dalam pangkalan data, iaitu 11 dengan protein mikronem EtMIC4, satu dengan EtMIC1 dan satu lagi dengan EtMIC2. Lapan klon selebihnya yang tidak menunjukkan sebarang pepadanan bermakna dengan jujukan dalam pangkalan data didapati membawa lima gen yang berlainan. Secara keseluruhannya, hasil kajian ini menunjukkan bahawa kaedah penyaringan imuno berupaya mengenalpasti gen baru yang kemungkinan besar mengekodkan protein membran dalam sporozoit *E. tenella*.

Kata kunci: protein membran; penyaringan imuno; sporozoit

ABSTRACT

In obligate intracellular parasites such as *Eimeria tenella*, membrane proteins are believed to play an important role in the identification of and attachment to host cell to facilitate host cell invasion. In order to identify proteins on the membrane of *E. tenella*, an immunoscreening was carried out using antisera against a subcellular fraction which was enriched with membrane proteins from the sporozoites. This immunoscreening effort successfully isolated 21 positive clones. From this total, 13 clones showed significant matches with sequences in the database, i.e. 11 with the microneme protein EtMIC4, one with EtMIC1 and another with EtMIC2. The remaining eight clones which did not show any significant match with sequences in the database was found to carry five different genes. Overall, results of this study demonstrated that the immunoscreening method is capable of identifying novel genes that are likely to code for membrane proteins in *E. tenella* sporozoites.

Keywords: membrane protein; immunoscreening; sporozoite

PENGENALAN

Eimeria tenella merupakan parasit protozoa apikompleksa yang menyebabkan masalah serius, terutamanya kepada industri ternakan ayam. Kerugian melebihi RM 13 billion setiap tahun dianggarkan berlaku di seluruh dunia disebabkan oleh kematian dan kehilangan berat badan ayam berikutan jangkitan parasit ini, di samping perbelanjaan untuk dadah kemoterapi dan vaksin (Williams 1999). Kemunculan parasit yang rintang terhadap dadah kemoterapi sejak beberapa dekad yang lalu dan juga kos vaksin yang tinggi, merumitkan lagi usaha untuk menangani penyakit koksidiosis yang disebabkan oleh parasit ini. Sebagai parasit intrasel obligat, *E. tenella* perlu memasuki sel perumah untuk bermandiri, dan menyebabkan

kepatogenan. Molekul-molekul yang terdapat pada membran parasit ini dipercayai memainkan peranan penting dari segi pegecaman dan pelekatan pada sel perumah, yang seterusnya membawa kepada penyerangan parasit ke dalam sel perumah.

Kajian lepas mengenai protein pada permukaan membran parasit apikompleksa, terutamanya *Toxoplasma gondii* dan *Plasmodium* spp. mendapati bahawa molekul ini merupakan komponen utama yang menjalinkan interaksi dengan protein pada permukaan sel perumah, yang seterusnya memulakan satu siri tindak balas berterusan yang membawa kepada penyerangan dan pembentukan vakuol parasitoforus dalam sel perumah. Pada masa yang sama, protein membran parasit ini juga dipercayai berfungsi sebagai molekul yang penting dalam merangsang tindak

balas imun sel perumah. Kebanyakan protein pada permukaan membran parasit apikompleksa dicirikan oleh kehadiran tapak pengikatan glikosilfosfatidilinositol (GPI) atau domain transmembran, dan sebahagian besarnya adalah spesifik kepada peringkat hidup yang tertentu (Lekutis et al. 2001). Didapati protein permukaan sirkumsporozoit merupakan molekul utama pada membran sporozoit *Plasmodium* spp. (Roditi & Liniger 2002) manakala permukaan takizoit *T. gondii* didominasi oleh protein famili SAG (Manger et al. 1998). Kajian oleh Tabarés et al. (2004) pula mendapati bahawa pelbagai protein dengan tapak pengikatan GPI daripada famili EtsAG wujud pada permukaan sporozoit dan merozoit *E. tenella*.

Kajian protein membran mula dilakukan dengan menggunakan kaedah pengiodinan, yang melibatkan penglabelan residu tirosin protein membran dengan iodine radioaktif melalui tindakan enzim laktoperoksidase dan hidrogen peroksida (Marchalonis et al. 1971, Nachman et al. 1973, Markwell 1982). Kaedah ini telah digunakan dalam pelbagai kajian protein membran, termasuk pencirian polipeptida pada permukaan membran *Plasmodium knowlesi* (Johnson et al. 1980), *Theileria annulata* (Shiels et al. 1989) dan *Trypanosoma* spp. (Gardiner et al. 1983, Schechter & Nogueira 1988, Samarawickrema & Howell 1990). Berikutan penemuan kaedah pembinaan perpustakaan cDNA yang lebih cekap, pengenalan protein yang berdasarkan penyaringan imuno mula dilakukan dengan menggunakan serum dari perumah semulajadi yang terinfeksi atau antiserum terhadap fraksi yang diperkayakan dengan organel/bahagian subsele tertentu (Mierendorf et al. 1987). Berbanding dengan kaedah pengiodinan, penyaringan imuno membolehkan pengenalan protein tersebut pada peringkat molekul, di samping memberikan maklumat mengenai profil protein dan keimmunogenan protein tersebut.

Dalam kajian ini, kaedah penyaringan imuno telah dilakukan dengan menggunakan antiserum terhadap fraksi subsele yang telah diperkayakan dengan protein membran untuk mengenalpasti protein pada membran sporozoit *E. tenella*. Kaedah pemfraksian telah dilakukan dengan menggunakan Triton X-100, yang merupakan sejenis detergen lemah. Interaksi protein membran dengan lipid dwi-lapis pada membran membolehkan penggunaan detergen lemah untuk melarutkan protein membran tersebut, dan seterusnya menghasilkan fraksi subsele yang kaya dengan protein membran. Fraksi tersebut telah digunakan untuk menghasilkan antibodi poliklon dalam ayam, yang kemudiannya digunakan untuk menjalankan penyaringan imuno terhadap perpustakaan cDNA sporozoit *E. tenella*. Klon-klon yang diperoleh dari penyaringan imuno ini telah diujuk, dan analisis jujukan melalui pepadanan dengan jujukan dalam pangkalan data membolehkan pengenalan klon-klon yang mengekodkan protein membran putatif daripada *E. tenella*.

BAHAN DAN KAEDAH

PEMENCILAN OOSISTA DAN PENGHASILAN SPOROZOIT *E. tenella*

Pemencilan oosista dari sekum ayam terinfeksi *E. tenella* dilakukan mengikut kaedah yang telah dilaporkan oleh Shirley (1995). Kandungan sekum yang diasingkan secara kikisan dengan slaid kaca drendamkan ke dalam 200 ml larutan garam berpenimbal fosfat (PBS) pH 8.0 sebelum dihomogenat dalam pengisar selama 2 minit. Ini diikuti dengan pengemparan pada 1500 g selama 10 minit dan pegeraman dalam 1.5 % (b/i) tripsin (Gibco, USA) pada 41°C selama 1 jam untuk memecahkan tisu sekum dan membebaskan oosista. Campuran ini kemudian diempar pada 1500 g selama 10 minit dan pelet terkumpul dibilas dengan PBS pH 8.0. Langkah pembilasan ini diulang sebanyak dua kali.

Oosista yang diperoleh kemudian dibiarkan tersporulasi dalam 2 % (b/i) kalium dikromat pada 28 °C selama 70 jam. Ini diikuti dengan pegeraman dalam 10 % (i/i) natrium hipoklorit pada 4 °C selama 10 minit, dan pembilasan beberapa kali dengan air steril sehingga bau hipoklorit hilang. Seterusnya, oosista diampakan dalam larutan air yang telah ditepu dengan garam. Ini diikuti dengan pengemparan pada 1000 g selama 10 minit dan oosista yang terapung pada permukaan air garam dikumpul dan dibilas dengan air steril. Proses pembilasan ini diulang sekali lagi, dan oosista yang diperoleh disimpan dalam PBS pH 8.0 pada 4 °C sehingga digunakan.

Untuk membebaskan sporosista, dinding oosista dipecahkan secara mekanikal dengan menggunakan manik kaca berdiameter 0.5 mm (Sigma, USA). Eksistasi sporozoit dilakukan dengan pegeraman dalam larutan eksistasi [1 % (b/i) asid taurokolid, 0.5 % (b/i) tripsin, 0.01 M MgCl₂ terlarut dalam PBS pH 7.6] selama 1 jam pada 41 °C. Penulenan sporozoit dilakukan dengan menggunakan turus yang mengandungi selulosa DE-52 (Sigma, USA).

PENYEDIAAN FRAKSI MEMBRAN SPOROZOIT

Pemfraksian membran dilakukan mengikut kaedah yang telah diubahsuai dari Bordier (1981). Sebanyak 10⁸ sporozoit *E. tenella* tertulen diampai dalam 1 ml PBS pH 7.6, dan campuran dihomogenat dengan menggunakan alat sonikasi pada 4 °C dengan frekuensi 50 Hz selama 30 saat untuk 3 kali. Proses ini dipantau dengan mikroskop cahaya untuk memastikan bahawa kesemua parasit telah terlis dengan sempurna. Campuran ini kemudian diempar pada 500 g selama 10 minit. Supernatan yang diperoleh kemudiannya disejukkan pada -20 °C untuk semalaman, dan ini diikuti dengan pengemparan pada 100000 g selama 60 minit. Pelet yang diperoleh diampakan dalam 1 % (i/i) Triton X-100 (dalam PBS pH 7.6), dan ini diikuti dengan pegeraman pada 4 °C untuk semalaman. Pengemparan dilakukan sekali lagi pada 100000 g selama 60 minit. Fraksi membran terlarut yang diperoleh dalam bentuk supernatan seterusnya

dianalisis dengan elektroforesis gel poliakrilamida - sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE).

PENGHASILAN ANTIBODI POLIKLON TERHADAP FRAKSI MEMBRAN SPOROZOIT

Penghasilan poliklon dilakukan dengan menggunakan ayam yang berumur 2 minggu. Fraksi membran dicampur dengan adjuvan lengkap (dalam nisbah isipadu 1:1) (Sigma, USA) dan disuntik ke dalam ayam secara subkutaneous. Proses ini diulang setiap 2 minggu untuk 2 kali. Sebanyak 1 ml darah ayam diambil seminggu sebelum suntikan kedua dan ketiga dilakukan dan 2 minggu selepas suntikan terakhir. Darah ayam dibiarkan beku pada suhu bilik untuk 1 jam, dan ini diikuti dengan pengemparan pada 400 g selama 20 minit untuk pengumpulan plasma. Plasma dari pendarahan pertama, kedua dan ketiga disatukan untuk tujuan penyaringan imuno.

PENYARINGAN IMUNO

Pemirisan perpustakaan cDNA sporozoit *E. tenella* (Tomley et al. 1996) dilakukan dengan menggunakan *Escherichia coli* XLI-Blue MRF⁺ (Stratagene, USA) sebagai sel perumah. Sebanyak 2 μ l stok faj yang mengandungi ~250000 unit pembentukan plak dicampur dengan sel perumah, dan dieram pada 37 °C selama 15 minit. Campuran kemudian ditambah dengan 30 ml agar lapisan atas NZY [50 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 1 % (b/i) NZ amin, 0.7 % (b/i) agaros] dan seterusnya dituangkan ke atas piring agar NZY [50 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 1 % (b/i) NZ amin, 1.5 % (b/i) agar teknikal] dengan serta merta. Piring dieram pada 42 °C selama 4 jam. Membran nitroselulosa yang telah direndam dalam 10 mM isopropiltiogalaktosida (IPTG) (Amresco Inc., USA) terlebih dahulu, diletakkan di atas permukaan agar supaya ia bersentuhan dengan plak-plak yang terbentuk. Membran tersebut seterusnya dieram pada suhu 37 °C selama 3.5 jam, dan ini diikuti dengan pengeraman dalam 5 % (b/i) susu skim untuk semalaman.

Membran kemudian dibasuh dengan PBS pH 7.4 dan dieram dengan antibodi poliklon (pencairan 1:200) dalam 1 % (b/i) albumin serum lembu selama 2.5 jam. Pembasuhan membran dilakukan dengan PBS pH 7.4 yang mengandungi 1 % (i/i) Tween 20 (Sigma, USA) selama 5 minit dan proses pembasuhan ini diulang untuk 3 kali lagi. Membran seterusnya dieram dalam antibodi anti-ayam (anti-IgG) yang terkonjugasi dengan enzim fosfatase beralkali.

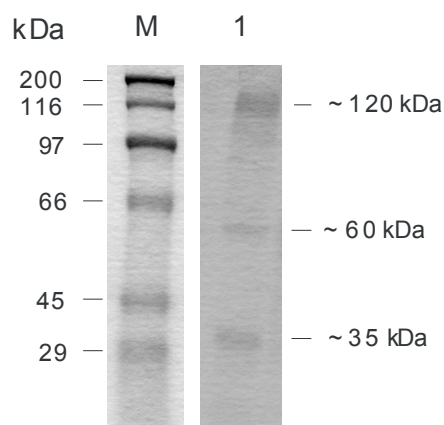
Untuk pengesanan isyarat positif, 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat (BCIP) (Sigma, USA) dan nitro biru tetrazolium klorida (NBT) (Sigma, USA) digunakan sebagai substrat. Isyarat positif dikesan sebagai bintik biru-keunguan selepas tindak balas enzim fosfatase beralkali terhadap BCIP/NBT berlaku. Plak-plak positif seterusnya dilakukan eksisi *in vivo* menggunakan sistem ExAssistTM/SOLR (Stratagene, USA) untuk mendapatkan bentuk plasmid.

PENJANAAN DAN ANALISIS JUJUKAN DNA

Pengekstrakan dan penulenan DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan kit RPM® (BIO 101, USA) mengikut protokol pengeluar. Seterusnya, DNA plasmid digunakan sebagai templat dalam penjujukan sekali lalu dengan menggunakan pencetus T3. Semua jujukan rawak yang telah disunting dibandingkan dengan jujukan dalam pangkalan data *non-redundant* (nr) GenBank melalui analisis dengan menggunakan perisian Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul et al. 1997). Pamadanan BLAST dengan nilai skor ≥ 100 dan nilai identiti $\geq 90\%$ dianggap sebagai bermakna.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Kaedah pemfraksian yang telah digunakan, secara amnya, melibatkan penyingkiran sebarang protein sporozoit yang larut air (terutamanya protein sitosol) pada peringkat permulaan. Pelet yang terhasil pada peringkat ini merupakan komponen yang mengandungi protein membran dan submembran (sitosekeleton). Triton X-100 kemudian digunakan untuk melarutkan membran protein, dan komponen ini dipisahkan dari komponen yang tidak larut dalam Triton X-100 dengan pengemparan tinggi. Supernatan yang terhasil merupakan fraksi membran yang larut. Analisis fraksi ini dengan SDS-PAGE menghasilkan tiga jalur dominan yang bersaiz lebih kurang 120 kDa, 60 kDa dan 35 kDa masing-masing (Rajah 1). Profil polipeptida ini adalah hampir sama dengan profil protein membran sporozoit yang telah diperoleh melalui cerun sukrosa (Kawazoe et al. 1992), iaitu kedua-dua profil menunjukkan jalur yang lebih jelas pada ketiga-tiga saiz tersebut. Walau bagaimanapun, kajian Kawazoe et al. (1992) didapati menghasilkan profil protein membran dengan jalur protein bersaiz < 29 kDa yang lebih nyata.



Telaga M: penanda protein julat luas;
telaga 1: fraksi protein membran.

RAJAH 1. Profil fraksi protein membran daripada sporozoit *E. tenella*.

Penyaringan perpustakaan cDNA sporozoit *E. tenella* dengan antibodi poliklon terhadap fraksi membran sporozoit berjaya menghasilkan 24 isyarat positif. Proses penyaringan ini diulang tiga kali untuk mendapatkan populasi plak yang homogenus. Plasmid pBlueScript-sk kemudian dieksisi keluar dari Uni-Zap λ , dan ini diikuti dengan pemencilan plasmid dan seterusnya penjujukan sekali lalu. Tiga daripada klon yang dijujuk gagal memberikan sebarang jujukan, walaupun proses penjujukan telah diulang. Oleh itu, analisis selanjutnya telah ditumpukan kepada jujukan yang berjaya diperolehi daripada 21 klon.

Kejayaan pemencilan sesuatu gen dengan menggunakan antibodi sebagai prob bergantung kepada kuantiti antigen yang diekspreskan atau yang dipindahkan ke atas membran nitroselulosa (Mierendorf et al. 1987). Telah dilaporkan bahawa kuantiti protein lakuran minimum yang dapat dikesan adalah dalam julat pikogram, dan ini bergantung kepada kecekapan kaedah pengesanan isyarat yang digunakan. Pada kes tertentu, antibodi mungkin mengecam modifikasi protein seperti penambahan karbohidrat pasca-translasi, dan oleh itu, antigen ini tidak akan dikenalpasti kerana modifikasi protein tidak berlaku dalam sistem pengekspresan bakteria. Antibodi mungkin juga mengecam konformasi tertentu pada antigen yang tidak dapat dihasilkan selepas pemindahan ke atas membran nitroselulosa (Mierendorf et al. 1987).

Tambahan pula, kuantiti antigen dalam fraksi membran perlu berada pada aras yang mencukupi untuk merangsang komponen imun humoral iaitu sel B ayam untuk menghasilkan antibodi terhadap epitop pada antigen. Penghasilan antibodi ini bergantung kepada dos. Dos antigen yang terlalu rendah adalah tidak mencukupi untuk merangsang penghasilan tindakan imun (Janeway et al. 2001). Di samping itu, penghasilan antibodi juga adalah lebih cenderung kepada protein yang bersaiz besar dan imunogenik

Pemadanan jujukan merupakan pendekatan yang paling berkesan untuk meramalkan fungsi bagi sesuatu jujukan gen. Pemadanan terhadap jujukan dalam pangkalan data nr GenBank dengan menggunakan perisian BLAST menunjukkan bahawa daripada 21 klon yang dijujuk, 11 klon menunjukkan pemadanan bermakna dengan protein mikronem EtMIC4 (Jadual 1). Kekerapan pemadanan dengan EtMIC4 yang tinggi ini kemungkinan besar disebabkan EtMIC4 merupakan suatu protein yang diekspres, bukan sahaja dalam organel mikronem, tetapi juga secara berterusan pada permukaan membran sporozoit *E. tenella* (Tomley et al. 2001). Di samping itu, EtMIC4 juga merupakan suatu protein yang besar (dengan saiz 218 kDa) dan mempunyai domain transmembran yang hidrofobik (Tomley et al. 2001). Dengan ciri-ciri ini, kebarangkalian untuk EtMIC4 dipencilkan dalam penyaringan immuno adalah tinggi.

Di samping EtMIC4, EtMIC1 dan EtMIC2 juga didapati hadir dalam fraksi membran sporozoit, iaitu masing-masing dipencilkan satu kali. EtMIC1 merupakan suatu protein mikronem yang imunodominan, dan seperti EtMIC4,

JADUAL 1. Hasil analisis BLAST dengan pangkalan data non-redundant GenBank

Klon	Panjang jujukan (bp)	Identiti putatif	No. pencapaian	Skor	Identiti (%)
S1	520	EtMIC4	AJ306453	499	98
S2	225	EtMIC4	AJ306453	147	98
S3	621	EtMIC4	AJ306453	529	98
S4	598	EtMIC4	AJ306453	485	98
S5	320	EtMIC4	AJ306453	136	90
S6	601	-	-	-	-
S7	607	-	-	-	-
S8	600	EtMIC4	AJ306453	614	100
S9	601	-	-	-	-
S10	532	EtMIC4	AJ306453	526	100
S11	626	EtMIC1	AF032905	560	98
S12	648	-	-	-	-
S13	213	EtMIC4	AJ306453	101	92
S14	609	-	-	-	-
S15	734	-	-	-	-
S16	28	-	-	-	-
S17	700	EtMIC2	Z71755	510	98
S18	549	EtMIC4	AJ306453	520	98
S19	781	-	-	-	-
S20	569	EtMIC4	AJ306453	525	98
S21	299	EtMIC4	AJ306453	420	98

Jujukan bagi klon *E. tenella* yang mempunyai keputusan BLAST yang bermakna (nilai skor ≥ 100 dan nilai identiti $\geq 90\%$) disenaraikan bersama dengan identiti putatif gen/protein, nombor pencapaian pangkalan data, skor BLAST dan peratus identiti yang berkaitan.

mempunyai domain transmembran yang hidrofobik (Tomley et al. 1991). Manakala EtMIC2 pula merupakan suatu protein mikronem yang didapati tersebar pada permukaan membran parasit semasa proses penyerangan (Tomley et al. 1996). Penggunaan Triton X-100 yang mempunyai ciri bukan ionik bertujuan memencilkan segala protein yang mempunyai ciri hidrofobik. Ini adalah berdasarkan kepada anggapan bahawa ciri hidrofobik ini sentiasa dijumpai pada protein membran yang berinteraksi dengan lapisan lipid membran. Triton X-100 berupaya menggantikan molekul lipid yang berinteraksi dengan domain hidrofobik pada protein membran dan seterusnya membentuk misel campuran protein-detergen yang boleh larut (Bordier 1981). Pada permulaan pemfraksian, sporozoit dilisis dengan sonikasi. Tindakan ini turut memecahkan sebarang organel yang ada pada sporozoit, termasuk mikronem yang diliputi membran. Maka sebarang protein yang terbebas dari organel yang mempunyai ciri hidrofobik dan protein yang berinteraksi dengan membran akan turut berada dalam fraksi Triton X-100.

Di antara lapan klon yang tidak mempunyai

pemadanan bermakna dengan jujukan dalam pangkalan data, klon-klon S6, S7, S14 dan S15 didapati membawa gen yang sama. Oleh itu, penyaringan imuno ini telah berjaya mengenalpasti sejumlah lima gen baru. Memandangkan sebilangan besar protein organel telah dikenalpasti setakat ini, kegagalan kelima-lima gen ini dipadankan dengan jujukan dalam pangkalan data memberikan implikasi bahawa gen-gen ini mengekodkan protein pada membran *E. tenella*. Pencirian lanjut gen-gen ini dijangka berupaya menyumbang dalam usaha untuk menentukan identiti protein membran putatif yang dikodkan dan seterusnya fungsi yang dimainkan oleh mereka dalam biologi parasit *E. tenella*.

KESIMPULAN

Untuk mengenalpasti protein membran *E. tenella*, antibodi terhadap fraksi membran sporozoit parasit ini telah dihasilkan dan digunakan dalam penyaringan imuno perpustakaan cDNA. Sejumlah lapan gen yang mengekodkan protein membran putatif telah berjaya dikenalpasti. Berdasarkan pemadanan dengan jujukan dalam pangkalan data, tiga daripada gen ini didapati mengekodkan protein organel mikronem, iaitu EtMIC1, EtMIC2 dan EtMIC4, manakala lima gen yang selebihnya tidak menunjukkan sebarang pemadanan bermakna. Oleh itu, kaedah penyaringan imuno ini telah berjaya mengenalpasti lima gen yang dipercayai mengekod protein membran baru dalam sporozoit *E. tenella*.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh peruntukan IRPA 09-02-02-0084 daripada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi, Malaysia. Geran CICHE daripada British Council juga dihargai.

RUJUKAN

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256: 1604-1607.
- Gardiner, P.R., Finerty, J.F. & Dwyer, D.M. 1983. Iodination and identification of surface membrane antigens in procyclic *Trypanosoma rhodesiense*. *J. Immunol.* 131: 454-457.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. 2001. *Immunobiology*, ed. ke-5. New York: Garland Publishing.
- Johnson, J.G., Epstein, N., Shiroishi, T. & Miller, L.H. 1980. Factors affecting the ability of isolated *Plasmodium knowlesi* merozoites to attach to and invade erythrocytes. *Parasitol.* 80: 539-550.
- Kawazoe, U., Tomley, F.M. & Frazier, J.A. 1992. Fractionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol.* 104: 1-9.
- Lekutis, C., Ferguson, D.J., Grigg, M.E., Camps, M. & Boothroyd, J.C. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 31: 1285-1292.
- Manger, I.D., Hehl, A.B. & Boothroyd, J.C. 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect. Immun.* 66: 2237-2244.
- Marchalonis, J.J., Cone, R.E. & Santer, V. 1971. Enzymic iodination. A probe for accessible surface protein of normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124: 921-927.
- Markwell, M.A. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins. I. Conditions for the efficient labeling of antiserum. *Anal. Biochem.* 125: 427-432.
- Mierendorf, R.C., Percy, C. & Young, R.A. 1987. Gene isolation by screening lambda gt11 libraries with antibodies. *Methods Enzymol.* 152: 458-469.
- Nachman, R.L., Hubbard, A. & Ferris, B. 1973. Iodination of the human platelet membrane. Studies of the major surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 248: 2928-2936.
- Roditi, I. & Liniger, M. 2002. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. *Trends Microbiol.* 10: 128-134.
- Samarawickrema, N.A. & Howell, M.J. 1990. The surface coat of bloodstream forms of *Trypanosoma muscili* from mice. *Int. J. Parasitol.* 20: 1055-1062.
- Schechter, M. & Nogueira, N. 1988. Variations induced by different methodologies in *Trypanosoma cruzi* surface antigen profiles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 37-45.
- Shiels, B., Hall, R., Glascodine, J., McDougall, C., Harrison, C., Taracha, E., Brown, D. & Tait, A. 1989. Characterization of surface polypeptides on different life-cycle stages of *Theileria annulata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 209-220.
- Shirley, M.W. 1995. *Eimeria* species and strains of chickens. Dlm. Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W. & Coudert, P. (pnyt.). *Biotechnology - Guidelines on techniques in coccidiosis research*, hlm. 1-24. Luxembourg: The European Commission DGXII.
- Tabarés, E., Ferguson, D., Clark, J., Soon, P.-E., Wan, K.-L. & Tomley, F. 2004. *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135: 123-132.
- Tomley, F.M., Billington, K.J., Bumstead, J.M., Clark, J.D. & Monaghan, P. 2001. EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats. *Int. J. Parasitol.* 31: 1303-1310.
- Tomley, F.M., Bumstead, J.M., Billington, K.J. & Dunn, P.P.J. 1996. Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79: 195-206.
- Tomley, F.M., Clarke, L.E., Kawazoe, U., Dijkema, R. & Kok, J.J. 1991. Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49: 277-288.

Williams, R.B. 1999. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 29: 1209–1229.

Puay-Eng Soon, Mohd. Sanusi Jangi & Kiew-Lian Wan
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor D.E.
MALAYSIA

Fiona M. Tomley
Institute for Animal Health
Compton, Newbury
Berkshire RG20 7NN
UNITED KINGDOM

