

文章编号:1000-7423(2000)-01-0001-04

不同疟区恶性疟原虫地理株 谷氨酸富有蛋白基因 R2 区序列分析及分型*

诸欣平 张新梅 周蕾 高欣

(首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054)

摘要 [目的] 测定云南与海南两省不同疟区恶性疟原虫分离株谷氨酸富有蛋白 (GLURP) 基因的部分序列及了解其分型。[方法] 采用套式 PCR 方法特异性扩增 GLURP 基因 R2 区片段, 并将该基因片段克隆于 T 载体, 用双脱氧末端终止法测定不同长度的阳性克隆核苷酸序列, 并应用 DNA Star 软件对云南与海南两省分离株 GLURP 基因及蛋白序列进行比较和分析。[结果] 首次发现云南与海南两省恶性疟原虫至少存有 7 个大小不同的 GLURP 等位基因型菌株, 其基因片段变化范围为 600~1 500 bp。不同分离株的 GLURP 基因 R2 区具高度保守性, 其由编码 19~20 个氨基酸的碱基的基本重复单位构成, 该基因具有长度的多态性, 表现在碱基基本重复单位的数目不同。序列分析结果表明, 我国不同分离株之间或同一地区不同株之间 GLURP 基因及氨基酸序列具有高度的同源性, 无明显的地理差异。[结论] 不同分离株 GLURP 基因结构的高度保守性及碱基重复片段数目的多态性, 对研究疫苗候选抗原和建立疟原虫基因分型方法具有一定理论价值。

关键词: 恶性疟原虫, 谷氨酸富有蛋白, R-2 区, 疫苗, 基因分型

中图分类号: R382.312

文献编号: A

谷氨酸富有蛋白 (glutamate rich protein, GLURP) 广泛分布于疟原虫肝期、红内期裂殖体的纳虫空泡及新释放的裂殖子表面, 具有强免疫原性, 并能为相应的免疫血清所识别。提示: GLURP 有可能成为疟疾疫苗中新的候选抗原分子蛋白^[1]。国外一些实验室对该蛋白的基因曾进行了不少的研究, 但国内尚未见报道。本文对云南与海南两省不同疟区的恶性疟原虫 GLURP 基因进行克隆测序及分型, 为疟疾疫苗的研究提供理论依据和建立新的疟疾分型方法。

材料与方 法

1 样本来源

在云南省勐腊县及海南省东方县东方镇用指尖采血法^[2]和静脉采血分别收集疟疾患者血样 (患者均为当地长期居住的成年人, 未去过外地疫区)。选取经镜检和 PCR 均证实为恶性疟原虫感染的血样进行基因分型检测。同时取非疫区健康供血员血样作为阴性对照。

2 DNA 制备

参照文献 [3] 进行。样本用生理盐水洗涤 2 次, 10 000 g 离心 5 min 后, 弃上清, 裂解液消化蛋白质, 等体积饱和酚/氯仿抽提去蛋白, 0.3 mol/L 醋酸钠和等体积无水乙醇沉淀, 80% 乙醇洗涤及空

气干燥 DNA 后, 加入缓冲液作为 PCR 扩增的模板。

3 引物设计及基因扩增

根据已发表的恶性疟原虫 GLURP 基因内部碱基重复单位的高度保守区域^[1]及查阅比较核苷酸序列资料库 (GenBank), 借助引物设计软件设计套式 PCR 扩增引物, 用以扩增 GLURP 基因 R2 区片段。第一对外引物用于第一次扩增反应:

上游引物为: 5'-TGAATTTGAAGATGTTACACTGAAC-3',

下游引物为: 5'-GTGGAATTGCTTTTCTTCAACACTAA-3',

第二对特异的内引物用于第二次扩增反应:

上游内引物为: 5'-TGTTCACTGAACAATTAGATTTAGATCA-3',

下游内引物序列同下游外引物, 引物由赛百胜公司在海外合成。套式 PCR 扩增反应体系见文献 [4]。取 10 μ l 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 UVP GDS8000 凝胶分析仪观察和记录结果。

4 GLURP 基因克隆, 鉴定和测序

分别将云南和海南两省扩增样本中片段约为 600 和 800 bp 的 DNA 再进行大量扩增至 100 μ l, 用纯化试剂盒 (QIA quick PCR purification kit, Qiagen) 纯化, 经电泳检测回收产物, 并将大小正确的片段定量后克隆入 T-载体 (pGEM-T vector system, Promega) 中, 经转化 DH5 α 感受态细胞后, 涂于 x-gal 氨苄琼脂糖平板, 次日挑取单个无色噬菌斑做特异 PCR 鉴定。将扩增出相应约 600 bp 或 800 bp 的阳性质粒送到赛百胜公司国外测序中心纯化和测序, 以进一步证实扩增产物确为 GLURP 基因特异目的

* 美国中华医学基金会 (CMB, Parasitology 98-674) 及北京市教委科技发展基金资助项目。

片段。

5 序列分析

测序结果采用 DNA star 序列分析软件进行了计算机辅助分析,对云南株与海南株 GLURP 部分基因序列进行了同源性比较和分析。

结 果

1 云南与海南两省分离株 GLURP-R2 基因扩增分型

恶性疟原虫 GLURP 基因是单拷贝基因,除了两头的保守区段外,内含两个编码重复氨基酸序列的 R1 和 R2 区。在 R2 区段内,根据其它国家的虫株研究报告,编码由 19-20 个氨基酸构成重复单位的碱基序列是高度保守的。但在同一地区的不同的恶性疟原虫株, R2 区氨基酸重复单位数目不同。因此, R2 区基因片段大小呈现多态性,因此可对不同的虫株进行基因分型。对我国海南 28 例与云南 27 例恶性疟原虫样本进行检测,结果表明按碱基大小分为 7 个基因型(表 1)。其基因片段变化范围是从约 600 bp 到 1 500 bp,显示了较大程度的

多态性(图 1)。在两省检出的分离虫株中,600 bp 大小的分离虫株出现的频率最高,属于优势虫株;800 bp 次之;1 500 bp 虫株出现频率最低,属于劣势虫株。

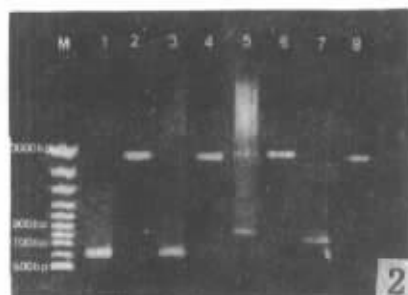
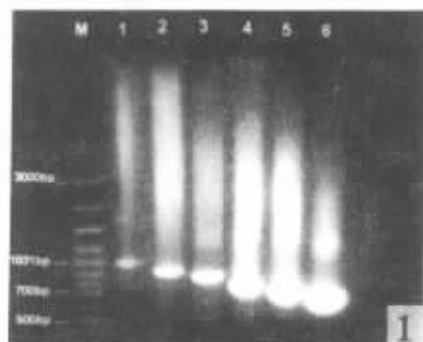
表 1 云南与海南两省恶性疟原虫 GLURP 基因家族的分型
Table 1 Genotyping of GLURP gene families from *P. falciparum* of Yunnan and Hainan Provinces

基因分型 Genotype	云南省 Yunnan Province	海南省 Hainan Province
I (1 500 bp)	无(Nil)	1
II (1 000 bp)	2	无(Nil)
III (901 bp)	5	5
IV (800 bp)	7	6
V (750 bp)	1	4
VI (700 bp)	1	2
VII (650 bp)	12	9

2 云南与海南两省分离株 GLURP 基因结构和同源性分析

基因克隆后挑取的无色噬菌斑摇菌扩增后,用碱裂解法抽提阳性质粒,用 GLURP 基因扩增的内引物做 PCR 鉴定,结果显示扩增出预期大小的片段(图 2)。

将插入云南分离株 800 和 600 bp 左右的 2 个阳



M 100 bp DNA 标准标志物(由大至小为 3 000,2 000,1 500,1 200,1 031,900,800,700,600 及 500 bp)

M 100 bp DNA size marker (from big size to small size: 3 000,2 000,1 500,1 200,1 031,900,800,700,600 and 500 bp)

图 1 以云南省恶性疟原虫分离株 GLURP 基因家族的分型为例 1-6 不同患者血中的恶性疟原虫 GLURP 基因型 图 2 GLURP 基因克隆的 PCR 鉴定 1,3,5 和 7 分别为云南株 II,海南株 II,云南株 I,海南株 I 的 PCR 扩增产物;2,4,6 和 8 分别为云南株 II,海南株 II,云南株 I,海南株 I 的克隆质粒

Fig.1 Taking the genotyping of GLURP gene families from *P. falciparum* isolates from Yunnan Province as an example. 1-6 *P. falciparum* GLURP genotypes in different patients. Fig.2 PCR identification of recombinant plasmids with GLURP gene. Lanes 1, 3, 5, 7 were PCR products of Yunnan II, Hainan II, Yunnan I and Hainan I, respectively. Lanes 2, 4, 6, 8 were cloning plasmids of Yunnan II, Hainan II, Yunnan I and Hainan I, respectively.

性质粒和相应大小的两个海南分离株阳性质粒进行序列测定,结果表明:云南的两个 GLURP 基因株分别为 I 株 740 和 II 株 628 bp。海南的两个基因株分别为 I 株 797 和 II 株 631 bp。分别将云南的 I 株与 II 株,海南的 I 株与 II 株,云南的 I 株与海南的 I 株,云南的 II 株与海南的 II 株进行碱基序列及推导出的氨基酸同源性分析(图 3 及表 2)。

由表 2 结果表明,无论是云南株与海南株之间,还是云南不同基因株之间和海南不同基因株之间碱基序列均具有高度的同源性,根据碱基序列推导出的氨基酸序列同源性也较高,提示在我国恶性疟的两个重要流行区云南和海南两省恶性疟原虫 GLURP 基因株不存在明显的地理差异,碱基序列具高度的保守性。

3 恶性疟原虫 GLURP 基因株的特征及分析

根据测定的碱基序列推导出其编码的氨基酸序列,结果显示具有典型的 19~20 个重复氨基酸序列。基本重复单位是 DKNEKGQHEIVEVEEILPE 或 DKNEKGQHEIVEVEEILPED。有的重复单位的第 6 位与第 7 位 GQ 分别被 VE、VQ、IQ 或 AQ 所代替

(图 3)。海南分离株 I 含有 9 个上述重复单位,云南分离株 I 含有 8 个上述重复单位,海南分离株 II 和云南分离株 II 均含有 6 个上述重复单位。提示我国恶性疟原虫 GLURP 基因 R2 区氨基酸具有高度的保守序列,其不同基因株的片段大小主要是由重复单位数目不同造成的。本研究与国外报告的非洲及

表 2 恶性疟原虫地理株 GLURP 基因碱基及氨基酸同源性的比较

Table 2 Homology comparison of DNA sequences and deduced amino acid of GLURP gene from geographically different *P. falciparum* isolates

分离株 Isolate	核苷酸同源性 Nucleotide homology	氨基酸同源性 Amino acid homology
云南分离株 I Yunnan I (740 bp)	97.8%	91.4%
海南分离株 I Hainan I (797 bp)	95.6%	76.7%
云南分离株 I Yunnan I (740 bp)	96.8%	89.4%
云南分离株 II Yunnan II (628 bp)	96.7%	82.8%

海南分离株 I (Hainan I)	N A I I N Q L G P E V E V E E I P S E L H E N E V A H P I V E I V E E V P P E N Q N N E P O E I N S D	55
云南分离株 I (Yunnan I)	Q L D L D H K T V D P E V E E I P S E L H E N E V A H P E V E E V E E P P P N Q N N E P Q E I N E D	55
海南分离株 II (Hainan II)	Q L D L D H K F V D P N R S R L N S F T X K S G A R N C N C S P S F N Q N N E P Q L N E D	55
云南分离株 II (Yunnan II)	Q L D L D H K T V D P E V E E I P S E L H E N E V A H P I V E I V E E V P P E N Q N N E P D E V E D	55
海南分离株 I (Hainan I)	D K S A H O H E V E V E E I L P E D D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	113
云南分离株 I (Yunnan I)	D K S A H O H E V E V E E I L P E D D K N E K Y H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	113
海南分离株 II (Hainan II)	D K S A H O H E V E V E E I L P E D D K N E K Y P H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	113
云南分离株 II (Yunnan II)	D K S A H O H E V E V E E I L P E D D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K Y O H E V E V E E I L P E	114
海南分离株 I (Hainan I)	D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E D K N E K Y O H E V E V E E I L P E	178
云南分离株 I (Yunnan I)	D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	178
海南分离株 II (Hainan II)	D K N E K G O H E V E V E E I L P E D D K N E K G O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	173
云南分离株 II (Yunnan II)	D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	173
海南分离株 I (Hainan I)	D K N E K G O H E V E V E E I L P E D K N E K A G O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	128
云南分离株 I (Yunnan I)	D K N E K Y O H E V E V E E I L P E D K N E K G O H E V E V E E I L P E	128
海南分离株 II (Hainan II)	-----	113
云南分离株 II (Yunnan II)	-----	105
海南分离株 I (Hainan I)	I V E E V P S Q T N N N E N I E T I P F R E E K K N E P S V E E K A I P	267
云南分离株 I (Yunnan I)	I V E E V P S Q T N N N E N I E T I P F R D Q K L L R K S N S	266
海南分离株 II (Hainan II)	I V E E V P S Q T N N N E N I E T I P F R E E K K N E P S V E E K A I P	218
云南分离株 II (Yunnan II)	I V E E V P S Q T N N N E N I E T I P F R E E K K N E P S V E E K A I P	209

图 3 恶性疟原虫分离株 GLURP 基因 R2 区的氨基酸序列比较 划线部分代表由 19~20 个氨基酸组成的重复单位序列“-”代表氨基酸的缺失

Fig. 3 Comparison of deduced amino acid sequences of GLURP gene R2 region from geographically different *P. falciparum* isolates. The sequences of the repeat units of 19~20 amino acid residues are underlined. "-" represents deletion of amino acid

泰国基因株的结果相近似^[1,4]。

讨 论

疟疾疫苗的研制走过了几十年艰辛的历程。尽管已发现,并合成了一些疫苗候选抗原,如裂殖子表面蛋白 1 (MSP1)^[5]、裂殖子表面蛋白 2 (MSP2)^[6]及环孢子蛋白 (CSP)^[7]等,但由于抗原本身的免疫原性及疟原虫抗原变异等因素,疟疾疫苗目前仍未见有根本的突破性进展。研究的重点仍将是继续寻找更有效的保护性抗原及研究复合多价疫苗,这样的疫苗应能针对疟原虫生活史中的有性期,红外期及红内期各阶段,并针对不同虫株的疟原虫有一定的交叉作用。恶性疟原虫谷氨酸富蛋白存在于整个无性期,由非重复的氨基端 R0 区和中央重复区 R1 以及羧基端重复区 R2 组成,编码

1 271 个氨基酸,分子量为 145 kDa,其中 R2 区具有较高的保守性,且含有 T、B 细胞表位,并具有强免疫原性。人工重组的 GLURP 在体外可刺激 T 淋巴细胞增生和被大多数急性恶性疟患者的免疫血清所识别^[8,9]。特异的人抗 GLURP IgG 与单核细胞协同作用在体外能够抑制疟原虫的生长^[10]。我们的研究也表明我国恶性疟原虫 GLURP 基因的 R2 区是高度保守的。无论是云南分离株还是海南分离株均由 19~20 个典型的基本氨基酸重复单位构成,与国外业已报道的恶性疟原虫虫株具有较高的同源性。该蛋白是否有可能成为理想的疫苗候选抗原,将有待于进一步的深入研究加以证实。我们的研究也发现 GLURP 基因具有多态性。但这个多态性仅表现在基本重复单位的数目上,而基本重复单位的序列无论在云南分离株还是海南分离株都是相当保守的。这个基因多态性的特征也为我们根据片段大小进行不同等位基因株的判断和基因分型提供了可靠的依据。

承陈沛泉和王学忠同志协助样本采集,北京朝阳医院张晶同志协助部分实验,特此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] Borre MB, Dziegiel M, Hogg B, et al. Primary structure and localization of a conserved immunogenic *Plasmodium falciparum* glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, 49:119~131.
- [2] 诸欣平,刘强,周蕾,等.套式聚合酶链式反应诊断恶性疟原虫及混合感染的研究. *中国寄生虫病防治杂志*, 1999, 12:16~19.
- [3] Snounou G, Viriyakosol S, Jara W, et al. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*, 1993, 58:283~292.
- [4] 诸欣平, Georges snounou, William Jara, 等.套式聚合酶链式反应扩增谷氨酸富蛋白基因片段应用于恶性疟原虫基因分型. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16:331~334
- [5] Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure

- and role in immunity. *Progr Allergy*, 1988, 41:72~97.
- [6] Clark JT, Donachie S, Anand R, et al. 46~53 kilodalton glycoprotein from the surface of *P. falciparum* merozoites. *Mol Biochem Parasitol*, 1989, 32: 15~24.
- [7] Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell*, 1985, 42: 401~403.
- [8] Dziegiel M, Rowe P, Bennett S, et al. Immunoglobulin M and G antibody responses to *P. falciparum* glutamate-rich protein: correlation with clinical immunity in Gambian children. *Infect Immun*, 1993, 61: 103~108.

- [9] Theisen M, Vuust J, Cottochau A, et al. Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *P. falciparum* expressed in *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1995, 2 (1): 30~34.
- [10] Theisen M, Soe S, Oeuvray C, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *P. falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect Immun*, 1998, 66 (1):11~17.

收稿日期:1998-04-02
(编辑:李雅卿)

SEQUENCE ANALYZING AND GENOTYPING OF THE GENE ENCODING GLUTAMATE RICH PROTEIN OF GEOGRAPHICALLY DIFFERENT *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISOLATES OBTAINED FROM DIFFERENT MALARIA ENDEMIC AREAS *

ZHU Xin-ping, ZHANG Xin-mei, ZHOU Lei, GAO Xin
(*Department of Parasitology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054*)

Abstract [Objective] To sequence a gene encoding GLURP and identify the genotypes of geographically different *Plasmodium falciparum* isolates from Yunnan and Hainan Provinces, China. [Methods] The gene of R2 repeat region of GLURP was amplified by the nested polymerase chain reaction and cloned into T-vector. The nucleotide sequence of the GLURP gene was determined using automatic sequencer (dideoxy chain termination method), and analyzed by DNA Star software. [Results] At least 7 different GLURP genotypes ranging from 600 bp to 1 500 bp were found in different *P. falciparum* isolates from Yunnan and Hainan Provinces. R2 region of GLURP gene consisted of several repeat units, each was composed of 19~20 residues which were shown to be highly conserved. The GLURP gene was also size polymorphic due to differences in the number of repeat units, whereas the repeat sequence was conserved. Sequence analysis showed that DNA sequences and deduced amino acid sequences were highly homologous among the geographically dispersed isolates or various isolates from the same geographical region. No obvious differences were found in the GLURP gene sequences among geographically different isolates. [Conclusion] The GLURP gene of geographically different *P. falciparum* isolates is highly conserved and size polymorphic, being useful in searching for malaria vaccine candidate antigen and developing a genotyping method for malaria research.

Key Words: *Plasmodium falciparum*, glutamate rich protein (GLURP), R2 region, vaccine, genotyping.