

中国脑型疟患者恶性疟原虫分离株裂殖子表面蛋白M SP1 第 16—17 区基因的分子克隆及序列分析*

边中启¹ 管惟滨¹ 宋关鸿¹ 王功焯² 李方银²

1 第二军医大学寄生虫学教研室 上海 200433

2 解放军五十七医院传染病中心 昆明 650223

摘要 目的: 为设计研制安全有效的人脑型疟疫苗提供进一步科学依据。方法: 应用多聚酶链反应(PCR)技术对中国 5 例脑型疟患者恶性疟原虫云南省勐腊县勐罕 CMH/YN 分离株和云南省盈江县农场 CYJ/YN 分离株基因组 DNA 裂殖子表面蛋白 1(M SP1) 第 13—17 区基因进行扩增, 将扩增产物分别经 EcoRI 和 KpnI 双酶切后, 回收的 M SP1 第 16—17 区基因分子定向克隆 M 13mp18 和 M 13mp19 载体, 按 Sanger 双脱氧链终止法进行 DNA 序列测定, 并与 MAD20, K1 和 Wellcome 株原型基因进行同源性分析比较。结果: 发现脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16—17 区基因之间的序列完全相同, 全长为 918 bp, 编码 306 个氨基酸, 含 12 个半胱氨酸组成的 2 个表皮生长因子(EGF) 单体结构域; 除了在核苷酸第 4 869 位缺失 1 个碱基和散在分布 5 个碱基点突变之外, 与 MAD20, K1 和 Wellcome 株相应基因之间的核苷酸同源性分别为 98.6%、23.3% 和 22.8%。结论: 本研究在世界上首次报道脑型疟患者恶性疟原虫分离株 M SP1 第 16—17 区 DNA 序列测定分析结果, 确认该基因与 MAD20 株高度同源性, 并发现在 1 691—1 701 位氨基酸存在 TCTEEDSGSSR 表位。

关键词 脑型疟患者 恶性疟原虫 裂殖子表面蛋白 1 分子克隆 序列分析 疫苗

脑型疟是世界流行的严重危害人类健康的重要传染病和寄生虫病之一。我们已报道中国脑型疟患者恶性疟原虫分离株 M SP1 第 16—17 区基因和 M SP2 基因的分子克隆在研制安全有效的人脑型疟疫苗、阐明脑型疟发病机制及建立新型的脑型疟恶性疟原虫检测方法中具有重要作用^[1], 本文以边中启报道^[1]的脑型疟患者恶性疟原虫分离株为实验材料, 进一步报道中国脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株基因组 DNA M SP1 第 16—17 区基因分子克隆及序列测定分析结果。

材料和方法

材料

1 脑型疟患者恶性疟原虫分离株
同前文的报道^[1]。

2 引物

按文献^[1-3]方法进行。

3 试剂

分子克隆试剂见文献^[1]。¹⁷Sequencing™ Kit 测序试剂盒购自 Pharmacia LKB 公司, 引物标记周期反应测序试剂盒(Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit) 购自 Applied Biosystems 公司, α -³²P-dATP (3 000 Ci/mmol) 为美国 Du Pont 公司产品, 蛋白胨为日本制药株式会社产品, 酵母抽提物为英国 Oxoid 公司产品, 琼脂为美国 Difco 公司产品。其余均为国产分析纯或优级纯试剂。

4 菌株与载体

同文献^[1]。

5 培养基

按文献^[1-3]方法进行。

方法

1 基因组 DNA 制备

按文献^[1-3]方法进行。

* 复旦大学分子遗传工程国家重点实验室基金资助项目

2 PCR 扩增

按文献^[1-3]方法进行。

3 PCR 产物酶切鉴定及纯化

按文献^[1-3]方法进行。

4 分子克隆与鉴定

按文献^[1]方法进行。

5 DNA 序列测定

按文献^[4]方法制备重组子 RFDNA 与单链 DNA。用 Sanger 双脱氧链终止法^[4]按⁷Sequencing™ Kit 程序测定,取 10 μl DNA 模板液(1 μg DNA),加退火缓冲液和引物各 2 μl 置 100 °C 水浴 3 min,快速插入盛液氮的容器中迅速冷却后,在室温下退火 20 min。取 1 μl 无菌水,3 μl Labelling Mix-dATP,1 μl α-³²P-dATP,2 μl T7DNA 多聚酶稀释液(2 U/μl)于无菌管中混匀,并将混和液加到退火液中再混匀,室温置 5 min。A, C, G, T, 各取 2.5 μl 分别加入 4 个无菌管中,于 37 °C 水浴 1 min,将上述混合液各取 4.5 μl 分别加入装有 A, C, G, T 的 4 个无菌管中,于 37 °C 反应 5 min,再每管各加入 5 μl 终止反应缓冲液,并在 85 °C 水中处理 2 min,置于 -20 °C 保存。灌制聚丙烯酰胺凝胶,按 A, C, G, T 顺序依次加样,100 V 电泳 6 h。将凝胶连同滤纸在真空干燥仪上 80 °C 抽干 1 h,置于 -70 °C 放射自显影 36 h。取出 X 光片晾干直接阅读序列分析结果。其中部分测序工作在美国 ABI 公司 373A 型 DNA 测序仪上进行核苷酸序列测定,并对其结果用 PC/GENE 计算机程序进行分析。

结 果

1 PCR 扩增产物与酶切鉴定

脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 MSP1 第 13—17 区基因和 MSP2 基因 PCR 扩增产物结果,作者已报道^[1]。图 1 为脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 MSP1 第 13—17 区基因 PCR 产物经含单一酶切位点 EcoR I 酶

切鉴定,在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳分析,结果显示各产生 0.918 kb 和 0.782 kb 两条特定基因带,其大小完全符合目的基因特征,这些结果确证 PCR 产物为脑型疟患者恶性疟原虫分离株 MSP1 目的基因;鉴于已报道^[1]脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 MSP2 基因 PCR 扩增产物故以此作为对照(图 1)。

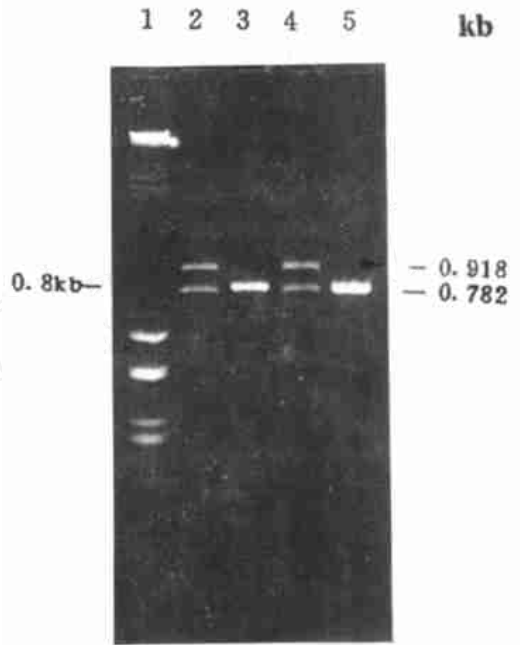


图 1 PCR 产物的酶切鉴定

- 1 DNA/Hind III+ pUC19/Hae III 标准分子量(同前文)
- 2 脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 分离株 MSP1 第 13—17 区基因 PCR 产物经 EcoR I 酶切鉴定
- 3 脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 分离株 MSP2 基因 PCR 产物作为对照
- 4 脑型疟患者恶性疟原虫 CYJ/YN 分离株 MSP1 第 13—17 区基因 PCR 产物经 EcoR I 酶切鉴定
- 5 脑型疟患者恶性疟原虫 CYJ/YN 分离株 MSP2 基因 PCR 产物作为对照

Fig 1 Restriction analysis of PCR products

- Lane 1: DNA standard Marker (DNA/Hind III+ pUC19/Hae III) ranging from 174 bp to 23 130 bp
- Lane 2: PCR product of genes encoding regions 13—17 in MSP1 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I
- Lane 3: PCR product of genes encoding MSP2 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria was used as control
- Lane 4: PCR product of genes encoding regions 13—17 in MSP1 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I
- Lane 5: PCR product of genes encoding MSP2 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria was used as control

2 分子克隆与鉴定

凡带有编码脑型疟患者恶性疟原虫分离株 M SP1 第 16—17 区基因的 M 13 重组子, 分别用 EcoR I 和 Kpn I 进行双酶切鉴定, 可以切出 0.918 kb 和 7.25 kb 2 个片段, 各片段大小均完全符合验证后的转化重组子外源基因正确插入特征。以上酶切鉴定结果证明可以识别带有编码脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 目的基因的重组子(图 2)。我们以重组子 DNA 作为 PCR 模板, 按文

献^[1-3]应用 PCR 验证同样可获得与原始 PCR 扩增产物完全一致的正确插入的脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 目的基因。

3 DNA 测序分析

发现脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16—17 区基因之间的序列完全相同, 全长为 918 bp (图 3), 编码 306 个氨基酸, 理论分子量为 33 660 Dalton, 含 12 个半胱氨酸组成的 2 个表皮生长因



图 2 脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M 13+M SP1 第 16—17 区基因重组子酶切鉴定

- 1 M 13mp18 噬菌体
- 2 M 13mp18 经 EcoR I+ Kpn I 双酶切
- 3 重组子 M 13mp18+ M SP1 第 16—17 区基因未酶切
- 4 λ DNA/Hind III+ pUC19/Hae III 标准分子量(同图 1. 1)
- 5 重组子 M 13mp18+ CMH/YN M SP1 第 16—17 区基因经 EcoR I+ Kpn I 双酶切鉴定
- 6 重组子 M 13mp19+ CMH/YN M SP1 第 16—17 区基因经 EcoR I+ Kpn I 双酶切鉴定
- 7 重组子 M 13mp18+ CYJ/YN M SP1 第 16—17 区基因经 EcoR I+ Kpn I 双酶切鉴定
- 8 重组子 M 13mp19+ CYJ/YN M SP1 第 16—17 区基因经 EcoR I+ Kpn I 双酶切鉴定
- 9- 12 原始 M SP1 第 16—17 区基因 PCR 产物

Fig 2 Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consisting of M 13 vectors with an insert of genes encoding regions 16—17 in M SP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria

- Lane 1: M 13mp18 vectors
 Lane 2: M 13mp18 digested by EcoR I and Kpn I
 Lane 3: M 13 recombinant DNA consisting of M 13mp18 with an insert of the regions 16—17 in M SP1 undigested
 Lane 4: DNA standard marker (λ DNA/Hind III+ pUC19/Hae III) ranging from 174 bp to 23130 bp
 Lane 5: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp 18 with an insert of the region 16—17 in M SP1 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I and Kpn I
 Lane 6: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp19 with an insert of the region 16—17 in M SP1 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I and Kpn I
 Lane 7: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp 18 with an insert of the regions 16—17 in M SP1 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I and Kpn I
 Lane 8: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp19 with an insert of the regions 16—17 in M SP1 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by EcoR I and Kpn I
 Lane 9—12: RCR amplified products of the regions 16—17 in M SP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria

AAT TCA GAA CAA AAA AAC ATA CTT TTA AAA N S E Q K N I L L K	30	AAA TTG ATA AAT GAT GAT ACG AAA AAA GAT K L I N D D T K K D	480
AGT TAC AAA TAT ATA AAA GAA TCA GTA GAA S Y K Y I K E S V E	60	ATG CTT GGC AAA TTA CTT AGT ACA GGA TTA M L G K L L S T C G L	510
AAT GAT ATT AAA TTT GCA CAG GAA GGT ATA N D I K F A Q E G I	90	GTT CAA ATT TTT CCT AAT ACA ATA ATA TCA V Q I F P N T I I S	540
AGT TAT TAT GAA AAG GTT TTA GCG AAA TAT S Y Y E K V L A K Y	120	AAA TTA ATT GAA GGA AAA TTC CAA GAT ATG K L I E G K F Q D M	570
AAG GAT GAT TTA GAA TCA ATT AAA AAA GTT K D D L E S I K K V	150	TTA AAC ATT TCA CAA CAC CAA TGC GTA AAA L N I S Q H Q C V K	600
ATC AAA GAA GAA AAG GAG AAG TTC CCA TCA I K E E A G K F P S	180	AAA CAA TGT CCA GAA AAT TCT GCA TGT TTC K Q C P E N S G C F	630
TCA CCA CCA ACA ACA OCT CCG TCA CCA GCA S P P T T P P S P A	210	AGA CAT TTA GAT GAA AGA GAA GAA TGT AAA R H L D E R E E C K	660
AAA ACA GAC GAA CAA AAG AAG GAA AGT AAA K T D E Q K K E S K	240	TGT TTA TTA AAT TAC AAA CAA GAA GGT GAT C L L N Y K Q E G D	690
TTC CTT CCA TTT TTA ACA AAC ATT GAG ACC F L P F L T N I E T	270	AAA TGT GAA GAA AAT CCA AAT CCT ACT TGT K C E E N P N P T C	720
TTA TAC AAT AAC TTA GTT AAT AAA ATT GAC L Y N N L V N K I D	300	AAC GAA AAT AAT GGT GGA TGT GAT GCA GAT N E N N G G C D A D	750
GAT TAC TTA ATT AAC TTA AAG GCA AAG ATT D Y L I N L K A K I	330	GCC ACA TGT ACC GAA GAA GAT TCA GGT AGC A T C T E D S G S	780
AAC GAT TGT AAT GTT GAA AAA GAT GAA GCA N D C N V E K D E A	360	AGC AGA AAG AAA ATC ACA TGT GAA TGT ACT S R K K I T C E C T	810
CAT GTT AAA ATA ACT AAA CTT AGT GAT TTA H V K I T K L S D L	390	AAA CCT GAT TGT TAT CCA CTT TTC GAT GGT K T D S Y P L F D G	840
AAA GCA ATT GAT GAC AAA TTA GAT CTT TTT K A I D D K I T D L F	420	ATT TTC TGC AGT TCC TCT AAC TTC TTA GGA I F C S S S N F L G	870
AAA AAC AAT AAC GAC TFC GAA GCA ATT AAA K N T N D F E A I K	450	ATA TCA TTC TTA TTA ATA CTC ATG TTA ATA I S F L L I L M L I	900
		TTA TAC AGT TTC ATT TAA L Y S F I	

图 3 脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株MSP1第16—17区DNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of genes encoding regions 16—17 in MSP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria

63	CMH/YN	NSE QKNLLKSYK YIKESVENDI KFAQEGHSYY EKVLAKYKDD LESIKKVIKE EKEKFPSSPP
	CYJ/YN	NSE QKNLLKSYK YIKESVENDI KFAQEGHSYY EKVLAKYKDD LESIKKVIKE EKEKFPSSPP
	MAD20	NSE QKNLLKSYK YIKESVENDI KFAQEGHSYY EKVLAKYKDD LESIKKVIKE EKEKFPSSPP
	K1	NKE KRDKFLSSYN YIKDSIDTDI NFANDVLGGY KILSEKYKSD LDSIKKVI ...
	WELL	NKE KRDKFLSSYN YIKDSIDTDI NFANDVLGGY KILSEKYKSD LDSIKKVI ...
163	CMH/YN	TTTPSPAKTD EQKKESKFLP FLTNIETLYN NLVNKIDDYL INLKAINDC NVLKDEAHVK ITKLSDLKAI DDKIDLFKNT NDFEAIKKLI NDOTKKDMLG
	CYJ/YN	TTTPSPAKTD EQKKESKFLP FLTNIETLYN NLVNKIDDYL INLKAINDC NVLKDEAHVK ITKLSDLKAI DDKIDLFKNT NDFEAIKKLI NDOTKKDMLG
	MAD20	TTTPSPAKTD EQKKESKFLP FLTNIETLYN NLVNKIDDYL INLKAINDC NVLKDEAHVK ITKLSDLKAI DDKIDLFKNT NDFEAIKKLI NDOTKKDMLG
	K1ND KQGENEYLP FLNNIETLYK TVNDKIDLFV IHLEAKVLNY TYEKSNEVVK IKELIYKTI QDKIADFKN NNFVGIADLS TDYNNHNLTT
	WELLND KQGENEYLP FLNNIETLYK TVNDKIDLFV IHLEAKVLNY TYEKSNEVVK IKELIYKTI QDKIADFKN NNFVGIADLS TDYNNHNLTT
262	CMH/YN	KFLSTGLV QI FPNTHL SK LI EGKIQDML NISQIQCVKK QCPENSGCFR HLDERECKC LLNYKQEGDK CEENPNPTCN ENNGGCADA TCTEEDSGSS
	CYJ/YN	KFLSTGLV QI FPNTHL SK LI EGKIQDML NISQIQCVKK QCPENSGCFR HLDERECKC LLNYKQEGDK CEENPNPTCN ENNGGCADA TCTEEDSGSS
	MAD20	KFLSTGLV QI FPNTHL SK LI EGKIQDML NISQIQCVKK QCPENSGCFR HLDERECKC LLNYKQEGDK CEENPNPTCN ENNGGCADA TCTEEDSGSS
	K1	KFLSTGMVFE NILKS ILSNL LDWKLARYVK HPTTPMRKKT MIQNSGCFR HLDERECKC LLNYKQEGSK CVENPNPTCN ENNGGCADA KCTEEDSGSN
	WELL	KFLSTGMVFE NLLKSVLSNL LDWKLARYVK HPTTPMRKKT MIQNSGCFR HLDERECKC LLNYKQEGSK CVENPNPTCN ENNGGCADA KCTEEDSGSN
306	CMH/YN	RKKITCECTK PDSYPIFDGI FCSSSNFLGI SFLIIMLIL YSFI
	CYJ/YN	RKKITCECTK PDSYPIFDGI FCSSSNFLGI SFLIIMLIL YSFI
	MAD20	RKKITCECTK PDSYPIFDGI FCSSSNFLGI SFLIIMLIL YSFI
	K1	RKKITCECTK PDSYPIFDGI FCSSSNFLGI SFLIIMLIL YSFI
	WELL	RKKITCECTK PDSYPIFDGI FCSSSNFLGI SFLIIMLIL YSFI

图 4 MAD20, K1和Wellcome株与脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株MSP1第16—17区编码基因推导氨基酸序列的比较 * 示缺失的氨基酸

Fig 4 Comparison of deduced amino acid sequence of genes encoding regions 16—17 in MSP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria with those of MAD20, K1 as well as Wellcome. Amino acid deletions are marked by asterisks

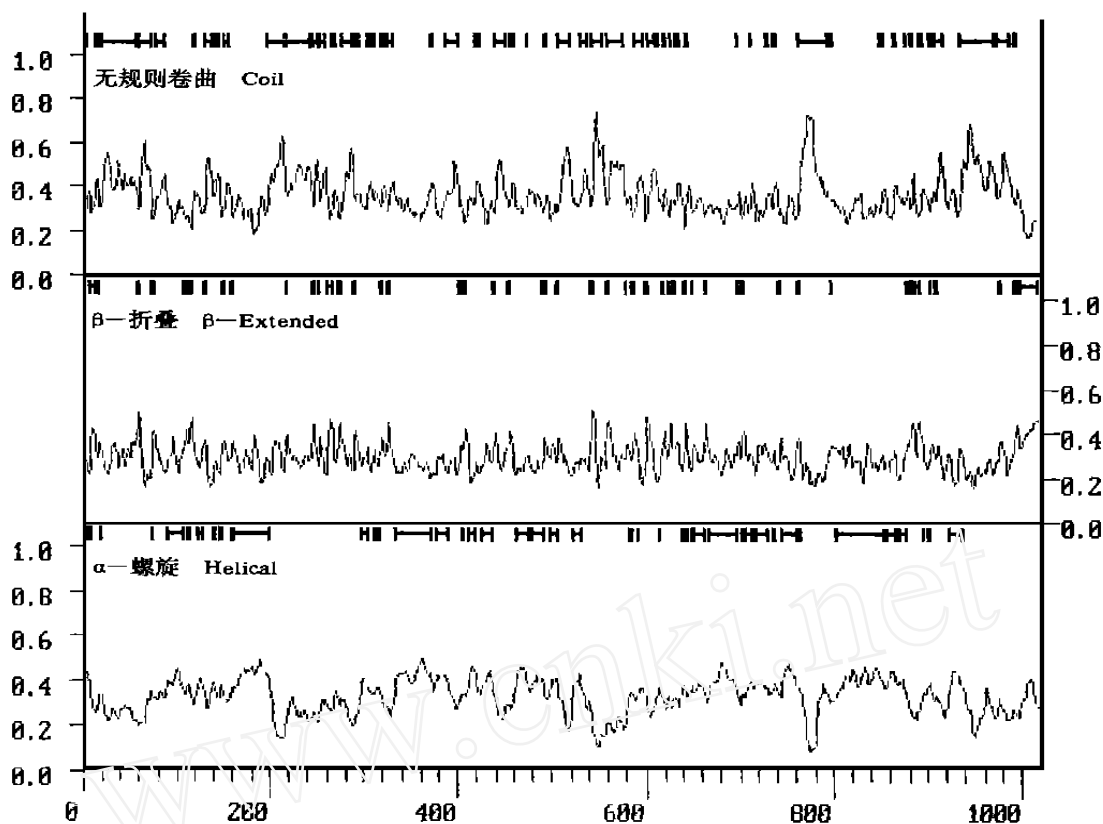


图 5 脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 MSP1 第 16—17 区二级结构; 曲线上方垂直线和水平线表示各二级结构分布区域

Fig 5 Secondary structure of genes encoding regions 16—17 in MSP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria; Extent of regions predicted in a conformation are indicated for the horizontal and vertical lines on the top of graphs

子(EGF)单体结构域,每个EGF单体结构域内含6个半胱氨酸构成3个二硫链,富含的半胱氨酸在脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株MSP1分子中呈高度保守;除了在第4494、4499、4507、4517和4521位核苷酸处散在分布5个碱基点突变G T, T A, G A, C T, G A和核苷酸第4869位缺失1个A,致使氨基酸序列在第1644位插入C恢复读框之外,与MAD20株相应基因之间的核苷酸序列完全一致,同源率为98.6%,而与K1和Wellcome株同源率分别为23.3%和22.8%,这些结果确证脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株MSP1第16—17区基因与MAD20株高度同源性,并发现在1691—

1701位氨基酸存在TCTEEDSGSSR表位(图4)。用PC/GENE计算机程序对该基因结构进行分析,结果发现该基因DNA序列富含A+T量达75%;二级结构 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲分别占40.6%、16.3%和43%(图5);氨基酸倾向形成 α -螺旋和亲水性峰值增强。

讨 论

最近报道^[5]多价合成多肽SPf66疫苗在流行区对人群恶性疟原虫感染无保护性免疫。我们已报道^[1]MSP1和MSP2作为恶性疟红内期疫苗重要的候选抗原正成为当今人类疟疾疫苗研究的热点之一。但迄今为止,对脑型疟患者恶性疟原虫分离株MSP序列测

定研究,国内外尚未见报道。本文在世界上首次报道脑型疟患者恶性疟原虫分离株MSP1第16—17区DNA序列测定,并与MAD20、K1和Wellcome株进行同源性分析比较,结果发现脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株MSP1第16—17区基因之间的序列完全相同,全长为918 bp,编码306个氨基酸,含12个半胱氨酸组成的两个表皮生长因子(EGF)单体结构域,每个EGF单体结构域内有6个半胱氨酸构成3个二硫键,并发现富含的半胱氨酸在脑型疟患者恶性疟原虫分离株MSP1分子中呈高度保守,这些保守的半胱氨酸反映了脑型疟恶性疟原虫MSP1在长期选择压力下的分子进化现象,这对维持MSP1空间结构的完整性和诱导脑型疟保护性免疫反应具有重要作用。同源性分析比较结果表明,中国脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN和CYJ/YN分离株与MAD20株表现出高度同源性属MAD20株。值得注意的是,用PC/GENE计算机程序对该基因二级结构分析表明,氨基酸倾向于形成 α -螺旋,由于 α -螺旋构型是T细胞表位所必需的结构,这提示该区可能存在T细胞表位;该区氨基酸亲水性峰值增强,这提示该区的抗原性可能具有保护性免疫作用。通过对该基因DNA序列测定,结果发现A+T含量达75%,与已报道^[6]的MAD20株MSP1一级结构中A+T含量所占74.5%基本一致,并发现在1691—1701位氨基酸存在TCTEEDSGSSR表位。令人感兴趣的是,Kaslow等^[7]用抗恶性疟原虫MSP1₁₉的单克隆抗体4H4/34鉴定出相同的TCTEEDSGSSR表位。至于为什么中国脑型疟患者恶性疟原虫分离株与MAD20株在分子遗传学上表现出高度同源性,尚有待于阐明。我们已将脑型疟患者恶性疟原虫分离株MSP1第16—17区基因插入到PWR590质粒的 β 半乳糖苷酶基因中,构建成含Lac启动子的编码 β 半乳糖苷酶590个氨基酸残基的基因和脑

型疟恶性疟原虫分离株MSP1第16—17区基因的重组质粒,并在大肠杆菌中进行了表达,通过Western Blot测定,结果表明获得的融合蛋白具有免疫原性。我们首次发现脑型疟患者受感染红细胞(parasitized erythrocyte, PE)表达的高分子量红细胞膜蛋白1(*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1, PfEMP-1)与脑血管内皮细胞(endothelial cell, EC)上受体蛋白CD36、血小板反应蛋白(thrombospondin, TSP)和细胞间粘附分子1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1)及血管细胞粘附分子1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)的结合是PE粘附EC导致脑型疟恶性疟原虫逃避依赖脾杀伤机制而引起局部脑组织损害的分子基础,可能是脑型疟临床上发生昏迷的始动因素。

参 考 文 献

- 1 边中启,宋关鸿,管惟滨,等.中国脑型疟患者恶性疟原虫分离株裂殖子表面蛋白MSP1第16—17区基因和MSP2基因分子克隆与鉴定.中国寄生虫学与寄生虫病杂志1997;1:1
- 2 边中启,管惟滨,宋关鸿,等.中国恶性疟原虫MSP1第13—17区基因片段和MSP2基因的分析.复旦大学遗传学研究所.遗传工程国家重点实验室1994—1995年报;17:16
- 3 边中启,宋关鸿,张龙兴,等.中国恶性疟原虫MSP1第13—17区基因和MSP2基因的研究.中华传染病杂志1996;14:214
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
- 5 Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. Lancet 1996; 348: 701
- 6 Tanabe K, Mackay M, Goman M, et al. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Mol Biol 1987; 195: 273
- 7 Kaslow DC, Hui G, Kumar S. Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biochem Parasitol 1994; 63: 283

1996年9月30日收稿 1997年1月10日修回

(编辑:任燕芬)



MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF GENES ENCODING REGIONS 16—17 IN MSP1 FROM TWO ISOLATES OF PLASMODIUM FALCIPARUM FROM CHINESE PATIENTS WITH CEREBRAL MALARIA

Bian Zhongqi¹, Guan Weibin¹, Song Guanhong¹,

Wang Gongzhuo², Li Fangyin²

1 Department of Molecular Parasitology, Second Military Medical University, Shanghai 200433

2 Center for Infectious Diseases, PLA 57 Hospital, Kunming 650223

ABSTRACT

AM: To further provide scientific evidence for designing safe and effective vaccines of human cerebral malaria **METHODS:** Genomic DNA samples of two *P. falciparum* isolates prepared directly from 5 cases of cerebral malaria patients' blood in Mengla County, Yunnan Province (CMH/YN) and in Yingjiang County, Yunnan Province (CYJ/YN) were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification and the two pairs of oligonucleotides for the highly conserved genes encoding the regions 12—17 in MAD20 merozoite surface protein 1 (MSP1) of Papua New Guinea strain of *P. falciparum* were used as primers. The PCR products were digested with EcoRI and KpnI, respectively, and the generated fragment regions 16—17 were cloned into M13mp18 and M13mp19 vectors and their DNA were analyzed as the templates for DNA sequencing by the dideoxy chain-termination method. **RESULTS:** Compared with the three other published MAD20, K1 and Wellcome sequences, DNA sequences of regions 16—17 in MSP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria examined contained identical genes which were composed of 918 bp, encoding 306 amino acid, and containing 12 cysteines, which consisted of 2 epidermal growth factor (EGF)—like domains, respectively, and they were highly homologous up to 98.6% with that of MAD20 strain except that it contained an additional single base deletion at positions 4869 nucleotides and 5 point mutations. **CONCLUSION:** The results demonstrate for the first time that both DNA sequence determined from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria belong to the MAD20 allelic dimorphic family, and the deduced amino acids 1691—1701 have been found to be TCTEEDSGSSR epitopes defined by monoclonal antibodies in *P. falciparum*.

Key words: Cerebral malaria patient, *Plasmodium falciparum*, MSP1, molecular cloning, sequence analysis, vaccine

* Project supported by the State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University.