

# 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 区基因和M SP2 基因的分子克隆与鉴定\*

边中启<sup>1</sup> 宋关鸿<sup>1</sup> 管惟滨<sup>1</sup> 严维耀<sup>2</sup> 郑兆鑫<sup>2</sup>

1 第二军医大学寄生虫学教研室 上海 200433  
2 复旦大学遗传工程国家重点实验室 上海 200433

**提要** 目的: 为设计研制安全有效的人脑型疟疫苗提供理论依据。方法: 根据MAD20 株裂殖子表面蛋白 1 (M SP1) 和 FC27 株裂殖子表面蛋白 2 (M SP2) 基因编码区高度保守碱基设计并合成两对引物, 应用多聚酶链反应 (PCR) 技术对 5 例脑型疟患者恶性疟原虫云南省勐腊县勐罕分离株 CMH/YN 和云南省盈江县农场 CYJ/YN 分离株基因组 DNA M SP1 第 13- 17 区基因和 M SP2 基因进行扩增, 并将扩增产物分别经 EcoR I 和 Kpn I, BamH I 和 Hind III 双酶切后, 分子定向克隆 M 13mp18 和 M 13mp19 载体, 转染大肠杆菌 (*E. coli*) TG1, 从含 X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上, 将随机筛选得到的单个无色噬菌斑经 *E. coli* JM 103 扩增, 用碱裂解法抽提重组子复制型 DNA (RF DNA) 后, 再分别经 EcoR I 和 Kpn I, BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定。结果: 证实重组子为编码脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16- 17 区基因和 M SP2 基因分子克隆 M 13 载体。结论: 首次报道确证脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16- 17 区基因和 M SP2 基因分别与 MAD20 株 M SP1 和 FC27 株 M SP2 相应基因完全一致。这些发现对研究预防人脑型疟疫苗和建立一种新型脑型疟恶性疟原虫检测方法具有重要意义。

**关键词** 脑型疟患者 恶性疟原虫 裂殖子表面蛋白 1 裂殖子表面蛋白 2 克隆 疫苗

脑型疟是严重危害人类健康的重要传染病之一, 尤其对热带和亚热带地区危害极大。全世界每年疟疾临床发病人数约 3 亿- 5 亿, 死亡人数约 150 万- 270 万, 其中有 100 万的儿童死于脑型疟<sup>[1]</sup>。因此, 研究开发安全有效的人脑型疟疫苗控制和消灭疟疾已成为各国学者关注的问题。人恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 M SP1 (merozoite surface protein 1, M SP1 又称 P190) 和 M SP2 (merozoite surface protein 2, M SP2 又称 M SA 2) 是恶性疟红内期疫苗重要的候选抗原<sup>[2]</sup>。本文首次报道, 应用 PCR 技术对 5 例脑型疟患者恶性疟原虫云南省勐腊县勐罕分离株 CMH/YN 和云南省盈江县农场分离株 CYJ/YN 基因组 DNA M SP1 第 13- 17 区基因和 M SP2 基因进行扩增, 并将其中 M SP1 第 16- 17 区基因和 M SP2 基因分子克隆与鉴定, 旨在为研制人脑型疟疫苗和建立一种新型脑

型疟恶性疟原虫检测方法提供理论依据。

## 材料和方法

### 材料

1 脑型疟患者恶性疟原虫分离株 5 例脑型疟患者恶性疟原虫分离株 CMH/YN 和 CYJ/YN 分别采自云南省勐腊县勐罕和云南省盈江县农场经现场救治之前的脑型疟患者静脉血各 5 ml, 经 0.1% 肝素抗凝后, 置液氮 (-196 °C) 中空运带回保存备用。5 例患者均为男性, 年龄 18- 49 岁。根据国际诊断脑型疟标准<sup>[3]</sup>: 具有恶性疟临床症状; 存在不能被唤醒的意识障碍; 血液中查到恶性疟原虫; 根据临床和实验室检查确证排除混合感染者确定诊断。2 例正常对照来自现场经临床和实验室检查的健康者。

### 2 引物设计 引物设计及合成按文献<sup>[2]</sup>方

\* 复旦大学遗传工程国家重点实验室基金资助项目

法进行。

3 试剂 DNA 限制性内切酶 DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow 片段) 及 T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 和 Boehringer-Mannheim 公司, PCR 试剂盒购自 Perkin Elmer Cetus 公司, 核酸和蛋白标准分子量 Marker 购自 Boehringer-Mannheim 和 Promega 公司, X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-βD-半乳糖苷) 与 IPTG (异丙基硫代-βD-半乳糖苷)、低熔点琼脂糖凝胶、丙烯酰胺 N, N-亚甲基双丙烯酰胺及硝酸纤维素膜购自 Sigma 公司, 皂素 E. Merck 进口分装购自上海化学试剂厂, DNA 合成试剂为美国 ABI 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯或优级纯试剂。

4 菌株与载体 大肠杆菌转化的受体菌为 *E. coli* TG1 (supE hsd Δ5 thiΔ (lac<sup>+</sup>proAB)F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacQ ZΔM 15]); *E. coli* JM 103 (thi strA supE endA sbcB hsdR4 Δ (lac<sup>+</sup>proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacQ ZΔM 15]); *E. coli* JM 109 (recA 1 endA 1 gyrA 96 thi hsdR 17 supE44 reA 1Δ (lac<sup>+</sup>proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacQ ZΔM 15])<sup>[4]</sup> 与载体 M 13mp18 M 13mp19 噬菌体均系复旦大学遗传工程国家重点实验室保存菌种。

5 培养基 LB 培养基 SOB 培养基和 M 9 培养基的配制均按文献<sup>[4]</sup>方法进行。

### 方法

1 基因组DNA 制备 5 例脑型疟患者血标本按文献<sup>[2]</sup>方法进行, 证实分别为脑型疟患者恶性疟原虫分离株 CMH/YN 和 CYJ/YN。取脑型疟患者血标本含虫血体积 200 μl, 按文献<sup>[2]</sup>方法分别进行 CMH/YN 和 CYJ/YN 基因组DNA 标本制备。

2 PCR 扩增 按文献<sup>[2]</sup>方法进行。

3 PCR 产物酶切鉴定及纯化 按文献<sup>[2]</sup>方法进行。

4 分子克隆与鉴定 按文献<sup>[4]</sup>方法进行。PCR 产物纯化后经 Klenow 片段补齐末端, 分别经 EcoR I 和 Kpn I, BamH I 和 Hind III 双酶切, 回收 0.918 kb 和 0.8 kb DNA 片段后, 与

经相应酶切、低熔点胶回收的 M 13mp18 和 M 13mp19 载体定向连接, 载体与目的基因按 1:5 摩尔比并确定连接反应终体积为 12 μl, 用 T4DNA 连接酶连接, 12 反应 24 h 后, 取含 40 ng 待转化 DNA 连接液转化 *E. coli* TG1, 同时以原始载体 M 13mp18 和 M 13mp19 RFDNA 的转化子作为正常对照, 从含 X-gal 60 μl (20 mg/ml) 和 IPTG 10 μl (200 mg/ml) 的 LB 平板上 37 培养 12 h 筛选重组子。将随机筛选得到的单个无色噬菌斑分别接种于 3 ml LB 培养基中, 加入 50 μl 的 *E. coli* JM 103 过夜菌置于 37 摇床振荡培养 6 h 扩增重组子, 用碱裂解法抽提重组子 RFDNA 后, 分别经 EcoR I 和 Kpn I 及 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 最后获得随机来源并复证后的脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16- 17 区基因和 M SP2 基因转化重组子各 10 个。

## 结 果

### 1 PCR 扩增产物与酶切鉴定

图 1 示脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 13- 17 区基因和 M SP2 目的基因 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析结果。可见, 未经酶切鉴定的 PCR 产物无论 CMH/YN 还是 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 13- 17 区基因之间、M SP2 基因之间均无差异, 各产生 1.7 kb 和 0.8 kb 两条特定基因带, 其大小与目的基因完全一致, 而正常对照无基因扩增带, 这些结果证实我们所设计的引物是合理的, 依此进行 PCR 反应具有很高的特异性。脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 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, 完全符合目的基因特征, 确证 PCR 产物为 M SP1 目的基因; 脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分

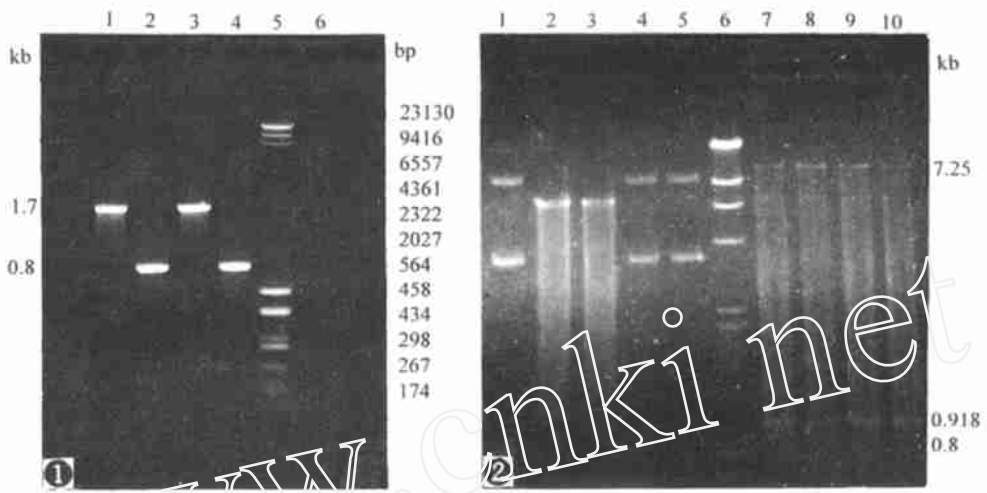


图 1 PCR 扩增产物

1: 脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN 分离株M SP1 第 13- 17 区基因 PCR 产物的电泳分析; 2: 脑型疟患者恶性疟原虫CMH/YN 分离株M SP2 基因 PCR 产物的电泳分析; 3: 脑型疟患者恶性疟原虫CYJ/YN 分离株M SP1 第 13- 17 区基因 PCR 产物的电泳分析; 4: 脑型疟患者恶性疟原虫CYJ/YN 分离株M SP2 基因 PCR 产物的电泳分析; 5:  $\lambda$  DNA/HindIII+ pUC19/HaeIII标准分子量23 130 bp- 174 bp; 6: 正常人对照

Fig 1 PCR amplified products

Lane 1: Electrophoretic analysis of PCR-amplified DNA of genes encoding the regions 13- 17 in M SP1 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria, showing a band of 1.7 kb; Lane 2: Electrophoretic analysis of PCR-amplified DNA of genes encoding M SP2 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria, showing a band of 0.8 kb; Lane 3: Electrophoretic analysis of PCR-amplified DNA of genes encoding the regions 13- 17 in M SP1 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria, showing a band of 1.7 kb; Lane 4: Electrophoretic analysis of PCR-amplified DNA of genes encoding M SP2 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria, showing a band of 0.8 kb; Lane 5: Molecular weight markers ( $\lambda$  DNA/HindIII+ pUC19/HaeIII) ranging from 174 bp to 23 130 bp; Lane 6: Uninfected human blood was used as normal control

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 区基因和M 13+ M SP2 基因重组子酶切鉴定

1: M 13mp18 噬菌体; 2: M 13mp18 经 EcoRI+ KpnI 双酶切; 3: M 13mp18 经 BamHI+ HindIII 双酶切; 4: 重组子M 13mp18+ M SP1 第 16- 17 区基因未酶切; 5: 重组子M 13mp18+ M SP2 基因未酶切; 6:  $\lambda$  DNA/HindIII+ pUC19/HaeIII标准分子量 (同图 1); 7: 重组子M 13mp18+ CMH/YN M SP1 第 16- 17 区基因经 EcoRI+ KpnI 双酶切鉴定; 8: 重组子M 13mp18+ CMH/YN M SP2 基因经 BamHI+ HindIII 双酶切鉴定; 9: 重组子M 13mp18+ CYJ/YN M SP1 第 16- 17 区基因经 EcoRI+ KpnI 双酶切鉴定; 10: 重组子M 13mp18+ CYJ/YN M SP2 基因经 BamHI+ HindIII 双酶切鉴定

Fig 2 Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consisting of M 13 vectors with an insert of genes encoding M SP2 and the regions 16- 17 in M SP1 from both 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 EcoRI and KpnI; Lane 3: M 13mp18 digested by BamHI and HindIII; Lane 4: M 13 recombinant DNA consisting of M 13mp18 with an insert of the regions 16- 17 in M SP1 undigested; Lane 5: M 13 recombinant DNA consisting of M 13mp18 with an insert of genes M SP2 undigested; Lane 6: DNA standard marker ( $\lambda$  DNA/HindIII + pUC19/HaeIII) ranging from 174 bp to 23 130 bp; Lane 7: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp18 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 EcoRI and KpnI; Lane 8: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp18 with an insert of genes encoding M SP2 from isolate CMH/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by BamHI and HindIII; Lane 9: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp18 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 EcoRI and KpnI; Lane 10: Restriction analysis of M 13 recombinant DNA consists of M 13mp18 with an insert of genes encoding M SP2 from isolate CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria digested by BamHI and HindIII

离株M SP2 基因 PCR 产物经含单一酶切位点 XbaI 酶切鉴定, 在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 结果显示, 各产生 0.62 kb 和 0.18 kb 两条基因带, 确证 PCR 产物为 M SP2 目的基因。

## 2 分子克隆与鉴定

分别用 EcoRI 和 KpnI, BamHI 和 HindIII 对复证后的转化重组子进行双酶切鉴定, 凡带有编码 M SP1 第 16-17 区基因的重组子可以切出 0.918 kb 和 7.25 kb 2 个片段, 而带有编码 M SP2 基因的重组子可以切出 0.8 kb 和 7.25 kb 2 个片段, 各片段大小均完全符合外源基因正确插入特征。以上酶切鉴定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 分离株目的基因的分子克隆 (图 2)。

## 讨 论

当前, M SP1 和 M SP2 作为恶性疟红内期疫苗重要的候选抗原正成为人类疟疾疫苗研究的热点之一。我们以往的研究<sup>[2]</sup>与国外学者的研究<sup>[5-10]</sup>均证实 M SP1 和 M SP2 广泛存在于自然界不同地理株恶性疟原虫内, 并发现其在不同的国家或同一国家不同地域存在抗原变异。因此, 更大范围地进行 M SP1 和 M SP2 序列分析, 以研制安全有效的脑型疟疫苗显得迫切需要。但迄今为止, 对脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株基因的研究, 国内外尚未见报道。本文在以往的研究<sup>[2]</sup>基础上, 首次报道应用 PCR 技术对编码脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 13-17 区基因和 M SP2 基因进行扩增, 并确证其中 M SP1 第 16-17 区基因和 M SP2 基因分子克隆 M 13 载体。

自 1987 年 Tanabe 等<sup>[5]</sup>克隆和测定了 MAD20 株 M SP1 基因全部序列以来, 人们对 M SP1 有了较清楚的了解<sup>[2, 6, 8-10]</sup>, 恶性疟原虫 M SP1 分子为单拷贝基因定位第 9 号染

色体<sup>[11]</sup>, 未发现内含子, 分子量约 195 kDa, 一级结构分 17 个区, 其中 1, 3, 5, 12 和 17 区呈高度保守。我们已证明<sup>[2]</sup> FCC1/HN 株 M SP1 第 2 区基因含有重复序列, 并发现 FCC1/HN 株 M SP1 分子属 MAD20 株。M SP2 分子亦为单拷贝基因定位第 2 号染色体<sup>[11]</sup>, 一级结构分 5 个区<sup>[2, 7, 8, 10]</sup>, 中央区含有重复序列。M SP1 和 M SP2 分子 C 端各分别与葡萄糖磷脂酰肌醇 (GPI) 结合。Gerold 等<sup>[12]</sup>报道, M SP1 和 M SP2 通过 GPI 连结固着于恶性疟原虫体表面, 并证实 GPI 是一种含核心聚糖的新型糖脂毒素, 能介导巨噬细胞产生肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 1 (L-1), 同时 GPI 又能促使成熟受染红细胞 (parasitized erythrocyte, PE) 表达恶性疟原虫红细胞膜蛋白 1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1, PfEMP1) 粘附血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 上表面蛋白 CD36、血小板反应蛋白 (thrombospondin, TSP) 和细胞间粘附分子 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM1) 等, 参与人类脑型疟的发病。值得注意的是, 体外试验研究业已证实<sup>[10, 13]</sup>, 抗 M SP1 分子 C 端 19 kDa 片段的单克隆抗体和免疫血清以及抗 FC27 株 M SP2 分子中 STNS 和 DTPTATE 表位的单克隆抗体 8G10/48 和 8F6/49, 均可阻断裂殖子入侵红细胞, 抑制人恶性疟原虫生长<sup>[14]</sup>。本文首次成功地将编码脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 和 M SP2 的目的基因进行分子克隆与鉴定, 并证实其目的基因分别与 MAD20 株 M SP1 和 FC27 株 M SP2 相应基因完全一致, 这些研究结果对研制人脑型疟疫苗, 阐明脑型疟的发病机制及建立一种新型脑型疟恶性疟原虫检测方法具有重要意义。最近, 我们用 Sanger 双脱氧链终止法进行 DNA 测序分析, 结果 (待发表) 进一步确证脑型疟患者恶性疟原虫 CMH/YN 和 CYJ/YN 分离株 M SP1 第 16-17 区基因之间一级结构完全

相同,均由 918 个核苷酸组成,编码 306 个氨基酸属 MAD20 株,含有 12 个半胱氨酸组成的两个表皮生长因子(EGF)单体区,每个 EGF 区内有 6 个半胱氨酸构成 3 个二硫键,并且发现脑型疟患者恶性疟原虫分离株 MSP1 第 16-17 区富含半胱氨酸,表明其可能对维持 MSP1 的空间结构完整性和对诱导脑型疟保护性免疫反应具有重要作用。

本文承解放军 57 医院传染病中心王功焯主任医师

唐国伟医师相助采集标本,谨此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Mabeza GF, Moyo VM, Thuma PE, et al Predictors of severity of illness on presentation in children with cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89(3) 221
- 2 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
- 3 Woodruff AW, Wright SG A synopsis of infectious and tropical diseases Bristol BSI QX Publishing, England 1987 227
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning A laboratory Manual, 2nd ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989
- 5 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
- 6 Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, et al Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59 1

- 7 Thomas AW, Carr DA, Carter JM, et al Sequence comparison of allelic forms of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP2. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43 211
  - 8 Reeder JC, Marshall VM. A simple method for typing *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigens 1 and 2 (MSP1 and MSP2) using a dimorphic-form specific polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 63 329
  - 9 Kimura E, Mattei D, Manani S, et al Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene* 1990; 91 57
  - 10 Holder AA. Proteins on the surface of the malaria parasite and cell invasion. *Parasitology* 1994; 108 S5
  - 11 Babiker HA, Charwood JD, Smith T, et al Gene flow and cross mating in *Plasmodium falciparum* in households in a Tanzanian village. *Parasitology*, 1995; 111 433
  - 12 Gerold P, Schofield L, Blackman MJ, et al Structural analysis of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 75 131
  - 13 Burghaus PA, Holder AA. Expression of the 19-kilodalton carboxy-terminal fragment of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in *Escherichia coli* as a correctly folded protein. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64 165
  - 14 Fenton B, Clark JT, Khan CMA, et al Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSP-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 1991; 11 963
- 1996 年 6 月 25 日收稿 1996 年 11 月 14 日修回  
(编辑: 富秀兰)

## MOLECULAR CLONING AND IDENTIFICATION OF GENES ENCODING MSP2 AND REGIONS 16-17 IN MSP1 FROM TWO ISOLATES OF PLASMODIUM FALCIPARUM FROM CHINESE PATIENTS WITH CEREBRAL MALARIA\*

Bian Zhongqi<sup>1</sup>, Song Guanhong<sup>1</sup>, Guan Weibin<sup>1</sup>, Yan Weiyao<sup>2</sup>, Zheng Zhaoxin<sup>2</sup>

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

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433

### ABSTRACT

**AM:** To provide a theoretical basis for designing safe and effective vaccines of human cerebral malaria. **METHODS:** Genomic DNA samples of two *P. falciparum* isolates were 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). The samples were used for polymerase chain reaction (PCR) amplification and the two pairs of oligonucleotides for the highly conserved genes encoding of FC27 merozoite surface protein 2 (MSP2) and 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, BamHI and HindIII, respectively, and the generated fragments were cloned into M13mp18 and M13mp19 vectors and transfected into *Escherichia coli* (*E. coli*) TG1. A single colorless plaque on the LB agar plate containing X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) and IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) was randomly picked and transformed into *E. coli* JM103. The replicative form (RF) DNA (RFDNA) of M13 recombinant DNA extracted from *E. coli* by the method of alkali lysis were digested with EcoRI and KpnI, BamHI and HindIII, respectively, and the generated fragments were identical with inserted foreign DNA 0.918 kb and 0.8 kb designed by ourselves. **RESULTS:** It is proved that M13 recombinant DNA consists of M13 vectors with an insert of genes encoding MSP2 and the regions 16- 17 in MSP1 from two isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria at its corresponding site. **CONCLUSION:** The results demonstrate for the first time that both isolates CMH/YN and CYJ/YN of *P. falciparum* from Chinese patients with cerebral malaria examined contain genes identical to those defined in known MAD20MSP1 and FC27MSP2 allelic dimorphic family. These findings provide valuable strategies both for the development of vaccines to prevent human cerebral malaria and for the establishment of a specific detection method of *P. falciparum* from patients with cerebral malaria.

**Key words:** Cerebral malaria patient, *Plasmodium falciparum*, MSP1, MSP2, clone, vaccine

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