

# 湖北省间日疟原虫分离株 环孢子蛋白部分序列分析

严继舟<sup>1</sup> 胡乐群<sup>1</sup> 张绍清<sup>1</sup> 徐博钊<sup>1</sup> David C Warhurst<sup>2</sup>

1 湖北省医学科学院寄生虫病研究所 武汉 430070

2 London School of Hygiene and Tropical Medicine

**摘要** 目的: 为了确定湖北省间日疟原虫株环孢子蛋白(CSP)的分型和探讨CSP多态性的生物学特征。方法: 采用常规的克隆和Sanger链终止法, 首次对湖北省间日疟原虫的环孢子蛋白(CSP)基因测序。结果: HB2株CSP基因的N-C-端非重复区包括重复区后可变区核苷酸序列与北朝鲜(NK)株和中国株(CH2-CH7)相同, 而中央前后重复区则有较大变异。在HB2CSP中央前后重复区, 有8种变异型。与其它已发表的间日疟原虫CSP核苷酸序列相比, 重复体GN GAG-GQP/AA和重复后可变区有明显的地理学特征。此外同一份HB2CSP基因PCR产物克隆后获得含两个大小不等插入片段的阳性克隆, 分别为0.75 kb和1.1 kb, 两者非重复区的核苷酸序列相同, 在中央前后重复区除了重复数次不同外, 仅有3处隐性核苷酸变异和1处显性核苷酸变异。结论: CSP基因变异, 尤其是重复区的变异不仅与DNA聚合酶的自身作用有关, 而且还可能牵涉到间日疟原虫潜伏期的改变。

**关键词:** 间日疟原虫 环孢子蛋白 测序 多态性 自身作用

间日疟原虫广泛地存在于各种环境中, 为我国及世界其它许多疟区优势疟原虫种。在湖北省, 自1965年后仅有间日疟流行, 偶尔有自外地输入恶性疟原虫感染。从疫情报告看, 许多地方的疟疾疫情存在着一种周期性流行的趋势, 这除了人员频繁流动导致疟疾增多外, 残存的间日疟病人复发也是一个重要原因。由于传统的化学药物预防和蚊媒防治容易产生抗性, 于是人们的注意力开始转向疟疾疫苗。遗憾的是间日疟原虫疫苗的研究因其候选疫苗抗原环孢子蛋白存在广泛变异而受阻。根据CSP基因的变异情况, 目前将间日疟原虫分为两型, PVCS I型和PVCS II型<sup>[1]</sup>最近, Qari等<sup>[2]</sup>在人体内又发现类间日疟原虫(*Plasmodium vivax-like human malaria parasite*), 从而使间日疟原虫的研究更趋复杂化。我们就湖北省疟疾流行区的间日疟原虫的核苷酸及其氨基酸序列进行分析探讨间日疟原虫在中国的分布的生物学特征。

## 材料和方法

实验血样从湖北省应城市间日疟原虫血检阳性病人采集, 去白细胞后, 按常规方法<sup>[3]</sup>苯酚-氯仿-异戊醇混合液(Sigma)提取疟原虫DNA。所提DNA用引物PV5 (GTCGGAA TTCAA TAA GCTGAAACAACC) 和PV6 (CAGCGGATCCACAGTTACTGCA T)<sup>[4]</sup>作聚合酶链反应(PCR)扩增。将反应混合液94先变性2.5 min, 接着扩增30个周期(93 1 min, 37 90s, 72 2 min), 最后72 延伸8 min。取10 μl PCR产物, 以Southern blotting法转移到尼龙膜(Hybrid™出品), 经紫外线固定后, 与<sup>32</sup>P末端标记的探针AL116, AL114, AL240进行杂交以鉴定其属于PVCS I型, PVCS II型或类间日疟原虫<sup>[5]</sup>。杂交后作严格漂洗。漂洗液为4XSSC, 0.1%十二烷基磺酸钠(SDS)。漂洗后, 于-70 放射自显影1 h。纯化后的阳性CSP片段按厂家要求克隆到pGEM-T载体中(Promega)。挑选阳性克隆, 进行Sanger链终止法测序(Sequenase, USBio-



区完全相同。在中央重复区则有较大变异,最明显的特点是NK, HB2 和 CH2-3 株含有多个 GN GA GGQ P/AA 重复体,而 CH4-7 仅在中央重复区末端有重复体 GN GA GGQ P/AA, 这又有别于在泰国发现的VK210 株,后者缺少完整的中央重复区后可变区。

## 讨 论

通过对湖北省间日疟原虫的核苷酸序列分析,本文为CSP 基因多态性分布增添了资料,也有助于了解人群对子孢子期的免疫差异和间日疟原虫的进化历程。首先,它证实湖北省间日疟原虫HB2 株与其它已鉴定的中国虫株一样属于PVCS I型。根据现已鉴定的CSP 基因中央重复区和中央重复区后可变区氨基酸序列变异的特点。我们建议将间日疟原虫PVCS I型分成3组:第1组的特点是重复区后有完整的可变区,它含有16个氨基酸序列(GGNAANKKAEDAGGNA),中央重复区有多个GN GA GGQ P/AA 重复体。NK, HB2 和CH2, 3 株就属于这一组;第2组的特征是重复区后可变区有完整的16个氨基酸,或/和重复区末端有一个GN GA GGQ P/AA 重复体,如:Belem, CH4—7; 菲律宾虫株PH46—84; 部分巴西株,B19/3, 8, 5; 泰国株,如VK210, NYU -Thai 等;第3组无上述特征,如部分巴西株, B7, B13; 巴布新几尼亚(PGN)株, Sa1-1, Chesson 等株。结合地理分布,不难看出间日疟原虫在热带,亚热带的进化历程。如果Sergiev 和Tiburskaya 的观点<sup>[9]</sup>正确,即间日疟原虫起源于东南亚森林地带,随着种群向北迁移,潜伏期延长。那么我们可以推测上述第1组间日疟原虫,属于长潜伏期型,这型可能还包括长潜伏期株(*P. vivax hibernas*)和伊丽莎白株(*P. vivax elizabeth*)等;第3组为短潜伏期型;第2组则介于两者之间。由此可见,CSP 的变异,尤其是重复区和重复区后可变区变异可能与间日疟潜伏期长短有关。

鉴于HB2 株的CSP 氨基酸序列特征与

NK 及部分中国株相似,表明在中国流行的间日疟原虫,至少是贵州以北的中国虫株与NK 株起源相同,属于长潜伏期型间日疟原虫。也就是说,如果人体感染这种长潜伏期疟原虫,即在流行季节或/和非流行季节均可发病,这可能是湖北省间日疟高发和一年四季均可发病的原因之一。

其次,我们发现间日疟原虫HB2 株CS的核苷酸及其编码氨基酸的变异主要集中在重复区,而非重复区相对稳定。Qari 等<sup>[1]</sup>发现间日疟原虫CSP 的变异既发生在重复区,又发生在非重复区。Mann 等<sup>[7]</sup>怀疑Qari 等的结果可能与DNA 聚合酶的自身作用有关。我们的实验发现克隆B6 和C6 的CSP 基因的差异不能排除克隆时DNA 聚合酶的自身作用,尽管这种作用是有限的。如果我们把HB2, B6 和C6 克隆间的核苷酸序列差异理解为同一株间日疟原虫同时存在两种变异型,就象Qari 等<sup>[1]</sup>在PGN 株发现的那样:同一份血样同时含有PVCS I 和PVCS II 型间日疟原虫核苷酸序列,那么我们有理由相信Lysenko 等<sup>[10]</sup>关于间日疟原虫复发的假说,即:复发是由于同时感染了迟发型和速发型子孢子引起。最近,刘多等在间日疟原虫红外期体外培养物中找到了间日疟原虫红外期裂殖体和休眠体<sup>[11]</sup>,这将有助于间日疟复发的深入研究。

总之,间日疟原虫CSP 的变异性报道了许多,但究其原因却颇有争论。我们认为间日疟原虫CSP 基因的确存在广泛变异,尽管随着蚊媒的介导作用,基因杂交和重组等都会诱导出更多的变异,促使间日疟原虫不断进化,但也不能忽略目前所显示的核苷酸序列,在很大程度上掺杂有DNA 聚合酶的自身作用。同许多报道的一样,本次实验B6 和C6 克隆间核苷酸在重复区域的差异不仅证实了自然变异和克隆时的DNA 聚合酶自身作用的存在,同时也说明重复区变异较大,而且对环境改变和DNA 聚合酶的自身作用

## 更敏感

致谢 严继舟曾获得 British Council 的部分资助, 并承蒙 Dr Roger Webber 和徐博钊教授的举荐。对 Dr David C Warhurst 实验室所提供的技术性帮助及 Mr Bruce Wedgwood-Oppenheim 赠送 PVC S II 型和 *P. vivax*-like human malaria parasite PCR 阳性对照物, 谨此一并忱谢。

## 参 考 文 献

- 1 Qari SH, Goldman IF, Pova MM, et al Polymorphism in the circum sporozoite protein of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 55 105
- 2 Qari SH, Shi YP, Pova MM, et al Global occurrence of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite *J Infect Dis* 1993; 168 1485
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning - A laboratory manual* Second edit Cold Spring Harbour Laboratory. 1989; 9 14- 9 23
- 4 Kain KC, Wirtz RA, Fernandez I, et al Serological and genetical characterization of *Plasmodium vivax* from whole blood- impregnated filter paper disc *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46 473
- 5 Qari SH, Shi YP, Goldman IF, et al Identification of *Plasmodium vivax*-like human malaria parasite *lancet* 1993; 341 780
- 6 Arnott DE, Barnwell JW, Stewart MJ. Does biased gene conversion influence polymorphism in the circum-sporozoite protein- encoding gene of *Plasmodium vivax* *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85 8102
- 7 Mann VH, Huang T, Cheng Q, et al Sequence variation in the circum sporozoite protein gene of *Plasmodium vivax* appears to be regionally biased *Mol Biochem Parasitol* 1994; 68 45
- 8 黄天谊, 程 勤, Alan Saul, 等 不同地区间日疟原虫孢子蛋白基因两侧翼 DNA 序列的比较 *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1994; 12 85
- 9 Wernsdorfer WH, Sir McGregor I *Malaria-Principles and Practice of Malariology*. Churchill Livingstone 1988; 69
- 10 Lysenko AY, Beljaev AE, Rybalka VM. Population studies of *Plasmodium vivax*. I the theory of polymorphism of sporozoites and epidemiological phenomenon of tertian malaria *Bull WHO* 1977; 55 541.
- 11 刘 多, 罗树宏, 叶炳辉, 等 Demonstration of in vitro-cultured exoerythrocytic schizonts and hypnozoites of *Plasmodium vivax* (Southern China isolate) by an immunoperoxidase antibody technique *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1995; 13 86

1995 年 5 月 19 日收稿 1996 年 10 月 21 日修回

(编辑: 李雅卿)

## ANALYSIS OF PARTIAL SEQUENCE OF CIRCUM SPOROZOITE PROTEIN OF PLASMODIUM VIVAX ISOLATES IN HUBEI PROVINCE

Yan Jizhou<sup>1</sup> Hu Lequn<sup>1</sup> Zhang Shaoqing<sup>1</sup> Xu Bozhao<sup>1</sup> David C Warhurst<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Parasitic Diseases, Hubei Academy of Medical Sciences, Wuhan 430070

<sup>2</sup> London School of Hygiene and Tropical Medicine

### ABSTRACT

**AM:** To identify circum sporozoite protein (CSP) genes of *Plasmodium vivax* in Hubei endemic areas and explore the biological features of CSP polymorphism. **METHODS:** Circum sporozoite protein (CSP) gene of *P. vivax* in Hubei was firstly sequenced by using routine cloning and Sanger Chain Terminal method. **RESULTS:** The N- and C-terminus sequences flanking the central tandem repeat, including post-repeat variable region of CSP gene of HB2 isolate were identical to those of North Korean (NK) isolate and Southern China isolates (CH2-7), while the central tandem repeat region existed extensive polymorphism. Compared with the other CSP gene sequences published so far, the repeat form GN-GAGGQP/AA and the post-repeat variable region had obvious geographical characteristics. Incidentally, one CSP gene PCR product of HB2 isolate produced two clones containing 0.75 kb and 1.1 kb DNA fragment, respectively. Their nucleotide sequences were almost the same except for three silent changes and one nonsilent change and the difference in the repeat number as well. **CONCLUSION:** The variation of CSP gene sequence, especially in the repeat and the post-repeat variable region, possibly involve the changes of latent period of *P. vivax*.

**Key words:** *Plasmodium vivax*, circum sporozoite protein, sequence, polymorphism, artefact