文章编号:1000-5404(2006)08-0757-03

论著

约氏疟原虫卵囊与唾液腺子孢子不同时相点的CSP与MAEBL基因表达研究

陈继德,张锡林,段建华,宋 蓓 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 为研究约氏疟原虫在蚊体内发育过程中,卵囊子孢子与唾液腺子孢子不同时相点的环子孢子蛋白(circumsporozoite protein, CSP)与红细胞结合蛋白(erythrocyte binding protein, MAEBL)基因表达水平的变化。**方法** 分别在约氏疟原虫感染斯氏按蚊后5、7、10 d取蚊腹部、12、15、18 d取蚊头胸部分离疟原虫总RNA,以rRNA 28S为对照,通过RT-PCR法半定量分析CSP与MAEBL mRNA表达量。**结果** 蚊期疟原虫子孢子CSP与MAEBL转录显著上调($P<0.01$),在侵入唾液腺后达到峰值。**结论** 疟原虫唾液腺子孢子CSP和MAEBL mRNA高水平表达,提示CSP和MAEBL可能与侵入脊椎动物宿主密切相关。

关键词:CSP;MAEBL;约氏疟原虫;斯氏按蚊
中图法分类号:R382.31;R384.1;R394-33 **文献标识码**:A

Gene expression of circumsporozoite protein and erythrocyte binding protein of *Plasmodium yoelii* in the sporozoites from oocyst and salivary gland at different phases

CHEN Ji-de, ZHANG Xi-lin, DUAN Jian-hua, SONG Bei (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the gene expression change of circumsporozoite protein (CSP) and erythrocyte binding protein (MAEBL) in the *Plasmodium yoelii* sporozoites from oocyst and salivary gland at different phases during *Plasmodium yoelii* development in mosquitos. Methods The total RNA of plasmodium was extracted from the abdomen on day 5, 7, 10 and the thoraces on day 12, 15, 18 after *Anopheles stephensi* was infected by *Plasmodium yoelii*, then the expression of CSP and MAEBL mRNA was analyzed by semiquantitative RT-PCR with rRNA 28S as control. Results The transcription of CSP and MAEBL of plasmodium sporozoite were obviously up-regulated during the mosquito stage ($P<0.01$) and reached the peak after invading the salivary gland. Conclusion The high expression level of plasmodium sporozoite CSP and MAEBL in salivary gland suggests CSP and MAEBL may play a role in plasmodium invading the vertebrate host.

Key words: circumsporozoite protein; erythrocyte binding protein; *Plasmodium yoelii*; *Anopheles stephensi*

疟疾是当今世界上严重危害人类健康的寄生虫病之一,在每年新增3亿~5亿病例中,有100万~300万人死亡,其中大多数是5岁以下的非洲儿童[1]。疟原虫在按蚊体内的发育过程是疟疾传播的关键环节,疟原虫与蚊的相互作用对疟疾成功传播有着重要的影响,但目前对这些了解的很少。按蚊对疟原虫的作用可以通过疟原虫基因表达的研究进行分析。由于蚊期内疟原虫取材困难,常得不到足够量的疟原虫DNA或mRNA来进行研究。为了克服这个局限,我们在约氏疟原虫-斯氏按蚊模型的基础上,建立RT-PCR方法对疟原虫的基因进行定性和半定量分析。本研究通过对蚊体内约氏疟原虫卵囊与唾液腺子孢子不同时相点的环子孢子蛋白(circumsporozoite protein, CSP)与红细胞结合蛋白(erythrocyte binding protein, MAEBL)基因表达进行检测,探讨CSP、MAEBL与蚊体内疟原虫成熟子孢子侵入脊椎动物宿主的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 约氏疟原虫、蚊媒和动物 约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)BY265株:每周用昆明株小鼠血传1次,每5周蚊传1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371261,30271163)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371261, 30271163)
作者简介:陈继德(1977-),男,湖南省衡山县人,硕士研究生,技师,主要从事疟原虫侵入分子相关方面的研究。电话:(023)68752243, E-mail: chensummer@126.com
通讯作者:张锡林,电话:(023)68752243
收稿日期:2005-04-21;修回日期:2005-12-21

次。斯氏按蚊(*Anopheles Stephens*)Hor 株:由本实验室在(24 ± 0.5)℃、相对湿度(70 ± 5)% 的养蚊室饲养,供实验使用。昆明株小鼠由本校实验动物中心提供,体质量 16 ~ 20 g,雌雄不限。

1.1.2 主要试剂和仪器 Tripure Isolation Reagent 购自 Roche 公司;M-MLV 逆转录酶和 RNase 抑制剂购自上海 Promega 公司;Oligo (dT)15、10 × Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP、DNA Marker 购自大连 Takara 公司。DYY-Ⅲ电泳仪购自北京六一仪器厂;GEL DOC EQ 型凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司;PTC-100 型 PCR 扩增仪购自德国 MJ Research 公司;5415R 型台式高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;DK-8D 型电热恒温水槽购自上海精宏实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 疟原虫感染率与感染度计算 斯氏按蚊吸约氏疟原虫感染小鼠血后,第 5 天检查蚊胃的早期卵囊,确定疟原虫感染蚊的感染率(感染蚊的数量/检查蚊的总量 × 100%)、感染度(蚊胃的疟原虫卵囊数量/有卵囊蚊的总量)。以检测感染率为 ≥70%、感染度在 30 个卵囊以上的斯氏按蚊确定为实验组,供实验使用。

1.2.2 标本采集及处理 雌性斯氏按蚊(4 ~ 5 d 龄)吸血感染后 5、7、10 d 切取感染蚊的腹部,收集卵囊子孢子;12、15、18 d切取感染蚊的胸部,收集唾液腺子孢子。每一时间点取 3 组标本,每组各为 50 只,分别置于匀浆试管中同时进行总 RNA 提取。

1.2.3 总 RNA 提取与 RT-PCR 取感染蚊组织置于匀浆试管中,以 Tripure 液提取组织总 RNA,氯仿-酚法分离 RNA。将提取的总 RNA 与 Oligo (dT)15 1 μl 于恒温水槽 70 ℃变性 10 min,冰上冷却至 0 ℃,分别加入 5 × Buffer 4 μl、10 mmol/L dNTP 1 μl、40 U/ μl RNase 抑制剂 0.5 μl、M-MLV 逆转录酶 1 μl,最后用灭 RNA 酶 ddH_2O 补足体积至 20 μl。反应条件为:恒温水槽 42 ℃ 2 h,PCR 仪内 95 ℃灭活逆转录酶 5 min。

1.2.4 PCR 引物与扩增程序 引物序列、片段长度以及反应条件见表 1。引物均由上海生工生物工程公司合成,使用浓度均为 20 μmol/L。PCR 反应体系为:cDNA 模板(20 倍稀释)1 μl,10 × Buffer 2.5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1 μl,2.5 mmol/L dNTP 2 μl,5 U/ μl *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl,上游和下游引物各为0.5 μl,加 ddH_2O 至 25 μl。PCR 反应均为 35 个循环周期。

表 1 PCR 引物序列与扩增程序

扩增基因	引物序列	片段长度	PCR 扩增程序
CSP	上游 5'-AACAGATTACTTGGCGATGCT-3' 下游 5'-AATTTTCTGGTTGCTTGTTTAC-3'	892 bp	94 ℃/300 s;94 ℃/30 s,50 ℃/30 s,72 ℃/90 s;72 ℃/300 s
rRNA 28S	上游 5'-AGGATGTATTCGCTTTATTTAATGC-3' 下游 5'-TCTTGTCCAAACAATTCATCATATC-3'	388 bp	94 ℃/180 s;94 ℃/30 s,60 ℃/40 s,70 ℃/30 s;70 ℃, 300 s
MAEBL	上游 5'-ATGCTGCTCAATATCAGATTATTGC-3' 下游 5'-AACAATTTCATCAAAAGCAACTTCC-3'	265 bp	94 ℃/300 s;94 ℃/30 s,45 ℃/30 s,72 ℃/90 s;72 ℃/300 s

1.2.5 凝胶成像扫描与图像分析 取 PCR 产物 10 μl,将 rRNA 28S PCR 产物与 CSP、MAEBL 加于同一泳道。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色后,紫外透射反射仪下观察结果,并在凝胶成像系统中扫描并摄影。以 DNA Marker 为标准,在片段相应位置出现条带为表达阳性。通过 Quantity one 软件计算每一泳道中 CSP、MAEBL 和 rRNA 28S PCR 产物条带的光密度值。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行 OD 值的方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 约氏疟原虫感染率与感染度

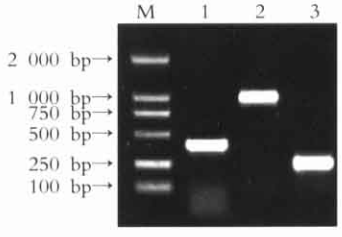
本实验中斯氏按蚊的疟原虫感染度与感染率 P 值均大于 0.05,表明各笼斯氏按蚊的约氏疟原虫感染度与感染率的差异无显著性(表 2)。

表 2 各实验笼斯氏按蚊的疟原虫感染率、感染度

	第 1 笼	第 2 笼	第 3 笼	第 4 笼	P 值
感染率	0.82 ± 0.04	0.76 ± 0.08	0.70 ± 0.06	0.76 ± 0.06	0.147
感染度	28.67 ± 13.50	34.00 ± 10.58	37.33 ± 12.09	42.75 ± 27.93	0.249

2.2 RT-PCR 结果

cDNA 扩增 CSP、MAEBL、rRNA 28S 电泳结果见图 1 。以 DNA Marker 为标准,扩增片段大小与预期目的片段位置相符。

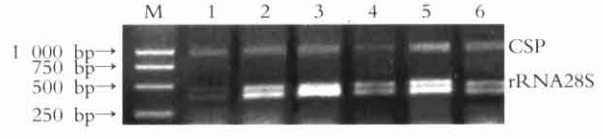


M:标准;1:rRNA 28 s;2:CSP;3:MAEBL

图 1 RT-PCR 扩增产物的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳图

2.3 RT-PCR 半定量分析结果

通过计算 CSP 与 rRNA 28S、MAEBL 与 rRNA 28S 条带的光密度的相对比值,比较不同时期 CSP 和 MAEBL 的相对值,从而半定量分析不同时期 mRNA 表达的高低(图 2、3)。



M:标准;1:第 5 天;2:第 7 天;3:第 10 天;4:第 12 天;5:第 15 天;6:第 18 天

图 2 不同时期疟原虫子孢子 CSP、MAEBL 基因的 mRNA 表达

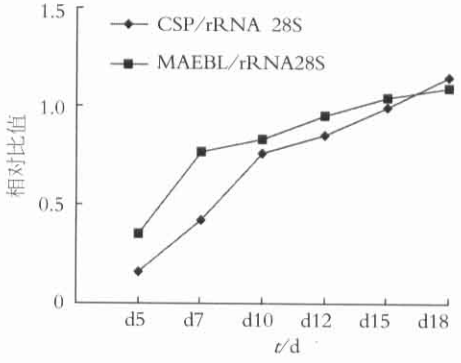


图 3　不同时期疟原虫子孢子 CSP、MAEBL mRNA 表达的半定量结果

3　讨论

通过 RT-PCR 方法，利用特异性引物分析了蚊体内约氏疟原虫卵囊与唾液腺不同时相点子孢子 CSP 与 MAEBL 基因表达水平的变化。本实验显示，在约氏疟原虫发育过程中，子孢子 CSP 与 MAEBL mRNA 表达显著性增高（$P<0.01$），并在成熟唾液腺子孢子中达到峰值（图 3），说明它们可能与疟疾的传播和肝细胞侵入密切相关。

CSP 覆盖于子孢子表面，是子孢子表面最丰富的抗原，在子孢子合成的总蛋白中约占 15%。CSP 也存在于微线体中。在早期卵囊期 CSP 基因开始转录，并在唾液腺子孢子期达到高峰（图 3），但该蛋白最早仅在中-晚期卵囊中检测到。子孢子结合蚊唾液腺和哺乳动物肝脏硫酸乙酰肝素蛋白多糖是由特异的 CSP 介导的。CSP 也与子孢子移行滑动相关。敲除 CSP 基因疟原虫在哺乳动物宿主中生长正常，但在蚊内早期卵囊发育停滞。CSP 参与子孢子细胞骨架的形成而与卵囊中子孢子形态发育相关。内膜和卵囊外膜下相关微管的发育是与子孢子合成 CSP 的量直接相关[2]。在红内期也能检测到疟原虫 CSP 基因转录，但它的表达水平比卵囊子孢子低得多[3]。不同时期卵囊的 CSP 比较，第 10 天卵囊子孢子 CSP mRNA 表达比第 5 天显著性增高（$P<0.05$），可能与成熟卵囊子孢子的释放以及迁移到唾液腺中密切相关。

红细胞结合蛋白家族在疟原虫结合至红细胞表面时起重要作用，而 MAEBL 是红细胞结合蛋白家族中一个特殊的成员，在红内期裂殖子与子孢子中均能检测到它的表达。MAEBL 蛋白首先是在约氏疟原虫和伯氏疟原虫红内期发现，位于裂殖子的棒状体中。MAEBL 能与红细胞结合说明它在裂殖子侵入红细胞中有很重要的作用。Kariu 等[4]发现 MAEBL 蛋白也存在于伯氏疟原虫子孢子，位于子孢子微线体中。Srinivasan 等[5]构建了卵囊子孢子差异 cDNA 文库，在富含伯氏疟原虫卵囊子孢子的表达基因中获得相应的 MAEBL 蛋白的 EST。与本实验相一致的是，蚊体内疟原虫子孢子发育过程中，MAEBL 基因表达类似于 CSP，在早期卵囊基因开始转录，在唾液腺子孢子期达到高峰（图 3）。基因敲除实验显示 MAEBL 是子孢子侵入唾液腺所必须的。但基因敲除并不影响子孢子活动力和对脊椎动物宿主的感染性。间接免疫荧光测定发现在子孢子发育中 MAEBL 的亚细胞定位会发生改变：在发育中的子孢子的顶端底部先检测到该蛋白（推测贮存在细胞器中），然后 MAEBL 才表达于成熟子孢子表面。

上述研究结果提示，按蚊体内子孢子发育过程中 CSP 和 MAEBL 表达量的持续增加是促进疟原虫侵入脊椎动物宿主的重要因素，但对它们表达产物的功能还不太清楚。对这一方面的进一步研究，可以增加疟原虫与蚊媒相互作用的认识，为有效开发阻断性疫苗提供有益的线索。

参考文献：

[1] MOREIRA C K, MARRELLI M T, JACOBS LORENA M. Gene expression in *Plasmodium*: from gametocytes to sporozoites[J]. Int J Parasitol, 2004, 34(13-14): 1431-1440.

[2] THATHY V, FUJIOKA H, GANTT S, *et al*. Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology [J]. EMBO J, 2002, 21 (7): 1586-1596.

[3] FRANCO A S, SILVEIRA H, DO ROSARIO V E. *Plasmodium yoelii*: semiquantitative analyses of circumsporozoite protein gene expression during the sporogonic development of *P. y. yoelii* and *P. y. nigeriensis* in the mosquito vector *Anopheles stephensi*[J]. J Parasitol, 2003, 89 (2): 255-260.

[4] KARIU T, YUDA M, YANO K, *et al*. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland[J]. J Exp Med, 2002, 195 (10): 1317-1323.

[5] SRINIVASAN P, ABRAHAM E G, GHOSH A K, *et al*. Analysis of the *Plasmodium* and *Anopheles* transcriptomes during oocyst differentiation[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (7): 5581-5587.

（编辑　龙　亮）