论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1752-04

约氏疟原虫红外期发育相关基因的研究

宋 蓓[1],张锡林[1],段建华[1],陈继德[1],姚玉淑[2] ([1]第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038;[2]安徽理工大学医学院病原生物学教研室,淮南 232001)

提 要:目的 寻找约氏疟原虫红外期发育相关基因,进行序列分析并推测其功能。**方法** 分别提取约氏疟原虫感染大鼠(I_L)和正常大鼠(U_L)肝脏总RNA,根据疟原虫基因A+T含量高(>70%)的特点,设计可选择性扩增约氏疟原虫基因的G+C含量为40%的引物,采用差异显示PCR(differential display RT-PCR,DD-PCR)技术进行扩增,筛选差异片段,经TA克隆后测序并进行序列分析。**结果** 找到6个与约氏疟原虫红外期发育相关基因(PyHs4、PyHs5、PyHs6、PyHs7、PyHs8、PyHs9);其中PyHs4与约氏疟原虫乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶(phosphoacetylglucosamine mutase,AGM)具有相似性,PyHs5与约氏疟原虫红细胞膜蛋白3(erythrocyte membrance protein,PyHs5)具有同源性,PyHs6、PyHs7、PyHs8、PyHs9为功能未知基因。**结论** 应用DD-PCR技术成功扩增了与约氏疟原虫红外期发育相关基因,为进一步的重组表达进行功能和疫苗研究奠定基础。

关键词:DD-PCR;红细胞外期;差异基因

中图法分类号:R382.31;R394.3 **文献标识码**:A

Study of *Plasmodium yoelii* development-related genes during exo-erythrocytic stage by differential display PCR

SONG Bei[1], ZHANG Xi-lin[1], DUAN Jian-hua[1], CHEN Ji-de[1], YAO Yu-shu[2] ([1]Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Pathobiology, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

Abstract: Objective To find the development-related genes of *Plasmodium yoelii* by sequence analysis and predict their functions during exoerythrocytic stage. **Methods** Total RNA was extracted from the liver of normal rat and *Plasmodium yoelii* infected rat followed by DD-PCR with the primer containing 40% G+C. The primer designed and synthesized accommodated the high adenine and thymidine rich genome of *Plasmodium yoelii*. The special bands of the PCR products were purified and cloned into plasmid T-vector. The recombinant plasmids were sequenced and analyzed. **Results** Six new genes (PyHs4, PyHs5, PyHs6, PyHs7, PyHs8, PyHs9) were related to the development of *Plasmodium yoelii* during exo-erythrocytic stage. In these genes, PyHs4 and PyHs5 had homology with phosphoacetyl glucosamine mutase (AGM) and erythrocyte membrance protein (EMP3) respectively. PyHs6, PyHs7, PyHs8, PyHs9 were all hypothetical genes with unknown function. **Conclusion** The developmental genes of *Plasmodium yoelii* have been amplified successfully by DD-PCR technique during exo-erythrocytic stage, which lays the foundation for the recombinant expression and new vaccine design.

Key words: DD-PCR; exo-erythrocytic stage; differential gene

疟疾是由感染性蚊媒叮咬而传播的疾病。疟原虫子孢子入血后,可在几分钟内侵入肝细胞,进行红外期的裂体增殖。当裂殖体发育成熟后肝细胞破裂,释出的裂殖子侵入红细胞后导致疟疾临床症状发作。有相关研究表明[1,2],经照射减毒的子孢子侵入肝细胞后出现裂殖体发育停滞可诱导宿主对疟原虫产生非消除性免疫,对再次感染的免疫力达到90%以上。这说明抑制疟原虫肝期发育对控制疟疾的发作是一种行之有效的方法。但宿主肝细胞、肝内组织所产生的高背景干扰,以及难以获得足量高纯度肝期疟原虫的技术障碍严重阻碍对疟原虫红外期研究。所以,如何排除或降低鼠源性干扰无疑是红外期研究的重点。本实验针对疟原虫基因A+T含量高(>70%)的特点[3],设计能从肝组织和疟原虫混合标本中选择性扩增疟原虫基因的G+C含量40%的引物,采用DD-PCR技术,克服

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:宋 蓓(1980-),女,河南省新乡市人,硕士研究生,主要从事疟原虫红外期方面的研究。电话:(023)68752243, E-mail:Happysky_00710@sina.com

通讯作者:张锡林,电话:(023)68752243, E-mail:jsczxl@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-09-03;**修回日期**:2005-12-25

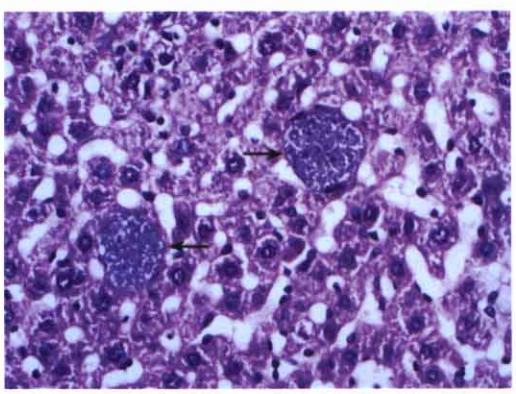
了纯化肝期疟原虫的技术屏障，特异扩增疟原虫基因。通过对疟原虫红外期发育差异基因的发现和鉴定，有助于认识疟原虫生长发育的分子机制，为疟疾的防治积累分子理论依据，为新的药物和疫苗的研制提供有利的靶点目标。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　6～8 周龄雌性 Wistar 大鼠 6 只，体质量 150～200 g，昆明株小鼠，体质量 18～25 g 均由第三军医大学实验动物中心提供；斯氏按蚊（*Anopheles stephensi*）Hor 株由本实验室在（24±0.5）℃、相对湿度（70±5）% 的养蚊室饲养，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 次，供实验使用。

1.1.2　子孢子分离、大鼠感染及组织学鉴定　　斯氏按蚊（*Anopheles stephensi*）Hor 株在羽化后 3 d 吸感染约氏疟原虫的小鼠血。吸血感染后置于 23～24 ℃，相对湿度 70%～80% 的恒温室内继续饲养，饲 10% 蔗糖水。在 15 d 时，检查蚊唾液腺子孢子，选择感染率 70% 以上的蚊为实验组。经 -20 ℃冷冻麻醉 5 min 后，在 500 μl 培养液（1 640～450 μl，FCS 50 μl）中解剖蚊唾液腺 110 对，每对唾液腺含子孢子约 5×10^3 个，研钵研磨后用培养液重悬，经血细胞计数板计数，以约 5×10^5 个子孢子/只的浓度，经尾静脉注射大鼠。43 h 后，麻醉后颈椎脱臼处死大鼠，参考 Lau[4] 介绍的方法，解剖大鼠后取其Ⅲ区肝组织。取约 100 mg Ⅲ区肝组织，浸泡于卡氏固定液（Carroy's）固定 1～1.5 h，以 95% 乙醇洗涤两次后，保存于 80% 乙醇中，常规石蜡包埋，制作连续切片，厚度为 5 μm，HE 染色，镜下鉴定，见图 1。其余肝组织立即分装浸泡于 RNAin 中放 -70 ℃保存，供提取总 RNA 实验备用。



→：红外期裂殖体

图 1　约氏疟原虫疟原虫红外期裂殖体　（HE×400）

1.2　主要试剂

1.2.1　试剂　　Tripure Isolation Reagent 购自 Roche 公司，M-MLV 逆转录酶和 RNase 抑制剂购自 Promega 公司，RNA PCR Kit Ver. 3.0、10×Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、$MgCl_2$、dNTP、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。DEPC（Promega），凝胶回收试剂盒（上海博亚），pMD18-T Vector 试剂盒（TaKaRa）、质粒小样快速提取试剂盒（北京博大泰克公司），*Eco*R Ⅰ、*Hind*Ⅲ内切酶（Promega），IPTG（上海博亚），X-gal（上海博亚），氨苄青霉素（北京天为时代），溴化乙锭（Sigma），其余试剂均为国产分析纯。

1.2.2　引物　　根据疟原虫基因组特征，参考文献[5]设计的 60% A+T 含量的 5′端随机引物（P25）：ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG，（P26）：ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG 以及改良的 DD-PCR3′端锚定引物 Oligod$(T)_{20}$YN（Y=A/G/C，N=A/G/C/T），M13：GTTTTCCCAGTCACGAC，28S rRNA 上游：5′-AGGATGTATTCGCTTTATTTAATGC-3′，28S rRNA 下游：5′-TCTTGTCCAAACAATTCATCATATC-3′[4]，委托上海生物工程有限公司合成。

1.3　红外期疟原虫总 RNA 提取及 RT-PCR

1.3.1　红外期疟原虫总 RNA 提取　　取感染大鼠（I_L）和正常大鼠（U_L）肝脏各 23 mg 冰上研磨、匀浆后，加入 1 ml Tripure 进行总 RNA 提取，以 DEPC 处理水溶解，各取 2.5 μl 与 1 μl Loading-buffer 混匀，以 1% 琼脂糖凝胶 120 V，15 min 电泳，在紫外灯下观察总 RNA 提取的结果。

1.3.2　逆转录为合成 cDNA　　将提取的总 RNA 17.5 μl 与 Oligod$(T)_{20}$YN 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、2.5 mmol/L dNTP 1 μl、40 U/L RNase 抑制剂 0.5 μl、M-MLV 逆转录酶 1 μl，最后用灭活 RNA 酶的 ddH_2O 补足体积至 25 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。

1.3.3　DD-PCR　　第一轮 PCR 反应体系为 25 μl，其中 cDNA 5 μl，2.5 mmol/L dNTP 2 μl，25 mmol/L $MgCL_2$ 1.5 μl，10×buffer 2.5 μl，上游 M13 引物 0.3 μl，下游以 60% A+T 含量 25 bp 随机引物 1 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μl。扩增条件为：先 94 ℃，5 min；40 ℃，5 min；68 ℃，5 min；5 个循环：94 ℃，2 min；45 ℃，2 min；68 ℃，2 min；再 25 个循环：94 ℃，1 min；62 ℃，1 min；72 ℃，1 min；最后 72 ℃，10 min。

将反应产物稀释 100 倍后取 2.5 μl 加入第二轮反应的 25 μl 体系，其中 2.5 mmol/L dNTP 2μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μl，10×buffer 2.5 μl，60% A+T 含量的 5′端 25 bp 随机引物各 2.5 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl。扩增条件为：先 94 ℃，5 min；再 45 个循环：94 ℃，30 s；40 ℃，30 s；72 ℃，90 s；最后 70 ℃，5 min。

1.4　差异基因片段筛选及克隆

将获得实验组（I_L）与对照组（U_L）的差异基因片段（200～750 bp）进行纯化回收，按照上海博亚凝胶回收试剂盒说明书进行操作。将目的片段与 pMD18-T 载体（TaKaRa）进行过夜连接构建重组子，具体操作按说明书进行。重组质粒采用 $CaCl_2$ 法转化至 XL_1-Blue 感受态细菌，涂布到含 X-gal 和 IPTG 的 AMP 选择平板上进行蓝白筛选。在平板上随机挑取阳性克隆增菌后提取重组质粒进行质粒抽提，以 *Eco*R Ⅰ、*Hind*Ⅲ内切酶酶切鉴定。

1.5　差异基因片段的序列测定

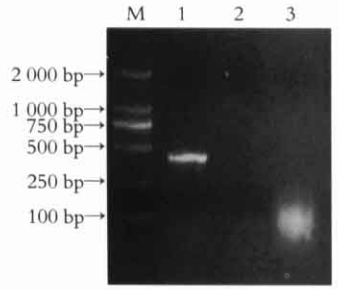
经酶切鉴定后的阳性重组子委托上海生物工程有限公司进行测序鉴定，测序结果经相关生物信息网站 NCBI 的 Blast 查询和 ExPASy 在线程序进行序列相似性检索，分析，并对其蛋白的结构和功能、理化性质进行预测。

2　结果

2.1　红外期疟原虫总 RNA 及 cDNA 的质量鉴定

总 RNA 电泳显示可见较清晰的 3 条带，即 5S、18S、28S，表

明提取的总 RNA 无降解，完整性和均一性较好，$D(260)/D(280)\approx1.90$。采用约氏疟原虫特异性 28S 核糖体 RNA 的引物，进行 PCR 扩增。总反应体系 12.5 μl，其中 cDNA 0.2 μl，2.5 mmol/L dNTP 1 μl，25 mmol/L MgCl 0.75 μl，10 × buffer 1.25 μl，约氏疟原虫特异性 28S 核糖体 RNA 的上游及下游引物各 0.5 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.1 μl。28S 扩增条件为：先94 ℃，3 min；再 35 个循环：94 ℃，30 s；60 ℃，40 s；70 ℃，30 s；最后70 ℃，5 min。扩增产物 8 μl 与 1 μl Loading-buffer 混匀，以 1% 琼脂糖凝胶 120 V，15 min 电泳，经 EB 染色，在紫外灯下观察：I_L 标本出现约 400 bp 锐利条带，U_L、U_B 标本未出现条带，见图 2。

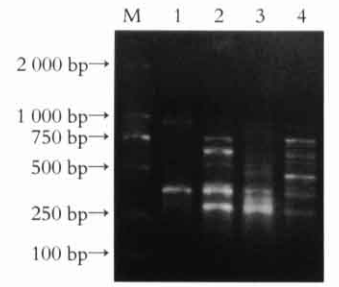


M：标准；1：感染约氏疟原虫大鼠肝脏标本（I_L）RT-PCR 扩增获得约氏疟原虫 28S 片断；2：未感染约氏疟原虫大鼠肝脏标本（U_L）；3：未感染约氏疟原虫大鼠血液标本（U_B）

图 2 28S RT-PCR 扩增结果 1% 琼脂糖凝胶电泳图

2.2 差异基因片段筛选

取 DD-PCR 扩增产物 8 μl 与 1 μl Loading-buffer 混匀，以 1.5% 琼脂糖凝胶 100 V，80 min 电泳，经 EB 染色，在紫外灯下观察：I_L 组与 U_L 组出现的多根条带存在差异，但在 700 bp、400 bp、250 bp 有相似条带，差异条带主要集中在 200 ~ 750 bp，见图 3。



M：标准；1、2：未感染约氏疟原虫大鼠肝脏标本（U_L）；3、4：感染约氏疟原虫大鼠肝脏标本（I_L）；以不同长度的上游引物对 I_L、U_L cDNA 进行 DD-PCR 扩增，1、3 泳道采用长度为 10 bp 的引物，2、4 泳道采用引物长度为 26 bp

图 3 DD-PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析

2.3 差异基因片段克隆及鉴定的结果

将 200 bp ~ 750 bp 之间差异片段（22 个片段）与 pMD18 - T 载体连接后，转化大肠杆菌 XL1-Blue，涂布含有氨苄青霉素的 LB 平板，获得若干蓝白菌落，随机挑取 35 个白斑，增菌后提取重组质粒，以 *Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ内切酶酶切鉴定有 24 个单克隆菌落含有长度不等的插入片段。

2.4 差异基因片段的序列分析

测序结果经 BLAST 查询后，有 6 个基因片段（分别命名为 PyHsg4、PyHsg5、PyHsg6、PyHs7、PyHs8、PyHs9）与疟原虫相关。此外，与寄生虫（锥虫，带虫，线虫）有关的有 5 条，与大肠杆菌、噬菌体相关的 1 条，见表 1。

表 1 筛选出与约氏疟原虫红外期发育相关的 6 个基因

基因	基因鉴定	推测功能	片段长度
PyHs4	AGM	UDP-GlcNAc synthesis	538 bp
PyHs5	EMP3	pre-erythrocytic antigen	422 bp
PyHs6	Hypothetical gene	Unknown	444 bp
PyHs7	Hypothetical gene	Unknown	177 bp
PyHs8	Hypothetical gene	Unknown	263 bp
PyHs9	Hypothetical gene	Unknown	261 bp

AGM：Phosphoacetylglucosamine mutase；EMP3：Erythrocyte membrance prontein）；UDP-GlcNAc：UDP-N-acetylgucosamine

3 讨论

疟原虫生活史十分复杂，有蚊和哺乳动物两个宿主，包括蚊体内的配子生殖和孢子增殖两个阶段，在哺乳动物体内又分为红细胞外发育和红细胞内发育。然而，统观疟原虫生活史，只有了解疟原虫红外期的发育进程，寻找阻止裂殖子发育成熟的靶分子，使裂殖子无法侵入红细胞才能有效避免疟疾临床症状发作。本研究应用 DD-PCR 方法获得的与疟原虫红外期发育相关基因以及在实验过程中所进行的实验方法的探索均为红外期阻断疫苗的研制提供理论基础和实践经验。

体外培养虽然可获得从子孢子到早期 EEF 的疟原虫，但从抗原性和形态学观察，体外培养 EEF 疟原虫的发育、分化与体内的时间步骤不尽相同[6]，这种方法虽然有利于 cDNA 文库的建立，但并不适于疟原虫生长发育的分期研究。本实验通过 DD-PCR 技术，先以 M13 启动子与 G + C 含量 40% 的长度为 25 bp 引物作为第一轮 PCR 反应的外引物，再以 G + C 含量 40% 的长为 25 bp 随机引物作为第二轮 PCR 反应的嵌套式引物，然后通过实验组与对照组的差异比较有效排除了鼠源基因的干扰，成功扩增了疟原虫红外期基因。实验过程中为探索 RT-PCR 扩增最适模板量，以 25、50、100 mg 感染肝脏分别作为模板进行扩增，结果表明：非特异性扩增对差异条带的影响随模板量增加上升，最终确定以 25 mg 作为 RT-PCR 扩增最适模板量。并且为减少非特异扩增的影响，将第一轮 PCR 产物作 1、10、100 倍稀释后分别作为第二轮 PCR 反应的模板，结果显示，稀释 100 倍的产物进行第二轮 PCR 扩增效果最佳。

DD-PCR 克隆获得的 6 个基因片段（PyHs4、PyHs5、PyHs6、PyHs7、PyHs8、PyHs9）通过 Blast（http://www.ncbi.nlm.nil.gov/）查询：PyHs4 与约氏疟原虫乙酰葡萄糖胺磷酸变位酶（phosphoacetylglucosamine mutase，AGM）基因具有相似性。现研究表明尿苷 - 5′ - 二磷酸 - N - 乙酰葡萄糖胺（UDP-N-

acetylgucosamine，UDP-GlcNAc）是肠贾第鞭毛虫滋养体阶段的 6 - 磷酸果糖（fructose 6-phosphate）在 AGM、GNP（glucosamine 6-phosphate deaminase）、GNA（glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase）、UAP（UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase）、UAE（UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase）共同催化作用下生成，是肠贾第鞭毛虫孢囊壁的特异性成分[D-GlcNAc(β1，3)-D-GlcNAc]$_n$（n≥23）的前体物质。AGM 等在孢囊形成期显著升高，在转录水平参与诱导了 UDP-GlcNAc 合成[7]，并且在真核生物的发育进程中 AGM 编码区高度保守[8]，从而推测 GalNAc 合酶（AGM、GNP、GNA、UAP、UAE 等）在红外期裂殖子发育中具有催化作用，并有可能参与裂殖子侵入红细胞过程。通过 Blastx 查询：PyHs5 与约氏疟原虫红细胞膜蛋白 3（Erythrocyte membrance protein，EMP3）的氨基酸序列具有同源性。红细胞膜蛋白 3 最初是在受疟原虫感染的红细胞表面瘤状突起中发现的，推测其与细胞黏附作用有关[9]。2001 年，Gruner 等[10]发现，在疟原虫子孢子表面和肝期成熟裂殖子细胞质中也有红细胞膜蛋白 3 的表达，并且以人抗 PfEMP3 可抑制约氏疟原虫子孢子侵入肝细胞，从而推测 EMP3 在子孢子侵入过程中发挥一定作用，可能是自然免疫保护反应的重要靶点。此外，在啮齿类疟原虫（约氏疟原虫、伯氏疟原虫）种间也存在红细胞膜蛋白 3 的同种抗原，所以推断 EMP3 在疟原虫的整个生活史中具有重要作用，但目前仍无法确定 EMP3 是否与受感染红细胞表面的 MHC 分子结合构成特异性 T 细胞靶点。通过 Blast 查询的假定基因（hypothetical gene）编码的蛋白虽然显示出一定的功能区域，但其翻译的氨基酸序列与编码蛋白的氨基酸只有部分匹配，无法行使其全部功能：如 PyHs6 通过 tbBlastx 查询推测与恶性疟原虫网织红细胞结合蛋白（*Plasmodium falciparum* reticulocyte binding protein）具有同源性，与编码该蛋白的氨基酸序列部分匹配。PyHs8 和 PyHs9 均为恶性疟原虫 3D7 株 12 号染色体上重复性较高的序列，这种在 cDNA 重复性较高的基因片段被推测为编码区或是编码区的一部分[11]。与本课题前期工作的研究资料相比，从感染约氏疟原虫的斯氏按蚊唾液腺子孢子扩增获得的与侵入相关基因 PyDg1、PyDg2、PyDg3 在肝期均未检测到，可以推测这 3 个基因在肝期不再表达或是表达量降低。这也说明，疟原虫基因在不同的发育阶段，转录的方式各不相同。

迄今为止，对于疟疾这种危害严重的传染性疾病仍然无有效的疫苗及防治方法，疟原虫红外期发育机制虽然一直是抗疟疫苗研究的热点，但由于研究难度大，技术要求高，难以获得足够纯净的肝期裂殖子等因素均致使这一领域的研究进展缓慢。2002 年恶性疟原虫基因组测序的完成，但其中有 60% 的基因所编码的蛋白与其他物种之间缺少有意义的相似性[12]。本次实验显示的 6 个与约氏疟原虫红外期发育相关基因不仅为阻断疫苗的研究增加理论依据，提供有价值的靶目标（PyHs4、PyHs5），也为下一步对假定基因（PyHs6、PyHs7、PyHs8、PyHs9）分类、鉴定及功能分析奠定了基础。

参考文献：

[1] FERREIRA A, SCHOFIELD L, ENEA V, *et al*. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon[J]. Science, 1986, 232(4752): 881 - 884.

[2] HERRINGTON D, DAVIS J, NARDIN E, *et al*. Successful immunization of humans with irradiated malaria sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals [J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45(5): 539 - 547.

[3] CARLTON J M, ANGIUOLI S V, SUH B B, *et al*. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* yoelii [J]. Nature, 2002, 419(6906): 512 - 519.

[4] LAU A O, SACCI J B, Jr., AZAD A F. Detection of *Plasmodium yoelii* stage mRNA in BALB/c mice[J]. J Parasitol, 2001, 87(1): 19 - 23.

[5] LAU A O T, SACCI J B, Jr., AZAD A F. Retrieving parasite specific liver stage gene products in *Plasmodium yoelii* infected livers using differential display [J]. Mol Biochem Parasitol, 2000, 111(1): 143 - 151.

[6] 陈孙孝，黄复生，王兴相，等. 约氏疟原虫红外期体外培养及影响因素的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1997，15(6)：340 - 344.

[7] LOPEZ A B, SENER K, JARROLL E L, *et al*. Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in Giardia intestinalis cyst wall polysaccharide biosynthesis [J]. Mol Biochem Parasitol, 2003, 128(1): 51 - 57.

[8] MIO T, YAMADA-OKADE T, ARISAWA M, *et al*. Functional cloning and mutational analysis of the human cDNA for phosphoacetylglucosamine mutase: identification of the amino acid residues essential for the catalysis[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492(2 - 3): 369 - 376.

[9] PASLOSKE B L, BARUCH D I, VAN-SCHRAVENDLIJK M R, *et al*. Cloning and characterization of a *Plasmodium falciparum* gene encoding a novel high-molecular weight host membrane-associated protein, PfEMP3[J]. Mol Biochem Parasitol, 1993, 59(1): 59 - 72.

[10] GRUNER A C, BRAHIMI K, ELING W, *et al*. The *Plasmodium falciparum* knob-associated PfEMP3 antigen is also expressed at pre-erythrocytic stages and induces antibodies which inhibit sporozoite invasion[J]. Mol Biochem Parasitol, 2001, 112(2): 253 - 261.

[11] GRUNER A C, HEZ-DEROUBAIX S, SNOUNOU G, *et al*. Insights into the *P. y. yoelii* hepatic stage transcriptome reveal complex transcriptional patterns[J]. Mol Biochem Parasitol, 2005, 142(2): 184 - 192.

[12] GARDNER M J, HALL N, FUNG E, *et al*. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2002, 419(6906): 498 - 511.

（编辑　陈聪连）