

文章编号: 1000-7423(2007)-04-0279-06

【论著】

犬贾第虫病毒转染载体介导的锤头状核酶对 KRR1 基因体外转录体切割效果的研究

陈丽凤^{1,2}, 李建华^{1*}, 邹亚学², 赵月平¹, 曹利利¹, 张西臣¹

【摘要】 目的 检测犬贾第虫病毒介导的锤头状核酶对犬贾第虫滋养体核仁功能性蛋白 KRR1 基因体外转录体切割效率。方法 将两端携带反义 KRR1 基因的锤头状核酶(ribozyme, R 酶)插入犬贾第虫病毒(*Giardia canis* virus, GCV)转染载体中, 构建两个核酶嵌合型犬贾第虫病毒载体: 短反义序列, 上游及下游均为 21 个碱基, 形成重组质粒 KRzS; 长反义序列, 上游为 288 个碱基, 下游为 507 个碱基, 形成重组质粒 KRzL。另设两种阴性对照, 即重组质粒 TRzL(即 R 酶两端含虫体反义磷酸丙糖异构酶基因, 上游为 324 个碱基, 下游为 380 个碱基)和重组质粒 PKR(即犬贾第虫病毒转染载体中仅有 KRR1 基因的反义片段而无 R 酶功能区)。应用荧光实时定量 RT-PCR 法检测嵌合型锤头状核酶体外对 KRR1 基因 mRNA 切割活性。结果 KRzS、KRzL 转录体对 KRR1 基因体外转录 RNA 切割效率分别达到 74.0% 和 81.1%。而 PKR 对 KRR1 mRNA 反转录的影响较小, RT-PCR 效率仅降低 12.0%。TRzL 对 KRR1 mRNA 反转录几乎无影响。结论 犬贾第虫病毒介导的锤头状核酶对 KRR1 基因体外转录体进行有效切割, 为以后的体内锤头状核酶对 KRR1 基因表达抑制试验提供依据。

【关键词】 犬贾第虫病毒; 转染载体; 锤头状核酶; KRR1 蛋白

中图分类号: R382.213 文献标识码: A

The Cleavage Activity of GCV Transfer Vector-mediated Hammerhead Ribozyme for KRR1 *in vitro* Transcript

CHEN Li-feng^{1,2}, LI Jian-hua^{1*}, ZOU Ya-xue², ZHAO Yue-ping¹, CAO Li-li¹, ZHANG Xi-chen¹

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;
2 Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China)

【Abstract】 **Objective** To detect the cleavage activity of *Giardia canis* virus (GCV) transfer vector-mediated hammerhead ribozyme for KRR1 *in vitro* transcript. **Methods** *Giardia*, a most primitive eukaryote, has KRR1 protein responsible for ribosome biosynthesis. cDNA encoding hammerhead ribozyme flanked with various lengths of antisense RNA was cloned into a viral vector pGCV634/GFP/GCV2174 derived from the genome of GCV, KRzS flanked with 21 nt KRR1 antisense RNA on each arm, or KRzL flanked with 288 nt and 507 nt KRR1 antisense RNA. At the same time, two control groups were established: PKR without the inserted ribozyme, and TRzL flanked with 324 nt and 380 nt triosephosphate isomerase (Tim) antisense RNA. The cleavage activity of GCV transfer vector-mediated hammerhead ribozyme for KRR1 *in vitro* transcript was then analyzed by absolute real-time quantitative RT-PCR. **Results** The *in vitro* cleavage activities on KRR1 mRNA of the two ribozyme KRzS or KRzL were 74.0% and 81.1% respectively by the absolute real-time quantitative RT-PCR. The two control groups, PKR or TRzL, showed no effect on KRR1 mRNA *in vitro*. **Conclusion** The GCV transfer vector-mediated hammerhead ribozyme shows a high cleavage activity for KRR1 *in vitro* transcript, which demonstrates the feasibility of using a viral vector to express a ribozyme targeted at a specific mRNA in *Giardia* to reduce the expression of a specific gene.

【Key words】 *Giardia canis* virus; Transfer vector; Hammerhead ribozyme; KRR1 protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30300260)

* Corresponding author, E-mail: jianhuali7207@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30300260)

作者单位: 1 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2 河北科技师范学院, 秦皇岛 066000

* 通讯作者, E-mail: jianhuali7207@163.com

核仁是普遍存在于真核细胞间期核中的最显著结构,它是 rDNA 转录和核糖体亚基组装的场所。由于贾第虫缺少核仁等结构,长期以来被认为是最古老的低等的真核生物之一^[1]。最近研究发现,没有核仁的贾第虫,却具有参与真核细胞核仁前体 RNA (precursor RNA)合成加工的同源基因,即核仁功能性蛋白 KRR1 基因^[2]。核仁 pre-RNA 合成加工是非常复杂的,由大量的蛋白因子参与,其中被详细描述过的有核仁纤维蛋白、核仁素及 NOP52 等^[3,4],而 KRR1 蛋白在贾第虫体内的确切生理功能尚不十分清楚。如果通过改变贾第虫体内 KRR1 基因的表达来观察对贾第虫的影响,也许对了解 KRR1 基因在贾第虫 pre-RNA 合成中的作用可提供参考依据。本研究拟将两端携带不同长度的反义 KRR1 基因的锤头状核酶插入到犬贾第虫病毒 (*Giardia canis virus*, GCV) 转染载体中,构建核酶嵌合型犬贾第虫病毒载体,其体外转录体经电穿孔方法转染犬贾第虫,通过犬贾第虫病毒介导的锤头状核酶对 KRR1 基因 mRNA 进行切割,从而抑制 KRR1 基因在犬贾第虫体内的表达。为了确保体内转染抑制试验的可行性,首先对犬贾第虫病毒转染载体介导的锤头状核酶对 KRR1 基因体外转录体切割效果进行了研究。

材料与方法

1 犬贾第虫携病毒株

由本室原代培养并保存^[5]。

2 质粒和载体

载体 pGCV631/GFP/GCV2174,是由本室构建的犬贾第虫病毒转染载体^[6]。载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。

3 主要试剂

培养基所用试剂为美国 Sigma 公司产品, T₇ 体外转录试剂盒为美国 Promega 公司产品。大肠埃希菌 DH5 α 株为本室保存。DNA 片段回收试剂盒、焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)购自北京鼎国生物技术发展中心。

4 引物的设计与合成

根据磷酸丙糖异构酶(Tim)、锤头状核酶、载体 pGCV631/GFP/GCV2174 以及核仁功能性蛋白 KRR1 基因序列特征,设计下列引物。

631F: 5'-GGAAGGAGTGCCAGCCATTACC-3',

TF1: 5'-TCTAGAATGCCTGCTCGTCGCCCTTC-3',

TR1: 5'-TGCCTCTTTCAGACTGCCCTCTGATGATGTCCTGAGGACGA-
ATATCACATGCTTCAAACC-3',

TR2: 5'-TCTAGAATCGATCTGCGTCTTTCAGACTGCCCT-3',

TF3: 5'-ATCGATAATCATGGGGAGACCGACC-3',

TR3: 5'-ATCGATCACTGGCCAAGCTTCTCGCAG-3',

KRR1F: 5'-CAGTTCTAGAATGACCGGGCGAAGTACG-3',

KRR1R: 5'-GACTTCTAGAAATTAAGGCCATCACTAGGG-3',

T7KF: 5'-GCTAATACGACTCACTATAGGATGACCGGGCGAAC-3',

65NT: 5'-TACGCACGAGGCCAACTCCGCCTGATGATGTCCTGAGGA-
CGAAACTTGCTCCCATGACTGCAAC-3',

KSF: 5'-GACTTCTAGATACGCACGA-3',

KSR: 5'-GACTTCTAGAGTTGCAGTC-3',

KLR2: 5'-GACTTCTAGAATCGATTACGCACGAGGCCAAC-3',

KLF3: 5'-GACTATCGATATATAGTCACAGATTGCATTG-3',

KLR3: 5'-GACTATCGATGCAGTCGTCGCGGAAGTAT-3',

KRTF: 5'-GCCCTAATGCTCAAACACTCAAG-3',

KRTR: 5'-CCGTTCAATGCAATCTGTGACTAT-3',

KRTP: 5'-FAM-CGAGGCCAACTCCGCGACTTGCTC-ECLIPSE-3'。

其中有下划线部分为锤头状核酶,斜体带下划线部分为 T₇ 启动子。引物及探针均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

5 犬贾第虫滋养体总核酸的提取

取纯化的犬贾第虫滋养体 2 \times 10⁷ 个,加入裂解液 [100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 20 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 2% 十二烷基磺酸钠(SDS), 蛋白酶 K 2 mg/ml], 液氮冻融 3 次(液氮中冻 5 min, 23 °C 水浴 10 min), 56 °C 水浴 2 h, 用酚/三氯甲烷抽提总 RNA, 上清加 1/10 体积乙酸钠(3 mol/L, pH 5.2)和 2 倍体积的冷乙醇, -20 °C 冰箱中放置 2 h, 4 °C 12 000 \times g 离心 30 min, 用 70% 冷乙醇淋洗, 倾去上清, 用滤纸吸干, 真空抽吸 2~3 min, 加入 50 μ l 无 RNA 酶水溶解核酸, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, -70 °C 保存备用。

6 目的基因的扩增

按下列顺序对目的基因进行 PCR 扩增, 反应条件为: 取模板 1 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, 脱氧核苷三磷酸(dNTP) 各 2.5 mmol/L) 4 μ l, 上、下游引物(10 pmol) 各 1 μ l, Taq 酶(5 U/ μ l) 1 μ l, 加 ddH₂O 至总体积 50 μ l。反应参数为: 变性 94 °C 1 min, 退火 57 °C 1 min, 延伸 72 °C 1 min, 30 个循环后于 72 °C 延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 用试剂盒回收 PCR 产物溶于 20 μ l TE 缓冲液中(含 10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0), 1 mmol/L EDTA-Na₂ (pH 8.0)。

模板 / 上下游引物 / 目的基因, 依次为:

- 犬贾第虫滋养体总核酸 / TF1, TR1 / TL1;
- TL1 / TF1, TR2 / TL2;
- 犬贾第虫滋养体总核酸 / TF3, TR3 / TL3;
- 犬贾第虫滋养体总核酸 / KRR1F, KRR1R / 核仁功能性蛋白 KRR1 基因;
- KRR1 基因 / T7KF, KRR1R / T7K;
- 65NT / KSF, KSR / KS;
- KRR1 基因 / KRR1F, 65NT / KL1;
- KL1 / KRR1F, KLR2 / KL2;
- KRR1 基因 / KLF3, KLR3 / KL3。

7 重组质粒的构建

将扩增的 PCR 产物分别与 pMD18-T 载体连接即得重组质粒 pMD/TL1、pMD/TL2、pMD/TL3、pMD/KRR1、pMD/KS、pMD/ KL1、pMD/KL2 及 pMD/KL3, 转化感受态菌 DH5 α , 提取质粒后进行酶切鉴定及测序。

将重组质粒 pGCV634/GFP/GCV2174 和 pMD/ TL2、pMD/KL2、pMD/KRR1、pMD/Tim 及 pMD/KS 均用 *Xba* I

进行单酶切, 回收 pGCV634/GCV2174 线性化载体和 TL2、KL2、KRR1 及 KS 片段, 通过 T₄ DNA 连接酶将 pGCV634/GCV2174 线性化载体与 TL2、KL2、KRR1 及 KS 片段分别进行连接即得重组质粒 pGCV631/TL2/GCV2174 (PTL2)、pGCV631/KL2/GCV2174 (PKL2)、pGCV634KRR1/GCV2174(PKR)及 pGCV631/KSGCV2174 (KRzS), 并以此 4 个重组质粒为模板, 用 631F 和 KL2F、631F 和 KRR1F、631F 和 TimF、631F 和 KSF, 共 4 对引物分别进行 PCR, 鉴定插入片段的正反向, 保留反向插入重组质粒。

将重组质粒 PTL2、KRzL2、pMD/TL3 及 pMD/ KL3 均用 *Cl*a I 进行单酶切, 回收 PTL2、KRzL2 线性化载体和 TL3、KL3 片段, 通过 T₄ DNA 连接酶连接即得重组质粒 pGCV631/TL3/TL2/GCV2174 (TRzL) 和 KL3/KL2/GCV2174 (KRzL), 以此重组质粒为模板, 用 631F 和 KLF3、631F 和 TF3 两对引物进行 PCR, 以鉴定插入片段的正反向, 保留反向插入的重组质粒 (图 1、图 2)。

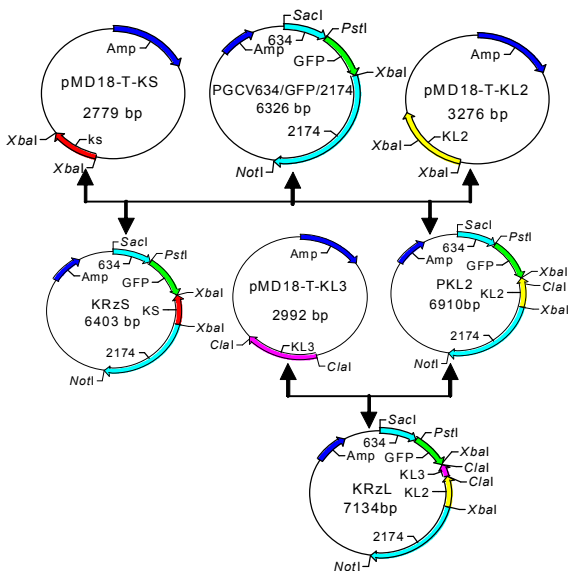


图 1 重组质粒 KRzS、KRzL 的构建

Fig.1 The construction of recombinant plasmid of KRzS, KRzL

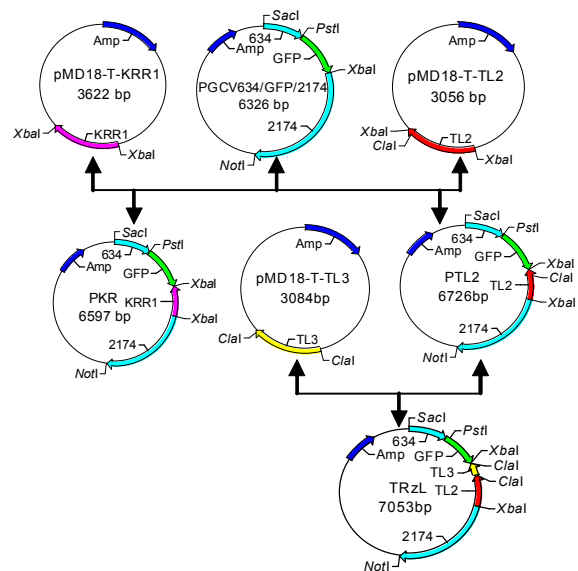


图 2 重组质粒 PKR、TRzL 的构建

Fig.2 The construction of recombinant plasmid of PKR, TRzL

8 体外转录

用扩增的 T7K 基因和重组质粒 KRzS、KRzL、PKR 及 TRzL 经 *Not* I 酶切线性化后作为模板, 应用 T₇ 体外转录试剂盒进行体外转录, 37 °C 反应 30 min, 加 1 μ l DNase 消化 DNA 模板后, 电泳观察转录结果, 并进行定量分析。

9 犬贾第虫病毒载体介导的锤头状核酶切割 KRR1 基因体外转录体活性的检测

9.1 犬贾第虫病毒载体介导的锤头状核酶体外切割

KRR1 基因体外转录体 将制备的 KRzS、KRzL、PKR 及 TRzL 的转录产物 RNA 与 T7K 转录的 RNA 以分子 1 : 1 的比例混合于 50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0) 溶液中, 95 °C 3 min, 37 °C 5 min, 室温下轻轻离心后再 37 °C 5 min, 最后加入 MgCl₂ 至终浓度 10 mmol/L, 37 °C 3 h 启动切割反应, 同时设立阴性对照。

9.2 标准曲线的绘制 取 9 \times 10⁶ pg T7K 转录的产物 KRR1 RNA, 以随机 6 核苷酸为引物进行 RT 反应 (20 μ l), 用稀释液将 cDNA 溶液按 1:1、1:10、1:10² ……1:10⁸ 梯度稀释, 各取 2 μ l 在荧光实时定量 PCR

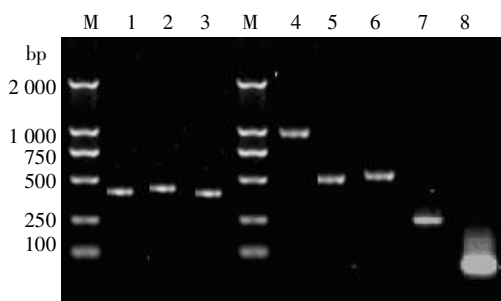
扩增仪(型号: ABI PRISM7000, 美国)上进行 PCR 反应。此时 PCR 反应液中的 cDNA 添加量分别相当于从 9×10^5 、 9×10^4 、 9×10^3 、 9×10^2 、 9×10^1 、 9×10^0 、 9×10^{-1} 及 9×10^{-2} pg 的 RNA 反转录得到的 cDNA 量, 每个梯度设 3 个重复。

9.3 犬贾第虫病毒载体介导的锤头状核酶切割 KRR1 基因体外转录体活性检测 切割反应完成后, 以随机 6 核苷酸引物进行 RT 反应(20 μ l), 各取 2 μ l 进行实时定量 PCR 反应, 用以检测锤头状核酶切割 KRR1 基因体外转录体的切割效率。

结 果

1 目的片段的扩增

通过 PCR 扩增, 均得到了与预计大小一致的目的片段(图 3)。



M: DNA 标志物(DL2000), 1~8: 目的片段, 1: TL1, 2: TL2, 3: TL3, 4: KRR1, 5: KL1, 6: KL2, 7: KL3, 8: KS PCR
M: DNA marker(DL2000), 1~8: PCR products, 1: TL1, 2: TL2, 3: TL3, 4: KRR1, 5: KL1, 6: KL2, 7: KL3, 8: KS.

图 3 目的片段的扩增

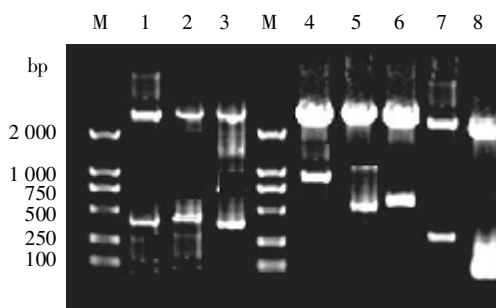
Fig.3 The PCR products of objective fragments

2 重组质粒的构建

经酶切鉴定和序列测定证明成功构建了重组质粒 pMD/TL1、pMD/TL2、pMD/TL3、pMD/KRR1、pMD/T7K、pMD/KS、pMD/KL1、pMD/KL2 及 pMD/KL3(图 4)。重组质粒 KRzL、PKR、TRzL、KRzS 均用 *Xba* I 进行单酶切, 并用 631F 和 KLF3、631F 和 KRR1F、631F 和 TF3、631F 和 KSF 等共 4 对引物分别进行 PCR 及正反向鉴定(图 5), 均证明获得了反向插入的重组质粒。

3 体外转录

用目的基因 T7K 和重组质粒 KRzS、KRzL、PKR 及 TRzL 经 *Not* I 酶切线性化后作为模板, 应用 T7 体外转录试剂盒进行体外转录, 电泳结果显示转录 RNA 完整(图 6), 符合转染条件。定量分析显示 T7K、KRzS、KRzL、PKR 及 PKT 转录 RNA 浓度分别为 9.0、8.9、9.3、9.2 及 8.7 μ g/ μ l。

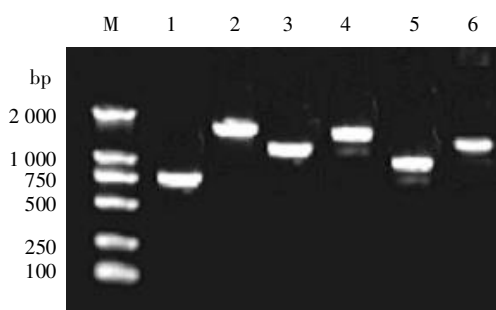


M: DNA 标志物(DL2000), 1~8: 重组质粒, 1: pMD/TL1, 2: pMD/TL2, 3: pMD/TL3, 4: pMD/KRR1, 5: pMD/KS, 6: pMD/KL1, 7: pMD/KL2, 8: pMD/KL3。

M: DNA marker(DL2000), 1~8: Recombinant plasmids, 1: Products of pMD/TL1, 2: pMD/TL2, 3: pMD/TL3, 4: pMD/KRR1, 5: pMD/KS, 6: pMD/KL1, 7: pMD/KL2, 8: pMD/KL3.

图 4 重组质粒 *Xba* I 单酶切鉴定

Fig. 4 Enzyme-digestion profile of recombinant plasmids by *Xba* I

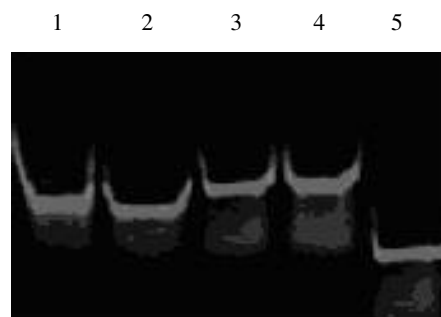


M: DNA 标志物(DL2000), 1~8: 重组质粒, 1: KRzS, 2: PKR, 3: PKL2, 4: KRzL, 5: PTL2, 6: TRzL

M: DNA marker(DL2000), 1~8: PCR products, 1: KRzS, 2: PKR, 3: PKL2, 4: KRzL, 5: PTL2, 6: TRzL

图 5 重组质粒插入片段的正反向的 PCR 方向鉴定

Fig.5 Direction identification of insertion element of the recombinant plasmids



1~5: 重组质粒, 1: KRzL, 2: KRzS, 3: PKR, 4: TRzL, 5: T7K。
1~5: *In vitro* transcription, 1: KRzL, 2: KRzS, 3: PKR, 4: TRzL, 5: T7K respectively.

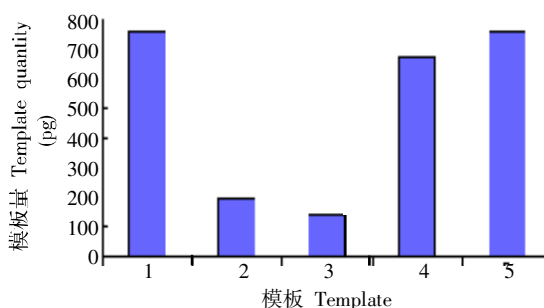
图 6 重组质粒体外转录

Fig. 6 *In vitro* transcription of the recombinant plasmids

4 犬贾第虫病毒载体介导的锤头状核酶切割 KRR1 基因体外转录体活性的检测

4.1 标准曲线的绘制 本试验检测到 KRR1 RNA 0.09~900 000 pg 相当量的 cDNA。标准曲线的线性关系良好, 相关系数为 0.997, 在实验浓度范围内能够进行准确定量。

4.2 切割效果检测 结果显示 KRzS、KRzL 体外转录 RNA 对 KRR1 RNA 的切割效率显著, 分别达到 74.0% 和 81.1%。而 PKR 对 KRR1 RNA 反转录的影响较小, RT-PCR 效率仅降低 12.0%, TRzL 对 KRR1 RNA 反转录几乎无任何影响(图 7)。



1: 阴性对照组, 2: KRzS DNA 模板量, 3: KRzL, 4: PKR, 5: TRzL。
1-5: The template DNA quantities of negative control group, KRzS, KRzL, PKR, and TRzL respectively.

图 7 犬贾第虫病毒介导的锤头状核酶对 KRR1 基因体外转录体切割效果

Fig.7 The cleavage activity of *Giardia canis* virus-mediated hammerhead ribozyme for KRR1 *in vitro* transcript

讨 论

贾第虫病毒(GLV) 是专性寄生于贾第虫体内的病毒。GLV 具有高度宿主特异性, GLV 及其 cDNA 体外转录体具有感染性, 小而稳定、易于纯化, 感染效率高, 每个细胞可达 10^5 个而不影响虫体正常形态, 对细胞生长无毒性。因此以 GLV 建立一种 RNA 病毒转染系统或一种真核表达载体具有明显的优点。近年来反向遗传学技术的兴起为贾第虫病毒载体的构建提供了技术保障。核酶是一类具有酶特性的 RNA 分子, 通过催化靶位点 RNA 链中磷酸二酯键的断裂, 特异性地剪切底物 RNA 分子, 从而阻断基因的表达。核酶种类较多, 其中锤头状核酶与发夹型核酶分子较小, 结构简单, 人工设计容易, 应用较广。锤头状核酶是由 11 个保守的核苷酸组成的催化核心以及 3 个由互补碱基构成的茎 (I ~ III)。根据茎 I 和 III 的不保守性, 可以设计出具有保守性的催化核心和茎 II, 以及两端与特异性底物结合的侧翼序列锤头状核酶, 该酶起反式切割作用^[7]。

Dan 等^[8]为确定丙酮酸-铁氧化还原蛋白酶 (pyruvate ferredoxin oxidoreductase, PFOR) 是否为虫体生长所必需, 虫体无氧代谢的原动力, 虫体对甲硝唑敏感的原因等, 将编码带有不同长度反义 PFOR mRNA 的核酶 cDNA 克隆至贾第虫病毒载体 (WB 株) PC631pac 中, 在导入转染细胞中表达 R 酶来切割 PFOR mRNA 从而阻断 PFOR 基因的表达, 该研究首次证明贾第虫病毒载体能够用于贾第虫蛋白质的功能性研究。目前以贾第虫病毒改造的载体系统已成功应用于外源基因的表达, 基因结构和功能分析、蛋白质功能性研究等各个领域, 显示出广泛的应用前景。

本研究根据锤头状核酶的特点和设计原则人工合成了一个由 23 核苷酸组成的锤头状核酶, 其中茎 I 和 III 设计成不同长度的反义 KRR1 臂, 将编码带有不同长度反义 KRR1 mRNA 的锤头状核酶 cDNA 克隆至犬贾第虫病毒(GCV)载体中, 在 GCV 基因 cDNA 的 5' 端 634 核苷酸和 3' 端 2 274 核苷酸之间插入绿色荧光蛋白基因(GFP)构建 PC634GFP。把 23 个核苷酸组成的 R 酶功能区插入不同长度的 KRR1 反义 RNA 之间, 以在特定位点 (508~509) 切割虫体 KRR1 mRNA, 一种是短反义序列, 上游 21 个碱基, 下游 21 个碱基, 形成 R 酶 KRzS; 另一种是长反义序列, 上游 288 个碱基, 下游 507 个碱基, 形成 R 酶 KRzL。

另作两种阴性对照, 一是 TRzL, 含虫体磷酸丙糖异构酶 mRNA 的两个片段, 上游 324 个碱基, 下游 380 个碱基; 二是反义 KRR1, 仅有 KRR1 mRNA 的反义片段而无 R 酶功能区。应用荧光实时定量 PCR 方法检测嵌合型锤头状核酶体外对 KRR1 基因体外转录体 RNA 切割活性, 结果显示 KRzS、KRzL 体外转录体对 KRR1 基因体外转录 RNA 的切割效率显著, 分别达到 74.0% 和 81.1%, 而对照组几乎无切割活性, 表明锤头状核酶对目的基因 mRNA 的特异有效切割结构要素为核酶两端必须携带反义目的基因序列, 其长度对切割效率似乎影响不大。本试验为以后进行体内犬贾第虫病毒介导的锤头状核酶对 KRR1 基因表达抑制试验提供了参考依据。

参 考 文 献

- [1] Adam RD. Biology of *Giardia lamblia* [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 447-475.
- [2] Xin DD, Wen JF, He D, et al. Identification of a *Giardia* krr1 homolog gene and the secondarily anucleolate condition of *Giardia lamblia* [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22: 391-394.
- [3] Ghosh S, Ghosh R, Das P, et al. Expression and purification of recombinant *Giardia* fibrillarlin and its interaction with small nuclear RNAs [J]. Protein Expr Purif, 2001, 21: 40-48.
- [4] Narcisi EM, Glover CV, Fechheimer M. Fibrillarlin, a conserved pre-ribosomal RNA processing protein of *Giardia* [J]. J Eukaryot Microbiol, 1998, 45: 105-111.

[5] Chen LF, Li JH, Zhang XC, *et al.* Establishment of *in vitro* cultivation of *Giardia canis* trophozoites infected with *Giardia canis* virus [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24: 261-265. (in Chinese)
(陈丽凤, 李建华, 张西臣, 等. 犬贾第虫携病毒株体外纯培养的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24: 261-265.)

[6] Chen LF, Li JH, Zhao YP, *et al.* *Giardia canis* virus transfection vector-mediated expression of green fluorescent protein in the parasite [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25:36-40. (in Chinese)
(陈丽凤, 李建华, 赵月平, 等. 犬贾第虫病毒转染载体介导的绿

色荧光蛋白在犬贾第虫体内的表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25:36-40.)

[7] Zheng XF. RNA Experimental Technique Manual [M]. Beijing: Science Press, 2004. 203-205. (in Chinese)
(郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 203-205.)

[8] Dan M, Wang AL, Wang CC. Inhibition of pyruvate-ferredoxin oxidoreductase gene expression in *Giardia lamblia* by a virus-mediated hammerhead ribozyme[J]. Mol Microbiol, 2000, 36: 447-456.

(收稿日期: 2007-03-09 编辑: 富秀兰)

文章编号:1000-7423(2007)-04-0284-01

【病例报告】

间隔十年后安吉县报告当地感染间日疟 4 例

陆锦明, 王珊红

中图分类号: R531.31 文献标识码: D

2006 年 10 月 4~24 日, 浙江省湖州市安吉县发生一起当地感染疟疾疫情, 共发现间日疟病例 4 例, 报告如下。

1 病例

病例 1, 女性, 59 岁, 杭垓镇磻溪村农民。2006 年 9 月 20 日患者不适, 卫生服务站按“感冒”治疗 3 d。9 月 28 日出现不规则发热, 镇卫生院门诊以“呼吸道感染”治疗 3 d。10 月 2 日到县人民医院检查, 血常规: WBC $1.3 \times 10^9/L$, 血红蛋白(Hb) 87 g/L, 血小板(PLT) 32×10^9 。X 线胸片检查: 两肺纹理增多, 按“肺部感染”, 返回镇卫生院治疗, 给予抗菌消炎和对症治疗, 制作血涂片, 10 月 4 日经安吉县疾病预防控制中心镜检确诊为间日疟。此为 2006 年安吉县首例疟疾病例。患者近 1 个月无外出、输血和供血史, 家庭成员及居住地附近无疟疾患者。但 8 月份安徽省宁国县的亲戚曾来家暂住 20 余天, 离开 1 个月该例患者发病。结合临床症状及实验室检验结果, 判定为当地感染。给予氯喹/伯氨喹 8 天疗法, 未再发热, 第 3 天出院。一周后复查血片, 阴性。

病例 2, 女性, 49 岁, 杭垓镇桐坑村农民。2006 年 10 月 9 日因发热就诊, 村卫生室以“感冒”治疗。15 日 10 时再次出现高热, 反复发热 1 周, 发热前有寒战, 入住镇卫生院诊治。给予抗菌消炎和对症治疗, 制作血涂片, 经安吉县疾病预防控制中心镜检确诊为间日疟。用氯喹/伯氨喹 8 天疗法, 服药当天体温开始下降, 症状消退, 出院。患者距上述病例 1 居住地约 5 km, 但无接触史。既往无疟疾病史, 近 1 个月内无外出、输血和供血史。家庭成员 1 个月内无发热史。家中不使用蚊帐, 平时用驱蚊剂。确诊为当地感染。

病例 3, 男性, 10 岁, 杭垓镇桐坑村学生。2006 年 10 月 14 日发热, 卫生服务站以“发热、感冒”治疗 3 d, 后转镇卫生院以“发热待查”治疗。10 月 18 日出现高热住院, 先有寒战, 后发热 5 d。给予抗菌消炎和对症治疗, 经安吉县疾病预防控制中心镜检确诊为间日疟。用氯喹/伯氨喹 8 天疗法, 服药当天体温开始下降, 症状消退, 出院。患者与病例 2 相距约

2 km, 流行病学情况与病例 2 相似, 但近 1 个月曾有安徽省广德县亲戚到家做客住宿一晚。确诊为当地感染。

病例 4, 男性, 43 岁, 杭垓镇高村农民。2006 年 10 月 11 日起隔天发热、寒战, 连续 6~7 次。23 日镇卫生院以“发热待查”治疗, 镜检疟原虫阴性。24 日再次出现高热、寒战, 镇卫生院给予抗菌消炎和对症治疗, 血涂片复查, 经安吉县疾病预防控制中心镜检确诊为间日疟。用氯喹/伯氨喹 8 天疗法, 服药当天体温开始下降, 症状消退, 出院。患者距前 3 病例居住地均远于 5 km, 无接触史。根据相似的流行病学条件判断, 确诊为当地感染。

2 讨论

浙江省湖州市安吉县杭垓镇已连续 10 年未发生疟疾。本次检出的 4 例间日疟病例, 均有较典型的临床症状, 均未能及时确诊。按照流行病学调查结果判断, 均为当地感染。表明当地仍然存在传播疟疾的条件。

随着社会发展, 人口流动频繁, 传染源的输入、输出亦随之增多。发生病例的杭垓镇与安徽省广德县、宁国县交界。2005 年安徽省出现疟疾大面积暴发流行, 1~8 月报告 5 743 例, 发病率为 0.89/万^[1]。湖州市各县区近年来均有数例来自安徽省的输入性疟疾病例发生。因此, 做好流动人口的疟疾监测, 特别是来自疟区人员的监测和管理, 尤其重要。

安吉县作为浙江省疟疾重点监测县, 今后应当进一步加强“三热病人”(疟疾、疑似疟疾、不明原因发热)血检, 加强防治疟疾知识宣传培训及督导、检查。做到及时发现、及时治疗。

参 考 文 献

[1] Hu LQ, Jin XL, Zhao CL, *et al.* Epidemiological survey on malaria in the provinces of Jiangsu, Shandong, Henan, Anhui and Hubei in 2004-2005 [J]. Pub Hlth Preven Med, 2006, 17 (4): 54, 57. (in Chinese)
(胡乐群, 金小林, 赵长磊, 等. 苏、鲁、豫、皖、鄂 2004-2005 年疟疾流行病学调查分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17 (4): 54, 57.)

(收稿日期: 2006-12-04 编辑: 富秀兰)