

文章编号: 1000-7423(2004)-04-0256-01

对恶性疟原虫 FCC1/HN 分离株 AMA-1 序列变异的见解

钱锋, 张龙兴, 潘卫庆

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

恶性疟原虫 FCC1/HN 分离株 (FCC1/HN) 是 1977 年 6 月由北京生物制品研究所在海南省昌江县采集并建立体外培养, 现已被我国多个研究室体外传代培养、广泛使用。本文通过 FCC1/HN 裂殖子顶端膜抗原 (AMA-1) 序列变异, 讨论其存在的不同克隆问题。

1 恶性疟原虫 AMA-1 第 1 区域序列

FCC1/HN 的 AMA-1 第 1 区域第 1 种序列引自文献 [1] (本文称为 FCC1*)。用 PCR-克隆测序法测序: 提取 FCC1/HN 染色体 DNA, PCR 扩增 AMA-1 第 1 区域的 DNA 片段, 克隆入测序质粒, 转化大肠埃希菌, 挑选 3 个有插入片段的阳性菌落进行测序。FCC1/HN 分离株 AMA-1 第 1 区域第 2 种序列引自文献 [2] (GenBank 序列号: AF277003, 本文称为 FCC1**), 同上述方法测序。4 株海南省恶性疟原虫分离株 (HN25, HN26, HN30, HN38) 和 3 株云南省恶性疟原虫分离株 (YN17, YN20, YN25) 的 AMA-1 第 1 区域序列引自内部资料。

2 恶性疟原虫 AMA-1 第 1 区域序列比较

FCC1* 与 FCC1** 的 DNA 序列比较, 在第 619 位, 前者是 G、后者是 T, 其余位置碱基相同, 这一碱基变换使 FCC1* 氨基酸序列第 207 位的天冬氨酸 (D) 变换为 FCC1** 的酪氨酸 (Y)。第 207 位 D/Y 变换也出现在其他的海南和云南的恶性疟原虫分离株的 AMA-1 氨基酸序列中 (图 1)。碱基和氨基酸残基位置参照文献 [2]。

FCC1*	RHFYKDNKDYKKNLDELTLCS
FCC1**	-----Y-----
HN25	-----Y-----
HN26	-LL-----ED-----
HN30	-LL-----ED-----
HN38	-LL-----ED-----
YN17	--L-----D-----
YN20	-----D-----
YN25	-----D-----

图 1 恶性疟原虫海南株及云南株 AMA-1 第 1 区域部分氨基酸序列

3 对 FCC1/HN 的 AMA-1 序列变异的见解

恶性疟原虫分离株, 往往由表现出不同生物活性的克隆组成, 体外传代培养的 FCC1/HN 也不例外。通过有限稀释法从 FCC1/HN 获得的 2 个克隆间 [3], 氯喹的半数抑制量 (ID₅₀) 有显著性差异。用 1 组抗恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (MSP1) 的单克隆抗体对 FCC1/HN 及 2 个克隆进行间接荧光反应, 获得了不同的反应谱 (表 1), 表明 2 个克隆的氨基酸序列有差异, 并使表位发生变异, 才导致不同的间接荧光反应谱。泰国分离株 (Thai) 不同克隆之间 MSP1 序列也存在差异 [4]。既然 FCC1/HN 包含不同的克隆, 并且不同克隆的 MSP1 存在差异, 所以 FCC1/HN 不同克隆之间的 AMA-1 序列也可能存在差异。FCC1* 和 FCC1** 的测序采用 PCR-克隆测序方法。一般而言, 如果分离株中存在优势克隆 [5], 则从分离株中提纯的染色体 DNA 大部分将来自优势克隆; 以这种染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 来源于优势克隆的 PCR

产物将在扩增产物中占据相当高的比例, 这使得优势克隆序列被测定到的概率远大于非优势克隆。

表 1 FCC1/HN 及其克隆对抗 MSP1 单克隆抗体的间接免疫荧光反应

	抗 MSP1 单克隆抗体			
	10.3	12.1	12.2	13.2
FCC1/HN 分离株	++	++	+	+
克隆 1-B6	+	+	+	-
克隆 1-C6	++	+++	+++	+

注: 抗 MSP1 单克隆抗体 6.1~9.5 各项数据均为阴性

据此, 作者推测, ① FCC1* 和 FCC1** 序列应是两个不同实验室 FCC1/HN 中优势克隆的 AMA-1 第 1 区域序列。在不同实验室, 由于培养条件不同, FCC1/HN 中的优势克隆和非优势克隆可能发生了变换, 或者说不同克隆之间的数量对比发生了改变, 原优势克隆降格为非优势克隆, 而原非优势克隆上升为优势克隆, 从而造成不同实验室测到的 AMA-1 序列发生差异。不清楚的是哪些实验室因素可造成优势与非优势克隆之间相对数量发生消长。② 另有一种可能是 AMA-1 基因发生突变, 但是在实验室无免疫压力下无性传代的分离株发生基因突变, 并且突变株成为优势克隆, 这样的可能性远小于前一种推断。

恶性疟原虫分离株由不同的克隆组成, 以往认为这是由于个体被多次反复感染造成。但近年的工作表明, 单次感染的恶性疟原虫也是由数量众多的不同克隆组成 [5], 这些克隆虽然存在遗传相关性, 但它们的一些基因型和表型是不同的, 推测可能是在蚊体内发生了基因重组, 是疟原虫对感染的不同个体的适应。作者认为, 在疟疾流行区, 如果同一分离株感染不同个体, 为适应生存, 虫体不同克隆间可能发生数量消长, 致使这一地区分离株的表现类型发生多样化, 并且这一多样化可始终处于动态之中。感染一个个体的分离株如果含有不同的克隆, 对于疟疾疫苗而言, 只要对其中一个克隆不起作用, 哪怕是弱势克隆, 都有可能使该疫苗失去对这一个体的效果。FCC1/HN 在国内获得广泛使用, 已有多个基因序列被测定。但必须认识到这些基因序列可能只是 FCC1/HN 中的一个克隆的序列 (优势克隆)。如果不同克隆的序列有差异, 则影响分离株不同克隆数量消长的任何因素都有可能使分离株序列的表现类型发生变异。

参 考 文 献

- [1] 聂本勇, 张龙兴, 潘卫庆, 等. 恶性疟原虫 AMA-1 基因变异区在大肠杆菌中的诱导表达[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19: 198-200.
- [2] 单志新, 余新炳, 李荣学, 等. 恶性疟原虫海南株 AMA-1、Pfs230 基因的序列分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(5): 19-24.
- [3] 徐荻, 管惟滨, 瞿逢伊. 恶性疟原虫的克隆化及克隆株某些生物学特性的初步观察[J]. 第二军医大学学报, 1992, 13: 29-33.
- [4] Holder AA, Lockyer MJ, Odink KG, et al. Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites[J]. Nature, 1985, 317: 270-273.
- [5] Druilhe P, Daubersies P, Patarapotikul J, et al. A primary malarial infection is composed of a very wide range of genetically diverse but related parasites[J]. J Clin Invest, 1998, 101: 2008-2016.

(收稿日期: 2004-01-27 编辑: 富秀兰)

作者单位: 第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433