

恶性疟原虫红内期不同发育阶段 PfRON4 基因转录水平分析

曹俊^{1,2}, 金子修³, 高琪^{1*}, 周华云¹, 夏超明², 诸葛洪祥², 坪井敬文⁴, 鸟居本美⁵

【摘要】 目的 分析恶性疟原虫棒状体颈部蛋白 4 基因 (PfRON4) 在红内期不同发育阶段的转录水平。方法 用山梨醇结合等渗细胞分离液 (Percoll) 对实验室体外培养的恶性疟原虫进行均一化处理, 收集间隔为 6 h 不同发育阶段的疟原虫, 提取 RNA。根据 PfRON4 基因及相关基因 (PfAMA1 和 PfRhopH2) 的序列设计特异性引物, 构建标准质粒并制作标准曲线, 对 PfRON4 及相关基因的 mRNA 进行定量检测分析。结果 纯化并同步后的疟原虫生长发育较为同步均一, 用于定量分析的标准曲线相关性较好, PfRON4、PfAMA1 和 PfRhopH2 的相关系数 (r 值) 分别为 -1.00、-0.98 和 -0.98。产物熔解曲线分析结果均显示为单一波峰。定量分析结果显示, 在恶性疟原虫红内期发育过程中, PfRON4 基因的转录水平在裂殖子入侵红细胞后 36~40 h (即成熟裂殖体阶段) 达到高峰。结论 恶性疟原虫 PfRON4 基因在成熟裂殖体阶段高表达。

【关键词】 恶性疟原虫; PfRON4; 实时定量 PCR; 转录

中图分类号: R382.312 文献标识码: A

Transcription Profile of PfRON4 Gene in Plasmodium falciparum Erythrocytic Stage

CAO Jun^{1,2}, Osamu KANEKO³, GAO Qi^{1*}, ZHOU Hua-yun¹, XIA Cao-ming¹,
ZHUGE Hong-xiang¹, Takafumi TSUBOI⁴, Motomi TORII⁵

(1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China; 2 Department of Pre-clinical Medicine, School of Medicine, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 3 Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, Japan; 4 Cell-Free Science and Technology Research Center, Ehime University, Ehime 790-8577, Japan; 5 Department of Molecular Parasitology, Ehime University, Ehime 791-0295, Japan)

【Abstract】 Objective To reveal the transcription profile of PfRON4 gene in Plasmodium falciparum erythrocytic stage. Methods P. falciparum schizonts were purified by differential centrifugation on a Percoll-sorbitol gradient, after which the released merozoites were allowed to invade uninfected erythrocytes for 4 hours before the clearance of all remaining schizonts using 5% D-sorbitol. The cultured synchronous parasites were harvested for RNA assay immediately, 24 hours later, and then at every 6th hour. PfRON4 and related genes (PfAMA1 and PfRhopH2) were amplified by real-time PCR for establishing standard curves to evaluate the copy number of genes. Results P. falciparum parasites were well synchronized. Those quantitative analyses were reliable because the R value of standard curves were more than 0.98 and the melting curve showed a single peak. When parasites were in the schizont stage, PfRON4 gene transcription reached a peak in 36-40 hours after invasion. Conclusion The transcription of PfRON4 peaks at mature schizont stage, suggesting that the PfRON4 gene may involve in erythrocyte-invasion of P. falciparum.

【Key words】 Plasmodium falciparum; PfRON4; Real-time PCR; Transcription

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30700695, 30872214) and the Natural Science Fund of Jiangsu Province (No. BK2008109)

* Corresponding author, E-mail: gaoqi54@hotmail.com

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30700695, 30872214); 江苏省自然科学基金 (No. BK2008109)

作者单位: 1 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064; 2 苏州大学医学院基础医学系, 苏州 215123; 3 日本长崎大学热带病研究所, 长崎 8528523; 4 日本爱媛大学无细胞技术研究中心, 松山 7908577; 5 日本爱媛大学分子寄生虫教研室, 松山 7910295

* 通讯作者, E-mail: gaoqi54@hotmail.com

疟疾是当今世界严重的传染性疾病之一^[1],也是危害我国人民身体健康和生命安全的重要传染病^[2]。红内期疟原虫在入侵新的红细胞前,裂殖子直接暴露于机体免疫系统,是疟原虫生命周期中最薄弱的环节之一,因此成为研究红内期疫苗的主要靶点。如能揭示疟原虫入侵红细胞的机制并鉴别相关的蛋白分子,就可制定相应的干预措施,从而控制疟原虫在人体内的发育增殖。

最近在刚地弓形虫的研究中,用蛋白质组技术分离得到一组新的棒状体颈部蛋白(TgRON),并发现其部分成员可与顶端膜蛋白抗原1(TgAMA1)形成复合体,在入侵宿主细胞过程中起关键作用^[3-5]。恶性疟原虫基因组数据库中也存在棒状体颈部蛋白基因的同源基因(PfRONS)。而且,Alexander等^[6]在恶性疟原虫的棒状体颈部发现TgRON4的同源基因——恶性疟原虫棒状体颈部蛋白4基因(PfRON4),且发现PfRON4蛋白可与恶性疟原虫顶端膜蛋白抗原1(PfAMA1)形成复合体。因此,PfRON4蛋白很可能和PfAMA1蛋白一起,在恶性疟原虫入侵宿主细胞的过程中起重要作用。目前尚不清楚PfRON4基因在红内期的转录和表达情况。因此,本研究通过对恶性疟原虫PfRON4基因及其相关基因的定量检测,来了解红内期不同发育阶段疟原虫中PfRON4基因转录水平的变化,从而为进一步研究该基因的功能提供信息。

材料与方 法

1 主要试剂及仪器

2×QuantiTect 反应混合物、定量 PCR 试剂盒(QuantiTect SYBR green I)、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒(QIAprep Spin Miniprep)均购自荷兰 Qiagen 公司,大肠埃希菌(E. coli)DH5α和 pGEM-T 载体购自美国 Sigma 公司,TA 克隆试剂盒购自美国 Progma 公司, RNA 抽提试剂 TRIzol LS 和反转录试剂 Superscript III 购自美国 Invitrogen 公司,实时荧光定量 PCR 仪(Light Cycle 480)为德国 Roche 公司产品,普通 PCR 仪(Mastercycler)为德国 Eppendorf 公司产品,紫外分光光度计(GeneQuant 1300/100)为美国通用公司产品。

2 疟原虫培养及同步处理

恶性疟原虫克隆株 HB3 按照常规条件在实验室进行体外培养^[7]。采用等渗细胞分离液(Percoll)非连续密度梯度离心法纯化疟原虫^[8],将收集的富含裂殖体的疟原虫继续培养 4 h,用 5%山梨醇进行同步化处理后继续培养^[9],并于同步后第 24 h 开始,每 6 h 收集 1 次,

各取 1 ml 于 -80 °C 冻存备用,同时取少量涂制薄血膜,吉氏染色后显微镜下观察疟原虫生长发育情况。

3 总 RNA 的抽提和反转录

取 250 μl 冷冻的恶性疟原虫(红细胞压积为 2%,疟原虫密度约 3%)加入 750 μl TRIzol LS,混匀。按 TRIzol LS 试剂使用说明提取总 RNA,进行 DNA 酶处理,用紫外分光光度计检测其吸光度(A₂₆₀/A₂₈₀值),检验 RNA 纯度并计算其浓度。反转录采用随机引物法,按 Superscript III 试剂使用说明操作,获得的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。

4 标准质粒的构建

根据目的基因 PfRON4 及相关基因(PfAMA1 和 PfRhopH2)的序列,分别设计特异性引物(表 1)。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, DNA 凝胶回收试剂盒割胶纯化 PCR 产物。TA 克隆法将 pGEM-T 载体与纯化后的 PCR 产物连接并转化感受态的 E. coli DH5α。筛选重组质粒,经测序进一步确认。挑选确认的重组质粒,进行大量制备,用质粒抽提试剂盒抽提,紫外分光光度计准确定量,并进行梯度稀释,作为标准品, -20 °C 保存备用。

表 1 荧光定量 PCR 引物
Table 1 Oligonucleotide sequence for real-time PCR

目的基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列 Oligonucleotide sequence
PfRON4	fRON4.qF	5'-cttttacatttattgatagatgtaaacc-3'
	fRON4.qR	5'-tatatggctagcagggtgttgctg-3'
PfAMA1	fAMA1.qF	5'-ggaagaggacagaattattggaac-3'
	fAMA1.qR	5'-cctgaatcttctgtgtgatgtatg-3'
PfRhopH2	fRhopH2.qF	5'-gtaacaacacttactaaggcagact-3'
	fRhopH2.qR	5'-gtacaagactacaatattgttagatct-3'

5 定量 PCR 测定及溶解曲线分析

定量 PCR 的反应体系为 2×QuantiTect 反应混合物 5 μl, cDNA 模板 4.5 μl, 10 pmol/μl 上、下游引物各 0.5 μl。反应条件为 95 °C 15 min; 92 °C 15 s, 55 °C 15 s, 68 °C 7 s, 共 60 个循环。循环结束后进行溶解曲线分析。在同一次反应中,设置标准质粒反应组(4 个浓度分别 4×10⁶、8×10⁴、1.6×10³ 和 32 copies/μl),所有反应设 3 个重复。用实时荧光定量 PCR 仪 Light Cycle 软件,根据质粒标准品建立标准曲线,计算待测样品中各目的基因的拷贝数。

结 果

1 处理后不同时期的疟原虫

光镜下观察不同时间收集的恶性疟原虫样品，发现同一时间样品的疟原虫形态高度一致。其中，纯化后大部分原虫为晚期滋养体或裂殖体，经山梨醇同步化处理后均为环状体，培养 24 h 后均为早期滋养体，30 h 后为晚期滋养体，有的疟原虫细胞核已开始分裂；36 h 后均为成熟裂殖体；42 h 后部分裂殖体已破裂，裂殖子入侵新的红细胞；48 h 后所有裂殖子均已入侵新的红细胞并发育为环状体（图 1）。

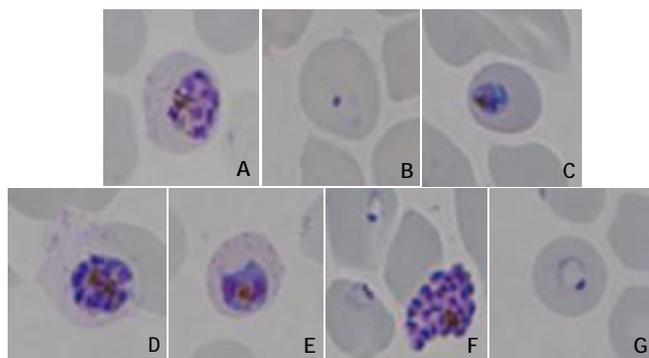


图 1 山梨醇同步化处理后不同时期疟原虫形态
Fig. 1 Plasmodium parasites at different stages of sorbitol treatment

2 标准曲线

配套软件根据标准质粒的测试结果自动绘制以初始浓度（拷贝数）的对数（log concentration）为 X 轴，初始循环数（cycle number）为 Y 轴标准曲线，PfRON4、PfAMA1 和 PfRhopH2 基因标准曲线的相关系数（r）分别为 -1.00、-0.98 和 -0.98，表明所得的标准曲线线性关系良好。

3 熔解曲线分析

PfRON4、PfAMA1 和 PfRhopH2 基因的熔解曲线分析结果均显示为单一峰，熔解温度（melting temperature, Tm）分别约为 71.8、75.5 和 74.5 °C，熔解温度均一，峰形较锐利，表明反应中未产生特异性产物。同时，制备标准质粒时 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果亦显示只有单一条带，由此双重确认了 PCR 产物的特异性。

4 定量分析结果

结果显示，PfRON4、PfAMA1 和 PfRhopH2 基因的转录水平均在入侵红细胞后 36~40 h 为最高（图 2）。

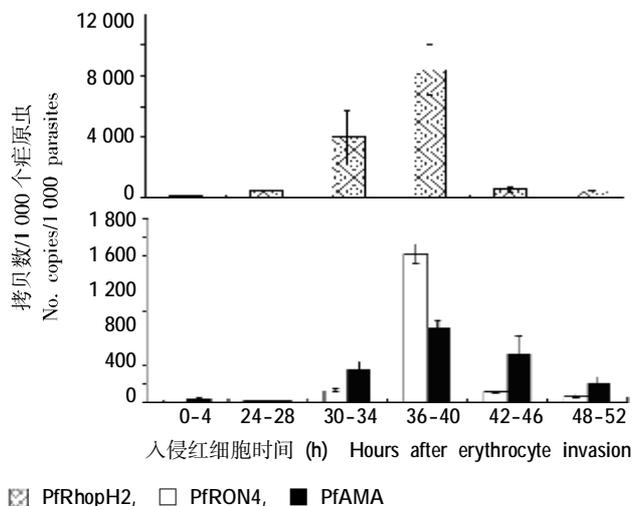


图 2 不同发育阶段红内期疟原虫 PfRON4、PfAMA1 和 PfRhopH2 的转录水平

Fig.2 Transcription level of PfRON4, PfAMA1 and PfRhopH2 in Plasmodium falciparum erythrocytic stage

讨 论

恶性疟原虫红内期体外连续培养技术的建立^[7]，为恶性疟分子生物学和免疫学研究提供了丰富的样品，大大促进了相关研究的进展。但要对某一发育阶段的原虫进行研究，获取同步发育的疟原虫仍较困难。本研究采用 Percoll 密度梯度离心纯化结合山梨醇同步化的方法对原虫进行“均一化”处理，先后收集到富含晚期滋养体和裂殖体的疟原虫，继续培养 4 h 后再用 5% 山梨醇同步化处理，杀死未入侵红细胞的原虫。继续培养的原虫均为两次处理间入侵红细胞，即仅有 4 h 的“窗口期”，从而得到相对发育较均一的疟原虫，然后进行不同时期转录水平的比较研究。观察不同时间点所收集的疟原虫，发现各个时间点的疟原虫形态非常统一，从而证实该方法有效，可获得均一的样品，用于进一步研究。

裂殖子顶端膜抗原 1（AMA1）广泛分布于顶复门寄生虫中，并行使着类似的功能——在入侵宿主细胞中起关键作用。恶性疟原虫裂殖子顶端膜抗原 1（PfAMA1）的单克隆抗体和多克隆抗体都能抑制体外培养疟原虫入侵红细胞^[10,11]，在自然感染者血清中提取的抗 AMA1 抗体亦有此抑制作用，鼠疟模型也证实抗 AMA1 抗体具有免疫保护力^[12]，因此，AMA1 成为目前最具潜力的红内期疟疾疫苗候选抗原之一。但由于 PfAMA1 在入侵红细胞过程中的具体生物学功能尚不清楚，在一定程度上阻碍了其在疫苗研究中的进展。而最近对刚地弓形虫的研究表明，AMA1 蛋白和

棒状体颈部蛋白 TgRON4 和 TgRON2 能免疫共沉淀, 在刚地弓形虫入侵宿主细胞的过程中, 它们分布在弓形虫和宿主细胞的联结部位, 并随着入侵过程后移, 直至虫体完全进入宿主细胞而消失。认为 TgRON4 与 TgAMA1 和 TgRON2 共同参与该“移动连接 (moving junction)”的构成^[4,5]。而 TgRON4 的同源基因 PfRON4 在恶性疟原虫棒状体颈部的发现, 以及 PfRON4 和 PfAMA1 同样形成复合体的现象^[6], 提示在疟原虫体内可能也存在类似的情形。最近, 本课题组在恶性疟原虫成熟裂殖体提取物中, 检测到 PfRON4、PfRON2 和 PfAMA1 形成免疫复合体^[13]。因此, PfRON4 很可能与 PfAMA1 和 PfRON2 一起, 在恶性疟原虫入侵宿主细胞的过程中起重要作用。本研究通过对 PfRON4 基因的转录水平分析, 发现它和其他棒状体蛋白 PfRhopH2 和 PfRON2^[13]转录谱类似, 在裂殖体时期水平较高, 而 PfAMA1 也是在成熟裂殖体时期达到高峰, 与推测相吻合: 它们在裂殖子中表达并在入侵红细胞过程中起关键作用。但最近对约氏疟原虫的研究发现, 其同源基因 PyRON4 的特异性抗体并不能产生免疫保护作用^[14]。因此, RON4 能否作为疟疾疫苗候选分子尚需进一步研究。

综上所述, 本研究首次对恶性疟原虫 PfRON4 及其相关基因的 mRNA 进行定量检测, 发现 PfRON4 的转录水平在成熟裂殖子阶段达到高峰, 因此可能在疟原虫裂殖子中表达, 从侧面证实了 PfRON4 在疟原虫入侵红细胞过程有重要的作用, 但其具体的生物学功能, 以及其与 PfRON2 和 PfAMA1 的相互作用机制, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Snow RW, Guerra CA, Noor AM, et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria [J]. *Nature*, 2005, 434(7030): 214-217.
- [2] Zhou SS, Wang Y, Tang LH. Malaria situation in the People's Republic of China in 2006 [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2007, 25(6): 439-441. (in Chinese)
- [3] Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, et al. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(40): 34245-34258.
- [4] Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, et al. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion [J]. *Cell Microbiol*, 2005, 7(12): 1823-1833.
- [5] Alexander DL, Mital J, Ward GE, et al. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles [J]. *PLoS Pathog*, 2005, 1(2): 17.
- [6] Alexander DL, Arastu-Kapur S, Dubremetz JF, et al. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii* [J]. *Eukaryot Cell*, 2006, 5(7): 1169-1173.
- [7] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture [J]. *Science*, 1976, 193(4254): 673-675.
- [8] Tharavanij S, Prasertsiriroj V. Simultaneous preparation of merozoites and concentrated schizonts of *Plasmodium falciparum* [J]. *Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth*, 1981, 12(4): 518-524.
- [9] Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture [J]. *J Parasitol*, 1979, 65(3): 418-420.
- [10] Crewther PE, Matthew ML, Flegg RH, et al. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(8): 3310-3317.
- [11] Deans JA, Knight AM, Jean WC, et al. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen [J]. *Parasit Immunol*, 1988, 10(5): 535-552.
- [12] Narum DL, Ogun SA, Thomas AW, et al. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(5): 2899-2906.
- [13] Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, et al. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites [J]. *Parasitol Int*, 2009, 58(1): 29-35.
- [14] Narum DL, Nguyen V, Zhang Y, et al. Identification and characterization of the *Plasmodium yoelii* PyP140/RON4 protein, an orthologue of *Toxoplasma gondii* RON4: the cysteine-rich domain does not protect against lethal parasite challenge infection [J]. *Infect Immun*, 2008, 76(11): 4876-4882.

(收稿日期: 2008-09-16 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2009)-03-0209-01

【消息】

新书《食源性寄生虫病图释》出版

我国当前寄生虫病流行的新特点, 是肠道线虫病危害大幅度下降, 而食源性寄生虫病呈迅速增长的态势。为此, 原卫生部寄生虫病专家咨询委员会副主任委员林金祥等专家, 集数十年积累的食源性寄生虫病原实物标本照片及防治工作的实际经验, 编辑出版了《食源性寄生虫病图释》。全书共 133 页, 收入彩图 860 幅, 有食源性寄生虫病的病原形态特征、传播媒介、终宿主等照片, 并附有简短的文字说明。本书的亮点是通过阅览, 能全面掌握各种食源性寄生虫病的生活史、识别各期病原形态特征、临床症状表现、诊治要点和食品病原的检查方法。全书分总论、各论, 总论介绍食源性寄生虫病定义、种类, 食物与寄生虫、寄生虫与人及动物的关系, 寄生虫对人的危害, 食源性寄生虫感染人方式, 食源性寄生虫种类。各论按不同的食物源, 依次介绍鱼源性、肉源性、贝类、甲壳类、蛙、蛇、昆虫类和植物源性寄生虫病, 是一本图文并茂、通俗易懂, 集科学性、可读性与一体, 雅俗共赏的专业参考书与科普宣教书。该书是高校教学、科研和疾病预防控制、卫生监督等单位的重要参考书, 也适合基层专业人员防治和科普宣教之用, 可供卫生监督人员、临床医务人员、疾病预防控制工作者工作中参考。本书已由人民卫生出版社出版, 定价 63 元。