

分子生物学技术在我国寄生虫学研究中的应用

刘 尔 翔

(中国协和医科大学)

寄生虫学的基础是形态学。过去用肉眼、光学显微镜,进而发展到亚细胞结构的电子显微镜观察,为种和某些株的鉴定提供依据。由于寄生虫受外界的影响不断地产生变异,因时间不同及地理的隔离,寄生虫出现了地理株。这些小的变异株,在亚细胞结构水平上,是很难区分的,给株的分类造成困难,需要更细致的方法加以鉴别。在形态学的基础上,过去开展了寄生虫生活史、生化、寄生虫与宿主间关系的研究。随着自然科学的发展,新的学科如寄生虫免疫学、寄生虫药理学等综合学科得到相应的发展。但这些学科都是处于细胞水平,说明了寄生虫学的一些现象,不能由机理上加以明确的阐述。近年来,分子生物学迅速发展,可以由蛋白、核酸等的分子水平了解寄生虫株间的差异,寄生虫之间在进化过程中的相互联系,和寄生虫全部生活史中各环节的分子结构和功能,可以更深入地、更广泛地理解寄生虫学,是寄生虫学研究的新方向。

本综述的材料,大部分来自寄生虫学会的大会学术资料^[1,2],有关染色体的研究请参考有关综述^[3],本文着重介绍分子生物学技术用于研究一些重要人类寄生虫的资料。

一、分子生物学方法在寄生虫分类学上的应用

(一) 中华按蚊类型问题

1. 同功酶谱分析 蒋成山等(1983)比较中华按蚊和嗜人按蚊8种同功酶谱间的差异,

其中只有酯酶图谱二者有明显差异。许龙善等^[1]也获得同样结果。叶炳辉等^[2]比较徐州、宜兴、福州和海口四地区中华按蚊的5种同功酶图谱。用PAGE分离时均无显著差异,用等电聚焦(IEF)分离则4株按蚊的酯酶图谱有区别。而在1988年^[4]进一步研究河南鸡公山的中华按蚊,与前比较,其酯酶带的差异(见图1)。

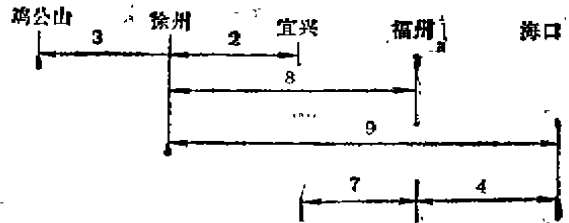


图1 五个不同地点中华按蚊酯酶带差异数

河清等^[1]比较北京、哈尔滨和南宁中华按蚊雌蚊酯酶图谱,发现有差异:哈尔滨标本有18条,其中4条为主带;南京标本有15条,其中5条为主带;南宁标本有23条,主带有4条。

2. 虫体蛋白质双向电泳分析 叶炳辉等^[2]比较中华按蚊与嗜人按蚊幼虫的双向蛋白电泳谱,发现二龄幼虫时,二者分布不同的肽点占肽点总数的33.6%;四龄幼虫时,差异肽点占22.3%。他们又比较无锡与郑州中华按蚊成虫的蛋白电泳,发现无锡株有142个肽点,郑州株有144个肽点,差异肽点占12.2%^[3-4]。河清等比较北京、哈尔滨和南宁中华按蚊成虫蛋白图谱的差异(见图2)。

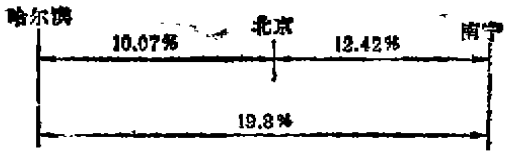


图2 不同地点中华按蚊成虫蛋白图谱的差异率

根据叶炳辉实验室的结果,用蛋白双向电泳分析的结果与同功酶的结果符合,但前者更细致更全面。这些结果都说明不同地理株的中华按蚊存在着差异。地理位置相距愈远,差异愈大。

3. 内切酶图谱分析 (RFLP) 李本文等(1988)用三种内切酶(Hae III, Bgl II Pst I)比较5种中华按蚊亚群蚊种的 RFLP。结果表明在同一蚊种内,不同发育时期,不同性别,三种内切酶图谱相同,但在5种不同中华按蚊亚群间 HaeIII 和 BglII 的 RFLP 有明显区别, Pst I 图谱则大体相似。在嗜人按蚊的广西株与无锡株 RFLP 之间比较,则 Bgl II 和 Pst I 图谱相似,而只有 Hae III 图谱有明显差异,说明种间 DNA 的差异大,株间的差异小。

4. DNA 探针杂交 李本文(1988)将上海株中华按蚊的 DNA 用 Pst I 消化,电泳分离,切取 0.78 kb 带 DNA,用 ³²P 标记作为 DNA 探针,与多种蚊虫 DNA 杂交。结果发现此探针与嗜人按蚊无锡株和广西株的 3.6kb 带出现杂交。与其他中华按蚊亚群的蚊种如凉山按蚊,小宽按蚊出现的杂交带不同,分别为 0.9kb 带及 4.1, 4.9kb 带。该探针与白纹伊蚊和肺吸虫的 DNA 不杂交。此结果说明采用合适的 DNA 探针,可以区分不同的蚊种,甚至蚊株。

(二) 肺吸虫分类问题

1. 同功酶谱分析 侯颖春等(1987)比较卫氏与小睾肺吸虫的苹果酸脱氢酶(MDH)谱,两种肺吸虫均有2条带,迁移率有差别。

2. 蛋白带电泳分析 侯颖春等(1987)用 PAGE 平板法比较卫氏、斯氏和小睾肺吸虫的蛋白带,认为三种均有区别。沈一平(1987)等

比较卫氏、斯氏和三平正肺吸虫的蛋白带。用 PAGE 法,卫氏及斯氏约有 21 条带,各有 5 条主带,其中有 3 条相近。三平正有 16 条带,4 条主带,其中有 3 条与上 2 种不同。当用 IEF 法时卫氏与斯氏的主带是一致的,而三平正的差异较大。因此由蛋白带的分析,可以看到三种肺吸虫的亲缘关系。

3. 内切酶图谱分析 王恩荣等^[4]比较 2 倍体与 3 倍体卫氏并殖吸虫的差异。应用 7 种内切酶,只有 Pst I 及 Dde I 酶切的片断有差异,其他所用内切酶的结果却均相同。作者认为 2 倍体和 3 倍体肺吸虫的 DNA 相似处较多,尚不宜订为独立种。

(三) 人蛔虫与猪蛔虫的差异

1. 同功酶的比较 罗仲金等(1988)报告人和猪蛔虫的乳酸脱氢酶(LDH 酶)图谱相同。黄跃进等(1987)认为除 LDH 酶图谱相同外,MDH 酶谱也相似。酯酶谱,人蛔虫有 4 条带,猪蛔虫有 5 条带。

2. 蛋白分析 黄跃进等(1987)用 PAGE 法分析带型,两种蛔虫无差别。罗仲金等(1987)对两种蛔虫 17 种氨基酸相对百分含量作了比较,认为没有明显区别。曹伟等(1987)用三种不同的电泳方法比较两种蛔虫体壁的蛋白带,结果见表 1。

表 1 猪蛔虫与人蛔虫体壁蛋白带的分析

蛔虫种类	PAGE	SDS-PAGE	等电聚焦
猪蛔虫体壁	13	18	9
人蛔虫体壁	11	16	10

综上所述,人蛔虫和猪蛔虫的蛋白成分有些差别,如能使用双向蛋白电泳分析,可能会更深入地加以比较。另外对两种蛔虫的核酸分析,黄跃进等(1987)认为两种蛔虫的 DNA 含量无差别,但此结果尚有待进一步探讨。

(四) 不同猪囊虫株间的比较研究

1. 同功酶分析 刘国章等(1987)对 LDH 和 MDH 同功酶图谱进行了比较,猪囊尾蚴和细颈囊尾蚴均有 5 条带,但迁移率有差别。连建安等(1987)用 LDH 图谱比较猪囊虫囊液、

头节和全囊,发现三者出现带数不同,囊液有一特异的带。在脂酶图谱中,三者无明显区别。

2. 蛋白电泳分析 连建安等(1988)用PAGE法分析囊液,头节及全囊的蛋白带,数量分别为15、15和16条。三者各有4条主带,其中一条三者都有。囊液中则有三条特异的主带,头节和全囊有三条共有的主带。当用IEF法分析时,三者的带数分别为28、34和34条。囊液有一条特异的主带,头节和全囊有三条特异主带。

3. RFLP分析 李齐等^[1]比较猪细颈囊尾蚴和5个猪囊尾蚴不同地理株的DNA经6种RFLP图谱分析,发现猪细颈囊尾蚴与5株猪囊尾蚴明显不同,而天津、哈尔滨、兰州、沈阳和郑州5个地理株的猪囊尾蚴的RFLP相似而有差异,其中郑州株的差异明显。

4. DNA探针分析 李齐等(1988)^[1]将哈尔滨株用Hind III酶水解得5.5kb和1.9kb片断,分别标记后作为探针与其他地理株杂交,结果两探针均不与猪细颈囊尾蚴或郑州株猪囊尾蚴杂交。5.5kb探针能与其他4个地理株杂交。1.9kb探针在与天津、兰州及沈阳株杂交时显示差异。以上实验结果,说明猪囊尾蚴可能存在不同的地理株,尤其是郑州株猪囊尾蚴。

(五) 利什曼原虫株间的比较

1. 同功酶分析 许焯燮等^[8-9]用10种同功酶分析我国利什曼原虫分离株。在5株由人分离的内脏利什曼中,4株与*Leishmania infantum*相似,1株与*L. donovani*相似。1株由豚分离的利什曼原虫与*L. infantum*相似。大沙鼠利什曼原虫与上述利什曼原虫均不同。

2. 蛋白分析 瞿靖琦等(1987)用斑点/单抗/ELISA法区分我国利什曼虫株,认为可以区分新疆荒漠株和平原株、山东株和北京株。

3. DNA杂交法 吕洪刚等^[10]用内切酶切开并标记的动基体DNA(kDNA)作探针,用Southern blot杂交法分析利什曼原虫分离株。结果用EcoRI酶切,³²P标记的四川人株杜氏利什曼DNA片断,42℃时能与四川人及犬利什曼原虫DNA杂交,但在65℃时只能与

人利什曼而不与犬利什曼杂交,估计两株的同源性为49—72%。他们又用k-DNA斑点杂交法区分不同地理株。用上述标记的四川人利什曼DNA探针,与四川人利什曼株和新疆荒漠型利什曼株杂交最强;与四川犬、甘肃人利什曼株杂交次之;与山东、江苏及新疆平原型利什曼株杂交弱;与蜥蜴利什曼原虫杂交甚弱。

(六) 丝虫地理株成虫间的比较 黄蕙芬等^[11]分析了5个不同马来丝虫地理株(福建建阳株,安徽泾县株,四川乐山株,贵州独山株和贵州荔波株)间蛋白及同功酶的差别。用PAGE法比较,5株无明显蛋白带的区别。用7种同功酶分析,其中5种的结果相似,而MDH和磷酸葡萄糖异构酶的酶谱有差别。5株的主带均相同,但次要带,贵州的两株与其他三株不同。

二、分子生物学在寄生虫诊断上的应用

(一) 应用单克隆抗体进行检测

1. 瞿靖琦等(1987)用斑点/单抗/ELISA法检测自然感染的白蛉体内利什曼原虫,5只均呈阳性。胡孝素等^[12]用以测黑热病人血清中的循环抗原,51例病人中,48例为阳性;183例正常人血清均为阳性;184例其他疾病病人的血清均为阳性。

2. 冯瑞元等(1988)用同样方法测肺吸虫病人血清中的抗原,共测16例,15例为阳性。50例正常人均均为阳性;22例血吸虫,19例肝吸虫病人均为阳性;35例间日症病人中,有2例为阳性。

3. 王秀珍等(1987)用单抗-ABC-AST法测92例间日症病人血清中抗原,结果血检阳性病人的血清中94.57%为阳性,115例健康人血清中,4.35%为阳性。

4. 高琪等(1988)^[13]用多抗-全血-单抗-ELISA法测31例海南岛恶性疟病人血中疟原虫抗原,90.3%为阳性;江苏恶性疟病人16例,15例为阳性(93.8%);正常人25例,有一例为阳性。周伟生(1987)用单抗制备抗独特型兔血清,用以检测培养的恶性疟原虫抗原,结果表明可检出1个原虫/10⁵红细胞,特异性好。

5. 严自助等^[1]用单抗测病人血清中血吸虫循环抗原, 敏感度为 1ng/ml, 阳性率为 83.3%。

6. 郑惠君等 (1987) 用多抗-血清-单抗-ELISA 法测血中有丝虫微丝蚴病人血清中的抗原, 阳性率可达 92.9—95.1%; 晚期患者达 51.9—6.92%; 非流行区正常人血清 49 例中有 2 例为阳性 (4.1%); 蠕虫感染 30 例均为阳性。

7. 石佑恩等^[2]选用特异性单抗在 Western blot 中确定分子量为 31/32 k α 带为日本血吸虫特异抗原, 再用此法检测各种寄生虫病人血清中的抗体, 以能与 31/32 k α 带呈阳性反应者为日本血吸虫抗体阳性。查 35 例血吸虫病人, 均为阳性; 30 例正常人为阳性; 其它寄生虫病如班氏丝虫 (5 例), 旋毛虫 (5 例), 猪囊虫 (5 例), 疟原虫 (10 例) 均为阳性^[3]。他们又用于现场, 并与其他方法比较, 检查 52 例血吸虫病人。此法特异性好, 与正常人及其他寄生虫无交叉, 52 例均为阳性。用血凝法检测, 只有 50 例为阳性, 且与肺吸虫, 旋毛虫病人交叉。用 ELISA 法, 敏感度与此法相同, 但与肺吸虫、旋毛虫及囊虫均有交叉, 特异性差^[4]。

(二) 应用 DNA 探针法进行检测

1. 张兆松等^[1]用光生物素标记恶性疟原虫 DNA 作探针检测培养的恶性疟原虫抗原。用全基因 DNA 探针作点杂交, 可检出 1ng 疟原虫 DNA。用重组质粒 DNA 探针作点杂交, 可检出 5ng。

2. 董茜萍等用³²P 标记恶性疟全基因 DNA, 可测出培养的恶性疟原虫, 敏感度为 1 个原虫/10⁶ 红细胞, 但有些与间日疟原虫交叉。

三、寄生虫疫苗的研究

(一) 疟疾疫苗

1. 选出能抑制疟原虫增殖的单抗, 北京生物制品所 (1983) 制备出 2 株抗恶性疟原虫的单抗, 未提纯的 10% 腹水能体外抑制恶性疟原虫的生长, 抑制率分别为 56% 及 64%。第一军医大学 (1985, 1987) 亦获得 2 株单抗, 当提纯抗体浓度为 150 μ g/ml 时, 可抑制恶性疟原虫生长, 各为 71% 及 83%。两单抗沉淀的抗

原, 分子量相同。

医科院基础所 (1984, 1986) 鉴定了三株有抑制作用的单抗及其相应抗原。单抗, McAb₃₂, 能沉淀 145、135、102 及 76 k α 抗原, 抗原分布于红内期各时期, 包括配子体。此单抗与恶性疟原虫、间日疟原虫、卵圆疟原虫、两种猴疟及约氏鼠疟均交叉, 同时与世界各地 (泰国、非洲、新几内亚、中美、海南岛、江苏及四川) 的恶性疟原虫分离株亦都交叉。McAb₃₂ 浓度为 200 μ g/ml 时可阻断裂殖子入侵红细胞达 52.0%; 浓度为 100 μ g/ml 时, 可抑制恶性疟原虫生长的 96.0%。单抗 McAbC₂ 可沉淀的抗原分子量为 82 及 41k α 。抗原位于棒状体内, 是恶性疟原虫特异的抗原。当单抗浓度为 200 μ g/ml 时, 可阻断 52.9% 裂殖子入侵红细胞。第三个单抗 McAbD₃, 能沉淀 185k α 蛋白, 位于裂殖子表面, 是恶性疟原虫特异的。当浓度为 50 μ g/ml, 单抗能阻断 76.7% 的裂殖子入侵红细胞; 100 μ g/ml 时可抑制恶性疟原虫生长的 95.4%。

2. 用基因重组及克隆方法获得保护性特异抗原。医科院基础所^[5]建立了我国海南岛 FCC₁/HN 株恶性疟原虫的 cDNA 库及 DNA 库, 由 cDNA 库中用单抗 32 及 C₂ 选出表达它们抗原的克隆, 并对表达上述抗原的 cDNA 进行 DNA 序列分析, 进一步确定单抗 32 的相应抗原决定簇是由 4 个氨基酸组成。但将提纯 32 融合蛋白, 在小鼠体内进行免疫原性测定时, 表明免疫原性弱。

(二) 血吸虫疫苗 刘述先等^[6]由日本血吸虫体内提取 mRNA, 初等建成 cDNA 库。

四、小 结

1980 年以后, 我国开始用分子生物学方法研究寄生虫学。最初多从寄生虫的同功酶或蛋白质分析种株间的差别, 近二、三年来开始使用内切酶图谱及 DNA 探针, 由核酸来分析, 以图解决过去一些重要传播媒介或组织内寄生虫的变异问题, 获得了一些线索, 还需要进一步深入比较分析。在实际应用方面, 分子生物学方法

为寄生虫诊断及疫苗的制备,提供了新的途径,并已取得一些成果,将对寄生虫病的防治起一定的作用。

参 考 文 献

- [1] 中华预防医学会医学寄生虫学会学术交流会议论文摘要特辑 1988 中国寄生虫学与寄生虫病杂志增刊。
- [2] 石佑恩等 1988 日本血吸虫成虫 31/32 KD 诊断蛋白: 与血吸虫单抗和病人血清的免疫印斑反应 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 6: 245。
- [3] 叶炳辉等 1985 不同地理株中华按蚊同工酶和糖、脂、蛋白质的比较研究 寄生虫学与寄生虫病学杂志 3: 161。
- [4] —— 1985 无锡和郑州中华按蚊蛋白质多肽点的比较研究 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 6: 311。
- [5] 刘国章 1989 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 7: 128。
- [6] 刘述先等 1988 日本血吸虫信使核糖核酸的分离和鉴定 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 6: 186。
- [7] 李文禄等 1986 三株抗恶性疟原虫抑制性单抗 (32, C₂, D₁) 的鉴定 中国医学科学院学报 8: 430。
- [8] 吕洪刚等 1988 用分子杂交技术分析不同种株利什曼原虫动基体 DNA 同源性 华西医科大学学报 19: 217。
- [9] —— 1988 光敏生物素标记 K-DNA 打点杂交鉴定利什曼原虫种株 华西医科大学学报 19: 222。
- [10] 黄惠芬等 1988 5 个地理株周期型马来丝虫成虫蛋白和同工酶电泳分析 中国寄生虫病防治杂志 1: 17。
- [11] 程勤等 1989 恶性疟原虫红内期 cDNA 库的组建及克隆的筛选 生物工程学报 5(2): 92—96。
- [12] 胡孝素等 1988 Kala-azar infected serum circulating-antigens and their characteristics detected by monoclonal antibodies C. M. J. 101:1.
- [13] 许焯燦等 1984 The characterization by isoenzyme electrophoresis of Leishmania isolated in the People's Republic of China. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78:689