

学校编码: 10384
学号: 21620131152563

分类号__密级__
UDC__

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

疟原虫 ApiAP2 转录因子基因家族的系统
功能分析

Systematic Analysis of ApiAP2 Transcription Factor Gene
Family in the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii*

赵伊华

指导教师姓名: 袁 晶 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

疟疾是疟原虫 (*Plasmodium spp.*) 感染导致的蚊媒传染性疾病, 疟原虫生活周期复杂, 经历了多宿主和多细胞形态的转化, 每一步都需要精确地基因时空表达调控, 转录因子介导的 DNA 转录水平的调控起到重要作用。

ApiAP2 基因家族是疟原虫基因组中预测的为数极少的转录因子基因家族, 在人疟原虫和啮齿类动物疟原虫中高度保守。在顶复体亚门生物 (包括疟原虫) 和植物中, ApiAP2 基因编码蛋白均含有一个或者多个 60 个氨基酸大小的 AP2 DNA 结合结构域, 起到激活或抑制转录的作用。

之前的转录谱和蛋白质组学分析发现, ApiAP2 基因家族的多个成员在疟原虫生活周期中的不同阶段表达。因此, 作为转录因子, ApiAP2 可能贯穿整个疟原虫的生活周期并发挥精确的调控作用。迄今为止, ApiAP2 基因家族的多数基因的功能是未知的, 这些成员在疟原虫发育的不同阶段如何调控基因转录也尚未见报道。

本课题选择约氏疟原虫 17XNL 作为模型, 构建 ApiAP2 家族 26 个 AP2 基因的单基因敲除载体, 利用 CRISPR/Cas9 基因修饰技术获得单基因敲除虫株。通过电击转染加药筛选敲除型虫株, 经多次转染和 DNA 水平 PCR 鉴定, 共有 18 个 AP2 基因能够被敲除, 并通过稀释法获得了 18 个能够被敲除的 AP2 基因的单克隆虫株。8 个 AP2 基因在红细胞期不能被敲除, 表明这 8 个基因对于疟原虫红期发育起重要作用。

本研究选择了两个成员基因 AP2-1 和 AP2-7, 对其单基因敲除单克隆虫株进行了完整生活周期表型的定量分析。

结果表明, AP2-1 敲除型虫株在无性增殖阶段的红细胞期发育正常, 雌雄配子体产生的数量均在正常范围内, 配子体被按蚊吸食后在按蚊中肠内正常发育。AP2-1 敲除型虫株血饲后 8 天卵囊数量与野生型相比没有差异, 但是血饲 15 天后无唾液腺孢子产生。进一步分析显示缺陷出现在卵囊发育阶段, AP2-1 敲除型虫株产生卵囊孢子的能力缺失, 共聚焦显微镜观察 11 天和 13 天的卵囊孢子, AP2-1 敲除型虫株均无明显可见的卵囊孢子产生。蛋白水平检测 CSP 表

达，western blot 结果显示在卵囊中早期发育过程中 CSP 不受 AP2-1 影响，正常表达。这些结果表明 AP2-1 调控疟原虫蚊期卵囊的发育。

AP2-7 被敲除后红细胞期疟原虫正常增殖，雌雄配子体发育正常，雌雄配子体被按蚊摄入体内后能够正常受精，发育形成卵囊。与野生型相比，血饲后 8 天 AP2-7 敲除型虫株卵囊数量正常，但血饲 15 天后解剖唾液腺发现 AP2-7 敲除型虫株不能产生唾液腺孢子。进一步研究表明 AP2-7 敲除型虫株卵囊孢子的数量与野生型相比没有差异，共聚焦显微镜观察 11 天的卵囊孢子也正常。这些结果表明 AP2-7 调控孢子的发育。

本研究共获得 18 个在红期能够被敲除的 AP2 基因，进一步获得单基因敲除的单克隆虫株，初步揭示了 ApiAP2 基因家族 2 个成员的生理功能，为构建疟原虫生活周期的转录表达调控网络奠定基础，也为疟疾的防控提供新思路和新方向。

关键词：疟疾寄生虫；转录调控；ApiAP2 基因家族

Abstract

Malaria is a mosquito-transmitted disease caused by *Plasmodium* parasites infection. The *Plasmodium* parasite resides in the alternative vertebrate and mosquito host, developing within several different kind of host cells or tissues during the life cycle. To complete this complex life cycle, precise regulation of gene expression is guaranteed, in which the transcription factor mediated gene transcription plays an important role.

The ApiAP2 gene family is one of the few predicted transcription factor protein families. These genes are highly conserved in both human and rodent malaria parasite. In apicomplexa and plants, AP2 proteins function as either transcription activators or repressors, usually containing at least one AP2 DNA-binding domain.

Previous studies using transcriptome and proteomics method indicated the ApiAP2 members expression in different stages during the parasite life cycle, which is implicated that different member of AP2 gene family functions as major regulators of gene expression in *Plasmodium* development. The functional role that each ApiAP2 gene playing in the biology of the parasite largely remains to be determined.

In this study, we explored the function of 26 member of ApiAP2 gene family in the rodent malaria parasite model *P.yoelii* 17XNL strain via reverse genetic strategy with newly developed CRISPR/Cas9 method.

Cas9-based vectors for gene deletion were constructed for each gene member. Transfection and drug selection strategy were used to obtain the gene knockout strain. In total, 18 AP2 genes could be genetically disrupted. Through several independent transfection effort, the others indicated refractory to be gene deleted, which suggested that these gene function are essential in parasite asexual intra-erythrocytic stage. Dilution method was applied to achieve gene knockout single clone strain of the 18 AP2 genes.

Two member, AP2-1 and AP2-7 genes were chosen to be analysed for the

possible phenotype through the whole life cycle.

AP2-1 gene knockout strain was not necessary for parasite proliferation in the red blood cell stage but was essential for formation of oocyst sporozoite. Gametocytes were as normal as wild type and oocyst number had no difference on day 8 after blood feeding. But there were no salivary gland sporozoites when mosquitoes were dissected on day 15. Further analysis showed that the discrepancy appeared in oocyst development phase. No visible oocyst sporozoite was observed on day 11 and day 13 using confocal microscopy after blood feeding. Western blot analysis showed protein expression of CSP was normal. All of these results suggested AP2-1 plays a central role in gene regulation of the oocyst sporozoite stage.

AP2-7 gene knockout strain was not necessary for parasite proliferation in the red blood cell stage but was essential to sporozoite gliding motility and invasion. The knockout strain replicated normally in the blood, developed into ookinetes and infected the mosquito midgut. The number and sizes of oocysts formed in the midgut were essentially the same as in the wild type. In the salivary gland, however, sporozoites were not observed. Nuclear staining with Hoechst33342 showed that oocyst sporozoites developed normally 11 days after blood meal in AP2-7 knockout as in wild type parasites. All of these results suggested AP2-7 plays an important role in gene regulation of the hemocoel sporozoites invasion stage.

18 AP2 genes knockout mutants were conducted in our study. Furthermore, the gene knockout single clone strains were obtained. This initially revealed the role of 2 transcription factor in ApiAP2 family. These results will lay the foundation of constructing the transcription regulation networks throughout the parasite life cycle, and also provide new ideas and a novel direction for preventing malaria.

Key words: Malaria parasite; Transcription regulation; ApiAP2 gene family

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
第一章 前言.....	1
1 疟疾.....	1
2 疟原虫生活史.....	2
2.1 在人体内的发育.....	2
2.2 在按蚊体内的发育.....	5
3 影响疟原虫蚊期发育的基因.....	5
3.1 配子体发育 (gametogenesis) 和动合子形成.....	6
3.2 动合子入侵中肠上皮细胞.....	7
3.3 动合子向卵囊转化.....	7
3.4 卵囊的发育和子孢子的分化.....	7
3.5 子孢子释放进入按蚊血腔和入侵唾液腺.....	8
4 啮齿类动物疟原虫.....	10
5 疟原虫中的 ApiAP2 转录因子基因家族.....	11
5.1 概述.....	11
5.2 研究进展.....	13
6 疟原虫转染与基因修饰.....	17
7 本研究的目的和意义.....	20
第二章 疟原虫 ApiAP2 转录因子家族基因敲除模型构建.....	21
2.1 引言.....	21
2.2 实验材料与方法.....	22
2.2.1 实验材料.....	22
2.2.2 实验方法.....	24
2.3 实验结果.....	30
2.3.1 ApiAP2 基因敲除原理示意图.....	30
2.3.2 通用载体酶切.....	31
2.3.3 DNA 水平 PCR 检测 ApiAP2 基因实现成功敲除.....	32
2.3.4 DNA 水平 PCR 检测 ApiAP2 基因成功获得单克隆.....	35
2.4 讨论.....	38
第三章 约氏疟原虫转录因子 AP2-1 对卵囊子孢子发育的影响.....	40
3.1 引言.....	40
3.2 材料与方法.....	40
3.2.1 实验动物与虫株.....	40
3.2.2 约氏疟原虫按蚊媒介感染步骤.....	41
3.2.3 斯氏按蚊感染后解剖.....	41
3.2.4 Western Blot 检测卵囊 CSP 表达.....	42
3.2.5 Hoechst 33342 染核鉴定卵囊子孢子的发育.....	43

3.3 实验结果.....	43
3.3.1 Δ AP2-1 配子体及蚊期表型初步分析.....	43
3.3.2 Δ AP2-1 卵囊尺寸和卵囊孢子数量分析.....	48
3.3.3 Δ AP2-1 卵囊发育分析.....	49
3.3.4 Western Blot 检测 CSP 表达.....	51
3.4 讨论.....	51
第四章 约氏疟原虫转录因子 AP2-7 对唾液腺孢子发育的影响.....	53
4.1 引言.....	53
4.2 材料与方法.....	53
4.2.1 实验动物与虫株.....	53
4.2.2 实验方法.....	53
4.3 实验结果.....	54
4.3.1 Δ AP2-7 配子体及蚊期表型初步分析.....	54
4.3.2 Δ AP2-7 卵囊尺寸和卵囊孢子数量分析.....	58
4.3.3 Δ AP2-7 卵囊发育分析.....	59
4.4 讨论.....	60
第五章 总结与讨论.....	62
参考文献.....	63
附表.....	69
附表 1. ApiAP2 基因家族同源重组模板分子克隆引物.....	69
附表 2. ApiAP2 基因敲除载体的靶向序列.....	71
附表 3. PCR 鉴定引物.....	73
附表 4. 缩略语及中英文全称.....	75
图表索引.....	78
攻读学位期间发表论文.....	79
致谢.....	80

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Contents in Chinese	V
Contents in English	VII
Chapter 1: Introduction	1
1 Malaria.....	1
2 <i>Plasmodium</i> life cycle.....	2
2.1 Development in human host.....	2
2.2 Development in <i>Anopheles</i>	5
3 Genes influenced <i>Plasmodium</i> development in mosquito.....	5
3.1 Gametogenesis and ookinete formation.....	6
3.2 Ookinete invasion of the midgut epithelium.....	7
3.3 Ookinete transform to oocyst.....	7
3.4 Oocyst development and sporozoite differentiation.....	7
3.5 Egress and invasion of the sporozoites into the mosquito hemocoel and salivary gland.....	8
4 Rodent malaria parasite.....	10
5 ApiAP2 transcription factor family in <i>Plasmodium</i>	11
5.1 Outline.....	11
5.2 Research progress.....	13
6 <i>Plasmodium</i> transfection and gene modification.....	17
7 The purpose and significance in this study.....	20
Chapter 2: Gene knockout vector construction in ApiAP2 family of <i>Plasmodium yoelii</i>	21
2.1 Introduction.....	21
2.2 Materials and methods.....	22
2.2.1 Experimental materials.....	22
2.2.2 Methods.....	24
2.3 Results.....	30
2.3.1 Schematic of ApiAP2 gene knockout.....	30
2.3.2 Digestion of pYC vector.....	31
2.3.3 PCR test of successful gain ApiAP2 genes knockout strain in DNA level.....	32
2.3.4 PCR test of ApiAP2 genes single clone in DNA level.....	35
2.4 Discussion.....	38
Chapter 3: AP2-1 influences oocyst sporozoite development in <i>P. yoelii</i>	40
3.1 Introduction.....	40
3.2 Materials and methods.....	40
3.2.1 Parasites mice and mosquito.....	40
3.2.2 <i>P.yoelii</i> blood feeding protocol.....	41
3.2.3 Mosquito dissection.....	41
3.2.4 Western Blot test of oocyst CSP expression.....	42

3.2.5 Hoechst 33342 dye to test oocyst sporozoite development.....	43
3.3 Results.....	43
3.3.1 Phenotypic analysis of Δ AP2-1 in gametocyte and mosquito stage.....	43
3.3.2 Oocyst size and sporozoite number analysis of Δ AP2-1.....	48
3.3.3 Oocyst development analysis of Δ AP2-1.....	49
3.3.4 Western Blot test of CSP expression.....	51
3.4 Discussion.....	51
Chapter 4: AP2-7 controls salivary gland sporozoite development in <i>P.yoelii</i>.....	53
4.1 Introduction.....	53
4.2 Materials and methods.....	53
4.2.1 Mice and <i>Plasmodium</i> strains.....	53
4.2.2 Methods.....	53
4.3 Results.....	54
4.3.1 Phenotypic analysis of Δ AP2-7 in gametocyte and mosquito stage.....	54
4.3.2 Oocyst size and sporozoite number analysis of Δ AP2-7.....	58
4.3.3 Oocyst development analysis of Δ AP2-7.....	59
4.4 Discussion.....	60
Chapter 5: Conclusion and discussion.....	62
Reference.....	63
Supplemental tables.....	69
Table S1. Homologous recombination template cloning primers of ApiAP2 gene family.....	69
Table S2. Target Site sequence of ApiAP2 gene knockout vector.....	71
Table S3. PCR test primers.....	73
Table S4. Abbreviations List.....	75
Index of figures and tables.....	78
Publications.....	79
Acknowledgements.....	80

第一章 前言

1 疟疾

疟疾 (malaria) 作为一种严重的传染性疾病, 与艾滋病、肺结核并列为全球三大传染性疾病。疟疾是由疟原虫 (*Plasmodium*) 感染引起的, 经按蚊 (*Anopheles*) 媒介传播的寄生虫病。目前已知的能够感染人的疟疾共有 5 种, 分别为恶性疟原虫 (*P. falciparum*)、间日疟原虫 (*P. vivax*)、三日疟原虫 (*P. malariae*)、卵形疟原虫 (*P. ovale*) 和诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*), 其中前四种疟原虫通过按蚊叮咬在人和人之间进行血液传播, 以恶性疟原虫的危害最大^[1]; 在东南亚雨林地帯, 诺氏疟原虫可以感染猴子, 携带有诺氏疟原虫的按蚊吸血后叮咬人, 可以引起人的感染^[2], 但诺氏疟原虫并不能在人之间通过血液传播。在疟疾流行地区, 疟疾的发病通常是多种虫株和虫种的混合感染^[3]。

世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 发布的《2015 年世界疟疾报告》指出, 全球共有 96 个国家和地区存在感染疟疾的风险, 欧洲地区的疟疾发病率已降至 0%, 疟疾在欧洲地区基本完全消除。据最新统计数据, 2015 年有 2.14 亿疟疾病例, 43.8 万人死亡, 与 2000 年以来的统计相比, 全球危险人群中疟疾发病率和死亡率分别下降了 37% 和 60%。撒哈拉以南的非洲地区在全球疟疾负担的比重中仍然是最高的。2015 年, 该地区占疟疾病例总数的 88%, 疟疾死亡总数的 90%, 其中 5 岁以下的儿童又占 70%^[4]。

由于经济的落后, 世界上最贫困和边缘化的国家感染疟疾的风险最高。同时这些地方医疗条件匮乏, 对疟疾的预防、诊断和治疗等知识普及面很窄, 在这些地区, 疟疾的防治面临重大挑战。在疟疾易感地区, 5 岁以下的儿童及孕妇是最容易感染疟疾的人群。孕妇感染后会出现严重的孕期贫血症^[5]、新生儿出生体重偏低、产期死亡率高^[6]等症状。

由于杀虫剂的滥用和抗药虫株的产生, 疟疾的治疗仍然面临巨大的挑战。目前仍无有效的疟疾疫苗。RTS, S/AS01 在疟疾疫苗研究领域曾被认为是一种最有前景的疫苗。5-17 个月的患病儿童在接受治疗后, 临床疟疾的抑制率达 39%, 对患有重症疟疾儿童的保护率为 31.5%^[7], 但是随着临床三期结果的公布^[8], 疫

苗研究变得更加困难。青蒿素的发现及其用于疟疾治疗的良好效果使其成为疟疾治疗药物的中流砥柱，但近年来研究发现出现了青蒿素的抗性疟原虫^[9]，严重威胁此类药物的使用。因此，目前急需新的策略来治疗疟疾。阻断疟原虫的传播（包括由脊椎动物宿主雌雄配子体向按蚊的传播和疟原虫在按蚊阶段子孢子向脊椎动物宿主的传播）至关重要，阐明疟原虫中调控这些过程的转录因子的作用可以为治疗疟疾提供新的策略。

目前我国境内本土感染疟疾病例的情况罕见报道，疟疾的防控也取得了重大成效。但近年来随着我国经济的高速发展，与东南亚、非洲各国经济、贸易、旅游往来的增加，大规模的人员流动和劳务输出，中国现阶段面临严重的输入性疟疾传播风险^[10]。为了进一步加快我国疟疾防治工作进程，有效预防和控制疟疾，使我国成为发展中国家率先实现基本消除疟疾目标的典范，卫生部发布了《2006-2015年全国疟疾防治规划》。中央和地方各级政府加大对疟疾防控工作的投入和支持，疟疾的传播在中国得到有效遏制。我国政府在2010年全面开展消除疟疾的工作，发布《中国消除疟疾行动计划（2010-2020年）》，提出到2015年大部分地区消除疟疾，到2020年实现全国消除疟疾的目标。

2 疟原虫生活史

疟原虫是一类真核的原生单细胞动物，属于顶复亚门（Apicomplexa）、孢子纲（Sporozoa）、疟原虫属（*Plasmodium*）。疟原虫的生活史极复杂，有脊椎动物和按蚊两个宿主。感染人的疟原虫其生活史大体相似，在人体内先后寄生于肝细胞和红细胞，进行裂体生殖（schizogony）；在红细胞内，除了进行裂体生殖以外，部分疟原虫进行有性生殖的初期发育。在按蚊体内，完成配子生殖（gametogony），之后开始孢子生殖（sporogony）（图 1-1）。

2.1 在人体内的发育

疟原虫在人体内先后经历肝细胞和红细胞的发育阶段。在肝细胞内的增殖称为红细胞前期或红细胞外期，简称红外期；在红细胞中的发育包括红细胞内无性增殖期（红细胞内期，简称红内期）和配子体的形成期^[11]。

（1）红细胞外期（Pre-erythrocytic stage）：带有子孢子的按蚊叮咬人之后，

会将孢子注入人的皮肤表层。孢子穿越真皮表层，运动迁移至血管中，随血液循环流经肝血窦，在一些肝细胞中穿梭，最终入侵肝细胞。进入肝细胞后，在肝细胞内摄取营养，形成纳虫泡（parasitophorous vacuole, PV）。孢子开始由长条形变成圆形，发育成为一个大的裂殖体，质膜内陷产生大量子代疟原虫。最终纳虫泡膜破裂，从宿主细胞内释放大量裂殖子，侵入红细胞进行下一阶段发育。

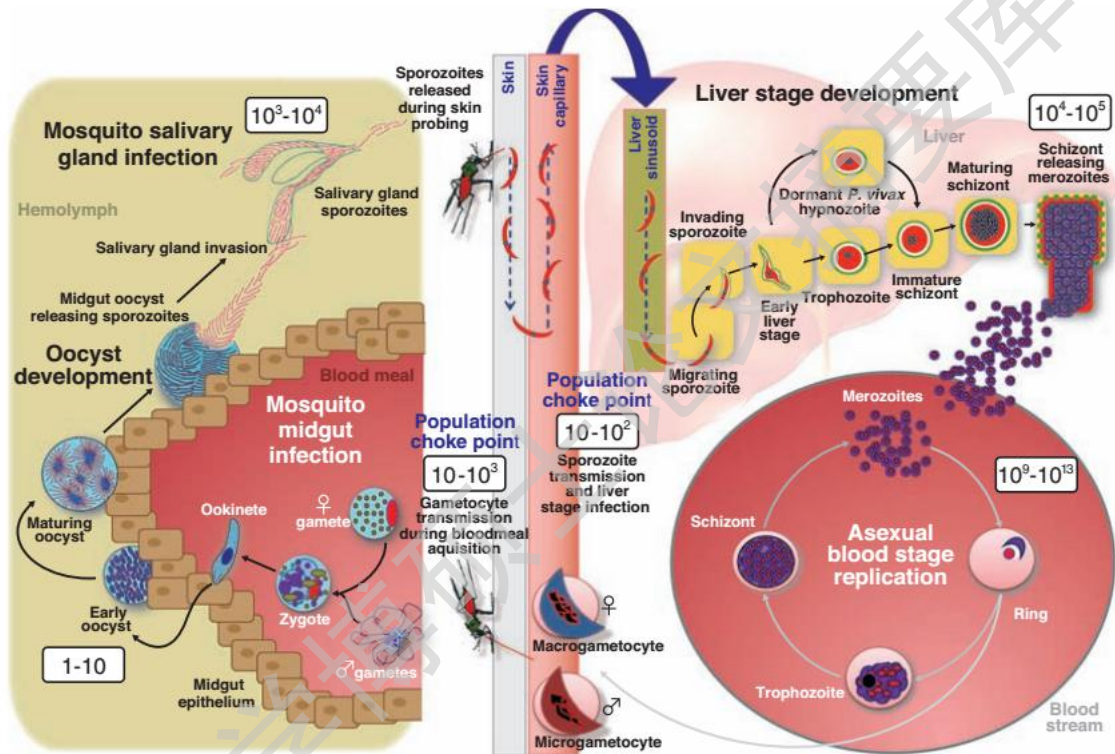


图 1-1 恶性疟原虫的生活史。

Fig 1-1 The life cycle of *Plasmodium falciparum*. (by Stefan H.I. Kappe, 2010^[12])

感染人的疟原虫有人和按蚊两个宿主。在人体内先后寄生于肝细胞和红细胞中，进行无性的裂体生殖。在红细胞中，除了无性生殖外，部分裂殖子形成配子体，开始有性生殖。按蚊吸血后配子体受精，在按蚊体内发育，形成合子、动合子，穿越中肠上皮细胞形成卵囊，卵囊进一步发育形成卵囊孢子，并入腺形成唾液腺孢子，在按蚊下一次叮咬时注入人体内，开始新一轮生活周期。

感染疟原虫后在肝期临床症状并不明显，普通抗疟药对这一阶段的疟原虫也不起作用。恶性疟原虫完成红细胞外期的时间为 6~7 天，间日疟原虫约需 8 天，卵形疟原虫为 9 天，三日疟原虫 11~12 天^[13]，啮齿动物疟原虫一般为 2~3 天。

此外，卵形疟原虫和间日疟原虫能够形成休眠子（hypnozoites），在肝脏内长期保持休眠状态，在一定诱因下重新激活并导致疾病复发。

红细胞内期（Intra-erythrocytic stage）：红外期产生的裂殖子，进入血液后很快入侵红细胞。细胞外的裂殖子随机地依附在红细胞表面，裂殖子的顶端朝向红细胞，与红细胞形成紧密的连接，在红细胞表面打孔，进而钻入其中。同时形成纳虫泡，纳虫泡在裂殖子入侵完成后封闭起来。侵入红细胞的裂殖子逐渐变大，形成环状体（ring），在这个阶段形成很大的消化空泡，对血红蛋白进行消化，形成疟原虫色素（hemozoin，简称疟色素）。之后疟原虫摄取营养，继续发育形成滋养体（trophozoite），疟色素在消化空泡中聚集。成熟的滋养体几乎占满整个红细胞，发育形成裂殖体（schizont）。裂殖体成熟后红细胞膜破裂，裂殖子被释放，大部分裂殖子再次入侵新的红细胞，重复其在红内期的裂体生殖（图 1-2）。疟疾症状的产生就在红细胞内期。完成一个周期的红内期裂体增殖，恶性疟原虫需 36-48h，间日疟原虫约为 48h，三日疟原虫为 72h，卵形疟原虫约为 48h^[15]，啮齿动物疟原虫完成一个周期的红细胞内期增殖为 18~24h。

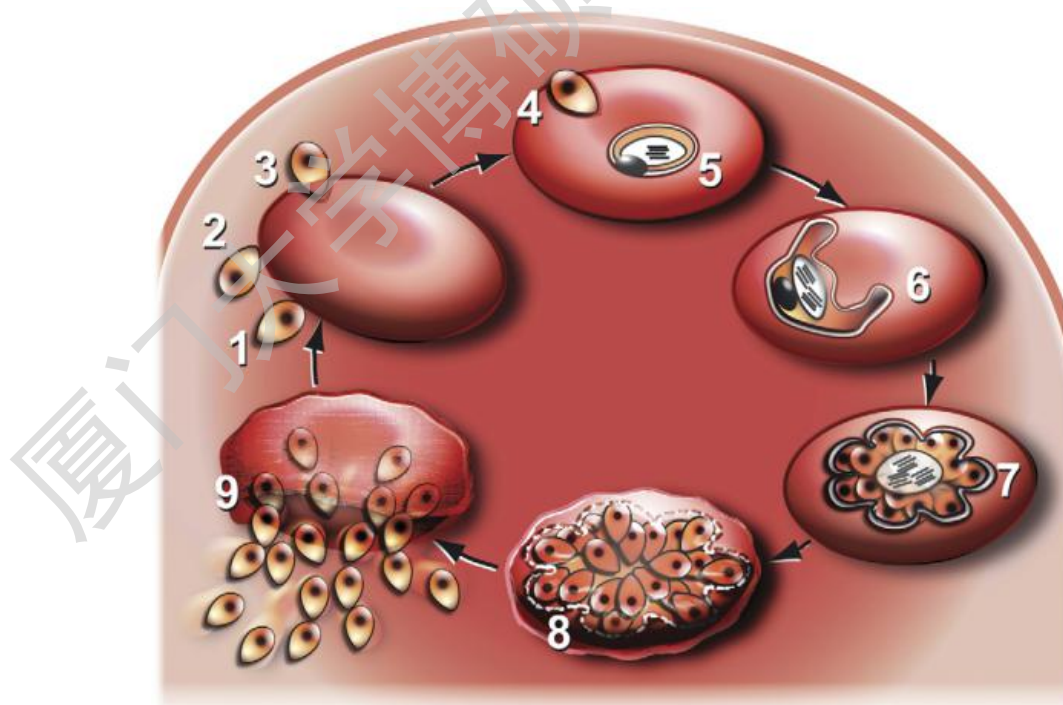


图 1-2 红细胞内期疟原虫的无性增殖。

Fig 1-2 Cycles of asexual parasite replication in intra-erythrocytic stage. (by Olivier Silvie, 2008^[14])

(2) 配子体形成: 红细胞内期的疟原虫在完成数代裂体生殖后, 部分裂殖子侵入红细胞后不再进行无性增殖, 而是转向形成雌、雄配子体, 开始有性生殖。恶性疟原虫配子体的发育主要发生在骨髓中, 成熟后才能在外周血中观察到。配子体的进一步发育需要在按蚊蚊胃中进行, 配子体在人体血液中可以存活 30~60 天^[16]。

2.2 在按蚊体内的发育

按蚊吸食带有雌、雄配子体的血液后, 配子体在蚊胃里开始有性生殖。由于温度、PH 和按蚊体内黄尿酸^[17] (xanthurenic acid) 水平的改变, 雌、雄配子体相继被激活, 发育形成雌配子 (female gamete) 和雄配子 (male gamete), 两者受精形成合子 (zygote)。合子在之后的 20-24h 内发育形成新月形的动合子 (ookinete), 动合子穿越按蚊的中肠上皮细胞到达基底侧, 开始由新月形变为圆形, 形成早期卵囊 (oocyst)。在一个按蚊的中肠内可以形成上百个卵囊, 每个卵囊内细胞核和胞质反复分裂, 进行孢子增殖, 形成上万个子孢子 (sporozoite)。子孢子成熟后从卵囊中释放, 经血腔循环到达唾液腺, 在按蚊叮咬人后注入新的宿主体内, 进行新一轮循环。

子孢子在按蚊体内可存活 70 多天, 随着时间的推移侵染能力逐步下降。不同种属的疟原虫在按蚊体内成熟的时间也不同。恶性疟原虫 10~12 天, 间日疟原虫 9~10 天, 三日疟原虫 25~28 天, 卵形疟原虫 16 天, 约氏疟原虫 14~17 天。

3 影响疟原虫蚊期发育的基因

疟原虫频繁的改变宿主栖息地以完成其生活周期, 在感染过程中由于宿主的免疫防御引起疟原虫数量的波动^[18], 为了避开宿主的免疫反应, 疟原虫选择在合适的细胞中不断地增殖^[19]。疟原虫的蚊期和肝期发育是疟原虫生活周期的瓶颈阶段, 阻断疟原虫的传播和感染可以从这两个阶段着手。近年来越来越多的研究开始关注于疟原虫的蚊期发育, 一些蚊期发育的基因也被发现。

按蚊体内子孢子的产生是一个极其复杂的过程, 包括许多不同的阶段, 需要多种基因的共同调控来完成。雌性按蚊吸食感染疟疾的人血, 将红细胞各发育时期的原虫吸入蚊胃, 除了配子体能够在蚊胃中发育, 其他各个时期的疟原虫均被

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.