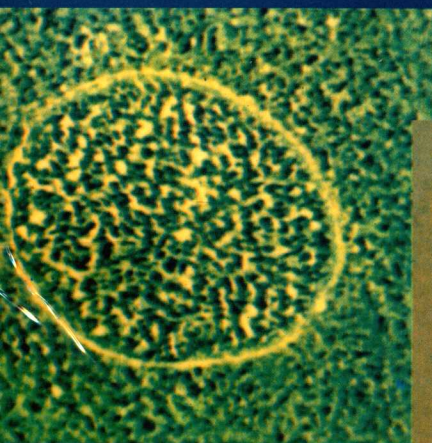




中國弓形蟲病

TOXOPLASMOSIS IN CHINA



亞洲醫藥出版社

中國弓形蟲病

TOXOPLASMOSIS IN CHINA

總編 于恩庶

主編 甘紹伯 陳觀今 沈繼龍 牛安歐

副主編 丁貞英 王崇功 楊連第 呂元聰

亞洲醫藥出版社

中國弓形蟲病

于恩庶總編

甘紹伯 陳觀今 沈繼龍 牛安歐主編

*

亞洲醫藥出版社出版發行

香港九龍尖沙咀寶勒巷 29 號寶昌商業大廈 5 字樓

發行人 孫 婷

亞洲醫藥出版社印刷廠印刷

*

開本: 787×1092 1/16

21.56 印張 510 千字

2000 年 11 月初版 2000 年 11 月第一次印刷

印數: 1—700 冊

ISBN 962-8037-33-1 定價: CNY50.00

遼寧省弓形蟲病研究情況	(245)
安徽省弓形蟲病研究情況	(248)
內蒙古自治區弓形蟲病研究情況	(255)
湖北省弓形蟲病研究情況	(258)
浙江省弓形蟲病研究情況	(264)
四川省弓形蟲病研究情況	(275)
山東省弓形蟲病研究情況	(279)
寧夏自治區弓形蟲病研究情況	(285)
湖南省弓形蟲病研究情況	(288)
青海省弓形蟲病研究情況	(294)
黑龍江省弓形蟲病研究情況	(298)
山西省弓形蟲病研究情況	(302)
海南省弓形蟲病研究情況	(306)
陝西省弓形蟲病研究情況	(307)
新疆自治區弓形蟲病研究情況	(317)
西藏自治區弓形蟲病研究情況	(322)
貴州省弓形蟲病研究情況	(324)
河北省弓形蟲病研究情況	(327)
吉林省弓形蟲病研究情況	(329)

前言

弓形蟲病在世界各地有廣泛的分布,大約有 25%~50%的人受到感染,歐洲一些地區感染率高達 80%。我國屬於低感染地區,也有 5%~10%的感染率。

我國弓形蟲的發現,在亞洲是較早的,1954 年首先從福建動物(貓、兔、豬、豚鼠、鼠類)分離到弓形蟲而得到確認,至今已有 40 年的歷史,從不認識,不重視,到今天作為一種重要寄生蟲病進行研究,說明我們的認識提高了,回顧 40 多年來的過程,是很有教育意義的。

1 我國弓形蟲病的歷史過程

1.1 初期階段

從弓形蟲發現到 70 年代中期,大約 20 多年,從事這項研究工作的單位很少,在福建分離出蟲株後,首先是建立實驗室診斷方法,當時國外使用的各種方法都建立起來了,弓形蟲的主要儲存宿主和傳染源找到了。這個期間發現兩例弓形蟲病患者,一例于 1964 年謝天華公開報道,另一例福州長樂患者住院治療好轉後出院,以後復發死亡。

為推動全國能有更多單位開展弓形蟲病工作,曾將福建分離的蟲株,分送鍾惠瀾、馮蘭洲和陳心陶教授,歡迎他們進行研究。

1.2 家畜弓形蟲病研究熱階段

從 70 年後期至 80 年代前期,豬弓形蟲病的大流行,涉及全國許多省市區,引起獸醫部門的重視,把弓形蟲病作為重點的研究和防治課題。豬弓形蟲病是上海市畜牧獸醫研究所確定的,接着江蘇省畜牧獸醫研究所做了多方面的研究工作,如包囊、卵囊的檢測,弓形蟲在活體細胞核內的繁殖情況以及家畜弓形蟲病的診斷和防治,為控制家畜弓形蟲病流行,提供了許多科學資料。

1.3 全國弓形蟲病流行病學調查階段

在 80 年代中期,由廣西自治區防疫站牽頭開展了人獸弓形蟲病的調查,有 19 個省、市、區 50 個單位,主要是防疫部門參加,檢測了人和各種動物 121 075 份標本血清,感染率平均為 5%強,分離出 37 株弓形蟲株,診治 11 例病人。調查結果指出弓形蟲病在我國並不罕見,糾正了過去的錯誤認識。

1.4 深入研究階段

從 80 年代後期起,科研單位和醫療部門開始進入弓形蟲病科研戰場,由傳統的細胞特征、生理指標,逐漸進入分子生物學的研究領域,建立起當今高新技術的各種研究手段。在弓形蟲核酸檢測及蟲株間分子水平差異性,基因體外擴張、克隆和表達等方面,均取得了不少進展,並開始了核酸免疫的研究,對脾臟 HK 細胞殺傷活性和淋巴細胞轉化率方面,顯示出一定的免疫效果。實驗診斷技術包括病原學診斷、免疫學診斷和 DNA 診斷等新技術,均達到了國際先進水平。

在臨床方面,對我國先天性弓形蟲病和獲得性弓形蟲病的臨床表現有了較深的認識,提出了初步診斷標準,開展了新藥治療研究。

病原學

1 概述

弓形蟲的整個發育過程需要兩個宿主,貓科動物,如家貓為終末宿主,在終末宿主體內為貓上皮細胞內進行無性和有性生殖。有性生殖只限貓小腸絨毛上皮細胞內,而無性生殖既可在貓小腸上皮細胞,又可在小腸外其它組織器官內進行。弓形蟲對中間宿主的選擇極不嚴格,無論哺乳類,鳥類和人都可為中間宿主。在中間宿主內只進行無性生殖,貓既是唯一的終末宿主又可作中間宿主。對組織的選擇也不嚴格,除紅細胞外,任何有核細胞都可侵犯。弓形蟲整個生活史過程包括 5 個發育期,即速殖子(tachyzoite),在假包囊(pseudocyst)內或外;緩殖子(bradyzoite),在組織包囊(cyst)內;子孢子(sporozoite),在卵囊(oocyst)內;裂殖體(schizont),包含裂殖子(merozoite);配子體(gametocyte),分雌(大)配子(macrogamete)和雄(小)配子(microgamete)。

1.1 速殖子

多呈香蕉形或新月狀,一端稍尖而末端鈍圓,大小為 $4\sim 7\mu\text{m}\times 2\sim 4\mu\text{m}$ 。掃描電鏡下為蟲體表面光滑,體側緣近胞核位置可見由表膜內陷形成的微孔(胞口)1~2 個。透射電鏡下見蟲體表膜由外膜、內膜和微管組成。外膜是典型的單位膜結構,包被整個蟲體;內膜較外膜為厚,前部有增厚的極環,後端亦具有一增厚環。膜下微管 22 根。蟲體前端為類錐體,自蟲體連續縱切面顯示,類錐體是截斷的錐狀而中空結構,微管似始于錐樣結構的後緣;自蟲體前端作連續橫切時,可見類錐體的壁呈環狀,高度嗜銀染色且結構均一,未顯示壁內有螺旋樣結構;環內可見管樣結構的斷面,似是棒狀體向蟲體前端延伸部分,類錐體部位的表膜與錐體壁之間,有數目不定的小嗜銀泡,分布不規律,是微綫體。棒狀體數目報告不一,吳增強(1994)見到 5 條,金根源等(1991)報告為 8~10 條,張蔚等(1987)看到的是 8 條。在蟲體的胞質內還可見細胞核位于後半部或中央稍近鈍端,呈圓形或橢圓形,由核膜包圍,位置不很固定的核仁。內質網呈管狀分布在整個蟲體內,相當發達;管壁外側附有許多核蛋白體,為粗面內質網。高爾基复合體由重疊平行的扁囊組成,多位于核前,扁囊壁僅一層膜,囊數可見 6~7 個。綫粒體 1 至數個常分布在核前部。還可見致密顆粒、空泡及溶酶體等。

速殖子的增殖方式主要為內二芽殖,增殖過程是:細胞核向高爾基體一側突出,分裂為二,分置于胞核兩側;在胞核附近出現兩組大小不等而對稱的半圓形體,大的為冠質膜,小的為類錐體。胞核向兩對半圓形體之間突出,在突出的部位核膜變得模糊;半圓形體不斷拉長,形成有開口的袋狀物即子細胞的雛形。母細胞的核內染色質通過開口進入細胞核中;母細胞內形成兩個完整的子細胞;母細胞蛻變、解體,分離出兩個成熟的子細胞。

于恩庶(1965)使用猴腎和乳豬腎單層細胞培養速殖子,證明在豬腎細胞中發育快,接種後 2 天即可見到細胞病變,而猴腎細胞要在第 5 天才出現細胞病變,但其繁殖蟲數却大于豬腎細

胞；用帶蟲鼠腹水 10^{-2} 接種豬腎細胞，1 天後發生病變，而接種猴腎細胞，則 4 天才出現病變。計浩(1979)採用組織細胞活體觀察的方法，從蟲體侵入細胞，至核內繁殖的全過程，觀察到蟲體核經過多次分裂，形成多核體，並與相應的原生質結合，呈現各種形式的排列群落，如橫列式、花瓣式及蜂窩狀等。此外，還觀察到速殖子也可在細胞核內繁殖。計浩等(1981)用微粒載體 Pk-15 細胞培養，能使弓形蟲繁殖量提高 400 倍。用 BHK-21 細胞旋轉培養法(8r/h)經 2 次換液，收獲蟲體可擴大 4000 倍以上。弓形蟲培養於 L-纖維母細胞、Detroid-98、HeLa、KB 和 BHK-21 等細胞，3~8 d 後出現細胞病變或脫落。Vero 細胞接種弓形蟲後 2 d，即可出現小塊細胞脫落。試驗證明，出現病變的時間與接種弓形蟲的量有關。蟲體的增殖還與細胞種類有關。陳觀今等(1985)在體外培養的兔睪丸纖維母細胞單層培養管中發育繁殖速殖子，發現在 37℃ 時，1 周細胞崩潰脫落，溫度降低可延長崩潰時間。楊秀珍等(1989)用 HeLa 細胞觀察 3 株弓形蟲速殖子生長動態。發現 RH 株速殖子與 HeLa 細胞單層接觸，只需 2 min 便可侵入；而 CN 株需 5min，ZS₂ 株和 PP 株需 10min。蟲體進入 HeLa 細胞後約需 6h 的發育遲滯期才開始增殖。RH 株增殖 1 代需 5.2h，CN 株 5.98h，ZS₂ 株是 6.78h，PP 株是 7.69h。孫新等(1995)以單核細胞 THP-1 細胞系的培養系統定量接種速殖子並加入源自蛇毒的磷脂酶 A₂(PLA₂)，以免疫熒光法和流式細胞儀檢測細胞感染率。結果表明 PLA₂ 對弱毒株速殖子侵入細胞有明顯的促進作用，在 4 株成囊株培養不同時間的檢測，其感染細胞比率均比對照有顯著提高。以 RH 株細胞培養上清(SRC)替代 PLA₂ 加入培養系統，對 3 株成囊株 4 次培養及與 PLA₂ 對照培養的觀察表明，含 SRC 的培養系統較常規培養檢出時間提前，陽性率提高，與含 PLA₂ 效果相當，提示 SRC 可作為 PLA₂ 的替代物。弓形蟲 RH 株，Prugniaud 株和 8 株源自羊水等標本的野生株速殖子，在以單核細胞 THP-1 作為受染細胞的培養系統中不同接種量其檢出時間的差異。結果表明，RH 株和 Prugniaud 株各不同接種量最早可在 1~4d 內獲陽性結果，而野生株僅 1 株可檢測到每管(2ml)10 個速殖子的接種量(第 14d)，100 速殖子接種量 6/8 株在第 14d 檢獲陽性。提示在以細胞培養進行弓形蟲病原檢測時適當延長培養檢測時間可提高陽性率。以血清抗弓形蟲抗體陽性的孕婦羊水進行細胞檢測，實驗組以 THP-1 細胞系培養並加入經離心過濾的 RH 株速殖子細胞培養上清(SRC)作為培養佐劑，在第 4~6d，第 7~10d，第 11~14d 進行 3 次檢測，對照組以 MRC5 細胞系培養，在第 4d、第 8d 進行 2 次常規檢測。結果 26 例羊水在 MRC5 組全部陰性，而 THP1 組分離出 3 株野生株，並在其後經同時接種小鼠的血清特异性 IgM 抗體和腦包囊檢測或臍血特异性 IgM 檢測所證實。提示加用 SRC 並延長培養檢測時間對提高弓形蟲感染以細胞培養作病原診斷的敏感性有顯著意義。孫新(1996)用弓形蟲 RH 株和 Prugniaud 株速殖子在成纖維細胞 MRC5 和單核細胞 THP-1 培養以 IFA 檢測結果，表明以兩種細胞系培養在較大接種量時(500 速殖子/ml)其檢測敏感性相當，而在少量接種(50/ml 和 5/ml 速殖子)則單核細胞培養較成纖維細胞敏感，檢出率分別為 60.0% 和 25.0%。前者尚有 6 例 IFA 陰性者以流式細胞儀(FCM)檢獲陽性，因而 TPH-1 組陽性率為 75.0%。提示以細胞培養進行弓形蟲病原分離時，懸浮的 THP-1 是較適宜的宿主細胞。張健寧等(1996)用電鏡觀察了弓形蟲 NT 株在猴腎細胞，人胚肺細胞、惡性膠質瘤細胞及小鼠腹水、肝臟和子宮等組織中的生長繁殖形式，計數了各種繁殖方式出現的百分率，結果顯示，大多數弓形蟲以內芽殖方式繁殖，少數為等分裂繁殖，裂殖繁殖最少見。裂殖繁殖時弓形蟲體內的子細胞生長繁殖常不是同步的。成熟的子細胞以出芽的方式脫離母體，並圍繞母體形成玫瑰花狀或蜂窩狀

等群落。三種繁殖方式在各種宿主細胞中出現的頻率各不相同，小鼠肝和子宮組織中弓形蟲等分裂繁殖較在其它細胞中少見，裂殖繁殖僅見于培養細胞和小鼠腹水中。提示宿主細胞的種類不同可能會影響弓形蟲的繁殖方式。楊秀珍等(1997)以弓形蟲 RH、PP、SH₁ 株速殖子 10^5 、 10^4 、 10^3 的接種量接種培養 24h 的 HeLa 細胞，分別維持 pH 值為 8.0、7.0、6.5 的培養條件，並適時補充 HeLa 細胞，結果可見在不同 pH 值有關條件下，3 株弓形蟲均可成囊，其成囊現象與速殖子接種量及培養基 pH 值有關，並有蟲株間差異。

吳增強(1994)用掃描和透射電鏡觀察了弓形蟲 RH 株速殖子對 HeLa 細胞和小鼠腹腔細胞的侵入，說明蟲體的侵入是一主動過程。首先是蟲體頂端復合物(apical complex, AC)部位伸長，頂端與宿主細胞密切附着，蟲體表面有收縮、扭動，有的蟲體的體部附于表面，頂端陷入宿主細胞，體表顯示收縮狀態，呈阿米巴鑽孔特征。宿主細胞與蟲體接觸局部下陷，兩者接觸附近有非組織結構成分，可能是蟲體的分泌物。剛剛進入宿主細胞的蟲體，位于納蟲泡之內，蟲體與納蟲泡壁之間有明顯間隙。弓形蟲侵入宿主細胞過程中，頂端復合物起着重要作用，其橫斷面可見環狀的結構是類錐體的壁(CW)，呈高度嗜鐵染色且結構均一；環內至少可見三個管狀結構的斷面(RT)；外圍見約 22 根微管(microtubule, MT)的切面，類錐體與微管之間，有多個小的嗜鐵泡，分布不規律，是微綫體(microneme, MN)。頂端複合物的正中縱切面，可見類錐體外壁(CM)縱切面，其內通過至達蟲體末端的管樣結構(RT)，似與其後的棒狀體(R)相連，棒狀體可見 5 個，自頂端復合物表膜下的縱切而顯示，類錐體呈截斷狀中空結構，微管的起始點似在錐樣結構的後環(或稱後極環)。同時認為類錐體壁是均一結構；所謂極環可能是橫切面所見的中空錐狀結構的斷面，類錐體中空，其內除通過細胞器(如棒狀體)的管之外，還間雜分布着許多微綫體。膜下微管是弓形蟲的主要細胞骨架，它與長軸平行分布全蟲，數目 22 條，其前端的起始部似在類錐體後末端。

計浩等(1991)用細胞培養基 0.89% TC199(日本)0.5%水解乳蛋白(Difco)、Eagle-MEM(美國、日本)培養弓形蟲 NT 強毒蟲株，經紫外綫全暴露垂直連續照射，通過細胞致弱培養篩選出抗輻射變異蟲株 NTA-Ⅱ系。該蟲對豬、兔和小鼠的毒力均明顯減弱。豬安全試驗 116 天，21 頭出現弱反應，占 18.1%，無重病及死亡；非帶蟲免疫試驗 36 頭，連續測至 128 天，均未查到蟲體包裹。用含蟲數 10^5 /ml 弱毒蟲株每頭豬接種 1ml，6 個月的免疫保護為 100%。

張健寧等(1995)用電鏡觀察了弓形蟲在人腦惡性膠質瘤細胞(HGC)，人胚肺細胞(HEPC)、人 K₅₆₂細胞和猴腎細胞(V-116)中感染和寄生狀態及受感染細胞的病理變化。結果顯示，HGC、HEPC 對弓形蟲感染率和受感染細胞含蟲數量均高于 V-116。提示中樞神經系統和胚胎細胞對弓形蟲的易感性較強。在一些超微結構損傷較嚴重的 V-116 細胞中，見弓形蟲攻擊溶解細胞核膜並進入核內寄生，可能細胞漿結構的損傷和環境的改變是弓形蟲進入細胞核的原因之一。此外，各種細胞感染弓形蟲後均可見綫粒體空泡化和髓樣變、細胞腫脹、核溶解和細胞崩解等病理變化。

王文實等(1999)以 RH、SH₁ 和 PP 3 個分離株弓形蟲速殖子，按 10^5 、 10^4 、 10^3 的接種量分別接種 HeLa 細胞，培養基的 pH 值分別為 8.0、7.0 和 6.5 進行培養。結果發現接種後 6d 速殖子的累積收穫量存在差異性，其中 SH₁ 收穫量大，RH 株次之，PP 株最少；接種量為 10^5 時，收穫量大， 10^4 次之， 10^3 最少。在培養基 pH 為 6.5 時的收穫量大，pH7 時次之，pH8.0 時最少。實驗結果顯示 pH6.5 的培養條件較適合于實驗的 3 株弓形蟲速殖子體外增殖；同時，弓形蟲的

體外增殖也與接種量及不同弓形蟲分離株有關。

王寶麟等(1992)從感染小鼠腹水內取得的速殖子,其染色體數目為 $2n=6$ 。連惟能等(1987)應用細胞電泳技術觀察弓形蟲 ZS₂ 株速殖子細胞電泳率和表面電荷密度顯示,在 pH6.0~8.0 時其電泳率為即 $-1.03 \sim -0.85 \mu\text{m}/\text{S}/\text{V}/\text{cm}$,表面電荷為 $-3615.96 \sim -4315.38 \text{esu}/\text{cm}^2$ 。在 pH7.0 條件下,經胰蛋白酶處理的速殖子電泳率與對照相比,兩組間有明顯差異,可能是由於蟲體表面陰性電離基團對胰蛋白酶敏感所致。

速殖子常見於感染宿主急性發病期的組織中細胞的納蟲泡內,常因細胞破裂而游離於細胞外。在吞噬細胞納蟲泡內含數個或數十個蟲體,這種被宿主細胞膜包裹的速殖子群落,因無囊壁而被稱為假包裹。

劉俊燕等(2000)以間接免疫酶法觀察弓形蟲(RH 株)感染時的急性期病變特點及蟲體在主要臟器的動態分布,以期為弓形蟲病的病理診斷提供依據,並對弓形蟲致病機理加深理解。

用弓形蟲 RH 株速殖子 10^3 個經腹腔感染昆明小鼠,於感染後第 2、4、6 和 8d,取肝、脾、肺和腦進行間接免疫酶染色。

蟲體首先在肝臟內被發現(第 2d),其次是脾和肺(第 4d),最後是腦(第 8d)。感染早期,肝與脾邊緣均可見蟲體且較多;隨時間延長,肝、脾與肺組織內部逐漸發現少量蟲體,分布均勻;隨病程延長,各臟器內蟲體由少增多;腦內發現蟲體最晚;小鼠體內蟲體大量增殖,病變嚴重,最終死亡。

間接免疫酶染色觀察可清楚顯示弓形蟲感染急性期的組織內弓形蟲速殖子及抗原成份。小鼠多臟器被累及如肝、脾和腦。間接免疫酶染色觀察結果提示,經腹腔感染小鼠時,蟲體播散途徑為:蟲體首先直接侵入腹腔內的器官,再通過血液循環播散,最後通過血腦屏障到達腦。

1.2 包裹和緩殖子

慢性感染宿主組織內,特別在腦及橫紋肌可找到圓形或橢圓形包裹。包裹內蟲體稱緩殖子,隨着緩殖子數目增多,其體積增大,直徑可至 $100 \mu\text{m}$ 。緩殖子較速殖子略小,含 PAS 陽性顆粒。包裹有一層具有彈性囊壁,嗜銀染色,對胃液有抵抗力。影響包裹形成的蟲體遺傳因素、宿主因素及兩者相關性等,仍有待進行研究。沈繼龍等(1991)以弓形蟲低毒力株 Beverley 株和無毒力株感染小鼠,在慢性期給予強的松龍後,可使消失的蟲血症再現,在淋巴結可持續分離到蟲體,而小鼠血清弓形蟲抗體無明顯下降。被感染小鼠內包裹密度高峰在第 3 周,攻擊感染和免疫抑制可增加 Beverley 和 Fukaya 株在小鼠腦內的包裹數。楊秀珍等(1995)研究顯示,實驗動物體內的 γ -干擾素可影響包裹的形成;速殖子接種於培養細胞單層,幾株弓形蟲幾乎都能在無免疫因素條件下形成早期包裹。

1.3 卵囊

徐秉鈺,陳觀今等(1981~1983)用含弓形蟲組織包裹喂貓,一般從感染後 5~8 天開始從貓糞中排出卵囊,持續 4~8 天。卵囊為圓或卵圓形,淡灰色,大小為 $10.7 \mu\text{m} \times 12.2 \mu\text{m}$,有一層光滑的薄囊壁。囊內充滿小顆粒,室溫($28^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$)下發育迅速,幾小時後囊內顆粒收縮成團呈圓球狀,與兩端囊壁形成半月狀空隙,24 小時發育為兩個孢子囊,囊內仍為小顆粒,其後顆粒變粗,數目不等。經 3~7 天,顆粒更粗大,常為 4~6 個及一個殘留體。劉達宏等(1983)把卵囊用瓊脂石蠟包埋法製成 $6 \mu\text{m}$ 切片,吉姆薩染色可見每個孢子囊內有 4 個新月狀子孢子,子

孢子一端尖另一端鈍，核紅染居中。解剖排出卵囊3天後的貓，從小腸上、中、下段粘膜印片，可檢查到不同發育期的蟲體，包括速殖子、裂殖體、雌雄配子體和卵囊。新排出的卵囊無感染力，在室溫下至少發育1天才有感染性。

2 病原體純化

病原體的純化是免疫及分子生物學研究的重要環節。

2.1 速殖子純化

沈繼龍等(1983)採用胰蛋白酶消化小鼠腹腔液，純化速殖子，純度達97.1%。吳增強等(1987)將感染腹水或培養的包含速殖子、假包囊和混雜細胞培養液，以胰蛋白酶進行消化後，經離心洗滌提純，這一方法可提高蟲體純度。但胰蛋白酶對速殖子表膜成分有破壞作用，已被透射電鏡觀察所證實。

沈繼龍(1991)在速殖子混懸液中，按0.01%(W/V)濃度加入植物血凝素P(phytohemagglutinin P, PHAP, Pharmacia 產品)，搖勻，25℃孵育30min。其間輕攪數次，進行離心洗滌，混懸於無菌NS中，將此懸液用0.1%NaOH煮沸清潔後的G3玻璃砂芯漏斗過濾，NS洗滌沉澱，收集沉澱物。楊揚等(1994)將感染小鼠腹水經纖維素粉柱(Cellulose Powder, CF-11, Porosity Costar 公司)過濾，取得純淨蟲體。該法與多聚碳酸纖維膜(Poly-carbonate Filter, 3 μ m, Porsity Costar 公司)濾過法相比較，前者的白細胞平均清除率為95.4%、紅細胞90.1%，蟲體回收率33.1%；而後者的白細胞清除率81.6%，紅細胞80.5%、蟲體回收率48.6%。鄭煥欽等(1993)用Ficoll-Urografin密度梯度離心法。以Ficoll-Urografin液與蟲體混懸液各5ml置於離心管內，用800r/min離心8min後加速至2000r/min離心10min後，管中形成3層，上層為細胞碎片，中層為蟲體，底層為細胞凝塊，用彎頭吸管收集中層蟲體，速殖子純度為95.0%~99.9%，收獲率為93.2%~99.3%，未發現DNA污染，該法適合於免疫學、酶學、分子生物學實驗及激光技術流式細胞儀的上機樣本制備等。

2.2 包囊的純化

沈繼龍(1991)把鼠腦置無菌碾鉢內輕磨成勻漿，混懸於NS中，分置於10ml離心管，每管3ml。用注射器從懸液底部注入淋巴細胞分離液Ficoll-paque(pharmacia 產品，批號7023)3ml，2000g×30min離心。此時試管中呈3個分離帶：上層為分離液；中層為鼠腦組織細胞；底層為包囊。小心吸出包囊，NS洗3次保存。

張愛民等(1996)對弓形蟲Fukaya株在腦組織的包囊，用Percoll密度梯度離心法和淋巴細胞分離液法進行比較。Percoll法離心後可成6層，淋巴細胞分離液法離心後可成4層(包括沉澱)，結果具有收集意義的包囊密集層為Percoll法的第3層及淋巴細胞分離液法的第1層(沉澱層)，該兩層在得率上極為接近，為46.73%~71.56%。分離所得包囊形態不變；接種小鼠均獲成功。在純淨度方面Percoll法所收集的包囊鏡檢清晰、無殘渣，而淋巴細胞分離液法鏡下則可見較多沉渣混雜。因此，對於分子生物學研究，Percoll法優於淋巴細胞分離液法。但淋巴細胞分離液法所需實驗儀器及試劑更為經濟，在純淨度要求不很高的實驗宜採用淋巴細胞分離液法。

3 生化特性與分子生物學

3.1 生化特性

楊惠珍等(1994)採用有機質譜法(GC/MS)對弓形蟲 RH、CN、RT、PP、SH₂、SH₃、SH₄、SH₅、SH₈、SH₁₀株,蟲體表膜脂肪酸的種類和含量進行觀察。實驗結果表明弓形蟲速殖子細胞膜含有 6 種主要脂肪酸,範圍在 C14~418 之間,分別為肉豆蔻酸、棕櫚油酸、軟脂酸、硬脂酸、油酸和亞油酸,而油酸和軟脂酸約占總脂肪酸的 70%(52%~84%)。SH 多個蟲株的脂肪酸含量與組分與 RH 株相一致,而 SH₄、SH₁₀與 PP 株,RT 株相似,與平行觀察的人和哺乳類動物,如人“O”型紅細胞,小鼠脾臟淋巴紅細胞和兔紅細胞膜的脂肪酸在含量和組分上均有顯著差異。

楊惠珍等(1995)採用弓形蟲特異 DNA 探針技術,聚丙烯酰胺電泳,免疫印迹試驗,色質譜分析對弓形蟲人源分離的 SH、ZS₂,豬分離的 CN、PP 株,兔源 RT 株等 11 個分離株在核酸、蛋白質、脂肪酸方面與國際代表株(RH)進行分子生化特性的比較與分析,實驗結果表明用³²P 標記弓形蟲探針(1.1kb)能與各蟲株 DNA 雜交,在 2.0kb 位點上顯示出明顯雜交帶;SDS-PAGE 電泳蛋白質分子量範圍在 1~120kD 間,以 14、18、22、30、35、37、41、43、52、76kD 為各蟲株共有的條帶;Western blot 分析,各蟲株在 30、52、76kD 均能被抗弓形蟲 IgG 識別;有機質譜儀檢測脂肪酸組分中各蟲株均有 6 種主要脂肪酸組成(C14-C18)分別為肉豆蔻酸、棕櫚油酸、軟脂酸、硬脂酸、油酸和亞油酸,其中油酸和軟脂酸占總脂酸含量的 70%,各蟲株相對含量有所差異。從實驗結果認為蛋白質組分上各蛋白區帶數和分子量的差異,脂肪酸和溶脂類的差別,可能與毒力差異有關。

梁志慧等(1995)在小鼠腹腔注射 RH 株弓形蟲速殖子 10000 個,2h 後分別灌服 5%澱粉溶液及蒿甲醚 200mg/kg,連續 8d,取腹腔液沉澱作電鏡酶化學。測定弓形蟲蟲體胞嘧啶單核苷酸酶(CMP 酶)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P 酶)的定位及用藥後 2 種酶超微結構水平上的變化。結果表明,CMP 酶定位于蟲體的溶酶體;G-6-P 酶定位于蟲體的質膜外及納蟲泡內。

3.2 基因檢測

夏愛娣等(1990)建立了弓形蟲人株(ZS₂)基因組文庫,篩選出一個弓形蟲特異 DNA 片段的克隆。該克隆的 DNA 片段(1.1kb)進行限制性內切酶譜分析。應用 Southern 印迹法及斑點印迹法檢測,結果示同位素³²P 標記的該克隆 DNA 片段能與弓形蟲 DNA,人工感染弓形蟲幼豬白細胞和胸腺 DNA、弓形蟲感染病人 DNA 雜交,但不與正常人,正常幼豬外周白細胞,正常小鼠脾臟、惡性瘧原蟲、肺孢子蟲、pBR322 的 DNA 雜交。斑點雜交檢測低限為 100 個弓形蟲或 500pg 弓形蟲 DNA。該探針應用于多種弓形蟲感染病例檢測,為特異靈敏的 DNA 診斷方法。

夏愛娣等(1992)根據實驗室篩選出的弓形蟲(ZS₂株)特異 DNA 克隆片段部分順序分析的數據,設計并合成特異的寡核苷酸引物對,建立多聚酶鏈反應(PCR)診斷弓形蟲病的方法。不同來源的弓形蟲株和 7 例畸形胎兒 DNA 經體外基因擴增,擴增產物經電泳檢測,均出現特異擴增條帶。對 42 例肝炎綜合征的嬰兒和 33 例不良生育史的孕婦外周血白細胞 DNA 檢測,

分別為 6 例和 4 例陽性,50 例正常人外周白細胞 DNA 檢測均為陰性。對擴增產物進行 Southern 印迹分析,以 ^{32}P 標記克隆的弓形蟲特異 DNA 片段為探針,能與陽性病例特異的擴增條帶雜交,而不與陰性樣品的擴增產物雜交。當與其它方法比較,顯示高度特異,敏感且快速的優點。

韋相才等(1994)將克隆的 RH 株弓形蟲核酸 TGR4 片段設計并合成了一對長度為 20bp 的寡核苷酸引物,擴增靶序列長度為 778bp,建立了聚合酶鏈反應技術檢測弓形蟲核酸的特異敏感的方法。檢測了 7 株弓形蟲及臨床疑似弓形蟲病患者樣品,均出現特異擴增帶,而其它 8 種病原體以及正常人或動物的 DNA 均未見特異擴增帶。擴增產物用地高辛標記作探針,與以上出現擴增帶的 DNA 模板能斑點雜交。而與無擴增帶的其余模板 DNA 無斑點雜交。結果顯示,該引物具有高度保守性和特異性。在含 10^5 個人白細胞中,可檢測到 2 個弓形蟲 DNA 或 1pgDNA。并通過人工感染弓形蟲鼠血樣品的檢測表明,所建立的 PCR 具有高度的敏感性,能早期檢出弓形蟲感染樣品。

石群立等(1995)運用 PCR 檢測 30 例先天畸形兒尸檢石臘包埋腦組織中弓形蟲,其中擴增後出現陽性帶者 13 例(43.3%),對照均陰性。

曹大興等(1995)應用 PCR 技術檢測 270 例孕 6~12 周婦女外周血及相應絨毛組織中的弓形蟲 DNA,結果 26 例陽性,相應絨毛組織中 8 例陽性,垂直傳播率為 30.77%(8/20)。同時用 ELISA 法檢測血中弓形蟲循環抗原(CAg)、IgM 和 IgG 抗體,陽性率分別為 3.70%、7.30%和 15.5%。IgM 和/或 CAg 陽性者,外周血均檢出弓形蟲 DNA。提示應用 PCR 檢測絨毛組織弓形蟲 DNA 結合 ELISA 法進行篩選可早期診斷先天性弓形蟲感染,較用羊水、胎兒血進行產前診斷時間提前 8~12 周,有利于盡早治療或中止妊娠。

陳曉光等(1996)根據弓形蟲主要表面抗原基因的序列,設計合成了兩對寡核苷酸片段,構建了弓形蟲特異的 PCR 檢測體系。經對弓形蟲 DNA 及人、鼠弓形蟲病的初步檢測,證明該 PCR 體系敏感性高,特異性强及適用面廣。

吳少廷等(1998)用 PCR 技術,以 Dig-11-dUTP 代替部分 dTTP 直接制備標記弓形蟲特異性 rDNA 基因片段作為探針,用于檢測弓形蟲感染。該探針和弓形蟲抽提物雜交陽性,而與惡性瘧原蟲、間日瘧原蟲、杜氏利什曼原蟲及正常人血樣核酸抽提物雜交陰性,該探針至少檢測出相當于 156 蟲數水平。結果表明 PCR 摻入法是一種簡便、有效的制備標記探針的方法,以該法制備的弓形蟲 rDNA 基因探針適用于弓形蟲感染的診斷及流行病學調查。

程彥斌等(1998)應用 PCR 技術,對弓形蟲 B1 基因的部分序列進行體外擴增,獲得 207bp 的特異性片段,并通過地高辛配基(Dig-11-dUTP)標記作為探針,通過斑點雜交試驗檢測弓形蟲核酸。實驗表明,該核酸探針能與 RH、SH₁、ZS₁、ZS₂ 及 GL₁ 株弓形蟲核酸特異性雜交,最低檢測量為 25pg 純化弓形蟲核酸。在急性弓形蟲小鼠,探針可于感染後第 2 天(24h 後),從組織(肝、脾及腎)中檢測到弓形蟲核酸。第 3 天(48h 後)可從部分小鼠(1/5)外周血中檢測到弓形蟲核酸。劉翠梅等(1998)用聚合酶鏈反應(PCR)和基因工程技術制備弓形蟲(RH 株)特異 DNA 克隆片段,以地高辛隨機引物法標記克隆的弓形蟲 DNA 片段作為探針,與淋巴結切片中核酸原位雜交試驗(ISH)檢測病理標本中的弓形蟲 DNA。結果在 32 例何杰金氏淋巴瘤(HD)和 41 例非何杰金淋巴瘤(NHL)病理標本中各有 1 例陽性,47 例慢性淋巴結炎(CL)病理標本中呈 ISH 陽性者 2 例,總陽性率為 3.3%(4/120)。研究證明探針能檢測 10pg 的 DNA,

且特异性强。甘紹伯等(1999)用 PCR 法檢測實驗感染家兔血液中 DNA 的動態變化,并以 ELISA 法檢測 CAg 進行比較。結果顯示兔感染弓形蟲後第 2 天,PCR 開始出現陽性,陽性率為 76.9%(10/13),總檢出率 100%。與 ELISA 法查 CAg 進行平行檢測,前者出現陽性時間早,陽性率明顯高于後者。

韋相才等(2000)用 PCR 方法檢測生殖道分泌物中弓形蟲 DNA,把檢測結果輸入計算機進行 SPSS 統計學處理,分析弓形蟲感染的概率。結果不孕不育組弓形蟲感染率為 18.15%,而正常生育組為 6.29%, $P<0.01$,兩組間有顯著性差異。夫妻之間感染無顯著性差異。

李爽等(2000)以 RH 株弓形蟲速殖子感染小鼠後第 2、4、6 天處死,取肝臟制備石蠟標本及冰凍切片標本,以直接法原位 PCR 擴增并檢測石蠟標本中的弓形蟲 DNA,與免疫組化方法檢測冷凍切片標本的結果相比較。18 例直接原位 PCR 法檢測標本中均陽性,病原體檢出率為 100%優于免疫組化法(11/18)。同年,以 RH 株弓形蟲速殖感染小鼠後第 2、4、6 天處死及肝臟制備石蠟標本及冰凍切片標本,以間接法原位 PCR 擴增并檢測石蠟標本中的弓形蟲 DNA,與原位雜交方法檢測冰凍切片標本比較。結果間接原位 PCR 方法檢測 18 例標本均得到陽性,病原體檢出率為 100%,優于原位雜交法(9/18)。

3.3 弓形蟲株間的抗原分子差異性

姜昌斌等(1993)報告 9 株弓形蟲強毒株速殖子,經凍融超聲粉碎後經 10000 r/min 離心,上清液經 SDS-PAGE 和免疫印迹技術(IB)。用 RH 株制備兔抗弓形蟲 IgG 為識別探針。顯示 RH 株約為 55 條區帶(銀染色),分子量範圍在 1kDa-240kDa 之間,大部分為 1kDa-120kDa,其中尤以 14、18、22、30、35、37、41、43、52、76、79 和 90kDa 區帶為主;與之相比,CN、SH₈、SH₄、SH₂ 和 SH₁ 的主要區帶皆同于 RH 株,ZS₂ 和 SH₅ 的主要區帶則另有較多相似之處;IB 分析顯示,RH 株可被 IgG 探針識別的抗原約有 20 多種。ZS₂ 約 8 種,CN 約為 15 種,SH₈ 約為 23 種,SH₅ 約 7 種,SH₄ 約 16 種,SH₃ 約 10 種,SH₂ 約 5 種,SH₁ 約 5 種;其中分子量為 30、52、76kDa 的抗原成分在各株中均存在。沈繼龍等(1990)研究 3 種毒力不同的 4 株弓形蟲(強毒株 RH、ZS₁,低毒株 Beverley 和無毒株 Fukaya)的膜抗原。以 0.5%的 Nonidet-40 為膜成分分離劑,應用 4 種血清學和 IB 技術,顯示膜蛋白中有 3 種主要抗原成分,分子量為 120、35 和 27kDa,且為所研究的蟲株共有;其中 P35 和 P27 具有很高的抗體親和力,與之相應的抗體是感染小鼠血清的主要抗體。P27 具有與 IgG 和 IgM 型抗體結合的雙重免疫反應性。誘導血清 IgG 抗體生成的抗原主要是 P35 和 P27。用部分純化的 P35 免疫小鼠,可使之獲得抗攻擊感染的部分免疫力。其後證明,P30 和 P65kDa 也是速殖子主要膜抗原分子。楊惠珍(1993)比較研究了 3 種表面活性劑的效果,即 Nonidet-40(Sigma)、Triton-100(Robm-mass)和 Chap(Sigma),說明 NP-40 法為 23 條區帶,分子量範圍是 1~140kDa。其中 22、30、35、43kDa 為三者共有的主要區帶。3 種表面活性劑中,前兩者為無離子型,而 Chap 為兩性離子型;對於提取蟲膜蛋白而言,以兩性離子型為佳,它不僅可用分光光度計測定蛋白含量,且 Chap 性能穩定,用量少,易操作而價廉。楊秀珍等(1982)將感染弓形蟲的小鼠腹水離心取上清,經硫酸銨沉澱法提取各組分,以雙向瓊脂擴散法、單向定量免疫電泳和聚丙烯酰胺凝膠電泳等分析認為,在腹水上清液中含有蟲體裂解抗原和特异的可溶性抗原即 E/SA。以經 30%的飽和度的硫酸銨析出的成分最好。沈繼龍等(1993)應用離心除去感染弓形蟲小鼠腹水的有形成分,制得上清液稱 E/SA;以速殖

子裂解物經 10 000g 離心 20min, 上清液即為全蟲抗原(WA); 而可溶性抗原(SA)是制備的 WA 再經 40 000g 離心 30min 的上清液。用 SDS-PAGE、IB 和 SPA-ELISA 分析說明; E/SA 可被兔抗弓形蟲 IgG 抗體識別出至少 13 條抗原區帶, 分子量範圍在 12~108kDa; SA 含的組分較少; E/SA 和 WA 具有 100、51.5、40、38、35、30、20 和 12kDa 等共同抗原成分。27kDa 抗原只見于 E/SA; 而 6.5kDa 抗原見于 WA 和 SA 之中, E/SA 中缺如。動態分析表明, E/SA 之中的 38 和 30kDa 出現于感染後 24h, 35 和 37kDa 見于感染後 72h 的小鼠腹水中。

陳彩華等(1993)將感染弓形蟲的小鼠腹水除去速殖子, 取 1 000~15 000r/min 離心 30min 的上清液, 經 30% 硫酸銨沉澱法析出物溶于生理鹽水為 E/SA。以改良的 Foussard (1990) 法制備膜抗原。以俞乃勛報告的方法制備細胞質抗原。經 SDS-PAGE、IB 和 ELISA 分析 CN、RH、BH、HH 株的上述 3 種抗原。IB 顯示 RH 株的高免兔血清與 4 株的細胞質抗原反應時, 分別出現 10、7、4、6 條顯色區帶, 且都在 35~38kDa 處呈極明顯區帶; 免疫血清與 4 株的膜抗原反應時, 分別出現 8、7、6、7 條區帶, 且都在 50kDa、100~108kDa 處呈極明顯區帶。這一研究說明, 不同蟲株應用同一方法制備的各類抗原, 與同一免疫血清識別時, 在區帶的分布上有不同程度的差異, 可能是弓形蟲蟲株血清型差異的基礎。

陳觀今等(1991)曾試用限制性內切酶譜分析法, 探討有關毒性差異的弓形蟲株限制性片段長度差異(RFLD3)。弓形蟲株基因組 DNA 酶切後電泳 DNA 呈涂布狀。按 10 μ g DNA 用 EcoRI 酶分別切 1 μ g、3 μ g、5 μ g RH 株弓形蟲基因組 DNA, 結果顯示 3 種含量的 DNA 酶切所觀察到帶的清晰度是基本一致。EcoRI 酶切圖譜上可見一條帶; BamHI 酶切可見 4 條強弱不同的帶; Hind III 酶切可見 3 條較淡的帶; Sall Hinf I 及 Hae III 酶切未見明顯帶型。4 株弓形蟲基因組 DNA 用 3 種內酶切, 未能反映出各蟲株特异性差別。

陳觀今等(1994)在分析弓形蟲限制性內切酶圖譜基礎上, 又試用隨機引物聚合酶鏈反應, 鑒別弓形蟲株株間差異, 實驗根據 M13 噬菌體已知部分核酸序列, 設計和合成 3 條引物, RP1: 5'GAGGCAGT3'; RP2: 5'TATGACCATG3'; RP3: 5'GCAACGCAAT3'。在一定條件下擴增 RH、ZS₁、ZS₂ 和 SH-14 株弓形蟲基因組 DNA, 擴增產物經 2% 瓊脂糖凝膠電泳分帶。結果顯示 4 株受檢的弓形蟲株有株間帶型差異, 各株擴增帶型數目及拷貝數存在差別。

史俊岩等(1999)分析比較了 3 株弓形蟲基因組 DNA 的多肽性。應用隨機擴增的多肽性 DNA(random amplified polymorphic DNA-RAPD)技術對弓形蟲 RH、BH、PP 株基因組 DNA 擴增產物進行瓊脂糖電泳。單一及復合引物均能擴增產生多肽性 DNA 指紋圖譜。3 株弓形蟲基因組 DNA 擴增產物的帶型和強度均有不同。根據 Nei's 相似系數對 3 株弓形蟲基因組 DNA 遺傳相似性進行定量分析, 用不同的引物擴增, 蟲體株間表現不同的相似性。表明 3 株弓形蟲基因組 DNA 經 RAPD 反應產生的多肽性能夠應用于弓形蟲種、株的鑒定和分類。

陳觀今等(1995)用激光流式細胞儀對弓形蟲 RH 株速殖子群體(10 000 個速殖子)DNA 進行了分析, 結果顯示其 DNA、蛋白質群體呈現相同分布規律有兩個群體, 兩個峰值, 表明速殖子群體在小鼠腹腔是以兩個時相存在。樓滌(2 000)采用流式細胞儀對 5 個蟲株弓形蟲速殖子群體 DNA 含量分析, 呈現明顯規律性, 即均有 2 個分布峰, 呈現 2 個時相。但各株間 2 個峰的參數各異, 與陳觀今等的報道相似, 認為采用流式細胞儀進行 DNA 分析, 似可反映蟲株間的差異。陸紹紅等(2000)用流式細胞術檢測分析激光照射對弓形蟲能抑制 DNA 的合成, 減少弓形蟲群體 DNA 含量。

由于抗原多肽在各株間并非很規律,難以確定定型標準。弓形蟲遺傳多樣性決定了蟲株間的差異。它既決定了小鼠的急性感染與慢性感染,在某種程度上也決定着人弓形蟲病類型。弓形蟲毒力差異的分子決定機制相當複雜,它不是由單一的基因或蛋白決定,而是由許多基因和蛋白共同參與相互作用的結果。究竟那些基因和蛋白與毒力有關及其作用機制,仍未得到揭示。

3.4 基因擴增、克隆及表達

陳曉光等(1994)設計合成一對引物,用聚合酶鏈反應方法,從弓形蟲 ZS_1 株基因組 DNA 中將 P30 編碼基因調出,經純化及相應酶切後,插入質粒 pBV220 中構成重組質粒 pBV220-P30。經 Sanger 雙脫氧鏈終止法測序確證該重組質粒中的插入片段即為 P30 基因。1996 年將弓形蟲 P30 基因插入轉移載體質粒 pSXIVVI⁺ × 3 中,然後將重組質粒 pSXIVVI⁺ × 3-P30DNA 與粉紋夜蛾核形多角體病毒 TnNPV DNA 共轉染培養的草地夜蛾細胞(Sf),通過同源重組和空斑純化,得到重組病毒 TnNPV-P30。對重組病毒感染的 Sf 細胞及銀紋夜蛾幼蟲進行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。結果顯示:P30 基因在 Sf 細胞及蟲體中得到了表達,表達產物具有特異的免疫反應性。又將 ZS_1 株弓形蟲主要表膜抗原(P30)基因亞克隆到轉移載體質粒 pSXIVVI⁺ × 3 中,然後用此重組載體質粒 DNA 與親本株病毒 DNA 共轉染培養的草地夜蛾細胞,經空斑純化篩選出重組病毒株。結果證實弓形蟲 ZS_1 株 P30 基因亞克隆到昆蟲病毒 TnNPVK 中。

夏愛娣等(1996)用異硫氰酸胍酸性一步法提取弓形蟲(RH)RNA,含 Poly U 的 mRNA 親和膜分離 Poly(A)⁺RNA,進而合成雙鏈 cDNA。將 cDNA 與 EcoR1/Not1 接頭連接,再與表達載體 λ g⁺11 DNA 臂連接,經體外包裝,感染大腸桿菌 Y1090。以 32p 標記的弓形蟲 RH 株基因組 DNA 為探針,對重組噬菌斑進行原位雜交。結果 cDNA 產物分布在 0.5~2kb,得到 6.97×10^5 重組子,重組率為 98.73 %,克隆效率為 6.97×10^6 克隆重/ μ g cDNA。噬菌斑原位雜交的陽性斑點占重組克隆 95.2%。該法簡便有效,建立了一個容量大、質量好的弓形蟲 cDNA 文庫。

嚴延生等(1997)用 PCR 技術從弓形蟲 DNA 擴增出一段長 902bp 編碼弓形蟲主要膜蛋白抗原(SAG1)的基因。將 SAG1 基因插入帶有轉座子供體的 pFastBac1 質粒,得到重組質粒 pFT9, pFT9 轉化含有杆狀病毒穿梭載體的 DH10 Bac 感受態細胞,通過轉座重組作用使 SAG1 基因整合到杆狀病毒載體上,將兩株重組子 Bac101 和 Bac304 DNA 分別轉染 Sf9 昆蟲細胞,用弓形蟲免疫血清所作的免疫印迹試驗證實這兩株重組杆狀病毒的昆蟲細胞株均表達了 SAG1 蛋白。

姜淑芳等(1998)根據弓形蟲主要表面抗原 P30 基因序列,設計合成了一對引物,分別在其正義鏈和反義鏈的 5' 末端加上了 BamHI 和 EcoRI 的酶切位點,利用 PCR 技術獲取 P30 抗原因子整個開放閱讀框架的碱基序列。PCR 產物經 BamHI 和 EcoRI 雙酶切後,與經同樣兩種內切酶切割的質粒載體 pBluescript SK 連接的成重組質粒-pBluescript SK-P30,轉化大腸桿菌 DH5 α 。通過遺傳標記篩選、PCR 擴增及酶切分析對重組子進行鑒定。

周永安等(1998)採用 PCR 技術,設計一對寡核苷酸引物,從弓形蟲 ZS_2 基因組 DNA 中特異擴增出編碼 P30 抗原的基因片段。擴增的目的片段經純化後用 EcoRI 和 HindIII 雙酶切

後,克隆到真核表達質粒 pcDNA3 中,轉化入大腸桿菌 TGI,用氨苄青霉素和 PCR 初篩,將 PCR 擴增的陽性重組子用 EcoRI 和 HindIII 雙酶切鑒定。結果顯示 ZS₂ 株 DNA 中擴增出 1025bp 的 P30 基因,構建重組質粒 pcDNA3-P30,酶切產物的大小與預期相符。為重組 P30 抗原及核酸免疫研究作準備。郭虹等(1999)體外擴增出弓形蟲 RH、ZS₁、ZS₂ 及 GT14 蟲株的編碼棒狀體蛋白(ROP1)和主要表膜蛋白(P30)基因片段,其大小 ROP1 為 75bp, P30 為 1025bp,電泳條帶未見蟲株間明顯差異,具有高度保守性。根據 ROP1 基因序列設計合成一對引物,將上、下游引物分別引入 EcoRI, BamHI 酶切位點,用 PCR 技術從 RH 基因組 DNA 中擴增編碼 ROP1 基因片段,插入 pBV220 質粒,轉化大腸桿菌 DH5 α 感受態細胞,于氨苄陽性 LB 培養平版上篩選陽性克隆,酶切鑒定;經溫度誘導在 *E. coli* 中表達 SDS-PAGE 及免疫印迹分析。ROP1 體外擴增產物大小為 756bp 成功構建了 pBV220-ROP1 重組質粒, SDS-PAGE、免疫印迹顯示特異條帶的分子量為 43kD,表達產量為菌體蛋白的 13.23%。賈雪梅等(1999)採用 PCR 技術的限制性內切酶技術對人源性 RH 株, ZS₂ 株及豬源性 CN 株的 GRA1 致密顆粒抗原 1 基因片段進行體外擴增,擴增目的基因片段分別用內切酶 HindIII、HpaII 及 TaqI 進行單酶切鑒定、比較。結果從 3 個蟲株基因組 DNA 中擴增出 785bp 的 GRA1 基因片段,3 個蟲株的 GRA1 基因片段基本相同,酶切圖譜基本一致,表明了蟲株的 GRA1 基因的高度保守。

古欽民等(1999)根據弓形蟲主要表面抗原(P30)基因序列,設計合成一對引物,通過聚合酶鏈反應,擴增出 P30 基因,將 P30 基因克隆入表達質粒 pCEMEX-1 中,經酶切鑒定後,陽性重組質粒轉化宿主菌 JM109(DE3),宿主菌經 IPTG 誘導表達後,產物進行 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。結果顯示, P30 基因以融合蛋白的形式表達,表達產物具有特異的免疫反應性。

叢華等(2000)根據弓形蟲 P30 基因序列,設計合成一對引物并在引物 5' 端分別引入限制性內切酶 EcoRI、Sall 酶切位點,用 PCR 技術從弓形蟲 RH 株基因組 DNA 中擴增 P30 基因片段,插入 pMALP₂ 質粒轉化大腸桿菌 DH5 α 感受態細胞,于氨苄 LB 培養平板上篩選陽性,經過酶切及 PCR 擴增鑒定重組子。將陽性重組子經 IPTG 誘導表達, SDS-PAGE 及免疫印迹分析。結果顯示弓形蟲 RH 株 DNA 中擴增出 976bp 的 P30 基因,構建成功 pMALP2-P30 重組質粒; SDS-PAGE 電泳及 Western-blot 顯示 MEP/P30 融合蛋白條帶的分子量約為 77.5kD,減去 MBP 的分子量 43kD,得出 P30 蛋白分子量為 34.5kD,且能被弓形蟲高敏鼠血清識別。

游東生等(2000)從基因組 DNA 中擴增出弓形蟲 P30 基因編碼序列,克隆入載體 pGEM-T pGEX-4T-1,經 PCR 和酶切篩選,測序驗證後,進行誘導表達和 Western blot 鑒定。結果證明從弓形蟲基因組 DNA 中擴增出 P30 基因編碼序列,并誘導表達出能被兔抗弓形蟲血清識別的重組 P30。高世同等(2000)採用 PCR 法擴增出弓形蟲 P22 目的基因片段,以低熔點瓊脂糖回收純化,并以限制性內切酶 BamH I 和 Kpn I 雙酶切後,插入質粒載體 P5.6 的多克隆位點,構建重組體 P5.6/P22,并轉化大腸桿菌 DH5 α ,快速酚法初篩陽性重組子,并以 PCR 法與限制性酶切分析對陽性克隆進一步鑒定。被鑒定的重組子以雙脫氧鏈終止法進行序列測定。結果從弓形蟲核酸提取物中擴增出約 593bp DNA 條帶,與預期擴增片段大小相符,空白對照無特異性擴增條帶;所構建的 P5.6/P22 重組體陽性克隆經雙酶切與 PCR 鑒定與預期結果一致;序列測定的結果確正插入片段的正確性。叢華等(2000)構建了弓形蟲 P30 基因的兩個原