

文章编号: 1000-7423(2001)-05-0290-05

我国利什曼原虫 RAPD 分析

芦殿梅¹ 胡孝素^{1*} 乔中东²

【摘要】 目的 我国不同疫区利什曼原虫分离株的 RAPD 分析。方法 用 7 种随机引物, 扩增来自我国 3 个疫区(得自利什曼病患者、病犬及白蛉)的利什曼原虫分离株和国际标准株, 并将扩增产物进行聚类分析。

结果 ①来自我国山丘疫区及平原疫区的 *L. d.* 分离株分别聚为两类, 两者遗传距离较远; ②来自新疆荒漠疫区、近荒漠疫区及平原地区的 *L. d.* XJ771、*L. d.* XJ901 和 *L. d.* XJ801 聚在一类, 表明它们的遗传距离较近; ③山丘疫区虫株中来自病人和病犬的分离株区别不明显, 两者同源性高, 表明犬在传播中起着重要作用; ④印度平原型标准株 *L. d.* DD8 与我国平原疫区虫株聚在一类; ⑤ *L. infantum* 与我国山丘疫区的 *L. d.* 分离株分属于两类; ⑥ *L. d. Jed* 与平原疫区 *L. d.* 分离株亲缘关系较近; ⑦ *L. infantum* 与 *L. tropica* 最早聚合, 遗传距离最近。

结论 我国不同疫区利什曼原虫分离株在基因水平上存有差异。

【关键词】 利什曼原虫; RAPD

中图分类号: R382.322

文献标识码: A

Analysis of *Leishmania* Species and Strains from China by RAPD Technique

LU dian-mei¹, HU Xiao-su^{1*}, QIAO Zhong-dong²

(1 Department of Pathogenic Biology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041,

2 Laboratory of Molecular Biology, Shanxi University of Medical Sciences, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To analyze genetic relationship of *Leishmania* species and strains from China by RAPD technique. **Methods**

DNAs from *Leishmania* strains, including *L. donovani* (*L. d.*) isolates from patients, dogs and sandflies of three different foci in China and international reference strains, were amplified by seven random primers. The DNA polymorphic bands detected were analyzed by clustering analysis with SPSS software. **Results** ① *L. d.* isolates from hill and plain foci in China were divided into two groups. The genetic distance of *L. d.* isolates is distant between them. ② *L. d.* XJ771, *L. d.* XJ901, *L. d.* XJ801 from desert, vicinity of desert, and plain regions in Xinjiang were in the same group. It indicated that the genetic distance among *L. d.* isolates from the three regions is close. ③ *L. d.* isolated from VL patients and dogs in hill foci could not be discriminated distinctly, showing high homology between them. ④ *L. d.* DD8 from India, the reference strain of plain type, was clustered with *L. d.* isolates from plain foci in China. It provided scientific basis for the viewpoint "Kala Azar from east area of China is similar to that from India". ⑤ *L. infantum* and *L. d.* isolates from hill foci in China were clustered into different groups. ⑥ The genetic distance is close between *L. d.* isolates from plain foci in China and *L. d. Jed*; ⑦ *L. infantum* and *L. tropica* showed the closest genetic distance. **Conclusion** Differences at genetic level exist in *Leishmania* isolates from different foci in China.

【Key words】 *Leishmania* species, RAPD

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970667)

* Corresponding author, HU Xiaosu

杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*, *L. d.*) 是利什曼原虫属中较复杂的虫种之一, 可引起世界上许多地区几种不同类型的黑热病。近年来, 应用基因分析方法显示出我国不同疫区 *L. d.* 分离株之间存有差异^[1-5]。对我国利什曼原虫的种株分析和鉴定, 有必要进行深入研究, 从而为我国黑热病的防治提供科学依据。应用 RAPD 技术可将多种引物扩增靶 DNA 所得的多态性资料转化为数据, 用统计学方法进行分析, 因而所得结果可反映种内及种间乃至种群间的遗传变异的程度、亲缘关系及起源进化等。本文采用 Noyes^[6] 已筛选出的 7 种随机引物(它们能鉴别 4 株相近的新世界利什曼原虫)扩

增我国不同疫区的利什曼原虫分离株以及国际标准株, 进行 RAPD 分析, 构建出反映我国利什曼原虫亲缘关系的树状图。

材料与方法

1 利什曼原虫虫种、分离株及培养

第 1 组: 用 20 株利什曼原虫 RAPD 分析, 所用虫种见表 1。

第 2 组: 用 8 株利什曼原虫 RAPD 分析见表 2。各虫种分离株前鞭毛体均在 M199 复合培养基(含 10% 小牛血清, 2.5% 葡萄糖)中, 25 °C ~ 27 °C 轻微振荡培养。

2 利什曼原虫前鞭毛体 DNA 提取

基金项目: 获国家自然科学基金(No. 39970667)资助。

作者单位: 1 四川大学华西医学中心寄生虫学研究室, 成都 610041; 2 山西医科大学分子生物学研究室, 太原 030001

* 通信作者: 胡孝素

表 1 第 1 组利什曼原虫种
Table 1 Origins of the selected strains of *Leishmania* (group 1)

编号 No.	种株名称 species and strains	国际编码 International code
1	杜氏利什曼原虫四川分离株 10 号 <i>L. donovani</i> SC10 isolate	MHOM/CN/90/SC10H ₂
2	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 号 <i>L. donovani</i> GS7 isolate	MHOM/CN/93/GS7
3	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 4 号 <i>L. donovani</i> GS4 isolate	MHOM/CN/? /GS4
4	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 3 号 <i>L. donovani</i> GS3 isolate	MHOM/CN/84/GS3
5	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 5 号 <i>L. donovani</i> GS5 isolate	MHOM/CN/? /GS5
6	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 6 号 <i>L. donovani</i> GS6 isolate)	MHOM/CN/? /GS6
7	杜氏利什曼原虫四川人分离株 6 号 <i>L. donovani</i> SC6 isolate	MHOM/CN/86/SC6
8	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 8 号 <i>L. donovani</i> GS8 isolate	MHOM/CN/94/GS8
9	杜氏利什曼原虫甘肃分离株 2 号 <i>L. donovani</i> GS2 isolate	MHOM/CN/83/GS2
10	杜氏利什曼原虫四川犬分离株 9 号 <i>L. donovani</i> SC9 isolate	MCAN/CN/86/SC9
11	杜氏利什曼原虫四川犬分离株 11 号 <i>L. donovani</i> SC11(isolate)	MCAN/CN/? /SC11
12	杜氏利什曼原虫甘肃犬分离株 1 号 <i>L. donovani</i> GS1 isolate	MCAN/CN/60/GS1
13	杜氏利什曼原虫山东分离株 1 号 <i>L. donovani</i> SD1 isolate)	MHOM/CN/84/SD1
14	杜氏利什曼原虫山东分离株 2 号 <i>L. donovani</i> SD2 isolate)	MHOM/CN/92/SD2
15	杜氏利什曼原虫江苏分离株 1 号 <i>L. donovani</i> JS1 isolate	MHOM/CN/84/JS1
16	杜氏利什曼原虫 DD8 株 <i>L. donovani</i> DD8 isolate	MHOM/IN/80/DD8
17	杜氏利什曼原虫新疆“771”株 <i>L. donovani</i> eXJ771 isolate)	IPHL/CN/77/XJ771
18	杜氏利什曼原虫吉达株 <i>L. donovani</i> Jed isolate)	MHOM/SA/81/Jeddah KA
19	热带利什曼原虫 <i>L. tropica</i>	MHOM/SU/74/K27
20	婴儿利什曼原虫 <i>L. infantum</i>	MHOM/FR/78/LEM75

表 2 第 2 组利什曼原虫种
Table 2 Origins of the selected strains of *Leishmania* (group2)

编号 No.	种株名称 Species and strains	国际编号 International code
1	杜氏利曼原虫新疆 771 株 <i>L. donovani</i> XJ771 isolate	IPHL/CN/77/XJ771
2	杜氏利什曼原虫甘肃分离 2 号 <i>L. donovani</i> GS2 isolate	MHOM/CN/83/GS2
3	婴儿利什曼原虫 <i>L. infantum</i>	MHOM/FR/78/LEM75
4	热带利什曼原虫 <i>L. tropica</i>	MHOM/SU/74/K27
5	杜氏利什曼原虫新疆 801 株 <i>L. donovani</i> XJ801 isolate	MHOM/CN/80/XJ801
6	杜氏利什曼原虫新疆 901 株 <i>L. donovani</i> XJ901 isolate	MHOM/CN/90/XJ901
7	硕大利什曼原虫 <i>L. major</i>	MHOM/SU/73/5ASKH
8	墨西哥利什曼原虫 <i>L. mexicana amazonensis</i> LV 78	-

按参考文献 [7] 方法略加修改。即将前鞭毛体用 Sarcosine 破膜，蛋白酶 K 消化，酚氯仿法抽提 DNA。

3 随机引物

按文献 [6] 选用的 7 种随机引物 (表 3) 由 Genosys 公司合成。

4 PCR 扩增

扩增总体积为 25 μ l，其中含 dNTP 2 μ l (各 250 μ mol/L)；随机引物 2 μ l (1 mmol/L)，DNA 10 ng，TaqDNA 聚合酶 2.5 U，10 \times buffer 2.5 μ l，加 30 μ l 液体石蜡油后在 MJ-PTC100 PCR 扩增仪中扩增。反应条件为：94 $^{\circ}$ C 1 min，36 $^{\circ}$ C 1 min，72 $^{\circ}$ C 2 min，共循环 45 次。产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上 80 V，

1.5 h 分离，溴化乙锭染色。GCT7500 系统下摄影分析结果。每个引物均经过重复扩增。

5 数据处理

随机扩增多态 DNA 片段的有无，分别用数字

表 3 随机引物及其序列
Table 3 Random oligonucleotide primers and their sequences

引物 Primer	序列 Sequence	碱基比 (G + C) %
M13	CTAAAACCGACGGCCAGT	53
AB1-04	GGACTGGAGT	60
AB1-09	TGGGGGACTC	70
AB1-13	TTCCCCCGCT	70
AB1-18	CCACAGCACT	60
3301 ³⁵	TCCTAGCCAA	50
A816	GTGACCTAGG	60

“1”和“0”表示，即某虫株在某一片段出现时计

为“1”，不出现时计为“0”，将数据输入计算机，建立一数据矩阵，并用 5.01 版 SPSS 统计软件进行聚类分析。

结 果

1 7 种引物对实验虫株 DNA 均扩增出了大小与数量不等的 DNA 片段

统计所有扩增片段及其长度，20 个虫株的全部扩增产物共有 167 条扩增片段，大小在 125 ~ 1 850 bp 之间。图 1 显示其中一种引物 (3301³⁵) 对 20 虫株的扩增片段。

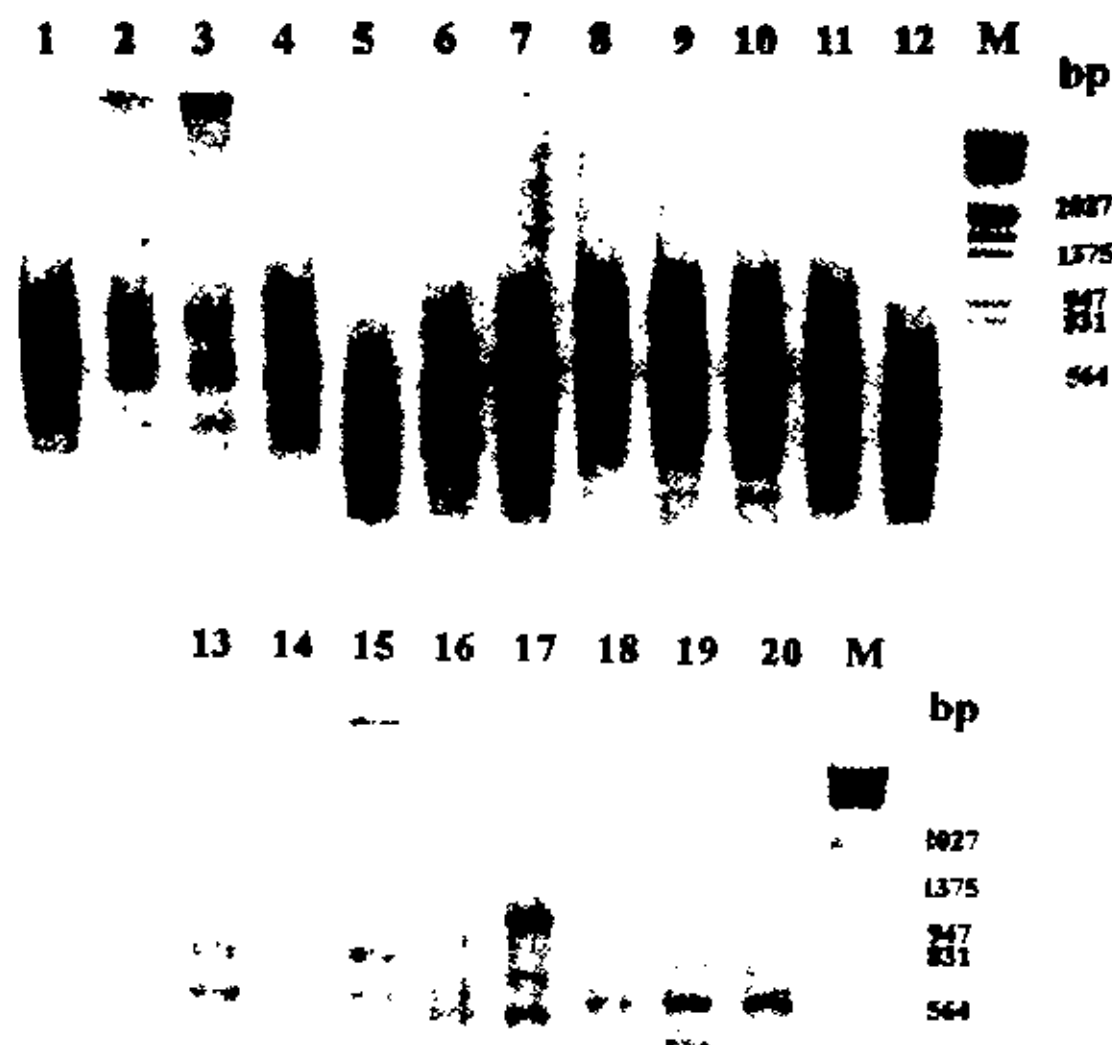


图 1 用随机引物 3301³⁵ 扩增 20 株利什曼原虫 DNA (1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色结果) 1 *L.d.* SC10 2 *L.d.* GS7 3 *L.d.* GS4 4 *L.d.* GS3 5 *L.d.* GS5 6 *L.d.* GS6 7 *L.d.* SC6 8 *L.d.* GS8 9 *L.d.* GS2 10 *L.d.* SC9 11 *L.d.* SC11 12 *L.d.* GS1 13 *L.d.* SD1 14 *L.d.* SD2 15 *L.d.* JS1 16 *L.d.* DD8 17 *L.d.* XJ771 18 *L.d.* Jed 19 *L. tropica* 20 *L. infantum* M (DNA/EcoRI + HindIII)

Fig. 1 PCR amplified product of 20 *Leishmania* strains using random primer 3301 35 PCR product was run on a 1.5% agarose gel. Stained with EB

2 分别建立第 1 组 (20 株) 及第 2 组 (8 株) 利什曼原虫的数据矩阵

经 SPSS 统计软件聚类分析，得出以下结果。

2.1 第 1 组：20 个虫株进化树状图结果 (图 2)

① 20 株利什曼原虫聚为两类，来自我国山丘疫区 (四川和甘肃) 的 12 个分离株聚为一类，其中得自人和犬的分离株区别不明显。平原疫区的 3 个分离株在另一类；② 山丘疫区虫株中 *L.d.* SC6 为四川南坪分离株，南坪县邻近甘肃，图中显示

L.d. SC6 与来自甘肃的各分离株遗传距离较近。而与来自四川汶川与北川的 *L.d.* SC10、*L.d.* SC1 则距离较远；③ 印度平原型标准株 *L.d.* DD8，与平原疫区分离株聚在同一类；④ 新疆荒漠疫区的 *L.d.* XJ771 与 *L.d.* DD8 的遗传距离较近；⑤ *L. infantum* 国际标准株与我国山丘疫区的 *L.d.* 分离株分别聚在两类；⑥ *L.d.* Jed 与平原疫区分离株的遗传关系较近；⑦ *L. infantum* 与 *L. tropica* 遗传距离很近。

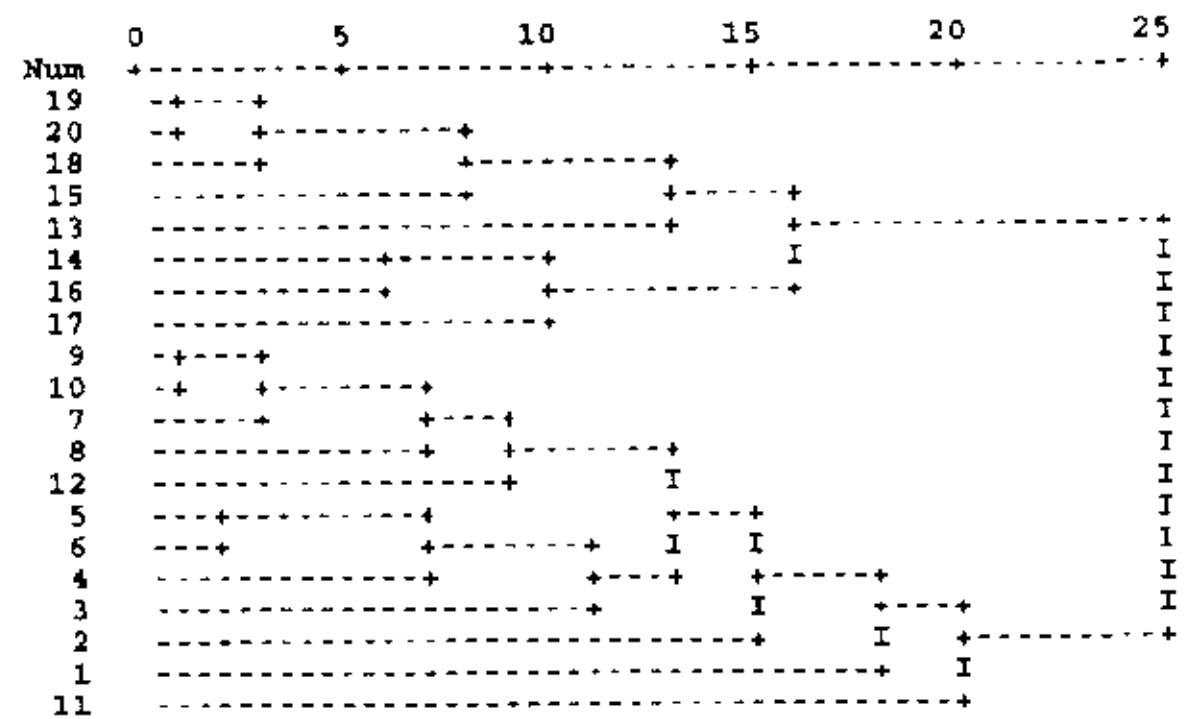


图 2 利什曼原虫亲缘关系树状图 (由 20 株利什曼原虫构建) 1 *L.d.* SC10 2 *L.d.* GS7 3 *L.d.* GS4 4 *L.d.* GS3 5 *L.d.* GS5 6 *L.d.* GS6 7 *L.d.* SC6 8 *L.d.* GS8 9 *L.d.* GS2 10 *L.d.* SC9 11 *L.d.* SC11 12 *L.d.* GS1 13 *L.d.* SD1 14 *L.d.* SD2 15 *L.d.* JS1 16 *L.d.* DD8 17 *L.d.* XJ771 18 *L.d.* Jed 19 *L. tropica* 20 *L. infantum*

Fig. 2 The phylogenetic tree of *Leishmania* constructed by twenty *Leishmania* strains with RAPD

2.1 第 2 组：8 个虫株进化树状图 (图 3)

由于第 1 组 20 个虫株中，尚缺少新疆平原地区 (如喀什疫区) 利什曼患者的分离株，故进行第 2 组试验，目的在于观察新疆的分离株与国际标准株及其

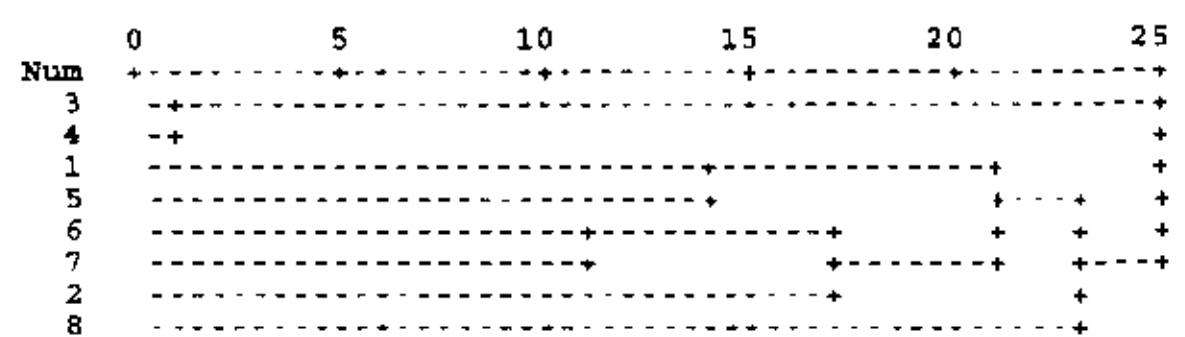


图 3 利什曼原虫亲缘关系树状图 (由 8 株利什曼原虫构建) 1 *L.d.* XJ771 2 *L.d.* GS2 3 *L. infantum* 4 *L. tropica* 5 *L.d.* XJ801 6 *L.d.* XJ901 7 *L. major* 8 *L. mexicana*

Fig. 3 The phylogenetic tree of *Leishmania* constructed by twenty *Leishmania* strains with RAPD

他有关虫株的关系。结果可见：① *L. infantum* 与 *L. tropica* 首先聚合，两者同源程度很高。与第 1 组结果相一致；② 新疆虫株中来自近荒漠疫区的 *L.d.* XJ901、平原地区的 *L.d.* XJ801 (自利什曼

病患者)及荒漠疫区的 *L. d.* XJ771 (自白蛉)聚在一起,遗传距离较近;③ *L. infantum* 与 *L. d.* GS2 的遗传距离较远;④ *L. mexicana amazonensis* 是引起皮肤利什曼病的另一虫种,与 *L. d.* 分离株最后聚合,遗传距离较远。

讨 论

近年来, RAPD 技术已被用于锥虫^[8]、细粒棘球绦虫^[9]、旋毛虫^[10]和血吸虫^[11]等寄生虫的进化树构建。所得结果与其他的分类结果(如同工酶、RFLP、MLEE 及形态学)基本一致,表明 RAPD 标记是可靠的基因标记。Noyes HA^[6]等用 28 个随机引物扩增新世界利什曼原虫 *L. viannia* 亚属中 4 个用 PCR 现有引物不能鉴别的虫株: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* 和 *L. peruviana*, 其中仅 7 个随机引物能扩增出具有鉴别意义的特异片段,提示这 7 种引物扩增出了过去尚未了解到的不同利什曼原虫 DNA 中的异源序列。本实验在此基础上选用了这 7 种引物扩增我国不同疫区的 *L. d.* 分离株及国际标准株,扩增片段在 *L. d.* 各分离株之间呈明显多态分布,表明用这 7 种引物对利什曼原虫可达到种间及种内鉴别水平。

我们首次用 RAPD 技术对我国利什曼原虫进行分子分类研究,并观察我国不同疫区 *L. d.* 虫株与国际标准株的亲缘关系。实验发现:① 来自我国山丘疫区的 *L. d.* 分离株与平原疫区的 *L. d.* 分离株分别聚为两类。这与吕洪刚^[1]和罗萍等^[2]用 kDNA 杂交分析不同疫区的利什曼原虫的结果一致。吕芳丽等^[3]报道山丘疫区和平原疫区的 *L. d.* 分离株的分子核型不同。郑学礼^[4]用 kDNA PCR-SSCP 分析显示平原疫区与山丘疫区分离株单链 DNA 迁移率明显不同。本实验通过 RAPD 分析进一步表明了两个疫区分离株之间遗传距离较远。这些结果表明两疫区的虫株在基因水平上存有差异。② 实验显示来自新疆荒漠地区、近荒漠地区及平原地区的 *L. d.* XJ771, *L. d.* XJ901 及 *L. d.* XJ801 聚在一类,表明它们的遗传距离较近。③ 山丘疫区的虫株中来自病人和病犬的分离株区别不明显,两者同源性高。表明犬在传播上起着重要作用。④ 印度平原型标准株 *L. d.* DD8 归为我国平原疫区虫株所属的这一类,为过去认为“华东地区的黑热病与印度的相似”这一观点提供了科学依据。⑤ 两组实验均显示 *L. infantum* 与我国山丘疫区的 *L. d.* 分离株分属于两类,与众多学者认为“西北地区的黑热

病似与地中海沿岸相似”的结论不一致^[12]。将 *L. infantum* 和 *L. donovani* GS2 全 DNA 的扩增片段,用 Nei 氏公式计算片段共享度 F 值为 0.255,与另文该 2 虫株 kDNA 及 nDNA 的 F 值 0.229 及 0.2 相近。进一步证明 *L. infantum* 与我国山丘疫区的 *L. d.* 分离株的遗传距离较远。⑥ *L. d.* Jed 为沙特阿拉伯的分离株。它的分类地位尚不甚明确,本文结果显示 *L. d.* Jed 与平原疫区分离株的关系较近。⑦ *L. infantum* 与 *L. tropica* 在两组实验的进化树中均最早聚合,表明两者遗传距离很近,与章涛等^[13]研究得出 *L. infantum* 与 *L. tropica* 的 SSUrDNA 多变区序列高度同源,同源性高达 98% 以上的结论一致。⑧ 第 2 组聚类结果与第 1 组结果相符合。新疆的 3 个虫株 *L. d.* XJ801、*L. d.* XJ901 与 *L. d.* XJ771 遗传距离较近。

致谢 实验中得到姜天云研究生及赵嘉惠老师的热情帮助,在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] 吕洪刚,胡孝素. 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, 1988, 19: 222-225.
- [2] 罗萍,胡孝素,熊光华,等. 用生物素标记 k-DNA 鉴定我国不同地区利什曼原虫种株. 地方病通报, 1989, 4(4): 61-64.
- [3] 吕芳丽,胡孝素,汤海妹,等. 我国山丘疫区与平原疫区利什曼原虫分离株分子核型分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 181-184.
- [4] 郑学礼,胡孝素,陈建平. 我国不同流行区内脏利什曼原虫分离株 kDNA 的 PCR-SSCP 分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 346-349.
- [5] 吴波,瞿琦琦. 中国利什曼原虫分离株分子核型分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16: 181-184.
- [6] Noyes HA, Belli AA, Maingon R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. Am J Trop Med Hyg, 1996, 55: 98-105.
- [7] 杨文天,胡孝素. PCR 扩增技术用于犬内脏利什曼病病原体 kDNA 的检测. 实用寄生虫病杂志, 1993, 1(1): 6-9.
- [8] Souto RP, Fernandes O, Macedo AM. DNA markers define two major phylogenetic linkages of *Trypanosoma Cruz*. Mol Biochem Parasitol, 1996, 83: 141-152.
- [9] Siles JM, Benito MC, Cuesta BC. *Echinococcus granulosus* genomic and isoenzymatic study of Spanish strains isolated from different intermediate hosts. Veterinary Parasitology, 1996, 63: 273-282.
- [10] Bandi C, La RG, Bardin MG, et al. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. Parasitology, 1995, 110: 401-407.
- [11] Gasser RB, Bao ZQ, Nansen P, et al. Use of RAPD for the detection of genetic variation in the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*, from mainland China. Mol Cell Probes, 1996 Oct, 10: 353-358.
- [12] 赵懋先主编. 人体寄生虫学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 86-87.
- [13] 章涛,胡孝素,敬保迁,等. 我国新疆皮肤利什曼病病原体 SSUrDNA 多变区序列分析. 中国寄生虫病防治杂志, 1998, 11: 279-283.

(收稿日期: 2001-06-18 编辑: 李雅卿)