

山丘疫区杜氏利什曼原虫核糖体基因内转录间隔区的克隆及序列分析

田玉, 陈建平*, 胡孝素

【摘要】 目的 构建我国山丘疫区杜氏利什曼原虫分离株前鞭体核糖体 DNA (rDNA) 内转录间隔区 (ITS) 片段克隆, 并进行测序及同源性分析。方法 提取杜氏利什曼原虫前鞭毛体 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增出 rDNA ITS 片段克隆入 pMD18-T vector 上, 双脱氧链末端终止法测序。结果 扩增出约 1 000 bp 的 rDNA ITS 片段。测序结果表明山丘疫区的 2 株利什曼原虫 L. d. SC10 和 L. d. 6 分别为 1 027 bp 和 1 028 bp。序列分析结果表明, L. d. SC10 和 L. d. 6 有一定差异。结论 获得了我国山丘疫区杜氏利什曼原虫分离株 L. d. SC10 和 L. d. 6 的前鞭体 rDNA ITS 序列。

【关键词】 利什曼原虫; 内转录间隔区; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: R382. 22

文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of the Ribosomal DNA ITS Gene of *Leishmania donovani* Isolates from Hill Foci of China

TIAN Yu, CHEN Jian-ping*, HU Xiao-su

(Department of Parasitology, School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610044, China)

【Abstract】 Objective To determine the nucleotide sequence of the ITS (internal transcribed spacer) gene of *Leishmania donovani* isolates from hill foci (L. d. SC10 and L. d. 6), and to find out the difference of the gene sequences between the two isolates. **Methods** Specific ITS fragments from nuclear DNA of two *Leishmania* isolates were amplified by PCR, cloned into pMD18-T vector, and finally sequenced by the dideoxy chain termination method. **Results** Sequence analysis showed that the amplified DNA fragments of the two isolates were 1 027 bp (L. d. SC10) and 1 028 bp (L. d. 6) respectively, showing a sequence difference. **Conclusion** Sequence difference exists between the *Leishmania* isolates L. d. SC10 and L. d. 6 from hill foci in China.

【Key words】 *Leishmania donovani*; ITS; Gene cloning; Sequence analysis

Supported by the Scientific Research Fund of the Ministry of Health (No. 98-1-210)

* Corresponding author, E-mail: jpchen007@163.com

内脏利什曼病 (visceral leishmaniasis, VL) 又称黑热病, 是威胁患者生命的人兽共患病, 也是 WHO/TDR 列出的对人类危害严重的六类热带病之一。在我国, 杜氏利什曼原虫引起的黑热病分为荒漠型、平原型和山丘型。我国大部分地区已达到基本消灭, 但近年来在山丘型疫区明显回升^[1], 具有较大的威胁性。为对我国山丘疫区利什曼原虫进行种株分析和鉴定, 本文采用 PCR 技术扩增山丘疫区利什曼原虫分离株 L. d. SC10 和 L. d. 6 的核糖体 DNA (rDNA) 内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 片段, 并进行克隆、测序和同源性比较。

材料与方法

1 虫株及利什曼原虫前鞭毛体 DNA 的提取

选用杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 四川省

汶川分离株 (MHOM/CN/90/SC10H2, 简称 L. d. SC10) 和人分离株 (MHOM/CN/86/SC6, 简称 L. d. 6)。将本室液氮保种的虫株先转入 NNN 培养基, 扩大培养时转入含 10% 小牛血清的 M199 复合液体培养基培养前鞭毛体。当原虫总数达 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 时, 按文献 [2, 3] 略加修改, 收集前鞭毛体, 制备 DNA。

2 引物设计和合成

根据 Elisa 等^[4] 报道的杜氏利什曼原虫 rDNA ITS 序列设计并合成一对引物。上游引物 IR1 的 5' 端添加 HindIII 识别序列和保护序列, 下游引物 IR2 的 5' 端添加 BamHI 识别序列和保护序列。引物由北京赛百盛公司合成。引物序列如下:

IR1 5'-CCC AAGCTT GCTGTAGGTGAAC-
HindIII

CTGC AGCAGCTGGATCATT

IR2 5'-CGC GGATTC GCGGGTACTCCTG-
BamHI

CCAAACACTCAGGTCTG

基金项目: 卫生部科研基金 (No. 98-1-210)

作者单位: 四川大学华西基础医学与法医学院寄生虫学教研室, 成都 610044

* 通讯作者: E-mail: jpchen007@163.com

3 rDNA ITS 片段的扩增

PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。PCR 反应总体积为 100 μ l, 反应条件按试剂盒说明和参考文献[4]进行, 即 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 2 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后一个循环为 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

4 rDNA ITS 片段的克隆

将上述两虫株的 PCR 扩增产物经胶纯化试剂盒(购自上海华舜生物工程有限公司)纯化后, 与 pMD18-T vector 连接。用连接试剂盒于 16 $^{\circ}$ C 分别将 2 个目的片段与载体相连, 取连接反应物分别转化预先制备的新鲜感受态大肠埃希菌 JM109, 涂布于用表面涂有异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)/X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。IPTG、X-gal 及连接试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

5 阳性重组克隆的筛选与鉴定

5.1 重组质粒的酶切鉴定 从 LB 平板上分别挑取数个白色菌落接种入含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。用质粒小量提取试剂盒(购自上海华舜生物工程有限公司)提取重组质粒 DNA。将重组质粒分别用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切, 酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

5.2 重组质粒的 PCR 鉴定 以酶切鉴定正确的重组质粒 DNA 为模板, IR1、IR2 为引物进行 PCR 反应。扩增产物也用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

6 rDNA ITS 序列测定

取酶切及 PCR 鉴定正确的重组质粒, 以双脱氧链末端终止法全自动测序仪测序。测序工作由大连宝生物工程有限公司完成。

结 果

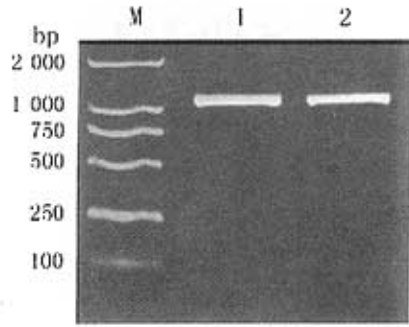
1 rDNA ITS 片段的 PCR 扩增

用 PCR 方法从 L. d. SC10 和 L. d. 6 DNA 样本中分别扩增出约 1 000 bp DNA 片段, 与预期大小一致(图 1)。

2 重组质粒的筛选和鉴定

2.1 重组质粒酶切鉴定 用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Bam*HI 对重组质粒进行双酶切, 可见与空质粒等大的约 2 600 bp DNA 片段和 1 000 bp DNA 片段(图 2)。

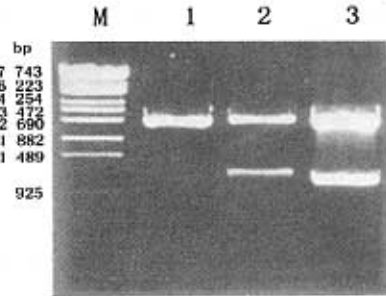
2.2 重组质粒的 PCR 鉴定 对酶切鉴定正确的重组质粒进行 PCR 扩增鉴定, 扩增出约 1 000 bp 的特异片



M 标志物 1 L. d. SC10 2 L. d. 6
M DNA DL2 000 marker 1 L. d. SC10 2 L. d. 6

图 1 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 L. d. SC10 和 L. d. 6 的 rDNA ITS 基因片段

Fig. 1 1.0% agarose gel electrophoresis for detection of specific fragment of L. d. SC10 and L. d. 6 amplified by PCR



M 标志物 1 pMD18-T vector 2 pMD18-T vector-ITS-SC10 重组质粒 3 pMD18-T vector-ITS-L. d. 6 重组质粒

M λ -EcoT14 I digest DNA marker 1 pMD18-T vector 2 pMD18-T vector-ITS-SC10 3 pMD18-T vector-ITS-L. d. 6

图 2 重组质粒的 *Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切鉴定 (1.0% 琼脂糖凝胶电泳)

Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid digested by *Hind*III and *Bam*HI (1.0% agarose gel electrophoresis)

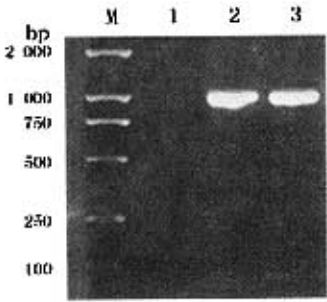
段, 而空质粒对照则为阴性(图 3)。

3 rDNA ITS 基因序列测定及同源性比较

3.1 序列测定 我国山丘疫区的 2 株利什曼原虫(L. d. SC10 和 L. d. 6)的 rDNA ITS 片段长度分别为 1 027 bp 和 1 028 bp。两者的序列及差异见图 4。

3.2 同源性分析 运用 BLAST 软件进行两个序列之间的两两比对, 结果见表 1。

分析结果表明, L. d. SC10 和 L. d. 6 ITS 序列差异主要位于多变区 520 ~ 693/521 ~ 692 [一致性 150/174(86%), 缺位 2/174(1%)], 而多变区 1 ~ 487/1 ~ 488 [一致性 477/488(97%), 缺位 1/488(0%)], 910 ~ 1027/911 ~ 1028 [一致性 116/118(98%)] 的同源性相对较高, 790 ~ 864/791 ~ 865 的序列完全相同。



M 标志物 1 pMD18-T vector 2 pMD18-T vector-ITS-SC10 重组质粒
3 pMD18-T vector-ITS-L. d. 6 重组质粒
M DNA DL2 000 marker 1 PCR amplified products of pMD18-T vector
2 PCR amplified products of pMD18-T vector-ITS-SC10 3 PCR amplified products of pMD18-T vector-ITS-L. d. 6

图 3 重组质粒 PCR 鉴定 (1.0% 琼脂糖凝胶电泳)
Fig. 3 PCR analysis of the recombinant plasmid (1.0% agarose gel electrophoresis)

L. d. SC10	1	ccccagctgctgtaggtgcaocctgcagcgcctggatcattccgattacaccccaaa
L. d. 6	1	aaa
L. d. SC10	61	aaaaa-catatatacaaaaactcggggggcotatattatatacattatagggcattccaca
L. d. 6	61	aaaaaa
L. d. SC10	120	ccactatcaacgcaaaacttttactctcgaagtttcagtaacacaaaagcgcctgcacatt
L. d. 6	121	o
L. d. SC10	180	atmacgcaocgcctatcaaaaagcaaaaacttccgtttatcaaatatacagcgtttc
L. d. 6	181	
L. d. SC10	240	ggttttgttgccgggggtgctgtgtgtggaacggcctacacactgcgtgcagctgg
L. d. 6	241	
L. d. SC10	300	atgaattgctctcatttctgttgcgaacgcgtaaaagtcgctgaagtgctatcaattg
L. d. 6	301	
L. d. SC10	360	oagcaatcattcaatcaacgctcttttgaagcaaacggcgcctgggagagctctattgt
L. d. 6	361	o
L. d. SC10	420	gtctccocctgctgaacatttctctcgtctgcaaaaacaaaacacgcgcctcctct
L. d. 6	421	
L. d. SC10	480	cttctgcatatgtatataatacaattatataatataatgtgtggagcaaacagggaggo
L. d. 6	481	
L. d. SC10	540	gtgtgtttgtgtgtgcacatataatataatataatataatataatataatataatataat
L. d. 6	541	atatataatataatataat-gt
L. d. SC10	600	aagttagattgtggcaaatcaacgcgcctcatttctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
L. d. 6	598	
L. d. SC10	660	ctctctctctgt
L. d. 6	658	t
L. d. SC10	720	tct
L. d. 6	719	
L. d. SC10	780	agggagagag-ctgtgcaacagctatttatacaaaaacaaaacagcaatcaactctg
L. d. 6	778	agg
L. d. SC10	838	cgttgcaacttttttct
L. d. 6	838	
L. d. SC10	898	gtctgt
L. d. 6	899	g
L. d. SC10	958	ccccacccttccccgcacacactttttaaagcagcctgctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt
L. d. 6	958	o
L. d. SC10	1018	agcaatcagc
L. d. 6	1018	

图 4 L. d. SC10 与 L. d. 6 的 rDNA ITS 基因片段序列比较
Fig. 4 Comparable of nucleotide sequence of ITS region of L. d. SC10 and L. d. 6

表 1 L. d. SC10 与 L. d. 6 的 rDNA ITS 片段序列比较

Table 1 Difference of the ITS nucleotide sequences between isolates L. d. SC10 and L. d. 6

多变区 Variable region (bp)	一致性 Identity	缺位 Gap	
L. d. SC10	L. d. 6		
1 ~ 487	1 ~ 488	477/488 (97%)	1/488 (0)
520 ~ 693	521 ~ 692	150/174 (86%)	2/174 (1%)
910 ~ 1 027	911 ~ 1 028	116/118 (98%)	
790 ~ 864	791 ~ 865	75/75 (100%)	

讨论

核糖体存在于所有的原核生物和真核生物细胞内，

主要是作为细胞中蛋白质合成场所。利什曼原虫编码核糖体的基因位于单一的染色体上，头尾相接，呈串珠状，拷贝数为 160 个重复单位。每个重复单位均可编码 16S rRNA, 5.8S rRNA 和 26S rRNA, 编码 rRNA 基因长度为 8 kb, 而周围的非转录间隔区 (non-transcribed spacer, NTS) 长度平均为 8.5 kb, rDNA ITS 基因平均长度为 1 kb。由于 rDNA 基因的高度保守性使其突变累积在成串重复排列的 rDNA 之间和两侧间隔区序列中, 而使核糖体基因间隔区序列具有种内和种间、以及亚种和株的特异性, 从而用于分类学和种株鉴定。

本研究采用 PCR 扩增位于 5.8S rRNA 基因两侧核糖体基因间隔区 ITS1 和 ITS2, 获得了我国山丘型疫区 L. d. SC10 和 L. d. 6 的 rDNA ITS 片段 (ITS1 + 5.8S RNA + ITS2), 将扩增出的 rDNA ITS 片段克隆入 PMD18-T vector 上并用双脱氧链末端终止法测序, 首次报道了我国山丘疫区杜氏利什曼原虫分离株 L. d. SC10 和 L. d. 6 的 ITS 序列及两者之间的差异。

本研究室多年的系列研究结果已证实, 我国荒漠、山丘、平原型疫区虫株间存在差异^[5,6]。卜玲毅等^[7]通过对 SSUrDNA 多变区序列点突变分析, 发现同属山丘疫区的 L. d. GS7 与 L. d. SC10 和 L. d. 6 在 UQ-I 区中存在不同的点突变。本研究通过对 rDNA ITS 序列分析, 发现 L. d. SC10 和 L. d. 6 在基因水平上存在一定差异。L. d. SC10 和 L. d. 6 均分离自四川省患者, 但 L. d. SC10 来源于南坪县, L. d. 6 来源于汶川县, 是否存在株间变异或其他原因, 尚待进一步证实。本研究结果验证了核糖体基因间隔区序列在分类学和种株鉴定上的价值, 并为我国山丘疫区黑热病的流行病学研究、临床诊断和防治提供了依据。

参 考 文 献

[1] 李一明, 管立人. 陇南川北山区黑热病的调查报告[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1990, 3: 13-15.
[2] Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients[J]. Parasitology, 1992, 105: 183-191.
[3] Fairlamb AH, Weisogel PO, Hoeymakers JHJ, et al. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from blood stream of *Trypanosoma brucei* [J]. J Cell Biol, 1978, 76: 293-309.
[4] Elisa C, Gabriel GJ, Hooman M, et al. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 73: 145-155.
[5] Hu XS, Bu LY, Ma Y, et al. Difference in DNA sequences in SSU rDNA variable regions among pathogens isolated from different epidemic foci of visceral leishmaniasis in China [J]. Chin Med J, 2002, 115: 1457-1459.
[6] 芦殿梅, 胡孝素, 乔中东, 等. 用 RAPD 技术对利什曼原虫 kDNA、nDNA 的分析[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2002, 9: 1-6.
[7] 卜玲毅, 胡孝素, 敬保迁, 等. 利什曼原虫中国分离株 SSUrDNA 多变区序列分析[J]. 实用寄生虫病杂志, 2001, 9: 1-3.

(收稿日期: 2004-03-16 编辑: 庄兆农)