

【论著摘要】

文章编号: 1000-7423(2002)-01-0055-02

# 恶性疟原虫 FCC1/HN 株 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的序列测定

江钢锋<sup>1</sup> 洪佳冬<sup>1</sup> 陆家海<sup>2</sup>

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)是疟原虫糖酵解过程中重要的酶,其基因最近被发现<sup>[1]</sup>。本文报告恶性疟原虫 FCC1/HN 株 GAPDH 基因序列测定结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 虫株

恶性疟原虫 FCC1/HN 株在本室长期保种,体外培养参照 Trager 等<sup>[2]</sup>方法并略作改进<sup>[3]</sup>。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

取 50 μl 培养物,按文献[4]方法用 5% 磷酸钠盐溶液提取,最后溶于 50 μl DEPC-H<sub>2</sub>O 中。

### 1.3 提取总 RNA

收获培养物中的环状体期疟原虫(1×10<sup>9</sup>以上),用 RNA 提取试剂盒(采用 TRIZOL 试剂盒, Gibco, BRL)抽提总 RNA,紫外分光光度计测定其含量,琼脂糖电泳鉴定其纯度。

### 1.4 cDNA 第 1 链合成

采用 Clontech 公司的 SMART<sup>TM</sup> cDNA 构建试剂盒。0.5 ml 无菌离心管中加入 RNA 样品 3 μl (0.05~1.0 μg 总 RNA), SMART II 寡核苷酸 1 μl, CDS II /3' PCR 引物 1 μl, 加双蒸水至 5 μl; 混匀, 72 °C 孵育 2 min, 置冰上 2 min 后离心沉淀。再加入 5×First-strand buffer 2.0 μl, 二硫苏糖醇(DTT) 1.0 μl (20 mmol), 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP) 混合液 1.0 μl (10 mmol), MMLV 逆转录酶(Superscript I, Gibco, BRL, 200 u/μl) 1.0 μl。混匀, 42 °C 孵育 1 h 后置冰上终止反应。

### 1.5 目的基因体外扩增

反应体系为: 50 μl 总反应液中含 20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 2.5 U Taq Plus DNA polymerase (上海生物工程有限公司产品), 引物各 0.5 μmol/L 和 5 μl 基因组 DNA 或 cDNA。

上游引物: 5'-TTATATAAAAACATATATTTTTCTTCGG-3';

下游引物: 5'-AAAATGCTTCATGTTTAAATAACTTAGTTG-3'。

反应条件为: 94 °C 变性 4 min, 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 70 °C 2 min 10 s, 共 30 个循环, 最后在 70 °C 延伸 2 min。因 GAPDH 基因有内含子, 为了能完整测出其全序列需增加另一个引物与上述上游引物组成另一对引物进行 PCR 反应, 该引物序列为: 5'-ACAATAAGTTGTTTGGTATCATATTGG-3'。

### 1.6 基因序列测定

PCR 产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化、乙醇和醋酸钠沉淀回收后, 用 ABI 测序系统测序。测序引物与 PCR 反应所用

引物同。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物

用基因组 DNA 作模板所得的 PCR 产物约 1 400 bp, 而用 cDNA 作模板所得的 PCR 产物约为 1 100 bp, 可见该基因含约 300 bp 的内含子。

### 2.2 基因序列测定

用 cDNA 作模板的 PCR 产物测序结果, 可知其编码区包含 1 011 bp, 其推断的编码氨基酸序列包含 337 个氨基酸残基。用基因组 DNA 作模板的 PCR 产物测序的结果, 在相当于开放阅读框的第 84 位碱基之后有 1 个约 300 bp 的内含子。由于内含子富含 AT, 无法测出其完整序列。本研究测得的恶性疟原虫 FCC1/HN 株的 GAPDH 基因序列的编码区与以前报告的 K1 株的序列完全一致<sup>[1]</sup>(图 1)。该基因的编码区碱基组成 62% 为 AT, 具有典型的恶性疟原虫 DNA 特征。该序列于 GenBank 登录号为 AF348158

```

ATGGCAGTAACAAAACCTTGAATT 24
M A V T K L G I
AATGATTTGGTGTATCGGACGTTTATGATTTAGAGCCAGCTTTGSAAGGAAAGATATC 84
N Q F G R I G R L V F R A A F G R K D I
GAAGTAGTTGCTATTAAGGACCGATTATGAGCCTTAACCACTTATGCTATCTGTTBAAA 144
E V V A I N D P F M D L N H L C Y L L K
TAAGATTCAATAGATGCTCAATTTGATGTTGAGGTAAGCCAGCTGATGATTTTATTA 204
Y D S V H G Q F P C E V T H A D G F L L
ATGGGAGAAAAGAAAGTCAGTGTGTTTTGCTGAAAAGGATCCATGCTGAAATTCCTGGGA 264
I G E K K V S Y F A E K D P S Q I P W G
AAATGCCAAGTAGATGTTGATGTTGAAATCAACTGCTGATTTTAAACGAAAGAAATAGCT 324
K C Q V D V V C E S T G V F L T K E L A
AGCAGTCACCTTAAGGAGGAGGAGCAAGGATTTATGTCGCGCCGCCAAGGATGAC 384
S S H L K G G A K K V I M S A P P K D D
ACCCGATTTATGTTATGAGTATTAAGCAGCAACATATGATACCAACCACTTATGTT 444
T P I Y V M G I N H N Q Y D T K Q L I V
TCCAGTGCATGATACCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 504
S N A S G T T N C L A P L A K V I N D R
TTTGGAAATTTTAAAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGG 564
F G I V E G L M T T V H A S T A N Q L V
GTTGATGCTGATGAAAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGG 624
Y D G P S K G Q K D W R A G R C A L S N
ATTATTCAGCTTCCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 684
I I P A S T G A A K A V G K V L P E L N
GGAAAATTAACAGGTTGATGCTTTCAGAGTACCAATTTGAACTGATGATGATGATGAT 744
G K L T G V A F R V P I G T V S V V D L
GTTGACAGATTAGAAAAGCAGGAAATATGAAAGGTTTAAAGGAGGTTTAAAGGAGGTT 804
V C R L Q K P A K Y E E V A L E I K K A
GCTGAAAGTCTACTTAAAGGAGTCTTAAAGGAGTCTTAAAGGAGTCTTAAAGGAGTCT 864
A E G L L K B V L G Y T E D E V V S Q D
TTGTTGATGATAAGAGTATCAATCTTTGAGATGAAAGCTGTTTAAAGGAGTCTTAAAG 924
F V H D N R S S I F D M K A B L A L N D
AATTTCTTCAAATTAATTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 984
N F F K L V S W Y D N E W G Y S N R V L
GATTAAGCCTTACAGATTACTAACAAC 1012
D L A V H I T N M
    
```

图 1 恶性疟原虫 FCC1/HN 株 GAPDH 的 DNA 及其推导的氨基酸序列 内含子位于第 84 与 85 位碱基之间

基金项目: 广东省高教厅自然科学重点科研项目(粤高教科[1999]89号)  
作者单位: 1 广东药学院寄生虫学教研室, 广州 510224; 2 中山大学  
医科大学寄生虫学教研室, 广州 510089

### 3 讨论

GAPDH 是生物体糖酵解过程中的重要酶。锥虫和利什曼原虫的 GAPDH 在酶和基因水平上已有深入研究, 布氏锥虫和墨西哥利什曼原虫均含两种 GAPDH 同工酶, 一种位于类微球体细胞器的糖体, 另一种见于细胞液中。这两种同工酶在氨基酸水平上只有 55% 相似性, 推测其功能有所不同<sup>[5, 8]</sup>。恶性疟原虫 GAPDH 基因的开放阅读框编码一个 337 氨基酸蛋白质, 估计分子量约为 36.65 kDa。恶性疟原虫 GAPDH 与人红细胞 GAPDH 有 63.5% 相似性<sup>[1]</sup>。用纯化的重组恶性疟原虫 GAPDH 免疫小鼠获得的抗血清进行免疫荧光抗体试验, 证明环状体、滋养体和裂殖体各期均被染, 表明该酶存在于上述各期中<sup>[1]</sup>。

通过抑制寄生虫所依赖的生物合成旁路中的某些关键酶是开发抗寄生虫药物的一种有效策略。已有报告针对锥虫的 GAPDH 设计出一些抑制剂, 不仅对锥虫, 而且对利什曼原虫也具有良好的抑制作用<sup>[2]</sup>。一般认为, 恶性疟原虫无功能上的三羧酸循环, 故其 ATP 产生完全依赖于糖酵解。抑制其糖酵解过程中的某些酶就可能抑制恶性疟原虫的生长发育。

最近发现, 哺乳动物的 GAPDH 除了具有酶活性外, 还参与膜转运、微管装配、核 RNA 转运、甚至基因表达的翻译调控等过程。因此, 对恶性疟原虫 GAPDH 酶及其基因的深入研究, 无论对于更全面了解恶性疟原虫的生理代谢和致病作用, 还是对新的抗疟药开发研究, 都具有重要意义。

### 参 考 文 献

[1] Daubenberger CA, Pohl-Frank F, Jiang G, et al. Identification and

recombinant expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* [J]. *Gene*, 2000, 245: 255-264.

[2] Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture [J]. *Science*, 1976, 193: 673-675.

[3] 江钢锋. 恶性疟原虫对青蒿酯钠抗性的体外培育 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1992, 10: 37-39.

[4] Foley M, Ranford-Cartwright L, Babiker HA. Rapid and simple method for isolating malaria DNA from fingerprick samples of blood [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 53: 241-244.

[5] Michels PAM, Marchand M, Kohl L, et al. The cytosolic and glycosomal isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei* have a distant evolutionary relationship [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 198: 421-428.

[6] Lambeir AM, Loiseau AM, Kuntz D, et al. The cytosolic and the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*-kinetic properties and comparison with homologous enzymes [J]. *Eur J Biochem*, 1991, 198: 429-435.

[7] Hannaert V, Blauw M, Kohl L, et al. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 55: 115-126.

[8] Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PAM. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*; expression in *Escherichia coli*, purification and characterization of the enzymes [J]. *Protein Expression and Purification*, 1995, 6: 244-250.

[9] Verlinde CLM, Callens M, Calenbergh SV, et al. Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness [J]. *J Med Chem*, 1994, 37: 3605-3613.

(收稿日期: 2000-11-06 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2002)-01-0056-01

## 【病例报告】

# 云南省建水县一起旋毛虫病暴发

徐 莉

中图分类号: R532.14

文献标识码: B

2000年6月, 本院收治5例旋毛虫病患儿, 经流行病学调查和实验室检查, 证实为一起因食生猪肉引起的旋毛虫病暴发。

2000年6月20日, 建水县某公路养护段一职工上街买回猪脊肉1.5 kg, 切片凉拌后生食。其中, 男性5例, 女性1例, 年龄最大者45岁, 最小者16岁。食后2~4 d, 6人全部发病, 出现上腹部不适、恶心、呕吐、腹痛腹泻及厌食等症状, 误认为急性胃肠炎。其中1例患者于食后第3天昏迷, 血压40/0 kPa, 在卫生所输液、抗休克及抗感染等救治无效死亡, 其余5例患者送本院治疗。入院时神志尚清楚, 均有发热(T 38~41℃), 伴头痛、头昏, 颜面浮肿, 全身肌肉酸痛, 尤以腓肠肌明显, 站立困难, 3例伴有双侧下肢水肿。血常规检查, 5例

患者白细胞总数  $12.2 \times 10^9/L \sim 20.0 \times 10^9/L$ , 嗜酸性粒细胞占 20%~45%。选择病情较重的2例作腓肠肌活检, 均查见旋毛虫幼虫囊包。5例患者均给予口服阿苯达唑 400 mg, 2次/d, 强地松 10 mg, 3次/d, 配合输液及对症治疗。7 d为1疗程, 连续用药2个疗程(强地松服用1 wk后逐渐减量至停药)病情明显好转, 体温逐渐正常。继续对症治疗, 住院26 d治愈出院。

旋毛虫病为动物源性疾病, 食用感染旋毛虫的未煮熟的猪肉易引起发病。各级卫生防疫部门应大力宣传贯彻《食品卫生法》, 加强对猪肉的检疫, 加强健康教育, 提高群众自我保护意识, 改变生食猪肉的习惯。

(收稿日期: 2001-10-30 编辑: 盛慧锋)

作者单位: 解放军第59中心医院, 开远 661600