

# 杜氏利什曼原虫四川分离株无鞭毛体蛋白基因的克隆及真核表达

李金福, 陈建平\*, 田玉, 杨志伟, 马莹, 胡孝素

**【摘要】** 目的 克隆、真核表达杜氏利什曼原虫四川株的无鞭毛体蛋白(amastin)编码基因。方法 PCR 扩增杜氏利什曼原虫四川汶川人株 L.d.SC10H2 与四川南坪犬株 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因, 将该基因导入 pcDNA3.1(+), 构建真核表达重组质粒, 转染 NIH3T3 细胞, 采用免疫荧光法鉴定重组质粒的瞬时表达; RT-PCR 和 Western blotting 鉴定稳定表达。结果 2株杜氏利什曼原虫均扩增出 552 bp 的无鞭毛体蛋白基因, 同源率为 86%。转染后在 NIH3T3 细胞膜和细胞内观察到较强的绿色荧光, 表明无鞭毛体蛋白基因在 NIH3T3 细胞中获得短暂表达。细胞裂解产物经 Western blotting, 在相对分子质量 (*Mr*) 约 20 000 处检测到阳性杂交信号, 表明无鞭毛体蛋白基因在 NIH3T3 细胞内获得了稳定表达。结论 获得了我国杜氏利什曼原虫四川分离株 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因序列, 并在 NIH3T3 细胞中稳定表达。

**【关键词】** 杜氏利什曼原虫; 无鞭毛体蛋白; 基因克隆; 表达

中图分类号:R382.22 文献标识码:A

## Cloning of Amastin Gene of *Leishmania donovani* Isolates from Sichuan Province and its Expression in Eucaryotic System

LI Jin-fu, CHEN Jian-ping\*, TIAN Yu, YANG Zhi-wei, MA Ying, HU Xiao-su

(Department of Parasitology, School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**【Abstract】 Objective** To clone and express the amastin gene of two *Leishmania donovani* isolates from Sichuan Province of China. **Methods** Amastin gene was amplified from nuclear DNA of two *L.donovani* isolates, cloned into pcDNA3.1(+), and sequenced by the dideoxy chain termination. NIH3T3 cell was transfected by recombinant plasmid. Transient expression of amastin gene was detected by immunofluorescence and stable expression was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Amastin gene of both isolates was 552 bp. Sequence analysis showed that the similarity was 86% between the two isolates. A high green fluorescence was found on the cell membrane and inside the cell. The NIH3T3 cell was transfected by the recombinant plasmid successfully. Amastin gene was obtained by RT-PCR from the transfected NIH3T3 cells. Western blot analysis showed that there was a protein about *Mr* 20 000 in lysate of the transfected NIH3T3 cells, indicating that the amastin gene was expressed in the cells. **Conclusion** Amastin gene of the two *L.donovani* isolates has been cloned and the gene can be expressed stably in the NIH3T3 cell.

**【Key words】** *Leishmania donovani*; Amastin; Gene cloning; Expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No39870656)

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

杜氏利什曼原虫引起的黑热病(又称内脏利什曼病)是一种严重威胁患者生命的人兽共患病, WHO/TDR 将其列为 6 种重点防治的热带病之一。迄今, 尚无可供临床大规模应用的疫苗。寻找有效的、新的

疫苗候选分子是当今黑热病预防研究工作的重点。近年来对无鞭毛体蛋白(amastin)的研究<sup>[1,2,5,6]</sup>使其有望成为一种黑热病疫苗候选分子。本文首次在国内首次克隆了分离自我国四川省的 2 株杜氏利什曼原虫的无鞭毛体蛋白编码基因, 并进行了序列分析。构建的重组质粒 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin 在真核表达系统 NIH3T3 细胞中稳定表达, 为构建黑热病无鞭毛体蛋白基因疫苗奠定了基础。

基金项目:国家自然科学基金资助(No39870656)

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 610041

\* 通讯作者, E-mail: jpchen007@163.com

## 材料与方法

### 1 虫株及利什曼原虫前鞭毛体基因组 DNA 的提取

两虫株分别为本室自行保存的四川省汶川县人分离株(MHOM/CN/90/SC10H2, 简称 L.d.SC10H2)和四川省南坪县犬分离株(MCAN/CN/86/SC7, 简称 L.d.SC7)。将虫株从液氮中取出, 先转入 NNN 培养基中 27 °C 培养 7 d, 之后转入含 15% 小牛血清的 M199 培养基(美国 Invitrogen 公司产品)中进行扩大培养。当虫体总数达  $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$  时收集虫体, 参照文献[3]的方法, 提取前鞭毛体的基因组 DNA。

### 2 PCR 引物的设计和合成

根据 GenBank 已有的 4 种利什曼原虫无鞭毛体蛋白编码基因序列设计一对引物。上游引物 P1 的 5' 端添加限制性内切酶 *Bam*H I 识别序列和保护序列, 下游引物 P2 的 5' 端添加限制性内切酶 *Xho* I 识别序列和保护序列。引物合成工作由宝生物工程(大连)有限公司完成。引物序列如下:

P1 5'-GGCGGATCCATGCTGTGCTCGTGCATCGTGT-3'  
*Bam*H I

P2 5'-CGCCTCGAGCTACATTATAATCAGCAGCACCAGG-3'  
*Xho* I

### 3 无鞭毛体蛋白基因的扩增

PCR 扩增所用聚合酶 Premix *ExTaq* 为宝生物工程(大连)有限公司产品。反应条件为 94 °C 3 min, 然后 94 °C 30 s, 60 °C 40 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环, 最后一个循环 72 °C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 4 无鞭毛体蛋白基因的克隆及鉴定

将上述两虫株的 PCR 产物、质粒载体 pcDNA3.1 (+) 分别进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切后的产物经胶回收试剂盒(杭州博日科技有限公司产品)纯化。用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶(英国 New England Labs 公司产品)分别将两虫株 amastin 基因片段与质粒载体 pcDNA3.1 (+) 相连接, 16 °C 过夜。取连接反应液分别转化预先制备的大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 均匀涂布菌液于含氨苄青霉素的 LB 培养基平皿上, 37 °C 培养 16 h 后从平皿上挑取菌落, 扩大培养, 并进行重组质粒的 PCR 鉴定和酶切鉴定。将四川人分离株 amastin 基因的重组质粒命名为 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin, 四川犬分离株 amastin 基因的重组质粒命名为 pcDNA3.1(+)-SC7-amastin。

### 5 无鞭毛体蛋白基因序列测定及同源性分析

对 PCR 鉴定及酶切鉴定均正确的重组质粒进行测序(由上海英骏生物技术有限公司完成)。使用 ORF Finding 软件确定所获序列是否拥有完整的开放阅读框。运用生物软件 DNAMAN, 将 L.d.SC10H2、L.d.SC7 无鞭毛体蛋白基因序列分别与 GenBank 中收录的其他 4 种利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列进行对比分析, 并同时进行 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因序列对比分析。另外, 分析了推导的 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白氨基酸序列与其他虫株无鞭毛体蛋白氨基酸序列的同源性。

### 6 重组质粒转染 NIH3T3 细胞

转染前 24 h 将细胞培养瓶中生长状态良好的 NIH3T3 细胞 [含 10% 小牛血清, 100 U/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM (美国 Invitrogen 公司产品) 完全培养基培养] 用胰蛋白酶消化, 以  $5 \times 10^5$  个/孔接种 6 孔细胞培养板, 当细胞生长至 70% 左右汇合时, 按照转染试剂(南京凯基生物科技发展有限公司产品)使用说明转染细胞。实验分 pcDNA3.1(+) 对照组和重组质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 实验组。

### 7 免疫荧光法检测瞬时表达

在 6 孔细胞培养板中制作细胞爬片, 按上述方法转染。转染后 48 h 处理爬片, 检测 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin 在细胞中的瞬时表达。具体步骤为: PBS 清洗细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗, 2% Triton X-100 处理 15 min, PBS 清洗, 加封闭血清 37 °C 封闭 15 min, 加 20  $\mu$ l 杜氏利什曼原虫兔血清抗体(本室自行制备, 工作浓度 1:200) 4 °C 过夜, PBS 清洗, 加 FITC 标记的第二抗体(北京成文免疫化学研究室产品, 工作浓度 1:100), 37 °C 孵育 15 min 后 PBS 清洗, 50% 缓冲甘油封片, 在荧光显微镜下观察结果。

### 8 G418 筛选稳定表达细胞克隆

转染 48 h 后, 换用含 G418 (美国 Invitrogen 公司产品, 300  $\mu$ g/ml) 的培养液继续培养细胞, 每 2 d 更换 1 次培养液。当空白对照孔细胞完全死亡时, 换用含 G418 (150  $\mu$ g/ml) 的培养液继续培养, 每 2 d 更换 1 次培养液, 至稳定表达转入基因的细胞克隆出现时转入细胞培养瓶中扩大培养。

### 9 RT-PCR 鉴定稳定表达

经 G418 筛选后存活细胞生长至 80% 左右汇合

时,使用总 RNA 提取试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司产品)提取其总 RNA。所获总 RNA 经反转录(反转录试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品)后再用前述引物进行 PCR 扩增,以鉴定其是否稳定表达无鞭毛体蛋白基因。

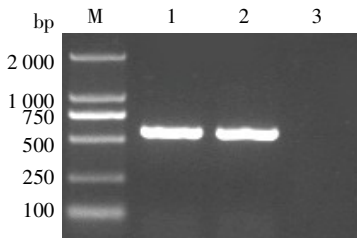
**10 Western blotting 鉴定稳定表达**

经 G418 筛选后存活的细胞生长至 80%左右汇合时,用 PBS 洗涤细胞,加预冷的细胞裂解液,冰浴 20 min,将裂解产物移至 1.5 ml 离心管中,4℃、10 000×g 离心 5 min,取上清,加 2×SDS 上样缓冲液,混匀,100℃处理 5 min,取 25 μl 进行 SDS-PAGE 分析(分离胶浓度为 15%),电泳后转印到硝酸纤维素膜上,将膜浸泡在含 50 g/L 脱脂奶粉的 TTBS 中,室温封闭 3 h,依次与杜氏利什曼原虫兔血清抗体(工作浓度为 1:200)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(北京中杉金桥公司产品,工作浓度为 1:1 000)作用后,用 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司产品)避光显色。

**结 果**

**1 无鞭毛体蛋白基因的 PCR 扩增**

用 PCR 方法从我国杜氏利什曼原虫四川分离株 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的基因组 DNA 中分别扩增出与预期大小一致,约 550 bp 的 DNA 片段(图 1)。



M: DNA 标志物, 1: L.d.SC10H2 无鞭毛体蛋白基因, 2: L.d.SC7 无鞭毛体蛋白基因, 3: 阴性对照。  
M: DNA marker (D2000), 1: Amastin gene of L.d.SC10H2, 2: Amastin gene of L.d.SC7, 3: Negative control.

**图 1 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因 PCR 扩增产物电泳结果 (1%琼脂糖凝胶电泳)**  
**Fig.1 PCR product of amastin gene of L.d.SC10H2 and L.d.SC7 (1% Agarose gel electrophoresis)**

**2 无鞭毛体蛋白基因序列测定及同源性分析**

**2.1 序列测定** L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因片段长度均为 552 bp,经 ORF Finding 软件确定拥有完整的开放阅读框。序列已被 GenBank 收录,收录号分别为 DQ864502 和 DQ864503。所获两序列与 GenBank 中收录的其他 4 种利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列对比结果见图 2。

<i>L. major</i>	1	ATGCTGTGCTCGTCATCGTTCATGTCTCTCGTGCAGCTCTGCGCCGATCTCGCAGTTC	60
<i>L. braziliensis</i>	1	-----A-----G-----C-----C	60
<i>L. mexicana</i>	1	-----A-----G-----C-----C	60
<i>L. amazonensis</i>	1	-----A-----G-----C-----C	60
<i>L. d. SC10H2</i>	1	-----G-----A-----C-----T	60
<i>L. d. SC7</i>	1	-----A-----G-----A-----C	60
<i>L. major</i>	61	CGCGCAGGGGCATCAAGCTAGCGCCACTGGCGCGGAGCAAGTGTGTGGCTGACT	120
<i>L. braziliensis</i>	61	---C---G---CA---AC---G---T---T---C---T	120
<i>L. mexicana</i>	61	---C---G---CA---AC---G---T---T---C---T	120
<i>L. amazonensis</i>	61	---C---G---CA---AC---A---T---T---C---C	120
<i>L. d. SC10H2</i>	61	---T---A---TC---GA---G---C---A---T---T	120
<i>L. d. SC7</i>	61	---C---G---CA---AC---G---T---T---C---C	120
<i>L. major</i>	121	GCGTGGGGCTGAAGAAGCACTGCAACTCCAACAACACTACGACTACCGCCGACGAGCATA	180
<i>L. braziliensis</i>	121	---C---T---GC---C---T---C---C---A	180
<i>L. mexicana</i>	121	---C---T---GC---C---T---C---C---A	180
<i>L. amazonensis</i>	121	---C---T---GC---C---T---C---A---A	180
<i>L. d. SC10H2</i>	121	---T---G---CT---T---A---C---C---G	180
<i>L. d. SC7</i>	121	---T---T---CC---T---G---T---C---A	180
<i>L. major</i>	181	GGGTGGCAGCGCGGAAGCAGTGTCCAGGTGTCGGAGCGCTTACATGTGCGCGTT	240
<i>L. braziliensis</i>	181	---G---CGCGGA---AG---C---TG---CG---T	240
<i>L. mexicana</i>	181	---G---CGCGGA---AG---C---TG---CG---T	240
<i>L. amazonensis</i>	181	---A---GACGTGG---GA---C---TG---CA---T	240
<i>L. d. SC10H2</i>	181	---G---CGTGCCA---AG---T---CA---T---TG---G	240
<i>L. d. SC7</i>	181	---G---CGCTCGA---AG---C---TG---C---TG---T	240
<i>L. major</i>	241	ATTGTGTCTCTGCTGCTGCTGATGACGGCGCTACTTTCATCGGCATGAAGGCAAG	300
<i>L. braziliensis</i>	241	---C---G---A---C---C---C---G---C	300
<i>L. mexicana</i>	241	---C---G---A---C---C---C---G---C	300
<i>L. amazonensis</i>	241	---C---G---A---C---C---C---G---C	300
<i>L. d. SC10H2</i>	241	---T---A---T---T---C---C---C---C	300
<i>L. d. SC7</i>	241	---C---G---A---C---T---G---C---C	300
<i>L. major</i>	301	GTGCTGCTAGTCTGCTGTGCGCTTGAGGTGTGGTGGCGCTGATCCCATGGGTGTGC	360
<i>L. braziliensis</i>	301	---AG---C---G---CC---T---T---TGG---C---C	360
<i>L. mexicana</i>	301	---AG---C---G---CC---T---T---TGG---C---C	360
<i>L. amazonensis</i>	301	---AG---C---G---CC---T---T---TGG---C---C	360
<i>L. d. SC10H2</i>	301	---GA---G---A---CT---C---TGT---T---T	360
<i>L. d. SC7</i>	301	---GG---C---G---TC---T---T---GTT---T---C	360
<i>L. major</i>	361	ATGACGGCGGTGTGGCAGCGCACTACTGCGCGGTGCGACCGTGAAGATCAACAGCTCG	420
<i>L. braziliensis</i>	361	---G---G---C---GG---A---CT---A---C---GA---C---C---T---G	420
<i>L. mexicana</i>	361	---G---G---C---GG---A---CT---A---C---GA---C---C---T---G	420
<i>L. amazonensis</i>	361	---G---G---C---AG---G---AC---A---T---GA---C---C---T---G	420
<i>L. d. SC10H2</i>	361	---T---C---C---AA---A---CT---C---C---TC---G---G---A---A	420
<i>L. d. SC7</i>	361	---G---G---T---GG---A---CT---A---C---GA---C---C---T---G	420
<i>L. major</i>	421	AACGGCAAGCGGACGGCGTGCCTGACGGCTCTGTGCTGCGTGAAGTCTTCAAGCCAGC	480
<i>L. braziliensis</i>	421	---A---GGC---C---G---T---CT---G---GTCG---A---GC---A	480
<i>L. mexicana</i>	421	---A---GGC---C---G---T---CT---G---GTCG---A---GC---A	480
<i>L. amazonensis</i>	421	---A---GGC---C---G---T---CT---G---GTCG---A---GC---A	480
<i>L. d. SC10H2</i>	421	---A---TTA---T---T---C---TG---A---TATT---G---AT---	480
<i>L. d. SC7</i>	421	---G---GTG---C---G---T---CT---G---GTCG---A---GC---A	480
<i>L. major</i>	481	GCTGGCTACGGTCTGACGGTTGCGCGGTGGTGCAACCAGGTGATGGCCCTGGTGTCTGC	540
<i>L. braziliensis</i>	481	-----G---G---CC-----	540
<i>L. mexicana</i>	481	-----G---G---CC-----	540
<i>L. amazonensis</i>	481	-----G---G---TC-----	540
<i>L. d. SC10H2</i>	481	-----T---T---TT-----	540
<i>L. d. SC7</i>	481	-----G---G---CC-----	540
<i>L. major</i>	541	ATTATAATGTAG	552
<i>L. braziliensis</i>	541	-----	552
<i>L. mexicana</i>	541	-----	552
<i>L. amazonensis</i>	541	-----	552
<i>L. d. SC10H2</i>	541	-----	552
<i>L. d. SC7</i>	541	-----	552

**图 2 6 株利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列比较**  
**Fig.2 Comparison of the amastin nucleotide sequences of six leishmania isolates**

**2.2 序列同源性分析** L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 分别与其他株利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列进行同源性分析(表 1)。推导的 L.d.SC10H2 和 L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白氨基酸序列分别与其他虫株无鞭毛体蛋白氨基酸序列进行同源性分析(表 1)。

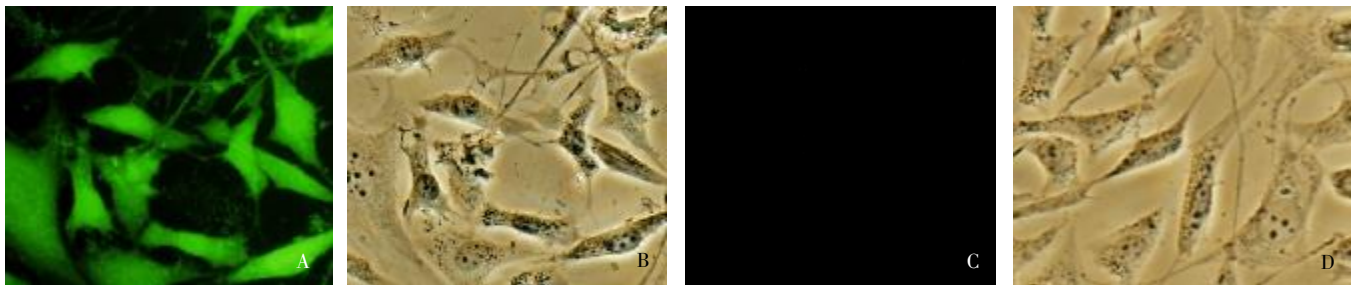
结果表明, L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因序列及推导的氨基酸序列与 GenBank 中收录的其他 4 种利什曼原虫的相应序列有高度的同源性, L.d.SC10H2 的序列相比而言则相对较低。L.d.SC10H2、L.d.SC7 两者的无鞭毛体蛋白基因序列及推导的氨基酸序列均有一定的差异,可能存在株间变异。

**3 免疫荧光法检测 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中的瞬时表达**

pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 转染的 NIH3T3 细

表 1 *L.d.SC10H2/L.d.SC7* 与其他株利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列和氨基酸序列的同源性 (%)  
Table 1 Similarity of the amastin nucleotide sequence and amino acid sequence between *L.d.SC10H2/L.d.SC7* and other *Leishmania* isolates (%)

		硕大利什曼原虫 <i>L.major</i>	巴西利什曼原虫 <i>L.braziliensis</i>	墨西哥利什曼原虫 <i>L.mexicana</i>	亚马逊利什曼原虫 <i>L.amazonensis</i>	杜氏利什曼原虫四川 人分离株 <i>L.d.SC10H2</i>	杜氏利什曼原虫四川 犬分离株 <i>L.d.SC7</i>
基因序列 Nucleotide sequence	四川人分离株 <i>L.d.SC10H2</i>	86	86	86	84	100	86
	四川犬分离株 <i>L.d.SC7</i>	96	96	96	93	86	100
氨基酸序列 Amino acid sequence	四川人分离株 <i>L.d.SC10H2</i>	80.87	80.87	80.87	75.96	100	79.78
	四川犬分离株 <i>L.d.SC7</i>	94.54	94.54	94.54	88.52	79.78	100



A: 转染质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 的 NIH3T3 细胞(荧光), B: 转染质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 的 NIH3T3 细胞(普通光), C: 转染质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 的 NIH3T3 细胞(荧光), D: 转染质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 的 NIH3T3 细胞(普通光)。

A: NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin (fluorescence), B: NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin (ordinary light), C: NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1(+) (fluorescence), D: NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1(+) (ordinary light).

图 3 免疫荧光法检测重组质粒 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中的表达 (×200)

Fig.3 Immunofluorescence of the expressed products of recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin in NIH3T3 cells (×200)

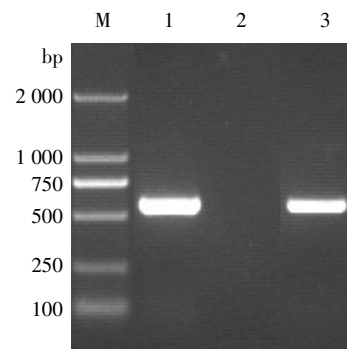
胞在荧光显微镜下可见细胞膜和细胞内有较强的绿色荧光 (图 3A), 同一视野细胞在普通光下形态清晰 (图 3B)。表明 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 成功转入 NIH3T3 细胞, 并在细胞膜和细胞内获得短暂表达。空质粒 pcDNA3.1(+)转染的 NIH3T3 细胞在荧光显微镜下未检测到绿色荧光 (图 3C), 而同一视野细胞在普通光下形态清晰 (图 3D)。

#### 4 RT-PCR 鉴定 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中的稳定表达

经 G418 筛选后存活细胞的总 RNA 经反转录后 PCR 扩增出无鞭毛体蛋白基因。而空质粒 pcDNA3.1(+)转染的 NIH3T3 细胞总 RNA 经反转录后 PCR 未扩增出任何产物 (图 4)。表明无鞭毛体蛋白基因在 NIH3T3 细胞中获得了稳定表达。

#### 5 Western blotting 鉴定 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中的稳定表达

经 G418 筛选后存活细胞的裂解产物, 在相对分子质量 (*Mr*)约 20 000 处可见明显的阳性杂交信号,



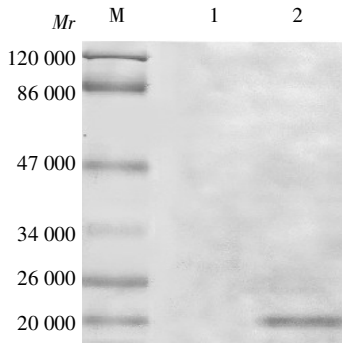
M: DNA 标志物, 1: 转染 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 的 NIH3T3 细胞的 RT-PCR 产物, 2: 转染 pcDNA3.1 (+)的 NIH3T3 细胞的 RT-PCR 产物, 3: 阳性对照。

M: DNA marker (D2000), 1: RT-PCR product of NIH3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin, 2: RT-PCR product of NIH3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+), 3: Positive control.

图 4 RT-PCR 检测 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 于 NIH3T3 细胞中的表达(1%琼脂糖凝胶电泳)

Fig.4 Detection of the expression of pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin in NIH3T3 by RT-PCR (1% agarose gel electrophoresis)

表明 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中稳定表达出无鞭毛体蛋白。而空质粒 pcDNA 3.1(+)转染的 NIH3T3 细胞裂解产物未检测到杂交信号(图 5)。



M: 蛋白质标志物, 1: pcDNA3.1 (+)转染的 NIH3T3 细胞裂解产物, 2: 重组质粒 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin 转染的 NIH3T3 细胞裂解产物。

M: Protein marker, 1: Lysate of NIH3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+), 2: Lysate of NIH3T3 cells transfected with pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin.

图 5 Western blotting 检测 pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin 于 NIH3T3 细胞中的表达

Fig.5 Detection of the expression of pcDNA3.1(+)-SC10H2-amastin in NIH3T3 by Western blotting

## 讨 论

杜氏利什曼原虫隐性感染者或黑热病患者康复后其机体可产生持久的针对杜氏利什曼原虫的保护性免疫应答, 表明疫苗接种的方法预防杜氏利什曼原虫的感染是可行的。免疫预防的免疫原可以来源于基因工程表达的蛋白或蛋白亚单位, 或者是编码这些蛋白的基因。但选择何种蛋白或其编码的基因作为免疫原则至关重要。

Teixeira 等<sup>[1]</sup>(1994)通过对锥虫 cDNA 文库的差异筛选, 在国际上首次报道并成功克隆了位于锥虫虫体表面的无鞭毛体蛋白基因。Wu 等<sup>[4]</sup>(2000)将几种与锥虫无鞭毛体蛋白类似的利什曼原虫无鞭毛体蛋白与绿色荧光蛋白融合, 利用激光共聚焦显微镜证实, 利什曼原虫的无鞭毛体蛋白也主要位于无鞭毛体时期虫体表面, 是一种转录后调控的发育调节蛋白。Salotra 等<sup>[5]</sup>的研究表明, 无鞭毛体蛋白在患黑热病后皮肤利什曼病(PKDL)时表达上调, 这有可能在改变患者的临床表现上起重要作用, 以致于影响黑热病的临床治疗效果。Stober 等<sup>[6]</sup>对 100 种新的硕大利什曼原虫疫苗候选者进行筛选, 发现无鞭毛体蛋白是其中一种最新的有前途的保护性抗原。加之无鞭毛体蛋白位于利什曼原虫虫体表面, 在利什曼原虫感染侵入宿主体内后有着更多的与宿主免疫系统接触的机会, 因而有望成为抗利什曼原虫感染的疫苗候选抗原蛋白, 其编码基因则可能成为基因疫苗的候选基因。但迄今为止, 未见利什曼原虫中对人生命威胁最大的杜氏利什

曼原虫无鞭毛体蛋白基因的克隆、序列报告以及真核表达方面的报道。

本研究克隆了杜氏利什曼原虫四川人分离株(L.d.SC10H2)和四川犬分离株(L.d.SC7)的无鞭毛体蛋白基因, 并进行了测序、序列分析以及该基因在真核表达系统 NIH3T3 细胞中表达的研究。结果发现, 克隆的两株杜氏利什曼原虫的无鞭毛体蛋白基因序列及推导的氨基酸序列存在一定的差异, 有可能存在株间变异或是由于宿主不同而产生的差异, 有待进一步证实。此外, L.d.SC7 的无鞭毛体蛋白基因序列及推导的氨基酸序列与成军等报道的 4 种利什曼原虫无鞭毛体蛋白基因序列及推导的氨基酸序列具有高度同源性, 而 L.d.SC10H2 的序列相比而言则同源性略低, 提示无鞭毛体蛋白是一种较保守的蛋白, 加之其位于虫体表面, 易于诱导机体产生保护性免疫力, 成为疫苗候选分子的希望较大。用免疫荧光法检测重组质粒 pcDNA3.1 (+)-SC10H2-amastin 在 NIH3T3 细胞中的瞬时表达时, 在荧光显微镜下见到细胞膜和细胞内有绿色荧光。经 G418 筛选存活细胞的总 RNA 经 RT-PCR 后扩增出无鞭毛体蛋白基因; 细胞裂解产物经 Western blotting 鉴定, 在相对分子质量 (*Mr*) 约 20 000 处检测到阳性杂交信号, 表明无鞭毛体蛋白基因可以在真核细胞中稳定表达。本研究为黑热病无鞭毛体蛋白基因疫苗的研制奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff CY, *et al.* Differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 20509-20516.
- [2] Cheng J, Zhong YW, Liu Y, *et al.* Cloning and sequence analysis of 4 amastin genes from *Leishmania* parasites [J]. *Chin J Infect Dis*, 2001, 19: 27-31. (in Chinese) (成军, 钟彦伟, 刘妍, 等. 利什曼原虫无鞭毛体蛋白的基因克隆与序列分析[J]. *中华传染病杂志*, 2001, 19: 27-31.)
- [3] 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: 183-192.
- [4] Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, *et al.* A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2000, 110: 345-357.
- [5] Salotra P, Duncan RC, Singh R, *et al.* Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis[J]. *Microbes Infect*, 2006, 8: 637-644.
- [6] Stober CB, Lange UG, Roberts MT, *et al.* From genome to vaccines for leishmaniasis: screening 100 novel vaccine candidates against murine *Leishmania major* infection[J]. *Vaccine*, 2006, 24: 2602-2616.

(收稿日期:2006-09-04 编辑:高石)