

杜氏利什曼原虫平原和荒漠疫区分离株 LACK 基因克隆及序列分析

马莹 胡孝素 王雅静 王子龙

【摘要】 目的 测定我国平原疫区和荒漠疫区杜氏利什曼原虫分离株活性蛋白激酶 C 受体同源物 (LACK) 基因序列, 并与山丘疫区分离株及国外利什曼原虫分离株进行比较。方法 应用 RT-PCR 扩增 LACK 基因, 将其克隆入 pUC18 载体后用双脱氧链末端终止法测序, 并与 GenBank 中相关数据进行比较。结果 用 RT-PCR 成功扩增出约 950 bp 的 LACK 基因片段, 测序结果表明其片段大小均为 942 bp, 与 GenBank 中多种利什曼原虫 LACK 基因的核苷酸序列一致性达 97% 以上。我国山丘、平原和荒漠 3 个不同疫区杜氏利什曼原虫分离株的 LACK 基因序列的一致性达 95% 以上。结论 获得了我国平原和荒漠疫区杜氏利什曼原虫 LACK 基因序列。我国 3 个不同疫区杜氏利什曼原虫分离株的 LACK 基因具有高度同源性。

【关键词】 利什曼原虫; LACK; 克隆; 序列分析

中图分类号: R 382. 22

文献标识码: A

Cloning and Sequence Analysis of LACK Gene of *Leishmania Donovanii* Isolates from Plain and Desert Foci of China

MA Ying, HU Xiao-su, WANG Ya-jing, WANG Zi-long

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

【Abstract】 Objective To determine the nucleotide sequence of the LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated protein kinase C) gene of *Leishmania donovani* isolates from plain foci (*L. d* SD1) and desert foci (*L. d* XJ771) of China, and to find out the difference of the sequence of LACK gene with other *Leishmania* spp. and also the isolate from hill foci of China. **Methods** The LACK genes of *L. d* SD1 and *L. d* XJ771 were amplified by RT-PCR and cloned into pUC18 vector respectively, sequenced by the dideoxy chain termination method, then analyzed and compared with that of other isolates. **Results** The LACK genes of the two isolates were successfully cloned. Both of the 2 fragments were 942 bp in length. Comparison of the two nucleotide sequences with that of other *Leishmania* spp. in GenBank showed that the identities were more than 97%, and the identities of the nucleotide sequences of LACK genes of the three *L. d* isolates from plain, desert and hill foci of China were more than 95%. **Conclusion** High identities exist among the nucleotide sequences of LACK genes of the three *L. d* isolates from the three foci of China.

【Key words】 *Leishmania donovani*, LACK, gene cloning, gene sequencing

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

内脏利什曼病 (visceral leishmaniasis, VL) 对人体危害严重, 流行时有反复, 我国山丘疫区 2/3 以上患者为 10 岁以下儿童, 荒漠疫区患者几乎均为 3 岁以下幼儿, 诊治较为困难^[1-2]。利什曼原虫活性蛋白激酶 C 受体同源物 (*Leishmania* homologue of receptors for activated protein kinase C, LACK) 是近年在硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) 和恰氏利什曼原虫 (*Leishmania chagasi*) 中发现的一种新蛋白^[3,4], 已有研究表明它能在动物模型体内诱导出较 gp63 等抗原更高水平的保护力。由 *L. major* 的 LACK 基因构建的核酸疫苗能诱导小鼠 Th1 反应, 免疫效果及保护性

免疫持续时间均优于 LACK 蛋白^[5], 因而 LACK 基因有望成为抗利什曼原虫核酸疫苗构建的候选基因。目前, 国外对利什曼原虫 LACK 的研究多针对皮肤利什曼病, 在我国仅对山丘疫区杜氏利什曼原虫分离株的 LACK 基因进行了克隆和序列分析^[6]。考虑到我国山丘、平原和荒漠疫区的内脏利什曼病在流行病学特点及防治效果方面均有明显差异, 若用 LACK 基因预防内脏利什曼病, 掌握平原和荒漠疫区分离株 LACK 基因序列十分必要。本文采用 RT-PCR 技术分别扩增我国平原疫区及荒漠疫区杜氏利什曼原虫分离株 LACK 基因, 并进行克隆和序列测定, 与山丘疫区分离株及国外利什曼原虫分离株进行同源性比较, 以便为我国内脏利什曼病核酸疫苗研究提供基础资料。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 39970667)

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

材料与方法

1 虫株及利什曼原虫前鞭毛体总 RNA 的提取

选用杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 山东分离株 MHON /CN /84 /SD 1 和杜氏利什曼原虫新疆分离株 IPHL /CN /77 /XJ 771。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 M 199 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, 按总 RNA 提取试剂盒(购自上海华舜生物工程有限公司)说明书分别提取两虫株的总 RNA。

2 引物设计和合成

根据文献^[7]修改设计了一对引物。在上游引物 L 1 的 5 端添加 *EcoR* I 识别序列和保护序列, 下游引物 L 2 的 5 端添加 *Xba* I 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:

L 1: 5'-GGAATTCCACCA TGA ACTACG-3'
EcoR I

L 2: 5'-GCTCTAGATTACTCGGCGTCGGA GAT-3'
Xba I

3 LACK 基因的扩增

一步法 RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。在 50 μ l 反应体系中进行 RT-PCR 反应, 分别扩增两虫株的 LACK 基因。反应条件按试剂盒说明和参考文献^[7]进行, 即 50 逆转录 30 min, 94 灭活逆转录酶及 DNA 变性 2 min 后进入: 95 变性 1 min, 41 退火 2 min, 72 延伸 3 min, 共 31 个循环, 最后一个循环在 72 延伸 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

4 LACK 基因的克隆

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, 用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 同时用这两种酶双酶切质粒 pUC18。酶切产物经乙醇沉淀后溶于蒸馏水。用连接试剂盒于 16 分别将两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大肠杆菌 DH5 α 感受态, 用表面涂有 IPTG/X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 平板 37 培养过夜。内切酶 *EcoR* I *Xba* I 和连接试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司。

5 阳性重组克隆的筛选与鉴定

从两个 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 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。

5.1 重组质粒的酶切鉴定

将重组质粒分别用限制性内切酶 *EcoR* I 进行单酶切及用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行双酶切, 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, 用 L 1, L 2 为引物进行 PCR 反应。扩增产物也以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

6 LACK 基因序列测定与分析

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并分析测序结果。

结 果

1 LACK 基因的 PCR 扩增

用一步法 RT-PCR 从杜氏利什曼原虫山东、新疆分离株总 RNA 样本中分别扩增出约 950 bp DNA 片段, 与预期大小一致, 而空白对照未扩增出条带(图 1)。

2 重组质粒的筛选和鉴定

2.1 重组质粒酶切鉴定

用 *EcoR* I 对重组质粒进行单酶切, 见一 3 500 bp 片段, 比空质粒约大 1 000 bp; 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 对该重组质粒进行双酶切, 见与空质粒等大约 2 500 bp 和 950 bp 两个片段(图 2)。

2.2 重组质粒的 PCR 鉴定

对酶切正确的重组质粒进行 PCR 扩增鉴定, 扩增出约 950 bp 的特异片段(图 3)。

3 DNA 序列测定及同源性比较

3.1 LACK 基因序列

我国平原疫区及荒漠疫区杜氏利什曼原虫分离株 LACK 基因片段的长度均为 942 bp (含起始密码子和终止密码子), 编码 312 个氨基酸(图 4, 图 5)。

3.2 同源性分析

平原疫区分离株 *L. d* SD 1 及荒漠疫区分离株 *L. d* XJ 771 LACK 基因与美国 NCBI 核苷酸序列数据库 (GenBank) 中杜氏利什曼原虫 (*L. donovani*), 婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*), 恰氏利什曼原虫 (*L. chagasi*), 硕大利什曼原虫 (*L. m major*), 亚马逊利什曼原虫

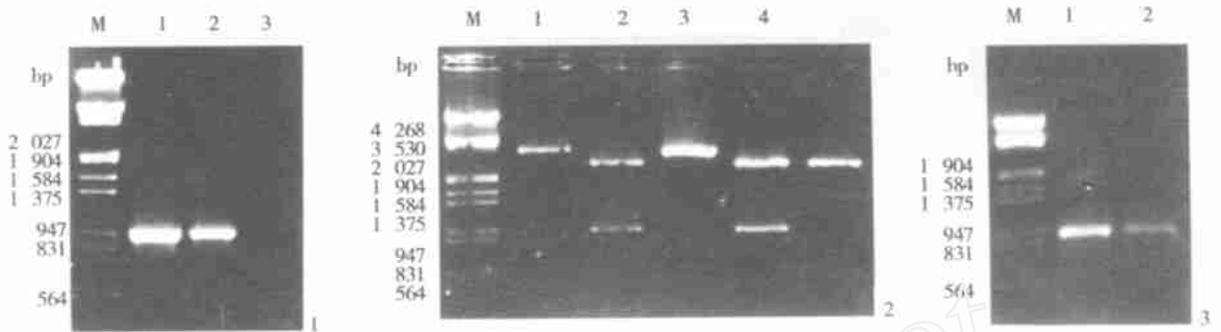


图 1 用 LACK 特异引物 RT-PCR 扩增利什曼原虫 *L. d* SD1 和 *L. d* XJ771 特异片段 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 M 标志物 1 *L. d* SD1 2 *L. d* XJ771 3 阴性对照 图 2 重组质粒酶切鉴定 (1.0% 琼脂糖凝胶电泳) M 标志物 1 pUC18-LACK-SD1 重组质粒用 EcoR I 单酶切 2 pUC18-LACK-SD1 重组质粒用 EcoR I 和 Xba I 双酶切 3 pUC18-LACK-XJ771 重组质粒用 EcoR I 单酶切 4 pUC18-LACK-XJ771 重组质粒用 EcoR I 和 Xba I 双酶切 5 pUC18 空质粒用 EcoR I 单酶切 图 3 重组质粒 PCR 鉴定 (1.0% 琼脂糖凝胶电泳) M 标志物 1 pUC18-LACK-SD1 重组质粒 2 pUC18-LACK-XJ771 重组质粒

Fig. 1 1.0% agarose gel electrophoresis for detection of specific fragment of *Leishmania* isolates *L. d* SD1 and *L. d* XJ771 by RT-PCR with LACK primers M Marker 1 *L. d* SD1 2 *L. d* XJ771 3 Negative control Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant plasmid (1.0% agarose gel electrophoresis) M Marker 1 pUC18-LACK-SD1 digested by EcoR I 2 pUC18-LACK-SD1 digested by EcoR I and Xba I 3 pUC18-LACK-XJ771 digested by EcoR I 4 pUC18-LACK-XJ771 digested by EcoR I and Xba I 5 pUC18 digested by EcoR I Fig. 3 PCR analysis of the recombinant plasmid (1.0% agarose gel electrophoresis) M Marker 1 PCR amplified products of pUC18-LACK-SD1 2 PCR amplified products of pUC18-LACK-XJ771

```

1 ACCATGAACTACGAGGGTACACCTGAAGGGCCACCGCGGATGG
  M N Y E G H L K G H R G W
43 GTCACCTCCCTGGCCTGCCCGCAGCAGCGGGGTCGTAC
  V T S L A C P Q Q A G S Y
82 ATCAAGGTGGTGTGACGTGCGCGGATGGCACGGCCATC
  I K V V S T S R D G T A I
121 TCGTGGAAAGGCCAACCCGACCGCCACAGCGTGGACAGC
  S W K A N P D R H S V D S
160 GACTACGGTGTGCCGAACCACCGCCTCGAGGGCCACACC
  D Y G L P N H R L E G H T
199 GGOTTGCGTGTGCGTGTGCGTGGCCACCGCCACCGAC
  G F V S C V S L A H A T D
238 TACGCGCTGACCGCGTCCCTGGGACCGCTCCATCCGCATG
  Y A L T A S W D R S I R M
277 TGGGACCTGCGCAATGGCCAGTGCCAGGCCAAGTTCCTG
  W D L R N G Q C Q R K F L
316 AAGCACACCAAGGACGTGCTCGCGCTCGCCTTCTCGCCG
  K H T K D V L A V A F S P
355 GACGACCGCTGATCGTGTCCGCGGGCCGCGACAACGTG
  D D R L I V S A G R D N V
394 ATCCGCGTGTGGAACGTGGCGGGGAGTGATGCACGAG
  I R V W N V A G E C M H E
433 TTCCTGCGGACGCCACGAGGACTGGGTGAGCAGCATC
  F L R D A H E D W V S S I
472 TGCTTCTCGCCGTGCTGGAGCCACCGCATCGTGGTGTCC
  C F S P S L E H P I V V S
511 GGCAGCTGGGACAACCCATCAAGGTGTGGAACGTGAAC
  G S W D N T I K V W N V N
550 GGGGGCAAGTGTGAGCGCAGCTCAAGGGCCACAGCAAC
  G G K C E R T L K G H S N
589 TACGTGTCCACGGTGACGGTGTGCGCAGACGGGTGCGTG
  Y V S T V T V S P D G S L
628 TGCGCGTGTGCGGCAAGGACCGCGCGCGCTGCTGTGG
  C A S G G K D G A A L L W
667 GACCTGAGCACCGCGGAGCAGCTGTTCAAGATCAACGTG
  D L S T G E Q L F K I N V
706 GAGTCGCCCATCAACCAGATCGCCTTCTCGCCCAACCGC
  E S P I N Q I A F S P N R
745 TTCTGGATGTGCGTGGCGAGGAGGTCTCTGTCCGTG
  F W M C V A T E R S L S V
784 TACGACCTGGAGCAAGGCCGTGATGCGGAGCTGACG
  Y D L E S K A V I A E L T
823 CCGGACCGCGGAAGCCGTCCGAGTGCATCTCCATTGCC
  P D G A K P S E C I S I A
862 TGGTCCGCGCAGCGCAACACTCTGTA CTCCGGCCACAAG
  W S A D G N T L Y S G H K
901 GACAACCTGATCCGCGTGTGGTCCATCTCCGACGCGAG
  D N L I R V W S I S D A E
940 TAA
    
```

图 4 平原疫区分离株 *L. d* SD1 LACK 基因片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of LACK gene of *Leishmania donovani* isolate from plain foci of China

(*L. amazonensis*), 墨西哥利什曼原虫 (*L. mexicana*) 和巴西利什曼原虫 (*L. braziliensis*) LACK 基因序列及推导的氨基酸序列的一致性, *L. d* SD1 与 7 种其他利什曼原虫 LACK 基因序列的一致性为 98%, 推导的氨基酸序列的一致性均达 99%。*L. d* XJ771 与上述 7 种

```

1 .....
43 .....
82 .....
121 ..... AAA.....
160 ..... AGC.....
199 ..... TGT.....
238 .....
277 .....
316 ..... ACC.....
355 ..... T.....
394 ..... GGC.....
433 ..... GGC.....
472 TGT..... CAT.....
511 ..... GTA.....
550 .....
589 .....
628 ..... TCCGGT.....
667 .....
706 .....
745 .....
784 .....
823 .....
862 ..... GGT.....
901 .....
940 .....
    
```

图 5 荒漠疫区分离株 *L. d* XJ771 LACK 基因片段核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of LACK gene of *Leishmania donovani* isolate from desert foci of China

利什曼原虫 LACK 基因序列的一致性分别为 99%、99%、99%、98%、98%、98%、及 97%，推导的氨基酸序列的一致性均达到 98% 以上。我国平原和荒漠疫区分离株的 LACK 基因序列的一致性达 99%，氨基酸序列一致性为 99%。两者与山丘疫区分离株相比较，

其核苷酸序列及氨基酸序列的一致性均为 95%。

讨 论

从我国平原疫区杜氏利什曼原虫山东分离株 (*L. d* SD1) 和荒漠疫区杜氏利什曼原虫新疆分离株 (*L. d* XJ771) 扩增出的 LACK 基因片段与 GenBank 中利什曼原虫 LACK 的基因序列进行类似性比较分析, 结果表明一致性为 97% 以上。根据两者的 LACK 基因序列推导的氨基酸序列与 GenBank 中利什曼原虫 LACK 基因推导的氨基酸序列比较, 一致性达 98% 以上。由此推断所获得的是编码 LACK 的片段。比较我国内脏利什曼病山丘、平原和荒漠 3 个不同疫区, 杜氏利什曼原虫分离株的 LACK 基因序列的一致性达 95% 以上, 氨基酸序列的一致性达 95%。同源性分析结果表明, LACK 基因具有高度的保守性, 我国 3 个不同疫区分离株 LACK 基因的同源性较高。

CD4⁺ T 细胞针对 LACK 的反应是通过识别其第 156~173 位的 18 个氨基酸 ICFSPSL EHPMVSGSWD 表位而引发^[8], 本文推导的平原和荒漠疫区分离株以及卜玲毅等^[6]推导的山丘疫区分离株 LACK 氨基酸序列中 156~173 位的 18 个氨基酸与上述序列完全相同。据此, 作者认为, 假设选用任一疫区杜氏利什曼原虫分离株的 LACK 基因构建核酸

疫苗, 可能对不同疫区的内脏利什曼病具有程度相当的保护性, 为应用 LACK 核酸疫苗预防我国不同疫区内脏利什曼病提供了可能性。

参 考 文 献

[1] 吴远祥, 陈敏 儿童黑热病治疗的几个问题[J]. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2(4): 40

[2] Chai JJ, Zuo XP, Zhang S, *et al* The desert-type kala-azar in Xinjiang, China [A]. *Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Central Eurasia* [C]. 1999: 15- 19.

[3] Mougneau E, Altare F, Wakil AE, *et al* Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen[J]. *Science*, 1995, 268(5210): 563- 568.

[4] Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen[J]. *Science*, 1996, 274(5286): 421- 423.

[5] Gurnathan S, Sacks DL, Brown DR, *et al* Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*[J]. *J Exp Med*, 1997, 186: 1137- 1147.

[6] 卜玲毅, 胡孝素, 易桃林 我国山丘疫区杜氏利什曼原虫 LACK 保护性抗原基因克隆和序列分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2): 20- 23.

[7] Gonzalez-Aseguiola G, Taladriz S, Marquet A, *et al* Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum* [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 259: 909- 916.

[8] Pingel S, Launois P, Fowell DJ, *et al* Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope[J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1111- 1120.

(收稿日期: 2002-04-08 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2002)-04-0200-01

【病例报告】

反复发病的疟疾一例报告

杨恒林 张志勇

中图分类号: R531.3

文献标识码: D

患者余某, 男, 50岁, 原籍江苏省, 近10年住云南省思茅市。2000年11月3日, 到缅甸佤联邦第二特别行政区办事, 2天后返回思茅市。11月17日出现畏寒、发热、头痛, 到思茅地区医院诊治, 3d后血检确诊为间日疟。经思茅地区卫生防疫站用氯/伯八天疗法(氯喹10片, 3d分服, 伯氨喹24片, 8d分服), 再加上第1天肌肉注射蒿甲醚160mg, bid, 第2~4天各80mg, 总量560mg治疗。用药后第3天疟原虫无性体阴转, 症状消失。12月15日再次发作, 血检查见间日疟原虫, 给予青蒿琥酯60mg 静脉滴注, bid×3d, 以及口服青蒿琥酯24片(50mg/片); 氯/伯八天疗法, 用药后第3天症状消失。2002年2月25日第3次发作, 住进昆明第三传染病院, 血检确诊为恶性疟和间日疟混合感染, 第1天肌肉注射蒿甲醚80mg, bid, 第2~7天各80mg, 总量640mg; 并给予氯/伯八天疗法, 用药后第3天疟原虫无性体阴转, 症状消失, 3月4日出

院。5月1日第4次发作, 思茅地区医院血检确诊为间日疟, 云南省疟疾防治研究所血检确诊为间日疟和恶性疟混合感染。第1天肌肉注射蒿甲醚160mg, qd, ×3d; 患者自行口服磷酸萘酚喹200mg, qd, ×3d, 伯氨喹22.5mg/d×8d, 48h后症状消失, 疟原虫无性体阴转。7月3日第5次发作, 肌注磷酸咯萘啶160mg×3d, 口服伯氨喹22.5mg/d×8d, 3d后疟原虫无性体阴转, 症状消失。据患者自述, 9月及12月还有2次发作, 用青蒿素类药及伯氨喹治疗, 症状得到控制。

自2000年11月~2001年12月共发病7次, 经4家医疗单位及疟疾专业研究所确诊为间日疟或与恶性疟混合感染, 经正规治疗症状得到控制, 但未能治愈。自首次发病后, 患者未再到过其他疟疾流行区, 再感染的可能性极小, 其反复发病(再燃, 其中可能有间日疟的近期复发)是否说明患者对以上多种药物存在抗性有待进一步证实。

(收稿日期: 2002-01-25 编辑: 富秀兰)

作者单位: 云南省寄生虫病防治所, 思茅 665000