

RT-PCR 检测亚马孙利什曼原虫 P-4 和 GP-46 基因表达

王华民¹, Soong Lynn²

【摘要】 目的 证明亚马孙利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体的基因表达水平。方法 用 RNA 分离试剂盒, 分别提取 3 种不同来源的无鞭毛体(由小鼠模型皮损组织获得的无鞭毛体、由前鞭毛体培养转化而来的无鞭毛体, 以及来自 J774.G8 巨噬细胞株的无鞭毛体)的总 RNA, 以及前鞭毛体总 RNA, 然后用 SuperScrip II 逆转录聚合酶将其逆转录为 cDNA, 再经 PCR 扩增无鞭毛体特异核酸酶(P-4)和前鞭毛体特异膜糖蛋白(GP-46)的特异片段, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。结果 3 种不同来源的无鞭毛体均观察到 P-4 特异性条带(273 bp), 且密度相似, 但在前鞭毛体中未观察到; 在前鞭毛体中观察到高表达的 GP-46 特异性条带(325 bp), 但在 3 种无鞭毛体中弱表达。结论 由前鞭毛体转化的无鞭毛体能高水平表达亚马孙利什曼原虫无鞭毛体 P-4 特异基因, 可为其生物化学及免疫学研究提供无鞭毛体来源。

【关键词】 亚马孙利什曼原虫; 无鞭毛体; 前鞭毛体; 阶段特异性蛋白

中图分类号: R382.22

文献标识码: A

Detection of P-4 and GP-46 Expression in *Leishmania amazonensis* Amastigotes and Promastigotes by RT-PCR

WANG Hua-min¹, Soong Lynn²

(1 Department of Microbiology & Immunology, Hainan Medical College, Haikou 571101, China;

2 Department of Micro-biology & Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX., USA)

【Abstract】 Objective To detect the expression level of stage-specific genes in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. Methods Total RNAs were isolated from *Leishmania amazonensis* stationary promastigotes and three sources of amastigotes: freshly obtained from mouse skin lesions, infected J774.G8 macrophages, and transformed from the cultured promastigotes. mRNAs were conversely transcribed into cDNA with SuperScripII reverse transcriptase and oligo dT primers. The polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the specific fragments of amastigote-specific nuclease (P-4) and promastigote-specific membrane glycoprotein (GP-46). PCR products were analyzed in 1.5% agarose gel. Results A P-4-specific band (273 bp) was observed in all three types of amastigotes with similar density, but it was almost undetectable in promastigotes. In contract, a GP-46-specific band (325 bp) was expressed at a higher level in promastigotes than in all three types of amastigotes. Conclusion Promastigote-derived amastigotes express high level of P-4-specific gene and can be used as a source of amastigotes for biochemical and immunological studies.

【Key words】 *Leishmania amazonensis*; Amastigote; Promastigote; Stage-specific protein

亚马孙利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*) 是墨西哥利什曼原虫之一, 可引起皮肤利什曼病、弥漫性皮肤利什曼病及黏膜利什曼病。亚马孙利什曼原虫前鞭毛体在体外可连续培养, 但体外培养无鞭毛体则较难。无鞭毛体, 不论是从皮损组织中、还是从感染的巨噬细胞获得, 其数量均有限、且费时, 还有宿主细胞成分的污染^[1,2]。

无鞭毛体可通过在体外转化培养而获得成功, 但这样获得的无鞭毛体是否具有脊椎动物宿主体内产生的无鞭毛体特性, 需经过特异性抗原及分子生物学鉴

定。而无鞭毛体与前鞭毛体的不同特性对于区别体外培养的无鞭毛体与动物宿主体内产生的无鞭毛体至关重要。无鞭毛体或前鞭毛体的不同阶段的特异蛋白质在基因水平上的表达可通过 RT-PCR 来检测。本文根据已知无鞭毛体特异核酸酶 P-4 和前鞭毛体特异膜糖蛋白 GP-46 序列, 设计特异引物, 用 RT-PCR 法检测由前鞭毛体培养转化而来的亚马孙利什曼原虫无鞭毛体的基因表达水平, 结果报告如下。

材料与方法

1 无鞭毛体

从小鼠模型皮损组织获得亚马孙利什曼原虫无鞭毛体, 作为原代, 经体外培养逐渐适应为纯培养的无

作者单位: 1 海南医学院微生物学与免疫学教研室, 海口 571101;

2 Dept of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX., USA

鞭毛体。无鞭毛体培养基为 Schneider's *Drosophila* 培养基 (美国 Gibco 公司) 加 20% 胎牛血清 (FBS), 以及胱氨酸 (Cystin)、L 酪氨酸 (L-tyrosin) (均为美国 Sigma 公司) 配制而成。培养温度为 33 °C, pH 7.2。完全培养基存放于 4 °C 不超过 3~4 周。

2 前鞭毛体转化为无鞭毛体

从小鼠模型皮损组织获得亚马孙利什曼原虫前鞭毛体 (MHOM/BR/77/LTB0016) 于 Schneider's *Drosophila* 培养基中 23 °C 培养。培养基 pH 7.2, 含 20% FBS (56 °C 70 min 灭活), 50 μg/ml 庆大霉素以及酵母浸膏 (美国 Sigma 公司)。从前鞭毛体转化为无鞭毛体的条件是, 首次转化时必须将 FBS 浓度增至 50%, 当原虫浓度达 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ /ml 时必须传代 1 次。

3 来源于 J774.G8 巨噬细胞株的无鞭毛体

J774.G8 巨噬细胞株的培养: 用含 10% FBS (30min 灭活) 的 IMDM 培养基 (美国 Gibco 公司) 于 5% CO₂ 37 °C 培养箱培养。当巨噬细胞呈指数增殖阶段即可收获, 调节细胞数至 2×10^5 /ml, 置于 15 mm 培养皿 (美国 Becton Dickinson 公司) 中继续培养。巨噬细胞覆盖平面达 50%~60% 时, 用稳定期原虫进行感染, 原虫与巨噬细胞比例为 10:1, 感染细胞在组织培养瓶 (Falcon) 中 33 °C 5% CO₂ 及 95% 湿度的培养箱中培养 12 h, 未吞噬原虫的巨噬细胞用纯 IMDM 培养基洗去, 吞噬原虫的巨噬细胞在完全培养基中再培养 72~96 h。分离的细胞与 0.5% 酪氨酸 (美国 Sigma 公司) 混合 3~5 min 后, 用 Schneider's *Drosophila* 完全培养基 (含 20% FBS, pH 5.2) 用 25 号针头注射器通过制成匀浆悬液, 850 × g 离心 3 min, 1 063 × g 再离心 5 min 除去宿主细胞残渣, 最后 1 656 × g 离心 10 min, 在沉淀中得到大量原虫, 制成悬液 (初浓度为 10⁶/ml), 于前述的无鞭毛体培养基中 33 °C 培养, 达到稳定期时即可收获来源于 J774.G8 巨噬细胞的无鞭毛体。

4 RNA 分离与 RT-PCR

用 RNA 分离试剂盒 (美国 Strata Gene 公司) 分离亚马孙利什曼原虫稳定期前鞭毛体及 3 种不同来源的无鞭毛体的总 RNA。根据操作说明, 取 2 μl 总 RNA, 用 Super Scrip II 逆转录聚合酶及寡核苷酸引物, 分别将上述总 RNA 逆转录为 cDNA, 再经 PCR 扩增无鞭毛体特异核酸酶 P-4 (273 bp) 和前鞭毛体特异膜糖蛋白 GP-46 (325 bp) 片段。P-4 的引物是 5'-ATG CTG GGC GGA TGA CG 和 5'-TGC GGG TAG

GCG GTA GTG; GP46 的引物是 5'-CGG GGT GCG AGG TGG ATG 和 5'-GTG CGC GTG TGG CTG TCG。用 β-微管蛋白片段作为对照, 其引物是 5'-CGC GCC GCT GAC GAG 和 5'-CTT GCG GCG GAA CAT ACC。PCR 反应在 DNA 扩增仪 (PTC-100 型, 美国 MJ Research, Inc. 公司) 中进行。95 °C 1 min, 68 °C 45 s, 72 °C 1 min 30 s, 共 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

结 果

1 亚马孙利什曼原虫培养

从 BALB/c 感染小鼠皮损组织获得利什曼原虫, 置于 Schneider's *Drosophila* 培养基 (含 20% FBS, pH 7.2) 23 °C 培养, 得到前鞭毛体。当有鞭毛的前鞭毛体生长达到指数增长期, 原虫即分裂成另一代。此时, 将前鞭毛体置 Schneider's *Drosophila* 培养基 (含 20% FBS, pH 5.1), 并将温度提高到 33 °C 时, 前鞭毛体即可转化为无鞭毛体, 但只在体外维持 3 代。如将 FBS 提高到 50%, 无鞭毛体在培养基中可稳定传代。稳定期的前鞭毛体用于传代无鞭毛体, 并产生大量的稳定期无鞭毛体, 这种从前鞭毛体转化为生长期的无鞭毛体, 与小鼠模型皮损组织来源的无鞭毛体相似。3 种来源的无鞭毛体经 Giemsa 染色及光学显微镜观察, 其形态与特征相近。3 种不同来源的无鞭毛体在形态上与纯培养的无鞭毛体一样无鞭毛, 圆形。但与前鞭毛体形态明显不同 (图 1)。

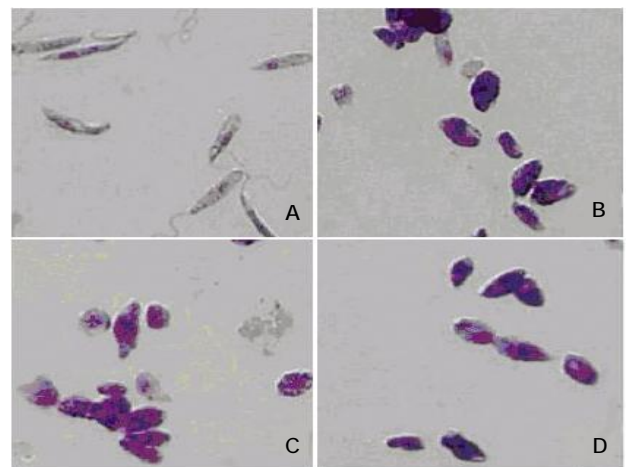
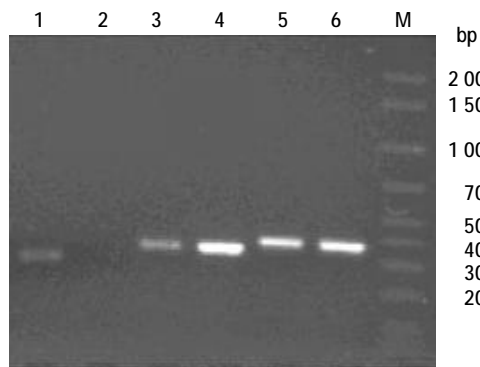


图 1 亚马孙利什曼原虫形态学观察 (Giemsa 染色, ×1000)
A: 前鞭毛体, B: 小鼠模型皮损来源的无鞭毛体, C: 前鞭毛体培养转化的无鞭毛体, D: J774.G8 巨噬细胞株来源的无鞭毛体。
A: Promastigotes, B: Amastigotes derived from animal skin lesion, C: Amastigotes transformed from promastigotes, D: Amastigotes from J774.G8 macrophage.

图 1 亚马孙利什曼原虫形态学观察 (Giemsa 染色, ×1000)
Fig.1 Morphology of *Leishmania amazonensis* (Giemsa staining, ×1000)

2 P-4/GP-46 mRNA 的 RT-PCR

3 种不同来源的无鞭毛体均观察到 P-4 的特异性条带, 而在前鞭毛体中未观察到。相反, 在前鞭毛体中有 GP-46 特异性条带的高表达 (325 bp) (图 2, 3)。考虑到来源于巨噬细胞的无鞭毛体总 RNA 其实既包含无鞭毛体 RNA, 也包含污染的宿主细胞 RNA, 来源于巨噬细胞的无鞭毛体的这一条带较其他两条弱。 β -微管蛋白用于对照, 375 bp 条带均出现在无鞭毛体和前鞭毛。

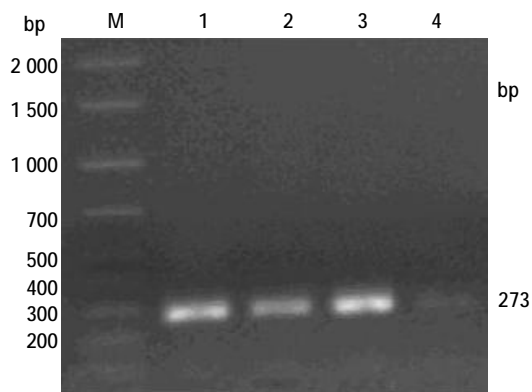


1: 无鞭毛体特异性 P-4 条带, 2: 前鞭毛体未检测到 P-4 条带, 3: 无鞭毛体 GP-46 条带较弱, 4: 前鞭毛体 GP-46 条带较强, 5: 无鞭毛体 β -微管蛋白表达, 6: 前鞭毛体 β -微管蛋白表达, M: DNA 标志物。

1: P-4 specific band (273 bp) expressed in amastigote, 2: P-4 specific band (273 bp) undetectable in promastigote, 3: GP-46 (325 bp), a weaker band in amastigote, 4: GP-46 (325 bp), a stronger band in promastigote, 5: β -tubulin bands expressed in amastigote, 6: β -tubulin bands expressed in promastigote, M: DNA ladder.

图 2 不同来源的无鞭毛体及前鞭毛体的 RT-PCR 结果

Fig.2 RT-PCR analysis on different sources of amastigotes and promastigotes



M: DNA 标志物, 1: 来自小鼠模型皮损处的无鞭毛体, 2: 来自 J774.G8 巨噬细胞株的无鞭毛体, 3: 自前鞭毛体培养转化的无鞭毛体, 4: 前鞭毛体。

M: DNA ladder, 1: P-4 gene expressed in amastigotes derived from lesion, 2: Amastigotes from J774.G8 macrophage, 3: Amastigotes from promastigotes, 4: Promastigotes.

图 3 RT-PCR 法检测 P-4 基因在不同来源的无鞭毛体中的表达

Fig.3 RT-PCR analysis of P-4 gene expression in different sources of amastigotes and promastigotes

讨 论

利什曼病是由于雌性白蛉吸血时将其体内寄生的利什曼原虫注入人或畜体内而引发的寄生虫病。像其他利什曼属原虫一样, 亚马孙利什曼原虫前鞭毛体能在体外连续培养, 但无鞭毛体则较困难。有研究者认为, 改变培养条件可促使前鞭毛体转化为无鞭毛体, 但不同利什曼原虫对培养条件 (包括温度、pH 值及胎牛血清浓度) 的要求不同^[2]。本文用 Schneider's 用 Schneider's *Drosophila* 培养基加 20% 胎牛血清, 及胱氨酸、L 酪氨酸, 于 33 °C 培养无鞭毛体, 获得成功。胎牛血清浓度提高到 50%, 由前鞭毛体转化的无鞭毛体在体外能持续传代且保持典型的形态学特征, 即与来自小鼠模型皮损处的无鞭毛体的特性相同, 而全然没有前鞭毛体的特征。

关于用无鞭毛体阶段特异性的单克隆抗体 P-4 和 P-8 及前鞭毛体阶段特异性单克隆抗体 GP46/M-2 鉴定亚马孙利什曼原虫的无鞭毛体和前鞭毛体已有报道^[3-5]。本文采用 RT-PCR 法检测亚马孙利什曼原虫阶段特异性无鞭毛体特异核酸酶 P-4 的 mRNA 水平, 结果表明 P-4 在 3 种来源的无鞭毛体 (图 1 B、C、D) 均有高水平表达, 而在前鞭毛体中只有弱表达。证明前鞭毛体培养转化为无鞭毛体获得成功。同时, 前鞭毛体膜糖蛋白 GP-46 只在前鞭毛体中表达, 而在 3 种来源的无鞭毛体则弱表达。因此, P-4 可作为亚马孙利什曼原虫无鞭毛体的特异性基因; 前鞭毛体培养转化而来的无鞭毛体可为亚马孙利什曼原虫的生物化学及免疫学研究提供大量的无鞭毛体来源。

参 考 文 献

- [1] Chang KP. Human cutaneous Leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites[J]. Science, 1980, 209: 1240-1242.
- [2] Teixeira MCA, de Jesus Santos R, Sampaio RB, et al. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different Leishmania species[J]. Parasitol Res, 2002, 88: 963-968.
- [3] Jaffe CL, Rachamim N. Amastigote stage-specific monoclonal antibodies against Leishmania major[J]. Infect Immun, 1989, 57: 3770-3777.
- [4] Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, et al. Leishmania amazonensis: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms[J]. Exp Parasitol, 1996, 83: 94-105.
- [5] Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, et al. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of Leishmania pifanoi amastigote cysteine proteinases[J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 68: 119-132.

(收稿日期: 2005-11-09 编辑: 盛慧锋)