

文章编号: 1000-7423(2000)-06-0321-04

我国内脏利什曼病山丘疫区与平原疫区 利什曼原虫 SSU rDNA 多变区序列分析*

卜玲毅¹ 胡孝素¹ 敬保迁² 易桃林¹

(1 华西医科大学寄生虫学研究室, 成都 610044; 2 川北医学院微生物学教研室, 南充 637000)

摘要 [目的] 分析我国内脏利什曼病(VL)山丘疫区与平原疫区利什曼原虫(*L. d.*)分离株小亚基核糖体 DNA (SSU rDNA) 多变区的序列差异。[方法] nDNA 进行 PCR 扩增, 将扩增出的 SSU rDNA 基因的特异片段克隆于 pGEM^R-T Easy Vector 上, 采用通用引物 M13 进行 PCR 扩增, 全自动测序仪测序。[结果] 序列分析显示, 扩增的 5 株利什曼原虫 SSU rDNA 序列大小均为 392 bp; 序列差异均发生在两个独特序列区(UQ-1 和 UQ-1'); 山丘疫区 *L. d.* 甘肃分离株和四川分离株均在 UQ-1' 区上有 2 个相同的碱基突变, *L. d.* 甘肃分离株 UQ-1 区上有 1 个碱基突变; 无移码突变。[结论] 山丘疫区分离株与平原疫区分离株之间的碱基序列有差异, 平原疫区 *L. d.* 山东分离株与婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*) 的碱基序列相同。

关键词: 利什曼原虫, 小亚基核糖体核酸基因, 聚合酶链反应, 克隆, 序列分析, 基因变异

中图分类号: R531.6

文献标识码: A

Van Eys 等^[1]报道, 利什曼原虫小亚基核糖体 DNA (SSU rDNA) 的中间序列存在两个独特序列区, 依据该多变区的点突变可进行利什曼原虫种株鉴定。我国新疆皮肤利什曼病病原体 SSU rDNA 多变区的序列分析已见报道^[2], 但我国内脏利什曼病尚未见有关的文献资料, 尤其是我国山丘疫区和平原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的差异。本研究采用利什曼原虫特异引物 R222 和 R333, 对我国平原疫区、山丘疫区和

国际标准株共 5 株利什曼原虫 nDNA 进行 PCR 扩增, 将扩增出的 SSU rDNA 基因的特异片段克隆于 pGEM^R-T Easy Vector 上, 进行序列测定分析, 为我国内脏利什曼病的流行病学研究、临床诊断和防治提供基因水平的依据。

材料与与方法

1 虫株

利什曼原虫虫株列于表 1。

表 1 利什曼原虫虫株及其国际编码和来源地
Table 1 *Leishmania* isolates and their international codes, isolated places

虫 株 Species and isolates	国际编码 International code	来 源 Source
婴儿利什曼原虫 <i>L. infantum</i>	MHOM/FR/78/LEM75	法国 France
杜氏利什曼原虫 DD8 株 <i>L. d.</i> DD8	MHOM/IN/80/DD8	印度 India
杜氏利什曼原虫四川分离株 10 号 <i>L. d.</i> SC10 isolate	MHOM/CN/90/SC10H2	四川省汶川县 Wenchuan County, Sichuan Province
杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 号 <i>L. d.</i> GS7 isolate	MHOM/CN/93/GS7	甘肃省文县 Wenxian County, Gansu Province
杜氏利什曼原虫山东分离株 2 号 <i>L. d.</i> SD2 isolate	MHOM/CN/93/SD2	山东省高密县 Gaomi County, Shandong Province

2 利什曼原虫前鞭毛体 nDNA 的提取

本室 NNN 培养基和液氮保种, 扩大培养时转入含 15% 小牛血清的 M199 复合液体培养基培养利什曼原虫前鞭毛体, 当原虫总数达 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 时, 按文献^[3,4]略加修改收集前鞭毛体, 制备 nDNA。

3 引物核苷酸序列及 PCR 反应体系的建立

根据文献^[1]合成一对利什曼原虫属特异引物, 上游引物 R222: 5'-TATGTGAGATTATGGAGCTG-3', 下游引物 R333: 5'-AAAGCGGGCCGCGGTGCTG-3'。反应体积为 100 μ l, 其中含 dGTP、dCTP、dATP 及 dTTP 各 250 μ mol/L; Taq 聚合酶 2 u; 引物各为 250 pmol/L; 模板 DNA 为 10 ng; 10 \times Taq 反应缓冲液 10 μ l (含 Tris-HCl 10 mmol/L, MgCl₂ 1.5

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39970667)

mmol/L, KCl 50 mmol/L, 0.1 mg/ml gelatin), 补无菌三蒸水到终体积。扩增条件为 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 2 min, 32 个循环, 反应混合液加 Taq 聚合酶前 100 °C 预变性 10 min, 最后 1 个循环 72 °C 延伸 10 min。取 8 μ l 反应液于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭), 紫外灯下观察结果。

4 PCR 扩增产物的克隆

PCR 扩增产物用 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶纯化回收, 无菌三蒸水溶解。选用 pGEM^R-T Easy Vector Systems (Promega 公司), 于 4 °C 连接目的片段与载体, 转化入预先制备好的 *E. coli* JM109 感受态细胞内。

5 重组子的筛选和鉴定

根据载体中 LacZ 基因插入失活, 挑取白色菌落

(含有重组质粒) 接种到 5 ml 含 Amp 的 LB 培养基中, 以蓝色菌落为对照, 于 37 °C 振荡培养过夜。取 4 ml 培养物按碱裂解法制备质粒 DNA^[5], 以 EcoRI 酶切分析。

6 DNA 序列测定

以质粒 DNA 为模板, 按 T7DNA 聚合酶测序试剂盒 (Pharmacia Biotech 公司) 说明书进行, 采用通用引物 M13 以双脱氧链末端终止法全自动测序仪测序, 计算机自动处理读序, 扫描打印测序图样。

结 果

1 利什曼原虫 SSU rDNA 多变区片段的 PCR 扩增

采用相同的方法, 在相同的条件下, 分别从 5 株利什曼原虫 nDNA 样本中, 扩增出 392 bp DNA 片段 (图 1)。

2 重组子的筛选和鉴定

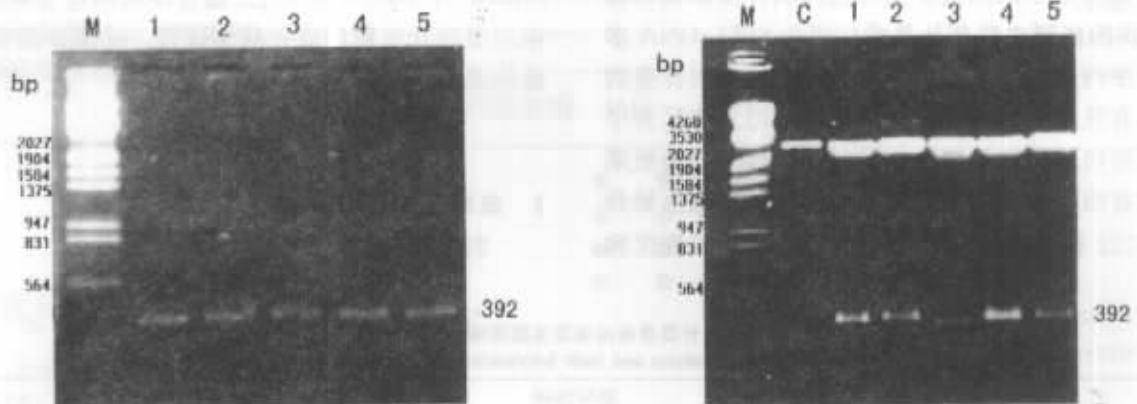


图 1 用引物 R222 和 R333 PCR 扩增 5 株利什曼原虫 SSU rDNA 的特定片段 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 E.B. 染色 M λ DNA/EcoRI + Hind III 标志物 1 婴儿利什曼原虫 2 杜氏利什曼原虫山东分离株 2 号 3 杜氏利什曼原虫 DD8 株 4 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 号 5 杜氏利什曼原虫四川分离株 10 号 图 2 EcoRI 酶切 5 株利什曼原虫 392 bp SSU rDNA 重组质粒 DNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳 E.B. 染色 M λ DNA/EcoRI + Hind III 标志物 1 婴儿利什曼原虫 2 杜氏利什曼原虫山东分离株 2 号 3 杜氏利什曼原虫 DD8 株 4 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 号 5 杜氏利什曼原虫四川分离株 10 号

Fig. 1 1.5% agarose gel electrophoresis for detection of specific fragment of five *Leishmania* species and isolates by PCR with primer R222 and R333, stained with E. B. M λ DNA/EcoRI + Hind III markers 1 *L. infantum* 2 *L. d.* SD2 3 *L. d.* DD8 4 *L. d.* GS7 5 *L. d.* SC10 Fig. 2 1% agarose gel electrophoresis for identification of recombinant plasmid DNA of EcoRI digested five *Leishmania* species and isolates, stained with E. B. M λ DNA/EcoRI + Hind III markers C Control 1 *L. infantum* 2 *L. d.* SD2 3 *L. d.* DD8 4 *L. d.* GS7 5 *L. d.* SC10

因 T 载体的多克隆位点两侧各有 1 个 EcoRI 酶切位点, 因而用 EcoRI 单酶切即可将插入片段切下, 0.8% 琼脂糖电泳, 可见到 392 bp 条带 (图 2)。

3 利什曼原虫 SSU rDNA 多变区片段序列比较

引物 R222 和 R333 扩增的 5 株利什曼原虫 SSU rDNA 多变区序列皆为 392 bp 长, 序列差异均

发生在两个独特序列区 (UQ-I 和 UQ-II), 山丘疫区 *L. d.* 甘肃分离株 (*L. d.* GS7) 和 *L. d.* 四川分离株 (*L. d.* SC10) 均在 UQ-I 区上有 2 个相同的碱基突变, 此外 *L. d.* GS7 在 UQ-I 上有 1 个碱基突变, *L. d.* 山东分离株 (*L. d.* SD2) 与 *L. infantum* 的碱基序列完全相同, *L. d.* DD8 有 2 个点突变, 均无移码突变, 其序列比较分析见表 2。

表 2 5 株利什曼原虫 SSU rDNA 多变区序列中的点突变
Table 2 Point mutations found in the variable regions of the SSU rDNA of five *Leishmania* species and isolates

虫株 Species and isolates	UQ- I			UQ- II	
	47	52	92	353	374
婴儿利什曼原虫 <i>L. infantum</i>	T	T	G	T	T
杜氏利什曼原虫山东分离株 2 号 <i>L. d.</i> SD2	T	T	G	T	T
杜氏利什曼原虫 DD8 株 <i>L. d.</i> DD8	C	T	A	T	T
杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 号 <i>L. d.</i> GS7	T	G	G	A	C
杜氏利什曼原虫四川分离株 10 号 <i>L. d.</i> SC10	T	T	G	A	C

讨 论

rRNA 是生物细胞中最为保守的结构基因, 在进化过程中, 不同种属真核生物 rDNA 序列特征保持相对稳定, 常显示出高度的保守性和广泛的异种同源性, 其序列不同位置上的变化速度不同而具有良好的钟性性质, 某些序列具有种株特异性, 已成为进行病原体种株鉴定和诊断的靶基因, 并应用于系统分类及构建进化树^[6~8]。吕洪刚等^[9]用 kDNA 杂交分析我国内脏利什曼病不同疫区的病原体分离株, 结果表明山丘疫区与平原疫区虫株间 kDNA 在同源程度上存在差异。郑学礼等^[10]用 kDNA PCR-SSCP 分析显示平原疫区与山丘疫区分离株的单链 DNA 迁移率明显不同。本文对我国平原疫区和山丘疫区杜氏利什曼原虫 SSU rDNA 多变区进行序列测定分析, 以期证实在此多变区内两者是否存在碱基序列的差异, 从而在基因水平上提供更为准确的依据。

Van Eys 等^[1]研究表明 9 株利什曼原虫的 SSU rDNA 序列中间存在两个独特序列区 UQ- I (1~148 位) 和 UQ- II (339~392 位), UQ- I 存在 7 个点突变, UQ- II 存在 2 个点突变, 引物 R222 和 R333 扩增的片段包含了这两个独特序列区。本研究中 5 株利什曼原虫均扩增出 392 bp 片段, 对其序列分析表明, 碱基相同在 98% 以上, 其碱基突变也均发生在两个独特序列区内, 这与 Van Eys 等的研究结果相符, 在 UQ- I 上有 3 个碱基突变, UQ- II 上有 2 个碱基突变, 但无移码突变。其中 *L. d.* SD2 与 *L. infantum* 的碱基序列完全相同, 两者同源性最高。在 UQ- II 区中, 只有山丘疫区 *L. d.* GS7 和 *L. d.* SC10 存在 2 个点突变, 并且两者在相同的位点有完全相同的点突变 (353 位上的 T 突变成 A, 374 位上的 T 突变成 C), 而 *L. d.* DD8, *L. d.* SD2 和 *L. infantum* 在独特序列区 UQ- II 上则均无点突变,

可见山丘疫区利什曼原虫在 UQ- I 区上不仅同来自地中海流行区的国际参考株 *L. infantum* 和来自印度的 *L. d.* DD8 株的碱基序列有差异, 而且与我国平原疫区的 *L. d.* SD2 也存在着碱基序列上的不同, 说明我国山丘疫区利什曼原虫在 SSU rDNA 多变区上有其特异的碱基突变, 不同于平原疫区的利什曼原虫; 所测的 SSU rDNA 序列与 GenBank 中的其它利什曼原虫类似性比较时, 同源性在 98% 以上; 并发现两个独特序列区中的 5 个位点 (47, 52, 92, 353, 374) 也是利什曼原虫 SSU rDNA 序列点突变和移码突变的主要位点, 本实验从基因水平上进一步证实了以前的研究结果, 表明我国山丘疫区与平原疫区虫株间存在着种间差异^[9,10]。在 UQ- I 区中, 山丘疫区中的 *L. d.* GS7 在 52 位上有一个点突变 (T 突变成 G), *L. d.* SC10 则在此独特区上无点突变, 提示可能是因为 *L. d.* SC10 来自四川省的汶川县, 而 *L. d.* GS7 来自甘肃省的文县, 两者在地理位置上距离较远, 可能存在地理分离株间的变异或其它原因, 这有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Van Eys GJM, Schoone GJ, Kroon NCM, et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, 51: 133~142.
- [2] 章涛, 胡孝素, 敬保迁, 等. 我国新疆皮肤利什曼病原体 SSU rDNA 多变区序列分析. *中国寄生虫病防治杂志*, 1998, 11: 279~283.
- [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. *Parasitology*, 1992, 105: 183~191.
- [4] Fairlamb AH, Weislogel PO, Hoefmakers JHJ, et al. Isolation and characterization of kinetoplast DNA from blood stream of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 1978, 76: 293~309.
- [5] 金冬梅, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996: 19~21.
- [6] Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA gene. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 1986, 83:1383~1387.
- [7] Johnson AM, Baverstock PR. Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. *Parasitol Today*, 1989, 5:102~108.
- [8] Waters AP, McCutchan TF. Ribosomal RNA; nature's own polymerase-amplified target for diagnosis. *Parasitol Today*, 1990, 6:56~60.
- [9] 吕洪刚, 胡孝素. 光敏生物素标记 kDNA 打点杂交鉴定利什曼原虫种株. *华西医科大学学报*, 1988, 19(3):222~225.
- [10] 郑学礼, 胡孝素, 陈建平, 等. 我国不同疫区内脏利什曼原虫分离株 kDNA 的 PCR-SSCP 分析. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1999, 17:346~349.

收稿日期: 1999-12-30

(编辑: 富秀兰)

SEQUENCE ANALYSIS OF SSU rDNA VARIABLE REGIONS OF *LEISHMANIA* ISOLATES FROM HILLY FOCI AND PLAIN FOCI OF CHINA*

BU Ling-yi¹, HU Xiao-su¹, JING Bao-qian², YI Tao-lin¹

(1 *Department of Parasitology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041;*

2 *Department of Microbiology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000)*

Abstract [Objective] To analyze the sequence difference of the SSU rDNA variable regions of *Leishmania* isolates from hilly foci and plain foci of China. [Methods] Specific SSU rDNA fragments from nuclear DNA of five *Leishmania* species and isolates were amplified by PCR. The amplified DNA fragments were cloned into pGEM³-T Easy vector. The specific fragments were sequenced by the automated DNA sequencer. [Results] Sequence analysis showed that the amplified DNA fragments of five *Leishmania* species and isolates were all 392 bp in length, point mutations were located in the two unique sequence (UQ- I and UQ- II); *L. d. SC10* and *L. d. GS7* had two same point mutations in UQ- II; only *L. d. GS7* had one in UQ- I; no insertion/deletion. [Conclusion] Sequence difference of the SSU rDNA variable region existed between *Leishmania* isolates from hilly foci and plain foci; The sequences of the SSU rDNA variable regions of *L. d. SD2* isolate and *L. infantum* were identical.

Key Words: *Leishmania*, small subunit ribosomal DNA, polymerase chain reaction, cloning, sequence analysis, genetic variation

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