

文章编号: 1000-7423(2006)-05-0389-02

## 阴道毛滴虫 dsRNA 病毒部分基因的克隆与序列分析

赵月平<sup>1,2</sup>, 张西臣<sup>1\*</sup>, 陈丽凤<sup>1</sup>, 李建华<sup>1</sup>, 尹继刚<sup>1</sup>, 刘全<sup>3</sup>, 宫鹏涛<sup>1</sup>

**【摘要】** 提取阴道毛滴虫总核酸为模板, 根据 GenBank 中发表的阴道毛滴虫病毒序列 (U08999, NC003873, NC003824, NC003834) 设计 1 对简并引物, 经 RT-PCR 得到与预计大小一致的 PCR 特异性产物, 将其进行克隆、测序, 得到目的基因片段长度为 1 454 bp, 与阴道毛滴虫病毒 T1 株 (U08999) 的序列同源性最高为 82.9%。

**【关键词】** 阴道毛滴虫; dsRNA 病毒; 克隆; 序列分析

中图分类号: R382.211

文献标识码: B

## Cloning and Sequence Analysis of a Partial Gene of *Trichomonas vaginalis* dsRNA Virus

ZHAO Yue-ping<sup>1,2</sup>, ZHANG Xi-chen<sup>1\*</sup>, CHEN Li-feng<sup>1</sup>, LI Jian-hua<sup>1</sup>,  
YIN Ji-gang<sup>1</sup>, LIU Quan<sup>3</sup>, GONG Peng-tao<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2 Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3 Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China)

**【Abstract】** A pair of degenerate primers were designed following the published nucleotide sequence of *Trichomonas vaginalis* virus (U08999, NC003873, NC003824, NC003834). Using the total nucleic acids extracted from the *Trichomonas vaginalis* as template, RT-PCR was performed with the primers to obtain a fragment of the TVV. The product was cloned, sequenced and compared with the sequences available in the GenBank. The size of the amplified gene was 1 454bp, which shares 82.9% sequence identity with the *Trichomonas vaginalis* virus T1.

**【Key words】** *Trichomonas vaginalis*; dsRNA virus; Cloning; Sequencing

Supported by a Fund of Returned Oversea Professionals (No.98H025)

\* Corresponding author, E-mail: Zhangxic @public.cc.jl.cn

阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*, TV) 寄生于人体泌尿生殖系统, 主要引起滴虫性阴道炎和泌尿道炎症。人群感染比较普遍呈全球性分布。而阴道毛滴虫病毒是专性寄生在阴道毛滴虫体内的 dsRNA 病毒, 也是首次被发现的原虫病毒。临床分离获得的虫株, 约有一半携带病毒, 而且同一株阴道毛滴虫存在多种 dsRNA 病毒<sup>[1,2]</sup>, 病毒相互间的同源性很低, 因此称阴道毛滴虫是多种不同的 dsRNA 病毒同时存在的贮存库。国外已成功地克隆出阴道毛滴虫病毒的 cDNA (U08999, NC003873, NC003824, NC003834)。我国阴道毛滴虫病毒的研究尚属空白。本研究从阴道毛滴虫体内筛选出一株含 dsRNA 病毒的阴道毛滴虫虫株, 并对 dsRNA 病毒部分片段进行了克隆和分析。

### 1 材料与方法

1.1 阴道毛滴虫虫株 系从吉林大学第一临床医学院妇科门

基金项目: 总后卫生部留学回国人员基金 (No.98H025)

作者单位: 1 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2 河北北方学院, 张家口 075000; 3 军事医学科学院兽医研究所, 长春 130062

\* 通讯作者, E-mail: Zhangxic@public.cc.jl.cn

诊滴虫性阴道炎患者阴道分泌物中分离, 经肝浸汤培养基于 37 °C 无菌培养。

1.2 试剂 胰蛋白胍、L-半胱氨酸盐、氯化钠、麦芽糖均为北京奥博星生物公司产品, 新生胎牛血清为哈尔滨江海生物公司产品, 禽源反转录酶 (AMV)、Taq DNA 酶、pMD18-T 载体、RNA 酶抑制剂 (Rnase) 均为大连宝生物工程有限公司产品, 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  株为本室保存。DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京鼎国生物技术发展中心, 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 购自北京同正生物技术公司。基因组 DNA 纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.3 阴道毛滴虫总核酸的提取 取 6 $\times$ 10<sup>9</sup> 个虫体, 参照基因组 DNA 纯化试剂盒方法提取总核酸并溶于 50  $\mu$ l 无 RNA 酶水中, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, -70 °C 保存备用。

1.4 阴道毛滴虫病毒部分片段的 RT-PCR 扩增

1.4.1 cDNA 第 1 链的合成 根据已发表的阴道毛滴虫病毒基因序列 (NC004034, NC003873, NC003824, U08999), 设计 1 对简并引物, 上游引物为 5'GTA(G)TCG(A)CAG(A)TTA(G)TAAATGT(A)AC3', 下游引物为 5'T(A)TCATCAACCGT(C)TTCCACGA3', 预计扩增目的片段长度为 1 500 bp。取阴道毛

滴虫总核酸样品 5 μl, 加入上下游引物各 1 μ (10 pmol/L), 100 °C 5 min, 然后分别加入 5×RT-PCR 缓冲液 4 μl, dNTP (10 mmol/L) 4 μl, RnaseA 抑制剂 (40 U) 1 μl、AMV 1 μl, 加 DEPC 处理水至总体积 20 μl, 42 °C 60 min, 然后 100 °C 5 min, -20 °C 保存。

1.4.2 目的基因的扩增 取 1.4.1 反转录产物 1 μl, 10×PCR 缓冲液 5 μl、dNTP (10 mmol/L) 4 μl、上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μl、*Taq* DNA 酶 (5 U/μl) 1 μl, 加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 50 μl 进行 PCR, 反应参数为: 变性 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环后于 72 °C 10 min, 1% 琼脂糖电泳分析, 用试剂盒回收 PCR 产物, 溶于 20 μl TE 中。

1.5 连接 取回收 4 μl 产物, 加入 5 μl 连接液, 1 μl pMD18-T 载体, 16 °C 连接 14 h。

1.6 转化 取 1.5 方法中所制备 5 μl 连接物, 加入到 100 μl 感受态菌中, 冰浴 30 min, 42 °C 水浴 90 s, 立即冰浴 5 min, 加入 400 μl 37 °C 预热的 LB 液体培养基, 37 °C 震荡 45 min; 取 100 μl 加入到预先涂有 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 氨苄青霉素抗性 LB 平板上, 均匀涂布后, 37 °C 培养过夜 (约 16 h), 可出现白色转化菌落。

1.7 重组质粒鉴定

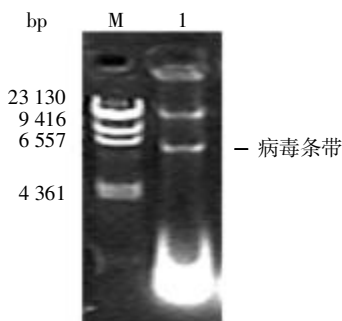
1.7.1 重组质粒的 PCR 鉴定 挑取在快速鉴定中质粒较大的相应编号菌落, 接种于 5 ml 含氨苄青霉素 LB 培养基中, 小量提取质粒 DNA。以质粒为模板, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 0.8% 琼脂糖电泳进行初步鉴定。

1.7.2 重组质粒的酶切鉴定 用 *Xho* I 限制性内切酶对 PCR 鉴定为阳性的质粒进行单酶切鉴定, 酶切结果与预计大小一致者, 即为阳性重组质粒。

1.8 序列测定 将含重组质粒菌液送大连宝生物工程公司测序, 通过比对(BLAST)GenBank 进行同源性搜索。

2 结果

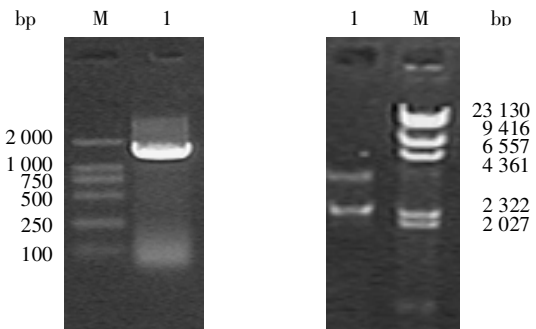
2.1 阴道毛滴虫总核酸分析 用阴道毛滴虫提取的核酸样品进行琼脂糖凝胶电泳, 在电泳图谱上可见 2 条清晰的条带, 分别为基因组 DNA 和病毒条带 (约 5.5 kb), 病毒条带大小与预期相符 (图 1)。



M: λ-HindIII 标志物, 1: 阴道毛滴虫总核酸。

图 1 阴道毛滴虫总核酸电泳分析

2.2 阴道毛滴虫病毒部分片段的 RT-PCR 扩增 用合成的特异性引物对阴道毛滴虫总核酸进行 RT-PCR 扩增, 得到与预计大小一致的 PCR 产物 (图 2)。片段经凝胶回收试剂盒回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化感受态 DH5a 菌中。克隆之后, 提取质粒, 经 PCR 和酶切鉴定, 得到 1 个阳性克隆菌 (图 3)。



M: DL-2000 DNA 标志物, 1: *Xho* I 酶切重组质粒, 1: 目的基因。 M: λ-HindIII 标志物。

图 2 目的基因的 RT-PCR 扩增 图 3 重组质粒酶切鉴定

2.3 序列分析 将阳性克隆菌送宝生物工程(大连)公司测序, 测得阴道毛滴虫病毒部分基因序列长 1 454 bp, 同源性分析, 结果显示该序列与国外报道的 TVV-T1 株(U08999)序列的同源性较高为 82.9%。

3 讨论

研究发现, 在阴道毛滴虫体内存在多种 dsRNA 病毒<sup>[1,2]</sup>。这类病毒大小约为 4 600~4 800 bp, 均编码衣壳蛋白和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 2 种蛋白。从临床分离到的虫株, 大约有一半携带双链 RNA 病毒, 而含病毒的虫体其致病力相对较弱, 分泌的黏附蛋白少。这一现象说明病毒感染可导致虫体毒力降低; 同时还发现对甲硝唑耐药的虫株不含病毒<sup>[3]</sup>。迄今阴道毛滴虫病毒与阴道毛滴虫的相互影响尚不清楚。本研究首次筛选到含病毒的阴道毛滴虫虫株, 并对病毒部分片段进行了克隆。经测序和同源性分析发现与 TVV-T1 株(U08999)的基因组序列具有较高同源性, 达 82.9%; 与另一阴道毛滴虫病毒株(U57899)的序列同源性为 79.9%, 证明所收的阴道毛滴虫携带病毒。对于所分离出的阴道毛滴虫病毒归属问题, 有待病毒全序列克隆测序后进一步证实。

参 考 文 献

[ 1 ] Benchimol M, Chang TH, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis*: observation of coexistence of multiple viruses in the same isolate [J]. Fems Microbiol, 2002, 215: 197-201.  
 [ 2 ] Ali K, Alderete JF. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus particles infecting *Trichomonas vaginalis* [J]. Virology, 1993, 67: 6950-6955.  
 [ 3 ] Lauren JS, Pascale MG, Elizabeth MN, et al. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates[J]. Clin Microbiol, 2000, 38: 3004-3009.

(收稿日期:2005-11-22 编辑:伯韦)