

我国不同流行区内脏利什曼原虫分离株 kDNA 的 PCR-SSCP 分析*

郑学礼** 胡孝素 陈建平

华西医科大学寄生虫学教研室 成都 610044

提要 目的: 分析我国不同类型流行区内脏利什曼原虫 (*L. d.*) 分离株 kDNA。方法: 应用利什曼原虫属特异引物 13A, 13B 及据杜氏利什曼原虫四川人分离株 kDNA 微环特异片段序列设计合成的引物 I、引物 II, PCR 扩增不同流行区利什曼原虫分离株 kDNA, 获特定片段, 进行 SSCP 分析。结果: 用引物 I 和引物 II PCR 扩增内脏利什曼原虫分离株 kDNA, 在同样试验条件下, 山丘地区和荒漠地区 *L. d.* 分离株扩增出 297 bp 特定片段, 而平原地区 *L. d.* 分离株及新疆皮肤利什曼原虫未扩增出 297 bp 特定片段。将上述各虫株的 297 bp 特定片段进行 SSCP 分析, 可见两个山丘地区的 *L. d.* 分离株 sDNA 迁移率相同, 而与荒漠地区新疆 771 分离株则相差较大。用引物 13A, 13B PCR 扩增平原地区的 *L. d.* 山东分离株和 *L. d.* 江苏分离株、山丘地区的 *L. d.* 汶川分离株、*L. d.* 甘肃分离株, 均扩增出 120 bp 特定片段。经 SSCP 分析, 平原地区的 *L. d.* 山东分离株和 *L. d.* 江苏分离株的 sDNA 迁移率完全相同; 山丘地区的 *L. d.* 汶川分离株和 *L. d.* 甘肃分离株 sDNA 迁移率相同, 但与平原地区者明显不同; 婴儿利什曼 sDNA 迁移皆异于各分离株的 sDNA 迁移率。结论: 应用 PCR-SSCP 分析我国不同流行区利什曼原虫分离株, 表明我国山丘、荒漠、平原地区利什曼原虫的 kDNA 不完全同源。

关键词 利什曼原虫 kDNA PCR-SSCP

内脏利什曼病仍是我国严重危害人民健康的寄生虫病, 防治任务仍十分艰巨。我国内脏利什曼病的临床表现及流行病学特点在各型流行区(山丘、荒漠、平原)有明显差异。本研究应用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术, 分析我国不同利什曼原虫分离株。

材料与方 法

利什曼原虫及其培养 虫株: 热带利什曼原虫 (*L. tropica*) 来自前苏联, 婴儿利什曼原虫 (*L. infantum*)

来自法国, 杜氏利什曼原虫四川人分离株 (*L. donovani* Sichuan isolate)、文川分离株 (*L. donovani* Wenchuan isolate)、甘肃分离株 (*L. donovani* Gansu isolate)、山东分离株 (*L. donovani* Shandong isolate)、江苏分离株 (*L. donovani* Jiangsu isolate)、新疆 771 分离株 (*L. donovani* Xinjiang 771 isolate)、及新疆 801 分离株 (*L. donovani* Xinjiang 801 isolate), 分别来自四川南坪、文川、甘肃、山东、江苏、新疆巴楚及新疆喀什。其国际编码见表 1。原虫培养方法见参考文献^[1]。

表 1 利什曼原虫虫株及国际编码

Table 1 Leishmania isolates and their international code

虫 株 Species and isolates	国际编码 International code
热带利什曼原虫 <i>L. tropica</i>	MHOM/SU/74/K27 (BT011)MHOM/SU/60/LRC-L39
婴儿利什曼原虫 <i>L. infantum</i>	MHOM/FR/78/LEM 75
杜氏利什曼原虫 四川人分离株 <i>L. donovani</i> Sichuan isolate	MOHM/CN/86/SC6
汶川分离株 <i>L. donovani</i> Wenchuan isolate	MHOM/CN/90/SC10H-2
甘肃分离株 <i>L. donovani</i> Gansu isolate	MHOM/CH/83/GS3
山东分离株 <i>L. donovani</i> Shandong isolate	MHOM/CN/84/SD1
江苏分离株 <i>L. donovani</i> Jiangsu isolate	MHOM/CN/84/JS1
新疆 771 分离株 <i>L. donovani</i> Xinjiang 771 isolate	IPHL/CN/77/XJ771
新疆 801 分离株 <i>L. donovani</i> Xinjiang 801 isolate	MHOM/CN/80/XJ801
硕大利什曼原虫 <i>L. major</i>	MHOM/SU/73/SA SKM

利什曼原虫前鞭毛体 kDNA 提取 用 M 199 复合液培养基扩大培养利什曼原虫, 当虫体总数达约 5×10^9 时, 按参考文献^[2]略加修改进行前鞭毛体

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39970667)和广东省自然科学基金资助项目(No. 994052)

** 现工作单位: 第一军医大学寄生虫学教研室 广州 510515

kDNA 抽提。

扩增利什曼原虫 kDNA 引物序列及 PCR 反应体系 据 Rodgers 等^[3]报道, 合成 1 对 kDNA 微环保守区引物 13A 及 13B。另据本室^[4]已设计的, 合成 1 对特异性寡核苷酸引物 I 与引物 II。经反复实验后确定, 用引物 13A 和 13B 进行 PCR 的最佳循环条件是: 变性温度 94 45 s, 复性温度 50 45 s, 链延伸温度 72 45 s。用引物 I 和引物 II 进行 PCR 的最佳反应条件是: 变性温度 94 60 s, 复性温度 55 60 s, 链延伸温度 72 60 s, 共计 28 个循环, 最后一个循环完毕, 放置 72 延伸 10 min。每次扩增试验设立阴性 (dH₂O) 对照。

SSCP 分析

取 PCR 产物 10 μ l, 加入甲酰胺 3 μ l, 5% 溴酚蓝 1 μ l, 煮沸 10 min 后冰中骤冷, 迅速加样。在 8% (29 1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电泳槽为 Mini-PROTEAN @ II Electrophoresis Cell, 丙烯酰胺, N, N-亚甲双丙烯酰胺为美国生命技术公司产品, 测序级纯度)。凝胶经 10% 乙醇浸泡 5 min, 1% HNO₃ 浸泡 5 min, 2% 硝酸银染色 30 min, 显色液中 (3% H₂CO₃, 0.05% 甲醛, 0.3 mg% Na₂SO₃) 显色至条带显示清晰, 弃去显色液, 加入 10% 冰醋酸终止反应。每一步骤后, 均用去离子水冲洗凝胶。单链 DNA (ssDNA) 的迁移率 (mobility, M) 以 DNA Markers 的最小片段移动的所在位置, 作为 DNA 样品从原点至迁移点的距离 (mm), 按下式计算出 ssDNA 的相对 M 值:

$$M = \frac{\text{DNA 样品从原点至迁点的距离 (mm)}}{\text{从原点至参照点的距离 (mm)}}$$

结 果

用引物 I 及引物 II PCR 扩增反应及 PCR-SSCP 分析 用引物 I 及引物 II PCR 扩增利什曼原虫 12 个不同的种和分离株及新疆皮肤利什曼病原体 (CLP, NO17) kDNA, 其中山丘地区的 *L. d. 四川人分离株*, *L. d. 汶川分离株*, *L. d. 甘肃分离株*, 新疆 771 分离株, 新疆 801 分离株, *L. infantum* kDNA, 皆扩增出 297 bp 特定片段 (图 1)。在同样试验条件下, 平原地区 *L. d.* 两个分离株即: *L. d. 山东分离株*, *L. d. 江苏分离株*, 及 *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. major*, CLPNO17 病原体, 均未扩增出特定片段。将上述各虫株的 297 bp 特定片段, 经 SSCP 分析, *L. d. 汶川分离株*, *L. d. 甘肃分离株*, 新疆 801 分离株, 新疆 771 分离株及 *L. infantum* 第一条单链 DNA 迁移率 (M₁) 依次为 0.821, 0.821, 0.821,

1.000 和 0.805, 其第二单链 DNA 迁移率 (M₂) 依次为 0.597, 0.597, 0.582, 0.925 和 0.582。由此可见山丘地区两个分离株即 *L. d. 汶川分离株* 和 *L. d. 甘肃分离株* 的两条 ssDNA 迁移率完全相同; 两个山丘地区分离株两条 ssDNA 迁移率, 与荒漠地区新疆 771 分离株两条 ssDNA 迁移率比较, 则相差较大; 山丘地区分离株与 *L. infantum*, *L. d. 新疆 801 分离株* 相比较, 均有一定差异 (图 2)。

山丘地区、平原地区 *L. d.* 分离株及 *L. infantum* 的 kDNA 120 bp PCR-SSCP 分析 用引物 13A, 13B PCR 扩增平原地区的 *L. d. 山东分离株* 和 *L. d. 江苏分离株*, 山丘地区的 *L. d. 汶川分离株*, *L. d. 甘肃分离株*, *L. d. 四川人分离株*, *L. infantum* kDNA, 均扩增出 120 bp 预定片段 (图 3)。经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色后, SSCP 分析, *L. d. 汶川分离株*, *L. d. 甘肃分离株*, *L. d. 四川人分离株*, *L. d. 山东分离株*, *L. d. 江苏分离株* 和 *L. infantum* 的第一条单链 DNA 迁移率 (M₁) 依次为 0.759, 0.759, 0.741, 0.769, 0.769 和 0.759, 其第二单链 DNA 迁移率 (M₂) 依次为 0.676, 0.676, 0.676, 0.667, 0.667 和 0.731。由此可见, 平原地区的 *L. d. 山东分离株* 和 *L. d. 江苏分离株* 的 ssDNA 迁移率相同; 山丘地区的 *L. d. 汶川分离株* 和 *L. d. 甘肃分离株* ssDNA 迁移率相同, 但与平原地区者明显不同; *L. infantum* ssDNA 迁移率皆异于各分离株的 ssDNA 迁移率 (图 4)。

讨 论

近年, 我国内脏利什曼病回升特点是以山丘地区 (甘肃与四川) 较为显著, 平原地区则疫情控制稳定。一个快速、敏感、特异及简便地检测鉴定利什曼病原体的方法, 对于黑热病的治疗与流行病学的研究及防治方面均为急待解决的问题。本研究应用 PCR-SSCP 银染技术及特异引物 PCR 扩增鉴定分析我国不同类型流行区利什曼原虫分离株, 获得敏感、特异的结果。用引物 I 及引物 II PCR 扩增山丘地区 3 个 *L. d.* 分离株及荒漠地区 *L. d. 新疆 771 分离株* kDNA, 皆扩增出特定的 297 bp 片段。在同样试验条件下, 平原地区的 *L. d. 山东分离株* 和 *L. d. 江苏分离株* 均未扩增出此特定片段。上述结果表明, 应用特异引物 I 及引物 II, 鉴定分析中国内脏利什曼病原体山丘地区 *L. d.* 分离株与平原地区 *L. d.* 分离株是可行的。kDNA PCR-SSCP 分析: 用引物 13A、13B, I、II 扩增利什曼原虫的 kDNA

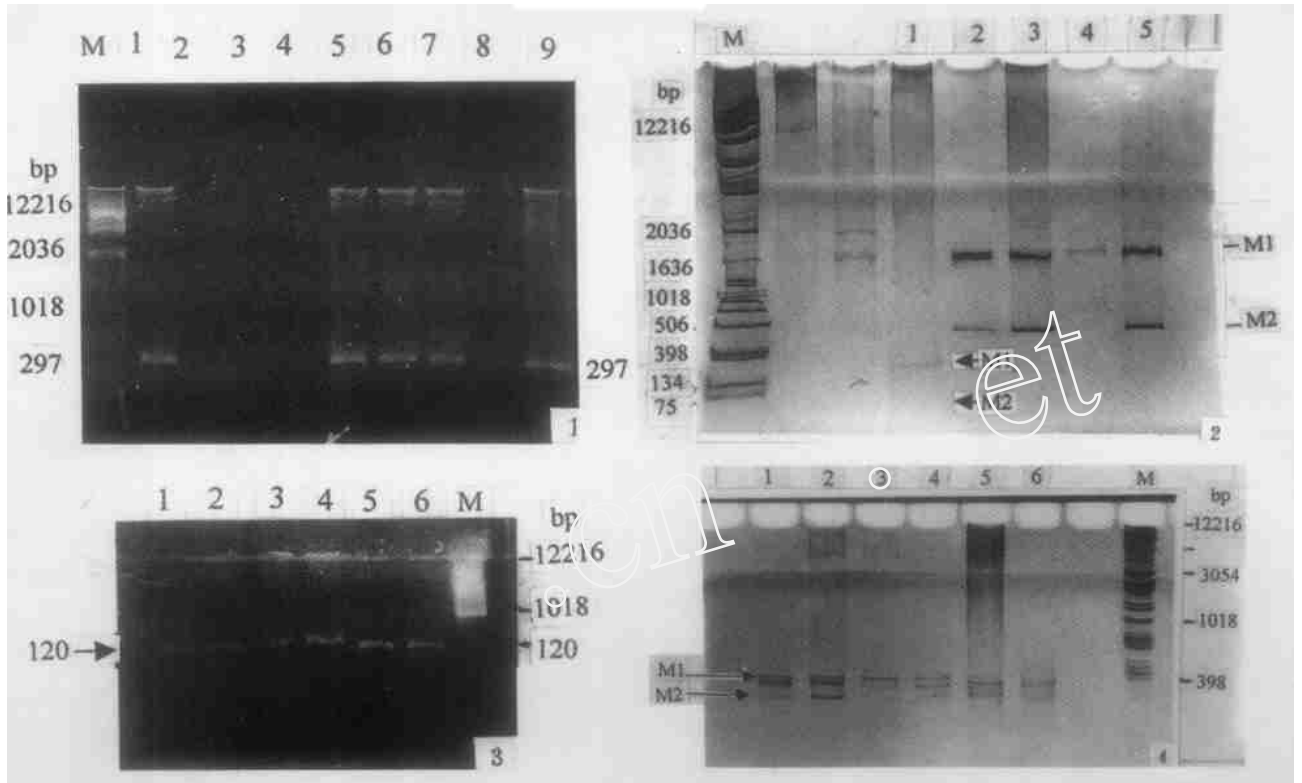


图 1 用特异引物 I、II PCR 扩增利什曼原虫株预期的 297 bp 片段, 2% 琼脂糖凝胶电泳, E. B. 染色 M 1 kb DNA 标准分子量 1 杜氏利什曼原虫新疆 801 分离株 2 杜氏利什曼原虫山东分离株 3 杜氏利什曼原虫江苏分离株 4 新疆皮肤利什曼病变组织 (No17) 5 杜氏利什曼原虫汶川分离株 6 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 7 杜氏利什曼原虫四川分离株 8 婴儿利什曼原虫 9 杜氏利什曼原虫新疆 771 分离株 图 2 PCR-SSCP 分析中国不同流行区利什曼原虫分离株 297 bp 片段, 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染结果 M 1 kb DNA 标准分子量 1 杜氏利什曼原虫新疆 771 分离株 2 杜氏利什曼原虫新疆 801 分离株 3 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 4 婴儿利什曼原虫 5 杜氏利什曼原虫汶川分离株 图 3 用引物 13A、13B PCR 扩增我国不同流行区利什曼原虫分离株 kDNA 120 bp 片段, 2% 琼脂糖凝胶电泳 E. B. 染色结果 1 杜氏利什曼原虫山东分离株 2 杜氏利什曼原虫江苏分离株 3 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 4 杜氏利什曼原虫汶川分离株 5 杜氏利什曼原虫四川人分离株 6 婴儿利什曼原虫 图 4 PCR-SSCP 分析中国山丘地区、平原地区杜氏利什曼原虫不同分离株 kDNA 微环 120 bp 片段, 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果 M 1 kb DNA 标准分子量 1 杜氏利什曼原虫山东分离株 2 杜氏利什曼原虫江苏分离株 3 杜氏利什曼原虫甘肃分离株 4 杜氏利什曼原虫汶川分离株 5 杜氏利什曼原虫四川人分离株 6 婴儿利什曼原虫

Fig. 1 PCR amplification with primers I and II to detect the kDNA specific fragment in different *L. eishmania* isolates, electrophoresis was run on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide M 1 kb marker 1 *L. donovani* Xinjiang 801 isolate 2 *L. donovani* Shandong isolate 3 *L. donovani* Jiangsu isolate 4 CLP (No17) 5 *L. donovani* Wenchuan isolate 6 *L. donovani* Gansu isolate 7 *L. donovani* Sichuan human isolate 8 *L. infantum* 9 *L. donovani* Xinjiang 771 isolate Fig. 2 A analysis of 297 bp kDNA specific fragment in different *L. donovani* isolates from various endemic regions in China by PCR-SSCP, DNA was run through 12% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis, the gel was then silver stained 1 *L. donovani* Xinjiang 771 isolate 2 *L. donovani* Xinjiang 801 isolate 3 *L. donovani* Gansu isolate 4 *L. infantum* 5 *L. donovani* Wenchuan isolate Fig. 3 PCR amplification with primers 13A and 13B to detect the kDNA specific fragment of different *L. donovani* isolates from various endemic regions in China, electrophoresis was run on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide 1 *L. donovani* Shandong isolate 2 *L. donovani* Jiangsu isolate 3 *L. donovani* Gansu isolate 4 *L. donovani* Wenchuan isolate 5 *L. donovani* Sichuan human isolate 6 *L. infantum* Fig. 4 A analysis of 120 kDNA specific fragment in different *L. donovani* isolates from various endemic regions in China by PCR-SSCP. DNA was run through 12% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis The gel was then silver stained 1 *L. donovani* Shandong isolate 2 *L. donovani* Jiangsu isolate 3 *L. donovani* Gansu isolate 4 *L. donovani* Wenchuan isolate 5 *L. donovani* Sichuan isolate 6 *L. infantum*

特定片段, 经 SSCP 分析, 平原地区的 *L. d.* 山东分离株和 *L. d.* 江苏分离株的两条单链 DNA 迁移率完全相同; 山丘地区的 *L. d.* 汶川分离株和 *L. d.* 甘肃分离株单链 DNA 迁移率完全相同, 但山丘地区与平原地区者明显不同。荒漠地区 *L. d.* 771 分离株 sDNA 迁移率与 *L. d.* 山丘地区分离株, *L. d.* 平原地区分离株者皆不同。吕洪刚和胡孝素^[2] 用 P³² 标记 *L. d.* 四川人分离株 kDNA 为探针, 杂交分析国内不同流行区的利什曼原虫, 结果表明, 山丘地区、平

原地区、荒漠地区 *L. d.* 分离株的 kDNA, 在同源程度上存在差异; 上述报告与本次研究首次 SSCP 分析结果一致。研究结果显示: 中国黑热病山丘、荒漠、平原地区病原体的 kDNA 不完全同源。

参 考 文 献

- 1 郑学礼, 胡孝素, 陈建平, 等 新疆克拉玛依地区皮肤利什曼病原体 SSU rRNA 基因及 kDNA 的 PCR-SSCP 分析 寄生虫与昆虫学报 1998; 5: 142-146
- 2 Lu HG, Hu XS Identification of *L. eishmania* by kinetoplast and minicircle and cloning of minicircle Chin Med J 1990; 103: 418-423

- 3 Rodgers MP, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267-275
4 杨文天, 胡孝素. PCR 扩增技术用于犬内脏利什曼病病原体 kD-

NA 的检测. *实用寄生虫学杂志* 1993; 1: 6-9
1998 年 8 月 24 日收稿 1999 年 6 月 16 日修回
(编辑: 李雅卿)

ANALYSIS OF KINETOPLAST DNA OF LEISHMANIA ISOLATES IN CHINA BY PCR-SSCP*

ZHEN G Xueli**, HU Xiao su, CHEN Jian ping

Laboratory of Parasitology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041

ABSTRACT

AM: To analyse the kDNA of the pathogens of leishmaniasis in China. **METHODS:** Based on leishmaniasis specific primers 13A, 13B and a set of oligonucleotide primers I and II with *Leishmania donovani* (*L. d.*) Sichuan isolate specificity, PCR were conducted to amplify minicircle kDNA fragments (297 bp and 120 bp) in the pathogens of leishmaniasis from different epidemiologic foci in China. The products were analyzed by single strand conformation polymorphism technology (SSCP). **RESULTS:** PCR amplified 297 bp product occurred in *L. d.* isolates from hill and desert foci, but no product was found in *L. d.* isolates from plain foci in China. SSCP of these 297 bp kDNA fragments showed that there was no difference in the mobility of ssDNA between isolates from hill foci, but there was apparent difference in the mobility of ssDNA between *L. d.* isolates from hill and desert foci. PCR amplified 120 bp products occurred in *L. d.* Sichuan isolate, *L. d.* Wenchuan isolate, *L. d.* Gansu isolate from hill foci and *L. d.* Shandong isolate and *L. d.* Jiangsu isolate from plain foci. SSCP of the 120 bp products showed that no difference in the mobility of ssDNA was found between two isolates from plain foci. There was also no difference in the mobility of ssDNA between *L. d.* Wenchuan isolate and *L. d.* Gansu isolates from hill foci. But there was apparent difference in the mobility of ssDNA between *L. infantum* and *L. d.* isolates from different foci. **CONCLUSION:** Heterogeneity does exist between the kDNA of *L. d.* isolates from different foci of leishmaniasis of China.

Key words: *Leishmania*, kDNA, PCR-SSCP

* Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39970667) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 994052)

** Present address: Department of Parasitology, First Military Medical University, Guangzhou 510515

膝关节舍蝇蝇蛆病一例报告

广东省顺德市第一人民医院中心血库 顺德 528300 朱列荣

广东省顺德市伍仲 纪念医院 顺德 528300 林容冰

患者男性, 39 岁, 因膝盖肿痛到当地医院就诊。主诉: 右膝盖砍伤, 院外治疗数月, 肿痛日增。体检: 体温 37, 右膝隆肿, 伤口溃烂、渗液、发臭, 右膝关节难屈伸, 右腹股沟可触及直径约 1 cm 的淋巴结, 有压痛。血象: 血红蛋白 120 g/L, RBC $4.2 \times 10^{12}/L$, WBC $14 \times 10^9/L$, 中性细胞 0.73, 淋巴细胞 0.21, 嗜酸性细胞 0.06。尿常规检查 (-), 粪检未查见寄生虫卵。清洗伤口时在其深处挑出一条乳白色可疑虫体, 长约 11 mm, 直径约 2 mm, 圆柱形, 头尖后钝。镜检: 虫体分 13 节, 胸部 3 节, 头节缩于胸部内, 仅见一对口沟外露; 腹部 10 节, 第 8 节后截面中央有一对后气门, 呈“D”字形, 气门环完整, 气门钮位于气门环的凹入部, 3 个

气门裂多处弯曲, 末端均为向心排列。此气门结构符合舍蝇蝇蛆后气门形态特征, 而后气门是鉴定蝇蛆的主要依据, 因此确诊该患者为膝关节舍蝇蝇蛆病。经对症处理, 2 d 后病情明显好转, 8 d 后痊愈。

参 考 文 献

- 1 白功懋主编. 寄生虫学与寄生虫检验学. 北京: 中国医药科技出版社, 1990: 92-93

1998 年 9 月 29 日收稿 1999 年 5 月 25 日修回
(编辑: 庄兆农)