

文章编号: 1000-7423(2014)-05-0327-07

【论著】

杜氏利什曼原虫表达位点相关基因样蛋白的分子克隆及表达定位

刘鹏, 张仁刚, 张洁, 敬保迁*

【摘要】 目的 克隆杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 无鞭毛体特异表达新基因, 观察其编码蛋白的亚细胞定位。方法 制备杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体 mRNA, 以消减抑制杂交技术筛选无鞭毛体新的表达序列标签, 扩增含有新表达序列标签的基因全长 cDNA, Northern 杂交和 RT-PCR 检测新基因在前鞭毛体和无鞭毛体中的表达, 共表达方法观察杜氏利什曼原虫内新基因编码蛋白的亚细胞定位。结果 构建了杜氏利什曼原虫无鞭毛体表达序列标签消减文库, 克隆到一个新基因, 命名为表达位点相关基因样蛋白 (ESAGLP) 基因, 其 cDNA 全长为 2 258 bp, 编码 620 aa。ESAGLP 基因仅在无鞭毛体内表达, 其编码蛋白定位于线粒体。结论 ESAGLP 鉴定为杜氏利什曼原虫无鞭毛体新基因, 其编码蛋白定位于无鞭毛体的线粒体。

【关键词】 杜氏利什曼原虫; ESAG 样蛋白; 表达; 定位; 消减抑制杂交

中图分类号: R382.221

文献标识码: A

Molecular Cloning and Localization of *Leishmania donovani* Expression Site Associated Genes-like Protein

LIU Peng, ZHANG Ren-gang, ZHANG Jie, JING Bao-qian*

(*Institute of Immunology and Molecular Biology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China*)

【Abstract】 **Objective** To clone the novel gene that specifically expressed in the amastigotes of *Leishmania donovani*, and observe subcellular localization of the gene encoding protein. **Methods** mRNA from promastigotes and amastigotes of *L. donovani* were prepared. The novel expressed sequence tag of amastigotes was selected by suppression subtractive hybridization. The expression of the novel gene in different stages of *L. donovani* was detected by Northern hybridization and semi-quantitative RT-PCR. The subcellular localization of the novel gene encoding protein was observed. **Results** The subtractive library of the specifically expressed sequence tag of amastigotes was constructed, and a novel gene designated as expression site associated genes-like protein (ESAGLP) gene was cloned. The full length of ESAGLP cDNA was 2 258 bp. The open-reading frame encoded a polypeptide of 620 amino acid residues. ESAGLP gene expressed only in amastigotes, the encoding protein was localized in the mitochondria. **Conclusion** The ESAGLP gene is identified as a novel gene which specifically expressed in *Leishmania donovani* amastigotes, and its encoding protein is localized in the mitochondria.

【Key words】 *Leishmania donovani*; ESAG-like protein; Expression; Localization; Suppression subtractive hybridization

Supported by the National Natural Foundation of China (No. 30371263, 30872232) and the Scientific Research Fund of the Education Department of Sichuan Province

* Corresponding author, E-mail: bqjing@nsmc.edu.cn

杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*) 感染可引起致死性的内脏利什曼病。在其感染致病过程中,

该原虫不产生毒素, 但表达多种毒力相关蛋白, 这些蛋白参与原虫对人巨噬细胞或树突状细胞的粘附和入侵, 促进前鞭毛体向无鞭毛体转化, 增强无鞭毛体对巨噬细胞内酸性、低糖、高自由氧及 37 °C 环境的耐受, 促进无鞭毛体在细胞内的增殖, 从而导致宿主细胞破损而发生疾病^[1]。比较无鞭毛体与前鞭毛体间的

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30371263, 30872234); 四川省教育厅科研基金

作者单位: 川北医学院免疫学与分子生物学研究所, 南充 637000

* 通讯作者, E-mail: bqjing@nsmc.edu.cn

基因表达, 可从无鞭毛体特异表达或上调表达基因中筛选到利什曼原虫毒力基因^[2], 从而揭示与利什曼病发生发展相关的分子, 发现药物作用靶位分子^[3], 或发展遗传减毒疫苗^[4]。本研究采用消减抑制杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术对我国流行的杜氏利什曼原虫无鞭毛体与前鞭毛体差异表达基因进行筛选, 获取新的无鞭毛体特异表达基因, 观察其在虫体内的表达和定位特征, 为发现杜氏利什曼原虫新的毒力基因奠定基础。

1 材料和方法

1.1 虫种与培养 杜氏利什曼原虫四川人源分离株 (MHOM/CN/92/SC10H2) 由四川大学寄生虫学教研室胡孝素教授惠赠。将保存在 NNN 培养基中的上述分离株于含 10% 新生小牛血清、100 U/ml 青霉素 G 和 100 μg/ml 链霉素的 M199 复合培养液 (pH 7.0), 26 °C 轻微震荡扩增培养, 制备对数生长期的前鞭毛体。按本研究室建立的方法^[5], 将前鞭毛体接种于含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 复合培养液 (pH 5.5), 于 37 °C、5% CO₂ 条件下诱导转化为无鞭毛体。

1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒 (Rneasy Mini Kit) 和 mRNA 纯化试剂盒 (Oligotex mRNA Mini Kit) 购自德国 Qiagen 公司。选择性 PCR 法 cDNA 消减试剂盒 (PCR-Select cDNA Subtraction Kit)、选择性 PCR 法差异筛选试剂盒 (PCR-Select Differential Screening Kit) 和 cDNA 末端快速扩增试剂盒 (SMART RACE cDNA Amplification Kit) 购自加拿大 Clontech 公司。DNA 地高辛标记与检测试剂盒 (Dig-DNA Labeling and Detection Kit) 购自德国 Roche 公司。Primer Star 高保真 PCR 试剂盒和一步法 RT-PCR 试剂盒 (Prime-Script One Step RT-PCR Kit) 购自日本 TaKaRa 公司。质粒 pT-easy 载体试剂盒购自美国 Promega 公司。利什曼原虫跨生活史时期穿梭表达质粒 pX-PAC 为美国华盛顿州立大学 Beverley 教授惠赠。质粒 pEGFP-N1 购自加拿大 Clontech 公司。质粒制备试剂盒与 DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司。Hoechst 33342 染色液购自美国 Sigma 公司。MitoTracker Red FF 荧光染料购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 杜氏利什曼原虫总 RNA 与 mRNA 的制备 收集增殖培养后的杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体, 约 2×10⁷ 个, 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 使用总 RNA 提取试剂盒, 参照其操作说明, 以异硫氰酸胍/盐酸胍液裂解细胞后, 旋转过滤柱法制备总 RNA, 使用 mRNA 纯化试剂盒, 参照其产品使用说明, 以 Oligotex 过滤柱纯化 mRNA, 所得样品用蛋白核酸检测仪

测定其浓度和纯度。

1.4 消减抑制杂交 按照选择性 PCR 法 cDNA 消减试剂盒说明操作。将杜氏利什曼原虫无鞭毛体设定为试验组, 前鞭毛体设定为驱动组。将等量的试验组和驱动组 mRNA (2 μg) 逆转录成 cDNA, 使用限制性核酸内切酶 *Rsa* I 完全消化, 分别连接接头 1 和接头 2R 进行第 1 轮杂交。即取少量的带有接头 1 的试验组 cDNA, 加入过量的带有接头 2R 的驱动组 cDNA 和 4× 杂交缓冲液, 于 98 °C 孵育 1.5 min 后, 68 °C 孵育 8 h。然后进行第 2 轮杂交, 在上述第 1 轮杂交的产物中再次加入带有接头 2R 的驱动组 cDNA 和 4× 杂交缓冲液, 于 98 °C 孵育 1.5 min 后, 68 °C 孵育过夜。然后取 10 倍稀释后的上述第 2 轮消减杂交后产物 1 μl, 以 PCR 引物 1 进行 PCR 指数扩增。PCR 扩增条件为: 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 27 个循环。取 PCR 指数扩增后的产物 1 μl, 以巢式 PCR 引物 2R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为: 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 12 个循环。

1.5 消减文库的构建与鉴定 取上述第 2 轮 PCR 扩增的产物, 用 pT-easy 载体试剂盒, 按操作说明进行连接, 产物转染经 CaCl₂ 处理后的大肠埃希菌 JM109 感受态细胞, 铺于 LB 培养板 (含 100 μg/ml 氨苄青霉素、20 μg/ml 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷和 4 μg/ml 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷), 于 37 °C 孵育过夜, 挑取 24 个阳性克隆以选择性 PCR 法差异筛选试剂盒, 参照其操作说明, 分别扩增各阳性克隆的插入子 cDNA, 经 NaOH 处理后点样于尼龙膜上。采用 DNA 地高辛标记与检测试剂盒, Dig-dUTP 标记驱动组第二轮 PCR 扩增产物作为探针。将尼龙膜于含 5% 奶粉提取物的 2×SSC 缓冲液中 72 °C 孵育 6 h 后, 与标记探针于 72 °C 孵育过夜, 以 2×SSC/0.5% SDS 缓冲液低强度洗涤 (68 °C, 20 min×4), 0.2×SSC/0.5% SDS 缓冲液高强度洗涤 (68 °C, 20 min×4), 然后将尼龙膜于含 5% 奶粉提取物的 TBST 缓冲液中封闭 30 min, 碱性磷酸酶标记的抗 Dig 抗体室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 (15 min×3), 以硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 (NBT/BCIP) 为底物进行显色, 观察结果。

1.6 EST 测序与 BLAST 检索 采用质粒制备试剂盒, 按操作说明, 制备上述 1.5 中各阳性杂交的消减克隆质粒 DNA, 送上海基康生物技术有限公司进行测序。以 BLASTN 和 BLASTX 方式对各克隆 EST 序列进行 GenBank 检索, 确定未曾研究过的利什曼原虫编码基因的 EST 序列。

1.7 RACE 法扩增全长基因序列 使用 cDNA 末端快速扩增试剂盒, 按说明操作, 取杜氏利什曼原虫无鞭

毛体 mRNA, 以 5'-CDS 引物和 BD SMART II A 寡核苷酸合成 5'-RACE 预制 cDNA, 以 3'-CDS 引物合成 3'-RACE 预制 cDNA。以上述方法 1.6 中确定的未曾研究过的利什曼原虫编码基因的 EST 序列为基准序列, 合成 RACE 正链 5' 端引物: 5'-CACGAACCTTGCCTGTGCGCTCAACTCT-3', RACE 正链 3' 端反向引物: 5'-GTGCTTGAACGGACACGCGAGTTGAGA-3', 然后分别以合成的 5'-RACE 预制 cDNA 与 3'-RACE 预制 cDNA 为模板, 降落 PCR 方式分别扩增 5' 端与 3' 端 cDNA。PCR 扩增条件: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环; 72 °C 10 min。产物经 2.0 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 全长基因序列测定及分析 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 RACE 扩增产物, 克隆入 pT-easy 载体, 阳性重组克隆送上海基康生物技术公司进行测序。组装全长 cDNA 序列后, 设计出 PCR 扩增基因全长 cDNA 的上游引物 (5'-GAATTCAGTATTGTTGCTTG-3') 和下游引物 (5'-CATCACGTAAGTATTTTCAGTTCAC-3')。使用 Primer Star 高保真 PCR 试剂盒, 以制备好的杜氏利什曼原虫无鞭毛体 cDNA 为模板进行基因全长 cDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 94 °C 2 min; 94 °C 0.5 min, 60 °C 0.5 min, 72 °C 2.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。产物克隆入 pT-easy 质粒, 将重组质粒送上海基康生物技术公司进行基因全长 cDNA 序列测定。并以其为基准序列, BLASTN 和 BLASTP 方式检索 GenBank, 分析 DNA 序列和编码蛋白氨基酸序列的同源性。SignalP 软件预测编码蛋白质的信号肽, PRINTS BLAST 与 BLOCK BLAST 方法搜索编码蛋白质的功能结构域。ScanProsite 方法搜索编码蛋白质的激酶作用位点。WoLF PSORT 搜索编码蛋白质的亚细胞定位。依据基因结构和序列特征, 将基因命名为表达位点相关基因样蛋白 (expression site associated genes-like protein, ESAGLP), 并对所获基因的全长 cDNA 序列进行 GenBank 登记。

1.9 不同生活史期杜氏利什曼原虫 ESAGLP 基因的表达

1.9.1 Northern 杂交检测 ESAGLP 基因表达 将制备的利什曼原虫四川人源分离株前鞭毛体和无鞭毛体 mRNA。以 1.0% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳, 毛细吸印法转移至尼龙膜上。采用 DNA 地高辛标记与检测试剂盒, 以 Dig-dUTP 标记 ESAGLP 基因全长 cDNA 并作为探针, 与尼龙膜于 50 °C 杂交过夜后, 用 1×SSC 缓冲液强烈洗涤尼龙膜 (15 min×3), 碱性磷酸酶标记的羊抗地高辛抗体识别, NBT/BCIP 进行显色。

1.9.2 RT-PCR 法检测 ESAGLP 基因的表达 按照 RT-

PCR 试剂盒说明操作, 以方法 1.8 中 ESAGLP 基因全长 cDNA 扩增引物对杜氏利什曼原虫前鞭毛体与无鞭毛体 mRNA 进行 RT-PCR 扩增。PCR 扩增条件: 42 °C 30 min; 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.10 杜氏利什曼原虫 ESAGLP 基因的表达定位

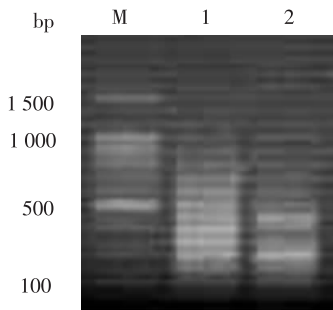
1.10.1 共表达质粒的构建 使用 Primer Star 高保真 PCR 试剂盒, 以 1.8 中所克隆的 ESAGLP 全长 cDNA 为模板, 用上游引物: 5'-TAAATCCCGGCCAATACGAACC-TGGTACTCCTCC-3' (下划线为 *Sma* I 识别位点), 下游引物: 5'-GCAGGGATCCAGATCTAGATAGTCG-AGGTAGTGCATAGCG-3' (下划线为 *Bam*H I / *Bgl* II 识别位点), 扩增 ESAGLP 基因中编码 N 端氨基酸编码区 150 个氨基酸残基的 cDNA 片段。以 pEGFP-N1 质粒 DNA 为模板, 用上游引物: 5'-GGACTCAGATCTCG-AGCTCAAG-3' (下划线为 *Bgl* II 识别位点), 下游引物: 5'-AGTCGGATCCGCTCTACTTGTACAGCTCGTC-CATGCC-3' (下划线为 *Bam*H I 识别位点), 扩增 EGFP 编码区。PCR 参数为: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 ESAGLP 基因 N 端编码区 cDNA 与 EGFP 编码区 DNA 连接后, 克隆入质粒 pX-PAC 多克隆区的 *Sma* I 与 *Bam*H I 识别位点间, 构建成重组质粒 pX-ESAGLP Tag-EGFP。

1.10.2 表达定位的观察 收集杜氏利什曼原虫前鞭毛体, 以冰冷的电穿缓冲液 [含 21 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸 (pH 7.5), 0.7 mmol/L Na₂PO₄, 137 mmol/L NaCl, 6 mmol/L 葡萄糖, 5 mmol/L KCl] 洗涤前鞭毛体 3 次, 并稀释至 1×10⁸ 个/ml, 于冰上放置 3 h 后, 取 50 μg 预冷的质粒 pX-ESAGLP Tag-EGFP DNA 与 400 μl 预冷的前鞭毛体混合, 用电穿仪 (Gene Pulser II, 美国 Bio-Rad 公司) 进行电穿转染。电穿参数为: 电压 450 V, 电容 500 μF; 电阻: 无穷大。转染后的杜氏利什曼原虫前鞭毛体, 于冰上冷却 10 min, 加入含 10% 新生小牛血清的 M199 复合培养液培养 24 h, 用无血清的 M199 复合培养液稀释虫体至终浓度 2×10⁶ 个/ml, 在激发波长为 481~520 nm 的荧光显微镜下直接观察前鞭毛体活体细胞内呈现绿色荧光的亚细胞结构的数量、形态和分布。另外, 将上述转染重组质粒后的前鞭毛体进行瑞氏染色, 观察前鞭毛体的整体形态结构。以 Hoechst 33342 染色, 在激发波长为 353~365 nm 的荧光显微镜下观察前鞭毛体活体细胞内细胞核和动基体形态和位置。以 MitoTracker Red 染色, 在激发波长为 581~644 nm 的荧光显微镜下观察前鞭毛体活体细胞内线粒体的数量、形态和位置。比

较上述各前鞭毛体图像，确定ESAGLP基因编码蛋白的亚细胞定位。

2 结果

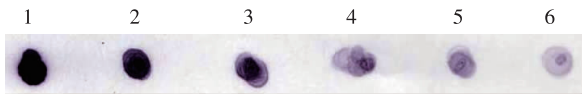
2.1 不同生活史期杜氏利什曼原虫消减文库的构建 杜氏利什曼原虫无鞭毛体mRNA与等量前鞭毛体mRNA经消减杂交后，其产物以抑制性PCR扩增和电泳检测（图1）。第1轮PCR指数扩增的产物呈弥散带型（100~1 000 bp），其中含有多条主带；第2轮巢式PCR扩增产物呈大小介于100~1 000 bp的弥散带型，但将在400 bp、200 bp处有明显的主带，与SSH的理论结果相符。将第2轮巢式PCR产物经DNA地高辛标记试剂盒标记后，经检测其敏感性可达10⁻⁷ μg（图2）。将标记好的第2轮巢式PCR产物与随机挑取24个消减文库中的阳性重组克隆的PCR扩增产物进行杂交，有18个克隆呈阳性，6个克隆呈阴性（图3）。说明消减文库中75%的重组子含有相关EST片段。



M: DNA标志物；1: 第1轮PCR指数扩增产物；2: 第2轮巢式PCR扩增产物。

M: DNA marker; 1: Exponential PCR amplification products; 2: Nested PCR amplification products.

图1 消减抑制杂交 cDNA样品PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳 Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the PCR amplification products with SSH cDNA samples



1: 1×10² μg; 2: 1×10³ μg; 3: 1×10⁴ μg; 4: 1×10⁵ μg; 5: 1×10⁶ μg; 6: 1×10⁷ μg。

图2 地高辛标记杜氏利什曼原虫无鞭毛体EST探针敏感性检测 Fig.2 The sensitivity detection of the digoxigenin-labeled subtracted cDNA probes

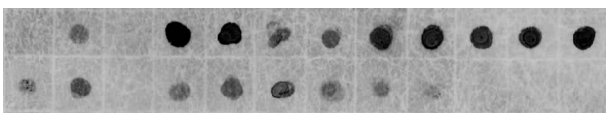
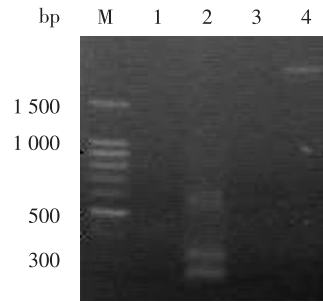


图3 以地高辛标记的消减cDNA探针随机挑取的消减文库重组子差异筛选结果

Fig.3 Differential screening results of randomly picked recombinants from SSH libraries with digoxigenin-labeled subtracted cDNA probes

2.2 ESAGLP基因的克隆及其生物信息学分析 对上述18个阳性重组克隆进行测序，并用BLASTN和BLASTP方式检索GenBank，发现大多数重组克隆中所插入的EST为利什曼原虫无鞭毛体时期上调表达的已知基因，如α微管蛋白基因、A2基因、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因和GDPMP基因等。仅1个为未报道过的基因EST序列，以其设计引物对杜氏利什曼原虫mRNA进行RACE扩增，在3'端负链负向RACE扩增中获得一大小约2.3 kb的cDNA片段（图4）。



M: DNA标志物；1、2: 分别为阴性对照和杜氏利什曼原虫mRNA 5'端RACE PCR扩增产物；3、4: 分别为阴性对照和杜氏利什曼原虫无鞭毛体mRNA3'端RACE PCR扩增产物。

M: DNA marker; 1, 2: PCR product of negative control and mRNA from *L. donovani* amastigotes by 5' RACE PCR amplification, respectively; 3, 4: PCR product of negative control and mRNA from *L. donovani* amastigotes of 3' RACE PCR amplification, respectively.

图4 使用ESAGLP EST特异引物对杜氏利什曼原虫无鞭毛体mRNA的5'和3' RACE PCR扩增

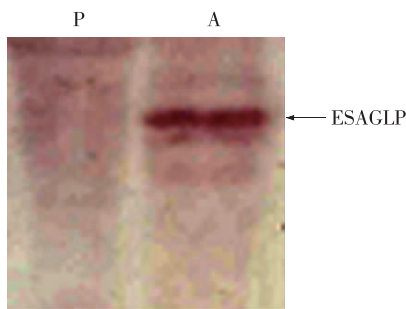
Fig.4 5' and 3' RACE PCR amplification of mRNA from *Leishmania donovani* amastigotes by using primers specific to ESAGLP EST

经克隆并测序，证实该cDNA片段与婴儿利什曼原虫15号染色体亚末端的一个推定蛋白基因XM_001464303的DNA序列高度相似，其读码框编码620 aa，其中，160~250 aa片段与利什曼原虫的ESAG家族基因（expression site associated genes）相应氨基酸序列存在一定相似性，且与ESAG家族不同成员基因均位于不同大染色体亚末端的特征一致，故将所克隆的未知基因命名为ESAG样蛋白(ESAG-like protein, ESAGLP)，GenBank登录号为EF151425。经INTERPRO DATABASE搜查，ESAG样蛋白N端1~69 aa为信号肽，54~74 aa为跨膜区。经TMHMM搜查，ESAG样蛋白为II型跨膜蛋白，其胞内区为1~53 aa，跨膜区为54~76 aa，胞外区为77~620 aa。经ScanProsite搜查，ESAG样蛋白具有多个蛋白激酶C、酪氨酸蛋白激酶作用位点和N-糖基化位点，不含链内二硫键。经PRINTS BLAST和BLOCK BLAST对蛋白功能结构域搜查，ESAG样蛋白含有膜型ATP酶I结构域。经WoLF PSORT搜查，ESAG样蛋白亚细胞定位于线粒

体可能性最大。

2.3 不同生活史期杜氏利什曼原虫ESAGLP基因的表达鉴定 Northern杂交检测杜氏利什曼原虫前鞭毛体与无鞭毛体内ESAGLP基因的表达,发现无鞭毛体内存在ESAGLP基因杂交带型,而前鞭毛体内则无ESAGLP基因杂交带型(图5)。进一步以RT-PCR从杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体mRNA中扩增的ESAGLP全长cDNA,发现无鞭毛体mRNA可扩增出ESAGLP全长cDNA,而前鞭毛体mRNA则仅见引物二聚体,未扩增出ESAGLP全长cDNA(图6)。说明无鞭毛体内存在ESAGLP基因mRNA表达,而前鞭毛体内无ESAGLP基因mRNA表达。

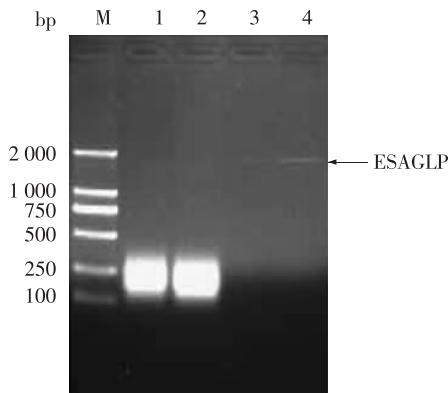
2.4 ESAGLP基因的表达定位 收集培养至对数生长



P: 前鞭毛体总RNA; A: 无鞭毛体总RNA。
P: Total RNA of *Leishmania donovani* promastigotes; A: Total RNA of *Leishmania donovani* amastigotes.

图5 地高辛标记的ESAGLP cDNA探针对杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体总RNA的Northern杂交

Fig. 5 Northern hybridization of total RNA from *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes with digoxigenin-labeled ESAGLP cDNA probes



M: DNA标志物; 1, 2: 前鞭毛体mRNA; 3, 4: 无鞭毛体mRNA。
M: DNA marker; 1, 2: mRNA templates of *Leishmania donovani* promastigotes; 3, 4: mRNA templates of *Leishmania donovani* amastigotes.

图6 RT-PCR扩增杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体mRNA中的ESAGLP基因

Fig. 6 Amplification of ESAGLP cDNA via RT-PCR using *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes mRNA templates

期的转染重组质粒pXG-ESAGLP Tag-EGFP的杜氏利什曼原虫前鞭毛体,经瑞氏染色后镜下观察发现,前鞭毛体形态完整,呈长梭形,细胞核及动基体呈深紫色,细胞膜和鞭毛为浅紫色。胞浆内含大小不等的多形性浅紫色胞浆颗粒(图7)。以Hoechst 33342染色活体细胞后荧光显微镜下观察发现,前鞭毛体运动活跃,胞内细胞核呈发散亮蓝色荧光的圆形结构,位于细胞的前段,而动基体呈发散亮蓝色荧光的腊肠状或椭圆形结构,位于中前段,而细胞膜、鞭毛、线粒体等其他细胞结构无荧光(图8)。以MitoTracker Red FF染色活体细胞后观察发现,前鞭毛体运动活跃,胞内线粒体呈多个大小不等的圆形或椭圆形红色颗粒,散在分布于细胞浆内,而细胞膜、细胞核、动基体和鞭毛等其他细胞结构无荧光(图9)。而将转染重组质粒pXG-ESAGLP Tag-EGFP的前鞭毛体于荧光显微镜下直接观察,发现前鞭毛体运动活跃,胞内含多个大小不等圆形或椭圆形的发散绿色荧光的颗粒结构,散在分布于细胞浆内,与线粒体的形态和分布相似,而细胞膜、鞭毛、细胞核和动基体等结构无荧光(图10)。说明ESAGLP基因编码蛋白主要表达于线粒体,与生物信息学预测结果一致。

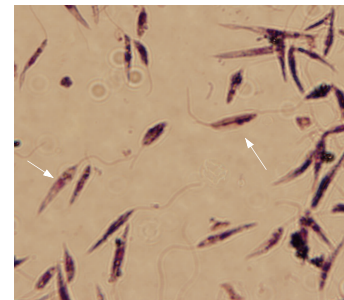
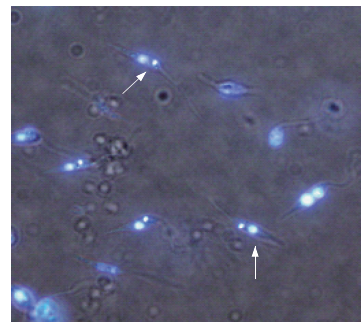


图7 杜氏利什曼原虫前鞭毛体(瑞氏染色, ×1000)

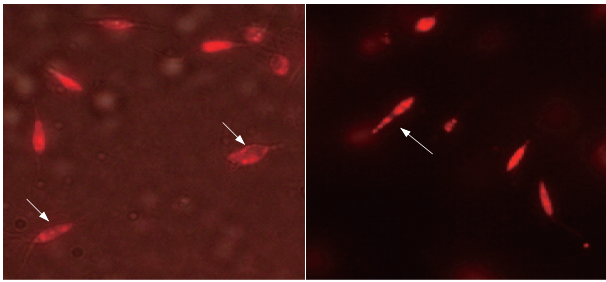
Fig. 7 Photomicrographs of *Leishmania donovani* promastigotes (Wright's staining, ×1000)



↑: 前鞭毛体内的细胞核与动基体 Nuclous and kinetoplast in live promastigotes.

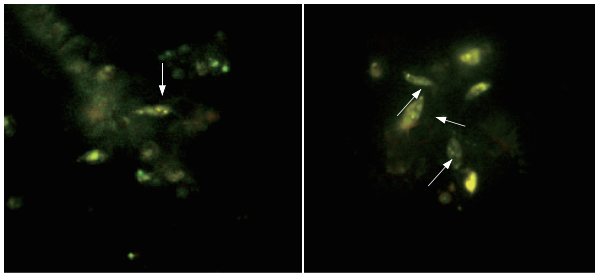
图8 杜氏利什曼原虫前鞭毛体(Hoechst 33342染色, ×1000)

Fig. 8 Photomicrographs of *Leishmania donovani* promastigotes (Hoechst 33342 staining, ×1000)



↑: 活的前鞭毛体内的线粒体 Mitochondria in live promastigotes。

图9 杜氏利什曼原虫前鞭毛体 (MitoTracker Red染色, ×1000)
Fig. 9 Photomicrographs of *Leishmania donovani* promastigotes (MitoTracker Red staining, ×1000)



↑: 活的前鞭毛体内GFP绿色荧光蛋白图像 GFP green fluorescence protein images in live promastigotes。

图10 质粒pXG-ESAGLP Tag-EGFP转染杜氏利什曼原虫前鞭毛体 (×1000)
Fig. 10 *Leishmania donovani* promastigotes transfected with plasmid pXG-ESAGLP Tag-EGFP (×1000)

3 讨论

先前研究证实, 利什曼原虫细胞内存在多个毒力基因, 不同的毒力基因在不同种株利什曼原虫或不同生活史期其表达不同。在同一种株内多个毒力基因可同时表达, 大多数毒力基因在无鞭毛体内上调表达或特异表达^[6]。在我国流行的杜氏利什曼原虫所致疾病与国外内脏利什曼病的临床表现不一致^[7], 其遗传背景与国际标准株间存在差异^[8]。根据毒力基因的表达和功能特点^[9], 寻找我国杜氏利什曼原虫关键毒力基因, 对研究内脏利什曼病的致病机制和防治方法具有重要意义。

ESAG家族分子为锥虫属原虫染色体端粒表达位点相关基因, 有十余个成员, 其编码基因存在于大染色体亚端粒区, 编码蛋白大多为跨膜蛋白, 在不同生活史期呈调节性表达^[10], 不同的ESAG家族分子其生物学性质不同, 一些为腺苷酸环化酶, 一些为膜受体蛋白, 一些为铁转运蛋白, 一些保护原虫耐受人血清蛋白损害, 一些参与线粒体再生^[11]。它们促进原虫适应人体内环境, 增强原虫代谢和增殖水平, 属原虫毒力基因^[12]。

本研究所获杜氏利什曼原虫ESAG样蛋白基因,

在基因结构方面, 该基因位于15号染色体亚端粒区, 紧邻无意义重复区, 与ESAG家族分子特点一致^[13], 故推测本研究所获的ESAGLP基因可能与其他ESAG家族基因一样, 与利什曼原虫原虫毒力有关^[14]。在基因表达和蛋白质生物学功能方面, ESAGLP基因主要在无鞭毛体期表达, 其编码蛋白为线粒体跨膜蛋白, 含有ATP酶 I 结构域, 由于膜型ATP酶 I 具有H⁺泵活性, 推测ESAGLP编码蛋白的功能可能是主动将无鞭毛体胞浆中H⁺转运至线粒体膜, 从而一方面维持细胞内酸碱度呈中性状态, 使无鞭毛体在巨噬细胞内酸性环境中维持正常代谢, 促进无鞭毛体的生存^[15,16]; 另一方面, 促进线粒体膜质子梯度形成和电势稳定, 通过电子传递和氧化磷酸化而获取ATP, 增强虫体能量代谢^[17,18], 说明ESAGLP基因的表达可能与杜氏利什曼原虫在人体内存活密切相关^[19]。

参 考 文 献

- [1] Naderer T, McConville MJ. Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites[J]. *Essays Biochem*, 2011, 51: 81-95.
- [2] Dupé A, Dumas C, Papadopoulou B. An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*[J]. *Mol Microbiol*, 2014, 91(3): 548-561.
- [3] Aulner N, Danckaert A, Rouault-Hardoin E, et al. High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania* amastigotes: application to anti-leishmanial drug discovery [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(4): e2154.
- [4] Dey R, Dagur PK, Selvapandiyam A, et al. Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2138-2149.
- [5] 敬保迁, 邓世山, 张仁刚, 等. 杜氏利什曼原虫前鞭毛体和无鞭毛体的比较蛋白质组学分析[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27(2): 102-106.
- [6] 张仁刚, 张洁, 敬保迁. 不同种(株)利什曼原虫毒力相关基因的表达差异 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2009, 27(4): 307-311.
- [7] 张仁刚, 张洁, 敬保迁. 不同种株利什曼原虫对Balb/c小鼠和金黄地鼠的致病性研究[J]. *四川动物*, 2009, 28(2): 202-205.
- [8] 卜玲毅, 胡孝素, 敬保迁, 等. 我国内脏利什曼病山丘疫区与平原疫区利什曼原虫SSUrDNA多态区序列分析 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2000, 18(6): 321-324.
- [9] Duncan R, Gannavaram S, Dey R, et al. Identification and characterization of genes involved in *Leishmania* pathogenesis: The potential for drug target selection[J]. *Mol Biol Int*, 2011, 2011: 428486.
- [10] Helm JR, Hertz-Fowler C, Aslett M, et al. Analysis of expressed sequence tags from the four main developmental stages of *Trypanosoma congolense*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 168(1): 34-42.
- [11] Pérez-Morga D, Pays E. A protein linked to mitochondrion development in *Trypanosoma brucei*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1999, 101(1-2): 161-172.
- [12] Merrick CJ, Duraisingh MT. Heterochromatin-mediated control of virulence gene expression[J]. *Mol Microbiol*, 2006, 62(3): 612-620.
- [13] Hertz-Fowler C, Figueiredo LM, Quail MA, et al. Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei* [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3527.
- [14] Li BB. Telomere components as potential therapeutic targets for

treating microbial pathogen infections[J]. *Front Oncol*, 2012, 2: 156.

- [15] Lim H, Cheong HK, Rho JR, *et al.* Expression, purification and characterization of human vacuolar-type H (+)-ATPase subunit d1 and d2 in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2014, 98: 25-31.
- [16] Sasaki Y, Nogami E, Maeda M, *et al.* A unique F-type H⁺-ATPase from *Streptococcus mutans*: an active H⁺ pump at acidic pH[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2): 677-682.
- [17] Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, *et al.* Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial

metabolism[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1): e1003888.

- [18] Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, *et al.* Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3, 3'-diindolylmethane through inhibition of FOF1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani* [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(5): 1292-1307.
- [19] Dey R, Meneses C, Salotra P, *et al.* Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence[J]. *Mol Microbiol*, 2010, 77(2): 399-414.

(收稿日期: 2014-05-14 编辑: 杨频)

文章编号: 1000-7423(2014)-05-0333-01

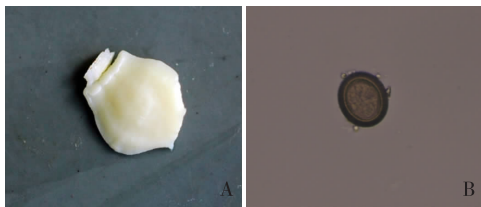
【病例报告】

幼儿感染犬复孔绦虫 1 例

李浩, 张永年, 陈韶红*, 常正山

中图分类号: R532.2 文献标识码: D

患儿, 男, 18 个月, 安徽省阜阳市太和县李兴镇人。2011 年 6 月 2 日在患儿粪便中发现 3~4 条黄白色的活动虫体, 长约 0.5 cm。患儿父亲诉其常有腹部不适、腹泻和肛门口瘙痒症状, 且与家中的犬和猫接触密切。虫体送当地县医院鉴定, 诊断为蛲虫感染。给予安乐士(含甲苯咪唑)口服, 100 mg/dx 3 d。此后, 其父仍在患儿粪便中发现类似虫体。9 月 20 日, 其父将虫体标本送中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所门诊检测中心鉴定。经镜检鉴定, 虫体为犬复孔绦虫 (*Dipylidium caninum*) 孕节。孕节长约 5 mm, 宽约 2 mm, 两端稍窄, 两侧缘中部稍突出处各有一生殖孔, 节片中充满椭圆形储卵囊, 每个卵囊内含有 1~30 个虫卵。虫卵呈圆球形, 直径 25~40 μm, 内含六钩蚴, 卵壳 2 层, 透明、较薄 (图 1)。给予吡喹酮, 20 mg/kg, 顿服。约 5 h 后, 患儿排出长约 40 cm 的虫体 2 条。2 个月后随访, 未再发现有虫体排出。



A: 孕节 (×4); B: 虫卵 (×40)。

图 1 犬复孔绦虫

讨论

人体感染犬复孔绦虫较为罕见^[1]。犬复孔绦虫主要寄生于犬和猫等终宿主体内, 当犬和猫的体表有蚤寄生时, 即可完成该虫的生活史。人因与犬、猫亲密接触, 误食受感染的蚤而被感染, 婴幼儿居多, 成人偶也可感染^[2-5]。该患儿家中饲养有犬和猫, 卫生条件较差, 患儿与犬、猫接触密切, 感染机会较大。本例患儿在当地医院被误诊为蛲虫感染, 说明极需加强对基层医务人员的培训^[6]。随着人民生活水平的提高, 农村、城市饲养犬、猫家庭日益增多, 因此, 应加强卫生宣教, 尤其是婴幼儿应避免与犬、猫等动物的密切接触, 还需定期对犬、猫等宠物进行驱虫。

参 考 文 献

- [1] 许隆祺, 蒋则孝, 姚民一, 等. 我国人体内寄生虫的虫种概况 (续)[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1998, 16(5): 388-393.
- [2] 刘影, 沈一平, 徐子喜, 等. 婴儿感染犬复孔绦虫 1 例 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(5): 117.
- [3] 李林, 张诗梅, 沈洁, 等. 婴儿感染犬复孔绦虫 1 例 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2010, 28(5): 392.
- [4] 詹汉庭. 幼儿感染犬复孔绦虫 1 例 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1987, 5(1): 24.
- [5] 宫玉香. 成人感染犬复孔绦虫 1 例 [J]. *山东寄生虫病防治研究*, 1986, 3(3): 36.
- [6] 刘影, 沈一平. 婴儿感染犬复孔绦虫的鉴定和治疗 [J]. *热带病与寄生虫学*, 2000, 29(2): 93-95.

(收稿日期: 2014-04-16 编辑: 瞿麟平)

基金项目: 上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划 (2011-2013 年)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: chensh637@163.com