

阴道毛滴虫症状株和带虫株黏附蛋白 33 基因的克隆和序列比较

杨树国¹, 王雅静^{1*}, 帖超男¹, 谢辉¹, 毕世樑², 刘佩娜¹, 廖琳¹

(1. 四川大学华西基础与法医学院寄生虫学教研室, 成都 610044; 2. 四川大学华西第二医院妇产科)

摘要: 目的 分析和比较阴道毛滴虫症状株和带虫株黏附蛋白 33 基因序列。方法 提取阴道毛滴虫各分离株基因组 DNA, PCR 扩增目的基因, 构建重组质粒, 克隆, 鉴定和序列比较。结果 黏附蛋白 33 基因长度约为 930 bp, 成功构建 pMD-18T-ap33 重组质粒。同 GenBank 上的黏附蛋白 33 基因序列比较, 症状株黏附蛋白 33 基因序列与已知序列有 2 个碱基不同, 而带虫株黏附蛋白 33 基因序列与已知序列有 1 个碱基存在差别。结论 阴道毛滴虫症状株和带虫株黏附蛋白 33 基因序列存在差异

关键词: 阴道毛滴虫; 症状株; 带虫株; 黏附蛋白 33; 基因克隆; 序列比较

中图分类号: Q78; Q959.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083 (2006) 03-0485-04

Cloning and Sequence Compare of Symptomatic and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Adhesion Protein 33 Gene

YANG Shu-guo¹, WANG Ya-jing^{1*}, TIE Chao-nan¹, XIE Hui¹, BI Shi-liang², LIU Pei-na¹, LIAO Lin¹

(1. Department of Parasitology, School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610044;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University)

Abstract: Objective To analyse and compare the sequence of adhesion protein gene on the symptomatic and asymptomatic isolates of *Trichomonas vaginalis*. **Methods** Total DNA was extracted from the two isolates. PCR technique was performed to amplify ap33 gene. Recombinant plasmid was constructed. Cloning and comparing the sequences was performed. **Results** The size of the two isolates, ap33 gene was 930bp. Recombinant plasmid pMD-18T-ap33 was successfully constructed. Compared to the ap33 gene sequence published on GenBank, the sequence of adhesion protein gene on the symptomatic isolate had two base pairs of difference, but the sequence of adhesion protein gene on the asymptomatic isolate had just one. **Conclusion** The ap33 gene sequence comparing showed a difference between the symptomatic and asymptomatic isolates.

Key words: *Trichomonas vaginalis*; symptomatic isolate; asymptomatic isolate; adhesion protein 33; gene cloning; sequence comparing

阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*, *Tv*) 是一种寄生于人体泌尿生殖道的一种常见病原体, 人体感染阴道毛滴虫后临床上可表现为滴虫性阴道炎、无症状带虫者等。关于阴道毛滴虫的致病机制目前还不清楚, 黏附蛋白 33 (Adhesion Protein 33, AP33) 是滴虫胞膜上一种非常重要的毒力因子, 以受体-配体方式介导虫体对宿主泌尿生殖道上皮细胞的黏附。Valadkhan Z 等^[1]对临床上有症状和无症状滴虫感染者进行滴虫的分离和体外培养, 分别与牛红细胞共同孵育, 对比后发现, 有症状病人滴虫分离株破坏红细胞后逸出血红蛋白的量

明显高于无症状滴虫感染者分离株。本文采用 PCR 扩增症状株和带虫株黏附蛋白 33 基因 (adhesion protein 33 gene, ap33 gene), 并进行克隆和序列比较, 从基因水平上对阴道毛滴虫的致病机制进行有益的探讨。

1 材料和方法

1.1 虫株、质粒与菌株

根据就诊者自诉症状及阴道分泌物的外观情况, 阴道毛滴虫有症状分离株 (阴道毛滴虫四川分离株-2) 和带虫分离株 (阴道毛滴虫四川分离株

-3) 来自四川大学华西第二医院妇产科门诊。无酶切位点线性 T 载体 (pMD-18T simple vector) 购自大连宝生物工程公司。大肠杆菌 JM109 为本室保种。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 BamH I、Xba I、耐热 Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小剂量提取试剂盒是北京天为时代公司产品, 蛋白酶 K 来自上海生工生物工程公司。

1.3 阴道毛滴虫的体外培养及基因组 DNA 的提取

将滴虫性阴道炎患者、无症状带虫者阴道后穹窿分泌物 5 ml 接种于含 12% 灭活兔血清及 2 万单位青霉素 G 的肝浸汤培养基中, 37℃ 培养 24 小时, 镜检、转种培养至对数生长期收获虫体, 调整虫体浓度至 1×10^6 /ml, 取 10 ml 虫液离心收集虫体, 有机法提取虫株基因组 DNA^[2]。

1.4 引物设计与合成

根据 GenBank 上公布的 ap33 基因 (ap33-1、ap33-2、ap33-3) 序列设计引物: ap33-1 (登录号为 U87096) P1 5-ATA GGATCCATGCTCGCAGG-CGACTTCT-3 P2 5-ATA TCTAGA TTAGATCTT-GCCATTCTC-3, ap33-2 (登录号为 U87097) P1 5-ATA GGATCC ATGCTCTCTTCATCATTTCGAG-3 P2 5-ATA TCTAGA GCGTTAGATCTTTC-CTAATCTC-3, ap33-3 (登录号为 U87098) P1 5-ATA GGATCC ATGCTCTCTCTTCCTTCGA-3 P2 5-ATA TCTAGA TTAGATCTTGCCATTCTC-3。3 对引物上下游分别添加 BamH I 和 Xba I 酶切位点, 引物合成由上海博亚公司完成。

1.5 目的基因的扩增与克隆

采用 20 μ l 反应体系, 以提取的两株阴道毛滴虫基因组 DNA 为模板, 用 3 对引物进行预扩增, 设灭菌双蒸水阴性对照, PCR 电泳鉴定, 确定两株虫株 ap33 基因类型。再行 50ul 体系对目的基因进行扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 之后进入循环: 94℃ 变性 35 s, 58℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 55 s 共 35 个循环。最后一个循环为 72℃ 延伸 5 min。电泳后将阳性条带切胶, 纯化回收目的基因。纯化产物与 pMD-18T 载体在 16℃ 进行连接反应 6 小时。连接产物全量转化于预先制备好的大肠埃希菌 JM109 感受态细胞中, 用表面涂有异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (ITPG) 和 5-溴-4-氯

-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 的含氨苄青霉素的 LB 培养基上 37℃ 倒置培养过夜。

1.6 阳性克隆体的筛选与鉴定

挑取白色菌落接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 以菌液为模板, PCR 法对克隆体进行初筛。并将阳性克隆体进行酶切鉴定。

1.7 ap33 基因序列测定和比较

取 PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物工程公司测序, 两株的测定结果分别与 GenBank 上的基因序列比较, 同时比较症状株和带虫株的基因差异性。

2 结果

2.1 ap33 基因扩增

用设计的 3 对引物对两株滴虫的基因组 DNA 进行预扩增, 结果显示两株滴虫 ap33 基因的类型均为 ap33-1, 其长度约 930 bp, 与预期长度一致, 空白对照组则为阴性 (图 1)

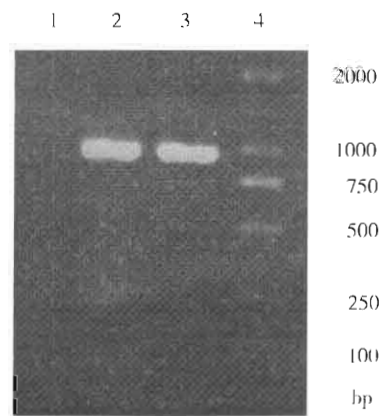


图 1 症状株和带虫株 ap33 基因扩增产物

Fig. 1 Amplified product ap33 gene of symptomatic and asymptomatic *Tv* isolate

1. 空白对照 (blank control), 2. 阴道毛滴虫四川分离株-2 ap33 基因扩增产物 (Amplified product ap33 gene of *Tv* isolate-2 from Sichuan Province), 3. 阴道毛滴虫四川分离株-3 ap33 基因扩增产物 (Amplified product ap33 gene of *Tv* isolate-3 from Sichuan Province), 4. DNA 标志物 DL2000 (DL2000 marke)

2.2 pMD-18T-ap33 重组质粒鉴定

2.2.1 PCR 鉴定 PCR 法对重组质粒 pMD-18T-ap33 进行鉴定, 扩增出约 930 bp 左右的条带 (图 2-5, 图 3-2)。

2.2.2 酶切鉴定 用 BamH I 单酶切, 见长度约 3630 bp 左右的片段 (图 2-3, 图 3-4), 比空质粒长约 930 bp。用 BamH I 和 Xba I 双酶切, 见与空质粒等长的 2700 bp 和约 930 bp 的两条带 (图 2-4, 图 3-5)。

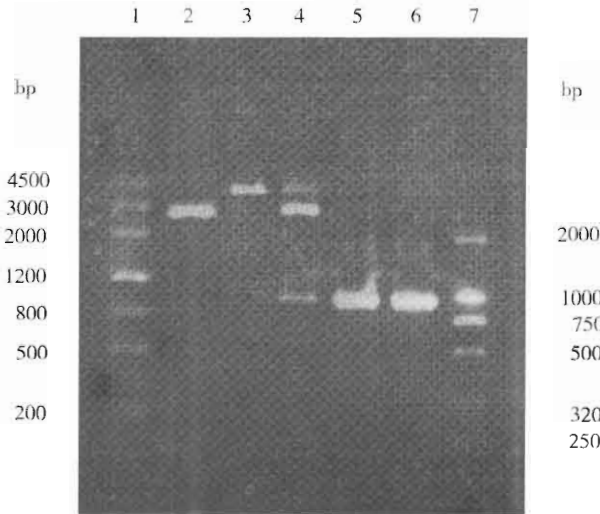


图 2 阴道毛滴虫四川分离株-2 重组质粒 pMD-18T-ap33 的双酶切及 PCR 鉴定

Fig. 2 Restrictin analysis and PCR identification of the recombinant plasmid pMD-18T-ap33 of Tv isolate-2 from Sichuan Province

1. DNA marker III 标志物 (DNA marker III), 2. 无酶切位点线性 T 载体 (pMD-18T simple vector), 3. 重组质粒 pMD-18T-ap33 用 BamHI 单酶切 (pMD-18T-ap33 digested by BamHI), 4. 重组质粒 pMD-18T-ap33 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 (pMD-18T-ap33 digested by BamHI and XbaI), 5. 重组质粒 pMD-18T-ap33 的 PCR 鉴定 (PCR amplified products of pMD-18T-ap33), 6. AP33 基因的 PCR 产物 (PCR products of pMD-18T-ap33), 7. DL2000 标志物 (DL2000 marker)

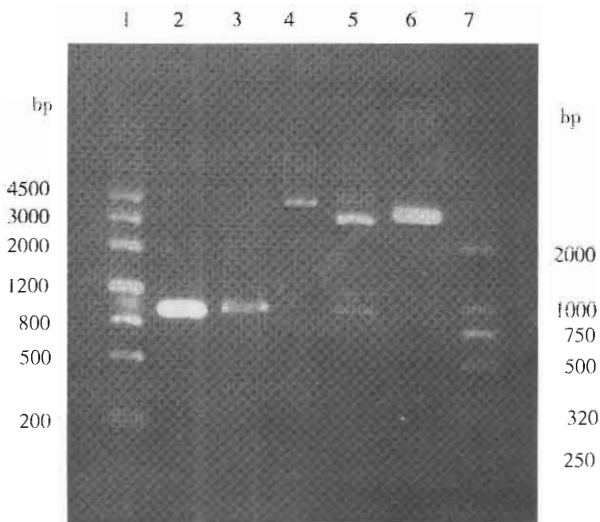


图 3 阴道毛滴虫四川分离株-3 重组质粒 pMD-18T-ap33 的双酶切及 PCR 鉴定

Fig. 3 Restrictin analysis and PCR identification of the recombinant plasmid pMD-18T-ap33 of Tv isolate-3 from Sichuan Province

1. DNA marker III 标志物 (DNA marker III), 2. 重组质粒 pMD-18T-ap33 的 PCR 鉴定 (pMD-18T simple vector), 3. ap33 基因的 PCR 产物 (pMD-18T-ap33 digested by BamHI), 4. 重组质粒 pMD-18T-ap33 用 BamHI 单酶切 (pMD-18T-ap33 digested by BamHI and XbaI), 5. 重组质粒 pMD-18T-ap33 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 (PCR amplified products of pMD-18T-ap33), 6. 无酶切位点线性 T 载体 (PCR products of pMD-18T-ap33), 7. DL2000 标志物 (DL2000 marker)

2.2.3 ap33 基因序列 两株 Tv 的 ap33 基因长度为 930 bp (含起始密码子 atg 和终止密码子 taa), 编码 309 个氨基酸。应用 BLAST 软件与 GenBank 上的 ap33-1 基因序列进行比较分析, 有症状株的 185 位 T→C, 759 位 A→T, 无症状株的 591 位 A→T。

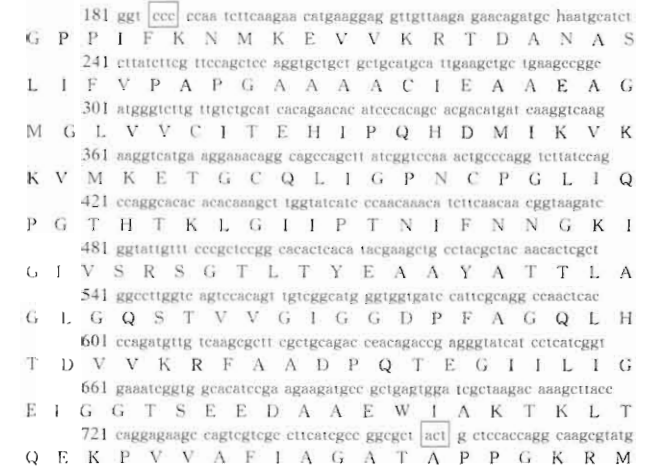


图 4 阴道毛滴虫四川分离株-2 部分 ap33 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 Part nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ap33 gene of symptomatic Tv isolate-2 from Sichuan Province of China



图 5 阴道毛滴虫四川分离株-3 部分 ap33 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig. 5 Part nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ap33 gene of asymptomatic Tv isolate-3 from Sichuan Province of China

3 讨论

从我国四川省分离的阴道毛滴虫症状株和带虫株基因组中均扩增出 930 bp 的基因片段, 两者的

基因序列与 GenBank 中基因序列比较, 同源性均为 99%, 但症状株和带虫株的 ap33 基因序列中有 3 个碱基不同, 由此带来其编码的氨基酸存在差异。两株滴虫细胞膜表面的蛋白 ap33 的构象和功能是否存在差异, 国内外尚未见类似报道。另外, 本文得出的 ap33 基因长度为 930 bp, 与袁丽杰等的研究一致^[3], 而与黄慧聪等得出的 927 bp 存在 3 个碱基的差异^[4], 但不会导致读码框移。

有关阴道毛滴虫的致病机制, 目前的共识是: 虫体对宿主泌尿生殖道上皮细胞的黏附是滴虫致病的第一步。滴虫表面有 4 种黏附蛋白参与了这一过程, 分别是: AP23, AP33, AP55, AP58。国外对 AP33 的报道较多, Engbring JA 等^[5,6]对 AP33 蛋白的功能进行了分析, 发现 AP33 蛋白的 N-末端约 72 个氨基酸的区域和 C-末端 24 个氨基酸的区域可以和宿主细胞相互反应, 介导了滴虫的黏附, 用抗滴虫的 mAb 主要与 AP33 蛋白 C-末端约 28 个氨基酸区域有免疫反应性, 同时报道, AP33 蛋白的等电点约为 10, 不同于其他 3 种黏附蛋白。这些研究结果提示: 阴道毛滴虫 AP33 蛋白的 C-末端对其黏附作用及刺激宿主产生抗体是必不可少的。因此, 分析带虫株和症状株的 ap33 序列有助于阐明阴道毛滴虫 AP33 蛋白的作用机制。另外,

我们在收集虫株的过程中发现: 很多患者通常不是以阴道炎来就诊的, 带虫感染率目前还未见报道, 血清学检查可作为一种辅助方法。带虫株和症状株的 ap33 基因序列 3'-末端无差异, 症状株滴虫 AP33 蛋白作为滴虫的毒力因子, 可作为种特异性抗原制备抗体, 用于检测带虫株有一定的意义。

3 参考文献

- [1] Valadkhan Z, Sharma S, Harjai K, et al. *In vitro* comparative kinetics of adhesive and haemolytic potential of *T. vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic females[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2003, 46 (4): 693-699
- [2] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 85-86
- [3] 袁丽杰, 高兴政. 阴道毛滴虫 7 个分离株表面黏附蛋白 33 基因序列比较[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2004, 22 (6): 53-56.
- [4] 黄慧聪, 梁韶辉, 潘长旺, 等. 阴道毛滴虫 ap33 基因克隆和序列分析[J]. *温州医学院学报*, 2004, 34 (1): 37-39.
- [5] Engbring JA, Alderet JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains[J]. *Microbiology*, 1998, 144 (11): 3011-3018.
- [6] Engbring JA, Alderet JF. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence[J]. *Mol Microbiol*, 1998, 28: 305-313

欢迎订阅《种植与养殖》(半月刊)

邮发代号: 18-278 每册定价 4.50 元 全年价 108 元 半年价 54 元

《种植与养殖》由中国人民大学主办。1983 年创刊, 是目前中国惟一汇集国内公开出版发行的所有种植与养殖类报刊信息的文摘期刊。通俗易懂, 科学实用, 只要您一册在手, 便可尽览千家报刊之精华, 得种养致富路百条。

《种植与养殖》主要栏目: 政策信息 (介绍国家最新发布行业政策信息、重要新闻及减轻农民负担的有关政策); 种植业包括粮食作物 (新品介绍、栽培管理技术)、经济作物 (药材、棉、油作物的品种介绍及栽培管理技术)、园艺作物 (详细介绍各种蔬菜、果树的品种推广、栽培技术、病虫害防治、市场行情等); 养殖业包括家畜养殖 (猪、牛、羊、兔)、家禽养殖 (鸡、鸭、鹅)、水产养殖 (各种水产品养殖技术)、特种养殖 (有品种介绍、养殖技术、疾病防治、市场行情); 龙头示范企业 (大力宣传种、养企业中的龙头企业); 供求信息 and 市场商情 (发布广告, 提供信息)。

《种植与养殖》编辑部电话: 010-64033975

咨询部为读者答疑解惑, 解决售后服务问题, 欢迎拨打咨询热线: 010-69268351

全国各地邮政局 (所) 或本刊发行部均可订阅。

通讯地址: 北京地安门邮局 22 号信箱《种植与养殖》发行部 邮编: 100009 收件人: 李健伟

网 址: www.zhongzhiyuyangzhi.com E-mail: zzyzbjb@126.com