

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0054-58

锥虫 Ls-rRNA 序列分析与锥虫 rDNA 探针群^{*}

屈良鹄, 伦照荣, 周 惠, 余小强

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 用大分子 RNA 快速测序法测定刚果锥虫 (*Trypanosoma congolense*) Ls-rRNA 5' 端 694 个核苷酸序列. 比较分析揭示伊氏锥虫、布氏锥虫和刚果锥虫之间以及它们与其它鞭毛虫和哺乳动物宿主的分子差异; 表明 Ls-rRNA 高变区可以作为一个灵敏的分子指标研究锥虫属内的系统进化关系; 并为研制属、种不同专一性的锥虫 rDNA 探针奠定了基础. 人工合成锥虫亚属 rDNA 探针 D1te 与 PCR 方法联用, 可以检测相当于单个伊氏锥虫的微量 DNA.

关键词: Ls-rRNA, 锥虫 (*Trypanosoma*), rDNA 探针

分类号: Q 751 **文献标识码:** A

锥虫 (*Trypanosoma*) 是一类寄生于脊椎动物血液中的单细胞鞭毛虫, 有的种类能使人畜产生严重的锥虫病, 被国际卫生组织列为重要的传染病之一. 对锥虫病原体进行比较分子生物学研究, 并建立起准确又高灵敏的分子检测技术一直是热带预防医学十分重要的课题.

核糖体 RNA 在所有的生物细胞中都具有很高的丰度, 它的基因 (rDNA) 一般都是多拷贝的, 所以是分子检测的理想目标. 然而, 一般都认为 rDNA 的结构十分保守, 所以国际上首先发展的用于检验锥虫的分子探针, 主要是以锥虫动基体 DNA (即 kDNA) 为目标. 但是, 通过对大量不同的生物 rDNA 核苷酸序列的精细分析和比较, 我们发现 rDNA 具有所谓镶嵌结构 (mosaic structure), 即 rDNA 中包含不同程度的保守区和一些高度变异区. 在一些高变区中, 可以发现一些生物物种特异性核苷酸序列. 这引起人们对 rDNA 探针极大的兴趣^[1]. 过去, 我们曾研究了布氏锥虫 (*T. brucei*) 和广泛流行于我国南方的伊氏锥虫 (*T. evansi*) 细胞质 Ls-rRNA 部分序列, 并提出了 rRNA 及其基因中高变区用于研制 DNA 探针的可行性^[2]. 为了进一步研究这 2 种锥虫与其它锥虫的亲缘关系和基因水平上的差异, 我们又选择测定了一种刚果锥虫 (*T. congolense*) Ls-rRNA 5' 端 690 多个核苷酸序列. 通过对这 3 种锥虫的 Ls-rRNA 序列的比较分析, 揭示出它们的分子特征, 为研制不同专一性的锥虫 rDNA 探针奠定了基础.

^{*} 基金项目: 国家杰出青年基金 (39525007); 广东省自然科学基金 (960053)

收稿日期: 1998-04-01 第一作者简介: 屈良鹄, 男, 45 岁, 教授

1 材料与方法

1.1 锥虫的来源和分离

刚果锥虫 (*Trypanosoma congolense*) 由英国 Glasgow 大学 Vickerman 教授提供. 锥虫感染 NIH 小鼠, 用 DEAE 纤维素法分离提纯锥虫.

1.2 细胞总 RNA 的提取及 Ls-rRNA 序列测定

以异硫氰酸胍法提取锥虫细胞总 RNA, 并直接用于 RNA 序列分析. 快速 RNA 序列分析按文献 [3] 进行, 即以 AMV 逆转录酶延伸与 Ls-rRNA 专一性杂交的引物, 在双脱氧核糖核苷酸存在下进行测序反应, 电泳, 放射性自显影. 4 个测序 D1a, D1b, D1c 和 D2 分别对应于 Ls-rRNA 的保守区位置 84~106, 278~302, 382~404, 1 126~1 149 (按小白鼠 28S rRNA 序列编号).

1.3 寡核苷酸引物和 PCR 扩增

锥虫亚属专一性 rDNA 探针 D1te 的序列为: 5' TACGCGCCTCCTCATGTTCGG 3' (见图 1). 用 T4 聚核苷酸激酶和 γ -³²P ATP 标记 D1te 的 5' 末端. 以 D1te 和测序引物 D1c 组成 Ls-rDNA PCR 扩增引物对. PCR 反应体积为 25 μ L, 操作按文献 [4]. PCR 结果以 ρ 为 6% 聚丙烯酰胺胶检验, 放射性自显影 2 h.

序列的比较分析采用 PCgene 6.0 软件包进行.

2 结果与讨论

2.1 刚果锥虫 Ls-rRNA 5' 端核苷酸序列测定及比较分析

除 5' 末端 2 个核苷酸之外, 刚果锥虫 Ls-rRNA 5' 端 694 个核苷酸序列被准确测定 (见图 1), 该序列包含 Ls-rRNA 5' 端 C1 和 C2 保守区以及 D1 和 D2 高变区. 由于我们采用直接 RNA 序列测定方法, 所测定的序列可以代表真正转录的 rRNA 基因序列. 虽然 rRNA 可能由多个基因转录而来, 但是, 在 RNA 序列阅读中并没有发现明显的异质性, 这表明锥虫 rDNAs 的均一性. 我们将该序列与伊氏锥虫、布氏锥虫、法氏短膜虫 (*Critidia fasciculata*) 以及 1 种哺乳动物老鼠的对应序列进行了比较分析. 从图 1 中可以看到, 4 种原生动物的 Ls-rRNA 的保守区中有较高的序列相似性, 表明它们在遗传上具有很大的同源性. 3 种锥虫显然具有更加密切的亲缘关系. 对 Ls-rRNA 5' 端 500 个核苷酸进行的分析计算表明: 刚果锥虫与伊氏锥虫和布氏锥虫的核苷酸差异为 11.2%, 它们与法氏短膜虫的差别分别为 15.6% 和 16.8%. 而 3 种锥虫与它们的哺乳动物宿主老鼠的差异已超过 40%. 上述差异大部分发生在 D1 高变区内. D2 高变区是 Ls-rRNA 中进化速度最快的区域. 从图 1 中可以看到, 各种锥虫都有自己特定的核苷酸序列; 伊氏锥虫和布氏锥虫仅有 2 个核苷酸的差异, 但是刚果锥虫与伊氏锥虫和布氏锥虫之间的差异却已达到饱和的程度. 此外, 在高变区还发生一系列的核苷酸插入或缺失, 造成了长度上的差异. 表明它们与保守区在进化机制上的差异. 值得指出, 紧靠 D2 高变区的下游, 与测序引物 D2 结合的 Ls-rRNA 核苷酸序列却十分保守, 从人到法氏短膜虫都完全一致 (图 1). 上述比较进一步证明我们过去提出 rDNA 高变区可以作为一个灵敏的分子指标研究锥虫属内的系统进化关系的设想^[2], 同时也为研制 3 种锥虫核苷酸探针提供了可以选择的序列依据.

2.2 锥虫 rDNA 探针群

rDNA 结构既具有保守性，又具有高变性。保守性能够反映生物物种的亲缘关系，为系统发育重建提供线索；高变性则能揭示出生物物种的特征核苷酸序列，是属种鉴定的分子基础。根据 rDNA 中保守和变化程度不同的区域来建立对各种生物类群（如种或属）专一性的分子探针，即 rDNA 探针群的概念^[1, 9]。

从图 1 可见，D1a、D1c 和 D2 几个引物对应的序列是 Ls-rRNA 中高度保守的序列。根据我们的考查，几乎所有的真核生物都有这一段十分相似的序列。而在一般的保守区，如 5' 末端区中 3 种锥虫具有相似甚至完全相同的序列，但与其他鞭毛虫有差异。而在 D1 高变区中，刚果锥虫与伊氏锥虫和布氏锥虫之间已有许多差别。显然，在 D2 高变区中，很容易发现 3 种锥虫各自的特有序列。根据这些相似序列和差异，既可以设计出 3 种锥虫共同的 rDNA 探针，又可以设计出各自专一性的 rDNA 探针。这些探针不仅具有理论意义，而且具有重要实用价值。例如，采用这一类 rDNA 探针，可检测某一种锥虫，也可检测锥虫属或锥虫科的其它原生动动物。这对于一些未知样品的快速分析、混合感染检验等具有重要的意义。虽然，在所测定的 Ls-rRNA 序列中，伊氏锥虫和布氏锥虫仅有 2 个核苷酸的差异，但是仍然是可以鉴别的。建立的高选择性杂交技术，可以对基因中的单个核苷酸突变加以检验^[9]。此外，最近对伊氏和布氏锥虫 rDNA 另一高变区 ITS 区序列进行了比较分析，从中还发现了更加专一的伊氏锥虫和布氏锥虫核苷酸探针序列（待发表）。

2.3 锥虫亚属 (Trypano Zoon) 专一性 rDNA 探针

根据图 1 的比较，在 D1 高变区选择了一段核苷酸序列，合成了 1 个伊氏锥虫和布氏专一性的锥虫亚属 rDNA 探针 D1te，并对该探针的灵敏度和专一性进行初步的检验。以

--- --
--- --

图 2 锥虫亚属 rDNA 探针的专一性

Fig 2 The specificity of the rDNA probe
for *T. evansi* and *T. brucei*
每个反应中含 0.1 μg DNA

A 牛 DNA; B 刚果锥虫 DNA; C 伊氏锥虫 DNA

图 3 锥虫亚属 rDNA 探针的灵敏度

Fig 3 The sensitivity of the rDNA probe for
T. evansi and *T. brucei*
每个反应中含 0.5 μg 伊氏锥虫 DNA

A PCR 30 次循环; B PCR 45 次循环

D1te 与测序引物 D1c 组合进行 PCR 扩增, 在伊氏锥虫样品中获得预期的 159 个核苷酸长的 PCR 产物, 而在牛和刚果锥虫样品中没有产生任何非特异性 PCR 产物 (图 2). 这表明 D1te 可以严格区分伊氏锥虫与哺乳动物宿主以及刚果锥虫的 DNA. 同时, 由于该探针可与 PCR 方法联用, 检测可以达到极高的灵敏度 (可检出单个锥虫的微量 DNA, 图 3). 锥虫 rDNA 探针群的提出对于锥虫流行病学研究和锥虫病的诊断具有重要价值. 这一概念也适用于其它生物类群 (尤其是病原微生物), 因而具有普遍的意义.

参考文献:

- [1] QU L H. Structuration et evolution de L' ARN ribosomique 28S chez les eucaryotes; [学位论文]. Toulouse: These de Doctoral d' Etat Universite Paul-Sabatier. No. 1273, 1986
- [2] QU L H, YU X Q, LUN Z R. Nucleotide sequences of the 5' terminal region of L-rRNA from *Trypanosoma evansi* and *T. brucei* and comparative analysis of D2 domains. Chinese Science Bulletin, 1991, 1: 1096 ~ 1098
- [3] BACHELLERIE J P, QU L H. Direct rRNA sequencing for phylogenetic studies. Methods in Enzymology, 1993, 224: 349 ~ 357
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd eds New York: CSH Press, 1989
- [5] 屈良鹤, 余小强. 系统演化探针: 大分子 rRNA 的结构分析及在生物检测和系统学鉴定中的应用. 见: 中国第四届遗传学大会论文集, 郑州. 1991
- [6] QU L H, NICOLOSO M, BACHELLERIE J P. A sequence dimorphism in a conserved domain of human 28S rRNA. Uneven distribution of variant genes among individuals. Differential expression in Hela cell. Nucleic Acids Research, 1991, 19: 1015 ~ 1019

Trypanosome Ls-rRNA Analysis and Application for Trypanosome rDNA Probes

QU Lianghu^{*}, LUN Zhaorong, ZHOU Hui, YU Xiaoqian

Abstract: Rapid rRNA sequencing method was applied to obtain the sequence of the 5' terminus of the Ls-rRNA from *Trypanosoma congolense*. A total of 694 nucleotides of the Ls-rRNA were precisely determined. By Comparative analysis of these sequences, the molecular differences among three African trypanosomes including *T. evansi*, *T. brucei* and *T. congolense* have been investigated. The results suggest that the divergent domains of Ls-rRNA could be used as a good index for the phylogenetic analysis of the trypanosome. According to the sequence homology and the nucleotide differences among the trypanosomes, other protozoa and their mammal host, group or species-specific rDNA probes (or primer) can be designed to detect one or more species of the trypanosomid. An oligonucleotide D1te was synthesized and used to identify *T. evansi*. The test is a most sensitive and selective assay by using PCR method. It was possible to detect as little as 0.5 pg DNA of *T. evansi*, no cross-reaction with *T. congolense* and cattle DNA. Therefore it may have potential in diagnosis of trypanosomiasis and other medical applications.

Keywords: Ls-rRNA, trypanosome, rDNA probes

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China