技术方法

文章编号:1000-5404(2008)01-0088-02

约氏疟原虫红内期18S UrRNA和Pir基因扩增实验条件的研究

周桃莉,徐文岳,吕 杨,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 扩增红内期约氏疟原虫相关基因方法的建立和优化。方法 收集约氏疟原虫感染昆明株小鼠抗凝全血,不处理或分别用淋巴细胞分离液去除白细胞、分离后破碎红细胞,提取总RNA,分别用Olig(dT)$_{15}$和随机引物进行常规反转录,在不同的$MgCl_2$浓度条件下,PCR扩增约氏疟原虫18S UrRNA和Pir基因。结果 经过淋巴细胞分离液分离处理组提取的RNA的纯度相对较高,可达1.9以上,但是3种处理方式在$MgCl_2$浓度大于等于2 mmol/L条件下,可成功扩增出约氏疟原虫的Pir基因,但是只有随机引物进行反转录组才能成功扩增出18S UrRNA。结论 不处理疟原虫感染全血提取的RNA纯度较低,但是能在2 mmol/L $MgCl_2$条件下成功扩增疟原虫相关基因;18S UrRNA只能从随机引物进行反转录组中成功扩增。

疟疾是一种危害严重的寄生虫病,在全世界人群中具有很高的发病率和死亡率。寄生于红细胞中的疟原虫,即红内期,不但能导致贫血和脑型疟,引起患者死亡,而且也是逃避宿主免疫攻击的重要因素[1]。筛选与致病和免疫逃避相关的红内期疟原虫成分是研制抗疟原虫药物和红内期疫苗的前提,而成功扩增和克隆上述相关成分是其中必要的技术平台之一。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验虫株

本实验所用昆明株小鼠由本校实验动物中心提供。约氏疟原虫(Plasmodium yoelii)BY265由本教研室长期通过血传或蚊传后保存。

1.2 主要试剂

4% EDTA、小鼠淋巴细胞分离液、Tripure提取总RNA试剂盒、Ex *Taq*酶(TaKaRa)、MMLV(Promega)和Oligo(dT)$_{15}$(Promega)。18S UrRNA引物Py18s(401):5′-TATGCATATTTTATATGTAG-3′和Py18s(1316):5′-GTAACTAAGCCAAAATAAGA-3′以及约氏疟原虫可变基因Pir引物P3Fa:5′-ATATGGTTAAGTTATATGTTAAACC-3′和P3R:5′-CCAAATAACGAATACTTATAAGAAATTC-3′,均委托上海英骏公司合成。

1.3 方法

1.3.1 取样 用液氮贮存的约氏疟原虫虫株复苏后经腹腔感染昆明株小鼠,3 d后取尾静脉血涂薄血膜,常规吉氏染色查疟原虫,鉴定原虫密度和主要发育虫期。摘眼球取感染小鼠血,立即加至含4倍体积4% EDTA中获得抗凝全血。一份抗凝血(100 μl)不作任何处理,加入1 ml Tripure,提取总RNA,标记为未处理组。另取两份抗凝血用小鼠淋巴细胞分离液常规进行分离,取沉淀红细胞,其中一管加水直接溶破红细胞,直到由红色转变为灰白色为止;另一管不溶血。两管分别加入1 ml Tripure,标记为分离组和分离/裂解组。

1.3.2 约氏疟原虫总RNA的提取 按Tripure试剂说明提取上述3组总RNA,然后用紫外分光光度计测定总RNA的浓度和纯度。

1.3.3 RT-PCR 以上述3组总RNA为模板,分别用Olig(dT)$_{15}$和随机引物进行逆转录合成cDNA。总反应体积为20 μl,含5 μg总RNA、1 μl Olig(dT)$_{15}$或随机引物、1 μl MMLV、4 μl 5×buffer和2 μl 10 mmol/L dNTP。反应条件为42 ℃ 1 h。

1.3.4 PCR和条件的优化 以RT-PCR所得的cDNA为模板进行PCR扩增,PCR反应体系如下:cDNA模板1 μl,10×PCR buffer 2.5 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μl,10 mmol/L dNTP 0.5 μl,10 pmol/μl的上、下游引物各0.5 μl,Ex*Taq*酶1.25 U,用ddH_2O补充到25 μl;PCR反应条件为94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸60 s,共30个循环,最后72 ℃延伸5 min。

调整$MgCl_2$浓度分别至1.5、2.5、4 mmol/L后进行PCR扩增约氏疟原虫红内期相关基因,以优化PCR反应体系。

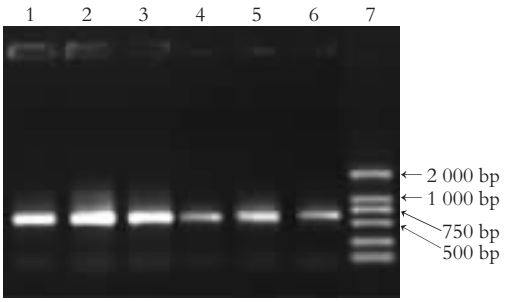
1.3.5 琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物 PCR结束后,吸取10 μl PCR产物和电泳缓冲液4 μl加至1%的琼脂糖凝胶进行电泳20 min,然后用凝胶图像分析系统扫描,并保存电泳结果。

2 结果

2.1 3种处理方法均能成功扩增约氏疟原虫可变基因Pir

为了探讨上述3种处理方法能否成功扩增约氏疟原虫红内期相关基因,我们选择与疟原虫致病和免疫逃避密切相关的约氏疟原虫可变基因Pir[2]作为靶基因进行扩增。虽然,未处理组提取的总RNA纯度只有1.63,但是仍能成功扩增出Pir,而且与分离和分离/裂解组在扩增效率上没有明显的差别(图1)。

作者简介:周桃莉,女,重庆市人,实验师,主要从事肺吸虫、疟疾防治方面的研究。电话:(023)68752243
通信作者:黄复生,电话:(023)68752244
收稿日期:2007-01-05;修回日期:2007-06-10

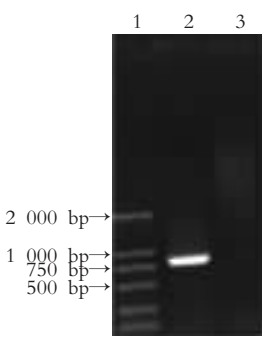


1：未处理组[用 Olig(dt)$_{15}$逆转录后 PCR 扩增结果]；2：分离组[用 Olig(dt)$_{15}$逆转录后 PCR 扩增结果]；3：分离/裂解组[用 Olig(dt)$_{15}$逆转录后 PCR 扩增结果]；4：未处理组(用随机引物逆转录后 PCR 扩增结果)；5：分离组(用随机引物逆转录后 PCR 扩增结果)；6：分离/裂解组(用随机引物逆转录后 PCR 扩增结果)；7：标准(DL2000)

图 1　3 种处理方式提取的总 RNA 逆转录后扩增 Pir 结果

2.2　用随机引物反转录合成的 cDNA 才能成功扩增 18S UrRNA 基因

除了可变基因等编码疟原虫蛋白外，核糖体小亚基蛋白 rRNA (18S UrRNA)在疟原虫 mRNA 的翻译过程中发挥着重要的作用，而且也是检测疟原虫混合感染的重要靶基因[3]。然而，18S UrRNA 的末端不含 polyA 结构，其扩增将不同于疟原虫 mRNA。鉴此，我们分别用 Olig(dT)$_{15}$和随机引物对提取的总 RNA 进行逆转录。结果显示，用 Olig(dT)$_{15}$逆转录合成 cDNA 确实不能有效扩增出 18S UrRNA，而随机引物逆转录合成 cDNA 却能成功扩增(图 2)。

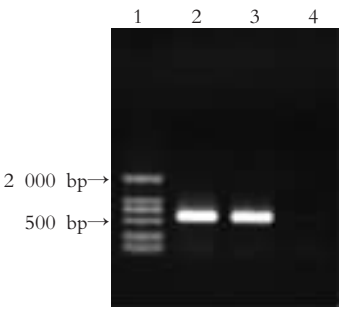


1：标准(DL2000)；2：用随机引物逆转录后 PCR 结果；3：用 Olig(dT)$_{15}$逆转录后 PCR 结果

图 2　分离组提取的总 RNA 逆转录后扩增 18S UrRNA 结果

2.3　不同 $MgCl_2$ 浓度对成功扩增红内期约氏疟原虫相关基因的影响

4% EDTA 可以防止血液的凝固，但是 EDTA 是 Mg^{2+} 的螯合剂，而 Mg^{2+} 又是 *Taq* 酶发挥其活性的重要二价离子，因此，$MgCl_2$ 浓度可能是影响 PCR 成功的重要因素。我们发现，虽然 1.5 mmol/L (1.5 μl 25 mmol/L $MgCl_2$)能够扩增出目的片断 18S UrRNA 和 Pir，但是条带非常弱(图 3)。当把 $MgCl_2$ 增加到 2.5 mmol/L 或 4 mmol/L 时，扩增条带明显增强，而且无任何非特异条带(图 3)。



1：标准(DL2000)；2：4.0 mmol/L 的 $MgCl_2$；3：2.5 mmol/L 的 $MgCl_2$；4：1.5 mmol/L 的 $MgCl_2$

图 3　不同 $MgCl_2$ 浓度对 PCR 扩增 Pir 的影响

3　讨论

红内期疟原虫寄生于红细胞中，然而全血还含有相当的白细胞、血小板和血浆，成分比较复杂。我们发现，直接提取未处理的全血总 RNA 的纯度比较低，可能与全血中的蛋白成分较多有关。然而，经淋巴细胞分离液分离去除白细胞和血浆后提取的总 RNA 的纯度就有明显的提高，而且不用对红细胞进行裂解，因为红细胞裂解后提取的总 RNA 纯度反而有所下降。有意思的是，虽然未处理组提取的总 RNA 纯度比较低，但是仍能成功扩增，其效率于与分离和分离/裂解组相当。

rRNA 与 mRNA 在结构存在明显的差别，rRNA 不含有 polyA，因此，Olig(dT)$_{15}$逆转录合成 cDNA 不适合于 18S UrRNA 的扩增。我们的结果证实了这一点，18S UrRNA 只能从随机引物逆转录合成 cDNA 中成功扩增。

虽然 4% EDTA 可以防止血液的凝固，但是 EDTA 是 Mg^{2+} 的螯合剂，会影响 *Taq* 酶发的活性。我们的结果证实了，1.5 mmol/L $MgCl_2$ 浓度不能有效扩增 18S UrRNA 和 Pir，增加 $MgCl_2$ 至 2.5 mmol/L 或 4 mmol/L 能明显地提高扩增效率，因此，Mg^{2+} 浓度是影响从小鼠全血中成功扩增疟原虫相关基因的重要因素。

关键词：18S UrRNA；Pir ；约氏疟原虫；PCR
中图法分类号：R382.31　　**文献标识码**：A

参考文献：

[1] Cunningham D A, Jarra W, Koernig S, *et al*. Host immunity modulates transcriptional changes in a multigene family (yir) of rodent malaria[J]. Mol Microbiol, 2005, 58(3): 636 – 647.

[2] Voss T S, Healer J, Marty A J, *et al*. A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in Plasmodium falciparum malaria[J]. Nature, 2006, 439(7079): 1004 – 1008.

[3] McCutchan T F, de-la-Cruz V F, Lal A A, *et al*. Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from Plasmodium falciparum[J]. Mol Biochem Parasitol, 1988, 28(1): 63 – 68.

(编辑　薛国文)