

网络出版时间: 2018-9-25 14:31 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180921.1451.009.html>

流行于我国的优势基因型弓形虫株毒力及其棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 蛋白序列差异分析

徐婷^{1,2}, 王聪², 罗庆礼², 沈继龙²

摘要 目的 分析流行于我国的优势基因型弓形虫株 (WH3 株和 WH6 株) 毒力差异以及棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 蛋白序列差异, 为研究其致病机制奠定基础。方法 使用弓形虫 WH3、WH6、RH 和 PRU 虫株分别感染 SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明鼠, 观察小鼠存活时间和存活率, 分析毒力强弱。同时 PCR 扩增 4 株弓形虫毒力相关效应分子棒状体蛋白 ROP5 和 ROP18 基因片段, 核苷酸测序后将其转换

为氨基酸序列, 在蛋白水平上比较其序列差异。结果 此 4 株弓形虫株中, WH3 和 RH 株对 BALB/c 小鼠和昆明鼠均有较强的毒性, 两种小鼠分别在感染后 5~7 d 和 9~12 d 均 100% 死亡; 而 WH6 和 PRU 株对 BALB/c 小鼠和昆明鼠的毒性均较弱, 两种小鼠在感染后 45 d 均 100% 存活, 且在脑内检出包囊。棒状体蛋白家族毒力相关分子 ROP5 和 ROP18 的氨基酸序列分析发现, Chinese 1 型虫株 WH3 和 Wh6 与 PRU 型虫株 (II 型虫株) 差异较小, 而与毒力较强的 RH 型虫株 (I 型虫株) 差异较大。结论 我国流行优势基因型弓形虫株的毒力相关分子 ROP5 和 ROP18, 与传统 I 型、II 型弓形虫株存在差异, 为我国弓形虫病的防治提供理论基础。

关键词 弓形虫; 毒力; ROP5 基因; ROP18 基因

中图分类号 R 382.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1695-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.009

2018-06-20 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (编号: 2010CB530001); 国家自然科学基金 (编号: 81471983); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2017A920)

作者单位: ¹ 安徽卫生健康职业学院护理系, 池州 247099;

² 安徽医科大学基础医学院病原生物学教研室、安徽病原生物学省级实验室、安徽省人畜共患病重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 徐婷, 女, 讲师, 硕士研究生;

沈继龙, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shen-jilong53@126.com;

罗庆礼, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: luqingli@ahmu.edu.cn

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种全球广泛传播的机会致病性原虫, 人类感染弓形虫主要通过经口食入未煮熟的含包囊 (cyst) 的动物肉类, 食

Interaction between deletion mutant CLIC1 ($\Delta 49-51$) and Sedlin

Hong Cuili, Jin Zhenhui, Zhu Liangliang, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the expression and localization of CLIC1 ($\Delta 49-51$), an intracellular chloride ion channel 1 (CLIC1) deletion mutant, and its effect on the interaction with Sedlin in mammalian cells. **Methods** The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-CLIC1 ($\Delta 49-51$)-FLAG was constructed based on the wild type CLIC1 expression plasmid pcDNA3.1-CLIC1-FLAG. Immunofluorescence and nuclear separation experiment were performed to detect the expression and colocalization of CLIC1 ($\Delta 49-51$) with Sedlin in COS7 cells; co-immunoprecipitation and GST pulldown experiments in HEK 293T cells were conducted to investigate the interaction of CLIC1 ($\Delta 49-51$) with Sedlin *in vivo* and *in vitro*, respectively. **Results** CLIC1 ($\Delta 49-51$) mainly localized in the cytoplasm of COS7 cells and much less in the nucleus. Compared with wild-type CLIC1, its intracellular localization changed significantly, and it did not colocalize with Sedlin. The result of Western blot showed that CLIC1 ($\Delta 49-51$) could be efficiently expressed in HEK 293T and COS7 cells. Co-immunoprecipitation and GST pulldown assays showed that it had no interaction with Sedlin *in vivo* and *in vitro*, respectively. **Conclusion** KRR motif at position 49-51 of CLIC1 plays an important role in the correct localization of CLIC1 protein to the cell membrane. Its deletion mutation affects the localization and expression of CLIC1 in cells and may further affect its interaction with Sedlin.

Key words CLIC1 deletion mutant; immunofluorescence; co-immunoprecipitation; GST pulldown

入被猫粪中的卵囊(oocyst)污染食物或饮水,以及母婴先天性垂直传播三个途径^[1]。近年来研究表明,世界各地分离的弓形虫株基因型具有丰富的遗传多态性和地域差异^[2],流行于我国的弓形虫株优势基因型为 Chinese 1 型(即 ToxoDB#9 型)^[3],且种群内存在有 2 个毒力不同的虫株: TgCtwh3(以下简称 Wh3)和 TgCtwh6(以下简称 Wh6)。该文通过对 Wh3 和 Wh6 虫株的毒力研究,比较 ROPs 家族毒力相关分子 ROP5 和 ROP18 的基因序列差异,为深入探讨我国优势基因型弓形虫株的毒力效应分子多态性与虫株致病性的关系具有重要理论和实际意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和参考虫株 5~6 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,4~6 周龄昆明鼠 60 只,均购自安徽省实验动物中心,室温下标准饲养。弓形虫虫株 Wh3 型、Wh6 型、RH 株(ToxoDB#10 型,传统的 I 型虫株)和 PRU 株(ToxoDB#1 型,传统的 II 型虫株)由安徽省人兽共患病重点实验室保种传代。

1.1.2 主要试剂和仪器 DNA 提取试剂盒及 PCR 预混液购自生工生物工程(上海)有限公司;琼脂糖为西班牙 GENE 公司产品;PCR 纯化试剂盒购自美国 Axygen 公司;基因扩增引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。温度梯度基因扩增仪、电泳仪和电泳槽均为美国 BIO-RAD 公司产品;凝胶成像系统为江苏省捷达科技发展有限公司产品。

1.1.3 引物 根据通用的弓形虫 ME49 虫株 GenBank 中 ROP5 基因(GenBank: XM 002371884.2)和 ROP18 基因(GenBank: XM 002367716.1)序列,设计 PCR 扩增引物,分别扩增 2 个基因的全长序列。引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 ROP5 和 ROP18 基因全长引物序列

扩增基因	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)
ROP5	F: ATGGCGACGAAGCTCGCTAG	1 650
	R: TCAAGCGACTGAGGGCTC	
ROP18	F: ATGTTTTCGGTACAGCGGCCACCTCTT	1 665
	R: TTATTCTGTGTGGAGATGTTCTCTGCTGTT	

1.2 方法

1.2.1 弓形虫株 Wh3 和 RH 株的速殖子的获取 从液氮中取出保种的弓形虫 Wh3 和 RH 株速殖子,

腹腔注射接种于 4~6 周昆明鼠下腹部,接种后密切观察小鼠进食水及精神状态,当小鼠出现发病症状后,麻醉断颈处死小鼠,抽取腹水并按照本实验室的常规方法^[4],PBS 洗涤 3 次后经梯度离心法纯化并收集速殖子,立即进行后续的毒力实验,并 -80 °C 保存备用。

1.2.2 弓形虫株 Wh6 和 PRU 株的速殖子的获取

实验室弓形虫 Wh6 和 PRU 虫株保种于慢性感染的昆明鼠,在脑组织中形成包囊。麻醉断颈处死保种小鼠,取鼠脑加无菌 PBS 匀浆,离心取匀浆沉淀收集包囊并计数,腹腔接种昆明鼠包囊 200 个/只,待小鼠急性感染发病时,麻醉处死小鼠,收集腹水,同样纯化并收集 Wh6 和 PRU 虫株的速殖子,获取的速殖子立即进行后续的毒力实验,并 -80 °C 保存备用。

1.2.3 虫株 RNA 提取与总 cDNA 制备 分别取上述方法收集的速殖子,PBS 重悬洗涤,加入 1 ml TR-Izol 冰上反复吹打裂解常规方法提取总 RNA,按 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒说明,制备 cDNA, -20 °C 保存备用。

1.2.4 虫株的毒力检测 将上述收集纯化后速殖子经 PBS 稀释至 2 ml 置显微镜下计数,按 1×10^3 个/只分别腹腔感染 SPF 级 BALB/c 小鼠和昆明鼠,每个虫株各感染 10 只。逐日观察各组小鼠的状态并计算死亡率和存活时间;若实验小鼠长期存活,则至感染后 45 d 麻醉颈椎脱臼处死各组存活小鼠,脑组织压片观察包囊是否形成。累积死亡率(%) = 死亡小鼠个数/感染小鼠个数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 毒力相关和成囊相关基因分析 以上述 4 个虫株制备的 cDNA 为模版,分别扩增 ROP5 和 ROP18 基因全长。PCR 反应体系:弓形虫 cDNA 模板 2.0 μ l, 2 \times PCR Taq 预混液 25.0 μ l,上游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ l,下游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ l,无核酶水补至总体积 50.0 μ l。ROP5 扩增条件:94 °C 预变性 5 min,接着 94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min;ROP18 退火温度为 60 °C,其余条件同 ROP5。PCR 结束后,1% 琼脂糖凝胶观察反应结果。扩增产物纯化后,送生工生物工程(上海)有限公司进行测序,将测序结果分别由核苷酸序列转换为氨基酸序列,使用 Clustal X 软件进行序列比对分析,分别比较 2 个毒力因子氨基酸序列在 4 个虫株中的差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。根据 BALB/c 小鼠和昆明鼠感染不同弓形虫株的存活时间、死亡率,采用 χ^2 检验比较小鼠感染各虫株反应有无差异;不同虫株两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 虫株毒力 分别取 4 个虫株 1×10^3 个速殖子经腹腔接种 BALB/c 小鼠后,第 5 天开始,感染 WH3 和 RH 株的 BALB/c 小鼠出现竖毛、腹水、抽搐等明显症状,至第 7 天完全死亡;昆明小鼠腹腔接种同样数量 WH3 和 RH 株弓形虫速殖子后,存活时间略长于 BALB/c 小鼠,但在 12 d 之内亦全部死亡。感染后小鼠生存曲线如图 1 所示,在感染同一品系小鼠后,两虫株之间的毒力差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.4303, 1.511, P > 0.05$)。而同一虫株感染两个品系小鼠时,昆明小鼠存活时间明显长于 BALB/c 小鼠 ($P < 0.01$),表现出同一虫株对不同品系的小鼠有着不同的毒力,见表 2。而分别感染 WH6 和 PRU 虫株的 BALB/c 小鼠和昆明小鼠均全部存活至 45 d,在这些长期存活的 BALB/c 小鼠和昆明小鼠脑内,均检出 WH6 和 PRU 虫株的包囊。

2.2 毒力相关和成囊相关基因扩增结果 通过 PCR 扩增 4 株弓形虫棒状体蛋白家族的毒力和成囊相关分子 ROP5 和 ROP18,扩增产物经琼脂糖凝胶

电泳,结果显示:4 株弓形虫 ROP5 基因分别扩增出略小于 2 000 bp 的目的片段,与预期的 1 650 bp 大小一致;ROP18 基因分别扩增出略小于 2 000 bp 的目的片段,与预期的 1 665 bp 大小一致。见图 2。

2.3 基因比对结果分析 上述 4 株弓形虫 ROP5 和 ROP18 基因扩增产物测序结果,分别转换为氨基酸序列后的序列比对分析。图 3 所示 4 株弓形虫 ROP5 和 ROP18 氨基酸序列进化树,ROP5 氨基酸序列上,WH3 株和 Wh6 株亲缘关系更近,而 ROP18 氨基酸序列上,WH3 株和 RH 株亲缘关系更近。序列比对结果发现,WH3 株的 ROP5 氨基酸序列与 RH 株和 PRU 株的一致性 (identity) 分别为 96.2% (528/549) 和 96.7% (531/549),ROP18 分别为 95.8% (531/554) 和 99.1% (549/554);WH6 株 ROP5 氨基酸序列与 RH 株和 PRU 株的一致性分别为 97.8% (542/554) 和 98.2% (544/554),ROP18 分别为 95.8% (531/554) 和 99.1% (549/554)。WH3 株和 WH6 株在 ROP5 和 ROP18 氨基酸序列上,均与 PRU 株更为接近,与 RH 株差异较多。

3 讨论

传统生物学的分类标准中弓形虫属下仅包含一个种 *Toxoplasma gondii*。目前世界各地从动物体和人体分离的弓形虫株逐渐增多,通过对这些虫株的生物学性状研究表明,各分离虫株的生活史完全相

表 2 BALB/c 小鼠和昆明小鼠分别感染 4 种弓形虫株后的存活时间比较

虫株	小鼠累积死亡率 (% 死亡个数/感染个数)	BALB/c 小鼠感染后 存活天数 (d)	昆明鼠感染后 存活天数 (d)	基因型	χ^2 值	P 值
WH3	100 (10/10)	5 ~ 7	10 ~ 12	Chinese 1 (ToxoDB #9)	18.38	<0.01
WH6	0 (0/10)	>45	>45	Chinese 1 (ToxoDB #9)	0.00	1.00
RH	100 (10/10)	5 ~ 7	9 ~ 11	ToxoDB#10	18.03	<0.01
PRU	0 (0/10)	>45	>45	ToxoDB#1	0.00	1.00

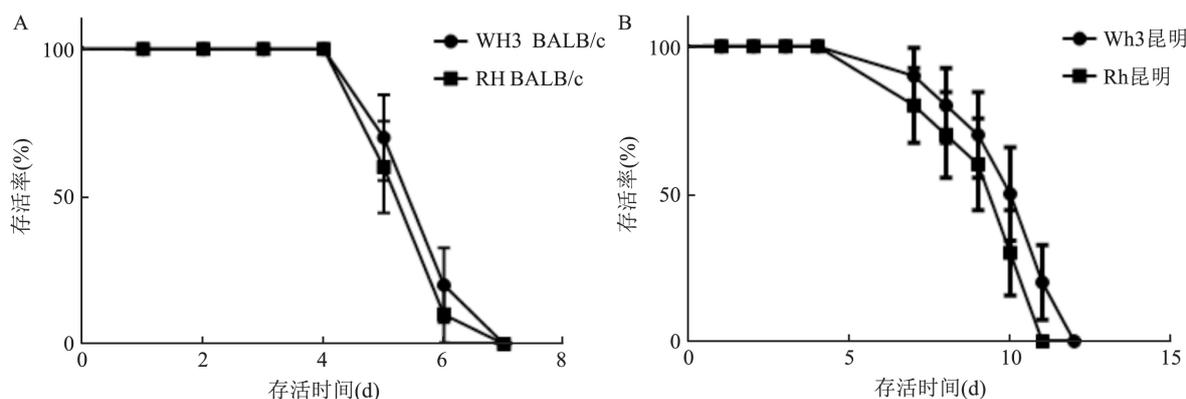


图 1 BALB/c 小鼠和昆明小鼠分别感染弓形虫 WH3 和 RH 株后的生存曲线

A: BALB/c 小鼠; B: 昆明小鼠

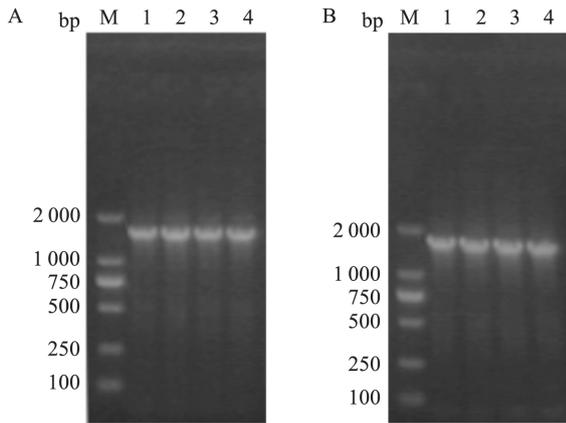


图2 琼脂糖凝胶电泳分析 ROP5 和 ROP18 基因 PCR 产物

A: PCR 扩增 ROP5 基因片段; B: PCR 扩增 ROP 18 基因片段; M: DNA Marker; 1: WH3 株; 2: WH6 株; 3: RH 株; 4: PRU 株

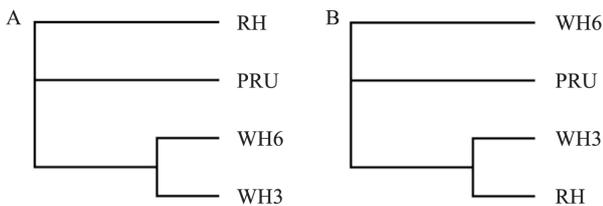


图3 4 株弓形虫 ROP5 和 ROP18 氨基酸序列进化树

A: ROP5 氨基酸序列; B: ROP18 氨基酸序列

同,虫体在各个生活史阶段(包括速殖子、包囊、卵囊等)的形态特征也完全相同。各弓形虫株唯一的区别是毒力上的差异,表现为弓形虫感染小鼠的致死率各不相同。是何种原因所致这种现象,一直是国内外学者近年来研究的热点。

欧美国家的学者按照虫株的毒力不同,将弓形虫简单划分 I 型、II 型和 III 型,各包含着多个虫株,且感染小鼠分别为“强毒”、“弱毒”和“无毒”。随着多位点 PCR-RFLP 技术的应用,选用 10 个分型的遗传标志,将这些虫株分成了更为详细的基因型,建立了弓形虫基因型数据库(ToxoDB)。传统的 I 型、II 型和 III 型分别为 ToxoDB#10 型、ToxoDB#1 型和 ToxoDB#2 型。随着弓形虫基因型研究的深入,发现世界各地弓形虫株具有丰富的遗传多态性^[2]。而国内其他学者以及本实验室的研究均显示,流行于中国的弓形虫株以 Chinese 1 型(ToxoDB#9)为其优势基因型,具有有限的遗传多态性^[5-6]。同时本实验室通过 RFLP 分型和微卫星分型均显示,Chinese 1 基因型虫株中存在 2 个分离株 WH3 和 WH6,其毒力和致病性有着明显的差异^[3-4,6]。这种差异也对传统的观点提出了挑战,是何种因素导致这种差异在同一种基因型弓形虫株中存在,一直是我们的重点

关注和深入研究的关键问题。

近年来一系列的研究^[7]表明,不同基因型弓形虫株入侵宿主细胞的过程以及对感染小鼠的毒力存在显著差异,弓形虫入侵宿主细胞过程中及定居在宿主细胞内,所分泌的包括 ROPs、GRAs、MICs、RONs 等多种效应分子蛋白,是这些差异产生的主要原因。ROPs 效应分子蛋白是由弓形虫棒状体(rhoptry)细胞器分泌,在虫体感染宿主细胞以及诱导宿主免疫应答,甚至感染结局等方面起到关键的作用。ROPs 具有多态性^[8-9],其中 ROP5、ROP16 和 ROP18 等弓形虫效应蛋白分子研究较多。本实验室利用 CRISPR-Cas9 技术敲除弓形虫 RH 株 ROP16 后发现,虫株毒力无明显变化,提示 ROP16 在弓形虫毒力方面非核心分子^[10]。

ROP5 和 ROP18 均为 ROP2 家族的成员^[11]。既往的研究可知,ROP5 作为 ROP18 必备的辅助因子,通过强化免疫相关 GTP 酶(immunity-related GTPases, IRGs)的非活化表型来阻止 IRGs 与 GTP 结合^[12-13]。ROP18 是虫株多态性丝/苏氨酸激酶,ROP18 遗传序列差异决定了其毒力的差异,I 型虫株 ROP18 可使所有品系的小鼠均致死,而 II 型和 III 型比较弱^[14],将 I 型虫株的 ROP18 转基因至 III 型虫株,则出现毒力增强,证实 ROP18 是弓形虫株毒力的主要决定因素之一^[15]。那流行我国的优势基因型 Chinese 1 型(ToxoDB#9)弓形虫的两个虫株为何具有不同的毒力和致病性,其 ROP5 和 ROP18 有何差异,是本次研究的重点内容。

本次的研究显示,WH3 虫株的 ROP5 基因型和 ROP18 基因型与毒力较弱的 II 型虫株差异较小,而与毒力较强的 I 型虫株差异较大,表明我国流行的优势基因型弓形虫株的毒力相关分子与传统基因型存在差异,也说明若仅仅以一种或少数几种毒力分子的遗传序列来判断弓形虫株的毒力具有明显欠缺之处。

参考文献

[1] Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection [J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(2): 109-21.

[2] Su C, Khan A, Zhou P, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(15): 5844-9.

[3] Wang L, Chen H, Liu D, et al. Genotypes and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* isolates from animals and humans in China [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53483.

- [4] Li M , Mo X W , Wang L , et al. Phylogeny and virulence divergence analyses of *Toxoplasma gondii* isolates from China [J]. *Parasit Vectors* , 2014 , 7: 133.
- [5] 沈继龙, 王 林. 弓形虫的基因型及其主要效应分子的致病机制 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2015 , 33(6) : 429 – 35.
- [6] Chen Z W , Gao J M , Huo X X , et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from cats in different geographic regions of China [J]. *Vet Parasitol* , 2011 , 183(1 – 2) : 166 – 70.
- [7] 夏 菁, 彭鸿娟. 刚地弓形虫毒力调节因子研究进展 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2015 , 33(4) : 297 – 300.
- [8] Mercier C , Cesbron-Delauw M F. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more [J]. *Trends Parasitol* , 2015 , 31(11) : 604.
- [9] Saeij J P , Boyle J P , Collier S , et al. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis [J]. *Science* , 2006 , 314(5806) : 1780 – 3.
- [10] 王 聪, 程维晟, 刘 芳, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的弓形虫 rop16 I / III 缺陷虫株的构建及毒力鉴定 [J]. *中国人兽共患病学报* 2017 , 33(1) : 22 – 6 , 31.
- [11] Reese M L , Boothroyd J C. A helical membrane-binding domain targets the *Toxoplasma* ROP2 family to the parasitophorous vacuole [J]. *Traffic* , 2009 , 10(10) : 1458 – 70.
- [12] Behnke M S , Fentress S J , Mashayekhi M , et al. The polymorphic pseudokinase ROP5 controls virulence in *Toxoplasma gondii* by regulating the active kinase ROP18 [J]. *PLoS Pathog* , 2012 , 8(11) : e1002992.
- [13] Fentress S J , Steinfeldt T , Howard J C , et al. The arginine-rich N-terminal domain of ROP18 is necessary for vacuole targeting and virulence of *Toxoplasma gondii* [J]. *Cell Microbiol* , 2012 , 14(12) : 1921 – 33.
- [14] 朱长东, 程维晟, 罗庆礼, 等. 徐州猫源弓形虫株基因型及其毒力研究 [J]. *安徽医科大学学报* , 2016 , 51(10) : 1421 – 5.
- [15] Taylor S , Barragan A , Su C , et al. A secreted serine-threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii* [J]. *Science* , 2006 , 314(5806) : 1776 – 80.

The virulence and putative amino acids difference of the main ROPs virulence factor proteins in the dominant genotype of *Toxoplasma gondii* in China

Xu Ting^{1,2} , Wang Cong² , Luo Qingli² , et al

(¹Dept of Nursing Anhui Health College , Chizhou 247099;

²Dept of Microbiology and Parasitology , Anhui Provincial Laboratory of Pathogen Biology and Anhui Key Laboratory of Zoonoses , School of Basic Medicine , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze the putative amino acids sequence difference of the virulence factor proteins of the dominant genotype of *Toxoplasma gondii* in China. **Methods** Forty SPF BALB/c mice and forty Kunming mice were infected with WH3 , WH6 , RH and PRU strains of *Toxoplasma gondii* respectively , which were preserved in our laboratory. The virulence of *Toxoplasma gondii* strains were analyzed using the measurements of survival time and survival rate. ROP5 and ROP18 , the virulence-related gene fragments , were amplified by PCR method. After DNA sequencing of the obtained DNA fragments , their nucleotide sequences were translated into putative amino acid sequences to compare the protein sequence differences of four *Toxoplasma gondii* strains. **Results** Among these four strains of *Toxoplasma gondii* , WH3 and RH strains exhibited strong virulence , leading to 100% animal death of BALB/c mice and Kunming mice within 5 ~ 7 days and 9 ~ 12 days after infection. However , the virulence of WH6 and PRU strains were weak , all animals of both BALB/c mice and Kunming mice survived 100% within 45 days after infection with the detected cysts in mice brains. The amino acid sequence analysis of ROP5 and ROP18 revealed that there were little difference between WH3 (Chinese 1) and WH6 (Chinese 1) with PRU strain (type II) , whereas much more difference were found between WH3 (Chinese 1) and WH6 (Chinese 1) with RH strain (type I) . **Conclusion** There are some difference in virulence-associated-molecule genes of ROP 5 and ROP18 among Chinese 1 strain and the traditional type I , type II strains in *Toxoplasma gondii*. These results may contribute to the basic theory research on toxoplasmosis in china.

Key words *Toxoplasma gondii*; virulence; ROP5 gene; ROP18 gene