

【论著摘要】

文章编号: 1000-7423(2001)-06-0371-02

云南省不同地区恶性疟原虫 MSA-1、MSA-2 和 Pf 60.1 基因多态性研究

张国森¹ 杨亚明¹ 刘慧¹ 张再兴¹ 沈旭²

中图分类号: R383.312

文献标识码: A

裂殖子表面抗原 MSA-1 和 MSA-2 是编码裂殖子表面抗原的多基因家簇, 有大量的保守区和可变区。这个基因被认为与恶性疟原虫的入侵, 保护性免疫和免疫逃避有关。研究表明该基因在高疟区、低疟区及在不同的疟疾季节性传播中表现出多态性^[1-3]。为了解在云南不同疟疾流行区的恶性疟原虫中该基因的多态性特征, 以便对云南省疟疾有深入的认识, 进行了探索性调查。

1 材料与方

1.1 主要试剂和仪器 DNA 快速提取试剂盒, DNA 扩增试剂盒和 Taq 酶等试剂购自上海复华生物技术公司, 引物由北京赛百盛公司合成。热盖式基因扩增仪和 PAC300 电泳仪(BIO-RAD)。

1.2 样本来源 169 份血样均采自恶性疟现症病人, 男 112 人, 女 57 人, 年龄 3~56 岁。用新华滤纸涂制干血滴, 自然干燥, 单个塑袋封装, 携带或邮寄至试验室, 低温干燥保存。所有样本经镜检确定虫种。用白细胞计数法测定原虫密度(70 份未计数)为 75~42 500 个/μl 血。13 份血样来自我所建立的恶性疟原虫库, 其原虫密度为 3%~5% RBC。这些血样来自西双版纳、思茅、红河、德宏、临沧和缅甸、老挝、越南边境等地。

1.3 DNA 提取

1.3.1 滤纸干血滴 1997 年前使用 BIO-RAD 试剂盒(编码 732-6212 和 732-6211)提取。以后改用 5% Chelex-100 煮沸法提取: 将含虫血滤纸剪碎, 置于小管中, 加去离子水 1 μl 溶血, 离心 12 000 g 1.5 min, 去上清液, 加 180 μl 已预热的 95℃ 5% Chelex-100 悬液于滤纸和沉淀物中, 煮沸 10 min, 取上清再离心 1 次, 留上清于 4℃ 或 20℃ 备用, 作为 PCR 模板。

1.3.2 全血或血培养物 取血样 200 ml 用 pH 7.2 PBS 洗涤(1:10)后, 加 1% 皂素溶液于冰上溶血 5 min, 离心 12 000 g 30 s 去上清, 再用 PBS 液洗涤 1 次。以下步骤同上。

1.4 PCR 扩增 引物 MSA-1、MSA-2 和 Pf 60.1 直接引用于发表的文献[6, 7]。

MSA-1 5'-GAAGATGCAGTATTGACAGG-3',
5'-GAGTTCTTTAATAGTGAACAAG-3';
MSA-2 5'-GAGTATAAGGAGAAGTATGG-3',
5'-CCTGTACCTTTAATCTCTGG-3';
Pf 60.1 5'-TGGTACTAGAACCTAGTGGTAAC-3',

5'-GGATAATATATTTCTTCTCCAC-3';

扩增反应总体积 50 μl 含 1× PCR 缓冲液, dNTPS 各 200 μmol/L, 上下游引物各 0.4 μmol/L, DNA 模板 10 μl。置于 PCR 仪中预变性 92.5℃ 7 min, 冷却至 55℃ 加入 Taq 酶 5U (1 μl) 混匀。按以下反应条件循环 30 次: 92.5℃ 30 s, 55℃ 30 s, 70℃ 90 s; 最后 70℃ 延伸。

1.5 PCR 产物鉴定 取 PCR 产物 8 μl 与 4 μl 载样液混匀加于含 1% 溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中, 电泳(55 mV) 1 h, 在 ZF-3 紫外透射仪下观察 DNA 带型。

2 结果

2.1 基因多态性 169 份样本用于 MSA-1、MSA-2 和 Pf 60.1 的 3 个 PCR 扩增, 19 份阴性, 44 个血样被同时扩增到 PCR 产物片段。在 3 个 PCR 反应中, 观察到有限的基因多态性。扩增出的等位基因片段以英文字母由大到小排列, 所有等位基因的变异情况概括于表 1 中。MSA-1 基因扩增到 200~480 bp 的 7 个不同片段, 有两个优势多态等位基因 310 和 315 bp, 分别占 16.5% 和 69.4%。同样, 特异的 MSA-2 基因可扩增出 6 个 280~630 bp 的片段。其中 600 和 540 bp 占优势地位, 约 70%。9 个样本显示双带, 但仅 2 个带型相同。Pf 60.1 产生 4 个 240~400 bp 的多态基因片段, 以 313 bp 片段为优, 其频度 91.4%。

表 1 恶性疟分离株中的等位基因多态性情况

编码位点	等位基因片段大小	例数	频度(%)
MSA-1			
A	200	1	6.8
B	260	1	0.8
C	280	2	1.6
D	310	20	16.5
E	350	84	69.4
F	404	12	9.9
G	480	1	0.8
MSA-2			
H	280	1	0.7
I	440	20	14.5
J	500	6	4.3
K	540	39	28.3
L	600	48	34.8
M	630	24	17.4
Pf 60.1			
N	240	1	1.1
O	313	85	91.4
P	340	3	3.2
Q	400	4	4.3

基金项目: WHO TDR 资助项目(ID900098)

作者单位: 1 云南省疟疾防治研究所, 思茅 665000; 2 云南思茅地区医院, 思茅 665000

2.2 种群基因结构 93.6% (146/156) 样本只扩增到 1 条带型, 提示对于每一个现症病人可能只含有单一原虫克隆簇感染。值得一提的是, 6.5% (9/138) 来自高疟区勐腊和德宏州的分离株出现 2 个以上的 MSA-2 基因扩增片段, 反映出有一定的混合感染存在。在云南不同地区均观察到上面提到的各种等位基因带型, 并且, 如果使用这 3 个基因的带型作为标志物描述基因图谱, 则无一样本相同, 提示云南的恶性疟原虫种群结构是复杂的。

2.3 地理分布特征 Pf 60.1 和 MSA 1 的等位基因型虽分别有 4 和 7 型, 但其地理频度分布无明显差异 (另文报道)。MSA-2 的等位基因型有一定的地域特征, 在云南红河流域, 以 600 bp 带型为主; 在云南高疟区勐腊和德宏州, 以 600 和 540 bp 带型占优势, 且含有所有带型, 特别是双带型。

3 讨论

本文应用特异 PCR 方法检测了编码恶性疟原虫裂殖子表面抗原蛋白 MSA 1 和 MSA-2 基因以及 Pf 60.1 多基因家簇的基因多态性。分析结果表明在云南这 3 个基因的多态性是有限的。这一观察结果与最近从不同疟疾流行区对 MSA-1 和 MSA-2 基因多态的一系列研究^[1-4] 表明, 在不同程度的疟疾流行区, 以上基因的多态性明显不同。高疟区,

如非洲, 比低疟区存在更复杂的基因多态性表现。我们的研究结果支持了这一观点。

致谢 本研究得到贵州省寄生虫病研究所黄大造教授的大力支持和指导; 也得到本所高白菊、杨宇林、勐腊县医院、沧源地区防疫站、红河地区防疫站、澜西卡防疫站及医院的支持, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Konaté L, Zwetyenga J, Rogier C, et al. Variation of *Plasmodium falciparum* MSP1 block 2 and MSP2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, 93(Suppl 1): 21-28.
- [2] Felger I, Tavul L, Kabintik S, et al. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface antigen 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Exp Parasitol*, 1994, 79: 106-116.
- [3] Aricy F, Chalvet W, Hommel D, et al. *Plasmodium falciparum* parasites in French Guiana: limited genetic diversity and high selfing rate. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61: 978-985.
- [4] Babiker HA. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. *Plasmodium falciparum* population in the unstable malaria area of Eastern Sudan is stable and genetically complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998, 92: 585-589.

(收稿日期: 2001-03-30 编辑: 庄兆农)

【简报】

文章编号: 1000-7423(2001)06-0372-01

开封市小学生蠕形螨感染情况调查

王国英 都景芳 孙伟力

中图分类号: R384.42

文献标识码: A

1998-2000 年, 我们在每年的 9、10 月份, 对开封市的部分小学生进行了蠕形螨感染调查。

1 调查对象

为开封市区 4 所小学的学生, 共 1 390 人 (男 740 人, 女 650 人), 其中二年级 480 人, 年龄 7-8 岁; 四年级 490 人, 年龄 9-10 岁; 六年级 420 人, 年龄 11-12 岁。

2 方法

2.1 挤压涂片法 用拇指挤压受检者两侧鼻翼及鼻尖部, 将溢出皮脂用沾水笔尖的后端刮取, 再用大头针尖端挑下置于滴有甘油滴的载玻片上, 将皮脂涂匀, 加盖玻片, 镜检。

2.2 透明胶纸粘贴法 将红狮牌透明胶带剪为 6 cm × 1.8 cm 大小, 贴于一洁净载玻片上, 嘱受检者夜晚睡前洗净面部, 将胶带贴于鼻尖及两侧鼻翼部, 次晨洗脸前将胶带取下粘于载玻片上, 注意将胶纸贴平, 镜检。

3 结果

检查 1 390 人, 累计阳性人数 650 人。受检学生总感染率为 46.8% (650/1 390)。男、女生感染率分别为 45.9% (340/740) 和 47.7% (310/650), 两者差异无显著性意义 (χ^2

= 0.43, $P > 0.05$)。共检查 3 次, 每周 1 次。第 1 次用挤压涂片法, 第 2、3 次用透明胶纸法对第 1、2 次检查中的原阴性者进行检查, 检查 1、2、3 次的累计阳性人数分别为 520、620 和 650 人, 累计阳性率分别为 37.4% (520/1 390)、44.6% (620/1 390) 和 46.8% (650/1 390)。不同检查次数的阳性率间差异有非常显著性意义 ($\chi^2 = 27.2$, $P < 0.005$)。

二、四、六年级的感染率分别为 25.0% (120/480)、55.1% (270/490) 和 61.9% (260/420), 3 个年级间的感染率差异有非常显著性意义 ($\chi^2 = 143.17$, $P < 0.005$)。六年级男、女生感染率分别为 50.0% (130/260) 和 81.3% (130/160), 两者间差异有非常显著性意义 ($\chi^2 = 41.01$, $P < 0.005$)。

受检者中, 共用洗具者感染率为 46.0% (640/1 310), 独用洗具者感染率为 12.5% (10/80)。

4 讨论

蠕形螨感染的检出率与检出次数有一定关系。本次调查, 1 次检查阳性者占总阳性人数的 80.0% (520/650), 2 次检查累计阳性人数占总阳性人数的 93.4% (620/650)。因此, 1 次检查结果为阴性者, 可考虑增加检查次数, 以提高检出率。调查发现, 共用洗具者感染率大大高于独用洗具者, 因此应对小学生加强健康教育, 使他们了解预防蠕形螨的知识, 以防自身受染。

作者单位: 河南大学医学院病原教研室, 开封 475001

(收稿日期: 2001-01-17 编辑: 庄兆农)