

PCR-ELISA 检测疟原虫DNA 的研究*

张龙兴** 汤林华 冯晓平 王聚君

中国预防医学科学院寄生虫病研究所 上海 200025

提要 目的: 介绍一种诊断疟疾的新方法 PCR-ELISA。方法: 根据业已报道的疟原虫 SSU rRNA 基因保守序列, 设计并合成一对通用于恶性疟原虫和间日疟原虫的引物, 其中一引物的5'端加以生物素标记。经 PCR 扩增后, 携带有生物素的扩增产物与先期包被于 ELISA 板上的亲和素结合, 再经与恶性疟原虫、间日疟原虫特异、荧光素标记的寡核苷酸探针分别杂交, 底物显色等步骤, 使 PCR 产物得以半定量地检出。结果: 对于恶性疟原虫和间日疟原虫, 本法检出最低原虫密度阈值分别为4和10个原虫/ μl 血 (取血20 μl)、本法检测两种疟原虫未发现交叉反应。结论: 本试验具有较高的敏感度和特异性, 可望用于疟疾流行病学调查。

关键词 PCR-ELISA, 疟原虫, DNA 检测

诊断疟疾通常用血膜镜检法。这种方法具有较高的敏感度, 熟练镜检员可检出的最低原虫密度阈值为10-20个原虫/ μl 血^[1]。但由于本方法耗时费力, 而使现场应用受到限制。据报道, 以小亚基核糖体 RNA (SSU rRNA) 序列作为 DNA 探针或 PCR 扩增的靶序列, 检测疟原虫核酸可用于诊断疟疾^[2,3]。但此法 DNA 抽提, 点杂交, 同位素标记等步骤较复杂, 因而并不适用于现场。本文介绍一种 PCR 产物的固相杂交显色新方法, 无需通过琼脂糖凝胶电泳, 而是以类似板上 ELISA 方法, 将 PCR 扩增产物加以显色而使其得以半定量地检出。

材料与方 法

疟原虫

1 恶性疟原虫 (*P. f.*) 按常规方法进行恶性疟原虫 FCC1/HN 株同步体外培养, 俟原虫血症达约5%, 且主要为环状体时收集原虫, 经0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗涤2次, 压积红细胞贮于4℃ 备用。

2 间日疟原虫 (*P. v.*) 1995年疟疾流行季节由云南省勐腊县采集间日疟患者抗凝血样, 血膜镜检主要为 *P. v.* 环状体及大滋养体, 4 000个原虫/ μl 血, 在现场同上法用 PBS 洗涤2次后, 贮于-20℃ 备用。

PCR 反应

1 引物 根据 *P. f.* 和 *P. v.* SSU rRNA 基因序列中疟原虫种特异性保守序列^[4-6], 设计并委托中国科学院上海细胞生物学研究所合成一对 *P. f.* 和 *P. v.* 通用的引物, 在引物2的5'端加以生物素标记。

引物1: 5'-A GTGAA GACGA TCA GA TACCGT-3'

引物2: 5'-B io ACTTTGATTTCTCA TAA GGTACT-3'

引物1位于 *P. f.* 基因序列的第1 066-1 087位和第1 173-1 195位, 引物2位于 *P. v.* 基因序列的第1 051-1 072位和第1 170-1 192位。

2 PCR 反应 模板 DNA 的抽提根据 Chelex-100方法^[7], PCR kit 购自华美生物技术公司, 反应条件为94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 末次反应于72℃ 保温10 min, 共35轮反应。

3 PCR 产物的鉴定 以经溴化乙锭染色的2% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 PCR 产物的特异性 DNA 条带。

ELISA 检测系统

1 链亲和素 (Streptavidin) 购自华美生物技术公司, 包被浓度为1·50。

2 寡核苷酸探针 根据 Arai 等^[8] *P. f.* 及

* 卫生部科学研究基金资助项目

** 现工作单位: 第二军医大学基础医学部寄生虫学教研室

P. v. 特异性寡核苷酸探针, 分别位于 *P. f.* 及 *P. v.* SSU rRNA 基因序列的1 135- 1 154位及1 131- 1 151位, 委托中国科学院上海细胞生物学研究所合成, 并在其5'端各加以荧光素标记。

P. f. 5'-FIAAGTCATCTTTTCGAA GTGAC-3'

P. v. 5'-F1GAATTTTCTCTTCGGAGTTTA-3'

3 标记辣根过氧化物酶 (POD) 的抗荧光素抗体 购自BoehringerM annheim 公司, 工作浓度为1:1 000。

4 ELISA 反应 根据Nutman 方法^[9], 略作变动。1:50的链亲和素包被聚氯乙烯板, 50 μl/井, 37 ℃ 2 h 后4 ℃ 过夜。次日以2×SSC (1×: 0.15 mol/L NaCl, 15 mmol/L 柠檬酸钠) 洗涤4次, 每井加入20 μl 含200 μg/ml 的鲑鱼精子DNA 的5×SSC (杂交液) 及5 μl PCR 产物, 37 ℃ 温育30 min, 洗涤同上, 每井加100 μl 1 mol/L NaOH, 室温下变性1 min, 洗涤同上, 加入以杂交液稀释的荧光素标记的 *P. f.* 或 *P. v.* 特异性寡核苷酸探针, 50 μl/井, 每井浓度为100 ng/ml, 50 ℃ 温育30 min, 洗涤同上, 加入含5% 脱脂奶粉的温育液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH7.5, 0.3 mol/L NaCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.05% 吐温-20) 稀释 POD 标记的抗荧光素抗体, 50 μl/井, 37 ℃ 温育30 min, 洗涤后加 POD 底物液, 37 ℃ 避光温育20 min, 以15 μl 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 在ELISA 读数仪 (Bio-Rad 450) 读取OD_{492nm} 值。

阳性反应阈值的确定

上海献血员抗凝血样26份, 弃血浆, 红细胞以PBS 洗涤 (方法同上), 按上述方法进行PCR-ELISA。以测得的OD 值计算均值 (\bar{X}) 与标准差 (SD), 以95% 可信限 $\bar{X} + 2SD$ 作为阳性反应阈值。

杂交温度对 ELISA 反应的影响

设室温 (约20 ℃), 37 ℃ 及50 ℃ 等三种不同温度, 以标记荧光素的 *P. f.* 特异性寡核苷酸探针与 *P. f.* PCR 产物杂交进行

ELISA 试验, 比较不同杂交温度对 ELISA 反应的影响。

敏感性试验

1 PCR-ELISA 检测 *P. f.* 的敏感性试验 体外培养的 *P. f.* FCC1/HN 株压积感染红细胞以正常人O 型红细胞稀释, 使每微升血含原虫数分别为: 1×10^4 、 2×10^3 、 4×10^2 、80、16、8、4、2及1, 取20 μl 血进行PCR-ELISA, 以恰好大于阳性反应阈值的OD 值对应的原虫密度为本试验可检出的最低原虫密度。

2 PCR-ELISA 检测 *P. v.* 的敏感性试验 以正常人红细胞稀释间日疟患者血样后使每微升血含原虫数分别为 4×10^3 、 8×10^2 、160、80、40、20、10、5、3及1。同上进行PCR-ELISA, 测定可检出的最低原虫密度。

特异性试验

以 *P. f.* 血样进行PCR 扩增, 并将扩增产物与 *P. v.* 特异性寡核苷酸探针杂交进行ELISA 检测; 以间日疟患者血样进行PCR 扩增并将扩增产物与 *P. f.* 特异性寡核苷酸探针杂交, 进行ELISA 检测, 以观察PCR-ELISA 的特异性。

结 果

1 PCR 扩增产物的鉴定

体外培养 *P. f.* 及间日疟患者血样经PCR 扩增, 其产物经2% 琼脂糖凝胶电泳, 见约140 bp 的DNA 条带。

2 阳性反应阈值的测定

26份正常人血样以 *P. f.* 寡核苷酸探针杂交者, PCR-ELISA 的OD 值范围为0.01-0.205, \bar{x} 为0.102, SD 为0.061, 最低阳性反应阈值为0.224, 即OD 值> 0.224者为恶性疟患者; 23份正常人血样以 *P. v.* 寡核苷酸探针杂交者, PCR-ELISA OD 值范围为0.09-0.220, \bar{x} 为0.136, SD 为0.042, 最低阳性反应阈值为0.220, 即OD 值> 0.220者为间日疟患者。

3 PCR-EL ISA 试验诊断疟疾的敏感性

1 检测 *P. f.* 检出 *P. f.* 的最低原虫密度为4个原虫/ μ l 血 (取血20 μ l) (图1)。

2 检测 *P. v.* 检出 *P. v.* 的最低原虫密度为10个原虫/ μ l 血 (取血20 μ l) (图2)。

4 PCR-EL ISA 检测疟原虫DNA 的特异性

P. f. 血样和间日疟患者血样经PCR扩

增后, 扩增产物分别以 *P. v.* 和 *P. f.* 特异性寡核苷酸探针进行 EL ISA 检测, 结果见表1。

5 杂交温度对 EL ISA 反应的影响

杂交温度分别为室温、37 及50 , 其中以50 进行杂交后 EL ISA 结果OD 值为高 (表1)。

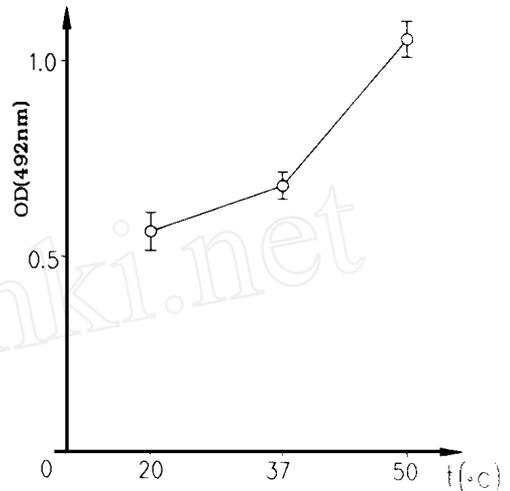
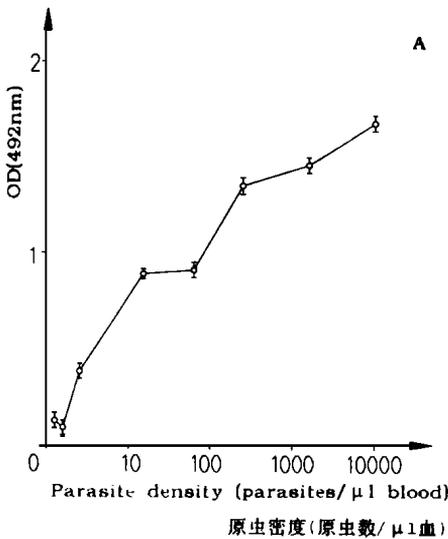


图2 温度对杂交效率的影响

Fig 2 Effects of temperature on hybridization

表1 PCR-EL ISA 检测疟原虫的特异性

Table 1 Specificity of detection of malaria parasites by PCR-EL ISA

PCR 产物 PCR products	PCR-EL ISA 试验的OD _{492nm} 值 OD _{492nm} values by PCR-EL ISA	
	<i>P. f.</i>	<i>P. v.</i>
<i>P. f.</i>	0.780 ± 0.105	0.071 ± 0.005
<i>P. v.</i>	0.062 ± 0.006	0.707 ± 0.065

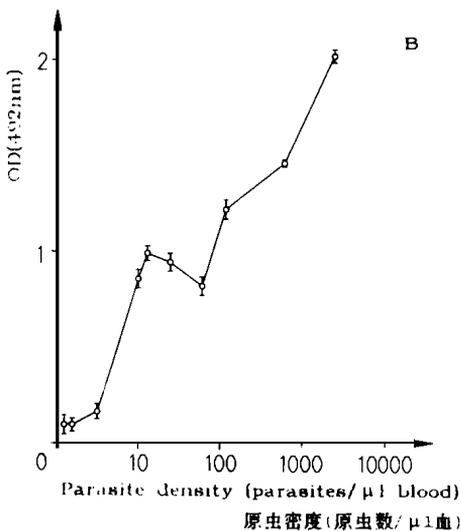


图1 OD_{492nm} 值与原虫密度的关系

A: *P. f.* B: *P. v.*

Fig 1 Correlations between OD value and parasite density

讨 论

在基于检测核酸, 如DNA 探针技术, PCR 技术等以诊断疟疾的方法中, 大部分为诊断恶性疟^[10, 11], 亦有诊断间日疟者^[12]。本试验以疟原虫 SSU rRNA 基因序列中疟原虫种特异性的保守序列设计成一对引物, 对 *P. f.* 血样和间日疟患者血样进行PCR 扩增, 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳上出现约140 bp 的DNA 条带, 与目的扩增片段大小一致, 表明所设计的引物可同时适用于 *P. f.* 和 *P.*

v. DNA 的扩增。

本试验具有较高的特异性和敏感性。PCR-ELISA 的特异性遵循 DNA 分子杂交 A - T, C - G 配对的一般规律由两部分组成, 一为 PCR 试验中的引物, 二为 ELISA 检测系统中所用的寡核苷酸探针。本文 PCR 试验中的引物决定疟原虫种特异性, ELISA 检测系统中的寡核苷酸探针决定 *P. f.* 或 *P. v.* 特异性, 即予以明确恶性疟或间日疟的诊断。表1可见, 本试验在诊断恶性疟或间日疟时并无交叉反应。敏感性试验表明, PCR-ELISA 可检出 *P. f.* 及 *P. v.* 的原虫密度阈值分别为4个原虫/ μ l 血和10个原虫/ μ l 血 (20 μ l 血), 与镜检法检测疟原虫的敏感度相当^[1], 但高于目前试用的纸片法^[13]。

杂交效率与温度及 DNA 分子中 C/G 含量有关。在一定范围内杂交效率随杂交温度升高而升高, C/G 含量在30% - 75% 范围内亦直接影响 T_m ^[14]。恶性疟原虫无性血液期 SSU rRNA 基因 C/G 含量为36%^[4]。一般认为, 最大杂交率往往在低于室温 20- 25 时出现。本文观察到在室温, 37 及50 三种温度下, 以50 的杂交效率较高。

参 考 文 献

1 Bruce-Chwatt LJ. DNA probes for malaria diagnosis Lancet 1984; 1:795
 2 Lal AA, Changkasiri S, Hollingdale MR, et al Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria Mol Biochem Parasitol 1989; 36:67

3 Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. Lancet 1989; 1:1343
 4 McCutchan TF, Cruz VF, Lal AF, et al Primary sequences of two small subunit ribosomal RNA genes from *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1988; 28:63
 5 Goman M, Mons B, Scaife J. The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSU rRNA gene and its comparison to other *Plasmodia* SSU rRNA genes. Ibid 1991; 45:281
 6 Waters AP, McCutchan TF. Partial sequence of the asexual expressed SU rRNA genes of *Plasmodium vivax*. Nucleic Acids Res 1989; 17:2135
 7 张龙兴, 詹斌, 王聚君, 等. 滤纸干血滴抽提恶性疟原虫DNA 用于PCR 扩增. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1995; 13:120
 8 Arai M, Kunisada K, Kawai S, et al DNA diagnosis of ovale malaria and malariae malaria using microtiter plate-hybridization. Nucleosides and Nucleotides 1994; 6:1363
 9 Nutman TB, Zimmerman PA, Kubofcik J, et al A universally applicable diagnostic approach to filarial and other infections. Parasitol Today 1994; 10:239
 10 Lannar DE, McLoughlin GL, Wirth DF, et al Comparison of thick film, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting *Plasmodium falciparum* malaria. Am J Trop Med Hyg 1989; 40:3
 11 Relf WA, Boreham RE, Tapchaisri P, et al Diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria using a specific deoxyribonucleic acid probe. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1990; 84:630
 12 张龙兴, 柴建华, 詹斌, 等. DNA 探针诊断间日疟的进一步研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1993; 11:86
 13 张龙兴, 汤林华, 冯晓平, 等. 纸片法诊断恶性疟的初步研究. 第二军医大学学报 1997; 17:80
 14 Brown TA. Essential molecular biology: a practical approach. Vol I Oxford University Press 1991:132-133

1996年10月15日收稿 1997年12月5日修回
 (编辑: 富秀兰)

STUDY ON DETECTION OF MALARIA PARASITE DNA BY PCR-ELISA*

Zhang Longxing**, Tang Linhua, Feng Xiaoping, Wang Jujun

Institute of Parasitic Diseases, Chinese Academy of Preventive Medicine, Shanghai 200025

ABSTRACT

AM: To present a new malaria diagnostic method based on detection of malaria parasite DNA by PCR-ELISA. **METHODS:** According to the conserved sequence of *Plasmodium* SSU rRNA genes reported, a pair of primers in which one primer was biotinylated and another was unbiotinylated, suitable for DNA amplification of both *falciparum* and *vivax* malaria parasites were designed and synthesized. After denaturation and washing, the incorporated biotinylated product with avidin coated on plates previously was hybridized with the fluores-

