

云南 HIV 阳性患者感染弓形虫基因型的初步分析

聂大平^{1,2}, 贾玉玺¹, 陈凌娟¹, 尤英霞¹, 李伟¹, 申丽洁^{3*}

【提要】 2011 年 9 月至 2012 年 12 月收集云南省西部地区 HIV 阳性患者全血样品 150 份, 利用巢式 PCR 技术对血样进行弓形虫 B1 基因的扩增, 扩增产物经限制性内切酶 *Pm*I 和 *Xho*I 酶切, 进行限制性内切酶片段长度多态性分析 (RFLP)。自 B1 基因扩增阳性的血样中取 5 份扩增产物测序, 结果与标准基因 I 型株 B1 基因序列 (登录号为 AF179871) 进行比对分析。在 150 份 HIV 阳性患者血样中, 13 份扩增出弓形虫 B1 基因, 约 530 bp。PCR 产物酶切结果显示, 13 份血样均得到 1 个片段, 约为 500 bp, 与标准基因 I 型株的条带一致。测序结果显示, 4 份血样的扩增产物完全一致, 与基因 I 型株的 B1 基因序列仅有 3 个碱基的差异; 余 1 份血样的扩增产物在第 230 对碱基处 G→A。因此初步确定此次研究中的云南省西部地区 HIV 阳性患者感染弓形虫基因型为 I 型。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒; 刚地弓形虫; B1 基因; 巢式 PCR; 基因分型

中图分类号: R382.5 文献标识码: B

Genotypes of *Toxoplasma gondii* Isolates from HIV Positive Patients in Yunnan Province

NIE Da-ping^{1,2}, JIA Yu-xi¹, CHEN Ling-juan¹, YOU Ying-xia¹, LI Wei¹, SHEN Li-jie^{3*}

(1 Department of Parasitology, College of Basic Medicine, Dali University, Dali 671003, China; 2 Ji'an County People's Hospital of Jiangxi Province, Ji'an 343100, China; 3 Department of Pathogen Biology and Immunology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

【Abstract】 One hundred and fifty serum samples of HIV positive patients were collected in western Yunnan Province from September 2011 to December 2012. *Toxoplasma gondii* B1 gene was amplified by nested PCR. Genotyping of *T. gondii* isolates were performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Pm*I and *Xho*I. 13 samples were found positive with the B1 gene (530 bp) amplification and belonged to type I. The sequencing results showed that 4 *T. gondii* B1 gene positive samples were identical, with 3 nucleotide variation compared with *T. gondii* strain RH (type I) B1 gene (GenBank No. AF179871), and in the other sample a "G→A" mutation at 230 bp was detected. The results indicated that the genotype of *Toxoplasma gondii* in HIV positive patients in Yunnan Province is type I.

【Key words】 HIV; *Toxoplasma gondii*; B1 gene; Nested PCR; Genotyping

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30960330)

* Corresponding author, E-mail: lijieshen@163.com

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是寄生于细胞内的机会性致病原虫, 可感染人和多种动物, 能导致孕妇流产, 胎儿或婴幼儿发育畸形, 甚至死亡^[1]。此外, 弓形虫脑炎是艾滋病患者最常见的机会性感染疾病之一^[2,3]。

根据弓形虫基因分析可将弓形虫分为 3 个主要基因型, I 型为强毒株 (即 RH 株), II 型和 III 型为弱毒株^[4]。弓形虫不同虫株基因组间存在微小差异, 这可能是不同虫株之间的毒力和药物敏感性等存在差异的原因^[5,6]。本研究通过对云南省 HIV 阳性患者感染的弓形虫进行基因型分析, 为该省 HIV 阳性患者弓形虫病的防治提供资料。

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30960330)

作者单位: 1 大理学院基础医学院寄生虫学教研室, 大理 671003;

2 江西省吉安县人民医院, 吉安 343100;

3 昆明医科大学病原生物学与免疫学系, 昆明 650500

* 通讯作者, E-mail: lijieshen@163.com

1 材料与方法

1.1 血样和虫株 2011 年 9 月至 2012 年 12 月共收集到云南省西部地区 HIV 阳性患者全血样品 150 份, 所有血样均来自云南省艾滋病防治机构, 经多次检测确定。弓形虫国际标准强毒株 RH 速殖子由中山大学基础医学院寄生虫学教研室惠赠。

1.2 主要试剂 DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。限制性内切酶 *Pm*I 和 *Xho*I 购自美国 Fermentas 公司。

1.3 巢式 PCR 将患者血样和弓形虫标准株分别按照血液和组织提取法提取 DNA, -20℃ 保存备用。参照文献^[7] B1 基因的引物序列, 第 1 轮引物分别为 S1 (5'-TGTTCTGTCATCGCAACG-3') 和 AS1 (5'-ACGGATGCAGTTCCTTCTG-3'), 预期产物长度约为 580 bp, 第 2 轮引物分别为 S2 (5'-TCTTCCCAGACGTG-GATTC-3') 和 AS2 (5'-CTCGACAATACGCTGCTTGA-3'), 预

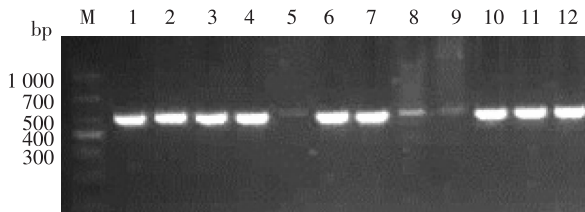
期产物长度约为530 bp。引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。第1轮反应体系为: *Taq* 酶0.25 μ l, 10 \times PCR缓冲液2.5 μ l, dNTP 2.0 μ l, 上、下游引物各1.0 μ l, 模板12 μ l, 加水至25 μ l。取第1轮反应产物4 μ l进行第2轮扩增, 反应体系为: *Taq* 酶0.25 μ l, 10 \times PCR缓冲液5.0 μ l, dNTP 4.0 μ l, 上、下游引物各1.0 μ l, 加水至50 μ l。2轮反应条件均为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共35个循环。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统拍摄图片。试剂盒回收产物, -20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.4 限制性内切酶片段长度多态性分析 (RFLP) 取巢式PCR产物, 反应体系为: PCR产物15 μ l、*Pm*1 I和*Xho* I各2 μ l、10 \times 缓冲液2 μ l、双蒸水2 μ l, 37 $^{\circ}$ C水浴过夜。酶切产物经凝胶电泳后染色, 拍摄图片。

1.5 测序及序列分析 取5份患者血样和1份感染弓形虫RH株小鼠血样的B1基因扩增产物, 以及1份弓形虫RH株速殖子的B1基因扩增产物, 送上海立菲测序有限公司测序。测序结果与GenBank中弓形虫I型株B1基因序列(登录号为AF179871)比对。

2 结果

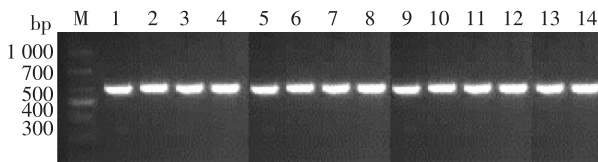
2.1 巢式PCR扩增结果 150份HIV阳性患者血样经巢式PCR扩增后, 有13份血样成功扩增出约530 bp的条带(图1)。



M: DNA标志物; 1、2: 弓形虫RH标准株; 3~12: HIV阳性患者血样。

图1 巢式PCR对弓形虫B1基因扩增结果

2.2 PCR产物的RFLP分析 经*Pm*1 I和*Xho* I酶切后, 13份B1基因阳性血样的PCR产物均切出1个片段, 大小约为500 bp, 与基因I型株(RH株)一致(图2)。



M: DNA标志物; 1~13: 患者血样; 14: 弓形虫RH标准株。

图2 B1基因限制性内切酶片段长度多态性分析

2.3 序列分析 测序结果显示, 5份患者血样中4份扩增得到的B1基因与感染弓形虫小鼠血样和弓形虫RH株中的B1基因序列完全一致; 与GenBank中I型株B1基因序列比对, 本次研究扩增得到的B1基因序列在第11对碱基处缺失一个腺嘌呤(A), 在第61对碱基处多了一个腺嘌呤(A)和一个鸟嘌呤(G)。5份患者血样中另1份血样扩增得到的B1基因在第230对碱基处G \rightarrow A。

3 讨论

在弓形虫基因型的分型研究中, 遗传标记的选择主要依据

基因位点多态性, 因此多选用多态性丰富的遗传标记。B1基因在目前所有的弓形虫株基因组中均存在, 但不同基因型的弓形虫在B1基因位点上有10个多态性位点, 这些位点可用限制性内切酶来分型。

国际上将弓形虫主要分为3个基因型, 其中人类弓形虫病多与基因I型和II型虫株有关^[9,10], 基因III型多见于动物感染。本实验从云南150份HIV阳性患者全血中扩增出弓形虫B1基因13份, 酶切并与标准I型株比对, 结果一致; 而Alfonso等^[7]的研究表明, 国际标准株II型(Me49)和III型(C56)酶切后可见2个片段, 分别为400 bp和100 bp。因此初步确定此次研究中的云南省西部地区HIV阳性患者感染的弓形虫基因型为I型。但目前样品数量有限, 尚不能完全说明云南全省HIV阳性患者感染弓形虫基因型的分布情况, 且随着对弓形虫基因水平研究的深入与扩展, 已发现不同于上述3个基因型的新的虫株^[11,12]。因此有必要收集更多的样品, 并寻找更敏感的遗传标记, 为云南省HIV阳性患者感染弓形虫的基因分型研究提供更准确的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Dubey JP. Distribution of tissue cysts in organs of rats fed *Toxoplasma gondii* oocysts[J]. J Parasitol, 1997, 83(4): 755-757.
- [2] Sibley LD, Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage[J]. Nature, 1992, 359(6390): 82-85.
- [3] 尤英霞, 李伟, 申丽洁, 等. 云南西部两地区HIV阳性者弓形虫感染血清学调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(5): 418-419.
- [4] Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease[J]. J Infect Dis, 1995, 172(6): 1561-1566.
- [5] Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings [J]. J Infect Dis, 2002, 186(5): 684-689.
- [6] Meneceur P, Bouldouyre MA, Aubert D, et al. In vitro susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(4): 1269-1277.
- [7] Alfonso Y, Fraga J, Jiménez N, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by nested PCR and rapid identification of type I allele at B1 gene by RFLP analysis[J]. Exp Parasitol, 2009, 122(3): 203-207.
- [8] Grigg ME, Boothroyd JC. Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1): 398-400.
- [9] Vallochi AL, Muccioli C, Martins MC, et al. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil[J]. Am J Ophthalmol, 2005, 139(2): 350-351.
- [10] 林爱芬, 申银希, 朴在焕, 等. 弓形虫韩国KI-1分离株的生物学特性鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(3): 183-186.
- [11] Dubey JP, Rajendran C, Costa DG, et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings [J]. J Parasitol, 2010, 96(4): 709-712.
- [12] Khan A, Dubey JP, Su C, et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America[J]. Int J Parasitol, 2011, 41(6): 645-655.

(收稿日期: 2013-01-07 编辑: 瞿麟平)