

用微卫星分析我国不同地区间日疟原虫的种群结构

郭鑫¹ 张冬梅¹ 王剑² 张苍林² 潘卫庆^{1*}

【摘要】 目的 了解我国不同疟疾流行区间日疟原虫种群结构和遗传多样性特征,积累我国间日疟原虫遗传相关数据。方法 收集云南、海南、河南流行区间日疟患者血样,血涂片鉴定间日疟原虫阳性者抽提血液基因组,采用巢式/半巢式 PCR 方法扩增特异性 2.21 微卫星片段,对扩增阳性产物进行基因扫描检测,根据检测微卫星的重复序列进行 STR 分型,并应用 GENALEX 软件计算等位基因频率、等位基因数目以及期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)。结果 间日疟原虫 2.21 微卫星在不同地区间日疟原虫样本中呈现高度的多态性,其等位基因数目变化范围为 4~9,期望杂合度为 0.613~0.853,比较不同地区,云南地区间日疟原虫等位基因数目为 9,期望杂合度为 0.853,变异度最高。结论 我国不同地区间日疟原虫基因组具有较高的遗传多样性,其种群结构具有地区特征,这可能与各种群传疟媒介种类不同及地理环境差异等相关。

【关键词】 间日疟原虫;微卫星;种群结构;期望杂合度

Analysis of the population structure of *Plasmodium vivax* isolates from different areas in China using microsatellites GUO Xin¹, ZHANG Dong-mei¹, WANG Jian², ZHANG Cang-lin², PAN Wei-qing^{1*}.

¹Department of Pathogen Biology, Second Medical Military University, Shanghai 200433, China ²Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Pu'er 665000, China

* Corresponding author; PAN Wei-qing, Email: wqpan0912@yahoo.com

Supported by the National Basic Research Program of China-973(2007CB513100)

【Abstract】 Objective To investigate the population structure and genetic diversity of *Plasmodium vivax* isolates from malaria-endemic areas in China, and to set up genetic database of vivax malaria. **Methods** Blood samples of symptomatic patients that were positive for *P. vivax* by microscope were collected from Yunnan, Hainan and Henan provinces and used for nested PCR amplification of DNA fragment containing microsatellite loci and detection of the microsatellite by Genescan. Then GENALEX software was used to calculate haplotype frequency, number of alleles and expected heterozygosity (H_e). **Results** The length of 2.21 microsatellite was highly variable in *P. vivax* isolates from different areas in China. The number of the microsatellite alleles varied from 4 to 9, and expected heterozygosity (H_e) was 0.613~0.853. The microsatellite showed the highest diversity in the isolates from Yunnan where the number of allele is 9 and H_e means 0.853 compared to those in other areas. **Conclusion** The *P. vivax* isolates from different areas in China showed high genetic diversity and regionally-centered differences.

【Key words】 *Plasmodium vivax*; Microsatellite; Population structure; Expected heterozygosity

疟疾是世界上广泛分布的重要寄生虫病,我国主要以间日疟为主^[1]。间日疟具有较高的复发率,它给人们尤其是儿童的健康,带来极大的危害。在我国,经过 50 多年不懈的努力,疟疾从整体上已经得到有效控制^[2],但近年来,我国多个地区间日疟

疾流行回升,“输入性疟疾”病例逐年增加。因此,现阶段我国面临的疟疾防治任务仍然十分艰巨。

为了应对当前疟疾流行的新形势,仍需要加强疟疾防治的基础研究,特别是确定我国间日疟原虫种群遗传结构。以往的研究大多通过分析抗原基因多态性研究疟原虫种群结构^[3],但这类基因极易受免疫选择压力作用而保留某种变异,因此不能准确反映间日疟原虫株的遗传特征。微卫星作为物种的遗传标志,正得到广泛的应用,它具有种类多、分布广、高度多态等优点。本研究通过对我国不同地区间日疟原虫虫株微卫星位点的检测,分析不同

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2012.04.001

基金项目:国家重点基础研究发展计划-973 项目基金资助(2007CB513100)

作者单位:¹200433 上海,第二军医大学病原生物学教研室;²665000 普洱,云南省寄生虫病防治所

* 通信作者:潘卫庆,Email: wqpan0912@yahoo.com

地区虫株的种群遗传特征,为建立我国间日疟虫虫株遗传数据库提供基础积累。

1 材料和方法

1.1 材料

采集来自中国 3 个疟疾流行区(云南、海南和河南地区)的间日疟患者血样各 30 例。基因组抽提试剂盒为德国 QIAGEN 公司的 QIAamp DNA (Blood) Mini Kit。PCR 扩增酶 KOD Plus 为日本 TOYOBO 公司产品。基因扫描技术由上海南方中心提供支持。

1.2 方法

1.2.1 样本基因组抽提

按 DNA 抽提试剂盒操作说明进行,具体如下:解冻间日疟血样,加 200 μ l 全血于 1.5 ml 离心管中,再加入 20 μ l QIAGEN 蛋白酶和 4 μ l RNA 酶(10 mg/ml),静置 1 min。加入 200 μ l 缓冲液 AL,震荡 15 s,56 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,取出瞬间离心。加入 200 μ l 无水乙醇,震荡 15 s 后将混合液上柱,置于 2 ml 离心管中,3 000 $\times g$ 离心 1 min。换新的 2 ml 离

心管,加入 500 μ l AW1,3 000 $\times g$ 离心 1 min。换新的 2 ml 离心管,加入 500 μ l AW2,10 000 $\times g$ 离心 3 min。再次换新的 1.5 ml 管,柱上加 200 μ l AE,静置 1 min 后 8 000 $\times g$ 离心 1 min。标记编号后 -20 $^{\circ}$ C 保存。滤纸血样本和玻片样本基因组抽提需要先加入 ATL 于 85 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,随后流程一致。

1.2.2 半巢式 PCR 扩增微卫星片段

PCR 反应体系为 10 μ l,第一轮反应 10 \times KOD 缓冲液 1 μ l, MgSO₄ (25 mmol/L) 0.4 μ l, dNTPs (2 mmol/L) 1 μ l,引物各 0.25 μ l (10 mmol/L),基因组模板 1 μ l, KOD Plus (1 U/ μ l) 0.1 μ l,双蒸水补足至 10 μ l,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,48 $^{\circ}$ C 40 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,共 20 个循环;65 $^{\circ}$ C 5 min。第二轮反应体系与第一轮类似,引物降至 0.2 μ l,且上游引物为 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein,6FAM)荧光标记,取第一轮 PCR 产物 0.5 μ l 作为模板,扩增条件参照第一轮反应,退火温度改为 52 $^{\circ}$ C。PCR 采用 96 孔 PCR 板,每次扩增前两孔设为阴性对照,后两孔为阳性对照。微卫星 2.21 引物信息见表 1。

表 1 微卫星 2.21 引物信息

Table 1 PCR primers of microsatellite 2.21

位点名称 Name	重复次数 Array length	重复碱基 Motif	外侧正向引物 External forward	反向引物 Reverse	内侧正向 (6FAM)
2.21	12	AC	GTGGGGTT GTTTAGCTTGT	TAACCCCTCTA TCGCTCTCAC	6FAM - GTGCCATCT GCTCAAATC

1.2.3 基因扫描检测

电泳鉴定符合要求的第二轮 PCR 产物送至国家人类基因组南方中心测序实验室进行基因扫描检测及 Genemapper4.0 软件分析 (Applied Biosystems, 国家人类基因组计划南方中心)。基因扫描检测方法自动检测等位基因长度,得到的片段大小 (bp) 作为等位基因类型;若某个位点上出现两个或两个以上峰形,次峰形状与主峰一致,且高度大于主峰高度的 1/3,则认为此位点检测到多个等位基因类型,可能是多重感染的样本^[4],否则认为次峰为噪音峰,予以舍去。如果检测荧光强度小于 200 单位,认为是阴性结果,并对该样本进行重复检测。

1.2.4 数据的统计学分析

种群的遗传学分析方法在恶性疟的研究中已经多有运用^[5-7],在间日疟原虫种群结构的研究中

可以进行比较和运用。本研究采用 GENALEX^[8] 软件计算等位基因频率、等位基因数目以及期望杂合度 (H_e)。

等位基因频率是各区间日疟原虫样本在某位点不同的基因型所占的比率的分布图,通过此图可直观判断不同地区样本间的分布差异,对寻找地区特异性位点提供帮助。用等位基因数目 N 和期望杂合度 H_e 对不同地区地理株进行遗传多样性评估, H_e 定义为从群体样本中抽到 2 个不同长度等位基因的概率大小,计算公式为: $H_e = [n / (n-1)] [1 - \sum p_i^2]$,其中 n 为感染样本数, p_i^2 为第 i 个等位基因频率。

2 结果

2.1 样本采集及基因组抽提

云南、海南与河南地区样本数目及样本形式如

下,云南地区全血的间日疟样本为 30 例,河南地区为 30 例滤纸血样,海南地区的 30 例样本则全部为玻片样本,一共 90 例样本全部采用 QIAGEN 的 QIAamp DNA (Blood) Mini Kit 进行基因组的抽提。全血样本每次抽提使用 200 μ l 样品,滤纸样本每次抽提使用 3 mm \times 3 mm 的浸血滤纸片 10 个,玻片样本将厚玻片上固定样品全部溶解,一次性使用。

2.2 微卫星位点特征

Imwong 等^[9]报道的微卫星标志显示泰国、印度和哥伦比亚的间日疟原虫种群具有高度多态性。本研究选择了 2. 21、3. 35、6. 34、7. 67、10. 29、12. 335 这 6 个微卫星标志对我国不同地区的间日疟原虫种群结构进行分析,实验发现,一些微卫星标志显示出较低的变异度,而由于血涂片抽提基因组质量不高,有些微卫星 PCR 扩增结果不好,故剔除了这些位点,最终选择了变异度较高的微卫星位点 2. 21 进行研究。2. 21 微卫星位点位于间日疟原虫二号染色体上的非编码区,核心的重复碱基为 AC,平均的重复次数为 12 次,半巢式 PCR 扩增内侧正向引物为 6FAM 荧光标记。

2.3 PCR 扩增及核酸电泳检测结果

采用半巢式 PCR 对间日疟样本进行 PCR 扩增,极大地提高了扩增产物的特异性。根据 2. 21 微卫星位点信息,扩增产物大小为 91 ~ 129 bp。核酸电泳的检测结果显示,云南、海南和河南地区的间日疟样本扩增条带清晰、单一,产物大小在 100 bp 左右,符合微卫星位点信息(图 1),这样的扩增产物为阳性结果,可以进行进一步的检测分析。

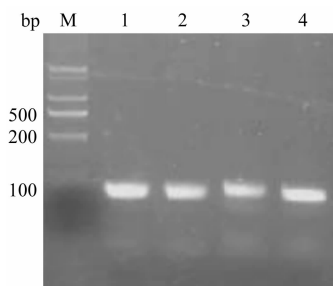


图 1 PCR 扩增产物电泳结果
M: DNA 标志物, 1~2: 云南, 3: 海南, 4: 河南
Fig. 1 Results of PCR amplification
M: DNA marker, 1-2: Yunnan, 3: Hainan, 4: Henan

2.4 基因扫描分析

核酸电泳检测阳性的 PCR 产物进一步进行基因扫描的分析,峰值对应的片段大小(bp)作为等位基因的类型,并按照多重感染判定的原则对结果进行筛选。基因扫描分析结果显示,河南地区样本主峰值高度约为 1 800 单位,峰值对应的位置约为 100 bp,其余背景峰值高度均小于 200 单位,这样的样本是单一感染的,其结果可以纳入统计分析(图 2A)。云南地区样本主峰高度约为 3 000 单位,峰值对应位置约为 100 bp,次峰高度约为 1 500 单位,远高于 200 单位荧光强度,且达到了主峰高度的 1/2,其余峰值虽然高于 200 单位荧光强度,但是不到主峰高度的 1/3,可忽略为背景峰。由于该样本在此微卫星位点有两个有效峰值,因此该样本可能是多重感染的样本,它们均不纳入统计分析(图 2B)。每一份采集的血样均按照这样的原则进行基因扫描检测和筛选,最终纳入统计的 90 例样本在微卫星位点 2. 21 均表现为单一感染。

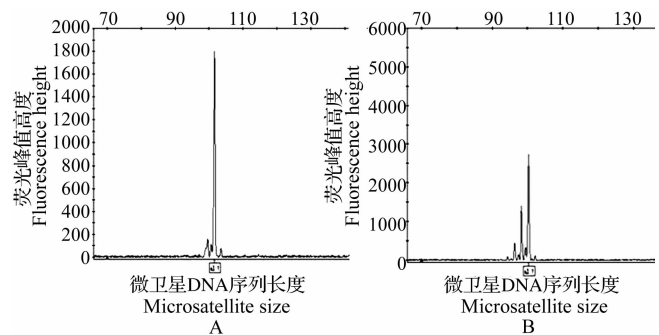


图 2 基因扫描的分析结果
A: 单一峰值结果, B: 多峰值, 可能是多重感染的结果

Fig. 2 Results of the GENESCAN
A: Single peak result, B: Multiple peaks result that may be regarded as multiple infection

2.5 等位基因频率分布

等位基因分布频率的分析分布图显示,三个地区样本在 2. 21 位点的等位基因分布存在差异(图 3)。云南间日疟样本等位基因分布范围最广,其基因型主要集中于 10、11、13、14 次微卫星重复类型;而海南样本基因型分布范围主要集中于 8、11、14 次,与云南间日疟样本分布有一定差异;河南样本则集中于 8、11 次微卫星重复类型,种群整体分布相对单一。通过等位基因分布频率图结果,发现三地区样本在 2. 21 微卫星位点均呈现高度多态性。

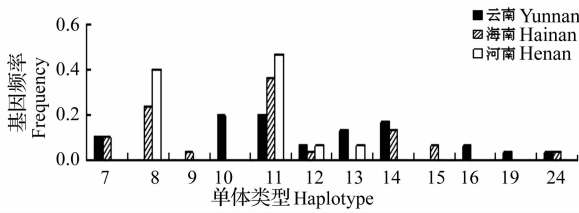


图3 三地区间日疟样本在 2.21 微卫星位点的等位基因频率分布
Fig.3 Haplotype frequency of *P. vivax* in microsatellite locus 2.21 in three areas of China

2.6 多态性分析

等位基因的个数 (number of allele, N_a) 和期望杂合度 H_e 是用于分析多态性的指标。 N_a 的差异范围反映种群间的遗传变异程度, H_e 值越接近 1, 变异度越大。3 个种群样本的 N_a 为 4 ~ 9, H_e 为 0.613 ~ 0.853 (表 2), 表明 2.21 位点在三地区间日疟种群中呈现多态性, 种群间存在较大的遗传变异。

表 2 我国不同地区间日疟原虫微卫星的多态性分析

Table 2 The characters of the microsatellite polymorphic loci of *P. vivax* in China

间日疟原虫 标本来源 Source of <i>Plasmodium</i> <i>vivax</i>	样本数 <i>n</i>	多态性指标 Index for polymorphism	
		等位基因个数 No. of allele	期望杂合度 Expeted heterozygosity
云南 Yunnan	30	9	0.853 ± 0.125
海南 Hainan	30	8	0.776 ± 0.174
河南 Henan	30	4	0.613 ± 0.237

3 讨论

近年来,我国一些地区疟疾疫情出现了回升,其中间日疟占疟疾总发病数的 80% 以上。云南、海南 2 省仍是我国疟疾的高传播地区。河南、安徽等中部地区间日疟出现明显回升。张山鹰等^[10]通过间日疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (PvMSP-1) 对我国福建、云南、安徽和海南间日疟原虫分离株进行分子生物学检测,发现等位基因型分布存在南北差异。本研究采用微卫星遗传标志分析我国不同地区间日疟原虫的种群结构,发现云南、海南和河南地区间日疟原虫具有高度的多态性,其遗传分布有各自的特点,进一步了解了我国疟疾流行区间日疟原虫的种群结构和遗传多样性特征,并为我国疟原虫遗传相关数据库提供了基础积累。本研究采用了 2.21 微卫星位点,对我国不同地区间日疟原虫进行较为全面系统的种群结构研究。研究样本形式多样,其中云南间日疟样本为全血样本,河南为滤纸样本,

海南样本为玻片样本,前两者基因组抽提 DNA 质量较高,玻片样本由于血样量少且保存时间较长,基因组抽提 DNA 质量较低。实验采用 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini Kit 试剂盒,将预热的 ATL 缓冲液滴在玻片上,待样本全部溶解后置离心管进行进一步抽提,反复几次,保证血样最大限度被利用,使抽提的基因组 DNA 浓度提高。PCR 结果显示,这样抽提的基因组扩增结果良好,可以作为玻片血样基因组扩增的方法使用。

微卫星位点的选择对种群结构的分析至关重要。国外有学者^[11]认为间日疟原虫的基因组变异度比较低,他们所选择的 13 个微卫星位点中,仅有一个位点在所用种群中是多态性的。这样的结论遭到了 Imwong 等^[9]的质疑,他们认为出现这样的结果是因为所选择的微卫星位点的重复单位的重复数太低(平均为 5.5 次重复),他们选择了 11 个重复数较高(平均为 15 次重复)的微卫星位点,对来自泰国、印度和哥伦比亚的 82 个样本进行了研究,发现了微卫星在这些种群中具有高度多态性。本研究选择 2.21 微卫星位点对中国不同地区间日疟原虫进行种群结构的分析,较为重要的原因就是它的核心重复单位重复次数较多,预实验各种群表现出较大变异度。另外我们采用半巢式 PCR 进行两轮扩增,则大大提高了产物的特异性,进一步保证了基因扫描的正确性,从而使统计结果更加可信。基因扫描是利用峰值对应长度来判定扩增片段长度的,结果较为直观,但是为了避免背景峰的干扰,必须对结果设定判断标准,即峰值高度必须大于 200 单位荧光强度,否则视为阴性结果;若次峰的高度大于主峰高度的 1/3,则有效值为两个,反之次峰可忽略^[12],我们以此保证了结果的可靠性,从而进一步进行统计学分析。

统计分析等位基因频率分布图结果显示,三个地区样本在 2.21 位点的等位基因分布存在差异,其中云南和海南间日疟样本等位基因分布范围最广,为 7 ~ 24 次,而 10 次重复等位基因类型为云南虫株所特有的基因型,海南和河南地区样本等位基因则主要集中于 8、11 次重复类型,河南样本分布相对较为集中。这提示云南和海南间日疟种群的遗传多样性较高,河南稍低,三地区种群结构有较大的差异,并且均有各自的特点。进一步对三地区样本进行进一步的多态性分析发现,云南、海南和河南三个流行地区的间日疟原虫虫株等位基因数相对较高,期望杂合度分别为 0.853, 0.776, 0.613, 这与等

位基因频率分布结果趋于一致。云南和海南种群的高变异度提示流行区复杂的地理环境及气候条件可能与之相关,不同地区种群结构具有地区特征,这可能与各种群传疟媒介种类不同有关,而云南间日疟原虫种群内部可能仍存在较大的种群差异,这值得我们进一步研究阐明。

本研究采用 1 个微卫星位点和 3 个流行区共 90 例样本进行了分析,位点数和样本数均偏少,利用更多的微卫星多态性位点进行相关的研究,可能会更加准确地反映不同种群内部和种群间的遗传多样性,从而使我们更加深入了解我国不同疟疾流行区间日疟原虫种群结构,为我国间日疟的防治提供新的思路和方法。

参 考 文 献

- [1] 周水森,王漪,房文,等. 2008 年全国疟疾形式[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(6):455-456.
- [2] Tang L. Progress in malaria control in China[J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(1):89-92.
- [3] 黄天谊,黄亚铭,王小力,等. 我国间日疟基因型种群结构及地理分布[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(5):260-264.
- [4] Su XZ, Joy DA, Gonzalez-Ceron L, et al. Local adaptation and vector-mediated population structure in *Plasmodium vivax* malaria [J]. Mol Biol Evol, 2008, 25(6):1245-1252.
- [5] Anderson TJ, Haubold B, Williams JT, et al. Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*[J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(10):1467-1482.
- [6] Machado RL, Povoas MM, Calvosa VS, et al. Genetic structure of *Plasmodium falciparum* populations in the Brazilian Amazon region [J]. J Infect Dis, 2004, 190(9):1547-1555.
- [7] Anthony TG, Conway DJ, Cox-Singh J, et al. Fragmented population structure of *Plasmodium falciparum* in a region of declining endemicity[J]. J Infect Dis, 2005, 191(9):1558-1564.
- [8] Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6(1):288-295.
- [9] Imwong M, Sudimack D, Pukrittayakamee S, et al. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*[J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(5):1016-1018.
- [10] 张山鹰,许龙善,张莹珍,等. 间日疟原虫不同 MSP-1 等位基因型形态学观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(3):234-236,205.
- [11] Leclerc MC, Durand P, Gauthier C, et al. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(40):14455-14460.
- [12] Imwong M, Nair S, Pukrittayakamee S, et al. Contrasting genetic structure in *Plasmodium vivax* populations from Asia and South America[J]. Int J Parasitol, 2007, 37(8-9):1013-1022.

(收稿日期:2012-04-18)

(本文编辑:王吉鹏,陈勤)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对题名和摘要的有关要求

题名应以准确、简明的词语反映文章中最重要、最特定的内容,一般用短语,不用具有主、谓、宾结构的完整句。中文题名一般不超过 20 个汉字。如设副标题,可用冒号将副题名与主题名分开。题名中尽量避免使用非公知公认的缩略语、字符、代号等,应使用原形词。

论著类论文的摘要采用结构式,包括目的(Objective)、方法(Method)、结果(Results)和结论(Conclusions)4 部分。目的必须明确;方法描述要具体、详细、清楚,如果有随机分组必须交代随机的方法;结果中要给出关键性或主要的数据,百分率后要在括号中给出具体的数值比;结论要与目的呼应,必须是从该文的结果中推导出,不能把与结果无关的内容写到结论中。摘要采用第三人称撰写,不列图、表,不引用文献,不加评论和解释。英文题目和摘要一般与中文摘要内容相对应。

本刊编辑部