

中缅边境恶性疟原虫 *pfmdr1* 基因多态性及 *pfmsp1* 等位基因分型研究

王珊珊¹ 董莹^{1,2*} 邓艳² 王剑²

【摘要】 目的 分析中缅边境恶性疟原虫多抗药基因 1 (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1, *pfmdr1*) 基因编码蛋白 86 位点多态性及裂殖子表面蛋白 1 (*P. falciparum* merozoite surface protein 1 gene, *pfmsp1*) 等位基因的分型特征。方法 采用 chelex-100 法提取 DNA, PCR 扩增 *pfmdr1* 基因编码蛋白 86 位点及 *pfmsp1* 基因第 2 区与第 3 区部分片段, 并对其进行 DNA 测序, 对扩增片段基因的结构、同源性进行分析。结果 检测的 50 份血样中, 49 份成功扩增 *pfmdr1* 基因, 49 份在第 25 位氨基酸均发生缺失, 且在第 27~29 位氨基酸由 STA 都突变为 EYR, 9 份在第 35 位氨基酸缺失, 第 86 位氨基酸均未发生点突变。50 份恶性疟患者样本中有 49 份共扩增出 72 个 *pfmsp1* 基因片段, 以 MAD20 型为主导型占 93.88%, KI、RO33 型为次之, 并存在不同基因株混合感染现象。结论 中缅边境恶性疟原虫株 *pfmdr1* 基因第 86 位氨基酸点无突变, *pfmsp1* 存在 MAD20 型、KI 型和 RO33 型 3 种等位基因型, 以 MAD20 型为优势虫株。

【关键词】 恶性疟原虫; *pfmsp1* 基因; *pfmdr1* 基因; 多态性; 基因分型

***pfmdr1* gene polymorphism and *pfmsp1* gene typing of *Plasmodium falciparum* from China-Myanmar border** WANG Shan-shan¹, DONG Ying^{1,2*}, DENG Yan², WANG Jian². ¹Institute of Pathogenic and Vector of Dali University (Puer division), Simao 665000, China ²Yunnan Institute of Parasitic Disease, Simao, Puer 665000, China

* Corresponding author: DONG Ying, Email: luxidongying@126.com

【Abstract】 Objective To identify fragments polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (*pfmdr1*) gene encoding protein at codon 86 and the genotype of *P. falciparum* merozoite surface protein 1 gene (*pfmsp1*) from China-Myanmar border. **Methods** Genomic DNA of *P. falciparum* was extracted by chelex-100 method, then PCR was applied to amplify fragments of *pfmdr1* gene including N86Y mutation and the Blocks 2 and 3 of *pfmsp1*. **Results** The *pfmdr1* gene N86Y mutation was not detected in 49 PCR products from the total of 50 samples. All of the PCR products had gene deletion at position 25 and mutant allele (EYR) at positions 27-30. Moreover, the position 35 of *pfmdr1* gene was deleted in 9 of 49 samples. From 48 of 50 blood samples of *P. falciparum* patients, 70 gene fragments of blocks 2 and 3 of the *pfmsp1* were amplified, of which the MAD20-type allele was dominant (93.88%), followed by KI-type and R033-type alleles. Also, mixed infection phenomena of the different allelic type existed. **Conclusion** The *pfmdr1* gene encoding protein at codon 86 has no mutation and three principal allelic types of *pfmsp1* gene (MAD20, KI and R033 type) exist in China-Myanmar border, and the MAD20-type is dominant.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*; *pfmsp1* gene; *pfmdr1* gene; Polymorphism; Genotyping

疟疾仍是当前全球严重的公共健康问题, 每年约有 2.4 亿人发病 88.1 万人死亡^[1]。近年来的研究表明疟原虫的遗传多样性与其对宿主的感染性、致病力、免疫学特性和药物敏感性等密切相关, 它严重影响着疟疾发病率和死亡率。一方面恶性疟原虫多抗药基因 1 (*Plasmodium falciparum* multidrug

resistance 1, *pfmdr1*) 多态性与恶性疟原虫的青蒿琥酯、阿莫地喹、奎宁、氯喹以及甲氟喹等抗性有关, 且 86 位点被认为是抗疟药抗性产生的关键性突变位点^[2-4]。另一方面恶性裂殖子表面蛋白 (*P. falciparum* merozoite surface protein, PFMSPI) 参与疟原虫裂殖子入侵红细胞的过程, 同时能诱导宿主产生免疫应答效应, 且 *pfmsp1* 基因具有独特的序列特征及多态性, 因此存在着独特的等位基因类型^[5]。而中缅边境恶性疟原虫这方面的研究较少, 本研究对中缅边境恶性疟原虫虫株 *pfmdr1* 基因多态性和 *pfmsp1* 基因进行分型, 了解该地区恶性疟原虫虫株

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2012.02.004

作者单位: ¹665000 普洱, 大理学院病原与媒介生物研究所普洱分部

²665000 普洱, 云南省寄生虫病防治所

* 通信作者: 董莹, Email: luxidongying@126.com

的基因类型、分布特点,为其分子流行病学研究及研制有效的疟疾疫苗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

2010 年 7—9 月在中缅边境拉扎地区选择 2 ~ 60 岁、有发热(38℃以上)等疟疾症状、镜检为单一恶性疟原虫感染,尚未服用抗疟药或有抗疟作用的抗生素类药物的疟疾患者为研究对象

1.2 虫株来源

取患者外周耳垂血约 20 μl 滴于滤纸上,室温下干燥,置塑料袋中 -20℃ 保存

1.3 基因组 DNA 的提取

去离子水浸泡 3 mm × 3 mm 大小的滤纸血迹 30 min,去滤纸 13 224 × g 离心 5 min 后去上清加

10% Chelex-100 100 μl 置 56℃ 水浴 30 min,剧烈震荡后置沸水浴 10 min,13 224 × g 离心 5 min,吸取上清, -20℃ 保存备用。

1.4 目的基因的扩增

根据参考文献[6-7]设计引物(表 1)来扩增 *pfmdr1* 基因及 *pfmsp1* 基因。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,主要试剂均购自上海生工生物工程技术有限公司。体积 50 μl 的 PCR 反应体系中含 2 μl 5 U/L *Taq* 酶、2 μl 25 mmol/L MgCl₂、2 μl 2.5 mmol/L dNTPs 以及各 2 μl 的 10 pmol/μl 上下游引物,去离子水 36 μl 和模板 4 μl。反应条件见表 1。*pfmsp1* 基因采用巢式 PCR 进行扩增,第一次扩增反应用 4 μl 上述制备的 DNA 作模板,第二次扩增反应用 4 μl 第一次反应产物作模板。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色后,在凝胶成像仪上观察摄像并记录结果。

表 1 *pfmdr1* 和 *pfmsp1* PCR 反应的引物序列及条件

Table 1 PCR amplification of fragments containing *pfmdr1* and *pfmsp1* gene

基因型 Genotype	引物 ^a Primer ^a	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	等位基因 Allele type	PCR 条件 PCR condition
<i>pfmdr1</i>	MDR1 - R	ATA AAC CTA AAA Agg AAC Tgg	PfMDR1/N86Y	30 个循环(94℃/ 30s, 55℃/30s, 72℃/1min)
	MDR1 - F	Tgg TAA CCT CAg TAT CAA AgA A		
<i>pfmsp1</i>	MSP1 - 1	AAT AAg gCT AAT gTA AAA Tg	非特异性	30 个循环(94℃/ 30s, 49℃/40s, 70℃/2min)
	MSP1 - 2	ggA TCA gTA AAT AAA CTA TA	非特异性	
	MSP1 - 3	ggT TCA ggT AAT TCA ACA CgT AC	MAD20 型	30 个循环(94℃/ 30s, 57℃/40s, 70℃/30s), 72℃ 5min
	MSP1 - 4	TCT TAA ATg AAg AAg AAA TTA CTA CAA A	KI 型	
	MSP1 - 5	TAA AgC ATg CAg CAA ATA CTC AAg T	RO33 型	
	MSP1 - 6	ACA TAT gAT Tgg TTA AAT CAA AgA g	通用	

a: MSP1-1 和 MSP1-2 为外引物; MSP1-3、MSP1-4 和 MSP1-5 分别与 MSP1-6 组成 3 对内引物

a: MSP1-1 and MSP1-2 are external primers, MSP1-3, MSP1-4 and MSP1-5 combined with MSP1-6 respectively are internal primers

1.5 序列测定和分析

将目的条带阳性的扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。应用 GenBank 的 Blastp 程序对扩增基因的结构、同源性比较等进行计算机辅助分析。

2 结果

2.1 一般情况

50 例恶性疟原虫感染患者,平均年龄 24.5 岁(4 ~ 51 岁)。原虫血症几何平均数为 11 612 个/μl 血,原虫密度为 50 ~ 450 000 个/μl 血液。

2.2 *pfmdr1* 基因的 PCR 扩增

50 份血样经 PCR 扩增含有第 86 位氨基酸的 *pfmdr1* 基因片段,结果 49 份样本为阳性,片段约为 520 bp,与预测值大小相符。

2.3 *pfmsp1* 基因分型结果

50 份样本有 49 份扩增出阳性条带。其中 46 份扩增出 MAD20 型基因片段,长度为 150 ~ 160 bp; 15 份扩增出 K1 型基因片段,长度在 264 ~ 390 bp 之间; 11 份扩增出 RO33 型基因片段,长度约 270 bp。5 份血样同时扩增出 MAD20、K1 和 RO33 型序列片段; 7 份血样同时扩增出 MAD20、K1 型序列片段; 6 份血样同时扩增出 MAD20、RO33 型序列片段(表 2)。

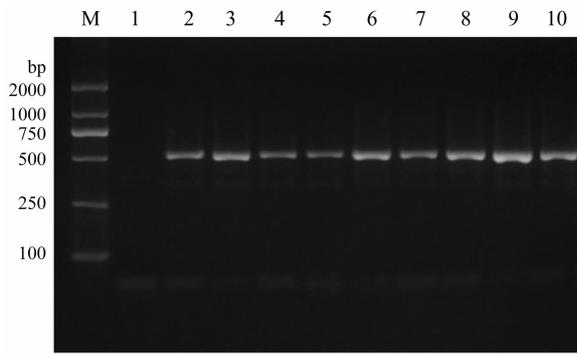


图1 *pfmdr1* 基因片段 PCR 产物
M: DNA 标志物 DL2000, 1~10: 血样
Fig. 1 PCR products of *pfmdr1* gene fragments
M: DL2000 marker, 1-10: Samples

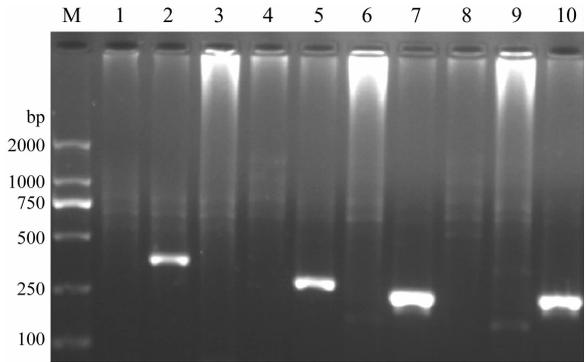


图4 *pfmsp1* 基因 k1 等位基因型电泳结果
M: DNA 标志物 DL2000, 1~10: 血样
Fig. 4 Electrophoresis result of *pfmsp1* gene RO33 type
M: DL2000 marker, 1-10: Samples

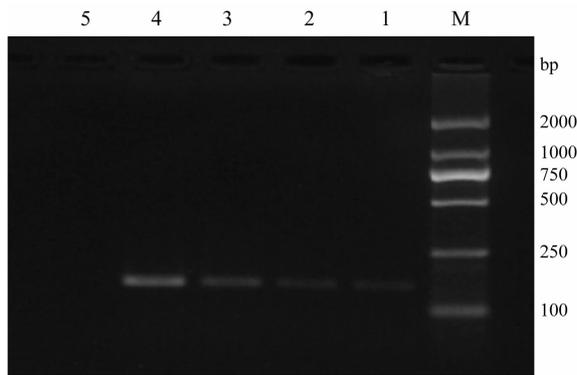


图2 *pfmsp1* 基因 MAD20 等位基因型 PCR 产物
M: DNA 标志物 DL2000, 1~5: 血样
Fig. 2 Electrophoresis result of *pfmsp1* gene MAD20 type
M: DL2000 marker, 1-5: Samples

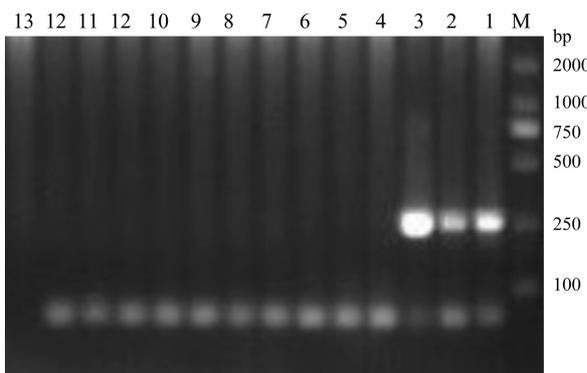


图3 *pfmsp1* 基因 RO33 等位基因型电泳结果
M: DNA 标志物 DL2000, 1~13: 血样
Fig. 3 Electrophoresis result of *pfmsp1* gene RO33 type allele
M: DL2000 marker, 1-13: Samples

表2 中缅边界恶性疟原虫 *pfmsp1* 基因分型

Table 2 Allele type in *pfmsp1* of *P. falciparum* from China-Myanmar border

感染类型 Type of infection	等位基因型 Allele	阳性例数 No. positive cases	百分率(%) Percentage(%)
单型感染 Single infection	MAD20	28	57.15
	K1	3	6.12
混合感染 Mixed infection	MAD20 + K1	7	14.29
	MAD20 + RO33	6	12.23
	MAD20 + K1 + RO33	5	10.21
合计		49	100

生突变。而在第 25 位氨基酸处均发生氨基酸缺失，且在第 27~29 位氨基酸由 STA 都突变为 EYR, 9 份在第 35 位氨基酸缺失造成读码框向后移一位。

3 讨论

pfmdr1 基因转录水平增强导致产物量增加, 加速抗疟药外排从而产生抗性; *pfmdr1* 基因部分位点突变也可能增强蛋白功能达到同样的效果^[8], 一些研究发现 *pfmdr1* 基因 86 等位点突变同抗疟药抗性的产生具有重要的关联性^[2,4,8]。本研究分析了 49 例中缅边境恶性疟原虫感染者的恶性疟原虫株 *pfmdr1* 基因 86 位点的多态性, 结果表明未发现恶性疟原虫存在 86 位点突变, 即全部虫株 *pfmdr1* 基因 86 位点的氨基酸均为野生型(天冬酰胺), 同样对恶性疟原虫海南株的研究, 于丹等未发现 86 位点突变^[9], 官亚宜等^[10] 仅检测到 3.4% 86 位点突变, 这也与泰国 9% 的检出率相似。而与云南株 *pfmdr1* 基因 86 的位点突变 47.4% 不相一致^[11]。本研究还发现 49 例中缅边境恶性疟样本的 *pfmdr1* 基因在第 25 位氨基酸处均发生氨基酸缺失, 且在第 27~29 位氨

2.4 目的基因序列测定与分析

序列同源性分析表明, 这些序列与恶性疟原虫 3D7 虫株基因序列(XM_001351751.1, GI: 124506378) 相比经测序 *pfmdr1* 基因第 86 位氨基酸均为 N, 未发

基酸由 STA 突变为 EYR,9 份在第 35 位氨基酸缺失造成读码框向后移一位。该地区是否存在抗药株需进行相关体外药物敏感性试验或体内治疗反应的监测来进一步明确。

恶性疟原虫 MSP1 分子第 2 区为高变区,主要由不同类型的串联重复序列构成,在不同虫株间有较大的变异存在显著的多态性^[5]。本研究以 MSP1-R2 区为基因标志物,结果表明中缅边境恶性疟原虫种群的 MSP1 等位基因同时存在 3 种类型,即 MAD20 型、K1 型和 RO33 型,以 MAD20 型为优势虫株及当地不同等位基因型虫株的混合感染率均与云南株的报告结果相似^[12],与海南株略有差异^[7,13-14](海南株尚未发现 RO33 型),与非洲、美洲等地区以 K1 型或 RO33 型为优势虫株差异更大^[15-16]。恶性疟原虫 MSP1 在不同的国家或同一国家不同地区均存在着抗原变异。某一地区恶性疟原虫种株的基因分型及变异程度与可能患者的年龄、遗传特性有一定的关系。

志谢 感谢云南省寄生虫病防治所中心实验室的大力支持和帮助;感谢云南省寄生虫病防治所提供恶性疟原虫标本。

参 考 文 献

- [1] Alam MT, de Souza DK, Vinayak S, et al. Selective sweeps and genetic lineages of *Plasmodium falciparum* drug-resistant alleles in Ghana[J]. J Infect Dis, 2011, 203(2):220-227.
- [2] Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, et al. Systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in falciparum malaria[J]. Malar J, 2009, 8:89.
- [3] Mungthin M, Suwandittakul N, Chaijaroenkul W, et al. The patterns of mutation and amplification of *Plasmodium falciparum* pfert and pfmdr1 genes in Thailand during the year 1988 to 2003[J]. Parasitol Res, 2010, 107(3):539-545.
- [4] Bin Dajem SM, Al-Qahtani A. Analysis of gene mutations involved in chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* parasites isolated from patients in the southwest of Saudi Arabia[J]. Ann Saudi Med, 2010, 30(3):187-192.
- [5] Holder AA, Blackman MJ. What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite[J]? Parasitol Today, 1994, 10(5):182-184.
- [6] 宋杰, 江钢锋, 陈沛泉. 海南省恶性疟原虫氯喹抗性相关基因 pfmdr1 多态性分析[J]. 热带医学杂志, 2005, 5:26-29.
- [7] 江钢锋, 洪佳冬, 陈沛泉, 等. 恶性疟原虫海南分离株裂殖子表面蛋白 1 基因的分型研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1):4-6.
- [8] Duraisingh MT, Darkeley CJ, Muller O, et al. Evidence for selection for the tyrosine-86 allele of the pfmdr1 gene of *Plasmodium falciparum* by chloroquine and amodiaquine[J]. Parasitology, 1997, 114 (Pt 3):205-211.
- [9] 于丹, 江钢锋, 陈沛泉. 恶性疟原虫海南分离株 pfmdr1 基因与氯喹抗性的相关性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23 (11):1143-1146.
- [10] 官亚宜, 汤林华, 胡铃, 等. 海南恶性疟原虫分离株 pfert 和 pfmdr1 基因点突变的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(3):135-138.
- [11] 杨亚明, Adagu IS, 高百荷, 等. 氯喹抗性相关基因 pfmdr1 两个突变点的初步研究[J]. 中国公共卫生, 2001, 17(11):1058-1059.
- [12] 诸欣平, 周蕾, 刘强, 等. 云南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 基因分型及测序[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(3):155-158.
- [13] 宋杰, 江钢锋, 陈沛泉. 套式 PCR 用于海南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 和 2 的分型研究[J]. 热带医学杂志, 2002, 2(3):230-232.
- [14] 江钢锋, 宋杰, 陈沛泉, 等. 海南省恶性疟原虫 MSP1 和 MSP2 等位基因分型研究[J]. 华南预防医学, 2003, 29(2):9-11.
- [15] Jiang G, Daubenberger C, Huber W, et al. Sequence diversity of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from The Kilombero district, Tanzania[J]. Acta Trop, 2000, 74(1):51-61.
- [16] Snewin VA, Herrera M, Sanchez G, et al. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia[J]. Mol Biochem Parasitol, 1991, 49(2):265-276.

(收稿日期:2011-10-17)

(本文编辑:卢延鑫,陈勤)