

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0043-03

【实验研究】

PCR-RFLP 检测输入性恶性疟原虫 *Pfcr*t 基因多态性

周水茂, 杨燕, 吴凯, 陈智, 徐明星, 刘勇, 王重新

【摘要】 目的 了解来自不同流行区输入性恶性疟原虫 *Pfcr*t 基因 K76T 的点突变情况, 探讨恶性疟原虫 *Pfcr*t 基因多态性。方法 采集 2008–2012 年从非洲 (尼日利亚、赤道几内亚、刚果、利比里亚、安哥拉和马里) 和东南亚 (缅甸和印度尼西亚) 等疟疾流行区回国人员恶性疟现症患者血样共 72 份, 根据恶性疟原虫 *Pfcr*t 基因序列设计巢式 PCR 引物, 以血样中的恶性疟原虫 DNA 为模板, 进行巢式 PCR, 扩增产物经限制性内切酶 *Apo* I 酶切后鉴定。结果 72 份输入性恶性疟现症患者血样中, 71 份扩增出目的条带。扩增产物酶切结果显示, 突变型 *Pfcr*t 等位基因 41 份 (57.7%, 41/71), 野生型 *Pfcr*t 等位基因 30 份 (42.3%, 30/71)。其中非洲 6 国 50 份血样中, 野生型和突变型各 25 份 (50%, 25/50); 缅甸和印度尼西亚 21 份血样中, 野生型 5 份 (23.8%, 5/21), 突变型 16 份 (76.2%, 16/21)。结论 来自不同流行区的恶性疟原虫分离株 *Pfcr*t 基因突变出现率不同。

【关键词】 输入病例; 恶性疟原虫; *Pfcr*t 基因; 多态性

中图分类号: R382.31

文献标识码: A

Analysis of *Pfcr*t Gene Polymorphism in *Plasmodium falciparum* from Imported Cases

ZHOU Shui-mao, YANG Yan, WU Kai, CHEN Zhi, XU Ming-xing, LIU Yong, WANG Chong-xin

(Centre for Disease Control and Prevention of Wuhan, Wuhan 430015, China)

【Abstract】 Objective To identify the incidence of the K76T mutation in *Pfcr*t gene of imported *Plasmodium falciparum* and study the *Pfcr*t gene polymorphism in *Plasmodium falciparum*. **Methods** Seventy-two blood samples were collected from patients infected with *P. falciparum* returning from Africa (Nigeria, Equatorial Guinea, Congo, Liberia, Angola and Mali) and Southeast Asia (Myanmar and Indonesia) from 2008 to 2012. According to *Pfcr*t gene sequence of *P. falciparum*, nested PCR primers were designed, and the reaction was applied with *P. falciparum* DNA in the blood samples as templates. PCR products were identified by *Apo* I digestion. **Results** Among 72 blood samples of *P. falciparum*, mutant *Pfcr*t alleles were found in 41 samples (57.7%, 41/71) and wild type *Pfcr*t alleles were found in 30 samples (42.3%, 30/71). There were 25 samples (50%, 25/50) each with mutant *Pfcr*t alleles or wild type that were from Africa, while 16 samples (76.2%, 16/21) with mutant *Pfcr*t alleles and 5 samples (23.8%, 5/21) with wild type that were from Southeast Asia, respectively. **Conclusion** The incidence of *Pfcr*t gene mutation is different in *P. falciparum* isolates from different regions.

【Key words】 Imported cases; *Plasmodium falciparum*; *Pfcr*t gene; Polymorphism

疟疾是当今严重危害人类健康的一种虫媒寄生虫病。恶性疟在世界范围内流行形势严峻, 2010 年有逾 2 亿病例和约 65.5 万死亡病例, 许多疟疾流行国家诊断资源有限, 特别是在农村地区^[1]。恶性疟原虫的抗药性对疟疾控制非常重要, 也是近半个世纪以来全球控制疟疾受挫的重要原因^[2], 成为疟疾防治工作的一大障碍。氯喹是应用范围最广的抗疟药, 自 20 世纪 50 年代末 60 年代初, 抗氯喹恶性疟出现在南美

洲和东南亚, 并不断扩散, 导致对氯喹的抗药性 (chloroquine resistance, CQR) 几乎遍及所有恶性疟流行地区, 疟原虫的抗性已成为全球控制疟疾的技术难题^[3]。

Fidock 等^[4]研究发现, 恶性疟原虫对氯喹抗性转运载体基因 *Pfcr*t (*Plasmodium falciparum* chloroquine resistant transporter) 位于 7 号染色体上, 编码的蛋白为恶性疟原虫氯喹转运蛋白 (*PfCRT*), 所有抗性株中均在 *Pfcr*t 基因的 76 位 (K76T) 发生点突变, 而所有敏感株则均无此突变, 因此认为恶性疟原虫的

CQR 表型可能由 *Pfcr*t 基因 76 号编码突变决定。*Pfcr*t 已成为目前恶性疟原虫抗药性基因研究的重点^[5]。本实验采集非洲和东南亚等疟疾流行区回国人员中的疟疾现症患者血样, 分析输入性恶性疟原虫 *Pfcr*t 基因多态性。

材料与方 法

1 主要试剂和仪器

*Taq*DNA 聚合酶购自加拿大 BioStar 公司, 琼脂糖购自法国 BIOWEST 公司, 三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 购自美国 Pharmacia 公司, DNA 标志物购自洛阳市华美生物工程有限公司, 限制性内切酶 *Apo* I 购自加拿大 Fermentas 公司。Gene Amp PCR System 2400 扩增仪为美国 Perkin Elmer 公司产品, PTC-200 Peltier Thermal Cycler 梯度 PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品, Cole-Parmer 28560-00 电泳仪为美国热电公司产品, Gene Genius Bio-Imaging System 凝胶成像系统为英国 Syngene 公司产品。

2 方 法

2.1 样本来源 采集 2008–2012 年从非洲和东南亚等疟疾流行区回国人员中的恶性疟现症患者血样 72 份 (显微镜检查阳性), 其中非洲 51 份, 东南亚 21 份。患者均知情同意。

2.2 滤纸血标本制作 从患者手指或耳垂取血, 制作 2 个直径约 1.2 cm 的滤纸血滴 (每个血滴相当于全血量 20 μ l), 做好标记, 滤纸血自然干燥后封入塑料袋中, 4 $^{\circ}$ C 或室温保存。

2.3 PCR 模板的制备^[6] 剪下滤纸干血滴, 置于 1.5 ml 离心管中, 加入蒸馏水 1 ml 溶血 1~2 h, 吸取至另 1.5 ml 离心管中, 400 \times g 离心 10 min, 弃上清, 加入蒸馏水 0.5 ml 洗涤 3 次, 弃上清, 加入蒸馏水 20 μ l, -20 $^{\circ}$ C 保存。

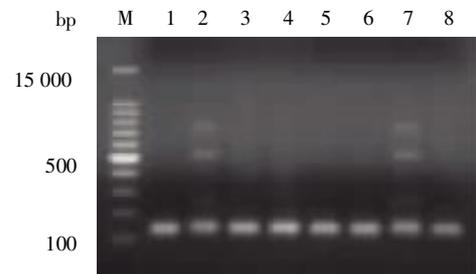
2.4 巢式 PCR 扩增 根据恶性疟原虫氯喹抗性基因 *Pfcr*t 序列设计 PCR 引物 2 对^[7,8], 由上海英骏生物技术有限公司合成。外引物 p1: 5'-CCGTTAATAATAAA-TACACGCAG-3', p2: 5'-C GGATGTTACAAAACATA-GTTACC -3'; 内引物 p3: 5'-TGTGCTCATGTGTTTAACTT-3', p4: 5'-CAAAACTATAGTTACCAATTTT-3'。巢式 PCR 反应体系: DNA 模板 2 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, *Taq*DNA 聚合酶 0.15 μ l, 25 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷酸 (dNTP)、20 mmol/L 外引物 p1 和 p2 各 0.5 μ l, ddH₂O 补足至 25 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 92 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 45 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 65 $^{\circ}$ C 5 min。第 2 轮 PCR 反应体系: 10 \times PCR 缓冲液

2.5 μ l, *Taq*DNA 聚合酶 0.15 μ l, dNTP、内引物 p3 和 p4 各 0.5 μ l, 第 1 轮 PCR 产物 1 μ l 作为模板, ddH₂O 补足至 25 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 92 $^{\circ}$ C 30 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环; 65 $^{\circ}$ C 5 min。取第 2 轮 PCR 反应产物 8 μ l, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察。2.5 酶切分析 取第 2 轮 PCR 扩增产物 10 μ l, 加入含 0.1 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 的 10 \times Tango 缓冲液 2 μ l, 限制性内切酶 *Apo* I 0.4 μ l, 加灭菌双蒸水至 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 过夜。1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电泳 40 min, 凝胶成像分析系统摄影记录。

结 果

1 PCR 扩增结果

72 份血样中, 71 份均扩增出 134 bp 的目的条带, 1 份来源于非洲的血样未扩增出目的条带 (图 1)。



M: DNA 标志物; 1~8: 恶性疟现症患者血样。

M: DNA marker; 1-8: Blood samples of *P. falciparum* patients.

图 1 血样 PCR 扩增结果

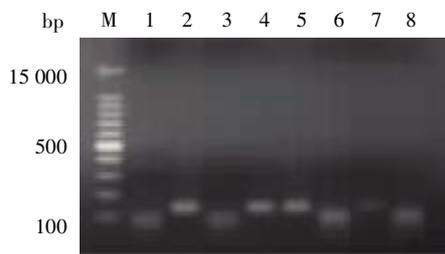
Fig. 1 PCR amplification of blood samples

2 酶切结果

71 份 PCR 扩增产物经限制性内切酶 *Apo* I 酶切, 其中 41 份未被酶切, 目的条带大小为 134 bp, 为 *Pfcr*t 等位基因突变型 (57.7%, 41/71); 30 份酶切为 100 bp 和 34 bp 的 2 个片段, 为 *Pfcr*t 等位基因野生型 (42.3%, 30/71) (图 2)。其中, 源自尼日利亚、赤道几内亚、刚果、利比里亚、安哥拉和马里等 6 国回归人员的 50 份血样中, 野生型和突变型各 25 份 (25/50, 50%); 源自缅甸和印度尼西亚回归人员 21 份血样中, 野生型 5 份 (23.8%, 5/21), 突变型 16 份 (76.2%, 16/21)。

讨 论

随着经济发展, 人群流动和劳务输出不断增加, 近年来境外感染疟疾病例输入逐年增多^[9]。本实验结果表明, 71 份血样中, *Pfcr*t 等位基因突变型占 57.7% (41/71), *Pfcr*t 等位基因野生型占 42.3% (30/71)。其中缅甸和印度尼西亚 2 个东南亚国家的恶性疟 *Pfcr*t



M: DNA 标志物; 1、3、6、8: 野生型; 2、4、5、7: 突变型。
M: DNA marker; 1, 3, 6, 8: Wild-type; 2, 4, 5, 7: Mutant type.

图 2 PCR 产物酶切结果

Fig. 2 Results of digested PCR products

基因突变型 (76.2%) 高于 6 个非洲国家 (尼日利亚、赤道几内亚、刚果、利比里亚、安哥拉和马里等, 50%), 提示来自不同流行区的分离株, 其基因突变出现率也不同。任何一种药物经过长时间的使用后都会使其作用机体产生一定的耐受性。如用药不规范、剂量不足、治疗不彻底、重复使用等均可致使恶性疟原虫对氯喹产生抗性。产生抗性后停止使用氯喹, 其抗性程度呈下降趋势, 药物敏感株有所增加。Kublin 等^[10]在马拉维研究发现, 氯喹停用多年后, 对氯喹敏感的恶性疟原虫又重新出现。目前非洲治疗疟原虫主要用药为蒿甲醚, 对治疗抗氯喹恶性疟效果较好。

*Pfcr*t 基因某些位点突变可能是恶性疟原虫产生氯喹抗性的关键性因素^[11,12], 但不是疟原虫对氯喹产生抗性的惟一因素, 如 *Pfmdr*1 等其他基因突变、宿主免疫状况和该地区的用药情况等均可能影响氯喹抗性的产生和发展^[13], 但 K76T 点突变存在于所有抗性虫株中^[4], 其点突变较敏感, 更容易产生氯喹抗性。也有研究发现, 并非所有 CQR 虫株均发生 K76T 突变, 一些氯喹敏感 (CQS) 虫株也能检测到该突变的存在^[11,14]。不同基因型的恶性疟原虫株其致病性、抗原性、对药物的敏感性和流行病学特征都有可能不同^[15], 为疟疾防治工作带来困难。目前 *Pfcr*t 基因 K76T 突变在研究氯喹抗药性方面仍十分重要, 对其突变的鉴别可以筛检出抗氯喹恶性疟原虫的感染, 有助于采取正确的治疗方案。对输入性疟疾患者进行分

子水平的抗性监测, 有利于了解不同来源地的输入性恶性疟的抗性类型和抗性程度, 并对抗性变化采取早期预警, 为采取正确的防治措施提供重要的科学依据。

参 考 文 献

- [1] Autino B, Noris A, Russo R, *et al.* Epidemiology of malaria in endemic areas[J]. J Infect Dis. 2012, 4(1): e2012060.
- [2] Ndiaye M, Faye B, Tine R, *et al.* Assessment of the molecular marker of *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance (*Pfcr*t) in Senegal after several years of chloroquine withdrawal [J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 87(4): 640-645.
- [3] 官亚宜, 汤林华. 恶性疟原虫药物抗性相关的分子标记及其在药物抗性监测中的应用 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(2): 117-120.
- [4] Fidock DA, Momura T, Talley AK, *et al.* Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein *PfCRT* and evidence for their role in chloroquine resistance [J]. Mol Cell, 2000, 6(4): 861-867.
- [5] Chen N, Kyle DE, Pasay C, *et al.* *Pfcr*t allelic types with two novel amino acid mutations in chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* isolates from the Philippines [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11): 3500-3505.
- [6] 周水茂, 王重新, 吴凯, 等. 巢式 PCR 技术在输入性疟疾监测中的应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2011, 29(1): 43-45.
- [7] Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, *et al.* A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria [J]. N Engl J Med, 2001, 344(4): 257-263.
- [8] 汤林华. 输入性疟疾诊治与管理 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 79-81.
- [9] 陈家英, 叶道光, 郑萍. 福州市 63 例输入性疟疾病例分析[J]. 医学动物防制, 2003, 19(7): 411-412.
- [10] Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, *et al.* Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi [J]. J infect Dis, 2003, 187(12): 1870-1875.
- [11] 宋杰, 江钢锋, 沈际佳. 恶性疟原虫氯喹抗性相关基因的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2003, 19(2): 158-159.
- [12] Syafruddin D, Asih PB, Casey GJ, *et al.* Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia[J]. Am J Trop Med Hyg, 2005, 72(2): 174-181.
- [13] 于丹, 江钢锋, 陈沛泉. 恶性疟原虫海南分离株 *Pfcr*t 基因同氯喹抗性的相关性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2008, 3 (1): 39-42.
- [14] Pillai DR, Labbe AC, Vanisaveth V, *et al.* *Plasmodium falciparum* malaria in Laos: chloroquine treatment outcome and predictive value of molecular markers[J]. JID, 2001, 183(5): 789-795.
- [15] Martin SK, Oduola AM, Milhous WK. Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil [J]. Science, 1987, 235(4791): 899-901.

(收稿日期: 2012-09-03 编辑: 张争艳)