

【研究简报】

文章编号: 1000-7423(2013)-06-0483-03

间日疟原虫环孢子蛋白 PCR-RFLP 多态性分析

刘颖, 周瑞敏, 陈伟奇, 钱丹, 赵玉玲, 赵旭东, 许汴利, 苏云普, 张红卫*

【提要】 采集 2011 年河南省间日疟原虫阳性患者血样, 用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 法分析环孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 基因型, 并结合流行病学资料进行初步种群分布分析。共采集间日疟患者血样 37 份, 根据流行病学调查确定河南当地感染病例血样 26 份, 输入性病例血样 11 份。37 份血样均扩增出 1 条约 750 bp 的条带。PCR-RFLP 结果显示, CSP 基因 PV-II 型 1 份, 占 2.7%, PV-I 型 36 份, 占 97.3%。26 份当地病例血样 CSP 基因均为 PV-I 型, 其中 PV-I-a 型占 42.3% (11/26), PV-I-b 型占 57.7% (15/26); 11 份输入病例血样中, PV-I-a 型占 90.9% (10/11), PV-II 型占 9.1% (1/11), 未见 PV-I-b 型。提示河南省当地流行的间日疟病例中, CSP 基因 PV-I-b 型略多于 PV-I-a 型; 输入性间日疟病例中 PV-I-a 型占优势。

【关键词】 河南; 间日疟原虫; 环孢子蛋白; 基因型

中图分类号: R382.311

文献标识码: B

Polymorphism Analysis on the Genotypes of Circumsporozoite Protein of *Plasmodium vivax* with PRC-RFLP

LIU Ying, ZHOU Rui-min, CHEN Wei-qi, QIAN Dan, ZHAO Yu-ling, ZHAO Xu-dong,
XU Bian-li, SU Yun-pu, ZHANG Hong-wei*

(Center for Disease Control and Prevention of Henan Province, Zhengzhou 450016, China)

【Abstract】 Thirty-seven blood samples from *Plasmodium vivax*-infected patients were collected in Henan Province in 2011. The gene for circumsporozoite protein (*Pv*CSP) was amplified by nested PCR. According to the epidemiological data, among the 37 *Plasmodium vivax* malaria cases, 26 were indigenous cases and 11 were imported cases. A fragment of 750 bp was obtained in the 37 blood samples. The 750 bp PCR product was digested with restriction endonuclease *Alu*-I and *Mva*-I, and genetic polymorphism was investigated with PCR-RFLP. PCR-RFLP analysis of *Pv*CSP revealed that the parasites were PV-I type (97.3%, 36/37) and PV-II type (2.7%, 1/37). 26 samples from indigenous cases were exclusively PV-I type with PV-I-b type (57.7%, 15/26) and PV-I-a type (42.3%, 11/26). Among 11 samples from imported cases, PV-I-a type accounted for 90.9% (10/11), and 1 PV-II type accounted for 9.1% (1/11), no PV-I-b type were detected.

【Key words】 Henan; *Plasmodium vivax*; Circumsporozoite protein; Genotype

* Corresponding author, E-mail: zhwei69@163.com

间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*) 在 4 种感染人的疟原虫中分布最广, 包含许多株、型。不同株、型疟原虫的生物学特性、对媒介按蚊的反应、对人类宿主的免疫原性以及对抗疟药物的敏感性等均有明显差异, 并直接影响疟疾的流行过程, 关系到制定合理的防治策略和措施^[1]。近年来, 随着经济全球化的发展, 国际化的劳务输出日益频繁, 输入性间日疟患者逐年增多, 中国政府提出至 2020 年在全国范围内消除疟疾, 因此, 区分本省当地感染病例和输入性病例的间日疟原虫的基因型, 对防治和研究工作等有实际意义。

环孢子蛋白 (circumsporozoite protein, CSP) 是疟原虫

孢子表达的一种期特异性表面抗原, 根据 CSP 基因序列的不同, 中国的间日疟原虫可区分为具有明显地理分布特征的 PV-I 型温带族、热带族和 PV-II 型等 3 大类群^[2]。本研究采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 法, 对 2011 年采集到的河南省镜检确诊的间日疟患者血样进行基因型的初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血样来源 收集 2011 年河南省经镜检确诊为阳性的全部间日疟患者血样, 根据流行病学调查结果判定为本地病例和输入病例。取患者外周血或静脉血制作成滤纸血, 常温干燥后, -20℃ 保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器 PCR 绿色体系套装 (Go Taq Green

作者单位: 河南省疾病预防控制中心, 郑州 450016

* 通讯作者, Email: zhwei69@163.com

Master Mix) 购自美国Promega公司, 琼脂糖购自日本TaKaRa公司, 核酸提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit) 购自德国Qiagen公司, 限制性内切酶*Alu- I* 和*Mva- I* 由上海生工生物工程有限公司合成。icycle PCR扩增仪和GELDOC凝胶成像系统为美国Bio-Rad公司产品。

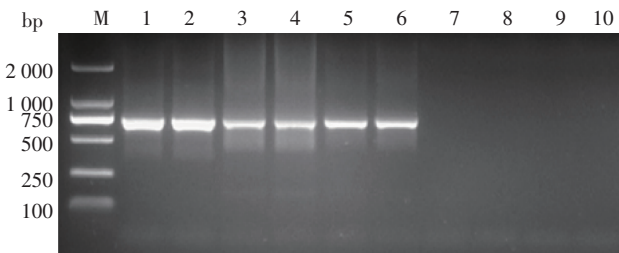
1.2 方法

1.2.1 DNA提取 用核酸提取试剂盒提取滤纸血中间日疟原虫DNA, 按照说明书操作, 获得100 μl DNA, -20℃保存。恶性疟原虫DNA为本室保存。

1.2.2 引物设计和合成 引物设计参照文献 [3], 第1轮上游引物F1: 5'-ATGTAGATCTGTCCAAGGCCATAAA-3', 下游引物R1: 5'-TAATTGAATAATGCTAGGACTAACAATATG-3'。第2轮上游引物F2: 5'-GCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAG-3', 下游引物R2: 5'-CCAACGGTAGCTCTAACTTTATCTAGG-TAT-3'。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 巢式PCR 巢式PCR反应分2轮进行, 第1轮反应扩增体系为: 2×PCR MasterMix 10 μl, 模板DNA (50 ng/μl) 1 μl, 外侧引物F1、R1 (10 μmol/μl) 各1 μl, 用ddH₂O补至20 μl。扩增条件为: 95℃ 4 min; 95℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共25个循环; 72℃ 7 min。第2轮扩增反应以第1轮的扩增产物为模板, 反应体系为: 2×PCR MasterMix 20 μl, 第1轮产物2 μl, 外侧引物F2、R2 (10 μmol/μl) 各2 μl, 用ddH₂O补至40 μl; 扩增条件为: 95℃ 4 min; 95℃ 1 min, 62℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共30个循环; 72℃ 7 min。以恶性疟原虫DNA为对照。取10 μl第2轮扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, 核酸染料 (Goldview) 染色, 凝胶成像系统观察结果。

1.2.4 PCR-RFLP分析 在对第2轮扩增产物经电泳后进行分析的基础上, 对阳性样品 (在目的片段上出现特征性条带的为阳性) 分别用*Alu- I* 和*Mva- I* 进行酶切反应, 琼脂糖凝胶电泳确定间日疟亚型。具体步骤为: 在体系中分别加入*Alu- I* 和*Mva- I* 各2 μl, 缓冲液2 μl, 二轮扩增产物16 μl, 总体积20 μl。轻轻混匀, 震荡后, 在37℃温箱中孵育3 h, 取10 μl酶切产物在1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳, 凝胶成像系统进行拍照并记录结果。基因型判定标准: 能被*Alu- I* 切开, 而不能被*Mva- I* 切开的为PV- I型; 能被*Mva- I* 切开, 而不能被*Alu- I* 切开的为PV- II型^[4]。



M: DNA 标志物; 1-6: 间日疟原虫血样; 7-10: 恶性疟原虫血样。

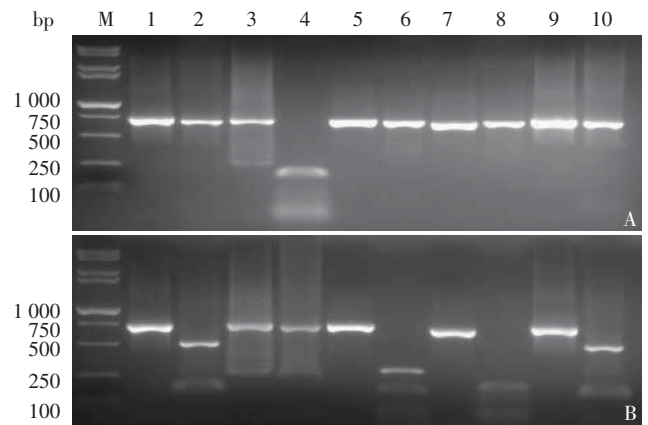
图1 PvCSP 基因扩增产物

2 结果

2.1 *Pv*CSP 基因扩增结果 37份血样经巢式PCR扩增, 均能扩增出一条约750 bp的条带, 对照组未扩增出任何条带 (图1)。

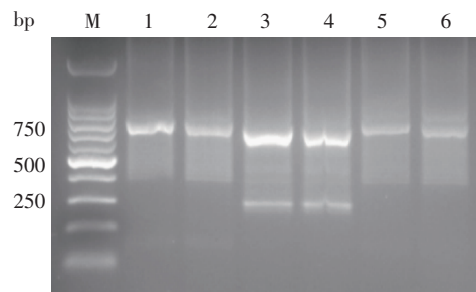
2.2 PCR-RFLP检测结果 经限制性内切酶*Alu- I* 和*Mva- I* 酶切后, 37份血样酶切后获得2种不同的RFLP带型。其中36份血样经*Alu- I* 酶切后获得约150 bp的片段, 经*Mva- I* 酶切后只有一约750 bp的片段, 鉴定为PV- I型, 占97.3% (36/37); 1份血样 (患者来自云南腾冲) 经*Mva- I* 酶切后获得约200 bp的片段, 经*Alu- I* 酶切后仅获得约750 bp的片段, 鉴定为PV- II型, 占2.7% (1/37)(图2)。

36份鉴定为PV- I型的血样, 经2轮PCR扩增后, 可产生明显不同的2类条带: 21份血样只产生1条约750 bp的条带, 暂命为PV- I-a型, 占58.3%; 15份血样产生约750 bp和约280 bp的双带, 暂命为PV- I-b型, 占41.7% (图3)。其中, 26份河南当地感染病例血样中, PV- I-a型占42.3% (11/26), PV- I-b型占57.7% (15/26)。11份输入病例血样中, PV- I-a型占90.9% (10/11), 未见PV- I-b型。



A: PCR产物经*Mva- I* 酶切结果; B: PCR产物经*Alu- I* 酶切结果。M: DNA 标志物; 2、6、8、10: PV- I型; 4: PV- II型; 1、3、5、7、9: 未经酶切的二轮PCR产物。

图2 PCR-RFLP鉴定间日疟原虫CSP基因型



M: DNA标志物; 1、2、5、6: PV- I-a型; 3、4: PV- I-b型。

图3 间日疟原虫CSP基因PV- I型分型的鉴定

3 讨论

CSP是研究间日疟原虫基因多态性最有意义的分子标记之一^[5,6], 广泛用于分子流行病学调查研究, 具有明显地理分布特征。根据CSP基因序列的不同, 间日疟原虫可分为PV- I型、PV- II型和PV- III型, 不同型别的间日疟原虫其地理分布不同^[7]。中国研究者根据PV- I型中央重复区后十二肽插入序列的有无将其进一步分为热带族和温带族, PV- I型温带族仅见于北纬25°以北地区, 而热带族见于纬度低于25°的热带、亚热带地区^[1]。

本研究采用PCR-RFLP方法对河南省2011年采集的37份间日疟病例血样做了初步分析,结果显示,36份属于PV-I型,只有1份来自云南腾冲的患者血样是PV-II型,与徐贵全等^[8]的研究结果一致;而本地感染病例均为PV-I型。但是36份PV-I型的血样经 Alu -I酶切后,部分血样除获得150 bp左右的片段外,还获得500 bp和250 bp的片段,这可能是由于酶切不完全所致。

本研究结果显示,36份鉴定为PV-I型的血样中,21份血样只产生1条约750 bp的条带,暂命名为PV-I-a;15份血样除产生约750 bp条带外,还产生约280 bp的条带,暂命名为PV-I-b。黎学铭等^[9]研究结果显示,PV-I型热带族产生1条700~850 bp条带,PV-I型温带族产生700~850 bp和约185~250 bp 2条带,据此可推测,本研究中的PV-I-a和PV-I-b可能分别是PV-I型热带族和PV-I型温带族,如果推测成立,河南省的间日疟原虫则存在PV-I型热带族和PV-I型温带族2种,热带族所占比例(42.3%)略低于温带族(57.7%),与资料中热带族、温带族以北纬25°为界不同,这可能与当地较高的传播强度导致频繁的同族异体间基因重组有关^[10],也可能与近年频繁的人口流动有关,PV-I型热带族有机会向高纬度地区输入与扩散,从而导致了不同地理株间日疟原虫混合感染和基因重组的机率增加,使得间日疟原虫种群基因型结构复杂化^[11,12]。因此,必须加强对云南省以及境外返回人员的管理和监测,尤其注意带有不同或新基因型的间日疟病例,及时采取防治措施,以免传播扩散。

参 考 文 献

[1] 黄天谊, Victoria HM, 程勤, 等. 不同地理株间日疟原虫环孢子蛋白基因多态性的特征 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1996, 14(1): 20-25.

- [2] 黄天谊, 黄亚铭, 王小力, 等. 我国间日疟原虫基因型种群结构及其地理分布 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(5): 260-264.
- [3] Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvc and Pvm-sp1 [J]. Malar J, 2005, 4(1): 20.
- [4] Zakeri S, Mehrizi AA, Djadid ND, et al. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran [J]. Trop Med Int Health, 2006, 11(5): 729-737.
- [5] Lim CS, Kim YK, Lee KN, et al. The analysis of circumsporozoite-protein gene sequence from South Korean isolates of *Plasmodium vivax* [J]. Ann Trop Med Parasitol, 2001, 95(3): 229-235.
- [6] Kim T, Kim YJ, Song KJ, et al. The molecular characteristics of circumsporozoites protein gene subtypes from *Plasmodium vivax* isolates in Republic of Korean [J]. Parasitol Res, 2002, 88(12): 1051-1054.
- [7] 王光泽, 华德, 王善青, 等. 海南省间日疟原虫CSP基因分型初探 [J]. 海南医学, 1999, 10(4): 209-210.
- [8] 徐贵全, 张再兴, 李娜, 等. 中缅边境间日疟环孢子蛋白基因分型 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2010, 28(4): 265-267.
- [9] 黎学铭, 郭传坤, 李锦辉, 等. 我国南方五省间日疟原虫环孢子蛋白基因型与疟疾防治效果关系的探讨 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 274-282.
- [10] Arnot D. Unstable malaria in Sudan; the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998, 92(6): 580-585.
- [11] 郭传坤, 黎学铭, 林睿, 等. 广西间日疟原虫环孢子蛋白基因型的初步研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2002, 15(6): 336-338.
- [12] 耿英芝, 田疆, 滕聪, 等. 辽宁省间日疟原虫环孢子蛋白基因型分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(5): 344-346.

(收稿日期: 2013-03-29 编辑: 张争艳)

文章编号: 1000-7423(2013)-06-0485-02

【病例报告】

1 例输入性恶性疟、间日疟、卵形疟混合感染重症病例报告

吴凯, 周水茂, 杨燕, 王重新, 徐明星

中图分类号: R531.3 文献标识码: D

患者,男,44岁,河南省信阳市新县人,农民工。于2012年10月19日赴非洲安哥拉务工,于2012年11月4日自行回国,在安哥拉期间无疟史、无其他疾病,出国前后均未进行抗疟预防性服药。11月5日开始出现不规则发热,伴寒战、呕吐和头晕等症状,11月7日至8日曾在当地乡镇卫生院以感冒病因治疗,11月9日至信阳市某医院住院治疗,未明确诊断,输液治疗时突发神志不清、全身抽搐和失禁等严重症状。于11月10日下午17时转入武汉市某部属三甲医院,入院诊断:疟疾、多器官功能衰竭、血小板减少、感染性休克。血检疟原虫阳性。入院时昏迷,体温39℃,心率143次/min,呼吸22次/min,血压:142/103 mm Hg。血常规:红细胞 $2.88 \times 10^{12}/L$,血小板 $4 \times 10^9/L$,

血红蛋白 $88 \times 10^9/L$,白细胞 $10.44 \times 10^9/L$,中性粒细胞 $5.71 \times 10^9/L$,单核细胞 $0.91 \times 10^9/L$,嗜酸粒细胞 $0.01 \times 10^9/L$ 。肝功能:总胆红素 $395.6 \mu\text{mol}/L$,直接胆红素 $242.7 \mu\text{mol}/L$,白蛋白 $27 \text{g}/L$ 。肾功能:血尿素氮 $42.4 \text{mmol}/L$,血肌酐 $540.1 \mu\text{mol}/L$ 。经武汉市疾病预防控制中心以常规镜检法复核患者血片,诊断为恶性疟原虫和卵形疟原虫混合感染,疑似含间日疟原虫(图1),密度约 $22\ 000/\mu\text{l}$ 血。其中,恶性疟原虫、间日疟原虫和卵形疟原虫密度约为 $1.6 \text{万}/\mu\text{l}$ 血、 $1\ 000/\mu\text{l}$ 血和 $5\ 000/\mu\text{l}$ 血。参照周水茂的蒸馏水直接溶血法抽提疟原虫DNA模板,以其成熟的疟原虫引物和巢式PCR反应体系检测该病例血样^[1,2],经琼脂糖凝胶电泳成像,结果显示,该病例血样扩增出恶性疟原虫205 bp特异性条带、间日疟原虫120 bp特异性条带和卵形疟原虫800 bp特异性条带,未扩增出三日疟原虫特异性条带(图2)。

作者单位:武汉市疾病预防控制中心,武汉430015