

## 2 株间日疟原虫 18S rDNA 的克隆及其同源性分析

高世同\* 李晓恒 耿艺介 黄达娜 谢旭 梅树江 张仁利

【摘要】目的 克隆间日疟原虫河南分离株与湖北分离株红内期 18S rDNA, 并进行同源性分析。

方法 采用 PCR 方法从间日疟患者血样 DNA 中扩增间日疟原虫 18S rDNA, 纯化后与 pGEM-Teasy 质粒连接, 转化大肠埃希氏菌 JM109; 阳性克隆质粒经双酶切鉴定后, 进行序列测定, 采用 BLAST 和 MEGA4 生物软件分析同源性。结果 间日疟原虫 18S rDNA 扩增片段大小为 998 bp; 阳性克隆重组质粒经双酶切鉴定, 与预期结果相符; 序列测定结果显示, 河南、湖北 2 分离株间日疟原虫 18S rDNA 序列完全相同, 与 GenBank 中报道的 12 株间日疟原虫相同序列进行比对, 其同源性均大于 99%; 用邻位连接法 (neighbor-joining, NJ) 和非加权组平均法 (UPGMA) 2 种方法构建系统发生树发现, 河南分离株、湖北分离株与间日疟原虫 X13926.1 株遗传距离小, 同属一个分支。结论 克隆了间日疟原虫河南与湖北分离株红内期 18S rDNA, 该基因序列在不同地理株间遗传稳定。

【关键词】间日疟原虫; 18S rDNA; 序列同源性分析

**Cloning and homology analysis of blood stage 18S rDNA of two *Plasmodium vivax* isolates** GAO Shi-tong\*, LI Xiao-heng, GEN Yi-jie, HUANG Da-na, XIE Xu, MEI Shu-jiang, ZHANG Ren-li. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

\*Corresponding author: GAO Shi-tong, Email: gst@szcdc.net.

Supported by Shenzhen Municipal Science and Technology Project (201202085)

【Abstract】Objective To clone and homology analyze the sequences of blood stage 18S rRNA-encoding gene fragment of two *P. vivax* isolates from Henan and Hubei provinces in China. Methods The 18S rDNA fragments were amplified by PCR from the DNA extracted from two *P. vivax* infection blood samples. After purification, the gene fragments were ligated with plasmid pGEM-Teasy to construct recombinant plasmids, and transformed into *E. coli* JM109. Positive clones were identified by double enzymes digestion methods. The sequences of inserted 18S rDNA fragments were finally determined and analyzed with BLAST and MEGA4 biological software. Results The amplified 18S rDNA fragments of two isolates were about 998 bp in length, and the 18S rDNA sequence of Henan isolate was same as that of Hubei isolate. As aligned with the corresponding sequences of twelve *P. vivax* strains deposited in the GenBank database, the identity of nucleotides was more than 99% respectively. Based on the 18S rDNA sequence, phylogenetic analysis with neighbor-joining and UPGMA methods indicated that two isolates have close association with *P. vivax* X13926.1 strain. Conclusion The blood stage 18S rDNA fragments of two *P. vivax* isolates were cloned, which were relatively conserved among different *P. vivax* isolates.

【Key words】*Plasmodium vivax*; 18S rDNA; Sequence homology analysis

疟疾是危害人类健康的虫媒传染病, 和艾滋病、结核病并列为发展中国家的三大公共卫生问题。我国的疟疾流行以间日疟为主, 具有传播快、易反复等特点。由于疟疾流行区人员的频繁流动, 疟原虫不同

地理株之间存在传播和扩散的风险。对疟疾病例进行科学分类和溯源是目前疟疾监测工作的重要内容。由于传统显微镜形态学观察方法的局限性, 国内外学者尝试采用分子生物学技术来对疟原虫进行基因分型和鉴定, 并取得了积极进展<sup>[1-3]</sup>。Severini 等<sup>[4]</sup>通过对间日疟原虫裂殖子表面蛋白 (merozoite surface protein) 1 的基因序列分析来调查意大利输入性疟疾病例的来源; 黄天谊等<sup>[5]</sup>采用环孢子蛋白

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4122.2013.06.004

基金项目: 深圳市科技计划资助项目 (201202085)

作者单位: 518055 深圳, 深圳市疾病预防控制中心

\* 通信作者: 高世同, Email: gst@szcdc.net

(circumsporozoite protein, CSP) 等位基因多重 PCR 基因分型方法对我国 10 个省(自治区)384 个间日疟原虫分离株进行分类,检出温带族 258 株,热带族 79 株,认为基因型种群的结构与地理分布关系明显。本研究克隆了间日疟原虫湖北分离株、河南分离株红内期小亚基核糖体 RNA(18S rRNA)编码基因,并与国外报道的间日疟原虫同源序列进行分析比对,以期对相关基因诊断和不同地理株的鉴定提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 血样与菌株

经镜检复核的河南和湖北间日疟患者血样各 1 份,正常人血样 2 份,均由深圳市疾病预防控制中心收集;全血标本采集均为静脉采血,2% EDTA- $\text{Na}_2$  抗凝,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存;大肠埃希菌 JM109 由深圳市疾病预防控制中心分子生物室保种。

### 1.2 主要试剂和仪器

PCR 扩增仪 PE-9700 为美国 ABI 公司产品, pGEM-Teasy 质粒为美国 Promega 公司产品,全血 DNA 提取试剂盒、DNA 分子标志物、dNTP、LA Taq DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒以及限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Sal* I 均由大连宝生物有限公司提供。

### 1.3 引物合成

根据间日疟原虫 PV2008/TR/DEL 株 18S rRNA 基因 (GenBank 登录号 GQ477744.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计,并委托上海生工生物工程有限公司合成。上游引物:5'-AAG GCC AAT CTG GCT TTG TA-3', 下游引物:5'-ACC GAA TTC AGT CCC ACG TA-3'。

### 1.4 血样 DNA 提取

取抗凝血 100  $\mu\text{l}$ , 采用全血 DNA 提取试剂盒抽提 DNA, 并溶于 100  $\mu\text{l}$  TE 缓冲液中,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

### 1.5 18S rRNA 基因的克隆与鉴定

PCR 反应体积为 50  $\mu\text{l}$ , 其中 dNTPmix (每种浓度均为 2.5 mmol/L) 5  $\mu\text{l}$ , 上、下游引物 (25 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 各 1  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 (5 U/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ ,  $10\times$  缓冲液 5  $\mu\text{l}$ , 灭菌去离子水 35  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 3  $\mu\text{l}$ 。反应条件为:  $94\text{ }^\circ\text{C}$  4 min;  $94\text{ }^\circ\text{C}$  35 s,  $52\text{ }^\circ\text{C}$  35 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 共 35 个循环;  $72\text{ }^\circ\text{C}$  5 min。PCR 扩增产物以 1.5% 琼脂

糖凝胶电泳分析, 切胶回收目的 DNA 片段, 并以 PCR 产物纯化试剂盒纯化。将纯化的间日疟原虫 18S rDNA 片段与 pGEM-Teasy 质粒连接后, 转化感受态大肠埃希菌 JM109, 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 培养过夜, 挑取阳性克隆菌落小量培养, 以质粒提取纯化试剂盒提取重组质粒, 采用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 作双酶切鉴定。

## 1.6 18S rDNA 片段的序列分析

委托上海生工生物工程有限公司采用双脱氧链末端终止法测定重组质粒的插入片段, 采用 BLAST 和 MEGA4 生物软件进行同源分析。

## 2 结果

### 2.1 18S rDNA 的扩增结果

湖北和河南 2 例间日疟患者的血样 DNA 模板均扩增出约 998 bp 的基因片段, 与预期的目的基因扩增片段大小一致; 健康人血 DNA 和蒸馏水空白对照未见特异性扩增条带 (图 1)。

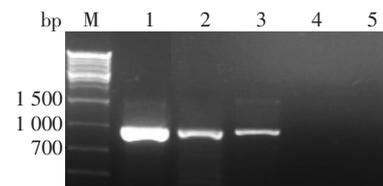


图 1 18S rDNA 片段 PCR 扩增的结果

M: DNA 标志物, 1~2: 河南间日疟患者血样, 3: 湖北间日疟患者血样, 4: 健康人血样, 5: 蒸馏水对照

Fig. 1 Results of 18S rDNA fragment amplified by PCR  
M: DNA marker, 1-2: *P. vivax* infected blood sample from Henan Province, 3: *P. vivax* infected blood sample from Hubei Province, 4: Normal blood sample, 5: Blank control

### 2.2 目的基因阳性克隆的鉴定

阳性克隆菌落经小量培养后, 提取重组质粒, 以限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I 作双酶切, 得到约 998 bp 的酶切片段 (图 2); 鉴定结果均与预期的结果相符。

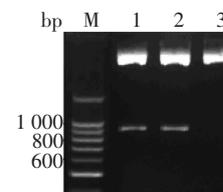


图 2 阳性克隆质粒的 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定

M: DNA 标志物, 1~2: 阳性克隆重组质粒, 3: pGEM-Teasy 质粒

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmids by *EcoR* I and *Sal* I restriction enzymes digestion

M: DNA marker, 1-2: Recombinant plasmids, 3: Plasmid pGEM-Teasy

### 2.3 18S rDNA 片段的序列测定与同源性分析

序列测定结果显示,河南与湖北 2 分离株间日疟原虫 18S rDNA 扩增序列均含有 998 个核苷酸,二者的核苷酸序列完全一致;根据测定的 18S rDNA 序列,采用 BLAST 软件在 GenBank 中搜索、比对,获得 12 条国外报道的间日疟原虫同源序列,序列号分别为 JQ627158.1 (SV6 株)、JQ627157.1 (SV5 株)、JQ627156.1 (SV4 株)、JQ627155.1 (SV3 株)、JQ627154.1 (SV2 株)、JQ627153.1 (SV1 株)、GQ477744.1 (PV2008/TR/DEL 株)、U03079.1 (Sal1 株)、U07367.1 (EL Salvador 株)、U93233.1 (PVK1294 株)、U83877.1 和 X13926.1。所克隆的 2 株间日疟原虫 18S rDNA 基因序列与上述序列比对的同源性均大于 99%。以 MEGA4 软件邻位连接法 (neighbor-joining, NJ) 和非加权组平均法 (UPGMA) 构建系统发生树,结果均显示:河南分离株、湖北分离株与 X13926.1 株遗传距离小,属同一个分支(图 3)。

### 3 讨论

疟原虫基因组序列的测定为从分子水平探讨基因的突变与表型的关系,开展疟原虫基因分型、耐药性研究及分子流行病学调查奠定了基础。目前,在疟疾的分子流行病学调查研究中,通常采用疟原虫重要功能基因作为标志物<sup>[5-8]</sup>,检测分析其多态性,了解不同地理株疟原虫基因变异的时空分布特点,分析这种多态性与疟原虫生物特性和种群结构内在的关系。疟原虫 CSP 和裂殖子表面蛋白 MSP 编码基因变异程度较高,其序列中央重复区的类型、重复次数和长度在不同分离株间均存在差异,可以根据扩增片段的大小或带型进行区分。目前,以疟原虫 CSP 基因、MSP 基因为分子标志研究疟原虫基因多态性的文献报道较多。黄天谊等<sup>[5]</sup>通过检测间日疟原虫 CSP 基因片段的多态性,认为我国北纬 25° 以北是单一温带族间日疟原虫的分布区,北纬 25° 以南地区是温带族和热带族间日疟原虫重叠分布区,并发现温带族内存在地理分布不明显的 2 个基因类群<sup>[5]</sup>。张山鹰等<sup>[9]</sup>以 MSP1 基因为分子标志,扩增分析 72 份从海南、安徽疟疾流行区收集的间日疟标本,将间日疟原虫感染分为 Sal-1、Belem 和混合型,其中混合基因型与多重感染无关联。

在生物进化过程中,18S rDNA 遗传相对稳定,长度适中,是重要的分子系统发生分析的标志物,可以通过对其序列的测定来对病原生物进行分类与鉴定。疟原虫 18S rDNA 在疟原虫的细胞质中含量丰富,且疟原虫不同种属存在种特异性基因序列区域,被认为是疟疾核酸诊断的理想靶基因和疟原虫种鉴别的良好生物标志物<sup>[10-12]</sup>。根据 18S rDNA 建立的不同人体疟原虫感染的分子检测技术特异性好、灵敏度高,在疟疾的临床诊断和现场流行病学调查中得到广泛应用<sup>[11-12]</sup>;基于 18S rDNA 序列构建分子进化树,分析 15 种灵长类疟原虫的亲缘关系,证实感染人类的疟原虫属于多系种群,间日疟原虫与猴疟原虫 (*P. simium*) 遗传距离最小,提示猴疟原虫可能存在通过变异而传播人类的风险<sup>[13]</sup>。近年来,在东南亚地区不断发现的人类诺氏猴疟原虫自然感染病例佐证了这个假设<sup>[14]</sup>。国内对于不同地理株间日疟原虫 18S rDNA 序列的研究分析不多。为丰富相关核酸背景资料,本研究克隆了河南与湖北 2 分离株间日疟原虫红内期 18S rDNA,并测定其序列,二者

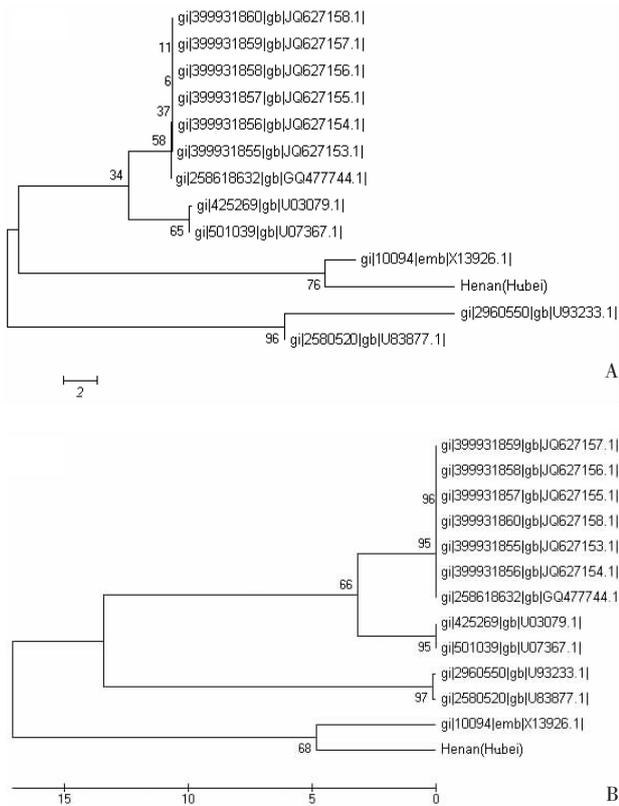


图 3 基于不同地理株间日疟原虫 18S rDNA 系统发生分析

A: 邻位连接法, B: 非加权组平均法

Fig. 3 Phylogenetic analysis of the relationship among different *P. vivax* isolates based on the 18S rDNA sequence  
A: Neighbor-joining, B: Unweighted pair-group method with arithmetic means

的基因序列同源性为 100%，其与 GenBank 中记录的 12 株国外间日疟原虫虫株的相同序列两两比对，结果显示同源性均大于 99%，表明间日疟原虫 18S rDNA 序列在疟原虫生物进化过程中遗传稳定，不同地理株间的序列差异仅表现为单核苷酸多态性。基于 18S rDNA 序列，邻位连接法和非加权组平均法分析不同地理株之间的遗传进化关系，可将上述 14 株间日疟原虫分为 3 大族群，河南分离株、湖北分离株与间日疟原虫 X13926.1 株遗传距离小，属同一个分支。尽管如此，对于我国间日疟原虫 18S rDNA 的变异特点，及其与生物学特性和地理分布的关系，有待在扩大样本量的基础之上，进行更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hussain MM, Sohail M, Kumar R, et al. Genetic diversity in merozoite surface protein-1 and 2 among *Plasmodium falciparum* isolates from malarious districts of tribal dominant state of Jharkhand, India[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2011, 105(8): 579-592.
- [ 2 ] Joshi H. Markers for population genetic analysis of human plasmodia species, *P. falciparum* and *P. vivax*[J]. J Vector Borne Dis, 2003, 40(3-4): 78-83.
- [ 3 ] Véron V, Legrand E, Yrinesi J, et al. Genetic diversity of msp3 alpha and msp1\_b5 markers of *Plasmodium vivax* in French Guiana[J]. Malar J, 2009, 8: 40.
- [ 4 ] Severini C, Menegon M, Gradoni L, et al. Use of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 gene sequence analysis in the investigation of an introduced malaria case in Italy [J]. Acta Trop, 2002, 84(2): 151-157.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Raza A, Ghanchi NK, Thaver AM, et al. Genetic diversity of *Plasmodium vivax* clinical isolates from southern Pakistan using pvcsp and pvmsp1 genetic markers[J]. Malar J, 2013, 12: 16.
- [ 7 ] Kosaisavee V, Hastings I, Craig A, et al. The genetic polymorphism of *Plasmodium vivax* genes in endemic regions of Thailand[J]. Asian Pac J Trop Med, 2011, 4(12): 931-936.
- [ 8 ] Santos-Ciminera PD, Alecrim Md, Roberts DR, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* in the State of Amazonas, Brazil[J]. Acta Trop, 2007, 102(1): 38-46.
- [ 9 ] 张山鹰, 许龙善, 张莹珍, 等. 间日疟原虫不同 MSP-1 等位基因形态学观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(3): 234-236.
- [10] Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54986.
- [11] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, et al. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5636-5643.
- [12] Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2521-2528.
- [13] Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, et al. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates(including humans): an 18S rDNA cladistic analysis[J]. Parasitology, 2004, 129(Pt 6): 677-684.
- [14] Cox-Singh J. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen[J]. Curr Opin Infect Dis, 2012, 25(5): 530-536.

(收稿日期:2013-04-12)

(本文编辑:高石)