

文章编号: 1000-7423(2014)-04-0318-02

输入性恶性疟原虫 *Pf60.1* 基因多态性初步研究

吴凯, 周水茂, 杨燕, 王重新, 徐明星

【摘要】 采用 PCR 方法扩增武汉市 2010–2013 年经镜检和巢式 PCR 确诊的 101 份国外输入性恶性疟病例血样的 *Pf60.1* 基因, 研究 *Pf60.1* 基因多态性。PCR 结果显示, 共 92 份血样扩增出 3 类基因片段, 其中 52 份扩增出 313 bp 片段, 占 56.5%; 34 份扩增出 340 bp 片段, 占 37.0%; 6 份扩增出 313 bp 和 340 bp 混合型片段, 占 6.5%。83 份自非洲地区输入病例血样中, 46 份扩增出 313 bp 片段, 占 55.4%, 31 份扩增出 340 bp 片段, 占 37.1%, 6 份扩增出混合型片段, 占 7.2%; 9 份自东南亚地区输入病例血样中, 6 份扩增出 313 bp 片段, 3 份扩增出 340 bp 片段。提示输入性恶性疟 *Pf60.1* 基因以 313 bp 基因型较多, 并且可能存在多克隆感染情况。

【关键词】 输入性病例; 恶性疟原虫; *Pf60.1*; 基因多态性

中图分类号: R382.31 文献标识码: B

An Analysis on *Pf60.1* Gene Polymorphism of *Plasmodium falciparum* from Imported Cases

WU Kai, ZHOU Shui-mao, YANG Yan, WANG Chong-xin, XU Ming-xing

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

【 Abstract 】 One hundred and one imported falciparum malaria cases in Wuhan City were confirmed by microscopy and Nest-PCR, and the blood samples were collected. The *Pf60.1* gene was amplified by PCR. Among 101 blood samples, three *Pf60.1* fragments [313 bp (56.5%, 52/92), 340 bp (37.0%, 34/92), 313 bp+340 bp (6.5%, 6/92)] were amplified from 92 samples. Among 83 blood samples from patients returning from Africa, 313 bp fragment were found in 46 samples (55.4%, 46/83), 340 bp fragment were found in 31 samples (37.1%, 31/83), and 7.2% (6/83) was mixed-fragment (313 bp+340 bp). Among 9 samples from southeast Asia, 6 samples were with 313 bp fragment and 3 samples with 340 bp fragment. The results indicated that the most common genotype was 313 bp-genotype, and there would be polyclonal *P. falciparum* infections.

【 Key words 】 Imported case; *Plasmodium falciparum*; *Pf60.1*; Polymorphism

武汉市曾为间日疟流行区, 近几年已无本地感染的疟疾病例, 全部为输入性疟疾, 且以恶性疟为主^[1]。恶性疟原虫 *Pf60.1* 基因是一个编码相对分子质量 (M_r) 60 000 抗原的多基因家族, 能在受染人红细胞内全程表达, 拷贝量大, 表现出明显的基因多态性, 具有易扩增、特异性强和稳定性好等优点^[2-4]。本研究通过扩增已确诊的恶性疟病例血样中 *Pf60.1* 基因, 结合流行病学资料, 探讨输入性恶性疟中 *Pf60.1* 基因多态性。

1 材料与方法

1.1 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, 脱氧核糖核苷三磷酸 (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。PCR 扩增仪 (Gene Amp PCR System2400) 为美国 Perkin Elmer 公司产品, 电泳仪 (Cole-Parmer 28560-00) 为美国热电公司产品, 凝胶成像系统 (Gene Ge-

nus Bio-Imaging System) 为英国 Syngene 公司产品。

1.2 血样和资料来源 收集武汉市 2010–2013 年经常规镜检法和巢式 PCR 方法确诊为恶性疟病例 (含混合型感染) 的滤纸血或抗凝血, 血量不少于 200 μ l。收集这些病例的流行病学调查报告和个案调查表等相关资料。

1.3 引物设计和 DNA 模板提取 参照文献 [5] 中的 *Pf60.1* 引物, 上游引物序列: 5'-TGCTACTAGAACCCTAGTGGTAAC-3', 下游引物序列: 5'-GGATAATTATATCTTCTCCAC-3', 可扩增出 240 bp、313 bp、340 bp 和 400 bp 等 DNA 片段^[2,4], 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。参照周水茂等^[6,7] 的蒸馏水直接溶血法抽提 DNA 模板。

1.4 PCR 扩增 PCR 反应体系: DNA 模板 4 μ l, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ l, 25 mmol/L dNTP 0.5 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, ddH₂O 补足 25 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 92.5 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 90 s, 共 35 个循环; 70 $^{\circ}$ C 5 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 100 V 电泳 40 min, 溴化乙锭染色后于凝胶成像分析系统观察。

2 结果

2.1 病例资料分析 2010–2013年武汉市经实验室确诊劳务归国的国外输入性恶性疟145例,占疟疾病例的73.6% (145/197) (表1)。男性143例,女性2例,年龄19~63岁。国外疟疾流行区停留时间6 d至2年时间不等。99例在国外有疟疾史,46例否认有疟疾发病史。9例脑型疟,全部为非洲输入病例,发病至确诊时间3~7 d,其中7例在国外无疟疾史。

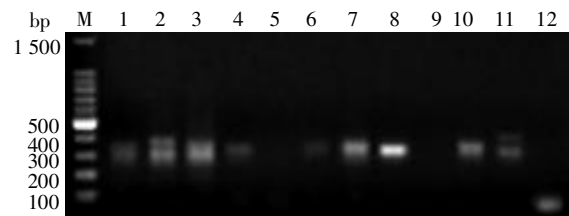
表1 2010–2013武汉市年国外输入性恶性疟发病情况

年份	来源地		出国事由			
	非洲	东南亚	务工	经商	旅游	留学生
2010	14	4	17	0	1	0
2011	27	2	27	1	0	1
2012	44	2	41	2	0	3
2013	51	1	48	4	0	0
合计	136	9	133	7	1	4

2.2 基因多态性分析 共收集恶性疟病例(含1例混合感染病例)血样101份,92份扩增出3类PCR产物片段,其中52份扩增出313 bp片段,占56.5%;34份扩增出340 bp片段,占37.0%;6份扩增出313 bp和340 bp两个片段,占6.5%。83份自非洲输入的病例血样中,46份扩增出313 bp片段,占55.4%;31份扩增出340 bp片段,占37.1%;6份扩增出313 bp+340 bp片段,占7.2%。9份自东南亚输入病例血样中,6份扩增出313 bp片段,3份扩增出340 bp片段。9例脑型疟病例血样中,6份扩增出313 bp片段,3份扩增出340 bp片段。

表2 输入性恶性疟疫源地*Pf60.1*基因多态性情况

地区分布	<i>Pf60.1</i> 基因片段			合计		
	313 bp	340 bp	313 bp+340 bp			
非洲 东部	乌干达	3	0	0	3	
	埃塞俄比亚	0	2	0	2	
	苏丹	1	0	0	1	
	坦桑尼亚	0	0	1	1	
	小计	4	2	1	7	
	南部	安哥拉	8	4	0	12
		莫桑比克	2	1	0	3
		赞比亚	1	0	1	2
		小计	11	5	1	17
		西部	尼日利亚	7	7	0
利比里亚	4		5	2	11	
几内亚	4		1	0	5	
塞拉利昂	4		1	0	5	
加纳	1		1	0	2	
马里	0		1	0	1	
小计	20		16	2	38	
中部	赤道几内亚		3	5	2	10
	刚果(金+布)		7	2	0	9
	加蓬		0	1	0	1
	中非	1	0	0	1	
	小计	11	8	2	21	
东南亚	缅甸	3	3	0	6	
	印度尼西亚	3	0	0	3	
	小计	6	3	0	9	
合计	52	34	6	92		



M: DNA标志物; 1、4、6、8: 扩增出313 bp DNA片段; 2、3、11: 扩增出混合型DNA片段; 5、9、12: 未扩增出DNA片段; 7、10: 扩增出340 bp DNA片段。

图1 PCR扩增患者血样中*Pf60.1*基因多态性结果

3 讨论

随着中国出国务工人员数的增加,归国人员中输入性恶性疟病例数随之增多,其分子生物学研究也越来越受到重视。本研究结果显示,2010–2013年武汉市输入性恶性疟占疟疾病例的73.6%,主要来自非洲,以撒哈拉沙漠以南及赤道附近的非洲中部、西部和南部地区居多,少量来自非洲东部和东南亚地区。313 bp片段为目前疟疾流行区恶性疟原虫主要基因片段(56.5%),340 bp片段(37.0%)次之,与中国云南省恶性疟流行区313 bp片段占绝对优势情况(91.4%)不同^[5]。本研究扩增出双片段型(6.5%),全部为自非洲输入病例,此前Carcy等^[3]在实验室虫株和野生虫株中扩增出多片段现象,其中FCR3源系的实验室虫株表现为相同的6片段型,塞内加尔野生虫株为单片段或双片段型,而张国森等^[5]报道云南恶性疟流行地区93份恶性疟血样中扩增出*Pf60.1*的4种单片段型,显示非洲疟疾流行区存在多克隆感染的存在,东南亚和中国则暂未发现。9例脑型疟病例中313 bp片段6份,340 bp片段3份,与2种基因片段流行程度基本相符,其中7例否认在国外有疟疾史,发病至确诊时间3~7 d天不等,显示恶性疟如不及时诊治易发展成脑型疟。受限于技术和样本量等原因,目前尚无输入性恶性疟*Pf60.1*基因多态性及其流行病学相关的报道。因此,本研究结果为解决部分国家和地区恶性疟*Pf60.1*分子流行病学情况丰富了资料。

参 考 文 献

- [1] 吴凯,王重新,陈野,等.武汉市流动人口输入性疟疾管理效果评价[J].中国病原生物学杂志,2012,7(1):53-55.
- [2] Bischoff E, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O, et al. A member of the *Plasmodium falciparum* Pf60 multigene family codes for a nuclear protein expressed by readthrough of an internal stop codon[J]. Mol Microbiol, 2000, 35(5): 1005-1016.
- [3] Carcy B, Bonnefoy S, Schrevel J, et al. *Plasmodium falciparum*: typing of malaria parasites based on polymorphism of a novel multigene family[J]. Exp Parasitol, 1995, 80(3): 463-472.
- [4] 刘慧,张国森,杨亚明,等. PCR检测*Pf60.1*基因诊断恶性疟实验方法研究[J].实用寄生虫病杂志,2001,9(1):8-10.
- [5] 张国森,杨亚明,刘慧,等.云南省不同地区恶性疟原虫MSA-1、MSA-2和*Pf60.1*基因多态性研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2001,19(6):371-372.
- [6] 周水茂,刘勇,陈智,等.一种简易的疟原虫PCR模板制备方法[J].中国卫生检验杂志,2012,22(10):2385-2387.
- [7] 周水茂,杨燕,吴凯,等. PCR-RFLP检测输入性恶性疟原虫*Pf60.1*基因多态性[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2013,31(1):43-45.

(收稿日期:2014-01-08 编辑:张争艳)