

文章编号: 1000-7423(2007)-03-0213-04

【实验研究】

# 套式 / 多重 PCR 诊断疟疾的敏感性、特异性和稳定性初探

郭传坤<sup>1</sup>, 黎学铭<sup>1</sup>, 李锦辉<sup>1</sup>, 毛玮<sup>1</sup>, 林珍<sup>1</sup>, 杜进发<sup>1</sup>, 黄天谊<sup>2\*</sup>

**【摘要】** 目的 提高标签引物-套式/多重 PCR 诊断疟疾的敏感性、特异性和稳定性。方法 用滤纸法采集非疟疾发热病人血样 30 份及其他传染病(感冒, 流感, 伤寒, 肝炎等)患者血样 20 份; 抽取恶性疟和间日疟各 1 例患者血 4 ml, 进行系列稀释制备不同疟原虫含量的感染血样; 健康者血样作对照。用热裂解法制备 DNA 模板, 用线粒体细胞色素氧化酶基因作为靶基因, 应用相关软件和网络资源 (Primer Premier 5.0, PUBMED, NCBI-BLAST 和 Mfold 服务器) 设计和优化标签引物-套式/多重 PCR, 并用于检测所采集制备的各种血样。结果 间日疟与恶性疟患者血系列稀释为含 1 000、100、10 和 1 个虫/ $\mu$ l 后经标签引物-套式/多重 PCR 检测, 恶性疟和间日疟患者各稀释含虫血样分别在 611 bp 和 255 bp 出现 1 条带, 能检测到原虫密度均为 1 个虫/ $\mu$ l 血; 非疟疾发热病人血样 30 份及其他传染病患者血样均为阴性; 健康者血样未出现扩增条带, 每种血样反复测试 3 次以上均获得同样结果。结论 经优化的标签引物-套式/多重 PCR 在疟疾诊断中具有较高的敏感性、特异性和稳定性。

**【关键词】** 恶性疟原虫; 间日疟原虫; 套式 / 多重 PCR; 标签引物; 疟疾诊断

中图分类号: R351.3

文献标识码: A

## Sensitivity, Specificity and Stability of the Tag-primer Nested/multiplex PCR for Malaria Diagnosis

GUO Chuan-kun<sup>1</sup>, LI Xue-ming<sup>1</sup>, LI Jin-hui<sup>1</sup>, MAO Wei<sup>1</sup>,  
LIN Zhen<sup>1</sup>, DU Jin-fa<sup>1</sup>, HUANG Tian-yi<sup>2\*</sup>

(1 Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China; 2 Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550001, China)

**【Abstract】** **Objective** To improve the sensitivity, specificity and stability of the Tag-primer nested/multiplex PCR for malaria diagnosis. **Methods** Filter paper blood samples were collected from 30 non-malaria fever patients and 20 infectious disease patients (common cold, influenza, typhoid, hepatitis, etc.). Four ml blood each taken from one falciparum malaria patient and one vivax malaria patient was serially diluted. Healthy blood sample was used as negative control. Improved direct heating method was used to prepare DNA template. The cytochrome oxidase gene (*coxI*) located in mitochondrion was selected as target gene. Relevant web resources and software (PUBMED, NCBI-BLAST, Mfold server and Primer Premier 5.0) were employed to design and optimize Tag-primer nested/multiplex PCR (UT-PCR) which was used to test all blood samples. **Results** A 611 bp band and a 255 bp band were seen in serially diluted infected blood samples (1 000, 100, 10 and 1 parasite/ $\mu$ l) from *P.f* and *P.v* patient tested by UT-PCR. The detection limit of either *P.falciparum* or *P.vivax* reached 1 parasite/ $\mu$ l, and the tested blood samples of non-malaria fever patients, patients with other infectious diseases and healthy persons were all negative. Consistent results of each sample in more than 3 duplicated tests were obtained. **Conclusion** The optimized Tag-primer nested/multiplex PCR shows high sensitivity, specificity and stability in malaria diagnosis.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; Nested/multiplex PCR; Tag primer; Malaria diagnosis

Supported by Guangxi Science and Technology Development Project (No. 0632007-3B)

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

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目 (No. 0632007-3B)

作者单位: 1 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530021; 2 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004

\* 通信作者, E-mail: tyhuang@163.com

PCR 诊断技术已用于疟疾辅助诊断与防治研究的许多领域,为检出低原虫血症病人和疑难病例的鉴别诊断或作为确诊的重要参考标准<sup>[1-5]</sup>,须采用套式/复式(多重)PCR 或实时定量 PCR<sup>[6-10]</sup>,后者因其设备、试剂及技术条件要求较高,目前我国尚难实际采用。常规套式 PCR 敏感性和特异性较高,但操作步骤复杂、常有严重二聚体扩增以及稳定性差等问题,目前仅在少数实验室采用。为适应疟疾防治、研究和临床诊断的需要,有必要研制步骤简化、能检出和鉴定至少 2 种疟原虫、同时保持高度灵敏性,特异性和稳定性(可重复性)的套式 PCR 疟疾诊断试剂盒。作者等在前文报告的标签引物-套式/多重 PCR 已实现单管化,消除了二聚体,显著提高了检出低原虫血症的敏感性<sup>[11]</sup>;但其特异性与稳定性出现新问题,主要是检测健康者血样时,易出现非特异扩增条带和试验不够稳定。本研究通过改进滤纸血样模板 DNA 制备方法,改用线粒体细胞色素氧化酶基因(*coxI*)为靶基因和创新的引物设计,解决了标签引物副作用所致的特异性以及稳定性问题,为 PCR 疟疾诊断试剂盒提供良好的技术保证。

## 材料与方法

### 1 疟原虫感染血样本的采集和准备

2005-2006 年在广西南宁、玉林、全州等市县,用国产新华定性滤纸采集非疟疾发热病人血样 30 份及其他传染病滤纸血样 20 份,干燥密封保存于 4℃冰箱备用。

选择镜检确诊为间日疟原虫(*P.v*)与恶性疟原虫(*P.f*)阳性患者各 1 例,各抽取静脉血液 4 ml 放入到乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝试管(7 mg/4 ml),同时制作厚薄血片染色镜检,通过原虫/白细胞计数换算出每微升血含虫数;分别用健康者全血按 10 倍系列稀释成每 1 μl 含 1 000、100、10 和 1 个虫的 *P.v* 与 *P.f* 系列含虫全血,再制成相应含虫密度、直径 6 mm (每片约含 4 μl 全血)的滤纸血样,自然风干后分装于 1 ml 小管,4℃冰箱保存备用。

### 2 滤纸血样 DNA 模板制备方法

2.1 1 μl 滤纸血样 DNA 制备方法 剪取 6 mm 直径滤纸血样圆片的 1/4(约 7 mm<sup>2</sup> 含 1 μl 全血),放入 0.2 ml PCR 反应管,加入 1×PCR 缓冲液 pH 7.6~7.9 100 μl,室温溶血 10 min,18 000×g 离心 2 min,吸去上清,仅留滤纸和管底沉淀,再加入 1×PCR 缓冲液 5 μl,95℃加热 5 min,直接加入试剂即可进行 PCR 扩增反应。

2.2 4 μl 滤纸血样 DNA 制备 取 6 mm 直径滤纸血样 1 片(约含 4 μl 全血)放入 0.5 ml 锥型管,加入 1×PCR 缓冲液或 pH 7.6~7.9 纯水 400 μl,室温溶血 10 min,18 000×g 离心 2 min,去上清,仅留滤纸和管底沉淀,再加入 1×PCR 20 μl,95℃加热 5 min,18 000×g 离心 1 min,吸出上清作为 PCR 扩增模板,4℃冰箱保存备用。

2.3 制备 DNA 模板 参照文献 [12,13] 用 Chelex-100 离子交换法制备 DNA 模板。

### 3 引物设计

以线粒体细胞色素氧化酶基因(*coxI*)为靶基因,参照文献[11,12]标签引物-套式/多重 PCR 方法、借助有关网络资源和软件(PUBMED, NCBI-BLAST, Primer Premier 5.0),设计标签引物 1 个,套式 PCR 外侧(*P.v*, *P.f* 公共)引物 1 对,内侧 *P.v* 与 *P.f* 特异加尾(其 5' 端均附加标签引物序列)引物各 1 对;然后在标签引物和加尾特异引物的 5' 端添加适当序列使其与 3' 端互补折叠形成发夹,通过 Mfold 网络服务器([www.bioinfo.rpi.edu/applications/](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/))预测引物发夹的熔点(65℃~70℃)。经测试最后选用的引物序列如下:

Um-1882 5'-CCCTTCTCGCCATTTGA-3'

Um-2817 5'-CGAACCTTCTTACCGTTAT-3'

T-zk2-3.6 5'-TAGATAGTCGTCGCCGGTCTCTATCTA-3'

Fmt-1995 5'-AGTCTGGTCGTCGCCGGTCTCTATCTAAGAACT-CTATAAATAACCAGACT-3'

Fmt-2605 5'-GATAGATAACATCGTCGCCGGTCTCTATCTAAC-TTCTGGTATGTTATCTATC-3'

Vmt-2361 5'-ACGTGCATCGTCGCCGGTCTCTATCTACATGCT-GTCATACATGATGCACGT-3'

Vmt-2615 5'-TCCTGATACTCGTCGCCGGTCTCTATCTATTTTC-ATCATTAGTATCAGGA-3'

### 4 优化的标签引物-套式/多重 PCR (UT-PCR)

UT-PCR 按标签引物-套式/多重 PCR 的单管 2 轮反应模式参照文献[11,12],但试剂组成和反应程序(温度/时间)则根据新引物的参数,通过梯度 PCR 和棋盘试验反复筛选确定。所有样本检测均重复 3 次以上。

试剂 A: 在标准 1×PCR 缓冲系统中(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.05% NP-40 (乙基苯基聚乙二醇与乙基酚聚乙二醇醚缩合物), 0.05% Tween-20 和 4 dNTP (4 种脱氧核糖核苷三磷酸)各 200 μmol/L), 含引物 Um-1882(60 nmol/L) 和 Um-2817(40 nmol/L)。

试剂 B: 在标准 1×PCR 缓冲系统中, 含种特异引物 Fmt-1995 和 Fmt-2605(各 14 nmol/L), Vmt-2361 和

Vmt-2615 (各 17.5 nmol/L), 标签引物 T-zk2-3.6(3.5 μmol/L)。

第 1 反应: 每管加入试剂 A 7.5 μl, Taq 酶 1.0 U 和模板 DNA 5 μl(总量 12.7 μl)。待扩增仪第一循环升温至 95 °C 时放入反应管, 94 °C 解链 90 s, 接着进入以下程序: 第 1~2 循环: 86 °C 45 s, 48 °C 30 s, 72 °C 90 s; 第 3~20 循环: 84 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 60 s; 第 21 循环: 72 °C 3 min, 4 °C 3 min。

第 2 反应: 第 1 反应结束, 取出反应管, 每管加入试剂 B 2.5 μl, Taq 酶 1.0 U(反应总量达 15.4 μl)。再次启动扩增仪, 待升温至 94 °C 时放入反应管, 94 °C 解链 30 s, 继续以下程序: 第 22~24 循环:(84 °C 45 s, 61 °C 30 s, 72 °C 90 s; 84 °C 30 s, 61 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 90 s)×3; 第 25~62 循环:(84 °C 30 s, 71 °C 30 s, 64.5 °C 05 s, 72 °C 60 s)×38; 第 63 循环: 72 °C 3 min, 4 °C 3 min。

## 5 PCR 产物分析

制备 2% 琼脂糖-溴乙锭凝胶, 取 10 μl 最终扩增产物电泳, 紫外透射分析仪(UV-, 北京市新技术应用研究所)上观察扩增条带, 用数码相机(Sony DSC-V1, 日本)加橙色滤片在黑白近摄模式下记录结果。

## 结 果

### 1 非疟疾发热病人血样检测结果

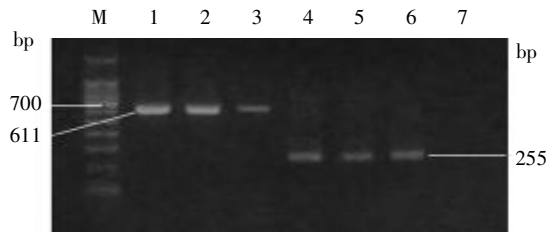
用 UT-PCR 检测非疟疾发热病人及其他常见传染病(感冒, 流感, 伤寒, 肝炎等)患者血样共 30 份, 重复测试 3 次以上结果均为阴性。

### 2 1 μl 滤纸血样检测结果

为简化步骤和更准确测定 UT-PCR 的敏感性, 在 0.2 ml 反应管内制备仅含 1 μl 感染血滤纸血样的 DNA 模板, 随后直接加入试剂进行 PCR 扩增反应, 结果与检测 4 μl 滤纸血模板一样呈现清晰的 P.f 611 bp 和 P.v 255 bp 条带, 检出 P.f 和 P.v 的低限均为 1 个虫/μl, 而健康人血样则不出现任何非特异扩增(图 1)。

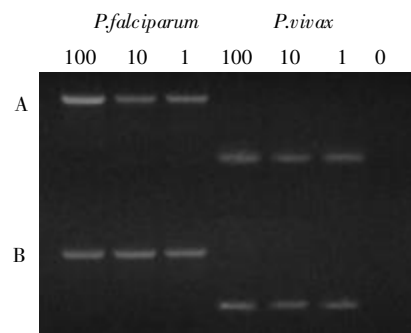
### 3 4 μl 滤纸血样检测结果

用本法检测系列稀释感染血的 4 μl 滤纸血样的 1×BF 模板与 Chelex-100 模板(pH 均为 7.6~7.8), 两种模板扩增结果对 P.f 和 P.v 都达到可检出 1 个虫/μl 的水平(图 2), 每种血样重复测试 3 次以上均获得一致结果。



M: DNA 标志物 (100 bp), 1~3: 分别为含恶性疟原虫 100、10 和 1 个/μl 血, 4~6: 分别为含间日疟原虫 100、10 和 1 个/μl 血, 7: 健康者血样。  
M: DNA markers (100 bp), 1-3: 100, 10, 1 Pf parasite (s)/μl blood respectively, 4-6: 100, 10, 1 P.v parasite (s)/μl blood respectively, 7: Healthy control.

图 1 UT-PCR 检测 1 μl 滤纸血样系列稀释含虫的电泳结果  
Fig.1 Electrophoresis of PCR tested 1 μl serially diluted filter blood sample



A: Chelex-100 模板, B: 1×BF 模板; 100、10、1 为每 μl 血原虫数, 0 为健康者对照血样。  
A: Chelex-100, B: 1×BF template; 100, 10, 1: 100, 10, and 1 parasite (s)/μl blood respectively, 0: Healthy control.

图 2 UT-PCR 检测 4 μl 系列稀释 P.f, P.v 感染滤纸血样电泳结果  
Fig.2 Electrophoresis of PCR tested 4 μl serially diluted Pf or Pv infected filter blood sample

## 讨 论

UT-PCR 是在套式 PCR 的基础上叠加高效率的标签引物扩增放大系统, 仅用很低浓度的特异引物, 就具有很高的扩增效率, 有利于单管多重引物扩增和检出超微量病原 DNA; 但由于滤纸血样中存在大量宿主白细胞-人染色体基因组 DNA, 当检测健康血样或低密度带虫血样时, P.f、P.v 特异加尾引物只要与人基因组 DNA 序列偶然错配产生的一个片段, 就可能被其后高效的标签引物扩增形成条带, 这是特异性下降的原因。此外, 为简化试验步骤、降低成本和提高敏感性, 采用亚微量反应容积和直接热裂解法制备 DNA 模板, 其反应总量 15 μl 仅为常规套式 PCR 的 1/3~1/7, 而模板量(5.0 μl)占反应容积的 1/3, 因而模板的 pH 对反应体系的 pH 影响极大, 是试验不够稳定的主要原因。

UT-PCR 克服了特异性下降的问题, 检测健康人血样不再出现非特异条带。对不同方法制备滤纸血样

DNA模板的系列测试表明:模板的 pH 变化是试验不稳定的主要原因。在本试验中滤纸血样用 1×BF(pH 7.6~7.9)溶血洗脱血红蛋白, 95 °C热裂解 5 min 的模板的扩增效果与 Chelex-100 制备的模板扩增效果相当。

本研究通过新的引物设计使原虫种特异引物和标签引物的反应温度限制在设定的较高温度范围, 低于其退火温度时它们形成自身封闭的二级结构, 从而大大增强了引物的特异性; 这是 UT-PCR 提高特异性的根据。选用多拷贝的线粒体基因组细胞色素氧化酶基因(*cox1*)代替原来的小亚单位核糖体 RNA 基因(SSUrRNA)作为靶基因, 缘于线粒体基因组是细胞核染色体外的遗传物质, 较好地保留了生物进化的种属特征, 常用于生物种属的鉴定和进化研究。每个原虫细胞内含有多个线粒体(恶性疟原虫约含 15~20 个), 疟原虫线粒体基因组仅为约 6 kb 的线状 DNA, 在反应程序中可使用较低的解链温度, 使细胞核染色体 DNA 处于不解链(或不充分解链)状态, 避免了特异引物与人基因 DNA 的错配。改进的热裂解法代替 Chelex 法使模板 DNA pH 保持在 7.6~7.9 之间, 保证了试验的稳定性, 且更为简便和经济。

UT-PCR 可在同一个反应管内制备滤纸血模板 DNA 并直接进行 PCR 扩增反应, 检出 P.f 和 P.v 的低限均达到 1 个虫/μl 血; 但其电泳条带稍弱和稳定性略逊于用 4 μl 血滤纸模板在另一管扩增者; 故作者推荐用 4 μl 滤纸血样制备模板法, 以保证稳定性。通过上述改进, 本法的敏感性、特异性和稳定性基本上可以满足疟疾诊断试剂盒的要求, 有可能在疟疾防治和临床诊断等领域推广应用。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Nsimba B, Jafari-Guemouri S, Malonga DA, et al. Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use[J]. Trop Med Int Hlth, 2005, 10: 1030-1037.

[ 2 ] Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, et al. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria[J]. Med Trop (Mars), 2005, 65: 176-183.  
[ 3 ] Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, et al. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria[J]. Clin Microbiol, 2006, 44: 1087-1089.  
[ 4 ] Oster N, Abdel-Aziz IZ, Stich A, et al. Comparison of different PCR protocols for the detection and diagnosis of *Plasmodium falciparum*[J]. Parasitol Res, 2005, 97: 424-428.  
[ 5 ] Nandwani S, Mathur M, Rawat S, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction analysis for diagnosis of falciparum malaria in Delhi[J]. Indian J Med Microbiol, 2005, 23: 176-178.  
[ 6 ] Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, et al. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2004, 46: 183-187.  
[ 7 ] Ndao M, Bandyayera E, Kokoskin E, et al. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 2694-2700.  
[ 8 ] Malhotra I, Dent A, Mungai P, et al. Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 3630-3635.  
[ 9 ] 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: 5636-5643.  
[ 10 ] Mangold KA, Manson RU, Koay ES, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp.[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 2435-2540.  
[ 11 ] Huang TY, Wang SH, Li XM, et al. Tag primer-nested/multiplex PCR for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23, 140-142. (in Chinese)  
(黄天谊, 黎学铭, 黎学铭, 等. 标签引物-套式/多重 PCR 检测恶性疟原虫和间日疟原虫的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 140-142.)  
[ 12 ] Huang TY, Li XM, Liu T, et al. Single-tube-nested/multiplex PCR for *Plasmodium vivax*[J]. Chin J Lab Med, 2004, 27: 642-645.  
(黄天谊, 黎学铭, 刘涛, 等. 单管-套式/多重聚合酶链反应鉴定间日疟原虫基因型[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27: 642-645.)  
[ 13 ] Huang TY, Wang XL, Li XM, et al. Studies on identification of circumsporozoite protein genotyping of *Plasmodium vivax*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2000, 18: 272-276. (in Chinese)  
(黄天谊, 王小力, 黎学铭, 等. 间日疟原虫孢子蛋白基因型的鉴别研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18: 272-276.)

(收稿日期:2006-11-27 编辑:盛慧锋)

## 【消息】

### 《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》征稿启事

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》被 MEDLINE 收录期刊, 中文核心期刊、中国生物医学核心期刊、中国基础医学类核心期刊, 中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国科技论文统计源来源期刊。

为进一步缩短论文刊出周期, 2007 年对有重大基金项目资助的优秀研究论文开设绿色通道; 对组稿(或约稿)的论文、及省级以上有价值的现场研究论文给予优先发表; 其他研

究论文争取在 6 个月内发表。欢迎踊跃投稿。投稿时请附作者联系电话和 E-mail。

地 址: 上海市瑞金二路 207 号

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》编辑部

邮 编: 200025

电话/传真: 021-54562376

E-mail: jsczz@shl63.net