

# 多重 PCR 技术检测恶性疟原虫抗药性相关分子标志的方法研究

张国庆, 汤林华\*, 官亚宜, 周水森, 郑彬, 黄芳, 武松, 刘燕

**【摘要】** 目的 建立恶性疟原虫 5 个主要抗药性相关基因的单管多重 PCR 扩增方法, 用于恶性疟原虫抗药性分子标志检测。方法 依据各基因参考序列, 运用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件, 设计 5 对特异性引物, 采用 Hot Start Taq DNA 聚合酶, 设置递增延伸温度, 对恶性疟原虫标准株(3D7、Dd2 和 HB3)、分离株(FCC1/HN、CMH/YN)、现场标本(来源于海南、云南和缅甸)、近缘虫种对照(间日疟原虫、伯氏疟原虫、食蟹猴疟原虫、杜氏利什曼原虫和牛源隐孢子虫)和空白对照(以 H<sub>2</sub>O 为模板)进行 5 个抗药性相关基因(包括恶性疟原虫氯喹抗性转运蛋白基因 *Pfcr*t、多药抗性基因 *Pfmdr*1、二氢喋酸合成酶基因 *Pfdhps*、二氢叶酸还原酶基因 *Pfdhfr* 和三磷酸腺苷酶第 6 亚基基因 *PfATPase6*) 的单管多重 PCR 扩增, 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果, 测定扩增产物序列, 并与参考序列(3D7 株)比对。结果 经电泳, 恶性疟原虫标准株、分离株和现场标本的多重 PCR 扩增产物均可见 5 条目标条带。测序结果与参考序列比对, 高度同源, 最低同源性为 98.5%。模板 DNA 量达 0.1 ng 即满足扩增要求, 近缘虫种对照和空白对照未见扩增产物。结论 多重 PCR 技术实现了单管 1 次反应完成 5 个抗药性相关基因的扩增, 该方法灵敏, 特异性好, 有助于提高恶性疟原虫抗药性分子标志的检测效率。

**【关键词】** 恶性疟原虫; 药物抗性; 单核苷酸多态性; 多重 PCR

中图分类号: R382.31 文献标识码: A

## Multiplex PCR for Analysis of the *Plasmodium falciparum* Drug Resistance Molecular Markers

ZHANG Guo-qing, TANG Lin-hua\*, GUAN Ya-yi, ZHOU Shui-sen, ZHENG Bin, HUANG Fang, WU Song, LIU Yan

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】** **Objective** To develop a multiplex PCR protocol for amplification of five *Plasmodium falciparum* drug resistance related genes, thereby facilitate the rapid and high throughput analysis of the drug resistance molecular markers. **Methods** Five pairs of primers were designed according to the reference sequences by using Primer Premier 5.0 and Oligo 6.0 software. Drug resistance related genes, including *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*t), multi-drug resistance 1 (*Pfmdr*1), dihydropteroate synthetase (*Pfdhps*), dihydrofolate reductase (*Pfdhfr*) and sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (*PfATPase6*), were amplified by single-tube multiplex PCR using Hot Start Taq DNA Polymerase among negative controls (*P. vivax*, *P. berghei*, *P. cynomolgi*, *Leishmania donovani*, *Cryptosporidium andersoni*), blank control (using H<sub>2</sub>O as template), as well as *P. falciparum* laboratory isolates (3D7, Dd2, HB3, FCC1/HN and CMH/YN) and field samples (collected from Yunnan, Hainan of China and Myanmar). After amplification, the PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The sequencing results were aligned to the reference sequence using BLAST. **Results** Five expected bands at 315, 437, 514, 594 and 770 bp were obtained with no additional or nonspecific products in *P. falciparum* laboratory isolates and field samples. The sequencing results were identical with the reference sequence except the polymorphism sites, and exhibited more than 98.5% homology. The multiplex amplification was performed successfully starting from 0.1 ng of DNA template. No band was observed in negative controls and blank control. **Conclusion** The present study establishes a method to amplify five *Plasmodium falciparum* drug

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目 (No. 2004BA718B13)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: ipdltlh@public3.sta.net.cn

resistance related genes harboring 21 SNPs by one-tube reaction. The multiplex PCR protocol showing high specificity and sensitivity is more convenient and efficient in analyzing the *P.falciparum* drug resistance molecular markers as compared with traditional nested PCR.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; Drug resistance; Single nucleotide polymorphism; Multiplex polymerase chain reaction

Supported by the Key Science-Technology Project of the National Tenth Five-year Plan of China(No. 2004BA718B13)

\* Corresponding author, E-mail: ipdth@public3.sta.net.cn

恶性疟在世界范围内流行形势严峻, 每年约 100 万人死于该病, 尚不包括间接引起的死亡<sup>[1]</sup>。我国疟疾防治已取得显著成就<sup>[2]</sup>, 但云南和海南仍存在恶性疟流行, 药物抗性的产生进一步使其危害加重。20 世纪 50 年代后期在泰缅边境和哥伦比亚出现氯喹抗性病例。随后, 氯喹抗性几乎遍布恶性疟流行区, 哌喹、甲氟喹、乙胺嘧啶和磺胺类药物抗性株相继出现, 甚至对青蒿素类药物的敏感性也开始下降<sup>[3-5]</sup>。研究表明我国也存在较为严重的恶性疟原虫抗药性问题<sup>[6]</sup>。深入了解恶性疟抗药性的产生机制, 准确快速监测抗性株的分布和流行已成为当前恶性疟防治工作中面临的重要问题。

新近研究表明抗疟药抗性的产生与疟原虫某些关键基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)有关。目前发现多个基因的 SNP 能较好反映疟原虫对相应药物的抗性情况, 并在不同地区的多项研究中得到验证。如: 恶性疟原虫氯喹抗性转运蛋白基因 (*Pfcr1*) 的 391 T/A、392 G/C、399 G/T、400 A/G、402 T/A 和 404 A/C 多态性(对应第 72~76 位氨基酸编码序列)与氯喹抗性相关联<sup>[7-12]</sup>; 恶性疟原虫多药抗性基因 (*Pfmdr1*) 的 256 A/T 和 257 A/T 多态性(对应第 86 位氨基酸编码序列)与氯喹等多种药物尤其是甲氟喹的抗性有关<sup>[7,8,13]</sup>; 恶性疟原虫二氢喋啶合成酶基因(*Pfdhps*)的 1482 T/G、1483 C/T/G、1486 C/G、1794 A/G、1918 C/G 和 2013 G/T/A 多态性(对应第 436、437、540、581 和 613 位氨基酸编码序列)与磺胺类药物抗性有关<sup>[5,14-16]</sup>; 恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因 (*Pfdhfr*) 的 148 T/C、152 A/T、153 T/C、175 T/C、323 G/A/C 和 490 A/T 多态性(对应第 50、51、59、108 和 164 位氨基酸编码序列)与乙胺嘧啶抗性有关<sup>[5,14-16]</sup>; 三磷酸腺苷酶第 6 亚基基因(*PfATPase6*)的 2306 G/A 多态性(对应第 769 位氨基酸编码序列)与青蒿素类药物的  $IC_{50}$  升高有关<sup>[17-19]</sup>。越来越多的研究者认为上述 21 个 SNP 可作为抗疟药抗性分子标志, 并试用于现场抗药性监测<sup>[5,20-22]</sup>。本研究根据多重 PCR 扩增原理, 采用 Hot Start *Taq* DNA 聚合酶, 设计 5 对特异性引物, 设置递增延伸温度, 优化多重

PCR (multiplex PCR) 反应条件、反应体系和引物组合, 为提高恶性疟原虫抗药性分子标志检测效率, 建立了 5 个抗药性相关基因的单管多重 PCR 扩增方法。

## 材料与方 法

### 1 标本及虫株来源

30 份恶性疟病例血标本分别取自海南省(10 份)、云南省(10 份)和缅甸禅邦(10 份), 均为镜检单纯恶性疟原虫阳性患者, 分别取外周静脉血约 20  $\mu$ l 滴于干滤纸, 干燥保存备用。恶性疟原虫 3D7 株、Dd2 株和 HB3 株 DNA 由美国国立卫生研究院疟疾研究与标准试剂资源中心提供, 云南 CMH/YN 分离株(云南勐腊县勐罕镇脑型疟患者体内分离, 实验室培养)由云南省寄生虫病防治所提供, 海南 FCC1/HN 分离株(海南省现场分离)由本所实验室培养, 为阳性对照。其中 3D7 株为恶性疟原虫参考株, 未见抗药性产生; Dd2 株存在对氯喹、甲氟喹和乙胺嘧啶抗性; HB3 株存在对乙胺嘧啶抗性。FCC1/HN 分离株为目前国内实验室最常用恶性疟原虫分离株, 未见抗药性产生; CMH/YN 分离株对氯喹、乙胺嘧啶和磺胺类药物存在抗性。以间日疟原虫(*P. vivax*, 取自安徽现场, 镜检确诊)、伯氏疟原虫(*P. berghei*, CS 株)、食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*, 本所实验室保种)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*, DD8 株)和牛源隐孢子虫(*Cryptosporidium andersoni*, XZ-BOV 株)为近缘虫株对照。以灭菌去离子水为空白对照。

### 2 主要仪器和试剂

主要仪器: 分光光谱仪(Gene Quant Pro 型, 美国), PCR 扩增仪(PTC-200 型, 美国), 凝胶成像系统(M-ULTI GENIUS Bio imaging system, 美国), 全自动测序仪(ABI PRISM 377 型, 美国)。主要试剂: 测序试剂盒(ABI PRISM Big Dye terminator v3.1)购自美国 PE 公司, chelex-100 购自美国 Bio-Rad 公司, PCR 及电泳所用试剂购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

### 3 DNA 提取

现场采集的恶性疟患者滤纸干血滴, 参照文献 [14,23] 方法提取恶性疟原虫 DNA。将滤纸血样剪碎置于 1.5 ml 离心管, 加 200  $\mu$ l 5% chelex-100, 100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min; 10 000 $\times$ g 离心 5 min, 振荡 30 s, 取上清, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

实验室培养的 CMH/YN 分离株和 FCC1/HN 分离株 DNA 提取方法为: 分别取 20  $\mu$ l 保种标本置于 1.5 ml EP 管, 加 1.0 ml H<sub>2</sub>O, 振荡 30 s, 室温静置 15 min, 13 000 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 加 200  $\mu$ l 5% chelex-100, 振荡 30 s, 100  $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 13 000 $\times$ g 离心 3 min, 取上清, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

将上述 DNA 提取液以 1:50 稀释后, 用分光光度计测量吸光度( $A_{260}$  和  $A_{280}$  值), 计算核酸浓度及纯度。

### 4 多重 PCR 扩增

4.1 多重 PCR 引物设计 运用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件, 根据 GenBank 中恶性疟原虫 *Pfprt*、*Pfmdr1*、*Pfdhps*、*Pfdhfr* 和 *PfATPase6* 的 DNA 参考序列(源自 3D7 株), 结合文献[14]设计 5 对引物(表 1)。

表 1 多重 PCR 反应所用引物及扩增产物长度  
Table 1 Primers and product sizes of the multiplex PCR

基因 Gene	引物 Primer	产物 Product (bp)
<i>Pfprt</i>	P1F 5'-GGAGGTTCTGTCTTGGTAAAT-3'	315*
	P1R 5'-ATATTGGTAGGTGGAATAGATTCT-3'	
<i>Pfmdr1</i>	P2F 5'-TGTGAAAGATGGGTAAAGAGCAGA-3'	514*
	P2R 5'-TCGTACCAATTCCTGAACTCACTT-3'	
<i>Pfdhps</i>	P3F 5'-GATTCTTTTCAGATGGAGG-3'	770 <sup>[14]</sup>
	P3R 5'-TTCCTCATGTAATTCATCTGA-3'	
<i>Pfdhfr</i>	P4F 5'-TGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-3'	594 <sup>[14]</sup>
	P4R 5'-CTGGAATAAATACATCACATTCATATG-3'	
<i>PfATPase6</i>	P5F 5'-AAAATAAATACCACATCAACACAT-3'	437*
	P5R 5'-TCAATAATACCTAATCCACCTAAA-3'	

注: \* 自行设计。

Note: \* Designed in this study.

4.2 多重 PCR 反应条件 多重 PCR 反应体系: 10 $\times$  PCR 缓冲液(含 20 mmol/L Mg<sup>2+</sup>) 5.0  $\mu$ l, 10 mmol/L 脱氧核苷三磷酸(dNTPs) 1.2  $\mu$ l, 10 条引物浓度均为 12.5  $\mu$ mol/L 的混合物液(含 3.2  $\mu$ l P1F、3.2  $\mu$ l P1R、2.0  $\mu$ l P2F、2.0  $\mu$ l P2R、2.0  $\mu$ l P3F、2.0  $\mu$ l P3R、2.0  $\mu$ l P4F、2.0  $\mu$ l P4R、2.0  $\mu$ l P5F、2.0  $\mu$ l P5R) 1.0  $\mu$ l, 模板 DNA 2.5  $\mu$ l, 5 U/ $\mu$ l 热启动 *Taq* DNA 聚合酶 0.4  $\mu$ l, 加灭菌双蒸水至 50.0  $\mu$ l。扩增参数, 94  $^{\circ}$ C 15 min; 94  $^{\circ}$ C 40 s、50  $^{\circ}$ C 2 min、由 50  $^{\circ}$ C 按 0.1  $^{\circ}$ C/s 递增至

72  $^{\circ}$ C, 共 40 循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。扩增产物 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。分别取 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0.025 ng 的 3D7 株 DNA 为模板, 进行多重 PCR 扩增, 观察其敏感性。

### 5 电泳鉴定

取 5.0  $\mu$ l 多重 PCR 扩增产物加 1  $\mu$ l 6 $\times$ 溴酚蓝上样缓冲液于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5  $\mu$ g/ml 溴化乙锭)电泳, 电泳缓冲液为 1 $\times$ Tris-乙酸(TAE), 电压 5 V/cm, 电泳时间 50 min。凝胶成像系统观察电泳结果并拍照记录。

### 6 序列测定

PCR 产物电泳后切胶、纯化, 采用测序试剂盒和全自动测序仪进行测序(由上海生工生物工程技术服务有限公司完成)。以 Chromas 2.3 软件分析测序结果, 多态性位点判读不清时, 行双向测序进一步确定。

### 7 序列比对

登录 NCBI BLAST 网页(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 选择 Specialized BLAST 中的 bl2seq 程序模块, 在“Sequence 1”框中逐一输入各标本 5 个基因扩增产物的测序结果, “Sequence 2”框中输入其对应的参考序列, 点击“Align”按钮进行序列比对, 根据比对结果, 分析各多态性位点碱基序列, 确定待测标本基因型。

## 结 果

### 1 多重 PCR 结果

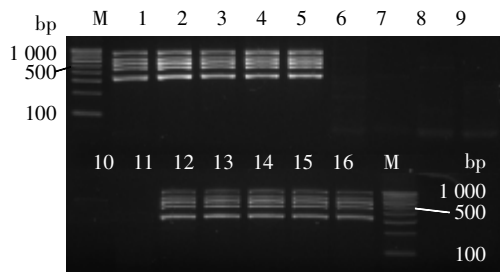
除 2 份现场恶性疟原虫标本 DNA 提取失败外, 28 份现场标本、3 份标准株和 2 份分离株经多重 PCR 扩增, 均见 5 条特异性目的条带, 长度分别为 315、437、514、594 和 770 bp, 与预期结果一致。5 份阴性对照与空白对照未见扩增产物(图 1)。不同模板 DNA 量多重 PCR 扩增结果表明, 模板达 0.1 ng 即可扩增出所有目的条带(图 2)。

### 2 测序结果

对恶性疟原虫 3D7 株、Dd2 株、FCC1/HN 分离株和 5 份现场标本(F01~F03 为云南现场标本, F04、F05 为缅甸禅邦现场标本)扩增产物测序结果见表 2。

### 3 序列比对结果

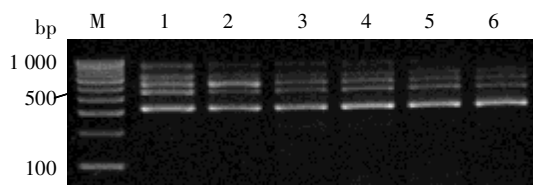
经比对, 各标本扩增产物序列除多态性位点以



M: DNA 标志物, 1: 恶性疟原虫 3D7 株, 2: 恶性疟原虫 Dd2 株, 3: 恶性疟原虫 HB3 株, 4: 恶性疟原虫 CMH/YN 分离株, 5: 恶性疟原虫 FCC1/HN 分离株, 6: 伯氏疟原虫 (CS 株), 7: 食蟹猴疟原虫, 8: 间日疟原虫 (取自安徽现场), 9: 杜氏利什曼原虫 (DD8 株), 10: 牛源隐孢子虫 (XZ-BOV 株), 11: 空白对照 (以灭菌去离子水为模板), 12~13: 云南现场恶性疟原虫, 14~15: 海南现场恶性疟原虫, 16: 缅甸现场恶性疟原虫。  
M: DNA marker, 1: *P. falciparum* 3D7, 2: *P. falciparum* Dd2, 3: *P. falciparum* HB3, 4: *P. falciparum* isolate CMH/YN, 5: *P. falciparum* isolate FCC1/HN, 6: *P. berghei*, 7: *P. cynomolgi*, 8: *P. vivax*, 9: *Leishmania donovani*, 10: *Cryptosporidium*, 11: Blank control (H<sub>2</sub>O), 12-13: *P. falciparum* samples from Yunnan, 14-15: *P. falciparum* sam-ples from Hainan, 16: *P. falciparum* samples from Myanmar.

图 1 恶性疟原虫多重 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.1 Multiplex PCR on *P.falciparum* field samples and controls



M: DNA 标志物, 1~6: 模板 DNA 依次为 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 和 0.025 ng, 7: 空白对照 (以灭菌去离子水为模板)。  
M: DNA marker, 1-6: DNA templates with 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.025 ng, respectively, 7: Blank control (H<sub>2</sub>O).

图 2 不同 DNA 模板量多重 PCR 扩增产物电泳结果

Fig.2 Multiplex PCR on different amount of DNA templates

外, 其余碱基与对应参考序列 (源自 3D7 株)一致, 呈高度同源, 最低同源率为 98.5% (262/266, F01 标本的 *Pfcr* 基因扩增片段)。以 FCC1/HN 分离株为例, 其扩增产物序列与对应参考序列比对结果见图 3。

表 2 8 株标本抗药性相关位点单核苷酸多态性检测结果

Table 2 Analysis of the drug resistance related SNPs in 8 isolates

虫株 Isolate	<i>Pfcr</i>						<i>Pfmdr1</i>		<i>Pfdhps</i>					<i>Pfdhfr</i>					<i>PFATPase6</i>		
	391	392	399	400	402	404	256	257	1482	1483	1486	1794	1918	2013	148	152	153	175	323	490	2306
3D7	T	G	G	A	T	A	A	A	T	C	G	A	C	G	T	A	T	T	G	A	G
Dd2	T	G	T	G	A	C	T	T	T	T	G	A	C	T	T	T	T	C	A	A	G
FCC1	T	G	G	A	T	A	A	A	T	C	C	A	C	G	T	A	T	T	A	A	G
F01	T	G	T	G	A	C	A	A	G	C	G	G	C	G	T	A	T	C	A	T	G
F02	T	G	T	G	A	C	A	A	T	C	G	G	G	G	T	T	T	C	A	A	G
F03	T	G	T	G	A	C	T	A	T	C	G	G	G	G	T	T	T	C	A	T	G
F04	T	G	T	G	A	C	A	A	G	C	G	G	C	G	T	A	T	T	A	T	G
F05	A	G	G	A	T	C	A	A	T	C	C	A	C	G	T	A	T	T	G	A	G

注: F01~F03 为云南现场标本, F04、F05 为缅甸现场标本; \* 斜体表示基因型为突变型。

Note: F01-F03 samples collected from Yunnan province, F04、F05 samples collected from Myanmar; \* Italics denote mutant genotype.

## 讨 论

恶性疟原虫的抗药性问题给疟疾防治工作带来了挑战, 恶性疟原虫抗药性监测已列入我国疟疾监测方案。目前采用的抗药性检测方法有体内法和体外法两种。这两种方法在检测对象的依从性、操作过程、技术水平与条件控制上要求较高, 人力、物力消耗较大。随着对抗药性机制研究的逐步深入, 发现多个抗疟药的靶分子或代谢酶基因如 *Pfcr*、*Pfmdr1*、*Pfdhps*、*Pfdhfr* 和 *PfATPase6* 的单核苷酸多态性与相应药物的抗性相关, 可作为抗药性分子标志, 并在泰国、印度尼西亚和刚果等恶性疟流行的国家和地区的抗药性监测中得到应用<sup>[20-22]</sup>。在分析上述基因多态性时, 首先需对相应基因进行扩增, 目前文献报道所普遍采用的巢式 PCR 扩增方法操作步骤复杂, 所需费用高, 时效性较差, 难以满足抗药性分子标志在现场监测中广泛应用的要求。

多重 PCR<sup>[24, 25]</sup> 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 它是在同一反应体系中添加两对以上引物, 可同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应, 其反应原理与一般 PCR 相同。本研究根据多重 PCR 扩增原理, 依据 *Pfcr*、*Pfmdr1*、*Pfdhps*、*Pfdhfr* 和 *PfATPase6* 等 5 个基因的参考序列设计 5 对特异性引物, 摸索和优化反应条件、反应体系和引物组合, 设置递增延伸温度, 建立了 5 个恶性疟原虫抗药性相关基因的单管多重 PCR 扩增方法。

该方法具有较高的灵敏度, 耗材和试剂用量显著减少, 可节省费用、人力和时间, 提高工作效率。只需 0.1 ng 模板 DNA 即可完成 5 个目的基因片段的扩增, 且特异性好, 对间日疟原虫、伯氏疟原虫、食蟹猴疟原虫、杜氏利什曼原虫和隐孢子虫进行扩增, 均未见扩增产物。

该方法扩增产物涵盖 21 个已知药物抗性相关

同源性(homology)=266/266 (100%) (A)

```

FCC1 1  GGATAATATTTTATTTATATTTTAAAGTATTTATTTTAAAGTGTATGTTGTAATGAATAA 60
3D7 345  GGATAATATTTTATTTATATTTTAAAGTATTTATTTTAAAGTGTATGTTGTAATGAATAA 404
FCC1 61  AATTTTGGCTAAAAGAAGCTTTAAACAAAATTTGGTAACCTATAGTTTGTAAACATCCGGAAC 120
3D7 405  AATTTTGGCTAAAAGAAGCTTTAAACAAAATTTGGTAACCTATAGTTTGTAAACATCCGGAAC 464
FCC1 121  TCACAACCTTATTTGTATGATTATGTTCTTTATGTTTATTCCTTATTGGAAATAAAAA 180
3D7 465  TCACAACCTTATTTGTATGATTATGTTCTTTATGTTTATTCCTTATTGGAAATAAAAA 524
FCC1 181  GGGAAATTCAAAAGTAAAGATAAATCAATATATTTAAATATGATGGATTATAAGAGAATCTA 240
3D7 525  GGGAAATTCAAAAGTAAAGATAAATCAATATATTTAAATATGATGGATTATAAGAGAATCTA 584
FCC1 241  TTCCACCTACCAATATAAAACATTAC 266
3D7 585  TTCCACCTACCAATATAAAACATTAC 610
    
```

同源性(homology)=420/420 (100%) (B)

```

FCC1 1  AACCAAAAGAGTACCCTGAAATATTTAGAAAAATAAAGAAATGAGAAAAATATCATTTTT 60
3D7 70  AACCAAAAGAGTACCCTGAAATATTTAGAAAAATAAAGAAATGAGAAAAATATCATTTTT 129
FCC1 61  TTACCCTTTAAAAGTTTACCTGCACAACATAGAAAAATATTTATATATCATTTGTATGT 120
3D7 130  TTACCCTTTAAAAGTTTACCTGCACAACATAGAAAAATATTTATATATCATTTGTATGT 189
FCC1 121  GCTGATATATCAGGAGGAACATTAACCTTTTTTTATATCTGTTGGTGTAAATATAAAG 180
3D7 190  GCTGATATATCAGGAGGAACATTAACCTTTTTTTATATCTGTTGGTGTAAATATAAAG 249
FCC1 181  AACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATAATATATCATTAGTATCTATAGGTTA 240
3D7 250  AACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATAATATATCATTAGTATCTATAGGTTA 309
FCC1 241  GTACAATTTATATTTCAATGATATCAAGTTATGTTATGGATGTAATACATCAAAAAATA 300
3D7 310  GTACAATTTATATTTCAATGATATCAAGTTATGTTATGGATGTAATACATCAAAAAATA 369
FCC1 301  TAAAAAATTTAAAGCTGAAATATTTAAAGAGTGTTTTTATCAAGATGGCAATTTTCAT 360
3D7 370  TAAAAAATTTAAAGCTGAAATATTTAAAGAGTGTTTTTATCAAGATGGCAATTTTCAT 429
FCC1 361  GATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGAACAAAGTGAGT 420
3D7 430  GATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGAACAAAGTGAGT 489
    
```

同源性(homology)=649/653 (99.4%) (C)

```

FCC1 18  AGGTGCTAGTGTATAGATATAGGTGGAGAATCCCTCTCTCCTTTGTTATACCTAATCC 77
3D7 1448 AGGTGCTAGTGTATAGATATAGGTGGAGAATCCCTCTCTCCTTTGTTATACCTAATCC 1507
FCC1 78  AAAAAATAGTGAAGAGAGATTTAGTAGTACCTGTATACAAATTTTCAAAAAGAAATGGAA 137
3D7 1508 AAAAAATAGTGAAGAGAGATTTAGTAGTACCTGTATACAAATTTTCAAAAAGAAATGGAA 1567
FCC1 138  TGATAAAAAAATAAAATTTGTAATGTGATGCGAAACCAATATAAGTATTGATACAAT 197
3D7 1568 TGATAAAAAAATAAAATTTGTAATGTGATGCGAAACCAATATAAGTATTGATACAAT 1627
FCC1 198  TAACATAAATGTTTTTAAAGAAATGTTGATATGATTTAGTTGATATATAAATGATAT 257
3D7 1628 TAACATAAATGTTTTTAAAGAAATGTTGATATGATTTAGTTGATATATAAATGATAT 1687
FCC1 258  TAGTCTGTACAATAATCCAGAAATATAAAAAATTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATCTA 317
3D7 1688 TAGTCTGTACAATAATCCAGAAATATAAAAAATTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATCTA 1747
FCC1 318  TAGTGTAGTTCTAATGCATAAAAAGGAAATCCACATACAATGGATAAATAAATAAATAA 377
3D7 1748 TAGTGTAGTTCTAATGCATAAAAAGGAAATCCACATACAATGGATAAATAAATAAATAA 1807
FCC1 378  TGATAATCTAGTTATGATATAAAAAATATTTAAACAAAGATATAATTTCTGTAT 437
3D7 1808 TGATAATCTAGTTATGATATAAAAAATATTTAGAACAAAGATATAATTTCTGTAT 1867
FCC1 438  AAATGGAATACCTCGTTATAGGATCTATTTGATATGGATTAGGATTTGCGAAGAAACA 497
3D7 1868 AAATGGAATACCTCGTTATAGGATCTATTTGATATGGATTAGGATTTGCGAAGAAACA 1927
FCC1 498  TGATCAATCTATTAACCTCTCAAAAATATACATGTATATGATGAGTATCCACTTTTAT 557
3D7 1928 TGATCAATCTATTAACCTCTCAAAAATATACATGTATATGATGAGTATCCACTTTTAT 1987
FCC1 558  TGGATATTCAGAAAAAGATTTATTTGCCCATTCGATGAATGATCAAAATTTGTAATAAA 617
3D7 1988 TGGATATTCAGAAAAAGATTTATTTGCCCATTCGATGAATGATCAAAATTTGTAATAAA 2047
FCC1 618  TACACAACAAAAATACATGATGAGCAACAAAATGAAAAATAAAAAATTTGTTGG 670
3D7 2048 TACACAACAAAAATACATGATGAGCAACAAAATGAAAAATAAAAAATTTGTTGG 2100
    
```

同源性(homology)=557/558 (99.8%) (D)

```

FCC1 11  CATATGTCATGTTGTAAGGTTGAAAGCAAAAATGAGGGGAAAAAATGAGGTTTTTAA 70
3D7 39  CATATGTCATGTTGTAAGGTTGAAAGCAAAAATGAGGGGAAAAAATGAGGTTTTTAA 98
FCC1 71  TAACACACATTTAGAGGCTTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATCCCT 130
3D7 99  TAACACACATTTAGAGGCTTAGGAAATAAAGGAGTATTACCATGGAAATGTAATCCCT 158
FCC1 131  AGATATGAAATATTTGTCAGTTACAACATATGTGAATGAAATCAAAAATGAAAAAT 190
3D7 159  AGATATGAAATATTTGTCAGTTACAACATATGTGAATGAAATCAAAAATGAAAAAT 218
FCC1 191  GAAATATAAGAGATGTAATATTTAAACAAAGAACTGGGAAATGTAATGATATGCC 250
3D7 219  GAAATATAAGAGATGTAATATTTAAACAAAGAACTGGGAAATGTAATGATATGCC 278
FCC1 251  TAATCTAAAAAATACAAAATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAACCTGGGAAAGCATTCC 310
3D7 279  TAATCTAAAAAATACAAAATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAACCTGGGAAAGCATTCC 338
FCC1 311  AAAAAAATTTAAACCTTTAAGCAATAGGATAAATGTTATATGTTCTAGAACCTAAAAAA 370
3D7 339  AAAAAAATTTAAACCTTTAAGCAATAGGATAAATGTTATATGTTCTAGAACCTAAAAAA 398
FCC1 371  AGAAGATTTGATGAGATGTTTATATCATTAAACAAGTTGAAGATCTAATAGTTTTACT 430
3D7 399  AGAAGATTTGATGAGATGTTTATATCATTAAACAAGTTGAAGATCTAATAGTTTTACT 458
FCC1 431  TGGGAAATTAATTAATAAATGTTTATATAGGAGGTTCCGTTGTTATCAAGAAT 490
3D7 459  TGGGAAATTAATTAATAAATGTTTATATAGGAGGTTCCGTTGTTATCAAGAAT 518
FCC1 491  TTTAGAAAAAATAAATAAAAAAATATATTTACTAGAATAAATAGTACATATGAATG 550
3D7 519  TTTAGAAAAAATAAATAAAAAAATATATTTACTAGAATAAATAGTACATATGAATG 578
FCC1 551  TGATGTAATTTTTCCAGA 568
3D7 579  TGATGTAATTTTTCCAGA 596
    
```

同源性(homology)=396/396 (100%) (E)

```

FCC1 17  TAATAATAATAGTAATAGTGTCCCAAGTGAATGTTCTTCTGGAGAAATGAATGTA 76
3D7 1998 TAATAATAATAGTAATAGTGTCCCAAGTGAATGTTCTTCTGGAGAAATGAATGTA 2057
FCC1 77  ACAATAAAAAATTTGAAATCCTAGGAGAAAGAACTTATGAGTGTATTGTTGAAAA 136
3D7 2058 ACAATAAAAAATTTGAAATCCTAGGAGAAAGAACTTATGAGTGTATTGTTGAAAA 2117
FCC1 137  TAAAAAATAAATAAATATGTTATGTAAGGTCACCTGAGAATAATAAAAAAATG 196
3D7 2118 TAAAAAATAAATAAATATGTTATGTAAGGTCACCTGAGAATAATAAAAAAATG 2177
FCC1 197  TAAATATTTAACGAAAAATGATATACGTCCTAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 256
3D7 2178 TAAATATTTAACGAAAAATGATATACGTCCTAATAAATAAATAAATAAATAAATAA 2237
FCC1 257  TCATAATAAGATCAAAAATGAGGAAAGAGCATTAAAGAACACTAGCTTTGCTTATA 316
3D7 2238 TCATAATAAGATCAAAAATGAGGAAAGAGCATTAAAGAACACTAGCTTTGCTTATA 2297
FCC1 317  AAAATTAAGTAAAGATTTAAATATAAAGAAATACAGATGATTATAAATAAATAA 376
3D7 2298 AAAATTAAGTAAAGATTTAAATATAAAGAAATACAGATGATTATAAATAAATAA 2357
FCC1 377  AGATTTAATTTATTTAGGTGAGTATGATTTATGTA 412
3D7 2358 AGATTTAATTTATTTAGGTGAGTATGATTTATGTA 2393
    
```

A: 与 *Pfcr* 序列比对, B: 与 *Pfmdr1* 序列比对, C: 与 *Pfdhps* 序列比对, D: 与 *Pfdhfr* 序列比对, E: 与 *PfATPase6* 序列比对; “↓” 为抗药性相关 SNP 位点, \* 为新发现多态性位点, FCC1 为 FCC1/HN 分离株。

A: Alignment of *Pfcr* sequence, B: Alignment of *Pfmdr1* sequence, C: Alignment of *Pfdhps* sequence, D: Alignment of *Pfdhfr* sequence, E: Alignment of *PfATPase6* sequence; “↓” Drug resistance related SNP site, \* Novel polymorphism site, FCC1: FCC1/HN isolate.

图3 恶性疟原虫 FCC1/HN 分离株扩增产物序列与参考序列(源自 3D7 株) 比对结果  
**Fig.3 The alignments of PCR products' sequence of *P. falciparum* isolate FCC1/HN to the reference sequence (from *P. falciparum* 3D7) using BLAST**

SNP位点, 分别反映恶性疟原虫对氯喹、甲氟喹、乙胺嘧啶、磺胺类和青蒿素类等药物的抗性情况<sup>[7-19]</sup>, 特别适用于 PCR-ELISA 和 SNP 芯片等高通量基因型分析技术。

利用该研究建立的方法成功扩增出 28 份现场标本和 5 份实验室标本的 5 个抗性相关基因, 并结合

基因测序分析了 3 份实验室标本和 5 份现场标本的 21 个抗性相关 SNP 位点。以 3D7 株为野生型, 可见 Dd2 株的 *Pfcr*、*Pfmdr1*、*Pfdhps* 和 *Pfdhfr* 发生突变, 提示存在氯喹、甲氟喹和乙胺嘧啶等药物抗性。FCC1/HN 分离株 *Pfdhps* 和 *Pfdhfr* 各存在一处突变, 表明曾受到乙胺嘧啶和磺胺类药物的压力。5

份现场标本分别存在多处突变,可推测相应药物抗性或敏感性下降。所有标本未见青蒿素类药物抗性相关基因 *PfATPase6* 的突变。

复习国内外文献,未见采用多重 PCR 方法扩增恶性疟原虫抗药性相关基因的报道,目前普遍采用巢式 PCR 方法,每扩增一基因需进行两轮 PCR 反应。本研究实现单管 1 次反应完成 5 个目的基因片段的扩增,为恶性疟原虫抗药性相关基因的扩增提供了新的技术方法,可提高恶性疟原虫抗药性分子标志的检测效率,将进一步推动恶性疟原虫抗药性分子标志在现场监测中的应用。

**致谢** 感谢本所倪奕昌研究员、曹建平研究员和第二军医大学张龙兴教授给予的指导与帮助。感谢美国国立卫生研究院疟疾研究与标准试剂资源中心 (Malaria Research and Reference Reagent Resource Center,NIH,USA)提供恶性疟原虫国际标准株 DNA。

### 参 考 文 献

[ 1 ] World Health Organization and UNICEF. World malaria report 2005 [M]. Geneva: World Health Organization, 2005. 11.

[ 2 ] Tang LH. Progress in malaria control in China[J]. Chin Med J, 2000, 113: 89-92.

[ 3 ] Luxemburger C, Brockman A, Silamut K, et al. Two patients with falciparum malaria and poor *in vivo* responses to artesunate [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998, 92: 668-669.

[ 4 ] Gogtay NJ, Kadam VS, Karnad DR, et al. Probable resistance to parenteral artemether in *Plasmodium falciparum*; case reports from Mumbai (Bombay), India[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2000, 94: 519-520.

[ 5 ] Guan YY, Tang LH. Molecular markers related to antimalarial resistance of *Plasmodium falciparum* and their applications on the surveillance to drug resistance[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 117-120. (in Chinese)  
(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: 117-120.)

[ 6 ] Liu DQ. Drug resistance of plasmodium and rational application of antimalarials[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 355-361. (in Chinese)  
(刘德全. 疟原虫的抗药性与抗疟药的合理应用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 355-361.)

[ 7 ] Anderson TJ, Nair S, Qin H, et al. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*pfert*) and multidrug resistance gene (*pfmdr1*) associated with antimalarial drug resistance? [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 2180-2188.

[ 8 ] Tagelsir N, Ibrahim Z, Medani A, et al. High frequency of *Plasmodium falciparum* *PfCRT* K76T and *Pfpg*h N86Y in patients clearing infection after chloroquine treatment in the Sudan[J]. Acta Trop, 2006, 97: 19-25.

[ 9 ] Guan YY, Tang LH, Hu L, et al. The point mutations in *Pfert* and *Pfmdr1* genes in *Plasmodium falciparum* isolated from Hainan Province [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23: 135-139. (in Chinese)  
(官亚宜, 汤林华, 胡铃, 等. 海南恶性疟原虫分离株 *Pfert* 和 *Pfmdr1* 基因点突变的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23: 135-139.)

[10] Yang YM, Zhang ZX, Dong Y, et al. Characteristic of point

mutation of three *Plasmodium falciparum* drug resistant genes in Yunnan Province[J]. Chin Trop Med, 2004, 4: 7-9. (in Chinese)  
(杨亚明, 张再兴, 董莹, 等. 云南省现场恶性疟原虫 3 个抗药性基因点突变特征[J]. 中国热带医学, 2004, 4: 7-9.)

[11] Dittrich S, Alifrangis M, Stohrer JM, et al. Falciparum malaria in the north of Laos: the occurrence and implications of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (*pfert*) gene haplotype SVMNT[J]. Trop Med Int Health, 2005, 10: 1267-1270.

[12] Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria [J]. N Engl J Med, 2001, 344: 257-263.

[13] Duraisingh MT, Refour P. Multiple drug resistance genes in malaria-from epistasis to epidemiology[J]. Mol Microbiol, 2005, 57: 874-877.

[14] Pearce RJ, Drakeley C, Chandramohan D, et al. Molecular determination of point mutation haplotypes in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of *Plasmodium falciparum* in three districts of northern Tanzania [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47: 1347-1354.

[15] Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, et al. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum dhfr* and *dhps* genes and age related *in vivo* sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria[J]. Acta Trop, 2005, 95: 183-193.

[16] Ndiaye D, Daily JP, Sarr O, et al. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal[J]. Trop Med Int Health, 2005, 10:1176-1179.

[17] Jambou R, Legrand E, Niang M, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6[J]. Lancet, 2005, 366: 1960-1963.

[18] Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, et al. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*[J]. Nature, 2003, 424: 957-961.

[19] Jung M, Kim H, Nam KY, et al. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum* Ca<sup>2+</sup>-ATPase (*PfATP6*) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2005, 15: 2994-2997.

[20] Congpuong K, Na Bangchang K, Mungthin M, et al. Molecular epidemiology of drug resistance markers of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand[J]. Trop Med Int Health, 2005, 10: 717-722.

[21] 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: 174-181.

[22] 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 Health, 2005, 10: 1030-1037.

[23] Zhang LX, Zhan B, Wang JJ, et al. Application of *Plasmodium falciparum* DNA extract from dried blood spot of falciparum malaria patient in polymerase chain reaction[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1995, 13: 120-122. (in Chinese)  
(张龙兴, 詹斌, 王聚君, 等. 滤纸干血滴抽提恶性疟原虫 DNA 用于 PCR 扩增 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1995, 13: 120-122.)

[24] Edwards MC, Gibbs RA. Multiplex PCR: advantages, development, and applications[J]. PCR Methods Appl, 1994, 3: S65-75.

[25] Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13: 559-570.

(收稿日期: 2007-06-09 编辑: 盛慧锋)