

【论著】

文章编号: 1000-7423(2001)-01-0004-03

恶性疟原虫海南分离株裂殖子表面蛋白 1 基因的分型研究*

江钢锋¹ 洪佳冬¹ 陈沛泉² 王善青³ 蒙锋³

【摘要】 目的 了解海南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1(PfMSP1)等位基因型的分型特征。方法 采用套式 PCR 方法,用几对 PfMSP1 特异引物扩增疟原虫虫株 PfMSP1 基因第 2 区与第 3 区部分片段,并对等位基因型代表株的基因片段进行序列分析。结果 39 份血样中有 36 份恶性疟患者共扩增出 44 个 PfMSP1 基因片段,以 MAD20 型为主导型(占 75%),K1 型为次要型,未检出 RO33 型。两种不同等位基因型的混合感染率为 19.4%。序列分析表明,海南省恶性疟原虫虫株的 MAD20 型和 K1 型第 2 区序列与 MAD20 和 K1 原型序列具有高度同源性。结论 海南省恶性疟原虫虫株存在 MAD20 型和 K1 型两种等位基因型,以 MAD20 型为优势虫株。

【关键词】 恶性疟原虫;裂殖体表面蛋白 1;基因分型;序列分析

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

Gene Typing of Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium falciparum* isolates from Hainan Province*

JIANG Gang-feng¹, HONG Jia-dong¹, CHEN Pei-quan², WANG Shan-qing³, MENG Feng³

(1 Department of Medical Parasitology, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224;

2 Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405;

3 Hainan Provincial Institute of Tropical Disease Control and Research, Haikou 570203)

【Abstract】 Objective To identify the genotype of merozoite surface protein 1 (MSP1) of *Plasmodium falciparum* isolates from Hainan Province. Methods Nested PCR was applied to amplify the MSP1 of Blocks 2 and 3 *Plasmodium falciparum* isolates from Hainan Province. Two allelic family representative gene fragments were sequenced. Results From 36 out of 39 blood samples from *Plasmodium falciparum* patients, 44 gene fragments of blocks 2 and 3 of the MSP1 were amplified, of which the MAD20-type allele was dominant(75%), followed by K1-type allele. No RO33-type allele was found. The mixed infection rate of the two different allelic type was 19.4%. Sequence analysis showed that the sequences of MAD20- and K1-type isolates from Hainan Province were highly homologous to that of the MAD20 and K1 allelic prototypes. Conclusion Two principal allelic types of MSP1 gene, MAD20-and K1-type, exist in malaria endemic areas in Hainan Province, the MAD20-type being the dominant.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*, MSP1, genotyping, sequence analysis

* Supported by the Scientific Research Fund for Returned Overseas Chinese Scholars, China Scholarship Council (CSC)

恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1(PfMSP1)是存在于恶性疟原虫裂殖子表面的一种分子量约为 190 kDa 的主要蛋白质,是疟疾疫苗的一种重要候选抗原。研究表明该分子由保守区、半保守区和可变区共 17 个区组成^[1-3],其可变区和半保守区仅存在两种基本类型,具有显著的二态性,K1 和 MAD20 被认为是 PfMSP1 的两种等位基因原型^[2];其第 2 区除上述两型外尚存在第 3 型即 RO33 型;不同基因型的虫株其致病性,免疫学特性,药物敏感性和流行病学特征可能不同。同时,该分子的多态性也给疟疾疫苗的研制造成一定的困难。因此,对疟疾流行区恶性疟原虫种群的 MSP1 基因进行分型研究,具有重要的意义。本研究采用套式 PCR 结合基因测序方法对我国海南省恶性疟原虫分离株的 MSP1 基因进行分型研究。

材料与方法

1 血样

1998 年和 1999 年在海南省保亭县,乐东县和东方市的恶性疟流行区采集经镜检确诊为恶性疟患者的血样共 39 份,这些患者近期未离开海南省,均为当地感染者。血样采集于 1.5 ml 小离心管,置于 -20℃ 备用。

2 基因组 DNA 的提取

取 50 μl 血样,按文献[4]方法用磷酸钠盐溶液提取,最后溶于 50 μl DEPC-H₂O 中。

3 目的基因的体外扩增

以上述提取的 DNA 作模板,以 PfMSP1 特异的引物进行套式 PCR。第 1 对引物(外引物)无等位基因型特异性,可扩增出 MSP1 基因 5' 端片段(1~4

基金项目: * 本研究为国家留学基金回国科研资助费资助项目
作者单位: 1 广东药学院寄生虫学教研室 广州 510224; 2 广州中医药大学热带医学研究所 广州 510405; 3 海南省热带病防治研究所 海口 70203)

区),用于第 1 次扩增反应;另 3 对引物(内引物)的上游序列具有基因型特异性,而下游序列为共用引物(无等位基因型特异性),能特异地扩增出不同 PfMSP1 等位基因型的序列片段,用于第 2 次扩增反应。引物的序列及相应扩增产物见表 1^[5]。PCR 反应体系为:50 μl 反应容积中含 5 μl DNA 模板,20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 2.5 U Taq DNA 聚合酶(上海生物工程技术服务公司产品)和 1 对引物各 0.2 mmol/L。反应条件为:先在 94℃ 变性 2 min,然后依次为 94℃ 30 s, 48℃ 40 s, 70℃ 2 min, 共 30 个循环,最后在 70℃ 延伸 5 min。第 1 次扩增反应产物作为第 2 次扩增反应的模板。扩增产物经 1.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

4 基因片段的序列测定

选择扩增产物中分别代表两种等位基因型的 PCR 产物,经纯化后进行序列测定,由中山医科大学达安基因公司完成。

结 果

1 PCR 分型

用表 1 中的几对等位基因型特异引物经套式 PCR 方法可分别扩增出 PfMSP1 基因的第 2 区和第 3 区部分序列片段。在 39 份恶性疟患者血样中有 36 份扩增得到了目的基因片段,其中有 33 份扩增出 MAD20 型序列片段(占 88.9%),有 11 份扩增出 K1 型序列片段(占 30.6%)。有 7 份血样(19.4%)同时扩增出 MAD20 型和 K1 型序列片段。所有血样均未扩增出 RO33 型序列片段。

表 1 引物序列及相应扩增产物
Table 1 Sequences of the primers and their corresponding PCR products

引物 Primer	序列 Sequence	扩增产物(bp) PCR product(bp)	等位基因型 Allele type
P1-F	AATAAGGCTAATGTAAAATC	1~4 区 Blocks 1~4 (1200)	非特异性 (non-specific)
P1-R	GGATCAGTAAATAAACTATA		
M2F	GGTTCAGGTAATTCAACACGTAC	2 区 Block 2(154)	MAD20
K2F	TCTTAAATGAAGAAGAAATTACTACAAA	2 区 Block 2(264~ 390)	K1
R2F	TAAACCATGGACCAAATACTCAAGT	2 区 Block 2(270)	RO33
C3R	ACATATGATTGGTTAAATCAAAGAG		通用(universal)

注:P1-F 和 P1-R 为外引物;M2F、K2F 和 R2F 分别与 C3R 组成 3 对内引物。

Note: P1-F and P1-R are external primers; M2F, K2F and R2F combine with C3R respectively as internal primers.

2 序列测定

选取同时扩增出 MAD20 型和 K1 型片段的 HN35 株的 PCR 产物,分别进行基因序列测定,并将测序结果与 MAD20 和 K1 原型序列进行比较。结果见图 1 和图 2。本研究所用的 MAD20 型特异性内引

```

MAD20  TCAGGTAAGTCAAGACCTACAAATCTCAGATAAATCAAGTGAATCA
          S G N S B R T N P S D V S S D S
HN35m  TCAGGTAAGTCAAGACCTACAAATCTCAGATAAATCAAGTGAATCA
          S G N S R R T N P S D N S S D S
MAD20  AAATCTAAAGCTTAAAGCTGATTAATAAATAGAGTTCAAAATTACTTG
          N T K T F A D L K H R V Q N Y L
HN35m  GAATCTAAAGCTTAAAGCTGATTAATAAATAGAGTTCAAAATTACTTG
          D A K S Y A D I K H R V Q N Y L
    
```

图 1 恶性疟原虫海南株 HN35m MAD20 型 MSP1 第 2、3 区部分 DNA 序列及推导氨基酸序列与 MAD20 株序列的比较。下划线表示海南株与 MAD20 株序列之间的差异。

Fig. 1 Alignment of MAD20-type MSP1 DNA sequence and deduced amino acid sequence from *P. falciparum* isolate HN35m with MAD20 sequence. Underlines represent the differences between Hainan isolate and MAD20 isolate.

物扩增所得的 MAD20 型片段不包括第 2 区的三肽重复序列。由图 1 可见,HN35m 序列片段与 MAD20 株序列相比,存在 3 个氨基酸的差异,这种差异已见

```

K1      GAAGAATTAACACAAAAGGTCGAAGTGGTCAAAAGTGGTACAAAGTGGTACA
          E E I T T K G A S A Q S G T S G T
HN35k  GAAGAAATTAACACAAAAGGTCGAAGTGGTCAAAAGTGGTACAAAGTGGTACA
          L E I T T A G A S A Q S G T S G T
K1      ATGGCTACA-----ATGGGTCGAAGTGGTCA-----
          V G T S G P S G P - - -
HN35k  AGTGGTACAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGT
          S G T S G T V G P S G P S G T S G
K1      -----AGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGT
          S G T S P S S R S N
HN35k  CCAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGT
          P S G P S G P S G T S P S S R S N
K1      AATTAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGT
          I L P K S N T S S G A S P P A D A
HN35k  AATTAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGTCAAAAGTGGT
          T L P R S N T S S G A S P P A D A
    
```

图 2 恶性疟原虫海南株 HN35k MSP1 第 2 区 DNA 及推导氨基酸序列与 K1 株的比较。横线“-”表示缺失的碱基,“—”表示缺失氨基酸。

Fig. 2 Alignment of DNA sequence and deduced amino acid sequence of K1-type MSP1 fragment from *P. falciparum* isolate HN35k with K1 sequence. Dashes represent the deletions of base pairs and amino acids

于以前的报道^[3,6,7]。而由图 2 可见,HN35k 序列与 K1 株第 2 区序列的差别在于该区的三肽重复序列的数目不同,前者比后者多了 5 个三肽重复序列。

讨 论

恶性疟原虫 MSP1 分子是一种重要的疟疾疫苗候选抗原, 该分子存在显著的多态性。有研究表明, 不同等位基因型的 PfMSP1 第 2 区具有不同的免疫原性和抗原性^[8]。对疟区 PfMSP1 进行分型研究, 既能了解当地疟原虫种群组成的特点, 有助于了解疟疾流行和传播规律, 也能为研制有效的疟疾疫苗提供依据。

本研究首次对我国海南省疟疾流行区恶性疟原虫种群的 MSP1 基因进行较大样本的分型研究, 结果表明海南省恶性疟原虫种群的 MSP1 等位基因型至少存在 MAD20 和 K1 型两种类型, 以 MAD20 型为优势虫株。当地不同等位基因型虫株的混合感染

率约为 20%, 与我国云南的情况相似^[9]。有趣的是, 通过比较发现, 越南、泰国和中国等亚洲国家的疟疾流行区多以 MAD20 型虫株占优势, 而非洲、美洲等地则以 K1 型或 RO33 型为优势虫株 (见表 2)。本研究未发现海南分离株中有 RO33 型的存在, 原因可能有两方面, 一是由于海南省是一个岛屿, 天然的屏障作用使当地疟疾的传播与流行相对独立于岛外, 外来虫株较不易传入, 造成海南省的恶性疟原虫基因型相对简单; 另一方面, 也有可能因为本研究检测的样本量尚不足以检出 RO33 型, 因为迄今的报告表明在亚洲的疟疾流行区 RO33 基因型所占的比例是最低的 (见表 2)。海南省的恶性疟原虫虫株中究竟是否存在 MSP1 的 RO33 等位基因型, 有待进一步研究。

表 2 不同国家 PfMSP1 第 2 区不同等位基因型检出频率的比较
Table 2 Comparison of frequency of allelic type in block 2 of PfMSP1 from different countries

国家 Country	检测例数 No. cases detected	检出基因数 No. gene fragments detected	MAD20 型 (%) MAD20-type	K1 型 (%) K1-type (%)	RO33 型 (%) RO33-type (%)
中国(海南省) China(Hainan)	36	44	33(75.0)	11(25)	0
中国(云南省) China(Yunnan) ⁹	30	38	22(57.9)	14(36.8)	2(5.3)
越南 Vietnam ^[5]	136	186	109(58.6)	51(27.4)	26(14.0)
泰国 Thailand ^[10]	19	25	16(64.0)	6(24.0)	3(12.0)
哥伦比亚 Colombia ^[11]	31	44	15(34.0)	3(6.8)	26(59.1)
塞内加尔 Senegal ^[12]	16	26	2(7.7)	9(34.6)	15(57.7)
塞内加尔 Senegal ^[13]	59	100	17(17.0)	32(32.0)	51(51.0)
坦桑尼亚 Tanzania ^[6]	18	27	6(22.2)	17(63.0)	4(14.8)

参 考 文 献

[1] Holder AA, Blackman MJ. What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite? Parasitol Today, 1994, 10: 182-184.
 [2] Tanabe K, Mackay M, Goman M, et al. Allelic Dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. J Mol Biol, 1987, 195: 273-287.
 [3] Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, et al. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). Mol Biochem Parasitol, 1993, 59: 1-14.
 [4] Foley M, Ranford-Cartwright LC, Babiker HA. Rapid and simple method for isolating malaria DNA from fingerprick samples of blood. Mol Biochem Parasitol, 1992, 53: 241-244.
 [5] Kaneko O, Kimura M, Kawamoto F, et al. *Plasmodium falciparum*: allelic variation in the merozoite surface protein 1 gene in wild isolates from southern Vietnam. Exp Parasitol, 1997, 86: 45-57.
 [6] Jiang G, Daubenberger C, Huber W, et al. Sequence diversity of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the Kilombero District, Tanzania. Acta Tropica, 2000, 74: 51-61.
 [7] Jiang G, Liu R, Daubenberger CA, et al. Sequence analysis of the MSP1 gene of *Plasmodium falciparum* isolates from Hainan, China. Chin J Parasitol Parasit Dis. 1999, 17: 294-297.

[8] Cavanagh DR, McBride JS. Antigenicity of recombinant proteins derived from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. Mol Biochem Parasitol, 1997, 85: 197-211.
 [9] 诸欣平, 周蕾, 刘强, 等. 云南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 基因分型及测序. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 155-158.
 [10] Jongwutiwes S, Tanabe K, Nakazawa S, et al. Sequence variation in the tripeptide repeats and T cell epitopes in P190 (MSA-1) of *Plasmodium falciparum* from field isolates. Mol Biochem Parasitol, 1992, 51: 81-90.
 [11] Snewin V A, Herrera M, Sanchez G, et al. Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia. Mol Biochem Parasitol, 1991, 49: 265-276.
 [12] Scherf A, Mattei D, Sarthou Jean-Louis. Multiple infections and unusual distribution of block 2 of the MSA1 gene of *Plasmodium falciparum* detected in the West Africa clinical isolates by polymerase chain reaction analysis. Mol Biochem Parasitol, 1991, 44: 297-300.
 [13] Robert F, Ntoumi F, Angel G, et al. Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90: 704-711.

(收稿日期: 2000-02-14 编辑: 李雅卿)