

文章编号: 1000-7423(2001)-02-0087-03

恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因的突变

张再兴 杨亚明 刘慧

【摘要】 目的 探测云南恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因(dhfr)与乙胺嘧啶和双氯胍抗性有关的基因位点突变的情况。方法 应用特异性套式 PCR 和限制性酶切片段长度分析(RFLPS)检测采自现场的干滤纸血样。结果 检测到恶性疟原虫 dhfr 基因内 16, 51, 108 和 164 位氨基酸有不同程度的突变, 以 Asn-108 和 Ile-51 为甚, 出现频率分别为 94.1% 和 90.1%。野生型(3D7 型)Ser-108 出现较低频率 9.1% (6/66), 而 Ala-16 出现频率较高 61.8% (42/68); 突变型比例高, HB3 型, 7G8 型/FCR3 型和 Cambodian 型比例为 1:21:7.5。结论 首次在云南西双版纳州检测恶性疟原虫 dhfr 基因内 16, 51, 108 和 164 位氨基酸存在不同程度的突变, 与乙胺嘧啶抗性有关的 7G8 型突变率较高, 而与双氯胍抗性有关的 FCR3 型则较低。

【关键词】 恶性疟原虫; 二氢叶酸还原酶(dhfr)基因; 基因突变

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

Gene Point Mutation in the Dihydrofolate Reductase-thymidylate Synthase Gene of *Plasmodium falciparum*

ZHANG Zai-xing YANG Ya-ming LIU Hui
(Yunnan Institute of Malaria Control, Simao 665000)

【Abstract】 Objective To investigate the gene point mutation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (dhfr) gene of *Plasmodium falciparum* isolate from Yunnan Province strongly associated with pyrimethamine and cycloquanil resistance. **Methods** Nested PCR and restriction endonuclease digestion were applied to detect the gene mutation using dried blood filter paper collected from the fields in Yunnan Province. **Results** Different mutations were found in 4 amino acids at positions 16, 51, 108 and 164 of dhfr gene, particularly, Asn-108 and Ile-51, the mutation frequency being 94.1% and 90.1%, respectively. The frequency of the wild-type genotype (3D7-type) Ser-108 appeared lower (9.1%), while the frequency of the Ala-16 was high (61.8%); the mutation-type was very high, the ratio of HB3-type, 7G8-type/FCR3-type and Cambodian-type was 1:21:7.5. **Conclusion** The investigation first demonstrated that *Plasmodium falciparum* Yunnan isolate dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene (dhfr) at positions 16, 51, 108 and 164 exhibited different degrees of point mutation. The frequency of mutation of the 7D8-type involved in pyrimethamine resistance was higher, while that of the FCR3-type involved in cycloquanil resistance was lower.

【Key words】 *Plasmodium falciparum*, dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (dhfr) gene, gene mutation

乙胺嘧啶和氯胍及体内生物活性代谢物环氯胍, 具有相似的化学结构, 抑制同样的药物作用分子靶^[1], 提示两个药物间可能产生交叉抗性。通过标准克隆株的恶性疟原虫二氢叶酸还原酶-二氢蝶啶合成酶基因序列的比较, 得到了与乙胺嘧啶抗性和双氯胍抗性有关的基因结构图^[2], 如在 108 位上丝氨酸改变为天冬酰胺即对乙胺嘧啶产生抗性; 如丝氨酸被苏氨酸所取代的同时伴有 16 位丙氨酸被取代, 则对双氯胍产生抗性。在 51, 59 和/或 164 位的辅助突变侧与抗叶酸抗性水平有关。从世界各地的研究资料看, 探讨抗叶酸药抗性基因的机制对确定乙胺嘧啶/磺胺多辛(防 2)及双氯胍抗性基因型具有很大潜力。本文初步调查云南恶性疟乙胺嘧啶/双氯胍抗性基因的突变情况。

材料与与方法

1 样本来源

所有血样于 1999 年 8 月~11 月采自云南西双版纳白果州公司麦龙山种植基地。镜检确诊为疟疾的病人, 用新华滤纸涂制 0.5 cm 的血滴 3 个, 自然干燥, 塑料袋封装, 带回实验室进行二氢叶酸还原酶基因突变位点检测。

2 提取恶性疟原虫 DNA

用 5% Chelex-100 煮沸法提取干滤纸血 DNA。将含血滤纸剪碎或用打孔器打出 6 cm 的小纸片, 置于小试管中, 加去离子水 1 ml, 溶血, 离心 12 000 g 1.5 min, 去上清, 留滤纸和沉淀物加 180 μl 已预热的 95℃ 5% Chelex-100 悬液煮沸 10 min, 开始和期间震荡 30 s 取出离心 12 000 g 1.5 min, 取上清再离

心 1 次, 留上清于 4℃ 或 20℃ 保存, 作为 PCR 模板。

3 PCR

参照 Duraisingh 等^[3]的引物和方法, 总反应体积 50 μl, 含 5 μl 样品 DNA, 0.25 μmol/L 的每对引物(赛百盛公司), 200 μmol/L dNTPs, 10×PCR 缓冲液, 1.25 Taq 酶 (Promega), 5% 二甲基亚枫 (DMSO), 扩增 dhfr 基因第一步: 94℃ 3 min 变性, 接着 94℃ 1 min, 45℃ 2 min, 72℃ 1 min 进行 5 个循环, 再在 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1 min 进行 35 个循环。第二步, 取 2 μl 第一反应的 PCR 产物作模板, 其余组份相同。首次循环 94℃ 3 min, 而后 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 1 min 40 个循环, 最后一个循环 72℃ 延长 10 min。PCR 结束后取 6 μl 扩增产物加于 1% 的含溴化乙锭凝胶上电泳, 紫外透射仪 (ZF-2 型, 上海产) 观察结果。M3/F 产生约 522 bp 片段, M4/F 为 330 bp 片段。

4 限制性酶切反应

dhfr 基因内的 108 编码 3 个氨基酸, 即丝氨酸, 天冬酰胺和苏氨酸, 可分别被 *AluI*, *BsrI* 和 *BstNI* 消化鉴别。编码 16, 51 和 164 的氨基酸变异可分别被 *NlaIII*, *Tsp509I* 和 *DraI* 消化鉴别。同样地, M4/F 的 PCR 产物将象 M3/F 的一样, 编码 108 的氨基酸变异可被 *AluI*, *BsrI* 和 *BstNI* 所鉴别。另外, 所特有的编码 59 的氨基酸变异可被 *XmnI* 鉴别(本研究未检测)。

5 分类分析

采用已证实的研究, dhfr 基因的 16, 51, 59, 108 和 164 位的 5 个氨基酸的突变可以归纳为下列几种类型: 野生型, 命名为 3D7 型模式, 为 Ala-16/Asn51/Cys-59/Ser-108/Ile-164 突变型, 具单一 Ser 突变为 Asn-108 的命名为 HB3 型; 具有双位点突变的命名为 K1 型 (Asn-108 + Arg59)、7G8-型 (Asn-108 + Ile-51) 和 FCR3 型 (Thr-108 + Val-16); 有 3 个突变位点的命名为 W2 型 (Asn-108/Arg51/Ile-51), 具有 4 个突变位点的命名为 Cambodian 型 (Asn-

108-/Arg-59/Ile-51/Leu-164)。

结 果

本研究共检测 103 份采自现症恶性疟病人干滤纸血样 (3 例混合感染)。年龄 5~56 岁, 原虫密度 70~52 460 个/μl, 108 位点的 Asn, Ser, Thr 必须有一种形式存在, 16, 51, 164 三位点必须检测成功两个位点以上才选入研究分析。70 份样本检测成功, dhfr 基因的 16, 51 108 和 164 位氨基酸发生不同程度突变(附表)。

按野生型和突变型分类分析结果如下: 3D7 型 Ser-108, Ala-16, Asn-51 和 Ile-164, 分别出现 6, 26, 6 和 10 例; HB3 型仅出现 2 例; 7G8 型和 FCR3 型分别为 36 和 6 例; Cambodian 型 15 例。HB3 型, 7G8 型/FCR3 型和 Cambodian 型的比例为 1:21:7.5。

PCR 扩增产物电泳结果和限制性酶切反应结果见图 1 和 2。

讨 论

双氯胍在云南已经停用多年。乙胺嘧啶复方 (防 2) 作为云南省主要预防药之一, 疗效差, 很少用于治疗。1994 年杨恒林体外抗性研究结果证实云南恶性疟原虫对防 2 已产生了高度抗性^[4]。

本研究首次探查了云南西双版纳百果州的恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因 16, 51, 108 和 164 位氨基酸的突变, 结果显示 4 个氨基酸位点都有不同程度的突变, 以 Asn-108 和 Ile-51 为甚, 出现频度高达 94.1% 和 90.5%。从已证实的抗性突变关系的角度分析, Asn-108 的突变显示恶性疟原虫对乙胺嘧啶产生抗性, 而辅助突变 Ile-51 则示抗性增加的程度, 我们推论恶性疟原虫已对乙胺嘧啶产生了较高的抗性。这与上述资料一致, 也符合我们多年对乙胺嘧啶/磺胺多辛抗性的观察。

20 多年未使用双氯胍, 但在本研究中仍观察到一定比例的 FCR3 (已证实它与双氯胍抗性有明显关系), 这可能是其与乙胺嘧啶有同样结构和药物作用靶而产生交叉抗性的缘故。

附表 Dhfr 基因的 16, 51, 108 和 166 位氨基酸突变情况
Table Mutations of 4 amino acids at positions 16, 51, 108 and 164 of dhfr gene

	16		51		164		108		
	Ala	Val	Asn	Ile	Ile	Leu	Asn	Ser	Thr
样本数 No. samples	42	26	6	57	10	48	66	6	27
频度 Frequency (%)	61.18	38.2	9.5	90.5	17.2	82.8	94.1	9.1	39.1

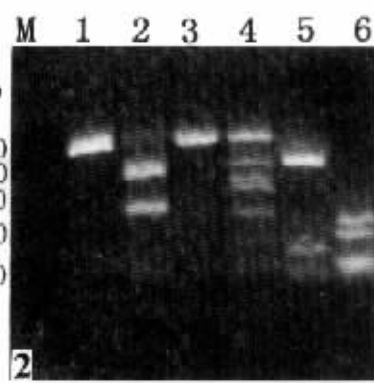
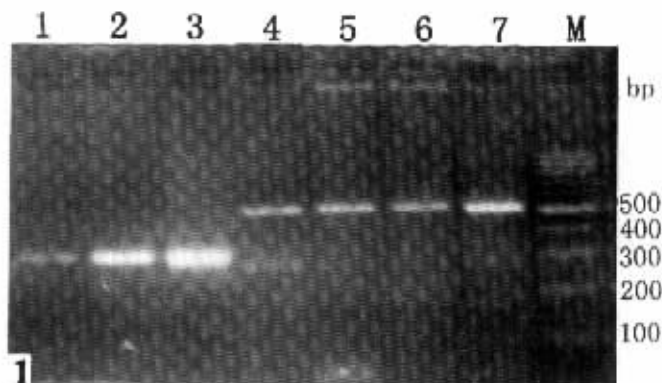


图 1 PCR 产物电泳结果 1-7 恶性疟原虫云南分离株 PCR 产物 M 标志物 图 2 限制性酶切结果 M 标志物 1 *AluI* 2 *BstI* 3 *BstNI* 4 *DraI* 5 *NlaIII* 6 *Tsp5091*

Fig. 1 Result of electrophoresis of PCR products Lanes 1-7 PCR amplified products from *P. falciparum* Yunnan isolate M Marker

Fig. 2 Result of restriction endonuclease digestion M Marker Lanes 1-6 *P. falciparum* Yunnan isolate DNA was digested with *AluI*, *BstI*, *BstNI*, *DraI*, *NlaIII* and *Tsp5091*, respectively

研究中发现除上述的分类归类外,还有少量的位点突变无法归类,如 Asn-108 和 Thr-108 同时出现突变,可能是由于该类样本的恶性疟原虫存在多个克隆株,有待进一步证实。我们也发现该方法灵敏度极高,在原虫 < 100 个/μl 时仍可获得成功。另外引物种特异性强,有 2 例混合感染都出了结果,而间日疟血样则呈阴性(1 例例外)。总之,我们认为该方法是可行的,得出的结果也与实际基本相符,拟进一步开展体内/体外抗性测定与 dhfr 基因检测的配对资料研究,以便证实各位点突变与实际抗性的相关性。

致谢 感谢李崇珍,周升,李丽,升晓东帮助现场采样,特此致谢

参 考 文 献

[1] Fidock DA, Normum T, Wellens TE. Cycloquanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase. *Mol Pharmacol*, 1998, 54: 1140-1147.
 [2] Basco LK, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in Yaounde, Cameroon. VI Sequence variations in the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthetase gene and *in vitro* resistance to pyrimethamine and cycloquanil. *Am J Trop Med Hyg*, 2000, 62: 271-276.
 [3] Darsisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: Detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol*, 1998, 89: 1-8.
 [4] 杨恒林,杨品芳,杨亚明. 云南南部恶性疟原虫对甲氧喹、奎宁、氯喹、氯唑、磺胺多辛/乙胺嘧啶及咯萘啶敏感性体外测定. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1994, 12: 140-142.

(收稿日期: 2000-10-26 编辑: 庄兆农)

中华预防医学会 21 世纪 我国医学寄生虫学学科发展展望研讨会征文通知

按中华预防医学会 2001 年学术活动计划,本分会定于 2001 年 8 月在哈尔滨市召开中华预防医学会 21 世纪我国医学寄生虫学学科发展展望研讨会,现将有关征文事宜通知如下:

1 征文内容

综合性或专题性从不同方面和视角探讨 21 世纪我国医学寄生虫学学科发展和寄生虫病防治面临的问题、机遇和发展前景。

2 征文要求:

①请寄送论文摘要或述评,要求论点明确,文字精炼,规范使用名词术语和计量单位,正确使用标点符号,免参考文献;②论文摘要将直接复制装订成汇编,故必须统一规范,激光打印,字迹清晰,并务必认真自行校对;③每篇征文占纸 1-3 页,注意尽可能满页,以免留空过多;④打印规格:每页字端周边宽 15 cm,长 22 cm,题目 3 号黑体,作者姓名小 4 号楷体,单位名称及城市名小 5 号宋体,正文 5 号宋体;⑤竭诚欢迎同时将全文投《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》,如入选会议交流,将予优先发表。

3 截止日期: 2001 年 6 月 30 日

4 联系人及地址:

胡亚青,上海市瑞金二路 207 号,中国预防医学科学院寄生虫病研究所,邮编 200025,
电话 021-64377008×8026,传真 021-64332670, E-mail: kqshi@81890.net.

中华预防医学会医学寄生虫分会