

从 Giemsa 染色的血膜中扩增间日疟原虫 DNA 方法探讨

肖方震, 张山鹰*, 许龙善, 黄江宏, 谢汉国, 欧阳榕

【摘要】 目的 建立从 Giemsa 染色的血膜中提取疟原虫 DNA 的方法。方法 分别采用 Na_2HPO_4 法和 Chelex-100 离子交换法, 经过反复优化, 提取血膜中的 DNA, 进行套式 PCR 扩增鉴定 PvMSP-1 等位基因型。结果 用 Na_2HPO_4 法和 Chelex-100 离子交换法分别提取 40 张不同类型的间日疟原虫阳性血膜 DNA, 未染色的厚血膜全部扩增出目的基因条带, 而染色的薄血膜未能扩增出目的基因条带。两种方法均可检测红细胞间日疟原虫感染率 $\geq 0.01\%$ 的血涂片。结论 从多年保存的标准血膜中提取疟原虫 DNA 进行基因型鉴别是可行的。

【关键词】 血膜; 间日疟原虫; 提取 DNA

中图分类号: R382.311

文献标识码: A

DNA Amplification of Plasmodium vivax Parasites from Giemsa-stained Blood Smears

XIAO Fang-zhen, ZHANG Shan-ying*, XU Long-shan, HUANG Jiang-hong, XIE Han-guo, OU Yang-rong

(Fujian Provincial Center for Diseases Control and Prevention, Fuzhou 350004, China)

【Abstract】 Objective To develop methods of extracting DNA from malaria parasites on Giemsa-stained blood smears. Methods Improved Na_2HPO_4 method and Chelex-100 ion-exchange technique were used to extract DNA from Giemsa-stained or unstained blood smears. Nested PCR was employed for amplification and identification of allelotypes in the Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 (PvMSP-1). Results Target DNA bands appeared in all samples of unstained thick blood smears, while no DNA bands were visible in the fixed and stained thin smears. Both methods identified PvMSP-1 alleles from smears with parasitemia of $\geq 0.01\%$. Conclusion It is feasible to identify PvMSP-1 alleles from Giemsa-stained blood smear.

【Key words】 Blood smear; Plasmodium vivax; DNA extraction

Supported by the Natural Science Foundation of Fujian (No.Z0516066)

* Corresponding author, E-mail: zsy@fjcdc.com.cn

近年来分子生物学技术特别是 PCR 技术在疟疾防治研究, 尤其是疟原虫基因分型、遗传特征分析及分子流行病学调查等方面应用日臻广泛。PCR 扩增受到许多因素的影响, 其中 DNA 抽提是获取成功的第一步。目前全血和滤纸血已被证明是良好的 DNA 来源^[1,6], 但在进行病原学追踪调查、研究既往疟区或暴发点基因型特征、开展回顾性分子流行病学研究时, 由于传统的疟疾病原检测方法是采血膜显微镜检查疟原虫, 往往无法获得全血或滤纸血, 很大程度地限制了研究工作的开展。如果能够从保存多年、经固定和染色处理的血膜中成功提取疟原虫 DNA 进行基因分析, 将对疟疾分子流行病学研究具有重大意义。

国外有学者在这方面做了一些尝试, 本文参考有关文献报道采用不同提取方法进行反复优化和改进, 建立了 2 种比较稳定的从血膜中提取疟原虫 DNA 的方法。

材料与方 法

1 间日疟患者血样

血样来自: ①福建省疾病预防控制中心血液寄生虫科保存的 20 年以上、经过甲醇固定、Giemsa 染色的间日疟原虫标准血涂片, 以及保存 10~19 年未染色的间日疟原虫标准血涂片, ②近期来本单位就诊的疟疾患者, 采集间日疟原虫标准血涂片 (约 5 μl 血量, 均匀涂制直径为 1 cm 的圆形厚血膜, 另约 1.5 μl 血, 涂制成约 2.5 cm 长度的薄血膜), ③从确诊的间日疟患者采集的滤纸血。④从确诊的恶性疟患者采集的滤纸血。

基金项目: 福建省自然科学基金 (No. Z0516066)

作者单位: 福建省疾病预防控制中心, 福州 350004

* 通讯作者: E-mail: zsy@fjcdc.com.cn

所有血涂片均经过 2 名经验丰富的镜检员检查，每张血涂片至少检查 100 个视野，计算疟原虫密度 [疟原虫数/100 个红细胞 (RBC)]。

2 DNA 制备

2.1 方法 1 (Na₂HPO₄ 法) 采用 Na₂HPO₄ 提取血涂片中 DNA，参考 Foley 等^[2]方法，并进行改进和优化。取 1.5 ml 离心管 (EB 管)，用高压灭菌的吸头将血膜刮入 EB 管中，加 5 mmol/L 冰浴的 Na₂HPO₄ 溶液 500 μl，漩涡振荡，室温下离心 10 min，弃上清，以上步骤重复 3 次。用双蒸水洗涤 1~2 次，加 50 μl 双蒸水，振荡，沸水浴 10 min，离心 10 min，留取上清液，-20℃ 保存备用。

2.2 方法 2 (Chelex-100 离子交换法) 采用 Chelex-100 离子交换法提取血涂片中 DNA，参考 Alger 等^[3]方法，并进行改进。取 1.5 ml 的 EB 管，用高压灭菌的吸头将血膜刮入 EB 管中，加 500 μl 皂素 (美国 BBI 公司) 溶液，置于冰上固定 1 h，期间漩涡振荡 3~4 次。室温下 12 000×g 离心 4 min，弃上清，用双蒸水洗涤 2~3 次，加 100 μl 预热的 5% Chelex-100 悬液 (美国 Sigma 公司)，漩涡振荡，沸水浴 10 min，12 000×g 离心 4 min，留取上清液，-20℃ 保存备用。

3 PvMSP-1 等位基因型鉴定

3.1 引物 根据文献^[4]报道，间日疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (PvMSP-1) 存在 Sal-1 和 Belem 2 种主要的等位基因型，设计的引物 (WF: 5'-CCCTACTACTTGATGGT-CCTCA-3'，WR: 5'-CCTTCTGGTACAGCTCAATG-3' 为外侧引物。NF: 5'-AGCATGATCGCCACTGAGAAG-3'，NR: 5'-GTGCTTGTGACATGCGTAAGC-3' 为内侧引物) 可分别扩增出 400 bp (Belem) 和 470 bp (Sal-1) 2 种不同长度的条带，并可进行测序比对。

3.2 套式 PCR 反应体系 第 1 轮扩增：以 15 μl 血样 DNA 提取液为模板加入总体积为 30 μl 的反应体系中，包括 10×PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris·HCl, pH 8.4, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton × 100)，MgCl₂ 1.5 mmol/L，脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 125 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 (上海生工生物工程有限公司) 1.5 U，外侧引物 (WF/WR) 各 0.25 μmol/L，反应体系置于 PCR 扩增仪 (Tgradient, 德国 Biometra 公司)。条件为 94℃ 2 min, 94℃ 55 s, 55℃ 55 s, 72℃ 70 s, 25 个循环, 72℃ 10 min。

第 2 轮扩增：取第 1 轮扩增产物 6 μl，加入总体积为 50 μl 的反应体系中，包括 10×PCR 缓冲液，

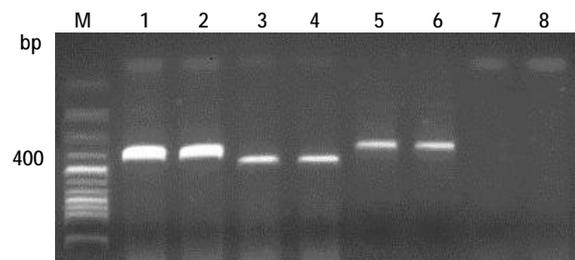
MgCl₂ 1.5 mmol/L，dNTPs 125 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 1.5 U，内侧引物 (NF/NR) 各 0.25 μmol/L，反应体系置于 PCR 扩增仪。条件为 94℃ 2 min, 94℃ 55 s, 55℃ 50 s, 72℃ 60 s, 35 个循环, 72℃ 10 min。

3.3 产物检测 取 5 μl 第 2 轮扩增反应液，加入 1 μl 溴酚蓝缓冲液，点样于 2% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭)，电泳缓冲液为 1×Tris-乙酸缓冲液 (TAE)，75 V 电泳 40 min，用凝胶成像系统成像。

结 果

1 方法 1 提取 DNA 扩增结果

提取 40 张不同来源的间日疟原虫阳性的血涂片 DNA (染色的厚血膜、未染色的厚血膜、染色的薄血膜、未染色的薄血膜各 10 张)，26 张扩增出目的基因条带，其中 400 bp 的条带 11 个，470 bp 的条带 15 个。染色的厚血膜、未染色的厚血膜、未染色的薄血膜成功扩增出目的基因比例分别为 70% (7/10)、100% (10/10)、90% (9/10)，染色的薄血膜未扩增出条带，其中 2 张保存 20 年以上的血涂片成功地扩增出条带。同时用该方法提取 5 份间日疟原虫滤纸血 DNA 均扩增出清晰条带 (图 1)。



M: DNA 标志物，1: 2 个疟原虫/100 RBC，2: 1 个疟原虫/100 RBC，3: 0.5 个疟原虫/100 RBC，4: 0.1 个疟原虫/100 RBC，5: 0.01 个疟原虫/100 RBC，6: 从滤纸血提取的 DNA (阳性对照)，7: 阴性对照，8: 恶性疟原虫 DNA。

M: DNA marker, 1: 2 parasites/100 RBC, 2: 1 parasite/100 RBC, 3: 0.5 parasites/100 RBC, 4: 0.1 parasite/100 RBC, 5: 0.01 parasite/100 RBC, 6: Blood on filter paper of Plasmodium vivax (positive control), 7: Negative control, 8: DNA of Plasmodium falciparum.

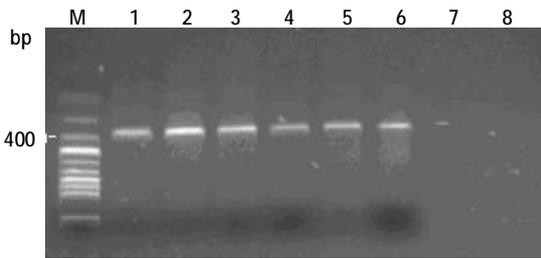
图 1 方法 1 提取 DNA 的扩增结果

Fig.1 PCR results on DNA extracted by Na₂HPO₄ method

2 方法 2 提取 DNA 扩增结果

用方法 2 提取 40 张不同的血涂片 DNA (染色的厚血膜、未染色的厚血膜、染色的薄血膜、未染色的薄血膜各 10 张)，23 张扩增出目的基因条带，其中 400 bp 的条带 9 个，470 bp 的条带 14 个，染色的厚血膜、未染色的厚血膜、未染色的薄血膜成功扩增出目的基因的比例分别为 50% (5/10)、100% (10/10)、80% (8/10)。与方法 1 相同，染色的薄血膜未能扩增出条带，5 份滤纸血均出现清晰条带 (图 2)。

固定染色的薄血膜各 10 份, 两种方法均未扩增出目的基因条带。



M: DNA 标志物, 1: 2 个疟原虫/100 RBC, 2: 1 个疟原虫/100 RBC, 3: 0.5 个疟原虫/100 RBC, 4: 0.1 个疟原虫/100 RBC, 5: 0.01 个疟原虫/100 RBC, 6: 从滤纸血提取的 DNA (阳性对照), 7: 阴性对照, 8: 恶性疟原虫 DNA。

M: DNA marker, 1: 2 parasites/100 RBC, 2: 1 parasite/100 RBC, 3: 0.5 parasite/100 RBC, 4: 0.1 parasite/100 RBC, 5: 0.01 parasite/100 RBC, 6: Blood on filter paper of *Plasmodium vivax* (positive control), 7: Negative control, 8: DNA of *Plasmodium falciparum*.

图 2 方法 2 提取 DNA 的扩增结果

Fig.2 PCR results on DNA extracted by Chelex-100 ion-exchange technique

3 模板制备的敏感度

分别对不同感染密度的血涂片进行检测, 方法 1 和方法 2 均能够检出原虫感染率 $\geq 0.01\%$ 的血涂片 (图 1, 图 2); $\leq 0.01\%$ 的血涂片, 用方法 1 和 2 均未扩增出目的条带。

讨 论

本实验从长期保存的染色血涂片中提取了 DNA, 并对间日疟原虫的基因型进行鉴定, 证实了在进行疟疾分子流行病学调查时, 以血涂片作为 DNA 的一个来源是可行的, 这将为间日疟患者病原学追踪调查、研究既往暴发点的基因型特征以及进行回顾性分子流行病学研究带来方便。Kirchgatter 等^[5] 曾报道从 Giemsa 染色的血涂片提取 DNA 对数年前恶性疟原虫的暴发来源进行分析, Scopel 等^[6] 也证实能够从血膜中提取疟原虫 DNA, 认为该方法对于开展疟疾的流行病学是一个便利的方法。

从固定染色的厚血膜提取 DNA 受到血量、原虫含量、各种固定剂、染色剂以及血膜中存在各种 Taq 酶抑制物等因素的影响和制约。本文报道 2 种提取方法在血涂片的血量符合标准、操作过程质量控制好的情况下, 原虫感染率 $\geq 0.01\%$ 以上的血涂片均能扩增出目的基因。这与国外相关报道一致^[2,7]。但实验中可能存在一部分假阴性, 可能的原因: ①血量少。标准厚血膜血量大约为 5 μl , 由于固定和染色使得血膜未能完全刮下、多次镜检以及在实验过程中反复地洗涤造成血量减少。因此实验过程中对是否进行洗涤存在不同看法。Alger 等^[3] 认为洗涤并未降低提取 DNA 的效率。本实验也发现洗涤的效果比未洗涤的

效果好; ②原虫的含量低, 超过实验方法能检测的灵敏度; ③血红蛋白以及血膜中其他未知物质对 Taq 酶抑制作用。血红蛋白是 Taq 酶的主要抑制物, 是能否成功提取厚血膜 DNA 的主要影响因素之一。

理论上, 染色的残留物干扰了细胞的裂解和 DNA 的释放, 从而造成靶 DNA 减少^[8], 国外也有研究者认为各种不同染色方法并不影响 DNA 的提取^[3]。本实验染色的血膜比未染色的血膜扩增的比例低, 表明染色剂对于间日疟原虫 DNA 的提取有一定影响。实验中染色的薄血膜未能扩增出目的基因, 原因可能是: ①薄血膜本身的血量少以及经过染色、镜检等造成靶 DNA 的血量进一步减少; ②染色剂影响 DNA 的释放。有研究者提出甲醇固定也是造成假阴性的一个原因^[7], 但本研究在对提取甲醇固定的血膜与未固定的血膜 DNA 时, 均扩增出间日疟原虫 DNA, 未见明显区别, 因此推测是否经过甲醇固定并不是血膜 DNA 提取的影响因素。

本实验以 2 种不同的方法从血涂片的血膜中提取间日疟原虫 DNA, 由于其灵敏度的限制会导致一些原虫密度低的患者被漏检, 以及实验存在各种影响因素会造成假阴性, 因此在进行大规模的现场调查以及对患者进行诊断时并不是首选的方法, 但在某些情况下对于间日疟原虫的分子研究提供了一个可选择方案。

参 考 文 献

- [1] Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, et al. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90: 519-521.
- [2] Foley M, Ranford-Cartwright LC, Babiker HA. Rapid and simple method for isolating malaria DNA from fingerprick samples of blood[J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 70: 241-244.
- [3] Alger J, Acosta MC, Lozano C, et al. Stained smears as a source of DNA[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1996, 91: 589-591.
- [4] Zhang SY, Xu LS, Lu HM, et al. Genotype detection of the merozoite surface protein alleles of *Plasmodium vivax*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2004, 22: 86-89. (in Chinese) (张山鹰, 许龙善, 陆惠民, 等. 间日疟原虫裂殖子表面蛋白的等位基因型检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22: 86-89.)
- [5] Kirchgatter K, Wunderlich G, Branquinho MS, et al. Molecular typing of *Plasmodium falciparum* from Giemsa-stained blood smears confirms nosocomial malaria transmission[J]. Acta Trop, 2002, 84: 199-203.
- [6] Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, et al. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region[J]. Malaria J, 2004.
- [7] Kimura M, Kaneko O, Inoue A, et al. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from Giemsa-stained thin blood smears[J]. Mol Biochem parasitol, 1995, 70: 193-197.
- [8] Vince A, Poljak M, Seme K. DNA extraction from archival Giemsa-stained bone-marrow slides: comparison of six rapid methods[J]. Br J Haematol, 1998, 101: 349-351.

(收稿日期: 2005-09-19 编辑: 伯韦)