

文章编号: 10000-7423(2005)-03-0140-03

# 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

黄天谊<sup>1</sup>, 王世海<sup>1</sup>, 黎学铭<sup>2</sup>, 郭传坤<sup>2</sup>, 徐建军<sup>1</sup>, 唐丽娜<sup>1</sup>, 卢丽丹<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 建立简便、灵敏、低本底、可同时检测恶性疟原虫和间日疟原虫的套式/多重聚合酶链反应 (PCR) 系统。方法 应用标签引物扩增技术、Primer Premier 5.0 软件、美国生物信息中心 (NCBI-BLAST) 网络资源和矩阵试验法优化套式/多重 PCR, 检测疟疾患者滤纸血样并与镜检结果进行比较。结果 新建立的标签引物套式/多重 PCR, 检测模拟现场滤纸血样的敏感性为恶性疟原虫 1~2 个虫/μl 血, 间日疟原虫 5~10 个虫/μl 血。检测 71 份现场采集的镜检疟原虫阳性滤纸血样 (恶性疟 24 份和间日疟 47 份) 的结果与镜检结果的符合率分别为 87.5% 和 100%。结论 通过标签引物扩增技术优化的套式/多重 PCR 系统, 适用于检测现场采集的滤纸血样, 其检出低原虫血症的敏感性和鉴定虫种的准确性均优于镜检法, 是很有潜力的疟疾诊断技术。

**【关键词】** 恶性疟原虫; 间日疟原虫; 聚合酶链反应; 标签引物; 疟疾诊断

中图分类号: R832.31

文献标识码: A

## Tag Primer-Nested/Multiplex PCR for Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

HUANG Tian-yi, WANG Shi-hai, LI Xue-ming, GUO Chuan-kun, XU Jian-jun, TANG Li-na, LU Li-dan  
(Guizhou Provincial Center for Diseases Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a sensitive, simple to use and low noise nested/multiplex PCR for simultaneously detection of *Plasmodium falciparum* (P.f) and *Plasmodium vivax* (P.v). **Methods** The tag primer amplification technique, software Primer Premier 5.0, NCBI-BLAST web resources and the matrix test were used to optimize the nested / multiplex PCR for detection of P.f and P.v with filter paper blood samples taken from malaria patients diagnosed by microscopy, and the results of the optimized nested/multiplex PCR and microscopy were evaluated. **Results** The sensitivity of the optimized PCR, determined by the examination of imitative filter paper blood samples, was about 1-2 parasites / μl for P.f and 5-10 parasites / μl for P.v. Primer-dimer and other PCR noise were removed. When 71 field filter paper blood samples taken from microscopically diagnosed patients (24 P.f, 47 P.v) were examined, the concordance between the optimized PCR and microscopy was 87.5% for P.f and 100% for P.v. **Conclusion** The nested/multiplex PCR optimized by tag primer amplification technique is simple, with low noise and being able to detect P.f and P.v simultaneously. It is more sensitive in detecting cases with low parasitaemia and more accurate in identifying *Plasmodium* species than microscopy.

**【Keywords】** *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; PCR; Tag primer; Malaria diagnosis

厚血膜吉氏染色显微镜检查疟原虫(镜检法)虽然简便、经济, 但因其费时、费力、敏感性低、虫种鉴定困难以及判断结果的准确性完全依赖专业镜检员的素质和经验等, 已不能满足现代疟疾控制、监测、药物试验和疫苗研究的要求<sup>[1-4]</sup>。PCR 敏感性、特异性高, 其中又以套式(半套式)或多重(复式)PCR 的效果较好<sup>[5-13]</sup>。但因其步骤烦琐和严重的二聚体积累等非特异扩增以及敏感性、特异性不稳定等问题尚待解决, 目前难以推广应用。本实验采用标签引物扩增技术优化

套式 / 多重 PCR<sup>[14,15]</sup>, 简化了实验步骤, 有效减少了二聚体等非特异扩增, 可同时检出和鉴别恶性疟和间日疟两种原虫。初步结果报告如下。

### 材料与方法

#### 1 疟原虫 DNA 来源

1994~1999 年采自海南、云南、贵州、广东、四川和广西等省(自治区)经显微镜检查疟原虫阳性患者滤纸血样 99 份; 另静脉采集间日疟原虫 (P.v) 感染血 (6 000/μl) 1 份和恶性疟原虫 (P.f) 培养血 (220 000 /μl) 1 份, 分别用健康者全血按 10 倍系列

作者单位: 1 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550001;

2 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530021

稀释成 1、10、100 和 1 000 个虫 / $\mu\text{l}$  和 2、20、200、2 000、20 000 / $\mu\text{l}$  并制备成含 P.v、P.f 相应系列密度的滤纸血样。用 Chelex-100 离子交换法<sup>[15,16]</sup> 提取 DNA 作为 PCR 扩增模板, 4 °C 保存备用。

## 2 引物设计

根据疟原虫小亚单位核糖体核糖核酸 (SSUr-RNA) 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件和美国生物信息中心 (NCBI-BLAST) 网络资源, 参照有关文献设计标签引物 T-03, 套式 PCR 外侧引物 (疟原虫公共) Pur-1 和 Puf-1, 内侧种特异加尾引物 Pfft-1 和 PVft-2 和 Purl-2<sup>[14-16]</sup>。引物序列如下:

T-03 5'-TGCTGCGGCATGTGAGGCTAT-3'

Puf-1 5'-AAAAGAGAGGTAAGTAC-3'

Pur-1 5'-ATCTAAGGACATCACAG-3'

PVft-2 5'-TGCTGCGGCATGTGAGGCTATTACGTGGGACTGAA-TTCGGTTG-3'

Pfft-1 5'-TGCTGCGGCATGTGAGGCTATTAAGATTT TCTGGA-GACGGACT-3'

Purl-2 5'-TGCTGCGGCATGTGAGGCTATTAGCAGGTTAAGATC-TCGTTTCGTT-3'

## 3 标签引物-套式/多重 PCR

反应试剂分为 2 组 (模板 DNA 和 Taq 酶在外), 试剂 A: 在标准 1 $\times$ PCR 缓冲系统中 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton) 含 4 种脱氧核苷酸 (dNTP) 200  $\mu\text{mol/L}$ , 外侧引物 Puf-1 和 Pur-1 各 60 nmol/L, 内侧种特异引物 Pfft-1 (15 nmol/L)、PVft-2 和 Purl-2 (各 30 nmol/L)。试剂 B: 在 1 $\times$ PCR 缓冲系统中含 4dNTP 各 200  $\mu\text{mol/L}$  和标签引物 T-03 (3.2  $\mu\text{mol/L}$ )。起始反应 (总量 12.5 $\mu\text{l}$ ): 每管含试剂 A 10  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 1.0~1.5 U 和 DNA 模板 (滤纸血样提取液) 2.5  $\mu\text{l}$ 。采用直接热启动方式, 待第 1 循环升温至解链温度 95 °C 再放入反应管, 进行以下程序: 第 1~4 循环: 95 °C 45 s, 45 °C 60 s, 72 °C 90 s; 第 5~20 循环: 90 °C 30 s, 46 °C 40 s, 72 °C 60 s; 第 21~30 循环: 86 °C 30 s, 59 °C 40 s, 72 °C 60 s; 第 31 循环 72 °C 5 min, 4 °C 5 min, 结束时取出, 每管加入试剂 B 2.0  $\mu\text{l}$ , Taq 酶 1.0 U (反应总量达 15  $\mu\text{l}$ ), 再次启动 PCR 扩增仪, 待升温至 94 °C 时将管放入继续下列反应程序: 第 32~62 循环: 86 °C 30 s, 66 °C 40 s, 72 °C 60 s; 第 63 循环: 72 °C 5 min, 4 °C 5 min。

## 4 PCR 产物的鉴定

取最终扩增产物 10  $\mu\text{l}$  作 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴

乙锭染色, 紫外透射分析仪上观察并摄像。恶性疟原虫特异带为 524 bp, 间日疟原虫特异带为 349 bp。

## 结 果

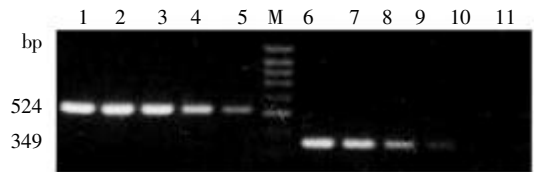
### 1 检测模拟现场血样的敏感性与特异性

标签引物-套式/多重 PCR 检测系列原虫密度滤纸血样扩增产物的电泳结果显示, P.f 与 P.v 原虫血样分别出现 524 bp 和 349 bp 条带, 两者极易鉴别。二聚体等 PCR 本底已消除, P.f 可检出的最低原虫密度为 1~2 个虫/ $\mu\text{l}$ , P.v 可检出最低密度为 5~10 个虫/ $\mu\text{l}$ 。健康者滤纸血样不出现上述特异扩增条带 (图 1)。

### 2 检测现场血样与镜检法的比较

检测现场采集血样 (包括境外感染者) 所有 P.f 均扩增出 524 bp 特异带, 所有 P.v 均扩增出 349 bp 特异带 (图 2)。

24 份镜检 P.f 阳性血样中, 21 份扩增出清晰的

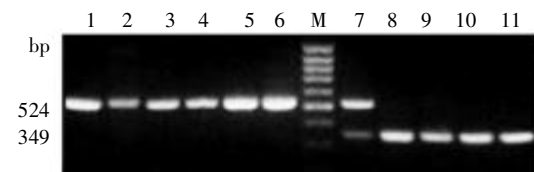


1~5: 分别为恶性疟原虫 20 000、2 000、200、20、2 个虫/ $\mu\text{l}$  血, M: 100 bp DNA 标志物, 6~10: 分别为间日疟原虫 6 000、1 000、100、10、1 个虫/ $\mu\text{l}$  血, 11: 健康者血样。

Lanes 1-5: *P. falciparum* 20 000, 2 000, 200, 20, 2 parasites/ $\mu\text{l}$  whole blood, M: 100 bp DNA marker, Lanes 6-10: *P. vivax* 6 000, 1 000, 100, 10, 1 parasites/ $\mu\text{l}$  whole blood, Lane 11: Blood sample of healthy human blood.

图 1 标签引物-套式/多重 PCR 检出系列稀释含虫滤纸血样中的恶性疟和间日疟原虫

Fig.1 Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* with serially diluted infected blood filter paper samples by Tag primer-nested/multiplex PCR



1: 云南, 2: 海南, 3: 老挝, 4: 坦桑尼亚, 5: 乌干达, 6: 缅甸, M: 100 bp DNA 标志物, 7: 云南恶性疟和间日疟混合感染, 8: 海南间日疟 PV-2 型, 9: 老挝间日疟热带族, 10: 巴基斯坦间日疟温带族, 11: 缅甸间日疟热带族。

Lane 1: Yunnan Province, Lane 2: Hainan Province, Lane 3: Laos, Lane 4: Tanzania, Lane 5: Uganda, Lane 6: Myanmar, M: 100 bp DNA marker, Lane 7: Yunnan mixed infection of P.f and P.v, Lane 8: Hainan P.v type-2, Lane 9: Laos tropical zone family of P.v, Lane 10: Pakistan temperate zone family of P.v, Lane 11: Myanmar tropical zone family of P.v.

图 2 标签引物-套式/多重 PCR 检出现场采集滤纸血样中的恶性疟和间日疟原虫

Fig.2 Detection of *P. falciparum* and *P. vivax* field blood filter paper samples by Tag primer-nested/multiplex PCR

524 bp P.f 特异带, 阳性符合率 87.5%; 其余 3 份扩增出典型的 349 bp P.v 特异带, 可能是镜检员的误判。

47 份镜检为 P.v 并经基因型鉴定阳性血样 (热带族 16 份, 温带族 19 份和 PV-2 型 12 份) 全部扩增出 349 bp P.v 特异带, 符合率 100%。另在 28 份镜检为 P.v 而基因型鉴定为阴性的血样中, 12 份扩增出 349 bp P.v 特异带, 可能是低原虫密度 (<10 个虫/μl 血), 13 份扩增出清晰的 524 bp 带为 P.f 感染, 2 份同时扩增出 349 bp 和 524 bp 两条带, 应为 P.f、P.v 混合感染, 仅 1 份未扩增出上述两种特异条带, 可能是镜检员误诊的阴性血样。

### 讨 论

以 PCR 扩增为基础的疟疾诊断技术是已公认的最有前途的新诊断方法之一, 但简单的 PCR 不足以检出低密度带虫和混合感染<sup>[4,8,9]</sup>。本研究以小亚单位核糖体 RNA (SSUrRNA) 基因作为靶基因, 根据 Hands-PCR<sup>[1]</sup>原理, 将套式 PCR 的第 2 步设计为标签引物扩增, 运用已建立的引物浓度-温度调控措施和矩阵试验筛选出最佳反应方案<sup>[15]</sup>。在实现套式 PCR 单管化、高度精简试剂与实验步骤的同时, 保持高敏感性, 成功地消除了套式/多重 PCR 常有的二聚体积累等 PCR 本底。

文献报道, PCR 诊断可检出疟原虫的最低水平约为 1/(10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup>) 感染 P.f 的红细胞 (相当于 0.05~5 个虫/μl), 多直接检测含虫血 (20~500 μl) (酚/氯仿或其他方法抽提的) DNA<sup>[6,8,12,13]</sup>, 因采样和提取 DNA 方法不同难以互相比较, 更不能代表检测现场滤纸血样的水平。作者等采用健康者血系列稀释含虫血, 模拟现场制备系列原虫密度的滤纸血样 (含 4~5 μl 全血), 完全按照现场血样处理方法提取 DNA, 检出 P.f 的最低原虫密度约为 1~2 个虫/μl, 检出 P.v 最低原虫密度约为 5~10 个虫 /μl, 因而可代表本法检测现场滤纸样的实际检出水平。

近年研究指出, 镜检法作为疟疾诊断的金标准正受到质疑。当复查 PCR 与镜检法结果不一致的血片时, 通常维持 PCR 的结果<sup>[4,6,9,10]</sup>。用标签引物-套式/多重 PCR 检测实验室保存 5~10 年镜检疟原虫阳性的患者滤纸血样, P.f 符合率为 87.5%, 不符合的 3 份均扩增出典型的 P.v 特异带, 镜检为 P.v 且基因型鉴定阳性患者血样的符合率为 100%, 所有疟原虫阳性患者血样 (包括来自缅甸、老挝、巴基斯坦以及非洲坦桑尼亚和乌干达等境外感染病例) 均一致扩增出相应的 524 bp P.f 特异带或 349 bp P.v 特异带。检测 28 份镜检法诊断为间日疟而基因型鉴定为阴性的血样中, 12 份扩增出 P.v 特异带, 13 份扩增出 P.f 特异带, 2 份同时扩增

出 P.v 和 P.f 条带, 这可能是感染者疟原虫密度低于基因型鉴定的密度 (<10 个虫/μl); 另一方面也与镜检员镜检技术的熟练程度有关, 未能准确鉴定出虫种。从以上初步结果可以看出标签引物-套式/多重 PCR 在同时检出 P.f 和 P.v、简化试验步骤和消除 PCR 本底方面已取得成效, 在检出低原虫血症和虫种鉴定方面明显优于镜检法。标签引物扩增技术进一步发挥套式/多重 PCR 敏感性的潜力<sup>[14,15]</sup>, 有希望在提高该方法特异性和稳定性的基础上, 研制出更敏感、特异、实用的疟疾诊断 PCR 试剂盒。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] A Joint WHO/USAID Informal Consultation. New perspectives malaria diagnosis[R]. WHO/MAL/2000. 1091.
- [ 2 ] Hamad AA, El Hassan IM, El Khalifa, *et al.* Chronic *Plasmodium falciparum* infections in an area of low intensity malaria transmission in the Sudan[J]. Parasitology, 2000, 120: 447-456.
- [ 3 ] Ohrt C, Purnomo, Sutamihardja MA, *et al.* Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials[J]. J Infect Dis, 2002, 186: 540-546.
- [ 4 ] Rubio JM, Buhigas I, Subirats M, *et al.* Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 2736-2737.
- [ 5 ] Morassin B, Fabre R, Berry A, *et al.* One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria[J]. Am J Trop Med Hyg, 2002, 66:503-508.
- [ 6 ] Rubio JM, Post RJ, Vanleeuwen WM, *et al.* Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR) [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002, 96(Suppl 1):199-204.
- [ 7 ] Emmanuel B, Antonella G, Jean-Francois T, *et al.* Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for sub-patent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1996, 90: 15-19.
- [ 8 ] Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, *et al.* Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay [J]. Am J Trop Med Hyg, 2001, 65: 355-361.
- [ 9 ] Zaman S, Tan L, Chen HH, *et al.* The detection of *Plasmodium falciparum* and *Pvixiv* in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001, 95:391-397.
- [ 10 ] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 61: 315-320.
- [ 11 ] 孙明林, 薛采芳. 疟疾复合 PCR 检测系统的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 109-112.
- [ 12 ] 陈珠, 陆惠民, 高琪, 等. 复式 PCR 检测恶性疟原虫与间日疟原虫的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17: 380-383.
- [ 13 ] 高世同, 吴少廷, 陈观今, 等. PCR 鉴别诊断间日疟及恶性疟的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, 15: 373-377.
- [ 14 ] Brownie J, Shawcross S, Theaker J, *et al.* The elimination of primer-dimer accumulation in PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3235-3241.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] 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: 2004-08-25 编辑: 盛慧锋)