

云南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1 基因分型及测序*

诸欣平 周 蕾 刘 强 高 欣
首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054

提要 目的: 确定云南省恶性疟原虫裂殖子表面蛋白 1(M SP 1) 基因分型和探讨 M SP 1 基因多态性的遗传及地理特征。方法: 采用巢式 PCR 法和引物标记周期反应测定法, 对云南疫区恶性疟原虫群体 M SP 1 基因分型, 并对代表株进行基因序列分析。结果: 30 例云南恶性疟患者, 检出 38 个基因型虫株, 其中 MAD 20 型是优势虫株, K1 次之, RO 33 最少, 并存在不同基因株混合感染现象。扩增片段序列分析表明, 云南疫区的 MAD 20 型、K1 型和 RO 33 型均分别与国际上典型的 M SP 1、MAD 20、K1 和 RO 33 等位基因代表株具有高度的同源性。结论: 以 M SP 1 为基因标记物的基因分型法, 有助于掌握流行区疟原虫种群的基因特点、分布及流行特征。

关键词 恶性疟原虫 裂殖子表面蛋白 1 基因分型 DNA 序列分析 等位基因

恶性疟原虫的基因分型是近年来国际上的研究热点。不同基因型的恶性疟原虫与虫株毒力、抗原变异及抗药性有一定的关系。疟原虫裂殖子表面蛋白 1 (M SP1) 是疟疾疫苗重要的候选抗原之一, 该基因的多态性为恶性疟疫苗的研制带来了一定的困难。我国流行区恶性疟原虫群体的基因分型尚未见报道。我们根据 M SP1 基因的特点, 对云南省疫区流行的恶性疟原虫进行了基因分型及测序。

材料和方法

血样标本及阳性对照

患者血样 30 份采自云南省, 经镜检和 PCR 法证实为恶性疟或恶性疟和间日疟混合感染者^[1]。恶性疟原虫标准克隆株 T9-94 株 DNA (MAD 20 等位基因型), T9-96 株 DNA (K1 等位基因型), RO 33 株 DNA 均由英国国家医学研究院分子寄生虫学研究室提供, 作为阳性对照。健康人血样来自非疟区正常供血源。

主要仪器试剂

PCR 仪 (Perkin Elmer TC-100), 低温高速离心机 (Hearus 产品), 凝胶分析仪 (UVP GDS8000), DNA 自动测序仪 (373A 型), 耐热 Tag 酶 (Gene 公司产品)。

样本的采集和 DNA 制备

基本参照文献进行^[2]。

等位基因引物设计与合成

恶性疟原虫 M SP1 基因被分为 17 个区, 包括保守区、可变区和半可变区。M SP1 基因第 2 区 (M SP1-R2) 具有多态性。据其多态性基因重复序列的差异可分为 3 个等位基因家族^[3,4], 即: MAD 20、

K1 和 RO 33。在每个等位基因家族内, 由于重复单位不同或个别碱基的差异而造成了不同恶性疟原虫株 M SP1-R2 基因长度或序列的多态性。我们根据已知的恶性疟原虫 M SP1-R2 基因序列和查寻比较了核苷酸序列资料库 (GenBank), 设计了 4 对引物并由赛百胜公司合成和纯化。第一对引物用于套式 PCR 的第一次扩增反应 (nest 1), 另 3 对等位基因特异的内引物用于第二次扩增反应 (nest 2)。引物序列及扩增产物见表 1。

表 1 恶性疟原虫基因分型所用的引物序列
Table 1 Sequences of the oligonucleotide primers used to genotype *P. falciparum*

引物名称 primer	序列 sequence	扩增产物 PCR product
M 1-OF	5'-CTA GAA GCT TTA GAA GA TGCA GTA TTG-3'	保守区
M 1-OR	5'-CTTAAA TA GTA TTCTAA TTCAA GTGGA TCA -3'	Conserved region (Nest 1)
M 1-MF	5'-AAA TGAA GGAACAA GTGGACA GCTGTTC-3'	MAD20 等位基因族
M 1-MR	5'-A TCTGAA GGA TTTGTACGCTCTTGA A TTA CC-3'	MAD20 family-specific Alleles (Nest 2)
M 1-KF	5'-AAA TGAA GAA GAAA TTA CTACA AAA GGTGC-3'	K1 等位基因族
M 1-KR	5'-GCTTGCA TCA GCTGGA GGGCTTGCA CCA GA -3'	K1 family-specific Alleles (Nest 2)
M 1-RF	5'-TAAA GGA GGA GCAAAA TACTCAA GTTGTTC-3'	RO 33 等位基因族
M 1-RR	5'-CA TCTGAA GGA TTTGCA GCACCTGGA GA TC-3'	RO 33 family-specific Alleles (Nest 2)

基因扩增鉴定和序列分析

恶性疟原虫 M SP1 基因扩增及琼脂糖凝胶电泳鉴定方法见文献^[5]。

扩增的 PCR 产物采用 Qiagen 公司 PCR 纯化试剂盒进行纯化, 以除去小片段的 DNA 分子, 剩余的引物及 dNTP 等。用 373 核酸自动序列分析仪测序。将测出的不同等位基因型与 GenBank 中的所有及目前文献报道的恶性疟原虫基因进行查寻比较, 用 BLASTN 程序进行基因同源性分析。

* 美国中华医学基金会 (CMB) 资助项目 (Parasitology 98-674)
北京市教委科技发展基金资助项目

结果

1 恶性疟原虫MSP1-R2 基因分型

云南省 30 份恶性疟患者血样,用上述多对等位基因特异引物共检测出 38 个基因型虫株。其中 MAD20 等位基因株 22 个、K1 等位基因株 14 个、RO33 等位基因株 2 个。MAD20 基因型虫株是优势虫株, K1 次之, RO33 最少。根据不同等位基因家族虫株电泳后各自基因长度的不同, MAD20 可分为 2 型(YM 1, YM 2), K1 分为 2 型(YK1, YK2), RO33 为 1 型(YR1)。多于 1/5 的患者为不同等位基因型混合感染者(表 2)。

表 2 云南省恶性疟原虫MSP1 等位基因型感染率

Table 2 Infection rate of alleles of *P. falciparum* MSP1 in Yunnan

感染类型 Type of infection	等位基因感染 Allele infection	感染率% (等位基因感染例数/病人例数) Infection rate % (No. of allele infections/No. of patients)
单独感染 Single infection	MAD20	15/30(50%)
	K1	7/30(23.3%)
	RO33	1/30(3.3%)
混合感染 Mixed infection	M + K	6/30(20%)
	M + R	0/30(0)
	K + R	0/30(0)
	M + K + R	1/30(3.3%)

2 不同基因型序列分析结果

上述检出的MAD 20 代表株 YM 1 及 YM 2 型, K1 代表株 YK1 型和 RO33 代表株 YR1 型分别进行基因序列鉴定。测序结果与美国NCBI 基因数据库有关序列进行同源性分析, 结果显示 YM 1 株为 169 bp, 与MAD20 代表株巴布亚- 新几内亚恶性疟原虫株MSP1-R2 序列具有高度同源性。YM 2 株为 151 bp, 与MAD20 株除了在 78~ 95 位缺失 18 个碱基外, 在第 98 位和 118 位各有单个碱基的突变。两株均具有由特定基因编码的丝氨酸, 甘氨酸, 甘氨酸(SGG), 丝氨酸, 缬氨酸, 丙氨酸(苏氨酸)[SVA (T)]三肽重复的串联组成的MAD20 等位基因型特征(图 1)。YK1 为 169 bp, 与MSP1 的 K1 典型代表株泰国 K1 株相应片段一致, 具有特定基因编码多个丝氨酸, 甘氨酸, 苏氨酸(SGT)和丝氨酸, 甘氨酸, 脯氨酸(SGP)串联组成的 K1 等位基因型特征(图 2)。YR1 为 153 bp, 与典型的RO33 型代表株巴西 Brazil strain B342 相应片段序列一致(图 3)。

PngMAD20	IA AAT GAA GGA ACA AGT GGA ACA GCT GTT ACA ACT AGT ACA CCT GGT TCA GGT GGT TCA 58
YM 1
YM 2
PngMAD20	GTT ACT TCA GGT GGT TCA GGT GGT TCA GTT GCT TCA GTT GCT TCA GGT GGT TCA GGT GGC 118

YM 1
YM 2 t 100
PngMAD20	TCA GTT GCT TCA GGT GGT TCA GGT AAT TCA AGA CGT ACA AAT CCT TCA GAT 169
YM 1
YM 2 151
PngMAD20	NEGTSGTAVT TSTPGSGGSV TSGGSGGSVA 30
YM 1	NEGTSGTAVT TSTPGSGGSV TSGGSGGSVA 30
YM 2	NEGTSGTAVT TSTPGSGGSV TS - - - GT 23
PngMAD20	SVA SGGSGGSVA SGGSGNSR R T N P S D 56
YM 1	SVA SGGSGGSVA SGGSGNSR R T N P S D 56
YM 2	SVA SGGSGGSVA SGGSGNSR R T N P S D 50

图 1 MAD20 株与云南省恶性疟原虫YM 1, YM 2 株MSP1 第 2 区 DNA 及氨基酸序列比较
横线“-”示缺失的碱基或氨基酸

Fig 1 Comparison of DNA sequence of MSP1-R2 and deduced amino acid sequence from MAD 20 allele and *P. falciparum* isolates YM 1 and YM 2 from Yunnan. Deletions of base pairs and amino acids are marked by “-”.

	N E E E I T T K G A S A Q S G T
Thairk1	I A AAT GAA GAA GAA ATT ACT ACA AAA GGT GCA AGT CCT CAA AGT GGT ACA 49
YK1
	S G T S G T S G P S G P S G T S P
Thairk1	AGT GGT ACA AGT GGT ACA AGT GGT CCA AGT GGT CCA AGT GGT ACA AGT CCA 100
YK1
	S S R S N T L P R S N T S S G A S
Thairk1	TCA TCT CGT TCA AAC ACT TTA CCT CGT TCA AAT ACT TCA TCT GGT GCA AGC 151
YK1
	P P A D A S
Thairk1	CCT CCA GCT GAT GCA AGC 169
YK1

图 2 K1 株与云南省恶性疟原虫YK1 株MSP1 第 2 区DNA 及氨基酸序列比较

Fig 2 Comparison of DNA sequence of MSP1-R2 and deduced amino acid sequence from K1 allele and *P. falciparum* isolates YK 1 from yunnan.

	K D G A N T Q V V A K P A G A
Brazil342	TA AAG GAT GGA CCA AAT ACT CAA GTT GTT GCA AAG CCT GCA GGT CCT 47
YR1
	V S T Q S A K N P P G A T V P S
Brazil342	GTA AGT ACT CAA AGT GCT AAA AAT CCT CCA GGT GCT ACA GTA CCT TCA 9
YR1
	G T A S T K G A I R S P G A A N
Brazil342	GGT ACT CCA AGT ACT AAA GGT GCT ATA AGA TCT CCA GGT CCT CCA AAT
YR1
	P S D
Brazil342	CCT TCA GAT G 153
YR1

图 3 RO33 株与云南省恶性疟原虫YR1 株MSP1 第 2 区DNA 及氨基酸序列比较

Fig 3 Comparison of DNA sequence of MSP1-R2 and deduced amino acid sequence from RO33 allele and *P. falciparum* isolates YR1 from yunnan.

讨 论

不同株的恶性疟原虫存在着变异, 这种变异的基础是基因的多态性。某一地区恶性疟原虫种株的基因分型及变异程度与患者的年龄、遗传特性有一定的关系^[6,7], 也与疟疾疫苗的效果评价密切相关^[8]。作者首次报道以MSP1-R2区为基因标记物, 检测出云南省恶性疟原虫种群同时存在着MAD20、K1、RO33三种基因型虫株, 其中MAD20为优势虫株。这与泰国疫区恶性疟原虫的基因型分布相近似^[5]。序列同源性分析证实了云南省存在的三个不同等位基因型虫株分别与国际代表株具有高度同源性。不同地理株的恶性疟原虫, 其生物学特性、对媒介按蚊的感染力、对人类宿主的免疫原性及对抗疟药的敏感性存在明显差异, 这在一定程度上影响了疟疾的发病率和死亡率^[9]。因此, 应用PCR法研究恶性疟原虫基因多态性, 可掌握疟原虫虫株的遗传学特征, 提高疟疾的诊断水平, 同时能够根据不同地理株疟原虫基因分型和分布情况, 迅速确定疾病的来源及判断传播趋势, 为防治工作提供科学依据。

本文得到姜洪杰教授和陈佩惠教授多方面的帮助, 特此感谢!

参 考 文 献

1 诸欣平, 刘强, 周蕾, 等. 套式聚合酶链式反应诊断恶性疟原虫及

- 混合感染的研究 中国寄生虫病防治杂志 1999; 12(1): 16~ 19
- 2 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, et al High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61 315~ 320
 - 3 Tanabe kazuyuki, Martin Mackay, Michael Gomen, et al Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987; 195 273~ 287
 - 4 Kimura E, Mattei D, Disnti SM, et al Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: High prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived from malaria patients. *Gene* 1990; 91 57~ 62
 - 5 Zhu Xinp ing, Georges Snounou, William Jarra, et al The potential uses of genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the nested polymerase chain reaction. *寄生虫与医学昆虫学报* 1996; 3 (1): 10~ 18
 - 6 Ntouni F, Contamin H, Rogier C, et al Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Amer J Trop Med Hyg* 1995; 52 81~ 88
 - 7 Ntouni F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, et al Sick-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol* 1997; 87 39~ 46
 - 8 Beck HP, Felger I, Huber W, et al Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine spf66. *J Infect Dis* 1997; 175 921~ 926
 - 9 Paul REL, Packer MJ, Wamsley M, et al Mating patterns in malaria parasite populations of Papua New Guinea. *Science* 1995; 269 1709~ 1711

1999年3月5日收稿 1999年5月17日修回

(编辑: 富秀兰)

GENOTYPE AND SEQUENCE ANALYSIS OF MEROZOITE SURFACE PROTEIN 1 OF PLASMODIUM FALCIPARUM ISOLATES IN YUNNAN PROVINCE*

ZHU Xinp ing, ZHOU Lei, LU Qiang, GAO Xin

Department of Parasitology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054

ABSTRACT

AM: To identify the genotype of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in Yunnan Province and explore the polymorphism of MSP1 genes in geographical characteristics and genetics. **METHODS:** Nested polymerase chain reaction was applied to genotyping of *P. falciparum* isolated in Yunnan Province. Some of parasite alleles were sequenced by dye primer cycle sequencing. **RESULTS:** In 30 *P. falciparum* infections, 38 different alleles were found. Of them, the dominant allele was a variant of MAD20, while was K1 less and the RO33 was few. In addition, incidences of mixed allele infections were observed. Sequence analysis showed that DNA sequences of MAD20, K1 and RO33 alleles from Yunnan