

文章编号: 1000-7423(2012)-01-0061-04

【综述】

PCR衍生技术在刚地弓形虫基因鉴定和分型中的应用

聂大平¹, 尤英霞¹, 申丽洁^{1,2*}, 李伟¹

【摘要】 不同基因型刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 的致病力及对药物的敏感性等均存在较大的差异。运用 PCR 衍生技术对不同弓形虫株进行基因鉴定和分型, 可为弓形虫病的临床诊断和治疗提供重要依据。本文就 PCR 衍生技术在弓形虫基因鉴定及分型中的应用进展作一综述。

【关键词】 刚地弓形虫; PCR 衍生技术; 基因鉴定; 基因分型

中图分类号: R382.5

文献标识码: A

PCR-derived Technology in Gene Identification and Typing of *Toxoplasma gondii*

NIE Da-ping¹, YOU Ying-xia¹, SHEN Li-jie^{1,2*}, LI Wei¹

(1 Department of Parasitology, College of Basic Medicine, Dali University, Dali 671003, China;

2 Department of Parasitology, Kunming Medical College, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Different genotypes of *Toxoplasma gondii* show a great diversity in pathogenicity and drug sensitivity. Application of the PCR-derived technologies in gene identification and typing of *T. gondii* provides an important basis to clinical diagnosis and treatment. This article reviews the relevant technologies in gene identification and typing of *T. gondii*.

【Key words】 *Toxoplasma gondii*; PCR-derived technology; Gene identification; Genotyping

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30960330)

* Corresponding author, E-mail: lijieshen@163.com

刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 是一种专性细胞内寄生虫, 可以感染包括人类在内的几乎所有温血动物, 属于机会性致病原虫。弓形虫在世界很多地方发生过大规模流行, 给人类健康带来了巨大威胁和经济上的严重损失^[1,2]。当人体感染弓形虫后, 免疫功能正常者多呈隐性感染, 免疫功能低下或缺陷者可出现严重的临床症状。弓形虫感染是艾滋病(AIDS)患者最常见的感染并发症之一, 随着 AIDS 发病率逐年升高, 弓形虫感染引起的相关疾病也随之增多。

PCR 技术及其衍生技术目前已广泛应用于基础医学和临床研究中, 如克隆基因、基因测序、肿瘤研究和基因分型等。通过运用 PCR 技术可将刚地弓形虫基因分为 I 型、II 型和 III 型, I 型是公认的强毒株, 其余 2 型属弱毒株, I 型和 II 型多见于人体感染, III

型多见于动物感染。刚地弓形虫不同虫株基因组之间存在微小差异, 这可能是导致不同虫株之间的毒力和感染力等方面差异的主要原因^[3], 不同基因型的弓形虫株对药物的敏感性也不同^[4], 但具体机制尚不清楚。通过对刚地弓形虫株基因鉴定和分型, 为弓形虫群体生物学、流行病学、遗传现状和基因型, 与疾病模式之间潜在的相关性研究等提供重要的依据。本文就 PCR 衍生技术在刚地弓形虫基因鉴定及分型中的应用进展作一综述。

1 限制性片段长度多态性 PCR

限制性片段长度多态性 PCR (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 是将 PCR 技术和限制性片段长度多态性(RFLP)技术相结合而成的一种分子生物学研究方法。PCR-RFLP 技术的理论依据是首先利用 PCR 扩增目的基因, 然后用限制性内切酶酶解样品 DNA, 产生大量的限制性酶切片段, 再将限制性酶切产物在含有溴化乙锭的琼脂糖凝

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30960330)

作者单位: 1 大理学院基础医学院寄生虫学教研室, 大理 671003;

2 昆明医学院寄生虫学教研室, 昆明 650500

* 通讯作者, E-mail: lijieshen@163.com

胶中电泳分离,在紫外灯下即可分辨各种限制性酶切片段的大小,或将限制性酶切产物与探针杂交进行自显影,从而区分各种片段。当目标 DNA 之间存在变异时,用一种限制性内切酶酶解后可能会产生不同片段长度的产物。Howe 等^[5]运用 PCR-RFLP 方法分析 106 株来自北美和欧洲西部的刚地弓形虫分离株,结果显示所有的分离株包含 3 个克隆世系,有 4 个分离株表现为基因 I 型和基因 III 型,或者基因 II 型和基因 III 型的重组基因型,多数人源分离的虫株属基因 I 型。谢德华等^[6]运用 PCR-RFLP 首次对中国的刚地弓形虫虫株进行了基因分型研究,分析来源于不同宿主的 ZS 人株、SH 人株、CN 猪株和 QH 绵羊株等 4 个弓形虫虫株,以及国际标准强毒株 RH 株的致密颗粒抗原(GRA6)基因进行分析,结果显示,RH 株、SH 株和 CN 株等 3 个虫株的 GRA6 基因序列上的 *gse* I 酶切位点与国外报道的 RH 株一致,同属于基因 I 型,为强毒株;QH 株和 ZS 株的 *gse* I 酶切位点与已报道的弱毒株 BEVERLEY 株和 ME49 株一致,同属于基因 II 型,但存在个别碱基的差异,结果证明中国的人源性和动物源性刚地弓形虫均包含了 I 型和 II 型 2 种基因型。Su 等^[7,8]和 Ajzenberg 等^[9]采用 PCR-RFLP 技术对 18 个弓形虫分离株进行单个位点 [即速殖子主要表面抗原 2 (SAG2)基因]的扩增,结果显示,18 个分离株中 I 型 4 株、II 型 3 株、III 型 3 株、非典型株 7 株、I 型或 III 型 1 株。进一步采用多个位点研究,同样运用 PCR-RFLP 对该 18 株弓形虫进行基因鉴定及分型,结果与单个位点基因 PCR-RFLP 结果基本一致。因此,PCR-RFLP 是一种简单、高效、稳定的基因鉴定技术。但是 PCR-RFLP 也有缺点,如存在不完整的 PCR 扩增和限制性内切酶消化不全等。若同时对微卫星序列中的串联重复序列进行扩增分析可弥补这些缺点^[10]。

2 随机扩增多态性 DNA PCR

随机扩增多态性 DNA PCR (random amplified polymorphic DNA PCR, RAPD-PCR)又称为任意引物 PCR (arbitrarily primed PCR, AP-PCR),由于不同种的基因组中与引物相匹配的碱基序列的位置和数目不同,得到扩增产物的大小和数量也可能不同。RAPD-PCR 的优点是无需预知待测基因组的核苷酸序列以及设计特定的引物,不需要 RFLP 分析的预备性工作,技术操作简单,成本低,检测灵敏度高,扩增结果基因多态性丰富,两个基因之间微小差异也能反映出来。史俊岩等^[11]应用 RAPD-PCR 技术对弓形虫 RH 株、BH 株和 PP 株基因组 DNA 进行分析,结果表明单一及

复合引物均能扩增产生多态性 DNA 指纹图谱,3 个弓形虫虫株基因组 DNA 扩增产物的带型和强度均不相同,根据 Nei's 相似系数对 3 个虫株基因组 DNA 遗传相似性进行定量分析,用不同的引物扩增,虫株间表现出不同的相似性。Ferreira 等^[12]利用 RAPD-PCR 对分离自巴西人和动物的 19 个刚地弓形虫分离株的遗传变异情况进行分析,结果显示,通过扩增一个或几个片段都能揭示该 19 个分离株基因图谱之间的差异。应用引物扩增 B5、B12、C8、C20 和 P5 等基因位点,根据 Nei's 和 Li 相似系数对该 19 个弓形虫分离株基因组 DNA 之间,及其与贝氏贝诺孢子虫 (*Besnoitia besnoiti*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)和二联巴贝虫 (*Babesia bigemina*)之间的遗传相似性进行定量分析,结果显示,弓形虫各个分离株之间的相似性系数为 0.76 ± 0.05 ,与贝氏贝诺孢子虫之间的相似性系数为 0.47 ± 0.04 ,与恶性疟原虫之间的相似性系数为 0.28 ± 0.02 ,与二联巴贝虫之间的相似性系数为 0.38 ± 0.02 。RAPD-PCR 分析所需的 DNA 样品量极少,而且使用一套引物即可用于多个物种或群体的遗传多样性的研究,因此应用该技术对弓形虫基因鉴定和分型可快速对病原体做出鉴定,为临床防治做出迅速判断。

3 多重 PCR

一般 PCR 仅应用一对引物,通过 PCR 扩增产生一个核酸片段,主要用于单一致病因子等的鉴定。多重 PCR (multiplex PCR),又称多重引物 PCR 或复合 PCR,即在同一 PCR 反应体系中加上一对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。其反应原理、试剂和操作过程与一般 PCR 相同。多重 PCR 可同时检测或鉴定多种病原生物和某些遗传病,以及进行癌基因的分型鉴定,具有高效性、系统性和简便性的特点。Ajzenberg 等^[13,14]运用多重 PCR 技术对 43 个刚地弓形虫分离株进行基因鉴定和分型,通过扩增 5 个微卫星标记 (B17、B1、TUB2、W35 和 TgM-A),将 43 个分离株分为基因 I 型、II 型、III 型、II 型相关型和重组或非典型基因型。进一步研究结果显示,运用多重 PCR 对 15 个微卫星标记 (TUB2、W35、TgM-A、B18、B17、M33、IV.1、XI.1、M48、M102、N60、N82、AA、N61 和 N83)进行扩增,研究 26 个弓形虫分离株,并与 PCR-RFLP 研究结果比较,多重 PCR 比 PCR-RFLP 能更有效地区分刚地弓形虫基因型,可用于分析刚地弓形虫在南美洲的遗传多样性。Dubey 等^[15]对 32 株分离自中美洲鸡的弓形虫进行生物与遗传特征研究,运用多重 PCR 技术对 5 个遗传

标记 (SAG1、SAG2、SAG3、BTUB 和 GRA6) 进行扩增, 发现了 5 个基因型, 其中基因 I 型 5 株、III 型 1 株, 剩余 26 株为 I/II、I/III 或 II/III 重组基因型。此外, 研究发现中南美洲的弓形虫分离株中未检测到基因 II 型, 而在欧洲感染人的弓形虫分离株主要为基因 II 型^[3], 可见不同地域和不同宿主之间弓形虫感染的基因型差异较大。Fekkar 等^[16]对分离自人弓形虫眼病的 20 个弓形虫分离株进行基因型鉴定, 应用多重 PCR 进行微卫星标记扩增, 利用弓形虫感染者的眼液直接进行弓形虫基因鉴定和分型, 结果发现弓形虫眼病患者感染的弓形虫主要为基因 II 型, 对比以前的研究结果^[17]发现, 弓形虫非典型基因型可能与弓形虫眼病的发生并无相关^[16]。多位点序列分型法是估计 DNA 多态性真实率的最佳方法, 但费时且费用较高, 不适合大规模的基因鉴定及分型研究, PCR-RFLP 适合大规模的基因鉴定及分型研究, 但其分辨率低, 不能有效区分遗传关系较近的虫株, 而多重 PCR 弥补了这些缺点。通过对微卫星标记进行扩增和检测, 多重 PCR 是揭示弓形虫不同分离株之间遗传背景是否相同的最有效工具之一。

4 PCR-DNA 测序法

PCR-DNA 测序是对生物遗传信息鉴定的金标准。20 世纪 90 年代, PCR-DNA 测序法只是作为辅助手段, 大部分研究只是选 1~2 个弓形虫分离株的目的基因作 PCR-DNA 测序, 与 PCR-RFLP、RAPD-PCR 和多重 PCR 等的结果相比较。随着 PCR 技术的发展及成本的降低, 全自动 DNA 测序仪已经逐步取代手工测序, 可以进行高通量的 DNA 测序, PCR-DNA 测序开始逐步大规模地应用于弓形虫的基因鉴定及分型研究中。Frazão-Teixeira 等^[18]将 PCR-DNA 测序法与 PCR-RFLP 进行对比研究, 分析来源于猪的弓形虫分离株的基因, 认为 PCR-DNA 测序法比 PCR-RFLP 技术能更有效地发现非典型等位基因, 并且通过对弓形虫株 B1 基因的扩增分析发现, 有 2 个以上的独特等位基因在巴西土著猪弓形虫株中循环。通过对猪感染的刚地弓形虫分离株的 17 个独特等位基因与基因 I、II 和 III 型中的典型等位基因对比研究, 发现了弓形虫分离株的遗传多样性。部分地区分离的虫株由于存在大量的非典型等位基因, PCR-RFLP 技术很难准确作出基因分型, 而 PCR-DNA 测序法却能弥补 PCR-RFLP 技术的这一不足, 能对含有较多非典型等位基因的弓形虫虫株做出准确分型。

5 高度重复序列 PCR

高度重复序列 (highly repetitive sequence) 是一种简单的重复序列, 重复单位长度一般 ≤ 6 bp, 但在基因组中重复可达 10 万次, 由于其重复次数不同或重复程度不同而形成每个基因座的多态性。高度重复序列 PCR, 包括简单重复序列 PCR (simple sequence repeat PCR, SSR-PCR), 又叫短串联重复序列 (short tandem repeats PCR, STRs-PCR) 或简单序列重复间区 PCR (inter-simple sequence repeat PCR, ISSR-PCR) 等。宋慧群等^[19]运用高度重复序列 PCR 对中国的 9 个刚地弓形虫分离株和国际标准强毒 RH 株的 529 bp 重复序列进行扩增, 结果显示, 10 个弓形虫分离株的 529 bp 重复序列均不完全相同, 它们之间的核苷酸序列变异范围为 0.8%~2.9%, 变异主要位于第 32~55 位碱基, 这些碱基变异与分离株的宿主来源、地域来源和毒力之间没有相关性。Ferreira 等^[12]运用高度重复序列 PCR 和 RAPD 技术综合分析巴西 19 个刚地弓形虫分离株的遗传特性, 通过引物 CAA 和 RY 进行扩增, 能准确地对弓形虫分离株和其他寄生虫做出鉴定。高度重复序列 PCR 所用的引物是标准化引物, 不需要特殊设计, PCR 扩增前也不需要预知模板 DNA 的信息, 而且稳定、方便、快捷且多态性丰富, 因而该方法在弓形虫分离株基因鉴定及分型方面将具有广阔的应用前景。

6 结语

随着 PCR 及其衍生技术的高速发展, 该类技术, 尤其是 PCR-RFLP 在弓形虫分离株的基因鉴定和分型中应用日趋广泛^[20-22]。Khan 等^[23]运用 PCR 扩增技术对分离自北美洲的刚地弓形虫虫株进行基因鉴定, 结果发了第四克隆世系, 随着对弓形虫的深入研究以及 PCR 扩增技术发展和广泛应用, 可能会有更多的克隆世系被发现。基因芯片等其他技术, 结合 PCR 技术运用于研究弓形虫基因的鉴定及分型等相关方面也将发挥更大的作用, 具有巨大的应用前景^[24]。PCR 及其衍生技术还有望用于揭示不同弓形虫基因型在致病性和对药物敏感性等方面差异的机制, 以及不同基因型和疾病模式之间潜在的相关性, 为临床治疗提供支持。

参 考 文 献

- [1] Balasundaram MB, Andavar R, Palaniswamy M, et al. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients [J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(4): 28-32.
- [2] Holland GN. An epidemic of toxoplasmosis [J]. Arch Ophthalmol, 2010, 128(1): 126-128.
- [3] Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings [J]. J Infect Dis, 2002, 186(5): 684-689.

- [4] Meneceur P, Boudouyre MA, Aubert D, *et al.* *In vitro* susceptibility of various genotypic strains of *Toxoplasma gondii* to pyrimethamine, sulfadiazine, and atovaquone [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1269-1277.
- [5] Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease [J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(6): 1561-1566.
- [6] Xie DH, Wen YB, Li HW, *et al.* Comparative studies on GRA6 gene of *Toxoplasma gondii* isolates from China [J]. *Sci Agr Sin*, 2005, 38(7): 1495-1500. (in Chinese)
(谢德华, 翁亚彪, 李华文, 等. 中国 4 个弓形虫株 GRA6 基因的比较分析 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(7): 1495-1500.)
- [7] Su C, Evans D, Cole RH, *et al.* Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission [J]. *Science*, 2003, 299(5605): 414-416.
- [8] Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: A high resolution and simple method for identification of parasites [J]. *Int J Parasitol*, 2006, 36(7): 841-848.
- [9] Ajzenberg D, Banuls AL, Su C, *et al.* Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii* [J]. *Int J Parasitol*, 2004, 34(10): 1185-1196.
- [10] Quan JH, Kim TY, Choi IU, *et al.* Genotyping of a Korean isolate of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP and microsatellite analysis [J]. *Korean J Parasitol*, 2008, 46(2): 105-108.
- [11] Shi JY, Wang HP. A study on DNA polymorphisms of *Toxoplasma* species and strains [J]. *Chin J Zoonoses*, 1999, 9(3): 1-6. (in Chinese)
(史俊岩, 王海鹏. 弓形虫种株 DNA 多态性研究 [J]. *中国人兽共患杂志*, 1999, 9(3): 1-6.)
- [12] Ferreira Ade M, Vitor RW, Carneiro AC, *et al.* Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR) [J]. *Infect Genet Evol*, 2004, 4(2): 131-142.
- [13] Ajzenberg D, Dumètre A, Dardé ML. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii* [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1940-1943.
- [14] Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, *et al.* Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12): 4641-4645.
- [15] Dubey JP, Su C, Oliveira J, *et al.* Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Costa Rica, Central America [J]. *Vet Parasitol*, 2006, 139(1-3): 29-36.
- [16] Fekkar A, Ajzenberg D, Bodaghi B, *et al.* Direct genotyping of *Toxoplasma gondii* in ocular fluid samples from 20 patients with ocular toxoplasmosis: Predominance of type II in France [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4): 1513-1517.
- [17] Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, *et al.* Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis [J]. *J Infect Dis*, 2001, 184(5): 633-639.
- [18] Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, *et al.* Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains [J]. *Vet Parasitol*, 2011, 175(1-2): 33-39.
- [19] Song HQ, Zhang DL, Liao SQ, *et al.* Amplification, cloning and sequence analysis of a repetitive 529 bp DNA fragment from *Toxoplasma gondii* strains from China [J]. *Sci Agr Sin*, 2007, 40(9): 2114-2118. (in Chinese)
(宋慧群, 张德林, 廖申权, 等. 中国弓形虫株 529bp 重复序列的 PCR 扩增、克隆及分析 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 2114-2118.)
- [20] Herrmann DC, Pantechev N, Vrhovec MG, *et al.* Atypical *Toxoplasma gondii* genotypes identified in oocysts shed by cats in Germany [J]. *Int J Parasitol*, 2010, 40(3): 285-292.
- [21] Boughattas S, Ben-Abdallah R, Siala E, *et al.* Direct genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with congenital toxoplasmosis in Tunisia (North Africa) [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 82(6): 1041-1046.
- [22] Velmurugan GV, Dubey JP, Su C. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe [J]. *Vet Parasitol*, 2008, 155(3-4): 314-318.
- [23] Khan A, Dubey JP, Su C, *et al.* Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America [J]. *Int J Parasitol*, 2011, 41(6): 645-655.
- [24] Yang PX, Zhang ZQ, Lu YX, *et al.* Development of liquid gene chip technique for detecting *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in food [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2010, 32(10): 777-780. (in Chinese)
(杨朋欣, 张子群, 路义鑫, 等. 食品中弓形虫和旋毛虫液相基因芯片检测方法研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(10): 777-780.)

(收稿日期: 2011-06-01 编辑: 高石, 瞿麟平)

文章编号: 1000-7423(2012)-01-0064-01

【消息】

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》2012 年征稿启事

本刊是卫生部主管、中华预防医学会和中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所主办的专业性学术期刊。于 1983 年创刊, 主要报道有关人体寄生虫学与寄生虫病的新研究成果和防治经验, 致力于推动寄生虫病防治科研工作, 提高专业人员的业务水平, 促进国内外学术交流。

本刊为 Medline 收录期刊, 2000-2012 年连续 4 个年版入选为《中文核心期刊要目总览》的中国基础医学类核心期刊; 2009 年度首次荣获“百种中国杰出学术期刊”奖, 2010 年遴选为“第二届中国精品科技期刊”; 2003-2011 年连续 4 个年度(每 2 年评选 1 次)荣获中华预防医学会系列杂志优秀期刊一等奖, 2009 年荣获第四届华东地区优秀期刊奖。本刊在国内外本领域有较高的影响力。

本刊设立论著、实验研究、临床研究、现场研究、述评、综述、学术争鸣(学术交流)、信息报道、新视野、教学研究、研究简报和病例报告等栏目。

为进一步缩短论文刊出周期, 对有重大基金项目资助的优秀研究论文开设绿色通道; 对省级较大规模的现场研究和现场调查、组稿(或约稿)的论文给予优先发表; 所有研究论文均争取在 6 个月内发表。欢迎踊跃投稿。

地址: 上海市瑞金二路 207 号

《中国寄生虫学与寄生虫病杂志》编辑部

邮编: 200025

电话: 021-54562376, 021-64377008 转 1305

E-mail: zgjcszz@vip.163.com <http://www.jsczz.cn>