

# 不同地理来源恶性疟原虫微卫星标记位点多态性研究

燕贺, 丰俊, 尹建海, 陈田木, 周水森\*

**【摘要】 目的** 比较东南亚与非洲输入性恶性疟原虫在Polyα、TAA87两个微卫星位点多态性的差异。**方法** 收集缅甸(92份)和加纳(126份)输入性恶性疟病例血液样本共218份,对所收集样本的Polyα、TAA87微卫星位点进行片段扩增,毛细管电泳检测扩增产物长度,应用Excel 2010和GenAEx 6.0软件计算等位基因频率和期望杂合度。**结果** 共获得146例单一感染样本的有效数据。Polyα、TAA87两个微卫星位点分别检测到16个和12个等位基因型,2个微卫星位点的平均期望杂合度为 $0.86 \pm 0.02$ 。缅甸输入样本在Polyα及TAA87位点的等位基因数分别为10个和8个,期望杂合度分别为0.86和0.81;加纳输入样本在Polyα及TAA87位点的等位基因数分别为15个和11个,期望杂合度分别为0.91和0.86。此外,长度为174 bp(Polyα)和113 bp(TAA87)的等位基因仅在东南亚缅甸样本中测出,其等位基因频率占17%以上。**结论** 东南亚与非洲输入性恶性疟原虫在Polyα、TAA87两个微卫星位点具有不同等位基因类型和数量,建议将这两个位点作为区分不同地理来源疟原虫的候选基因。

**【关键词】** 恶性疟原虫;微卫星;多态性;东南亚;非洲

**【中图分类号】** R382.31 **【文献标识码】** A

## Polymorphism analysis of microsatellite marker loci of *Plasmodium falciparum* from different geographical origins

YAN He, FENG Jun, YIN Jian-hai, CHEN Tian-mu, ZHOU Shui-sen\*

National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, National Health Commission, Shanghai 200025, China

\* Corresponding author

**【Abstract】 Objective** To compare the genetic diversity of imported *Plasmodium falciparum* by Polyα and TAA87 microsatellite markers in Southeast Asian and African geographical isolates. **Methods** Ninety-two and 126 filter paper samples from patients infected with *P. falciparum* from Southeast Asia (Myanmar) and Africa (Ghana) were collected, respectively. Two neutral microsatellite loci, Polyα and TAA87 were amplified by PCR. The length of PCR fragments was detected by capillary electrophoresis. The allele frequency and expected heterozygosity ( $H_e$ ) were calculated by Excel 2010 and GenAEx 6.0 software. **Results** A total of 146 *P. falciparum* samples were analyzed as single infection samples with a total of 26 alleles in locus Polyα and 12 alleles in locus TAA87. The mean  $H_e$  value of the two loci was  $0.86 \pm 0.02$ . Ten alleles in locus Polyα and 8 alleles in locus TAA87 were distributed in Myanmar isolates, with the  $H_e$  values of 0.86 and 0.81 respectively. Fifteen alleles in locus Polyα and 11 in locus TAA87 were detected in Ghana isolates, with the  $H_e$  values of 0.91 and 0.86 respectively. In addition, the haplotype of 174 bp (Polyα) and 113 bp (TAA87) were only detected in Myanmar isolates with more than 17% gene frequency, whereas they were absent in Ghana isolates. **Conclusions** The two different geographical sources of imported *P. falciparum* strains have different allele frequencies and haplotypes at the two neutral microsatellite markers, Polyα and TAA87. Therefore, these two microsatellite loci may be considered as the potential molecular marker candidates for identifying *P. falciparum* strains with different geographical sources.

**【Key words】** *Plasmodium falciparum*; Microsatellite; Polymorphism; Southeast Asia; Africa

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金(81602904);上海市卫生和计划生育委员会科研课题青年项目(20164Y0216)

**【作者单位】** 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所、世界卫生组织热带病合作中心、科技部国家级热带病国际联合研究中心、国家卫生健康委员会寄生虫病原与媒介生物学重点实验室(上海 200025)

**【作者简介】** 燕贺,女,硕士,助理研究员。研究方向:疟疾分子流行病学、疟原虫抗药性

\* 通信作者 E-mail: zhous@nipd.chinacdc.cn

**【数字出版日期】** 2018-08-20 15:09

**【数字出版网址】** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1374.r.20180816.0847.001.html>

我国疟疾防治已从控制进入消除阶段,当前报告病例多为输入性疟疾病例。在每年疟疾病例报告中,输入性病例占总报告病例的95%以上,且非洲撒哈拉以南的国家与东南亚(特别是缅甸)是主要的疟疾病例输入来源地<sup>[1]</sup>。如何避免由输入性病例引起的继发性传播是疟疾消除阶段的重要目标。在分子水平上如何实现对疟原虫种来源的判定是当前疟疾防控阶段的主要技术难点之一<sup>[2-6]</sup>,但目前鲜有文献报道。

微卫星(Microsatellite)序列因含有丰富的遗传信息标记而被广泛应用于种群溯源和种群结构分析。微卫星标记是指位于基因序列的短串联重复片段标记位点,重复单位为2~6个核苷酸不等,重复次数5~30次不等<sup>[7-10]</sup>。微卫星序列分析是在一定样本量基础上,针对短串联重复片段的标记位点扩增出相应片段,根据不同样本同一微卫星位点片段长度进行多态性分析,包括单倍体型分类和分布等。

本研究基于既往报道<sup>[11-12]</sup>,选用Polyα、TAA87这两个对不同地理来源具有较高特异性的中性微卫星位点,对东南亚缅甸与非洲加纳输入的恶性疟原虫进行微卫星分析。通过对两个位点的不同单体型进行分析,探索不同地区恶性疟原虫地理株的基因型差异,从而为疟疾病例的基因溯源提供理论依据和数据支撑。

## 材料与方法

### 1 恶性疟病例血样来源

共收集218份恶性疟血样。2008~2011年在云南边境地区共收集92份血样,主要来自于腾冲市和保山市(40份)、盈江县及缅甸拉咱和瓦邦(52份),病例感染地均为东南亚缅甸。另126份来自广西壮族自治区上林县,样本收集时间为2012年6~7月,病例感染地均为非洲加纳。感染地来源判断以网络疫情直报个案信息为依据,确定无本地既往病史,均为外出返回后发病。

### 2 主要试剂和仪器

QIAamp DNA Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司, KOD Plus 酶套装购自日本 ToYoBo 公司, ABI 9700 扩增仪、ABI 3730 测序仪购自上海赛默飞公司,琼脂糖、DNA 染料等购自上海皓嘉公司。

### 3 样本基因组提取与扩增

按照 QIAamp DNA Mini Kit 说明书提取样本 DNA。

3.1 扩增引物序列 针对区分度较高的两个微卫星位点 Polyα、TAA87,参照文献<sup>[13]</sup>合成半巢氏 PCR 扩增引物。其中,外部引物即 F 和 R 用于每个位点的第一轮扩增;内部引物(即 IF\*或 IR\*)与外部引物 F 或 R 配对并进行第二轮扩增,引物 5' 端用羟基荧光素

(FAM)标记。引物序列见表1。

表1 polyα与TAA87位点引物序列  
Table 1 Primer sequences of polyα and TAA87 microsatellite loci

引物名称 Primer	序列 5'→3' Sequence 5'→3'
Polyα-F	AAAATATAGACGAACAGA
Polyα-R	ATCAGATAATTGTTGGTA
Polyα-IR*	GAAATTATAACTCTACCA
TAA87-F	AATGGCAACACCATTCAAC
TAA87-R	ACATGTTTCATATTACTCAC
TAA87-IF*	ATGGGTTAAATGAGGTACA

3.2 半巢氏 PCR 扩增 采用 Toyobo 公司 KOD-401 DNA 聚合酶试剂盒,首先以提取的恶性疟基因组 DNA 为模板进行第一轮 PCR 扩增。反应总体积为 10 μL,含 H<sub>2</sub>O 6.1 μL、10 × KOD Buffer 1 μL、MgSO<sub>4</sub> (25 mmol/L) 0.4 μL、dNTPs (2 mmol/L) 1 μL、上游和下游引物各 0.2 μL (20 pmol/L)、模板 DNA 1 μL 和 KOD Plus (1 U/mL) 0.1 μL。PCR 反应条件:94 °C 3 min;94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 65 °C 30 s, 28 个循环;65 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

以第一轮扩增产物为模板,加入内部引物,总体积不变,退火温度降低到 50 °C,进行第二轮反应。

3.3 产物鉴定及毛细管电泳 反应结束后,产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。选择阳性产物以 1:800 比例稀释,用 ABI3730 测序仪进行毛细管电泳检测。毛细管电泳检测的分子量标准为 DL500 bp DNA marker,电泳结果图取峰高 > 1 000 (相对值,与本底的比值)作为有效样本值。为尽可能减少不同批次样本毛细管电泳检测的批间差,每批检测均以 3D7 标准株的微卫星位点片段检测指标作为内参,每个批次样本的检测值自动根据内参数值进行归一化处理。

3.4 单一及混合感染样本的判定 本研究仅以单一感染样本进行分析。参照文献<sup>[14]</sup>的方法,将测得的 218 份样本结果进行单一/混合感染的判定:若样本电泳结果图在某位点测得的次峰高度 ≥ 1/3 主峰高度峰值时,则判断该样本为多重感染,分析时剔除该样本。

### 4 统计分析

以 SPSS 13.0 软件进行统计分析,采用  $\chi^2$  检验比较两地区样本单一/多重感染率差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。用 Excel 2010 和 GenALEx 6.0<sup>[15]</sup> 计算 Polyα、TAA87 两个位点的等位基因数目,以及不同输入来源样本在这两个位点的期望杂合度。根据等位基因数目和期望杂合度对不同地区地理株进行遗传多样性评估<sup>[16]</sup>。期望杂合度定义为从群体样本中

抽到2个不同长度等位基因的概率大小,计算公式为:期望杂合度 =  $[n / (n - 1)] \times [1 - \sum p_i^2]$ ,其中 $n$ 为有效样本数, $p_i$ 为第 $i$ 个等位基因频率。采用Alequine 3.0软件分析和计算东南亚和非洲来源样本Poly $\alpha$ 、TAA87位点的单体型分类和遗传分化系数 $F_{st}$ 值<sup>[17]</sup>。

## 结 果

### 1 Poly $\alpha$ 、TAA87位点扩增结果及两地区恶性疟样本单一/多重感染判定

对PCR扩增阳性恶性疟原虫样本进行毛细管电泳检测,图1为S169、S183、S190、S224样本在TAA87位点检测到的微卫星片段长度,右侧纵坐标数值代表该样本测得的信号值。S190样本在其所测的位点有多个信号峰值,且次峰高度大于主峰的1/2,判定其为多重感染样本。

218份恶性疟原虫样本中,分别有90份缅甸输入样本和117份加纳输入样本得到有效检测。该207份样本检测结果表明,两地区单一恶性疟原虫感染率分别为84.44%(76/90)和59.83%(70/117),其中缅甸输入样本单一恶性疟原虫感染率高于加纳( $\chi^2 = 14.83$ ,  $P < 0.01$ )。检测结果经单一/混合感染样本判定后,仅有146份样本用于后续统计描述分析。

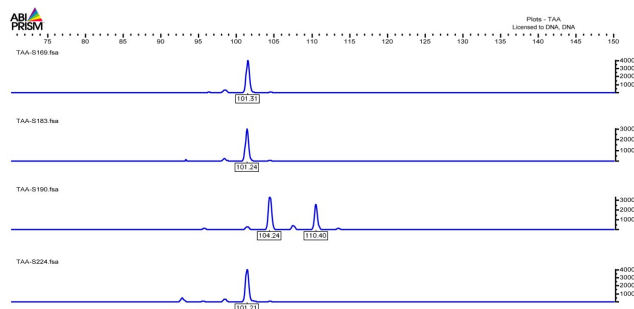
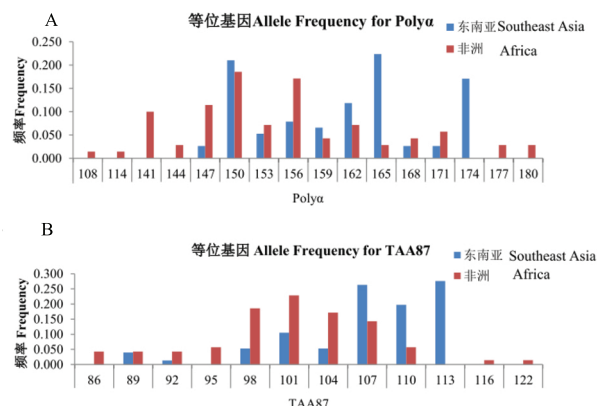


图1 TAA87位点等位基因长度扫描  
Fig. 1 Gene scans for locus TAA87

### 2 Poly $\alpha$ 、TAA87位点等位基因频率分析

146份单一恶性疟原虫感染样本中,TAA87、Poly $\alpha$ 位点等位基因数分别为12个和16个,其中缅甸输入样本在TAA87及Poly $\alpha$ 位点的等位基因数分别为8个和10个,加纳输入样本在TAA87及Poly $\alpha$ 位点的等位基因数分别为11个和15个。加纳输入样本在2个位点的等位基因数均多于中缅边境的样本。此外,等位基因型174 bp(Poly $\alpha$ )和113 bp(TAA87)仅在缅甸输入样本中检出,构成比均 $> 17\%$ ;在加纳输入样本中未发现该等位基因型(图2)。



注:A Poly $\alpha$ ; B TAA87

Note: A Poly $\alpha$ ; B TAA87

图2 TAA87、Poly $\alpha$ 位点等位基因频率分布

Fig. 2 Allele frequency distribution of two microsatellite loci, TAA87 and Poly $\alpha$

### 3 两地区单体型分类分析

所测得的恶性疟原虫样本在Poly $\alpha$ 、TAA87位点的单体型共有79种,缅甸和加纳输入样本的单体型数分别为30个和49个。加纳恶性疟原虫样本在这两个微卫星标记位点的单体型种类均高于缅甸样本。

### 4 Poly $\alpha$ 、TAA87位点期望杂合度

所检测的恶性疟原虫样本在两个微卫星位点的平均期望杂合度为 $0.86 \pm 0.02$ 。缅甸与加纳输入恶性疟原虫样本在TAA87位点的期望杂合度分别为0.81、0.86,在Poly $\alpha$ 位点的期望杂合度分别为0.86、0.91。加纳输入恶性疟原虫样本在该两位点的期望杂合度均高于缅甸输入样本。

### 5 两地区Poly $\alpha$ 、TAA87位点遗传分化指标 $F_{st}$ 分析

采用Alequine 3.0软件计算得到Poly $\alpha$ 、TAA87位点 $F_{st}$ 平均值分别为0.06、0.03。根据文献<sup>[18]</sup>,Poly $\alpha$ 位点 $F_{st} \geq 0.05$ 被认为在群体间存在一定程度的遗传分化。

## 讨 论

微卫星序列为短串联重复序列,因在恶性疟原虫基因组中广泛分布,具有多样性和易检测的特点,而被广泛应用于药物选择压力的检测分析。这一技术同样也适用于对一定样本量恶性疟原虫种的基因分型与种群溯源分析<sup>[19-20]</sup>。本研究采用微卫星遗传标记的分析方法,选用TAA87及Poly $\alpha$ 两个微卫星位点对东南亚和非洲输入的恶性疟病例血液样本进行分析比较,发现非洲加纳来源的恶性疟原虫在TAA87及Poly $\alpha$ 位点的等位基因数均多于东南亚缅甸输入样本,说明非洲加纳的恶性疟原虫在这两个位点的基因多态性均高于东南亚缅甸恶性疟原虫,这不仅与既往



研究结果一致<sup>[21-22]</sup>,同时也符合目前恶性疟在非洲分布较东南亚广泛的特点<sup>[23]</sup>。

本研究证实了不同来源地的恶性疟原虫样本在同一位点的等位基因型别上具有基因长度分布特异性,如TAA87位点的等位基因型86、95、116、122 bp仅在非洲加纳样本中出现,占其样本数的12.9%;又如Poly $\alpha$ 位点中的等位基因型108、114、141、144、177 bp和180 bp也仅在非洲加纳样本中检出,占其样本数的21.4%。值得注意的是,Poly $\alpha$ 位点的等位基因型174 bp和TAA87位点的等位基因型113 bp,仅在缅甸来源的恶性疟原虫样本中检出,其构成比均>17%,提示这两个基因型可能在恶性疟原虫来源地的判定上具有一定参考价值。其次,不同地区样本在相同位点的单体型分布具有较明显的地理特征。如在Poly $\alpha$ 位点上,缅甸输入的恶性疟原虫样本中等位基因(150 bp + 162 bp + 165 bp + 171 bp)的组合占全部样本的72.4%,而同样的基因型组合在非洲加纳输入样本中仅占28.6%。

目前,输入性疟疾仍是我国现阶段疟疾消除工作所面临的重要挑战之一<sup>[2]</sup>。能否对疟疾病例来源地进行准确判断,直接影响疫点处置策略的制定及相关措施的应用。目前微卫星检测技术相对成熟、相关报道较多,但鲜有研究运用此方法来比较东南亚与非洲疟原虫基因多态性的差异。本研究通过检测Poly $\alpha$ 和TAA87微卫星位点,得出了如下结论:①非洲加纳多重感染率高于东南亚缅甸,反映出东南亚地区恶性疟相较于非洲地区具有低传播和高感染率的特点;②从期望杂合度及基因单体型种类看,非洲来源的恶性疟原虫样本均表现出比东南亚缅甸来源样本更为丰富的多态性,这可为今后的种群溯源和分类提供理论依据。今后,可在扩大样本量和筛选更多中立微卫星位点的基础上,进一步对不同来源恶性疟原虫样本的输入源进行分析和判定。

### 【参考文献】

- [1] 张丽,丰俊,张少森,等. 2015年全国疟疾疫情分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2016,34(6): 515-519.
- [2] 汤林华. 中国的疟疾:从控制走向消除[J]. 国际医学寄生虫病杂志,2009,36(5): 258-265.
- [3] 钱会霖,汤林华. 中国五十年疟疾防治工作的成就与展望[J]. 中华流行病学杂志,2000, 21(3): 225-227.
- [4] 曹俊,周水森,周华云,等. 中国疟疾从控制走向消除——消除阶段的目标 策略和措施[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2013, 25(5): 439-443.
- [5] 汤林华. 我国消除疟疾的关键策略:线索追踪,清点拨源[J]. 中国热带医学,2017,17(5): 431-434.
- [6] 孙艾明,董莹,陈梦妮,等. 云南省恶性疟原虫青蒿素耐药性相

关基因K13 kelch结构域序列多态性的分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2016,34(4): 339-345.

- [7] Gardner MJ, Hall N, Fung E, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* [J]. Nature, 2002, 419(6906): 498-511.
- [8] Mu J, Awadalla P, Duan JH, et al. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum* [J]. PLoS Biol, 2005,3(10): e335.
- [9] Rich SM, Licht MC, Hudson RR et al. Malaria's Eve: evidence of a recent population bottleneck throughout the world populations of *Plasmodium falciparum* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4425-4430.
- [10] 李军伟,周水森,黄芳. 微卫星标记技术及其在疟原虫遗传多态性研究中的应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2012, 24(2): 232-234, 238.
- [11] Ferdig MT, Su XZ, Microsatellite markers and genetic mapping in *Plasmodium falciparum* [J]. Parasitol Today,2000,16(7): 307-312.
- [12] Preston MD, Assefa SA, Ocholla H, et al. PlasmoView: a web-based resource to visualise global *Plasmodium falciparum* genomic variation[J]. J Infect Dis, 2014, 209(11): 1808-1815.
- [13] Anderson TJ, Su XZ, Bockarie M, et al. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples[J]. Parasitology, 1999, 119 (Pt2): 113-125.
- [14] 燕贺,张丽丽,王健,等. 简单重复序列技术鉴别恶性疟原虫单/多重感染 [J]. 中国热带医学, 2011,11(8): 913-915.
- [15] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update [J]. Bioinformatics, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [16] Wei G, Zhang L, Yan H, et al. Evaluation of the population structure and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in southern China[J]. Malar J,2015,14: 283.
- [17] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis [J]. Evol Bioinform Online, 2007, 1: 47-50.
- [18] Wright S. Evolution and the genetics of populations [J]. Physiol Biochem Zool, 1968, 8: 1191-1192.
- [19] Chimusa ER, Meintjies A, Tchanga M, et al. A genomic portrait of haplotype diversity and signatures of selection in indigenous southern African populations[J]. PLoS Genet, 2015, 11(4)215-217.
- [20] 陈学迪,叶润,潘卫庆. 中缅边境及泰国东南地区恶性疟原虫K13基因侧翼微卫星多态性研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2017,35(3): 209-212.
- [21] Volkman SK, Sabeti PC, DeCaprio D, et al. A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum* [J]. Nat Genet, 2007, 39(1): 113-119.
- [22] Diez BE, Ward Z, Chan W, et al. Genomic variation in *Plasmodium vivax* malaria reveals regions under selective pressure[J]. PLoS One, 2017,12(5): e0177134.
- [23] Duffy CW, Ba H, Assefa S, et al. Population genetic structure and adaptation of malaria parasites on the edge of endemic distribution [J]. Mol Ecol, 2017,26(11): 2880-2894.