

不同检材微量血间日疟原虫PCR检测模板制备方法的研究

高世同,张仁利,李晓恒,黄达娜,耿艺介,吴少庭

摘要:目的 探寻不同检材微量血间日疟原虫PCR检测模板制备的方法。方法 全血标本采用酚/氯仿抽提法、洗涤沉淀法、Chelex煮沸法和洗涤水煮法,滤纸干血滴及厚血膜标本以Chelex煮沸法和洗涤沉淀法制备模板。以间日疟原虫特异性引物作PCR扩增检测模板制备的效果。结果 采用上述4种不同的方法制备的全血间日疟原虫DNA模板与采用Chelex法和洗涤沉淀法制备的滤纸干血滴以及厚血膜疟原虫DNA模板均可被扩增出1条341bp的间日疟原虫特异性DNA条带,与预期的扩增片段大小一致;不同方法制备的10份间日疟患者血样DNA模板用于PCR扩增检测,结果无明显差异。其中,Chelex煮沸法和洗涤沉淀法对不同检材的疟原虫感染血样DNA模板均能有效制备,且可在同一离心管中进行,减少了交叉污染的机会。结论 Chelex法和洗涤沉淀法简便、实用,适用于不同检材微量血疟原虫PCR模板的制备。

关键词:间日疟原虫;DNA提取;聚合酶链反应

中图分类号:R531.3 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)9-1039-03

A study on the methods for preparing DNA templates of *Plasmodium vivax* from different trace blood samples for PCR detection. GAO Shi-tong, ZHANG Ren-li, LI Xiao-heng, HUANG Da-na, GENG Yi-jie, WU Shao-ting (Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong, P.R.China)

Abstract:Objective To establish a method for preparing *Plasmodium vivax* DNA templates from different trace blood samples. **Methods** The DNA templates of whole blood samples were prepared by the phenol / chloroform extraction, washing precipitation, Chelex-boiling, and water-boiling methods, and the DNA templates of filter paper dried blood drops and thick blood film specimens were prepared by Chelex boiling method and washing precipitation method. **Results** The DNA templates from the blood samples prepared with the different methods could be used in polymerase chain reaction for detection of *Plasmodium vivax*. Among the different preparation methods, no significant difference was observed in respect of effect of DNA extraction. Chelex-boiling and washing precipitation methods could be used in the DNA templates preparation of the different trace blood samples in one centrifuge tube, thus the chance of cross contamination reduced. **Conclusions** The Chelex-boiling method and washing precipitation method were simple and effective in the DNA preparation for PCR detection of *Plasmodium vivax* in different blood samples.

Key words: *Plasmodium vivax*; DNA extraction; Polymerase chain reaction

疟疾是经由按蚊传播的寄生虫病,广泛流行于热带和亚热带地区的发展中国家。与传统的镜检法相比,聚合酶链反应技术(PCR)对于低原虫密度感染的人群监测以及虫种的分类鉴定具有重要意义^[1-3]。由耳垂或指尖采集的几微升~几十微升血是疟疾现场和临床诊断较为适宜的取血量。如何对不同检材微量血疟原虫DNA模板进行有效制备是PCR检测疟原虫感染所必需解决的问题之一。本文就血液疟原虫检测中较为常见的检材,包括全血、滤纸干血滴及厚血膜涂片,采用不同的方法进行疟原虫DNA模板的制备,通过观察核酸PCR扩增检测的效果,进行对比研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血样标本 镜检阳性的间日疟患者血样10份

及健康成人血样标本由深圳市疾控中心收集保存。全血标本的采集均为静脉取血,2%EDTA-Na₂抗凝(100μl/ml血),-20℃低温保存。在取全血同时,用玻片涂制厚血膜,并取20μl血滴于滤纸片上,室温晾干后,封于塑料袋中保存。

1.1.2 主要仪器及试剂 PE-9600型PCR扩增仪(美国PE公司);Chelex-100树脂(Sigma公司);滤纸(上海新华造纸厂);DNA标志物,4种dNTP、Tris碱、Triton-100、明胶、NP40和Tween-20为大连宝生物公司产品;TaqDNA聚合酶及10×PCR Buffer(含500mM KCl,100mM Tris-HCl,PH 8.4,20mM MgCl₂,1% Triton,0.1% NP40,0.1% Tween20,0.1%明胶)为Promega公司产品;皂素裂解液(含0.015% 50mM NaCl),NP40洗涤液(含0.5%的STE液)。

1.1.3 引物 间日疟原虫特异性扩增引物1对,序列

基金项目 深圳市科技计划项目(No.200902090)

作者单位 深圳市疾病预防控制中心 广东 深圳 518055

作者简介 高世同(1969~),男,硕士,主任医师,主要从事感染性疾病的控制与研究工作。

分别为5'-AAC ATG GCT ATG ACG GGT AAC G-3'和5'-ATG TGG ATT AAG CTA GAA GCG T-3',根据疟原虫小亚基核糖体RNA设计合成。

1.2 方法

1.2.1 全血DNA模板的制备

1.2.1.1 酚/氯仿抽提法 取200μl冻存血置灭菌EP管中,加入1ml皂素裂解液混匀,10000 rpm离心5min,弃上清,加入1ml的PBS缓冲液洗涤1次,离心弃上清,沉淀中加入STE液200μl、10%SDS 20μl和10mg/ml蛋白酶K 4μl,混匀,55℃水浴3h,饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:4:1)、氯仿各抽提1次,2倍体积冰冻无水乙醇沉淀DNA,70%乙醇洗涤1次,加入TE缓冲液40μl溶解DNA,4℃保存备用。

1.2.1.2 洗涤沉淀法^[4,5] 取20μl冰冻血样,加入1ml皂素裂解液混匀,10 000 rpm离心10 min,弃上清,再加入500μl 1×PCR Buffer混匀,10000 rpm离心10 min,弃上清,沉淀用于PCR反应。

1.2.1.3 洗涤水煮法 取20μl冰冻全血,加500μl的皂素裂解液混匀,离心弃上清,500μl NP-40洗涤液悬浮沉淀,离心弃上清,加60μl三蒸水,煮沸10min,12000rpm离心5min,10μl用于PCR。

1.2.1.4 Chelex煮沸法^[6] 取20μl冰冻全血,加500μl的皂素裂解液混匀,离心弃上清,500μl PBS洗涤1次,加60μl的三蒸水,20% Chelex-100 20μl,100℃沸水浴5min,涡旋30s,100℃沸水5min,12000rpm离心5min,5-10μl上清用于PCR。

1.2.2 滤纸干血滴DNA模板的制备

1.2.2.1 Chelex法^[7,8] 剪碎滤纸血片加入5% Chelex溶液(与血样之比为1:10),涡旋30s,100℃沸水浴10min,12000rpm离心2min,上清5-10μl用于PCR。

1.2.2.2 洗涤沉淀法 将干血滴滤纸片剪下置离心管中加1ml的皂素裂解液,室温浸泡30min以上,涡旋振荡30s,10000rpm离心10min,1×PCR Buffer洗涤沉淀1次,10000rpm离心10min,弃上清,沉淀用于PCR。

1.2.3 厚血膜DNA模板的制备

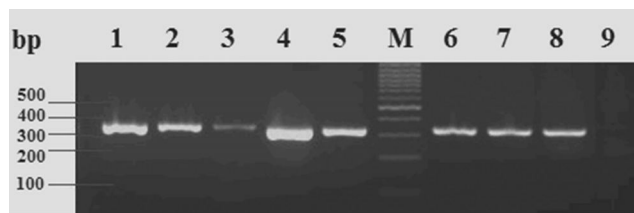
1.2.3.1 Chelex法 将血膜刮入EP管中,加0.5ml皂素裂解液混匀,10000rpm离心10min,弃上清,500μl NP-40洗涤液悬浮沉淀,离心弃上清,加入100μl预热5% Chelex溶液,涡旋30s,100℃煮沸10min,12000rpm离心2min,上清至另管,12000rpm离心2min,上清5-10μl用于PCR。

1.2.3.2 洗涤沉淀法 将血膜刮入离心管中,加0.5ml皂素裂解液混匀,置室温10min,10000rpm离心10min,1×PCR Buffer洗涤沉淀1次,10000rpm离心10min,弃上清,沉淀用于PCR。

1.2.4 PCR反应 反应总体积为50μl,沉淀中加灭菌三蒸水38μl,混匀后,95℃15 min,25℃1min,两个循环。再加入10×Buffer 5μl,2.5mM dNTP 4μl,引物各0.7μl,50pmol,混匀后,94℃变性4 min,再加TaqDNA聚合酶0.6μl(1.5U)。前10个循环94℃变性40s,60℃退火35s,72℃延伸30s,后30个循环88℃30s,60℃35s,72℃30s。最后72℃延伸5min。对于非沉淀形式的DNA模板,无需进行95℃两个热循环,其余反应条件相同。

2 结果

2.1 不同方法制备全血疟原虫DNA模板的结果 采用酚/氯仿抽提法、洗涤沉淀法、洗涤水煮法以及Chelex煮沸法制备的全血间日疟原虫DNA模板,PCR均能扩增出341bp间日疟原虫特异性基因条带,与预期的扩增片段大小一致,见图1;不同方法制备10份间日疟患者血样DNA模板的比较见表1。



M: DNA 标志物;1-4:全血样本的酚/氯仿法、洗涤沉淀法、洗涤煮沸法和Chelex法;5-6:滤纸干血滴的Chelex法和洗涤沉淀法;7-8:厚血膜的Chelex法和洗涤沉淀法;9:空白对照

M: DNA marker;1-4: The DNA templates of whole blood samples prepared with the phenol / chloroform extraction, washing precipitation, water-boiling and Chelex-boiling methods; 5-6: The DNA templates of dried blood spots on filter paper prepared with, Chelex-boiling and washing precipitation methods; 7-8: The DNA templates of thick blood smears prepared with, Chelex-boiling and washing precipitation methods; 9: Blank control

图1 不同方法制备血样疟原虫DNA的PCR扩增结果

Fig 1 The DNA templates prepared by different methods amplified by PCR

2.2 滤纸干血滴及厚血膜疟原虫DNA模板的制备

采用Chelex法和洗涤沉淀法两种方法制备的滤纸干血滴以及厚血膜疟原虫DNA模板均可被扩增出1条341bp的间日疟原虫特异性DNA条带,见图1。10份间日疟患者滤纸干血滴和厚血膜样本经两法处理后,PCR均为阳性。

3 讨论

通过经典酚/氯仿抽提方法,可以获得纯度很高的疟原虫全基因组DNA,满足限制性酶切、克隆以及PCR等各种分子生物学实验的需要。因为PCR对于核酸纯度的要求不是很高,存在一定量的蛋白质或有机物对于PCR反应影响不是很大,故没有必要采用经典的方法制备疟原虫PCR模板。此外,酚/氯仿核酸

表 1 不同方法制备全血疟原虫 DNA 模板的比较
Table 1 Comparison of different methods in preparing malarial PCR DNA templates

方法 Methods	PCR 检出数 No. detected by PCR	制备时间 Time for preparation	有害化学物 Use of hazard chemicals	交叉污染风险 Chance of cross contamination	费用 Cost
酚/氯仿法 Phenol / chloroform extraction	10	4h	使用 Yes	高 High	中 Medium
洗涤沉淀法 Washing precipitation	10	25-30 min	未使用 No	较低 low	低 Low
洗涤煮沸法 Water-boiling	9	35-45 min	未使用 No	较低 low	低 Low
Chelex 法 Chelex-boiling	10	35-45 min	未使用 No	较低 low	中 Medium

提取方法步骤多 ,易造成交叉污染 ,影响实验的结果。简化 DNA 模板的制备对于疟疾的临床检测及分子流行病学调查是非常必要的。

减少 PCR 反应的抑制因子 ,充分地使疟原虫裂解并释放 DNA 是 PCR 模板制备的中心环节。血红蛋白、蛋白酶及血中的金属离子是 Taq 酶的抑制因子^[9] ,本文述及的疟原虫微量血 DNA 模板的制备方法中 ,采用皂素裂解液以及洗涤液进行充分混匀 ,离心沉淀 ,其目的是裂解红细胞并去除大部份的红细胞碎片和血红蛋白 ;Chelex-100 则是离子交换树脂 ,为金属螯合剂的一种 ,可以螯合血液中的各种金属离子^[6] ;通过水浴煮沸或高温热循环来裂解释放疟原虫 DNA。上述方法均未采用蛋白酶 K 消化 ,然而却获得了满意的结果。对于 10 份间日疟全血标本 ,Chelex 法和洗涤沉淀法制备的疟原虫 DNA 模板的 PCR 扩增效果和经典的酚/氯仿抽取方法相一致 ,同时缩短了模板制备的时间 ,避免了有毒化学物质的使用。采用滤纸干血滴法大大方便了血样的收集、保存和运输 ,干血标本无需低温保存 ,在室温放置 4 个月 ,不影响 PRC 结果的重现性^[10]。滤纸干血滴法收集血样解决了 PCR 法用于现场的样本的保存和运输问题。

综上所述 ,采用 Chelex 法和洗涤沉淀法处理不同检材微量血疟原虫感染血样 ,无需蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提 ,简便有效 ,且疟原虫 DNA 模板的制备 ,均可在同一离心管中进行 ,减少了交叉污染的机会。

参考文献 :

[1] Jeslyn WP, Huat TC, Vernon L,et al. Molecular epidemiological investigation of *Plasmodium knowlesi* in humans and macaques in Singapore. [J].Vector Borne Zoonotic Dis. 2011 ,11(2):131-5.

[2] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Detection of four *Plasmodium species* in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays[J] J Clin Microbiol. 2004;42 (12):5636-43.

[3] Padley D, Moody AH, Chiodini PL, et al. Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present.[J] Ann Trop Med Parasitol. 2003;97:131 137.

[4] Hyde JE. Protocols in Molecular Parasitology[M]. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1993.

[5] Proux S, Suwanarusk R, Barends M,et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection[J]. Malar J. 2011; 10: 323. Published online 2011,28. doi: 10.1186/1475-2875-10-323

[6] Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*[J]. Parasitol Today. 1993;9(8):303-5.

[7] Kain KC,Brown AE, Mirabelli L, et al. Detection of *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction in a field study[J]. J Infect Dis,1993,168 (5):1323-6.

[8] Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies[J]. Am J Trop Med Hyg. 1999,60(4):687-92.

[9] Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM,et al. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria[J].Exp Parasitol. 1994,79(1):41-9.

[10] Kain KC, Keystone J, Franke ED, et al. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*[J]. J Infect Dis, 1991, 164:208-210.

收稿日期 2012-07-27 编辑 崔宜庆