

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.13.021

高分辨熔解曲线非标记探针基因分型技术检测恶性疟原虫青蒿素耐药相关 K13 基因突变方法学的建立^{*}

陈伟忠

广东省潮州市人民医院检验科,广东潮州 521000

摘 要:目的 建立一种通过高分辨熔解曲线(HRM)-非标记探针基因分型分析方法,检测恶性疟原虫青蒿素耐药相关 K13 基因 C580Y 突变位点。**方法** 通过构建野生型和 C580Y 突变型质粒,设计相应引物、探针,应用 HRM-非标记探针技术检测 C580Y 突变。**结果** 成功检测出标本中含有 C580Y 突变的基因型及野生基因型。检测野生型和突变型的探针峰的温度之差为 5℃。**结论** HRM-非标记探针技术是一种能够快速、准确、廉价、反应通量大的检测方法,适用于疫区恶性疟原虫青蒿素耐药相关 K13 基因突变的大批量检测。

关键词:恶性疟原虫; HRM; 基因突变

中图法分类号:Q343.1+2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)13-1908-04

Establishment of a methodology for detecting artemisinin-Resistant K13 gene mutations in Plasmodium falciparum using High-Resolution Melting curve unlabeled probe genotyping^{*}

CHEN Weizhong

Department of Clinical Laboratory, Chaozhou People's Hospital, Chaozhou, Guangdong 521000, China

Abstract: Objective To establish a High-Resolution Melting (HRM) analysis with an Unlabeled Probe for artemisinin resistance related mutation site C580Y of K13 gene in Plasmodium falciparum. **Methods** The wild-type and C580Y mutant plasmids were constructed, and the corresponding primer probes were designed. The C580Y mutation was detected by HRM analysis with an Unlabeled Probe. **Results** Genotypes containing C580Y mutation and wild genotypes were successfully detected in the samples. The difference in temperature between the wild-type and mutant probe peaks was 5℃. **Conclusion** The high resolution melting analysis with unlabeled probes technique is a fast, accurate, inexpensive, and high-throughput assay, suitable for the large-scale detection of K13 gene mutations associated with Plasmodium falciparum artemisinin resistance in endemic areas.

Key words: Plasmodium falciparum; High-Resolution Melting; gene mutations

疟疾是由疟原虫造成的一种全球性急性寄生虫传染病^[1-2]。据世界卫生组织统计,2018 年全球发生了 2.28 亿例疟疾病例,其中以非洲的撒哈拉以南地区感染疟疾的疫情最重^[3]。青蒿素是我国科学家从青蒿中发现的新型抗疟药物。以青蒿素为基础的联合疗法(ACT)被广泛用于疟疾临床治疗,成为治疗疟疾的一线药物^[4-5]。近年来,恶性疟原虫开始出现了青蒿素抵抗的现象。目前的研究表明,恶性疟原虫第 13 号染色体上编码的 kelch 蛋白的基因,即 K13 基

因,其螺旋桨域 N458Y、Y493H、R539T、I543T、R561H 和 C580Y 氨基酸替换能够影响原虫体外存活率和体内清除率,该基因单核苷酸多态性(SNP)可以作为监控 ACT 药物抗性的分子标记^[6]。特别是在东南亚地区 C580Y 被认为是一种主要和富有潜力的衡量青蒿素抵抗的分子标志。通过对这些恶性疟原虫青蒿素耐药相关基因突变的检测,可以评价和预测耐药性情况^[7]。

本实验运用的非标记探针法高分辨熔解曲线

^{*} 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2019198)。

作者简介:陈伟忠,男,主管技师,主要从事临床医学检验技术研究。

本文引用格式:陈伟忠.高分辨熔解曲线非标记探针基因分型技术检测恶性疟原虫青蒿素耐药相关 K13 基因突变方法学的建立[J]. 检验医学与临床,2021,18(13):1908-1910.

(HRM)分析技术,不仅可以确定特定等位基因的存在或缺失,还可以检查探针下的整个区域单个碱基差异^[8]。该分析方法的主要优点是灵敏度和特异度极高;所有实验反应试剂均在实验前加入管中,以避免开盖造成的实验污染;其检测通量大而成本低,适合临床大批量标本的筛查^[9]。

1 材料与方法

1.1 一般资料 通过设计的目的基因突变位点的探针和引物,构建标准质粒,使用 HRM 非标记探针基因分型技术检测恶性疟原虫青蒿素耐药性相关 K13 基因 C580Y 突变位点。

1.2 仪器与试剂 Thermo Cell 恒温金属浴、薄壁管、低俗离心机、BIOER 基因扩增仪、LightScanner 高分辨溶解曲线分析仪;干血斑基因组 DNA 提取试剂盒(DP334)、2×Taq plus PCR MasterMix、饱和荧光染料 LC Green、96 孔全裙边板 HSP9665、0.2 mL 薄壁管 PCR-02-C。

1.3 方法

1.3.1 设计探针与引物 引物和探针设计后由上海美吉医学检验有限公司合成,产品真空冷冻干燥保存。探针序列:TCATCATCTATGTGTGTTGCTTT -block;上游引物序列:GCTCTTCTATTATACCGAA;下游引物序列:TTCTAATAAGGCATATGGAA。产物长度为 218 bp。

1.3.2 标准质粒构建 采用人工合成的办法由华大公司合成含有青蒿素耐药相关突变 C580Y 和野生型的 pUC57-amp 质粒。

1.3.3 PCR 反应体系 本实验采用不对称 PCR 扩增法,上、下游引物比为 5 : 1。反应体系为 20 μL,试剂配制及用量如下:2.0 μL(约 20 ng)基因组 DNA 或 103 copy/mL 质粒(对照)、0.2 μL 10.0 μmol/L 上游引物、1.0 μL 10.0 μmol/L 的下游引物、10.0 μL 2×Master Mix(艾德莱公司)、0.5 μL 10.0 μmol/L 非标记探针(3'端采用 C3 spacer 或磷酸化封闭)、2.0 μL 饱和荧光染料 LC Green,最后加无菌蒸馏水至 20.0 μL。进行反应前加入矿物油 10 μL,以防止挥发污染。突变型和野生型标本分别进行 5 个重复实验。

1.3.4 PCR 扩增与 HRM 检测 将反应体系加入 96 孔全裙边板,放至 BIOER 基因扩增仪,PCR 程序为 94 ℃ 预变性 3 min,然后 94 ℃ 30 s、60 ℃ 15 s、72 ℃ 20 s,进行 55 个循环,95 ℃ 1 min,使异源双链核酸分子形成。15 ℃ 保持直到实验结束。

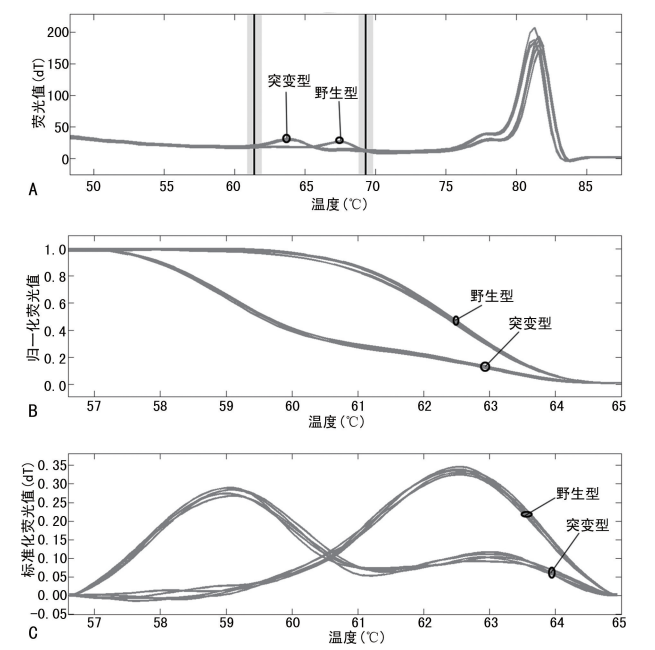
扩增完毕后,将 96 孔全裙边板放至微孔板专用

离心机进行离心,将产物聚集于反应孔底部。产物通过 Lightsanner96 仪器检测分析,设置起始温度为 45 ℃,结束温度为 95 ℃,仪器采集荧光信号并绘制溶解曲线图进行分析。

1.3.5 灵敏度检验 为了验证本实验灵敏度,同时评估该方法在野生型和突变型混合感染中突变检测能力,笔者对突变型和野生型质粒(10~10⁵ ng/μL)按不同比例混合稀释。突变型质粒和野生型质粒原倍浓度均为 1 105 copy/L,按照突变型/野生型质粒比例为 10 : 90、30 : 70、50 : 50、70 : 30 和 90 : 10 进行混合,然后分别对混合标本进行检测。每个混合比例进行 5 个重复实验。

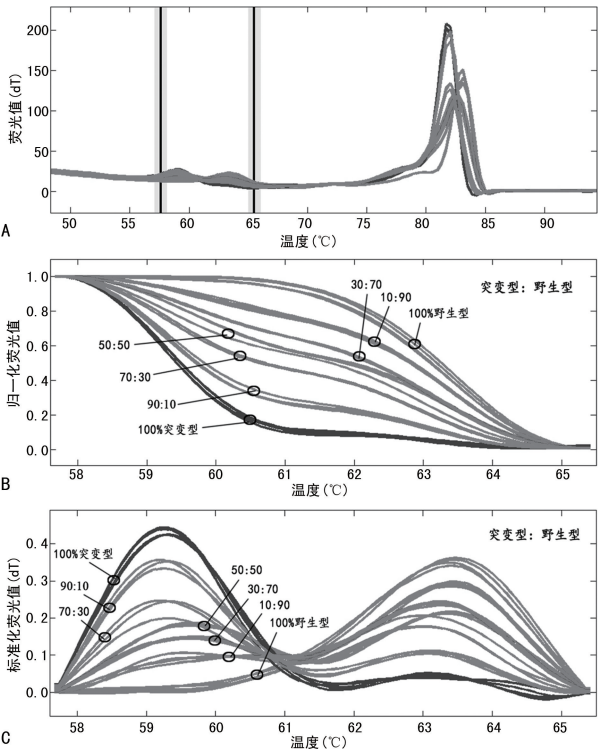
2 结 果

2.1 HRM 检测结果 通过 Lightsanner96 仪器对产物进行分析形成熔解曲线图。在 60~85 ℃ 形成两个熔解曲线峰,即在低温区(61~69 ℃)的探针峰和高温区(75~84 ℃)的产物峰。在探针峰上,突变型和野生型之间的温度差达到 5 ℃,能够很好地鉴别区分,见图 1。



注: A 为溶解曲线图; B 为差异曲线图; C 为标化熔解峰图。
图 1 HRM 方法检测 K13 基因 C580Y 突变的结果

2.2 灵敏度检验结果 将突变型和野生型质粒按照比例为 10 : 90、30 : 70、50 : 50、70 : 30 和 90 : 10 进行混合后再检验得到的熔解曲线,见图 2。各个混合比例曲线按比例递进顺序依次排列,均能很好地区分,形成单一的扩增峰,无非特异性产物干扰峰形成。结果显示,本实验具有良好的重复性、扩增效率及良好的线性关系,可做基因分型的半定量检测。



注: A 为熔解曲线图; B 为差异曲线图; C 为标化熔解峰图。
图 2 HRM 方法检测突变型/野生型质粒不同比例混合标本的结果

3 讨 论

疟疾具有非常强的传播性,其对人类的危害不单单是局限在某一个地区或国家,而是关系到全人类的公共卫生问题^[10]。疟原虫耐药性的产生和流行,更是对全球公共卫生工作提出了巨大的挑战^[11]。目前,世界卫生组织确认性疟原虫 K13 基因突变与青蒿素耐药性相关,可以作为恶性疟原虫青蒿素耐药性的分子标志物。根据 2019 年世界卫生组织关于疟疾的 ACT 药物抵抗报告,PFK13 基因的 F446I、N458Y、Y493H、R539T、I543T、R561H、C580Y 这 7 个突变已经被证实与青蒿素和其衍生物的抵抗有关,推荐其作为监控 ACT 药物抗性的分子标记。

目前,对恶性疟原虫青蒿素耐药相关基因 SNP 的检测方法比较多,常见的有 Sanger 测序法^[12]、PCR-限制性片段长度多态性分析技术(RFLP)^[13]、环介导等温扩增技术(LAMP)联合纳米孔测序技术^[14]及突变扩增系统(ARMS)结合实时荧光定量 PCR 等^[15]。然而这些方法由于需要昂贵的仪器、严格标准的实验环境、昂贵的费用,以及实验方法操作繁琐,耗时长等原因,限制了它们用于高疟区大量临床标本的快速诊断。

HRM 分析技术是一种快速而有效的基因突变检测技术,升温过程中双链 DNA 开始变性解离,嵌合在其中的饱和荧光染料逐渐释放,荧光强度随着变弱。系统通过荧光强度变化与时间的关系绘制出熔解曲线。不同位点基因型会产生不同的熔解曲线峰形,因

此 HRM 能够有效区分。目前,临床已经开发了几种复杂的 PCR-HRM 方法用于从临床标本中检测疟原虫,但鲜见用于检测恶性疟原虫青蒿素耐药性相关基因突变。

本研究基于 HRM 非标记探针基因分型技术,建立了针对世界卫生组织推荐的已经验证的青蒿素耐药相关的突变 C580Y 的检测方法。相对于其他分子诊断方法,此方法检测灵敏度高,操作简便快速,成本低,反应通量大,结果准确,可以满足临床标本的检测,并且实现了真正的闭管操作,减少实验室污染的机会,是理想的检测方法,可用于疫情地区大批量人群筛查。同时,该实验方法可作为突变的半定量检查,用于耐药性疟原虫水平的粗略估算,可更好地指导临床用药。研究中笔者发现,应用梯度 PCR 对实验体系和反应条件进行优化,本实验上、下游引物之间 5 : 1 的比例是最适合的;探针可被设计成与野生型或突变型互补,探针的设计应该将突变位点尽量置于中间,在应用非标记探针时,退火温度确定在 60 °C 左右最合适,否则会产生非特异熔解峰而影响判读结果。本研究将对实验继续优化和改良,提高实验灵敏度和特异性,将该方法应用到其他耐药相关基因检测中。

参考文献

[1] 叶升玉,成依依,李曼,等.我国恶性疟原虫主要药物抗性研究[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2020,38(5):631-636.

[2] WASSMER S C, TAYLOR T E, RATHOD P K, et al. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multi-disciplinary and cross-geographical approach[J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 93(3 Suppl): 42-56.

[3] World Health Organization. World Malaria Report 2019[EB/OL]. (2019-12-04)[2020-10-13]. https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report/en/.

[4] WANG J, XU C, YIN K W, et al. Artemisinin, the magic drug discovered from traditional chinese medicine[J]. Engineering, 2019, 5(1): 32-39.

[5] ARYA A, KOJOM FOKO L P, CHAUDHRY S, et al. Artemisinin-based combination therapy (ACT) and drug resistance molecular markers: a systematic review of clinical studies from two malaria endemic regions-India and sub-Saharan Africa[J]. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2021, 15: 43-56.

[6] CHHIBBER-GOEL J, SHARMA A. Profiles of Kelch mutations in Plasmodium falciparum across South Asia and their implications for tracking drug resistance[J]. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2019, 11: 49-58.

[7] STELLA M, SHEILA A, CURTIS S, et al. Independent emergence of the plasmodium falciparum kelch propeller domain mutant allele C580Y in Guyana[J]. J Infect Dis, 2016, 213(9): 1472-1475.

(下转第 1914 页)

- [3] 许宁,杨镜玉,殷亮,等. LncRNA ZFAS1 靶向微小 RNA-150-5p 对胃癌细胞侵袭和迁移的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(2): 109-114.
- [4] 车亚,陈根祥,陈绪阳,等. 胃癌患者 microRNA-126 水平与其放化综合疗效的关系及对其胃癌细胞放射增敏作用的影响[J]. 海南医学, 2019, 30(1): 25-28.
- [5] 王玉君,刘颖,林秀艳. MicroRNA-188 在胃癌中的表达及对胃癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 海南医学院学报, 2019, 25(11): 818-825.
- [6] MA Q, WANG Y, ZHANG H, et al. miR-1290 Contributes to colorectal cancer cell proliferation by targeting INPP4B[J]. Oncol Res, 2018, 26(8): 1167-1174.
- [7] 杨俭,薛辉,穆素恩,等. 微小 RNA-26a 在胃癌患者血清中的表达及其对该病的诊断价值[J]. 中国医药, 2020, 15(10): 1572-1575.
- [8] 卞晨璐,徐磊霞,周锋. 血浆微 RNA-27b-3p, PGR, CA15-3 及 CEA 联合检测在胃癌早期筛查及评估中的应用[J]. 临床输血与检验, 2020, 22(1): 46-50.
- [9] 许丽芳,任鸿昌,黄志君,等. 微小 RNA-146a 和血管内皮生长因子在幽门螺杆菌相关性胃癌组织中的表达情况及临床意义[J]. 癌症进展, 2020, 18(7): 739-743.
- [10] 范波,施莉. MicroRNA-27a 靶向 PHLPP2 促进胃癌细胞增殖和转移的机制探讨[J]. 中国现代医生, 2019, 57(11): 1-4.
- [11] XIE R, WU S N, GAO C C, et al. Prognostic value of combined and individual expression of microRNA-1290 and its target gene nuclear factor I/X in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biomark, 2017, 20(3): 325-331.
- [12] WU L, LIU T, XIAO Y, et al. Polygonatum odoratum lectin induces apoptosis and autophagy by regulation of microRNA-1290 and microRNA-15a-3p in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 85(8): 217-226.
- [13] 全细云,李明,陈栋良,等. 胃癌组织中 microRNA-214 和 MGAT5 表达及预后的相关性分析[J]. 陕西医学杂志, 2019, 48(1): 117-120.
- [14] 程勇,韩广森,顾焱晖,等. 微小 RNA-183 对胃癌细胞增殖和迁移的影响及其分子机制[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(3): 405-407.
- [15] CHEN X, HUANG Y, SHI D, et al. LncRNA ZNF667-AS1 promotes ABLIM1 expression by adsorbing micro RNA-1290 to suppress nasopharyngeal carcinoma cell progression[J]. Onco Targets Ther, 2020, 13(3): 4397-4409.
- [16] 王耀东,张琰,朱理辉. MicroRNA 在胃癌早期诊断中的研究进展[J]. 西南军医, 2020, 22(4): 328-331.
- [17] 许春蕾,李凡周,唐勇. microRNA-21 表达水平与胃癌患者新辅助化疗敏感性的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(8): 1319-1322.
- [18] 梁先春. 胃癌相关性 microRNA 的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2020, 33(3): 371-373.

(收稿日期: 2020-09-18 修回日期: 2021-02-11)

(上接第 1910 页)

- [8] NDIAYE Y, DIÉDHIOU C, BEI A, et al. High resolution melting: a useful field-deployable method to measure dhfr and dhps drug resistance in both highly and lowly endemic Plasmodium populations[J]. Malar J, 2017, 16(1): 153-161.
- [9] MURILLO E, MUSKUS C, AGUDELO L, et al. A new high-resolution melting analysis for the detection and identification of Plasmodium in human and Anopheles vectors of malaria[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1674.
- [10] GACHELIN G, GARNER P, FERRONI E, et al. Evidence and strategies for malaria prevention and control: a historical analysis[J]. Malar J, 2018, 17(1): 96-102.
- [11] ELIZABETH A, AUNG P, CHARLES J. Malaria[J]. Lancet, 2018, 391(10130): 1608-1621.
- [12] KHAN A Q, PERNAUTE-LAU L, KHATTAK A A, et al. Surveillance of genetic markers associated with Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapy in Pakistan, 2018 — 2019 [J]. Malar J, 2020, 19(1): 206-212.
- [13] PUTAPORN T P, KUAMSAB N, KOSUWIN R, et al. Natural selection of K13 mutants of Plasmodium falciparum in response to artemisinin combination therapies in Thailand[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(3): 1-8.
- [14] IMAI K, TARUMOTO N, RUNTUWENE L R, et al. An innovative diagnostic technology for the codon mutation C580Y in kelch13 of Plasmodium falciparum with MINION nanopore sequencer[J]. Malar J, 2018, 17(1): 217-231.
- [15] MATSUDA K. PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. [J]. Adv Clin Chem, 2017, 80: 45-72.

(收稿日期: 2020-10-22 修回日期: 2021-03-09)