

DOI:10.13350/j.cjpb.230806

• 论著 •

基于 AS-PCR 技术 *pf dhps* 耐药位点快速检测平台的建立及评价

朱辉银^{1,2}, 李昱婷¹, 李芸¹, 宋晓楠¹, 程唯佳¹, 李健^{1*}

(1. 湖北医药学院基础医学院, 湖北十堰 442000; 2. 湖北医药学院附属十堰市太和医院)

【摘要】 目的 磺胺多辛-乙胺嘧啶(SP)是 WHO 推荐的非洲地区间歇性预防治疗孕妇及儿童疟疾的主要药物。SP 耐药性(SPR)的出现及传播给疟疾防控带来严峻挑战。恶性疟原虫二氢叶酸还原酶基因(*pf dhfr*)和二氢蝶酸合酶基因(*pf dhps*)作为 SP 耐药分子标记被广泛用于 SPR 监测。本研究旨在建立一种快速、低成本的 *pf dhps* 检测平台,为疟疾精准防控提供新的分子检测方法。**方法** 基于等位基因特异性 PCR(AS-PCR)原理,针对每个单核苷酸多态性(SNPs)位点设计野生型及突变型引物,对引物的倒数第三个碱基增加人工错配及硫代修饰。以人工构建的 *pf dhps* 重组质粒为模板,筛选最佳 PCR 体系及反应条件,建立 *pf dhps* 快速检测平台,以琼脂糖凝胶显影的方式呈现基因型检测结果。以梯度稀释的质粒为扩增模板,评估检测方法的灵敏度和特异性。**结果** 针对 *pf dhps* 的不同位点,表现出不同的检测灵敏度及特异性,其中突变率最高的 437 位点质粒 DNA 灵敏度达 10^3 拷贝/ μ L,无非特异性扩增;540 位点检测灵敏度为 10^4 拷贝/ μ L,但在质粒浓度大于 10^8 拷贝/ μ L 时出现非特异性扩增;581 位点检测灵敏度为 10^6 拷贝/ μ L,特异性良好。**结论** 基于 AS-PCR 技术、辅以人工碱基错配及硫代修饰建立的快速基因分型检测方法具有较高的检测灵敏度及特异性,该方法不仅限于抗疟药物耐药基因检测,还可扩展至其他传染病的快速诊断以及遗传性疾病、肿瘤的快速诊断。

【关键词】 等位基因特异性 PCR;磺胺多辛;二氢蝶酸合酶基因;单核苷酸多态性;恶性疟原虫;耐药性

【中图分类号】 R382.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0899-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):899-904.]

A rapid and SNPs detection platform for *Plasmodium falciparum* sulfadoxine resistance based on allele-specific PCR

ZHU Huiyin^{1, 2}, LI Yuting¹, LI Yun¹, SONG Xiaonan¹, CHENG Weijia¹, LI Jian¹ (1. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China; 2. Department of Pediatrics, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine) *

【Abstract】 Objective Sulfadoxine-pyrimethamine (SP) is the main drug recommended by the WHO for intermittent preventive treatment of malaria in pregnant women and children in Africa. The emergence and spread of SP resistance (SPR) poses a serious challenge to malaria control. *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (*pf dhfr*) and dihydropteroate synthase (*pf dhps*) genes are widely used as molecular markers for SPR surveillance. This study aim to establish a rapid and low-cost detection platform for *pf dhps*, providing a new molecular detection method for the precise prevention and control of malaria. **Methods** Based on the principle of allele-specific PCR (AS-PCR), wild-type and mutant primers were designed for single nucleotide polymorphisms (SNPs) loci, with artificial mismatches and phosphorothioate modification added to the penultimate base of the primers to improve primer specificity. The *pf dhps* recombinant plasmids were used as templates, and the optimal PCR system and reaction conditions were selected to establish a rapid detection platform for *pf dhps*, and the genotype detection results were presented on agarose gel. The sensitivity and specificity of the assay were evaluated by using gradient diluted plasmids as amplification templates. **Results** For different loci of the *pf dhps* gene, the sensitivity and specificity were different. Among these loci, locus 437, with the highest mutation rate, had a detection sensitivity of 10^3 copies/ μ L and no nonspecific amplification; locus 540 had a detection sensitivity of 10^4 copies/ μ L, but nonspecific amplification occurred when the plasmid concentration was $>10^8$ copies/ μ L; and locus 581 had a detection sensitivity of 10^6 copies/ μ L with high specificity. **Conclusion** The rapid genotyping technique based on AS-PCR, supplemented with artificial base mismatches and phosphorothioate modification, has high detection sensitivity and specificity, and is not only limited to the detection of antimalarial drug resistance genes, but can also be extended to the

* **【通讯作者】** 李 健, E-mail: yxljian@163.com

【作者简介】 朱辉银(1983-),男,湖北十堰人,在读硕士研究生。研究方向:疟原虫分子诊断。E-mail: 34177623@qq.com

rapid diagnosis of other infectious diseases, hereditary diseases and tumors.

【Key words】 Allele-specific PCR; sulfadoxine; *pf dhps*; single nucleotide polymorphism (SNP); *Plasmodium falciparum*; drug resistance

疟疾是一种严重危害人类健康和经济发展的蚊媒传染病,全球 84 个有疟疾流行的国家和地区,2021 年估计有 2.47 亿例疟疾病例,导致 61.9 万人死亡,其中非洲国家的疟疾病例占约 95%,主要罹患人群为孕妇及 5 岁以下儿童^[1]。尽管在过去的 30 年疟疾防控取得了巨大进展,但抗疟药物耐药性的出现和广泛传播正成为消灭疟疾的主要障碍^[2]。

在疟疾流行地区,磺胺多辛-乙胺嘧啶 (Sulphadoxine-pyrimethamine, SP) 被 WHO 推荐用于孕妇 (Intermittent Preventive Treatment in pregnancy, IPTp) 和婴儿 (Intermittent Preventive Treatment in infants, IPTi) 疟疾的间歇性预防治疗。在非洲的撒哈拉以南, IPTp 在减少孕产妇贫血、围产期死亡率和低出生体重方面发挥了积极作用^[3]。使用 SP 加阿莫地喹 (AQ) 对儿童进行季节性疟疾化学预防 (Seasonal-Malaria Chemoprevention, SMC), 可将临床发作和严重疟疾的发生率降低约 75%^[4]。然而在许多国家都出现了 SP 疗效下降的情况,不同地区的 SP 耐药性水平也不尽相同,因此监测疟疾 SP 耐药性 (SPR) 变得越来越紧迫^[5]。

SPR 与叶酸代谢途径中二氢叶酸还原酶 (dhfr) 和二氢蝶酸合成酶 (dhps) 的氨基酸替换密切相关^[6]。这些突变降低了 SP 与目标酶的结合亲和力^[7]。体外和体内研究均表明, SPR 主要与恶性疟原虫磺胺多辛耐药基因 *pf dhps* 编码蛋白的 S436A、A437G、K540E、A581G、A613S 和 *pf dhfr* 编码蛋白的 N51I、C59R、S108N、I164L 的氨基酸突变有关。这些突变,特别是 A437G 和 S108N 突变,被认为介导了 SPR 增加的渐进趋势^[8-9]。因此,对这些单核苷酸多态性 (SNPs) 位点的检测将有利于疟疾的预防控制。

目前,检测抗疟药物耐药性分子标记的主要方法是巢式 PCR 联合测序。虽然该方法是 SNP 检测和基因分型的金标准,但需要昂贵的仪器,检测时间长,操作复杂^[10]。一些基于 PCR 的方法已经被开发出来,如实时定量 PCR (qPCR),该方法通过检测反应过程中的荧光信号来监测 PCR 过程,观察扩增产物,无需电泳,污染风险低,但同样是操作流程复杂,且需依赖昂贵的设备^[11]。当前新型冠状病毒肺炎大流行,在经济欠发达的疟疾流行区迫切需要开发一种即时、有效且负担得起的疟原虫抗性分子标记筛查工具。等位基因特异性 PCR (Allele-Specific PCR, AS-PCR) 是针对 SNPs 位点设计不同的特异性引物,用来区分不同基

因型的检测方法,该技术已应用于氯喹耐药基因 *pf crt* 的检测^[12]。

本研究基于 AS-PCR 技术,建立 *pf dhps* 的 SNPs 检测平台,通过设计人工错配及双硫代修饰引物,以提高平台的检测特异性和灵敏度,并减少对仪器设备的需求,成本低,易于操作,为资源有限地区提供一种新的快速检测方法。

材料与方 法

1 材 料

快速质粒小提试剂盒购自天根生物科技(北京)有限公司,货号:DP105-02;KOD-Plus-Neo 高保真聚合酶)购自日本东洋纺公司,货号:KOD-401;琼脂糖和限制性内切酶 BamHI、XhoI 购于美国赛默飞世尔科学公司。PCR 仪 (BIO-RAD, T100) 及凝胶成像分析系统均购自美国伯乐公司。

2 方 法

2.1 质粒的构建与鉴定 恶性疟原虫 3D7 菌株的 *pf dhps* (PF3D7_0810800) 序列下载自 PlasmoDB (<http://plasmodb.org/plasmo/>)。将野生型及突变型的 *pf dhps* 片段分别克隆到载体 pUC57 中,构建重组质粒 (pDNA),命名为 *pf dhps*-A437-K540-A581 (野生型) 和 *pf dhps*-437G-540E-581G (突变型)。使用 TIAN prep Mini Plasmid Kit 从转化的大肠埃希菌 Trans1-T1 抗噬菌体化学竞争细胞中提取重组质粒,然后进行酶切和测序验证,通过 Gene5 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) 对其浓度和质量进行评估。

2.2 特异性引物的设计与筛选 参照文献^[12-13],针对 A437G、K540E、A581G 每个 SNPs 位点,在 3' 端倒数第三位碱基设计 3 个具有不同人工错配碱基的引物。再对每条特异性引物 3' 端进行双硫代修饰 (图 1)。另外,针对 3 个突变位点设计 2 条通用引物,其中 540、581 位点共用一条通用引物 (表 1)。引物由 Genewiz 生物技术(中国苏州)有限公司合成。将野生型和突变型质粒 DNA (pDNA) 稀释为 10 $\mu\text{mol/L}$,将其作为模板与每对引物进行交叉扩增。PCR 反应体系总体积 25 μL ,包括 0.5 U KOD-Plus-Neo、2.5 μL 10 $\times$ Buffer、1.5 μL MgSO₄ (25 $\mu\text{mol/L}$)、2.5 μL dNTPs (2 $\mu\text{mol/L}$)、等位基因特异性引物及反向引物各 1 μL , 1 μL pDNA (10 $\mu\text{mol/L}$), 15 μL ddH₂O。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52~65 $^{\circ}\text{C}$ (设置多个

退火梯度)30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。反应结束后取 3 μL 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳(电压 100 V,电泳 35 min),在凝胶成像系统中观察结果及拍照。选出条带单一明亮且无非特异性扩增的引物为最佳引物。

表 1 AS-PCR 引物
Table 1 AS-PCR primers

引物名称 Primer	序列信息和修饰位置(5'-3') Sequences and modification position	备注 Reference
<i>pfdhps</i> -437-W1	GATATAGGTGGAGAATCCTCA * G * G	
<i>pfdhps</i> -437-W2	GATATAGGTGGAGAATCCTCC * G * G	
<i>pfdhps</i> -437-W3	GATATAGGTGGAGAATCCTCG * G * G	等位基因
<i>pfdhps</i> -437-M1	GATATAGGTGGAGAATCCTCA * G * C	特异性引物
<i>pfdhps</i> -437-M2	GATATAGGTGGAGAATCCTCC * G * C	
<i>pfdhps</i> -437-M3	GATATAGGTGGAGAATCCTCG * G * C	
<i>pfdhps</i> -437-R	TGCATTAGAACTACACTATAG	通用反向引物
<i>pfdhps</i> -540-W1	GAGGAAATCCACATACAATGGG * T * A	
<i>pfdhps</i> -540-W2	GAGGAAATCCACATACAATGGC * T * A	
<i>pfdhps</i> -540-W3	GAGGAAATCCACATACAATGGT * T * A	等位基因
<i>pfdhps</i> -540-M1	GAGGAAATCCACATACAATGGT * T * G	特异性引物
<i>pfdhps</i> -540-M2	GAGGAAATCCACATACAATGGC * T * G	
<i>pfdhps</i> -540-M3	GAGGAAATCCACATACAATGGG * T * G	
<i>pfdhps</i> -540/581-R	CATTTTGTGTTCATCATG	通用反向引物
<i>pfdhps</i> -581-W1	ATTGTATATGGATTAGGATTA * G * C	
<i>pfdhps</i> -581-W2	ATTGTATATGGATTAGGATTC * G * C	
<i>pfdhps</i> -581-W3	ATTGTATATGGATTAGGATTG * G * C	等位基因
<i>pfdhps</i> -581-M1	ATTGTATATGGATTAGGATTA * G * G	特异性引物
<i>pfdhps</i> -581-M2	ATTGTATATGGATTAGGATTC * G * G	
<i>pfdhps</i> -581-M3	ATTGTATATGGATTAGGATTG * G * G	

注:加粗碱基为人工错配碱基;*代表硫代修饰的位置;540、581 位点共用同一反向引物。

Notes:The bolded bases are artificially mismatched bases;* represents the location of phosphorothioate modification;Loci 540 and 581 share the same reverse primer.

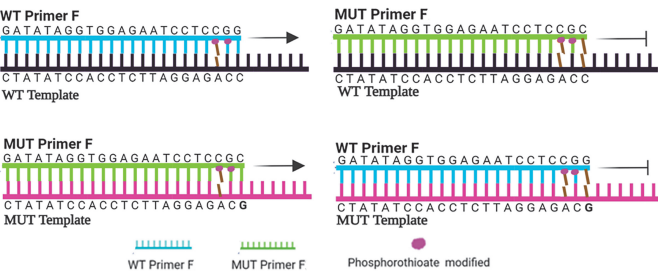


图 1 AS-PCR 原理图

Fig. 1 Principle of AS-PCR

2.3 AS-PCR 的优化反应 体系中的引物浓度、Mg-SO₄ 浓度、退火温度及循环次数,对扩增效率有显著影响。为了提高扩增效率和特异性,针对选出的最佳引物设置不同浓度梯度,并对 MgSO₄ 的浓度、退火温度和循环数进行优化。选择的标准是条带在凝胶成像中明显且无特异性扩增。在进行引物退火温度梯度筛选时,因各引物碱基 GC 含量不同,每条引物设置不同的

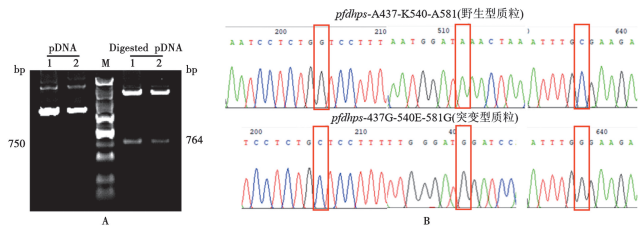
退火温度范围。在上述过程中,扩增模板为野生型和突变型质粒。

2.4 AS-PCR 敏感度和特异性检测 将倍比稀释至 10¹~10⁹ 拷贝/μL 的野生型、突变型质粒作为模板,采用筛选出的最佳反应体系及条件对每条特异性引物进行交叉扩增。灵敏度定义为肉眼可见的最浅条带对应的质粒浓度。通过观察是否有非特异性扩增条带来评价特异性。

结果

1 重组质粒的构建与鉴定

将两个目标序列克隆到 pUC57 载体中,获得重组质粒 *pfdhp*-A437-K540-A581 (野生型)和 *pfdhps*-437G-540E-581G (突变型)。重组质粒用 BamHI 和 XhoI 双酶切,获得的目标片段长度为 764 bp (图 2A),与预期一致。对重组质粒测序,结果与 PlasmidDB 上的 *pfdhps* 序列完全一致(图 2B),重组质粒构建正确。



A *pfdhps* 重组质粒双酶切分析 M DNA 标志物(DL5000) 1 *pfdhps* 重组质粒野生型 2 *pfdhps* 重组质粒突变型(目标片段 764bp) B 野生型及突变型质粒测序峰图。

图 2 重组质粒酶切鉴定及质粒测序分析

A *pfdhps* recombinant plasmid digestion with the restriction endonucleases BamHI and XhoI M DNA marker(DL5000) 1 Wild type 2 Mutant type(Target fragment 764bp) B Wild type and mutant plasmid sequencing

Fig. 2 Recombinant plasmid identification

2 AS-PCR 引物筛选

根据人工错配碱基不同,针对 437、540、581 位点分别设计 3 条野生型特异性引物(W1、W2、W3)和 3 条突变型特异性引物(M1、M2、M3)(表 1)。对于 437 位点,选择琼脂糖凝胶电泳条带单一、明亮的 W2 和 M2 为最佳引物(图 3A);选择的 540 位点最佳特异性引物为 W1、M1;581 位点最佳特异性引物为 W1、M2 (图 3B、图 3C)。

3 AS-PCR 体系优化

3.1 最佳退火温度 针对每条特异性引物,依据 GC 含量和试验实际情况设置不同的退火温度梯度(52~65 ℃,图 3)。对于 A437G 位点,野生型特异性引物退火温度梯度为:52.0、52.4、53.1、54.3、55.7、56.8、57.5、58.0 ℃。退火温度升至 57.5 ℃时,观察到单个预期大小的扩增条带,继续提高退火温度时条带开始

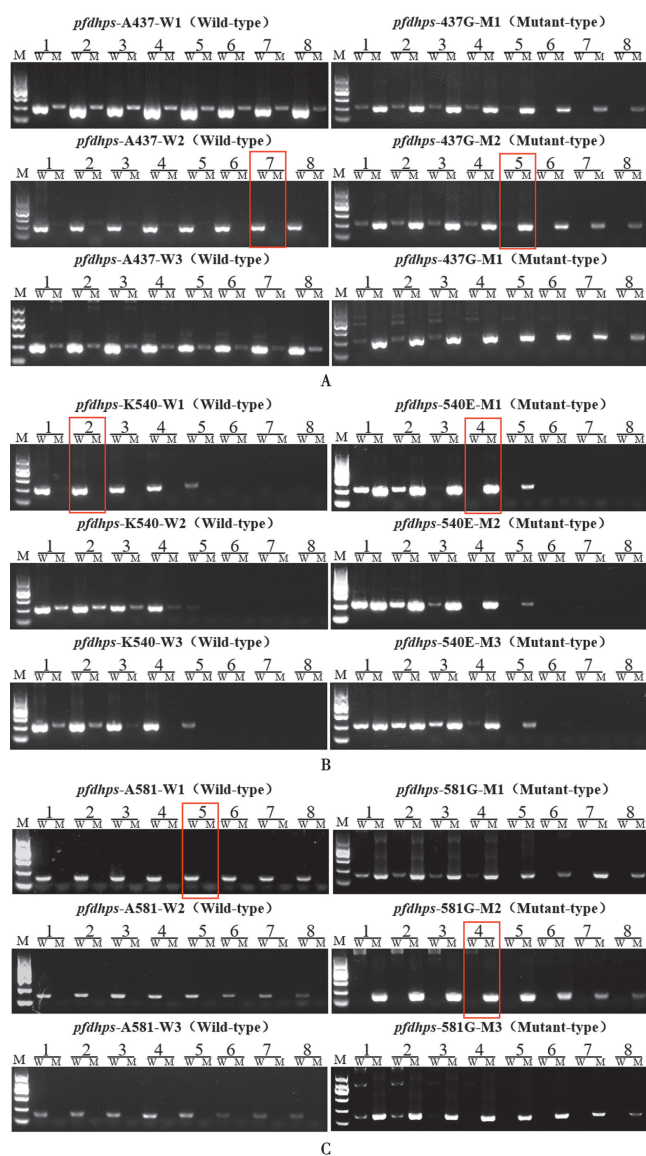


图 3 引物筛选及退火温度优化
A 437 位点 1)野生型引物 W1、W2、W3 1-8 退火温度分别为 52.0、52.4、53.1、54.3、55.7、56.8、57.5、58.0℃；2)突变型引物 M1、M2、M3 1-8 退火温度分别为 58.0、58.3、58.8、59.5、60.5、61.2、61.7℃、62.0℃ B 540 位点 1)野生型引物 W1、W2、W3 1-8 退火温度分别为 60.0、60.4、61.0、61.9、63.1、64.0、64.6、65.0℃；2)突变型引物 M1、M2、M3 1-8 退火温度梯度同野生型；C 581 位点野生型引物及突变型引物退火温度梯度同 437 位点野生型

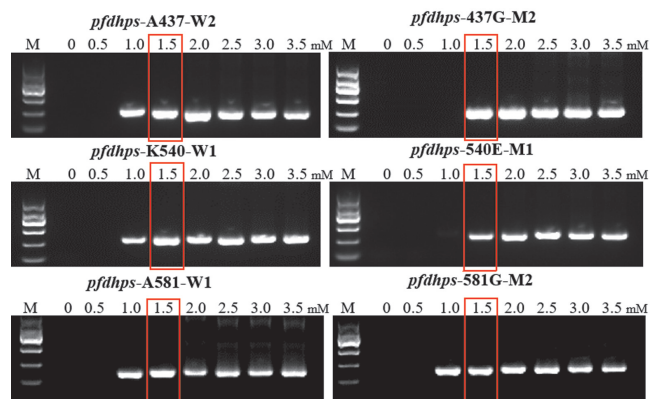
图 3 引物筛选及退火温度优化
A 437 loci wild-type primers W1、W2 and W3 1-8 Represent 52.0℃, 52.4℃, 53.1℃, 54.3℃, 55.7℃, 56.8℃, 57.5℃ and 58.0℃, Mutational primers M1, M2, M3 1-8 Represent 58.0℃, 58.3℃, 58.8℃, 59.5℃, 60.5℃, 61.2℃, 61.7℃, 62.0℃ B 540 loci Wild type and mutant type 1-8 Rrepresented 60.0℃, 60.4℃, 61.0℃, 61.9℃, 63.1℃, 64.0℃, 64.6℃ and 65.0℃; C The annealing gradient of wild-type and mutant primers at locus 581 is the same as that of wild-type primers at locus 437

Fig. 3 Primer screening and annealing temperature optimization

减弱。因此,最佳退火温度为 57.5℃。突变型特异性引物退火温度梯度设置为:58.0、58.3、58.8、59.5、60.5、61.2、61.7、62.0℃。退火温度升至 60.5℃时,出现单个预期目标条带,退火温度继续升高时条带逐渐减弱,因此选择 60.5℃为最佳退火温度。依据同样方

法选出 K540E 位点野生及突变型引物的最佳退火温度分别为 60.4℃和 61.9℃,A581G 野生、突变型引物最佳退火温度分别为 55.7℃和 54.3℃。

3.2 最佳 $MgSO_4$ 浓度 PCR 反应体系中的 Mg^{2+} 浓度与 DNA 聚合酶的活性密切相关,当 $MgSO_4$ 的浓度过低时,扩增无法顺利进行;当 $MgSO_4$ 的浓度过高时,非特异性扩增增加。本实验对体系中的 $MgSO_4$ 浓度进行优化,设计的终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mmol/L(图 4)。根据琼脂糖凝胶电泳是否出现非特异性扩增条带以及比较目的条带的强弱,确定 $MgSO_4$ 最佳浓度为 1.5 mmol/L。



注:该图为不同 $MgSO_4$ 浓度梯度下的扩增反应结果,M 为 DNA 标志物,红色方框内为筛选出的 Mg^{2+} 最佳浓度。

图 4 Mg^{2+} 浓度优化

Notes: The amplification reaction was performed under different concentration gradients of $MgSO_4$. The optimal concentration was screened in the red box.

Fig. 4 Optimization of Mg^{2+} concentration

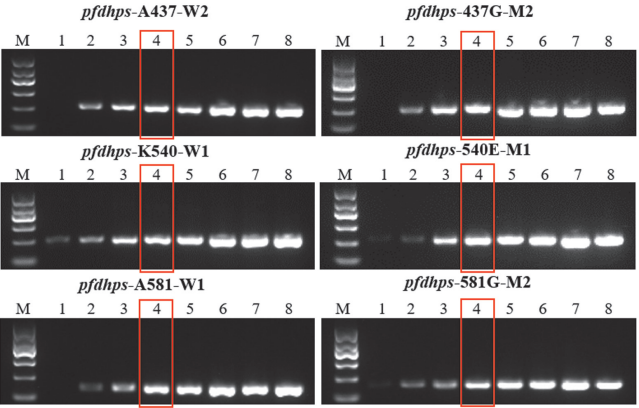
3.3 最佳引物浓度 针对每个位点选出的最佳引物进行引物浓度优化,设置的引物浓度梯度为:0.04、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 和 0.7 mmol/L,优化的引物对野生型和突变型菌株应均无非特异性扩增。结果显示,随着引物浓度的增加,靶带逐渐增强,在引物浓度增加到 0.3 mmol/L 时,条带明亮单一,因此确定最佳引物浓度为 0.3 mmol/L(图 5)。

3.4 最佳循环数 在上述优化条件基础上对循环次数进行优化,结果如图 6。在 15、20、25、30 和 35 个循环后,选择条带明亮单一的 30 个循环作为 AS-PCR 的最佳循环数。

4 AS-PCR 的灵敏度及特异性

采用优化的 PCR 体系及反应条件,以构建的 *pfdhps* 野生型和突变型重组质粒按不同梯度稀释后作为模板进行 AS-PCR,评价方法的敏感性和特异性。图 7 显示,随着质粒浓度降低,与之相应的条带也随之降低,*pfdhps*-A437 浓度在 10^3 拷贝/ μ L,*pfdhps*-K540 浓度在 10^4 拷贝/ μ L,*pfdhps*-437G、*pfdhps*-A581、*pfdhps*-581G 浓度在 10^6 拷贝/ μ L,以及

pfdhps-540E 浓度在 10^8 拷贝/ μL 时均可见弱条带,即重组质粒检测灵敏度为 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μL 。分析方法的特异性,除 *pfdhps*-K540 在质粒浓度大于 10^8 拷贝/ μL 时出现非特异性条带外,其余位点野生型与突变型之间均无交叉扩增反应。

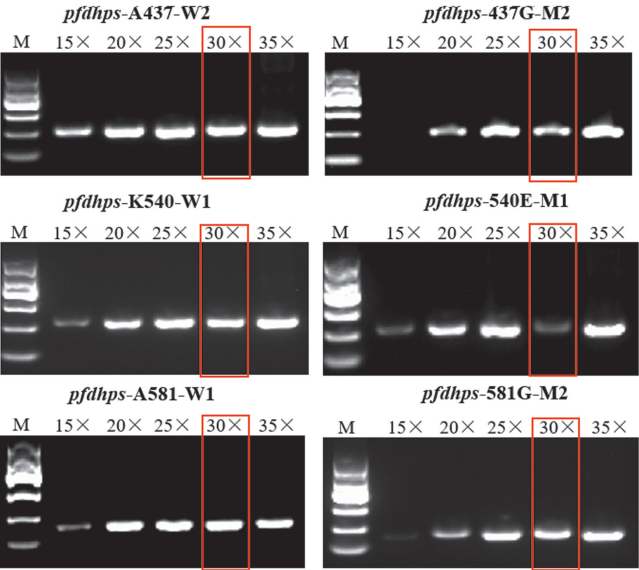


注:该图为不同引物浓度梯度下的扩增反应结果,M为DNA标志物,1-8的引物浓度依次为0.04、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mmol/L;红色方框内为筛选出的最佳引物浓度。

图5 引物浓度的优化

Notes: Amplification reaction under different concentration gradients of primers, where 1-8 respectively represents the amount of primers added into the system: 0.04, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mmol/L, and the red box is the optimal concentration of selected primers

Fig. 5 Optimization of primer concentration



注:该图为不同循环数下的扩增反应结果,红色方框内为选出的最佳循环数。

图6 PCR循环数优化

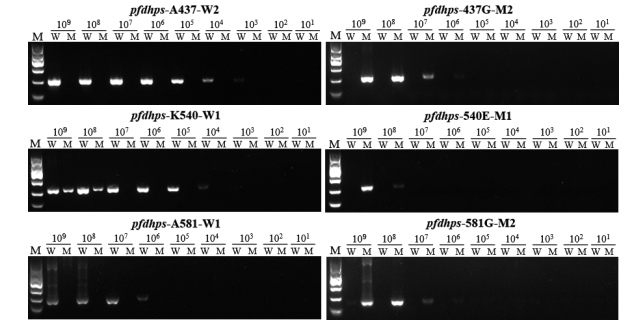
Notes: The optimal number of cycles is shown in the red box.

Fig. 6 Optimization of the number of PCR cycles

讨论

随着恶性疟原虫对抗疟药物抗性的出现与快速蔓延,全球消除疟疾目标的实现面临前所未有的挑战^[10,14]。早期获得恶性疟原虫的耐药信息对及时有

效地治疗恶性疟患者至关重要。另外,及时了解疟疾流行区抗疟药物耐药特征,可以帮助卫生行政部门制定更精准的防控策略^[15]。目前,针对抗疟药物耐药性的检测主要包括体内试验法、体外试验法和分子生物学方法^[16]。其中,分子生物学检测法具有快速、灵敏和准确等优点,是当前恶性疟耐药性检测的最常用方法^[17]。然而,传统分子生物学检测方法的使用因检测时间长和依赖大型实验设备等而受到限制。例如作为单核苷酸多态性检测金标准的DNA测序,仪器设备成本较高,耗时较长,难以在一般实验室及基层医院普及^[18]。因此,建立一种经济、快速、准确的检测方法是疟疾防控的当务之急。



注:本图为437、540、581位点灵敏度及特异性检测,分别用筛选出的野生型引物及突变型引物与倍比稀释的野生型及突变型重组质粒为模板(单位:拷贝/ μL)进行交叉扩增反应。

图7 灵敏度与特异性检测

Notes: The sensitivity and specificity of 437, 540 and 581 sites were detected by cross-amplification reaction with wild-type primer and mutant primer, respectively, and wild-type and mutant recombinant plasmid as template (copies/ μL) at fold dilution.

Fig. 7 Sensitivity and specificity

AS-PCR是一种常用的分子生物学检测方法,具有操作简单、经济的特点,但其弱点是假阳性率高^[19-20],单靠错配碱基无法完全解决非特异性扩增的问题^[13]。而硫代修饰结合高保真酶可提升碱基错配的识别能力^[21]。Cheng等^[12]和Jiang等^[13]等报道针对乙胺嘧啶(*pfdhfr*)及氯喹(*pfcr*)耐药基因检测取得了较高的灵敏度及特异性,最低检测限分别达200 fg/ μL 和1.5 pg/ μL 。本研究针对引物3'端倒数第三位碱基设计了人工错配及双硫代修饰,根据不同错配碱基设计多条候选引物,筛选出灵敏度和特异性最高的引物。同时对AS-PCR的引物浓度、镁离子浓度、退火温度、循环数进行优化,结合高保真DNA聚合酶,检测灵敏度及特异性获得了显著提高。针对*pfdhps*基因重组质粒,多个位点检测灵敏度为 $10^4 \sim 10^6$ 拷贝/ μL ,*pfdhps*-A437G最低检测浓度为 10^3 拷贝/ μL 。关于方法的特异性,除*pfdhps*-K540E位点检测时质粒浓度大于 10^8 拷贝/ μL 出现非特异性扩增条带外,其余位点均未发生非特异性反应。表明建立

的 AS-PCR 检测平台用于等位基因分型准确且灵敏度高。

本研究建立的 AS-PCR 方法最低检测限达 10^3 拷贝/ μL ,但也有个别位点检测灵敏度仅 10^8 拷贝/ μL ,提示针对特定位点的检测还有进一步优化改进空间。本实验是以人工构建的重组质粒为检测对象,未对临床样本进行验证。另外,AS-PCR 只能检测已知基因型,不具备未知基因型检测能力。尽管存在一些局限性,建立的 AS-PCR 仍然为恶性疟原虫的临床基因分型提供了一种简便、快速的分子诊断方法,为缺乏昂贵仪器设备和专业技术人员的基层医院及非洲等资源匮乏等地区带来极大便利。

疟原虫耐药性的出现与传播对疟疾防控构成了重大威胁,而各种分子生物学检测手段的不断发展与进步为早期发现抗疟药物抗性提供了越来越丰富实用的检测手段,为临床应用推广带来极大便利,为全球消除疟疾计划的实施提供了有力的技术支持。本研究建立了敏感特异的 AS-PCR 方法,可用于疟原虫耐药基因检测,也可为其他病原体耐药基因及肿瘤基因快速检测方法的建立提供借鉴。

【参考文献】

- [1] WHO. World malaria report[R]. Geneva: World Health Organization, 2022.
- [2] Artimovich E, Schneider K, Taylor TE, et al. Persistence of sulfadoxine-pyrimethamine resistance despite reduction of drug pressure in Malawi [J]. J Infect Dis, 2015, 212(5): 694-701.
- [3] Diamond-Smith N, Singh N, Gupta RKD, Dash A, Thimasarn K, Campbell OMR, Chandramohan D: Estimating the burden of malaria in pregnancy; a case study from rural Madhya Pradesh, India. Malar J 2009, 8: 24.
- [4] WHO. World malaria report[R]. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [5] Naidoo I, Roper C. Mapping 'partially resistant', 'fully resistant', and 'super resistant' malaria [J]. Trends Parasitol, 2013, 29(10): 505-515.
- [6] Aubouy A, Jafari S, Huart V, et al. DHFR and DHPS genotypes of *Plasmodium falciparum* isolates from Gabon correlate with in vitro activity of pyrimethamine and cycloquanyl, but not with sulfadoxine-pyrimethamine treatment efficacy [J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(1): 43-49.
- [7] Kumpornsin K, Modchang C, Heinberg A, et al. Origin of robustness in generating drug-resistant malaria parasites [J]. Mol Biol Evol, 2014, 31(7): 1649-1660.
- [8] Jiang T, Chen J, Fu H, et al. High prevalence of Pfdhfr-Pfdhps quadruple mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea [J]. Malar J, 2019, 18(1): 101.
- [9] Triglia T, Menting J G, Wilson C, et al. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(25): 13944-13949.
- [10] Yao Y, Wu K, Xu M, et al. Surveillance of genetic variations associated with antimalarial resistance of *Plasmodium falciparum* isolates from returned migrant workers in Wuhan, central China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(9).
- [11] Bashir IM, Otsyula N, Awinda G, et al. Comparison of PfHRP-2/pLDH ELISA, qPCR and microscopy for the detection of *Plasmodium* events and prediction of sick visits during a malaria vaccine study [J]. PloS one, 2013, 8(3): e56828.
- [12] Cheng W, Song X, Zhu H, et al. A rapid and specific genotyping platform for *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance via allele-specific PCR with a Lateral flow assay [J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(2): e0271921.
- [13] Jiang T, Huang Y, Cheng W, et al. Multiple single-nucleotide polymorphism detection for antimalarial pyrimethamine resistance via allele-specific PCR coupled with gold nanoparticle-based lateral flow biosensor [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(3).
- [14] Cheng W, Song X, Tan H, et al. Molecular surveillance of antimalarial resistance pfcrt, pfmdr1, and pfk13 polymorphisms in African *Plasmodium falciparum* imported parasites to Wuhan, China [J]. Malar J, 2021, 20(1): 209.
- [15] Slater L, Betson M, Ashraf S, et al. Current methods for the detection of antimalarial drug resistance in *Plasmodium* parasites infecting humans [J]. Acta Trop, 2021, 216: 105828.
- [16] Nsanabana C, Djalle D, Guerin PJ, et al. Tools for surveillance of anti-malarial drug resistance: an assessment of the current landscape [J]. Malar J, 2018, 17(1): 75.
- [17] 张梅花, 陆凤, 曹俊, 高琪. 恶性疟原虫药物抗性相关分子标记研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2015, 27(03): 323-327.
- [18] 吴洁, 侯佳展, 程倩, 等. 等位基因特异性 PCR 检测 CYP3A5 和 MDR-1 基因多态性方法的建立及临床应用[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(11): 844-848.
- [19] Ranford-Cartwright LC, Johnston KL, Abdel-Muhsein AM, et al. Critical comparison of molecular genotyping methods for detection of drug-resistant *Plasmodium falciparum* [J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002, 96(5): 568-572.
- [20] Yang Z, Zhao N, Chen D, et al. Improved detection of BRAF V600E using allele-specific PCR coupled with external and internal controllers [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13817.
- [21] Zhang J, Li K, Pardinas JR, et al. SNP discrimination through proofreading and OFF-switch of exo+ polymerase [J]. Mol Biotechnol, 2004, 27(1): 75-80.

【收稿日期】 2023-02-16 【修回日期】 2023-05-09