

## CLIP-PCR 直接检测血液中 疟原虫雌性配子体特异转录产物 s25 mRNA

杨珺源, 骈红茹, 杨明珠, 郑直\*

(中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物化学与分子生物学系, 北京 100005)

**摘要:**目的 建立一种疟原虫雌性配子体的分子检测法。方法 根据疟原虫雌性配子体特异性 mRNA 靶标(待测靶序列)即动合子表面蛋白(s25)的转录产物,设计特异性的捕获探针和连接探针。血液样品经裂解释放的 mRNAs, 无需核酸提取,通过“三明治”杂交被捕获到 96 孔板表面。洗去未结合探针后,将结合在 mRNA 靶标上的连接探针进行连接,得到两端为特殊设计序列的单链扩增模板。再用通用引物进行染料法 qPCR 扩增,或在端部设计 TaqMan 探针序列,用通用引物和通用 TaqMan 探针进行探针法 qPCR 扩增。评价这一基于捕获和连接扩增的方法 (CLIP-PCR)的灵敏度、特异性和重复性并与普通的 RT-qPCR 方法进行比较,将其应用于临床样品的检测。结果 该 CLIP-PCR 具有较高的灵敏度和特异性。与普通的 RT-qPCR 一样,均可检测低至 11 拷贝数的 s25 mRNA 靶标;而且该 CLIP-PCR 操作更简便。该 CLIP-PCR 可准确检测到疟疾患者血液中的雌性配子体。可将 96 个样品的检测时间缩短至 3 h。结论 建立了灵敏高效的染料法和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 检测疟原虫雌性配子体,为疟疾传播的控制、配子体大规模筛查奠定了基础。

**关键词:** 疟原虫;配子体;检测方法;捕获;连接

中图分类号:R331 文献标志码:A

## Direct detection of *Plasmodium* female gametocyte-specific transcript s25 mRNA in blood by CLIP-PCR

YANG Jun-yuan, PIAN Hong-ru, YANG Ming-zhu, ZHENG Zhi\*

(Department of Molecular Biology and Biochemistry, Institute of Basic Medical Sciences CAMS,  
School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China)

**Abstract: Objective** To establish a molecular detection method for the *Plasmodium* female gametocyte. **Methods** Probes for capture and ligation probe-PCR (CLIP-PCR) were specific designed based on *Plasmodium* female gametocyte special RNA targets, which were the transcripts of the ookinetes surface protein (s25). After the whole blood cells were lysed, the RNA targets were directly released and captured on the 96-well plate by “sandwich” hybridization without extraction. Washing away the unbound probes, the ligation probes which also hybridized to the RNA target were ligated to form a single-strand amplification template with specific-designed sequence at both ends. The SYBR Green qPCR was carried out with universal primers. Or with TaqMan probe binding sequence was designed at the end of the templates, the TaqMan qPCR was carried out with universal primers and universal fluorescent

收稿日期:2021-10-08 修回日期:2021-11-22

基金项目:国家科技重大专项(2018ZX10101001-001-005);中国医学科学院医学与健康科技创新(2018-12M-1-001);国家自然科学基金(81902167)

\*通信作者(corresponding author):zhizheng100@126.com

probes. The sensitivity, specificity and repeatability of CLIP-PCR were evaluated and compared with the RT-qPCR. And it was also used to detect a small number of clinical samples. **Results** This method was successfully applied to detect s25 mRNA with high sensitivity and specificity. Both RT-qPCR and CLIP-PCR could detect s25 mRNA targets as low as 11 copies. However, CLIP-PCR was simpler compared to RT-qPCR. And it could accurately detect gametocytes in blood of malaria patients. The detection of 96 samples could be completed within 3 h. **Conclusions** SYBR Green CLIP-PCR and TaqMan CLIP-PCR for the female gametocyte of *Plasmodium* detection provides a sensitive and efficient method for large-scale screening of gametocytes and control of malaria transmission.

**Key words:** *Plasmodium*; gametocyte; detection method; capture; ligation

恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*, *P. falciparum*, Pf)和间日疟原虫(*Plasmodium vivax*, *P. vivax*, Pv)是传染病疟疾的主要病原体<sup>[1]</sup>。有效控制或消除疟疾必须阻断疟原虫的传播<sup>[1-2]</sup>。疟原虫配子体是按蚊通过受感染的人类传播疟疾的关键<sup>[3]</sup>。

疟原虫雌性配子体特异性转录的动合子 25 ku 表面蛋白的转录子 (ookinetes surface protein s25 mRNA, s25 mRNA) 已被广泛用作检测疟原虫雌性配子体的靶标, s25 mRNA 仅在雌性配子体中转录, 在雌雄配子结合受精后发育成的动合子中激活翻译为表面蛋白 s25<sup>[4]</sup>。目前针对 Pfs25 和 Pvs25 mRNA 的检测方法有 RT-qPCR, nest-RT-PCR, RT-LAMP, QT-NASBA 等<sup>[5-9]</sup>, 但由于大部分方法需核酸提取和反转录, 耗时耗力且需要针对每个靶标(待测靶序列)设计其反转录的荧光探针, 灵活性低; 有些方法仍需电泳分析, 或因本身步骤复杂、易污染、技术难度高等原因无法应用于大规模筛查。所以目前缺乏一种操作快速简便, 灵敏特异且高通量的雌性配子体的筛查方法。

本研究基于实验室前期研究基础<sup>[11]</sup>, 建立了基于捕获和连接的 PCR (capture and ligation probe-PCR, CLIP-PCR) 染料法和通用 TaqMan 探针法检测疟原虫雌性配子体 s25 mRNA, 将血样裂解后直接特异性捕获 mRNA 靶标, 通过探针杂交将扩增模板置换为 DNA, 通过通用 TaqMan 探针或 SYBR Green 染料检测, 全程高效灵敏, 为大规模配子体检测带来便利。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品: 北京健康受试者的血液 3 份、云南那邦镇的 Pv 疟原虫感染血液样品 3 份、中国医学科学

院基础医学研究所的血液培养的 Pf 样品 1 份。该研究获得北京协和医学院伦理委员会批准(批准文号: 032-2016)及受试者的知情同意。

1.1.2 主要试剂: T4 多聚核苷酸激酶(New England Biolabs, NEB 公司); 裂解液和 96 孔捕获板和洗液(Diacurate 公司; www.diacurate.com); 血液 DNA 提取试剂盒和蛋白酶 K(北京天根生化科技有限公司); T4 DNA 连接酶(北京康为世纪生物科技有限公司); TransStart Green qPCR SuperMix 和 Ex Taq Premix (全式金生物技术有限公司); One Step PrimeScrip™ RT-PCR Kit (TaKaRa 公司); MEGAscrip® Kit (Thermo Fisher Scientific 公司); 捕获探针和连接探针(Diacurate 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 样品的采集: 血液样品使用真空采样管抽取一定量的静脉血, 而后分装于 1.5 mL 的离心管, 裂解液裂解后于 -80 °C 保存。血液培养的 Pf 样品由中国医学科学院基础医学研究所王恒教授馈赠。

1.2.2 CLIP-PCR 捕获和连接探针的设计: 以 Pf 雌性配子体 (GenBank: XM\_001347551) 和 Pv 雌性配子体 (GenBank: XM\_001608410) 的 Pfs25 和 Pvs25 mRNA 为检测靶标, 根据 CLIP-PCR 原理<sup>[11]</sup>, 设计捕获探针 (capture probe, CP) 和连接探针 (ligation probe, LP) (表 1, 2)。即在靶标互补结合序列的 5' 或 3' 端加入特殊设计的尾巴序列, CP 的尾巴序列可以与 96 孔板上固定的寡核苷酸杂交, LP 的尾巴序列可以与通用引物和通用 TaqMan 探针杂交。

1.2.3 扩增用通用 TaqMan 探针的设计: 设计一条 TaqMan 探针, 该探针含有 3 个 LNA (locked nucleic acid), 且该探针与人类基因组和疟原虫基因组具有低同源性。

表 1 恶性疟 s25 mRNA 的捕获探针和连接探针的靶标结合序列

Table 1 Target-binding sequences for Pfs25 mRNA capture probe and ligation probe

name	target-specific sequence of probe (5'-3')
CP1	TCTTCATTTACTAACACCAAATC
CP2	TCCATCTATTTTAATACATTTGG
LP1	CAGAACTTTTTCTTCACATGTT
LP2	TTACAGTCTTTTCGTCACATTT
LP3	AAAAATCTCCACATGGTTTAT

表 2 间日疟 s25 mRNA 的捕获探针和连接探针的靶标结合序列

Table 2 Target-binding sequences for Pvs25 mRNA capture probe and ligation probe

name	target-specific sequence of probe (5'-3')
CP1	GCCAAATCCCGCATG
CP2	ACACAAGTGTCTTCCTTCAAAGT
LP1	GGGTCTGGGTTTTCTATACTG
LP2	CATTTGTACATGTTTACCTGTGCT
LP3	GTAGCCCTCAATGCAACCA

1.2.4 标准品的制备:1)根据 Pf 和 Pv 雌性配子体 s25 mRNA 即基因的序列设计扩增引物,用从血液培养的 Pf 或云南那邦镇 Pv 感染血液样品提取的 DNA 为模版,扩增目的基因。2)用 T7 启动子加入原正向引物作为新扩增正向引物和反向引物对目的基因进行扩增得到 5'端有 T7 启动子序列的 s25 基因。3)以此作为转录模板,最终经转录纯化分别得到的 Pfs25 和 Pvs25 mRNA,得量分别

为 155.9 ng/ $\mu$ L 和 201.0 ng/ $\mu$ L,换算得到的拷贝数(copies)为  $4.49 \times 10^{11}$  copies/ $\mu$ L 和  $6.17 \times 10^{11}$  copies/ $\mu$ L,以此分别作为接下来实验中的标准品。

1.2.5 CLIP-PCR 检测疟原虫配子体:原理见图 1。1)样品(血液 10  $\mu$ L)加入配制好的裂解体系中(16.7  $\mu$ L 的 3 $\times$ 裂解液、2.5  $\mu$ L 20 g/L 蛋白酶 K、0.5  $\mu$ L 100 nmol/L 探针工作液、去离子水)共 50  $\mu$ L,恒振荡仪 56  $^{\circ}$ C,1 200 r/min 裂解 30 min (RNA 标准品无需此步骤)。2)将裂解产物转移至 96 孔捕获板,每孔 50  $\mu$ L,1 000 r/min 恒温振荡捕获 30 min。3)捕获结束后将板内的液体甩出,用 1 $\times$ 的洗液以每孔 150  $\mu$ L $\times$ 3 次洗涤捕获孔,拍干,2 500 r/min 反向离心 20 s。4)加入连接体系每孔 50  $\mu$ L(5 $\times$ 连接缓冲液 10  $\mu$ L、1  $\mu$ L T4 DNA 连接酶、39  $\mu$ L 去离子水),于 37  $^{\circ}$ C 12 min 进行连接反应。连接反应结束后甩干板子,通过 SYBR Green 染料法或者 TaqMan 探针法进行 qPCR 检测。

(1)SYBR Green 染料法:加入 qPCR 反应体系每孔 25  $\mu$ L/孔(含 12.5  $\mu$ L TransStart Green qPCR SuperMix、0.2  $\mu$ L 10 nmol/L 引物、12.1  $\mu$ L 去离子水),离心后放入 BioRad CFX96 荧光定量 PCR 仪中,95  $^{\circ}$ C 10 min;95  $^{\circ}$ C 10 s,55  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 20 s,进行 40 个循环,最后进行熔解曲线分析。

(2)通用 TaqMan 探针法:加入 qPCR 反应体系每孔 25  $\mu$ L(12.5  $\mu$ L Premix Ex Taq Probe qPCR、0.5  $\mu$ L 10 nmol/L 引物、0.25  $\mu$ L 10 nmol/L TaqMan 探针、11.25  $\mu$ L 去离子水),离心,放入 BioRad 荧光定量 PCR 仪中,95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 10 s,55  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 20 s,进行 40 个循环。

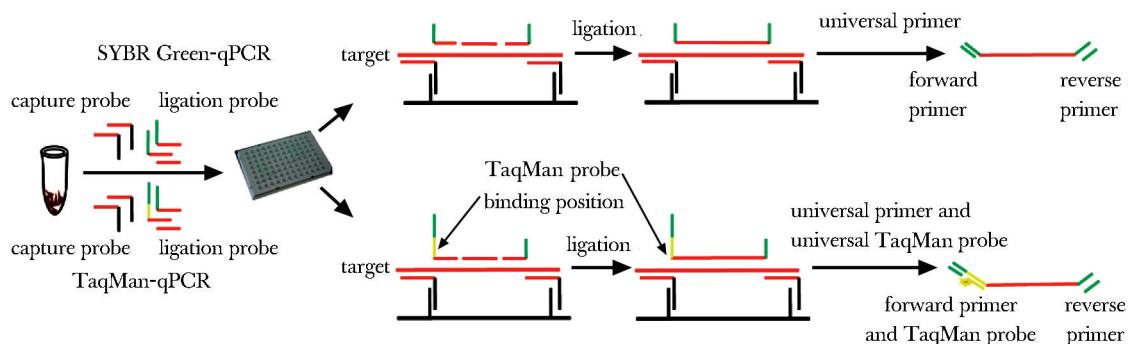


图 1 CLIP-PCR 配子体检测技术的实验原理

Fig 1 Principle of gametocytes detection by CLIP-PCR

1.2.6 标准 RT-qPCR: 参照文献[10]中的 TaqMan 探针和引物序列的设计, RT-qPCR 定量检测疟原虫的靶标 s25 mRNA。

1.2.7 疟原虫检测: 参照文献[11]的方法定量检测培养的 Pf 或 Pv 实际样品中 18S rRNA。

### 1.3 统计学分析

运用 OriginPro 9.1 软件进行统计学分析, 计量资料以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 两组间比较用 *t* 检验。

## 2 结果

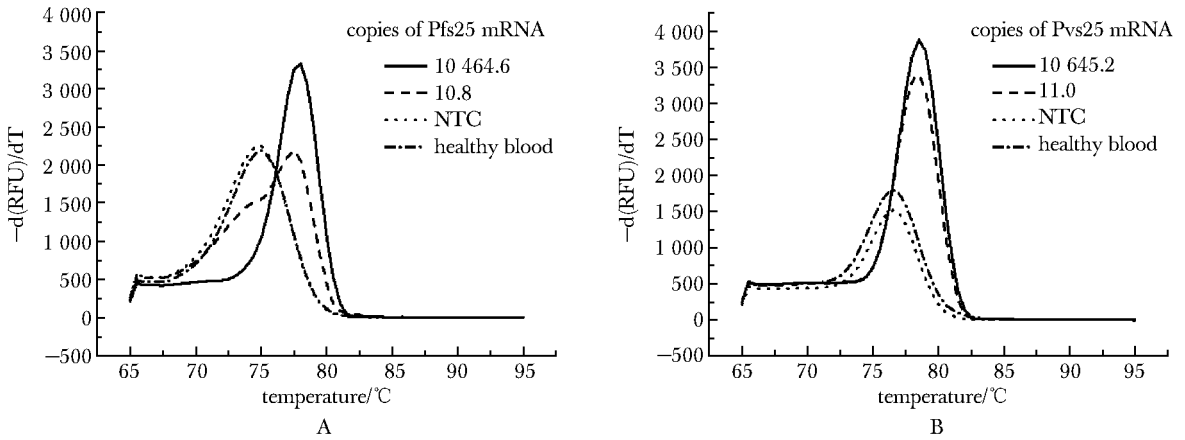
### 2.1 染料法 CLIP-PCR 的熔解曲线和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 的扩增曲线

分别检测不同拷贝数的 Pfs25 和 Pvs25 mRNA 标准品、健康人血液样品和无模板对照(no template

control, NTC)。CLIP-PCR 染料法检测 Pfs25 mRNA 的阳性峰  $T_m$  值为 78 °C, 健康人血液样品和 NTC 的引物二聚体峰  $T_m$  值为 75 °C (图 2A); Pvs25 mRNA 的阳性峰  $T_m$  值为 78.5 °C, 健康人血液样品和 NTC 的引物二聚体峰  $T_m$  值为 76.5 °C (图 2B), 不同靶标浓度下的熔解曲线峰形均一, 均为单峰。CLIP-PCR 通用 TaqMan 探针法检测 Pfs25 mRNA 和 Pvs25 mRNA 在各浓度均有 S 型扩增曲线的趋势, 健康人血液样本和 NTC 无扩增信号(图 3)。

### 2.2 染料法和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 与 RT-qPCR 灵敏度与重复性对比

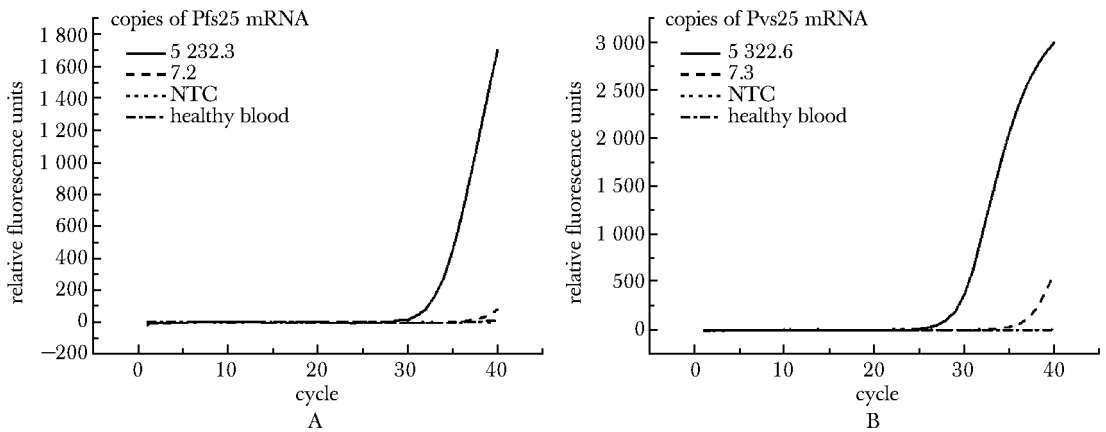
如图 4 所示, 2 种方法与 RT-qPCR 相比, 不同浓度标准品测得的循环定量(quantification cycle, C<sub>q</sub>)值与拷贝数的对数值呈良好的线性关系, 且线



-d(RFU)/dT. derivative of fluorescence intensity with respect to temperature; NTC. no template control

图 2 染料法 CLIP-PCR 检测 Pfs25 mRNA (A) 和 Pvs25 mRNA (B) 的熔解曲线

Fig 2 Melting curve of SYBR Green CLIP-PCR by detecting Pfs25 mRNA (A) and Pvs25 mRNA (B)



NTC. no template control

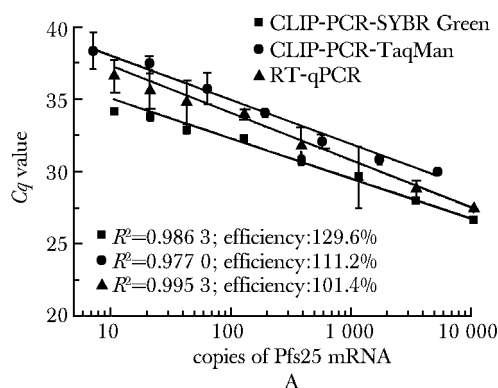
图 3 通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 检测 Pfs25 mRNA (A) 和 Pvs25 mRNA (B) 的扩增曲线

Fig 3 Amplification curve of TaqMan CLIP-PCR by detecting Pfs25 mRNA (A) and Pvs25 mRNA (B)

性基本相似。与 RT-qPCR 相比,2 种方法都可以检测到 11 copies/reaction 的 Pfs25 和 Pvs25 mRNA,且相同浓度重复 3 次检测批内重复性均良好。各个浓度的 C<sub>q</sub> 值变异系数(coefficient of variaiton,CV) 均小于 5%。

### 2.3 染料法和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 检测疟原虫雌性配子体特异性分析

染料法和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 可以



从人为混合的 RNA 模板中准确检测出 Pfs25 mRNA 和 Pvs25 mRNA(表 3),且与非混合模板的差异无统计学意义。

### 2.4 在实际样品中的应用

CLIP-PCR 染料法检测血液培养 Pf 样品和 3 例 Pv 疟原虫阳性血液样品(表 4)。

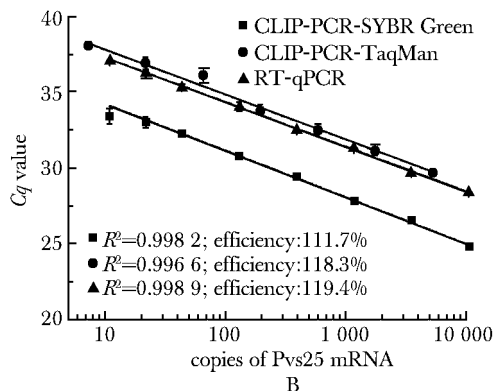


图 4 染料法、通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 和 RT-qPCR 检测 Pfs25 mRNA(A) 和 Pvs25 mRNA(B) 的比较

Fig 4 Comparison of SYBR Green CLIP-PCR and TaqMan CLIP-PCR with RT-qPCR in detection of Pfs25 mRNA (A) and Pvs25 mRNA (B)

表 3 染料法和通用 TaqMan 探针法 CLIP-PCR 检测单独或混合的 Pfs25 和 Pvs25 mRNA 模板

Table 3 Detection of Pfs25 和 Pvs25 mRNA in single and mixed RNA templates by SYBR Green CLIP-PCR and TaqMan CLIP-PCR ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

RNA templates no. of copies		SYBR Green Cq average		TaqMan Cq average	
Pfs25	Pvs25	Pfs25	Pvs25	Pfs25	Pvs25
0	10 <sup>4</sup>	-	25.56±0.24	-	27.68±0.11
10 <sup>4</sup>	0	26.46±0.24	-	28.27±0.08	-
10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	26.26±0.13	25.10±0.15	28.03±0.20	27.45±0.05

- . represented negative result.

表 4 Pf 和 Pv 实际样品中疟原虫(18S rRNA)及其雌性配子体密度(s25 mRNA)的 Cq 值

Table 4 Cq value of detection parasite density(18S rRNA) and female gametocyte density(s25 mRNA) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

sample name	18S rRNA	s25 mRNA
Pv-1	8.43 *	21.81±0.05
Pv-2	13.62 *	27.09±0.17
Pv-3	16.73 *	-
cultured Pf	18.65±0.26	29.96±0.13

\* these samples were tested only once; -. represented negative result.

## 3 讨论

本研究建立了一种基于捕获和连接扩增的染料法和通用 TaqMan 探针法检测疟原虫雌性配子体 s25 mRNA。将裂解血样与 CP、LP 在 96 孔捕获板中共同孵育,CP 一端与靶标互补配对,另一端与捕获板上的寡核苷酸互补配对,直接把特异性 RNA 靶标固定到 96 孔板上,LP 也与靶标互补配对,形成“三明治”杂交。酶促反应连接连续的 LP,形成两端为通用引物和通用荧光探针序列结合序列的 DNA 模板,由此将



待检靶标由 RNA 置换为单链 DNA 扩增模板,从而省去了核酸提取和反转录的步骤。除此之外,相比 RT-qPCR,本方法无需对特异性靶标进行单独的荧光探针设计,通过在 LP 中加入通用荧光探针的互补序列,使得扩增模板 5'端通用引物的下游带有荧光探针结合区域,从而可直接用探针法进行检测。本工作相较于实验室前期基础<sup>[11]</sup>,拓展了设计思路,建立了一种新的探针检测方法。

本方法适用于多种靶标的检测,根据不同靶标设计可自由设计探针。针对同一靶标设计多组探针,同时扩增,在靶标含量极少的情況下能有效降低假阴性的出现。本方法具有多重检测的应用潜力,通用 TaqMan 探针和引物的使多重体系的调整方便灵活。利用通用引物进行单独扩增,避免了特异引物在 PCR 中的非特异结合,同时也减少了由于引物的相互影响带来的错误结果;利用通用 TaqMan 探针替代设计探针避免了不同靶标荧光探针结合能力不同对信号的影响,同时减少多根荧光探针错误结合的情况。

## 参考文献:

- [1] Meibalan E, Marti M. Biology of malaria transmission[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7: a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452.
- [2] Beri D, Balan B, Tatu U. Commit, hide and escape: the story of *Plasmodium* gametocytes [J]. Parasitol, 2018, 145: 1772-1782.
- [3] Muthui MK, Mogeni P, Mwai K, et al. Gametocyte carriage in an era of changing malaria epidemiology: a 19-year analysis of a malaria longitudinal cohort[J]. Wellcome Open Res, 2019,4:66. doi:10.12688/wellcomeopenres.15186.2.
- [4] Kosasih A, Koepfli C, Dahlan MS, et al. Gametocyte carriage of *Plasmodium falciparum* (pfs25) and *Plasmodium vivax*(pvs25) during mass screening and treatment in West Timor, Indonesia: a longitudinal prospective study [J]. Malar J, 2021,20:177. doi:10.1186/s12936-021-03709-y.
- [5] Meerstein-Kessel L, Andolina C, Carrio E, et al. A multiplex assay for the sensitive detection and quantification of male and female *Plasmodium falciparum* gametocytes[J]. Malar J, 2018, 17:441. doi: 10.1186/s12936-018-2584-y.
- [6] Santolamazza F, Avellino P, Siciliano G, et al. Detection of *Plasmodium falciparum* male and female gametocytes and determination of parasite sex ratio in human endemic populations by novel, cheap and robust RT-qPCR assays[J]. Malar J, 2017, 16:468. doi:10.1186/s12936-017-2118-z.
- [7] Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes[J]. Parasitol Int, 2010, 59:414-420.
- [8] Nathália F. Lima, Bastos MS, Ferreira MU. *Plasmodium vivax*: reverse transcriptase real-time PCR for gametocyte detection and quantitation in clinical samples [J]. Exp Parasitol, 2012, 132:348-354.
- [9] Pett H, Goncalves BP, Dicko A, et al. Comparison of molecular quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes by Pfs25 qRT-PCR and QT-NASBA in relation to mosquito infectivity[J]. Malar J, 2016, 15:539. doi: 10.1186/s12936-016-1584-z.
- [10] Wampfler R, Mwingira F, Javati S, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes[J]. PLoS One, 2013,8:e76316. doi:10.1371/journal.pone.0076316.
- [11] Cheng Z, Wang D, Tian X, et al. Capture and ligation probe-PCR (CLIP-PCR) for molecular screening, with application to active malaria surveillance for elimination [J]. Clin Chem, 2015, 61:821-828.