

聚合酶链反应方法检测鼠疫耶尔森菌的内部对照研究

张志凯 海荣 张恩民 俞东征

【摘要】 目的 避免聚合酶链反应(PCR)方法检测鼠疫菌发生假阴性。方法 通过克隆,将 16S rRNA 引物的扩增产物与鼠疫菌 F1 抗原基因克隆子相连,并以其作为内部对照模板进行 PCR 试验。结果 得到了在包含 F1 抗原基因中连接有 16S rRNA 扩增产物的质粒,并初步确立了作为内部对照质粒的参照标准浓度。结论 在采用 PCR 方法检测鼠疫菌时,加入适宜浓度的内部对照质粒作为模板与待检样品同时扩增,可避免假阴性的发生。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 聚合酶链反应; 内部对照

Study on the internal control on polymerase chain reaction in *Yersinia pestis* detection ZHANG Zhi-kai, HAI Rong, ZHANG En-min, YU Dong-zheng. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective For the detection of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction(PCR), internal control(IC) is required in order to prevent false negative results that might be caused by PCR inhibitors. **Methods** F1 antigen was amplified by PCR with primer F1 and the PCR product of primer F1 were cloned with TOPO TA cloning Kit. The plasmid of positive clone was then digested with Hpa I. The digested plasmid and the PCR products of 16S rRNA were ligated with T₄ DNA ligase before the ligated products were transformed. Isolate plasmid DNA on positive clone and its concentration were measured. Plasmid DNA on different concentration by PCR amplification with primer F1 was analyzed and the standard concentration of IC was determined. **Results** Constructing an IC by inserting a 16S rRNA amplicon to the original target DNA between the two primer F1 sites, the size was longer than the target DNA. The standard concentration of IC was determined. **Conclusion** An optimal IC concentration to increase the reliability of the PCR assays might be used to prevent false negative results and appeared to be useful for detection of *Yersinia pestis*.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Polymerase chain reaction; Internal control

随着分子生物学技术的发展,聚合酶链反应(PCR)技术已得到了广泛的应用,尤其对于致病微生物的检测有着重要的作用。但是,PCR 方法也有它的不足之处,由于交叉污染或者非特异性扩增,以及反应抑制剂等多种原因,总会出现假阳性或假阴性^[1]。一旦发生了假阴性,对于鼠疫这类烈性传染病其后果是极其严重的。为了避免假阴性的发生,需对 PCR 方法设计内部对照,即人工合成 DNA 模板,以相同的引物与鼠疫菌 DNA 模板同时进行 PCR 扩增。但是,作为内部对照的质粒模板,其浓度对于结果也有一定的影响。只有选取适宜的浓度,才能真正避免假阴性的发生。本实验便对此方法进行了研究,现将结果报道如下。

材料与amp方法

1. 材料:

(1)菌株与克隆载体及受体菌:实验所用鼠疫菌株为疫苗株 EV。载体 PCR[®]2.1-TOPO[®]和受体菌 One Shot[®]TOP10 为 Invitrogen 公司产品。

(2)主要试剂与仪器:Taq 酶、dNTP、质粒快速提取试剂盒购自鼎国和华美生物工程公司,TOPO TA Cloning Kit 为 Invitrogen 公司产品,Robocycler[®] Gradient 40 型 PCR 基因扩增仪为 Stratagene[®]产品,UVIpro GAS7001X 凝胶影像分析系统为 UVI 公司产品,紫外分光光度计、高速台式离心机为上海安亭科学仪器厂产品,水平电泳仪为北京东方仪器厂产品。

2. 实验方法:

(1)PCR 扩增:根据已经公布的鼠疫菌 F1 抗原

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病研究室

及 16S rRNA 序列设计引物。引物序列如下。F1 上游引物: 5'-GGAACCACTAGCACATCTGTT-3'; F1 下游引物: 5'-ACCTGCTGCAAGTTTACCGCC-3'; 16S rRNA 上游引物: 5'-AGCGGCAGCGGG AAGTAGTT-3'; 16S rRNA 下游引物: 5'-TCA ACCCCTTCCTCCTCGCT-3'。反应条件: 变性 95℃ 5 min, 1 个循环, 然后 95℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min; 30 个循环; 最后 72℃ 5 min。

(2) 克隆: 鼠疫苗 F1 抗原经 PCR 扩增的产物, 采用 TOPO TA Cloning Kit, 根据其说明书进行克隆, 对克隆子提取质粒后进行酶切鉴定。

(3) 酶切: 将鉴定为阳性的克隆子质粒采用 Hpa I 进行酶切。

(4) 连接: 将 16S rRNA 引物的扩增片段采用 T₄ DNA 连接酶, 与酶切后的阳性克隆子质粒相连。

(5) 再克隆: 将上述连接后的质粒再次进行克隆。将克隆子提取质粒并酶切鉴定。

(6) 浓度的选择: 利用紫外分光光度计测量二次克隆子质粒的吸光度 (A_{260}) 值, 计算其浓度。分别以 1:10、1:100、1:500、1:1000、1:2000、1:5000 的比例进行稀释。在提取鼠疫苗 DNA 之前, 我们先采用菌落计数的方法测其菌液的浓度。然后再以这些浓度的质粒以及不同浓度的鼠疫苗 DNA 为模板, 采用引物 F1 同时进行 PCR 扩增。

结 果

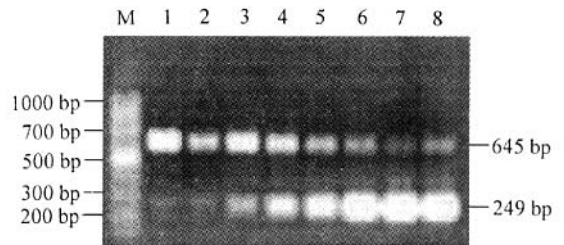
1. PCR 扩增: 以鼠疫苗 DNA 为模板通过 F1 抗原及 16S rRNA 引物扩增, 分别得到了长度为 249 bp 和 396 bp 的片段; 再以包含 F1 抗原基因中连接有 16S rRNA 扩增产物的阳性克隆子为模板, 通过 F1 抗原引物扩增, 得到了长度为 645 bp 的片段。它们都与预期结果一致。

2. 连接与克隆: 将 F1 抗原的 PCR 扩增产物采用 TOPO TA Cloning Kit 进行克隆, 得到了阳性克隆子。提取质粒并将质粒采用 Hpa I 进行酶切。将上述 16S rRNA 引物的扩增片段与经 Hpa I 酶切后的阳性克隆子质粒相连后, 再次进行克隆, 得到了在包含 F1 抗原基因中连接有 16S rRNA 扩增产物的阳性克隆子。

3. 结果判断: 我们在检测标本时, 需要以内部对照质粒与标本模板同时进行扩增。如果两者都扩增出来, 我们认为标本为阳性; 如果只有内部对照有扩增结果, 标本为阴性; 如果只有标本有扩增结果, 那

么为假阳性; 如果两者都无扩增结果, 那么此结果为假阴性。所以在检测标本时, 加入内部对照质粒作为模板同时扩增, 可以有效地排除假阴性。

4. 质粒浓度的选择: 采用紫外分光光度计测得上述提取的内部对照质粒的 A_{260} 值为 1.12, 其浓度为 56 $\mu\text{g/ml}$ 。按设计的比例进行稀释后, 再分别以这些浓度的质粒为模板进行 PCR 扩增, 结果浓度至 1:2000 和 1:5000 时扩增产物条带不清晰。提取鼠疫苗 DNA 之前, 我们采用菌落计数的方法测得菌液的浓度为 1.54×10^{10} CFU/ml。然后以 1:10、1:50、1:100、1:200、1:500、1:1000、1:2000、1:5000 的比例进行稀释, 再以上述浓度的质粒与这些不同浓度的鼠疫苗 DNA 模板同时进行扩增, 结果只有浓度为 1:10 和 1:100 的内部对照得到理想结果 (图 1、2)。结果显示 1:10 浓度的内部对照质粒模板可与 1:10~1:2000 浓度的鼠疫苗 DNA 模板同时扩出明显的预期条带, 并且随着鼠疫苗 DNA 浓度的增加, 鼠疫苗 DNA 模板的扩增条带越来越亮, 而内部对照模板的扩增条带越来越暗。1:100 浓度的质粒模板可与 1:500~1:2000 浓度的鼠疫苗 DNA 模板同时扩出明显的预期条带, 鼠疫苗 DNA 模板浓度越高, 扩增条带越亮, 而在此浓度范围之外的内部对照质粒模板扩增条带不清晰。



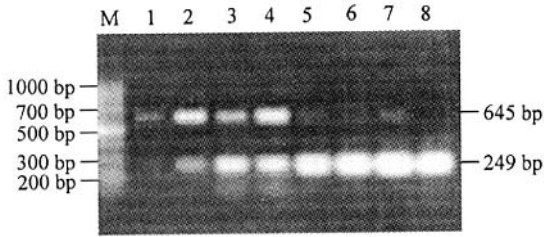
M: 100 bp DNA Step ladder Markers; 1~8: 分别为 1:5000、1:2000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:10 的鼠疫苗质粒, 内部对照质粒均为 1:10; 645 bp 为内部对照结果

图1 1:10 内部对照质粒与不同浓度鼠疫苗质粒同时 PCR 扩增结果

讨 论

鼠疫是由鼠疫耶尔森菌引起的一种自然疫源性传染病, 对人类的危害十分严重, 近些年又呈现抬头的趋势。鼠疫的临床诊断主要靠细菌学和血清学的方法来判断^[2]。随着 PCR 方法的广泛应用, 检测鼠疫苗也是一种快速的方法。由于荚膜抗原 (F1) 是鼠疫苗毒力决定因子, 它是一种糖蛋白, 是鼠疫苗的

特异性抗原之一,具有抗吞噬能力^[3]。因此针对此抗原基因序列设计引物,可以通过 PCR 方法来鉴定鼠疫菌。



M:100 bp DNA Step ladder Markers; 1~8:分别为 1:5000、1:2000、1:1000、1:500、1:200、1:100、1:50、1:10 的鼠疫菌质粒,内部对照质粒均为 1:100; 645 bp 为内部对照结果

图2 1:100 内部对照质粒与不同浓度鼠疫菌质粒同时 PCR 扩增结果

PCR 方法也有它的缺陷。由于交叉污染或者非特异性扩增,可导致假阳性^[4];而一些反应抑制剂,例如食物、灰尘、DNA 提取液、实验中所用的耗材等,以及反应条件或者所用试剂不太合适,都有可能造成假阴性^[1,5]。对于假阳性,我们可以通过紫外线或漂白粉消毒、设立阴性对照和空白对照等方法进行排除;而对于假阴性,我们可以通过内部对照的方法来进行鉴别^[1,5,6]。

研究表明,对 PCR 方法设立内部对照,可以有效地避免假阴性的发生。但是,作为内部对照的质粒 DNA 的浓度与所测样品的浓度对实验结果有着关键作用。我们的研究发现,作为内部对照的质粒模板浓度在 $5.6 \mu\text{g/ml}$ 时,与 $7.7 \times 10^6 \sim 1.54 \times 10^9$ CFU/ml 浓度鼠疫菌的 DNA 模板可同时扩增出明显的条带来,并且随着鼠疫菌 DNA 浓度的增加,鼠疫菌 DNA 模板的扩增条带越来越亮,而内部对照模板的扩增条带越来越暗。高于此浓度时,只有鼠疫菌 DNA 模板可扩增出预期的条带来,而低于此浓度时,只有质粒模板可扩增出预期的条带来。质粒模板浓度在 $0.56 \mu\text{g/ml}$ 时,只与 $7.7 \times 10^6 \sim 3.1 \times 10^7$ CFU/ml 浓度的鼠疫菌 DNA 模板可同时扩增出

明显的条带来,鼠疫菌 DNA 模板浓度越高,扩增条带越亮,而在此浓度范围之外的内部对照质粒模板扩增条带不清晰。当质粒 DNA 的浓度再降低时,就只有鼠疫菌质粒可扩增出明显的条带来。且其亮度会随着鼠疫菌 DNA 浓度的增加而增加。由此可见,作为内部对照的质粒 DNA 浓度对待检样品的扩增是有影响的。因此我们认为,在使用 PCR 内部对照模板的过程中,应采用适宜的浓度,才可真正避免假阴性的发生。建议采用浓度为 $0.56 \mu\text{g/ml}$ 的内部对照质粒作为参照标准,来避免采用 PCR 方法进行检测中的假阴性,可检测的鼠疫菌的最小浓度为 7.7×10^6 CFU/ml。另外,我们实验中所用的待检样品为鼠疫菌 DNA,与实际所要检测的样品是有差异的。在实际工作中,作为内部对照质粒的浓度参照标准,可能会与此有些不同,还有待于我们在现场使用中进一步的确定。

参 考 文 献

- 1 Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3741-3751.
- 2 纪树立,主编. 鼠疫. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 257-265, 292-300.
- 3 Andrews GP, Heath DG, Anderson GW, et al. Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect Immun*, 1996, 64: 2180-2187.
- 4 Rys PN, Persing DH. Preventing false positive: quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 2356-2360.
- 5 Brightwell G, Pearce M, Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Mol Cell Probes*, 1998, 12: 367-377.
- 6 Sarkar G, Sommer SS. Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 1990, 343: 27.

(收稿日期:2003-04-28)

(本文编辑:尹廉)