

## · 实验研究 ·

## 实时荧光定量 PCR 检测普氏立克次体

杨晓 陈梅玲 温博海 牛东升 朱丽娜 李青凤 孙长俭

**【摘要】** 目的 采用新型 TaqMan-MGB 探针建立检测普氏立克次体的实时荧光定量 PCR 方法。方法 根据普氏立克次体外膜蛋白 B 的基因(*ompB*)序列设计引物和探针,以克隆的 *ompB* 基因片段作 DNA 模板,在荧光定量 PCR 检测仪(ABI 7900 型)上建立实时荧光定量检测方法。结果 建立的定量标准曲线的循环阈值(*C<sub>t</sub>*)与模板拷贝数呈良好的线性关系( $r=0.999$ );与巢式 PCR 相比较,荧光定量 PCR 检测敏感性是其 100 倍。用荧光定量 PCR 检测莫氏立克次体及其他相关立克次体和细菌 DNA,检出结果均为阴性。用荧光定量 PCR 检测普氏立克次体感染的豚鼠血标本,某些样本检测为阳性,而用巢式 PCR 检测的结果均为阴性。结论 研究中建立的检测普氏立克次体实时荧光定量 PCR 具有很高的特异性和敏感性,适合于快速检测样本中微量普氏立克次体 DNA,可用作临床实验室快速确诊流行性斑疹伤寒。

**【关键词】** 流行性斑疹伤寒;普氏立克次体;实时定量 PCR;外膜蛋白 B 基因

**Detection of *Rickettsia prowazekii* by quantitative real-time PCR** YANG Xiao, CHEN Mei-ling, WEN Bo-hai, NIU Dong-sheng, ZHU Li-na, LI Qing-feng, SUN Chang-jian. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China  
Corresponding author: WEN Bo-hai, Email: wenbohais@sohu.com.cn

**【Abstract】 Objective** To develop a quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Rickettsia prowazekii*. **Methods** Primers and TaqMan-MGB probes designed based on *ompB* gene of *R. prowazekii*, were used to develop this method. **Results** For the quantitative real-time PCR, the relationship between the values of threshold cycle (*C<sub>t</sub>*) and the DNA copy number was linear ( $r=0.999$ ) and the sensitivity was about 100 times higher than that of the nested PCR for detecting the same DNA sample. The results of the genomic DNA samples of other rickettsial and bacterial agents detected by real-time PCR were all negative. DNAs extracted from blood samples of guinea pig infected with *R. prowazekii* were examined by real-time PCR and the positive results were obtained from some of these samples. However, the results of some samples in nested PCR assay were all negative. **Conclusion** These results suggested that the real-time PCR was highly specific and sensitive for detection of *R. prowazekii* that was useful for the detection of tiny DNA of *R. prowazekii* in blood samples from patients suspected of having epidemic typhus.

**【Key words】** Epidemic typhus; *Rickettsia prowazekii*; Quantitative real-time PCR; *ompB*

斑疹伤寒是由普氏立克次体(*R. prowazekii*)或莫氏立克次体(*R. mooseri*)引起的急性感染性疾病,普氏立克次体引起的感染称为流行性斑疹伤寒,而由莫氏立克次体引起的称为地方性斑疹伤寒。流行性斑疹伤寒为虱传播,临床症状较重,主要表现为高热、头痛、皮疹,甚者神经症状显著,可出现听觉障碍、神志昏迷直至死亡。地方性斑疹伤寒又称鼠型斑疹伤寒,由鼠蚤传播,多散发,症状较轻<sup>[1]</sup>。在我

国流行性斑疹伤寒和地方性斑疹伤寒均有流行,长期以来由于两者临床症状的相似性以及普氏立克次体和莫氏立克次体的高度同源性,两种斑疹伤寒的临床诊断在很大程度上还依赖于对病史和流行病学资料的研究和分析。近 20 年来,我国没有发生流行性斑疹伤寒大流行,也没有针对性地对易感人群进行预防流行性斑疹伤寒的疫苗接种,人群对流行性斑疹伤寒的免疫力正在逐渐削弱,因而在特定条件下流行性斑疹伤寒在我国有可能再度爆发性流行。因此,我国迫切需要建立一种简便、快速、敏感而特异的检测方法作为流行性斑疹伤寒的实验室诊断方法。

目前我国流行性斑疹伤寒的实验室诊断主要包

基金项目:国家科技攻关课题资助项目(2003BA712A04-07)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室

通讯作者:温博海,Email:bohaisen@sohu.com

括非立克次体特异的外斐氏实验以及斑疹伤寒立克次体特异性的免疫荧光抗体检测等血清学检测方法,由于特异性抗体检出多在感染 2 周以后,这些血清学检测方法不能用于斑疹伤寒的早期诊断。另外,血清学检测很难将流行性斑疹伤寒与地方性斑疹伤寒区分。近年来,在国内外已有文献报道采用巢式 PCR 方法来检测普氏立克次体 DNA。虽然巢式 PCR 方法比血清学方法敏感,但也难以检出流行性斑疹伤寒患者血样本可能存在的微量普氏立克次体或普氏立克次体 DNA,并且常见的 PCR 检测的假阳性或假阴性直接影响到检测结果的可靠性。目前,一种将 PCR 与液相探针杂交相结合的检测方法,即实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR) 已经开始用于病原体的检测<sup>[2-6]</sup>。本研究采用最新定量 PCR 技术 (TagMan-MGB 探针),依据普氏立克次体外膜蛋白 B 基因 (*ompB*) 设计引物和探针,建立了快速检测普氏立克次体的实时荧光定量 PCR 法。

### 材料与方 法

1. 菌株与 DNA: 普氏立克次体 (E 株)、莫氏立克次体 (Wilmington 株)、恙虫病东方体 (Gilliam 株、Karp 株)、贝氏柯克斯体 (新桥株)、立氏立克次体 (R 株)、汉赛巴通体 (Houston-1)、查菲埃立克体 DNA 为本室保存;五日热巴通体 DNA 为美国加州大学惠赠。金黄色葡萄球菌 (26066)、肺炎链球菌 (31004)、出血性大肠埃希菌 (O157:H7 EDL933)、福氏 2a 志贺菌 (301)、鸚鵡热衣原体 (AR39)、伯氏疏螺旋体 (太一株)、嗜肺军团菌 (12 型)、炭疽杆菌 (A16R)、鼠疫杆菌 (EV76)、猪型布氏杆菌 (104M) 等细菌 DNA 样本由本所细菌室或中国疾病预防控制中心传染病预防控制所惠赠。

2. 主要试剂: DNA 回收试剂盒购自上海生工生物公司, T 载体试剂盒购自 Promega 公司, 质粒提取试剂盒和全血基因组 DNA 提取试剂盒均购自德国 Qiagen 公司。荧光定量 PCR 检测专用 96 孔板和盖膜以及 TaqMan Universal PCR Master Mix 由美国 ABI 公司生产。TaqMan-MGB 探针由上海基康公司合成, 引物由赛百盛公司合成。

3. 探针和引物: 采用 ABI Primer Express 2.0 software 和遵循 TaqMan-MGB 探针设计原则, 依据普氏立克次体 *ompB* 序列, 设计引物 Pr204F (5'-AGG ACA ACA AAT GCA GCA GCT A-3') 和

Pr266R (5'-AGC ACC AGC AGC TTG ATC AA-3'), 探针 (5'-AAC CTT TGA TGG TAT AGG C-3')。扩增的片段为 63 bp, 序列为 aggacaacaaatgcagcagctacaacctttgatggataggctttgatcaagctgctgggtgct, 下划线部分为引物, 加粗部分为探针。

4. 制备标准 DNA 模板: 用 PCR 方法扩增普氏立克次体 *ompB* 基因片段, 扩增所用的引物为 Pr65F (5'-TTA AAT ATA GGA AAA AAT TAT GGC T-3') 与 Pr493R (5'-GAG CAT TTT GAG CAT TTA TTG TAT T-3'), 用 DNA 回收试剂盒从电泳后的琼脂糖胶上回收扩增的目的 DNA 片段。依据试剂盒说明书, 将纯化的目的 DNA 片段连接到 pMD-T 载体上, 该 T 载体克隆的目的 DNA 片段作为标准 DNA 模板。计算标准 DNA 模板拷贝数公式为 DNA 拷贝数 = DNA 含量 / 片段大小 × 615 (Da) × 1.67 × 10<sup>-24</sup> (gram)<sup>[7]</sup>。使用 Beckman Du 640 核酸定量仪测定 DNA 模板量, 本次实验的 DNA 模板为 205.074 μg/ml, 计算模板的拷贝数为 6 × 10<sup>10</sup> / μl。

5. 荧光定量 PCR 反应体系: 采用 25 μl 反应体积: 每个反应中含 12.5 μl 通用 PCR 反应混合物 (TaqMan Universal PCR Master Mix), 5 μl 引物和探针混合物 [100 μl 混合物中含引物各 3 μl (50 μmol/L), 探针 2 μl (50 μmol/L), 去离子水 92 μl], 5.5 μl 去离子水, 2 μl DNA 模板。荧光定量 PCR 反应在 ABI 7900 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司产品) 内进行, 反应条件为先 50℃ 2 min 和 95℃ 10 min, 然后以 95℃ 15 s 和 60℃ 1 min, 循环 45 次。

6. 普氏立克次体感染豚鼠: 150~200 g 雄性豚鼠 9 只, 由军事医学科学院实验动物中心提供。将普氏立克次体感染的鸡胚卵黄囊膜 (感染程度为 4+, 即感染卵黄囊膜涂片染色后显微镜观察, 每个视野观察到 ≥1000 个菌体) 加入无菌生理盐水研磨制备匀浆, 并用无菌生理盐水适当稀释匀浆 (菌体计数约含 2.3 × 10<sup>10</sup> 个/ml 普氏立克次体)。每只豚鼠腹腔注射匀浆 1 ml, 感染后每天测量体温, 并于第 3、6、9、12、15 和 18 天分别对豚鼠心脏采血; 每份血样本取 200 μl, 用德国 Qiagen 公司的血 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 最后一步用 40 μl 无菌去离子水将柱中 DNA 洗脱, 获得约 40 μl DNA 样本。分别用 2 μl DNA 样本作模板行定量 PCR 检测和巢式 PCR 检测。

7. 间接免疫荧光 (IFA) 检测豚鼠血清普氏立克

次体抗体:采用普氏立克次体感染鸡胚卵黄囊膜制备 12 孔普氏立克次体抗原片。用普氏立克次体抗原片做 IFA 测定感染豚鼠血清的抗普氏立克次体的特异性 IgG 效价。将倍比稀释的感染豚鼠血清与普氏立克次体抗原片在 37℃ 作用 1 h, 然后用 0.02% Tween 20 的 PBS(PBS-T)漂洗 3 次后吹干; 加入 FITC 标记的抗豚鼠 IgG 抗体, 37℃ 作用 1 h 后用 PBS-T 漂洗 3 次后吹干, 然后用荧光显微镜镜检。在紫外光激发下, 被特异性抗体结合的立克次体在镜下为绿色小球杆菌。镜下能清晰看到立克次体时的血清最大稀释度为该份血清的普氏立克次体 IgG 抗体的效价。

## 结 果

1. 敏感性分析:用无菌去离子水稀释的普氏立克次体标准 DNA, 使其拷贝数分别为  $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10。将其分别加到反应体系中做荧光定量 PCR 检测。所测定的反应曲线和标准曲线见图 1。所建立的标准曲线表明, 该方法检测的普氏立克次体最低能够检测到 < 10 个拷贝的模板 DNA, 普氏立克次体标准品 DNA 的拷贝数与循环阈值 ( $C_t$ ) 的相关值 ( $r$ ) 为 0.999, 见图 1(A、B)。

依据参考文献[8], 采用巢式 PCR 扩增普氏立克次体 DNA, 所用外引物为 pgRp1 (5'-TCA GAA AGG AGA AAA GAT T-3') 和 pgRp2 (5'-CTT GCG TAA TAA TTC TTT TC-3'), 内引物为 NRp1 (5'-ACG CAT TAG TCG GGC TTT ATT GTC CC-3')

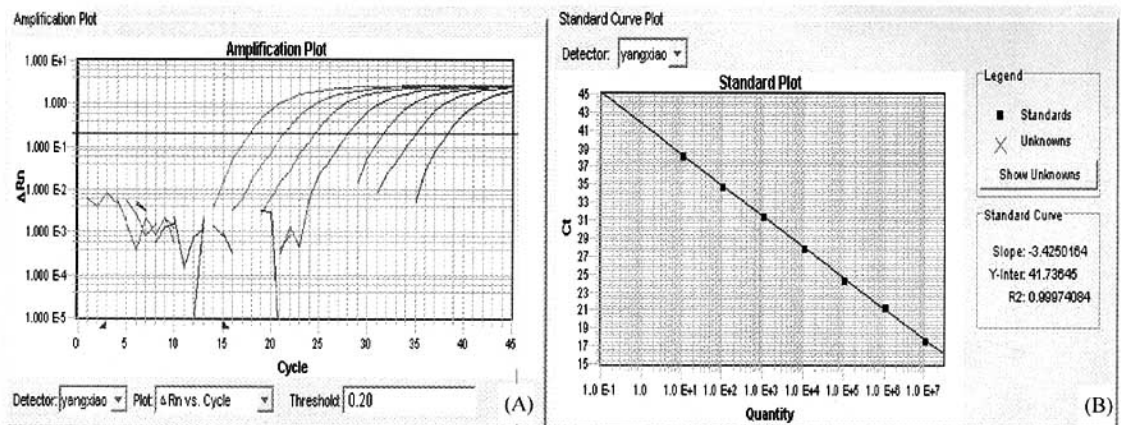
和 NRp2 (5'-ACC GTG GAA TAT TGG TCC-3'), 该巢式 PCR 检测普氏立克次体目的 DNA 的最低检测量为  $10^4$  拷贝 (图 2), 荧光定量 PCR 法检测普氏立克次体的灵敏度约为该巢式 PCR 法的 100 倍。

2. 特异性分析:用荧光定量 PCR 分别检测了普氏立克次体、莫氏立克次体、恙虫病东方体、贝氏柯克斯体、立氏立克次体、汉赛巴通体、查菲埃立克体、五日热巴通体、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、出血性大肠埃希菌、福氏 2a 志贺菌、鸚鵡热衣原体、伯氏疏螺旋体、嗜肺军团菌、炭疽杆菌、鼠疫杆菌、猪型布氏杆菌等病原体的 DNA 样本, 除普氏立克次体样本检出强烈信号外, 其他立克次体和病原菌 DNA 样本均未见荧光信号, 即检测结果为 0。

3. 重复性分析:对同一批次和不同批次的倍比稀释普氏立克次体标准 DNA 样品进行检测, 根据  $C_t$  值的 CV (变异系数) 对重复性进行了评价。批内 CV 为 0.5% ~ 1.5% (图 3), 批间 CV 从 0.4% ~ 2.1% (图 4)。结果表明所建立的检测方法 CV 小, 方法的重复性良好。

4. 普氏立克次体感染豚鼠血样本的检测:先用巢式 PCR 检测感染后第 3、6、9、12、15 和 18 天的豚鼠血样本, 均未扩出目的条带。再以实时荧光定量 PCR 检测同样的 DNA 样本, 部分样本检测的结果为阳性, 结果见表 1。

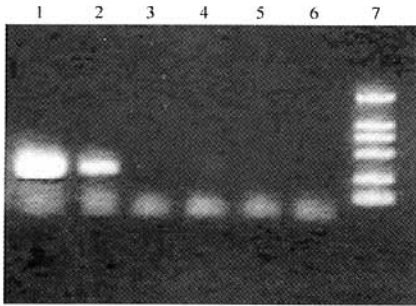
5. IFA 检测感染豚鼠血清普氏立克次体抗体:用普氏立克次体抗原片做 IFA 检测, 检测普氏立克次体感染后第 6、12 和 18 天的豚鼠血清 IgG 效价。



(A) 荧光定量 PCR 检测普氏立克次体标准 DNA 样本; 标准 DNA 拷贝数为 10、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$  (从左到右)。 (B) 荧光定量 PCR 检测标准 DNA 样本产生的标准曲线

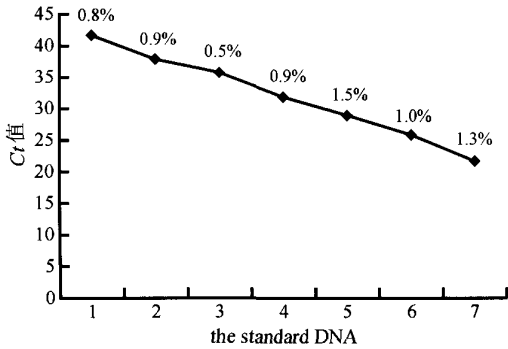
图1 普氏立克次体荧光定量 PCR 检测标准 DNA 样本

其中 5 只豚鼠血清特异抗体检测结果为阳性(效价为 1:320~1:5120), 另外 4 只检测结果为阴性。



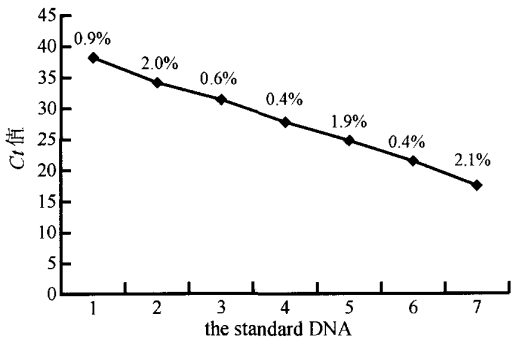
1:10<sup>5</sup> 拷贝 DNA 样本; 2:10<sup>4</sup> 拷贝 DNA 样本; 3:10<sup>3</sup> 拷贝 DNA 样本; 4:10<sup>2</sup> 拷贝 DNA 样本; 5:10 拷贝 DNA 样本; 6:阴性对照; 7:DL2000 DNA 相对分子质量标准

图2 巢式 PCR 法检测普氏立克次体 DNA



横坐标为 DNA 样本拷贝数 1:10; 2:10<sup>2</sup>; 3:10<sup>3</sup>; 4:10<sup>4</sup>; 5:10<sup>5</sup>; 6:10<sup>6</sup>; 7:10<sup>7</sup>。每一个浓度 DNA 在同批内做 4 孔。Ct(循环域值)值的 CV 为 0.5%~1.5%

图3 检测普氏立克次体的荧光定量 PCR 的批内重复性分析



横坐标为 DNA 样本拷贝数 1:10; 2:10<sup>2</sup>; 3:10<sup>3</sup>; 4:10<sup>4</sup>; 5:10<sup>5</sup>; 6:10<sup>6</sup>; 7:10<sup>7</sup>。每一个浓度 DNA 检测 4 次。Ct(循环域值)的 CV 为 0.4%~2.1%

图4 检测普氏立克次体的荧光定量 PCR 的批间重复性分析

表1 荧光定量 PCR 检测普氏立克次体感染豚鼠血 DNA 标本

豚鼠编号	感染后的天数					
	3	6	9	12	15	18
1	0	154.8035	401.9945	278.6532	95.0483	68.2252
2	832.8687	0	0	0	0	0
3	180.8058	0	0	0	0	0
4	297.4707	0	581.0376	95.7145	1337.354	0
5	656.5639	33.1496	0	0	97.1179	642.2511
6	1168.4252	0	0	15.0613	0	35.0836
7	618.3809	0	1026.7162	162.5689	38.3113	251.5528
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0

注:表中数据为定量 PCR 检测样本中普氏立克次体 DNA 的拷贝数

表2 间接免疫荧光法检测感染豚鼠血清的普氏立克次体抗体

豚鼠编号	感染后天数		
	6	12	18
1	1:320	1:1280	1:1280
2	-	-	-
3	-	-	-
4	1:1280	1:5120	1:5120
5	1:2560	1:5120	1:5120
6	1:320	1:320	1:1280
7	-	1:5120	1:1280
8	-	-	-
9	-	-	-

注:表中数据为 IFA 检测豚鼠血清样本的普氏立克次体抗体(IgG)的效价

## 讨论

实时荧光定量 PCR 是目前国际公认的特异性最好、最灵敏、重复性好的核酸定量检测方法。荧光定量 PCR 技术有多种,包括 Amplisensor 法、Molecular beacon 法、TaqMan 探针法等<sup>[9]</sup>,其中以 TaqMan 探针法最好,显著提高了定量检测的敏感性、特异性和重复性,同时可在较短的时间内得到准确的结果。TaqMan-MGB 探针是近几年才出现的新型定量 PCR 技术,由于这种探针的荧光淬灭基团是一种基本无荧光本底的小型凹槽结合物(MGB),使得定量 PCR 检测的荧光本底明显降低,从而提高检测的分辨率。另外,探针结合上这种小型凹槽结合物后,使得探针的 *T<sub>m</sub>* 值有近 10℃ 的提高,从而使探针的杂交稳定性和特异性显著增强<sup>[9]</sup>。

本文采用了新型 TaqMan-MGB 探针建立了检测普氏立克次体的实时荧光定量 PCR。普氏与莫氏立克次体的基因高度同源,在 16S rRNA 基因的

1500 个碱基中普氏与莫氏立克次体仅有 7 个碱基不同<sup>[1]</sup>,难以设计种特异性的引物与探针将它们有效鉴别。但是本文根据普氏立克次体 *ompB* 基因序列设计的特异引物和 TaqMan-MGB 探针,建立的实时荧光定量检测方法能特异地检测普氏立克次体 DNA,而不是莫氏立克次体以及其他立克次体和细菌的 DNA,显示出高度的种特异性。用克隆的 *ompB* 基因片段作为标准 DNA 模板建立标准曲线,循环阈值(*Ct*)与标准 DNA 拷贝数呈线性相关( $r = 0.999$ ),显示该方法很好的定量准确性。用该实时荧光定量 PCR 检测标准 DNA 模板,检测灵敏度约为检测相同目的 DNA 的巢式 PCR 的 100 倍,证明该方法检测普氏立克次体具有高度敏感性。

我们采用巢式 PCR 法检测普氏立克次体感染血样本,检测结果均为阴性。而采用本文建立的荧光定量 PCR 法在感染后的第 3 天一直到第 18 天(实验结束)均从某些豚鼠血样本中检出到普氏立克次体 DNA,说明本文所建立的检测普氏立克次体的实时荧光定量 PCR 具有比巢式 PCR 显著增强的灵敏度,可以对血标本中的微量普氏立克次体进行快速检测。另外,该荧光定量 PCR 检测的结果与 IFA 法检测豚鼠血清普氏立克次体特异性抗体的效价有明显的相关性。由于本文所用的普氏立克次体 E 株为作减毒疫苗的弱毒株,受该弱毒株攻击后某些豚鼠并未建立稳定的感染,表现为血清 IFA 抗体检测和定量 PCR 检测结果均为阴性。

实验证明本文所建立的荧光定量 PCR 方法具有普氏立克次体种特异性和高度的检测灵敏度,可用于临床疑为普氏立克次体感染样本的检测,为流行性斑疹伤寒的早期诊断。普氏立克次体引起的流行性斑疹伤寒与莫氏立克次体引起的地方性斑疹伤

寒在传染源、传播媒介和预防措施上是完全不同的两种疾病<sup>[10]</sup>,该定量 PCR 法将在斑疹伤寒疫情出现时能准确对它们进行快速确认和区分,以便及时采取针对性的防治措施,控制疫情的发展。

#### 参 考 文 献

- 1 俞树荣,陈香蕊.立克次体与立克次体病.第 1 版.北京:军事医学科学出版社,1999.24-31.
- 2 张晶波,温博海,陈梅玲,等.检测贝氏柯克斯体的实时荧光定量 PCR. 中国人兽共患病杂志,2005,21:652-655.
- 3 Archie L. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. Rev Mol Biotechnol,2002,82:279-300.
- 4 Fernandez C, Boutolleau D, Manichanh C, et al. Quantitation of HHV-7 genome by real-time polymerase chain reaction assay using MGB probe technology. J Virol Met,2002,106:11-16.
- 5 Mikula M, Dzwonek A, Jagusztyl KK, et al. Quantitative detection for low levels of *Helicobacter pylori* infection in experimentally infected mice by real-time PCR. J Microbiol Met,2003,55:351-359.
- 6 Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. Am J Trop Med Hyg,2004,70:351-356.
- 7 Brennan RE, Samuel JE. Evaluation *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real time PCR assay. J Clin Microbiol,2003,41:1869-1874.
- 8 崔红,宫占威,张雪颖,等.用种特异性聚合酶链反应检测普氏立克次体的研究. 中国人兽共患病杂志,2002,18:77-79.
- 9 柯昌文,郑夔,张欣,等. TaqMan-MGB 探针实时聚合酶链反应检测登革病毒. 中国人兽共患病杂志,2005,21:716-720.
- 10 常丙功,贺金荣,王士明.斑疹伤寒型别鉴定的研究. 中国公共卫生,2002,18:482.

(收稿日期:2006-03-06)

(本文编辑:张林东)

## · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 本刊 2007 年投稿须知

为提高本刊刊出文章的时效性,缩短文稿的刊出时滞,避免在邮寄过程中的丢失,本刊编辑部决定,请作者投稿前仔细阅读本刊的稿约并予以执行,同时作者可选择两种方式投稿:

①凡采取纸版形式邮寄方式作者务必提供有效的 Email 地址及方便联系电话,本刊编辑部将根据情况采用 Email 或电话与作者联系。

②本刊欢迎采用 Email 方式投稿,但以电子版方式投稿后请电话通知本刊编辑部,同时最好在寄单位推荐信时邮寄一份纸版稿件。

本刊 Email: lxbonly@public3.bta.net.cn

电话: 010-61739449

本刊编辑部