

多重荧光定量PCR甄别霍乱弧菌方法的建立

张政 金大智 朱水荣 叶菊莲 罗芸

【摘要】 目的 利用多重荧光定量PCR技术,建立一种快速、准确、特异甄别霍乱弧菌的定量方法。方法 分别根据霍乱弧菌霍乱毒素A亚单位基因(*ctxA*)和糖基转移酶基因(*LPSgt*)作为检测的靶基因,设计引物和TaqMan-MGB探针,探针的5'端分别用FAM和VIC进行荧光标记,3'端标记MGB。优化PCR扩增体系,对多重实时荧光定量PCR方法的特异性、灵敏度、重复性评价,同时进行一定数量临床样本考核鉴定,与常规方法进行比较。结果 该方法可准确、特异地鉴定霍乱弧菌,同时能够甄别O139群霍乱弧菌。全部的霍乱弧菌用*ctxA*基因对应引物和探针检测均为阳性,其中只有O139群霍乱弧菌出现*LPSgt*基因阳性,其他菌株均无阳性结果。检测的灵敏度为 2×10^2 cfu/ml。同时对收集的45例临床样本进行鉴定,结果显示10例为霍乱弧菌,其中O139群有4例,其余均为阴性结果,与常规鉴定方法一致。结论 研究建立的多重荧光定量PCR方法特异、灵敏、快速,可有效鉴定产毒霍乱弧菌及甄别O139群霍乱弧菌,可用于霍乱监测和防控工作实验室诊断。

【关键词】 霍乱弧菌;多重实时荧光定量PCR

Development of multiplex real time PCR methodology for better identification and discrimination of *Vibrio cholerae* and O139 serotype ZHANG Zheng, JIN Da-zhi, ZHU Shui-rong, YE Ju-lian, LUO Yun. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: ZHANG Zheng, Email: zhzhang@cdc.zj.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Projects of China (No. 2008ZX10004-002).

【Abstract】 Objective To develop a rapid, sensitive and specific assay method, based on multiplex real time PCR for identifying *Vibrio cholerae* and distinguishing *Vibrio cholerae* O139 serotype from *Vibrio cholerae*. **Methods** Cholera toxin A subunit gene (*ctxA*) and glycosyltransferase gene (*LPSgt*) were chosen as targets according to *Vibrio cholerae* and *Vibrio cholerae* O139 serotype, and then the primers and TaqMan-MGB probe were designed. The 5' end of probes was labeled with FAM and VIC fluoresceins respectively while the 3' end of probes was labeled with MGB. The PCR reaction was optimized systematically. Then the specificity, sensitivity and reproducibility of multiplex real time PCR were estimated. Finally, multiplex real time PCR was applied to detect the clinical specimens. **Results** *Vibrio cholerae* was identified by multiplex real time PCR accurately and quickly, which could distinguish *Vibrio cholerae* O139 serotype from *Vibrio cholerae*. *Vibrio cholerae* was identified positive for primer pairs and probes from *ctxA* gene, and *Vibrio cholerae* O139 serotype tested was positive for *LPSgt* gene. Meanwhile, none of other bacteria was identified. Sensitivity of the test was 2×10^2 cfu/ml. When this assay was applied directly to identify 45 clinical specimens, results showed that 10 were positive to *Vibrio cholerae*, in which 4 clinical specimens were positive to *Vibrio cholerae* O139 serotype. All the results were the same to the one that had been obtained from the conventional assays. **Conclusion** Our results showed that the multiplex real time PCR was a reliable, accurate and feasible method for identifying *Vibrio cholerae* that carrying toxin gene and distinguishing *Vibrio cholerae* O139 serotype from *Vibrio cholerae*. This method could be applied to the cholera surveillance, prevention and control system for identifying and distinguishing *Vibrio cholerae* in the labs.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Multiplex real time PCR

霍乱是危害严重的夏秋季急性肠道传染病,迄

今仍然是发展中国家面临的重大公共卫生问题之一。霍乱弧菌常规检测以传统培养方法为主,不仅操作繁琐,耗时长,而且容易污染,因此建立一种快速、敏感、特异的检测方法对霍乱防治工作具有十分

重要的意义^[1]。霍乱弧菌抗原包括耐热的菌体抗原O与不耐热的鞭毛抗原H,O抗原具有群和型特异性,是霍乱弧菌分类的基础,根据O抗原的特异性可分为O1群、O139群和非O1、非O139群,目前认为只有前两者可引起霍乱流行。霍乱弧菌的主要毒力因子是霍乱毒素,是一种外毒素,具有很强的抗原性,而且霍乱毒素基因的保守性相当高,由霍乱弧菌染色体上一种称为CTX的溶原性丝状噬菌体基因组中的*ctxAB*所编码;产霍乱肠毒素的O1群和O139群霍乱弧菌致病性和流行性强,能引起霍乱的大流行^[2],在霍乱的防治上具有重要意义。编码糖基转移酶基因(*LPSgt*)是霍乱弧菌O139群特异基因,可以作为检测霍乱弧菌O139群的靶基因^[3,4]。双重荧光定量PCR技术具有敏感、特异、快速、简便及污染可能性低等特点,目前已经应用到病原菌诊断领域^[5,6]。本实验根据霍乱弧菌肠毒素A亚单位基因(*ctxA*)和O139群霍乱弧菌特异性*LPSgt*为待扩增序列设计了PCR引物和TaqMan-MGB探针,对产毒霍乱弧菌进行鉴定的同时,对O139群霍乱弧菌进行甄别。

材料与与方法

1. 标准菌株:本实验采用的O139群霍乱弧菌标准株MO45和地方株、O1群霍乱弧菌小川型、O1群霍乱弧菌稻叶型、非O1、非O139群霍乱弧菌(分离株)及其他常见病原菌,如福氏志贺菌、宋内志贺菌、空肠弯曲菌、肠产毒性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠出血性大肠埃希菌O157:H7、小肠结肠炎耶尔森菌、河弧菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、丙型副伤寒沙门菌、枸橼酸杆菌、肠球菌等58株标准菌株或分离株,均由浙江省疾病预防控制中心菌种室提供。

2. 方法:

(1) 模板制备:取200 μl含有标准菌株的培养液,10 000 r/min离心5 min,弃上清,加入25 μl纯水重悬后,煮沸10 min,10 000 r/min离心2 min,取上清液作为模板-20℃备用。为了进行灵敏度评价,采用平板稀释法制备系列10倍梯度稀释的标准品。临床采集的样本按照常规方法(卫生行业标准:WS 289-2008)进行前增菌,6~8 h后,煮沸裂解10 min,12 000 r/min离心2 min,取上清液作为模板,待用。

(2) 仪器和试剂:本实验采用ABI7000实时定量

PCR仪(ABI公司);icycler PCR仪(BioRad公司);比浊仪(法国梅里埃公司);Taq酶、dNTPs等实时荧光定量PCR相关试剂、DNA凝胶回收试剂盒(DV805A)购自宝生物工程(大连)有限公司,pGEM-T试剂(A3600)和质粒提取试剂盒购自Promage公司。

(3) 引物和探针设计与合成:在GenBank数据库中下载*ctxA*基因(AB449339)和*LPSgt*基因(VCU72485)序列,用Primer Express 3.0软件设计引物和探针,PCR产物长度分别为58 bp和126 bp。*ctxA*基因上游引物F1:5'-GTT TCC CTC CGG AGC ATA GAG-3';下游引物R1:5'-CGG CGG TGC ATG ATG AA-3';探针P1:5'(FAM)-TTG GAG GGA AGA GCC-(MGB)-3';*LPSgt*基因的上游引物F2:5'-AAT GAA GTG CTT ACA TCT ATA GGG ATT G-3';下游引物R2:5'-AAG ATG CGC TCT TAT CAT ATC ACA A-3';探针P2:5'-(HEX)AAT GAG CGC ATT ATT AAC-(MGB)-3',引物和探针均由上海超世生物科技有限公司合成并纯化。

(4) 双重实时荧光定量PCR扩增:荧光定量PCR扩增体系和反应条件,PCR反应体系为20 μl,包括1×PCR buffer,0.2 mmol/L dNTPs,5 mmol/L MgCl₂,F1:0.25 μmol/L,R1:0.25 μmol/L,F2:0.5 μmol/L,R2:0.5 μmol/L,P1:0.1 μmol/L,P2:0.25 μmol/L,模板DNA 2 μl(40~100 ng),Taq酶0.25 U,用ddH₂O补足至20 μl。PCR反应条件为95℃预变性5 min;95℃30 s,60℃40 s,共40个循环,荧光采集在每个循环的退火温度时进行。

3. 样本评价:应用本实验所建立的双重实时荧光定量PCR方法,对收集的45份临床样本进行鉴定,基因组DNA提取和实时荧光定量PCR扩增条件同上。

结 果

1. 特异性评价:本实验选取两个基因主要是对产毒霍乱弧菌进行鉴定的同时,甄别O139群霍乱弧菌,*ctxA*基因是产毒霍乱弧菌特异性的片段,目前已经有关报道建立了PCR和实时荧光定量PCR检测方法,*LPSgt*基因是O139群霍乱弧菌特异性基因,本实验室在前期工作中已经建立了单重荧光定量PCR方法。通过BLAST序列比对后,设计引物和TaqMan-MGB探针,通过对多种标准菌株进行鉴定,结果显示产毒霍乱弧菌均出现*ctxA*基因阳性,O139群霍乱弧菌出现*ctxA*基因和*LPGst*基因阳性,S形扩

增曲线较为明显。而非产毒霍乱弧菌均未出现阳性信号,结果见图 1。上述结果说明本实验建立的多重实时荧光定量 PCR 特异性较好。

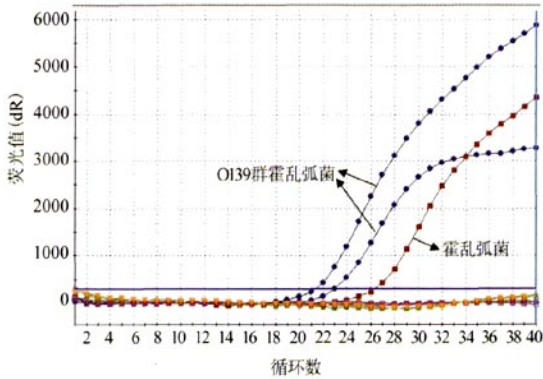


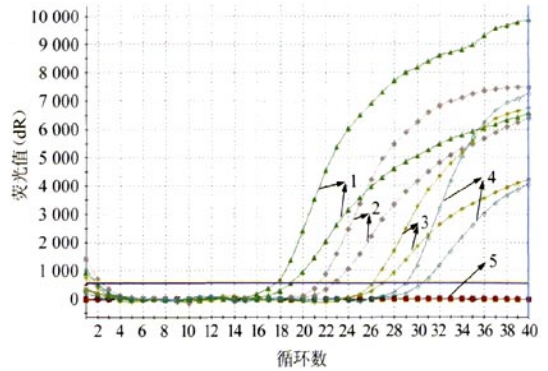
图 1 特异性扩增结果

2. 双重实时荧光 PCR 检测的灵敏度: 将 O139 群霍乱弧菌标准株采用平板计数法进行计数得到初始浓度 (cfu/ml), 再制成系列 10 倍梯度稀释的标准品, 稀释的线性范围为 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^1$ cfu/ml, 按照本文“方法 (3)”进行基因组 DNA 提取, 然后进行双重实时荧光 PCR 检测。根据每个反应管测定的 C_t 值与管中所含模板浓度之间的对应关系, 分别得到双重实时荧光定量 PCR 检测 O139 群霍乱弧菌 *ctxA* 基因和 *LPSgt* 基因的灵敏度, PCR 扩增结果见图 2。结果显示含有 2×10^2 cfu/ml DNA 模板的反应管中为出现荧光信号, 因此, 本试验所建立方法的灵敏度为 2×10^2 cfu/ml。为了定量分析待检模板浓度, 根据模板浓度与扩增阳性的 C_t 值之间存在的关联性, 制备的标准曲线如图 3 所示。 *ctxA* 基因的标准曲线是 $Y = -3.871 \times \log(X) + 34.61$, *LPGst* 基因的标准曲线是 $Y = -3.848 \times \log(X) + 33.27$ 。式中 Y : 对应的 C_t 值; X : 细菌的 cfu/ml, r^2 值分别为 0.998 和 0.992。上述结果说明本实验建立的标准曲线线性关系较好, 能够通过标准曲线对未知浓度的样本进行定量。

3. 检测的重复性评价: 对 10 倍系列稀释的霍乱弧菌中的 2 个不同浓度梯度 (2×10^5 cfu/ml, 2×10^3 cfu/ml), 每个做 3 次重复试验, 计算不同浓度模板各重复反应 C_t 值之间的变异系数, 分别为 0.871%、0.569%。对于检测方法来说, 统计结果的变异系数 CV 值 $< 5\%$ 即可以认为该方法的重复性良好。从本文的结果显示, 该试验所建立的方法 CV 值 $< 5\%$, 因此该方法具有较好的重复性。

4. 临床样本检测: 应用多重实时荧光定量 PCR 对收集的 45 份样本进行检测, 同时用常规培养法验

证多重实时荧光 PCR 检测结果的正确性。结果显示本实验所建立的方法检测到 10 例霍乱弧菌阳性, 其中包括 O139 群霍乱弧菌有 4 例, 其余均为阴性结果, 与常规鉴定方法一致 (图 4)。



注: 1~5 号分别为 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^1$ cfu/ml
图 2 标准曲线 PCR 扩增结果

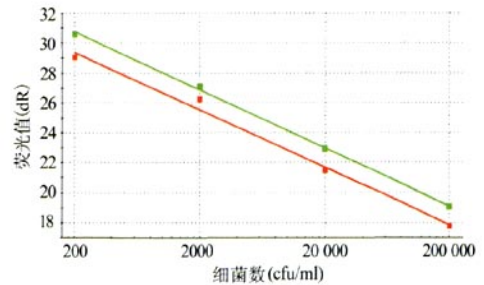


图 3 多重荧光定量 PCR 标准曲线

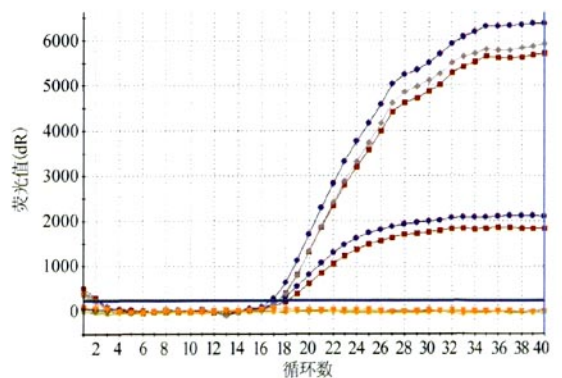


图 4 多重实时荧光定量 PCR 检测临床样本的结果

讨 论

目前霍乱弧菌的分子生物学检测技术, 主要为 PCR、实时荧光定量 PCR 和基因芯片等方法, 利用这些技术已经研发出很多针对 O1 群霍乱弧菌和 O139 群霍乱弧菌的检测方法^[3,4,7-12], 选择的靶点均是该致病菌特异性基因。多重实时荧光定量 PCR 方法是

近几年在实时荧光PCR基础上发展起来的,随着荧光标记种类的不断增多,如FAM、VIC、HEX、ROX、Cy5等,因此同时进行PCR扩增的引物数量也不断增多。据文献报道,实时荧光定量PCR检测霍乱弧菌的方法有很多,但是都是检测单一基因,检测的结果不完整。因此,有必要建立一种既能对霍乱弧菌进行准确鉴定,又能对血清群进行有效甄别的方法。

对于多重实时荧光定量PCR反应,关键的是选取靶基因的特异性及排除体系中多种荧光素之间的干扰造成检测结果不稳定。因此,在选取特异性靶基因作为检测位点的同时,对体系中引物和探针的浓度及Mg²⁺浓度等因素进行系统优化,最终获得了较好的反应体系和反应条件。本实验在最初筛选引物和探针的过程中,两条探针各自的单重实时荧光PCR均得到较好的扩增结果,但是将探针混合到同一个体系中时,出现了标记HEX荧光素的探针完全没有信号,说明FAM荧光素完全干扰了HEX荧光素,所以对引物探针浓度比例进行优化,结果显示标记FAM的探针终浓度要低于标记HEX的探针终浓度。

通过特异性实验和重复性结果显示,本方法重复性良好,结果稳定可靠,特异性好,完全满足检测需要。灵敏度可达到 2×10^2 cfu/ml,与单重荧光定量PCR相比低一个数量级,说明多重PCR对于检测的灵敏度还是有影响。同时通过细菌浓度与Ct值的相关性制备了标准曲线,通过该标准曲线可以准确地计算被测菌株的浓度。在进一步的工作中,本实验室正在探索进行三重以上实时荧光定量PCR检测,通过标记不同波长的荧光分子,优化不同引物和探针的浓度,尽量避免干扰。同时,对现有的实时荧光定量PCR方法进行更大规模的样本考核,更加系统地评价其实用性。

本实验根据*ctxA*和*LPSgt*为待扩增序列设计了PCR引物和TaqMan-MGB探针,能够对产毒霍乱弧菌进行鉴定的同时甄别O139群霍乱弧菌。检测灵敏度达到 2×10^2 cfu/ml,重复性较好,对45例临床样本检测结果显示本方法快速、准确、操作简便,结果完整可靠。在进一步的工作中,应该从提高本方法的灵敏度和特异性等方面进行系统的研究,使其能够应用到样本初筛和实验室霍乱弧菌快速诊断。

参 考 文 献

[1] Chatterjee S, Ghosh K, Raychoudhuri A, et al. Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during 2003. *J Med*

Microbiol, 2007, 56: 824-832.

- [2] Lizárraga-Partida ML, Quilici ML. Molecular analyses of *Vibrio cholerae* O1 clinical strains, including new nontoxic variants isolated in Mexico during the cholera epidemic years between 1991 and 2000. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(5): 1364-1371.
- [3] Jin DZ, Chen SH, Xu XJ, et al. Detection and Identification of *Escherichia coli* O157: H7 and *Vibrio cholerae* O139 using oligonucleotide microarray. *BMC: Infectious Agents and Cancer*, 2007, 2: 23.
- [4] Zhang Z, Jin DZ, Zhu SR, et al. Study on *Vibrio cholerae* O139 detection by real time PCR. *Chin J Health Laborat Technol*, 2008, 18(8): 1477-1479. (in Chinese)
- 张政, 金大智, 朱水荣, 等. 实时荧光定量PCR检测O139群霍乱弧菌研究. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(8): 1477-1479.
- [5] Sachithanandham J, Ramamurthy M, Kannangai R, et al. Detection of opportunistic DNA viral infections by multiplex PCR among HIV infected individuals receiving care at a tertiary care hospital in South India. *Indian J Med Microbiol*, 2009, 27(3): 210-216.
- [6] Omiccioli E, Amagliani G, Brandi G, et al. A new platform for real-time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiol*, 2009, 26(6): 615-622.
- [7] Xu XJ, Wen SY, Chen SH, et al. Detection of *Vibrio cholerae* O139 by using multiplex PCR. *Heilongjiang Animal Sci Vet Med*, 2006, 3: 74-75. (in Chinese)
- 徐晓静, 文思远, 陈苏红, 等. 应用多重PCR方法检测霍乱弧菌O139. *黑龙江畜牧兽医*, 2006, 3: 74-75.
- [8] Xu XJ, Wen SY, Chen SH, et al. Detection and identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and *Vibrio cholerae* O139 using genechip technology. *Bull Ac Military Medical Sciences*, 2006, 30(2): 122-126. (in Chinese)
- 徐晓静, 文思远, 陈苏红, 等. 基因芯片技术鉴定出血性大肠杆菌O157: H7和霍乱弧菌O139. *军事医学科学院院刊*, 2006, 30(2): 122-126.
- [9] Gómez-Duarte OG, Bai J, Newell E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 63(1): 1-9.
- [10] Singh DV, Mohapatra H. Application of DNA-based methods in typing *Vibrio cholerae* strains. *Future Microbiol*, 2008, 3(1): 87-96.
- [11] Hoshino K, Yamasaki S, Mukhopadhyay AK, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1998, 20: 201-207.
- [12] Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4685-4693.

(收稿日期: 2010-01-04)

(本文编辑: 张林东)