

致病性钩端螺旋体 TaqMan Real-time PCR 检测技术的建立及其应用

张翠彩 李秀文 聂一新 杨会棉 蒋秀高

【摘要】 目的 建立致病性钩端螺旋体(钩体)TaqMan Real-time PCR 检测技术。方法 以钩体 16S rRNA 基因的部分片段 *rrs* 基因作为靶基因,设计引物、TaqMan 探针,PCR 产物克隆到 pMD19-T 载体,制作标准曲线,建立定量分析质控标准。利用中国 15 群 15 型致病性钩体参考菌株、16 群 21 型非致病性钩体参考菌株、50 株不同血清群致病性分离株及伯氏疏螺旋体、嗜肺军团菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌等 27 株其他常见致病菌检验引物、探针的灵敏性、特异性。将 Real-time PCR、普通 PCR 同时应用于倍比稀释致病性钩体染色体 DNA 及 25 份现场鼠肾标本的检测。结果 建立、优化致病性钩体 Real-time PCR 技术,致病性钩体扩增荧光信号阳性,非致病性钩体及其他非钩体菌均无扩增。对于倍比稀释的质粒标准品,Real-time PCR 和普通 PCR 的最低检测下限分别是 10 copy/ μ l 和 10⁴ copy/ μ l。对于倍比稀释的钩体染色体 DNA,两者的最低检测下限分别为:100 fg/ μ l 和 1 ng/ μ l。25 份现场鼠肾标本检测显示,两种方法的检测结果一致。结论 以 *rrs* 为靶基因建立的 Real-time PCR 技术,具有较高的灵敏度和特异度,可用于致病性钩体的病原学检测。

【关键词】 钩端螺旋体; TaqMan; Real-time PCR

Establishment and application of TaqMan Real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* species ZHANG Cui-cai, LI Xiu-wen, NIE Yi-xin, YANG Hui-mian, JIANG Xiu-gao. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: JIANG Xiu-gao, Email: jiangxiugao@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Mega-Projects of China (No. 2008ZX10004-002, 2008ZX10004-008).

【Abstract】 Objective To develop and evaluate a TaqMan Real-time PCR method for the detection of pathogenic *Leptospira* species. Methods *rrs* gene of part fragment on 16S rRNA was used to design primers and TaqMan probe. The target gene was cloned into vector pMD19-T in order to make the standard curve and be used for quality control. To determine the specificity and sensitivity, DNA from Chinese *Leptospira* strains belonging to 15 pathogenic reference strains, 21 non-pathogenic reference strains, and 50 different serotypes of pathogenic isolates as well as 27 other micro-organisms were included in this study. Eight serial DNA dilutions from pathogenic *Leptospira* and DNA from 25 kidney tissues were detected by Real-time PCR and conventional PCR simultaneously. Results A Real-time PCR methodology was developed and optimised. All the pathogenic *Leptospira* gave a positive amplification. Non-pathogenic *Leptospira* and all the other micro-organisms were not amplified. The plasmid sensitivity of Real-time PCR and conventional PCR were 10 copy/ μ l and 10⁴ copy/ μ l respectively. The DNA sensitivity of Real-time PCR and conventional PCR were 100 fg/ μ l and 1 ng/ μ l respectively. The kidney tissue detection of the two methods appeared to be exactly the same. Conclusion This research project successfully developed a Real-time PCR methodology with better sensitivity and specificity for the identification of pathogenic *Leptospira*, using the *rrs* gene.

【Key words】 *Leptospira*; TaqMan; Real-time polymerase chain reaction

钩端螺旋体(钩体)病的早期临床症状和流行性感冒极其相似,易延误诊断,因此该病的早期诊断显

得尤为重要。近年来,Real-time PCR 技术逐渐发展起来,其具有高灵敏度,不需电泳分离、读胶等操作,大大减少了实验室 DNA 交叉污染的机会,已被广泛应用于多种病原微生物检测。16S rRNA 基因是核糖体小亚基上一段 1400 bp 左右的相对保守基因,可用于细菌种属的鉴定。本研究参考 2002 年 Smythe

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.015

基金项目:国家科技重大专项(2008ZX10004-002, 2008ZX10004-008)

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钩端螺旋体病室

通信作者:蒋秀高, Email: jiangxiugao@icdc.cn

等^[1]报道,以 16S rRNA 基因的部分序列 *rrs* 基因作为靶基因,建立钩体的 Real-time PCR 检测方法,并观察其灵敏度、特异度、稳定性等指标,以应用于钩体的病原学检测。

材料与方法

1. 菌株来源:本研究选用的致病性钩体 15 群 15 型参考菌株、非致病性钩体参考菌株 16 群 21 型以及 50 株不同血清群地方钩体分离株均为本实验室提供。其他 27 株非钩体菌株 DNA 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所莱姆病室、无形体室、呼吸道传染病室、应急实验室提供,包括伯氏疏螺旋体、查菲埃立克次体、无形体、恙虫病东方体、黑龙江斑点热立克次体、贝氏柯克斯体、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌、嗜肺军团菌、弗氏耶尔森菌、假结核耶尔森菌、沙门菌、雷氏普罗威登斯菌、副溶血性弧菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、大肠埃希菌、肠产毒性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠出血型大肠埃希菌、肠粘附性大肠埃希菌(各 1 株)及小肠结肠炎耶尔森菌(2 株)。

2. 试剂和仪器:硅胶膜型™基因组 DNA 提纯试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒为北京赛百盛基因技术有限公司产品, DNeasy Blood & Tissue Kit 为 Qiagen 公司产品, 中量质粒提取试剂盒为天根生物工程公司产品, 超纯水为 Gibco 公司产品, 100 bp DNA Marker 为北京全式金生物技术有限公司产品, Taq DNA 聚合酶、dNTPs、pMD19-T Vector、JM109 感受态细胞、Premix Ex Taq™ 为 TaKaRa 公司产品。分光光度计为 NanoDrop-1000 Spectrophotomete, 荧光定量 PCR 扩增仪为 ABI-7500 Fast, PCR 扩增仪为德国 SensoQuest-LabCycler, 凝胶成像系统为美国 UVP EC3 Imaging System。

3. Real-time PCR 检测:

(1) 钩体菌基因组 DNA 提取:采用 EMJH 培养基进行钩体培养, 5~10 d 后按硅胶膜型™基因组 DNA 提纯试剂盒推荐步骤进行菌株 DNA 提取。

(2) 引物、TaqMan 探针合成:参考 Smythe 等^[1]报道,以 *rrs* 为靶基因进行引物、探针合成,探针的 5' 端标有报告荧光 FAM, 3' 端标有淬灭荧光 TAMRA(表 1), 由上海基康生物技术中心完成。

(3) 质粒标准品及标准曲线的制备:①质粒制备:以 *rrs* 基因为靶基因,利用 Lepto F、Lepto R 扩增致病性钩体参考菌株黄疸出血群赖型 56601, PCR

表 1 Real-time PCR 所用引物、探针序列及扩增产物长度

引物、探针	序列(5'~3')	产物(bp)
Lepto F	171 CCC GCG TCC GAT TAG	87
Lepto R	258 TCC ATT GTG GCC GR ^{AG} ACAC	
Lepto P	205(FAM)CTC ACC AAG GCG ACG ATC GGT AGC 228 (TAMRA)	

产物大小为 87 bp, 纯化 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体, 导入 JM109 感受态细胞, 筛选阳性克隆子, 提取质粒, 测序验证后作为荧光定量 PCR 的标准品。②质粒拷贝数浓度(copy/μl)换算:用分光光度计测定质粒浓度(ng/μl), 计算质粒拷贝数浓度公式:拷贝数浓度(copy/μl)=(质粒浓度/质粒分子量)×6.02×10²³, 质粒的分子量为 660×(2692+87), 其中 660 是每个碱基的平均分子量, 2692 为 pMD19-T 载体的碱基数。③标准曲线制作及重复性检测:调整质粒浓度, 进行 10 倍系列稀释, 使浓度介于 1.0×10⁷~1.0×10⁹ copy/μl 之间, 进行 Real-time PCR 检测, 每个样本同时做 7 个平行样, 观察 Ct 值的变异大小。

(4) 反应体系及扩增参数:20 μl Real-time PCR 反应体系, 其中含: Premix Ex Taq™ 10 μl, Lepto F (5 pmol/μl) 0.4 μl, Lepto R (5 pmol/μl) 0.4 μl, TaqMan Probe(10 pmol/μl) 0.2 μl, DNA 模板 2 μl, 去离子水 7 μl。扩增参数:95 ℃ 预变性 10 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环。每次扩增均以 56601 克隆质粒为阳性对照, 超纯水为阴性对照。

(5) 引物、探针的特异性检测:致病性钩体参考菌株及地方分离株、非致病性钩体参考菌株以及其他非钩体菌株共计 113 株, 利用 Real-time PCR 进行检测, 以检验引物、探针的特异性。

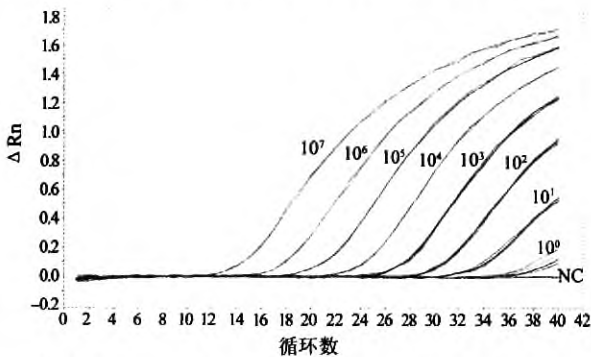
4. 普通 PCR 反应体系、扩增参数及灵敏度检测:应用普通 PCR 对上述倍比稀释质粒标准品进行检测, 确定检测下限。20 μl PCR 反应体系, 其中 DNA 2 μl, Lepto F (5 pmol/μl) 2 μl, Lepto R (5 pmol/μl) 2 μl, dNTP 2 μl, TaKaRa Taq™ 0.5 μl, 10× Buffer 2 μl, 去离子水 9.5 μl。扩增参数:预变性 94 ℃ 10 min, 然后 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 25 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 2 μl 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 EB 染色, 在紫外成像检测系统下观察结果。

5. 钩体基因组 DNA 灵敏度检测:提取钩体 56601 株的基因组 DNA, 用 NanoDrop 分光光度计测定其 DNA 浓度后按 10 倍系列稀释成 1.0 ng/μl~0.1 fg/μl 之间的 8 个不同浓度, 采用 Real-time PCR 和普通 PCR 平行检测, 每个样品同时做 3 个平行样, 确定最低检测下限。

6. 现场鼠肾标本致病性钩体检测:对分离培养阴性的江西省浮梁、龙南地区 25 份现场鼠肾标本采用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取 DNA, 利用 Real-time PCR 和普通 PCR 进行平行检测, 对比两种方法的检测结果。

结 果

1. 标准曲线制备及灵敏度检测:对 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^7$ copy/ μ l 质粒标准品进行 Real-time PCR 检测, 得到扩增曲线和标准曲线(图 1、2), 虽然 1.0×10^0 copy/ μ l 有扩增信号, 但 2 次阴性, 其余 5 次的重复性不好, 所以检测下限定为 10 copy/ μ l。由标准曲线得知, $R^2=0.997$, 扩增效率(Eff%)=100.707, 斜率为-3.305, 表明质粒浓度在 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ copy/ μ l 范围内, 与相应的 C_t 值具有良好的线性相关关系。普通 PCR 对质粒标准品的检测下限为 1.0×10^4 copy/ μ l(图 3)。



注:浓度介于 $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^0$ copy/ μ l 之间, NC 为阴性对照

图 1 质粒标准品系列浓度 Real-time PCR 扩增曲线

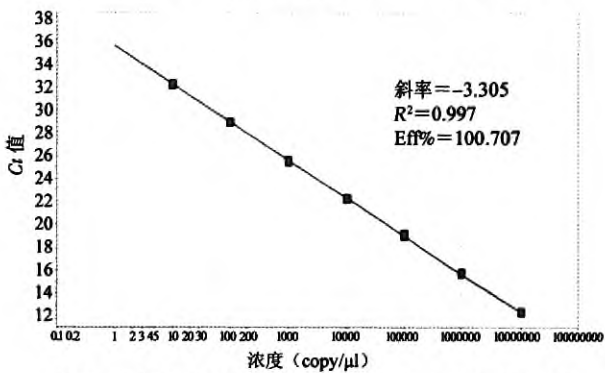
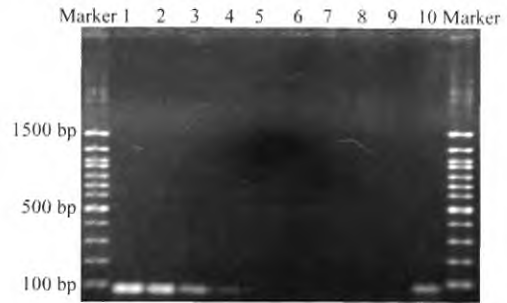


图 2 质粒标准品系列浓度及其对应 C_t 值标准曲线

2. 引物及探针特异性检测:致病性钩体 15 群 15 型参考菌株、50 株不同血清群致病性钩体分离株检测均为阳性, 非致病性钩体 16 群 21 型参考菌株及其他 27 株非钩体菌检测结果为阴性, 特异性良好。

3. 重复性检测:将 10 倍系列稀释质粒标准品进行荧光定量 PCR 扩增, 每管平行重复 7 次, 检测结果(表 2)表明, 1.0×10^0 copy/ μ l 浓度时, 7 管中有 2 管



注:1~8: $1.0 \times 10^7, 1.0 \times 10^6, 1.0 \times 10^5, 1.0 \times 10^4, 1.0 \times 10^3, 1.0 \times 10^2, 1.0 \times 10^1, 1.0 \times 10^0$; 9: 阴性对照; 10: 阳性对照, 单位: copy/ μ l

图 3 质粒标准品普通 PCR 检测下限

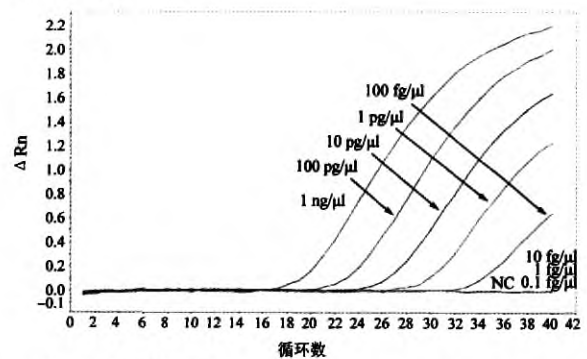
无扩增信号, 其他 5 管标准差为 0.838, 变异系数为 2.32%, 重复性较差。 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ copy/ μ l 范围内, 7 管平行样本结果较稳定, C_t 值变异系数介于 0.56% ~ 1.77% 之间, 重复性良好。

表 2 质粒标准品系列浓度重复性检测结果

平行检测(试管数)	质粒浓度(copy/ μ l)							
	1.0×10^7	1.0×10^6	1.0×10^5	1.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^2	1.0×10^1	1.0×10^0
1	12.77	15.84	19.27	21.76	25.47	28.89	31.61	36.09
2	12.37	15.92	19.18	21.99	25.41	28.98	32.04	35.72
3	12.93	15.84	18.59	21.97	25.60	28.84	32.12	37.17
4	12.65	15.92	18.94	22.19	25.70	28.92	31.75	-
5	12.33	15.79	18.85	21.50	25.34	28.96	31.84	36.76
6	12.44	15.86	19.00	22.25	25.45	28.75	32.05	35.05
7	12.48	16.22	18.56	22.13	25.69	29.35	32.11	-
均值	12.567	15.911	18.913	21.971	25.524	28.956	31.931	36.158
标准差	0.223	0.144	0.270	0.289	0.142	0.191	0.200	0.838
变异系数 (%)	1.77	0.91	1.43	1.32	0.56	0.66	0.63	2.32

注:- 无信号

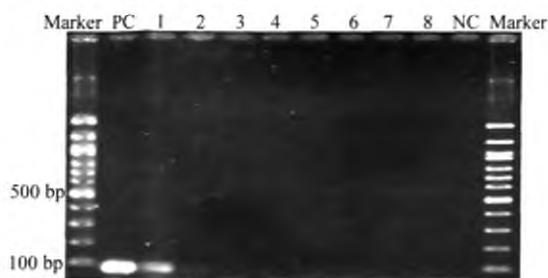
4. 钩体基因组 DNA 灵敏度检测:56601 基因组 DNA 10 倍系列稀释样品, Real-time PCR 的最低检测下限为 100 fg/ μ l(图 4), 普通 PCR 的最低检测下限为 1 ng/ μ l(图 5)。



注:NC 为阴性对照

图 4 钩体基因组 DNA 系列稀释样本的 Real-time PCR 检测下限

5. 现场鼠肾标本致病性钩体检测:对江西省浮



注: PC: 阳性对照; 1~8: 分别为 1.0 ng/μl、100 pg/μl、10 pg/μl、1 pg/μl、100 fg/μl、10 fg/μl、1 fg/μl、0.1 fg/μl; NC: 阴性对照

图 5 钩体基因组 DNA 系列稀释样本的普通 PCR 检测下限
梁、龙南地区现场 25 份鼠肾标本检测, Real-time PCR 和普通 PCR 的检测结果一致, 阳性率为 4%, 阳性标本为同一鼠肾。

讨 论

目前, 国内外学者用于钩体 Real-time PCR 技术的靶基因有 *gyrB*^[2]、*rrs* (16S rRNA gene)^[1]、*secY*^[3]、*lipL32*^[4,5]、*ligA*^[6]、*ligB*^[6] 等。2002 年 Smythe 等^[1] 报道以 *rrs* 为靶基因建立的 Real-time PCR 能够区分致病性和非致病性钩体, 可用于环境水样致病性钩体的检测。2010 年 Thaipadunpanit 等^[7] 分别将 *rrs*、*lipL32* 作为靶基因进行 Real-time PCR, 研究发现: 以 *rrs* 为靶基因建立的 Real-time PCR 灵敏度高于 *lipL32*, 因此本研究初步选用 *rrs* 为靶基因进行钩体 Real-time PCR 的研究。

Real-time PCR 实验中通常以标本的重复性、标准曲线的斜率、扩增效率、相关系数 R^2 等作为判断该技术是否优化的主要参数。为了获得更准确的测量值, 要使标准品的数量级覆盖待测品所在浓度, 一般为 5~6 个对数级, C_t 值介于 8~35 之间较为理想。 R^2 值表示标准曲线回归线与标准反应单个 C_t 值之间的拟合程度, $R^2=1.00$ 表示完全拟合, $R^2>0.99$ 较为理想。标准曲线斜率接近 -3.32 表示最佳。由于 Real-time PCR 具有高度灵敏性, 所以检测下限的确定需要谨慎, 既要有稳定性良好的扩增信号, 又要排除假阳性。本实验中当质粒浓度介于 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ copy/μl 时, 重复性较好, 而质粒浓度为 1.0×10^0 copy/μl 时, 虽然仍有扩增信号, 但是重复性不好, 因此最低检测下限定为 10 copy/μl, 这与文献 [1] 报道结果基本一致。本研究重复性检测发现, 每个系列稀释标准品的平行样本检测结果稳定, C_t 值变异系数介于 0.56%~1.77% 之间, 重复性良好。本研究标准曲线的各项参数表明已建立的钩体 Real-time PCR 检测技术(引物、探针设计、反应体

系、扩增参数)均得到优化。

本研究建立的 Real-time PCR, 对质粒标准品和基因组 DNA 的最低检测下限, 比普通 PCR 要高 3~4 个数量级, 因此具有较好的灵敏度。扩大菌株量验证表明: Real-time PCR 对致病性钩体的检测均为阳性, 而非致病性钩体菌株以及非钩体菌株检测均为阴性, 具有良好的特异度, 该方法能够良好的区分致病性和非致病性钩体。

研究中还检测了 25 份钩体分离培养阴性的鼠肾标本, Real-time PCR 和普通 PCR 的检测结果一致。虽然在此次检测中, Real-time PCR 未表现出明显的灵敏度优势, 分析其原因可能是: 鼠肾标本数有限, 阳性标本较少, 导致两者的阳性率一致。因此, 待后续研究增大样本数量, 以减少偶然性。

目前, 钩体病的血清学诊断方法有多种快诊试剂盒, 而钩体抗体的产生往往需要等到发病 10 d 后才会出现, 因此血清学诊断结果受到病程时间的限制。常规普通 PCR 虽然方便、快捷, 但当宿主体内只有少量菌体感染时灵敏度不高, 易造成假阴性。钩体生长缓慢, 分离培养需 2 周左右的时间, 也不利于其检测。而本研究建立的致病性钩体 Real-time PCR 检测方法, 不需要分离培养大量活菌, 也不必依赖于后期抗体的产生, 具有良好的灵敏度和特异度, 能够区分致病性和非致病性钩体, 可用于临床病例的早期诊断或环境水样致病性钩体的检测, 可成为钩体病病原学监测的有力工具。

参 考 文 献

- [1] Smythe LD, Smith IL, Smith GA, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. BMC Infect Dis, 2002, 2: 13.
- [2] Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, et al. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiol, 2006, 6: 95.
- [3] Ahmed A, Engelberts MF, Boer KR, et al. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. PLoS One, 2009, 4: e7093.
- [4] Levett PN, Morey RE, Galloway RL, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol, 2005, 54: 45-49.
- [5] Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *lipL32* gene. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 64: 247-255.
- [6] Palaniappan RU, Chang YF, Chang CF, et al. Evaluation of lig-based conventional and real-time PCR for the detection of pathogenic *Leptospira* spp. Mol Cell Probes, 2005, 19: 111-117.
- [7] Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, et al. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. PLoS One, 2011, 6: e16236.

(收稿日期: 2011-05-09)

(本文编辑: 张林东)