

立氏立克次体实时荧光定量聚合酶链反应检测方法的建立

牛东升 陈梅玲 温博海 李青凤 邱玲 张晶波

【摘要】 目的 采用 TaqMan-MGB 探针建立立氏立克次体实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测方法。**方法** 依据立氏立克次体外膜蛋白 B 基因序列设计引物和探针,以克隆的 *ompB* 基因片段为 DNA 模板,在 ABI 7900 型荧光定量 PCR 检测仪上建立实时荧光定量 PCR 检测方法。**结果** 建立的定量标准曲线 C_t 值与模板拷贝数呈线性关系($R_2 = 0.996$),最低检测浓度为 5 拷贝/ μl ;用荧光定量 PCR 方法检测其他相关立克次体和常见非立克次体病原菌,检出结果均为阴性。用该方法检测立氏立克次体感染的豚鼠血液标本、小鼠脾脏标本及细胞培养标本,检测的结果与立氏立克次体感染相关。**结论** 研究建立的检测立氏立克次体实时荧光定量 PCR 方法具有高特异性和高敏感性,适用于快速检测各种样本中的立氏立克次体和立氏立克次体感染早期的实验室诊断。

【关键词】 立氏立克次体; 实时荧光定量, 聚合酶链反应; 敏感性; 特异性

Study on the development of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay to detect *Rickettsia rickettsii* NIU Dong-sheng, CHEN Mei-ling, WEN Bo-hai, LI Qing-feng, QIU Ling, ZHANG Jing-bo. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Corresponding author: WEN Bo-hai, Email: bohawen@sohu.com

【Abstract】 Objective To develop a real-time quantitative polymerase chain reaction(PCR) assay for detecting *Rickettsia rickettsii*. **Methods** The primers and TaqMan-MGB probe were designed according to the *ompB* gene of *R. rickettsii*. A DNA fragment of *ompB* gene amplified from *R. rickettsii* by PCR was used as a standard template for the development of the method. **Results** 5 copies of *ompB* fragments of *R. rickettsii* were detected. The genomic DNA of *R. rickettsii* was detected by the developed quantitative PCR assay. However, the genomic DNA from another rickettsial or bacterial agent was not determined. Through this developed method, the positive results were obtained from the animals and cells, artificially infected with *R. rickettsii*. **Conclusion** The real-time quantitative PCR assay seemed to be highly sensitive and specific which might be used to rapidly detect *R. rickettsia* DNA in various samples and to early diagnose patients infected by *R. rickettsii*.

【Key words】 *Rickettsia rickettsii*; Real-time quantitative, polymerase chain reaction assay; Sensitivity; Specificity

立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)是落基山斑点热的病原体,为专性细胞内寄生的小革兰阴性菌,人对其十分易感。目前最常用的实验室诊断方法为血清学方法检测特异性抗体和聚合酶链反应(PCR)检测立氏立克次体 DNA^[1,3]。由于高水平的特异性抗体出现较晚,所以抗体的检测难以作落基山斑点热的早期诊断^[4,5]。PCR 是检测病原体的一种简

便、敏感、特异的分子生物学检测技术,但是由于 PCR 高度敏感,如检测样本或试剂受到微量的目的 DNA 片段污染后很容易产生假阳性结果^[6-9]。实时荧光定量(real-time quantitative)PCR 技术是目前最准确、重现性最好的核酸定量检测方法;本研究依据立氏立克次体外膜蛋白 B 基因序列建立了快速检测立氏立克次体的实时荧光定量 PCR 方法。

材料与方 法

1. 菌株或 DNA:立氏立克次体(R 株)及其他斑点热群立克次体感染的 Vero 细胞,贝氏柯克斯体(新桥株)、普氏立克次体(E 株)和莫氏立克次体

基金项目:国家“九五”科技攻关资助项目(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: bohawen@sohu.com

(Wilmington 株)感染的鸡胚卵黄囊膜,恙虫病东方体(Karp 株)感染的 L929 细胞,以及查非埃立克体和汉赛巴通体基因组 DNA 等均为本室保存。采用标准酚-氯仿法从立克次体感染组织或细胞中提取 DNA 作 PCR 模板。常见非立克次体病原体 DNA 由本所分析微生物学实验室宋亚军博士惠赠(表 1)。

表1 特异性分析所用细菌和立克次体菌株或 DNA

斑点热群立克次体	非斑点热群立克次体	非立克次体病原体
立氏立克次体 R 株	普氏立克次体 Madrid E	出血性大肠埃希菌
扇头婢立克次体 3-7-6	莫氏立克次体 Wilmington	O157:H7 EDL933
派氏立克次体 SF110	恙虫病东方体 Karp	福氏 2a 志贺菌 301
斯洛伐克立克次体 B 株	汉赛巴通体 Houston-1	嗜肺军团菌 12 型
西伯利亚立克次体 246	贝氏柯克斯体 新桥株	牛型布氏杆菌 S2
小蛛立克次体 Kaplan	查非埃立克体 Sapulpa	肺炎链球菌 31004
马赛立克次体 M tul		炭疽芽胞杆菌 A16R
澳大利亚立克次体 Phillips		鼠疫耶尔森菌 EV76
以色列婢传斑疹伤寒立克次体 CDC		伯氏疏螺旋体 太一株
康氏立克次体 Seven		鸚鵡热衣原体 AR39
黑龙江立克次体 054		
新疆立克次体 精河株		

2. 主要试剂:DNA 回收试剂盒购自上海生工公司, T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒和全血基因组 DNA 提取试剂盒为德国 QIAGEN 公司生产;细胞培养试剂均为 Hyclone 产品;荧光定量 PCR 检测专用 96 孔板、盖膜和 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,引物由上海生工公司合成,基因测序由上海华诺公司完成。

3. 实验动物:6 周龄雄性 SPF 级 Balb/c 小鼠及 350 g 左右雄性豚鼠购至军事医学科学院实验动物中心。

4. 主要仪器:PE2400 DNA 热循环仪,ABI7900 型实时荧光定量 PCR 仪,Beckman Du640 核酸定量仪。

5. 探针和引物:采用 ABI Primer Express 2.0 软件,依据立氏立克次体 *ompB* 基因序列,设计引物 Rr514F(5'-TGA AGA TAC TAC CTT AGG GTT CAT CAC TA-3')和 Rr589R(5'-ACC GGC ATT AAG CGT AAG GTT-3'),探针 Rr544P(5'-TGT TGT TCA TAA CGC TCA C-3')。该引物所扩的 *ompB* 基因片段为 76 bp,序列如下:5'-tgaagatactaccttagggttcatcacta a tggtgttcataacgctc actccttt aaccttacgcttaatgccggt-3',划线者依次为上游引物、探针和下游引物。

6. 标准 DNA 模板:用 PCR 方法扩增立氏立克次体 *ompB* 基因片段,扩增引物为 Rr190F(5'-GAC AAA AAT TAT GGC TCA AAA ACC-3')和 Rr1233R(5'-GTT GCT ACC TTA CCA TTA TCT ACG-3')。用 DNA 回收试剂盒从电泳后的琼脂糖凝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 pMD18-T 载体, T 载体克隆的目的 DNA 片段作为标准 DNA 模板。使用 Beckman Du640 核酸定量仪测定 DNA 模板量,从 10^7 拷贝/ μl 系列稀释质粒至 5 拷贝/ μl ,作为绝对定量的标准品。

7. 荧光定量 PCR 反应体系:采用 25 μl 反应体系:每个反应中含 12.5 μl TaqMan Universal PCR Master Mix, 5 μl 引物和探针混合物 [100 μl 体系中含引物各 3 μl (50 μmol), 探针 2 μl (50 μmol), 92 μl 去离子水], 5.5 μl 去离子水, 2 μl DNA 模板。扩增条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 然后以 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 循环 45 次。

8. 小鼠感染实验:取 21 只 Balb/c 小鼠,随机分为 7 组,每组 3 只,以立氏立克次体感染的鸡胚卵黄囊膜匀浆悬液 0.5 ml (约含 1×10^7 立氏立克次体)腹腔注射感染每只小鼠。感染后每天处死一组小鼠,用试剂盒从收集的小鼠抗凝血和脾脏样本中分别提取 DNA 作模板,以荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。

9. 豚鼠感染实验:取 6 只豚鼠,以立氏立克次体感染的鸡胚卵黄囊膜匀浆悬液 0.5 ml (约含 1×10^7 立氏立克次体)腹腔注射感染每只豚鼠。感染后每天测量体温,在发热第 1 天(感染后第 3-4 天)心脏采血,用试剂盒从抗凝血中提取 DNA 作模板,以荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。

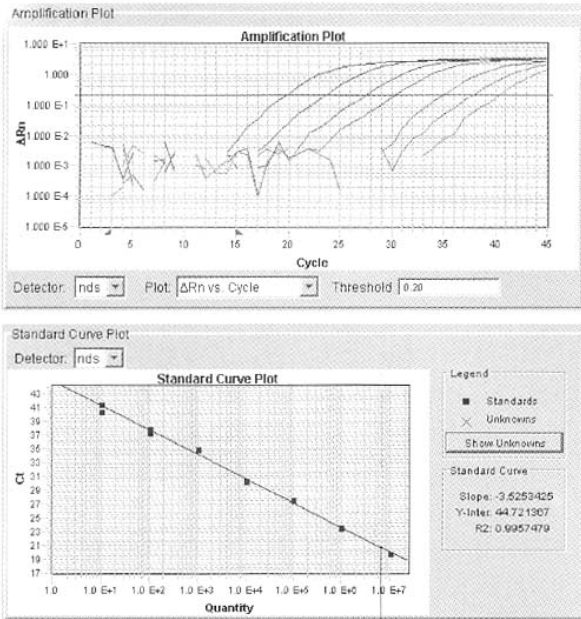
10. 细胞感染实验:以立氏立克次体感染的鸡胚卵黄囊膜匀浆悬液感染 3 瓶生长旺盛的单层 Vero 细胞,感染后第 3、5、7、9 天各吸取培养上清 2 ml,用试剂盒从感染细胞中提取 DNA,以荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。

结 果

1. 标准曲线的建立:稀释的立氏立克次体标准 DNA ($0.5 \times 10^7 \sim 5$ 拷贝/ μl), 将其分别加到反应体系中作荧光定量 PCR 反应。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,该方法检测的立氏立克次体最低能够检测到 5 拷贝/ μl 的

模板 DNA, 立氏立克次体标准品 DNA 的拷贝数与循环数(C_t)的相关值(R_2)为 0.996。

2. 特异性分析: 用荧光定量 PCR 分别检测了其他斑点热群立克次体和非斑点热立克次体, 以及其他 11 种常见非立克次体病原菌的 DNA 样本, 除恙虫病东方体有微弱信号外($C_t > 40$), 其他均未见荧光信号。



注: 上图纵坐标 E+1 为 $\times 10^1$, E-1 为 $\times 10^{-1}$ 余此类推

图1 立氏立克次体标准扩增曲线的建立

3. 立氏立克次体感染小鼠的血液和脾脏标本的检测: 用该荧光定量 PCR 检测小鼠血和脾脏样本 DNA。结果在感染小鼠的血液中未检测到立氏立克次体 DNA, 在感染第 2 天以后的小鼠脾脏中可检测到立氏立克次体 DNA 存在, 第 5 天达到高峰(图 2)。

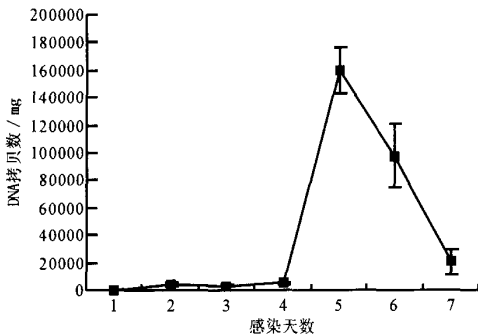


图2 荧光定量 PCR 检测立氏立克次体在小鼠脾脏中的增殖情况

4. 立氏立克次体感染豚鼠血液标本的检测: 以荧光定量 PCR 检测立氏立克次体感染豚鼠的血 DNA 样本。结果在发热第 1 天的豚鼠血液中即检测到了立氏立克次体 DNA(表 2)。

表2 荧光定量 PCR 检测立氏立克次体在豚鼠血液中的增殖情况

豚鼠编号	C_t 值($\bar{x} \pm s$)	DNA 数/ml 全血($\bar{x} \pm s$)
1	37.70 \pm 0.48	1.71 $\times 10^4 \pm$ 6.61 $\times 10^3$
2	38.46 \pm 0.30	6.09 $\times 10^3 \pm$ 5.49 $\times 10^3$
3	39.14 \pm 0.76	5.95 $\times 10^3 \pm$ 3.51 $\times 10^3$
4	40.79 \pm 1.03	1.75 $\times 10^3 \pm$ 1.08 $\times 10^3$
5	40.47 \pm 1.12	2.32 $\times 10^3 \pm$ 1.50 $\times 10^3$
6	42.27 \pm 1.62	6.75 $\times 10^2 \pm$ 5.23 $\times 10^2$

5. 立氏立克次体感染 Vero 细胞标本的检测: 以 1×10^7 立氏立克次体感染单层 Vero 细胞(75 cm^2 细胞培养瓶), 感染后第 3、5、7、9 天换液并取培养上清提取 DNA, 以荧光定量 PCR 检测立氏立克次体在细胞中的增殖情况。结果显示在第 3 天的培养上清中存在大量立氏立克次体, 以后检出数逐渐递减(图 3)。

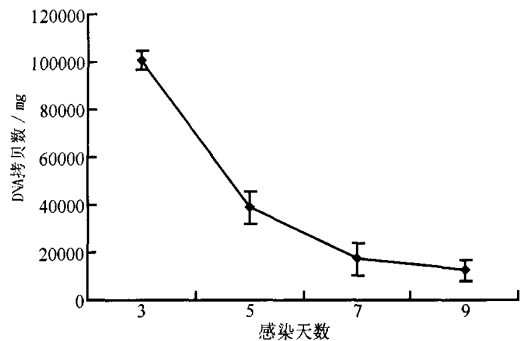


图3 荧光定量 PCR 检测立氏立克次体在 Vero 细胞中的增殖情况

讨 论

对于病原体的快速检测与鉴定的常用分子生物学方法有 PCR 和 DNA 探针杂交, 但这两种方法都存在不足之处, 需要相互印证才能确保检测结果的可靠性。1996 年, 美国 Applied Biosystems 公司推出实时荧光定量 PCR 技术, 是一种将 PCR 与液相探针杂交相结合的新的核酸检测技术。其原理是在 PCR 扩增的同时加入一个特异性的寡核苷酸探针, 该探针 5' 端标记一个报告荧光基团, 3' 端标记一个淬灭荧光基团; 当探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; 随着 PCR 的进行, 当引物延伸至探针位置, Taq 酶的 5' \rightarrow 3' 外切酶活性将探针

的 5' 端的荧光分子切下,使淬灭分子失去对荧光分子的淬灭作用,从而使荧光分子发出荧光。切下的荧光分子数与 PCR 产物的数量成正比,因此依据 PCR 反应液的荧光强度即可计算出初始模板的量。该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,与常规 PCR 相比,具有特异性更强、敏感性更高、有效解决 PCR 污染、自动化程度高等特点。2001 年 ABI 公司又推出了新型 TaqMan MGB 探针技术,与常规 TaqMan 荧光探针相比,MGB 荧光探针 3' 端结合了小型凹槽结合物,使得探针的 T_m 值提高,大大增加了探针的杂交稳定性。此外,MGB 探针还具有荧光本底低、杂交特异性强、探针长度缩短等优越性。TaqMan MGB 荧光探针的这些优势使定量 PCR 的敏感性和特异性得到进一步提高^[10-12]。

我们采用 TaqMan MGB 探针建立了立氏立克次体实时 PCR 快速检测方法,该方法检测立氏立克次体具有较高的敏感性,最低能够检测 5 拷贝/ μl 的模板 DNA,且立氏立克次体标准品 DNA 的拷贝数与循环数呈线性相关($R_2 = 0.996$),即起始拷贝数越多, C_t 值越小。利用已知拷贝数的质粒标准品作出标准曲线[其中横坐标代表起始拷贝的对数,纵坐标代表 C_t 值(图 1)],在每次实时荧光定量 PCR 反应中,根据待检样品的 C_t 值,控制计算机即可根据标准曲线自动计算出待检样品的基因拷贝数,从而判断待检样品的检测结果。用本方法检测其他斑点热立克次体的 DNA 样本结果均为阴性(拷贝数为 0),用它检测非斑点热群立克次体和其他 11 种常见病原体的 DNA 样本检测中,除恙虫病东方体有微弱信号外,其他均未见荧光信号,表明该方法具有很好的立氏立克次体种特异性。

用实时荧光定量 PCR 法检测感染豚鼠第 1 天发热的血标本,结果 6 份标本中均检测到立氏立克次体 DNA,说明该方法可用于立氏立克次体感染的早期诊断。用它检测立氏立克次体感染细胞标本,感染后第 3 天的细胞培养上清中即可检出大量立氏立克次体,以后检出数逐渐递减,与文献报道立氏立克次体感染 Vero 或 L929 细胞 72 小时左右,大量立氏立克次体逃出宿主细胞进入培养液的结果一致^[13],表明该方法可对立氏立克次体在培养细胞中增殖作实时监测。采用该实时荧光定量 PCR 方法分析立氏立克次体感染小鼠脾脏样本,结果发现感染后第 2 天脾脏存在少量立氏立克次体,其后脾脏

中立氏立克次体量逐渐增多,于第 5 天达到高峰,随后逐渐下降。由于 Balb/c 小鼠并非立氏立克次体感染的敏感动物,所引起的感染可以被小鼠自身的免疫系统所克服。

以上实验表明,我们建立的实时荧光定量 PCR 方法具有立氏立克次体种的特异性,和高度敏感性及稳定性,可应用于立氏立克次体感染的早期诊断,也可用于不同样本中的立氏立克次体的检测,为检测立氏立克次体生物恐怖剂提供一种快速、敏感的检测方法。

参 考 文 献

- 1 LaScola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2715-2727.
- 2 Walker DH. Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. *Clin Microbiol Rev*, 1989, 2: 227-240.
- 3 Hechemy KE, Anacker RL, Carlo NL, et al. Absorption of *Rickettsia rickettsii* antibodies by *Rickettsia rickettsii* antigens in four diagnostic tests. *J Clin Microbiol*, 1983, 17: 445-449.
- 4 Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*, 2001, 32: 897-928. Erratum: *Clin Infect Dis*, 2001, 33: 749.
- 5 Raoult D, Dasch GA. Immunoblot cross-reactions among *Rickettsia*, *Proteus* spp. and *Legionella* spp. in patients with Mediterranean spotted fever. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995, 11: 13-18.
- 6 Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 2866-2868.
- 7 Gage KL, Gilmore RD, Karstens RH, et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in saliva, hemolymph and triturated tissues of infected *Dermacentor andersoni* ticks by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*, 1992, 6: 333-341.
- 8 Tange Y, Matsumoto M, Okada T, et al. Detection of DNA of causative agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan from the patient's blood sample by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, 1994, 38: 665-668.
- 9 Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ. Detection of spotted fever group *rickettsiae* in ticks and rodents by polymerase chain reaction technique in People's Republic of China. *Acta Virol*, 1995, 39: 263-267.
- 10 Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 655-661.
- 11 Afonina IA, Zivarts M, Kutyavin I, et al. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 2657-2660.
- 12 Afonina IA, Reed MW, Lusby E, et al. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *Biotechniques*, 2002, 32: 940-949.
- 13 Wiseman CL, Edlinger Jr EA, Waddell AD, et al. Infection cycle of *Rickettsia rickettsii* in chicken embryo and L-929 cells in culture. *Infect Immun*, 1976, 14: 1052-1064.

(收稿日期: 2005-07-14)

(本文编辑: 尹廉)