

· 实验研究 ·

聚合酶链反应和地高辛标记的核酸杂交技术用于钩端螺旋体的检测

王兆芬 蒋秀高 耿排力 聂一新 李秀文

【摘要】 目的 为钩端螺旋体快速诊断和流行病学调查建立一种比较理想的方法。方法 根据钩端螺旋体赖株 DNA 合成一对 *flaB* 引物,用 PCR 技术对钩端螺旋体菌株、疫区现场动物标本等进行 *flaB* 基因扩增,用地高辛(DIG)标记 *flaB* 基因探针,用琼脂糖凝胶电泳和斑点杂交技术进行检测。结果 纯化钩端螺旋体 DNA 5 pg 经 *flaB*-PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳可以目测。用 DIG 标记的 *flaB* 探针可以检测到 5 fg 及以下的 DNA 扩增产物。疫区 70 份蛙肾标本,分离细菌 8 株,阳性率 11.43%。*flaB* 扩增阳性 14 份,阳性率 20%; DIG 标记探针斑点杂交检测,阳性 19 份,阳性率为 27.14%。结论 PCR-斑点杂交是一种灵敏、特异、快速的钩端螺旋体检测方法,既可用于快速检测和早期诊断,也可用于疫情监测和流行病学调查。

【关键词】 钩端螺旋体;聚合酶链反应;地高辛探针

The detection of *Leptospira interrogans* by polymerase chain reaction and hybridization of nucleic acid with digoxigenin-labeled *flaB* probe WANG Zhao-fen*, JIANG Xiu-gao, GENG Pai-li, NIE Yi-xin, LI Xiu-wen.**Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China*
Corresponding author: JIANG Xiu-gao, Email: jiangxiugao@icdc.cn

【Abstract】 Objective To establish a promising and powerful technique for early diagnosis and epidemiological investigation on leptospirosis. **Methods** *flaB* of *Leptospira* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the pair of oligonucleotide primers of *flaB* and *flaB* probe was labeled with digoxigenin. 70 kidney specimens collected from epidemic area of leptospirosis were detected by isolation, PCR or Dot blotting respectively. Then amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis and Dot hybridization. **Results** Results showed that 5 pg of purified DNA of leptospira could lead to a positive PCR by agarose gel electrophoresis and 5 fg by digoxigenin-labeled (DIG) specific probe hybridization. Among 70 samples of frog kidneys, 8 by culture, 14 by PCR and 19 by Dot blotting were positive, with positive rates was 11.43%, 20% and 27.14% respectively. **Conclusion** *flaB*-PCR combined with Dot blotting of *flaB* probe labeled with DIG seemed a high sensitive, specific and rapid technique both in early diagnosis of leptospirosis and in epidemiological investigation of *Leptospira*.

【Key words】 *Leptospira*; Polymerase chain reaction; Digoxigenin-labeled

近年来钩端螺旋体(钩体)的诊断和检测方法有了很大进展,由十分困难的分离培养检测菌体,到血清学检测抗体,发展成为今天的分子生物学技术。本文采用聚合酶链反应(PCR)结合地高辛(DIG)标记的核酸探针,建立了一种灵敏、特异的 PCR-斑点杂交实验方法,并对不同含量的钩体和钩体病流行区的标本进行了试验,以探讨一条适合推广应用的检测钩体的途径。

材料与方法

1. 实验材料:

(1)钩体菌株:实验所用钩体菌株均由中国疾病预防控制中心(CDC)传染病预防控制所(传染病所)提供。

(2)对照菌株:实验所使用的结核分枝杆菌 H₃₇Rv、莱姆病螺旋体 B₃₁、FP₁ 等由传染病所相关研究室提供。

(3)主要试剂:PCR 试剂盒为华美生物工程公司产品;DIG 标记及检测试剂盒为德国 Mannheim Boehringer 公司产品;PCR 产物纯化试剂盒为德国

基金项目:国家“863”计划资助项目(2003AA223030)

作者单位:810001 西宁,青海大学医学院(王兆芬、耿排力);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(蒋秀高、聂一新、李秀文)

通讯作者:蒋秀高,Email:jiangxiugao@icdc.cn

QIAGEN GmbH 产品。

(4) *flaB* 引物:引物序列为:5'-ACGATGAAA GCTCTGTCTTCC-3'、5'-CTGCATATTTTCATA CGCACC-3'。引物退火温度为 55℃,PCR 产物预期长度为 627 bp。由传染病所钩体实验室合成。

(5) 组织标本:70 份金线蛙肾组织标本,采自安徽省黄山钩体流行区,由安徽省 CDC 赠送。

2. 实验方法:

(1) 菌株培养:实验所用钩体菌株先种于 10 ml 含 8% 兔血清磷酸盐培养基,28℃ 7-10 天后,转种于 EM 培养基 28℃ 培养 5-10 天,生长良好(10^8 条/ml)的菌液,用于提取染色体 DNA。

(2) 全细胞 DNA 的提取:参照文献[1]的方法并稍加改变。酚、酚/氯仿/异戊醇、氯仿各抽提 2 次。

(3) 组织标本 DNA 提取:参照文献[2]快速提取法。

(4) PCR 扩增反应及 PCR 产物纯化回收:反应总体积 20 μ l。反应扩增参数:预变性 95℃ 5 min,1 个循环;变性 94℃ 1 min,退火 55℃ 1 min,延伸 72℃ 2 min,共 35 个循环;最后 72℃ 10 min。PCR 产物的纯化回收按 QIAGEN GmbH PCR 产物纯化试剂盒说明书进行。

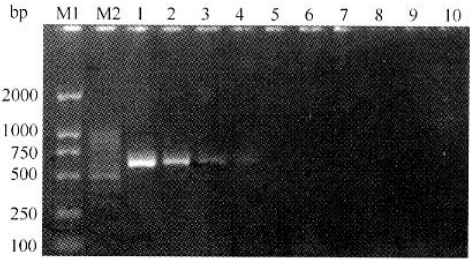
(5) DIG 探针标记:取上述纯化的 PCR 产物 *flaB* 10 ng~3 μ g 为模板 DNA,热变性 10 min,用随机引物法标记 DIG 探针。探针的敏感性用斑点杂交的方法进行检测。标记方法按照试剂盒说明书操作。

(6) 斑点杂交及免疫检测:将待杂交的钩体、对照菌株 DNA 和蛙肾标本 DNA 的 PCR 产物分别置 0.5 ml 离心管中 100℃ 变性 10 min 使成单链,迅速置冰水中以维持单链状态。用加样器吸 2 μ l 点于预处理的 NC 膜上,80℃ 干烤 2 h。加预杂交液于 68℃ 恒温水浴 2 h,再加 *flaB* 探针进行斑点杂交 16-18 h,探针终浓度为 5~25 ng/ml,杂交温度为 68℃。室温下取出膜,在不同浓度的 SDS 及 SSC 溶液中漂洗,加入抗 DIG 抗体作用 30 min,洗膜后加入显色底物液避光显色至杂交斑点清晰满意为止。取出膜用蒸馏水漂洗中止显色,拍照或晾干密封保存。

结 果

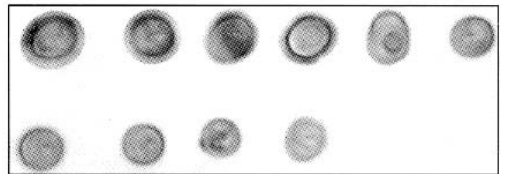
1. *flaB* 探针的敏感性:将纯化的钩体黄疸出血群赖型赖株 DNA 用分光光度计定量后作 10 倍稀释,从 5 ng~0.5 fg 不同量的 DNA 用 *flaB* 引物进行

扩增。扩增产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,5 pg 的 DNA 肉眼可见扩增信号(图 1)。以 DIG 标记的特异性 *flaB* 探针进行斑点印迹检测,少于 5 fg 的纯化 DNA 的扩增产物均能见到清晰的斑点(图 2)。



M1:Marker(DL2000); M2:Marker(100 bp PCR ladder); 泳道 1~10 被扩增模板 DNA 依次为:5 ng、500 pg、50 pg、5 pg、500 fg、50 fg、5 fg、 5×10^{-1} fg、 5×10^{-2} fg、 5×10^{-3} fg

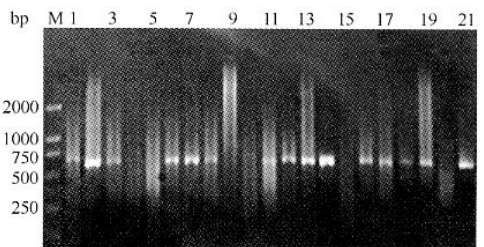
图1 不同含量纯化钩体赖株 DNA 扩增产物 琼脂糖凝胶检测结果



从左至右被扩增模板 DNA 依次为:5 ng、500 pg、50 pg、5 pg、500 fg、50 fg、5 fg、 5×10^{-1} fg、 5×10^{-2} fg、 5×10^{-3} fg

图2 不同含量纯化钩体赖株 DNA 扩增产物 斑点杂交检测结果

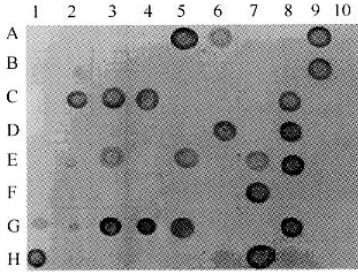
2. 疫区蛙肾标本检测结果:采自安徽省黄山钩体流行区现场的 70 份蛙肾标本进行了细菌分离和 *flaB* 基因的扩增。结果分离到钩体 8 株,而 PCR 扩增则 14 份阳性(泳道 1、2、3、6、7、8、11、12、13、14、16、17、18、19),见图 3。阳性率分别为 11.43% 和 20%,差异有统计学意义($P = 0.031 < 0.05$)。



M:Marker(DL2000); 泳道 1~19:蛙肾组织标本; 20:阴性对照; 21:阳性对照

图3 疫区蛙肾标本 *flaB*-PCR 检测结果

对 70 份蛙肾标本 PCR 产物用 Dot blotting 检测,结果阳性 19 份(图 4)。8 份分离到细菌和 PCR 电泳检测 14 份阳性者杂交均呈较强信号。电泳检测未见条带的 5 份标本, Dot blotting 显示了较为明显的杂交信号。



A~G 排 1~10: 疫区 70 份蛙肾标本扩增产物; H1: 钩体赖株 DNA+ EcoRI; H2: 正常鼠肾组织标本扩增物; H3: 结核杆菌扩增物; H4: 莱姆病螺旋体 B₃₁ 扩增物; H5: 空白对照(不加 DNA); H6: 莱姆病螺旋体 FP₁ 扩增物; H7: 阳性对照(钩体 DNA 扩增产物)

图 4 疫区 70 份蛙肾标本 *flaB* 的 Dot blotting 检测结果

讨 论

钩体病是由钩体引起的一种广泛分布的人兽共患性传染病^[3,4]。该病菌群菌型繁多,临床表现复杂,动物宿主多。近年来,随着气候和环境的变化,洪水时常发生,随时都有暴发钩体疫情的可能。目前钩体病原体检查方法有直接镜检、分离培养。直接检查可以达到快速检测和诊断的目的,但菌量过低时($\leq 2 \times 10^4$ /ml)易漏检。分离培养可确证钩体的存在,然而此法需时长,短则 6~8 周,长则 2~3 个月,不能快速、早期诊断;且标本极易污染,阳性检出率较低。血清抗体虽然已经应用,但在感染初期检测不到。近年随着分子生物学的发展,PCR 和核酸杂交技术在传染病的诊断、检测中已显示出优越性,其优点是不依赖于病原体的复制,从分子水平上检测标本中已经存在的病原体有关基因。常见的杂交方法有:斑点杂交、Southern 杂交和原位杂交。Southern 杂交特异性最高,但这种杂交步骤多、时间长、所需 DNA 量大(至少 10 μ g),所以量小的标本,无法进行这种杂交,因而降低了它的敏感性。Dot 敏感性很好,但因病原体 DNA 与真核细胞 DNA 混合在一起检测,且病原体 DNA 只占整个 DNA 量的很少一部分,虽然杂交是在高严谨的条件下进行,但

仍有一定的交叉反应,所以特异性稍差。

PCR 能够选择性的扩增位于两个引物之间的一段特异性的 DNA 序列。鞭毛是钩体的运动器官,与钩体的粘附和侵袭有关^[2,5]。鞭毛蛋白 *flaB* 为其主要成分,由 *flaB* 基因编码。*flaB* 基因是致病性钩体普遍存在的高度保守序列^[6],我们以此为目的基因,以黄疸出血型赖株设计了一对 *flaB* 引物。该引物对分别由 21 bp 组成,PCR 产物长 627 bp。待测 DNA 经 PCR 扩增后,受到钩体感染的标本,其钩体鞭毛蛋白基因 *flaB* 得到放大。这时再用地高辛标记的 *flaB* 探针对本标本进行检测,既可提高检测的敏感性,又能增强检测的特异性。

本项研究结果充分说明了这一点。5 μ g 的 DNA 经 PCR 扩增后肉眼可见扩增信号,而以 DIG 标记的特异性 *flaB* 探针进行斑点印迹检测,少于 5 fg 的纯化 DNA 的扩增产物仍能见到清晰杂交斑点。70 份蛙肾组织标本,病原体分离阳性 8 份,PCR 产物凝胶电泳检测阳性 14 份,而 Dot blotting 检测阳性 19 份,5 份凝胶电泳阴性者,也出现明显的杂交。表明 DIG 探针杂交比琼脂糖凝胶电泳敏感性更高。所以当被检材料中钩体菌量极低时,可先行 *flaB*-PCR 扩增,再用 DNA 杂交方法检测。由于 Dot blotting 一次可以检测几十份甚至上百份标本,所以特别适于流行病学监测和调查。该标记物无放射,也利于推广应用。

参 考 文 献

- 1 Marshall RB, Wilton BE, Robinson AJ. Identification of *Leptospira* serovars by restriction-endonuclease analysis. J Med Microbiol, 1981, 14: 163-166.
- 2 Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 1990, 28: 495-503.
- 3 于恩庶, 罗海波, 鲍行豪, 等, 主编. 钩端螺旋体病学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 7-13.
- 4 Faine S, Adler B, Bolin C, et al. *Leptospira* and leptospirosis. second edition. Australia: MediSci Melbourne, 1999. 17.
- 5 Li C, Motaleb A, Sal M, et al. Spirochete periplasmic flagella and motility. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000, 2: 345-354.
- 6 Lin M, Surujballi O, Nielsen K, et al. Identification of a 35-kilodalton serovar-cross-reactive flagellar protein, *flaB*, from *Leptospira interrogans* by N-terminal sequencing, gene cloning, and sequence analysis. Infect Immun, 1997, 65: 4355-4359.

(收稿日期: 2005-02-05)

(本文编辑: 尹廉)