

应用 TaqMan 荧光定量聚合酶链反应技术检测鼠疫耶尔森菌

李伟 海荣 俞东征 张志凯 蔡虹

【摘要】 目的 发展一种快速、敏感、特异的检测鼠疫耶尔森菌方法。方法 应用荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术,针对 pMT1 质粒上的 *caf1* 基因, pPCP1 质粒上的 *pla* 基因,染色体上的与色素沉着相关的 *hms* 基因和侵袭素 *inv* 基因设计 TaqMan 引物探针,进行荧光定量 PCR 检验,评价方法的特异性、敏感性;构造并应用上述引物探针的外标对照定量;构造 *pla* 的内标对照,采用多重荧光定量 PCR(FAM, VIC 荧光检测),发现假阴性;采用 UDG 抗污染、ROX 参照荧光染料矫正背景噪音,提高检验能力;检验模拟鼠疫耶尔森菌强毒株和 EV 菌感染的动物脾脏器样本,评价该法在实际工作的应用。**结果** 设计的引物、探针特异性良好, *pla*、*fl*、*hms* 指标的敏感性分别是最低检出 10 拷贝、1 拷贝、1 拷贝。**结论** 该方法能快速、灵敏、特异检出鼠疫耶尔森菌,对鼠疫监测、预防生物恐怖等方面具有重要意义。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 实时荧光聚合酶链反应; 定量分析

Establishment and application of real-time fluorescence polymerase chain reaction based on the TaqMan probes for detection of *Yersinia pestis* LI Wei, HAI Rong, YU Dong-zheng, ZHANG Zhi-kai, CAI Hong. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: YU Dong-zheng

【Abstract】 **Objective** Establishing and developing methods for quick, special and sensitive detection of *Yersinia pestis* (*Y. pestis*). **Methods** Using real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) based on TaqMan technology with UDG anti-contamination systems and ROX reference dye, we established a method to detect *Y. pestis*. Probes and primers from *pla*, *caf1*, *hms* and *inv* gene were designed. An internal positive control was added to the reaction mixture in order to detect the presence of PCR inhibitors that were often found in biological samples. Sensitivity was evaluated by serial dilution of colons, internal template and *Y. pestis* strains while specificity was confirmed by amplifying real DNAs from bacteria, the representative *Y. pestis* strains and blind assay. **Results** The methods used could provide quick, special and sensitive detection of *Y. pestis*, with sensitivities of *pla*, *fl*, *hms* as 10, 1 and 1 copie(s) respectively. **Conclusion** The newly developed technologies seemed to be well suited to identify the *Y. pestis* in case of emergency, bio-terrorist attack and surveillance of the epidemics.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Real-time fluorescence polymerase chain reaction; Quantitative analysis

我国从 20 世纪 50 年代起,对鼠疫菌的实验室诊断使用“四步检验”。目前,鼠疫诊断尚缺乏 8 h 内的稳定、快速检验方法。实时荧光聚合酶链反应(real-time fluorescence polymerase chain reaction, RTF-PCR)检测技术是近年来发展起来的定量 PCR 技术,具有快速、无需电泳、特异性高、定量准确、抗污染等优点。本实验采用多重荧光定量 PCR 技术,

针对鼠疫菌 pMT1 质粒上 *caf1*、pPCP1 的 *pla* 基因、染色体基因组 *hms* 和 *inv* 基因设计特异 TaqMan 引物探针(用 FAM 标记)^[1,2],并采用外标定量和 *pla* 基因的内对照(VIC 标记)等检验鼠疫耶尔森菌。

材料与方法

1. 标本菌株:鼠疫菌 EV 株,中国鼠疫菌 18 个生态型代表菌株 20 株,假结核耶尔森菌为本实验室保存;小肠结肠炎耶尔森菌 03 血清型由中国疾病预

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

通讯作者:俞东征

防控制中心传染病预防控制所(传染病所)腹泻病室提供。蜡样枯草杆菌(菌号 CMCC63530)、枯草芽孢杆菌(菌号 CMCC63301)购自中国药品生物制品鉴定所。混合 DNA 模板(小肠结肠炎耶尔森菌 9 个血清型,霍乱弧菌 8 个血清型,致病性大肠埃希菌 8 株混合,副溶血弧菌 8 株,空肠弯曲菌 8 株,沙门菌 8 株,志贺菌 7 株)由传染病所诊断实验室提供。

2. 主要设备:ABI7000 荧光定量 PCR 仪,PCR 扩增仪,紫外成像仪,核酸检测仪。

3. 主要试剂:TaKaRa ExTaqTM PCR 聚合酶,Platinum[®] Quantitative PCRSuperMix-UDG (invitrogen 公司产品),ROX 参考荧光染料 (invitrogen 公司产品),普通 TaqDNA 聚合酶,质粒提取试剂盒、核酸纯化试剂盒、A/T 克隆试剂盒及感受态 DH5 α 均购自上海生工生物工程有限公司。

4. 引物探针及合成:克隆用普通引物见表 1,由赛百盛生物公司合成。标准内对照由博亚公司合成。荧光定量 PCR 探针、引物:以染色体 *hms*、*inv* 基因(上游引物在 *inv* 基因内,下游在 IS1541 内,探针横跨二者交界处)、pPCD 质粒 *pla* 基因、pMT1 质粒 *caf1* 基因为靶序列,根据复合荧光探针设计原则,用 primer express 2.0 设计 TaqMan-MGB 探针、引物,NCBI(BLAST)比对,选择同种间保守,异种间特异的片段设计引物、探针,荧光定量 PCR 探针 5' 端标记 FAM,3' 端标记淬灭基团。内对照探针 5' 标记 Vic 荧光基团,3' 标记淬灭基团。探针由上海基康生物公司合成。荧光探针引物略。

表 1 克隆用普通 PCR 引物及序列

引物名称	序列	基因定位	扩增长度 (bp)
FI 普 F/R	F:GCTAATGCGGCAGATTAAAC R:GTTACGGTTACAGCATCAGT	pMT1 质粒	447
pla 普 F/R	F:GAAAGGAGTGCGGGTAAIAG R:GACITTTGGCATATAGGTGTGA	pPCP1 质粒	248
hms 普 F/R	F:GATAGACXXCTCTGACCAGTT R:CGGTACTCTTCAC1GACATG	染色体	275

5. 模拟感染动物脏器模板制备:掺入法模拟:2 月龄昆明小白鼠 6 只,无菌解剖取脾,称取脾半只 (0.05 g),混入系列稀释的 EV 疫苗株悬液 300 μ l (拷贝数 $6 \sim 6 \times 10^6$),研磨,煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心取上清,分装, -20°C 保存备检;EV 感染动物模型:比浊确定 EV 菌 $10^7/\text{ml}$,腹腔注射 1 ml,隔夜鼠毙,解剖,取脾半只,注 300 μ l 生理盐水研磨,

煮沸 10 min, 10 000 r/min 离心取上清,分装, -20°C 保存备检。强毒株模拟攻山野鼠脏器模板制备:用鼠疫强毒株感染野鼠,鼠毙,解剖取肝,用活菌平板计数法计数,肝标本煮沸,离心取上清,10 倍系列稀释, -20°C 保存备检。

6. 外部定量对照的制备:分别以 pla 普 F/R、F1 普 F/R、hms 普 F/R 为引物(扩增片段包括荧光探针)进行 PCR 扩增,A/T 克隆,连接到 PUTm 载体上,转化至 DH5 α 大肠埃希菌中,PCR 鉴定挑取阳性克隆。提取重组质粒(按质粒提取试剂盒操作)。用核酸测定仪测定浓度后,定量外标,10 倍系列稀释,终浓度在 $1 \sim 10^8$ 拷贝/ μ l 之间,取 1 μ l 为模板。

7. 内部对照及探针制备:内对照模板构建:合成两侧能与引物 pla F/R(荧光)互补结合的序列,中间夹以人为构造的探针互补序列,合成后确定吸光度 (A) 值,10 倍稀释,定量模板,终浓度为 $1 \sim 10^8$ 拷贝/ μ l,取 1 μ l 为模板。内标探针的构建:人为构造一段系列,GC 含量和目标探针一致,5',3' 端分别用 VIC 和淬灭基团标记。联合检测时加入待测模板和系列稀释的内对照模板,双荧光 (FAM, VIC) 探测,ROX 矫正背景。

8. 荧光定量 PCR 扩增:采用 ABI7000 实时 PCR 检测仪进行 PCR 扩增及结果分析。反应体系 1:宝生物荧光定量酶体系 25 μ l: buffer ($5 \times$) 5 μ l; MgCl_2 (250 mmol/L) 0.4 μ l; 上、下游引物 (400 nmol/L) 0.4 μ l; dNTP (各 10 mmol/L) 0.8 μ l; TaqDNA 多聚酶 1.5 U、ROX 参考荧光染料 1 μ l; 模板 1 μ l (联合实验模板各 1 μ l); 探针 (400 nmol/L) FAM 0.25 μ l 或 VIC 0.25 μ l 或二者联合;三蒸水应量调整。反应体系 2: invitrogen 体系 25 μ l: Platinum[®] Mix-UDG (UDG; dG/A/CTP) 400 μ mol/L; dUTP 800 μ mol/L) 12.5 μ l; 上、下游引物 (400 nmol/L) 0.5 μ l; ROX 参考荧光染料 1 μ l, 模板或内对照 1 μ l; 探针 (400 nmol/L) 为 FAM 或 VIC 或二者联合,三蒸水应量调整。两步法扩增条件为 55°C 2 min; 95°C 2 min (热启动一个循环); 95°C 10 s, 62°C 40 s, 40 个循环。三步法扩增条件: 55°C 2 min, 95°C 2 min (热启动一个循环), 95°C 10 s, 55°C 20 s, 72°C 30 s, 40 个循环。

结 果

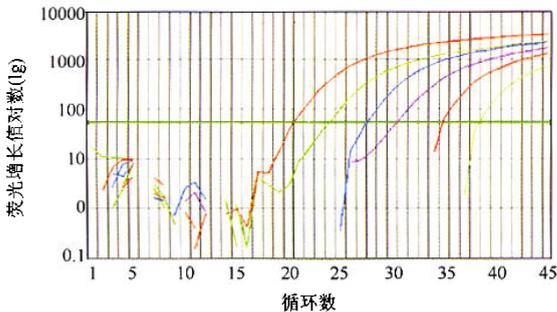
1. 定量 PCR 条件的优化及一致性评价:优化荧光定量 PCR 镁离子、探针浓度: Mg^{2+} 浓度 $3 \sim$

4 mmol/L 为宜, 过高或过低均影响 Ct 值及荧光信号强度。荧光探针浓度为 400 nmol/L 为宜、探针浓度增高, 背景噪音较大, 结果不稳定。探讨两步 PCR 和三步 PCR 对扩增的影响, 结果显示三步法扩增曲线波动较大, 扩增效果不理想。两步法所用时间少, 结果稳定, 结果未显示。本实验结果均采用两步法。比较不同厂家试剂(宝生物, inviongen)的扩增效率, 两者扩增效果相同。

2. 特异性评价: 以鼠疫耶尔森菌 1322 为阳性对照, 假结核耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌 03 血清型、巴斯德菌属 飞禽菌、致病性大肠埃希菌 O157:H7、肠道致病菌混合样本(包括小肠结肠炎耶尔森菌 9 个血清型, 副溶血弧菌 8 株, 空肠弯曲菌 8 株, 霍乱弧菌 8 个血清型的混合模板, 沙门菌 8 株, 志贺菌 7 株), 混合样本 2(包括炭疽疫苗株、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌)染色体组为现实模板, 评价四对引物探针的特异性, 仅强毒株 1322 出现特异扩增, 其他模板均阴性。扩增图略。

3. 敏感性评价结果:

(1) 鼠疫 1322 号 10 倍系列稀释, 以 f1 探针检测, 最小检出为 1:10⁵ 稀释度, 测定核酸浓度以鼠疫菌染色体组质量换算成拷贝数, 相当于 12 个拷贝(图 1)。



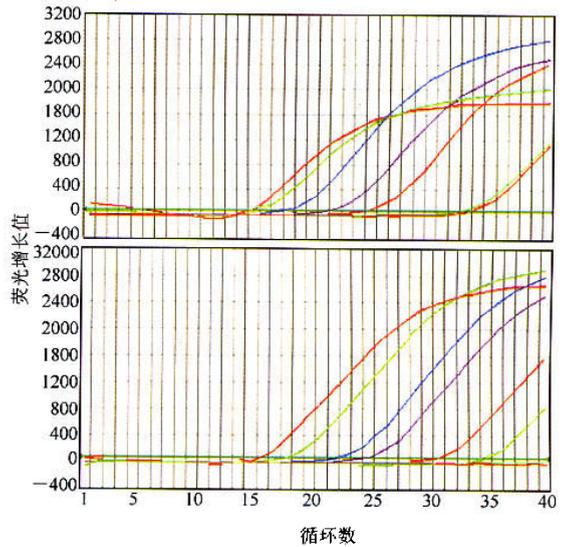
注: 从左至右依次为原液, 10、10²、10³、10⁴、10⁵ 倍稀释

图1 鼠疫 1322 号系列稀释敏感性结果

(2) 用人工构造的内部对照模板系列稀释为 1~1000 万拷贝, 用 Vic 荧光探测: 最低检出为 10 拷贝。

(3) f1、hms、pla 的敏感性评价: f1、hms、pla 克隆的最小检出分别是 1、1、10 拷贝(PCR 体系的检测拷贝数)。f1 和 hms 的扩增结果见图 2。

4. 不同生态型代表菌株实验: 选取包括中国鼠疫菌 18 个生态型的 20 株代表菌株, f1、pla、inv、hms 指标均出现阳性扩增。



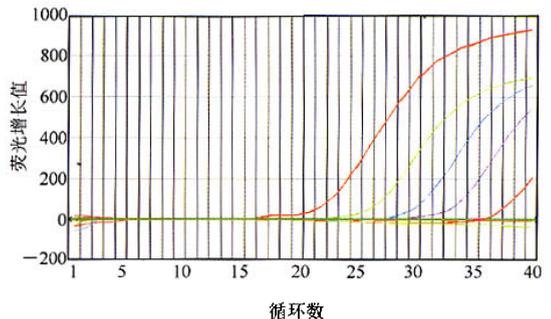
注: 上图 f1 克隆阳性扩增从左到右依次为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10(拷贝/μl); 下图 hms 克隆阳性扩增从左到右 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10(拷贝/μl)

图2 f1、hms 克隆的敏感性评价

5. 外标对照的构建及定量: f1、hms、pla 克隆株系列绘制标准曲线, r 在 0.95 以上。对克隆的中间稀释拷贝及 1322 号强毒株的多个稀释定量检测, 结果符合。

6. EV 菌掺入法模拟感染脾脏的检出: 用掺入法模拟和感染脾脏模板, 以 f1、hms、pla 指标检出的底限分别为 17、1.7、1.7 拷贝(PCR 体系的检测拷贝数)。

7. 鼠疫强毒株模拟攻击野鼠肝脏的 qPCR 检测: 用鼠疫强毒株感染野鼠, 肝脏模板系列稀释, 以 pla、hms、f1 探针检测, 最小检出依次为 3 × 10³、3 × 10⁴、3 × 10³ 拷贝。如 pla 阳性结果见图 3。



注: pla 探针检测阳性的拷贝数从左至右依次为 3 × 10⁷、3 × 10⁶、3 × 10⁵、3 × 10⁴、3 × 10³

图3 鼠疫强毒株模拟攻击野鼠脏器的检测结果

8. 盲法考核评价:从鼠疫耶尔森菌 18 个生态型中随机挑选 5 株; *pla*、*f1*、*hms* 的外标克隆; 小肠结肠炎耶尔森菌; 假结核耶尔森菌、肠道致病菌混合模板、水。采取双盲检测评价。检出符合率为 100%。

讨 论

长期以来,我国主要使用“四步检验”和血清学方法(如 IHA、RIHA、ELISA 等)诊断鼠疫,其操作繁琐耗时较长、影响因素多,不能达到快速诊断的目的。TaqMan 荧光探针定量 PCR 是新近发展起来的快速 PCR 检测方法,该法具有效率高、适应性好、标记灵活等优点。实时定量 PCR 荧光信号与产物模板数成对应关系。但是不设置外标或内标的定量,即便是使用定量 PCR 仪,亦不能达到绝对定量,只能是定性或相对定量。荧光定量 PCR 通过检测 Ct 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的最小循环数)定量,Ct 值反映低浓度荧光值明显扩增的最小循环数,故重现性好,Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,Ct 值越小。利用已知拷贝数的外标准品作标准曲线可对样品定量。

本实验应用 TaqMan 实时荧光定量技术,选择鼠疫菌的不同目标基因(*f1*、*pla*、*inv*、*hms*)用于检测,避免了由于使用单一引物造成的漏检。采用 PCR 热启动 Taq DNA 聚合酶,ROX 参考染料校正背景噪音,UDG 抗污染,提高了检出效率及准确性。应用 *f1*、*pla*、*hms* 的外标可精确定量。构造 *pla* 基因的竞争内标对照(探针用 VIC 标记),在检测过程中平行作内对照的多重荧光检测,可发现样品中存在强的抑制因素造成的假阴性。为评价检验现场样品的能力,模拟 EV 疫苗株污染/感染脾脏和强毒株感染野鼠脏器、盲法评价,获得了理想的结果。

特异性及敏感性:本实验从四个方面保证了特异性:①在引物设计上,选用引物都位于同种的保守区,经过 NCBI 比对(BLAST),选择异种或属特异性

强的引物,保证引物序列的特异性;② *Inv* 探针设计方面,设计上下游引物分别位于 *inv* 基因和 IS1541 片段内,探针横跨二者交界处,使该探针对于耶尔森菌属的小肠结肠炎和假结核耶尔森菌检测特异性增强,现实应用价值大^[3,4];③通过 TaqMan 探针和上下游引物的三重特异性杂交,只有在退火杂交时三者均有效结合,扩增/报告才能实现;④本试验采用假结核耶尔森菌和多株小肠结肠炎耶尔森菌及其他细菌的现实模板进行特异性检测评价,*f1*、*hms*、*inv*、*pla* 探针特异性良好;上述四者的联合检测更保证了检测的可靠性。该法检测灵敏度较好,*f1*、*pla*、*hms* 指标最低检出分别是 1、10、1 拷贝;用鼠疫染色体模板可检出 1:10⁵ 的稀释度,相当于 12 个染色体组拷贝。*Inv* 探针引物受横跨 *inv* 基因和 IS1541 的位置限制,设计条件不能完全保证最优,故敏感性稍低。

荧光定量 PCR 技术可以准确灵敏地检测鼠疫等病原菌,对鼠疫诊断、监测、评价等方面具有重要意义,在应对可能出现的生物恐怖袭击,提高处理突发事件的能力方面应用前景广阔。利用 PCR 技术检测病原体的实践中,从环境样品中,如土壤、组织标本检测致病菌对疾病监测和评价意义更大,由于二者中存在大量 PCR 抑制因素,如何减少抑制,提高检出是需进一步研究的问题。

参 考 文 献

- 1 俞东征. 后基因组时代的鼠疫细菌学研究. 中华流行病学杂志, 2003, 24 增刊:1-8.
- 2 刘振才, 海荣, 李富忠, 等. 青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地的发现与研究. 中国地方病防治杂志, 2001, 16: 321-327.
- 3 Odaert M, Devalckenaere A, Trieu-cuot P, et al. Molecular characterization of IS1541 insertions in the genome of *Yersinia pestis*. J Bacteriol, 1998, 180: 178-181.
- 4 魏建春, 海荣, 蔡虹, 等. 鼠疫耶尔森菌 *inv* 基因中 IS1541 的研究及应用. 中国地方病学杂志, 2000, 19: 401-403.

(收稿日期:2004-08-06)

(本文编辑:尹廉)