

泰泽氏菌 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法的建立及应用

高正琴 岳秉飞 贺争鸣

【摘要】目的 建立泰泽氏菌的 TaqMan 小沟结合物(MGB)探针荧光定量 PCR 检测方法。**方法** 针对泰泽氏菌 16S rRNA 基因的保守区设计特异性引物和探针,建立 MGB 探针荧光定量 PCR 方法,并验证该方法的特异性、敏感性和稳定性。对 2008—2011 年采集的 1156 份临床样本进行检测,同时进行普通 PCR 检测作为对照。**结果** 泰泽氏菌 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法具有高度特异性,与肝螺杆菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲菌、侵肺巴斯德氏菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌之间无交叉反应,检测灵敏度达 2.2 copy/ μ l。标准曲线显示各浓度范围内具有良好线性关系,相关系数为 0.999,斜率为 -3.204,PCR 效率为 100%。对 1156 份临床样本进行检测,荧光定量 PCR 检出 101 份泰泽氏菌阳性样本,而普通 PCR 则仅检出 44 份。荧光定量 PCR 方法从临床样本中检出泰泽氏菌 DNA 仅需 2 h。**结论** TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法具有特异、灵敏和稳定性,适于泰泽氏菌的快速检测。

【关键词】 泰泽氏菌;小沟结合物探针;荧光定量 PCR

Development and application of TaqMan MGB probe fluorescence quantitative PCR method for rapid detection of *Clostridium piliforme* GAO Zheng-qin, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming. National Institutes for Food and Drug Control of China, Beijing 100050, China
Corresponding author: GAO Zheng-qin, Email: gaozhengqin@126.com
This work was supported by a grant from the Mild-Youth Research and Development Program of National Institutes for Food and Drug Control of China (No. 2010C5).

【Abstract】Objective To develop a TaqMan MGB probe-based, sensitive and specific fluorescence quantitative PCR assay method for rapid detection of *Clostridium piliforme*. **Methods** Primers and probes specific to 16S rRNA gene of *Clostridium piliforme* were designed. A TaqMan MGB probe-based, fluorescence quantitative PCR method was established. Specificity, sensitivity and stability of the method were assessed, followed by real-time quantitative PCR assay to detect *Clostridium piliforme* on 1156 clinical specimens during 2008–2011 and compared with conventional PCR assay. **Results** The specificity of TaqMan MGB probe-based fluorescence quantitative PCR was high and did not show cross-reactivity with *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella pneumotropica*, *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*. The detection limit was 2.2 copies/ μ l. The correlation coefficient and slope value of standard curve were 0.999 and -3.204, respectively and the efficiency of TaqMan MGB-based probe fluorescence quantitative PCR assay was 100%. When the TaqMan MGB-based probe fluorescence quantitative PCR assay was performed to detect *Clostridium piliforme* on 1156 clinical specimens, a total of 101 specimens showed positive on *Clostridium piliforme*. However, only 44 specimens showed positive when conventional PCR was used. The real-time quantitative PCR for *Clostridium piliforme* could be completed within 2 hours. **Conclusion** The TaqMan MGB-based probe fluorescence quantitative PCR assay method was a reliable, specific, sensitive and useful tool for rapid detection of *Clostridium piliforme*.

【Key words】 *Clostridium piliforme*; Minor groove binder probe; Fluorescence quantitative PCR

泰泽氏菌(*Clostridium piliforme*)是导致细菌性急性致死性肝肠疾病暴发的主要原因之一^[1,2]。感染一般在尸检时测出,患者生前很少能作出诊断^[3]。目前,国内外还未见用 TaqMan 小沟结合物(MGB)探针荧光定量 PCR 检测泰泽氏菌的报道。本研究利用新

一代 MGB 探针建立泰泽氏菌的荧光定量 PCR 检测方法,并将该方法用于临床样本的检测。

材料与方 法

1. 样本和菌株来源:临床肝癌、肝硬化患者腹水和腹泻患者粪便样本由首都医科大学附属北京佑安医院提供。小型猪由“国家实验用小型猪种质资源基地”提供。金黄地鼠由四川成都生物制品研究所

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.02.022

基金项目:中国食品药品检定研究院中青年研究发展基金(2010C5)

作者单位:100050 北京,中国食品药品检定研究院

通信作者:高正琴, Email: gaozhengqin@126.com

提供。猴、犬、兔、豚鼠、大鼠、小鼠由北京20多个动物繁育中心提供。幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)购自美国标准菌种收藏所。侵肺巴斯德氏菌(*Pasteurella pneumotropica*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由中国医学细菌保藏管理中心提供。泰泽氏菌、肝螺杆菌(*Helicobacter hepaticus*)由本实验室保存。

2. 引物、探针设计及标准质粒和DNA提取:对泰泽氏菌16S rRNA基因序列进行同源性分析,用Primer Premier 5.0软件设计引物和探针,GZQTCFP: 5'-TGC TTC TTA TTC AGG TAC CGT CAT TT-3'; GZQTCRP: 5'-ACG CCG CGT GAA GGA A-3'; 探针GZQTCPP: 5'-AAG TAT TTC GGT ATG TAA ACT T-3'。探针两端分别用FAM和NFQ-MGB标记,目标扩增产物长度为84 bp,引物和探针由美国ABI公司合成和标记。含有泰泽氏菌16S rRNA基因的质粒由本实验室构建保存^[4]。标准质粒浓度为 2.2×10^{11} copy/ μ l。用DNA提取试剂盒提取临床样本和菌株的DNA,DNA置-70℃保存。

3. 荧光定量PCR检测体系建立:采用经过优化后确定的最佳荧光定量PCR反应体系和扩增条件。荧光定量PCR总反应体系20 μ l,包括正、反向引物和探针1 μ l、TaqMan Mix 10 μ l、模板DNA 1 μ l、DEPC水8 μ l。荧光定量PCR扩增条件:50℃ 2 min, 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环。以DEPC水为模板作为阴性对照。在荧光定量PCR运行过程中,借助ABI公司的SDS软件实时观察PCR荧光扩增曲线、采集并分析数据。

4. 荧光定量PCR反应的敏感性、特异性及重复性分析:将泰泽氏菌标准质粒(2.2×10^{11} copy/ μ l)作10倍倍比稀释,分别取1 μ l稀释后的标准质粒($2.2 \times 10^0 \sim 2.2 \times 10^9$ copy/ μ l)为模板,同上述条件进行定量PCR反应,观察能够检出的最小标准质粒拷贝数,分析该方法灵敏性。以泰泽氏菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲菌、肝螺杆菌、侵肺巴斯德氏菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌的DNA为模板,同上述条件进行荧光定量PCR反应,分析该方法的特异性。分别取1 μ l稀释后的标准质粒($2.2 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^7$ copy/ μ l)作为模板,同上述条件进行定量PCR反应。在同一个实验中,每个稀释度标准质粒做3个复孔,以分析组内差异。再以相同标准质粒为模板,在不同时间段进行3次独立重复实验,以分析组间差异。计算Ct值的重现性(RSD)以验证该方法的稳定性。

5. 荧光定量PCR标准曲线制作:分别取1 μ l稀释后的标准质粒($2.2 \times 10^0 \sim 2.2 \times 10^9$ copy/ μ l)作为模板,同上述条件进行荧光定量PCR反应。每个稀释度平行重复3次试验。选取Ct值为15~30的点建立标准曲线。根据标准曲线计算待测样本中泰泽氏菌载量。

6. 荧光定量PCR及普通PCR检测临床样本:为了评价TaqMan MGB探针荧光定量PCR方法对临床样本检测的实用性,分别以临床样本的DNA为模板,同上述条件进行荧光定量PCR反应,并参考文献[4]中泰泽氏菌普通PCR引物和条件进行扩增。阳性样本做进一步测序鉴定。

结 果

1. 荧光定量PCR敏感性检测:以不同浓度标准质粒为模板进行检测,结果显示,各浓度质粒均出现扩增信号,最低浓度(2.2×10^0 copy/ μ l)也产生良好的特异性扩增曲线,阴性对照没有扩增信号,说明该方法敏感性较好(图1)。

2. 荧光定量PCR方法特异性检测:利用荧光定量PCR检测方法对泰泽氏菌进行检测,出现特异性的“S”形荧光扩增曲线,Ct值为17.6(<30);而对肝螺杆菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲菌、侵肺巴斯德氏菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌检测,未见特异性的荧光扩增曲线(图2)。结果表明,该方法具有较强的特异性。

3. 荧光定量PCR方法重复性检测:组内重复测定其RSD值在0.41%~0.83%之间,组间重复测定其RSD值在0.43%~0.81%之间,均在可接受的合理范围内,说明该方法稳定性良好,见表1。

表1 泰泽氏菌TaqMan MGB探针荧光定量PCR重复性实验结果

重复性	质粒 (copy)	Ct值					RSD(%)
		1	2	3	\bar{x}	s	
组内	10 ⁷	15.38	15.59	15.39	15.45	0.1169	0.75
	10 ⁶	18.54	18.39	18.23	18.39	0.1533	0.83
	10 ⁵	22.05	21.91	22.12	22.02	0.1047	0.47
	10 ⁴	26.06	25.91	25.85	25.94	0.1082	0.41
组间	10 ⁷	14.38	14.30	14.26	14.31	0.0617	0.43
	10 ⁶	17.71	17.84	17.68	17.74	0.0823	0.46
	10 ⁵	21.63	21.31	21.32	21.42	0.1755	0.81
	10 ⁴	24.52	24.75	24.73	24.67	0.1281	0.51

4. 荧光定量PCR标准曲线:根据Ct值与其标准质粒的浓度对数值绘制标准曲线,其相关系数为0.999($Y = -3.204X + 38.208$),扩增效率为100%,Ct值和浓度之间呈现良好的线性关系。

5. 临床样本泰泽氏菌检测:利用荧光定量PCR对1156份临床样本进行检测,101份为泰泽氏菌阳性(表2)。普通PCR检出44份阳性。所测得的阳性样本序列与

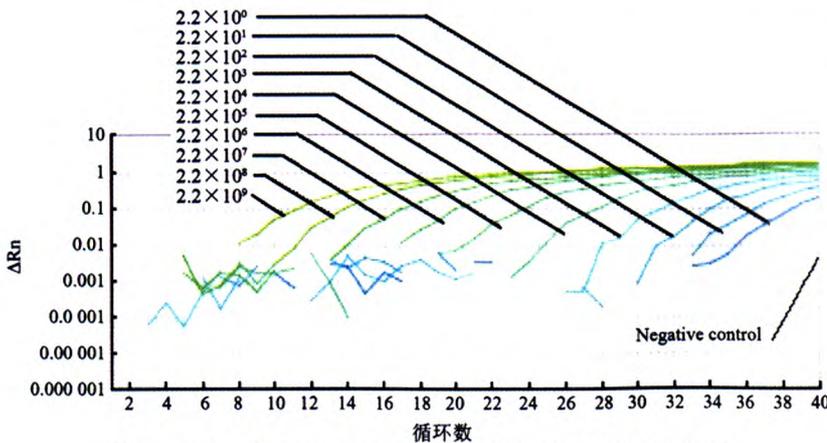


图1 泰泽氏菌 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 敏感性结果

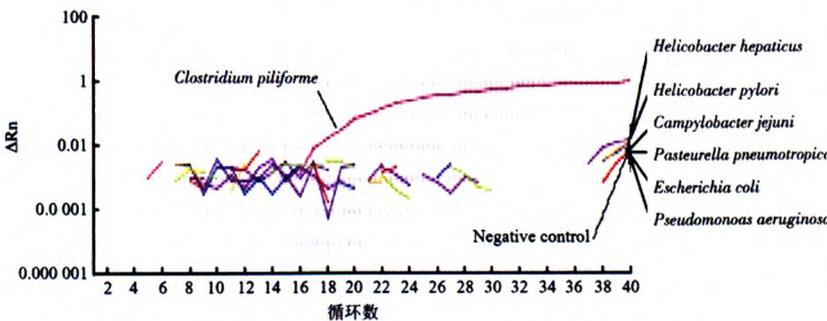


图2 泰泽氏菌 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 特异性结果

表2 临床样本中泰泽氏菌 TaqMan MGB 探针
荧光定量 PCR 检测结果

样本名称	样本例数	阳性例数	阳性率 (%)	样本名称	样本例数	阳性例数	阳性率 (%)
2008年				2010年			
小型猪肠	25	4	16.0	猴粪便	66	5	7.5
金黄地鼠肠	30	8	26.6	大鼠肝	27	1	3.7
犬血清	112	7	6.2	2011年			
2009年				猴血	42	1	2.3
患者腹水	22	22	100.0	犬血	45	0	0.0
患者粪便	1	1	100.0	兔血	105	5	4.7
猴粪便	62	5	8.0	豚鼠血	90	4	4.4
犬血清	50	1	2.0	大鼠血	40	7	17.5
大鼠肠	123	13	10.5	小鼠血	120	14	11.6
小鼠肠	196	3	1.5	合计	1156	101	8.7

GenBank中收录的泰泽氏菌序列同源率为99%~100%。

讨论

本研究采用 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法对 1156 份临床样本进行检测,从临床肝癌、肝硬化患者、腹泻患者、猴、小型猪、金黄地鼠、犬、兔、豚鼠、大鼠、小鼠均检出泰泽氏菌,其中临床肝癌、肝硬化患者、腹泻患者、金黄地鼠、大鼠、小型猪的泰泽氏菌感染最为严重。实验室主要采用 IFA 方法检测血清中泰泽氏菌抗体来判定泰泽氏菌感染,但易存在交叉反应、假阳性和检测灵敏度不高的问题。在本研究 1156 份临床样本中,用 IFA 方法检测泰泽氏菌抗体,仅从 2009 年 123 份大鼠血清中检测到 7 份

阳性,阳性检出率为 5.6%;用普通 PCR 方法检测 123 份样本,有 8 份为阳性,阳性检出率为 6.5%;用 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法对 123 份样本进行检测,13 份为阳性,阳性检出率为 10.5%。与普通的 TaqMan 探针比较,MGB 探针具有两大特点:一是探针 3' 端标记了自身不发光的淬灭分子,以取代常规可发光的 TAMRA 等荧光标记。这使荧光本底降低,荧光光谱分辨率得以改善。二是探针 3' 端增加了一个 MGB。MGB 可以稳定探针与模板的杂交,提高探针的退火温度,一方面缩短了探针长度,使荧光基团和淬灭基团的距离更近,淬灭效果更好;另一方面,也提高了探针的特异性,使结果更精确,分辨率更高^[5]。因此,运用时效性和准确性均比较高的 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 技术阶段性的开展泰泽氏菌污染监测工作,可阻断中间污染环节,有利于预防和控制泰泽氏菌所致的急性致死性肝肠疾病发生。

综上所述,本研究以 16S rRNA 为靶基因,应用 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 技术,实现泰泽氏菌的定量分析,并将此方法成功应用于临床样本中泰泽氏菌的检测。本研究建立的 TaqMan MGB 探针荧光定量 PCR 方法具有准确、可靠、快速检测的特点,可推广应用于食品、药品安全检验、临床检测、环境监测、流行病学调查等诸多领域,为提高泰泽氏菌的检出率提供特异有效的评价手段。

参考文献

- [1] Tyzzer EE. A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore-bearing bacillus (*Bacillus piliformis*, N. SP.). J Med Res, 1917, 37: 307-338.
- [2] Duncan AJ, Carman RJ, Olsen GJ, et al. Assignment of the agent of Tyzzer's disease to *Clostridium piliforme* comb. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43 (2): 314-318.
- [3] Smith KJ, Skelton HG, Hilyard EJ, et al. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: Confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis. J Am Acad Dermatol, 1996, 34(2): 343-348.
- [4] Gao ZQ, Yue BF, He ZM. Cloning and identification of 16S rRNA and *cagA* genes of *Brucella* and *Helicobacter pylori* and other six pathogenic bacteria. Chin J Zoonoses, 2010, 26(8): 715-719. (in Chinese)
- [5] Kutayin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. Nucleic Acids Res, 2000, 28(2): 655-661.

(收稿日期: 2011-08-19)
(本文编辑: 万玉立)