

文章编号: 1000-7423(2008)-02-0158-02

## FTA/PCR检测加入饮料中的隐孢子虫

李晓虹<sup>1\*</sup>, 闫东丽<sup>2</sup>

【摘要】 用建立的 FTA/PCR 方法检测饮料样品中隐孢子虫, 可检测到隐孢子虫卵囊 1.0 个/ml, 且在 6 h 内完成。该方法敏感性较高, 省时, 是检测饮料样品中隐孢子虫的较好方法。

【关键词】 隐孢子虫; FTA/PCR; 检测

中图分类号: R382.3

文献标识码: B

## FTA/PCR Detection for *Cryptosporidium* Added in Beverage

LI Xiao-hong<sup>1\*</sup>, YAN Dong-li<sup>2</sup>

(1 Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic Of China, Shanghai 200135, China; 2 East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

【Abstract】 An established FTA/PCR protocol was applied to detect *Cryptosporidium* oocysts which were added in beverage, and proved to be as sensitive as 1.0 oocyst/ml detected within 6 hours. The study indicates that this technique is sensitive, time-saving and easy to perform.

【Key words】 *Cryptosporidium*; FTA/PCR; Detection

Supported by a Grant for Standard Development, Shanghai Science and Technology Commission(No. 05dz05008)

\* Corresponding author, E-mail: lixh@shciq.gov.cn

隐孢子虫病是重要的人畜共患病。很多报道认为, 隐孢子虫的发病率与当地的空肠弯曲菌、沙门氏菌、志贺氏菌、致病性大肠菌和贾第鞭毛虫相近<sup>[1]</sup>。隐孢子虫可感染免疫功能正常者和免疫功能受损者, 其中婴幼儿、艾滋病患者感染后症状比较严重。隐孢子虫病为艾滋病患者主要致死病因之一, 故国外艾滋病患者检查隐孢子虫感染已被列为常规项目<sup>[1]</sup>。

目前, 隐孢子虫的检测方法主要有镜检法(如改良抗酸染色法、免疫荧光显微镜法)、巢式 PCR 法等, 其中 DNA 抽提法如传统的酚/氯仿抽提法、各种 DNA 试剂盒抽提等, 操作繁杂、费时费力且敏感性低。本实验建立了一种无需抽提、基于过滤的 DNA 模板制备的 PCR 法, 用于饮料样品中隐孢子虫检测。

### 1 材料与与方法

1.1 实验材料 微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)购自丹麦 Dynal 公司, 贝氏隐孢子虫(*C. baileyi*)由中国农业科学院上海兽医研究所何国声教授惠赠, 安氏隐孢子虫(*C. andersoni*)、犬隐孢子虫(*C. canis*)由同济大学黄峡同学惠赠、金黄色葡萄球菌(ATCC 51816)购自美国菌种保存中心。实验所用饮料样品为橙汁, 购自超市。

1.2 主要试剂 抗隐孢子虫磁珠试剂盒购自丹麦 Dynal 公司, FTA 纯化试剂(英国 Whatman 公司专利产品), FTA 洗涤试剂[TE-1 缓冲液含 0.01 mol/L 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris), pH 8.0; 0.1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)], 1%牛血清白蛋白(BSA)购

自上海华美生物工程有限公司, 2×Taq PCR 基本混合液[0.1U Taq DNA 聚合酶/μl、脱氧核苷三磷酸(dNTPs)各 500 μmol/L、20 mmol/L 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH 8.3)、100 mmol/L 氯化钾、3 mmol/L 氯化镁、其他稳定剂和增强剂]购自北京天为时代科技有限公司, FTA 滤膜购自英国 Whatman 公司。

1.3 巢式 PCR 引物<sup>[2,3]</sup> 第 1 轮 PCR 引物, ExCry1: 5'-TTCT-AGAGCTAATACATGCG-3', ExCry2: 5'-CCCACCTT CTTCGAA-GCAGGA-3'; 第 2 轮 PCR 引物, NesCry3: 5'-GGAAGGGTTG-TATTTATTAGATAAAG-3', NesCry4: 5'-CTCATAAGGTGCTGA-AGGAGTA-3'。以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 免疫磁珠(IMS)分离纯化隐孢子虫卵囊<sup>[4]</sup> 按照抗隐孢子虫磁珠试剂盒操作说明进行隐孢子虫卵囊的分离纯化。在 L10 管内加入饮料样品 10 ml(原液)、1 ml 10×SL™ 缓冲液 A 和 1 ml 10×SL™ 缓冲液 B; 吸取 100 μl 混旋好的抗隐孢子虫磁珠加入 L10 管内; 用混合器(DYNAL MX1, 丹麦 Dynal 公司)在室温下混合 1 h; 把 L10 管放到磁极上, 90°转动 2 min, 弃上清液; 将 L10 管从磁极取下后加入 1 ml 1×SL™ 缓冲液 A 旋转混匀, 将 L10 管中所有液体和磁珠转移到另一离心管(1.5 ml)内, 再将离心管放到磁极上, 90°转动 1 min, 弃上清液; 把 1.5 ml 离心管从磁极上取下, 加入 100 μl 0.1 mol/L 盐酸, 涡旋 10 s, 室温下放置 5 min, 再涡旋 10 s, 放到磁极上 10 s。将管内与磁珠分离后的卵囊溶液转移到另一离心管中, 并用 10 ml 1 mol/L 氢氧化钠中和, 4 °C 保存备用。

1.5 DNA 抽提<sup>[5-7]</sup> 将上述分离纯化好的隐孢子虫卵囊约 10 μl 滴加到 FTA 滤膜上, 室温干燥。用单孔打孔器(直径 6 mm)从样品卡上取 6 mm 的小圆片, 并将其放入 1.5 ml 离心管中。吸取

基金项目: 上海市科委技术标准专项资助项目 (No. 05dz05008)

作者单位: 1 上海出入境检验检疫局, 上海 200135;

2 华东理工大学, 上海 200237

\* 通讯作者, E-mail: lixh@shciq.gov.cn

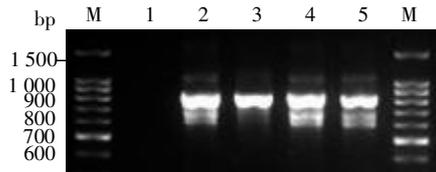
400  $\mu$ l FTA 纯化试剂, 室温培养 5 min, 吸出洗涤纯化后的缓冲液, 重复一次。加入 400  $\mu$ l FTA 洗涤试剂, 室温培养 5 min, 吸出加入的洗涤试剂, 重复 2 次。将上述处理过的圆片室温下干燥 1 h 或 56  $^{\circ}$ C 干燥 10 min 至完全干燥。干燥后的圆片可常温下保存。

**1.6 巢式 PCR 扩增** 第 1 轮 PCR 扩增反应体系为: 将上述方法制得的 FTA 滤膜片作为模板, 加 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 50  $\mu$ l, 1% BSA 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 引物各 2.5  $\mu$ l, 双蒸水 41  $\mu$ l。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 54  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min。扩增产物长度为 1 330 bp。第 2 轮 PCR 扩增反应体系为: DNA 模板 (第一轮 PCR 产物) 1  $\mu$ l, 2 $\times$ Taq PCR 基本混合液 50  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 引物各 5  $\mu$ l, 双蒸水 39  $\mu$ l。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 4 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 58  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 8 min。扩增产物长度为 830 bp。取 PCR 扩增产物 10  $\mu$ l, 在含有溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察并拍照。

**1.7 FTA/PCR 敏感性检测** 将贝氏隐孢子虫卵囊用血球计数板计数为  $1.0 \times 10^8$  个/ml, 再分别依次稀释为  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^1$  个/ml。取橙汁饮料样品 8.9 ml, 加入上述已知浓度的 1.1 ml 卵囊中, 混合。经免疫磁珠分离纯化后, 每个接种样品取 10  $\mu$ l 加到 FTA 滤膜上抽提 DNA, 进行巢式 PCR 扩增。

## 2 结果

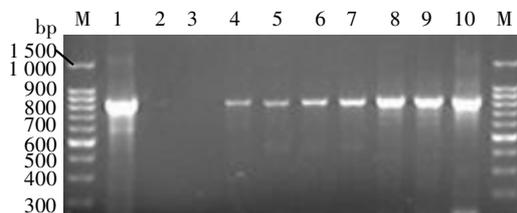
**2.1 引物的特异性** 分别对微小隐孢子虫、贝氏隐孢子虫的卵囊、安氏隐孢子虫和犬隐孢子虫进行巢式 PCR 反应, 4 种不同的隐孢子虫均可扩增出 830 bp 目的片段(图 1)。



M: DNA 标志物, 1: 阴性对照 (ATCC 51816 金黄色葡萄球菌), 2: 微小隐孢子虫, 3: 贝氏隐孢子虫, 4: 安氏隐孢子虫, 5: 犬隐孢子虫。

图 1 巢式 PCR 引物特异性检测结果

**2.2 模拟样品敏感性实验结果** 饮料样品中添加贝氏隐孢子虫卵囊浓度分别为  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^1$ 、 $1.0 \times 10^0$ 、 $1.0 \times 10^{-1}$  个/ml, 结果可见模拟样品中贝氏隐孢子虫卵囊检测的最低限度为 1.0 个/ml(图 2)。



M: DNA 标志物, 1: 阳性对照, 2: 阴性对照 (ATCC 51816 金黄色葡萄球菌), 3~10: 贝氏隐孢子虫的卵囊数分别为  $1.0 \times 10^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^0$ 、 $1.0 \times 10^1$ 、 $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^3$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^6$  个/ml。

图 2 模拟样品的敏感性检测

## 3 讨论

目前的检测方法在 DNA 制备方面费时费力、效率低且容易产生不一致的结果。尤其在隐孢子虫数较少时, 效果不佳。其检测敏感性受样品基质和样品处理过程影响, 检测结果易出现假阴性。本实验采用的 FTA 滤膜 (英国 Whatman 公司的专利产品), 是经变性剂、螯合剂和自由基浸渍而成。隐孢子虫卵囊加到 FTA 滤膜上时, 卵囊裂解, DNA 释放出来并结合到滤膜上, 其他的裂解碎片及 PCR 抑制因子将经由纯化试剂和洗涤试剂洗涤后除去。因此这样不但可以免受样品基质的影响, 而且可以达到较高的检测敏感性。FTA 滤膜经洗脱干燥后, 易于保存, 常温下可放置十多年, 使用非常方便。该操作过程极其简单, 从加样到 DNA 模板干燥整个程序不超过 3 h。

本实验的巢式 PCR 根据隐孢子虫 SSU rRNA 的基因序列设计内外两对引物, 连续进行两轮 PCR, 对于浓度较低的卵囊悬液, 可显示出其较高的敏感性。同时利用免疫磁珠分离, 具有较高的特异性和回收率<sup>[4]</sup>。可大大提高检测的灵敏度。

本研究建立的 FTA/PCR 方法, 经实验证明是一种简单、快速、高灵敏度且经济的快速检测饮料中隐孢子虫的方法, 是目前饮料中隐孢子虫检测方法中较好的方法。

## 参 考 文 献

- [1] Chen PH. Human Parasitology [M]. 4th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 73-77. (in Chinese) (陈佩惠. 人体寄生虫学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 73-77.)
- [2] Zhang LX, Jiang JS, Liu Q, et al. Study on detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal sample from animal by nested-PCR [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2003, 34 (5): 509-514. (in Chinese) (张龙现, 蒋金书, 刘群等. 巢式 PCR 检测隐孢子虫卵囊的研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34 (5): 509-514.)
- [3] Xiao L, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (4): 1578-1583.
- [4] US Environmental Protection Agency. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration, immunomagnetic separation, and fluorescent antibody [R]. Office of Water, Washington, DC Publication, 1999b. EPA-821-R-99-006.
- [5] Orlandi PA, Lampel KA. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa [J]. Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2271-2277.
- [6] Orlandi PA, Frazar C, Carter L, et al. Detection of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* [A]. From Fresh Production, Isolation and Identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Microscopic Analysis [C]. Chapter 19A (revised), Bacteriological Analytical Manual Online, 2004.1-9.
- [7] Geoff H, Jacqueline MH, Robert M. A rapid and simple method of detection of *Blepharisma japonicum* using PCR and immobilisation on FTA paper [J]. BMC Ecology, 2003, 3: 7.
- [8] Xiao LH, Fayer R, Ryan U, et al. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health [J]. Clin Microbiol reviews, 2004, 17 (1) : 72-97.

(收稿日期: 2007-08-14 编辑: 盛慧锋)