

文章编号: 1000-7423(2008)-04-0299-05

【实验研究】

实时荧光定量 PCR 法检测日本血吸虫

周立¹, 梁冰¹, 赵友云^{1,2}, 黄露¹, 王业富^{1*}

【摘要】 目的 运用实时荧光定量 PCR 法检测日本血吸虫。方法 根据日本血吸虫 18 S 小亚基单位核糖体核酸 (18S rRNA) 基因设计特异性引物, PCR 扩增出 1 450 bp 序列, 经 TA 克隆后转入大肠埃希菌 DH5 α , 提取重组质粒, 鉴定后作为模板制作荧光定量 PCR 标准曲线。方法重现性评价, 用初始循环数 (Ct, 拷贝/反应) 进行标准差分析, 并计算变异系数 (CV)。结果 制作的标准曲线循环阈值与模板浓度具有良好的线性关系, 相关系数为 0.998 7。方法重现性评价, 在 $1.05 \times 10^7 \sim 1.05 \times 10^3$ 个拷贝范围内, 对应的 Ct 平均值分别为 17.55、20.93、24.32、27.59 和 30.95; CV 值分别为 1.31%、1.53%、0.90%、1.85% 及 0.90%, 在重复性试验中试验间数据平均变异系数为 1.27%, 无非特异性扩增。在试验检测范围内 (Ct \leq 30.95), 可检测的日本血吸虫基因组浓度为 6.15 pg, 3 h 内完成。结论 运用荧光定量 PCR 方法检测日本血吸虫 DNA, 快速、灵敏、特异性高。

【关键词】 日本血吸虫; 荧光定量 PCR; TaqMan 探针; 18S 小亚基单位核糖体核酸

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Fluorescent Quantitative Real-time PCR for Detection of *Schistosoma japonicum*

ZHOU Li¹, LIANG Bing¹, ZHAO You-yun^{1,2}, HUANG Lu¹, WANG Ye-fu^{1*}

(1 State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

【Abstract】 Objective To establish a sensitive and specific fluorescent quantitative real-time PCR method for the detection of *Schistosoma japonicum*. **Methods** Based on 18SrRNA sequence of *S. japonicum*, a PCR assay was established. The 1450bp fragment was amplified and cloned into T vector which was subsequently transformed into *E. coli* DH5 α . Following extraction and identification, the positive recombinant plasmid was used as quantitative template to generate standard curve. Reproducibility and specificity of the assay was determined as well. **Results** The standard curve established by recombinant plasmid showed a fine linear relationship between threshold cycle (Ct) and template concentration, and the correlation coefficient was 0.998 7. Using the coefficient of variation (CV) value to evaluate the reproducibility, at the template concentration of $1.05 \times 10^7 \sim 1.05 \times 10^3$ copies per reaction, the average Ct values were 17.55, 20.93, 24.32, 27.59, 30.95, and the CV values were 1.31%, 1.53%, 0.90%, 1.85% and 0.90% respectively. In the evaluation of the reproducibility, the mean interassay CV was 1.27% and no unspecific amplification was observed. The real-time PCR assay could quantitatively detect as low as 6.15 pg *S. japonicum* genome in the study (Ct \leq 30.95), and the detection should be done in 3 hours. **Conclusion** A fluorescent quantitative real-time PCR for the detection of *S. japonicum* is developed, which is rapid, sensitive and specific for pathogen detection.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Real-time PCR; TaqMan probe; 18SrRNA

* Corresponding author, E-mail: wangyefu@hotmail.com

使用病原学方法 (粪检法、组织内虫卵检测法等) 及血清免疫学方法 (酶免疫法、间接血凝试验和胶体金/胶体染料试纸条法) 诊断血吸虫病, 操作较复杂, 低度感染者易漏检。采用压碎法和逸蚴法检测钉

螺感染尾蚴数量, 评估血吸虫病流行态势, 当感染率和感染度较低时同样易漏检。PCR 法用于诊断日本血吸虫病和检测钉螺感染尾蚴情况^[1-3], 其敏感性和特异性虽有提高, 但有其局限性。荧光定量 PCR 可在反应过程中分析和检测其扩增产物 (即“实时”检测), 无须后续凝胶电泳分析, 减少污染, 近年来成为诊断寄生虫病的研究热点, 并已用于诊断线虫病和弓形虫

作者单位: 1 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 武汉 430072; 2 湖北中医学院检验科, 武汉 430061

* 通讯作者, E-mail: wangyefu@hotmail.com

病^[4-6]。Lier 等^[7]用 DNA 结合染料 SYBR Green I 检测日本血吸虫病患者粪便虫卵 DNA 含量, 较粪检法效率高, 特异性强 (可检测仅含 1 个虫卵的粪便样品), 与其他血吸虫不发生非特异性反应。本研究用实时荧光定量 PCR TaqMan 水解探针法检测日本血吸虫成虫 DNA、人畜粪便标本中的血吸虫虫卵 DNA, 以便寻找较好的临床诊断血吸虫病方法, 并为其用于血吸虫病流行趋势调查提供实验依据。

材料与方 法

1 材料来源

日本血吸虫成虫及阴性钉螺, 由湖北省血吸虫病防治所提供。疫区血吸虫病患者粪便样品由湖北省公安县卫生局提供, 于 2007 年 9 月采自公安县斑竹均镇。

2 仪器和试剂

PCR 扩增仪 (PTC-1148, 美国), 琼脂糖凝胶电泳仪 (DYY-III, 北京六一仪器厂), 凝胶成像系统 (FR-980, 上海复日科技有限公司), 紫外分光光度计 (UV-2102PC, 上海尤尼柯公司), 荧光定量 PCR 仪 (ABI 7000, 美国), 恒温恒湿培养箱 (PYX-150H-A, 郑州科力科技有限公司), 超声波细胞破碎机 (Scient JY92-II, 宁波新芝生物科技股份有限公司), 洁净工作台 (SB-JC-1B, 上海博迅实业有限公司) 和低温恒温箱 (Isotemp 3006, 美国)。通用型基因组 DNA 提取试剂盒 (Kit Ver 3.0, 大连宝生物工程有限公司), DNA 胶回收试剂盒 (UNIQ-10, 上海生工生物工程有限公司), TA 克隆试剂盒 (TAK-101, 日本东洋坊公司), B 型质粒小量快速提取试剂盒 (北京博大泰克生物基因技术有限责任公司), DNA (DL2000) 标志物 (广州东盛创新生物技术有限公司)。Taq DNA 聚合酶、热启动酶及脱氧核苷三磷酸 (dNTPs) 等购于上海申能博彩生物技术有限公司。

3 模板 DNA 制备

血吸虫 DNA 的提取, 取血吸虫成虫 128 条 (雌、雄各半), 放入预冷研钵中, 研磨均匀, 用基因组 DNA 提取试剂盒制备模板 DNA, 按说明书进行, 定量到 100 μ l。提取阴性钉螺软体组织 DNA, 方法同上。

用快速一步法 (ROSE) 提取粪便中血吸虫虫卵 DNA。参考 Lier 等^[7] 方法, 配制 ROSE 提取缓冲液 (简称 DNA 缓冲液) [含 10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、300 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 1% 聚乙烯基吡咯烷酮

(PVP), pH 8.0]。取患者粪便 1 g, 置 5 ml EP 管中, 加 1 ml 双蒸水, 剧烈震荡, 500 \times g 离心 2 min, 弃上清。重复操作 1 次, 振荡 10 min。取沉淀, 加入 700 μ l DNA 缓冲液, 混匀, 置 95 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 不时剧烈颠倒, 混匀, 18 000 \times g 离心 10 min, 弃沉淀, 取上清 (约 700 μ l), 加入 3 mol/L 醋酸钠 50 μ l (pH 5.3, 4 $^{\circ}$ C 预冷) 和 1 ml 100% 乙醇 (4 $^{\circ}$ C 预冷), 18 000 \times g 离心 15 min, 弃上清。用 500 μ l 70% 乙醇 (4 $^{\circ}$ C 预冷) 小心清洗, 18 000 \times g 离心 15 min, 弃上清。沉淀置于 37 $^{\circ}$ C 15 min, 然后溶于 100 μ l TE 缓冲液 (含 10 mmol/L Tris·HCl, 0.1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。

4 常规 PCR 引物以及荧光定量 PCR 引物探针的设计

根据日本血吸虫 18S 小亚基单位核糖体核酸 (18S rRNA) 基因序列 (AY157226), 应用 Primer Premier 5.0 软件和 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 的序列比对功能 (Blast), 设计 1 对特异性引物, 扩增片段长度为 1 450 bp, 由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

Sense: 5'-ATTAC CCACT CCCAG CAC-3'

Anti-sense: 5'-AGCGA TAAAG CCACT ACAAG-3'

根据 TaqMan 水解探针和引物设计原则, 用 ABI Primer Express 2.0 软件在常规 PCR 序列的内部保守区域设计荧光定量 PCR 引物和探针, 扩增长度为 81 bp, 由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

18s-FP: 5'-CACAG ACACG GCTGA AAGGT T-3'

18s-RP: 5'-TGCTT GTTCA CGGTC TTGGT TA-3'

Probe: 5'-FAM-CACTA CGCCG AGCTG ACCAC TGCC-Eclipse-3'

5 常规 PCR 扩增产物回收克隆及鉴定

PCR 反应体系为 50 μ l, 其中 10 \times PCR 缓冲液 (含 100 mmol/L Tris·HCl, 500 mmol/L KCl) 5.0 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 3 μ l, 10 mmol/L dNTPs 1.2 μ l、10 μ mol/L 上下游引物各 2.0 μ l、模板 DNA 2 μ l, 5 U/ μ l Taq DNA 聚合酶 0.4 μ l (2U), 加灭菌双蒸水至总体积为 50 μ l。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 胶回收试剂盒回收。在 Taq DNA 聚合酶作用下, 扩增产物 3' 端加了一个碱基 A, 故扩增产物可与 T 载体发生 TA 克隆。在连接酶作用下, 回收片段与载体按摩尔比 3:1 连接, 构建重组质粒, 转化入 DH5 α 感受态细菌, 在含有氨卞青霉素 (Amp) 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 提取质粒并用 PCR (反应体系和反应条件同

上) 和酶切法鉴定, 送上海英骏生物技术公司测序。

6 荧光定量 PCR 反应条件

为提高反应的扩增效率与灵敏度, 选择 $1.05 \times 10^6 \sim 1.05 \times 10^4$ 拷贝/ μl 3 个浓度的重组质粒为检测样品, 50 μl 体系中 Mg^{2+} 浓度分别为 2.5、3.0、3.5、4.0 及 4.5 mmol/L, 引物浓度分别为 0.32、0.36、0.40、0.44 及 0.48 $\mu\text{mol/L}$, 采用矩阵法对两种成分用量进行优化。在最适 Mg^{2+} 和引物浓度下, 对探针浓度在 0.08、0.12、0.16、0.20 及 0.24 mol/L 之间探讨。在荧光定量 PCR 仪上进行, 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 循环过程采用两步法, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 共 40 个循环。通过对 3 种物质不同浓度组合时荧光定量 PCR 反应动力曲线的形状和检测稳定性的比较, 以期找到反应体系中 Mg^{2+} 、引物和探针最适合的浓度组成。

7 制作标准曲线

测定重组质粒吸光度 (A_{260}) 后, 将重组质粒浓度按 10 倍系列稀释成 $1.05 \times 10^{10} \sim 1.05 \times 10^0$ 拷贝/ μl , 分别取 1 μl 为模板, 在最佳反应条件下进行定量扩增。配套电脑软件自动绘制以初始模板浓度 (拷贝数) 的对数为 X 轴 (\lg concentration), 初始循环数 (Ct) 为 Y 轴的标准曲线。

8 荧光 PCR 重复性试验

连续 6 次进行荧光定量 PCR 反应, 每次各浓度设 6 个平行管, 计算试验内、试验间循环阈值 (Ct) 的变异系数。

9 荧光 PCR 特异性和敏感性试验

取 64 对雌、雄各半的日本血吸虫, 提取 DNA 并定量到 100 μl , 用紫外分光光度计测定 DNA 含量为 615 ng/ μl 。然后依次稀释 10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 及 10^6 倍, 分别作为阳性模板, 正常钉螺和白色链球菌 DNA 为阴性模板, 并设空白对照, 进行荧光定量 PCR 反应, 记录试验结果。

10 临床样品检测

用快速一步法提取 50 份患者粪便中血吸虫虫卵 DNA, 进行荧光定量 PCR 反应, 记录结果。

11 结果分析

用荧光定量 PCR 仪配套软件, 制作标准曲线以及每次反应后的动力曲线。对不同浓度下的初始循环数 (threshold cycle, Ct) 进行标准差分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 计算变异系数 (coefficient of variation, CV), $CV = s/\bar{x}$, s 为标准差, \bar{x} 为 Ct 平均值。

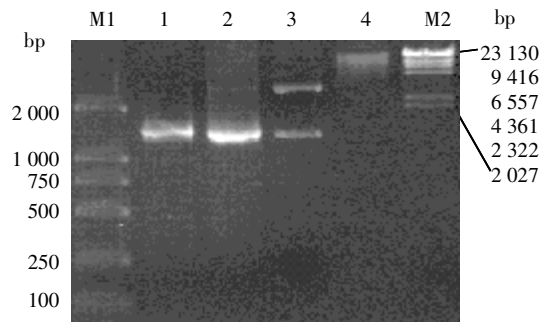
结 果

1 重组质粒筛选和鉴定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到约 1.45 kb 条带。重组质粒经 *EcoR* I 酶切, 得到一条约 1.5 kb 条带 (图 1)。测序结果显示, 除 1 个碱基外 (第 1252 位, A \rightarrow T) 其余均与 NCBI 上发表的序列相同。

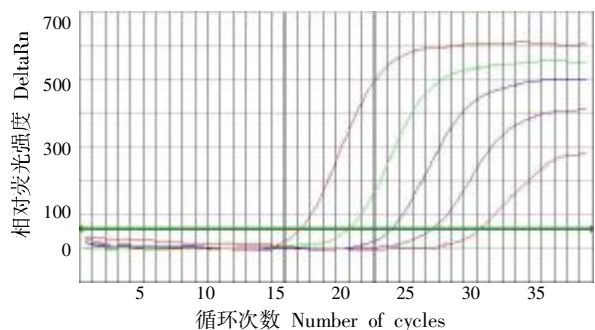
2 荧光定量 PCR 最佳反应条件的摸索

通过多组试验, 最佳反应条件为 Mg^{2+} 浓度为 3.5 mmol/L、引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 。在此条件下, 当探针浓度 ≥ 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 荧光强度并不随探针浓度增加而明显增加, 故选择其浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ (图 2)。



M1: DNA 标志物 (DL2000), M2: DNA 标志物 (λ HindIII), 1: 日本血吸虫基因组 PCR 扩增产物, 2: 重组质粒 PCR 扩增产物, 3: 重组质粒用 *EcoR* I 酶切鉴定, 4: 日本血吸虫基因组 DNA。
M1: DNA marker (DL2000), M2: DNA marker (λ HindIII), 1: PCR product from *S. japonicum* genome DNA, 2: PCR product from recombinant plasmid, 3: Recombinant plasmid digested by *EcoR* I, 4: *S. japonicum* genome DNA.

图 1 日本血吸虫 PCR 扩增以及基因组 DNA 和重组质粒鉴定
Fig.1 PCR amplification of *S.japonicum* genome DNA and identification of the recombinant plasmid



1~5: 重组质粒模板浓度 (拷贝/反应), 1: 1.05×10^7 , 2: 1.05×10^6 , 3: 1.05×10^5 , 4: 1.05×10^4 , 5: 1.05×10^3 。
1~5: Real-time PCR results of the recombinant plasmid concentrations of copies/reaction, 1: 1.05×10^7 , 2: 1.05×10^6 , 3: 1.05×10^5 , 4: 1.05×10^4 , 5: 1.05×10^3 。

图 2 荧光定量 PCR 对 18S rRNA 基因重组质粒的检测
Fig.2 Detection of 18S rRNA recombinant plasmids with 10 fold serial dilution by the real-time PCR

3 制作标准曲线

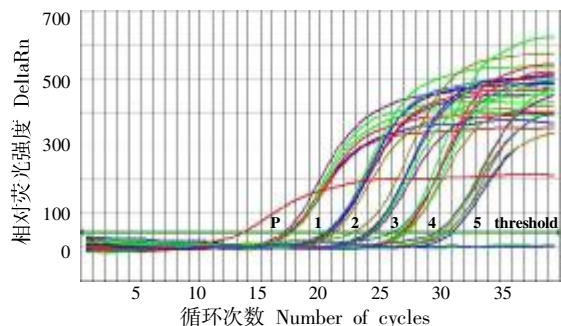
将重组质粒浓度 ($1.05 \times 10^{10} \sim 1.05 \times 10^0$ 拷贝/ μl), 在最佳反应条件下进行定量扩增, 初始模板浓度为 $1.05 \times 10^{10} \sim 1.05 \times 10^3/\mu\text{l}$ 时线性关系较好。使用配套软件制作以初始模板浓度 (拷贝数) 的对数为 X 轴 (lg concentration), 初始循环数 (Ct) 为 Y 轴的标准曲线, 对未知样品定量。

4 荧光定量 PCR 重复性试验结果

重复性试验采用变异系数 (CV) 进行方法重现性评价 (表 1)。以 $1.05 \times 10^7 \sim 1.05 \times 10^3$ (拷贝/反应) 6 个浓度梯度为模板, 每个浓度检测 6 份。对应的初始循环数 (Ct) 平均值分别为 17.55、20.93、24.32、27.59 及 30.95, CV 值分别为 1.31%、1.53%、0.90%、1.85% 及 0.90% (图 3)。

6 特异性与敏感性试验结果

用日本血吸虫成虫 DNA 为阳性模板, 进行荧光定量 PCR 反应, 结果与预期相符, 未见非特异性扩增产物。敏感性试验中, 能检测到最高稀释倍数为 10^5 倍, 即日本血吸虫基因组 DNA 含量为 6.15 pg/反应 , 约 10^5 只日本血吸虫/反应体系。



1~5: 重组质粒模板浓度 (拷贝/反应), 1: 1.05×10^7 , 2: 1.05×10^6 , 3: 1.05×10^5 , 4: 1.05×10^4 , 5: 1.05×10^3 , P: 阳性对照, N: 阴性对照。
1~5: Real-time PCR results of the recombinant plasmid concentrations of 1.05×10^7 , 1.05×10^6 , 1.05×10^5 , 1.05×10^4 , 1.05×10^3 copies/reaction, six reaction mixture used in each concentration, P: Positive control, N: Negative control.

图 3 荧光定量 PCR 重复性试验曲线
Fig.3 Reproducibility curve of real-time PCR

7 临床样品检验结果

以 50 份患者粪虫卵 DNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 反应, 结果 24 份阳性 (阳性率为 48.0%), 其中 23 份与常规粪检以及虫卵孵化法检测结果一致。另 1 份标本用实时荧光定量 PCR 法重复检测 2 次, 结果 Ct 值均约为 30, 接近本实验方法检测的底线, 无法判断是否为阳性, 标注为疑似阳性待作进一步的观察。而粪检及虫卵孵化法检测结果均为阴性。

表 1 荧光定量 PCR 重复性实验数据
Table 1 The reproducibility data of Real-time PCR

样品浓度 (拷贝/反应) Concentration (copies/reaction)	初始循环数 No. Ct						$\bar{x} \pm s$	变异系数 CV(%)
	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp.4	Exp.5	Exp.6		
1.05×10^7	17.71	17.62	17.65	17.13	17.45	17.74	17.55 ± 0.23	1.31
1.05×10^6	21.04	20.85	20.71	21.09	20.48	21.41	20.93 ± 0.32	1.53
1.05×10^5	24.06	24.24	24.18	24.51	24.26	24.66	24.32 ± 0.22	0.90
1.05×10^4	26.97	28.07	27.11	27.33	28.00	28.08	27.59 ± 0.51	1.85
1.05×10^3	31.16	30.88	31.19	30.64	31.22	30.60	30.95 ± 0.28	0.90

讨 论

诊断血吸虫病, 主要依靠血清免疫学和病原学方法。目前尚未找到一种敏感性好、特异性强的单抗, 而血吸虫生活史不同阶段的抗原性有差异, 给免疫学检测带来一定的困难。病原学诊断在实际操作中较复杂。传统的钉螺压碎镜检尾蚴法和逸蚴法, 在检测效率、标准化及鉴别方面存在诸多不足。

近年研究资料表明, 检测日本血吸虫 DNA 的 PCR 技术已经建立。陈一平等^[1] 报道检测日本血吸虫 5D 基因的实验研究, 通过巢式 PCR (nest-PCR) 能够检测到单个虫卵、单个尾蚴或者针尖大小的成虫组

织, 且与人类基因组和肠道细菌无交叉阳性出现。周钧等^[8] 以 5D 基因为靶标设计了基因芯片, 能够特异、敏感地检测出感染性钉螺, 江西、湖南感染性钉螺的检出率为 100%, 但对安徽省品系的感染性钉螺检出率略低。Driscoll 等^[3] 报道检测日本血吸虫尾蚴的 PCR 方法选择的靶基因为日本血吸虫基因组中有大量拷贝数的一种逆转录子 (SjR2)。陈军虎等^[2] 报道了检测日本血吸虫感染性钉螺 PCR 方法, 靶基因是 18S 小亚基单位核糖体核酸基因。以上研究选择的都是一些相对保守的多拷贝基因序列, 这些序列在不同个体中碱基差异不大, 保守性好; 用这些多拷贝基因序列进行检测, 可以增强扩增灵敏度。荧光定量 PCR

法, 具有高灵敏、高特异、低污染和实时监测的特点, 将该方法应用于检测寄生虫也是一种发展趋势^[5]。Lier 等^[4] 报道用荧光染料法检测日本血吸虫, 靶基因是线粒体还原型辅酶 I (ND I) 基因。本实验采用实时荧光定量 PCR 水解探针法, 且合成的 TaqMan 探针 3' 端标记的非荧光淬灭基团 Eclipse, 可降低背景干扰。相对于荧光染料法、水解探针法特异性和敏感性更好。

本研究在靶基因的选择上, 考虑了 5D 基因、ND I 基因、逆转录子 Sjr2 序列及 18S rRNA 等基因的特点。5D 基因长约 560 bp, 为一重复序列, 但能够给予设计引物探针的序列长度不足, 5D 基因与 8C、8I 基因同源性很高, 不能设计仅仅能扩增出 5D 基因的特异引物, 不利于制备重组质粒^[9]。ND I 基因是线粒体基因, 且进化速率较快, 而线粒体 DNA 的演化快于 (/等于) 核 DNA^[10]。根据郭凯文等^[11] 的研究, 我国各地日本血吸虫线粒体 DNA 片段存在不同程度的遗传差异, 比例为 0.3%~6.7%。Taqman 探针理论上能区分 1 个碱基的差异, 这种遗传差异会影响探针的灵敏性以及适用范围, 可能出现假阴性。逆转录子 Sjr2 序列长度约为 3.9 kb, 在日本血吸虫基因组中约有 10 000 个拷贝, 拷贝数大、且分散在整个染色体中, 约占核基因组的 14%^[12], 具有保守性和多拷贝的优势。18S rRNA 基因是一种持家基因 (house-keeping gene), 在日本血吸虫基因组中拷贝数也相当大, 以串联多拷贝的形式组成庞大的多基因家族, 可大大提高检测的灵敏度, 其进化速率在核糖体 DNA 中最慢。18S rRNA 基因与 Sjr2 序列相比, 除了具有相对其他候选基因的优点外, 还是作为检测日本血吸虫其他基因表达时的内参。

目前已知的 19 种裂体属的血吸虫, 根据其成虫和卵的形态、生活史、地理分布等方面把它们分为 4 个种群, 即曼氏血吸虫种群、埃及血吸虫种群、日本血吸虫种群和印度血吸虫种群。日本血吸虫群包括日本血吸虫 (*S. japonicum*)、湄公血吸虫 (*S. menkongi*) 和马来血吸虫 (*S. malayensis*)^[13]。本研究选取的 18S rRNA 靶序列是日本血吸虫群特有的, 属核糖体 DNA 中转录区域, 具有种内高度保守性和种间特异性。18S rRNA 基因是一种持家基因, 其表达量在一定条件下稳定, 能作为荧光定量检测日本血吸虫群基因表达的内参, 为基础研究提供参考。日本血吸虫群中 3 种血吸虫在我国只有日本血吸虫分布, 故该方法可特异地检测出日本血吸虫。从荧光定量 PCR 标准曲线可以看出, 不同拷贝数的对数值与 Ct 之间有较好的线性关系, 相关系数达 0.998 7。该实时荧光定量 PCR 法的灵敏度很

高, 一方面由于该方法本身具有的高灵敏性, 另一方面采用了多拷贝的基因序列。从重复试验显示, 该方法重复性可以满足实际检验应用的要求。特异性试验显示未见非特异性扩增产物。

本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测日本血吸虫 DNA, 最低检测浓度约为 6 pg。本法已经初步应用于血吸虫病患者粪便标本检测, 准确性和特异性较好。

参 考 文 献

- [1] Chen YP, Weng XH, Xu ZY, et al. Experimental study on detection of *Schistosoma japonicum* 5D gene by using PCR[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1998, 16(1): 58-61. (in Chinese) (陈一平, 翁心华, 徐肇玥, 等. 聚合酶链反应检测日本血吸虫 5D 基因的实验研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(1): 58-61.)
- [2] Chen JH, Wen LY, Zhang XZ, et al. Development of a PCR assay for detecting *Schistosoma japonicum*-infected *Oncomelania hupensis*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24(3): 204-207. (in Chinese) (陈军虎, 闻礼永, 张旭照, 等. 检测日本血吸虫感染性钉螺 PCR 方法的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24(3): 204-207.)
- [3] Driscoll AJ, Kyle JL, Remais J. Development of a novel PCR assay capable of detecting a single *Schistosoma japonicum* cercaria recovered from *Oncomelania hupensis*[J]. Parasitology, 2005, 131(4): 497-500.
- [4] Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology[J]. Trends Parasitol, 2002, 18(8): 337-342.
- [5] MacMillan K, Blok V, Young I, et al. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(14): 1453-1461.
- [6] Lin MH, Chen TC, Kuo TT, et al. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(11): 4121-4125.
- [7] Lier T, Simonsen GS, Haaheim H, et al. Novel real-time PCR for detection of *Schistosoma japonicum* in stool[J]. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth, 2006, 37(2): 257-264.
- [8] Zhou J, Tao KH, Li YX, et al. Development and preliminary application of the genechip for detection of *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Pest Control, 2003, 19(9): 524-527. (in Chinese) (周钧, 陶开华, 李越希, 等. 基因芯片检测日本血吸虫及其现场应用[J]. 医学动物防制, 2003, 19(9): 524-527.)
- [9] Scallon BJ, Bogitsh BJ, Carter CE, et al. Characterization of a large gene family in *Schistosoma japonicum* that encodes an immunogenic miracidial antigen[J]. Mol Biochem Parasitol, 1989, 33(22): 105-112.
- [10] Hoeh WR, Blakley KH, Brown WM, et al. Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA [J]. Science, 1991, 251(5000): 1488-1490.
- [11] Guo KW, Niu AO. Studies on the genetic variation of two mitochondrial DNA molecules of *Schistosoma japonicum*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2004, 22(5): 300-302. (in Chinese) (郭凯文, 牛安欧. 日本血吸虫线粒体 DNA 两个分子的遗传变异[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2004, 22(5): 300-302.)
- [12] Laha T, Brindley PJ, Smout MJ, et al. Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*[J]. Int J Parasitol, 2002, 32(9): 1163-1174.
- [13] Rollinson D, Simpson AJG. The Biology of Schistosomes: from Genes to Latrines[M]. London: Academic Press, 1987. 1-49.

(收稿日期: 2007-09-19 编辑: 富秀兰)