

9 种蜱媒病原体 xMAP 悬浮芯片高通量检测方法的建立

王旺, 杨宇, 王静, 赵婷婷, 孙肖红, 刘丽娟

中国检验检疫科学研究院卫生检疫研究所, 北京 100123

摘要: 目的 建立森林脑炎病毒(forest encephalitis, TBEV)、新疆出血热病毒(Xinjiang hemorrhagic fever, XHF)、斑点热群立克次体(spotted fever group rickettsiae, SF)、巴贝西原虫(*Babesia* spp.)、埃立克体(*Ehrlichiae*)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*, Fr)、Q 热立克次体(*Coxiella burnetii*, Q)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*, Bo)、巴尔通体(*Bartonella*, Barton)9 种蜱传病原体的悬浮芯片多重检测方法。方法 将 9 种蜱媒病原体分为两组构建多重 PCR 体系, 各上游引物均带有不同的 anti-TAG 标记, 下游引物标记生物素, PCR 产物与偶联对应 x-TAG 的磁性微球进行杂交, 结合物用 Bio-plex 100 液相芯片系统检测, 并对 9 种蜱媒病原体分别进行单一、多重检测分析。结果 将平均荧光强度的判定阈值定为背景对照的 3 倍, 多批次实验均能对混合模板进行准确鉴定, 未出现交叉反应, 表明该方法的稳定性和特异性均较好; 同时对该方法的灵敏性进行鉴定, 结果表明本检测方法灵敏度良好。结论 通过利用偶联有标签序列及生物素的引物对, 成功建立了可同时检测 9 种蜱媒病原的液相芯片检测技术平台; 该平台对于蜱媒病原体的检测具有较好的应用前景。

关键词: 悬浮芯片; 蜱媒; 多重; 标签序列

中图分类号: R384.4; R373.3 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)05-0397-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2013.05.005

High-throughput xMAP suspension arrays for simultaneous detection of 9 tick-borne pathogens

WANG Wang, YANG Yu, WANG Jing, ZHAO Ting-ting, SUN Xiao-hong, LIU Li-juan

Institute of Health Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China

Corresponding author: WANG Jing, Email: wangjing0115@126.com

Supported by the International Cooperation Project of Ministry of Science and Technology (No. 2010DFA34250) and the Basic Scientific Research Project of Chinese Academy of Inspection and Quarantine (No. 2012JK016)

Abstract: Objective To develop xMAP suspension arrays for simultaneous detection of tick-borne pathogens including forest encephalitis virus, Xinjiang hemorrhagic fever virus, spotted fever group rickettsiae, *Babesia* spp., *Ehrlichiae*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi*, and *Bartonella*. **Methods** The 9 tick-borne pathogens were divided into two groups, and a multiplex PCR system was designed with up-primers labelled with anti-TAG and down-primers labelled with biotin. The PCR products were hybridized to the magnetic microspheres coupled with x-TAG. The conjugates were tested using the Bio-plex 100 system, and the 9 tick-borne pathogens were subjected to single and multiple detections and analyses. **Results** The mean fluorescence intensity three times higher than that of the background was judged as positive reaction. The results of single-plex and multiplex assays for the pathogen cultures demonstrated specific positive signals, without cross reaction, and the stability, sensitivity, and specificity of the method was good. **Conclusion** The liquid biochip technology platform with the beads coupled with x-TAG, which can simultaneously detect 9 tick-borne pathogens, has been successfully established. This platform holds promise for detection of tick-borne pathogens.

Key words: Suspension array; Tick-borne pathogen; Simultaneous detection; x-TAG

蜱是一种寄生在动物体表的吸血寄生虫, 作为最

重要的医学媒介之一, 蜱种类多、分布广、生活习性多样, 能侵袭鸟类、爬行类、哺乳动物等多种宿主, 并且能传播多种病原体, 其中大多数是重要的自然疫源性疾

基金项目: 科技部国际合作项目(2010DFA34250); 中国检验检疫科学研究院科研基金项目(2012JK016)

作者简介: 王旺(1984-), 男, 主要从事传染性病原体检测技术研究。

Email: ww19841016@yahoo.com.cn

通讯作者: 王静, Email: wangjing0115@126.com

病和人兽共患病, 且大部分都没有有效疫苗, 给人类健康及畜牧业带来重大危害^[1-2]。因此开发针对蜱传病原特异、敏感且快速的检测方法对相应疾病的预防控

制具有重要意义。

悬浮芯片(suspension array)也称液相芯片(liquid array, liquid chip),是一种非常灵活的多功能技术平台,可以进行蛋白、核酸等生物大分子检测、受体和配体识别分析等研究。悬浮芯片主要通过可偶联探针的荧光编码微球与两束激光检测,对被测物的定性和定量分析,一个反应孔内可以完成 100 种不同的生物学反应,从而实现核酸的多重检测^[3]。本研究利用悬浮芯片系统为平台,针对 9 种重要的蜱传病原,建立一种能检测蜱类所携带的一种或多种病原的迅速、准确而可靠的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及样品 分别包含 9 种病原检测靶标基因的菌株,由北京华大基因公司合成基因片段后,转化至 JM109 菌株。亚东璃眼蜱(*Hyalomma asiaticum kozlovi*)成蜱 58 只,2010 年 5 月在内蒙古乌拉特中旗甘其毛都

口岸地区采集。

1.1.2 主要试剂及仪器 酶及缓冲液(TaKaRa, 大连);DNA-marker(TaKaRa, 大连);胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒(QIAGEN, Germany);反转录试剂盒(PROMEGA, USA);MicroPlex-TAG Beads(Luminex, USA);藻红蛋白标记的链霉亲和素(Streptavidin-R-phycoerythrin, SA-PE) Invitrogen 公司 SA-PE(Invitrogen, USA);96 孔酶标板(Nunc, USA);Bio-plex 100 液相芯片检测系统(Bio-rad, USA);恒温混匀器(Eppendorf, Germany)。

1.1.3 引物设计与合成 通过 DNASTAR 软件分别对每个属的基因进行序列比对和保守序列分析。用 PrimerPlex 软件设计特异引物。每条上游引物 5' 端添加特异的标签序列(TAG)(与 Luminex 公司提供 x-TAG 磁性微球上的 anti-TAG 序列反向互补),引物与 TAG 之间连接 C9 作为加臂,下游引物 5' 端用生物素修饰。PCR 引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1)。

表 1 多重 PCR 扩增过程所用引物

Table 1 Primers used in the process of multiplex PCR amplification

检测病毒	引物序列*(5' ~3')	扩增长度 (bp)	微球 编号
土拉弗朗西斯菌	ACATCAAATTCCTTTCAATATCTTCAGGTTTCAGCTACAGCATCTATCGCTACCCCTCTGCCATTAGCACC	550	55
Q 热立克次体	TCATCACTTTCTTTACTTTACATTGAAGCGCAACAAGAAGAACACATGAGCGGTTTCGTGCTTC	437	44
伯氏疏螺旋体	ACTACTTATTCTCAAACCTAATAATGCACATCTGGTGTAACTAGACTTATCACCGGCAGTCTTA	351	33
巴尔通体	CTTTCTCATACTTTCAACTAATTTGCTATGTCTGCATTCTATCAGATCYTCAATCAATTTCTTTCCA	791	20
森林脑炎病毒	ATTAAACAACCTTAACTACACAAACAGACTTGARATGGCCATGTGGAGCCCATCACTCTGTGTCACACT	373	36
新疆出血热病毒	AATGCTCTACAATTTCTCTCTAATATGGACACYTTCACAACTCGACAAATTCCTGCACCA	536	61
斑点热群立克次体	TTAATACAATTTCTCTCTTTCTCTAGGCAATTAATATCGCTGACGGCATCTGCACTAGCACTTTTC	654	54
巴贝西原虫	TTAAACAACCTTATACAACACAAACCTTAGTATAAGCTTTTATACAGCATAGGTCAGAACTTGAATGATACA	237	53
埃立克体	CACTACACATTTATCATAACAAATCAATTGCTTATAACCTTTTGGTCCCTATTAGGAGGGATACGACCTT	914	42

注: a. 斜体为 TAG(与 x-TAG 磁性微球上的 anti-TAG 反向互补)。

1.2 方 法

1.2.1 多重 PCR 体系及条件优化 将 9 种待检病原体分为 2 组, A 组为土拉弗朗西斯菌、Q 热立克次体、伯氏疏螺旋体、巴尔通体; B 组有巴贝西原虫、森林脑炎病毒、斑点热群立克次体、埃立克体、新疆出血热病毒。

合成好的引物按说明溶解后, 配制多重 PCR 反应体系, 反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

反应结束后以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查扩增情况。结合后续实验结果, 对多重 PCR 的退火温度以及体系中加入引物量进行优化。

1.2.2 杂交及杂交条件的优化 取带有 anti-TAG 标签的微球每种各 3500 个加入到杂交液中, 使其总体积为

35 μl; 向各管中加 10 μl 蜱传病原的 PCR 产物吹打混匀。再向各孔加 4 ng/μl SA-PE 的 1×TMAC 液, 使之总体积变为 80 μl。37 °C 下杂交一定时间。转移至磁力板上洗掉未结合的 PCR 产物再向各孔加入 80 μl 1×TE 溶液, 振荡使微球重悬, 然后用 Bio-Plex 100 进行检测, 通过激发微球基质上的红色分类荧光, 对微球的编号进行识别; 通过激发微球表面的藻红蛋白, 对结合的 PCR 产物进行分析。

杂交条件的优化: 分别对杂交温度、杂交时间和 PCR 产物加入量进行优化。杂交温度分别选择 35、37、40、42、45 °C 进行, 其他步骤按上述进行, 保持不变, 根据信号荧光(MFI)值进行结果判断。确定杂交温度后, 杂交时间分别取 15、20、25、30 min, 进行杂交

时间的优化。

1.2.3 检测体系特异性实验 体系内特异性:将 9 种蜱传病原中每一种模板分别用其他 8 种检测引物扩增并杂交,上机检测 MFI 值,考核系统内对样品检测的特异性。

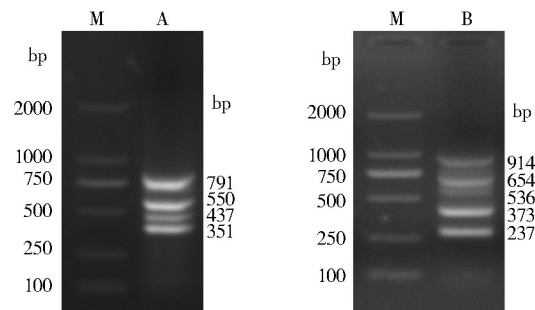
1.2.4 检测体系灵敏度实验 待检目标核酸系列稀释,设 10 个稀释度,最优条件下进行检测,根据检测结果,用 Bio-Plex Version 4.0 软件分析系统得到检测体系的方程拟合标准曲线,同时得出检测体系的检测下限。

1.2.5 样品检测 无菌操作台上,每只蜱用 75%乙醇浸泡 20 min 后,用 PBS(pH 7.4)漂洗 3 次,分装 2 ml 的 EP 管中,加入 500 μ l PBS,研磨后分别取 60 μ l 和 140 μ l 的组织研磨液按照试剂盒说明书提取基因组 DNA 和 RNA。以提取的 DNA 及反转录的 cDNA 为模板,采用新建立的高通量筛查方法检测扩增产物。结果与实验室以往 PCR 方法进行比较。

2 结果

2.1 多重 PCR 反应 按照 1.2.1 中方法配置体系后放

入 PCR 仪中进行扩增,多重 PCR 结果如图 1 所示。



注: M. Marker DL2000; A. Bo、Q、Fr、Barton; B. Babesia、TBEV、XHF、SF、Ehrlichia(从下到上)。

图 1 蜱媒病原多重 PCR 扩增结果
Figure 1 Results of multiplex PCR amplification of tick-borne pathogens

2.2 退火温度优化 按以上基本 PCR 体系,退火温度选择 52、54、56、58、60 $^{\circ}$ C,分别对两组待检病原进行扩增,并同时设置 PCR 阴性对照,扩增结果用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查,结果证明 56 $^{\circ}$ C 时两组中大部分病原检测的 MFI 值均高于其他温度(表 2),因此选用 56 $^{\circ}$ C 为退火温度。

表 2 退火温度优化结果

Table 2 Optimization results of annealing temperature

退火温度 ($^{\circ}$ C)	MFI 值									
	A 组				B 组					
	Q	Fr	Bo	Barton	XHF	TBEV	Babesia	Ehrlichia	SF	
52	2195.0	697.0	935.0	1154.5	994.0	1055.0	2989.0	2008.0	756.0	
54	2628.0	1256.0	1392.5	1676.0	1543.0	1475.5	3442.5	2286.0	1243.5	
56	3524.0	1590.0	1873.5	2355.0	2245.0	1364.0	4346.0	3072.5	1552.0	
58	3203.5	1322.0	2051.0	2078.0	2045.5	1267.5	4032.0	3023.5	1676.0	
60	2467.0	1020.0	1854.0	1446.0	1876.5	1056.0	3575.5	2823.0	1353.0	

2.3 引物对浓度优化 根据基本 PCR 体系对体系内各靶标的扩增情况,对两组 PCR 反应体系中 9 种引物的浓度进行调整,确保各组 PCR 产物在多重 PCR 体系中均能与有效扩增量接近,经调整后各组引物加入量(10 μ mol/L)见表 3。

表 3 引物对加入量优化结果

Table 3 Optimization results of amounts of primers

A 组		B 组	
检测病毒	引物加入量(μ l)	检测病毒	引物加入量(μ l)
Barton	0.8	XHF	1.5
Fr	1.8	SF	2.0
Q	1.2	TBEV	1.2
Bo	1.2	Babesia	1.0
		Ehrlichia	1.5

2.4 杂交以及杂交条件的优化 先后优化 PCR 反应体系和反应过程各条件,优化杂交条件以确保得到高信号的检测值。

2.4.1 杂交温度的优化 杂交温度分别选择 35、37、40、42、45 $^{\circ}$ C 5 个温度进行,以 MFI 值的高低作为条件优化的依据,结果如图 2 所示,在 42 $^{\circ}$ C 时大部分病毒检测时可得到的 MFI 值最高,因此选用杂交温度为 42 $^{\circ}$ C。

2.4.2 杂交时间的优化 确定杂交温度后,杂交时间分别取 15、20、25、30 min,同上一部分进行杂交时间的优化。

如图 3 所示,在杂交进行到 25 和 30 min 时所得到的 MFI 值相近,并且 9 种病原体的检测值普遍高于 15 和 20 min,考虑到实验快捷性,选用杂交时间为 25 min。

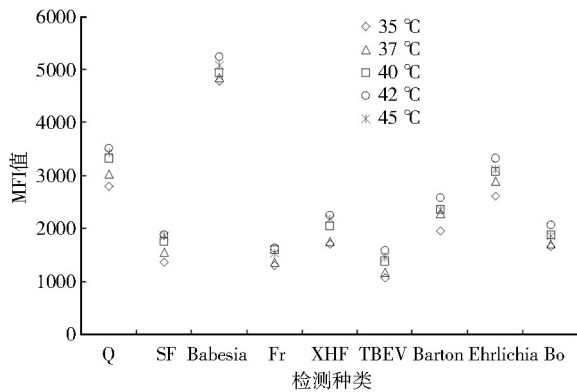


图2 杂交温度优化结果

Figure 2 Optimization results of hybridization temperature

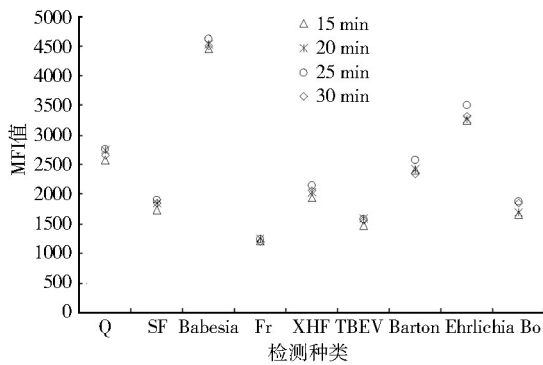


图3 杂交时间优化结果

Figure 3 Optimization results of hybridization time

2.5 敏感性实验 测定9种病原的染色体DNA浓度,分别进行系列稀释,PCR扩增后进行检测,Bio-Plex Version 4.0软件分析,得出剂量-反应曲线并根据方程算出检测下限。经计算,9种病原检测下限如表4所示。

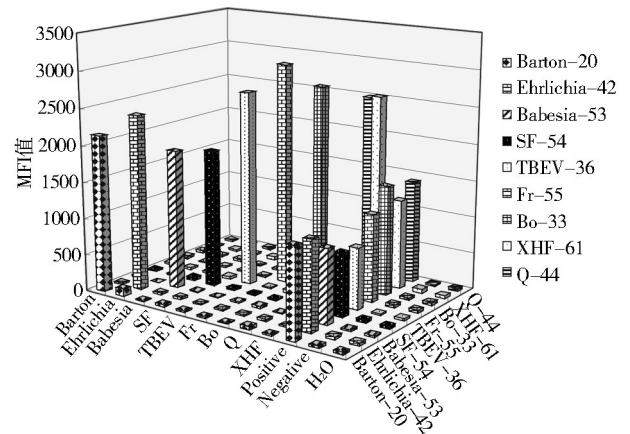
表4 9种蜱传病原检测下限

Table 4 Lower detection limits for 9 tick-borne pathogens

A组		B组	
检测病毒	检测下限 (pg/体系)	检测病毒	检测下限 (pg/体系)
Barton	0.089	XHF	0.767
Fr	0.032	SF	0.311
Q	0.139	TBEV	1.604
Bo	0.032	Babesia	0.098
		Ehrlichia	0.609

2.6 特异性检测 对土拉弗朗西斯菌、Q热立克次体、伯氏疏螺旋体、巴尔通体、巴贝西原虫、埃立克体、斑疹伤寒立克次体、鼠疫耶尔森菌、恙虫病立克次体进行交叉检测,结果如图4所示,体系内交叉检测所得荧光值接近空白值,说明均与组内其他病原间不发生交叉反应,特异性好。

2.7 样品检测 采用建立的多重悬浮芯片检测方法对2010年5月在内蒙古乌拉特中旗甘其毛都口岸地区



注: X轴:检测样品; Y轴:检测项目; Z轴:检测荧光信号(MFV)。

图4 检测体系内部特异性验证结果

Figure 4 Specificity validation results within the detection system

采集的亚东璃眼蜱成蜱58只进行盲测,检出伯氏疏螺旋体5份,与实验室前期荧光定量PCR检测结果相符^[4],证明该方法可以用于实际样品的检测,结果可信度好。

3 讨论

目前全世界面临着新发传染病的重大威胁,其中相当一部分是由蜱媒传播的疾病,包括森林脑炎、克里米亚-刚果出血热、蜱媒斑疹伤寒、Q热、人埃立克体病、莱姆病等。我国已发现119种蜱,其中多数可通过叮咬动物或人而传播疾病^[5]。很多研究发现,蜱传病原往往是2种或多种同时存在于同一蜱媒,肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)是埃立克体的传播媒介,同时也传播莱姆病和巴贝西原虫病^[6],在美国东北部地区,白足鼠(*Peromyscus*)是巴贝西原虫和伯氏疏螺旋体的主要贮存宿主^[7],对许多地区人群的血清流行病学调查也显示存在多种蜱媒病的抗体^[8-9]。因此在检测蜱传病原时需要一种可以同时检测多种病原的快速检测方法,对于媒介控制、保护旅游人群健康具有重要的流行病学和现实意义。

悬浮芯片是近年来兴起的一种检测技术,与常规的病原分离鉴定、琼脂扩散试验、血凝抑制试验、免疫荧光法和ELISA等实验方法相比,具有高通量、操作简便、重复性好、灵敏度高以及线性范围宽等优点,特别适合于多病原体的高通量检测及鉴定,并已经广泛的应用于各种病原体的检测研究^[10-12]。

目前悬浮芯片方法中杂交所采用的主要为直接杂交法,即在检测片段上选取一段序列作为探针,检测前需要预先用氨基化探针对微球进行包被^[13],步骤较繁琐,并且多重检测中,由于多重探针的存在,杂交温度的选择也是一个技术开发时的瓶颈^[14]。利用TAG标

记技术解决了这一问题, x-TAG 与 anti-TAG 是基于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的序列设计而成, 不含有碱基 G, TAG 与 anti-TAG 精确互补、杂交温度统一。杂交前用带有 TAG 序列的探针对扩增产物进行目标特异性引物延伸, 以得到带有 TAG 序列的单链片段, 解决杂交温度统一性问题, 但同时也带来了耗时长步骤繁琐的新问题^[15]。本研究结合前两种方法的优点, 将 TAG 直接合成至引物上, 在 PCR 扩增中直接将 TAG 序列引入扩增产物, 减少了实验操作, 缩短了检测时间, 节省了试剂及耗材。Jobs 等^[16]曾用该方法对真菌进行分型, 成功地区分 10 种不同的真菌种, 但用于同一宿主病原体的多重检测尚属首次。从本实验得到的检测下限可见, 由于引物间扩增效率差距的存在, 几种病原间检测灵敏度差异较大, 部分病原体的检测灵敏度不高, 接下来需要继续优化引物, 从而使检测体系灵敏度均一。

本实验建立的悬浮芯片检测方法经与实时定量 PCR 比对, 对蜱类样品的检测结果完全一致, 且有很好的特异性。由于杂交条件的同一性, 在检测时, 可以根据样本的不同特点, 从中选择所需组合的微球, 随意搭配所需要的检测项目。该悬浮芯片检测方法的建立, 不仅有利于积极开展新发传染病的监测、检测、风险评估和控制的研究, 还可以有效预防和控制传染病的发生和传播, 为传染病的流行趋势提供预测预警信息, 具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 冯云. 重要虫媒病毒传播媒介的研究进展[J]. 医学动物防制, 2008, 24(3): 165-169.
- [2] 刘琪. 蜱及蜱传病的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3): 1107-1109.
- [3] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1/2): 71-82.
- [4] 杨宇, 张晓龙. 2010 年中蒙边境甘其毛都口岸蜱携带病原体调查研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(5): 339-342.

- [5] 杨晓军, 陈泽, 刘敬泽. 中国蜱类的有效属和有效种[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2008, 32(4): 529-533.
- [6] Piesman J, Mather TN, Telford SR, et al. Concurrent *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infection in nymphal *Ixodes dammini* [J]. J Clin Microbiol, 1986, 24(3): 446-447.
- [7] Anderson JF, Johnson RC, Magnarelli LA, et al. *Peromyscus leucopus* and *Microtus pennsylvanicus* simultaneously infected with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* [J]. J Clin Microbiol, 1986, 23(1): 135-137.
- [8] Stafford KC, Massung RF, Magnarelli LA, et al. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(9): 2887-2892.
- [9] Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(3): 724-727.
- [10] Pabbaraju K, Wong S, Tokaryk KL, et al. Comparison of the Luminex x-TAG respiratory viral panel with x-TAG respiratory viral panel fast for diagnosis of respiratory virus infections [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1738-1744.
- [11] Liu J, Kibiki G, Maro V, et al. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis [J]. J Clin Virol, 2011, 50(4): 308-313.
- [12] Iannone MA, Consler TG, Pearce KH, et al. Multiplexed molecular interactions of nuclear receptors using fluorescent microspheres [J]. Cytometry, 2001, 44(4): 326-337.
- [13] 罗渊, 刘伯华, 杨保安. 5 种虫媒病毒悬浮芯片的建立 [J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(6): 708-711.
- [14] Taylor JD, Briley D, Nguyen Q, et al. Flow cytometric platform for high-throughput single nucleotide polymorphism analysis [J]. Biotechniques, 2001, 30(3): 661-666, 668-669.
- [15] Janse I, Bok JM, Hamidjaja RA, et al. Development and comparison of two assay formats for parallel detection of four biothreat pathogens by using suspension microarrays [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31958.
- [16] Jobs M, Eriksson R, Blomberg J. Quantitative and multiplex detection of pathogenic fungi using padlock probes, generic qPCR, and suspension array readout [J]. Methods Mol Biol, 2013, 968: 105-118.

收稿日期: 2013-04-21