

多重荧光定量PCR检测鼠感染 3种病原体的方法

吉尚志^{1,2}, 杨宇¹, 王静¹, 王振东², 纪海波²

(1 中国检验检疫科学研究院卫生检疫研究所, 北京 100123; 2 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: **目的** 建立多重荧光定量PCR快速检测以鼠为宿主伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的方法, 对预防3种病原体引发的疫情具有重要意义。**方法** 通过设计特异性引物和探针, 扩增伯氏疏螺旋体23S rRNA基因, 弓形虫的BI基因和恶性疟原虫的SSU基因, 采用倍比梯度稀释法检测该体系的灵敏度, 以另外8种以鼠为宿主的致病菌评价检测体系的特异性; 建立了同时感染3种病原体的鼠全血模拟样本检测试验, 以验证方法的适用性。**结果** 建立自鼠血液模拟样本中同时检测伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的多重荧光定量PCR方法, 检测3种病原体的灵敏度分别为5.5、12.8、17.2拷贝/ μl , 特异性强。**结论** 建立了多重荧光定量PCR检测伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫方法, 缩短了检测时间, 在疾病防控等方面有很好的应用前景。

关键词: 伯氏疏螺旋体; 弓形虫; 恶性疟原虫; 鼠传疾病; 多重荧光定量PCR

中图分类号: S443; R38 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2011)06-0531-04

A multiplex fluorescent quantitative PCR method for detection of three rodent-carrying pathogens

Ji Shang-zhi^{1,2}, YANG Yu¹, WANG Jing¹, WANG Zhen-dong², Ji Hai-bo²

1 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China;

2 Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China

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

Supported by the Quality Inspection of Public Industry Research Special Project (No. 2007GYJ023, 2007GYJ024) and National Natural Science Foundation of China (No. 30900053)

Abstract: Objective To develop a multiplex fluorescent quantitative PCR assay for rapid and simultaneous detection of *Borrelia burgdorferi*, *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* carried by rodents. **Methods** Specific primers and probes were designed to amplify the 23S rRNA gene of *B. burgdorferi*, the BI gene of *T. gondii* and the SSU gene of *P. falciparum*. The sensitivity of the assay was detected by the fold dilution method. The other eight strains of rodent-borne bacteria were used to examine the specificity of the assay. The method was evaluated to detect *B. burgdorferi*, *T. gondii* and *P. falciparum* simultaneously in mice blood. **Results** A highly sensitive and specific multiplex fluorescent quantitative PCR assay was established for detection of *B. burgdorferi*, *T. gondii* and *P. falciparum*. The sensitivity was 5.5 copies/ μl for *B. burgdorferi*, 12.8 copies/ μl for *T. gondii* and 17.2 copies/ μl for *P. falciparum*. **Conclusion** A multiplex fluorescent quantitative PCR assay was developed for detection of *B. burgdorferi*, *T. gondii* and *P. falciparum*, significantly reducing the time needed for simultaneous detection of the three rodent-borne pathogens.

Key words: *Borrelia burgdorferi*; *Toxoplasma gondii*; *Plasmodium falciparum*; Rodent-borne diseases; Multiplex fluorescent quantitative PCR

伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)主要以蜱为传播媒介^[1], 使人和动物感染莱姆病, 可致皮肤、心脏、神经和关节等多系统、多脏器受到损伤, 严重者终身致残甚至死亡。其在不同时期具有不同的临床症状, 检测

的部位也不同。莱姆病早期, 在蜱的叮咬处常出现游走性红斑, 检测的部位主要是皮肤, 但临床症状比较明显, 比较容易判断。晚期莱姆病常常是未经治疗的患者在数月、甚至数年后发生的, 主要症状表现为关节炎、外周神经病等, 主要检测的是血液^[2]、脑脊液、关节滑液。弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是细胞内寄生虫, 寄生于细胞内, 宿主种类十分广泛, 可侵袭人和易感动物的多种脏器组织, 也是致胎儿畸形的一个重要因素。随血液流动, 到达全身各部位, 破坏大脑、心脏、眼

基金项目: 质检公益性行业科研专项课题(2007GYJ023, 2007GYJ024); 国家自然科学基金(30900053)

作者简介: 吉尚志(1981-), 男, 在读硕士, 从事病原体快速检测技术研究。Email: jishangzhi1164@163.com

通讯作者: 王静, Email: wangjing0115@126.com

底,致使人的免疫力下降,患多种疾病。主要检测血液^[3-4]。疟疾广泛流行于世界各地,据世界卫生组织统计,目前仍有 92 个国家和地区处于高度和中度流行,每年发病例数为 1.5 亿例,死于疟疾逾 200 万例。恶性疟原虫(*Malaria parasite*)侵袭宿主后,主要寄生于宿主的红细胞内,侵犯不同年龄的红细胞。主要检测血液^[5-6]。

3 种病原体分布广泛,危害严重,临床症状相似。如莱姆病和弓形虫都会在皮肤表面出现皮疹、神经系统受到损伤等症状。疟疾和弓形虫常常出现间歇式发热、贫血、肌肉和关节疼痛等症状。同时 3 种病原体也都能以鼠类为宿主^[7-9],传播各种疾病,是世界性的严重威胁人类生命和健康的公共卫生问题。建立一种同时快速检测鼠类血液中的伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的方法,在疾病防控、口岸卫生检疫中都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与动物 伯氏疏螺旋体、弓形虫、恶性疟原

虫、Q 热立克次体、斑点热立克次体、普氏立克次体、莫氏立克次体、鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)、土拉弗朗西斯菌(土拉菌)、类鼻疽菌、布鲁氏菌均为本实验室保存菌种。

1.1.2 仪器 美国 cepheid smartcycler 荧光定量 PCR 仪(购自天津仪美科技有限公司),美国 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司生产),美国 NanoDrop ND-1000 超微量分光光度计(购自摩根生物科技)。

1.1.3 试剂 Premix EX Taq™ × 2、无核酶 H₂O、DNA 回收试剂盒、pMD19-T 载体及连接酶,均购自宝生物工程(大连)有限公司;Qiagen DNA 提取试剂(购自 Qiagen 试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针 伯氏疏螺旋体依据 23S rRNA 基因序列^[10],弓形虫依据 *BI* 基因序列^[11]、恶性疟原虫依据 *SSU* 基因序列设计^[12],三者经 DNASTAR 软件的 primer select 进行引物和探针的多重评价,在理论上符合多重反应。引物和探针序列见表 1。

表 1 伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的引物和探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes of *B. burgdorferi*, *T. gondii* and *P. falciparum*

基因名称	上游引物序列	下游引物序列	探针序列
23S rRNA	cgagtctttaaaggcgatttagt	gcttcagcctggccataaatag	agatgtgtagacccegaagccgagtg
<i>BI</i>	agagacaccggaatcgatct	ttctccaagcctccgact	tcgtggtgatggcggagagaattga
<i>SSU</i>	acatggctatgacgggtaacg	tgccctcttagatgtgtagta	tcaggtccctctccggaatcga

1.2.2 标准品制备 分别将 3 种病原菌的 23S rRNA、*BI* 和 *SSU* DNA 片段上下游各延长 50 bp,经 PCR 扩增后,用 DNA 回收试剂盒回收扩增片段。依据试剂盒说明书,将纯化的目的 DNA 片段连接至 pMD19-T 载体,以 T 载体克隆的目的 DNA 片段作为标准 DNA 模板。用美国 NanoDrop ND-1000 超微量分光光度计测定 DNA 模板浓度,并做 10¹~10⁸ 梯度倍比稀释,作为绝对定量标准品。

1.2.3 荧光定量 PCR 体系建立 先对每种病原体做单体系定性反应,然后逐步增加反应重数,并对多重荧光定量 PCR 反应的引物浓度、探针浓度和 T_m 进行优化,建立最佳反应体系。

1.2.4 灵敏度测试 取伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的标准品各 1.65 μl 均匀混合,然后按 10¹~10⁵ 梯度稀释,每一梯度取 5 μl 作为模板,做 3 个重复的荧光定量 PCR 反应。

1.2.5 特异性测试 用建立的多重荧光定量 PCR 体系,检测 Q 热立克次体、斑点热立克次体、普氏立克次体、莫氏立克次体、鼠疫菌、土拉菌、类鼻疽菌、布鲁氏菌 8 种以鼠类为宿主的病原菌。

1.2.6 鼠全血模拟样本的建立 抽取 3 只体重约为

20 g 的健康 BALB/C 小鼠全血,按 1 ml 血液注入 0.15 ml 伯氏疏螺旋体菌液(0.45 × 10⁶ CFU/ml 菌体)、弓形虫和恶性疟原虫(约 30 个虫体),均匀振荡 30 s,静止 1 h 后,用 Qiagen DNA 提取试剂盒提取全血 DNA 作为检测模板,具体 DNA 提取操作详见试剂盒说明书。

1.2.7 用建立的多重荧光定量 PCR 体系检测小鼠血液 DNA 采用 25 μl 反应体系:伯氏疏螺旋体和弓形虫的上下游引物终浓度均为 15 μmol/L,恶性疟原虫为 12.5 μmol/L,探针浓度分别为 2.5、2.0 和 5.0 μmol/L,模板加 5 μl, MIX 加 12.5 μl。

扩增条件:95 °C 2 min,95 °C 15 s,60 °C 30 s,70 °C 30 s,45 个循环。实时荧光定量 PCR 检测在 smartcycler 荧光定量 PCR 仪上进行。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 灵敏度实验 伯氏疏螺旋体、弓形虫、恶性疟原虫灵敏度测试结果见图 1。按照拷贝数 = [DNA/RNA 浓度(g/ml) × 6.02 × 10²³ 拷贝/mol] / 340 × 单链碱基数(g/mol) 公式计算,该方法检测的灵敏度分别为 5.5、12.8 和 17.2 拷贝/μl。3 个标准曲线的相关值(r)分别为 0.990、0.990 和 0.983,说明 3 个标准

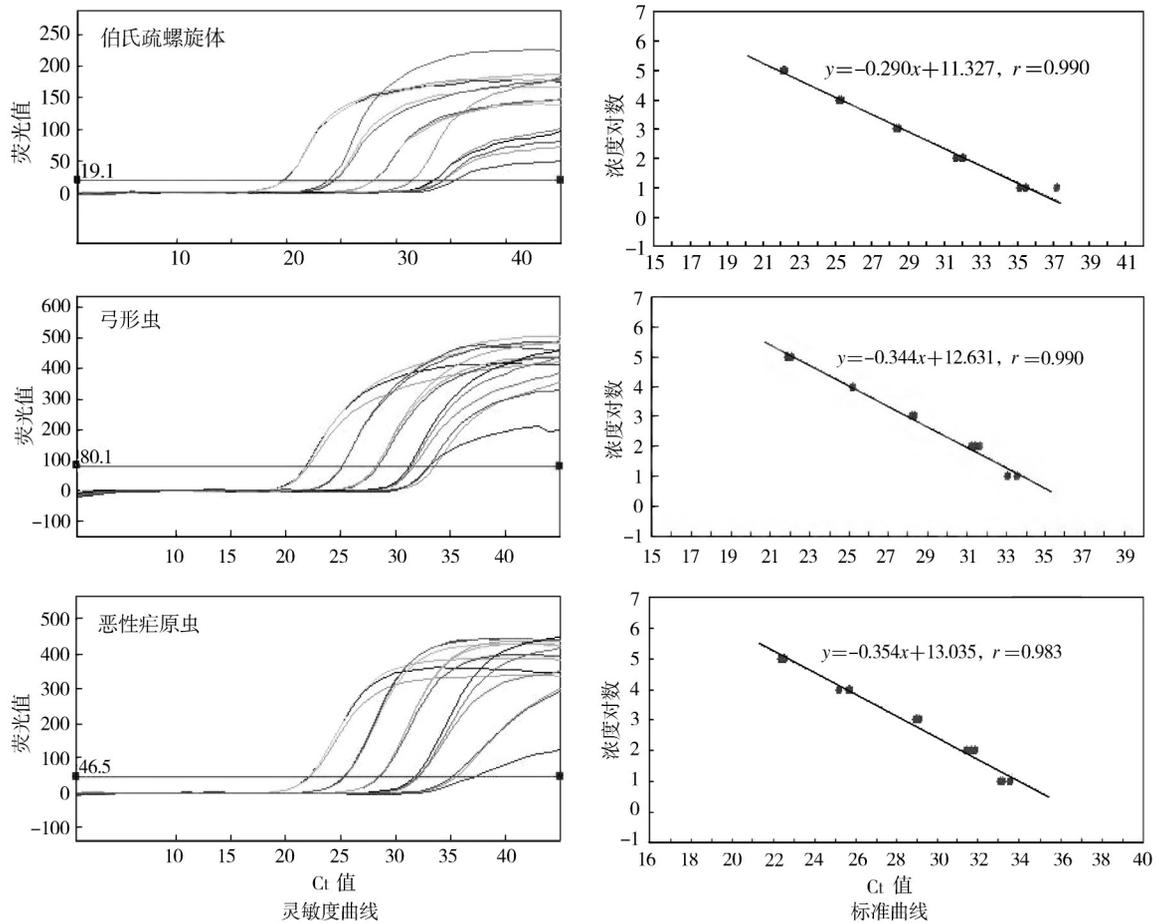


图1 伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的灵敏度曲线和标准曲线
 Fig.1 Sensitivity curve and standard curve of *B. burgdorferi*, *T. gondii* and *P. falciparum*

曲线的各个点呈明显的线相关性,梯度稀释很好。标准品每个梯度重复做3次,每个梯度的Ct值变化很小,说明该实验具有很好的重复性。

2.2 荧光定量PCR特异性实验 用该方法检测Q热立克次体、斑点热立克次体、普氏立克次体、莫氏立克次体、鼠疫菌、土拉菌、类鼻疽菌、布鲁氏菌,结果均呈阴性。

2.3 荧光定量PCR感染样品检测 用该方法检测鼠全血模拟DNA样本,伯氏疏螺旋体、恶性疟原虫和弓形虫都有明显扩增曲线,结果均呈阳性(图2)。该检测在ABI7500荧光定量PCR仪上进行。

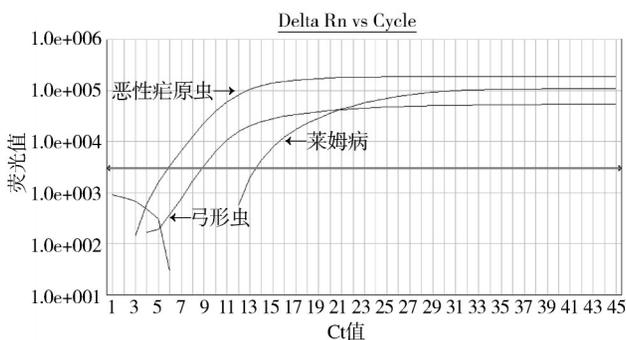


图2 鼠全血模拟样本检测结果
 Fig.2 Simulated whole rodent blood samples

3 讨论

多重荧光定量PCR,是指在同一个荧光定量PCR反应体系中加入2对以上的引物和探针,同时扩增出多个核酸片段的PCR反应。它在具有灵敏度高、特异性强、无交叉污染等特点的同时,还具有以下优点:①高效性,在同一PCR反应管内同时检出多种病原微生物,或对有多个型别的目的基因进行分型。②系统性,多重荧光定量PCR很适宜成组或者感染部位相同的病原体检测,如乙型肝炎病毒、肠道致病性细菌、无芽胞厌氧菌、战伤感染细菌及细菌战剂的同时侦检。③经济简便性,多种病原体在同一反应管内同时检出,将节省大量时间、试剂及经费开支,为临床提供更多、更准确的诊断信息。本实验建立的多重荧光定量PCR方法,可以在同一个PCR体系中同时检测血液中感染的伯氏疏螺旋体、恶性疟原虫和弓形虫3种病原体。在节省实验成本的同时,也缩短了检测时间,对3种病原体的及时诊断和防控具有重要意义。

目前,多重荧光定量PCR已成为实验室检测病原体的主要手段之一,但在多重检测体系中,多对引物和

探针及荧光基团之间会相互干扰,导致实验出现非特异、灵敏度不高、特异性不强、甚至检测不出来的情况。解决多对引物和探针之间的相互干扰问题,是做多重荧光定量 PCR 的关键。

本实验通过 primer select 软件评估了大量关于伯氏疏螺旋体、弓形虫和恶性疟原虫的引物和探针,选择相互之间 ΔG 最大并且 T_m 值相同的 3 组,把多对引物和探针之间的相互干扰降到最低,并对反应体系进行了优化,根据扩增曲线的形状有针对性的增大或减少每对引物和探针的浓度,最终的优化条件:伯氏疏螺旋体和弓形虫的上下游引物终浓度均为 $15 \mu\text{mol/L}$,恶性疟原虫为 $12.5 \mu\text{mol/L}$,探针分别为 2.5 、 2.0 、 $5.0 \mu\text{mol/L}$,MIX 为 $12.5 \mu\text{l}$ 。最终使该体系检测 3 种病原体的灵敏度分别达到 5.5 、 12.8 和 17.2 拷贝/ μl ,同时具有很强的特异性。

在多重荧光定量 PCR 实验过程中有几个方面不同于单重荧光定量 PCR,需要注意:①做多重荧光定量 PCR 时,要按照重数逐步增加的原则,先做单重定性实验,确保每对引物和探针都能扩增出对应的病原体,然后再逐步增加检测的重数,这样有利于对实验结果的分析。②设计探针时要使每种病原体探针的报告基团荧光发射最大波长处于不同的光谱范围,以确保荧光定量 PCR 仪的检测通道能区分每种病原体的探针。本实验选用的 FAM、JOE、TexasRed 和 CY5 四种荧光染料,其波长处于不同光谱范围,相互间不能干扰,具有明显的区分效果和信号强度。③当某种病原体未扩增出或者扩增出来的曲线相对于其他曲线信号强度偏低时,需要增加这种病原体的引物和探针浓度,同时降低曲线信号强度最强的引物和探针的浓度。本实验中莱姆病的荧光检测信号强度相对于弓形虫、疟疾偏低,通过不断提高莱姆病的引物和探针浓度,同时降低弓形虫、疟疾的引物和探针浓度,最终使三者都有明显的扩增曲线和信号强度。④要调整多重模板的浓度处于适当的比例,彼此之间的浓度差别不要太大。高浓度的模板常常会对低浓度模板的扩增产生一定的抑制作用。

本实验建立的多重检测体系可同时检测出伯氏疏螺旋体、恶性疟原虫和弓形虫 3 种病原体,并且具有很高的灵敏度和很强的特异性。通过检测鼠全血模拟样

本,验证了该方法的可靠性。该方法可以广泛地应用于以鼠为宿主的伯氏疏螺旋体、恶性疟原虫和弓形虫的快速检测,在疾病的防控和出入境检验检疫领域具有很好的应用前景。

参考文献

- [1] Kumar M, Yang XL, Adam S, et al. BBA52 Facilitates *Borrelia burgdorferi* transmission from feeding ticks to murine hosts [J]. J Infect Dis, 2010, 201(7): 1084-1095.
- [2] Sabljic ER, Arnez M, Furlan SL, et al. Genotypic and phenotypic characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human blood [J]. J Med Microbiol, 2001, 50(10): 896-901.
- [3] 陈俏梅,张俐,何国声. 检测实验动物弓形虫感染的 2 种 PCR 方法的建立和比较 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2003, 11(2): 5-8.
- [4] Silveira C, Vallochi AL, Ulisses RS, et al. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis [J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(3): 396-400.
- [5] 刘忠湘,孙明林,赵亚,等. 不同血样收集和模板制备方法聚合酶链反应检测疟疾比较 [J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(1): 21-23.
- [6] Antia R, Yates A, Jacobus CR. The dynamics of acute malaria infections. I. Effect of the parasite's red blood cell preference [J]. Proc R Soc B, 2008, 275(1641): 1449-1458.
- [7] Ouyang Z, Haq S, Norgard MV. Analysis of the *dbpA* upstream regulatory region controlled by RpoS in *Borrelia burgdorferi* [J]. J Bacteriol, 2010, 192(7): 1965-1974.
- [8] Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans [J]. Phil Trans R Soc B, 2009, 364(1530): 2749-2761.
- [9] Déchamps S, Maynadier M, Wein S, et al. Rodent and nonrodent *Malaria parasites* differ in their phospholipid metabolic pathways [J]. J Lipid Res, 2010, 51(1): 81-96.
- [10] Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, et al. MuLtiplex Real-time PCR for detection of anaplasma phagocytophilum and *Borrelia burgdorferi* [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7): 3164-3166.
- [11] Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, et al. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and Real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of *Ocular toxoplasmosis* [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6): 1965-1967.
- [12] Lee MA, Tan CH, Aw LT, et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of *Malaria parasites* [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4343-4345.

收稿日期: 2011-04-26