

A 型肉毒梭菌 *atx* 基因 TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测*

王春晖, 赵素慧, 韦耀, 周莹, 万成松

摘要:目的 采用 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法对 A 型肉毒梭菌 *atx* 基因进行检测。方法 以 *atx* 基因为靶基因, 设计引物和 TaqMan 探针, 优化反应条件, 制作定量标准曲线, 进行灵敏度、特异性和重复性验证, 建立 A 型肉毒梭菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法。结果 构建质粒 pUC57- Δatx , 标准曲线在 $10^3 \sim 10^7$ 拷贝数之间有较好的线性关系, 相关系数为 0.997, 灵敏度达到 22 个拷贝数, 比普通 PCR 提高约 100 倍; 能选择性检测 A 型肉毒梭菌, 与其他 5 种食源性病原菌无交叉反应, 结果与普通 PCR 一致; 重复性试验表明, 同一浓度的 15 个平行样品的变异系数为 1.0%。结论 A 型肉毒梭菌 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法具有灵敏度高、特异性强、重复性好等特点, 可以快速、准确、定量地检测 A 型肉毒梭菌。

关键词: 肉毒梭菌; TaqMan 探针; *atx* 基因; 荧光定量 PCR

中图分类号: R-331

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0863-03

Detection of *atx* gene in *Clostridium botulinum* using TaqMan probe FQ-PCR WANG Chun-hui, ZHAO Su-hui, WEI Yao et al. *Central Laboratory, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University (Guangzhou 510515, China)*

Abstract: Objective To detect the *atx* gene of *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) type A neurotoxin (bont/A) using TaqMan probe fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Methods** By targeting the gene *atx* of bont/A, designing primer and TaqMan probe, optimizing the reaction conditions, making quantitative standard curve, and verifying sensitivity, specificity and repeatability of the method, we established a TaqMan FQ-PCR method to detect bont/A. **Results** Plasmid pUC57- Δatx was constructed successfully. The standard curve established had good linearity when gene quantity was between $10^3 - 10^7$ copies and the coefficient of correlation was 0.997. The limit of detection for FQ-PCR was 22 copies. The sensitivity was about 100 times higher than that of ordinary PCR. The FQ-PCR method could selectively detect *C. botulinum* and there were no cross reactions with other five food-borne pathogen samples, consistent with the results of ordinary PCR. Repeatability tests showed that the coefficient of variation of 15 parallel samples in same concentration was only 1.0%. **Conclusion** A TaqMan probe FQ-PCR method with high sensitivity and specificity and good repeatability was established for rapid, accurate and quantitative detection of *C. botulinum* type A.

Key words: *Clostridium botulinum*; TaqMan probe; *atx* gene; fluorescence quantitative PCR

肉毒神经毒素 (botulinum neurotoxin, BoNT) 是由肉毒梭菌分泌的毒性最强的蛋白质, 引起人中毒的主要为 A 型, 可用于生物武器。近年来, 肉毒中毒在世界各地时有发生, 特别是“9·11”事件之后, 肉毒毒素成为各国生物反恐的重要内容。建立一种快速、灵敏、可靠的肉毒梭菌检测方法, 对于生物防护和食品安全具有重要意义^[1]。目前, 肉毒梭菌的常规检测方法主要包括毒素蛋白检测和 PCR 基因检测等^[2-3]。本研究以 A 型肉毒神经毒素基因 (botulinum neurotoxin type A *atx*) 为靶基因, 建立一种灵敏度高、特异性强、快速准确检测肉毒梭菌的 TaqMan 探针荧光定量 PCR 方法。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌株 伤寒沙门菌 (H901 50097) 由北京军事医学科学院惠赠; 变形杆菌 (49027) 由北京药检所惠赠; 金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)、肠出血型大肠埃希菌 O157:H7 2 株 (883、88236) 和 DH5 α 由本系保存; 肉毒梭菌阳性模板人工合成。

1.1.2 试剂 pUC57 (Amp⁺) 载体克隆系统 (美国 Promega 公司); 质粒小提试剂盒 (北京天根生化科技有限公司);

Premix Ex TaqTM (Perfect Real Time)、DNA marker、Taq Master 酶 (大连 TaKaRa 公司); Tirs-乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic, EDTA, 简称 TE) 溶液、Luria-Bertani 培养基 (LB) 等自行配制。

1.1.3 仪器 蛋白核酸检测仪 (美国 GE 公司); PCR 仪 (德国 Tgradient 公司); 凝胶成像分析系统 (英国 UVItec 公司); Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Stratagene 公司); 生物安全柜 (新加坡 ESCO 公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 *atx* 基因引物与探针的设计 根据 Sebahia 等^[4] 公布的 A 型肉毒梭菌神经毒素基因 *atx* 序列 (GenBank No: CBO0806), 利用 DNAMAN 软件进行同源性分析, Primer Express 3.0 软件设计 PCR 引物和 TaqMan 探针, 引物 *atx1* 序列为 5'-ATGGTTATGGCTCTACTCAATACATTAG-3', 引物 *atx2* 序列为 5'-CACCTAAAAGAGGATTTGTATCAACTTC-3', TaqMan 探针序列为 5'-TGACTCCTCAAAACCAAATG-TAAAATCTGGGCT-3', 探针 5' 端标记羧基荧光素 (carboxy fluorescein, FAM), 3' 端标记淬灭基团 (Black hole quencher, BHQ)。引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 *atx* 标准质粒的构建 A 型肉毒梭菌为严格管控菌种, 本文根据 GenBank 上的 *atx* 基因序列, 人工合成目的片段, 作为后续实验的模板。对模板进行 PCR 扩增, 连接到 pUC57 (Amp⁺) 载体, 制备重组质粒, 转化 DH5 α 感受态细胞, 增殖培养, 抽提回收, 测定重组质粒浓度和纯度, PCR 鉴定。

* 基金项目: 广东省社会发展领域科技计划项目 (2010B031000005); 广州市科技亚运专项 (2010U1-E00591)

作者单位: 南方医科大学公共卫生与热带医学学院中心实验室, 广东广州 510515

作者简介: 王春晖 (1985-), 男, 湖南衡阳人, 硕士在读, 研究方向: 病原微生物检测技术研究。

通讯作者: 万成松, E-mail: gzwcs@fimmu.com

1.2.3 标准曲线制作 利用构建的 pUC57 重组质粒作为肉毒梭菌定量标准品,根据测定的质粒浓度对标准品进行 10 倍梯度稀释。优化的反应体系为 Taq 酶 10.0 μL 、上下游引物和探针各 0.5 μL 、ROX reference dye II 0.5 μL 、DNA 模板 1.0 μL 、去离子水 7.0 μL 共 20.0 μL 。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,以 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,扩增 40 个循环,反应时间约 1 h。利用优化的反应条件检测各梯度标准品的 Ct 值,建立质粒拷贝数与其对应关系的定量标准曲线。

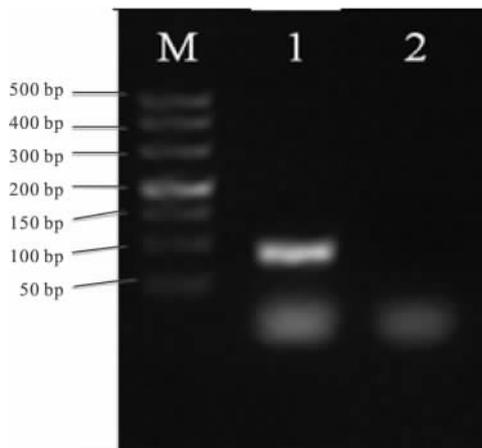
1.2.4 荧光定量 PCR 的灵敏度检验 将已知拷贝数的重组质粒用 TE 溶液进行 10 倍梯度极限稀释,对各稀释浓度的模板同时进行普通 PCR 和荧光定量 PCR 检测,比较 2 种方法对靶基因片段的最低检出限。

1.2.5 荧光定量 PCR 的特异性检验 采用菌落 PCR 方法⁽⁵⁾,以人工模拟的细菌混合液为食品污染样品,验证该法检测 *atx* 基因的特异性。实验以含重组质粒的样品作为阳性品,以 5 株食源性细菌作为阴性对照菌株,以上述细菌的混合液作为污染的模拟样品,以去离子水作为无模板空白对照 (no template control, NTC)。反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,以 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,扩增 35 个循环,反应时间约 90 min。

1.2.6 荧光定量 PCR 的重复性 以拷贝数为 2.2×10^5 的重组质粒作为检测模板,利用同一实验条件检测分装的 15 份平行样品的 Ct 值变异系数(标准差/重复样品的算术均数)来初步评估该方法的重复性。

2 结果

2.1 标准品的制备与鉴定(图 1) 实验测得抽提的重组质粒浓度为 66.54 ng/ μL ,OD260/280 为 1.868,说明该重组质粒的纯度较高。根据阿伏伽德罗常数计算重组质粒的拷贝数为 2.2×10^{10} copies/ μL 。取稀释的重组质粒作为模板,进行 PCR 扩增,3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。在 100 bp 处可见一明亮条带,扩增产物大小为 96 bp。



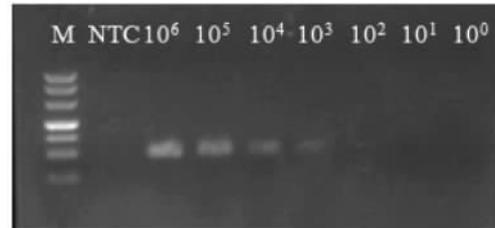
注: M: DL500 DNA marker; 1: 扩增的目的片段(96bp); 2: 无模板空白对照。

图 1 肉毒神经毒素 *atx* 基因扩增片段鉴定

2.2 荧光定量 PCR 标准曲线 利用优化好的反应体系对 5 个 10 倍梯度稀释的定量标准品进行检测,标准曲线在 $2.2 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^7$ 拷贝数之间有较好的线性关系,相关系数为 0.997,扩增效率为 101.1%,得到标准品拷贝数与 Ct 值的线性方程为: $\text{Ct} = -3.296 \times \text{LOG}(\text{copies}) + 42.69$ 。对样品进行检测时,根据其 Ct 值和线性方程就可获得该样品 DNA 拷

贝数。

2.3 荧光定量 PCR 灵敏度检测(图 2) 将已知拷贝数的重组质粒进行 10 倍梯度极限稀释,对 $2.2 \times 10^6 \sim 2.2 \times 10^0$ 拷贝数样品进行荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测。实验结果可知,荧光定量 PCR 最低可检测到 2.2×10^1 个拷贝数;而普通 PCR 检测中,当质粒浓度为 10^3 拷贝数时,可见一微弱条带,表明普通 PCR 的最低检出限约为 2.2×10^3 个拷贝数。



注: M: DL500DNA marker; NTC: 无模板空白对照; $10^6 \sim 10^0$: 各样品质粒浓度拷贝数。

图 2 肉毒梭菌 PCR 极限浓度检测

2.4 荧光定量 PCR 特异性检测(表 1) 利用本实验建立的肉毒梭菌荧光定量 PCR 检测方法对肉毒梭菌标准品和 5 株食源性细菌进行检测,只有含 *atx* 基因扩增片段的 4 个样品出现典型的扩增曲线,为阳性结果;而其他食源性细菌和空白对照均为一直线,Ct 值无法读取,判为阴性。结果与普通 PCR 检测完全一致。

表 1 肉毒梭菌特异性检测结果

样品	Ct 值(dRn)	普通 PCR
重组质粒	25.73	+
DH5a 工程菌	11.98	+
重组质粒混合菌 ^a	23.80	+
DH5a 混合菌 ^b	12.02	+
金黄色葡萄球菌	No Ct	-
伤寒沙门菌(H901)	No Ct	-
EHEC O157: H7 883	No Ct	-
EHEC O157: H7 88236	No Ct	-
变形杆菌	No Ct	-
空白对照	No Ct	-

注: a 重组质粒与食源性细菌的混合模拟样品; b 含质粒的 DH5a 与食源性细菌的混合模拟样品。

2.5 荧光定量 PCR 重复性检测 为评估该检测方法的重复性,本研究对同一浓度模板的 15 个样品进行检测,并统计获得的 Ct 值。结果显示,15 个样品的 Ct 值读数范围为 25.51 ~ 26.65,标准差为 0.27,变异系数为 1.0%。表明本实验建立的肉毒梭菌荧光定量 PCR 检测方法重复性较好,可对 A 型肉毒梭菌样品进行稳定、可靠的检测。

3 讨论

肉毒梭菌具有极强的神经毒性,被列为重要的生物战剂,一般很难得到该菌样品。随着基因工程技术的发展,免疫 PCR⁽³⁾、分子信标 PCR⁽⁶⁾、荧光定量 PCR⁽⁷⁾ 等分子克隆技术在病原微生物领域广泛应用,使得人工合成基因序列检测重要管控病原微生物成为可能。本文通过合成肉毒梭菌毒素基因序列,作为检测的模拟阳性样品,建立荧光定量 PCR 快速检测方法,用于高度危险、不易获得的病原微生物检测。

研究结果显示,荧光定量 PCR 检测灵敏度达到 22 个 DNA 拷贝数,与 Fach 等⁽⁸⁾的实验结果基本一致,比普通 PCR 提高了 100 倍,可用于微量污染样品的检测。实验检测含肉毒毒素基因样品均呈阳性,其他菌株均为阴性,表明本方法对肉毒梭菌有较高的检测特异性,而且可重复性好,能保证对样品进行稳定、可靠的检测。同时该技术自动化程度高,封闭环境,无后处理,保障了实验人员的安全,适合于临床大规模快速检测。结合菌落 PCR 技术简化了细菌基因组提取的繁琐步骤,比传统检测方法大大缩短了检出时间。

与传统的肉毒梭菌检测方法相比,本研究建立的荧光定量 PCR 检测方法具有灵敏度高、特异性强、操作简单、省时省力等特点,为肉毒梭菌检测和流行病学调查提供了有力工具,适用于肉毒中毒高发区进出口物品检验检疫、食品安全检测、致病菌临床诊断及生物安全防护等领域,应用前景广阔。

参考文献

(1) 杨慧盈,王慧,荫俊,等. A 型肉毒神经毒素基因的 PCR 检测[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(1): 37-39.

(2) 张雪平. 肉毒毒素生物学活性及肉毒中毒病原检测方法的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(7): 728-733.
 (3) Chao HY, Wang YC, Tang SS, et al. A highly sensitive immune-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A [J]. *Toxicon* 2004, 43(1): 27-34.
 (4) Sebahia M, Peck MW, Minton NP, et al. Genome sequence of a proteolytic (group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes [J]. *Genome Res*, 2007, 17(7): 1082-1092.
 (5) 徐丽,蔡俊鹏. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2004, 32(5): 51-55.
 (6) 万成松,谭翰清,温文川. 副溶血性弧菌 tdh 基因的分子信标 PCR 技术检测[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(12): 1475-1477.
 (7) 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等. toxR 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌[J]. 生物工程学报, 2008(10): 1837-1842.
 (8) Fach P, Mischeau P, Mazuet C, et al. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum* [J]. *J Appl Microbiol* 2009, 107(2): 465-473.

收稿日期: 2011-10-10

(宋艳萍编辑 郑新校对)

【基层公共卫生】

手术麻醉前患者焦虑状态调查

白金鹏

关键词: 心理因素; 术前问卷; 焦虑

中图分类号: R 395.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)06-0865-01

患者在手术前对麻醉和手术感到紧张和恐惧,对自身所患疾病的预后感到焦虑或忧伤,甚至悲观、绝望,这种情绪上的波动必然引起患者机体内环境的紊乱,影响患者对麻醉和手术的耐受力⁽¹⁾。本研究于 2010 年对辽宁省沈阳市苏家屯区中心医院麻醉科 204 例手术前患者进行焦虑状态及原因调查,现将结果报告如下。

对象与方法 (1) 对象: 对 2010 年 1 月—2011 年 1 月 204 例择期手术患者进行术前心理调查。(2) 方法: 依据汉密尔顿焦虑评分(HARS)制定问卷。调查员在手术前与患者交谈观察面谈,完成问卷,回收率和有效率均为 100%。问卷最后设立一个开放性问题,让患者陈述其焦虑原因。(3) 统计分析: 采用 EXCEL 2003 软件录入数据,应用 SPSS 15.0 软件进行方差分析和 t 检验。

结果 (1) HARS 评分情况依据患者答案进行 HAMD 评分,并行焦虑程度比较。总分 >29 分为严重焦虑的患者 90 例,占 45%; >21 分为明显焦虑的患者 62 例,占 30.4%; >14 分为焦虑的患者 34 例,占 16.7%; >7 分为可能有焦虑的患者 18 例,占 8.8%; ≤7 分为无焦虑。(2) 患者术前心理因素(表 1): 情绪上波动必然引起患者机体内环境和紊乱,严重影响患者对麻醉手术的耐受力。

表 1 204 例患者术前紧张原因构成

术前紧张原因	例数	构成比%
对手术方式、麻醉不了解,害怕意外	54	26.5
表现无助,可怜,甚至消极绝望心理反应	24	11.8
对手术没有信心,担心预后及病情演变	36	17.6
担心经济负担	28	13.7
害怕疼痛,担心术中及术后疼痛无法忍受	62	30.4
合计	204	100.0

讨论 随着医学的发展和医学模式的改变,各种心理因素对人的健康和疾病的影响逐渐受到人们的关注,消极的自我认知评价结果在焦虑情绪的产生过程中起重要中介作用⁽³⁾,而心理因素对手术安全性的影响越来越受到重视。麻醉前访视,通过加强沟通技巧,让患者知情却不增加精神上的负担,避免造成不利影响。对患者进行心理疏导,使患者情绪稳定,主动配合,可明显提高手术患者围术期的安全性。因此,应以关心和鼓励的方法消除其思想顾虑和焦虑心情。耐心听取和解答患者提出的问题,以取得患者的理解、信任和合作。

参考文献

(1) 徐启明. 临床麻醉学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 26-33.
 (2) 刘俊杰,赵俊. 现代麻醉学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 448-457.
 (3) 李敬阳,刘洋,万洪泉,等. 大学社交焦虑情绪影响因素分析[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(9): 1073-1075.

作者单位: 沈阳市苏家屯区中心医院麻醉科, 辽宁 110101
 作者简介: 白金鹏(1972-),男,满族,辽宁沈阳人,副主任医师,本科,研究方向: 临床麻醉。

收稿日期: 2012-01-10

(刘铁编辑 郑新校对)