

荧光定量PCR 检测查菲埃立克体^{*}

张晶波^{1,2} 温博海^{1**} 陈梅玲¹ 杨晓¹ 李丽莉¹

(1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071;

2. 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京)

摘要 依据查菲埃立克体 16S rRNA 基因序列设计特异性引物和 TaqMan-MGB 探针, 以克隆的查菲埃立克体 16S rRNA 基因片段作 DNA 模板, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法。与套式 PCR 相比较, 荧光定量 PCR 检测的灵敏度是其 30 倍; 用荧光定量 PCR 检测其他相关立克次体和细菌 DNA 样本, 检出结果为 0; 对荧光定量 PCR 检测重复性进行分析, 变异系数 (CV) 批内和批间误差在 0.2%~2.0% 之间。结果证明本研究建立的荧光定量 PCR 方法具有种特异性和良好的重复性, 可用于检测感染样本中的微量查菲埃立克体 DNA。

关键词 查菲埃立克体; 实时荧光定量 PCR; 16S rRNA 基因; 埃立克体感染

埃立克体 (*Ehrlichiae*) 是一类专性细胞内寄生的革兰阴性菌, 主要寄生于白细胞、血小板, 它们引起的感染通称埃立克体病 (*Ehrlichiosis*) (Rikhsa, 1991)。埃立克体有 10 多个种, 基于 16S rRNA 等基因的序列分析, 将埃立克体分为 3 个属, 即埃立克体属 (*Ehrlichia*)、无形体属 (*Anaplasma*) 和新立克次体属 (*Neorickettsia*)。在埃立克体属中, 对人致病的重要病原体主要是查菲埃立克体 (*E. chaffeensis*)。查菲埃立克体是 1980 年代末在美国首次发现的蜱传人埃立克体, 其主要感染人单核细胞, 故它所引起的人感染称为人单核细胞埃立克体病 (*Human monocytic ehrlichiosis*, HME) (Anderson *et al.*, 1991)。近年来, 国内学者已用 PCR 和基因序列分析方法在我国内蒙、云南、福建等地采集的蜱和野鼠样本中检测到查菲埃立克体 (高东旗等, 2000a; 2000b), 和其他埃立克体 (Wen *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2003) 提示我国有查菲埃立克体等埃立克体病原体的存在。人埃立克体病无特异的临床表现, 主要表现为发热、头痛、肌痛等类似流感的症状, 严重感染可引起机体多种脏器的损伤, 如无及时治疗, 患者可因心、肾功能衰竭而死亡 (俞树荣和陈香蕊, 1999)。对埃立克体感染的有效治疗有赖于埃立克体病的早期确诊。

目前, 查菲埃立克体感染的临床确诊主要依

靠血清学诊断, 但是由于特异性抗体出现较晚, 血清学检测无法对早期的埃立克体感染进行确诊。从病人血标本中分离查菲埃立克体是确诊感染的最可靠的方法, 可采用犬巨嗜细胞 (DH82) 对该病原体进行分离 (Dawson *et al.*, 1991)。但是细胞培养分离查菲埃立克体不仅复杂和耗时, 而且成功率不高。PCR 法是检测病原体的一种敏感方法, 许多检测查菲埃立克体的 PCR 方法已经建立。但是, 由于感染早期的血样本中查菲埃立克体量很少, 普通 PCR 法显得不敏感, 加上 PCR 法的其他缺陷, 使得查菲埃立克体的 PCR 检测难以在临床上推广使用。实时荧光定量 PCR 是一种快速检测病原体的高特异和高敏感技术, 我们基于查菲埃立克体的 16S rRNA 基因的特异序列, 采用最新的 TaqMan-MGB 探针 (Kutyavin *et al.*, 2000) 技术建立了检测查菲埃立克体的实时定量 PCR 方法。

1 材料与方法

1.1 菌株或 DNA

查菲埃立克体由美国德克萨斯大学医学中心于学杰博士惠赠, 本室保存。贝氏柯克斯体 (新桥株)、普氏立克次体 (E 株)、立氏立克次体 (R 株)、恙虫病东方体 (Gilliam 株) 和汉赛巴通

收稿日期: 2006-08-07

* 基金项目: 国家科技攻关项目 (2003BA712A 04-07)

** 通讯作者, E-mail: bohawen@sohu.com

体 (Houston-1) DNA 为本室保存, 五日热巴通体 DNA 为美国加州大学惠赠。出血性大肠杆菌 (O157H7 EDL 933)、福氏志贺菌 (301)、金黄色葡萄球菌 (26066)、肺炎链球菌 (31004)、嗜肺军团菌 (12 型)、炭疽杆菌 (A16R)、鼠疫杆菌 (EV76)、猪型布氏杆菌 (104M)、伯氏疏螺旋体 (太一株) 和鸚鵡热衣原体 (AR39) 等细菌 DNA 来自本所或中国 CDC 传染病预防控制所。

1.2 主要试剂

DNA 回收试剂盒购自上海生工公司; T 载体试剂盒购自 Promega 公司; 质粒提取试剂盒、血 DNA 提取试剂盒购自德国 Qagen 公司; 荧光定量 PCR 检测专用 96 孔板和盖膜以及 TaqMan Universal PCR Master Mix 由美国 ABI 公司生产。TaqMan MGB-探针由上海基康公司合成, 引物由上海生工公司合成。

1.3 仪器

PE 2400 DNA 热循环仪 (美国 PE 公司), Beckman Du 640 核酸定量仪, ABI 7900HT 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。基因测序均由上海华诺公司完成。

1.4 半套式 PCR

引物 HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTT-CCCTAT-3') 和 PER2 (5'-CTCTACACTAGGAAT-TCCGCTAT-3') 来自文献 (Aderson *et al.*, 1992), U1 (5'-CTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') 为新设计的引物, 引物由上海生工公司合成。HE3 和 PER2 反应扩增条件同文献 (Aderson *et al.*, 1992)。半套式 PCR 使用引物 U1 和 HE3, 模板为 HE3 和 PER2 扩增产物, 扩增条件为退火温度 58℃, 其他同 HE3 和 PER2 的扩增。两对引物的扩增产物大小分别为 635 bp 和 438 bp。

1.5 定量 PCR 引物和探针

根据 16S rRNA gene 序列的比较, 选择高变区基因序列, 使用 ABI Primer Express 2.0 software 设计荧光定量 PCR 引物 FP-23 (5'-AGCCTAACA-CATGCAAGTCGAA-3') 和 RP-97 (5'-CCCGTC-TGCCACTAACAATTATT-3'), 以及 TaqMan MGB probe-49 (5'-CAATTGCITATAACCTTTTGTG-3')。引物由上海生工公司合成, TaqMan MGB-探针由上海基康公司合成。该引物扩增的目的片段为 75 pb (5'-AGCCTAACAACATGCAAGTCGAACGGAC-AATTGCTTATAACCTTTTGGTTATAAATAATTGTTA-GTGGCAGACGGG-3')。

1.6 标准 DNA 模板制备

用试剂盒将半套式 PCR 扩增产物从琼脂糖电泳凝胶中纯化, 然后将纯化的扩增产物连接到 T 载体上, 用试剂盒提取该重组质粒作为标准 DNA, 作为定量 PCR 绝对定量的标准。

1.7 荧光定量 PCR 反应体系

采用 25 μ L 反应体积, 每个反应中含 12.5 μ L 通用 PCR 反应混合物 (TaqMan Universal PCR Master Mix), 5 μ L 引物和探针混合物 (100 μ L 混合物中含引物 FP 和 RP 各 3 μ L (50 μ mol/L), 探针 2 μ L (50 μ mol/L), 去离子水 92 μ L), 5.5 μ L 去离子水, 2 μ L DNA 模板。反应条件为 50℃ 2 min 和 95℃ 10 min, 然后以 95℃ 15s 和 60℃ 1 min 循环 45 次。

1.8 模拟血标本的制备

将查非埃立克体基因组 DNA 进行倍比稀释为 6 个浓度 (10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 拷贝/100 μ L), 将 200 μ L 不同浓度的 DNA 与等量的正常 BALB/c 小鼠抗凝血混匀后, 用血 DNA 提取试剂盒提取模拟感染血样本中的 DNA。

2 结果

2.1 敏感性分析

用实时荧光定量 PCR 的引物与探针, 以查非埃立克体 16S rRNA 基因片段作标准模板在荧光定量 PCR 仪上作实时检测并绘出标准曲线 (图 1)。检测结果表明, 标准品 DNA 的拷贝数与循环阈值 (C_t) 的相关值 (R^2) 为 0.996 (图 1), 该定量 PCR 法检测的查非埃立克体目的基因片段的最小检出量小于 10 个拷贝, 而套式 PCR 最低检测到 10^{-6} 稀释度为 3.1×10^2 个拷贝 (图 2)。荧光定量 PCR 方法的敏感度约为该套式 PCR 的 30 倍。

2.2 特异性分析

用该荧光定量 PCR 分别检测其他立克次体和其他细菌 DNA, 除普氏立克次体出现微弱信号外, 其他检测结果均未见荧光信号。

2.3 重复性分析

将同一批次和不同批次的稀释的标准 DNA 样品检测后, 根据 C_t 值的变异系数 (CV) 对重复性进行了评价 (图 3, 4), 共作 4 批, 批内每个浓度作 2 孔。批内 CV 为 0.2%~2.0%, 批间 CV 为 0.6%~1.7%。

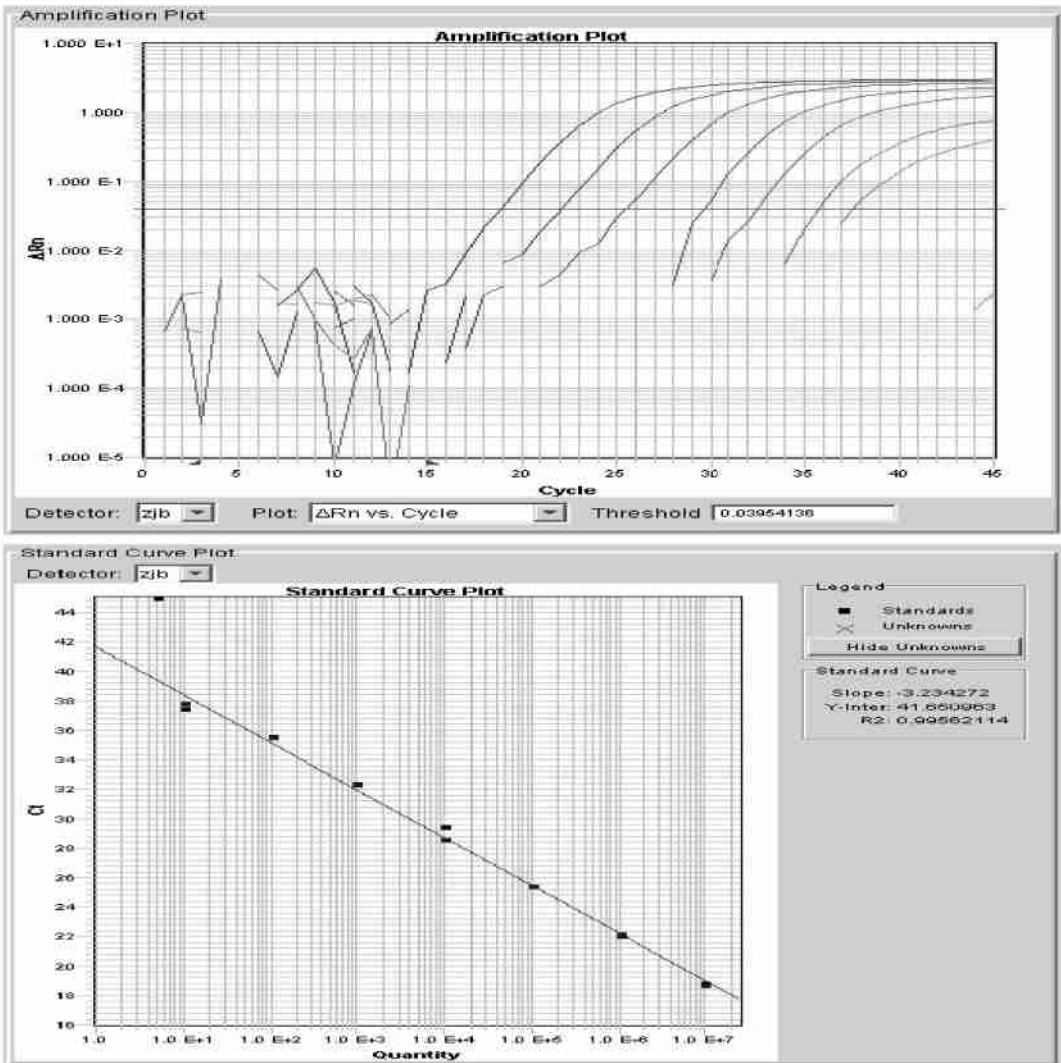


图 1 查菲埃立克体荧光定量PCR 的扩增曲线和标准曲线

Fig. 1 Establishment of the quantitative standard curve for detection of *E. chaffeensis*

A: 荧光定量PCR 扩增标准DNA 样品 (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 拷贝) 曲线图;

B: 荧光定量PCR 扩增标准DNA 样品的定量标准曲线图。

A: Amplification plots of *E. chaffeensis* standards by real time PCR. The copy number of standard DNA are

10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10(from left to right) ;

B: Standard curve generated from the C_t values of the amplification plots with ABI Sequence Detection software .

2.4 模拟感染血标本的检测

模拟血标本中查菲埃立克体基因组DNA 最初掺入总量分别为 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 拷贝, 与等量的正常 BALB/c 小鼠抗凝血混匀后, 用血 DNA 提取试剂盒提取模拟感染血样本中 DNA, 用所建立的荧光定量PCR 检测提取后的 DNA 样本, DNA 总量检测结果分别为 0, 4.6×10^2 , 1.1×10^3 , 1.4×10^4 , 1.4×10^5 , 1.2×10^6 拷贝, 结果表明掺入的 DNA 在提取过程中损失了一部分, 提取后定量检测结果还是保持原始样本的浓度梯度。

3 讨论

本研究根据查菲埃立克体的 18S rRNA 基因的特异序列, 设计了种特异性的引物和 TaqMan MGB 探针, 用克隆的 18S rRNA 基因的 DNA 片段作为标准 DNA 模板建立标准曲线, 建立了查菲埃立克体的实时荧光定量PCR 方法。结果显示循环阈值 (C_t) 与标准DNA 拷贝数呈线性相关。用实时荧光定量PCR 检测相同基因组DNA 模板, 检测敏感度约为半套式 PCR 的 30 倍。用建

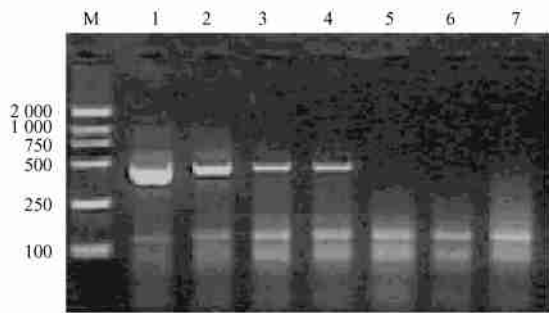


图2 巢式PCR 方法检测查非埃立克体DNA 的敏感性

Fig. 2 Detection of *E. chaffeensis* DNA by nested PCR

M: DL 2000 DNA 分子量标准; 1~6: 标准DNA 稀释 10^{-3} ~ 10^{-8} ; 7: 阴性对照

M: DL 2000 DNA marker; 1~6: Dilutions of standard DNA are 10^{-3} ~ 10^{-8} ; 7: Negative control.

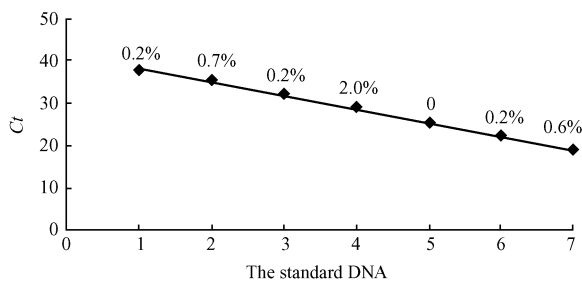


图3 查非埃立克体荧光定量PCR 方法的批间重复性 (横坐标为标准模板的拷贝数 10^1 to 10^7)

Fig. 3 Intra assay reproducibility of real time PCR of detecting *E. chaffeensis*. The number of the standard DNA copies is indicated on x axis; from 10^1 to 10^7 (from left to right).

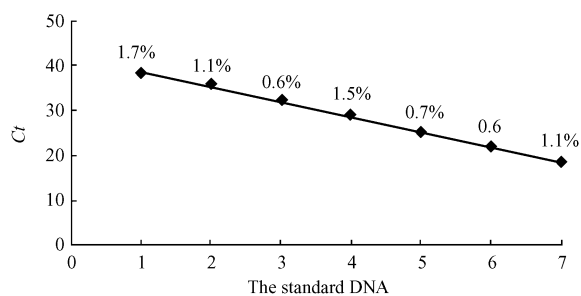


图4 查非埃立克体荧光定量PCR 方法的批间重复性 (横坐标为标准模板的拷贝数 10^1 to 10^7)

Fig. 4 Inter assay reproducibility of real time PCR of detecting *E. chaffeensis*. The number of the standard DNA copies is indicated on x axis; 10^1 to 10^7 (from left to right).

立的荧光定量PCR 检测其他立克次体和细菌DNA, 检出结果除普氏立克次体出现微弱信号外其余均为0, 显示该荧光定量PCR 的高度特异

性。用该荧光定量PCR 检测标准样品, 其批内和批间的变异系数小于2%, 说明该荧光定量PCR 具有良好的重复性。

本研究将查非埃立克体DNA 掺入到正常小鼠血中制备了模拟感染血标本, 用检测查非埃立克体的定量PCR 检测试剂盒提取的模拟感染样本的DNA, 检测结果显示除目的DNA 量在提取过程中有所损失外, 检出的目的DNA 拷贝数依然保持原始目的DNA 的浓度梯度, 进一步证明该荧光定量PCR 的高度特异性和将其用于临床实验室诊断查非埃立克体感染的可行性。

综合分析本研究的结果, 说明本研究所建立的检测查非埃立克体的定量PCR 具有高度特异性和高度敏感性, 可以用于临床实验室对感染患者的血标本的检测, 特别适合检出血标本中微量查非埃立克体, 以便对疑为人单核细胞埃立克体病的病例进行确诊。同时, 这种定量PCR 也可以用于对野外采集的蜱和动物样本的检测, 以发现人单核细胞埃立克体病的自然疫源地。

参考文献

- 俞树荣, 陈香蕊. 1999. 立克次体与立克次体病. 北京: 军事医学科学出版社, 142~152.
- 高东旗, 曹务春, 张习坦, 等. 2000a. 用半套氏PCR 检测蜱和啮齿动物中查非埃立克体. 中国人畜共患病杂志, 16: 8~11.
- 高东旗, 曹务春, 张习坦, 等. 2000b. 用半套氏PCR 检测我国北方一些蜱种中的查非埃立克体. 中国人畜共患病杂志, 11: 220~222.
- Anderson, B. E., J. E. Dawson, D. C. Jones *et al.* 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2 838~2 842.
- Anderson, B. E., J. W. Sumner, J. E. Dawson *et al.* 1992. Detection of the etiologic agent of human Ehrlichiosis by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 775~780.
- Dawson, J. E., B. E. Anderson, D. B. Fishbein *et al.* 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 2 741~2 745.
- Kutyavin, I. V., I. A. Afonina, A. Mills *et al.* 2000. 3-minor groove binding DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. *Nucleic Acids Res.*, 28: 655~661.
- Rikihisa, Y. 1991. The tribe *Ehrlichia* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 286~308.
- Wen, B., J. Rui, Y. Zhang *et al.* 2002. Simultaneous detection of *Anaplasma marginale* and a new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia chaffeensis* by sequence analyses of 16S ribosomal DNA in *Boophilus microplus* ticks from Tibet. *J. Clin. Microbiol.*, 40:

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY SPECIFIC FOR *EHRILICHAE CHAFFEENSIS*

ZHANG Jing-Bo WEN Bo-Hai CHEN Mi-Ling YANG Xiao LI Li-Li

(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Bioresecurity, Beijing 100071)

Abstract According to the 16S rRNA gene sequences specific for *Ehrlichiae chaffeensis*, a pair of primers and one TaqMan-MGB probe were designed. The real time quantitative polymerase chain reaction was developed with the primers, probe, and the template (16S rRNA gene DNA fragment of *E. chaffeensis*). The sensitivity of this real time quantitative PCR was about 30 times higher than that of the nested PCR used to detect homologous DNA. By this quantitative real time PCR, the DNA sample of *E. chaffeensis* was positively detected but not other rickettsial or bacterial DNA samples and the variation coefficients of intra- and inter assay reproducibility were 0.2%~2.0%. The results show that the method is useful for detection of tiny DNA of *E. chaffeensis* in various samples.

Key words *Ehrlichiae chaffeensis*; Quantitative real time PCR; 16S rRNA; Ehrlichiosis